



Bitki Biyoteknolojisi

-II-

Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları
(Toplam 16 Bölüm, 106'sı renkli 126 şekil)

2. Baskı

Editörler

Sebahattin Özcan . Ekrem Gürel . Mehmet Babaoğlu

2004

Bu eserin tamamı yada bir kısmı Editörlerin ve S. Ü. Yaşatma ve Geliştirme Vakfı'nın izni olmaksızın herhangi bir şekilde basılıp çoğaltılamaz, yayınlanamaz. Bu konuda yürürlükteki kanun hükümleri geçerlidir.

Ofset Hazırlık/Baskı
S. Ü. Basımevi Tel&Fax: 0332 2411844

Bitki Biyoteknolojisi *(Plant Biotechnology)*

Takım No: 975-6652-03-9

Cilt 2
Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları
(Vol. 2. Genetic Engineering and its Applications)
Editors: S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu
ISBN: 975-6652-05-5
Birinci Baskı Eylül, 2001

Cilt 1
Doku Kültürü ve Uygulamaları
(Vol. I, 11 Chapters, Tissue Culture and its Applications)
Editors: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan
S. Ü. Vakfı Yayınları, Birinci Baskı: Ocak 2001, İkinci Baskı: 2002
ISBN: 975-6652-04-7

S. Ü. Vakfı Yayınları
Hilton Oteli Girişi Sarpet Petrol Tesisleri Yanı
Vakıf Merkez Binası Selçuklu-KONYA
Tel: 0 332 241 44 40 – Fax: 0 332 341 32 20
E-posta: suvakfi@selcuk.edu.tr
(İsteme adresi)

2 Şubat 2004 Konya, Zümrüt Sitesi mağdurlarına...

İçindekiler	i-x
Önsözler	xi-xvii

Bölüm 12. DNA'nın Moleküler Yapısı ve Kromozomlar. 1-45

Muhsin Konuk, Mehmet Babaoğlu

- 12.1. Giriş
- 12.2. Nükleik Asitler
- 12.2.1. Nükleik asitlerin miktarları
- 12.2.2. Nükleik asitlerin moleküler yapıları
- 12.2.2.1. DNA'nın kimyasal yapısı
- 12.2.2.1.1. Pürinler
- 12.2.2.1.2. Pirimidinler
- 12.2.2.2. DNA'nın fiziksel yapısı
- 12.3. DNA Sentezi ve Replikasyonu
- 12.3.1. DNA'nın replikasyonu
- 12.3.1.1. DNA replikasyonunun başlaması ve yönü
- 12.3.1.2. Replikasyon enzimleri
- 12.3.1.2.1. DNA polimerazlar ve DNA ligaz
- 12.3.1.2.2. Diğer replikasyon enzimleri
- 12.3.1.3. Replikasyonun ilerlemesi ve tamamlanması
- 12.4. DNA'yı İncelememizi Kolaylaştıran Enzimler
- 12.5. DNA'nın Tamir Mekanizması
- 12.6. Genetik Şifre (Kod) ve Evrenselliği
- 12.7. DNA Uzunlukları ve Bilgi Kapasiteleri
- 12.8. Bitki Hücrelerinde DNA'nın Bulunduğu Yerler
- 12.8.1. Çekirdek DNA'sı (kromozomal DNA)
- 12.8.2. Organel genomları (sitoplazmik genomlar)
- 12.8.2.1. Kloroplast DNA'sı (*ctDNA*)
- 12.8.2.2. Mitokondri DNA'sı (*mtDNA*)
- 12.9. DNA Kromozom İlişkisi (DNA'dan Kromozoma)
- 12.9.1. GISH (genomik *in situ* hibridizasyonu)
- 12.9.2. FISH (floresan *in situ* hibridizasyonu)
- 12.10. DNA'nın Ölçülmesinde Kullanılan Bazı Birimler
- 12.11. Sonuç
- Teşekkür
- Kaynaklar

Bölüm 13. Genlerin Moleküler Yapıları ve Protein Biyosentezi . . 46-79

Ahmet Yıldırım

- 13.1. Giriş
- 13.2. Genlerin Moleküler Yapıları
- 13.3. Genlerin Çalışma Sistemleri
- 13.4. Bir Gen–Bir Enzim Hipotezi
- 13.5. Gen–Protein İlişkileri
- 13.5.1. Proteinlerin yapısı
- 13.5.2. Protein dizisinin belirlenmesi

- 13.6. Protein Biyosentezi
 - 13.6.1. Protein biyosentezinin kuralları
 - 13.6.2. Transkripsiyon (Yazılım)
 - 13.6.2.1. Başlangıç safhası
 - 13.6.2.2. Uzama safhası
 - 13.6.2.3. Sona eriş safhası
 - 13.6.3. Translasyon (Çevrilim)
 - 13.6.3.1. Transfer RNA (tRNA)
 - 13.6.3.2. Genetik kod
 - 13.6.3.2.1. Kodonların çıkışma durumu
 - 13.6.3.2.2. Kodda boşluk bulunmaması
 - 13.6.3.2.3. Kodun üçlü yazılıma sahip olması
 - 13.6.3.3. Kodun çözülmesi
 - 13.6.3.4. Kodon ve antikodon arasındaki anormal baz eşleşmesi (Yalpalama hipotezi)
 - 13.6.3.5. Ribozomlar
 - 13.6.3.6. Protein biyosentezinin genel aşamaları
 - 13.6.3.6.1. Başlangıç safhası
 - 13.6.3.6.2. Uzama safhası
 - 13.6.3.6.3. Sona eriş safhası
 - 13.6.3.6.4. Protein biyosentezinin genel özeti
- 13.7. Ökaryotlarda Protein Biyosentezinde Görülen Farklılıklar
- Kaynaklar

Bölüm 14. Gen İzolasyonu ve Klonlanması 80-111

Ahmet Yıldırım, Nejdet Kandemir

- 14.1. Giriş
- 14.2. Gen Klonlama Stratejileri
 - 14.2.1. Gen fonksiyonu veya ifadesinden hareketle gen klonlama
 - 14.2.1.1. Protein saflaştırma
 - 14.2.1.2. Mutant düzeltilmesi
 - 14.2.1.3. Antisens RNA kullanımı
 - 14.2.1.4. Subtraktif melezleme
 - 14.2.1.5. Diferansiyel tarama ve diferansiyel gösterim
 - 14.2.2. Dizi bilgisi, mRNA veya önceden klonlanmış genlerden hareketle gen klonlama
 - 14.2.2.1. Genomların komple dizi analizi
 - 14.2.2.2. Rasgele cDNA analizi
 - 14.2.2.3. Önceden klonlanmış genlerin kullanımı
 - 14.2.2.3.1. Heterolog RFLP problemleri
 - 14.2.2.3.2. PCR metodu
 - 14.2.3. Entegre olabilen DNA etiketlemesiyle gen klonlanması
 - 14.2.3.1. Transpozon etiketlemesi
 - 14.2.3.2. T-DNA etiketlemesi
 - 14.2.4. Haritalara dayalı gen klonlanması
 - 14.2.4.1. Genin kabaca haritalanması ve geni çevreleyen markörler arasındaki uzaklığın baz sayısı olarak belirlenmesi
 - 14.2.4.2. Harita üzerindeki işaretlerden klonlanacak olan gene doğru ilerleme
 - 14.2.4.3. Genetik harita ve BIBAC vektör sistemlerinin kombinasyonu
 - 14.2.4.4. Genomik DNA dizisinde bir gen bulunduğunun ispatlanması
- 14.3. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 15. *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı 112-159

Sebahattin Özcan, Serkan Uranbey, Cengiz Sancak, İskender
Parmaksız, Ekrem Gürel, Mehmet Babaoğlu

- 15.1. Giriş
- 15.2. Tümör ve Saçak Kök Oluşumu
- 15.3. T-DNA Aktarımında Gerekli Olan Ögeler
 - 15.3.1. T-DNA bölgesi
 - 15.3.2. Virülens (*vir*) bölgesi
 - 15.3.3. Kromozomal genler
- 15.4. T-DNA Aktarımının Moleküler Mekanizması
- 15.4.1. *Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturmaları
- 15.4.2. Virülens genlerinin uyarılması
- 15.4.3. T-DNA transferi
- 15.4.4. T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu
- 15.5. Ti Plazmidlerinin Bitkilere Gen Aktarımında Kullanılması
 - 15.5.1. Ko-entegratif (*cis*) vektörler
 - 15.5.2. İkili (binari/*trans*) vektörler
 - 15.5.3. Bitkilere gen aktarımı
 - 15.5.3.1. *Agrobacterium*'un büyütülmesi ve muhafazası
 - 15.5.3.2. *A. tumefaciens* aracılığıyla tütüne gen aktarımı
 - 15.5.3.3. *A. tumefaciens* aracılığıyla lüpen bitkisine gen aktarımı
 - 15.5.3.3. *A. tumefaciens* aracılığıyla mısıra gen aktarımı
- Sonuç
- Teşekkür
- Kaynaklar

Bölüm 16. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri 160-189

Şule Arı

- 16.1. Giriş
- 16.2. Gen Aktarımının Prensipleri
 - 16.2.1. Genetik transformasyonda kullanılan alıcı hücreler
 - 16.2.1.1. Alıcı hücrelerin fizyolojisi
 - 16.2.1.2. Somoklonal varyasyon
 - 16.2.2. Aktarılan nükleik asit moleküllerinin özellikleri
 - 16.2.2.1. Promotorlar
 - 16.2.2.2. Seçici işaret (markör) genleri
 - 16.2.2.3. Raportör genler
 - 16.2.3. Gen aktarım sistemleri
- 16.3. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri
 - 16.3.1. Agro-enfeksiyon
 - 16.3.2. Makro-enjeksiyon
 - 16.3.3. Protoplastlara gen aktarımı
 - 16.3.3.1. Kimyasal yöntemlerle protoplastlara gen aktarımı
 - 16.3.3.2. Lipozomlarla protoplastlara gen aktarımı
 - 16.3.3.3. Elektroporasyon ile protoplastlara gen aktarımı
 - 16.3.4. Hücre ve dokulara gen aktarımı
 - 16.3.4.1. Biyolistik (partikül bombardımanı)
 - 16.3.4.2. Mikro-enjeksiyon

- 16.3.4.3. Elektroforez ve mikrolazer
- 16.3.4.4. Polen transformasyonu
- 16.3.4.5. Polen tüpü yoluyla DNA aktarımı
- 16.3.4.6. Zigotik embriyoya DNA emdirilmesi
- 16.3.4.7. Fiberler aracılığı ile DNA aktarımı
- 16.3.4.8. Sonikasyon
- 16.3.4.9. Desikasyon
- 16.4. Sonuç
- Teşekkür
- Kaynaklar

Bölüm 17. Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi 190-207

Hüseyin Avni Öktem

- 17.1. Giriş
- 17.2. Herbisitler ve Etki Mekanizmaları
- 17.3. Herbisite Dayanıklı Bitki Elde Edilmesi
- 17.3.1. Hedef molekülün modifikasyonu
- 17.3.2. Hedef molekülün fazla üretimi
- 17.3.3. Etken maddenin detoksifikasyonu
- 17.4. Glutamin Sentetaz İnhibitörleri
- 17.4.1. PPT etki mekanizması
- 17.4.2. PPT'ye dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesi
- 17.4.3. PPT'yi detoksifiye edebilen enzimler
- 17.4.4. Gen aktarım çalışmaları
- 17.5. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 18. Böceklerle Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi 208-238

Hüseyin Avni Öktem

- 18.1. Giriş
- 18.2. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksinleri
- 18.3. Bt Geni Taşıyan Transgenik Bitkiler
- 18.4. Diğer İnsektisidal Aktivite Gösteren Proteinler
- 18.4.1. Proteinaz inhibitörleri
- 18.4.2. Lektinler
- 18.4.3. Alfa-amilaz inhibitörleri
- 18.4.4. Kitinaz
- 18.4.5. Kolesterol oksidaz
- 18.4.6. Avidin
- 18.4.7. Diğer stratejiler
- 18.5. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 19. Virüslere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi 239-260
Ali Ergül, Sümer Aras, Mustafa Erayman, Sebahattin Özcan

- 19.1. Giriş
 - 19.2. Kılıf Proteini
 - 19.3. Antisens RNA
 - 19.4. Virüsün Haraketini Sağlayan Proteinler
 - 19.5. Replikaz Genleri
 - 19.6. Ribozimler
 - 19.7. Satelit ve Hasarlı RNA'lar
 - 19.8. Gen İnaktivasyonu
 - 19.9. Dayanıklılık Genleri
 - 19.10. Ribozomları İnaktive Edici Proteinler
 - 19.11. Memeli 2',5' Oligoadenilat (2-5A) Sistemi
 - 19.12. Virüs Proteinlerine Karşı Antikor Kullanımı
- Kaynaklar

Bölüm 20. Hastalıklara Dayanıklılığın Artırılması 261-287
Kemal Kazan, Ekrem Gürel

- 20.1. Giriş
 - 20.2. Bitki-Patojen İlişkisi
 - 20.2.1. Hastalık yapıcı bakteriler
 - 20.2.2. Hastalık yapıcı funguslar
 - 20.2.3. Bitki savunma sistemleri
 - 20.2.3.1. Genel (temel) dayanıklılık
 - 20.2.3.2. Özel (spesifik) dayanıklılık
 - 20.3. Patojenik Bakterilere ve Funguslara Dayanıklı Bitki Üretimi
 - 20.3.1. Başka kaynaklardan izole edilen antimikrobiyal genlerin aktarımı
 - 20.3.1.1. Antimikrobiyal peptitler
 - 20.3.1.2. Thionin grubu proteinler
 - 20.3.2. Bitki savunma genlerinin bitkilerde ifadesi
 - 20.3.2.1. Patojenin hücre duvarını etkileyen genlerin kullanımı
 - 20.3.2.2. Lizozimler
 - 20.3.2.3. Patojeniz ile ilgili (PR) protein genlerinin bitkide ifadesi
 - 20.3.2.4. Poligalaktrunazı inhibe eden proteinler (PGIP)
 - 20.3.3. Fitoaleksin kodlayan genlerin bitkilerde ifade edilmesi
 - 20.3.4. Bitkilerde aktif oksijen türlerinin üretimi
 - 20.3.5. Patojene ait virülens faktörlerinin etkisiz hale getirilmesi
 - 20.3.6. Monoklonal antikor genlerinin bitkilerde ifade edilmesi
 - 20.4. Dayanıklılık (R) Genlerinin Bitkilerden Klonlanması
 - 20.5. Dayanıklılık Genlerinin (R) Bitkilerde İfadesi
 - 20.6. Sistemik Dayanıklılık
 - 20.7. Patojen Sinyallerinin İletimi ve Bitki Korumada Yararlanması
 - 20.8. Hastalık Etmeni Tarafından Uyarılan Promotorların Seçimi
 - 20.9. Gen İfadesine Etki Eden Öteki Faktörlerin Optimizasyonu
- Kaynaklar

Bölüm 21. Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi 288-326

Aynur Gürel, Rıza Avcıoğlu

- 21.1. Giriş
- 21.1.1. Stres kavramı
- 21.1.2. Stres faktörleri (stresörler)
- 21.1.3. Stres tarafından teşvik edilen fazlar
- 21.1.4. Stresi tanıma
- 21.1.5. Strese karşı bitki tepkileri
- 21.2. Radyasyon: Görünür Radyasyon (Işık) ve Ultraviyole Radyasyon
- 21.2.1. Işık azlığı ya da gölge
- 21.2.1.1. Işık azlığından kaçınma
- 21.2.1.2. Işık azlığına tolerans
- 21.2.2. Güçlü ışık
- 21.2.2.1. Güçlü ışığın neden olduğu zararlar
- 21.2.2.2. Güçlü ışık stresine adaptasyon
- 21.2.3. Ultraviyole radyasyonun zararları ve korunma yolları
- 21.3. Sıcaklık
- 21.3.1. Bitkilerde ısı ve zararları
- 21.3.1.1. Isı stresine adaptasyon
- 21.3.1.1.1. Isıdan kaçınma
- 21.3.1.1.2. Isı toleransı
- 21.3.2. Bitkilerde üşüme
- 21.3.2.1. Bitkilerde üşüme zararları
- 21.3.2.2. Üşümeye adaptasyon
- 21.3.3. Donma şekilleri ve zararları
- 21.3.3.1. Donmaya adaptasyon
- 21.3.3.1.1. Donmadan kaçınma
- 21.3.3.1.2. Donma toleransı
- 21.3.3.1.3. Kış kuraklığı
- 21.3.3.1.4. Buz veya kar altında uzun süre kalmanın zararlı etkileri
- 21.4. Kuraklık
- 21.4.1. Bitkilerde kuraklık zararları
- 21.4.2. Kuraklığa adaptasyon
- 21.4.2.1. Kuraklıktan kaçınma
- 21.4.2.2. Kuraklık toleransı
- 21.5. Toprakta Oksijen Eksikliği
- 21.5.1. Bitkilerde oksijen eksikliğinin yol açtığı zararlar
- 21.5.2. Oksijen eksikliğine adaptasyon
- 21.6. Tuz Stresi
- 21.6.1. Bitkilerde tuz stresinin zararları
- 21.6.2. Tuza adaptasyon
- 21.6.2.1. Tuz içeriğinin düzenlenmesi: Tuzdan kaçınma
- 21.6.2.1.1. Tuzu bünyeye almama
- 21.6.2.1.2. Tuz eliminasyonu
- 21.6.2.1.3. Tuzun seyreltilmesi
- 21.6.2.1.4. Tuzun protoplastlardaki bölmelerde biriktirilmesi
- 21.6.2.2. Tuz toleransı
- 21.7. Antropogenik Stres
- 21.7.1. Kirlilik zararı
- 21.7.1.1. Havadan gelen kirlleticiler

- 21.7.1.1.1. Kükürt dioksit
- 21.7.1.1.2. Atmosferik oksidanlar: Azot oksitler, ozon ve sekonder fotooksidanlar
- 21.7.1.2. Toprak ve suyun ağır metallerle kontaminasyonu
- 21.7.1.2.1. Ağır metallerin alınımı ve bunların toksik etkileri
- 21.7.1.2.2. Ağır metallerle adaptasyon
- 21.8. Doku Kültürleri ve Stres
- 21.9. Genetik Mühendislik ve Stres
- 21.10. Stres ile İlişkili Olarak Gerçekleştirilen Biyoteknolojik Çalışmalar
- 21.11. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 22. Erkek Kısır Bitkilerin Üretimi 327-333

Kenan Turgut

- 22.1. Giriş
- 22.2. Angiosperm Bitkilerde Anter Gelişmesi
- 22.3. Anter Gelişmesi Süresince İfade Edilen Genlerin Klonlanması
- 22.4. Erkek Kısır Bitkilerin Üretilmesi
- 22.5. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 23. Genetik Markörler ve Analiz Metodları 334-363

Ahmet Yıldırım, Nejdett Kandemir

- 23.1. Giriş
- 23.2. Genetik Markörlerin Kullanım Alanları
- 23.2.1. Genetik haritaların hazırlanması
- 23.2.2. Genetik parmak izi (fingerprinting) analizi
- 23.2.3. Doğrudan gen etiketlenmesi
- 23.2.4. Genlerin klonlanması
- 23.3. Genetik Markörlerle İlgili Önemli Kriterler
- 23.3.1. Farklılık gösterme (polimorfizm)
- 23.3.2. Lokus sayısı
- 23.3.3. Haritalar arasında transfer edilebilme
- 23.3.4. Güvenilirlik
- 23.3.5. Eşbaskınlık (ko-dominanslık)
- 23.3.6. Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenme
- 23.3.7. Fenotipi etkileme
- 23.3.8. Bütün dokularda gözlenebilme
- 23.3.9. Allel sayısı
- 23.3.10. Otomasyona uygunluk
- 23.3.11. Genomdaki dağılım
- 23.4. DNA Markörlerinin Moleküler Esasları
- 23.5. Genom Analizi İçin Kullanılan DNA Markörleri
- 23.6. Genetik Markörler Arasındaki İlişkiler
- 23.7. Gen Haritalarının Hazırlanmasında Kullanılan Populasyonların Seçimi
- 23.8. Genetik Haritalar ile Fiziksel Haritaların Yakınlığı
- 23.9. Farklı Türlerin Haritalarının Birbiriyle Olan İlişkisi (Synteny veya Karşılaştırmalı Haritalama)

- 23.10. Genetik Markör Tipleri ve Analiz Metotları
- 23.10.1. Morfolojik markörler
- 23.10.2. Protein markörleri
- 23.10.3. DNA markörleri
- 23.10.3.1. DNA melezleme markörleri (RFLP markörleri)
- 23.10.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan markör teknikleri
- 23.10.3.2.1. Rasgele çoğaltılmış DNA farklılığı (RAPD)
- 23.10.3.2.2. Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP)
- 23.10.3.2.3. Dizisi etiketlenmiş alanlar (STS)
- 23.10.3.2.4. Basit dizi tekrarları (SSR veya mikrosatelitler)
- Kaynaklar

Bölüm 24. Proteinler ve Protein Mühendisliği 364-400

Nejdet Kandemir, İbrahim Halil Kavaklı

- 24.1 Giriş
- 24.2. Proteinlerin Canlı Sistemlerdeki Fonksiyonları
- 24.2.1. Büyüme ve farklılaşmanın kontrolü
- 24.2.2. Aktivitelerin koordinasyonu
- 24.2.3. Enzim aktivitesi
- 24.2.4. Destek ve koruma
- 24.2.5. Taşıma ve depolama
- 24.2.6. Algılama
- 24.2.7. Hareket
- 24.2.8. Savunma sistemi
- 24.2.9. Besin olarak proteinler
- 24.3. Proteinlerin Analizi ve Saflaştırılması
- 24.3.1. Protein tanıma metodları
- 24.3.2. Proteinlerin saflaştırılması
- 24.4. Proteinlerin Yapısal Özellikleri
- 24.4.1. Proteinlerin birincil yapısı
- 24.4.2. Proteinlerin ikincil yapısı
- 24.4.3. Proteinlerin üçüncül yapısı
- 24.4.4. Proteinlerin dördüncül yapısı
- 24.5. Polipeptid Zincirden Fonksiyonel Proteine: Protein Katlanması
- 24.6. Proteinlerin Diğer Molekülleri Bağlama Özelliği
- 24.7. Proteinlerdeki Kritik Amino Asitler
- 24.8. Protein Mühendisliği
- 24.8.1. Proteinlerin üretim miktarlarının değiştirilmesi
- 24.8.2. Protein yapısında makro değişikliklerin yapılması
- 24.8.3. Protein yapısında rasgele küçük değişikliklerin yapılması
- 24.8.4. Protein yapısında bilinçli küçük değişikliklerin yapılması
- 24.8.4.1. Protein kodlayan genin izolasyonu, klonlanması ve ifadesi
- 24.8.4.2. Yapı-işlev ilişkisinin kurulması
- 24.8.4.3. İstenen değişikliklerin gerçekleştirilmesi
- 24.8.4.4. Mutantların incelenmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu
- 24.9. Sonuç
- Kaynaklar

Bölüm 25.	Antisens RNA Teknolojisi	401-420
	Kenan Turgut, Serkan Uranbey, Sebahattin Özcan	
25.1.	Giriş	
25.2.	Antisens RNA Teknolojisinin Tanımı ve Temeli	
25.3.	Antisens RNA Regülasyonunun Mekanizması	
25.4.	Antisens Tekniği ile Gen İnaktivasyonunu Etkileyen Faktörler	
25.4.1.	Antisens DNA dizininin büyüklüğü ve yapısı	
25.4.2.	Promotor seçimi	
25.4.3.	T-DNA kopya sayısı	
25.4.4.	Heterozigotik dizinler	
25.4.5.	Diğer faktörler	
25.5.	Bitkilere Aktarılan Bakteri Genlerinin Antisens Düzenlenmesi	
25.6.	Bitki Genlerinin Antisens Düzenlenmesi	
25.7.	Viral Genlerin Antisens Düzenlenmesi ve Virüslerin Engellenmesi	
25.8.	Sonuç	
	Kaynaklar	
Bölüm 26.	Teknoloji Koruma Sistemi (Terminatör Teknolojisi) .	421-437
	Gökhan Özertan, Yüksel Bölek	
26.1.	Giriş	
26.2.	Dünya Transgenik Tohum Sektörü ve Teknoloji Koruma Sisteminin Geliştirilmesi	
26.3.	TKS'nin Çalışma Sistemi	
26.4.	Teknolojinin Etkileri	
26.5.	TKS'nin Bugünkü Konumu ve Amerikan Tarımındaki Uygulamalar	
26.6.	Sonuç	
	Dipnotlar Listesi	
	Kaynaklar	
Bölüm 27.	Biyoteknolojinin Ahlaki ve Hukuki Yönleri	438-452
	Nazimi Açıkgöz, Nevin Açıkgöz, Muzaffer Tosun	
27.1.	Giriş	
27.2.	Fikri Mülkiyetle İlgili Gelişmelerin Tarihçesi	
27.3.	Biyoteknoloji ve Fikri Mülkiyet Hakları - Patent Sistemi	
27.4.	Biyoteknoloji ve Fikri Mülkiyet Hakları - İslahçı Hakları	
27.5.	Teknoloji Koruma Sistemi (TKS) veya Terminatör Teknolojisi	
27.6.	Biyo-güvenlik Protokolü	
27.7.	Etiketleme	
27.8.	Refüj	
27.9.	Biyo-korsanlık	
27.10.	Sonuç	
	Kaynaklar	
İndeks		453-456

Önsöz (Editörler)

Günümüze kadar uygulanan klasik ıslah programları sayesinde bitkisel ürünlerin kalite ve miktarındaki gelişmeler göz ardı edilemez bir gerçektir. Ancak, hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere kültür bitkilerinin diğer birçok tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri çoğu zaman yetersiz kalmakta ya da oldukça uzun bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Oysa ki, son 15 yıl içerisinde çok hızlı gelişen **bitki biyoteknolojisi** teknikleri sayesinde tarımsal öneme sahip genler farklı bitki türlerinden veya organizmalardan izole edilerek, kültür çeşitlerine kolayca aktarılabilmektedir.

Bitki biyoteknolojisindeki baş döndürücü gelişmeler, 1980'li yıllarda *Agrobacterium*'un neden olduğu kök boğazı ur hastalığının moleküler mekanizması açıklığa kavuştuktan sonra gerçekleşmiştir. Daha sonra, doğanın en etkili genetik mühendisi olarak adlandırılan *Agrobacterium* bakterisi, arzu edilen genetik özelliklerin hızlı ve etkili bir şekilde bitkilere aktarımı için araştırmacılar tarafından genetik olarak değiştirilmiştir. O günden beri önemli tarımsal özellikleri kodlayan genler değişik teknikler kullanılarak çok sayıda bitki türüne aktarılmış ve transgenik bitkilerin günümüzde ekim alanı 40 milyon hektarı aşmıştır.

Bitki biyoteknolojisinin ilk uygulama alanları herbisitlere, böceklerle ve virüslere dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi yönünde olmuştur. Son yıllardaki araştırmalar ise stres şartlarına dayanıklılık, kalitenin iyileştirilmesi ve insan tedavisinde kullanılan ürünlerin bitkiler tarafından üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. İlave olarak, değişik bitki türlerinin genom haritalarının çıkartılması üzerine de yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Bütün bu gelişmeler dikkate alındığında biyoteknolojinin 21. yüzyıla damgasını vuracağı açıktır.

Dünyada biyoteknoloji alanında önemli gelişmeler olurken, ülkemizde de 1990'lı yıllardan sonra biyoteknoloji alanındaki araştırmalara önem verilmeye başlanmıştır. Bu amaçla, TÜBİTAK ve DPT başta olmak üzere değişik kuruluşlar tarafından çok sayıda proje desteklenerek belirli üniversitelerde önemli altyapılar oluşturulmuştur. Ayrıca, biyoteknoloji konusunda çok sayıda genç araştırmacı ABD ve İngiltere başta olmak üzere lisansüstü eğitim için yurtdışına gönderilmiş ve eğitimlerini tamamlayarak ülkemize geri dönmüşlerdir. Bütün bu olumlu gelişmelere karşın, ülkemizde biyoteknoloji alanındaki gelişmeler arzu edilen seviyeye ulaşamamıştır. Bunun temel nedeni bu konuda yetişmiş elemanların altyapısı yetersiz olan üniversitelere dağıtılarak araştırma yapamamaları, diğer taraftan da iyi araştırma altyapısına sahip olan laboratuvarların yetişmiş eleman sıkıntısı çekmesidir. İlave olarak, araştırma öncelikleri belirlenerek ülkesel biyoteknoloji politikaları da henüz belirlenmemiştir.

Ülkemizde bitki biyoteknolojisi alanındaki araştırmaların istenilen seviyeye gelebilmesi için iyi yetişmiş araştırmacılara, altyapısı ve araştırma olanakları yüksek olan laboratuvarlarda çalışma imkanı verilmelidir. Ülkemizin biyoteknoloji araştırma önceliklerinin de bir an önce belirlenmesinde fayda vardır. Özellikle, birçok bitki türünün gen merkezi olan ülkemizin doğal florasındaki bitkilerin korunması ve önemli tarımsal özellikleri kodlayan genlerin bu bitkilerden izole edilerek kültür bitkilerine aktarılması yönündeki araştırmalara hız verilmesi gerekmektedir. Ayrıca biyoteknoloji konusunda nitelikli araştırmacı yetiştirilmesine, her zaman olduğu gibi gereken önem verilmelidir.

Biyoteknolojinin ülkemiz için oldukça yeni olduğu dikkate alındığında, bu konuda Türkçe kaynak yetersizliği de önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Konuya olan ilgiyi artırabilmek ve geniş kitlelerin katılımlarını sağlayabilmek için bu konudaki Türkçe yayın

sayısının artırılması büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla, geniş katımlı ve uzman bir yazar kadrosu tarafından hazırlanan, bitki **genetik mühendisliği ve uygulamaları** alanındaki son gelişmeleri içeren bu kitabın Türkiye'deki biyoteknolojik araştırmaların gelişmesine, canlı materyalle uğraşan araştırmacılar ile lisans ve lisansüstü eğitim gören öğrencilere faydalı olacağına inanmaktayız. Ayrıca, gerek daha önce 2. baskısı yapılan I. cildin gerekse bu cildin bölüm sayısı ve içerik olarak genişletilmesi için biyoteknoloji alanında araştırmalar yürüten tüm bilim adamlarımızı davet etmekteyiz.

Biz editörler; bu kitabın hazırlanmasındaki özverili katkılarından dolayı bütün bölüm yazarlarına, önsöz yazan sayın hocalarımıza, olumlu fikir ve görüşleriyle her zaman bizleri destekleyen mesai arkadaşlarımıza, kitabın basılması için verdikleri destek ve yardımlarından dolayı Selçuk Üniversitesi eski Rektörü Sayın *Prof. Dr. Abdurrahman Kutlu*'ya, eski Rektör Yardımcıları Sayın *Prof. Dr. Behiç Çoşkun*' ve Sayın *Prof. Dr. Mehmet Nizamhoğlu*'na, Eski Genel Sekreter Sayın *Doç. Dr. Ahmet Peker*'e, kitaba desteğini sürdüren Selçuk Üniversitesi Vakfı ve Selçuk Üniversitesi Rektörü Sayın *Prof. Dr. Süleyman Okudan*'a teşekkürü bir borç biliriz.

Ankara-Bolu-Konya, Şubat 2004
Sebahattin Özcan, Ankara Üniversitesi
Ekrem Gürel, Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Mehmet Babaoglu, Selçuk Üniversitesi

Önsöz (Prof. Dr. İbrahim Genç, Prof. Dr. Rüştü Hatipoğlu)

Biyolojik sistemlerin teknolojiye kullanılması ve bunlardan yararlar sağlanması şeklinde tanımlanan ve basit pratik uygulamaları çok eski yıllara kadar uzanan biyoteknoloji; özellikle 20. yüzyılın son çeyreğinde tanımı ve kapsamı genişleyen ve insanoğlunun gündemini en fazla meşgul eden bir çalışma alanı olmuştur. Mikroorganizma, insan, hayvan ve bitkiler olmak üzere tüm canlılar üzerinde uygulanma olanağı bulunan bu yeni teknolojilerin içersinde bulunduğumuz 21. yüzyıla da damgasını vuracak en önemli çalışma alanlarından birisi olacağı kuşkusuzdur.

Klasik bitki ıslahı uygulamaları için yeni ve yardımcı yöntemler olan **bitki biyoteknolojisi** yöntemleri; varyasyon yaratma, mevcut varyasyon kaynaklarından yararlanma ve arzu edilen karakterlerin sistematik sınırlama olmaksızın bitki veya bitkiler dışındaki organizmalardan gen halinde izole edilerek bitkilere aktarılmasına olanak sağlayarak, klasik bitki ıslahı yöntemlerinin etkinliğini artırmaktadır. Bitki ıslahında etkinliğin artması ise, mevcut bitkisel üretim alanlarında, 6 milyarı aşan ve hızla artmaya devam eden dünya nüfusu için yeterli gıda maddesi üretiminin gerçekleştirilmesi anlamına gelmektedir. İçerisinde bulunduğumuz yüzyılda, bitki biyoteknolojisi yöntemlerinde sağlanan yeni gelişmelerin, kimi tarım tekniklerini değiştirmesi, taze ve işlenmiş bitkisel gıda ürünlerinin kalitesinde artışa neden olması ve tarımsal üretimin çevre üzerindeki olumsuz etkisini azaltması beklenmektedir.

Bir tarım ülkesi olan ülkemizin bu yeni teknolojiye uzak kalması ve bu teknolojilerden ülkemiz tarımının etkilenmemesi söz konusu değildir. Bu nedenle, ülkemizde tarım, ormancılık ve biyoloji alanında çalışanların veya bu alanlarda çalışmayı amaçlayan genç araştırmacılarımızın bitki biyoteknolojisindeki gelişmeleri yakından izlemeleri ve bu teknolojilerin ülkemizde de uygulanması için çaba göstermeleri gerekmektedir. Bilgi çağı olan yüzyılımızda, bilgiye erişmek çok kolay olmakla beraber, yabancı dil eğitimi açısından büyük sorunlar yaşayan ülkemizde erişilen bilginin Türkçe olması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, editörlüğünü Doç. Dr. Sebahattin Özcan, Doç. Dr. Ekrem Gürel ve Doç. Dr. Mehmet Babaoğlu'nun yaptığı bu kitabın, ülkemizde bitki biyoteknolojisi yöntemlerinin anlaşılması ve uygulanması açısından büyük katkılar sağlayacağı kanısındayız.

Kitabın hazırlanmasında emeği geçen başta sayın editörler olmak üzere, kitaba yazar olarak katkı sağlayan değerli bilim insanlarının tümünü içtenlikle kutlar, kitabın başta tarım, ormancılık ve biyoloji alanlarında öğrenim gören öğrencilere ve bu alanlarda çalışan araştırmacılara yararlı bir kaynak olmasını dileriz.

Adana, Nisan 2001
Prof. Dr. İbrahim Genç
Prof. Dr. Rüştü Hatipoğlu
Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü

Önsöz (Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem)

Bitkilerde genetik transformasyon çalışmalarının ilk örneklerinin literatüre yansıdığı 1980'li yılların başlarında dünyada bu teknolojiyi uygulayabilen laboratuvar sayısı tek haneli rakamlarla ifade edilirken, günümüzde bu sayı binlerle ifade edilmektedir. Bu konudaki araştırma potansiyelindeki gelişmeye paralel olarak 1980'lerde tütün ve yonca gibi model bitkiler üzerinde gerçekleştirilebilen transformasyon çalışmaları günümüzde hemen hemen tüm bitki türlerinde uygulanabilir duruma gelmiştir. Benzeri bir gelişme bitkilere aktarılan genler ve yeni karakterlerde de gözlenmektedir. 1990'lı yıllara kadar herbisit, böcek ve hastalıklara karşı direncin artırılması konularında yoğunlaşan araştırmalar, günümüzde stres direnci, kalitenin iyileştirilmesi, biyomolekül üretimi gibi oldukça geniş bir yelpazede ele alınabilmektedir. Son yıllarda ise, transgenik bitkilerin insan ve hayvanların ağızdan aşılınması, kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilmesi ile ilgili araştırmalara rastlanmaktadır.

Ülkemizde bitkilerin genetik transformasyonu üzerine araştırmalar 1990'lı yılların ilk yarısında başlamıştır. Ancak, bu araştırmaların dünya genelindeki gelişmeye paralellik göstermediği ve nitelik/nicelik açısından halen yetersiz olduğu üzülmeye gözlenmektedir. 2000 yılı sonu itibarı ile dünyada 44.2 milyon hektarlık bir alanda tarımı yapılmakta olan transgenik bitkilerin, yakın bir gelecekte hem ekiliş hem de uygulama alanları açısından yaygınlık kazanacağı yadsınamaz bir gerçektir. Ülkemizin de bu teknolojiye minimum risk ve maksimum fayda ile yararlanabilmesi için teknoloji transfer eden ülke konumundan, teknolojiyi geliştirebilen ve uygulayabilen bir ülke konumuna gelmesi gerekmektedir. Bu nedenle, ülkemizin halen oldukça yetersiz olan insan gücü ve araştırma altyapısına, belki de kurulacak ulusal bir "Bitki Biyoteknolojisi Araştırma Enstitüsü" bünyesinde en kısa sürede ulaşması gereklidir.

Hazırlanmış olan bu kitap, transgenik bitkilerin farklı alanlardaki uygulamalarının geniş bir yelpazede ele alındığı ve araştırmacıların olduğu kadar, her seviyeden öğrencinin de rahatlıkla yararlanabileceği kapsamlı bir Türkçe kaynağı oluşturmaktadır. Bu eserin, yukarıda belirtilen hedefe ulaşılabilmesi açısından ilk adımı oluşturmaya ve kitabın gerçekleştirilmesi için başta sayın editörler olmak üzere emeği geçen tüm katılımcılara teşekkür dileklerimle.

Ankara, Haziran 2001
Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem
ODTÜ Fen Edebiyat Fakültesi
Biyolojik Bilimler Bölümü

Önsöz (Prof. Dr. Nermin Gözüakırmızı)

20. yüzyıl Mendel'in bezelyelerle yaptığı deneylerin yeniden keşfi ve genetik biliminin başlangıcı oldu. Bizlerin de gözlemleyebildiği ilk bitki (*Arabidopsis thaliana*) genom projesinin tamamlanması ve *The Plant Cell*, *Nature* gibi önde gelen bilimsel dergilerin yüzyılın son sayılarını bu çalışmalara ayırması ile sonuçlandı. Genetik yüzyılı bir anlamda yerini 'İşlevsel Genetik' yüzyılına teslim etti. Böylece bir bitki yaklaşık 499.999 bitki genomu ise taşıdıkları yararları ziraat, sağlık, enerji ve çevre uygulamalarına taşımak için 21. yüzyılın bilim insanlarını bekliyor. Çoğunlukla yerinden kıpırdıyamayan ve bu nedenle tüm gereksinimlerini kendileri karşılamak zorunda olan bu canlı grubunun doğaya olan katkıları; havanın O₂ dengesini korumak, nem sağlamak, erozyonu önlemek, diğer canlılara gıda, ilaç vb. kimyasallar sağlamak olarak sıralanabilir. Bu yararları daha da arttırmak için bu organizmaların gen ve genomlarının iyi anlaşılması gerekir.

Klasik bitki inceleme ve ıslah yöntemleri genellikle ekonomik önemi yüksek olan bitkilerin kültüre alınması ile insanlığa önemli katkılar sağlamıştır. Yine, 20. yüzyılda bitkilerin doku kültürüne alınabilme yöntemlerinin geliştirilmesi başlangıçta "elit" genotiplerin hızlı üretimi, haploidi, embriyo kültürü, somaklonal varyasyon gibi teknolojilerle bu alanda ilerlemelere neden olurken, diğer taraftan kalıtım maddelerinin biyokimyasal yapı ve organizasyonunun yüzyılın ortasında keşfi ve son çeyrekteki moleküler biyolojiye dayalı teknolojiler; moleküler markörler, gen haritalaması, transgen teknolojisi ve son 5 yılda "DNA mikroarraylerinin kullanılması, dizi analiz programları, robotik ve biyoinformatik uygulamalar genç bilim insanları için koşullar olarak bile yakalanabilmesi güç bir bilim ortamı doğurmuştur.

Yurdumuzda son 20 yılda genetik ve biyoteknolojinin Devlet Planlama Teşkilatının 5 yıllık kalkınma programlarına alınması ile çeşitli iç ve dış kaynaklarla desteklenen programlarla gerek alt yapı kurulması gerekse yetişkin insan gücü sağlanması konusunda büyük atılımlar gerçekleşmiştir. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü bünyesinde bir Bitki Biyoteknolojisi biriminin (1991) ve İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında aynı konudaki çalışmaların başlatılmasındaki (1985) öncü girişimler sırasında konuya ilgi duyup özverili çalışmalar sergileyen genç arkadaşlarıma, 21. yüzyılda bitki biyoteknolojisi çalışmalarını anlayıp, yorumlayıp ve yeni katkılarla karşılayabilmemizi sağladıkları için teşekkür ediyorum.

Bu kitabın çeşitli bölümlerini yazan araştırmacıların çoğu devletimizin bu konuda eğitilmek üzere yurtdışına gönderdiği seçkin genç bilim insanlarıdır. Bu araştırmacıların hemen hepsi yurdumuza dönerek değişik üniversite ve araştırma kurumlarında nöbeti devir almışlardır. Yurtdışında kalan bir kısım ise gerek ortak bilimsel programlar gerekse özgün bilimsel katkılarla desteklerini sürdürmektedir. Ben, öncelikle bitki bilimindeki son teknoloji ve uygulamaları anlatan bir kitap yazmayı ve bunu bir sonraki bilim nöbetçilerine iletmeyi hedefleyen editörlere teşekkür ederim. Kitabı katkısı olan tüm bilim insanlarını kutlarım. Elbirliğiyle gerçekleştirdikleri bu eser genç bilim insanlarına uygulamada yardımcı olacak ve Türk bilim tarihinde gerçek yerini bulacaktır.

İstanbul, Haziran 2001

*Prof. Dr. Nermin Gözüakırmızı
İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
TÜBİTAK, MAM, GMBAE
Bitki Biyoteknolojisi Danışmanı*

Önsöz (Doç. Dr. Kemal Kaşan)

Bilimin, insan yaşamındaki yeri konusunda hiç düşündünüz mü? Dünyanın öteki ucunda olan bir ülkede/kıtada, “Bitki Biyoteknolojisi” kitabının önsözünü yazdığım bilgisayarında canlı olarak bir Türk televizyon kanalında yayınlanan müzik programını izlerken bu soru üzerinde düşünmekten kendimi alamadım. Hepimizin yakından bildiği gibi, bilimsel gelişmeler yaşamamızı dönüşü olmayan bir şekilde değiştirdi ve değiştirmeye de devam edecek. Bir kaç yıl önce ancak bilim kurgu filmlerinde gördüğümüz sahneler, bugün hayatın olağan bir parçası haline geldi. Birkaç yüzyıl öncesi yerçekiminin varlığı ya da dünyanın yuvarlak olup olmadığı konusunda düşünmeye başlayan insan, kısa bir süre içinde uzayın keşfine taşıyacak bir gelişmenin içinde buldu kendini. Bu gelişmenin temelindeki güç, insanı diğer canlılardan ayıran özelliklerden de biri olan bilimsel bilgi birikimini eğitim yolu ile bir sonraki kuşağa aktarabilme yeteneğidir. Bilimin evrensel bir uğraşı haline gelmesine bence bu özellik yol açmıştır. Geçmişte bazen amacı dışında kullanılmış olsa bile, bilimsel buluşların yaşamın iyileştirilmesinin temelini oluşturduğu bir gerçektir. Bu gelişmelerin daha büyük bir ivme kazanarak bundan sonra da süreceğini beklemek hiç de zor olmasa gerek.

İnsanın kendini ve çevresini daha iyi tanıyabilme uğraşısı tüm bilim dallarında olduğu gibi biyolojik bilimlerin de temelini oluşturmuştur. Özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısında biyoloji/moleküler biyoloji alanındaki ilerlemeler geçtiğimiz yüzyıla damgasını vurarak bu yüzyılın “biyoteknoloji çağı” olarak adlandırılmasına neden olmuştur. 1950’li ve 60’lı yıllarda DNA’nın kalıttaki rolü ve moleküler yapısının aydınlatılmasıyla başlayan temel çalışmalar, 1980’li yıllarda genlerin bir organizmadan ötekine aktarılmasını rutinleştiren bir ustalığa erişmiştir. Yirminci yüzyıl sonlarında gelinen nokta insan dahil öteki bir çok canlının genomlarındaki DNA dizisinin bilinmesinden, omurgalı canlı türlerinin klonlanabilmesi düzeyine erişmiştir. Günümüzde öteki bilim dallarındaki gelişmelerden etkilenmeyen bir biyoloji bilimini düşlemek bile olanaksız hale gelmiştir. Özellikle fizik, matematik, malzeme, biyokimya, kimya ve bilgisayar teknolojilerindeki gelişmeler, biyoloji ve moleküler biyolojiye yeni bir ivme kazandırmıştır.

Moleküler biyolojideki gelişmelerin nedenlerinden biri de kuşkusuz model organizmaların kullanılarak araştırma olanaklarının yoğunlaştırılmasıdır. Tek hücrelilerden *Escherichia coli* bakterisinin moleküler düzeyde tanımlanması, özellikle insanlarda hastalık yapıcı öteki bakteriyel kökenli hastalık etmenlerinin incelenmesinde önemli bir model oluşturmuştur. Benzer şekilde maya, sirke sineği (*Drosophila*), model nematod (*C. elegans*), fare ve model bitki *Arabidopsis* üzerinde yoğunlaşan araştırmalar, çok hücreli canlılarda gen düzenlemesi ya da büyüme ve farklılaşma gibi tek hücreli canlılarda belirgin izlenemeyen fizyolojik olayların incelenmesine olanak sağlamıştır. Bitkilere örnek oluşturan *Arabidopsis*’in genom dizi analizi 2000 yılının sonlarında tamamlanmıştır. Gelecek on yıldaki hedef bu bitkideki 25 bin genin her birinin fonksiyonunun ne olduğunun moleküler düzeyde anlaşılmasıdır. Model organizmaların hayat dönemlerinin kısalığı, üreme yöntemlerinin genetik çalışmalara uygunluğu, hücrelerindeki toplam DNA miktarının oransal azlığı, mutant bireylerin varlığı ve bu organizmaların gen aktarım çalışmalarına uygunluğu gibi faktörler bilimsel çalışmaların başarı şansını önemli ölçüde artırmıştır.

Bitki biyoteknolojisi, biyolojik bilimlerdeki bilgi birikiminin uygulamaya aktarılmasının doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Gerçekte bazı biyoteknolojik yöntemler, temelindeki bilimsel mekanizma bilinmeden uzun zamandır kullanılmaktaydı. Bunun en bilinen örneklerinden biri mayanın ekmek, yoğurt, alkol vs. gibi maddelerin üretilmesi için

kullanılmasıdır. Yine, bitki ıslahında seçme (seleksiyon) yöntemi çok yaygın olarak yıllar boyu kullanılmıştır. Ancak fizyolojik olayların temelindeki moleküler mekanizmanın bilinmesi günümüzde bitki biyoteknolojisini kendi ayakları üzerinde yükselen uygulamaya yönelik bir teknoloji haline getirmiştir.

Sevindirici bir gelişme, ülkemizin biyoteknoloji alanındaki gelişmelere katkısında görülen artıştır. Son yıllarda üniversitelerin ilgili fakülte ve bölümlerinde bu alanda yetişmiş çekirdek kadrolar oluşmuştur. Bitki Biyoteknolojisi kitabına kendi alanlarında katkıda bulunarak bir ilke imza atan yazarlar bunun en güzel örneğidir. Bu yapılaşmanın doğal bir sonucu olarak bitki biyoteknolojisi dersi, üniversite öğretim programlarında yer almaya başlamıştır. Ancak bu alanda lisans ve lisans üstü öğrencilerinin şimdiye değin gereksinim duydukları kaynak bir kitabın olmayışı Bitki Biyoteknolojisi (I ve II) kitabının yazılmasındaki temel nedendir.

Bitki Biyoteknolojisi kitabında, günümüze değin bu alanda ortaya konan gelişmelerin bir çoğuna ayrıntılı olarak değinilmiştir. Bu kitabın ilk cildi bitki doku kültürü ve uygulamalarını, ikinci cildi ise genetik mühendisliğinin temel ilkeleri ve bitkilere uygulanması konularını kapsamaktadır. Bitki Biyoteknolojisi II kitabının ilk bölümlerinde, genlerin yapıları ve çalışma esaslarına ilişkin temel bilgiler verilmiştir (Bölüm 12 ve 13). Bunu izleyen bölümlerde bitki biyoteknolojisinin günümüzdeki konumuna ulaşmasında önemli yeri olan gen izolasyon ve gen aktarım yöntemleri incelenmiştir (Bölüm 14, 15 ve 16). Genetik mühendisliğinin bitkilerde uygulanma alanlarına ilişkin örneklerle de bu kitapta geniş yer verilmiştir. Örneğin, yabancı ot öldürücü kimyasallara karşı kültür bitkilerine dayanıklılık kazandırılması bitki biyoteknolojisinin ilk uygulamalarından biridir (Bölüm 17). Bu teknoloji ile yabancı ot mücadelesinde kimyasalların kullanımı ile ürün maliyetinin düşürülmesi amaçlanır. Öte yandan hastalık, zararlı ve virüslere karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesindeki (Bölüm 18, 19 ve 20) amaçlardan biri, çevre kirliliğine ve ürünlerde birikime yol açabilecek pestisit kullanımının da azaltılmaya gidilmesidir. İlk bakışta çelişkili gibi görünen bu iki kavram, gerçekte biyoteknolojik yaklaşımların bölge, bitki çeşidi ve pazar özelliklerine göre değişebilen bir çeşitlilikte olduğunun göstergesidir.

Çevre koşullarındaki olumsuzlukların bitkileri etkileme mekanizması bu koşullara daha dayanıklı bitkilerin elde edilmesi dünya ikliminin değişmeye başladığı günümüzde daha da önemli hale gelmiştir. Örneğin, tuzluluk ve yağış eksikliği birçoğu az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bulunan alanları etkileyerek bitkisel üretimi önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Kuraklığa ve tuzluluğa karşı dayanıklılığı fazla olan bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle ıslah edilmesi, bu alanlardan elde edilecek üretimi artıracak kuşkusuzdur. Bu konu, Bölüm 21’de incelenmiştir. Bölüm 23’de tartışılan DNA işaretlerine (markörlerine) ilişkin uygulamalar, moleküler biyoloji tekniklerinin bitki ıslahına uygulanmasının en belirgin örneklerinden biri olarak sayılabilir. Moleküler biyolojide sıkça kullanılan bir başka yöntem de, bir genin çalışmasını engelleyerek o genin eksikliğinde ortaya çıkan durumdan genin fonksiyonunun bulunmasıdır. Bu ve buna benzer teknolojilerin bitki biyoteknolojisinde uygulanmasına Bölüm 22, 23 ve 26’da ayrıntılı olarak değinilmiştir.

Biyoteknolojinin tarımsal üretim potansiyeline olabilecek etkileri kuşkusuz burada verilen örneklerle sınırlı değildir. Gelecekte biyoteknolojik yöntemlerin ürünlerde kalite iyileştirilmesi amacıyla kullanımı daha da yaygınlaşacaktır. Örneğin, lignin miktarı azaltılmış ağaç türlerinin kağıt sanayiinde kullanılarak maliyetin azaltılması, vitamin A miktarı artırılmış pirincin üretilmesi ile özellikle beslenmesi pirince dayalı ülkelerdeki halkın gereksinimlerinin karşılanması, insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan ve önemli bazı amino asitlerden

yoksun olan bitki tohumlarının biyoteknolojik yöntemlerle besleme değerin artırılması gibi bazı örnekler hali hazırda gerçekleştirilmiştir. Bu ürünlerin gerekli yasal izinlerin alınından sonra yaygın olarak üretilmesi beklenmektedir. Bu nedenle yakın bir gelecekte bitkilerden elde edilen yağ, protein, şeker ve vitamin gibi temel ürünlerin içeriklerinde istenilen değişimlerin yapılarak, ürün kalitesinin artırılması ve maliyetin azaltılması bitki biyoteknolojisinin temel hedefi olacaktır. Umuyorum ki, Bitki Biyoteknolojisi II kitabının sonraki baskılarında, ürünlerde kalite iyileştirilmesi konusu daha kapsamlı işlenecektir.

Biyoteknolojik yöntemler ile ıslah edilmiş bitkilerin önemli bir diğer kullanım alanı çevre korumadır. Bitkilerin topraktan aldıkları besin maddeleri miktarının artırılıp azaltılması ile besin maddelerinin daha etkin biçimde kullanılması veya ağır metalleri bulundurarak bitki gelişimi için elverişli olmayan bölgelerin temizlenmesinde biyoteknolojik yöntemler ile değiştirilmiş bitkilerin kullanılması gelecekte daha da büyük bir önem kazanacaktır. Ancak, unutulmamalıdır ki "İkinci Yeşil Devrim" olarak nitelendirilen biyoteknolojik ilerlemelerin özellikle nüfus yoğunluğu fazla ve gelişmişlik düzeyi az olan ülkelerde yaygın kullanımı olmaksızın istenilen verim ve kalite artışını sağlamak olanaksızdır. Üstün özelliklere sahip biyolojik materyallerden beklenen fayda, yine uygun tarımsal sistemlerin kullanımı sayesinde ortaya çıkacaktır. Biyoteknolojik yöntemlerin tarımsal üretime uygulanması bu kadar olumlu ve çeşitli iken, niçin bazı sancıları da beraberinde getirmektedir? Bu konu, Bitki Biyoteknolojisi II kitabının son bölümünde (Bölüm 27) ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Günümüzde bilimsel bilgi üretim ve dağıtımının etkinleşmesi toplumun bir çok kesiminin bu gelişmelerin tam olarak ne anlama geldiğini bilemez hale getirmiştir. Bu, bazı durumlarda biyoteknolojik yöntemlerle üretilen ürünlerin toplum tarafından kabulünde kuşku yaratan doğmasına yol açmaktadır. Yine biyoteknolojik yöntemlerin kullanım haklarının çok uluslu şirketlerin eline geçiyor olması bu alanda tekelleşmeye yol açabileceği kaygısı ile bazı grupları tedirgin etmektedir. Biyoteknolojik yöntemlerin toplumun yararına kullanımını en yüksek düzeye çıkartabilmek amacıyla bunların denetlenmesi gereği bir başka tartışma konusudur. Ancak bu denetimin bilimsel ilerlemeyi olumsuz olarak etkilememesine çalışmak da bir zorunluluktur. Benim kişisel görüşüm; biyoloji ve biyoteknolojik yöntemlerin uygulandığı her alanda, bitki ıslahından tutun da insan sağlığına kadar, başarılı örneklerin sayısı artıkça toplumun bu teknolojilere olan güveninin de artacağıdır. Günümüzde patent altındaki bazı yöntemlerin patent haklarının sona ermesinden sonra yaygın olarak kullanıma geçeceği bir gerçektir. Ancak ortaya konan gelişmelerden toplumun bilgilendirilmesi son derece önemlidir. Bence Bitki Biyoteknolojisi II kitabının sağlayacağı bir başka yarar da, sadece bilimsel teknolojiye öğrenciyi bilgilendirmek değil, aynı zamanda toplumda bu teknolojinin getirebileceği faydaların bilincinde olan birey sayısını artırmaktır. Bu kitabın her iki amaca da en iyi şekilde hizmet edeceğine inanıyorum.

Son olarak, bu alanda bir ilke imzasını atarak eksikliği duyulan bir gereksinimi karşılayan Bitki Biyoteknolojisi kitabının yazılmasındaki özveriye çalışmalarıdan dolayı tüm Editör ve yazarları tebrik ediyorum. Bitki Biyoteknolojisi kitabının birinci ve ikinci cildinin gelecekte genişletilerek yeniden basılacağı umudumu şimdiden yinelemek istiyorum. Genç kuşakların biyoteknolojiye olan ilgilerini artırmaktan başka beklentileri olmayan Editör ve bölüm yazarlarının bu görevi yeniden severek üstleneceklerine eminim. Öğrenci ve okur kitlesinden gelecek olumlu tepkiler bu işin başarılmasında önemli rol oynayacaktır.

Brisbane, Haziran 2001

Doç. Dr. Kemal Kazan

The University of Queensland, Avustralya

Bölüm 12

DNA'nın Moleküler Yapısı ve Kromozomlar

Muhsin Konuk¹, Mehmet Babaoğlu²

Selçuk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Meram, Konya¹

Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42031 Kampüs, Konya²

e-posta: mkonuk@selcuk.edu.tr¹ e-posta: mbabaoglu@selcuk.edu.tr²

12.1. Giriş

James Watson ve Francis Crick'in 1953 yılında Nature Dergisi'nde yayınladıkları 'DNA'nın fiziksel yapısı' ile ilgili buluşları, Gregor Mendel'in 1869 yılında yayınladığı bezelye ile ilgili sonuçları da dahil, genetik alanında ortaya konulan en büyük buluşlardan birisi olup, günümüzde önemini hala korumaktadır.

Bütün canlılarda hayatsal olayların şifresini taşıyan molekül olan DNA bir hücrenin kontrol merkezi veya kütüphanesi olarak tanımlanabilir. Bu kütüphanede depolanan ve nesilden nesile belirli mekanizmalarla aktarılan bilgiler, bir hücre veya organizmanın oluşumu ve devamlılığı için gerekli olan bilgilerin tümünü içermektedir.

1999 yılında *Caenorhabditis elegans* adlı bir nematodun genomunun şifresi (DNA diziliş sırası veya sekansı) çözülmüştür. Bundan bir yıl sonra, J. Watson'ın başkanlığında bir çok ülkeden bilim adamının 10 yıl önce başlattıkları, insanın DNA sekansı, gen ve kromozom haritasının belirlenmesini amaçlayan 'İnsan Genomu Projesi'nin ilk sonuçları açıklanmış ve insan hücre çekirdeği DNA'sının sekansının büyük bir kısmının tespit edildiği bildirilmiştir. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak ve bilimsel yorumları ile birlikte 12 Şubat 2001'den itibaren Science

Dergisi'nin özel bir sayısı ile yayınlanmaya başlanmıştır. Yine, bu bölüm yazılırken (Ocak 2001) çeltik bitkisinin DNA diziliş sırasının tespiti bitirilmiş ve gıda olarak bir çok ülkede temel besin kaynağı olan pirincin bir çok özelliğinin değiştirilerek daha besleyici (örnek: A vitamini üretmesi gibi) olabilmesinin yolu açılmıştır. Benzer şekilde, bitki genetikçilerinin model bitkisi olan *Arabidopsis thaliana*'nın genomu bitirilmiş olup, fare ve bazı balık türlerinin de bitirilmek üzeredir. Şüphesiz bu çalışmalar diğer birçok canlıda (mikroorganizma, böcek, bitki ve hayvan) yürütülmektedir. Elde edilen ve edilecek sonuçların karşılaştırmalı analizleri bizlere belki de dünya üzerindeki canlıların DNA ve genetik özellikleri bakımından birbirine benzeyen çok yönleri olduğunu ortaya koyacaktır.

RNA ile birlikte nükleik asitler olarak adlandırılan DNA, bütün bu çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Nükleik asitlerin bu özelliklerinin tespitinde en fazla hizmeti basit DNA yapılarına sahip olan mikroorganizmalar (örnek: *Eschericia coli* ve *Agrobacterium* sp.) yapmıştır. Bu nedenle bitki, insan, hayvan ve gıda biyoteknolojisinin günümüzde ulaştığı ve ileride ulaşacağı sonuçlar DNA'nın ne kadar bilinebilmesi ve değiştirilebilmesiyle doğru orantılı olarak gerçekleşecektir.

DNA'nın kimyasal ve fiziksel özellikleri ve bu özellikleri kullanarak DNA izolasyonu, zincirlerin birbirinden ayrılması, enzimlerle çeşitli fragmentlere ayrılıp tekrar birleştirilmesi ve belirli bir fonksiyona sahip bir DNA parçasının (gen) bir hücreden diğer bir hücreye, bir canlıdan diğer bir canlıya aktarılması en çok karşılaşılan uygulamalardır. Bu açıdan, DNA'nın bu özellikleri mümkün olduğunca şekillerle verilmeye çalışılmıştır. Çünkü, bitki biyoteknolojisinin en başarılı pratik sonuçları DNA'nın bu özellikleri kullanılarak elde edilmiştir.

Bu bölümde aynı zamanda DNA'dan kromozomun oluşumu, kromozomların genel özellikleri ve moleküler sitogenetik (*in situ* hibridizasyon) ile ilgili kısa bilgiler de verilmiştir.

12.2. Nükleik Asitler

Nükleik asitler, hücre nükleusunun en önemli kimyasal bileşenleridir. Hücrelerde başlıca iki tip nükleik asit vardır. Bunlar De(z)oksiribo-Nükleik-Asit (DNA) ve Ribo(z)-Nükleik-Asit (RNA)'dır (Şekil 12.1a,b). Nükleik asitlerin her iki tipi de nükleotid denilen çok sayıda tekli yapılardan (monomer) oluşan düz polimer (zincirli yapı) veya polinükleotidlerdir. RNA, sitoplazmada daha yaygın olarak bulunduğu halde, DNA esas olarak çekirdek, yeşil bitkilerin kloroplastları ve bütün yüksek organizmaların mitokondrilerinde bulunmaktadır. DNA ayrıca sentrozomlarda da yer almaktadır (Karol ve ark., 1995).

Nükleik asitlerin görevlerinin iyi bilinmesi onların yapılarının daha iyi anlaşılması için gereklidir. Hayatsal olaylar kesintisiz bir şekilde enerji, bilgi, madde ve mesaj akımını oluşturmaktadır. Hücre çekirdeğinden esas olarak iki tip bilgi akışı olmaktadır. Bunlardan birisi kalıtımla ilgili olanı, diğeri ise hücrenin fonksiyonları ile

ilgili olanıdır. İşte bu her iki olayda da bilgi akışını gerçekleştiren ve bilginin kaynağı durumunda olan esas moleküller nükleik asitlerdir.

Çekirdekteki bilgi deposu olan molekül DNA'dır. Böylelikle DNA bir canlının fenotipi, metabolik yetenekleri, makro-moleküler bileşenleri ve morfolojik değişikliklerini tayin etmektedir. Hücre bölünmesi esnasında ana hücrenin çekirdeğinde bulunan her bilginin DNA seviyesinde kopyaları yapılmakta ve yavru hücrelere aktarılmaktadır. Hücre fonksiyonları ile ilgili bilgiler ise DNA'dan sentezlenen bir RNA molekülü aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Hartl, 1994).

RNA'nın tipi, görev ve fonksiyonları daha bağımsız ve karmaşıktır. Farklı tipteki RNA'lar, büyüme ve çoğalma için gerekli olaylarda doğrudan görev alırlar. Her bir özel protein veya enzimin sentezlenmesi için gerekli bilgi RNA aracılığıyla taşınır. RNA'nın bu fonksiyonu oluşturmadaki en önemli kanıt bütün mozaik virüsünden (TMV) elde edilmiştir. TMV, protein bir örtü ile kaplı bir RNA molekülünden oluşur. Bu virüsün RNA'sı proteinden ayrıştırılmış ve bütün yaprağına aşılanmıştır. Bir süre sonra enfeksiyon yerinde virüse özgü protein örtüsünün oluştuğu gözlenmiştir. Böylece, kendisini tamamlayarak şekillenen virüs, yaprak dokusunda yayılmıştır. Bu uygulama, virüs RNA'sının kendine özel proteini sentez etme yeteneğini taşıdığını ve ilettiğini açıkça göstermektedir (Stryer, 1988; 1995).

Nükleik asitlerin kalıtsal bilgiye sahip oldukları ve naklettiklerini gösteren kanıtların elde edildiği önemli buluşlardan bazıları şu şekilde özetlenebilir (Stryer, 1988; Darnell ve ark., 1990; Hartl, 1994; Lodish ve ark., 2000):

1. Bakterilerde belli bir ırkın kalıtım seyri, farklı genetik özelliklere sahip başka bir ırkın saflaştırılmış DNA'sının bakteriye aktarılmasıyla değiştirilebilir. Buna transformasyon denir. Transformasyonun en iyi örneği *Diplococcus pneumonia*'da gösterilmiştir. *D. pneumonia* türünün iki tipi bulunmaktadır. Bunlardan birisi kapsüllü ve patojenik, diğeri ise kapsülsüz ve patojenik değildir. Kapsüllü olanların DNA'sı izole edilip kapsülsüz olanlara aktarıldığında, kapsülsüz tiplerde de kapsül oluştuğu ve patojenik hale geldiği gösterilmiştir.
2. RNA içeren bitki virüslerinin hastalık yapması, onların nükleik asit bileşimine bağlı olmaktadır. Saflaştırılmış virüs RNA'sının bitkiye verilmesi hastalık oluşması için yeterlidir. Virionlar bilindiği gibi sadece RNA molekülünden meydana gelmiş moleküllerdir.
3. Bir bakteri hücresi, bir bakteriofajla enfekte olduğu zaman enfeksiyonu yapan kısım proteinden ayrılmış olan nükleik asittir. Bakteriofaj T2'nin DNA'sı P^{32} ile, proteinleri de S^{35} ile işaretlendikten sonra radyoaktivitenin dağılışından enfeksiyon yapan kısmın hücre içine girmiş DNA olduğu belirlenmiştir. Bu da transdüksiyona güzel bir örnektir.

4. *Paramaecium* ve *E. coli* türlerinde görülen konjugasyon da yine nükleik asitlerin yönetici molekül olduklarını ortaya koymaktadır.

12.2.1. Nükleik asitlerin miktarları

Nükleik asitlerin miktarları bir organizmadan diğerine değişiklik göstermektedir. Bir TMV'nün toplam ağırlığının %5'i RNA, %95'i ise proteinlerden meydana gelmektedir. Maya hücrelerinde DNA içeriği %1 olmasına karşın, RNA oranı %10 civarındadır. Halbuki bakterilerin kuru ağırlıklarının %60-70'i proteinlerden, %10-25 kadarı da nükleik asitlerden oluşmaktadır (Goodwin ve Mercer, 1988; Stryer, 1995).

En küçük DNA'ya sahip olan ϕ x174 bakteriyofajında yaklaşık 5000 nükleotid bulunmaktadır. Bakteriyofaj T2'de nükleotid sayısı 4.0×10^5 , *E. coli* bakterisinde ise yaklaşık 10^7 dir. Daha yüksek canlılarda ise bu miktar 5×10^5 ila 5×10^{10} arasında değişmektedir. Nükleotid sayıları türler için özel ve karakteristiktir. Normal kromozom sayısının 2-3 katına sahip kromozom taşıyan dokulardaki hücrelerde de DNA miktarları yine 2-3 kat fazla bulunmuştur. (Nelson ve Cox, 1993; Brown ve Brown, 1999). (DNA miktarı konusunda daha fazla bilgi için bkz. Bölüm 12.8.1).

12.2.2. Nükleik asitlerin moleküler yapıları

Nükleik asitlerin molekül büyüklüğü 30 nükleotitten birkaç milyon nükleotide kadar değişebilir. Bu bölümde daha çok DNA molekülü (Şekil 12.1a) üzerinde durulacak ve zaman zaman da karşılaştırma açısından RNA ile ilgili bilgiler verilecektir. RNA molekülünün daha küçük, tek zincirli, şeker molekülünün riboz olması ve bünyesinde bazlardan DNA'daki timin'in yerine urasil'in bulunması DNA'dan en önemli farklarıdır. Genel bir ifadeyle RNA, DNA'nın tek zincirli modifiye bir formudur (Şekil 12.1b).

12.2.2.1. DNA'nın kimyasal yapısı

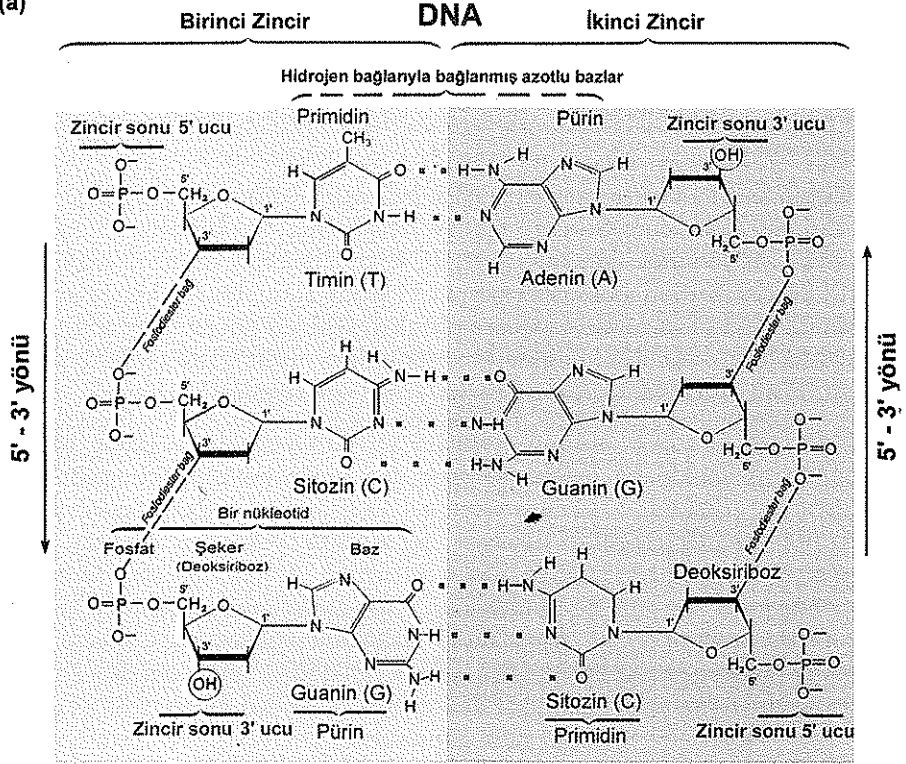
DNA; C, H, O, N ve P elementlerinden oluşan üç farklı molekülün (şeker, fosfat ve bazlar) birleşerek nükleotidleri ve bunların da uzun, dallanmış zincirler şeklinde birleşmesiyle oluşan nükleotid polimeridir. Kimyasal olarak şu özellikler sıralanabilir (Demir, 1986; Darnell ve ark., 1990; Hartl, 1994; Brown, 1998; Nelson ve Cox, 2000):

1. Her nükleotitte bir adet beş karbonlu şeker (pentoz) [DNA'da deoksiriboz (bir oksijeni eksik, $C_5H_{10}O_4$) ve RNA'da riboz ($C_5H_{10}O_5$)], bir adet azotlu baz [DNA'da Adenin (A), Timin (T), Guanin (G) ve Sitozin (C), RNA'da Timin yerine Urasil (U)] ve bir de fosforik asit (H_3PO_4) bulunur. Bir polimerde zincirin iskeleti veya omurgası almasıyla yer alan fosfat ve şeker gruplarıyla

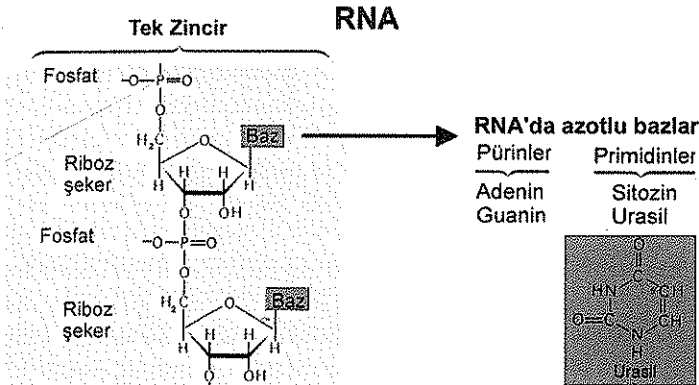
şekillenir. Bu iskelete yan grup olarak azotlu bazlar bağlanır ve oluşan bu yapıya nükleotid denilir (Şekil 12.1ab). dATP (deoksiadenozin trifosfat), dGTP (deoksiguanozin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), ve dCTP (deoksisitidin trifosfat), olmak üzere 4 farklı nükleotid vardır. Bir şeker molekülü ve bir bazın oluşturduğu yapıya ise nükleosit denir. Bu nedenle bir nükleotide deoksinükleosit trifosfat veya kısaca nükleosit fosfat da denilmektedir.

2. Şekerin 5 karbon halkalı yapısında bazın bağlandığı karbon atomu sürekli olarak 1' karbon atomudur. Şekerin karbon halkasında bu bağlantı noktasından itibaren saat yönünde döndükçe 2', 3', 4' ve 5' karbon atomları vardır (Şekil 12.1). Şekerin karbon atomuyla bazlara ait karbon atomunun halkasal yapılarının karıştırılmaması için prime veya üssü olarak (') şeklinde gösterilmektedir. Ayrıca, buradaki baz kelimesini kimya literatüründeki 'alkali' anlamındaki baz ile karıştırmamak gerekir. Çünkü bu bazlar 'temel' anlamındaki bazlardır.
3. Bir zincirde şekerin 5' karbon atomuna sürekli olarak fosfat grubu bağlanır. Yine bir polinükleotid zincir üzerinde bir nükleotidin fosfat grubu diğer nükleotidin şekerinin 3' karbon atomuna fosfodiester bağlarla bağlanır (Şekil 12.1, sol zincirde aşağıdan yukarıya, sağ zincirde yukarıdan aşağıya). Fosfat negatif (-) değerli olduğundan DNA molekülü de bu nedenle negatif yük kazanmaktadır. Bu özellik molekülün yeni bağlar oluşturması ve özellikle enzimlerle kesilmiş DNA parçalarının elektroforezisi sırasında pozitif kutba gitmeleri açısından önemlidir. Bu şekilde (5'-3'-5'-3' bir zincirde, 3'-5'-3'-5' diğer zincirde) polinükleotid zincir devam eder. Yani, her bir zincirde uç gruplar bir ucta 5'-fosfat (5'-P), diğer ucta 3'-hidroksil (3'-OH) grubu olarak bulunur (Şekil 12.1a).
4. Azotlu bazlar pürin (çift karbon halkalı; adenin ve guanin) veya pirimidin (tek karbon halkalı; timin, sitozin ve urasil) bazlarından oluşmuştur. Pürin ve pirimidinler canlılarda sadece serbest baz şeklinde değil, nükleosit ve nükleotid şekillerinde de bulunurlar. DNA'da pürin ve pirimidin birlikteliğini 'zayıf hidrojen bağları' sağlamaktadır. Adenin ile timin arasında 2, guanin ile sitozin arasında 3 hidrojen bağı bulunur. Aslında bu tür bir eşleşme rastlantı değil bazların stereo-kimyasal yapılarına bağlı bir zorunluluktan kaynaklanmaktadır. Sarmalın kararlılığı ise bazların kendilerine ait hidrofobik özellikten kaynaklanan çekim güçleri vasıtasıyla sağlanmaktadır. Bu özellik molekülün dış kısmının sıvı ortam ile ilişkisini sağlar ve bazların bir arada tutulmasını devam ettirir. Ayrıca, zayıf H bağları da ilave bir dayanıklılık kazandırır. Guanin ile sitozin arasındaki 3 hidrojen bağı, guanin ve sitozince zengin bir çift zincirli DNA polinükleotidinin daha stabil olmasını sağlar.

(a)



(b)



Şekil 12.1. DNA ve RNA molekülünün yapısı: a) çift zincirli ve her zincirde 3 nükleotid bulunan bir DNA molekülünün yapısı (Moore ve ark., 1995'ten değiştirilmiştir), b) iki nükleotidli bir RNA molekülünün (solda) ve urasilin yapısı (sağda) (Stryer, 1988'den değiştirilmiştir).

5. DNA molekülünde A+G molar konsantrasyonu T+C molar konsantrasyonuna eşittir. Yani $A+G/T+C=1$ 'dir. $A+T/G+C$ oranı ise büyük çoğunlukta 1'e eşit değildir. Bu oranın yüksek yapılı canlılarda daima ≥ 1 şeklinde olması beklenir. Tablo 12.1'de bazı örnekler verilmiştir.

Tablo 12.1. Bazı bitki ve mikroorganizmaların DNA'larındaki baz eşitlikleri (Lehninger, 1976; Nelson ve Cox, 1993; Hartl, 1994; Stryer, 1995).

Canlı	Baz Kompozisyonu (% Mol)				Asimetrik Oran		
	A	T	G	C	A/T	G/C	A+T/G+C
Buğday	27.3	27.1	22.8	22.7	1.01	1.00	1.19
Mısır	26.8	27.2	22.8	23.2	0.98	0.98	0.96
Maya	31.3	32.9	17.1	18.7	0.95	1.09	1.79
İnsan	29.8	31.8	20.2	18.2	0.93	1.10	1.60
Küf mayası	25.0	24.9	25.0	25.1	1.00	1.00	1.00
<i>E. coli</i>	24.7	23.6	25.7	26.0	1.04	1.01	0.93
<i>B.faj</i> ϕ x174	26.3	26.4	22.3	22.3	1.00	1.00	1.18

12.2.2.1.1. Pürinler

Pürinler (adenin ve guanin) nükleik asitlerin temel bileşenleridir. Bunun yanında pürinler bazı canlılarda N-metillenmiş bazlar halinde, insanlık için farmakolojik öneme sahip olan theobromin, kafein, teofilin ve kakao şeklinde de bulunurlar. Bunlardan başka, özellikle zeatin ve N^6 -(trans-4-hidroksi-3-metil-2-enil)-2-metiloadenin formunda adeninin türevleri olarak sitokinin etkili bitki büyüme hormonları şeklinde de bulunurlar (Brown, 1998).

Pürinler *de novo* nükleotid seviyesinde sentezlenirler. DNA sentezi için de pürinlerin mutlaka deoksinükleotid şekline getirilmesi gerekmektedir. Bu mekanizmayla ilgili olarak bitkisel kaynaklardan tam bir sonuç alınamamış olmasına rağmen hayvanlarda ve bakterilerdeki mekanizma aydınlatılmıştır. *E. coli*'de indirgenme difosfat seviyesinde yapılmaktadır. Bu reaksiyon bir çoklu-enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. Deoksinükleotid oluşumunu gerçekleştiren maddelerden birisi, ısıya dayanıklı ve hafif asidik olan tioredoksin adlı 12.000 Dalton (Da) ağırlığındaki bir ditiol proteindir. Diğeri ise, iki alt birimden oluşan ve Mg^{++} gereksinimi olan difosfat ribonükleosit redüktazdır (Goodwin ve Mercer, 1988; Brown, 1998).

Birçok pürin nükleotidi canlıların metabolizmasında oldukça önemli rollere sahiptir. ATP-, NAD-, FAD-, GTP- ve ADP-glikoz gibi şeker nükleotidleri bunlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca, halkasal nükleotidler (c-AMP, c-GMP, c-IMP)

canlılardaki hücresel haberleşmede ikincil haberci (second messenger) olarak görev yapıp metabolizmanın düzenlenmesinde ve nükleik asit ve protein biyosentezinde önemli roller oynarlar (Konuk ve Turan, 2000).

12.2.2.1.2. Pirimidinler

Nükleik asitlerin bileşeni olan pirimidinler sitozin, timin ve urasildir. Fakat metillenmiş-sitozin de oldukça yaygın bir bileşiktir. Bazı bitkilere özgü visin, konvisin, spongotimidin ve ψ -uridin (tRNA'nın bir bileşeni) gibi pirimidinlerin yanında amino asit eklenmiş olarak da doğada pirimidinlere rastlamak mümkündür (örnek: willardiine, izowillardiine, lathirine). Bunlardan başka doğal olarak bitkilerde rastlanan pirimidin türevlerinden birisi de tiamin (Vitamin B₁)'dir (Brown, 1991; Brown, 1998).

Pirimidinlerin biyosentezinde ilk olarak amonyak ve karbondioksitin birleşmesiyle karbomil fosfat oluşur. Buradan itibaren 6 adım sonra pirimidin halkasına sahip olan orotik asit yapılır. Şeker fosfatların orotik aside ilavesi ve oluşan bu yapıdan karbondioksitin uzaklaştırılmasıyla üridin monofosfat (urasil monofosfat, UMP) *de novo* sentezlenmiş olur. UMP artık diğer pirimidinlerin öncül molekülüdür. Sitozin ve timin bundan sentezlenerek pürinlerde olduğu gibi deoksijenasyon işleminden geçirilerek DNA için hazır moleküller haline gelirler (Brown, 1998).

12.2.2.2. DNA'nın fiziksel yapısı

Watson ve Crick (1953)'e göre DNA molekülü iki poli-deoksiribonükleotid zincirinin yan yana, tıpkı iki örgü ipliğinde olduğu gibi birbirini üzerine bükülmesiyle oluşan bir sarmal şeklindedir. DNA bu yapısıyla bir yangın veya minare merdivenine benzetilebilir. Bu benzetimede bazlar merdivenin basamaklarını, şeker ve fosfatlar da duvarları oluşturmaktadır. DNA'nın bazı fiziksel özellikler şöyledir (Darnell *ve ark.*, 1990; Hartl, 1994; More *ve ark.*, 1995; Lewin, 1998; Nelson ve Cox, 2000; Lodish *ve ark.*, 2000):

1. Canlılardan bugüne kadar tespit edilen fiziksel DNA molekülü tipleri A-DNA, B-DNA, Z-DNA, C-DNA, D-DNA ve E-DNA'dır. Doğada en çok rastlanılan ve Watson-Crick tarafından açıklanan tip B-DNA'dır (Şekil 12.2a,b) (Tablo 12.2). Uzun eksen boyunca her iki nükleotid (iki basamak) arasındaki mesafe 3.4 Å'dur. DNA molekülü tam bir dönüş yaptığında, bu dönüşü tamamlayan 10.4 nükleotid çifti bir arada bulunmaktadır. Dolayısıyla, 35.4 Å'luk aralıklarla tam bir dönüş yapılmaktadır (Şekil 12.2a). A- ve B-DNA'nın izolasyonu sırasında, daha kuvvetli dehidrasyon koşulları oluşturulduğunda, C-DNA tipi elde edilir. C-DNA'daki her bir tam dönüşteki nükleotid çifti sayısı 9.3'tür. Buna bağlı olarak daha sıkı (kapalı) bir yapı göstermektedir. C-DNA'nın sarmal çapı da 19 Å olarak bulunmuştur. D-DNA'nın her bir tam dönüşünde 8, E-DNA'da ise

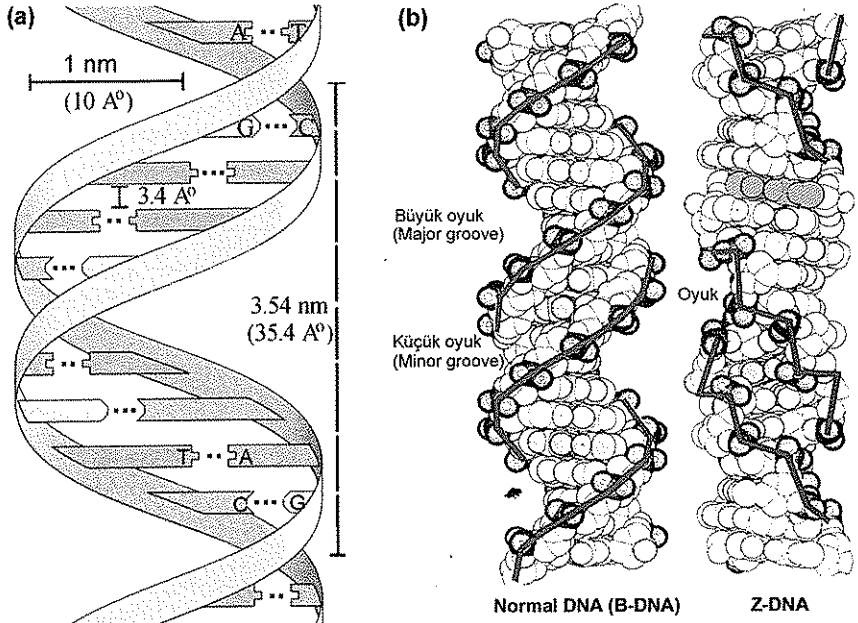
7.5 baz çifti bulunduğu gözlenmiştir. Z-DNA tipinde de bazı iç bölgelerdeki nükleotidler düzleme göre olan duruşlarında 180° 'lik bir açı oluşturmakta ve buna bağlı olarak da büyük ve küçük oyukların yapısında önemli değişiklikler meydana getirmektedir. Bu tipin kanserli hücrelerde görülmesi de oldukça ilginçtir. DNA'nın bu kadar farklı formunun bulunuşu, onun oldukça dinamik ve esnek bir molekül olduğunu da göstermektedir.

Tablo 12.2. En çok rastlanılan DNA tiplerinin karşılaştırılması (Stryer, 1995; Nelson ve Cox, 2000).

Özellikler	Sarmal Tipi		
	A-DNA ¹	B-DNA	Z-DNA
Şekli	Geniş	Orta geniş	Uzun
İki baz çifti arasındaki mesafe ($\text{\AA}$)	2.3	3.4	3.8
Sarmal çapı ($\text{\AA}$)	25.5	23.7	18.4
Sarmal yönü	Sağa	Sağa	Sola
Sarmalın her bir dönüşündeki baz çifti sayısı	11	10.4	12
Sarmalın tam bir dönüş uzunluğu ($\text{\AA}$)	25.3	33.4	45.6
Baz çiftlerinin sarmal eksenine olan eğimi	19°	1°	9°
Büyük oyuk	Dar ve derin	Geniş ve derin	Düz
Küçük oyuk	Çok geniş ve sıg	Dar ve çok derin	Çok dar ve derin

- Dizilişte mutlaka belirli bazlar karşılıklı gelmek koşuluyla çiftler oluşturabilirler. DNA'da eşleşen nükleotidler birbirlerine paraleldirler. Fakat bir çift zincirli yapıda bağlanma sırası olarak bir zincir $5'-3'$ yönünde buna karşılık gelen (tamamlayıcı=komplementer) zincir ise $3'-5'$ yönünde sıralanmaktadır. Bu yönden iki zincir anti-paraleldir (Şekil 12.1). Başka bir ifadeyle kimyasal polarite yönünden iki zincir birbirine zıttır. Bununla birlikte DNA'yı oluşturan bazların normal düzleme göre farklı açılarda molekülün yapısına katılmaları söz konusu olabilmektedir. Şöyle ki; timin 50° , adenin 51° , sitozin 52° ve guanin ise 54° 'lik açılarla birbirine tutunmaktadır. Bu açı farklılıkları da molekülün makro yapısında görülen büyük oyuk (major groove) ve küçük oyuk (minor groove) adı verilen yapıların oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 12.2b).
- Doğada bu güne kadar yapısal olarak 4 farklı DNA tespit edilmiştir. Bunlar; a) sıkıca kapalı düz zincir, b) açık halkasal zincir, c) süper-kıvrımlı halkasal zincir ve d) Katena yapısındaki zincirdir. Herhangi bir DNA molekülünü bir kromozomdan bütün olarak çıkarmak oldukça zor olmakla birlikte, bakteri, virüs, mitokondri ve plastid DNA'ları kolayca bir bütün olarak elde edilebilir. Bu moleküller ikili sarmala ilave olarak daha fazla kıvrım göstererek (süper-kıvrımlı=super-coiled) halkasal, 'tersiyer' yapıyı oluştururlar. Bu yapının oluşturulmasında Topoizomeraz enzimleri görev almaktadırlar. Herhangi sıkı-

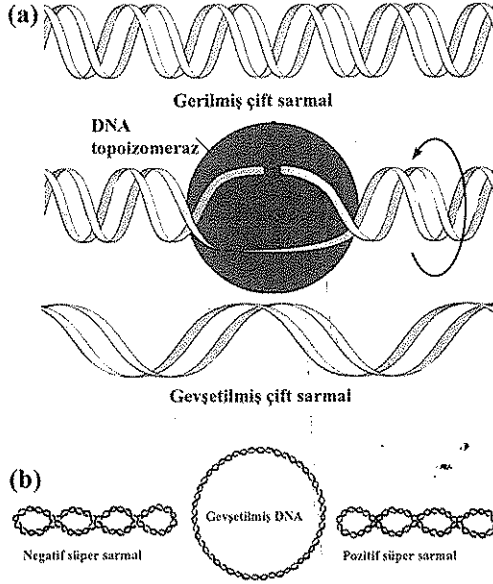
kıvrımlı bir DNA'nın bir bağı koparılarak onun gevşemesi veya açılması sağlanabilir. Buna 'nicking' (çentme, kırma veya koparma) denir.



Şekil 12.2. DNA'nın fiziksel yapısı a) B-DNA'da bazlar arası mesafenin şematik gösterimi (Moore ve ark., 1995'ten değiştirilmiştir), b) B- ve Z-DNA'nın yapısı ve büyük-küçük oyuklar (Darnell ve ark., 1990'dan değiştirilmiştir).

4. *DNA'nın süper kıvrımlılığı:* DNA'nın süper kıvrımlı (superhelicity veya supercoiled) hali, ilk defa SV40 ve polyoma virüslerinin küçük DNA moleküllerinin sedimentasyon analizi ile incelenmesi esnasında elektron mikroskobu çalışmaları ile gözlenmiştir. Çoğu doğal olarak ortaya çıkan DNA molekülü negatif süper sarmalıdır. DNA'nın süper kıvrımlı yapısını, bağlanma sayısı, kıvrım ve büküm sayısı belirlemektedir. Bağlanma sayısı, sarmaldaki bir şeridin diğeri ile ilişkili olduğu sayıyı ifade etmektedir. Büküm sayısı da bir şeridin diğeri üzerine oluşturduğu tam dönüşleri ifade etmektedir. SV40 süper sarmalında her bir büküm yaklaşık olarak 10.6 baz çifti içermektedir. DNA kıvrım yönü bakımından negatif veya pozitif kıvrımlı olabilmektedir (Şekil 12.3a). Negatif süper kıvrımlı oluşum DNA'da zincirlerin ayrılması işlemine öncülük etmektedir. DNA'nın süper-kıvrımlı olmasında topoizomerez enzimleri rol oynamaktadır (Şekil 12.3b). Bu enzimlerin bir kısmı hiç şüphesiz DNA replikasyonu ve transkripsiyon işlemlerinde de rol oynamaktadır. Çeşitli canlı gruplarından da birkaç tip topoizomerez enzimi elde edilmiştir. Bunlar Tip I ve Tip II topoizomerezlerdir (bkz. Tablo 12.3). Tip I topoizomerezler

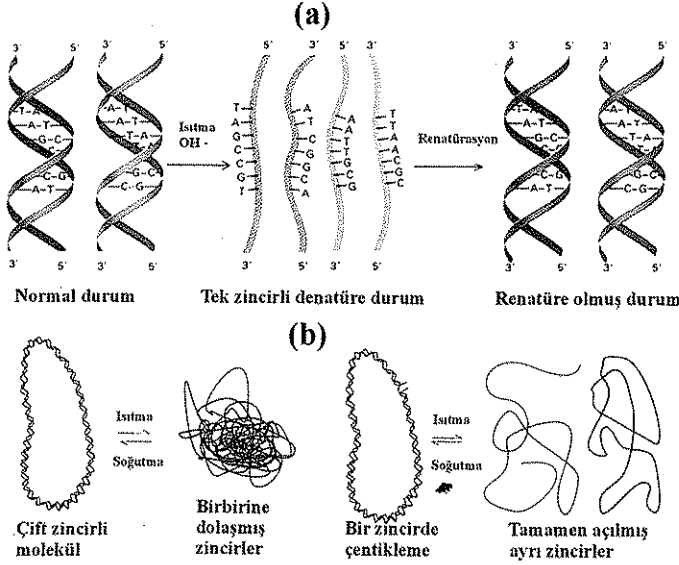
DNA'nın bir şeridini, Tip II enzimler ise her iki şeridi de kesebilmektedir. Topoizomerazlar 3 aşamalı bir işlemi katalizleyerek DNA'nın bağlanma sayısını değiştirmektedirler (Stryer, 1995).



Şekil 12.3. DNA'da süper kıvrınlık a) topoizomerazlarca gevşetme (Moore ve ark., 1995'ten değiştirilmiştir), b) negatif ve pozitif süper sarmalın yapısı (Stryer, 1995'den değiştirilmiştir).

- Derişik CsCl veya CsSO₄ çözeltilerinde santrifüj yardımıyla ya da 90-95 °C'de ısıtılırsa, DNA sarmalının kolları açılabilir. Buna DNA'nın denatürasyonu denir (Şekil 12.4). Bu açılma ve zincirlerin birbirinden ayrılması aralarında 3 hidrojen bağı bulunan G-C nükleotidlerinin daha fazla olduğu bir DNA molekülünde, A-T sayısı fazla olana göre daha yavaş olabilmektedir. Erime noktasına kadar ısıtılıp denatüre edilen DNA molekülü içeren çözelti, yavaş yavaş soğutulup 20 °C'de uzun süre tutulacak olursa DNA tekrar eski haline gelir ve sarmalı oluşturur. Buna da DNA'nın renatürasyonu denilmektedir (Şekil 12.4a). Isıtılarak denature edilen DNA eğer hızlıca buz sıcaklığına (0 °C) soğutulacak olursa, iki polinükleotid şeridi ayrı ayrı kalır. Bu durum zincirlerin çeşitli analiz metotlarında (örnek: Southern Blotting ve melezleme) kullanılmaları açısından oldukça önemlidir. Halkasal DNA molekülünde denatürasyon ve renatürasyon ise çentiklenmemiş veya çentiklenmiş olma durumuna göre (örnek: kloroplast DNA'sı veya bakteri plazmid DNA'sı) farklı davranış sergilemektedir. Eğer DNA kapalı halka yapıda ise denatüre olduğunda çift sarmal yapı bozulmakta fakat ayrılan zincirler birbirine dolaşıp

ayrılmamakta (Şekil 12.4b, solda), bir veya her iki zincirde yapılan bir çentikleme (nicking) ise zincirlerin birbirinden tamamen ayrılmasını sağlamaktadır (Şekil 12.4b, sağda) (Lodish ve ark., 2000).



Şekil 12.4. DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu, a) normal çift sarmalda, b) halkasal DNA'da (Lodish ve ark., 2000'den değiştirilmiştir).

12.3. DNA Sentezi ve Replikasyonu

Nükleotid yapımı için gerekli moleküllerin yapımı da dahil yeni DNA zincirlerinin oluşturulması işlemine bir bütün olarak DNA sentezi (DNA synthesis) adı verilmektedir. DNA replikasyonu veya kromozom replikasyonu ise aynı zamanda başlama ve sonlanma terimlerini de içermektedir. Bu konuda iki durum ortaya çıkmaktadır; 1) DNA sentezinin bir hücrenin hayat döngüsünün hangi bölümünde gerçekleştiği ve ne kadar zaman aldığı, 2) DNA replikasyonunun şekli ve oluşumudur (Kornberg ve Baker, 1992; Stryer, 1995).

Ökaryotik hücrelerde bir hücrenin hayat döngüsünün (interfaz-mitoz-sitokinez) en uzun safhası olan interfazda, DNA sentezinden (S alt devresi) önce ve sonra iki farklı aralık bulunmaktadır (G_1 =birinci boşluk, G_2 =ikinci boşluk). G_1 alt devresi türlere göre en değişken devredir. Bu alt devrede, S alt devresinde üretilen DNA için gerekli nükleotidler sentezlenmektedir (Moore ve ark., 1995). Bu durum çok hızlı bölünen mikroorganizma hücrelerinde bile (örnek: *Saccharomyces cerevisiae*) gerçekleşmekte ve devamlı olarak korunmaktadır. Fakat bazı istisnalar görülebilmektedir. Örneğin, *Drosophila* embriyogenesinde çekirdek bölünmesi 10-

15 dk içerisinde tamamlanmakta ve döllenmiş yumurtanın ilk 12 bölünmesinde bu boşluklar (G_1 , G_2) görülmemektedir.

Bilindiği gibi bazı bakteriler optimum şartları buldukları zaman 20-30 dakikada bir bölünmektedir. Bu süre çift zincirli halkasal bir DNA molekülünün (plazmid DNA gibi) baştan başa bölüneceği süreye de denk gelmektedir (Streyer, 1995). Bunun anlamı DNA sentezi tamamlanır tamamlanmaz hücre de ikiye bölünmektedir. Buna karşılık kışın hücre hayat döngüleri belirli bir süre durdurulan (kış dormansisi) bitkilerde G_1 aylar boyunca sürebilmektedir. İlkbaharda hücreler tekrar aktif hale gelince döngü kalınan yerden tekrar başlatılmaktadır. Buna karşılık değişime uğrayarak çeşitli şekillerde özelleşmiş hücreler sürekli olarak G_1 alt devresinde dormant durumda kalmakta ve ancak yaralanma, enfeksiyon vb. uyarılar ortaya çıkınca DNA sentezi için hazırlıklar başlatılmaktadır (Moore ve ark., 1995). Yani bölünmenin olmadığı hücreler genellikle G_1 alt devresindeki pozisyonda kalmaktadırlar. Fakat kültüre alınmış memeli hücrelerinde yapılan füzyon deneyleri, hücrelerin hayat döngüsünün değişik kısımlarında da DNA sentezi için hazır olabileceklerini göstermiştir. Eğer G_1 fazındaki bir hücre S fazındaki bir hücreyle kaynaşmışsa (füzyon), DNA sentezine hemen başlamaktadır. Bu çalışmaya göre, G_1 fazındaki hücrede de DNA sentezi için hiçbir engel bulunmamaktadır.

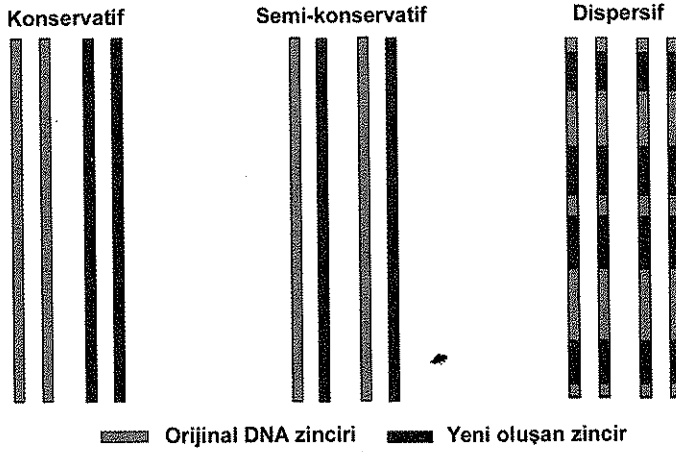
DNA sentez işleminden sonra yeni replike olmuş kromatin kademeli olarak bükülmeye ve yoğunlaşmaya başlar. G_2 safhasında ise hücre mitotik mikrofibrillerin, kromozomların işlenmesi ve hücre zarının eritilmesi için gerekli proteinleri yaparak mitoz için hazırlıkları bitirir. Mitozda profaz, metafaz, anafaz ve telofaz alt safhaları gerçekleştikten sonra sitokineze hücre bölünür. Yeni oluşan iki yavru hücre eğer tekrar bölünecekse yukarıda verilen döngü yeniden başlatılır.

Hücre bölünmesi (mitoz), yeni hücrelerin orijinal kalıtsal materyal ile tıpa tıpa aynı kalıtsal materyal içermelerini sağlamaktadır. Bitkilerde veya insanda 2 haploid ($n+n$) hücrenin birleşmesiyle tam ($2n$ =diploid) bir hücre olan zigot oluşur. İşte bu zigot hücrenin DNA'sı içerik olarak canlının ölümüne kadar aynı şekilde korunmaktadır. Bir insandaki hücre tamiri olayları hariç tutulacak olursa, ergin hale gelinceye kadar zigottaki kalıtsal materyalin mitoz bölünme ile 60-100 trilyon kopyası yapılmaktadır. Bitkilerde de durum aynıdır. İşte, bir canlının bütün hücrelerindeki kalıtsal materyalin hiç değişmeden korunup, kopyasının yapılması olayı DNA molekülünün kendisini eşlemesi yeteneği ile gerçekleştirilmektedir. DNA molekülünün kendi kendini eşlemesine yani kendisinin bir kopyasını yapmasına DNA'nın replikasyonu, DNA'nın duplikasyonu, DNA'nın reduplikasyonu veya DNA'nın kendini eşlemesi denilmektedir.

12.3.1. DNA'nın replikasyonu

DNA'nın replikasyonu son 40 yıldır üzerinde en çok çalışılan konulardan birisidir. Watson-Crick modeline göre oluşan iki yeni DNA molekülü eski iki zincirden

sentezlenmekteydi. Bu açıklama gerçi genetik bilginin nasıl kopyalandığını ve çoğaltıldığını izah etmekteydi, fakat burada şu soruyu akla getirmekteydi; Eşlenme tam korunumlu (muhafazakar) mı yoksa yarı-korunumlu mu gerçekleşmektedir? Bu güne kadar DNA'nın kendini eşlemesinin şekli konusunda çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Bunlar; *Konservatif (korunumlu) teori*, *Semi-konservatif (yarı-korunumlu) teori* ve *Dispersif (dağınık, rasgele) teori*'dir (Şekil 12.5).



Şekil 12.5. Çeşitli teorilere göre DNA replikasyonu

Konservatif teoriye göre, DNA molekülü hiç bir şekilde işe karışmadan kendisinin bir kopyası sentezlenmektedir. Bu teori DNA'nın sadece kalıp olarak kullanıldığını, sanki bir aynadaki görüntü gibi kendisinin kopyasının yapıldığını savunmaktadır.

Semi-konservatif modelde, DNA molekülü kendisini eşlerken sarmalı oluşturan zincirler birbirinden ayrılmakta ve ayrılan zincirlerin karşısına ana zincirdeki şifreye göre yeni zincirler sentezlenmektedir. Böylelikle oluşan iki DNA molekülünün birer şeridi ana (orijinal) DNA molekülüne ait olmaktadır. Bundan dolayı da yarı-korunumlu eşlenme olarak ifade edilmektedir.

Dispersif teoriye göre ise; yeni sentezlenen DNA molekülünde yer yer hem eski DNA hem de yeni DNA molekülünden parçalar bulunmaktadır. Yani, DNA sentezlenirken eski DNA'nın bir parçası kopmakta ve bu parça yeni sentezlenen DNA parçası ile devam etmektedir.

Replikasyonun şekli konusunda en ciddi ilk çalışma Meselson ve Stahl (1958) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, *E. coli* basiliini radyoaktif etiketli azot içeren bir ortamda ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) 14 generasyon boyunca çoğaltıp her generasyonda sentezlenen DNA'larda ^{15}N etiketlerinin takibini yapmışlardır. Bu denemenin benzeri fasulye tohumlarının çimlenmesi sırasında kök hücrelerine DNA sentezi sırasında ^3H

işaretli timin verilerek tekrarlanmıştır. İşaretli timin verilmesi kesildikten sonra normal timin ilave edilerek DNA sentezi beklenmiş ve kromozomlardaki kromatidlerin birisinin işaretli timin, diğerinin ise işaretlenmemiş timin içerdiği gözlenmiştir. Her iki sonuç da DNA molekülünün replikasyonunun semi-konservatif şekilde olduğunu ortaya koymuştur Bugün en çok kabul gören teori budur (Şekil 12.5).

12.3.1.1. DNA replikasyonunun başlaması ve yönü

En çok kabul gören model olan semi-konservatif replikasyonla ilgili olarak birkaç molekül mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlardan en basit olanına göre; yeni bir polinükleotid zinciri bir orijinden, diğeri de öbür orijinden kaynaklanmaktadır. Buna göre, her bir büyüme noktasından sadece birer zincir büyümektedir. Bu mekanizma uzun ve düz DNA moleküllerinde, [DNA virüsleri gibi (adenovirüs)], görülen bir çoğalma şeklidir. Bu gibi durumlarda DNA moleküllerinin son uçları sentezin başlangıç ve sonuç kodlarını içeren birer özel bölge olarak fonksiyon görmektedir (Kornberg ve Baker, 1992; Stryer, 1995; Nelson ve Cox, 2000).

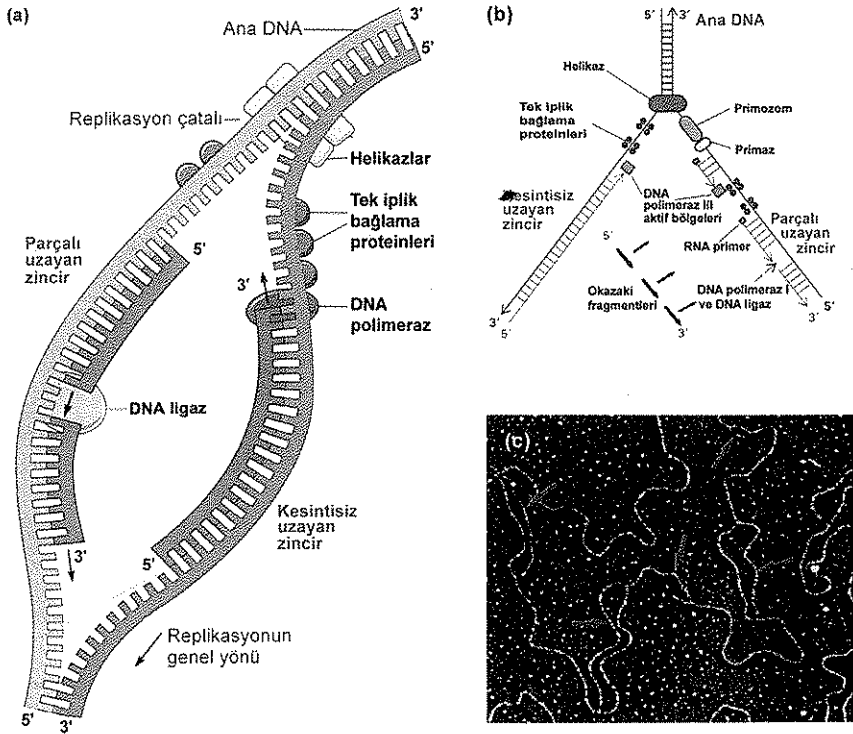
İkinci mekanizmaya göre replikasyon, bir bölgede başlamakta ve her iki zincirin kopyalanması aynı yönde ilerleyerek 'bir orijin' ve 'bir büyüme çatalı' oluşturacak şekilde devam edip sentez tamamlanmaktadır.

Üçüncü mekanizmaya göre ise, sentezlenme işlemi bir noktadan başlayıp her iki yöne doğru ilerlemektedir. Böylelikle iki şeridin kopyalanması iki yönlü devam etmektedir. Bunun neticesinde de 'iki sentez yönü' ve 'iki büyüme çatalı' oluşmaktadır (Şekil 12.6a,b). Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular bu şekildeki replikasyonun daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur (Zubay, 1993; Stryer, 1995).

Halkasal DNA'ya sahip canlılarda ise sentez bir noktadan başlamakta ve iki yönlü olarak devam etmektedir. İki büyüme çatalında devam eden her iki iplikçiğin sentezi sona vardığında çataların birleşmesiyle bitmekte ve iki yeni halkasal DNA molekülü ortaya çıkmaktadır.

Bitkilerde DNA replikasyonunun başlatılması henüz tam olarak anlaşılamayan bir takım sinyal molekülleri ile kontrol edilmektedir. Her büyüme çatalında bir tane yeni sentezlenen iplikçik oluşmaktadır. Bu iplikçiğe uzayan iplikçik (=leading strand) adı verilmekte ve kesintisiz olarak 5'→3' yönünde uzamaktadır. Diğer yeni şeridin oluşumu ise kesintili, kısa segmentler halinde olmakta (=lagging strand) ve yine 5'→3' yönünde olmaktadır. Bu segmentler daha sonra da DNA ligaz enzimi tarafından birleştirilmektedir (Şekil 12.6a,b). Elektron mikroskobu çalışmalarında ise replikasyonun her iki zincirde de aynı anda başladığını ve hava kabarcıkları şeklinde görünümüler oluştuğunu ortaya koymuştur (Şekil 12.6c) (Stryer, 1995; Lodish ve ark., 2000).

Uzayan DNA iplikçığı için sentezlenen primer ana DNA'dan sentezlenmektedir. Primer ise bir oligo-nükleotid (4-12 nükleotid) olan RNA molekülüdür. Bu primerlerin açık kalan ucuna DNA polimeraz tarafından DNA nükleotidleri eklenmekte ve 5'→3' yönünde sentez devam etmektedir. RNA ve DNA içeren bu kısa iplikçikler Okazaki fragmentleri olarak adlandırılmaktadır (Reiji Okazaki tarafından keşfedildikleri için bu şekilde adlandırılmaktadır) (Şekil 12.6b). DNA sentezi sırasında, Okazaki fragmentlerinin olduğu iplikçik polimeraz etrafında kıvrılmakta ve diğer iplikçik ise düz bir hat şeklinde uzamasına devam etmektedir. Böylece, eklenecek deoksिनükleotidler de uygun yere daha çabuk eklenebilmektedir. Ayrıca bu kıvrım nükleotid eklenecek kısmı katalitik bölgeye daha yakın tutmakta ve işlemi hızlandırmaktadır (Darnell *ve ark.*, 1990; Lodish *ve ark.*, 2000).



Şekil 12.6. DNA replikasyonunu: (a,b) iki yönlü başlaması, ilerlemesi ve enzimler (a) Moore *ve ark.*, 1995'ten, (b) Stryer 1988'den değiştirilmiştir, (c) DNA'da replikasyon bölgelerinin elektron mikroskobu görüntüsü (Darnell *ve ark.*, 1990'dan değiştirilmiştir).

Her bir segment uygun bir Okazaki fragmentinin 5' ucuna yaklaştığında, DNA polimeraz burada 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi göstererek RNA'dan oluşan primeri koparmaktadır. Hemen sonra boş kalan bölge (primerden arta kalan yer) deoksिनükleotidlerce polimeraz enziminin aktivitesiyle doldurulmaktadır. Daha

sonra DNA ligaz uygun parçacıklarını birbirine ekleyerek sentezi tamamlamaktadır (Şekil 12.6a,b).

12.3.1.2. Replikasyon enzimleri

Genel olarak DNA ile ilgili bir çok enzim tespit edilmiştir. Bu enzimler a) replikasyon enzimleri ve topoizomerazlar, b) restriksiyon ve modifikasyon enzimleri, c) rekombinasyon ve tamir enzimleri olarak gruplara ayrılabilir (b ve c grubundaki enzimler ileriki bölümlerde verilmiştir).

DNA replikasyonunun başlamasından sonuna kadar bir çok enzim görev yapmaktadır. *E. coli*'de DNA replikasyon mekanizması bütün detayları ile ortaya çıkarılmış olup, bu olayda rol alan yaklaşık 20 kadar protein veya enzim tespit edilmiştir. Ökaryotik hücrelerde ise çalışmalar daha yavaş ilerlemekle birlikte, büyük ölçüde benzerlikler göstermektedir. Replikasyonda görev alan enzimler Tablo 12.3'de verilmiştir. Bu enzimler genel olarak replikasyona hazırlayıcı, replikasyonu başlatıcı, yürütücü ve sonlandırıcı olarak çeşitli görevlerde bulunmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri DNA polimerazlar ve DNA ligaz'dır (Lodish ve ark., 2000) (Tablo 12.3).

12.3.1.2.1. DNA polimerazlar ve DNA ligaz

DNA polimerazlar DNA senteziyle ilgili olarak ilk keşfedilen enzimlerdir. Bu enzimler deoksिनükleositlerin tri-fosfat formlarını DNA'ya ekleyerek onun uzamasını sağlayan enzimlerdir. Bunlar ancak bir kalıp molekül olduğu zaman bu işi gerçekleştirebilmekte ve Watson-Crick baz çifti eşleşmesine uygun sentez gerçekleştirmektedirler. İlk defa *E. coli*'den elde edildikten sonra diğer organizmalardan da saflaştırılmışlardır. Fonksiyonel olabilmeleri için mutlaka 3'-OH'ı serbest olan bir primere ihtiyaç duymaktadırlar (West, 1992; Stryer, 1995).

E. coli'den üç farklı tipte DNA polimeraz (Pol I, Pol II ve Pol III) enzimi elde edilmiştir. DNA polimeraz III enzimi sıcaklık yükseldiği zaman sentezi durdurucu olarak faaliyet göstermektedir. Büyüme çatalında da sentezi sağlayan fonksiyonel bir enzim olarak çalışmaktadır. DNA polimeraz I enzimi ise DNA tamiri sırasında boşlukları dolduran enzimdir. DNA polimeraz II'nin gerçek fonksiyonu ile ilgili kesin bilgilerin olmamasına rağmen, bu enzimin kimyasal ve fiziksel etkilerle DNA'da oluşan hasarların giderilmesinde rol oynadığı sanılmaktadır. *E. coli*'den DNA polimerazlar saflaştırıldıktan yıllar sonra, bunlara ilave olarak memeli hücrelerinden dördüncü bir DNA polimeraz enzimi olan Polimeraz δ izole edilmiştir (Darnell ve ark., 1990; Lodish ve ark., 2000).

DNA Pol III'ün şablon olacak DNA'ya bağlandıktan sonra ayrılması pek kolay olmamaktadır. Primere 20 kadar nükleotid ilave ettikten sonra Pol I ve Pol II enzimleri Pol III'e bağlanmaktadır. Pol III enzimi uygun koşullar altında, *in vitro*

şartlarda 500 nükleotid, *in vivo* koşullarda ise bir saniyede 1000 nükleotidi bağlayabilmektedir.

Tablo 12.3. DNA replikasyon enzimleri ve topoizomerazlar (Darnell *ve ark.*, 1990; Roberts, 1992; Hartl, 1994; Lewin, 1998; Nelson ve Cox, 2000; Lodish *ve ark.*, 2000).

Enzimler	Fonksiyonları
Helikazlar (Helicases)	DNA sarmalını açarak zincirlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan ve hidrojen bağlarını kıran proteinlerdir.
Tek Zincir Bağlama Proteinleri (Single Strand Binding Proteins)	DNA Helikazlarla ayrılan tek şeridin dengesini sağlayan ve DNA'ya tetramer olarak bağlanan proteinlerdir. Bu proteinler ayrılmış zincirlerin replikasyon sırasında tekrar birleşmesini önlerler. Tekrar sarmal yapıya dönmeye yardımcı olurlar ve replikasyonun hızını artırır.
DNA Polimerazlar (Polymerases)	Polimerazlar ilk tespit edilen ve en iyi tanımlanan enzimlerdir. DNA Pol I 5'-3' yönünde uzamayı (polimeraz aktivitesi); 3'-5' ekzonükleaz aktivitesini (düzeltme, doğrulama işlemi) ve 5'-3' ekzonükleaz (tamir aktivitesi) işlemini yapmaktadır. DNA Polimeraz III 5'-3' polimeraz fonksiyonunu yerine getiren enzimdir (bkz. Bölüm 12.3.2)
DNA Polimeraz I (Pol I)	
DNA Polimeraz II (Pol II)	
DNA Polimeraz III (Pol III)	
Primaz (Primase)	Başlangıç bölgesinde serbest 3' hidroksil grubuna olan gereksinimi karşılayan RNA primerleri bu enzim tarafından sentezlenmektedir.
DNA Ligaz (DNA Ligase)	Yeni yapılan molekül uçtan uca bir bütün halinde üretilmediğinden ayrı ayrı sentezlenen parçaları birbirine kovalent fosfodiester bağlar oluşturarak (3'-OH-5'-fosfat gruplarını) DNA ligaz enziminin bağlar.
DNA Giraz (Gyrases) (Topoizomeraz II)	Bu enzim DNA'nın her iki şeridini de birden kesmekte, Katena oluşumu ile bunun bozulmasını da katalizlemektedir. Böylelikle farklı DNA moleküllerinin bağlantısını oluşturmada veya bu oluşumu bozmaktadır. Yine negatif süper sarmal oluşumunu katalize etmektedir. Bu da DNA sarmalının dönerek açılmasına yardımcı olmaktadır.

Polimerazlar DNA'nın sentezi sırasında 1/10.000 oranında yanlış nükleotid yerleştirmektedir. Bu da kabul edilemeyecek seviyede bir hata oranı olarak kabul edilmektedir. DNA Pol I ve III'ün her ikisi de 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahip (Tablo 12.4) olduğundan bu enzimler ekzonükleaz (Tablo 12.5) aktiviteleriyle yanlış yerleştirilmiş olan nükleotidleri yerinden çıkarılmakta ve doğru olanlarıyla

değiştirmektedirler. Böylelikle, düzeltme işlemiyle hata oranı 1/1.000.000 veya daha az bir seviyeye indirilmektedir. *E. coli* ve memeli hücrelerindeki DNA-polimeraz enzimlerinin karşılaştırmalı aktiviteleri Tablo 12.4'te özetlenmiştir (Lodish ve ark., 1998).

Replikasyon sonucu yeni yapılacak DNA molekülü uçtan uca bir bütün halinde üretilmediğinden ayrı ayrı sentezlenen DNA parçaları birbirine kovalent fosfodiester bağlar oluşturarak (3'-OH-5'-fosfat gruplarını) DNA ligaz enziminin bağlanır (Şekil 12.6a,b). Bu enzim rekombinant DNA üretiminde de en çok kullanılan enzimlerden birisidir (bkz. Bölüm 12.4, Tablo 12.5)

Tablo 12.4. Ökaryotik hücreler ve *E. coli*'den elde edilen DNA-polimerazların karşılaştırmalı bazı özellikleri (Roberts, 1992; Nelson ve Cox, 2000; Lodish ve ark., 2000).

Organizma	Polimerazlar			
Ökaryotik hücreler	I	II	III	δ
5'→3' polimerizasyon yönü	+	+	+	+
3'→5' ekzonükleaz aktivitesi (düzeltme fonksiyonu)	+	-	-	+
RNA primerinden sentezlenmesi	+	-	-	+
DNA primerinden sentezlenmesi	-	-	+	+
Çekirdekte bulunma durumu	+	+	-	+
Mitokondride bulunma durumu	-	-	+	-
<i>E. coli</i>	I	II	III	-
5'→3' polimerizasyon yönü	+	+	+	-
3'→5' ekzonükleaz aktivitesi	+	+	+	-
5'→3' ekzonükleaz aktivitesi	+	-	-	-
Primerli tek zincirden sentezlenmesi	+	-	-	-
Bir dakikada <i>in vitro</i> 'da ilave edilen nükleotid sayısı	600	?	30.000	-
Hücrede mevcut molekül sayısı	400	?	10-20	-

12.3.1.2.2. Diğer replikasyon enzimleri

Replikasyonda rol oynayan polimerazlar dışındaki diğer bütün proteinler bazen replizom olarak da adlandırılmaktadır. DNA polimerazlar her ne kadar replikasyon için en gerekli enzimler olsalar da, bir büyüme çatalının oluşması için tek başlarına yeterli değildirler. Örneğin, *E. coli*'den saflaştırılan DNA polimerazlar, primer ve gerekli nükleotidlerle aynı ortama (*in vitro*) konulduğunda sadece bir tek şeridin replikasyonunun yapıldığı görülmüştür. Aynı bakteriye bu defa plazmid gibi halkasal tek zincirli DNA verilmiş ve bunun replikasyonu sağlanmıştır. Daha sonra da, bu molekülün belirli bir bölgesinden oluşturulan çentik ile ayrılan zincirlerin yeniden replikasyonu sağlanmış ve bu esnada işleme katılan diğer proteinler saflaştırılmıştır. Ökaryotik hücrelerden bu enzimlerin tamamı tek tek elde

edilememiş olmasına rağmen, etki mekanizmaları *E. coli*'deki mekanizmaya benzer olmaktadır.

Primozomlar: *E. coli*'de primaz ile ilişkili olan 6 primozom kompleksi Okazaki fragment primerlerinin oluşumunu gerçekleştirmektedir.

Helikazlar: Primozomlarla ilgili ilk çalışmalarda elde edilen ve ATP enerjisi harcayan bir başka proteinin de Okazaki fragment primerlerinin oluşumunda etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu proteine önce rep protein adı verilmiş daha sonra DNA'nın açılmasını sağladıkları için fonksiyonlarına bağlı olarak helikaz olarak adlandırılmışlardır (West, 1992; Stryer, 1995).

Tek Zincir DNA Bağlama Proteini (ssDBP=Single Strand DNA Binding Protein): Bu protein de büyüme çatalının oluşumu için mutlak gerekli olup, sarmaldan yeni açılmış bölgelere bağlanarak onu tutmakta ve şablonu bir yandan replikasyona hazır bulundurup diğer yandan da başka moleküllerin tutunmasını engellemektedir.

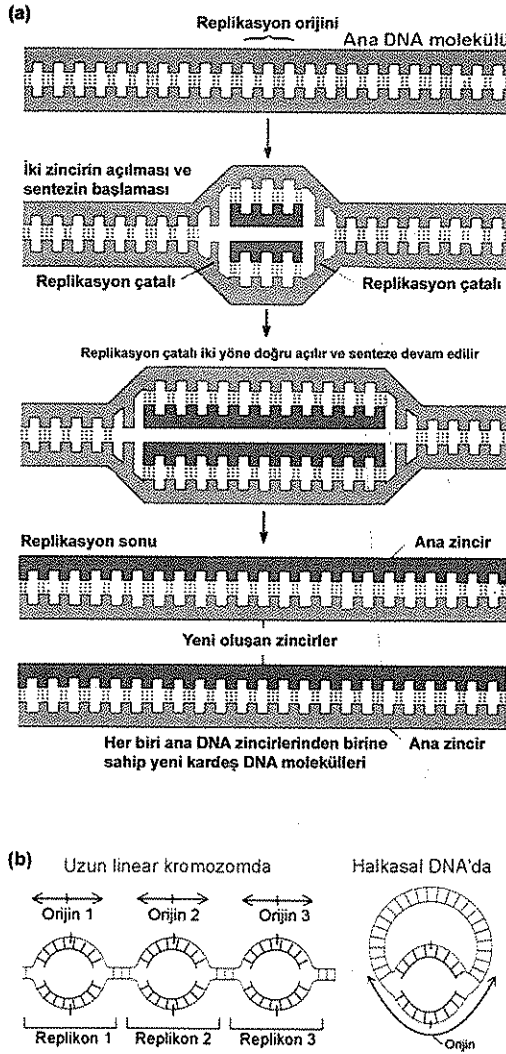
Çoğaltıcı Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA=Proliferating Cell Nuclear Antigen): Bu protein δ -polimeraz aktivasyonu için gereklidir. PCNA eksikliğinde DNA sentezi sırasında sadece Okazaki fragmentlerinin olduğu iplikcik sentezlenmekte, varlığında ise her iki kolun da sentezi gerçekleştirilerek koordineli bir şekilde DNA eşleşmesi gerçekleşmektedir. Böylelikle, aynı lokustaki DNA sentezi aynı anda gerçekleşmektedir (Nelson ve Cox, 2000).

Tip I Topoizomerazlar (Topo I): Omega proteini olarak adlandırılan bu enzim *E. coli*'den elde edilmiştir. Bu enzim zincirlerden birisine tutunmakta ve o zincirde bir çentik oluşturup sarmal yapısını bir dönüş kadar açmakta ve şeridi çentik yaptığı kısımlardan tekrar birleştirmektedir. Böylece her bir dönüşte bağlantı sayısı bir tane azalmakta ve süper-kıvrım ortadan kalkmaktadır.

Tip II Topoizomerazlar (Topo II): Bu enzimler giraz (gyrase) olarak da adlandırılır. Topo II'de ilk defa yine *E. coli*'den elde edilmesine karşın bütün hücrelerde bulunmaktadır. Topo I ile birlikte *E. coli*'deki süper sarmal oluşumunun dengelenmesini gerçekleştirmektedir. Topo II, DNA sentezi tamamlandıktan sonra kromozomal seviyede bulunan yeni oluşmuş bağlantıları da koparmak işlevini gerçekleştirmektedir (Tablo 12.3).

12.3.1.3. Replikasyonun ilerlemesi ve tamamlanması

DNA replikasyonu kromozomların belirli bölgelerinde başlamakta ve bu bölgelere replikasyon orijini denilmektedir (Şekil 12.7a,b). *E. coli*'deki replikasyon orijinleri oriC olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgeler tekrarlanan baz dizileri ile karakterize olmuştur. Ökaryotik hücrelerde de aynı şekilde birbirinden bağımsız bölgelerde yerleşmiş olan orijinler vardır. Örneğin *S. cerevisiae*'deki 17 kromozom üzerinde 400 kadar orijin bulunmakta ve ancak orijine bağlanan bazı proteinlerin varlığında replikasyon başlayabilmektedir (Kornberg ve Baker, 1992; Stryer, 1995).



Şekil 12.7. DNA replikasyonu: a) başlama ve yeni zincirlerin oluşumu (Moore *ve ark.*, 1995'ten değiştirilmiştir), b) uzun ve linear kromozomda replikonlar (solda), halkasal DNA'da replikasyon orijini (sağda) ve bir replikon (Darnell *ve ark.*, 1990'dan değiştirilmiştir).

İki replikasyon orijini arasındaki DNA bloğuna ise replikon (replikasyon aralığı) denilmektedir (Şekil 12.7b). İlk çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre bir tek halkasal DNA içeren *E. coli* hücrelerinde büyüme iki farklı noktadan başlamakta ve 30 dakikada tamamlanmaktadır. Buna göre her iki yönde devam eden sentez düşünüldüğünde, büyüme hızı 1000 baz çifti/sn/her bir çatal olarak

hesaplanmaktadır. Çünkü, *E coli* kromozomu 3×10^6 baz çifti içermektedir. Bu hız insan DNA'sında 100 baz çifti/sn/her bir çatal olarak hesaplanmıştır (Moore ve ark., 1995).

Bitkilerde replikonlar uzunluk olarak 30.000'den 300.000 nükleotid çiftine kadar değişebilmektedir. Bir saniyede ortalama 50 nükleotidin replikasyonunun yapıldığı düşünülürse bir replikasyon aralığında replikasyon için 10-100 dakika geçmesi gerektiği anlamına gelir. Genom hacmi büyük olan bitkilerle (örnek: soğan, 4,4 milyar nükleotid çifti) çok daha küçük olan bitkiler (örnek: *Arabidopsis*, 70 milyon nükleotid çifti) ($4,4 \text{ milyar} / 70 \text{ milyon} = 62,8$) arasında DNA'nın replikasyonunun gerçekleştiği S devresinin süresi bakımından (soğan, 10,9 saat; *Arabidopsis*, 2,8 saat, $10,9 / 2,8 = 3,9$) ortaya çıkan yaklaşık 4 kat fark bütün bir genomda aynı anda çok sayıda replikonun aktif olması ve replikon sayısının soğanda *Arabidopsis*'e göre çok daha fazla olduğunu göstermektedir (Hartl, 1994). Elektron mikroskobu ile yapılan analizlerle bu durum teyit edilmiştir.

12.4. DNA'yı İncelememizi Kolaylaştıran Enzimler

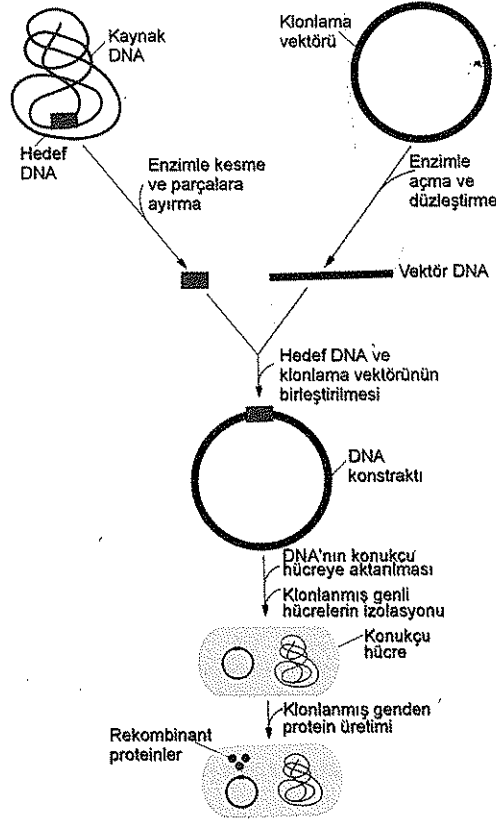
DNA'yı incelemek ve istenilen değişiklikleri yapabilmek için bir çok enzim bulunmuştur (Tablo 12.5). 1970'li yılların başında bakteriyel restriksiyon endonükleazlarının (RE, kesim enzimlerinin) (Tablo 12.6) bulunuşu rekombinant DNA teknolojisi (RDT)'nin yani 'moleküler klonlama'nın gelişmesinde en önemli adımlardan birisi olmuştur. RDT'si bir organizmadan belirli bir genetik bilginin (DNA parçasının) diğerine transferini sağlayan bir dizi işlemi kapsamaktadır. Genel olarak Şekil 12.8'de gösterildiği gibi uygulanır. Önce istenilen DNA parçası çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilir ve klonlanır (bkz Bölüm 15). Kesilen bu parça çoğaltılacağı bir vektörün plazmid DNA'sı içine yerleştirilir. Daha sonra plazmid bir hücre (genellikle bakteri) içine yerleştirilir ve hücreler istenildiği kadar çoğaltılır. En son olarak bu hücreler tarafından ilgili DNA parçasının (gen) ürettiği protein veya enzimler izole edilip saflaştırılır ve amaca uygun olarak kullanılır (Glick ve Pasternak, 1998; Nelson ve Cox, 2000). Rekombinant DNA parçasını üreten mikroorganizmanın kısa sürede çok sayıda çoğalması ilgili proteini üretecek çok sayıda hücre oluşmasını ve bu işlemin ekonomik olmasını sağlar.

Restriksiyon endonükleazlar

Bakterilerce üretilen restriksiyon (kesim) endonükleazlar (RE); DNA üzerinde belirli nükleotid dizilerini tanıyarak her iki zincirde de bu dizileri taşıyan yerlerden DNA'yı kesen protein enzimleridir (Öner ve ark., 1997). RE'ler kesme işlemi sırasında içsel fosfat bağlarını rasgele kırarlar ve DNAaz ile fosfodiesterazlardan farklı olarak 4, 6, 8 nükleotidden oluşurlar. Birçok enzim için tanıma yerleri (recognition sites) her iki zincirde de aynıdır. Bu tanıma yerlerine palindromik bölgeler (ters ve düzden okunuşu her iki zincirde de aynı olan) denir (Tablo 12.6).

Tablo 12.5. Rekombinant DNA üretiminde kullanılan enzimler (Darnell *ve ark.*, 1990; Glick ve Pasternak, 1998)

Enzimler	Etkileri
Alkaline fosfotaz	DNA'dan fosfat gruplarını uzaklaştırır
Polinükleotid kinaz	DNA'ya fosfat (PO ₄) grubu ekler
Terminal nükleotid transferaz	3' ucuna tam bir nükleotid ekler
Ekzonükleaz	En uçtan tam bir nükleotidi uzaklaştırır
DNAaz I	DNA'yı şeker ve fosfat arasından çentikler
Ters (revers) transkriptaz	RNA şablonuna göre DNA şeridi yapar
DNA ligaz	Daha önceki bölümlerde verilmiştir
DNA polimeraz I	Daha önceki bölümlerde verilmiştir

**Şekil 12.8.** Rekombinant DNA teknolojisinin uygulaması (Glick ve Pasternak, 1998'den değiştirilerek).

Tablo 12.6. Bazı restriksiyon endonükleazlarının özellikleri (Darnell ve ark., 1990; Roberts, 1992; Glick ve Pasternak, 1998).

Enzim adı	Kaynak mikroorganizma	Tanıma dizisi ¹	Kesim sayısı (kb) ²			
			λ	Ad2	SV40	pBR322
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	143	158	34	14
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	121	50	1	13
<i>HphI</i>	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	GGTGA+5	168	99	4	18
<i>HgaI</i>	<i>Haemophilus gallinarum</i>	GACGC+8	102	87	0	12
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	5	5	1	1
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	AAGCTT	6	12	6	1
<i>NofI</i>	<i>Nocardia oitidis</i>	GCGGCCGC	0	7	0	0

¹Tanıma dizisi kısmında gösterilen diziliş 5'→3' yönündedir; ² λ : bakteriyofaj, Ad2: Adenovirus tip 2, SV40: Simian virüsü 40, pBR322: bir *E. coli* plazmididir.

RE, DNA'daki büyük oyuklara tutunarak buradaki tanıma dizisinden ikili sarmala yapıştır. Bunun neticesinde DNA'nın her iki formu (A-DNA ve B-DNA) aynı molekülde oyukların konformasyonel değişimine göre meydana gelir. Bu iki farklı formun aynı molekülde oluşması neticesinde DNA orta bölgeden 25° lik bir eğime sahip olur ve büyük oyuk daha da genişler. Bunun sonucunda DNA zincirlerinden önce birisi, sonra da diğeri endonükleaz aktivitesiyle kesilir (Roberts, 1992).

Özel bir RE ile DNA'nın parçalanması, DNA'yı belirli baz dizilişinde ve yeniden bir araya gelebilen parçalara (fragmentler) ayırır. Bu parçalar aynı zamanda özgül kesim bölgelerinin yerleşim sıklığını da yansıtmaktadır. Bu durum rekombinant DNA teknolojisinin uygulanmasında şu açılardan önemlidir:

1. Genomik DNA örneklerinin parçalanması ile örneğin, *EcoRI* enzimi, insan genomunda yaklaşık 1.000.000 *EcoRI* fragmenti meydana getirir (*EcoRI*; DNA'yı 5'-GAATTC-3' bölgesinden keser). Bu da bize genomdan elde edilmiş olan farklı uzunluktaki (bir kaç baz çiftinden, bir milyon baz dizisine kadar) bir milyon parçanın gerek yerleşim yeri, gerekse özelliğinin incelenmesine olanak sağlar. Uzun tanıma bölgelerine sahip enzimler kısa tanıma bölgelerine sahip enzimlerden daha az frekansta DNA fragmentleri oluştururlar.
2. Orijin ve büyüklüğü ne olursa olsun, RE ile kırılan DNA molekülleri benzer tek zincirli yapışkan uca sahip olurlar. Bu nedenle örneğin, *EcoRI* ile kesilmiş ve iki farklı orijinden gelen farklı iki DNA molekülü komplementer olan dört bazdan dolayı karşılıklı olarak bir araya gelir ve bunlar ligaz enzimlerince birleştirilir. İşte, bu ligasyon (birleşme) ile rekombinant-DNA molekülü oluşur.

3. Restriksiyon enzimleri ve bunlarca kesilen fragmentler; DNA molekülünün fiziksel olarak haritalanmasında, bir popülasyondaki polimorfizmin (çok şekillilik) analizinde, DNA moleküllerinin yeniden düzenlenmesinde, moleküler problemlerin (şablonların) hazırlanmasında, mutant üretiminde ve DNA'daki modifikasyonların tespitinde kullanılabilir (bkz. Bölüm 13, 14, 23).

12.5. DNA'nın Tamir Mekanizması

DNA dizilerindeki hatalar ya çevresel faktörlerden (radyasyon, mutajenik kimyasallar, veya nükleositlerin termal dekompozisyonu) ya da replikasyon sırasında DNA polimerazlardan kaynaklanmaktadır. Eğer bu hatalar düzeltilmeden kalırsa somatik hücrelerde birikerek çok büyük genetik arızalara neden olarak hücrelerin normal fonksiyonlarını yerine getirmelerini engelleyebilirler. Özellikle, bu durum gamet hücrelerinde görülecek olursa, yeni nesillerde oldukça büyük ve önlenemez anomalilere neden olabilir. Bundan dolayı, her tip hücredeki bu bozuklukların düzeltilmesi hayatın düzenli devamı için mutlak gerekliliktir (Stryer, 1988, 1995; Darnell ve ark., 1990).

E. coli'de DNA replikasyonu sırasında görülen doğru baz diziliminin ve bunların kontrolünün enzimatik olarak nasıl yapıldığı hemen hemen tamamen aydınlatılmıştır. Bunlardan; DNA Pol I ve III *in vitro* sentezde 10.000 nükleotitte 1 tane yanlış nükleotid eklemesi yapmaktadır. *E. coli*'nin her bir geninin 1000 nükleotitten oluştuğu düşünülürse, her bir replikasyonda her 10 genden birisi mutasyona uğramış olacak demektir. Bu da her bir nesilde 1/10 birey mutant olacak anlamına gelmektedir. Halbuki, gerçekteki mutant birey sayısı hiç de öyle değildir. Çünkü, normal çoğalmalarda ortaya çıkan mutant birey sayısı 1/100.000-1/1000.000 arasındadır. Bu düzenlilik, DNA polimerazların düzeltme-okuması (proof-reading) fonksiyonları sayesinde sağlanmaktadır. Bütün hücrelerde bulunan bu sistem DNA'nın bozulmasını engellemektedir.

Çevresel etkenlerle oluşan DNA arızaları geliştirilmiş birden fazla mekanizmayla onarılabilmektedir. Bazı hücreler çok yavaş bölünür veya hiç bölünmezler (insanlarda karaciğer ve beyin hücreleri, bitkilerde epidermal hücreler ve iletim demetleri hücreleri gibi). Bu hücreler sahip oldukları genetik materyali haftalar, aylar hatta yıllar boyunca kullanmak zorundadırlar. Bununla birlikte hücrelerdeki DNA devamlı olarak fiziksel ve kimyasal hasara maruz kalmaktadır. DNA'sı hasara uğramış ve bölünemeyen bir hücrede hatalı olarak üretilmiş proteinlerin miktarı da devamlı olarak artacaktır. İşte, böyle problemlere karşı gelişmiş olan sistem, DNA tamir sistemidir. Tablo 12.7'de DNA hasarları ve buna neden olan etkenler verilmiştir. Yaşadığımız gezegendeki en önemli hasar nedeni güneşten gelen ultraviyole (UV) radyasyondur. Her ne kadar bu radyasyon ozon tabakası tarafından tutulsa da, ozonun incelendiği günümüzde, bunun etkisi giderek artmaktadır. UV absorpsiyonu pirimidin dimerinin oluşumuna neden olmaktadır.

Bu da en fazla timin nükleotidinde siklobütül (cyclobutyl) bağlantısı şeklinde görülmektedir (Nelson ve Cox, 2000).

Tablo 12.7. Düzeltme gerektiren DNA lezyonları (Stryer, 1995; Brown, 1999).

Lezyon Faktörü	Lezyonun Şekli
Asit ve sıcaklık	Pürinlerin uzaklaştırılması yoluyla baz kaybı (bir memeli hücresinde her gün $\sim 10^4$ pürin kaybedilmektedir)
İyonlaştırıcı radyasyon ve alkilleştirici ajanlar	Alternatif baz değişimi
Kendiliğinden oluşan deaminasyon (C→U, A→hipoksantin)	Yanlış baz
Akridin boyaları gibi maddeler	Silme (delesyon)/İlave
UV radyasyonu ve bazı kimyasallar (Bleomisin)	Siklobütül dimeri, zincir kopması
Psoralen türevleri ve mitomisin C gibi antibiyotikler	Zincirlerde çapraz bağlantı

Dimer oluşum yerlerinde DNA ve RNA sentezi durur. Hem *E. coli* hem de mayalarda bir flavin gerektiren enzim olan fotolizaz (photolyase) siklobütül bağlantılarını doğrudan koparmaktadır. Bu enzim normal görünür (visible) ışığa ihtiyaç duymaktadır. Bu şekildeki enzimatik düzeltme de fotoreaktivasyon olarak ifade edilir. Ancak, DNA'daki, hasarların çoğu direkt olarak onarılamamaktadır. Bunların onarımı için değişik yollar geliştirilmiştir.

Pürinler pirimidinlere göre UV radyasyonuna daha az duyarlı olmalarına rağmen, kaynaklanan hasarlar değişik şekilde olmaktadır. Bunun en güzel örneği kendiliğinden oluşan depürinasyondur. Bu olayda pürin bazları şeker ve fosfat içeriklerini molekülde bırakarak DNA'dan ayrılmaktadır. Böylece bunların ayrıldığı bölge boş kalmaktadır. Hesaplamalara göre bir memeli hücresinde bir günde, ortam şartları değişmemiş olsa bile yaklaşık 10.000 pürin molekülü DNA'dan uzaklaşarak orada apürinik bölgelerin oluşmasına neden olmaktadır. Bunlardan başka bazı azotlu kimyasal ajanlar, bazı kompleks organik bileşikler (aflatoksin), geriye dönüşümsüz olarak pürinlere bağlanır veya pürin halkasını bozarlar. Bunlara ilave olarak, iyonlaştırıcı radyasyon da pürinlerdeki imidazol halkasının bozulmasına neden olmaktadır (Brown, 1998; Konuk ve Turan, 2000).

Depirimidasyon olayı ise çok nadir olarak görülmektedir. Ancak, sitozinin amino grubu 37 °C'de kopmaya çok eğilimlidir. Amino grubu ayrıldıktan sonra da sitozin urasile dönüşmektedir. Eğer bu duruma gelmiş hasar onarılmazsa A:U baz çifti

G:C ile yer değiştirmiş olacaktır. Bilindiği gibi DNA hataları eğer düzeltilmezse bunun sonucu mutasyondur (Lodish ve ark., 2000).

E. coli bakterisinde oluşan değişik arızalarda hatalı bölge bir segment halinde kesilerek çıkartılır ve yeniden sentezlenen doğru iplikçik parçası onun yerine yerleştirilir. Hatanın belirlenmesinde spesifik bir endonükleaz enzimi iş görmektedir. Bu enzim en azından beş farklı arızayı tanımlayıp tamir edebilmektedirler. Depürinasyon veya pirimidin deaminasyonu ile oluşan arızalı bölgede oluşan yarık tanımlandıktan sonra bu bölge ekzonükleazlar aracılığıyla uzaklaştırılmakta, tamir işi DNA polimeraz I ve DNA ligaz enzimleri tarafından tamamlanmaktadır (Lodish ve ark., 1998).

Özel bir tamir mekanizması ise UvrABC olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanizmada birçok kimyasal madde için içine girmekte ve timin-timin dimerleri tamir edilmektedir. Ayrıca, diğer bazı kimyasal maddelerin eklenmesiyle (metilkolenteren gibi kanserojenik bileşikler) ortaya çıkan yapısı değişmiş bazların oluşturduğu arızalar da yine bu mekanizma ile onarılmaktadır. Bu tip onarımın başlayabilmesi için öncelikle hasarlı bölge bulunur. Bu işte UvrA ve UvrB adlı iki protein görev yapmaktadır. Önce protein bu bölgeye bağlanır ve DNA'nın kısmi olarak sarmalı açılır. Bundan sonra, üçüncü protein olan UvrC diğer proteinlere bağlanarak arızalı bölgenin etrafını sarar. Buradaki 12 nükleotitik bir parça kesilip çıkarılır ve arızalı bölgeye uygun dizilişteki parça yerleştirilir. Burada çıkarılma işleminde helikaz II enziminin yardımı vardır. Daha sonra boşluğun doldurulmasında da DNA polimeraz I etkilidir. DNA ligazlar da parçanın birleştirilmesinde rol oynamaktadır. Onarım işlemi tamamlandıktan sonra da UvrABC proteinleri proteazlar tarafından sindirilerek ortadan kaldırılmaktadır (Darnell ve ark., 1990, Lodish ve ark., 1998).

Ökaryotik hücrelerdeki DNA tamir mekanizmasına ait enzimlerin hepsi henüz keşfedilmemekle birlikte, tabii olarak oluşan mutasyonlar ökaryotik DNA-tamir mekanizmasının aydınlatılmasında yardımcı olacak gibi görünmektedir. Örneğin, insanlarda kalıtsal bir hastalık olan kseroderma pigmentozum'lu hastalar deri kanserine oldukça fazla bir eğilim göstermektedir. Bu hastalardaki hücrelerde UV'ye bağlı olan DNA hasarının giderilmesinde bir kaç delil elde edilmiştir. Bu delillere göre, UV etkisinden sonra DNA'nın tamir edilmesi için bir kaç farklı enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan başka bazı kalıtsal hastalığa sahip olan hastalarda da kanser oluşumuna bir eğilim görülmüştür. Bu da muhtemelen bu hastalarda DNA tamir mekanizmasının bozukluğundan kaynaklanmaktadır.

12.6. Genetik Şifre (Kod) ve Evrenselliği

Nükleik asitlerin organizmalardaki genetik maddeyi teşkil ettiği, DNA üzerindeki belirli dizilerin genleri, genlerin de proteinlerin yapımını sağladıkları ve proteinlerin çeşitli şekillerde bir araya gelerek enzimleri oluşturdukları anlaşıldıktan sonra, iki büyük makro-molekül olan nükleik asitler ve proteinler grubu arasındaki bağlantıyı

anlama çalışmaları hız kazanmıştır. Proteinlerin en önemli ortak özelliği, amino asit adı verilen belirli sayı ve cinsten yapı taşlarından oluşmuş olmaları ve düz zincir şeklinde uzayabilmeleridir. Proteinlerin yapısında 20 çeşit amino asit vardır. Bunların diziliş sıraları o proteinin kimyasal özelliği ve biyolojik fonksiyonunu belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Öyleyse, her iki molekülün zincir şeklinde olmasından dolayı, genlerdeki nükleotidlerle proteinlerdeki amino asitler belirli kurallara göre birbirine uydurulabilmelidir. Genlerin moleküler yapıları ve protein biyosentezi, genlerin izolasyonu ve klonlaması ve proteinlerin yapıları kitabın diğer bölümlerinde detaylı olarak işlenmiştir (bkz. Bölüm 13, 14 ve 24).

DNA'nın ve genetik kodon tablosunda verilen kodonların (bkz. Bölüm 13) bütün canlılarda aynı olmaları ve benzer şekilde çalışmalarından dolayı genetik şifre evrenseldir. Genetik kod üzerindeki çalışmalarda bazı araştırmacılar sistematik bakımdan birbirinden uzak olan canlılara ait şifrelerin benzerliğinin karşılaştırılmasını amaçlamışlardır. Yapılan deneylerden elde edilen bazı sonuçlar şöyle bulunmuştur:

- ◆ Hayvansal virüslerin nükleik asitlerinden hazırlanan preparatlarla bakterileri enfekte etmek mümkün olmuştur. Bu durumda bakteri hücresi tıpkı bir bakteriyofajla enfekte olmuş gibi viral polipeptidler sentezlemeye başlamıştır.
- ◆ Bitkilerde hastalık yapan virüslerin nükleik asitleri, bakteri virüslerinin özütlerinden hazırlanan yapay ortamlarda yine normal biyolojik faaliyetlerine devam etmişlerdir.
- ◆ Çok değişik kökenli kaynaklardan elde edilen yapay ortamlar sanki bir kökenden gelmişçesine davranmışlardır.
- ◆ Değişik organizmaların hücrelerinden hazırlanan ortamlara, mRNA molekülü ilave edildiğinde, hepsinden benzer sonuçlar elde edilmiştir.
- ◆ Bakteri, bitki veya diğer canlılardan izole edilen genler (belirli uzunlukta ve diziliş sırasında DNA parçaları) bitkilere veya diğer canlı türlerine aktarıldığında donör canlıda ortaya koyduğu sonuçları, aktarılan canlıda da ortaya koymuştur.

Bütün bu bilgiler ışığı altında genetik kod ile ilgili şu özellikleri sıralamak mümkündür:

- ◆ Her bir şifre üçlü nükleotid grubundan (kodon) (örnek: AAA veya AGC) meydana gelmektedir. Fakat, bir kodondaki üçüncü baz daha az spesifiktir. Yani amino asitler şifrelenirken eğer birden fazla kodon bulunuyorsa çeşitliliği genelde üçüncü bazdaki değişimler sağlamaktadır.
- ◆ Her üçlü kodon bağımsızdır ve bazı virüsler hariç nükleotidlerde üst üste gelme söz konusu değildir.
- ◆ Bazı amino asitler birden fazla üçlü nükleotid tarafından şifrelenebilir.

- ◆ Belirli bir triplet, birden fazla amino asiti şifreleyemez.
- ◆ Bazı şifreler amino asitleri şifrelemezler, protein sentezinin başlatılması ve sonlandırılması gibi işlevleri yerine getirirler.

12.7. DNA Uzunlukları ve Bilgi Kapasiteleri

DNA'nın uzunluğu canlıdan canlıya değişebilir. Bir bakteriyofaj DNA'sı ortalama 10 µm uzunluğundadır. Bakterilerin DNA'sı ortalama 1 mm, insanın bir hücresine ait DNA uzunluğu ise yaklaşık 100 cm, yani bir kromozomdaki ortalama DNA uzunluğu 2 cm'den büyük kabul edilmektedir. Bu duruma göre, bir bakteri DNA'sından 1.000 sayfalık, insanın bir hücresinde bulunan DNA'dan da her biri en az 20.000 sayfadan oluşan 46 ciltlik (yaklaşık 1.000.000 sayfa) bir bilgi depolanmıştır. Canlıların bütün canlılık faaliyetleri, kimyasal, fiziksel ve psikolojik (nörolojik temele dayalı olanlar) özellikleri ve fonksiyonlarının tamamı bu bilgi deposunun denetimi ve yönetimi altında yürütülmektedir (Brown ve Brown, 1999).

Hücreyi yöneten genetik bilgi 'bireysel bilgi' ve 'toplumsal bilgi' şeklinde de düşünülebilir. Hücre kendi organellerinin kuruluş ve işleyişine, yani yaşama, büyüme ve üreme gibi bireysel ihtiyaçlarının giderilmesine bireysel bilgi ile hükmetmektedir. Bununla beraber, o hücrenin de bir üyesi bulunduğu organizmanın bütün hücreleri ile ilişki kurmasına, tüm organizmanın yönetimindeki hiyerarşiye itaat etmesine, gerektiğinde ona katkıda bulunmasına yarayan genetik bilgi grubu da toplumsal bilgi içerisinde değerlendirilmektedir.

Çok hücreli bir organizmanın içinde yaşayan hücrelerdeki toplumsal genetik bilgi, bireysel genetik bilgi kadar önemlidir. Hücrenin farklılaşma ve yaşlanma süreci içerisinde hücre yaşının gerektirdiği fenotipik özelliği kazanması için sırası gelen genler açılmakta ve işlevlerini yerine getirmektedirler. İş bitenler tekrar kapatılıp inaktif olurlar. Böylece, bir hücrenin hayatı boyunca kendi mikroskobik çevresinin gerekleri ile içinde yaşadığı organizmanın istekleri doğrultusunda uyumlu bir şekilde çalışmaktadır. Tüm organizma, her organından beklediği görev ve fonksiyonları her an ona belirli yollarla duyurur ve ondan karşılığını bekler. Büyümesi gereken bir organda, yaraların yeni hücre rejenerasyonu (bölünmesi) ile kapatılması gereken bir dokuda hücrelerin çoğalması istenir ve hücre hayat döngüsünü yeniden başlatılarak hücreler yeteri kadar bölünür ve yara kapatılır. Yeteri kadar büyüyen ve yapısı tamamlanan bir organda hücrelerin bölünmesi yavaşlar ve ancak ölen hücrelerin yerine onların boşluğunu dolduracak şekilde bölünme sağlanır. İşte, bunların hepsi de toplumsal bilgi dediğimiz bilgiyle sağlanır. Bu bilginin işletilmesi de belirli bir düzenle, hormonal sistem ile sağlanır.

Bilgi kayıplarında veya bozulmalarında ise o hücrede hastalık dediğimiz olay gelişir, böylelikle hücre(ler) ölebilir. Bu durumda genellikle tüm organizma zarar görmez ve ölen hücrenin yerine yenisi yapılır. Ancak, hücrede toplumsal bilgide bir değişme

veya kaybolma olmuşsa ve genellikle hormon üretimi bakımından kendi otonomisini kazanmışsa vücudun genel kontrolünden çıkar ve kontrolsüz şekilde büyüme ve bölünmeye başlar. Organizma istemediği halde hücredeki bölünme devam eder. Bu durumda hücre kendisine gelen sinyalleri de alamaz. Bunun sonucunda da organizma içerisinde bir anarşizm ve kaos başlar. İşte bu durumda da o hücre habis (sarkom=kanser) bir tümör hücresi haline gelmiş olur.

12.8. Bitki Hücrelerinde DNA'nın Bulunduğu Yerler

Ökaryotik hücrelerde birçok organel bulunmaktadır. Bir hücredeki DNA'nın büyük bir kısmı çekirdekte bulunur. Bu DNA'ya nükleer DNA veya kromozomal DNA denir. Kromozomal DNA'ya ilave olarak bitkilerde sitoplazmada plastidler ve mitokondri olmak üzere 2 farklı yerde daha halkasal yapıda DNA bulunmaktadır. En çok incelenen plastid olan kloroplastlardaki DNA'ya 'kloroplast DNA' (ctDNA) ve mitokondrideki DNA'ya ise 'mitokondriyel DNA' (mtDNA) denilmektedir (Palmer, 1985; Martin ve Herrmann, 1998; Brown ve Brown, 1999).

Bitkilerde ve diğer ökaryotik canlılarda DNA miktarı genellikle pikogram (pg), megabaz nükleotid çifti (Mb), kilobaz nükleotid çifti (kb) veya baz çifti (bp) ile ifade edilmekte ve genellikle verilen değer hücrenin haploid genomundaki DNA miktarını ifade etmektedir. Bir pg (10^{-12} g) (bkz. Bölüm 12.10) DNA'nın yaklaşık kaç Mb nükleotid çiftine eşit olduğu konusunda farklı bildirimler mevcuttur. Bir Mb 1000 (10^3) kb veya 1 milyon (10^6) nükleotid baz çiftine (bp) eşittir. Bu miktar DNA Bennett ve Leich (1995, 1997)'e göre 980 Mb'a, Moore *ve ark.* (1995)'na göre 269 Mb'a eşittir. Yani iki bildirim arasında yaklaşık 4 kat bir fark vardır. Başka bir ifade ile 1 pg'lık DNA Bennett ve Leich (1995, 1997)'e göre 980×10^6 (980 milyon) bp ihtiva ederken, Moore *ve ark.* (1995)'e göre 269 milyon nükleotid çiftine eşittir. DNA'da iki baz arası mesafe $3.4 \text{ \AA}$ olduğu bilindiğine göre pg olarak bilinen bir genom hacmi moleküler uzunluk (cm veya mm) olarak hesaplanabilmektedir. Buna göre bir milyon bazlık bir DNA düz yapıda 0.34 mm uzunluğa sahiptir.

12.8.1. Çekirdek DNA'sı (kromozomal DNA)

Çekirdek DNA'sı, bölünmenin belirli devreleri hariç, genelde kromozomal yapıda bulunur. Bir DNA ile kromozom arasındaki ilişkisi Bölüm 12.9 ve Şekil 12.10'da gösterilmiştir.

Poliploidi olmazsa, herhangi bir türün DNA oranı bireyleri ve dokuları arasında hiç değişmeden nesilden nesile aynı kalır. Bu sabite, canlının beslenmesi, büyüme derecesi ve yaşı gibi etkenlere de bağlı değildir. Ancak, hücrenin bölünmeye hazırlandığı zaman DNA miktarı, hücre hayat döngüsünde interfazın S (sentez) safhasında iki katına çıkar. Böylece, oluşacak iki yavru hücre için de çekirdek içeriği hazırlanmış olur. Bölünmeden sonra da DNA miktarı eski haline döner. DNA

miktarındaki bu düzenlilik, kalıtsal maddenin depolanmasında ne derecede önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Brown ve Brown, 1999).

Günümüzde artık bitki tür ve çeşitlerini birbirinden ayırt edebilmek için çekirdek DNA'sı miktarları tespit edilerek çok sağlıklı neticeler alınabilmektedir (Babaoğlu ve ark., 1998). DNA miktarını ifade ederken kromozom sayısı ile karıştırılmasını önlemek amacıyla 'C değeri' ('C' sabite manasınadır) ortaya atılmıştır (Bennett ve Leitch, 1995, 1997; Babaoğlu ve ark., 1998). Replikle olmamış haploid sayıda kromozoma (normal mayoz bölünme sonucu oluşan tetrad nükleusları gibi) sahip bir bireyin (örnek: mısır, $n=10$) çekirdeğindeki DNA miktarına 1C, replike olmuş diploid ($2n=20$) yapıdaki (mayoz bölünmenin pakiten safhasında olduğu gibi) DNA miktarına ise 4C değeri verilmektedir (Bennett ve ark., 2000).

Hayvanlar içinde memeliler, kuşlar ve sürüngenler, bitkiler içinde de açık tohumlularda (gymnosperm) türler arası genom hacmi bakımından fark azdır. Bunlardan kültürü yapılan bitki türlerinin de içinde bulunduğu angiospermiler, üzerinde en yoğun çalışmaların yapıldığı taksonomik grup olup, DNA miktarları bakımından geniş bir varyasyon göstermektedir. Şu ana kadar angiospermlerden 2500 civarında türün DNA miktarı tespit edilmiştir. Bu miktar yaklaşık 250.000 türü içeren dünya angiosperm florasının %1'ine karşılık gelmektedir (Bennett ve Smith, 1991; Bennett ve Leitch, 1995, 1997). Bitkiler üzerine radyasyonun, ozon tabakasındaki incelmelerin ve global ısınmanın etkisini araştırmada çekirdek DNA-C değerlerinin önemli bir özellik olabileceği, moleküler çalışmalarda çekirdek DNA'sı miktarının bilinmesinin bir türün gen kütüphanesini oluşturan klon sayısının tahmininde araştırmacılara ışık tutabileceği bildirilmektedir (Bennett ve Leitch, 1997). Bazı türlerde elde edilen DNA-C değerleri kromozom sayılarıyla birlikte Tablo 12.8'de verilmiştir.

Şu ana kadar Bennett ve Smith (1976), Bennett ve Smith (1991), Bennett ve Leitch (1995, 1997) ve Bennett ve ark. (2000) tarafından derlenerek yayınlanan DNA-C değerlerinin yaklaşık %85'i mikrodensitometri metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Son yıllarda ise flowsitometri metodu daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Flowsitometri metodunun en büyük avantajı çok fazla sayıda örneğin hızlı bir şekilde hazırlanması ve analiz edilmesidir. Hücre DNA miktarını ölçmek için bölünmekte olan hücrelere ihtiyaç duyulmaktadır. Yine flowsitometri ile genom hacmindeki çok küçük farklılıklar bile yüksek hassasiyetle araştırılabilmektedir. Flowsitometri benzer birçok örnekle ilgili kalitatif çalışmalarda, örneğin *Medicago* türlerinin ekotiplerini veya değişik populasyonları, mısırdaki F_1 hibritleri ile kendilenmiş hatların karşılaştırılmasında başarılı şekilde kullanılmıştır (Bennett ve Leitch, 1995).

DNA-C değerindeki varyasyonlar türler arasında, bir tür içindeki varyasyona göre daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, yapılan çalışmalarda DNA miktarının fazlalığı veya azlığının organizmanın karmaşıklığıyla veya kromozom sayısı ile orantılı olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 12.8). Bu bakımdan DNA-C değerinin çok yüksek ve çok

düşük olduğu türler arasında ortaya çıkan varyasyonun sebebinin genom içinde tekrarlanan DNA dizisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bennett ve Leich, 1997).

Ökaryotik bir genom içinde tekrarlanan DNA dizilerini, 1) tekli kopya dizileri (single copy sequences), 2) orta derecede tekrarlanan diziler (middle repetitive DNA) ve 3) yüksek derecede tekrarlanan diziler (highly repetitive DNA) oluşturmaktadır (Hartl, 1994) (Tablo 12.9).

Tablo 12.8. Değişik bitki türlerinin hücre çekirdeğindeki kromozom sayıları ve DNA miktarları (Bennett ve Smith, 1991; Bennett ve Leitch, 1995, 1997; Bennett *ve ark.*, 2000)*.

Tür	Familya	Kromozom sayısı (2n)	DNA miktarı (pg=10 ⁻¹² g)	
			1C	4C
<i>Haplopappus gracilis</i>	Compositae	4	0.9	3.7
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cruciferae	10	0.2	0.6
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	14	0.4	1.6
<i>Hordeum vulgare</i>	Graminae	14	5.1	20.2
<i>Pisum sativum</i>	Leguminosae	14	4.3	17.1
<i>Cicer arietinum</i>	Leguminosae	16	0.8	3.1
<i>Beta vulgaris</i>	Chenopodiaceae	18	0.8	3.1
<i>Viscum album</i>	Loranthaceae	20	90.8	363.1
<i>Zea mays</i>	Gramineae	20	2.4	9.5
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Leguminosae	22	0.6	2.4
<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	24	3.8	15.0
<i>Oryza sativa ssp. indica</i>	Gramineae	24	0.5	1.9
<i>Helianthus annuus</i>	Compositae	34	3.3	13.2
<i>Brassica napus</i>	Cruciferae	38	1.3	5.1
<i>Triticum aestivum</i>	Gramineae	42	18.1	72.2
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	48	4.4	17.5
<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	48	1.8	7.2
<i>Agave americana</i>	Agavaceae	60	3.1	12.2
<i>Ipomea batatas</i>	Convolvulaceae	90	1.7	6.6
<i>Acacia raddiana</i>	Leguminosae	104	1.9	7.6
<i>Bischofia javanica</i>	Euphorbiaceae	196	1.9	7.4

*Kromozom sayılarına göre sıralanmıştır.

Tekli kopya dizileri genomda bir veya iki defa tekrarlanırlar. Fonksiyonel genleri kodlayan diziler bu sınıfa girerler. Fakat, çoğunluğu genik (genle ilgili) olmayan dizilerdir. Orta derecede tekrarlanan diziler genelde genom içinde 10-1000 defa tekrarlanırlar. Baz dizileri 100 bp ile 5000 bp (5.0 kb) arasında değişir. rRNA,

tRNA ve mısırdaki depo proteinlerini oluşturan diziler bunlara örnektir. Yüksek derecede tekrarlanan diziler ise en çok görülen dizilerdir. Genom içinde 100.000-1000.000 defa tekrarlanabilirler. Uzunlukları 5-300 bp arasında değişebilir. Tandem tekrarlamalar halinde, ATTATA, ATTATA, ATTATA // ATTATA gibi bulunurlar. Tandem tekrarlanan DNA'ya uydu (satelit) DNA denilir ve sentromerlerle telomerleri içine alır. Transposable elementler ise çekirdek genomunun çok önemli bir kısmını oluşturan, bir bölgeden diğer bölgelere hareket edebilen (kromozom içi veya kromozomlar arası) DNA parçalarıdır. Bunlar da çeşitli genleri kodlayabilirler.

Tablo 12.9. Bazı türlerde DNA sekanslarının dağılımı (Brown ve Brown, 1999).

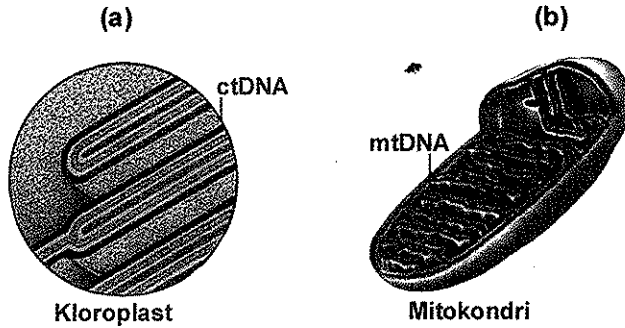
Tür	Dizi Dağılımı	Dağılım (%)
Bakteriler	Tekli kopya	99.7
İnsan	Tekli kopya	70
	Orta derecede tekrarlanan diziler	13
	Yüksek derecede tekrarlanan diziler	8
Pamuk	Tekli kopya	61
	Orta derecede tekrarlanan diziler	27
	Yüksek derecede tekrarlanan diziler	8
Mısır	Tekli kopya	30
	Orta derecede tekrarlanan diziler	40
	Yüksek derecede tekrarlanan diziler	20
Buğday	Tekli kopya	10
	Orta derecede tekrarlanan diziler	83
	Yüksek derecede tekrarlanan diziler	4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tekli kopya	55
	Orta derecede tekrarlanan diziler	27
	Yüksek derecede tekrarlanan diziler	10

Tekrarlanan DNA dizilerinin çoğu genle ilgili değildir veya bunların transkripsiyonu olmaz. Birçok durumda bu dizilerin, genom içinde yalnızca replike olabildikleri için tutuldukları görülmektedir. Tekrarlanan dizilerin bulundukları organizmalar için fonksiyon olarak genik dizilerle aynı önemde olduğu ve mutajenik aktivitelerinin popülasyonun potansiyel gelişmesine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, bazen popülasyonların uyum gücünün kaybolmasına sebep olduklarına dair örnekler de görülmüştür. Bu konular hala araştırılmaya devam edilmektedir.

Genle ilgili olmayan DNA oranı en büyük C değerine sahip bir angiospermde nüklear genomun %90 hatta %99'una kadar ulaşabilmektedir. Nüklear genomda miktar ve oranı değişen ve transkripsiyonu olmayan DNA dizisine genik olmayan 'Junk DNA', 'işe yaramaz DNA', 'bencil DNA', 'parazitik DNA' veya 'kör DNA' gibi değişik isimler verilmiştir (Bennett ve Leitch, 1997).

12.8.2. Organel genomları (sitoplazmik genomlar)

Ökaryotik canlılarda bir çok karakter çekirdek genleriyle belirlenmekte ve Mendel kalıtımı göstermektedir. Bitkilerde diğer canlılardan farklı olarak (belki de daha kompleks) çekirdek dışında, sitoplazmada 2 yerde daha genom bulunur. Bunlar organel adıyla adlandırılan kloroplast ve mitokondridir. Yapı olarak prokaryotların (örnek: bakteri) genomlarına benzerler ve ribozomları vardır. Mendel kalıtımı yerine sitoplazmik kalıtım gösterirler. Her iki organelde de kalıtımda ananın katkısı daha fazladır. Genellikle kloroplast genomu mitokondriyel genomdan daha büyüktür. Kloroplast DNA (ctDNA) ve mitokondriyel DNA (mtDNA)'ların (Şekil 12.9a,b) en önemli işlevleri fotosentez (ctDNA) ve solunumla (mtDNA) ilgili genleri barındırmaları ve translasyonda görev almalarıdır. Bu organellerde bulunan genlerin çekirdekte bulunmaması da ilginçtir. Fakat bazı işlevlerde çekirdek genleriyle bir paylaşım halindedirler. Organellerde DNA replikasyonu yapıldıktan sonra DNA yeni üretilen yavru organelle aktarılır (Hartl, 1994).



12.8.2.1. Kloroplast DNA'sı (ctDNA)

Bitkilerde sitoplazmada bulunan plastidler a) kloroplast (ışıkta yetişen yeşil bitkilerde), b) etiolooplast (karanlıkta yetiştirilen bitkilerde), c) kromoplast (sentez ve karotenoidlerin depolanmasında) ve d) amiloplast (nişasta depolamasında) olmak üzere farklı tipte olabilmektedir. Bir bitkideki tüm plastidler aynı genoma sahiptir. Sadece sitoplazmada plastid genomlarının farklı kopyaları bulunabilir. Plastid genomuna plastom da denilmektedir. Plastom DNA'sı tekrarlanan diziler bakımından 3 gruba ayrılmaktadır. Birinci grup plastidlerde (bazı baklagiller) ters tekrarlanan (aynı dizi ardı ardına, bir doğru bir ters) diziler bulunmazken, 2. grup genomlarda (hemen hemen bütün bitkiler) aynı dizinin birbirine ters tekrarlanan kopyaları bulunur. Üçüncü grup plastidlerde de (çok nadir görülür) bir biri ardına tekrarlanan (tandem) diziler bulunabilmektedir. Plastidlerin kalıtımı çoğunlukla

ananın kontrolü altında olmasına rağmen bazı türlerde (örnek: çam, yonca ve çavdar) kalıtım baba tarafından kontrol edilmektedir (Palmer, 1985; Martin ve Herrmann, 1998).

Kloroplastlar plastidlerin ışıkta oluşan ve fotosentez yapabilen formlarıdır. Üzerinde en çok çalışılan plastid DNA'sı kloroplast DNA'sıdır (Şekil 12.9a). 1960'lı yıllarda, çekirdek DNA'sından farklı özelliklere sahip bir molekül olarak ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde tütün, mısır, çeltik gibi bitkilerin plastid genomlarının tamamının özellikleri ortaya konulmuştur. Martin ve Herrmann (1998)'a göre tamamen fonksiyonel bir kloroplast genomu 120-160 kb uzunluğunda tek bir dairesel DNA molekülünden oluşup, üzerinde yaklaşık 60-80 gen bulunmaktadır. Buna karşılık tek hücreli bir siyanobakteri olan *Synechocystis*'in kloroplast genomu ise 3168 protein üretebilmektedir.

Yüksek bitkilerde ctDNA'nın aynı kloroplast içinde çok fazla kopyası bulunabilir. Ayrıca bir sitoplazma içinde birden fazla (20-100) kloroplast bulunabilmektedir (Hartl, 1994). ctDNA ile çekirdek DNA'sının genetik sistemi birbirinden oldukça farklıdır. Fakat bitkilerde fotosentezden sorumlu genler hem çekirdek DNA'sı hem de kloroplast DNA'sı üzerinde paylaşılmış olarak bulunmaktadır. Fotosentez enzimi olan Rubisco (ribüloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz) her biri 2 alt üniteden oluşan 8 kopya halinde sentezlenir. Bunlardan küçük olanı (rbcS) çekirdekte, daha büyük olanı (rbcL) kloroplastlarda sentezlenir (Brown ve Brown, 1999).

ctDNA'sının G+C içeriği farklı türlerde farklılık göstermesine karşın, değişik ctDNA *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle parçalandığında hiçbirinde normal olmayan fragmente rastlanılmamıştır. ctDNA'sının diğer önemli bir özelliği de molekülde hiç metilleşmiş baz içermemesidir. Bu da DNA'nın renatürasyonunu oldukça kolaylaştırmaktadır. ctDNA'sının büyüklüğü de farklılıklar göstermektedir. Halkasal molekül oldukça sıkı şekilde kapanmış bir süper-sarmal oluşturmaktadır. Bu molekülün en ilginç özelliklerinden birisi de, (örneğin bezelyede) yapısında yaklaşık olarak 18 ribonükleotid içermesidir. Kapalı yapıdaki DNA molekülünün alkali-labil bölgesinin varlığına bağlı olmaktadır. Bundan başka pankreastan elde edilen RNAaz ve RNAaz T₁'in bu molekülü çentikleyerek açması, bu DNA'ya ribonükleotidlerin girdiğini ortaya koymaktadır.

12.8.2.2. Mitokondri DNA'sı (mtDNA)

Mitokondriyel DNA (Şekil 12.9b) küçük halkasal yapıdaki ikili bir sarmaldan oluşur. Ayrıca, çekirdek DNA'sından farklı yoğunluk ve baz dizilişine de sahiptir. Bir hücredeki toplam DNA miktarının yaklaşık %10 kadarını teşkil eder.

Yüksek bitkilerde, mtDNA'nın mitokondri içinde birden fazla dairesel molekül kopyası ve birden fazla mitokondri (2-10 kopya) bulunabilmektedir. Bitki mitokondriyel genomları 200 kb'den 2600 kb'ye (örnek: patatesten 200 kb, kavunda

2000 kb) kadar değişebilmektedir (Backert *ve ark.*, 1997). Mitokondriyel DNA'da en fazla solunumla ilgili genler bulunmaktadır. Bitkilerde hastalıklara dayanıklılık genleri ile kısırılık (sitoplazmik erkek kısırılık = cms) genlerinin de mtDNA'da bulunduğu bildirilmektedir (Martin ve Herrmann, 1998).

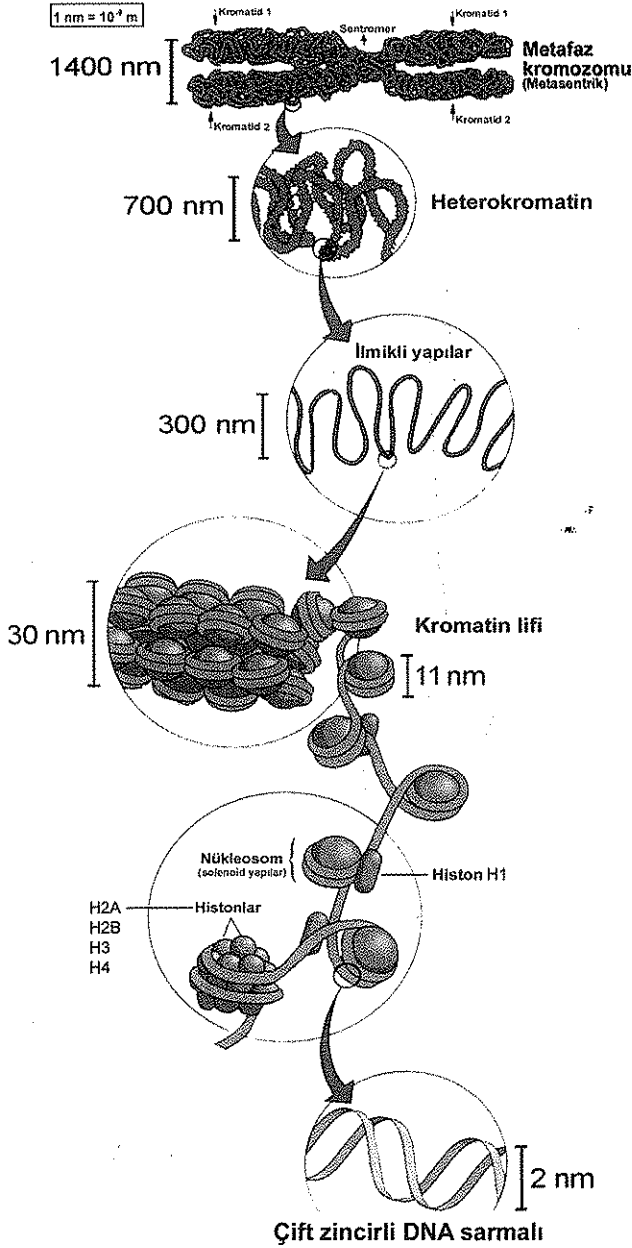
12.9. DNA Kromozom İlişkisi (DNA'dan Kromozoma)

Ökaryotik canlılarda politen kromozomları hariç, bir kromozom genellikle çok uzun bir DNA molekülünden oluşur (Hartl, 1994). *Drosophila* ve diğer bazı iki kanatlı sineklerde yaklaşık 1000 DNA molekülünden oluşan ve politen kromozomları denilen dev kromozomlar bulunmaktadır. Genel olarak bir kromozom, histon proteinlerine sarılmış (topa sarılmış ip gibi), genellikle kesintisiz çift zincirli bir DNA molekülünün oluşturduğu yapıların (nükleosom) düzenli olarak bir araya gelmesiyle (kromatin lifi) ortaya çıkmaktadır (Şekil 12.10). Bir kromozomun çok büyük bir kısmını histon ve histon olmayan proteinler (%67) ve DNA (%27) ile RNA (%6) oluşturur. Bir insanda toplam DNA ağırlığı yaklaşık 10 g olmasına rağmen uzunluğu 2×10^{13} m'ye ulaşmaktadır. Bu da güneşe yaklaşık 100 defa gidip gelme mesafesine eşittir (Lloyd, 1986).

Histon proteinlerinin büyük çoğunluğu hücre döngüsündeki S evresinde sentezlenmekte ve DNA ile birliktelik oluşturmak amacıyla hızlıca nükleusa girmektedir. Az bir miktarı da döngüdeki diğer evrelerde sentezlenmekte ve bunlar muhtemelen DNA tamiri veya transkripsiyon esnasında kullanılmaktadır. DNA sentezinden bir kaç dakika sonra 2 nm çapındaki çift zincirli DNA (100-200 bp), her birinden ikiye moleköl olmak üzere H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinin bir oktamet etrafında kıvrılmasıyla 10-11 nm çapındaki nükleozomlar oluşmaktadır (Şekil 12.10) (Moore *ve ark.*, 1995).

Histonlar 100-200 amino asitten oluşan küçük proteinlerdir ve bünyelerinde çok miktarda lizin ve arginin bulunduğundan pozitif yüklüdürler. Bu nedenle negatif yüklü DNA ile bağlanabilmektedirler. Ayrıca, oluşan bu sıkı yapı enzimlerin etkisinden de korunmaktadır. Nükleozomlarda histonlara bağlanan ve histon olmayan proteinler de vardır. Bunlar asidik karakterdeki nükleoplazmin (29 KD, H2A ile H2B'ye bağlanır) ve N1-proteini (H3 ve H4'e bağlanır)'dir. Histon olmayan bu proteinlerin muhtemelen uzun DNA yarıklarında yapısal iskelet oluşturduğu düşünülmektedir.

Nükleozomlar (solenoid yapılar) arasında 40-60 nükleotitten oluşan bir ayırıcı DNA parçası bulunmaktadır. Bu aralıktan sonra nükleozoma beşinci bir histon proteini olan H₁ bağlanmaktadır. H₁ proteini bir nükleozomdaki DNA iplikçigini diğer nükleosomdaki DNA iplikçigine bağlama görevini yapmakta ve böylece oluşan ikili bir yapıya (nükleozom ünitesine) kromatozom adı verilmektedir. Nükleosomların kendi aralarında belirli aralıklarla birleşme ve yoğunlaşma neticesinde de kromatin lifi denilen daha kalın ve sağlam yapılar oluşmaktadır (Şekil 12.10).



Şekil 12.10. DNA'dan kromozomun oluşumu (Moore ve ark., 1995'ten değiştirilmiştir).

Belirli koşullar altında izole edilen kromatin materyalinin kalınlaştığı ve yoğunlaştığı görülmüştür. Bu kalınlaşmış liflerde, nükleosomlar solenoid yapılar halinde bulunmaktadır. Kromatin lifleri de yoğunlaşarak 20.000 - 100.000 nükleotid uzunluğunda kıvrılmış, ilmekli yapılara (looped domains) dönüşmektedir. Bu yapıların oluşum mekanizması henüz bilinmemekle birlikte, uçların kromozom aksindeki proteinlere bağlandığı tahmin edilmektedir. Kıvrılmış yapılar daha da yoğunlaşarak çeşitli boyama teknikleri ile boyanabilen ve ışık mikroskobu ile görülebilen kromatini (heterokromatin) oluşturmaktadır. Kromatinin daha az yoğun ve açık formu olan kromatine ökromatin denilmektedir. Ökromatin ışık mikroskobu ile görülememektedir. Bu durum heterokromatinin daha fazla paketlenmiş olduğundan görülebildiği ve bu paketlenmenin genlerin belirli dönemlerde aktif hale geçip fonksiyonel olup olmamaları ile ilişkili olduğu şeklinde değerlendirilmektedir.

Kromatinler yeni bir organizasyonla daha yoğunlaşmış ve bir metafaz kromozomunu oluşturan kromatidlere dönüşmektedir (Şekil 12.10). Kromatin sentezi incelendiğinde interfazın S alt devresinde eşit miktarda DNA ve histon proteinleri yapılmaktadır. Bu durumda DNA sadece kendisini eşlemekte aynı zamanda histonların üretimini de yapmaktadır. ❖

Yine, ökaryotik bir kromozomun ucunda bulunan ve kromozomun dengesini (stabilitesi) sağlayan DNA sekanslarına telomerler denilmektedir. Telomerler telomerase enzimi tarafından kromozom DNA'sının ucuna ilave edilirler. Bu işlem bir tür kromozomun diğer kromozomlardan ayırt edilmesini sağlayan bir işlemdir. Çünkü, telomersiz kromozomlar birbirleriyle füzyona girebilmektedirler.

Yeni sentezlenmiş bir DNA molekülünün nasıl paketlenmesi konusu ökaryotik hücrelerdeki genin tarifi açısından iyi bir örnektir. Bu paketlenmenin olmaması durumunda bir çok anormalliklerin olacağı ve genetik materyalin yavru hücrelere dağılımının dengesiz olacağı bildirilmektedir (Hartl, 1994).

Kromozomların sayısı, iç düzeni büyüklüğü ve şekilleri türler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Mitoz profazi sonunda bir kromozomun iki kromatidi arasında oluşan bağlanma noktasına sentromer denir (Şekil 12.10). Sentromer bir kromozomun en önemli bölgesidir. Sentomere kinetokor, kinomer ve primer konstriksiyon bölgesi gibi isimler de verilmektedir (Elçi, 1982).

Çekirdekteki kromozomlar sentromerlerinin bulunduğu yere göre asentrik (sentromersiz), metasentrik (median, sentromer orta noktada), submetasentrik (submedian, sentromer kollardan birine yakın), telosentrik (subterminal, sentromer uçlardan birine çok yakın), disentrik (iki sentromerli), polisentrik (ikiden fazla sentromerli) izo (kromozomun iki kolu birbirinin aynısı) ve satelitli (uzun kol, kısa kol, ikincil yapı ve satelite sahip) kromozom olarak farklı şekillerde isimlendirilebilmektedir (Elçi, 1982). Sentromerin iki yanında kalan kısımlara kromozom kolları denilmekte bir kromozomda sentromerin yeri ile uzun kol/kısa

kol oranı sürekli aynı kalıp değişmemektedir. Karyotip analizleri sonucu genomun sitolojik fenotipi çıkarılmakta ve homolog kromozomlar düzlem üzerinde gösterilmektedir. Karyotip analizleri ile tür tanımlaması yapılabildiği gibi, melezlemeler ile ortaya çıkan farklılıklar ve ploidi seviyesi değişiklikleri izlenebilmektedir (Gupta ve Tsuchiya, 1991).

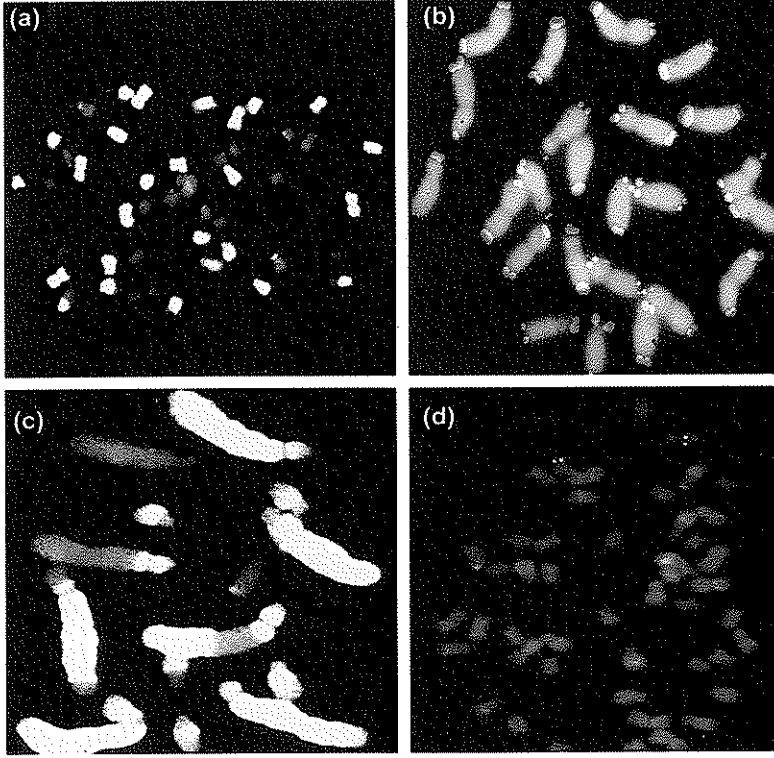
Son yıllarda klasik sitogenetik çalışmalarından moleküler sitogenetik çalışmalarına doğru bir kayma başlamıştır. Bu yolda geliştirilen en önemli metotlar; elektron mikroskobu destekli ve türe has DNA sekanslarının prob olarak kullanıldığı floresan *in situ* hibridizasyonu (FISH) veya ebeveynden birinin toplam genomik DNA'sının prob olarak kullanıldığı genomik *in situ* hibridizasyonu (GISH) metotlarıdır (Şekil 12.11). Moleküler sitogenetik alanında GISH ve FISH uygulamalarıyla; bitki ıslahında, biyosistematiğe, genom ilişkilerinin tespitinde, genom karşılaştırmalarında, introgresyon (bir türden az bir miktarda germplazmanın başka bir türe aktarılması), translokasyon ve inversiyon, melezlerin ebeveynlerden farkları, autopoloidi, allopoloidi'nin oluşumu gibi bir çok konuda kesin ve net sonuçlar alınabilmektedir. Aşağıda bu metotların uygulanışıyla ilgili bilgiler verilmiş olup, daha fazla bilgi için bkz. Martin *ve ark.* (1995) ve Bennett (1995).

12.9.1. GISH (genomik *in situ* hibridizasyonu)

GISH metodunda bir genomun çeşitli enzimlerle kesilmiş bir çok tipte etiketlenmiş küçük DNA parçaları (toplam genom probu) rasgele diğer genomun herhangi bir yeriyle veya hepsiyle eşleşmek üzere aynı solüsyonda yukarıdaki şekilde melezlenir. Buna iyi bir örnek Şekil 12.11a'da verilmiştir. Melezleme sonucu *Nicotiana silvestris*'in tüm genom DNA'sı prob (şablon) olarak kullanılmış ve *Nicotiana tabacum* DNA'sı (kromozomları) ile eşleşmesi ve bunun sonucunda da benzer olan ve olmayan bölgeler ortaya çıkarılmıştır. GISH metodu daha sonra, sadece aynı sekanslara sahip olan bölgeler dışında kalan ve her iki türe has bölgelerin etiketlenmiş proba eşleşmesine imkan tanıyan bloklama yönteminin bulunmasıyla geliştirilerek (Şekil 12.11c) bir birine çok yakın olan *Hordeum vulgare* ve *H. bulbosum*'ün melezlerinin F₁ de kolaylıkla ayırımında kullanılmış (Bennett, 1995) ve krossing-over oluşumunun izlenmesinde de faydalı sonuçlar ortaya koymuştur.

12.9.2. FISH (floresan *in situ* hibridizasyonu)

FISH metodunda sekansı bilinen bir DNA şeridi kullanılır. Bu şekilde bir genin klonlaması (bkz. Bölüm 13) da yapılabilir. Teknik temel olarak ilk önce DNA sekanslarının prob oluşturmak için etiketlenmesi (immuno veya radyoaktif metotlarla), hedef kromozomun açılması (DNA'sının denatürasyonu yoluyla tek zincirli hale getirilmesi) ve sekansı bilinen bir prob DNA ile melezlenmesi



Şekil 12.11. Bitki kromozom preparatlarının *in situ* melezleme sonrası floresan mikroyrafları. (a) GISH metoduyla, florokromla etiketlenmiş *Nicotiana silvestris* total genomik DNA'sının *Nicotiana tabacum* kromozomları ile eşleştirilmesi. Kromozomlar eşleşme (homoloji) gösteren (DNA dizisinde benzerlik olan) bölgelerde sarı renkli, eşleşmenin olmadığı bölgelerde ise kırmızı renkli olarak görülmektedir. Sarı renkli bölgelerin çokluğu iki türün akrabalık durumunu da ortaya koyabilmektedir (Kenton A., Parokonny AS., Gleba YY. Bennett MD., 1993, Mol Gen Genet., 240: 159-169). (b) FISH metodu kullanılarak *Arabidopsis*'e has telomer sekanslarıyla (TTTAGGG) eşleştirilmiş *Nicotiana sylvestris* kromozomları. Probla eşleşen bölgeler kırmızı florokrom Cy3'le boyanmıştır. (Adams SP., Hartman TPV., Lim KY., Chase MW., Bennett MD., Leitch IJ., Leitch AR., Proc. Royal Society, baskıda). (c) (*Gasteria lutzii* x *Aloe aristata*) x *Gasteria lutzii* melezinin kromozomlarının *G. lutzii* genomik DNA'sı ile eşleştirilmesi. Florokromla boyanmış bölgeler eşleşmenin görüldüğü bölgelerdir. *G. lutzii* genomunun tamamı (4 büyük ve 2 küçük çift) benzer olarak sarı renkte ışık vermekte, F₁ melezinin rekombinant kromozomlarında ise crossing-over noktalarını gösteren sarı ve turuncu renkte segmentler görülmektedir. (Takahashii C., Leitch IJ., Ryan A., Bennett MD., Brandham, PE., 1997, Chromosoma 105: 342-348). (d) Gemini virüsüne ait DNA sekanslarıyla eşleştirilmiş *Nicotiana tabacum* kromozomları. Küçük 2 çift submetasentrik kromozomun uzun kolunda sarı renkli 2 çift melezlenmiş bölge görülmektedir (Kenton A., Khashoggi A., Parokonny A., 1995 Chromosome Res. 3: 346-350). (Fotoğraflar Prof. Dr. M.D. Bennett ve Dr. Ilia Leitch tarafından temin edilmiştir).

esasına dayanır. Daha sonra prob sekanslarıyla birbirine uyan (complementer=tamamlayıcı) sekanslar eşleşir (probla denatürasyon veya re-annealing). Yıkama ve floresanla etiketlenmiş (örnek: konjuge biyotin) prob DNA'nın ilgili şeridi ile eşleşen yerler farklı bir boyaya bağlı avidinle bağlanarak haritalanır. Bu şekilde sadece probun bağlı olduğu bölgelerde belli dalga boylarında sarı ışık veren renk oluşumu sağlanır. Bu durum da floresan mikroskobu ile tespit edilir (Şekil 12.11b,d). Eğer proba eşleştirilmemiş bölgeler propidyum iyodidle boyanırsa (counter staining) aynı görüntü altında onlar da kırmızıya boyanır. Böylece, hedef DNA üzerinde prob DNA'nın eşleştiği bölgeler sarı, diğer bölgeler kırmızı renkli olarak görülürler (Bennett, 1995).

12.10. DNA'nın Ölçülmesinde Kullanılan Bazı Birimler¹

DNA uzunluğunun ifadesinde;

Baz çifti=base pair (bp)=Çift zincirli DNA'da birbirine karşılık gelen iki baz

Kilobaz çifti=kilobase pair (kb=kbp)=1000 bp.

Megabaz çifti=megabase pair (Mb=Mbp)=1000 kb=1 milyon bp

Angström (Å)= 10^{-10} m

Nanometre (nm)= 10^{-9} m= 10 Å

Mikrometre (µm)= 10^{-6} m

Milimetre (mm)= 10^{-3} m

DNA&RNA kütlesinin ifadesinde;

Pikogram (pg)= 10^{-12} g

Nanogram (ng)= 10^{-9} g

Mikrogram (µg)= 10^{-6} g

RNA moleküler ağırlığı veya uzunluğunun ifadesinde¹;

Nükleotid sayısı (nt)

Kilo nükleotid sayısı (knt=1000 nt)

Baz çifti (bp) veya Kilobaz çifti (kb)

Protein ve enzimlerin moleküler ağırlığının ifadesinde¹;

Dalton (Da=D)=gram/mol (=yaklaşık 1 H atomu kütlesi)

kilo Dalton (kD)=1000 Da

¹Biology Hyper Text Book (1998), <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/>

12.11. Sonuç

Bu bölüm yazılırken bir tümevarım amaçlanmıştır. Genetiğin ve tüm yaşamsal faaliyetlerin temelinde oturan ve 1953 yılında başlayıp hala en önemli buluşlar arasında yer alan en temel moleküller olan nükleik asitlerin (DNA ve RNA) yapılarından başlanmış ve kromozomlarla ilişkisi ortaya konulmuştur. Kromozomlar üzerinde belirli bölgelerde (lokus) yer alan ve belirli işlevleri olan genlerin (belirli uzunlukta ve diziliş sırasında DNA parçaları); amino asitler, proteinler ve enzimlerin sentezlenmesi ve bunların değişik faaliyet ve karakterlerin ortaya çıkmasında kullanımı, sonuçta hep DNA'dan kaynağını almakta, tüm işlemler RNA ve diğer sitoplazmik organellerin işbirliğiyle şekillenmektedir. Bu işlemler detaylı bir şekilde kitabın diğer bölümlerinde verilmiştir.

Bilinen ve kültüre alınmış bitkilerden başlamak suretiyle, DNA diziliş sıralarının ve bu sıralarda genlerin yerlerinin (gen haritaları) tespit edilmesi, gelecekte büyük sorunu teşkil edecek olan ekolojik dengenin bozulmasına bağlı sekonder problemlerin çözümünde bize rehberlik edecektir. Yani, kuraklık, artan sıcaklık, fazla nem ve tuzlu şartlarda yetişecek, mikrobiyal enfeksiyonlara daha toleranslı, üstün verimli ve düşük masraflı daha fazla ürün elde edebilme yollarını sağlayacaktır. Şu anda devam eden çalışmalarla, sokağ aydınlanmasında lüsiferinden oksilüsiferin oluşumunu sağlayan enzimin genleri ateş böceğinden izole edilip, tütün bitkisine klonlanarak ışık yayması sağlanmıştır. Benzer şekilde bazı bakterilerin üretebildiği biyolojik olarak ayrışabilir plastik üretiminden sorumlu genlerin bitkilere aktarılmasıyla bitkiler de plastik üretebilmektedirler. Çünkü, bitki, insan, hayvan, böcek, bakteri, fungus vb. bütün canlıların hepsinin farklı uzunluk ve diziliş sırasında ama hemen hemen aynı temel fiziksel ve kimyasal özelliklerde paylaştıkları tek şey belki de hücrelerinde bulunan nükleik asitlerdir. Bu nedenle doku, organ vb. özellikler bakımından birbirleriyle uyumsuzluk gösterebilirler de RNA ve özellikle DNA bakımından birbirlerine uyumludur. Bitkilerde yapılan bu tür uygulamalar da kitabın diğer bölümlerinde verilmektedir.

Bu bölüm ile DNA'nın daha iyi anlaşılması, çeşitli amaçlar için değiştirilip kullanılması, bu kitabın takip eden diğer bölümlerine bir temel teşkil etmesi, Bölüm 13 ve Bölüm 14'le birlikte Türkiye'de bitki genetiği, moleküler biyoloji, moleküler genetik ve biyoteknoloji derslerine katkıda bulunmak en büyük dileğimizdir.

Bölüm yazılırken örnekler özellikle bitkilerden verilmiş olmasına rağmen, diğer canlılarla bitkiler arasında DNA'nın yapısı ve özellikleri, kromozomların yapısı ve genom organizasyonu bakımından pek fazla farkın bulunmadığı da dikkate alınmalıdır. Hatta, bitkilerin birçok (çoklu genom yapıları ve döllenme biyolojileri) açıdan daha karmaşık olduğu söylenebilir.

Teşekkür

DNA-C değerleri ile ilgili katkılarından dolayı Prof. Dr. M. D. Bennett, Dr. IJ. Leitch ve *Annals of Botany*'ye teşekkür ederiz. Türkiye'de bitki genetiğine çok önemli katkıları bulunan Prof. Dr. İbrahim Demir ve merhum Prof. Dr. Orhan Düzgüneş Hoca'lara sonsuz saygı ve teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

- Babaoglu M, Soylu S, Yorgancilar M (1998) Tarla bitkilerinde çekirdek DNA'sı miktarları. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi* 12(17): 31-43.
- Backert S, Nielsen BL, Borner T (1997) The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends Plant Sci.*, 2: 495-502.
- Bennett MD (1995) The development and use of genomic in situ hybridisation (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: Brandham PE, Bennett MD (eds.) *Kew Chromosome Conference IV*. Royal Botanic Gardens, Kew, England, pp. 167-183.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Ann. Bot.*, 86: 859-909.
- Bennett MD, Leitch IJ (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.*, 76:113-176.
- Bennett MD, Leitch IJ (1997) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.*, 80:169-196.
- Bennett MD, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 274: 227-274.
- Bennett MD, Smith JB (1991) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 334: 309-345.
- Brown EG (1991) Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides. *Methods in Plant Biochem.* 5: 53-90.
- Brown EG (1998) *Ring Nitrogen and Key Molecules: The Biochemistry of N-Heterocycles*, Kluwer Ac. Publishers, Dordrecht, USA.
- Brown TA, Brown EA (1999) *Genomes*. BIOS Scientific Pub. Ltd., UK.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1990) *Molecular Cell Biology*, Second Edition, Scientific American Books Inc., USA.
- Demir İ (1986) *Genetik*. Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yay. No: 263, İzmir.
- Elçi Ş (1982) *Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri*. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Yayınları, Biyoloji: 3, Elazığ, s. 16-20.
- Glick BR, Pasternak JJ (1998) *Molecular biotechnology*. In: *Principles and Applications of Recombinant DNA*, Second Edition, pp. 1-108. ASM Press, Washington, USA.

- Goodwin TW, Mercer EI (1988) Introduction to Plant Biochemistry, Second Edition, Pergamon Press, Exeter, England.
- Gupta PK, Tsuchiya T (1991) Chromosome Manipulations in Higher Plants: An Overview. In: Gupta PK, Tsuchiya T (eds.) Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution. Part A. Elsevier Publishers B.V., The Netherlands, pp. 1-14.
- Hartl DL (1994) Genetics, Third Edition. Jones and Bartlett Publishers Int., London.
- Karol S, Ayvalı C, Suludere Z (1995) Hücre Biyolojisi, Gözde Ofset, Ankara.
- Konuk, M, Turan Y (2000) On the interesting features of purines. S.Ü. Eğt. Fak. Fen Bilimleri Derg. 8(1): 35-47.
- Kornberg A, Baker TA (1992) DNA Replication. 2nd edition, Freeman and Company, USA.
- Lehninger AL (1976) Biochemistry, 2nd edition. Worth Pub. Inc., New York.
- Lewin B (1998) Genes. Oxford University Press, New York.
- Lloyd JR (1986) Genes and chromosomes. In: Thompson J (ed), Dimensions of Science, MacMillan Education Ltd., UK.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Darnell J (1998) Molecular Cell Biology, 3rd edition. WH Freeman Company, New York.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Molecular Cell Biology, 4th edition. WH Freeman Company, USA.
- Martin R, Busch W, Hermann RG, Wagner G (1995) In situ hybridisation and signal detection by high resolution scanning electron microscopy. In: Brandham PE, Bennett MD (eds.) Kew Chromosome Conference IV. Royal Botanic Gardens, Kew, England, pp. 159-166.
- Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? Plant Physiol., 118:9-17.
- Meselson M, Stahl F (1958) The replication of DNA in *E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci., 44: 671-682.
- Moore R, Clark WD, Stern KR, Vodopich D (1995) Botany. WCB Publishers Inc.
- Nelson DL, Cox MM (1993) Lehninger Principles of Biochemistry, Second edition, Worth, USA, 1170 s.
- Nelson DL, Cox MM (2000) Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd edition. Worth Publishers, New York.
- Öner R, Korkmaz Ö, Mergen H (1997) DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi ve nitroselüloz membrana transferi. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri, Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları, Hacettepe Üniversitesi, s. 45-56, Ankara.
- Palmer J (1985) Comparative organisation of chloroplast genomes. Ann. Rev. Gen., 2: 325-354.

- Roberts RJ (1992) Restriction enzymes and their isoschizomers. Nucl. Acids Res., 20: 2167-2180.
- Stryer L (1988) Biochemistry, 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Stryer L (1995) Biochemistry, 4th edition. WH Freeman Company New York.
- Watson JD, Crick FH (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171: 737-738.
- West CF (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombinations. Ann. Rev. Biochem., 61: 603-640.
- Zubay G (1993) Biochemistry, 3rd edition. Wm. C. Brown Publisher Inc., Dubuque, USA.

Bölüm 13

Genlerin Moleküler Yapıları ve Protein Biyosentezi

Ahmet Yıldırım

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 60240 Tokat
e-posta: yasin@gop.edu.tr

13.1. Giriş

Canlılarda farklı karakterlerin oluşumu bilim adamlarının her zaman ilgisini çekmiştir. Uzun süre genlerin varlığından habersizce yapılan çalışmalar, önce hücre çekirdeğinde kromozomların keşfi ve daha sonra genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu ispatlanmasıyla yeni bir boyuta ulaşmıştır. Böylece, yapılan çalışmaların çoğu genlerin doğal yapıları ve fenotipi nasıl kontrol ettikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin, nasıl oluyordu da bir genin bir alleli bezelyede kıvrık tane üretirken, bir diğeri yuvarlak tane oluşumuna neden oluyordu? Günümüzde araştırma sonuçlarına dayanarak bir hücredeki bütün biyokimyasal reaksiyonların özel üç boyutlu yapıya sahip enzimler tarafından katalize edildiği artık bilinmektedir. Genlerin proteinlerin yapılarını belirlediği ve hatta proteinlerin yapıları ile genetik materyalin yapısı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.

Gen fonksiyonunun doğası hakkında ilk ipuçları insanlarda yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Yirminci yüzyılın başlarında Garrod (1909) birçok kalıtsal insan hastalıklarının resesif mutasyonlardan kaynaklandığını belirtmiştir. Bu hastalıkların bazıları direkt olarak temel vücut kimyasını etkileyen metabolik noksanlıklara dayandırılabilir. Örneğin, bir otozomal resesif allel tarafından kontrol edilen fenilketonuri hastalığı; fenilalaninin tirozine çevrilememesinden kaynaklanmaktadır. Böylece, fenilalanin birikerek zehirli bir bileşik olan fenilpirüvik aside dönüşmektedir.

Bu bölümde genlerin moleküler yapıları özetlenerek, çalışma sistemleri ve protein biyosentezinde gerçekleşen olaylar detaylı bir şekilde incelenecektir.

13.2. Genlerin Moleküler Yapıları

Genlerin kromozomlar üzerinde taşındığı ve doğrusal (linear) olarak dizildikleri 1910 yılında Morgan tarafından ispatlandıktan sonra, kromozomlardaki kalıtsal genetik bilginin ise deoksiribonükleik asit (DNA) olduğu Avery ve ark. (1944)'nın bakterilerde yaptıkları transformasyon deneyleri sonucunda ortaya konmuştur. DNA yüksek moleküler ağırlığa sahip olup, azot bazları (pürin ve pirimidin) ile deoksiriboz ve fosfat gruplarından oluşmaktadır. Pürinler *adenin* (A) ve *guanin* (G), pirimidinler ise *sitozin* (C) ve *timin* (T)'den oluşmaktadırlar. Bir azot bazının bir deoksiriboz şekeri ve bir fosfat grubuna bağlandığında oluşan yapıya nükleotid adı verilmektedir (Daha fazla bilgi için bakınız Bölüm 12).

Kalıtımda DNA'nın rolü anlaşıldıktan sonra, araştırmacılar DNA'nın gerçek yapısını bulmaya çalışmışlardır. Watson ve Crick (1953), DNA'nın bazı çiftlerinin hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlandıkları bir çift helezonvari polinükleotid sarmalından oluştuğunu bulmuşlardır. Bazların çift oluşturma işlemi oldukça spesifik olup, *adenin* ile *timin*, *guanin* ile de *sitozin* eşleşir. Dolayısıyla, primidin nükleotidlerinin (C ve T) toplamıyla, pürin nükleotidlerinin (A ve G) toplamı daima birbirlerine eşittir. Ayrıca, T miktarı A miktarına, G miktarı ise C miktarına daima eşit olmasına rağmen, (A+T) her zaman (G+C)'ye eşit olmayabilir. Dolayısıyla, bir DNA sarmalındaki iplikçiklerin herbiri diğerini tamamlayıcı bir özelliğe sahiptir (Bkz. Bölüm 12).

Bir kromozom bütün kromozom boyunca uzanmış olan tek bir DNA molekülü taşımaktadır. Genetik materyalde DNA ile beraber ribonükleik asit (RNA)'de görev almaktadır. RNA, *timin* primidinin yerine *urasile* (U) ve şeker kompleksinde ilave bir oksijen atomuna sahip oluşuyla DNA'dan farklılık göstermektedir (Bkz. Bölüm 12).

Hücre bölünmesi öncesinde DNA molekülünün kopyası oluşturularak çoğaltılmakta ve kopyalar hücre bölünmesi süresince yavru hücrelere dağıtılmaktadır. DNA'nın kopyalanma işleminin yarı-muhafazakar (semi-konservatif) olduğu Watson ve Crick tarafından önerilmiş ve daha sonra birçok araştırma grubu tarafından doğrulanmıştır. Buna göre, DNA çift sarmalı çözülerek fermuar gibi açılır ve açılan iplikçiklerin her biri kalıp görevi üstlenerek bunları tamamlayan yeni iplikçiklerin sentezini sağlarlar. Bu işlem sonrasında oluşan iki adet çift sarmal orijinal sarmalın aynısı olup, her biri bir eski bir de yeni iplikçikten oluşmaktadır.

Bir gen, bir DNA molekülü üzerinde birkaç yüz nükleotid çiftinden oluşan ve bir protein üreten parçaların her birine verilen isimdir. Kısaca, nükleik asit bazlarının doğrusal bir dizisi bir araya getirilerek bir amino asit sentezlenir. Daha sonra amino asitlerin bir doğrusal dizisi birleştirilerek bir protein biyosentezlenir. Dolayısıyla bir

genin nükleik asit bazlarının sırası amino asit çeşitlerinin oluşumunu ve bunların da birbiriyle oluşturdukları kombinasyonlar farklı proteinlerin biyosentezini sağlamaktadır. Bir protein yapısal bir ünite olabileceği gibi, bazı biyolojik aktivitelerin başlatılmasını katalize eden bir enzim de olabilir. Proteinin üretim işlemindeki bir hata veya bir değişiklik, nükleik asit bazlarının gruplandırılmasını değiştireceğinden, sonuçta genin fonksiyonunu değiştirerek, mutasyon oluşumuna neden olacaktır. Tüm bu sentezleme işlemleri bölümün ilerleyen kısımlarında detaylı bir şekilde açıklanmaktadır.

13.3. Genlerin Çalışma Sistemleri

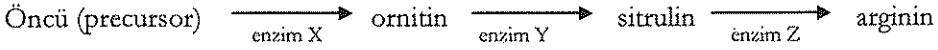
Genlerin gerçek fonksiyonlarının ortaya konması, Beadle ve Tatum (1940)'un *Neurospora* üzerinde yaptıkları araştırma ile olmuştur. Beadle ve Tatum haploid bir genoma sahip bir fungus olan *Neurospora*'nın mutantlarını incelemişlerdir. İlk olarak mutasyona neden olmak için *Neurospora*'yı radyasyona tabi tutmuşlar ve daha sonra dikkat çekici mutant fenotipleri belirlemek için askosporları kültür ortamında test etmişlerdir. Çalışma sonunda besin ortamında bir veya birkaç özel besin elementi ile desteklenmeden yaşayamayan birçok *auxotrophlar* saptamışlardır. Bütün durumlarda *auxotrophic* ihtiyaca neden olan mutasyon tek-gen mutasyonu kalıtımına sahip olup, yabancı tipte melezlendiklerinde 1:1 oranını vermişlerdir.

Mutant ırkların bir seti minimal bir besin ortamında büyüebilmek için argininine ihtiyaç duymaktaydı. Bu ırklar Beadle ve Tatum'un daha sonraki çalışmalarının odak noktasını oluşturmuşlardır. İlk olarak, araştırmacılar bu mutasyonların farklı kromozomlar üzerinde üç ayrı lokusta olduğunu saptamışlardır. Beadle ve Tatum *arg-1*, *arg-2* ve *arg-3* olarak adlandırdıkları bu üç lokusun herbirindeki *auxotrophların*, arginin ile akraba olan ornitin ve sitrulin kimyasal bileşiklerine karşı farklı reaksiyonda bulunduklarını belirlemişlerdir. *Arg-1* mutanlığı minimal besin ortamına ilaveten ornitin, sitrulin ve arginin ile desteklendiği zaman büyümüştür. *arg-2* mutanlığı arginin veya sitrulin üzerinde büyümüş fakat ornitinde büyümemiştir. *arg-3* mutanlığı ise yalnızca arginin ile desteklendiğinde büyümüştür (Tablo 13.1).

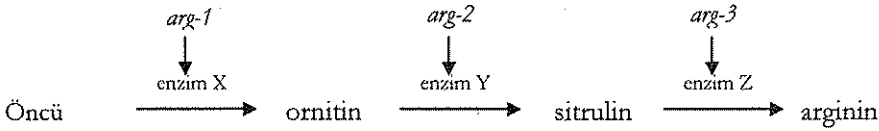
Tablo 13.1. Takviye elementlerine karşılık olarak *arg* mutantlarının büyüme durumları (+ = büyüme, - = büyüyememe).

Mutant	Takviye Elementi		
	Ornitin	Sitrulin	Arginin
<i>arg-1</i>	+	+	+
<i>arg-2</i>	-	+	+
<i>arg-3</i>	-	-	+

Bunlar gibi birbiriyle alakalı bileşiklerin hücresel enzimler tarafından sık sık karşılıklı dönüşüme uğradıkları bilinmekteydi. *Arg* mutantlarının özelliklerine dayanarak Beadle ve Tatum *Neurospora*'daki bu tip dönüşümler için şu biyokimyasal modeli önermişlerdir:



arg-1 mutantları enzim X'e sahip olmadıkları için arginin üretiminde ilk adım olan öncünün ornitine dönüşümünü sağlayamazlar. Bununla birlikte *arg-1* mutantları normal olarak enzim Y ve enzim Z'ye sahip oldukları için ornitin veya sitrulinden biri ile takviye edildiklerinde arginin üretebilirler. Öte yandan, *arg-2* mutantları enzim Y ve *arg-3* mutantları enzim Z bakımından eksiktirler. Dolayısıyla, belirli bir gendeki bir mutasyonun tek bir enzimin üretimini engellediği varsayılmaktadır. Daha sonra eksik olan enzim bazı biyosentetik reaksiyon zincirinin oluşumunda engel oluşturmaktadır. Bu engel reaksiyon zincirinde normal olarak bu noktadan sonra gelen herhangi bir bileşiğin hücrelere takviye olarak verilmesi yoluyla aşılabılır. Bu bilgilerin ışığı altında yukarıdaki model bir bütün olarak şöyle gösterilebilir:

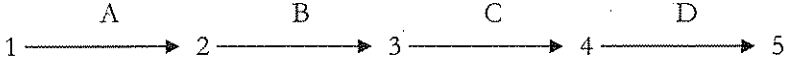


'Bir gen-bir enzim hipotezi' olarak bilinen bu model genlerin fonksiyonlarının anlaşılmasında ilk heyecan verici bilgileri sağlamıştır. Bu modele göre genler bir şekilde enzimlerin fonksiyonlarından sorumludurlar ve her bir gen açık olarak yalnızca bir enzimi kontrol etmektedir. Beadle ve Tatum'un buluşlarının sonuçları üç madde halinde özetlenebilir:

1. Yaşayan bir hücre içindeki (*in vivo*) biyokimyasal reaksiyonlar birbirinden ayrı merdivenvari reaksiyonlar olarak oluşurlar.
2. Her bir reaksiyon özel olarak tek bir enzim tarafından katalize edilir.
3. Her bir enzim tek bir gen tarafından kontrol edilir.

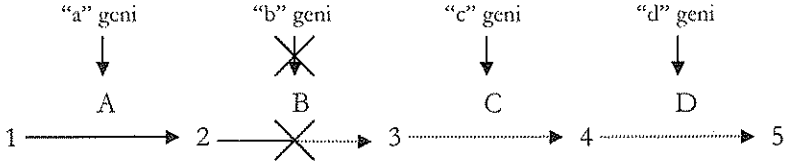
13.4. Bir Gen-Bir Enzim Hipotezi

Beadle ve Tatum'un ortaya attığı bir gen-bir enzim hipotezi günümüz anlayışına göre de biyosentetik reaksiyonların temelini oluşturmaktadır. Günümüzde artık moleküllerin her birinin bir enzim tarafından katalize edilen bir aşamalar serisi şeklinde sentez edildiği bilinmektedir. Örneğin, bir biyosentetik reaksiyon zinciri başlangıç materyali 1 ve son ürünü 5 olan 4 aşamadan oluşabilir:



Her bir aşama A, B, C ve D olarak adlandırılan bir enzim tarafından katalize edilmektedir. Burada “a” geninin A enzimini, “b” geninin B enzimini ve diğer genlerin (c ve d) diğer enzimleri (C ve D) katalize ettiği söylenebilir. Eğer bir enzimden sorumlu olan geni inaktive edersek, gerekli bir aşamayı engellemiş ve reaksiyon zincirinin kesintiye uğramasına neden olmuş oluruz.

Aşağıdaki diyagramda “b” geninde oluşan bir mutasyon sonucu B enzimi elimine edilmiştir.



Bu durumda hücre bileşik 2'yi bileşik 3'e çevirecek reaksiyonu gerçekleştiremez. Reaksiyon zinciri bileşik 2'de bloke edilmekte ve daha ileriye gidememektedir. Ancak, eğer hücreye bileşik 2'den sonraki bileşiklerden (3, 4) herhangi biri verilirse, hücre bileşik 5'i üretebilecektir. Fakat bileşik 1 ve 2 ne kadar verilsin verilsin hücre bileşik 5'i üretemeyecektir, çünkü reaksiyon bileşik 2'den itibaren bloke edilmiştir.

Bu hipotezi bir başka örnekle daha detaylı açıklayabiliriz. Farzedelim ki büyüme için gerekli bileşik G'yi sentezleyemeyen beş adet (1'den 5'e kadar) mutant izole edilmiştir. A'dan E'ye kadar beş bileşiğin biyosentetik reaksiyonlar zincirinde gerekli olduğunu bilmemize rağmen, yabancı tüpte bunların hangi sıra ile sentezlendiğinin bilinmediğini kabul edelim. Her bir mutantın büyümesini destekleme kabiliyetini ölçmek için bütün bileşikler test edilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

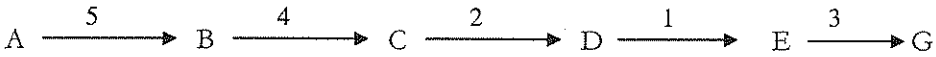
		Test Edilen Bileşik					
		A	B	C	D	E	G
		(+ = büyüme, - = büyüyememe)					
Mutant	1	-	-	-	+	-	+
	2	-	+	-	+	-	+
	3	-	-	-	-	-	+
	4	-	+	+	+	-	+
	5	+	+	+	+	-	+

Reaksiyon zincirindeki bileşiklerin sırasını bulmak için daha önce tanımladığımız prensibi uygulamamız gerekir. Burada temel nokta, bir mutasyonun reaksiyon

zincirinde gerekli olan bir enzimi engelleyerek biyosentetik zinciri bloke etmesidir. Dolayısıyla mutant, zincirde gerekli olan bir bileşiğe sahip olmadığından sonraki gelen bileşikler üretilmez. Eğer bloke edilen bileşikten önceki herhangi bir bileşik eklenirse, mutant yine de zincirdeki diğer bileşikler üretilmeyecektir. Oysa mutant sonraki bileşikler üretmek için gerekli olan enzimlere sahiptir. Eğer bloke edilen veya daha sonraki bileşiklerden herhangi biri ilave edilecek olursa mutant büyüyecektir. Bu testte reaksiyon zincirinde en son gelen bileşik en fazla sayıda mutantın büyümesine izin verecek, en önce gelen bileşik ise en az sayıda mutantın yaşamını destekleyecektir. Dolayısıyla diyagram aşağıdaki şekilde oluşturulabilir:



Her bir mutantın zincirde hangi noktada bloke edildiğine bakıldığında, beşinci mutantın E-A dönüşümünde bloke edildiği ve bu mutantın E tarafından desteklenemeyeceği açıkça görülecektir. E'nin dışındaki diğer bileşikler ise mutant 5'in büyümesini destekleyecektir. Mutant 4'ün ise E veya A tarafından desteklenemeyeceği ve A-C dönüşümünde bloke edildiği görülecektir. Benzer yaklaşımla 5-4-2-1-3 sıralaması elde edilir ve diyagrama aşağıdaki şekilde ilave edilir:



13.5. Gen-Protein İlişkileri

Bir gen-bir enzim hipotezi, genin fonksiyonunun anlaşılmasına yarayan önemli bir adım olmuştur. Ancak genlerin enzimlerin fonksiyonunu nasıl kontrol ettiğini anlamak için öncelikle, enzimlerin protein olmalarından dolayı, proteinlerin yapılarının incelenmesi gereklidir.

13.5.1. Proteinlerin yapısı

Bir protein molekülü, düz bir iplik üzerinde sonlarından birbirine bağlanmış amino asitlerden oluşan bir makromolekül olup, genel formülü $H_2N-CHR-COOH$ şeklindedir. Bu zincirdeki reaktif grup (R) glisin amino asidindeki gibi bir hidrojen atomundan, triptofandaki gibi kompleks bir zincire kadar herşey olabilir. Yaşayan organizmalarda her biri farklı bir R grubuna sahip olan 20 adet yaygın amino asit vardır. Proteinler geleneksel olarak dört seviyeye sahip olduğu düşünülen karmaşık bir yapıya sahiptirler. Tüm bu yapılar 24. Bölümde Proteinler ve Protein Mühendisliği başlığı altında detaylı olarak açıklanmaktadır.

13.5.2. Protein dizisinin belirlenmesi

Belirli bir protein saflaştırıldığında, bu proteini oluşturan çeşitli amino asitlerin belirli bir bölümü saptanabilmektedir. Ancak, proteinler sabit sayıda belirli özellikteki amino asitlerin birleşmesiyle oluşmuş bir yapı değildir. Her bir protein kendine has karakteristik diziye sahiptir. Küçük bir polipeptitten her defasında bir amino asitin kesilip tanımlanması yoluyla amino asit dizisi belirlenebilir. Ancak, büyük polipeptidler bu yolla kolayca dizi oluşturmazlar.

Büyük polipeptidlerin dizisinin bulunması için Frederick Sanger etkili bir metod geliştirmiştir. Proteindeki belirli amino asitler arasındaki bağları kıran farklı birçok proteolitik enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler önce büyük bir proteini küçük parçalar haline getirebilmekte ve daha sonra bu parçalar kromatografik kağıt üzerindeki bir çözücü içindeki hareket hızlarına göre ayrılmaktadırlar. Farklı parçaların değişik çözücülerde farklı hızlara sahip olmalarından ötürü, parçaların ayrışımını teşvik etmek için iki-boyutlu kromatografi kullanılabilir (Şekil 13.1a). Bu teknikte, bir parça karışımı bir çözücüde ayrıldıktan sonra, kromatografi kağıdı 90° döndürülerek başka bir çözücü kullanılır. Kağıt boyandığında polipeptidler kağıt üzerinde karakteristik kromatografik yapılarda noktalar halinde belirlirler. Bu durum proteinin parmak izi olarak adlandırılır. Her bir nokta kesilip çıkarılabilir ve parçalar kağıttan yıkanabilir. Her bir noktanın yalnızca küçük polipeptidler içermesinden dolayı amino asit dizileri kolayca belirlenebilir.

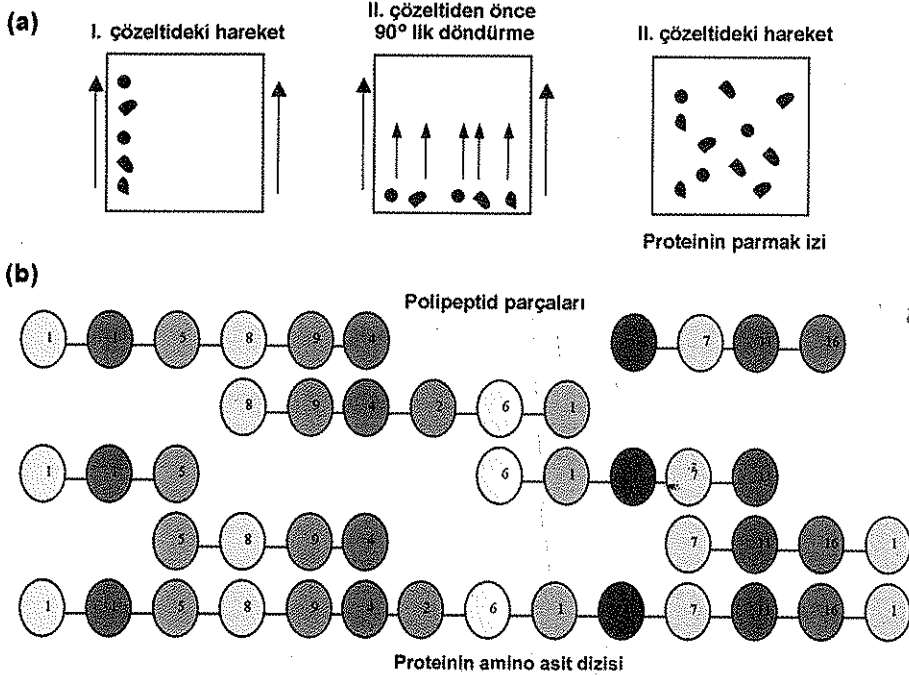
Farklı proteolitik enzimler kullanılarak protein farklı noktalardan bölünür ve çalışma tekrarlanarak parçaların başka setleri elde edilebilir. Değişik çalışmalardan elde edilen parçalar birbiriyle karşılaştırılır. Dolayısıyla, bu sorun bulmaca çözer gibi küçük parça dizilerinin eşleştirilmesi yoluyla çözülür (Şekil 13.1b). Bu ince tekniği kullanarak Sanger amino asit dizilerinin ve hatta farklı amino asitlerin miktarlarının belirli bir proteine özel olduğunu ispatlamıştır.

13.6. Protein Biyosentezi

DNA şeklinde organize olmuş olan genetik bilgi kopyalanma esnasında ya daha fazla DNA halinde kopyalanır, ya da protein haline dönüştürülür. Bu işlemler DNA'nın fonksiyonunu oluşturan bilgi transfer işlemleridir.

DNA'nın protein biyosentezini nasıl idare ettiğinin ilk ipuçları, bakteriofajlarda genlerin etkisini göstermesinin (expression), transkripsiyon (yazılım) adı verilen bir olay ile, bir DNA kalıbından RNA moleküllerinin sentez edilmesinin bir sonucu olduğunun bulunmasıyla anlaşılmıştır. RNA çift iplikçikli DNA sarmalının yalnızca bir iplikçikinden sentezlenir. Bu yazılım işlemi RNA polimeraz adı verilen bir enzim tarafından katalize edilir ve kopyalanmanın (replikasyon) kurallarına benzer yolları takip eder (Şekil 13.2). RNA, DNA ile benzerlikler gösterir, ancak RNA'da şeker olarak riboz kullanılır ve DNA'nın timin (T) bazının yerine urasil (U) bulunur. Bir hücreden RNA'nın izalasyonu birçok temel RNA çeşidiyle sonuçlanır.

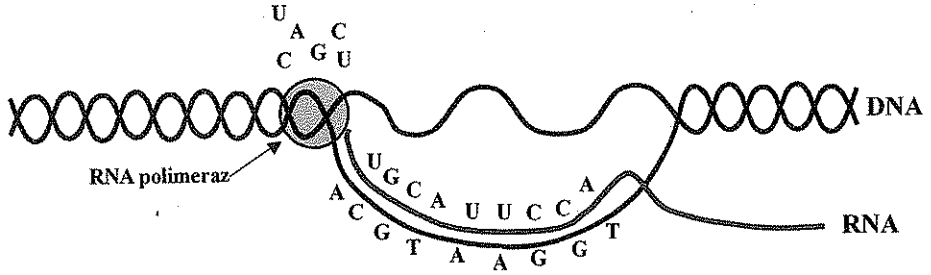
Bunlar; ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), elçi (mesajcı) RNA (mRNA) ve az miktarlardaki diğer küçük RNA'lardır.



Şekil 13.1. (a) Bir polipeptid parça karışımının iki-boyutlu kromatografisi. (b) Tam bir amino asit dizisinin inşası için polipeptid parçalarının dizilimi. Aynı protein üzerinde farklı proteolitik enzimler kullanılarak farklı parmak izleri elde edilir ve bu parmak izlerindeki çıkan amino asit dizileri eşleştirilerek proteinin tam amino asit dizisi belirlenmiş olur (Griffiths ve ark., 1996'dan uyarlanmıştır).

Üç farklı büyüklükteki RNA, protein biyosentezinin makinaları olan ribozomları oluşturmak için spesifik proteinlerin bir sırası halinde birleşir. Bir elçi RNA (mRNA) molekülünden ribozom yardımıyla bir polipeptidin sentezlenmesine translasyon (çevrilim) denir. Transfer RNA (tRNA) ise daha ziyade küçük RNA moleküllerinin bir grubunu kapsar. Bunların her biri belirli bir amino asite özel olup, amino asitleri ribozomlara taşırlar. Böylece, her taşınan amino asit büyüyen bir polipeptide bağlanır.

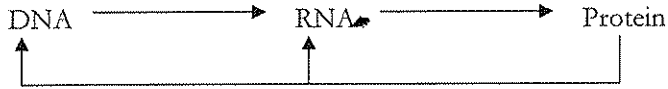
Bir DNA kalıbından üretilen mRNA molekülleri proteinler halinde çevrilen bilgiyi içerirler. mRNA'daki bazların dizilimi amino asitlerin dizisini belirler. İlerideki kısımlarda bu işlemin nasıl gerçekleştirildiği ve bu genetik şifrenin nasıl çözümlendiği ayrıntılı olarak verilecektir.



Şekil 13.2. Tek iplikçikli bir DNA kalıbından serbest nükleotidler kullanılarak RNA'nın sentezi. İşlem RNA polimeraz enzimi tarafından katalize edilmektedir.

13.6.1. Protein biyosentezinin kuralları

Hücrelerdeki DNA, RNA ve protein biyosentezi arasındaki karmaşık ilişki dönüşümlüdür ve aşağıdaki şekilde özetlenebilir:



DNA, RNA sentezini; RNA da protein biyosentezini idare eder ve bazı özel proteinler de hem RNA hem de DNA sentezini katalize ederler. Bu sirküler bilgi dönüşümü bütün hücrelerde oluşur ve moleküler biyolojide “Temel Kural” olarak isimlendirilir. Araştırma sonuçlarına dayanılarak protein biyosentezinin kuralları dört madde halinde özetlenebilir:

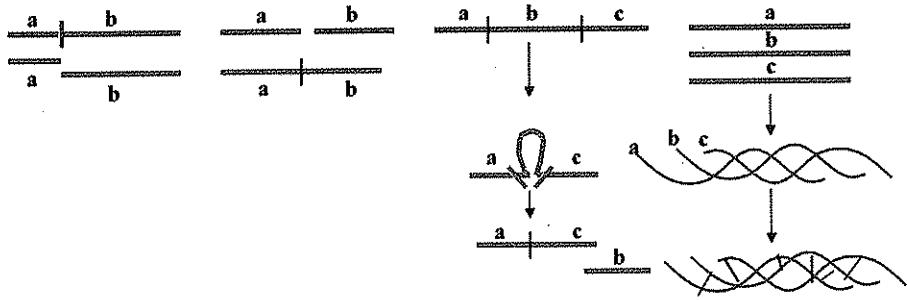
1. Proteinler sınırlı sayıda farklı alt ünitelerin birleşmesinden meydana gelirler. Teorik olarak amino asit sınıfının sınırsız olması ve değişik organizmalarda birkaç düzine amino asidin metabolik ürünler olarak tanımlanmalarına rağmen, yalnızca 20 farklı amino asit protein yapımında kullanılmaktadır (Tablo 13.2).
2. Alt ünitelerin her biri sırayla zincire eklenmektedir. Proteinlerin inşası adım adım gerçekleşen bir olaydır. Protein biyosentezi amino (NH_2) kısmından başlar ve karboksil (COOH) kısmına doğru devam eder.
3. Her bir zincir spesifik bir başlangıç noktasına sahip olup, büyüme belirli bir yönde devam eder. Dolayısıyla bu işlem başlangıç ve durma sinyallerine ihtiyaç duyar. Polimer sentezi yapan bir hücresel mekanizma işleme doğru noktadan başlayıp son vermeseydi, bir hücre kısmen tamam olur ve muhtemelen işe yaramaz polimerlerle dolu olurdu. İnce bir şekilde planlanmış olan hücresel mekanizmalar bu olumsuzluğa neden olmayacak doğru başlangıç ve son verme işlemini garanti altına alır.

4. İlk sentetik ürün genellikle modifiye edilir. Bir protein molekülünün fonksiyonel formunun uzunluğu çok seyrek olarak ilk sentezlenen formunun uzunluğuyla aynıdır. Orijinal zincir çoğunlukla aktif değildir veya tam değildir. Aktif bir zincir yapmak için spesifik enzimler orijinal zincirin uzunluğunu değiştirirler. Proteinler çoğunlukla kısaltılır ve RNA zincirleri birbirlerine bağlanır. Uzun RNA zincirlerinin uzak parçaları birbirine, aradaki parça uzaklaştırılarak, eklenebilir veya protein zincirleri kovalent bağlarla birbirlerine sarılabilirler (Şekil 13.3). İlk zincirler de zincirin oluşturulması esnasında veya sentezi tamamlandıktan sonra bazı kimyasal eklemelerle karşılaşabilirler. Metil grupları DNA, RNA ve proteindeki spesifik bölgelere eklenebilir. Aynı şekilde fosfat grupları ve oligosakkaritlerin geniş bir çeşidi proteinlere ilave edilir. Bu tip kimyasal değişiklikler önemli fonksiyonlara sahip olabilirler.

Tablo 13.2. Genetik kod. Toplam 20 adet olan amino asit, kendilerini kodlayan 64 adet kodon ile birlikte verilmiştir.

		İkinci kodon				
		U	C	A	G	
Birinci kodon (5'	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } DUR UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } DUR UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G

Ala: Alanin, Arg: Arginin, Asn: Asparagin, Asp: Aspartat, Cys: Sitein, His: Histidin, Ile: İzolösin, Gln: Glutamin, Glu: Glutamat, Gly: Glisin, Leu: Lösin, Lys: Lisin, Met: Metionin, Phe: Fenilalanin, Pro: Prolin, Ser: Serin, Thr: Treonin, Trp: Triptofan, Tyr: Tirozin, Val: Valin.



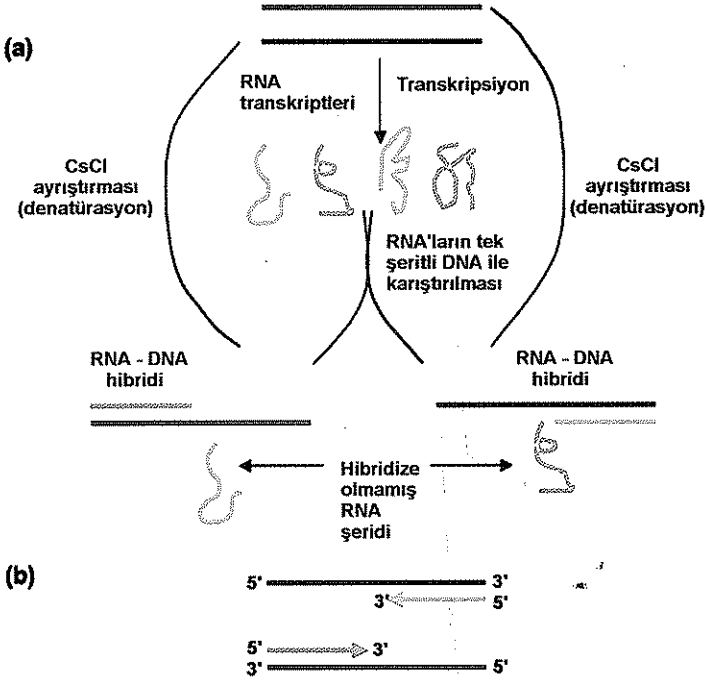
Şekil 13.3. Doğrusal biyopolimerlerin oluşumlarından sonraki modifikasyonlar.

13.6.2. Transkripsiyon (Yazılım)

Transkripsiyon işlemi, DNA replikasyonundaki baz eşleşmesi kurallarının aynısını takip eder. Hangi DNA kaynağı kullanılırsa kullanılsın, sentez edilen RNA $(A+G)/(U+C) = 1$ oranına sahiptir. Hatırlanacağı gibi bu oran DNA'da $(A+G)/(T+C)$ şeklindeydi. Bu baz eşleşmesi bir RNA transkriptinin genin güvenilir bir kopyası olduğunun garantisidir.

RNA yalnızca bir DNA iplikçğinden yazılır ve aynı DNA ipliğinin bütün kromozom boyunca veya hücre döngüsünün tüm dönemlerinde transkripsiyona uğraması zorunlu değildir. Döngünün farklı dönemlerinde üretilen mRNA, kromozomun farklı bölgelerine hibridize olmakta, böylece her bir dönemde farklı genlerin aktifleştğı görülmektedir (Şekil 13.4). mRNA'yı üretmek için transkript edilen DNA iplikçğıne kalıp (sens) iplikçğı ve karşısındaki tamamlayıcı iplikçğı de kalıp olmayan (antisens) iplikçik adı verilir (Şekil 13.5). Transkript edilen mRNA, "T"nin yerine geçen "U" dışında, kalıp olmayan iplikçikle tam bir benzer diziyeye sahiptir.

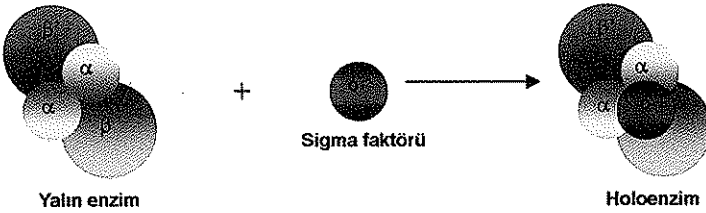
Doğal olarak transkripsiyon gibi oldukça kontrollü bir kimyasal reaksiyon kendi kendine gerçekleşmez. Bu reaksiyon RNA polimeraz adı verilen bir enzim tarafından katalize edilir. Şekil 13.6, *E. coli*'de RNA polimerazın yapısını göstermektedir. Enzimin dört alt ünite tipinden oluştuğı görülmektedir. Beta (β) alt ünitesi 150000, beta prime (β') 160000, alfa (α) 40000 ve sigma (σ) 70000 dalton molekül ağırlığına sahiptir. Sigma (σ) alt ünitesi kompleksten ayrılarak yalın enzim (core enzyme) oluşumuna neden olur. Sigma ile birlikteki tam enzim RNA polimeraz-holoenzim olarak adlandırılmakta ve transkripsiyon başlangıcının doğru olması için gereklidir. Yalın enzim ise başlangıç sonrası transkripsiyona devam edebilir. Transkripsiyon; başlangıç, uzama ve sona eriş safhaları olmak üzere üç farklı safha halinde gerçekleşir.



Şekil 13.4. (a) DNA-RNA hibridizasyonu, her bir RNA transkriptinin anaç DNA'nın yalnızca bir ipliğini tamamlayıcı olduğunu göstermektedir. (b) Zıt iki DNA iplikçiginden gerçekleşen transkripsiyonun birbirine asimetric pozisyonu (Griffiths ve ark., 1996'dan uyarlanmıştır).



Şekil 13.5. β -galaktosidaz enzimini kodlayan genin bir bölümünden transkript edilen ve sentezlendiği kalıp DNA'yı tamamlayıcı olan mRNA'nın dizisi.



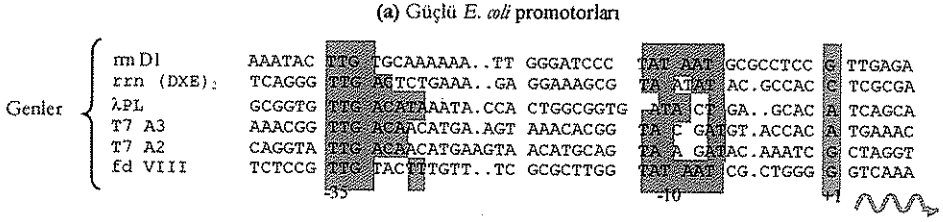
Şekil 13.6. RNA polimerazın yapısı. Yalın enzim iki adet α polipeptidi, bir β ve bir de δ polipeptidlerini içerir. Sigma (σ) alt ünitesinin eklenmesi promotor (teşvik edici) bölgelerinin doğru başlangıç yapmalarını sağlar.

13.6.2.1. Başlangıç safhası

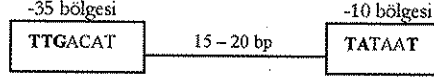
İlk olarak, RNA polimeraz enzimi genden önde bulunan ve promotor (teşvik edici) olarak adlandırılan bir bölgeyi tanır. Yaptıkları görev aynı olmasına rağmen promotor'ların yapısı prokaryot ve ökaryotlarda küçük farklılıklar göstermektedir. *E. coli* genomunda 6 farklı transkripsiyon başlangıç noktasındaki promotor dizileri Şekil 13.7'de gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi her durumda kısmi homolojiye sahip iki bölge dikkati çekmektedir. Bu bölgeler transkripsiyon başlangıç bölgesine göre bulundukları yerden ötürü -35 ve -10 bölgeleri olarak adlandırılmaktadır.

Ökaryotlardaki promotor yapısı ise Şekil 13.8'de özetlenmiştir. Ökaryotik promotor'larda da korunan bölgelerin varlığı dikkati çekmektedir. Transkripsiyonun başlamasını sağlayan RNA polimeraz II'yi yöneten TATA kutusu, transkripsiyon başlangıç noktasından memelilerde 30 baz çifti (-30 bp) ve mantarda ise 60-120 baz çifti önde bulunmaktadır. TATA kutusu promotora yakın diğer iki korunmuş bölge ile birlikte olduğunda en etkin şekilde çalışır. Bu bölgeler transkripsiyon başlangıç bölgesinden yaklaşık 100 bp ve 200 bp önce gelirler. CCAAT kutusu (~ -100 bp) bu bölgelerden ilki ve GC-zengin bölge (~ -200 bp) ikincisi olarak hizmet eder.

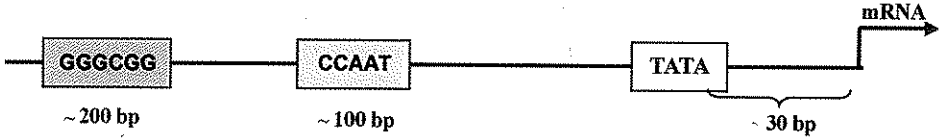
RNA polimerazın ayrılan ünitesi olan sigma (σ) faktörü, enzimin özellikle promotor bölgelerini tanımasını ve bağlanmasını sağlar. İlk olarak holoenzim bir promotora araştırır ve -35 ve -10 bölgelerini tanıyarak promotora gevşek bir şekilde bağlanır (Şekil 13.9). Elde edilen bu yeni yapıya kapalı promotor kompleksi adı verilir. Daha sonra enzim promotora sıkıca bağlanarak, promotor içindeki DNA'nın iki iplikçığının -10 bölgesinde birbirinden ayrılmasını sağlar. Bu yapı ise açık bir promotor kompleksi olarak adlandırılır. Yaklaşık olarak 10 baz çifti çözülür ve polimeraz enzimi RNA zincirini inşa etmeye başlar. Enzimin bu iş için kullandığı yapı malzemeleri ATP, GTP, CTP ve UTP'den oluşan dört ribonükleosit trifosfatlardır. İlk veya başlangıç noktası genellikle bir pürin nükleotidir. İlk nükleotid yerleştirildikten sonra, polimeraz ikinci nükleotide bağlanır ve onu birinci nükleotidle birleştirir. Böylece, RNA zincirinin başlangıç fosfodiester bağı oluşmuş olur. Bu aşamada başlangıç safhası tamamlanmış olur.



(b) promotorların ortak sekansları



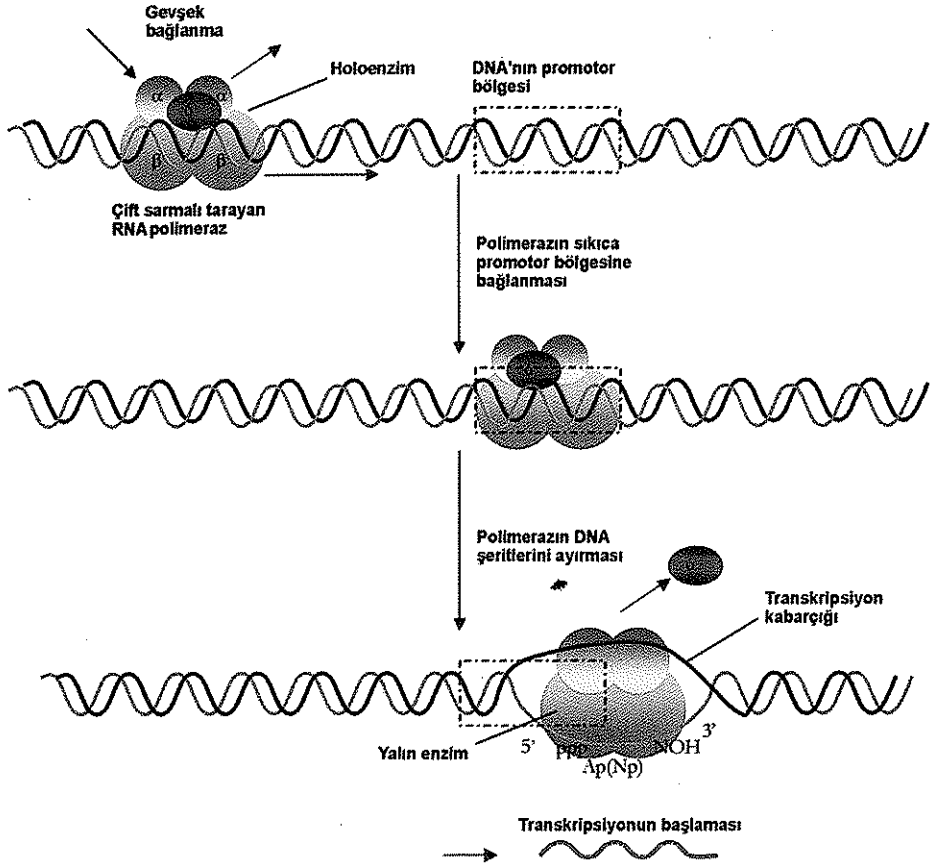
Şekil 13.7. (a) Altı güçlü *E. coli* promotorundaki mavi renkle gösterilen ortak diziler. Dizilerin yazılımı sırasında aralarında bırakılan boşluklar ortak dizilerdeki homolojiyi maksimum düzeyde gösterebilmek amacıyla bırakılmıştır. (b) Promotorların ortak dizileri. Koyu siyah bazlar bütün promotorlarda mevcut iken, renkli gösterilen bazlar bazılarında mevcut, bazılarında ise değildir (Lodish ve ark., 1995'ten uyarlanmıştır).



Şekil 13.8. Yüksek ökaryotlarda promotorun yapısı. TATA kutusu mRNA başlangıç bölgesinden yaklaşık 30 bp önde bulunur. Diğer iki korunmuş bölge olan CCAAT ve GC kutuları genellikle transkripsiyon başlangıç noktasından, sırasıyla, yaklaşık 100 ve 200 bp önde bulunurlar.

13.6.2.2. Uzama safhası

Başlangıç safhasının başlamasından kısa bir süre sonra sigma faktörü RNA polimerazdan ayrılır ve uzama safhası başlar. Transkripsiyonun uzama safhasında RNA polimeraz, ribonükleotidlerin büyüyen RNA zincirine ardışık olarak bağlanmalarını sağlar. RNA, daima 5'→3' yönünde sentez edilir. Bu işlem esnasında RNA polimeraz DNA kalıbı boyunca ayrılan DNA iplikçiklerinin oluşturduğu transkripsiyon kabarcığı ile beraber hareket eder (Şekil 13.9). Bu kabarcık içinde bulunan DNA kalıbındaki bazlar teker teker gelen ribonükleotidlerle eşleşirler. Bu transkripsiyon aleti ilerledikçe ayrılmış olan DNA iplikçikleri tekrar birbirine sarılarak eski çift sarmal hallerine geri dönerler. Bu işlem DNA replikasyonu ile transkripsiyon arasındaki iki temel farklılığa işaret etmektedir. Bunlar:



Şekil 13.9. Transkripsiyonun başlangıç safhası. İlk olarak RNA polimeraz bir promotor bölgesi araştırır. Bulduğu promotor bölgesine sıkıca bağlanarak kapalı bir kompleks oluşturur. Holoenzim kısa bir DNA bölgesini açarak DNA iplikçiklerini çözer ve transkripsiyon başlatılarak sigma faktörü serbest bırakılır (Darnell *ve ark.*, 1990'dan uyarlanmıştır).

- RNA polimeraz transkripsiyon süresince yalnızca bir RNA ipliği üretmektedir. Yani, yalnızca bir DNA iplikçisi kopyalanmaktadır. Dolayısıyla transkripsiyonun bu yüzden asimetric olduğu ifade edilir. Oysa DNA replikasyonunda her iki iplikçikte kopyalanmaktadır.
- Transkripsiyonda DNA'nın çözülümü sınırlıdır ve geçici bir süre içindir. Yalnızca RNA polimerazın DNA kalıp iplikçisini okumasına yetecek kadar iplikçik ayrışımı gerçekleşir. Buna karşılık DNA replikasyonunda iplikçikler birbirinden tamamen kalıcı olarak ayrılırlar.

13.6.2.3. Sona eriş safhası

Promotor'ların transkripsiyon için başlangıç sinyalleri olarak görev yapmaları gibi genlerin sonlarındaki diğer bölgeler de sona eriş sinyalini verirler. RNA polimeraz sona eriş sinyallerini de tanır ve sonuçta olgunlaşmamış (ham) RNA ve enzim DNA kalıbından ayrılır. *E. coli*'de gerçekleşen transkripsiyonun sona erdirilmesi iki ana mekanizmaya sahiptir.

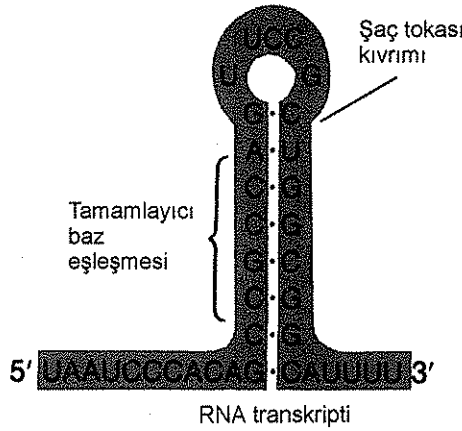
İlki, işlemin direkt olarak sona erdirilmesidir. Bitirici diziler yaklaşık olarak 40 bp içerirler ve kalıp üzerinde 6 veya daha fazla A tarafından izlenen GC-zengin bir bölge ile son bulurlar. RNA üzerindeki tamamlayıcı GC dizileri sıralanmış şekillerinden ötürü transkriptin bu bölgesinde kendisi üzerinde tamamlayıcı bir bağ oluşturma kabiliyetindedir. Bu bölgede sonuç olarak oluşan çift iplikçikli RNA bölgesi saç tokası kıvrımı olarak adlandırılır (Şekil 13.10). Bu kıvrım DNA kalıbındaki A'lara karşılık gelen bir seri U ile son bulur. Saç tokası kıvrımı yapısı ve U serisi RNA polimerazın serbest bırakılması ve transkripsiyonun sona erdirilişi için bir sinyal görevi görür.

Sona erişin ikinci tipinde, RNA polimerazın sona eriş sinyallerini tanıması için *rho* olarak isimlendirilen ilave bir protein faktörünün yardımına ihtiyaç duyulur. Bu tip sona eriş sinyaline sahip mRNA'larda saç kıvrımı yapısı ve U serisi bulunmamaktadır. İlk olarak *rho* RNA üzerindeki spesifik bir bölgeye bağlanır ve RNA'yı RNA polimerazdan çekerek kurtarır ve transkripsiyonun sona ermesini sağlar. Sona erişin her iki mekanizmasının etkinliği, çevreleyen diziler ve diğer protein faktörleri tarafından da edilmektedir.

13.6.3. Translasyon (Çevrilim)

Translasyon, yapı ve fonksiyonunun özelliğinden ötürü transkripsiyona nazaran daha kompleksir. mRNA protein biyosentezini yönetmesine rağmen, mRNA ve 20 amino asidin hepsi bir tüp içinde karıştırılıp protein oluşumu beklenilse, bunun gerçekleşmeyeceği görülecektir. Çünkü, protein yapımı için başka komponentler gereklidir. Bu komponentlerin yapılarının anlaşılması translasyon mekanizmasının anlaşılmasında anahtar rolü oynamaktadır.

mRNA protein yapımında gerekli olan bilgileri üç harf olarak kodlanmış bir şekilde taşır. tRNA'lar mRNA'daki bu kodonları tanıyan ve karşılık gelen amino asidi büyüyen protein zincirine yerleştiren bir adaptör veya tercüman olarak görev yaparlar. tRNA'nın bu adaptör fonksiyonunun püf noktası, onun çift iplikçikli olarak son bulan yapısında yatmaktadır. tRNA'nın son kısmının bir tarafı spesifik bir amino asitle eşleşmektedir; diğer tarafı ise mRNA'daki kodona karşılık gelen bir antikodon içermektedir. Ribozomlar ise protein biyosentezinin fabrikaları olup bir proteinin yapımı için amino asitlerin birlikte bağlanmalarını sağlayan şartları oluştururlar. Bu bölümde tüm bu yapılar ve translasyonun oluşumunda oynadıkları roller detaylı olarak incelenecektir.



Şekil 13.10. RNA polimerazda bir sona eriş bölgesinin yapısı.

13.6.3.1. Transfer RNA (tRNA)

Protein biyosentezinde oldukça önemli bir fonksiyona sahip olan tRNA üçgü yaprağını andıran bir yapıya sahiptir (Şekil 13.11a). Aslında bu molekülün gerçekte bu şekilde görülmediği, normalde L şeklinde kıvrılmış bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 13.11b). Ancak, üçgü yaprağı modeli tRNA'nın ikincil yapısını yani molekülün baz çiftleşmesini göstermesi açısından önemlidir. Örneğin, diyagramın tepesinde tRNA'nın 5' kısmı sağda ve 3' kısmı solda olmak üzere iki ucu gösterilmektedir. Bu uçlar birbiriyle baz eşleşmesine sahip olup, kabullenici dal olarak adlandırılır ve 7 baz çiftine sahiptir. mRNA'nın yazılımını tanıyan kodonun bazlarını tamamlayıcı ve antiparalel olan bölge antikodon kıvrımı olarak adlandırılır. Diğer bir bölge ise daima modifiye olmuş urasil bazları içermesinden ötürü D-kıvrımı (dihidrourasil kıvrımı) adı verilen kısımdır. TΨC kıvrımı ise adını, hemen hiç değişmeyen üç baz dizisinden (TΨC) almaktadır. Psi (Ψ) tRNA içinde modifiye olmuş bir bazı (pseudouracil = yalancı urasil) simgelemektedir. Antikodon kıvrımı ile TΨC kıvrımı arasında uzunluğu 4 ile 13 baz çifti arasında bulunan değişken kıvrım bulunmaktadır.

Bu şekiller, tRNA nükleotid dizilimlerinin oldukça detaylı kimyasal analizler ve molekülün genel şeklinin X-ışığı kristalografisi yöntemiyle incelenmesi sonucunda belirlenmiştir. tRNA molekülleri birçok yapısal benzerlik göstermelerine rağmen, her biri doğru sentetaz enzimi tarafından tanınmasını sağlayan benzersiz (farklı) bir üç boyutlu yapıya sahiptir. Sentetaz enzimi bir tRNA'nın, aminoasil-tRNA'yı oluşturmak için spesifik bir amino asit ile birleşmesini katalize eder. tRNA'nın tutulmasının spesifikliği protein biyosentezinin bütünlüğü açısından önemlidir.

tRNA'nın nereden geldiği, DNA'sı ısıtılarak kısmen denature edilmiş bir hücreye radyoaktif tRNA'nın verildiği bir çalışma ile gösterilmiştir. Otoradiyografi

metoduyla hücre içine verilen radyoaktivitenin kromozomların belirli bölgelerinde toplandığı görülmüştür. Bu bölgeler muhtemelen tRNA genlerinin yerini göstermektedir. Bunlar bir proteini üreten mRNA'dan ziyade tRNA'yı üreten DNA bölgeleridir. Etiketlenmiş tRNA anaç gen ile arasındaki baz dizisi eşleşmesinden ötürü bu bölgelere hibridize olmaktadır. Aynı durum rRNA için de geçerlidir. Bu olay bize her genin protein kodlamadığını, bazı genlerin translasyon komponenti olan RNA'yı kodladığını göstermektedir. tRNA'nın üçgüç yaprağı gibi olan şekli muhtemelen maksimum stabiliteyi sağlamak amacıyla oluşturulmaktadır. tRNA nükleotidleri içinde birçok modifiye olmuş bazlar (pseudouracil= Ψ gibi) bulunmakta ve bunlar tRNA'nın kıvrılmasında direkt rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda, diğer tRNA fonksiyonlarında da görev aldıkları farz edilmektedir.

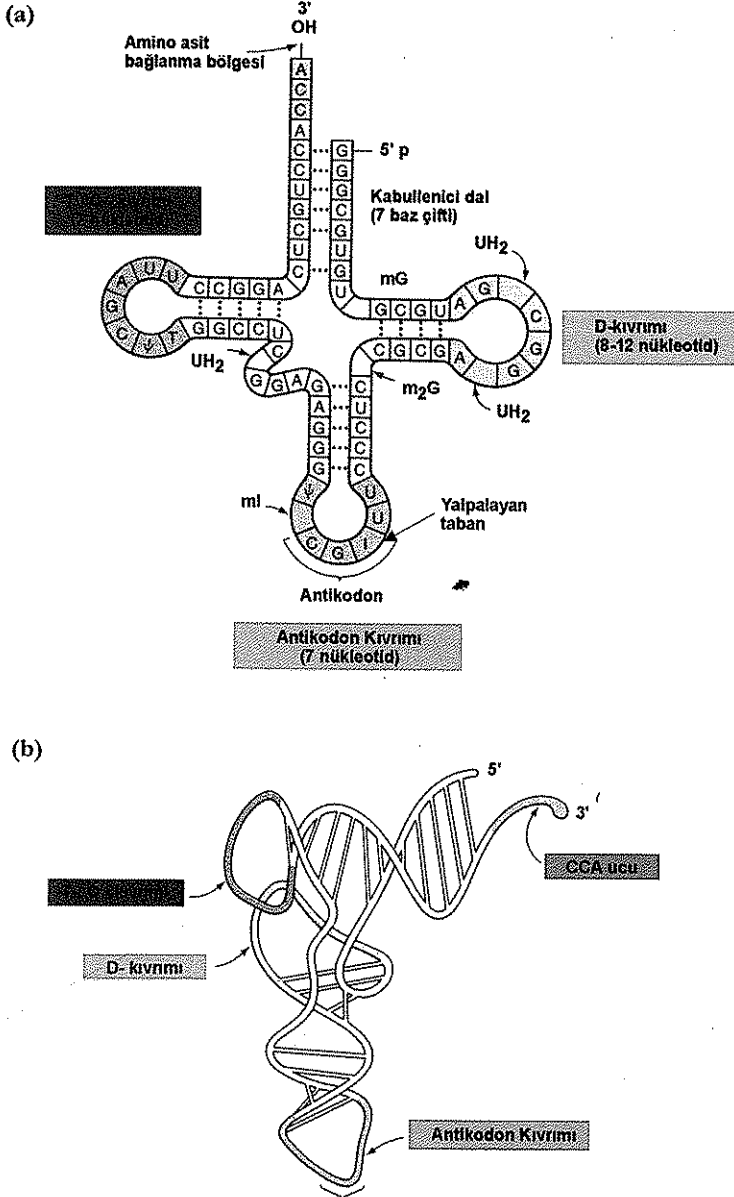
Bir tRNA'nın 3' sonuna bir amino asidin bağlanmasına tRNA'nın yakalanması adı verilir ve aminoasıl-tRNA sentetaz adı verilen bir enzim tarafından katalize edilir. Her bir amino asit için oldukça spesifik olan yalnızca 20 adet sentetaz enzimi bulunmaktadır. Her bir enzim spesifik amino asidini doğru tRNA ile birleştirir. Hem amino asit hem de tRNA için oldukça spesifik olan bu reaksiyon, amino asidin aminoasıl-AMP'yi oluşturmak için ATP tarafından aktive edilmesini ve daha sonra aktifleşmiş amino asidin uygun tRNA'ya transferini gerektirir.

13.6.3.2. Genetik kod

Genetik kod terimi, 20 adet amino asidi gösteren ve mRNA'lardaki üç bazlı kod kelimelerinin (kodon) setini ifade eder. Genetik kodun oluşum şekli ile ilgili kodonların çakışıp çakışmadığı, kodda boşluklar olup olmadığı ve bir kodonun kaç bazdan oluştuğu gibi birçok sorunun cevabı 1960'larda yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır.

13.6.3.2.1. Kodonların çakışma durumu

1961 yılında Tsugita ve Frankel-Courat, bütün mozaik virüsünden elde edilen mRNA'daki bir bazı değıştirdiklerinde (missense mutation) yalnızca bir amino asidin değıştiğini görmüşlerdir. Bu da kod çakışmasının olmadığını, her bir üçlü kelimenin (kodon) birbirinden bağımsız olduğunu göstermiştir. Örneğin, AUGCUA şeklinde bir mikro mesajı göz önüne alalım. Kodun üçlü olarak baştan itibaren okunduğunu kabul ettiğimizde, eğer kodonlar çakışmıyorsa AUG ve CUA şeklinde okunacaktır. Üçüncü baz olan G'deki bir değışiklik yalnızca bir kodonda (AUG), dolayısıyla bir amino asitte değışikliğe neden olacaktır. Diğer yandan, eğer bir çakışma söz konusu olsaydı, G bazı üç komşu kodonun (AUG, UGC ve GCU) bir parçası olacaktı. Dolayısıyla, son ürün olan proteinde üç amino asidin değışikliği söz konusu olacaktı. Ancak, üstte bahsedilen çalışma ile bunun böyle olmadığı ve kodonların birbirlerinden bağımsız oldukları açıkça gösterilmiştir.



Şekil 13.11. Transfer RNA (tRNA)'nın özellikleri. (a) Maya'ya ait fenilalanin tRNA'ya ait spesifik dizi yapısı. y=psödoüridin, mG=metilguanozin, m2G=dimetilguanozin, mI=metilinozin, UH₂ (veya DHU)=dihidroüridin. (b) tRNA^{Phe}'nin üç boyutlu yapısı. (Griffiths *ve ark.*, 1996'dan uyarlanmıştır).

13.6.3.2.2. Kodda boşluk bulunmaması

Eğer kodda tercüme edilmeyen boşluklar bulunsaydı, bir mesajdan bir baz çıkaran veya ekleyen mutasyonlar birkaç kodonu değiştirebilecekti ve bir sonraki boşlukta ribozomun normal faaliyetine dönmesi beklenecekti. Eğer herhangi bir boşluk söz konusu değilse, bu tip mutasyonlar iskelet değişimine neden olacaklarından ölümcül olacaktı.

AUGCAGCCAACG şeklindeki başka bir küçük mesajı örnek alalım. Eğer translasyon mesajın ilk bazından başlarsa, kodonlar AUG, CAG, CCA, ACG şeklinde okunacaktır. Eğer ilk U'dan sonra bir ekstra baz (X) eklenirse, şifre AUXGCAGCCAACG şeklinde değişecektir. Dolayısıyla kodonlar AUX, GCA, GCC, AAC olacaktır. Dikkat edilirse şifredeki bütün kodonlar değişmektedir. Böylece okuma iskeleti bir baz sola kaymıştır, yani ikinci kodon orijinal mesajda C ile başlarken, yeni mesajda C'nin yerini G almıştır.

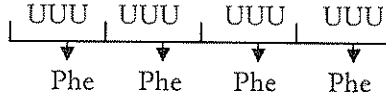
Diğer yandan eğer kodda boşluklar bulunsaydı, genetik koddaki her bir kodon bir veya daha fazla tercüme edilmeyen bazlarla çevrili olacaktı. Eğer boşluk Z harfi ile gösterilirse, başta verilen mesaj AUGZCAGZCCAZACGZ şekline dönüşecektir. Bu mesajın herhangi bir bölgesinden bir bazın silinmesi veya eklenmesi yalnızca bir kodonun değişmesine diğer kalan kodonların aynen korunmasına neden olacaktır. Örneğin, ilk kodona bir ekstra baz (X) eklenirse, ilk kodon AUXGZ şekline dönüşecek ve yanlış olacaktır. Ancak, boşluktan sonraki diğer kodonlarda bir değişiklik söz konusu olmayacak ve Z'den itibaren normal olarak translasyon gerçekleşecektir.

Francis Crick (1966a), tek baz ekleme veya silinmesine neden olan akridin (acridine) boyalarını bakterilere uyguladıklarında, oluşan mutasyonların çok şiddetli olduklarını ve hiçbir fonksiyonel ürün vermediklerini bulmuşlardır. Bu bize kodda herhangi bir boşluk bulunmadığını ve bu tip mutasyonların iskelet değişimine neden olacağını göstermiştir. Crick (1966a), ayrıca bir baz eklenmesinin, baz silinmesinin etkisini iptal edeceğini de (veya tam tersi) belirtmiştir. Son olarak Crick *ve ark.* (1962) üç komşu baz setinin eklenmesi veya çıkarılmasının yabani tip bir gen üretebileceğini açıklamışlardır. Bu durum şu örnekle açıklanabilir. Elimizde CAT CAT CAT CAT şeklinde kodon dizisine sahip bir mRNA olduğunu kabul edelim. Bu diziye ilk iki bazından sonra üç adet G bazının (GGG) eklendiğini veya ilk iki bazdan sonraki üç bazın silindiğini farz edelim. Sonuçta yabani genimiz CAG GGT CAT CAT CAT şeklini alıp ilk iki kodonu değişecek veya CAT CAT CAT CAT şeklini alarak bir kodonunu kaybetmiş görüntüsü verecektir. Her iki durumda da yabani tip genin ürettiği normal protein ürünü elde edilebilecektir.

13.6.3.2.3. Kodun üçlü yazılıma sahip olması

Her bir kodonun üç harften oluştuğu görüşü, Nirenberg ve Matthaei (1961)'in çok sayıda U bazını kullanarak ilk suni protein oluşumunu gözlediği çalışma ile

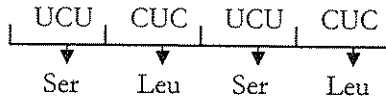
belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen proteinin amino asit diziliminin çoklu fenilalanininden oluştuğu belirlenmiştir. Dolayısıyla UUU üçlüsü fenilalanini kodlamalıdır.



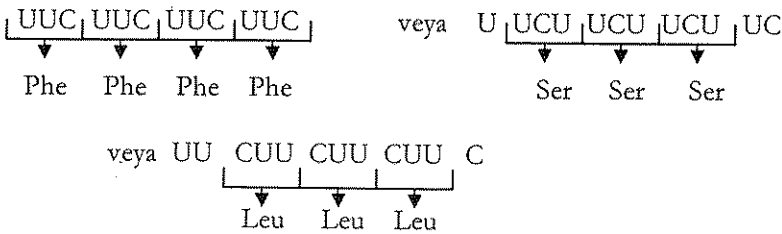
Bu çalışma hem kodonların üçlü yazılıma sahip olduklarını göstermesi, hem de dizisi bilinen sentetik mRNA'ların dizayn edilebileceği ve protein ürünlerinin analiz edilerek kodun yapısının açığa çıkarılabileceğini göstermesi açısından oldukça önemliydi. Nitekim, Khorana (1968)'nin sentetik mRNA araştırmaları kodonların üç baz içerdiklerini göstermiştir. Khorana çalışmasında UC bazlarının tekrarlandığı bir sentetik şifre kullanmıştır.

Eğer kodonlardaki baz sayısı tek ise, UC'nin tekrarlandığı ikili nükleotid, translyasyonun nereden başladığı farketmeksizin alternatif iki kodondan oluşmalıdır: UCU ve CUC. Sonuçta oluşan protein alternatif olarak tekrarlanan iki amino asitten oluşur. Eğer kodonlardaki baz sayısı çift olsaydı, sadece bir kodon (örneğin, UCUC) tekrarlanacaktı. Doğal olarak translyasyon ikinci bazdan (C) başlasaydı, tekrarlanan kodon CUCU olacaktı. Her iki durumda da sonuç proteini tek bir amino asidin tekrarlanmasıyla oluşacaktı.

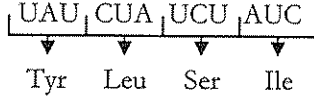
Ancak, Khorana (1968) çalışmasının sonunda çoklu UC'nin tekrarlanan ikili peptid şeklinde (UCU ve CUC) translyasyon edildiğini ve çoklu serin-lösin serisinin oluştuğunu bulmuştur. Bu da kodonların tek sayılı bazlardan oluştuğunu kesinlikle ispatlamıştır.



Tekrarlanan üçlüler ise translyasyonun başlama noktasına bağlı olarak farklı çoklu-peptidler oluştururlar. Örneğin, çoklu UUC, fenilalanin, serin veya lösin dizileri halinde translyasyon olabilir:



Bu durumu perçinleyen delil dördtlü bir nükleotidin tekrarlanmasıydı. Örneğin, çoklu UAUC serisinin tekrarlanması ile tirozin-lösin-serin-izolösin şeklinde bir translasyon olmuştur:



Bu durum kodonların üçlü yazılıma sahip olduğunu açıkça göstermektedir.

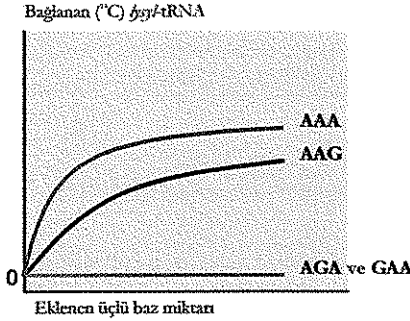
13.6.3.3. Kodun çözülmesi

Genetik kodun çözülmesi son iki asrın en heyecan verici genetik buluşlarından. Khorana (1968)'nin sentetik mRNA'ları bazı kodonlar hakkında kuvvetli ip uçları vermişti. Örneğin, çoklu UC bazları üçlü yazılım sonucu UCU veya CUC kodonlarını verecek, dolayısıyla bu kodonların birisi serini diğeri lösin kodlayacaktı. Fakat esas soru acaba hangisinin hangi amino asidi ürettiğinin altında yatmaktaydı. Nirenberg ve Matthaei (1961) bu soruya cevap olacak güçlü bir tahlil metodu geliştirmiştir. Araştırmacı üç nükleotidin bir spesifik aminoasit-tRNA'nın ribozomlara bağlanması için, bir mRNA kadar yeterli olduğunu bulmuştur. Örneğin, üçlü bir UUU, fenilalanil-tRNA'nın ribozoma bağlanmasına neden olacaktır. Dolayısıyla UUU, fenilalanini kodlayan bir kodondur. Ancak, bu metot dört dördlük değildi; bazı kodonlar amino asitler için gerekli olmasına rağmen, herhangi bir aminoasit-tRNA'nın bağlanmasına neden olmamıştır.

Bu iki metodun birlikte kullanımına aşağıdaki örnek verilebilir. Çoklu AAG dizimi lisin, glutamik asit ve arginin oluşumuna neden olmaktadır. Bu dizinin oluşturduğu sentetik mesajda AAG, AGA ve GAA olmak üzere üç farklı kodon bulunmaktadır. Ancak, acaba hangisi lisini üretmektedir? Bu üç kodon Nirenberg ve Matthaei (1961)'nin tahlil metoduna göre test edilmiş ve Şekil 13.12'deki sonuçları vermiştir. AGA ve GAA'nın (¹⁴C) lisil-tRNA'yı ribozoma bağlayamamalarına rağmen, AAG'nin bunu sağladığı görülmektedir. Dolayısıyla çoklu AAG dizisinde, AAG lisin üreten kodondur. Bu çalışmada dikkati çeken diğeri bir konu da üçlü AAA'nın da lisil-tRNA'nın bağlanmasına neden olmasıdır. Bu da AAA'nın diğeri lisin kodonu olduğunu göstermektedir. Bu durum genetik kodun genel bir özelliği olan çoğu durumda birden fazla üçlünün aynı amino asidi kodladığına işaret etmektedir. Diğer bir ifade ile kod "dejenere" olmuştur.

Bütün genetik kodlar daha önce verilen Tablo 13.2'de gösterilmiştir. Görüleceği gibi, 64 adet farklı kodon olmasına ve hepsinin de kullanılmasına rağmen yalnızca 20 farklı amino asit vardır. Mesajların sonunda bulunan üç dur (stop) kodonu (UAA, UAG ve UGA) dışındaki bütün kodonlar amino asitleri kodlarlar. Bu da

genetik kodun büyük oranda dejenere olduğunu gösterir. Örneğin, lösin, serin ve arginin 6 farklı kodona; prolin, treonin ve alaninin dahil olduğu birçok amino asit 4 farklı kodona; *izolösin* 3 farklı kodona ve diğer birçoğu iki farklı kodona sahiptirler. Yalnızca iki amino asit (metionin ve triptofan) bir kodona sahiptir.



Şekil 13.12. Farklı kodonlara karşılık olarak *lysyl*-tRNA'nın ribozomlara bağlanma durumu. *Lysyl*-tRNA radyoaktif (¹⁴C) ile etiketlenmiş ve AAA, AAG ile GAA bazlarının varlığında *E. coli* ribozomlarıyla karıştırılmıştır. *Lysyl*-tRNA-ribozom kompleksinin oluşumu selüloz nitrat filtreye bağlanma durumuyla ölçülmüştür.

13.6.3.4. Kodon ve antikodon arasındaki anormal baz eşleşmesi (Yalpalama hipotezi)

Bir organizmanın aynı amino asit için fazla sayıdaki kodonlarla nasıl başa çıktığı merak konusu olmuştur. Bunun bir yolu, aynı amino asidin her biri farklı bir kodon için spesifik olan fazla sayıda tRNA'lara sahip olabilmesidir. Ancak bu gerçek cevabın yalnızca bir parçasıydı, çünkü bu basit hipotezde tahmin edilenden daha az sayıda tRNA'lar elde edilmekteydi. Crick (1966b) tekrar araştırma sonuçlarına dayanarak yeni bir teori geliştirmiştir. Buna göre Crick, bir kodonun ilk iki bazının antikodon ile Watson-Crick baz eşleşmesi kurallarına göre doğru bir şekilde eşleşmek zorunda olduğunu, ancak üçüncü bazın "yalpalayarak" antikodonla anormal bir baz eşleşmesi gösterdiğini belirtmiştir. Bu öneri "yalpalama hipotezi" (wobble hypothesis) olarak adlandırılmaktadır.

Yalpalama hipotezine göre bazlar arasındaki muhtemel eşleşme olasılıkları Tablo 13.3'de gösterilmektedir. Tablodan da görüleceği gibi, Crick, tRNA'da "T" harfi ile gösterilen bir nükleosidin bulunduğunu farketmiştir. Bu nükleosid 'inozin' olarak adlandırılmaktadır. İnozin, guanozine benzer bir yapıya sahip olup aynı guanin gibi hareket eder. Dolayısıyla I'nın bir kodonun üçüncü pozisyonundaki C veya U ile eşleşmesi beklenirken, aynı zamanda yalpalama sonucu A ile de eşleşebilmektedir. Böyle bir durum üç kodonu AUC, AUU ve AUA olan izolösinde görülebilmektedir. Sonuç olarak, yalpalama olayı ile genetik kodu translasyon yapmak için gereken tRNA sayısı azaltılmaktadır.

Tablo 13.3. Yalpalama hipotezine göre muhtemel kodon-antikodon eşleşmeleri.

Antikodonun 5' sonu	Kodonun 3' sonu
G	U veya C
C	Yalnızca G
A	Yalnızca U
U	A veya G
I	U, C, veya A

13.6.3.5. Ribozomlar

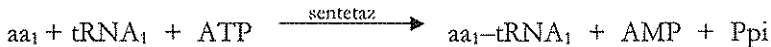
Daha önce de belirtildiği gibi, ribozomlar hücrelerdeki protein makineleri olup, RNA ve proteinden oluşan karmaşık bir yapıya sahiptirler. Ribozomlar prokaryotlarda birleşerek 70S parçasını oluşturan 50S ve 30S olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır (Şekil 13.13a). Buna karşılık olarak ökaryotlarda ise 80S parçasını oluşturan 60S ve 40S şeklindeki iki alt ünite bulunmaktadır (Şekil 13.13b). Ribozomlar kendilerini mRNA, tRNA ve protein biyosentezi için gerekli olan spesifik protein faktörlerine bağlama kabiliyetinde olan özel bölgeler içerirler.

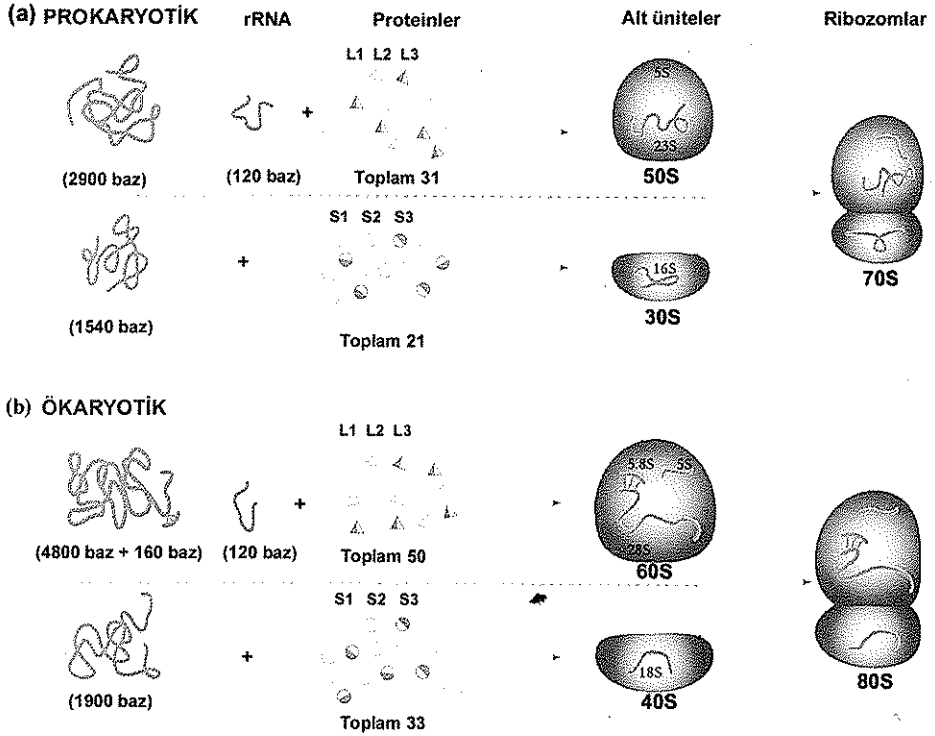
Ribozomda bir polipeptidin sentez edilişi Şekil 13.14'de gösterilmektedir. mRNA 30S alt-ünitesine, tRNA'lar ise alt-üniteler ile, çıkan ribozom üzerindeki iki bölgeye (A ve P) bağlanırlar. "A" bölgesi bir aminoasıl-tRNA'nın giriş bölgesidir. "P" bölgesi ise büyüyen polipeptid zincirini taşıyan peptidil-tRNA'nın bağlandığı bölgedir. Her bir yeni amino asit yeni bir aminoasıl-tRNA'ya, yeni bir peptid bağı oluşturacak şekilde büyüyen zincirin transferi yoluyla eklenir. Daha sonra tRNA, "P" bölgesinden serbest bırakılır ve ribozom mesaj boyunca bir kodon ileriye hareket eder. Böylece yeni bir peptidil-tRNA, "P" bölgesine transfer edilir ve "A" bölgesi gelecek olan yeni bir aminoasıl-tRNA için boşaltılır.

13.6.3.6. Protein biyosentezinin genel aşamaları

Protein biyosentezi aslında bir kimyasal reaksiyon olarak kabul edilebilir ve reaksiyonda karşılaşılan olaylar 4 madde halinde özetlenebilir:

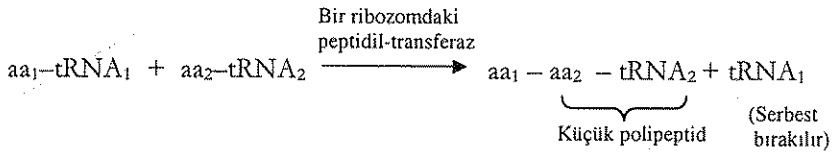
1. Her bir amino asit (aa) kendisine spesifik bir tRNA molekülüne ATP'den üretilen bir yüksek-enerji bağı ile bağlanır. Bu işlem sentetaz adı verilen spesifik bir enzim tarafından katalize edilir. Her bir amino asit için farklı bir sentetaz vardır.



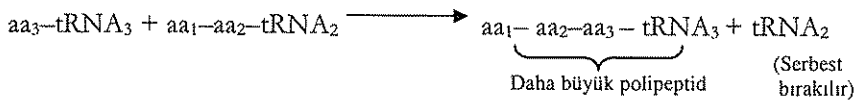


Şekil 13.13. Prokaryotlar (a) ve ökaryotlarda (b) birer adet küçük ve büyük alt üniteden oluşan ribozomların yapısı (Lodish ve ark., 1995'den uyarlanmıştır).

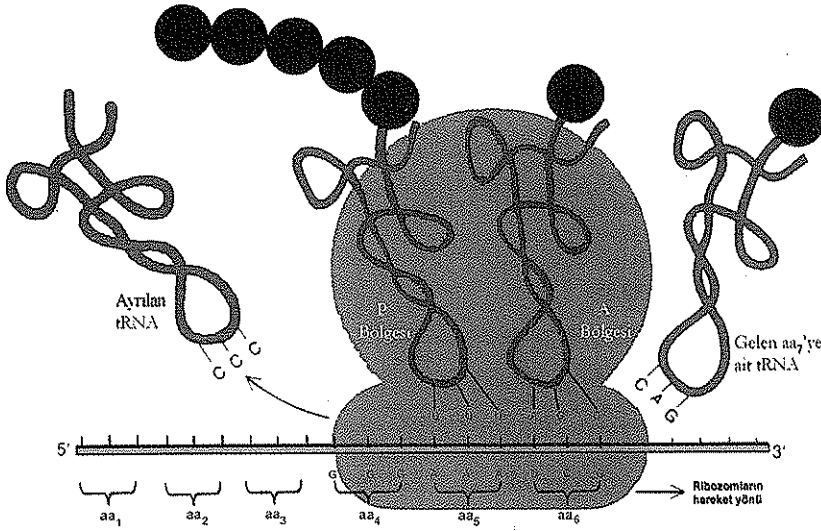
2. Tutulan tRNA'nın enerjisi ribozomda bir amino asidi bir diğerine bağlayan peptid bağı haline dönüştürülür.



3. Yeni amino asitler büyüyen zincire peptid bağları ile ilştirilirler.



4. Bu işlem en son amino asit eklenene kadar devam eder. Doğal olarak bütün her şey mRNA, ribozomlar, birçok ilave protein faktörleri, enzimler ve inorganik iyonların varlığında gerçekleşir.



Şekil 13.14. mRNA'nın translasyonu süresince büyümekte olan bir polipeptid zincirine amino asit eklenmesi (Griffiths *ve ark.*, 1996'dan uyarlanmıştır).

Protein biyosentezi transkripsiyonda olduğu gibi translasyonda da başlangıç, uzama ve sona eriş safhaları olmak üzere üç farklı safhada gerçekleşir.

13.6.3.6.1. Başlangıç safhası

Başlangıç safhası mRNA, ribozomlar ve spesifik tRNA moleküllerine ilave olarak, başlangıç faktörleri olarak adlandırılan IF1, IF2 ve IF3 gibi birçok faktöre ihtiyaç duyar. *E. coli* ve diğer bir çok prokaryotik organizmalarda yeni sentezlenen herhangi bir polipeptidteki ilk amino asit N-formilmetionindir. Bu amino asit tRNA^{Met} yerine tRNA^{fMet} olarak tanımlanan bir başlangıç tRNA'sı tarafından temin edilmektedir. Bu başlangıç tRNA'sı normal metionin antikodonuna sahip olmasına rağmen, metioninden ziyade N-formilmetionin temin etmektedir. *E. coli*'de AUG ve GUG ve seyrek olarak UUG başlangıç kodonları olarak kullanılmaktadır. Bu üçlülerden biri başlangıç pozisyonunda bulunduğu anda, N-formilMet-tRNA tarafından tanınır ve metionin, zincirdeki ilk amino asit olarak karşımıza çıkar.

Başlangıç safhası üç aşamada gerçekleşir ve aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Başlangıç safhası mRNA'nın 30S alt-ünitesine bağlanmasını içerir (Şekil 13.15). Bağlanma IF3 faktörü tarafından teşvik edilir. Protein biyosentezine angaje olmamış olan ribozom alt üniteleri serbest formda bulunurlar. Bunlar başlangıç işleminin bir sonucu olarak bütün bir ribozom halinde birleşirler.

2. IF2 başlangıç faktörü GTP (guanozin trifosfat)'ye ve başlatıcı fMet-tRNA'ya bağlanır ve fMet-tRNA'nın başlangıç kompleksine bağlanmasını teşvik eder. Böylece, fMet-tRNA'yı "P" bölgesine götürür.
3. Bir ribozom proteini parçalanarak iki alt ünitenin oluşumu sağlanır. Bu safhada IF2 ve IF3 faktörleri serbest bırakılır. (IF1'in rolü tam olarak açık değildir, ancak ribozomun tekrar sirkülasyonunda rol aldığı düşünülmektedir.)

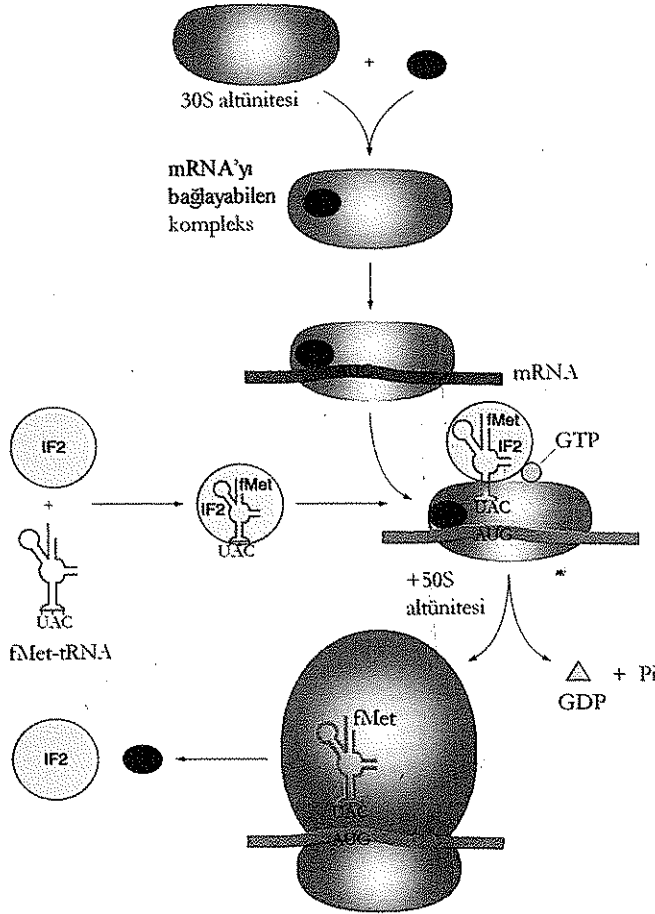
13.6.3.6.2. Uzama safhası

Uzama safhasının detayları Şekil 13.16'de gösterilmektedir. Bu işlem EF-Tu, EF-Ts ve EF-G gibi üç protein faktörü tarafından gerçekleştirilir ve üç ayrı adımdan oluşur:

1. Uzama faktörü EF-Tu aminoasit-tRNA'nın "A" bölgesine girişine yardım eder. Bunu başarmak için, EF-Tu ilk önce GTP'ye bağlanır. Aktifleştirilen bu EF-Tu/GTP kompleksi tRNA'ya bağlanır. Daha sonra kompleksin GTP'si GDP'ye hidrolize olmak yoluyla aminoasit-tRNA'nın "A" bölgesine bağlanmasına yardımcı olur ve bu noktada EF-Tu serbest bırakılır (Şekil 13.16a) ve yeni tRNA "A" bölgesinde terkedilir (Şekil 13.16b).
2. Uzama faktörü EF-Ts ribozomdan EF-Tu/GDP'nin ayrılışı ve EF-Tu/GTP'nin yeniden oluşumuna aracılık eder.
3. Translokasyon bölümünde, peptidyl-tRNA üzerindeki polipeptid zinciri peptidiltransferaz enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyonda "A" bölgesinde aminoasit-tRNA'ya transfer edilir (Şekil 13.16c). Daha sonra ribozom mRNA boyunca 5'→3' yönünde bir kodon ileri giderek translokasyon gerçekleştirilir. Bu adım uzama faktörü EF-G'nin yardımıyla ve bir GTP'nin GDP'ye dönüşümüyle oluşur (Şekil 13.16d). Bu işlem "P" bölgesinden boşaltılmış tRNA'yı serbest bırakır ve yeni oluşturulmuş peptidyl-tRNA'yı "A" bölgesinden "P" bölgesine transfer eder (Şekil 13.16e).

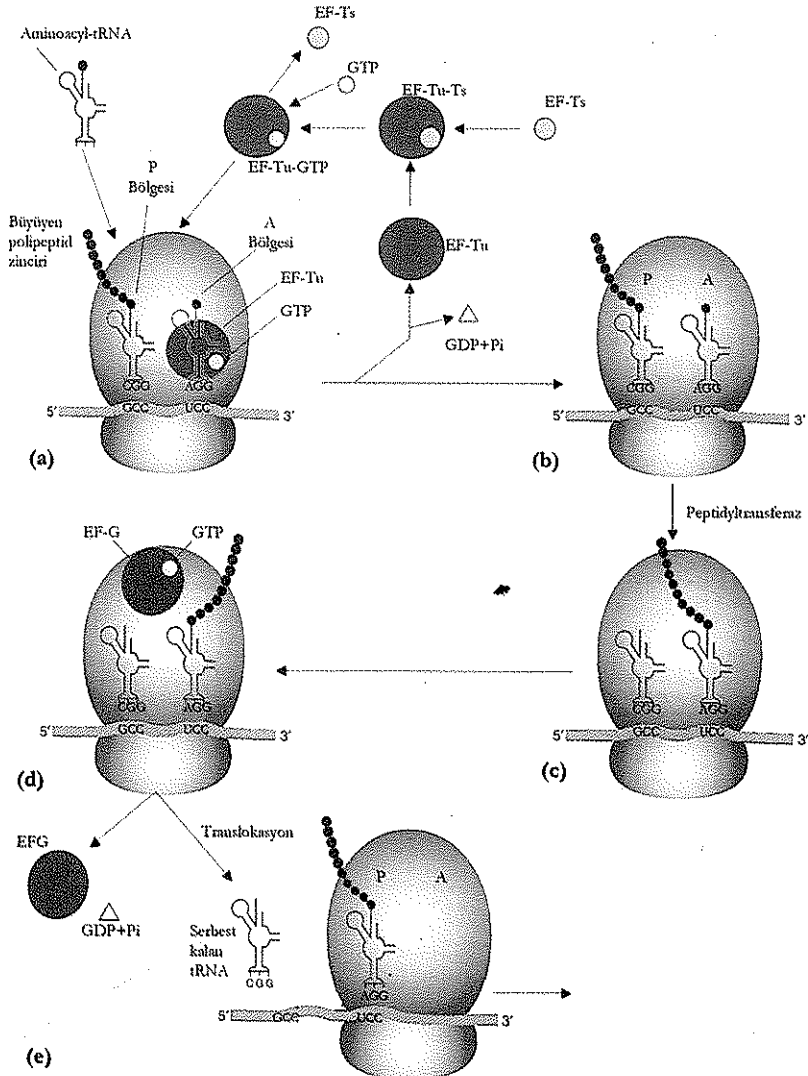
13.6.3.6.3. Sona eriş safhası

Daha önceki bölümde genetik kod anlatılırken UAG, UAA ve UGA şifresine sahip dur (stop) kodonlarını tanımlamıştık. İlginçtir ki, bu üçlü yazılımlar bir tRNA tarafından değil fakat RF1 ve RF2 şeklinde gösterilen ve serbest bırakma faktörleri olarak adlandırılan protein faktörleri tarafından tanınırlar. RF1 faktörü UAA ve UAG kodonlarını, RF2 ise UAA ve UGA kodonlarını tanırlar. Üçüncü bir faktör olan RF3 ise zincir sonlanması katalizasyonuna yardım eder.



Şekil 13.15. Translasyonun başlangıç safhasındaki aşamaların oluşumu (Griffiths ve ark., 1996'dan uyarlanmıştır).

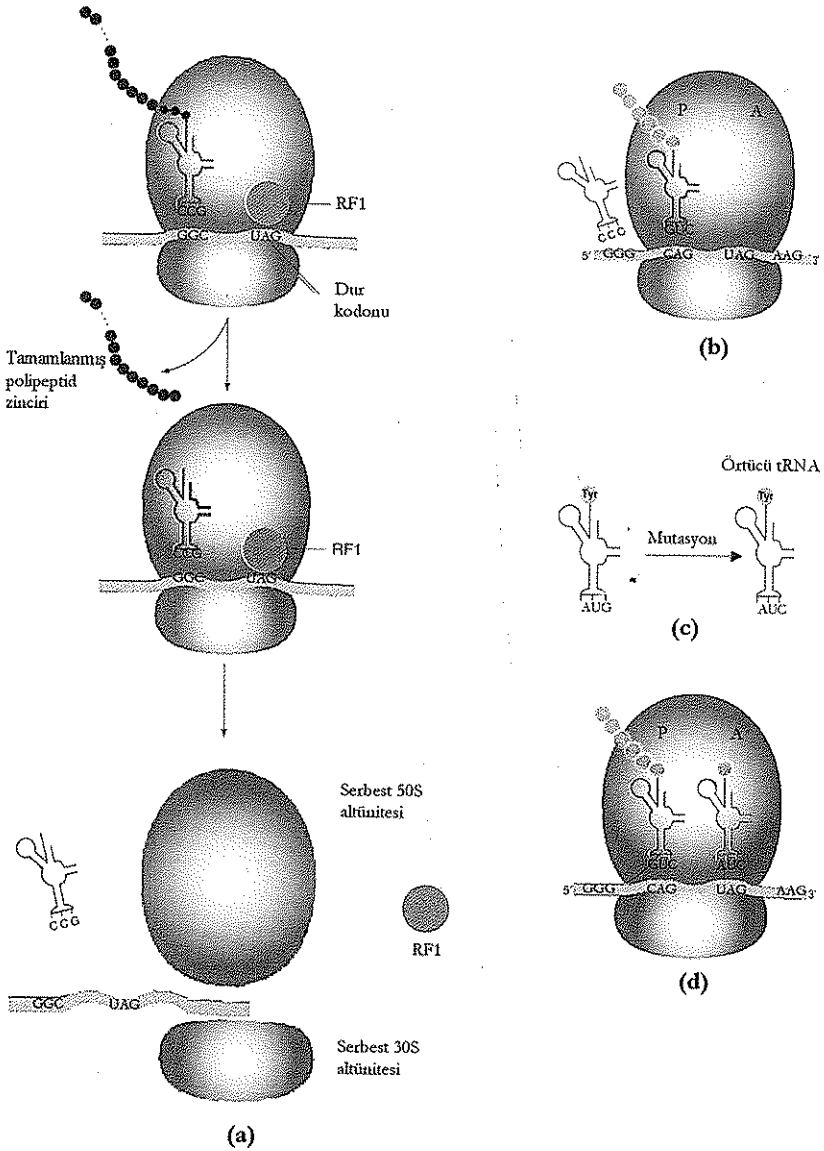
Peptidil-tRNA "P" bölgesinde iken serbest bırakma faktörleri zincir sonlandırıcı kodonlara bir karşılık olarak "A" bölgesine bağlanırlar. Sonra polipeptid "P" bölgesinden serbest bırakılır ve ribozomlar bir GTP molekülünün hidroliziyle gerçekleştirilen bir reaksiyonda iki alt ünite halinde bölünürler (Şekil 13.17a). Bu noktadan sonra translasyon aygıtı UAG üçlüsünü tanıyacak bir tRNA olmadığı için dur kodonundan daha ileriye geçemez (Şekil 13.17b). Bu durum protein biyosentezinin son bulmasına ve polipeptid parçasının serbest bırakılmasına neden olur. Bazı durumlarda ise örtücü mutasyonlar (nonsense suppressor mutation) oluşarak, belirli tRNA'ların antikodon kıvrımını değiştirip mRNA'daki dur kodonlarına bağlanmayı sağlarlar (Şekil 13.17c). Böylece dur kodonuna karşılık bir amino asit yerleşerek translasyonun devam etmesi sağlanır (Şekil 13.17d).



Şekil 13.16. Translasyonun uzama safhasının aşamaları (Griffiths ve ark., 1996'dan uyarlanmıştır).

13.6.3.6.4. Protein biyosentezinin genel özeti

Şu ana kadar anlatılan protein biyosentezindeki tüm safhalar Şekil 13.18'de özetlenmektedir. Başlangıç safhasında, ribozom mRNA'nın bir bölgesindeki başlama noktasını tanır ve tek bir amino asit taşıyan bir tRNA molekülünü bu noktaya bağlar. Bakteriyel proteinlerin hepsinde bu ilk amino asit daima N-formilmetionindir. Uzama safhasında, ikinci bir amino asit birinciye iliştilir. Sonra



Şekil 13.17. Protein biyosentezinin sona erdirilişi: (a) Translasyonun sona erişine öncülük eden aşamalar, (b) stop kodonunda translasyon işleminin durması, (c) bir tirozin tRNA'nın antikodon kıvrımında meydana gelen örtücü mutasyonun moleküler sonuçları, (d) değiştirilmiş olan tRNA tarafından dur kodonunun okunabilmesi ve uzama safhasının devam etmesi (Watson ve ark., 1983 ve Griffiths ve ark., 1996'dan değiştirilerek düzenlenmiştir).

ribozom, mRNA molekülü üzerindeki pozisyonunu değiştirir ve uzama devri tekrarlanır. Dur kodonuna ulaşıldığı zaman, amino asitlerden oluşan zincir bir proteini oluşturmak için kendiliğinden kıvrılır. Hemen bunu takiben ribozom iki alt ünitesine parçalanır. Bu iki alt ünite daha sonra yeni bir mRNA parçasının translasyonu için tekrar birleşecektir. Protein biyosentezi başlangıç, uzama ve sona eriş faktörleri olarak adlandırılan birçok katalitik proteinler ve enerji kaynağı olarak kullanılan GTP (guanozin trifosfat) tarafından katalize edilir.

13.7. Ökaryotlarda Protein Biyosentezinde Görülen Farklılıklar

Ökaryotlardaki protein biyosentezi prokaryotlardakine nazaran birçok açıdan farklılık gösterir. Prokaryotlarda tek bir RNA polimeraz tüm RNA'ları sentezlerken, ökaryotlarda üç farklı RNA polimeraz bulunmakta ve farklı görevleri gerçekleştirmektedir. Bunlar rRNA'yı sentezleyen Polimeraz I, mRNA'yı sentezleyen Polimeraz II ve tRNA ile 5S rRNA'yı sentezleyen Polimeraz III'tür.

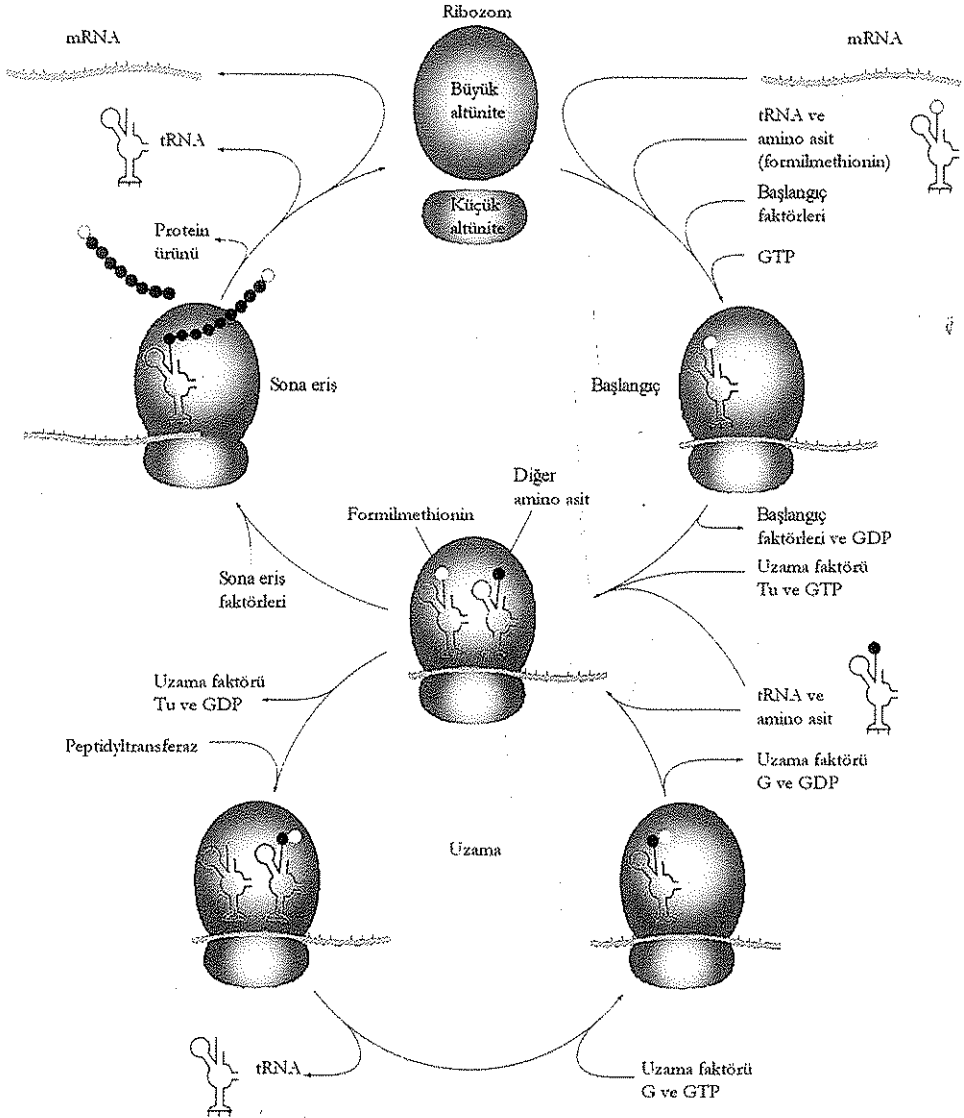
RNA polimeraz II tarafından tanınan ökaryotik promotorlar genelde en az bir ortak özelliğe sahiptirler. Bu da TATA kutusu olarak adlandırılan ve transkripsiyonun başlangıç noktasından yaklaşık 25-30 baz çifti önde bulunan ortak bir dizidir (Şekil 13.8). TATA kutusu yaklaşık olarak 25-30 baz çifti sonra transkripsiyonun başlama pozisyonunu belirler veya transkripsiyonun etkinliğini artırıcı bir rol oynar. Polimeraz II promotorları genellikle TATA kutusundan daha önde bulunan bazı önemli dizileri içerirler. Bu korunmuş bölgeler transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan spesifik aktivasyon proteinlerini tanıyan bölgelerdir (Şekil 13.8).

Birçok ökaryotik genler aynı zamanda teçvik ediciler (enhancers) olarak adlandırılan bağımsız elementleri de içerirler. Bunlar promotor elementleri olmayıp, yakınında bulundukları genin transkripsiyonunu harekete geçiren (stimüle eden) yapılardır. Polimeraz I promotor'ları kontrol ettikleri genin 5' bölgelerinde bulunurken, polimeraz II promotor'ları ise tamamen genin içine yerleşmiş durumdadırlar.

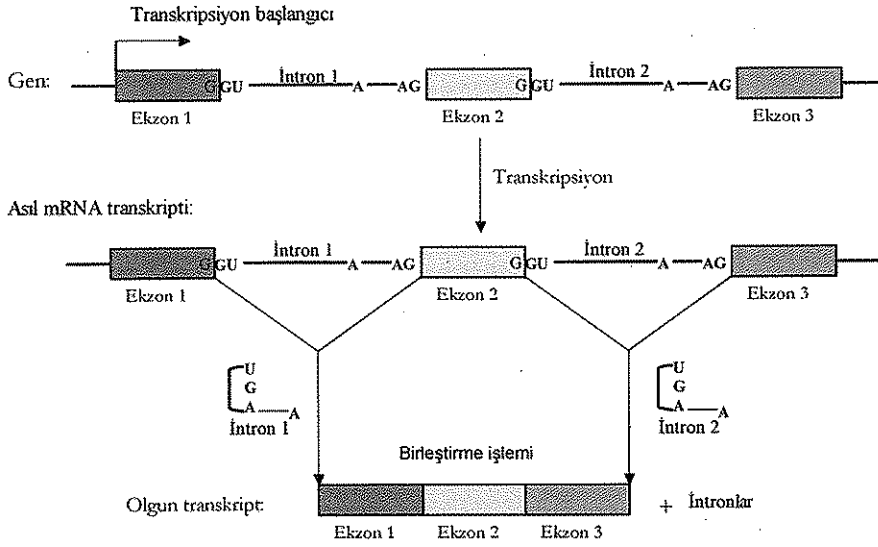
mRNA ve tRNA'yı kodlayan ökaryotik genlerin çoğu ara diziler olarak adlandırılan intronlarla kesilmiştir. Intronları çevreleyen ve proteinleri kodlayan diğer parçalara ise ekzon (exon) adı verilmektedir. Bir mRNA'nın olgunlaştırılması işlemlerinden biri intronların uzaklaştırılarak ekzon parçalarının birleştirilmesidir (splicing) (Şekil 13.19). Ökaryotik mRNA'nın birleştirme sinyalleri şaşılabacak derecede uniformdur. Intronların ilk iki bazları hemen daima GU ve son iki bazları da sürekli AG'dir. Ayrıca 5' ve 3' birleştirme bölgelerinde de ortak diziler bulunmaktadır.

Ökaryotik mRNA'ların çoğu 3' sonlarında yaklaşık 150-200 baz uzunluğunda çoklu (A) kuyruğuna sahiptirler. Çoklu (A) polimerazı tarafından eklenen bu kuyruk, mRNA'ya çekirdek içinde eklenir ve birleştirme olayı ile sitoplazmaya taşınma esnasında mesajla birlikte hareket eder. Çoklu (A)'nın mRNA'yı bozulmaktan koruduğuna inanılmaktadır. mRNA'ların 5' sonları ise başlık (caps) adı verilen

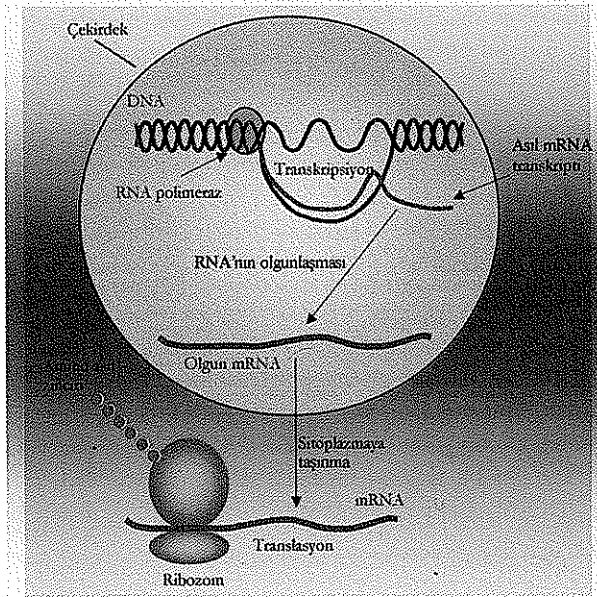
yapılar tarafından bloke edilmiştir. Başlıklar mesajı bozulmalardan koruma ve translasyon için ribozomlara girişi sağlama gibi iki görevi yerine getirirler.



Şekil 13.18. Başlangıçtan sona kadar bir protein biyosentezinde gerçekleşen olaylar (Griffiths ve ark., 1996'dan değiştirilerek düzenlenmiştir).



Şekil 13.19. İntronların uzaklaştırılarak ekzonların birleştirilmesi işlemi. Bu işlem sonucu elde edilen olgun mRNA transkripti sitoplazmaya taşınarak transasyonda kullanılır (Weaver ve Hedrick, 1991'den uyarlanmıştır).



Şekil 13.20. Ökaryotlarda protein biyosentezi. mRNA sitoplazmaya taşınmadan önce çekirdek içinde olgunlaştırılma işlemine tabi tutulmaktadır (Darnell, 1983'ten değiştirilerek düzenlenmiştir).

Ökaryotların özel fonksiyonlara sahip bazı genleri, düzenleyici proteinlerle interaksyonları sonucu çoğunlukla transkripsiyon düzeyinde kontrol edilirler. Gen etkisinin kontrol edildiği diğer düzeyler transkripsiyon sonrası ve translasyon anıdır. Temelde, translasyon sonrası düzeyde dahi kontrol edilebilirler. Bu temel farklılıklar dışında genlerin yapısı ve protein biyosentezi açısından prokaryotlar ve ökaryotlarda gerçekleşen olaylar daha önce anlatıldığı gibidir. Ökaryotlarda gerçekleşen protein biyosentezi basitçe Şekil 13.20'de gösterildiği gibi özetlenebilir.

Kaynaklar

- Avery OT, McLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance-inducing transformation of pneumococcal types. J. Exp. Med., 79: 137-158.
- Beadle GW, Tatum EL (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. Proc. Natl. Acad. Sci., 27: 499-506.
- Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ (1962) General nature of the genetic code for proteins. Nature, 192: 1227-1232.
- Crick FHC (1966a) The genetic code. Sci. Am., 215: 55-62.
- Crick FHC (1966b) Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. J. Mol. Biol., 19: 548-555.
- Darnell JE (1983) The processing of RNA. Sci. Am., 249: 90-100.
- Darnell JE, Lodish H, Baltimore D (1990) Molecular Cell Biology, 2nd edition, Scientific American Books, Inc.
- Garrod AE (1909) Inborn errors of metabolism. Oxford University Press, London. (Reprinted 1963, Oxford University Press, London)
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1996) An Introduction to Genetic Analysis, 6th edition, WH Freeman and Company, New York.
- Khorana HG (1968) Synthesis in the study of nucleic acids. Biochem. J., 109: 709-725.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J (1995) Molecular Cell Biology, 3rd edition, Scientific American Books, Inc.
- Morgan TH (1910) Sex-limited inheritance in *Drosophila*. Science, 32: 120-122.
- Nirenberg MW, Matthaei H (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci., 47: 1588-1602.
- Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171: 737-738.
- Watson JD, Tooze J, Kurtz DT (1983) Recombinant DNA: A Short Course. WH Freeman and Company, New York.
- Weaver RF, Hedrick PW (1991) Basic Genetics: A Contemporary Perspective, WmC Brown Publishers.

Bölüm 14

Gen İzolasyonu ve Klonlanması

Ahmet Yıldırım¹, Nejdet Kandemir

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 60250 Tokat
e-posta: yasin@gop.edu.tr¹

14.1. Giriş

Bitki ıslahçıları asırlardır istedikleri karakterlerin seçimi yoluyla genlerle çalışmışlardır. Bu çalışma çoğu kez özel olarak belli bir gen ile değil, genin üzerinde bulunduğu büyük bir kromozom parçası ve bu parçanın taşıdığı çok sayıda diğer genlerle ilgili olmuştur. Ancak, genetik biliminin ortaya çıkışından sonra mutasyon çalışmalarının da yardımıyla, bireysel olarak genlerin etkileri çalışılabilmektedir. Ne var ki, bireysel genlerin etkilerini nasıl ortaya çıkardıkları konusunda bilinenler uzun süre oldukça sınırlı kalmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerden sonra, uzun DNA moleküllerinin laboratuvarında çalışılabilecek küçük parçalara ayrılabilmesi ve daha sonra fonksiyonel olarak organizmalara geri kazandırılması ile genleri meydana getiren nükleik asit dizilişlerinin ortaya çıkarılması, yani gen izolasyonu, mümkün olmuştur. Genlerin nükleik asit dizilişlerinin belirlenmesi biyoloji biliminde yeni ufuklar açmıştır. Bu şekilde, farklı karakterlerin genler tarafından nasıl ortaya çıkarıldıkları, aynı genin farklı allellerinin nasıl farklı fenotipler meydana getirdiği açıklanabilmektedir. Ayrıca, bireysel genlerin karakterlerin ortaya çıkması esnasında meydana gelen zincirleme biyokimyasal reaksiyonların hangi kısmında hangi rolü oynadığı saptanmış ve buradan söz konusu karmaşık sistemlerin diğer elemanlarına ulaşılmıştır. Bu çalışmalar esnasında bir bütün olarak zincirleme reaksiyonun hızını sınırlayan aşama tespit edilip, bunun hızlandırılması yoluna gidilebilmektedir. Örneğin, nişasta sentezinde hız sınırlayıcı faktör, ADP-glukoz pirofosforilaz

enziminin üretim miktarıdır. Normalde, enzim miktarı yüksek olduğunda ilgili genin ifadesi azalmakta, sonuçta da ortamdaki enzim miktarı düşmektedir. İlgili genin ortamdaki enzim miktarına bağlı olmadan ifade edilecek şekilde değişikliğe uğratılması ve patatese aktarılması ile patates yumrularındaki nişasta miktarında ticari anlamda önemli bir artış meydana gelmiştir (Stark ve ark., 1992).

Farklı genler veya allellerin karşılaştırılmasından elde edilen bilgiler ve biyokimyasal simülasyon çalışmaları ile genlerin fonksiyonlarının geliştirilebileceği, hatta sentetik genlerin tasarlanabileceği fikri ortaya atılmıştır. İzole edildikten sonra çeşitli vektörlere klonlanan genler, bu vektörler yardımıyla bitkilere transformasyon yoluyla kazandırılmaktadır. Böylece, eşeysel uyuma olup olmadığına bakılmaksızın bireysel genler oldukça kısa bir sürede yeni genomlara aktarılmaktadır. Genetik mühendisliği olarak tanımlanan bu bilim dalı klonlanmakta olan çok sayıdaki bitki genleri ile bir araya geldiğinde dünya gıda probleminin çözümü için büyük umutler sunmaktadır.

Bitkisel genlerin izolasyonunun kendine has avantaj ve dezavantajları vardır. Bakteri, mantar veya mayalarla karşılaştırıldığında bitki genomlarının oldukça büyük olması gen izolasyonu için bir dezavantajdır. İnsan genomu çalışmaları ile karşılaştırıldığında ayrılan kaynakların çok küçük olması diğer bir dezavantajdır. Ancak bitkilerin kolayca üretilmesi, çoğunda kendileme yapılarak homozigotluğun artırılması, melezlemelerin kolayca yapılabilmesi, bitkisel materyallerin tohum halinde kolayca saklanabilmesi, diğer genetik çalışmaları olduğu kadar genlerin izolasyonunu da kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, *Arabidopsis thaliana* gibi oldukça küçük genomlu, genetik transformasyonun çok kolay olduğu, DNA polimorfizmi yüksek olan, kolay yetişen ve çok sayıda döl veren model bir bitkinin gen izolasyonunda ve diğer genom çalışmalarında kullanılması söz konusudur. Böylece, *Arabidopsis* genlerinden hareketle aralarında kültür bitkilerinin de bulunduğu diğer bitkilerdeki genlere ulaşılabilir.

14.2. Gen Klonlama Stratejileri

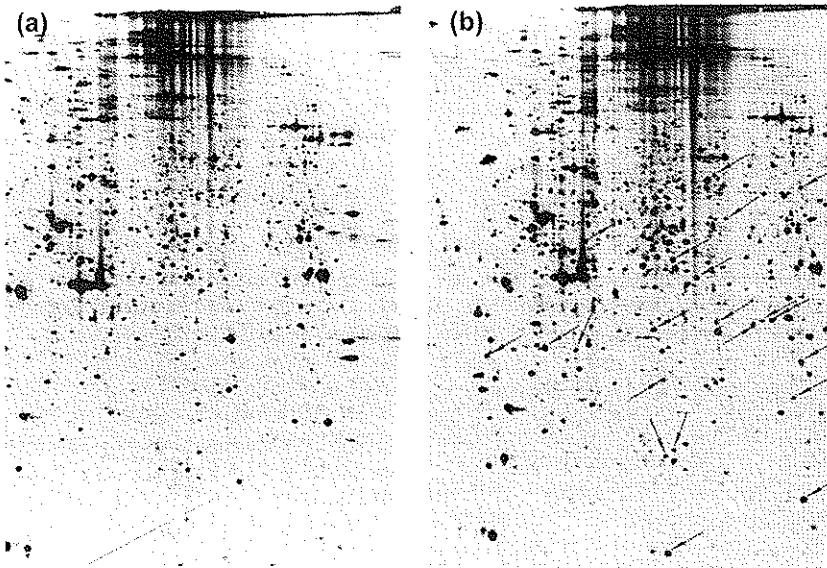
Gen izolasyonu ve klonlanmasında kullanılan bütün teknikler genin tanımında kullanılan dört özelliği göz önünde bulundurulur (Gibson ve Somerville, 1993). Bunlar; a) bütün genler spesifik bir diziyi sahiptirler, b) genler genom içinde belli bir bölgeyi işgal ederler, c) genler özel bir ifadeye sahip bir RNA'yı kodlarlar, ve d) genlerin çoğu bir fonksiyona sahiptirler. Bazı gen klonlama teknikleri bütün genlerin izolasyonuna izin verirken, diğerleri sadece belli özellikler taşıyan genlere uygulanabilirler. Bununla birlikte, bir bitkiden izole edilen genler heterolog melezleme yoluyla diğer bitkilerden benzer genlerin izolasyonunda kullanılabilir.

Bu bölümde bitki genlerinin izolasyonu ve klonlanması teknikleri dört ana başlık altında incelenecektir.

14.2.1. Gen fonksiyonu veya ifadesinden hareketle gen klonlama

14.2.1.1. Protein saflaştırma

Bir genin kodladığı protein üzerinden klonlanması durumunda öncelikle proteinin tanınması gerekmektedir. Eğer proteini tanıyan bir antikor varsa ilgili protein saflaştırılabilir ve proteinin amino asit dizisi bulunabilir. Bir başka yaklaşımda, söz konusu proteinin bulunduğu ve bulunmadığı iki durum hazırlanabilirse iki boyutlu protein elektroforez uygulaması ile elde edilen motifler analiz edilerek protein tanınabilir (Şekil 14.1). Saflaştırma sonrasında proteinler amino asit analizine tabi tutulmakta ve amino asit dizisi nükleik asit dizisine çevrilmektedir. Bu dizilerden geliştirilen sentetik oligonükleotid probler veya PCR primerleri ile genin tüm nükleik asit dizisi bir genomik DNA kütüphanesinden çıkarılabilir.



Şekil 14.1. İki boyutlu protein elektroforezı kullanılarak doku kültüründeki hücrelerin protein motiflerinin belirlenmesi. Elektroforez işleminde proteinler önce elektrik yüklerine göre soldan sağa ve sonra da kütlelerine göre yukarıdan aşağı doğru sıralanmışlardır. Durgun hücrelerin (a) ve tazelenen besin ortamı ilavesi ile çoğalmaya teşvik edilen hücrelerin (b) proteinleri. Çoğalmaya teşvik edilen hücreler mitoz bölünmeye hazırlanmak amacıyla bazı yeni proteinler sentezlerler. Oklarla gösterilen proteinler (b) ortam ilavesinden sonra ortaya çıktıkları için bunlar mitoz bölünmeyle ilgili genlerin meydana getirdiği proteinler olabilir. Bu jeldeki proteinlerden antikorlar geliştirilebilir ve bunlarla ilgili proteinler saflaştırılabilir. Saflaştırılan proteinin amino asit dizisinin belirlenmesi ve bunun nükleik asit dizisine çevrilmesiyle elde edilen bilgidan sentetik oligonükleotit probler veya PCR primerleri geliştirilir ve bunlarla mitoz bölünme ile ilgili genler bir genomik DNA kütüphanesinden izole edilebilir (Watson ve ark., 1992'den).

Protein saflaştırması üzerinden gen klonlanması yaklaşımının önemli dezavantajlarından birisi genin kodladığı proteinin tanınamaması ve amino asit analizi veya antikor hazırlamaya yetecek miktarda protein saflaştırılamamasıdır. Ayrıca ilgilenilen proteinin miktarı elektroforez işleminde sinyal verecek kadar güçlü olmayabilir veya elektroforezde jel motiflerinin karşılaştırılmasında güçlük yaşanabilir. Teknikle ilgili belki de en önemli güçlük ise, çeşitli sebeplerden dolayı iki jel motifi arasında çok sayıda proteinin farklılık gösterecek olmasıdır. Bütün bu durumlar, protein saflaştırma esasına göre gen klonlanması işlemini ancak çok özel şartlarda kullanılabilen bir işlem haline getirmektedir.

14.2.1.2. Mutant düzeltilmesi

Bakteri ve maya gibi küçük genomlu ve genetik transformasyonu kolay olan organizmalara ait mutasyonlar normal organizmalardan geliştirilen bir seri rasgele DNA'larla transforme edildiğinde bazı transformantlarda mutant özellik düzeltilebilmektedir. Mutant organizmadaki anormalliği düzelten DNA parçası mutant karakterle ilgili genin normal formunu taşımaktadır. Bu yolla küçük genomlu organizmalarda çok sayıda gen izole edilmiştir. Sistemin başarısı, genel olarak genomlarının nispeten büyük olduğu ve çok etkin transformasyon sistemlerinin bulunmadığı bitkilerde sınırlıdır. Ancak, bitkilerin bakteri veya mayalar ile ortak olan bazı genleri, bakteri veya mayalardaki mutasyonların bitki DNA'ları kullanılarak düzeltilmesi yoluyla izole edilebilmektedir. Nitekim, ispanak sakkaroz taşıyıcısını kodlayan gen bir maya sistemi kullanılarak klonlanmıştır (Riesmeier *ve ark.*, 1992).

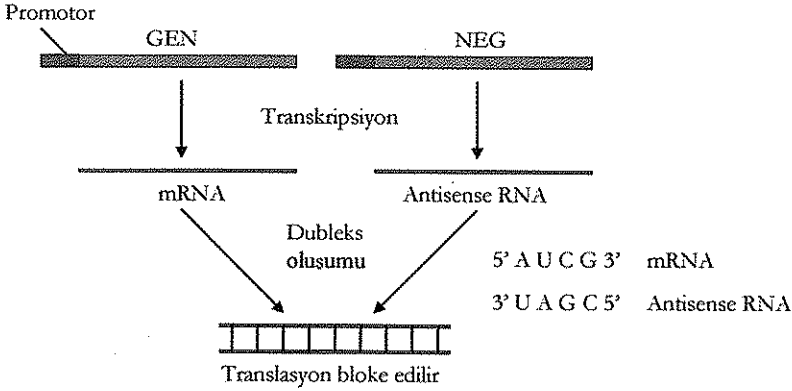
Bilinen güçlüklerle rağmen, mutant düzeltilmesi yoluyla bitki genlerinin klonlanması potansiyel olarak mümkündür. Bu potansiyel, bir bitkiye kazandırılmış olan bir antibiyotik dayanıklılık geninin klonlanması ile ispatlanmıştır (Gibson ve Sommerville, 1993). Ancak, bu sistemin kullanılabilirliği, etkileri sadece hücre kültürlerinde seçilebilen bir kaç gen ile sınırlı olmaktadır. Son zamanlarda sağlanan bazı gelişmeler sayesinde bu sistem ile bitkilerde gen klonlanmasını yaygınlaştırabilir. Her şeyden önce pek çok bitkide transformasyon sistemleri hızla geliştirilmektedir. Bu amaçla *Arabidopsis* ve çeltik gibi küçük genomlu bitkilerde sistemin başarı şansı daha yüksektir. Mutant tamamlaması tekniğinin bir versiyonu, daha sonra görüleceği üzere, büyük DNA'lar ile bitki transformasyonuna izin veren BIBAC vektörleri ve genetik haritaya dayalı gen klonlanması tekniklerinin kombinasyonu şeklinde kullanılmaktadır.

14.2.1.3. Antisens RNA kullanımı

Transkripsiyon işleminde DNA'nın yalnızca bir iplikçigi (sense, yani kalıp iplikçigi) mRNA halinde kopyalanmaktadır. Dolayısıyla, mRNA tek iplikçikli bir moleküldür. Normalde mRNA nükleotidleri, kitabın 13. bölümünde de anlatıldığı gibi, genetik

mesajın ribozom tarafından translasyona uğratılması esnasında tRNA antikodonları tarafından okunur. Ancak, RNA da aynen DNA gibi dubleks yapılar oluşturabilir. Bunun için gerekli olan tek şey, mRNA'yı tamamlayıcı olan ikinci bir RNA iplikçığıdır (antisens RNA). mRNA, kendisini tamamlayıcı diziye sahip olan antisens RNA ile dubleks oluşturduğunda translasyon bloke edilir. Promotorun genin 5' bölgesinde normal pozisyonunda bulunması doğru iplikçikten mRNA üretilmesini garantiler. Eğer gen promotora nazaran ters pozisyonda ise kalıp olmayan (antisens) iplikçik transkripsiyon işlemine tabi tutulur ve böylece antisens RNA üretilir (Şekil 14.2).

Fonksiyonu henüz bilinmeyen klonlanmış gen sayısının artmasından dolayı, antisens RNA'ya sahip transgenik bitkiler üretilerek hedef genin fonksiyonunun belirlenmesi mümkündür. Bu yaklaşım biçiminde esas, hedef genin kendisi olmayıp mRNA'sıdır. Tekniğin ana fikri, hedef genin mRNA'sının ters yazılımlı bir nükleik asit molekülü ile bloke edilmesidir. Bu ters yazılımlı molekül mRNA'nın bazılarıyla eşleşerek çift iplikli RNA melezi oluşturur ve mRNA'dan translasyon işlemiyle protein sentezlenmesini engeller. Bu açıdan bakıldığında, ters yazılım tekniğinin kullanımı spesifik bir mutasyon meydana getirmeye eşdeğerdir. Antisens nükleik asitlerin hücrelere aktarılmasında farklı teknikler kullanılmaktadır (bkz. Bölüm 23).



Şekil 14.2. Antisens RNA üretimi ve translasyonun bloke edilmesi.

Antisens RNA ilk olarak domateste yumuşama ve aşırı olgunlaşmaya neden olan poligalakturonaz enziminin miktarının azaltılmasında kullanılmıştır (Sheehy *ve ark.*, 1988). Böylece transgenik bitkilerde daha uzun bir raf ömrü ve ezilmelere daha fazla dayanıklılık sağlanmıştır (bkz Bölüm 25). Daha sonra domateste etilen biyosentezini düzenleyen iki temel enzimin üretimi yine antisens RNA tekniği ile azaltılarak meyvelerin raf ve pazar ömrü uzatılmıştır (Oeller *ve ark.* 1991).

14.2.1.4. Subtraktif melezleme

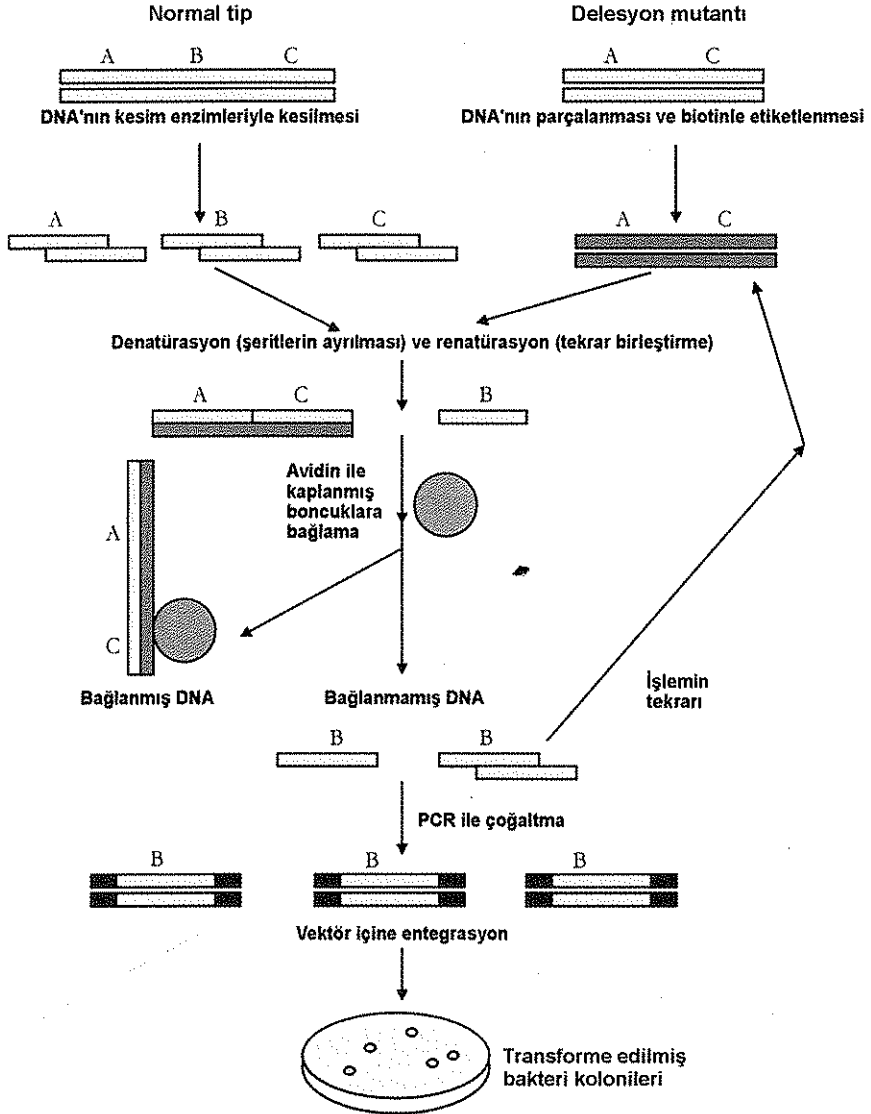
Bu teknikte bir delesyon mutasyonu içeren bir hattın genomik DNA'sı normal tip bitkilerden elde edilen yüksek oranda parçalanmış DNA ile melezlenmektedir (Şekil 14.3). Mutantın DNA'sına yapışmayan parçalar delesyona uğramış bölgeye karşılık gelmektedir. Bu metodun kullanılabilirliği *Arabidopsis*'te gibberellin biyosentezinde kullanılan *gal* geninin izolasyonu ile gösterilmiştir (Sun ve ark., 1992). Bu teknik aynı zamanda cDNA düzeyinde belirli tip mutasyonları içeren ve bu nedenle ifade edilmeyen genlerin izolasyonunda kullanılabilir. *Brassica napus*'ta salisilik asitin teşvik ettiği genlerin izolasyonu bu yaklaşıma örnek verilebilir (Chu ve Cho, 1996).

Diğer metodların çoğunda olduğu gibi, subtraktif melezleme yoluyla yapılan klonlamada daha çok küçük genomlu bitkiler için pratik bir teknik özelliğindedir. Bu teknikle ilgili ana sorun, küçük delesyon bölgelerine sahip mutant bitki popülasyonlarını güvenli bir şekilde üretebilecek metodların henüz geliştirilememiş olmasıdır. Ayrıca, bir mutasyon izole edildikten sonra, bu mutasyonun bir delesyondan mı yoksa diğer bazı anormalliklerden dolayı mı kaynaklandığını belirlemek için yoğun bir genetik analiz gerekmektedir.

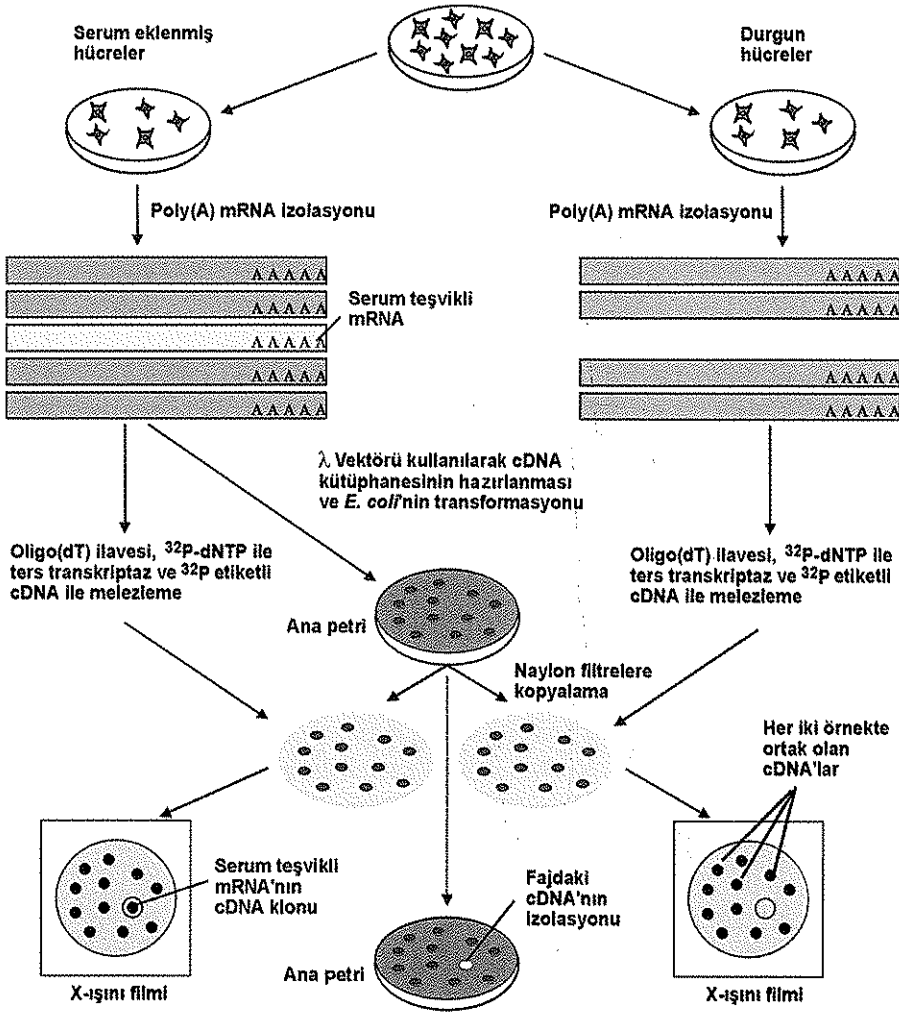
14.2.1.5. Diferansiyel tarama ve diferansiyel gösterim

Bu teknikler belli dokularda, belli gelişme dönemlerinde veya özel çevre şartlarında fonksiyonel olan genlerin klonlanmasında kullanılır. Genler çoğunlukla özel dokularda ifade edilirler. Bu şekildeki genlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan metodlardan ilki diferansiyel taramadır (differential screening). Bu teknikte, mRNA özel bir çevre faktörüne (örneğin kuraklık) maruz kalan ve kalmayan gibi değişik şartlar altındaki bitkilerden veya farklı bir doku ve gelişme döneminden alınan örneklerden hazırlanır. Birisi ilgilenilen genin çalıştığı, diğeri ise çalışmadığı olmak üzere iki farklı sistem oluşturulur. Klonlanması istenen genin çalıştığı sistemden hazırlanan bir DNA kütüphanesi etiketlenmiş cDNA'lar ile melezlenir. Genin çalıştığı cDNA preparasyonunun gösterdiği fakat diğerinin göstermediği klon ilgili gene ait olabilir (Şekil 14.4). Bu tekniğin ana kısıtlayıcı etmeni sadece çok yüksek derecede ifade edilen genlerin klonlanmasında kullanılabilmesidir.

Daha yeni olan diğer teknik ise diferansiyel gösterim (differential display) olarak adlandırılmaktadır. Bunu ilk metottan farklı kılan özellik, seyrek cDNA'ların çoğaltılmasında PCR tekniğinin kullanılması ve sonuçta farklı bir şekilde etkisini gösteren, fakat daha az sıklıkta bulunan genlerin tanımlanmasını mümkün kılmasıdır (Liang ve Pardee, 1992). Teknikte, cDNA parçalarının bir örneği, tek cDNA ipliğinden 5'-(dT)₁₁dN₂-3' (5'-TTTTTTTTTTTNN-3') formülüne sahip 12 muhtemel oligonükleotidlerin bir seti ve rasgele bir 10-bazlı primer PCR primerleri kullanılarak çoğaltılır (Şekil 14.5). Farklı kaynaklardan elde edilen

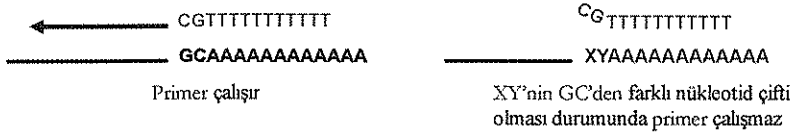


Şekil 14.3. Subtraktif melezleme yoluyla klonlama. Normal bitkinin genomik DNA'sı bir kesici enzimle küçük parçalara bölünür. Delesyon mutanlığının DNA'sı da rasgele parçalanır ve sonra biotin ile etiketlenir. Bu iki DNA örneği denatüre edilerek tek iplikçikli hale getirilir ve daha sonra etiketlenmiş DNA ile etiketlenmemiş DNA birbirine melezlenir. Hazırlanan bu DNA çözeltisi avidin kaplanmış boncuklar içeren silindirden geçirilerek biotinle etiketlenmiş DNA'nın boncuklara bağlanması sağlanır. Böylece, mutant bitkideki delesyona uğramış bölge (B) dışındaki normal tip DNA silindirde yakalanmış olur. Bu işlem birçok kez tekrarlanır ve elde edilen DNA bölgesi (B) PCR ile çoğaltılarak klonlanır. Klonlar Southern analizine tabi tutularak test edilir (Gibson ve Somerville, 1993'ten).

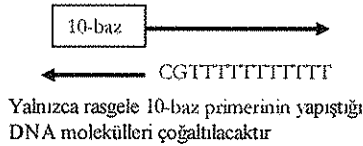


Şekil 14.4. Diferansiyel tarama yoluyla bir genin klonlanması. Durgun hücrelere büyüme faktörü içeren serum eklenip, örneklerin poly(A) mRNA'ları izole edilmiştir. Serum teşvikli hücrelerin mRNA'sı bir lambda faj (λ phage) vektöründe cDNA kütüphanesi oluşturulmasında kullanılmıştır. Sonra bu cDNA'lar *E. Coli* bakterisine aktararak bir petride kolonilerin büyümesi sağlanmıştır ve petrideki yerleşim düzeni iki naylon filtreye kopyalanmıştır. Daha sonra her iki örnekte ^{32}P etiketli dNTP'ler ile cDNA problemleri üretilmiştir. Herbir naylon filtre kendi etiketli cDNA probu ile hibridize edilmiştir. Elde edilen X-ışını filmleri dikkatlice karşılaştırıldığında, serum teşvikli hücrelerden elde edilen filmde ekstra bir etiketli bölge saptanmıştır. Dolayısıyla ana petride bu bölgeye karşılık gelen faj kolonisinin hedef geni taşıdığı bilindiğinden, bu fajdan cDNA izole edilmiştir (Watson ve ark., 1992'den).

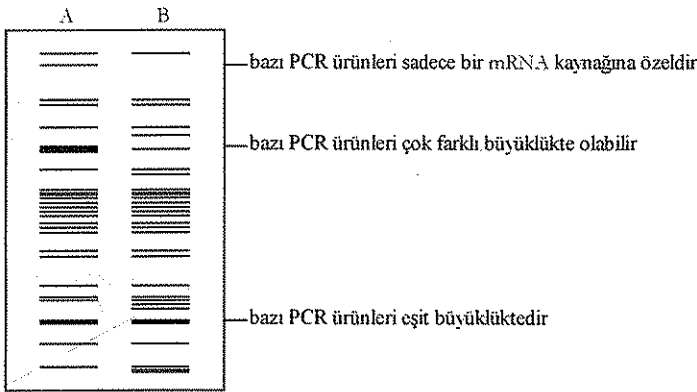
- a) A ve B kaynaklarından poly(A) mRNA'lar izole edilir ve takip eden işlemler her iki RNA örneği için paralel olarak yürütülür
- b) T(11)XY sekansına sahip 12 muhtemel oligonükleotitlerden birisi [bu örnekte T(11)GC] ile ters transkripsiyon



- c) Ters yazılmış DNA'yı çoğaltmak için rasgele bir 10-baz primeri ile T(11)GC oligonükleotidinin kullanımı



- d) Yüksek çözünürlüğe sahip poliakrilamid jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin ayrılması



- e) Farklı şekilde ekspres olan genleri klonlamak için bantlar kesilir ve (c) maddesinde belirtildiği gibi tekrar çoğaltılır. Daha sonra bir vektöre yerleştirilir ve bakteri transforme edilir.

Şekil 14.5. Diferansiyel gösterim tekniği ile gen klonlanması.

mRNA'ların bir DNA dizileme jeli üzerindeki reaksiyon ürünleri karşılaştırıldığında, doku tipleri arasındaki gen ifade farklılıkları ortaya çıkmaktadır. Aynı primerler daha sonra jelden kesilen bantların klonlanmasında veya cDNA kütüphanelerinin (veya genomik DNA) gözlemlenmesinde prob olarak kullanılabilirler.

Bu metotlarla belirli bir genin tanımlanmasındaki en önemli sorun, birçok genin benzer ifade şekillerine sahip olmalarıdır. Dolayısıyla araştırmayı tek bir gene daraltmak için antisens yapısına sahip bir transgenik bitki üretimi gibi ek bir kriter ihtiyacı duyulmaktadır.

14.2.2. Dizi bilgisi, mRNA veya önceden klonlanmış genlerden hareketle gen klonlama

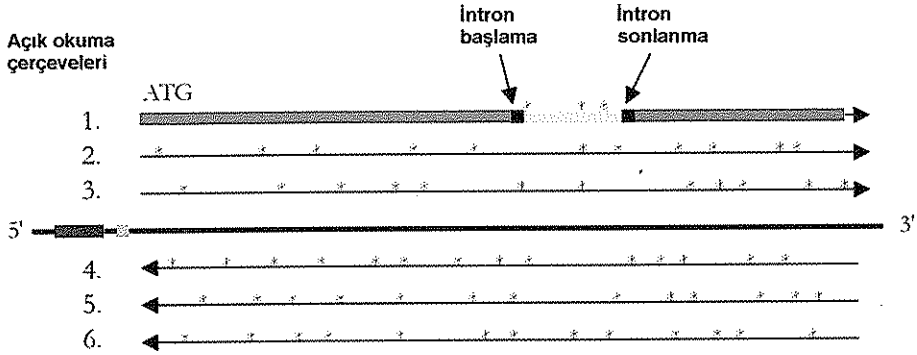
Bu klonlama yaklaşımında çeşitli şekillerde elde bulunan nükleik asit dizilerinden hareketle genlere ulaşılır. Bu amaçla; 1) genomların komple dizi analizi, 2) genlerin bir ürünü olan mRNA'lardan elde edilen cDNA'ların rasgele dizi analizleri ve 3) daha önceden klonlanmış genler kullanılır.

14.2.2.1. Genomların komple dizi analizi

Nükleik asit dizilişi, analiz tekniklerindeki gelişmeler sayesinde bakteri ve maya gibi küçük genomlardan sonra, insan (Bentley, 2000), genetik model bitki olan *Arabidopsis* (The *Arabidopsis* Initiative, 2000) ve çeltik (Dickson ve Cyranoski, 2001) genomlarının sekans analizleri de tamamlanmıştır. Bu analizler, genomların yapısal özellikleri ve birbirlerine benzerlikleri açısından çok faydalı bilgiler üretmesi yanında, organizmalardaki bütün genlerin nihai bir şekilde klonlanmalarını da sağlamaktadır. Ancak, genom dizi analizi ile elde edilen çok uzun ve anlamsız harfler dizisinin fonksiyon meydana getiren genler halinde açıklanması gerekmektedir. Bu amaçla, bir gende bulunması gereken unsurlar yönünden DNA dizilimleri incelenir ve potansiyel genler belirlenir.

Dizi analizinden gen araştırılması bilgisayar programlarıyla yapılmaktadır. Bu amaçla, bir dizide ilk aranacak unsur translasyonu durduran kodon (TAA TAG veya TGA) taşımayan açık okuma çerçeveleridir (Şekil 14.6). Bir DNA dizisinde genin her iki yönde de kodlanmış olabileceği ve üç nükleik asitin bir amino asit kodlaması nedeniyle her yönde üç okuma çerçevesi bulunduğu için toplam altı çerçeve durdurma kodonlarının varlığı bakımından incelenir. Açık okuma çerçevesinden önce, belli pozisyonlarda genin promotor bölgesi (bkz. Bölüm 13, Şekil 13.7), transkripsiyon başlama bölgesi ve translasyonun başladığı ATG dizisi bulunmalıdır. Genin içindeki kodlama yapmayan intron kısımlarında bazı durma kodonlarının bulunabileceği bilinmelidir. Intronların başlangıç ve bitiş kısımlarında bulunan özel dizilişlere de dikkat edilmelidir (Bölüm 13, Şekil 13.19). Bütün bu özellikleri taşıyan DNA dizilerinin gen olma olasılığı bulunmaktadır. Böyle bir dizinin gen olup olmadığının belirlenmesi için ürettiği bir mRNA aranmalıdır. Bu işlem ya RT-PCR (reverse - ters - transkriptaz PCR; Old ve Primrose, 1994) ile bir RNA preparatında veya bir cDNA kütüphanesinde yapılabilir. RT-PCR işleminde, genin çalıştığı düşünülen bir gelişme dönemi ve bitki organından elde edilen bir RNA preparatında önce ters transkriptaz enzimi ile ilk DNA zinciri oluşturulur.

Daha sonra genomik DNA dizisinden geliştirilen iki primer ile çoğaltım yapılır ve RNA preparatında gene ait mRNA olup olmadığı belirlenir. Kantitatif RT-PCR adı verilen bir RT-PCR formunda mRNA'nın miktarı da belli bir hassasiyetle belirlenebilmektedir.



Şekil 14.6. Genomik bir klonda yapılan sekans analizi sonrasında genlerin bulunması. Öncelikle altı kodlama çerçevesi üzerinde, durma kodonu taşımayan açık okuma çerçevesi araştırılır. 1 numaralı okuma çerçevesi böyle bir dizi taşımaktadır. Bundan sonra, açık okuma çerçevesinin 5' yönünde promotor dizileri (mavi bar), transkripsiyon başlama bölgesi (yeşil bar), translyasyon başlama dizisi (ATG) ve varsa intron başlama ve bitme dizileri (siyah bar) aranır. İtron içinde (eflatun bar) durma kodonları bulunabilir.

Gene ait bir mRNA (veya cDNA) bulunduğunda translyasyona tabi tutulan gen dizisi nükleik asit veya amino asit dizileri halinde veri tabanı araştırmalarına tabi tutularak daha önce klonlanmış genlere veya rasgele analiz edilmiş cDNA dizilişlerine benzerlikleri araştırılmaktadır. Gen kimliğinin kesin olarak kanıtlanması için gene karşılık gelen genomik DNA dizisinin ilgililenilen genin meydana getirdiği karakteri taşımayan bir bitkiye (örneğin bir mutanta) genetik transformasyon yoluyla kazandırılması gerekmektedir. Bir başka yaklaşımda ise gen, ilgili karakteri taşıyan bir bitkiye antisens RNA yoluyla (bkz. Bölüm 23) kazandırılmakta ve fonksiyonda meydana gelecek bozulma ile gen etkisi gözlenerek genin kimliği ispatlanmaktadır.

14.2.2.2. Rasgele cDNA analizi

Genler etkilerini mRNA üretimi ile ortaya çıkarırlar. RNAz enzimlerinin aktivitesi ile normal koşullarda çok çabuk parçalandıklarından, mRNA'lar ile laboratuvar şartlarında çalışılması oldukça güçtür. Bu nedenle, mRNA preparatları mRNA'nın DNA karşılığı olan cDNA'ya çevrilirler ve bu halde kullanılır.

Gen klonlanması araştırmalarında çoğu kez özel bir genin klonlanması hedeflenir. Ancak bazen özel bir gen yerine bir bitkide belli bir anda aktif olan bütün genlerin araştırılması istenebilir. Bu amaçla oluşturulmuş bir cDNA kütüphanesinden

rasgele cDNA klonları dizi analizine tabi tutulurlar. Ancak böyle bir analizde bilinmesi gereken bazı önemli konular bulunmaktadır. Her şeyden önce genlerin çalışması bitkinin hayat devresine, çevre şartlarına ve bitki organına bağlıdır. Yani, her gen her an ve her yerde aktif değildir. Bir diğer konu da genlerin transkripsiyon seviyeleri, yani bir cDNA kütüphanesinde bulunan klonların oransal dağılımları, aynı değildir. Çünkü belli bir anda bir hücrede bir mRNA on binlerce kopya halinde bulunabilirken, bir başkası sadece bir kaç kopya halinde olabilir veya hiç olmayabilir. Bu durum doğal olarak mRNA populasyonundan elde edilen cDNA kütüphanesinde de görülür. Bu nedenle, mümkün olduğunca farklı klonların analiz edilebilmesi amacıyla ya klonlar için bir ön seçim işlemi ya da nadir klonların oranca zenginleştirilme işlemi yapılması gerekmektedir. Bir cDNA kütüphanesinde bazı tip klonların oranını yükseltmenin en genel yolu ilgili genin çalıştığının düşünüldüğü gelişme döneminde ve bitki organından mRNA elde etmektir. Örneğin, kısa gün şartlarında çiçeklenmeyi sağlayan genlere ait cDNA araştırması kısa gün şartlarında ışığa maruz bırakılmış, 2-3 haftalık fide devresindeki bir bitkinin yaprak dokusundan elde edilen cDNA kütüphanesinde yapılmalıdır.

Rasgele cDNA klonlanmasında bilinmesi gereken üçüncü faktör cDNA klonlarının çoğu kez genin transkripsiyon ile üretilen tüm kısmını taşımadığı gerçeğidir. Bunun için cDNA sentezi esnasında cDNA'yı tüm uzunlukta elde etme önlemleri alınmalıdır. cDNA analizinde bilinmesi gereken son ama belki de en önemli konu cDNA'ların genlerin tüm dizisini vermediğidir. cDNA'lar ancak kodlayan bölgeleri taşır fakat promotor, intron, 3' uçtaki kodlanmayan bölge gibi gen kısımlarını taşımazlar. Bu nedenle cDNA'dan hareketle gen klonlanmasında istenen cDNA'nın bulunmasından sonra gen, bir genomik DNA klonu halinde elde edilmelidir.

Bir cDNA kütüphanesinde bulunan rasgele cDNA klonlarının dizi analizi EST (tezahür eden dizi etiketi) analizi olarak bilinir. EST analizi için cDNA'larda genellikle bir yönden 450-500 bazın okunduğu bir dizi analizi yapılır. Bu okuma, vektör içine rasgele değil yönlü olarak klonlanmış olan cDNA'larda genellikle 5' uçta yapılır. Çünkü 3' uçta translasyon yapılmayan bazı diziler bulunmaktadır ve bunlar yapılacak tek okumada elde edilecek amino asit kodlayan dizi bilgisini sınırlayacaktır (Nunberg *ve ark.*, 1996).

Dizi bilgisinin elde edilmesinden sonra bu diziden vektör dizileri çıkarılır ve okuma hataları düzeltilir. Düzeltilen dizi verisi bilinen genlere benzerliklerinin saptanması için çeşitli veri tabanları ile karşılaştırılır. Karşılaştırmalar nükleik asit dizisi veya amino asit dizisi olarak yapılabilir. Bunlardan Entrez web sayfasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) GenBank veri tabanında bilinen diziler ile veya dbEST veritabanında diğer EST'ler ile karşılaştırılır. İlginç bulunan dizilerde orijinal cDNA klonuna gidilerek klonun tüm dizisi çıkarılır. Gerekirse bu cDNA'nın kaynaklandığı gen, genomik klon halinde bir genomik DNA kütüphanesinden elde edilir. Genin kimliğinin ispatlanması için yaygın olarak antisens RNA tekniği kullanılır.

Rasgele cDNA analizi ile *Arabidopsis* bitkisinde kısa gün şartlarında çiçeklenmeyi etkileyen LD geninin mısır bitkisindeki karşılığı bulunmuş ve buradan mısır LD geni bir genomik klon halinde elde edilmiştir (Van Nocke *ve ark.*, 2000). Yapılan bir başka çalışmada, EST dizi analizi sonrasında arpa bitkisinde rasgele incelenen 43 cDNA klonundan 23 tanesi (%53) bilinen genlere yüksek oranda benzerlik göstermiştir (Michalek *ve ark.*, 1999). 2001 yılı başı itibarı ile dbEST veri tabanında çeşitli organizmalara ait toplam olarak yaklaşık yedi milyon dizi verisi bulunmaktadır. Pek çok kültür bitkisinin her birine ait ise 50.000'in üzerinde dizi bulunmaktadır. Bu aşamadan sonra yapılacak işlem, fonksiyonu bilinen proteinlere benzerlik araştırmaları, genetik transformasyon veya antisens RNA çalışmaları ile gen ürünleri olan cDNA'lara ve dolayısı ile onları meydana getiren genlere fonksiyon atfetmek olacaktır.

14.2.2.3. Önceden klonlanmış genlerin kullanımı

Bilinen genler çoğu kez başka genlerle ortak özellikler taşımaktadır. Dahası birbirinden çok uzak türlerde aynı fonksiyonu meydana getiren genler arasında amino asit seviyesinde yüksek oranda bir benzerlik bulunmaktadır. Bu nedenle bir gen klonlandığında o genin farklı türlerdeki eşdeğeri veya aynı bitkide o gene benzer başka genler de klonlanabilmektedir. Bu uygulama diziliş bilgisinden hareketle heterolog RFLP problemleri veya PCR tekniği yoluyla olabilmektedir.

14.2.2.3.1. Heterolog RFLP problemleri

Genler arasında amino asit düzeyindeki benzerlikler kısmen de olsa DNA düzeyinde de bulunmaktadır. Önceden klonlanan bir genin RFLP probu olarak kullanılıp genomik DNA veya cDNA kütüphanelerinin araştırılmasıyla yeni genler bulunabilir. Bu yolla aynı organizmada bir protein ailesinde yer alan benzer proteinleri kodlayan genler veya özel bir proteinin farklı bir organizmadaki karşılığını kodlayan gen klonlanabilir.

Aynı protein ailesindeki farklı proteinleri kodlayan genlerin klonlanması için bu aile içinde bir kaç üyenin klonlanmış olması gerekir. Bu genlerin kodladığı proteinlerde belli motifler aranır ve bu motiflerin farklı proteinlerde değişiklik göstermeyen kısımlarından sentetik oligonükleotitler geliştirilir. Bu amaçla protein ailesinin üyelerinde korunan (yani değişiklik göstermeyen) 6-7 ardışık amino asit bulunması yeterlidir. Bu yolla, protein serine kinaz ailesinin yeni üyeleri klonlanmıştır (Hanks, 1987). Bilinen protein serine kinaz üyelerinde değişiklik göstermeyen bir motifteki Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn amino asit dizisi kullanılarak 17 baz taşıyan ve kimi bazlarda çok seçeneklilik gösteren sentetik bir oligonükleotit prob kullanılmasıyla bir cDNA kütüphanesi taranmış ve 89 klon belirlenmiştir. Bu 89 klon üzerinde aynı işlemin ikinci bir motif kullanımıyla yapılması bir sağlama işlemi gerçekleştirmiştir. Sonuçta 19 klonun ikinci bölgeyi de taşıdığı belirlenmiştir. Bu klonların bazılarının

diziliş analizleri onların protein serine kinaz ailesinin yeni üyesi olduklarını ortaya çıkarmıştır.

Heterolog RFLP problemleri özel bir proteinin başka bir organizmadaki karşılığının klonlanması için de kullanılır. Ancak, bu amaçla kullanılan prob istenen özel proteini diğer benzer proteinler arasından ayırt edecek kadar seçici olmalıdır. Prob DNA ile kütüphane klon DNA'ları arasında belli oranda benzerliğin olması da gerekir. Amino asit dizilişi aynı olsa da türler arasındaki akrabalık derecesi azaldıkça türlerin aynı amino asit için kullandıkları kodon (bir amino asiti kodlayan üç nükleik asit) farklı olabilmektedir. Böylece, nükleik asit dizilişleri oldukça farklı olabilmekte ve sonuçta bir türdeki gene ait DNA'nın diğer türdeki geni klonlamak için RFLP probu olarak kullanılma şansı azalmaktadır. Böyle durumlarda melezlenme şartlarını değiştirerek (örneğin melezleme ortamının tuz içeriğini yükseltmek ve sıcaklığı düşürmek) melezlenme başarısı artırılabilir. Nişasta sentezinde iş gören nişasta sentez I geninin arpadaki formu bir buğday prob DNA'sı kullanılarak klonlanmıştır (Gubler ve ark., 2000). Nişasta sentez I geninin buğday prob DNA'sı ile bir arpa genomik DNA kütüphanesi taranmış, bulunan nükleotit dizisinin bir mRNA kodladığı daha sonra yapılan deneylerle ispatlanmış ve böylece genin kimliği kanıtlanmıştır.

14.2.2.3.2. PCR metodu

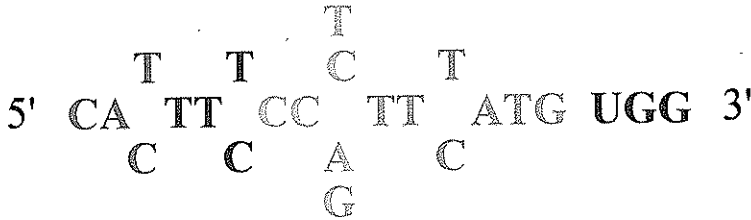
Önceden klonlanmış genlerin korunan (yani benzer genlerde değişiklik göstermeyen) bölgelerinden geliştirilen PCR primerleri kullanımıyla aynı organizmadaki benzer genler veya aynı genin farklı organizmalardaki homologları klonlanabilir. Bu amaçla yine genin kodlayan dizisinin değişiklik göstermeyen bölgelerinden primerler geliştirilir. Kodon farklılıklarını engellemek için de mümkün olduğunca az sayıda kodon ile kodlanan amino asitlerin karşılık geldiği nükleik asit bölgesinden primer geliştirilmelidir. Primerler birkaç baz bakımından çok ihtimalli olabilirler ancak bu sayının mümkün olduğunca az olması gerekmektedir (Şekil 14.7). PCR işlemi genomik DNA veya bir RNA preparatı üzerinde yapılabilir.

PCR tekniği ile çeltik bitkisinde kırmızı/kırmızı ötesi ışık reseptörü fitokrom sistemindeki yeni bir gen bilinen diğer genlerden hareketle izole edilmiştir (Tahir ve ark., 1998). İki fitokrom geni *PhyA* ve *PhyB*'nin değişiklik göstermeyen Asp-Ile-Pro-Gln-Ala ve Ala-Cys-Glu-Phe-Leu amino asit dizilerine karşılık gelen nükleik asit dizisinden geliştirilen ve bazı bölgelerinde çoklu bazlara sahip olan primerler ile genomik DNA üzerinde PCR yapılmıştır. Üretilen DNA'nın prob olarak kullanılmasıyla bir cDNA kütüphanesi araştırılarak *PhyC* geni klonlanmıştır.

PCR tekniği ile aynı genin farklı bitkilerdeki homologlarının klonlanmasına örnek olarak patatesten bir etilen reseptör geninin (*Etr1*) klonlanması verilebilir. İlk olarak *Arabidopsis*'te klonlanan *Etr1* geninin homologları daha sonra diğer bitkilerde de elde edilmiştir. *Etr1* homologları arasında korunmuş olan bölgelerden geliştirilen

primerler ile patates bitkisinden elde edilen RNA preparatı üzerinde RT-PCR yoluyla *Etr1*'in patatesteki homoloğu klonlanmıştır (Yau, 1999).

His - Phe - Pro - Phe - Met-Trp



Şekil 14.7. Benzer genlerde amino asit dizilişi bakımından değişiklik göstermeyen bir bölgeden PCR primeri geliştirilmesi. Çoklu baz bulunan pozisyonlarda primer sentezi esnasında birden fazla nükleotit kullanılır. Bu tip pozisyonların olabildiğince az olması için Met ve Trp gibi az sayıda genetik koda sahip amino asitlerce zengin korunan bölgelerden primer geliştirilmelidir.

14.2.3. Entegre olabilen DNA etiketlemesiyle gen klonlanması

Genomlara entegre olabilen DNA parçalarının genlerde mutasyonlar meydana getirdiği gerçeği, entegre olan DNA'lardan hareketle mutasyona uğratılan genlerin klonlanabileceği fikrinin doğmasına yol açmıştır. Bitki genomu içerisine dışarıdan DNA verildiğinde, bu DNA parçası genoma entegre olarak kromozomun bir parçası haline gelebilir. Bu entegrasyon işlemi genom içerisinde rasgele gerçekleşir ve doğal olarak hiç bir kromozom parçası entegrasyondan muaf değildir. İlgilenilen genin içerisine entegrasyon gerçekleştiğinde, bu entegre olan DNA parçası mutagen gibi davranarak genin fonksiyonunu bozar. Daha sonra genin içerisine saplanan etiket DNA'nın etrafındaki ilgilenilen gene ait DNA kullanılarak gen bir genomik DNA klonu halinde klonlanır.

Transpozonlar ve *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmidine ait T-DNA, genomlara entegre olabilen DNA'lardır ve bitki genlerinin klonlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu yaklaşımla gen klonlamasının temel dezavantajı transpozon veya *Agrobacterium* sistemlerinin bütün bitki türlerinde doğal olarak bulunmayışdır. Ancak günümüzde gerek transpozonlar ve gerekse *Agrobacterium* sistemlerinin doğal olarak bulunmayan sistemlere aktarılması mümkün hale gelmiştir (Gibson ve Somerville, 1993).

14.2.3.1. Transpozon etiketlemesi

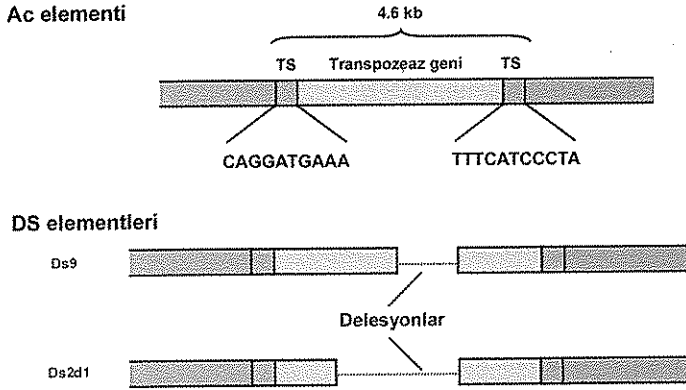
1950'lerde Barbara McClintock mısır bitkisinde genlerle yakın temasa geldiğinde onların çalışmasını engelleyen, sabit bir kromozomal bölgede bulunmayıp genomda

yer değiştiren transpozonların varlığını keşfetmişti. Bunların en iyi bilineni “aktivatör (Ac)” olarak adlandırılan genetik elementlerdi. Bu elementler genlerin çevresinden uzaklaştıklarında genler tekrar fonksiyonel hale gelebilmekteydi. Daha sonra benzer unsurlar meyve sineğinde ve *E. coli* bakterisinde de keşfedilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle bu elementlerin yapısı ve genomda bir bölgeden diğerine nasıl atıldıkları anlaşılmıştır. Ökaryot genomlarda sekans analizleri tamamlandıkça neredeyse tüm organizmalarda genomların transpozon benzeri kalıntılar ile dolu oldukları belirlenmiştir.

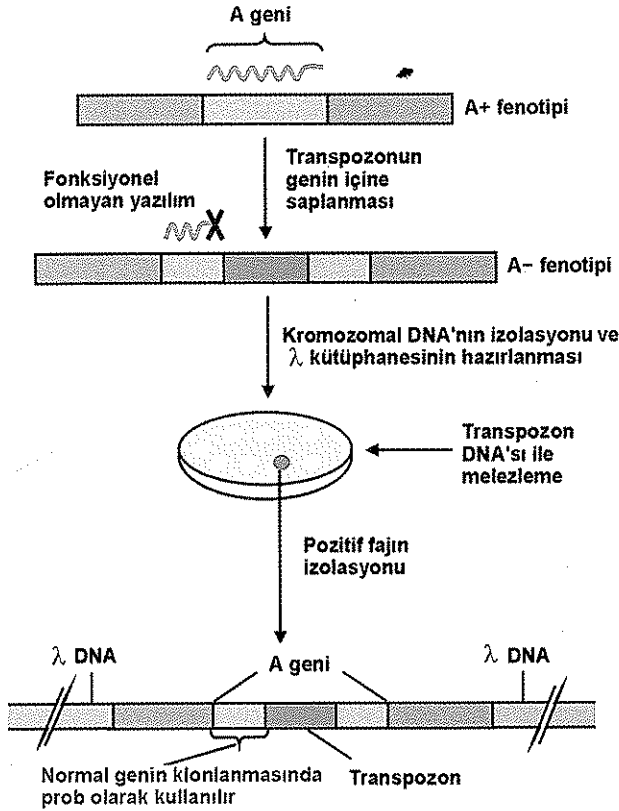
Transpozon etiketlenmesinin mısır gibi diploid, kendine dölünebilen ve iyi karakterize edilmiş, doğal olarak transpozon içeren türlerde gen izolasyonunda oldukça yararlı olduğu ispatlanmıştır (Balcells ve ark., 1991; Walbot, 1992). Bu yaklaşım kullanılarak izole edilen genler, mısırdaki *opaque-1* (toluam gelişimi ile ilgili bir gen) (McCarty ve ark., 1993) ve *opaque-2* (bir transkripsiyonal düzenleyici gen) (Schmidt ve ark., 1987) ile birlikte aslan ağzı (*Anthurium sp*) bitkisinde çiçek gelişimine etki eden bir çok geni içerir (Bradley ve ark., 1993). Diğer bitkilerde de transpozon etiketlenmesini kullanılabilir yapmak için, mısırın Ac elementinin çeşitli versiyonları değişik bitki türlerine aktarılmıştır (Dean ve ark., 1992; Grevelding ve ark., 1992).

Mısır bitkisinde bulunan Ac elementinin nükleik asit dizisi incelendiğinde Ac’nin diğer transpozonlarda da bulunan iki temel unsuru taşıdığı anlaşılmıştır. Bunlardan ilki bir transpozeaz enzimini (DNA’nın kesilip genomun diğer kısımlarına entegrasyonu sağlayan enzim) kodlayan gen ile bu genin iki tarafında iki adet ters çevrilmiş tekrarlanan nükleik asit dizisidir. Ac elementinin transpozeaz geninde delesyon meydana geldiği için tek başına atlama yapamayan ancak Ac’nin varlığında atlayabilen ve Ds unsurları olarak adlandırılan formları da bulunmaktadır (Şekil 14.8).

Klonlandıktan sonra sekansları saptanan doğal transpozonlar normal konukçularının genomlarında hareketli bir etiket olarak hizmet ederler. Klonlanması arzulanan bir genin içerisine transpozon saplanması gerçekleştiğinde, transpozon melezleme probu genomik kütüphaneden hedef geni izole etmede kullanılır (Şekil 14.9). Genom içerisinde yüzlerce transpozon bulunması durumunda bu yaklaşımla genin klonlanması zor olabilir, ancak birçok organizmada bu sorun mutantın transpozon taşımayan bir akrabasıyla defalarca melezlenmesi yoluyla aşılabilir. Birçok melezleme sonrasında genom içerisinde birisi de hedef gene bağlantılı olan yalnızca birkaç transpozon kalır. Dolayısıyla bunlar arasından sekansı bilinen transpozon DNA’sı prob olarak kullanılarak genomik kütüphaneden pozitif klonlar seçilir.

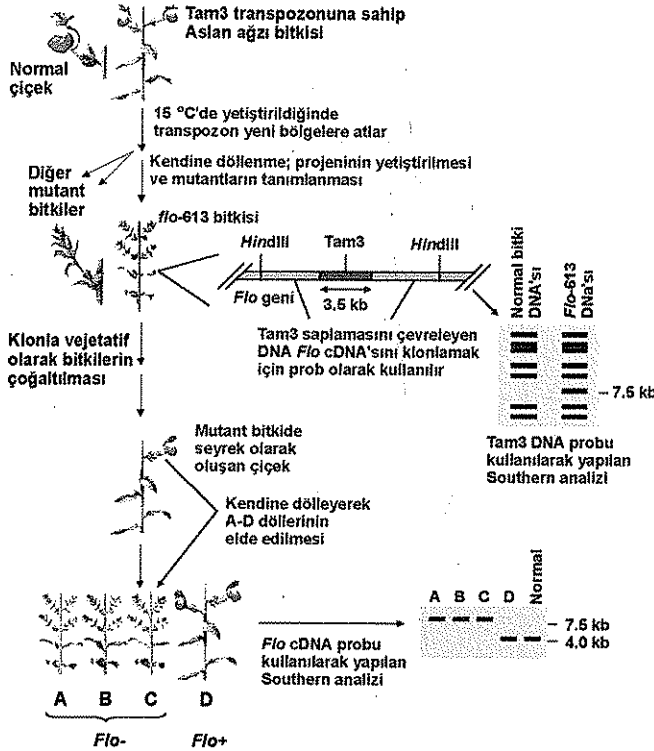


Şekil 14.8. Mısır bitkisinin Ac/Ds transpozon elementleri. Ac elementi tam bir transpozon olup, transpozeaz enzimini kodlayan bölgeyi çevreleyen iki adet ters çevrilmiş diziye (TS) sahiptir. Ds elementleri ise transpozeaz geninde delesyonlar içeren Ac elementleridir.



Şekil 14.9. Transpozon etiketlemesi yoluyla bir genin klonlanması.

Bitkiler mutantları heterozigot halde barındırıp daha sonra F₂ generasyonunda homozigot döller verebildiğinden transpozon mutasyonları için çok uygundurlar. Bir kez Ac sistemi ile transpozon mutasyonu oluşturulduktan sonra, mutasyona uğramış bitkilerden oluşturulan kütüphane Ac sekansları ile hızlı bir şekilde taranarak Ac taşıyan klonlar bulunmaktadır. Buna güzel bir örnek olarak Aslan ağzı bitkisinde çiçek gelişimi ve morfolojisini etkileyen *floricaula* (*Flo*) geninin transpozon mutasyonuna uğratılması ve Ac sistemi ile klonlanması verilebilir (Şekil 14.10).



Şekil 14.10. Tam3 transpozonu ile etiketleme yoluyla aslan ağzı bitkisinde çiçeklenme geninin klonlanması. Normal tip bitkinin (*Flo*+) ve *flo-613* mutantının (*Flo*-) DNA'ları *Hind*III enzimi ile kesilip Tam3 probu ile Southern analizine tabi tutulduğunda, *flo-613* mutantının 7.5 kb büyüklüğünde yeni bir banta sahip olduğu görülmüştür. Daha sonra Tam3 saplamasını çevreleyen DNA *Flo* cDNA'sını klonlamak için işaret olarak kullanılmıştır. Klonlanan bu normal tip cDNA'nın tahmin edilen protein dizisinin bilinen hiç bir proteine benzemediği belirlenmiştir. Tam3 transpozonu ile mutasyona uğratılmış olan bitkinin (*flo-613*) ara sıra mutant özelliğini kaybederek çiçek oluşturduğu gözlenmiştir. Bu tip bitkiler kendilendiklerinde içlerinden birinin hem normal tip (*Flo*+) hem de mutant tip (*Flo*-) döller verdiği görülmüştür. Bu bitkilerde *Flo* cDNA'sı kullanılarak yapılan Southern analizi *Flo*+ bitkisinin (D bitkisi) normal tip banda 4.0 kb), mutant *Flo*- bitkilerinin (A, B ve C bitkileri) ise 7.5 kb'lık *Hind*III bandına sahip oldukları belirlenmiştir (Watson ve ark., 1992'den).

Aslan ağzı bitkisinde *Flo* mutasyonu çiçek meristemini bir başka meristeme çevirmekte ve çiçek oluşumu engellenmektedir. *Flo* geni Tam3 adı verilen bir transpozonun kullanıldığı bir araştırmada *flo*-613 alleli sayesinde klonlanmıştır. Tam3 transpozonuna sahip bitkiler uygun şartlarda yetiştirildiğinde (15 °C), transpozon yeni bölgelere atlamaktadır. *flo*-613 bitkilerinin bazen normal tip çiçek oluşturmaları transpozonun varlığının bir delili sayılmıştır. Mutasyonun bu gen ile bağlantılı olduğunu gösteren anahtar gözlem, mutant bitkilerde oluşan bir çiçeğin kendine tozlanması sonucunda normal tip ve mutant çiçek oluşumlarının saptanması olmuştur. Normal çiçek oluşturan bitkiler (*Flo*+) ile *flo*-613 (*Flo*-) bitkilerinin DNA'ları izole edilerek, Tam3 DNA'sı içeren bir prob ile Southern analizine tabi tutulduğunda, *flo*-613 bitkilerinin farklı bir banta sahip oldukları görülmüştür. İzole edilerek klonlanan bu bantın transpozonu çevreleyen bir miktar bitki DNA'sını içerdiği saptanmıştır. Bu bitki DNA'sı da normal-tip geni klonlamakta kullanılmıştır. Aynı şekilde mısır Ac transpozonunun *Waxy* geninde meydana getirdiği mutasyon sonrasında, mutant bitki DNA'sı Ac dizilimleri ile taranmış ve Ac içeren parçalardan *Waxy* geni klonlanmıştır (Watson ve ark., 1992). Her ne kadar transpozonlar sadece mısır ve aslan ağzı gibi birkaç bitkide bulunuyorsa da patates, domates, tütün, arpa, buğday ve *Arabidopsis* gibi bitkilere transpozonlar aktarılmış olup, halen kullanılmaktadırlar.

14.2.3.2. T-DNA etiketlemesi

Agrobacterium tumefaciens, konukçu bitkilerinde kök urları yapan bir bakteridir. Kök urları *Agrobacterium*'da bulunan bir plazmidin (dairese DNA molekülü) T-DNA olarak adlandırılan bir kısmının konukçu bitki hücrelerine entegre olmasıyla oluşur. T-DNA'da yalnızca *Agrobacterium*'un kullandığı *opin*'ler adı verilen nadir amino asitleri sentezleyen genler ile, oksin gibi bitki hormonu sentezleyen enzimleri üreten genler bulunmaktadır. Bu bitki hormonları sayesinde enfekte edilen hücreler bölünmeye teşvik edilirler. T-DNA'nın iki tarafında 25 baz uzunlukta sol uç (LB) ve sağ uç (RB) olarak adlandırılan özel dizilimler mevcuttur ve entegrasyon esnasında T-DNA Ti plasmidden bu kısımlardan kesilir.

T-DNA bitki transformasyonunda kullanılacak bir vektör olarak yeniden düzenlenmiştir. T-DNA transferi için gerekli unsurlar T-DNA içinden çıkarılıp Ti plazmidine veya ikinci bir vektöre konarak bitki transformasyonunda kullanılacak gen için yer açılmıştır. Bitki hormonu genleri de çıkarılarak enfekte edilen hücredeki kontrolsüz büyüme engellenmiştir. Entegrasyon sonrasında T-DNA'yı taşıyan hücrelerin seçilmesine izin vermesi açısından bir antibiyotik dayanıklılık geni, NPT-II (kanamisin dayanıklılığı sağlar), T-DNA içine yerleştirilmiştir.

T-DNA ile transformasyon yapıldığında eğer T-DNA bir genin içine entegre olursa mutasyon meydana getirir. Transformasyon sonrası kanamisine dayanıklı bitki hatları arasından mutantlar aranır. *Arabidopsis* gibi küçük genomlu ve tekrarlanan

DNA'sı az olan bir bitkide elde edilen 136 kanamisin dirençli hattan 36'sı bir mutant özellik taşımıştır. Örneğin bunlardan bir tanesinin boyu normal *Arabidopsis* bitkisinin beşte biri kadar olmuştur. Yöntemin ana kısıtlayıcı özelliği, yüksek miktarlarda transforme olmuş bitkilerin elde edilebilmesi için oldukça fazla çaba gerektirmesidir.

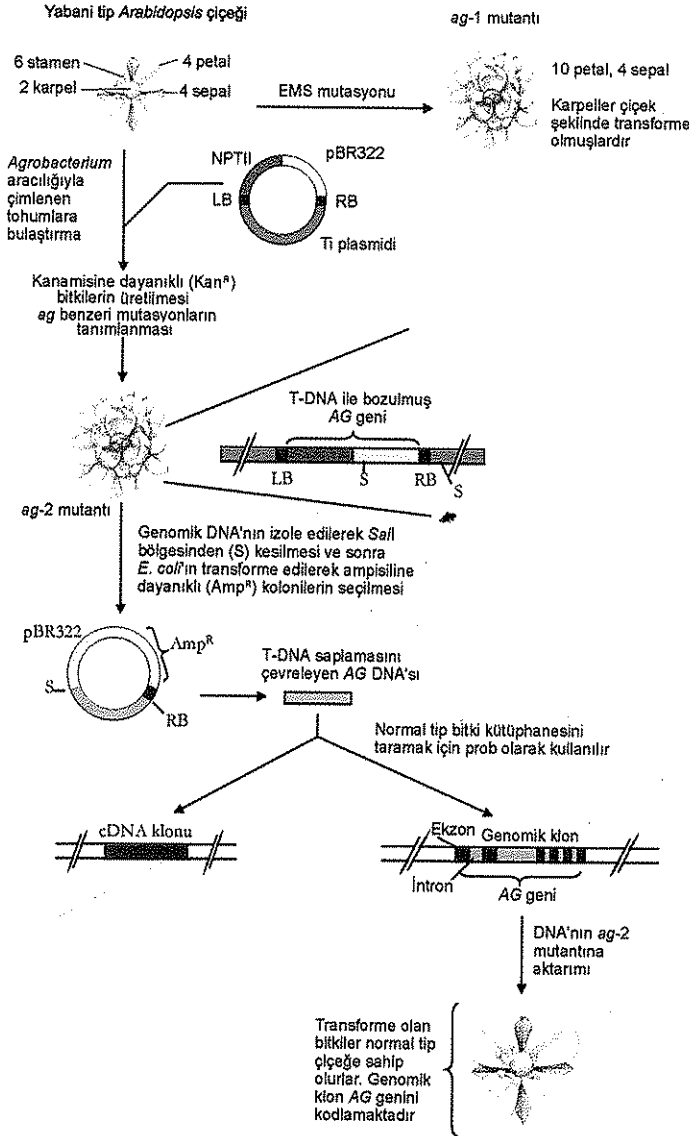
Bu tekniğin uygulanışına örnek olarak *Arabidopsis*'te çiçeklenme geninin (*AG*) T-DNA saplaması ile mutasyona uğratarak klonlanması verilebilir (Şekil 14.11). Normal tip *Arabidopsis* çiçekleri normalde dört adet sepal, dört adet petal, altı adet stamen ve iki adet karpel sahiptir. Etil metan sülfonat (EMS) mutasyonu ile bir mutant *Arabidopsis* bitkisi (*ag1*) elde edilmiştir. Bu bitkide normal çiçek kısımları yerine çoklu petal ve sepaller gözlemlenmiştir. Benzer çiçek yapısına sahip başka bir mutant *Arabidopsis* bitkisi (*ag2*) ise T-DNA entegrasyonu yoluyla sağlanmıştır. Yapılan genetik çalışmalar *ag2*'nin *AG* lokusunun bir alleli olduğunu göstermiştir.

Daha sonra T-DNA saplamasını çevreleyen DNA, plazmid kurtarma (plasmid rescuing) yöntemiyle klonlanmıştır. Bu klonlanan DNA'nın *AG* lokusundan geldiği mutant düzeltilmesi yöntemiyle ispatlanmıştır. Genin içine saplanan T-DNA parçası transforme olan hücrelerin seçimini sağlayan NPTII geni yanında tüm PBR322 plazmid dizisini de içermektedir. PBR322 plazmidinde *E. coli* replikasyon başlangıç noktası (*ori*) ile plazmid kurtarmayı sağlayacak olan bir amfisilin dayanıklılık geni (*Amp^R*) bulunmaktadır. Genomik DNA *SaI* enzimi ile kesildiğinde, enzim T-DNA saplamasını kesmediğinden, T-DNA saplaması bir miktar bitki genomik DNA'sı ile birlikte serbest kalmaktadır. Dairesel molekül kendi kendine birleşmesinden sonra, *E. coli* içerisine transforme edilerek burada çoğalması sağlanır ve ampisilin ortamında dayanıklı koloniler seçilerek plazmid kurtarma işlemi gerçekleştirilmiş olur. Daha sonra klonlanan genomik DNA'dan bir cDNA ve normal tip *AG*'yi kodlayan bir genomik klon elde etmede yararlanılır. *AG*-kodlayan genomik klon *ag2* bitkilerine aktarıldığında, transforme olan hücrelerden tekrar elde edilen bitkilerin normal çiçek ürettikleri görülmüştür. Bu sonuç genomik klonunun gerçekten *AG* genini içerdiğini göstermektedir.

14.2.4. Haritalara dayalı gen klonlanması

Genler, genomdaki pozisyonlarından hareketle genetik haritalar yardımıyla klonlanabilirler. Ancak, ortalama 3.000 bazdan oluşan genleri (Gibson ve Somerville, 1993) 120 milyon (*Arabidopsis*) ile 15 milyar (buğday) civarında baz içeren bitki genomlarının içinden çekip çıkarmak oldukça güç bir işlemdir. Bu nedenle haritalara dayalı gen klonlama işlemi, genellikle diğer gen klonlama tekniklerinin uygun olmadığı durumlarda başvurulmuş bir metottur.

Haritaya dayalı gen klonlaması tekniğinin başarısı için bazı koşulların sağlanması gereklidir. Her şeyden önce, ilgili bitki türünde klonlanması istenen genin açılım



Şekil 14.11. T-DNA entegrasyonunun neden olduğu mutasyon yoluyla *Arabidopsis*'de çiçeklenme geninin (AG) klonlanması (Watson ve ark., 1992'den).

gösterdiği çok iyi bir genetik harita bulunmalıdır. Genomda tekrarlanan DNA miktarı ile birim genetik harita mesafesi (cM) başına düşen fiziksel DNA miktarının

az olması gerekmektedir. Tablo 14.1’de model bir genetik bitki olan *Arabidopsis* ile değişik boyutlarda genomu sahip olan bazı kültür bitkilerinde fiziksel büyüklük ve harita birimi açısından bazı genom özellikleri verilmiştir. Bitkilerde bulunan gen sayıları arasında iki kat civarında bir değişim tahmin edilirken (örneğin *Arabidopsis*’te 25.000, çeltikte 50.000) genom büyüklüğündeki değişim çok daha fazladır. Bu nedenle, birim gen başına genomda bulunan DNA miktarı, büyük genomlu organizmalarda artmakta ve böylece “gereksiz” DNA’ların arasından istenen genin izole edilmesi daha da güçleşmektedir. Birim genetik harita mesafesi (cM) başına düşen DNA miktarı azaldıkça genetik haritalar daha etkin bir şekilde gen klonlanmasında kullanılmaktadır. Söz konusu türde ploid seviyesinin düşük olması da avantajdır, çünkü bu türlerin genomik kütüphanelerinde daha az sayıda klon vardır ve işaret sistemleri daha basittir.

Tablo 14.1. Çeşitli bitkilere ait bazı genom özellikleri.

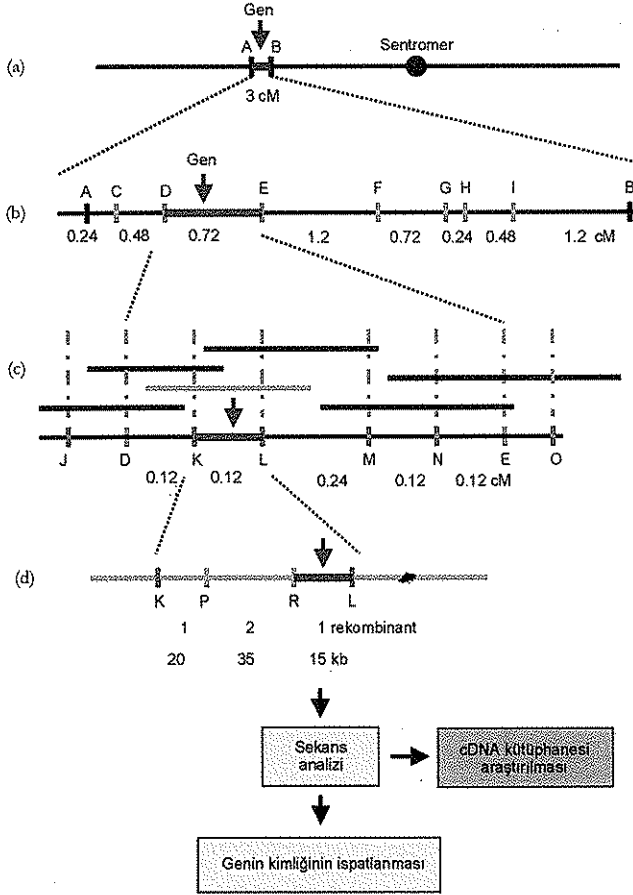
Genom özelliği	<i>Arabidopsis</i>	Çeltik	Arpa	Ekmeklik buğday
Ploidi	2X	2X	2X	6X
Kromozom sayısı	2n=10	2n=24	2n=14	2n=42
Haploid genom büyüklüğü (Mb*)	120	430	4.900	16.000
Genom uzunluğu (cM)	700	1.500	1.250	3.500
Ortalama kb/cM**	280	300	4.000	?
Genomu kaplamak için gereken 150 kb klon sayısı	800	2.900	32.000	107.000

*Mb (1000 kb), **Genom içindeki yere göre değişiklik göstermektedir.

Haritaya dayalı gen klonlanması metodunun başarısı harita bilgisinin doğruluğuna çok büyük ölçüde bağlıdır. Bu nedenle teknik, ancak etkileri net olarak görülebilen genlerin, yani kalitatif genlerin, klonlanmasında kullanılabilir. Haritalama, hatalara çok açık olan kantitatif karakter lokuslarının klonlanmasında uygun değildir.

14.2.4.1. Genin kabaca haritalanması ve geni çevreleyen markörler arasındaki uzaklığın baz sayısı olarak belirlenmesi

Haritaya dayalı gen klonlanmasında (Şekil 14.12) yapılacak ilk işlem ilgili gen bakımından farklılık (polimorfizm) gösteren ebeveynlerden oluşan bir açılım



Şekil 14.12. Birim cM harita uzunluğu başına 500 kb düşen bir genom bölgesinde haritaya dayalı gen klonlanması. **a)** İlgili gen, 100-200 gamet taşıyan bir populasyon kullanılarak bir kromozom üzerinde A ve B markörleri arasında 3 cM uzunluğundaki bölgeye haritalanır. **b)** 3.000 gametten oluşan bir populasyonda gen detaylı olarak haritalanır ve bu bölgeye olabildiğince fazla yeni işaret (C-I) konur. Gen 0,72 cM uzunlukta olan D ve E işaretleri arasındaki bölgededir. **c)** Her iki uçta D ve E markörlerinden başlayarak ortalama 100 kb uzunluğunda DNA taşıyan BAC klonları kendilerinden geliştirilen J-O işaretleri kullanılarak üst üste dizilir ve ilgili kromozom bölgesi yeniden oluşturulur. Bu işaretler detaylı harita üzerinde de haritalanır ve genin 0,12 cM uzunlukta K-L aralığında olduğu belirlenir. K ve L işaretlerinin her ikisi de pembe renkle gösterilen BAC klonu üzerinde olduğu için artık sadece bu klonla çalışılır. K-L aralığında sadece dört rekombinant bitki bulunsun. **d)** BAC klonundan geliştirilen P ve R işaretleri ilgili dört rekombinantta analiz edilir ve genin R ile L arasındaki yaklaşık 15 kb uzunluğundaki bölgede olduğu saptanır. Bu bölge dizi analizine tabi tutulur. Bu bölgeye ait cDNA bulunup bulunmadığı araştırılır. Genin kimliğini ispatlamaya yönelik diğer işlemler yapılır.

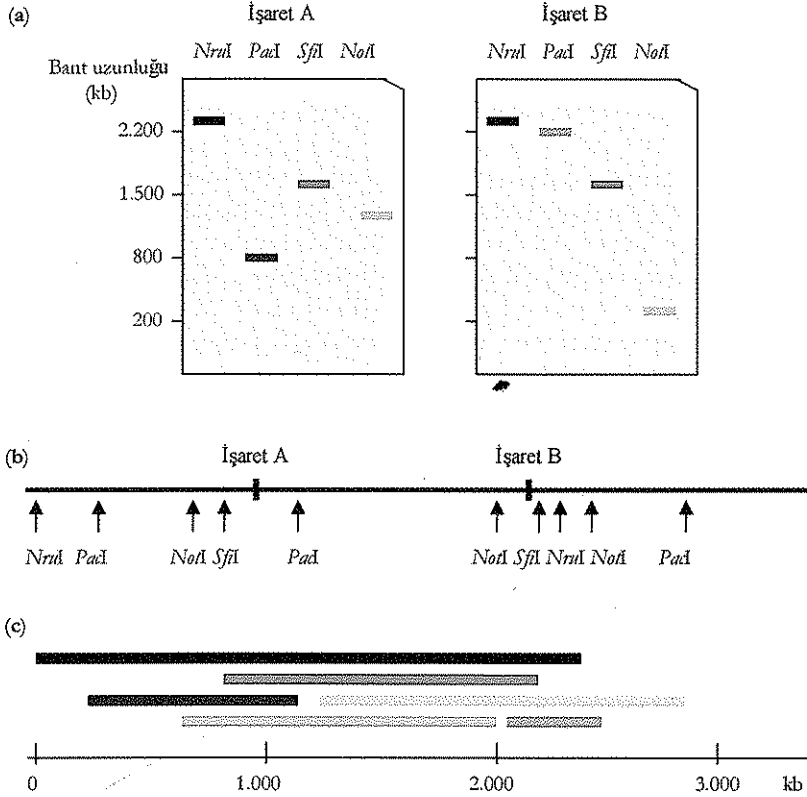
populasyonu hazırlanmasıdır. Daha sonra gen, 100-200 gametlik bir haritalama populasyonunda DNA yol sembolü olan işaretler kullanılarak kabaca haritalanır. Kaba haritalamadan sonra çok daha fazla bireyden oluşan detaylı haritalama populasyonu hazırlanır ve genin haritalandığı bölgeye mevcut olan her türlü işaret yerleştirilir. Bu işlem çok sayıda işaret veren AFLP ve RAPD gibi teknikler yanında başka haritalardan RFLP işaretleri gibi transfer olabilen işaretler getirilmesi ile de gerçekleştirilebilir. Detaylı haritalamanın kalitesi (ilgili gene çok yakın işaretler bulunması ve hata olmayışı) ile klonlama için gerekli iş miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Genetik haritalarda kullanılan harita birimi cM ilgili DNA'nın boyutunu göstermesi bakımından güvenilir değildir. Genom üzerindeki farklı noktalarda rekombinasyon oranı farklıdır ve bu durum bir cM harita mesafesi başına düşen DNA miktarında çok fazla değişiklik meydana getirebilir. Örneğin, *Arabidopsis*'in 4 numaralı kromozomu üzerinde cM harita mesafesi başına düşen DNA miktarı 70 ve 500 kb (kilobaz = 1.000 baz) arasında değişmektedir (Schmidt ve ark., 1995). Ayrıca, cM cinsinden mesafe hesaplaması rekombinasyon frekansı üzerinden yapıldığı için tesadüfi bir olaydır. Bir haritada 10 cM olan bir mesafe, kullanılan harita populasyonunun büyüklüğüne bağlı olarak aynı türün diğer bir haritasında sıfır cM dahi olabilir. Bu nedenlerden dolayı, klonlanmak istenen genin etrafındaki iki işaret arasındaki fiziksel DNA büyüklüğünün yaklaşık olarak tahmini, araştırmacı için çok kullanışlı bir ön bilgidir. Bu amaçla, özel metotlarla, parçalanmadan elde edilen uzun DNA molekülleri hazırlanır. Rutin DNA deneyleri için kullanılan DNA ekstraksiyon metotları yeterli uzunlukta parçalanmamış DNA üretemezler. Hazırlanan 200-2000 kb uzunluğundaki DNA, bitki genomlarında nadiren kesim yapan DNA kesim enzimleri ile kesilip pulsed-field jel elektroforezi olarak adlandırılan metotla jel içinde yürütülür. Southern blot tekniğinin de kullanımıyla, her iki işareti de taşıyan en küçük DNA bandının büyüklüğü, bu iki işaret arasındaki mesafenin olabileceği maksimum uzunluğu bildirir. Bu şekilde farklı kesim enzimleri kullanılarak her iki işareti de taşıyan en küçük bant araştırılır (Şekil 14.13).

14.2.4.2. Harita üzerindeki işaretlerden klonlanacak olan gene doğru ilerleme

a) Kromozom yürüyüşü

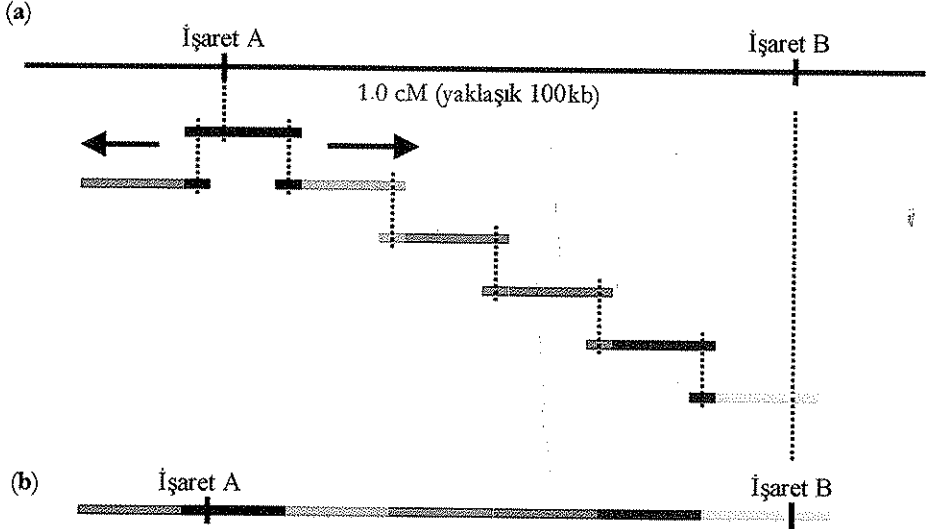
Klonlanmak istenen genin DNA işaretlerine göre pozisyonundan hareketle genin bulunduğu kromozomal bölge DNA kütüphanelerindeki genomik DNA klonları ile yeniden oluşturulur. Bu amaçla kullanılan genomik klonlar birkaç bin baz taşıyan plazmidlerde değil, 15-20 kb taşıyan lambda faj (λ phage) ve çok daha fazla baz taşıyan diğer vektörler üzerinde bulunmaktadır. Bu klonlar üst üste gelebilmelerinin sağlanması için düzenli olarak değil, rasgele bir şekilde kesilmişlerdir. Klonların uçlarındaki DNA dizileri kullanılarak farklı klonların sıralanması gerçekleştirilir ve kromozom üzerinde ilerlenir (Şekil 14.14). Kromozom yürüyüşü olarak adlandırılan bu teknikle kromozom üzerinde her iki yöne doğru da ilerlenir. İlgili kromozom

bölgesinde rekombinasyon taşıyan bitkiler ilerlemenin gene doğru mu yoksa aksi yönde mi olduğunu gösterir. Doğru yöndeki ilerleme genin diğer tarafındaki işarete ulaşınca kadar devam ettirilir. Bu şekilde geni taşıyan bölge genomik klonlar ile yeniden oluşturulmuş olur. Elde edilen her yeni klondan yeni DNA işaretleri geliştirilir ve bu işaretlerin detaylı harita'daki yerleri belirlenir.



Şekil 14.13. Pulsed-field elektroforez ile iki işaret arasındaki DNA baz sayısının yaklaşık olarak tahmin edilmesi. a) Çok uzun DNA moleküllerinin elde edilmesini sağlayan özel metotlarla bitki DNA'sı üretilir. Bu DNA, bitki DNA'sını nadiren kesen bazı enzimlerle kesilir ve pulsed-field elektroforez metoduyla her bir enzimle kesilen DNA farklı bir jel kulvarında yürütülür. Southern transfer metoduyla DNA jelden membrana alınır. Membranlar önce radyoaktif olarak etiketlenen A işareti ile melezlenir ve incelenir. Yıkanan membran daha sonra yine radyoaktif etiketli B işareti ile melezlenir. b) Enzimlerin DNA üzerinde kestikleri yerlerin şematize gösterimi. c) Enzimlerin kesmesi ile oluşan parçalar. *NruI* ve *SfiI* enzimlerinin kestiği parçalar (sırasıyla yaklaşık olarak 2.400 kb ve 1.500 kb uzunlukta) her iki işareti de içermektedir. O halde A ve B arasındaki mesafe 1.500 kb'den daha azdır.

Kromozom yürüyüşü ortalama 400-700 kb uzunlukta olan YAC (maya suni kromozomu) ve ortalama 150-300 kb uzunlukta olan BAC (bakteri suni kromozomu) vektörleri ile de yapılabilir. Birim harita mesafesi başına düşen DNA uzunluğu fazla olan organizmalarda bu tip büyük DNA taşıyabilen vektörlerin kullanımı gereklidir.



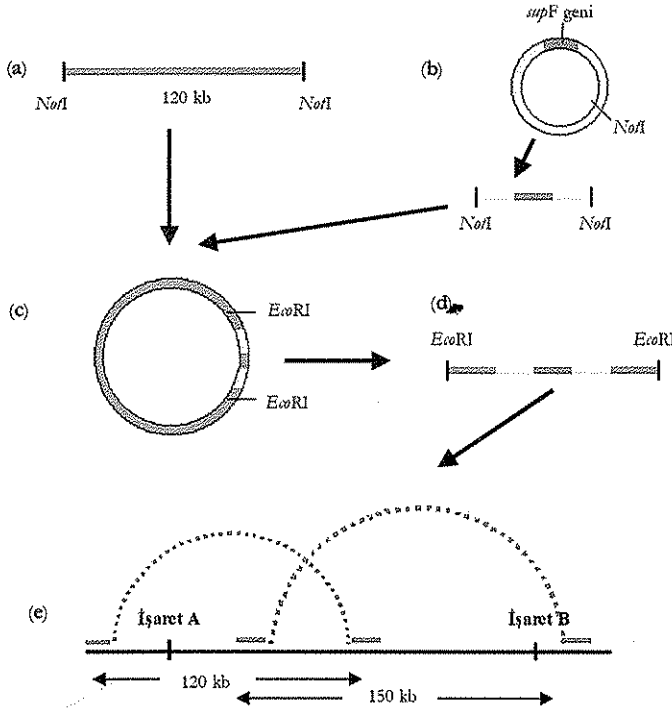
Şekil 14.14. Yaklaşık 20 kb uzunlukta genomik klonlar kullanarak yapılan kromozom yürüyüşü. a) A işareti kullanılarak bulunan bir klonun her iki ucundan DNA dizileri kullanılarak her iki yön için yeni klonlar seçilir. Seçilen her klondan geliştirilen işaretler sürekli olarak genetik haritaya yerleştirilir ve gene doğru ilerleyen yön belirlenir. Her uç dizisi ile yeni bir klon belirlenir ve B işaretine ulaşılır. b) Elde edilen klonların ortak olan kısımlarının üst üste getirilmesi ile A ve B işaretleri arasındaki kromozom bölgesi yeniden oluşturulmuş olur.

b) Kromozom atlaması

Kromozom atlaması tekniği işaret ile gen arasındaki uzun mesafenin hızlı bir şekilde aşılması için kullanılmaktadır (Şekil 14.15). Kromozom atlamasında büyükçe bir DNA parçası dairesel bir hale getirilip uç kısımları elde edilir. Bu uçlar kullanılarak ortadaki büyük DNA parçası ile uğraşmadan kromozom üzerinde büyük mesafeler kolayca kat edilir. Bu metodun bir diğer avantajı, bilhassa tekrarlanan DNA miktarı fazla olan genomlarda görülür. Bu genomlarda küçük klonların tekrarlanan bölgelere ait dizilişler taşıması durumunda aynı dizilişler başka kromozomların üzerinde de bulunabileceği için istenen kromozomda sağlıklı bir ilerleme sağlanamaz. Kromozom atlamasında ise oldukça uzun olan genomik DNA'nın uçlara yakın kısımlarında tekrarlanmayan bir dizi bulunabilir. Böylece, başka bir kromozoma ait olan bir klonun seçilmesi riski önlenir.

c) Küçük genomlu organizmaların genomik klonlarının kullanılması

Genin bulunduğu bölgenin genomik klonlarla yeniden oluşturulması amacıyla çalışılan organizma ile genom benzerliği bulunan başka organizmalardan genomik klonlar getirilebilir. Örneğin, çoğu tahıl türleri arasında bu tip olaylar sağlanabilmektedir. Çeltik gibi küçük genomlu bir türden arpa gibi büyük genomlu bir türe klon getirilmesi ile arpada harita mesafeleri çok daha kolayca kat edilir ve klonlama kolaylaştırılır.



Şekil 14.15. Kromozom atlaması. a) Özel metotlar ile oldukça uzun DNA molekülleri üretilir ve nadiren kesen bir enzimle (*NotI*) kesilir. Pulsed-field elektroforez ile sıralanan DNA'lardan 50-200 kb taşıyanlar ayırt edilir. b) Supresor tRNA geni taşıyan plazmid aynı enzim ile (*NotI*) kesilir. c) Bu iki grup parça bir araya getirilir ve ligaz enzimi ile birbirine yapıştırılarak büyükçe bir dairesel DNA elde edilir. Dairesel DNA, plazmid dizisini kesmeyen fakat genomik DNA üzerinde sıkça kesim yapan bir enzim ile (*EcoRI*) kesilir. d) Plazmid ve iki ucunda genomda 120 kb uzaklıktan gelen iki parça kalır. Bu DNA parçaları amber mutasyonları içeren fajlara aktarılır. Fajlar supresor mutanlığı taşıyan *E. coli* koloniler üzerinde üretilirse ancak *supF* genini taşıyanlar, yani d'de gösterilen parçayı taşıyanlar yaşayabilir. Buradan uç kısımlardaki DNA'lar çoğaltılır. e) Uçtaki parçalar haritaya yerleştirilir ve bu parçaların kullanımıyla yeni atlamalar yapılarak B işaretinin diğer tarafına geçilir.

d) Kromozoma konma

Büyük DNA klonları taşıyabilen vektörlerin geliştirilmiş olması zengin işaret sistemleri ile bir araya geldiğinde, bilhassa birim harita mesafesi (cM) başına düşen DNA miktarının az olduğu durumlarda harita üzerinde geni çevreleyen iki işaret aynı genomik klon üzerinde elde edilebilir. Kromozoma konma adı verilen bu teknik kromozom yürümesi veya atlaması işlemlerinin devreden çıkarılmasını sağlar. Kromozoma konma tekniğinde gerekli olan bölgenin işaretlerle doyurulması işlemi için fazla sayıda işaret veren RAPD ve AFLP gibi işaret sistemleri yanında aynı tür, benzer türler ve hatta cinslerin haritaları arasında transfer edilebilen işaretler kullanılır. Tekniğin kısmen modifiye edilmiş bir formunda klonlanmak istenen gene yakın bir işaret kullanılarak büyük bir genomik klon bulunur. Bu klonun iki ucundan geliştirilen işaretlerin genin iki tarafında yer aldığıın ispatlanması genin bu klon üzerinde olduğunu gösterecektir (Şekil 14.16).

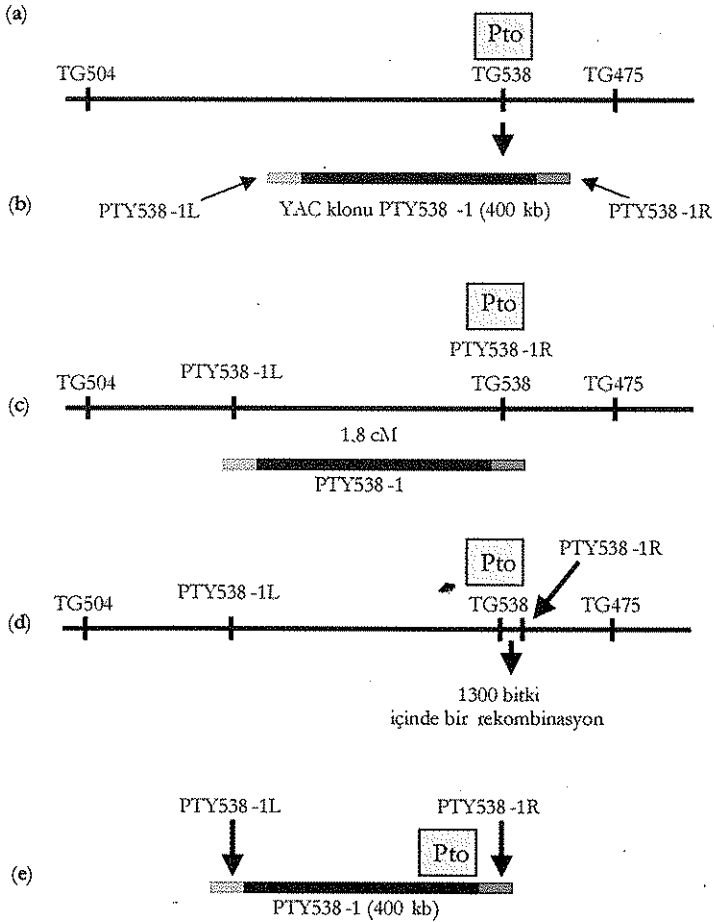
14.2.4.3. Genetik harita ve BIBAC vektör sistemlerinin kombinasyonu

Son zamanlarda, büyük DNA parçaları ile genetik transformasyona izin verebilen ve BIBAC (iki sistemli bakteri suni kromozomu) olarak adlandırılan vektörler geliştirilmiştir (Hamilton *ve ark.*, 1996). BIBAC vektörleri hem *E. coli* ve hem de *Agrobacterium tumefaciens*'te çoğalabilmekte olup, büyük DNA parçalarını bitki kromozomlarına entegre etmek için gerekli bütün özelliklere sahiptir. Bu sistem, haritaya dayalı gen klonlanması işleminde, YAC veya BAC klonları ile genin bulunduğu iki işaret arası bölge yeniden oluşturulduğunda devreye girmektedir. YAC veya BAC klonlarındaki genomik DNA'lar tamamen veya kısmen BIBAC vektörlerine aktarılmakta ve bunlarla transformasyon yapılmaktadır. Bu transformasyon sonucunda istenen fenotipik etkiyi sağlayan BIBAC klonu ilgili geni taşıyacaktır. BIBAC üzerindeki DNA daha küçük parçalara ayrılıp işlem tekrarlanır veya bütün DNA dizi analizine tabi tutulur ve aranan gen izole edilir.

BIBAC ve genetik harita sistemleri kombinasyonu büyük genomlu organizmalarda gen klonlanmasında oldukça kullanışlıdır. Domates (Hamilton *ve ark.*, 1999) ve kolza bitkilerinde (Wu *ve ark.*, 2000) BIBAC vektörleri kullanılarak genomik DNA kütüphanesi hazırlanmıştır. Buğdayda ise bu tip bir kütüphane hazırlanma aşamasındadır. Böylece, BAC veya YAC vektörlerindeki genomik DNA'nın BIBAC'a aktarılması işlemi devreden çıkarılmaktadır.

14.2.4.4. Genomik DNA dizisinde bir gen bulunduğunun ispatlanması

Haritaya dayalı gen klonlanmasının son aşamasında genin bulunduğu düşünülen genom bölgesi 10-15 kb civarında bir büyüklüğe indirildiğinde nükleik asit dizi analizi yapılır ve gen olmaya aday dizi belirlenir. Bu amaçla nükleik asit dizisi



Şekil 14.16. Domateste *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bakterisine karşı dayanıklılık sağlayan *Pto* geninin klonlanmasında kromozoma konma tekniğinin kullanılması. a) 251 F₂ (502 gamet) taşıyan bir haritalama populasyonunda *Pto* geninin TG504 ve TG475 işaretleri arasında olduğu ve TG538 işareti ile tam bağlantıya sahip olduğu saptanmıştır. b) TG538 işareti kullanılarak bir genomik DNA kütüphanesinden 400 kb taşıyan bir YAC klonu (PTY538-1) elde edilmiştir. Bu klonun iki ucundan PTY538-1L ve PTY538-1R işaretleri geliştirilmiştir. c) Bu iki işaret, genetik harita üzerine konunca PTY538-1L'nin 1.8 cM uzaklıkta bulunduğu, PTY538-1R'nin ise *Pto* ile tam bağlantıya sahip olduğu saptanmıştır. YAC klonunun sağ ucu olan PTY538-1R eğer gerçekte *Pto*'nun solunda ise PTY538-1 YAC klonu *Pto*'yu taşımayacaktır. d) F₂, F₃ bitkileri ve 50'nin üzerinde çeşit içeren 1300 bitkilik bir detaylı haritalama populasyonunda *Pto* ve PTY538-1R arasında rekombinasyon taşıyan bir bitki bulunmuştur. e) Bu rekombinant bitki *Pto*'nun PTY538-1R işaretinin solunda, yani klonun üstünde olduğunu göstermiştir. Böylece kromozom yürüyüşü yapılmadan klonlanmak istenen gen bir genomik klon üzerinde belirlenmiştir. Buradan genin kimliğinin ispatlanması işlemlerine geçilmiştir (Martin ve ark. 1993'den).

promotor, açık okuma çerçevesi ve diğer gen unsurları bakımından araştırılır (bkz. Bölüm 13, Şekil 13.7). Gen karakteri taşıyan her diziliş aktif bir gen olamayacağı için, çalışılan kromozom bölgesinde aktif bir gen bulunup bulunmadığı cDNA klonu araştırmasıyla belirlenir. Eğer bu bölgede aktif bir gen varsa, bu gen bir mRNA üretecektir. Bu mRNA cDNA'ya çevrilmiş halde cDNA kütüphanelerinde bulunabilir. Çalışılan bölge DNA'sının prob olarak kullanımıyla cDNA kütüphaneleri taranır. Bulunan cDNA'lar eğer varsa önceden klonlanmış olan genlerle karşılaştırılır. Bir genomik DNA'nın bir mRNA meydana getirip getirmediği bir cDNA kütüphanesi oluşturulmadan daha önce tanıtılmış olan RT-PCR (reverse transkriptaz PCR) ile de belirlenebilir. Gen kimliğinin kesin olarak ispatlanmasında geni meydana getiren genomik DNA dizisi gen fonksiyonunu taşımayan bitkilere genetik transformasyon yoluyla aktarılıp meydana getirdiği sonuçlar incelenir. Gen kimliğinin ispatlanmasının bir başka yolunda ise gen antisens yönünde klonlanarak bitkiye geri kazandırılır ve bu yolla bloke edilen gen etkisi incelenir.

14.3. Sonuç

Her ne kadar tek hücreli organizmalardaki kadar kolay ve insan genomundaki kadar üzerinde duruluyor olmasa da, bitki genleri de izole edilmekte ve klonlanmaktadır. Bitki genlerine adı geçen organizmalarda klonlanmış olan genlere ait bilgilerden hareketle veya diğer stratejiler kullanılarak ulaşılabilmektedir. Bazı bitkilerin genomlarının dizi analizi de gerçekleştirilmiştir. Agronomik açıdan önemli olan ve bitki fizyolojisinin az bilinen labirentlerinde bulunan genlerin teşhis edilmesi bir miktar daha zaman alabilir. Ancak, bu zor işlem başarılı olduğunda birbiriyle akrabalığı hiç olmayan türler arasında transfer edilecek genlerle kültür bitkilerine devrimsel nitelikte karakterler aktarılabilecektir. Yine, izole edilen genlerden elde edilen bilgilerden hareketle, doğal veya sentetik genlerin laboratuvarlarda geliştirilmesi artık bir hayal olmaktan çıkacaktır.

Kaynaklar

The *Arabidopsis* Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 408: 796-815.

Balcells L, Swinborne J, Coupland G (1991) Transposons as tools for the isolation of plant genes. Trends Biotechnol., 9: 31-37.

Bentley DR (2000) Decoding the human genome sequence. Human Mol. Gen., 9(16): 2353-2358.

Bradley D, Carpenter R, Sommer H, Hartley N, Coen E (1993) Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. Cell, 72: 85-95.

- Chu HS, Cho TJ (1996) Isolation of salicylic acid-induced genes in *Brassica napus* by subtractive hybridization. *Mol. Cells*, 6(6): 766-772.
- Dean C, Sjodin C, Page T, Jones J, Lister C (1992) Behaviour of the maize transposable element Ac in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.*, 2(1): 69-81.
- Dickson D, Cyranoski D (2001) Commercial sector scores success with whole rice genome. *Nature*, 409: 551.
- Gibson S, Somerville C (1993) Isolating plant genes. *TIB Tech.*, 11: 306-312.
- Grevelding C, Becker D, Kunze R, Von Menges A, Fantes V, Schell J, Masterson R (1992) High rates of Ac/Ds germinal transposition in *Arabidopsis* suitable for gene isolation by insertional mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 6085-6089.
- Gubler F, Li Z, Fieg S, Jacobsen JV, Morrell MK (2000) Cloning and characterization of a starch synthase I gene from barley. *Plant Physiol.*, 122: 1457-1459.
- Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 9975-9979.
- Hamilton CM, Frary A, Xu Y, Tanksley SD, Zhang HB (1999) Construction of tomato genomic DNA libraries in a binary-BAC (BIBAC) vector. *The Plant J.*, 18(2): 223-229.
- Hanks S (1987) Homology probing: Identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 388-392.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic mRNA by means of polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971.
- McCarty DR, Carson CB, Stinard P, Robertson DS (1993) Molecular analysis of *viniparous-1*: an abscisic acid insensitive mutant of maize. *The Plant Cell*, 1: 523-532.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436.
- Michalek M, Künzel G, Graner A (1999) Sequence analysis and gene identification in a set of mapped RFLP markers in barley. *Genome*, 42: 849-853.
- Nunberg AN, Li Z, Thomas TL (1996) Analysis of gene expression and gene isolation by high-throughput sequencing of plant cDNAs. In: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*. Academic Press.
- Oeller PW, Miw-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254: 437-439.
- Old RW, Primrose SB (1994) The polymerase chain reaction. In: Carr NG (ed), *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, Fifth Edition. Blackwell Scientific Publications.
- Riesmeier JW, Willmitzer ME, Lacroute F (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.*, 11: 4705-4713.

- Schmidt RJ, Burr FA, Burr B (1987) Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. Science, 238: 960-963.
- Schmidt R, West J, Love K, Lenehan Z, Lister C, Thompson H, Bouchez D, Dean C (1995) Physical map and organization of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. Science, 270: 480-483.
- Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR (1988) Reduction of polygalacturonase in tomato fruit by antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 8805-8809.
- Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM (1992) Regulation of the amount of the starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. Science, 258: 287-292.
- Sun TP, Goodman HM, Ausubel FM (1992) Cloning the *Arabidopsis* *GAI* locus by genomic subtraction. Plant Cell, 4: 119-128.
- Tahir M, Kanegae H, Takano M (1998) Phytochrome C (PHYC) gene in rice : Isolation and characterization of a complete coding sequence (Accession No. AB018442) (PGR98-210). Plant Physiol., 118: 1535.
- Van Nocke S, Muszynski M, Briggs K, Amasino RM (2000) Characterization of a gene from *Zea mays* related to the *Arabidopsis* flowering-time gene *LUMINIDEPENDENS*. Plant Mol. Biol., 44(1): 107-122.
- Walbot V (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol., 43: 49-82
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) Recombinant DNA, Second Edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Wu Y, Tulsieram L, Tao Q, Zhang H-B, Rothstein SJ (2000) A binary vector-based large insert library for *Brassica napus* and identification of clones linked to a fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility (CMS). Genome, 43(1): 102-109.
- Yau CP, Sun KW, Yip WK (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA sequence encoding an ethylene receptor in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants (Accession No. AF051938) (PGR99-081). Plant Physiol., 120: 634.

Bölüm 15

Agrobacterium Aracılığıyla Gen Aktarımı

Sebahattin Özcan¹, Serkan Uranbey², Cengiz Sancak²,
İskender Parmaksız², Ekrem Gürel³, Mehmet Babaoğlu⁴

^{1,2} Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı, Ankara

³ Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 14280 Bolu

⁴ Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42031 Kampüs, Konya

e-posta: ozcan@agri.ankara.edu.tr¹

15.1. Giriş

Yıllardır ıslahçılar ve yetiştiriciler, arzu edilen karakterlere göre bitki tiplerini seçerek çoğaltmışlardır. Ancak, son yıllarda doğanın en etkili genetik mühendisi olan *Agrobacterium* bakterisi araştırmacılar tarafından arzu edilen genetik özelliklerin hızlı ve etkili bir şekilde bitkilere aktarımı için genetik olarak değiştirilmiştir. İlk transgenik bitki, 1980'li yıllarda *Agrobacterium* aracılığıyla tütün protoplastlarından elde edilmiştir (Horsch ve ark., 1984; De Block ve ark., 1984). O günden beri arzu edilen tarımsal özellikleri kodlayan genler değişik teknikler kullanılarak 40'ın üzerinde bitki türüne aktarılmış ve transgenik bitkilerin günümüzde ekim alanı 40 milyon hektara ulaşmıştır. Bu başarı üç önemli buluş sonucunda gerçekleşmiştir (Hinchee ve ark., 1994): (1) Gen aktarımında kullanılan *Agrobacterium* vektörlerinin elde edilmesi, (2) yeni bir bitki oluşturma yeteneğindeki bitki hücrelerine gen aktarım yöntemlerinin ve (3) seçici işaret (markör) genlerinin geliştirilmesidir.

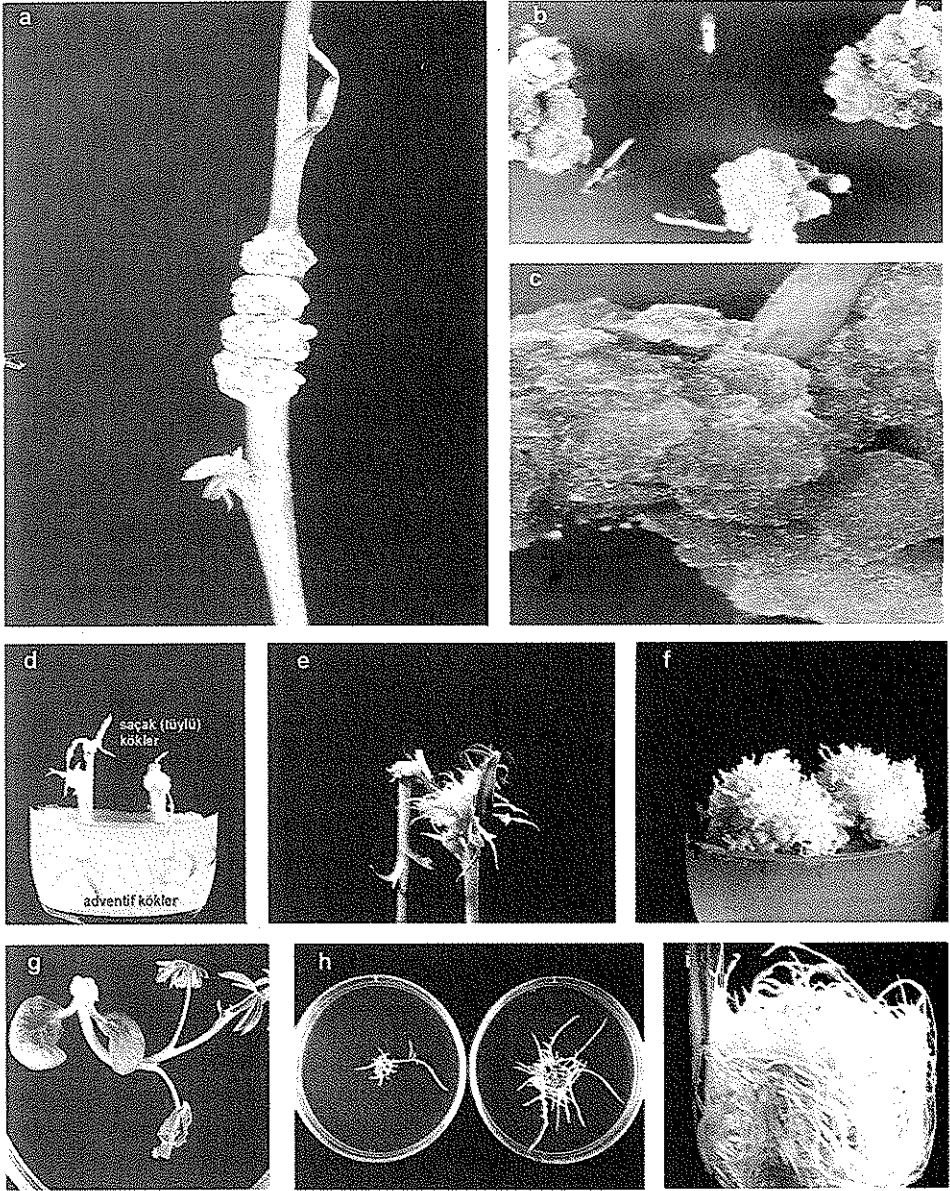
Herhangi bir gen aktarım sisteminin esasını, tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi ve o hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesi oluşturmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). Günümüzde, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan araç *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri

sayesinde hemen hemen tüm kültür bitki türlerinde transgenik bitkiler elde edilebilmiştir. Başlangıçta, buğdaygilleri de içeren tek çenekli bitkilere *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan gen aktarım çalışmalarında istenilen başarıya ulaşılamamış (Potrykus, 1990), bu engelleri aşabilmek için elektroporasyon, mikroyeksiyon ve partikül bombardımanı gibi doğrudan gen aktarım teknikleri geliştirilerek, oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (bkz Bölüm 16). Ancak, son yıllarda geliştirilen süper “binarı” *Agrobacterium* vektörleri sayesinde mısır (Ishida ve ark., 1996), çeltik (Hiei ve ark., 1997), arpa (Tingay ve ark., 1997) ve buğday (Cheng ve ark., 1997) gibi tek çenekli buğdaygillere de başarılı gen aktarımı yapılabilmektedir. Doğrudan gen aktarım yöntemlerine göre, *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımının daha kolay ve ekonomik olması ile başarı şansının daha yüksek olması, bu yöntemi popüler kılmıştır.

15.2. Tümör ve Saçak Kök Oluşumu

Agrobacterium, *Rhizobiaceae* familyasından, toprakta yaşayan gram-negatif bir bakteridir. İki çenekli (dikotiledon) bitkilerde *A. tumefaciens* kök boğazı uruna, *A. rhizogenes* ise saçak kök oluşumuna neden olmaktadır (Şekil 15.1). Ur (tümör) oluşumuna bazı tek çenekli bitkilerde de rastlanmaktadır. Bu bakteriler rizosfer ve toprakta yaşamlarını sürdürürler. 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 (Şekil 15.1a-c). 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 döner. *A. rhizogenes* ile enfeksiyon sonucunda da enfeksiyon bölgesinden saçak kökler oluşmaktadır (Şekil 15.1d-i). *Agrobacterium*'un fitopatojenik özellikleri uzun yıllar önce belirlenmesine rağmen (Smith ve Townsend, 1907), enfeksiyonun gerçek doğası ancak son yıllarda ortaya konabilmiştir (Hooykaas ve Schilperoot, 1984).

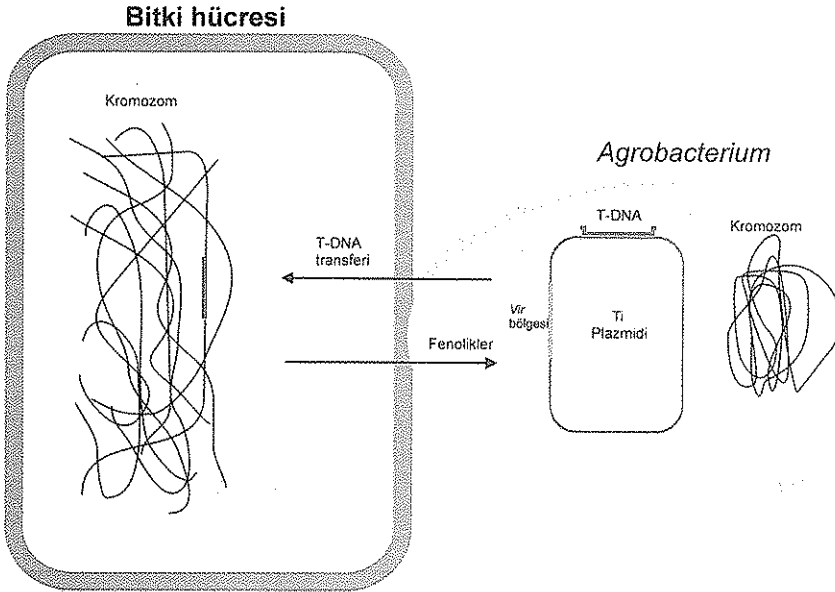
Oksin ve sitokinin grubu bitki hormonları, bitki hücrelerinin *in vitro* şartlarda çoğalarak kallus oluşturabilmeleri için mutlak gereklidirler (Braun, 1958). Oysa, *Agrobacterium* tarafından bir kez tümör veya saçak kök oluşumu başlatıldıktan sonra, tümör veya saçak kökler izole edilerek steril kültür koşullarında, bakteri olmadan ve yardımcı hormonlara ihtiyaç duymadan büyütülebilmektedir (Özcan, 1995; Özcan ve Özgen, 1996) (Şekil 15.1b, c ve e, f, h, i). Yapılan araştırmalarda, enfeksiyon sonucu oluşan dokunun normal bitkide bulunmayan bazı aminoasitleri ve opin'ler olarak bilinen şeker türevlerini sentezlediği görülmüştür (Tempé ve



Şekil 15.1. *In vivo* (a) ve *in vitro* (b ve c) şartlarda yabancı tip *A. tumefaciens* A281 hattı tarafından mercimeğin gövde kısımlarında tümör oluşumu (Karakaya ve Özcan, 1998'den değiştirilerek). *A. rhizogenes* R1601 tarafından *Lupinus angustifolius* cv. Kube: a (d, e, f) ve *L. mutabilis* cv. Potosi (g, h, i)'nin çeşitli eksplantlarından (d, g = hipokotil, e = gövde,) saçak (tüylü) kök oluşumunun uyandırılması (Babaoğlu, 1996'dan değiştirilerek).

Goldmann, 1982; Tempé ve Casse-Delbart, 1989; Kado, 1991). Bu bileşikler bakteri tarafından karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır (Messens ve ark., 1985). Tümörlü dokunun sentezlediği opinlerin türleri (nopalın, oktopin, agrosinopin, agropin gibi) enfekte eden bakteri hatları tarafından belirlenir (Bomhoff ve ark., 1976). Böylece, *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) (Şekil 15.2) ile ilişkili olduğunu göstermiştir (De la Riva ve ark., 1998; Zaenen ve ark., 1974; Watson ve ark., 1975). *Agrobacterium* enfeksiyonu sonucunda T-DNA bölgesi bitki hücrelerine aktarılmakta ve kromozomlarla stabil olarak bütünleşmektedir (Şekil 15.2). T-DNA bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonu sonucunda tümör ve saçak kök oluşumu ile opin sentezi gerçekleşmektedir (Nester ve ark., 1984; Binns ve Thomashaw, 1988) T-DNA bölgesini taşıyan ve *A. tumefaciens* bakterisinde bulunan plazmid, Ti (tumour-inducing/tümör oluşturan) plazmidi; *A. rhizogenes* bakterisindeki ise Ri (root inducing/saçak kök oluşturan) plazmidi olarak adlandırılmıştır (Zaenen ve ark., 1974; Watson ve ark., 1975; Chilton, 1982; Caplan ve ark., 1983; Yadav, 1986).



Şekil 15.2. *Agrobacterium* hücresinde bulunan Ti plazmidi ve bitki hücrelerine T-DNA aktarımı (Özcan, 1995'den değiştirilerek).

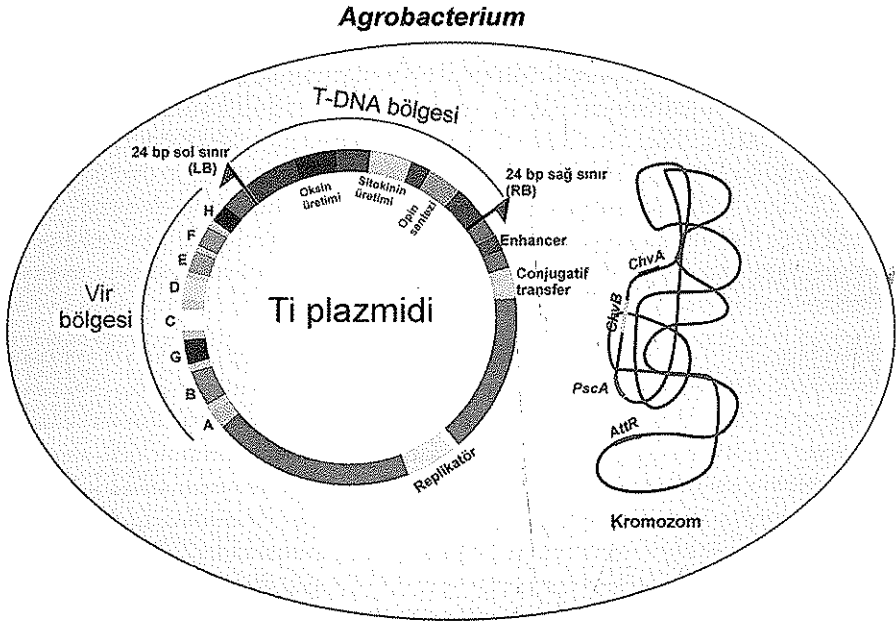
15.3. T-DNA Aktarımında Gerekli Olan Ögeler

Agrobacterium bakterisi, bitki hücrelerine T-DNA aktarımı için gerekli olan üç ögeyi taşımaktadır (Gheysen ve ark., 1992; Özcan ve Özgen, 1996; Zambryski, 1988): (1) T-DNA bölgesi, (2) virülens (*vir*) bölgesi ve (3) bakteri kromozomlarında bulunan *chuA*, *chuB*, *pscA* ve *attR* genleridir (Şekil 15.3).

15.3.1. T-DNA bölgesi

T-DNA bölgesi çift sarmal Ti veya Ri plazmidinde bulunan ve bakteriden bitki hücrelerine aktarılacak bitkinin genomuyla birleşen küçük bir DNA parçasıdır (Şekil 15.2, Şekil 15.3) (Chilton ve ark., 1980; Willmitzer ve ark., 1980). Enfeksiyon sonucunda bitkinin genomik DNA'sına bir veya birden fazla T-DNA aktarılabilir. Oktopin ve nopalın 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 sınıflandırılmış T-DNA bölgelerine sahiptir (Thomashow ve ark., 1980). Öte yandan, nopalın tipi plazmidlerde ise tek bir T-DNA bölgesi bulunmaktadır. Her iki plazmid tipinin 23 kb büyüklüğündeki T-DNA'larında 13 adet gen belirlenmiştir (Fraley ve ark., 1986). Oktopin tipi plazmidlerin, 13.2 kb uzunluğundaki TL-DNA'ları üzerinde 8, 7.9 kb uzunluğundaki TR-DNA'larında ise 5 gen taşındıkları ve TL-DNA bölgesi ile nopalın tipi plazmidin T-DNA'sı arasında büyük benzerlikler olduğu saptanmıştır. Ayrıca, oktopin tipi plazmidlerde bulunan TR bölgesi tümör oluşumu için mutlak gerekli değilken, TL-DNA kısmının oktopin sentezini kodlayan bir geni taşıdığı bilinmektedir. Diğer taraftan, nopalın türü plazmidlerdeki T-DNA bölgesinin nopalın (*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 agropine dönüşümünü sağladığı bildirilmektedir (Salomon ve ark., 1984). Bunların dışında, T-DNA bölgesinde bitkilerde oksin ve sitokininlerin üretimini katalize eden enzimleri kodlayan *iaaM* (*aux1* veya *tms1*), *iaaH* (*aux2* veya *tms2*) ve *ipt* (*cyt* veya *tmr*) gibi genlerin de bulunduğu tespit edilmiştir (Inze ve ark., 1984; Kado, 1991). *iaaM* geni, L-triptofanın indol-asetamide dönüşümünü katalize eden mono-oksijenaz enzimini kodlarken, *iaaH* geni ise hidrolitik etkisiyle indol asetamidi indol-3-asetik asite çeviren indol asetamid hidrolazı kodlamaktadır. *Ipt* geninin ise sitokinin üretiminde görev alan dimetilalil profosfat-AMP transferaz enziminin üretiminden sorumlu olduğu bildirilmektedir. *6b* olarak isimlendirilen bir diğer genin ise yabani tütün (*Nicotiana glauca*) ve *Kalanchoe tubiflora*'da küçük tümörler oluşturduğu ifade edilmektedir (Hooykaas ve ark., 1988). Bu genin, incelenen bütün T-DNA'larda bulunmasına rağmen, üstlendiği rol tam olarak tarif edilememiştir (Kado, 1991). *iaaM*, *iaaH*, *ipt* ve *6b* genlerinin bitki hücrelerine aktarılmasıyla, hücrelerin hormon

dengeyi bozulmakta ve onkogenik (tümör oluşturan) fenotipler oluşmaktadır. Bu nedenle de; söz konusu genlere *onkogenler* (*onc*) adı verilmektedir.



Şekil 15.3. *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımında gerekli olan öğeler.

Agrobacterium rhizogenes, *A. tumefaciens*'in bitkilerde neden olduğu tümör oluşumuna benzer şekilde, saçak kök hastalığı meydana getirmektedir. Ri plazmidleri, TL ve TR olmak üzere iki bağımsız T-DNA bölgesini bitki hücrelerine aktarırlar (Huffman *ve ark.*, 1984). TR-DNA, Ti plazmidlerinde olduğu gibi oksin sentezini teşvik eden genleri taşırken; TL-DNA opin sentezi ve saçak kök oluşumu için gerekli olan genleri bulundurmaktadır (Huffman *ve ark.*, 1984; De Paolis *ve ark.*, 1985).

Yukarıda bahsedilen genlerin dışında, T-DNA bölgesi *ons* (6a) ve ORF1 (gen 5) adı verilen genleri de bünyesinde bulundurmaktadır. *Ons* geni oktopin ve nopalin salgılanmasını kontrol ederken (Messens *ve ark.*, 1985), ORF1 geni transkripsiyonel düzenlemeyen sorumlu olan bir promotörü taşımaktadır (Koncz *ve Schell*, 1986).

Oktopin ve nopalin tipi plazmidlerin T-DNA bölgeleri, sağ (RB/right border) ve soldan (LB/left border) 24 bp uzunluğundaki düzensiz nükleotid dizileri ile sınırlandırılmıştır (Şekil 15.3) (Caplan *ve ark.*, 1983; Yadav *ve ark.*, 1982). Bu diziler sınır dizileri olarak isimlendirilmektedir. Genelde, bu diziler arasında bulunan

DNA bitki hücrelerine aktarılmaktadır. Ancak, bazı durumlarda T-DNA dışındaki bölgelerin de bitki kromozomlarıyla bütünleştiği gözlenmektedir. Sınır dizileri plazmid tipine göre farklılık gösterebilmekte olup (Tablo 15.1), nopalın tipi Ti plazmidin tek T-DNA'sının, oktopin tipi Ti ve *A. rhizogenes*'in Ri plazmidinin TL ve TR-DNA'larının her iki tarafında bulunmaktadır. Sınır dizilerine ilave olarak, pTiA6 ve B6 gibi oktopin tipi Ti plazmidlerin sağ sınır bölgesi yakınında 24 bp'lik "cis" özellikli bir "enhancer" (teşvik edici) bölgesi de bulunmaktadır (Şekil 15.3) (Peralta ve ark., 1986). Bu bölge TL ve TR-DNA'nın bitki hücrelerine etkili aktarımında gerekli olup, bulunduğu yere bağlı olmaksızın sınır dizilerinin 6 kb uzağında olsa bile etkisini gösterebilmektedir. Öte yandan, "enhancer" bölgesi pTiC58 gibi nopalın tipi plazmidlerde bulunmamakta ve etkili bir şekilde gen aktarımı için bu plazmidlerin sağ sınır bölgesinin aynı görevi üstlendiği bildirilmektedir (Wang ve ark. 1984; Kado, 1991).

Araştırmalar, iki T-DNA sınırı arasına yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolayca bitki hücresine aktarılabilirdiğini göstermiştir (Leemans ve ark., 1982; Schell ve Montagu, 1983). Üstelik, tümör oluşturan genlerin kesici (restriksiyon) enzimler yardımıyla T-DNA bölgesinden çıkarılmasını da bitki hücresine gen aktarımını hiçbir şekilde engellemediği belirlenmiştir (Leemans ve ark., 1982; Schell ve Montagu, 1983). Tümör oluşturan genlerin çıkartıldığı plazmidler, non-onkogenik (tümör oluşturmayan) Ti-plazmidler olarak adlandırılmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). Araştırmalar, T-DNA'nın sağ sınır nükleotid dizisinin gen aktarımında mutlak gerekli olduğunu ortaya koyarken (Joos ve ark., 1983; Wang ve ark., 1984; Shaw ve ark., 1984; Özcan, 1997), sol sınırdaki parça eksilmelerinin (delesyonların) bakteriden bitki hücresine genetik materyal aktarımını etkilemediğini göstermiştir (Joos ve ark., 1983).

Tablo 15.1. Farklı *Agrobacterium* plazmidlerine ait 24 bp'lik T-DNA sınır nükleotid dizileri (Kado, 1991'den alınmıştır).

Ti plazmidi/ opin tipi	Sınır	Nükleotid Dizisi	Kaynak
pTiC58/nopalın	Sol	TGGCAGGATATATTGTGGTGTA	Zyprain ve Kado, 1990
pTiC58/nopalın	Sağ	TGACAGGATATATTGGCGGGTA	
pTiT37/nopalın	Sol	TGGCAGGATATATTGTGGTGTA	Yadav ve ark., 1982
pTiT37/nopalın	Sağ	TGACAGGATATATTGGCGGGTA	
pTi15955/oct.TL	Sol	CGGCAGGATATATTCAATTGTAA	Barker ve ark., 1983
pTi15955/oct.TL	Sağ	TGGCAGGATATATACCGTTGTAAT	
pTiAch5/oct.TL	Sol	CGGCAGGATATATTCAA'TGTAA	Gielen ve ark., 1984
pTiAch5/oct.TL	Sağ	GGCAGGATATATACCGTTGTAAT	
pRiA4/agrop. TL	Sol	TGGCAGGATATATTGTGATGTAA	Slightom ve ark., 1986
pRiA4/agrop. TL	Sağ	TGACAGGATATATGTCCTGTCAT	

15.3.2. Virülens (*vir*) bölgesi

Vir bölgesi, T-DNA aktarımında gerekli olan ürünlerin önemli bir kısmını sağlamaktadır (Şekil 15.3). 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 (Stachel ve Nester, 1986; Horsch *ve ark.*, 1986). T-DNA’nın dışında ve sol sınıra yakın olan, yaklaşık 30-40 kb uzunluğundaki “virulens” (*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 (Şekil 15.3) (Stachel ve Nester, 1986; Zambryski, 1992; Stachel *ve ark.*, 1987; de la Riva *ve ark.*, 1998). *VirA*, *VirG* ve *VirF* operonları tek gene sahipken, *VirE*, *VirC* ve *VirH* operonları ikiye gen taşımaktadır. Öte yandan, *VirD* dört, *VirB* ise 11 gen içermektedir. *VirA* ve *VirG* konstitütif (daima aktif) operonlardır (de la Riva *ve ark.*, 1998).

VirA ve *VirG* operonları *vir* genlerinin aktivitelerini yönlendiren pozitif bir düzenleyici sistemini kodlamaktadır (Stachel ve Zambryski, 1986a). *VirA* geninin üretmiş olduğu hücre içi membran proteini yaralanmış bitki hücrelerinin salgıladığı fenolik bileşikler tanıyarak onlarla bağlantı kurar (Stachel ve Zambryski, 1986a; Zambryski, 1992). Daha sonra *VirA* geni, muhtemelen protein fosforilasyonu ile bu bilgiyi *VirG* lokusuna aktarır (Zambryski, 1992). Sonuçta, uyarılan *VirG* proteini ise kendi geni ve diğer *vir* genleri için transkripsiyon işlemcisi görevini üstlenmektedir. *VirD* operonu, T-DNA iplikciğinin rejenerasyonunu sağlarken; *VirC*, bu bölgenin sınırlardan kesilmesinde (Tora *ve ark.*, 1989), *VirB* ve *VirE* operonları ise T-DNA’nın bakteriden bitki hücresine hareketinde etkili olmaktadır (Zambryski, 1992). *VirH* operonunun T-DNA transferinde gerekli olmadığı bildirilmekle birlikte, bu lokusun kodladığı enzimlerin enfeksiyon sırasında bitkinin salgılamış olduğu bakteriyosidal ve bakteriyostatik bileşiklere karşı bakteriyi koruduğu belirtilmektedir (Zambryski, 1992). Farklı Ti plazmidlerinde *VirA* ve *VirG* genlerinin uzunlukları ve kodlamış oldukları proteinlerin büyüklükleri Tablo 15.2’de verilmiştir.

15.3.3. Kromozomal genler

Agrobacterium bakterisinin kendi kromozomu üzerinde bulunan dört adet lokus (Şekil 15.3) [*chvA*, *chvB*, *pseA* (*exoC*) ve *attR*]; bakterinin bitki hücrelerine tutunması, yaralanmış bitki dokularında bakterinin çoğalması ve Ti plazmidini üzerinde bulunan *vir* genlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Kado, 1991; Douglas *ve ark.*, 1985). Bunlardan, büyüklüğü 8.5 kb olan *chvB* geninin, β -1,2 glukanın oluşumunda etkili olan 235 kDa’lık bir proteini şifrelediği (Zorreguieta ve Ugalde, 1986); 7 kb büyüklüğündeki *chvA* lokusunun ise β -1,2 glukanın periplazm içerisine taşınması

için gerekli bileşikleri sentezlediği (Cangelosi ve ark., 1989); 3.0 kb'lık *psaA* geninin ise nötr ve asidik yapıdaki önemli hücre dışı polisakkarid bileşiklerinin yapılmasında gerekli olduğu anlaşılmıştır (Thomashow ve ark., 1987; Özcan ve Özgen, 1996).

Tablo 15.2. *VirA* ve *VirG* genlerinin moleküler karakterizasyonu (Kado, 1991).

<i>Vir</i> geni	Ti Plazmid	Opin tipi	Nükleotid dizisi (bp)	Protein (Da)
<i>VirA</i>	pTi15955	oktopin	2486	91.639
	pTiAg162	oktopin	2505	92.443
	pTiA6	oktopin	2487	91.797
	pTiC58	nopalın	2499	91.300
<i>VirG</i>	pTi15955	oktopin	801	29.995
	pTiA6	oktopin	801	30.083
	pTiC58	nopalın	759	28.400

15.4. T-DNA Aktarımının Moleküler Mekanizması

Agrobacterium'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımı 4 ana aşamada gerçekleşmektedir (de la Riva ve ark., 1998): (1) *Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturmaya başlaması, (2) virülens genlerinin uyarılması, (3) T-DNA transferi ve (4) T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonudur. Ri ve Ti plazmidlerinden bitki hücrelerine T-DNA aktarım mekanizması birbirine benzediğinden, bu bölümde sadece Ti plazmidlerinden bitki hücrelerine T-DNA aktarımı üzerinde durulacaktır.

15.4.1. *Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturmaya başlaması

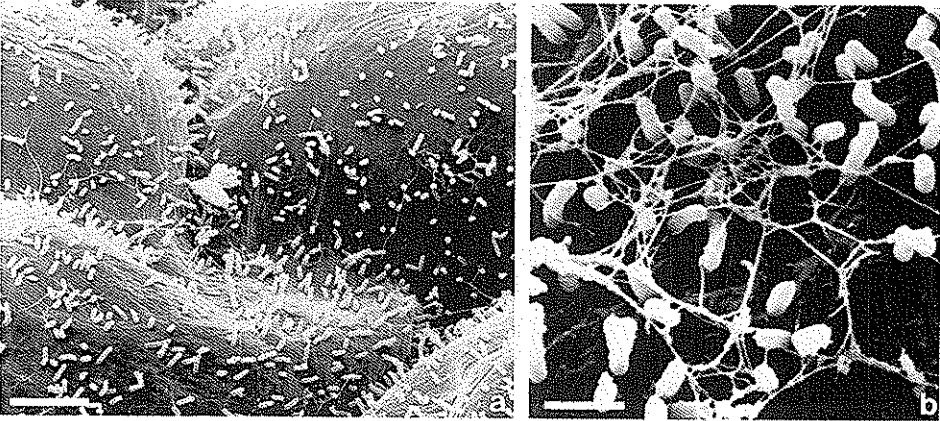
Agrobacterium'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturmaya başlaması tümör oluşumu için gerekli olan ilk aşamadır. Mutasyon çalışmaları sonucunda, bitki hücre duvarına tutunma kabiliyetini yitiren mutant bakterilerin, tümör oluşturma kapasitelerini de yitirdikleri gözlenmiştir (Thomashow ve ark., 1987; Bradley ve ark., 1997). *Agrobacterium* hücrelerinin yüzeylerindeki polisakkaritlerin bitki hücrelerine tutunmada önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Reuhs ve ark., 1997; Bradley ve ark., 1997). İnokulasyondan önce bitki dokuları virulent hatların solüsyonlarından elde edilen lipopolisakkaritlerle muamele edildikleri zaman bakteri tutunması engellenmektedir (Whatley ve Sprent, 1977). Polisakkarit sentezi için 20 kb büyüklüğündeki kromozomal *attR* lokusuna ihtiyaç duyulmaktadır. Bu lokus bakterinin bitki hücrelerine tutunması için gerekli olan genleri taşımaktadır (de la

Riva ve ark., 1998). *AtzR* lokusundaki mutasyonlar bitki hücrelerine tutunmasını ve asidik polisakkaritlerin oluşumunu engellemektedir (Gelvin, 2000).

Bakteri hücre duvarına tutunduktan sonra bakteri tarafından selüloz lifleri sentezlenmekte ve böylece bitki hücre duvarında çok sayıda bakteri yığılması gözlenmektedir (Şekil 15.4) (Sangwan ve ark., 1992; Matthysse, 1995). Laboratuvar şartlarında yapılan inokulasyonlarda tümör oluşumu için selüloz üretimine gerek duyulmamasına rağmen, doğal şartlarda bakterinin hücre duvarına tutunması için gerekli olabilmektedir. Çünkü, selüloz üretmeyen bakteri hatları yabancı hatlara göre bitki yüzeyinden daha kolay yıkanmaktadır (Matthysse, 1983; Gelvin, 2000).

Kromozomal *chuA*, *chuB* ve *pscA* virülens genlerinin β -1,2 glukan ve diğer şekerlerin sentezlenmesinde ve dolaylı olarak bakterinin tutunmasında rol aldığı belirtilmektedir (Zorreguieta ve Ugalde, 1986; Cangelosi ve ark., 1989; Thomashow ve ark., 1987). Bu genlerde meydana getirilen mutasyonların bakteri tutunmasını etkilediği görülmüştür (Douglas ve ark., 1982).

Agrobacterium enfeksiyonunun sadece düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşikleri salgılayan, yaralanmış veya hızlı bölünen süspansiyon hücreleri ile *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı duyarlı bitki hücrelerinin bulunması durumunda gerçekleşebildiği bilinmektedir. Bakteri yaralanmış bitki dokularının hücre duvarlarına tutunmakta ve bu olayda bitki hücre yüzeylerinde bulunan proteaz-duyarlı moleküllerin etkili olduğu belirtilmektedir (Neff ve ark., 1987). Ancak, bu bitkisel proteinlerin bakteri tutunmasındaki olası etkileri genetik analizlerle henüz gösterilmemiştir (Gelvin, 2000).



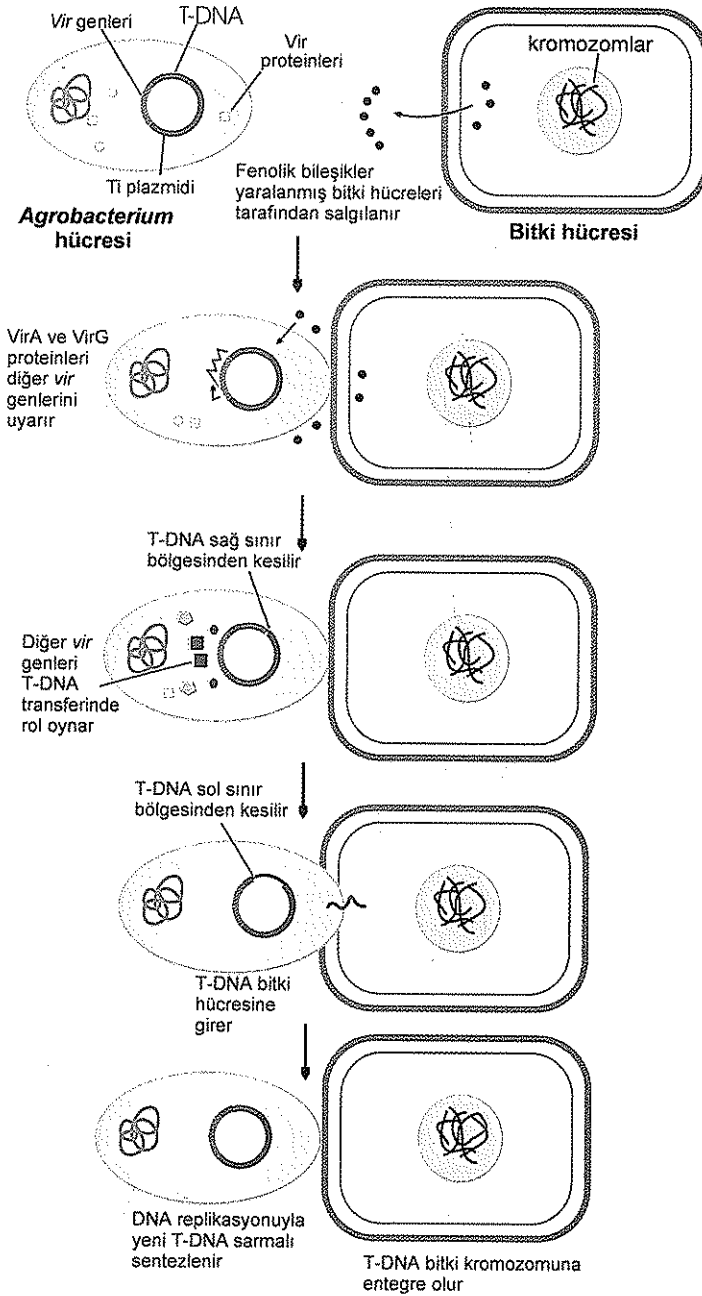
Şekil 15.4. *A. tumefaciens* (p35-GUS-INT)'in *Arabidopsis* kotiledon hücrelerine tutunması ve koloni oluşturmalarının elektron mikroskobu altında görünümü. (a) Enfeksiyondan 12 saat sonraki görünüm (x6000, bar = 2.5 μ m). (b) Enfeksiyondan 48 saat sonra çok sayıda bakteri yığılması ve selüloz liflerinin oluşması (x15000, bar = 1 μ m) (Sangwan ve ark., 1992'den değiştirilerek).

15.4.2. Virülens genlerinin uyarılması

Bakteri bitki hücre duvarına tutunduktan sonra, yaralanmış bitki hücrelerinden salgılanan fenolik bileşikler, *Agrobacterium*'un algılamasıyla T-DNA aktarım işlemi başlatılır (Şekil 15.5). Normalde bitkilerde fitoaleksin ve lignin biyosentezinde rol aldığı tahmin edilen asetosrington (AS) gibi fenolik bileşikler (Gelvin, 2000), bakteri hücrelerine girerek *vir* genlerini uyarmaktadır (Stachel ve ark., 1985; Leroux ve ark., 1987). Fenolik bileşiklerle birlikte bu uyarılma işleminde belirli monosakkaritler de rol oynamaktadır (de la Riva ve ark., 1998). Fenolik bileşikler bitki türleri ve dokuları arasında farklılık göstermektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992). 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 (Spencer ve Towers, 1988; Song ve ark., 1991a). Buğday süspansiyon hücrelerinde ise *vir* genlerini uyarıcı olarak etil ferulat salgılanmaktadır (Messens ve ark., 1990). 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 (Schafer ve ark., 1987; Sheikholeslam ve Weeks, 1987). Yeterli fenolik bileşik bulunmadığı durumlarda, besin ortamlarındaki şeker konsantrasyonunun yüksek olması gerekmektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992). Bitki besin ortamında bulunan yüksek oranlardaki inositol ve katabolize olmayan 2-deoksi-*d*-glikoz ve 6-deoksi-*d*-glikoz gibi şekerler *vir* genlerinin aktiviteğini artırdığı bildirilmektedir (Shimoda ve ark., 1990; Song ve ark., 1991b).

Farklı Ti plazmidlerinin *vir* sistemleri benzer olmakla birlikte, optimum *vir* uyarımı için istekleri farklı olabilmektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992). Örneğin, optimum uyarılma için oktopin ve leusinopin tipi plazmidler, nopalin ve sukkinamopin tipi plazmidlerden daha düşük pH düzeylerine ihtiyaç duymaktadırlar (Turk ve ark., 1991). Yine, LHR hatlarının *vir* sistemleri sadece düşük miktarlardaki AS ile uyarılırken, süpervirulent Bo542 leusinopin hattını uyarmak için daha yüksek oranlarda AS'a ihtiyaç duyulmaktadır (Hooykaas ve Schilperoort, 1992). Optimum T-DNA aktarımı için besin ortamının pH'sı 5-6, sıcaklık ise 20-30 °C arasında olmalıdır (Turk ve ark., 1991; Hooykaas ve Schilperoort, 1992). 32 °C'den daha yüksek sıcaklıklar *vir* genlerinin ifadelerini engellemektedir (Jin ve ark., 1993). *In vitro* ko-kültivasyon çalışmaları genellikle 25 °C'de yürütülmektedir. Öte yandan, Dillen ve ark. (1997) yaptıkları bir *in vitro* çalışmasında en yüksek oranda T-DNA aktarımını ko-kültivasyon sıcaklığının 22 °C olduğunda elde etmişlerdir.

Agrobacterium bakterisinin hücre zarı içerisinde lokalize olan algılayıcı/sensör VirA proteini (91.6 kDa) yaralanmış hücre tarafından salgılanan sinyal proteinlerini, yani fenolik bileşikler yakalar (Pan ve ark., 1993). VirA proteini, bir priplazmik ve iki transmembran (TM1 ve TM2) olmak üzere üç bölge (domain)'den oluşmaktadır



Şekil 15.5. Yaralanmış bitki hücreleri tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin *vir* genlerini uyarması ve bitki hücresine T-DNA transferi (Watson ve ark., 1996'dan değiştirilerek).

(de la Riva ve ark.,1998). Priplazmik kısım monosakkaritlerin yakalanmasında rol oynarken, TM1 ve TM2 algılama ve sinyal verme görevini üstlenmektedir (Chang ve Winans, 1992; Parkinson, 1993). Kinaz TM2 bölgesi yaralanmış bitki hücrelerinden salgılanan sinyal proteinleri algılayarak fosforilasyonla VirA'nın uyarılmasında önemli rol almaktadır (Huang ve ark., 1990). *Vir* genlerinin uyarılmasında, önemli bitki hücre duvarı polisakkarit monomerleri olan D-galakturnonik ve D-glukoronik asit gibi asidik monosakkaritlerin AS ile birlikte rol oynadığı bildirilmektedir (Shimoda ve ark. 1990). Ancak, bu şeker-uyarılmasının gerçekleşebilmesi için kromozomal ChvA ve periplazmik VirA domain proteinlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Beijersbergen ve Hooykaas, 1993). Monosakkaridin ChvA proteinine bağlanmasından sonra, bu kompleksin VirA proteininin periplazmik VirA bölgesi ile ilişkiye geçtiği ve sonuçta VirA proteininin aktivasyonunun gerçekleştiği bildirilmektedir (Beijersbergen ve Hooykaas, 1993).

Uyarılan VirA kendi fosfatını sitoplazmik bir DNA bağlanma proteini (binding protein) olan VirG proteinine aktarma kapasitesine sahiptir. VirA tarafından fosforilasyona uğrayan VirG daha sonra diğer *vir* genlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde transkripsiyonal faktör olarak görev yapar (Pan ve ark., 1993; Jin ve ark., 1990; de la Riva ve ark., 1998). Vir G proteininin C terminal bölgesi DNA bağlanma aktivitesinden sorumlu iken, N terminali fosforilasyon bölgesi olup, VirA sensör bölgesi ile homoloji göstermektedir (de la Riva ve ark., 1998). VirG proteininin *vir*-kutularına bağlanmasıyla *vir* genlerinin ifade edildikleri düşünülmektedir. Ayrıca, fosforilize olan VirG proteininin RNA polimeraz ile daha etkili bir şekilde ilişkiye geçtiği ve RNA polimerazın *vir* promotorlarını tanımasını kolaylaştırdığı veya kapalı DNA'yı açık DNA kompleksine dönüştürdüğü belirtilmektedir (Beijersbergen and Hooykaas, 1993). VirG proteini tarafından uyarılan *vir* genlerine ait proteinlerin önemli bir kısmı Ti plazmidinden bitki hücresine T-DNA aktarımında doğrudan görev almaktadır. Tablo 15.3'de *vir* genleri tarafından kodlanan proteinlerin *Agrobacterium* ve bitki hücrelerindeki fonksiyonları sıralanmıştır (Gelvin, 2000).

15.4.3. T-DNA transferi

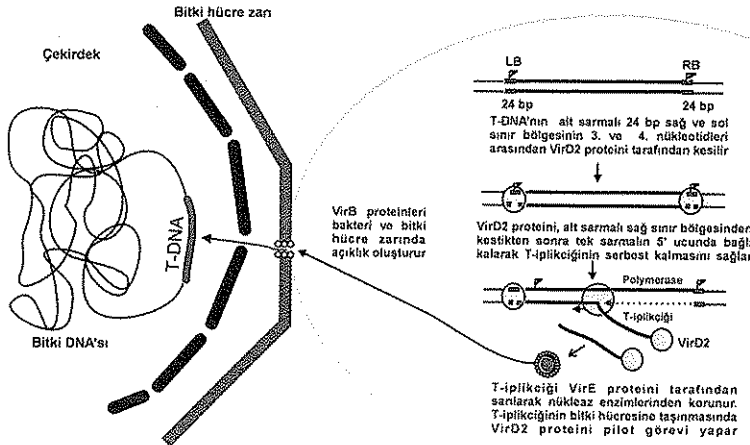
Vir genlerinin uyarılmasının sonucunda T-DNA'nın alt sarmalına homolog, tek sarmal bir DNA molekülü (T-iplikciği) üretilir (Şekil 15.6). T-DNA sınırları içerisine yerleştirilen herhangi bir DNA parçası tek sarmal olarak bitki hücrelerine aktarılır ve bitki genomuna entegre olur. T-iplikciğinin sentezi, T-DNA'nın alt sarmalının her iki 24 bp sınırının 3. ve 4. nükleotid dizileri arasındaki belirli bir noktada çentik oluşmasıyla başlar (Şekil 15.6.) (Stachel ve Zambryski, 1986b). Bu işlem, VirD1 ve VirD2 proteinlerinin T-DNA sınır bölgelerindeki nükleotid dizilerini belirli noktalardan tanıyan endonükleaz etkisi tarafından gerçekleştirilmektedir (Zambryski, 1992). VirD1 proteininin 24 bp sınır dizilerinde

DNA'yı gevşettiği, VirD2'nin ise çentik oluşturduğu bildirilmektedir (McLean *ve ark.*, 1993). VirC operon ürünlerinin ise T-DNA sınır kesimini hızlandırdığı gösterilmiştir (Tora *ve ark.*, 1989; Zambryski, 1992; Stachel *ve ark.*, 1987). Kesilen noktalar, tek sarmal T-DNA bölgesi için başlama ve bitiş yerleri olarak kullanılmaktadır (Şekil 15.6). Sağ sınır bölgesinde yapılan mutasyonlar T-DNA transferini tamamen engellerken, sol sınırda yapılan mutasyonlar sadece gen aktarım frekansını azaltmaktadır. Bu da, T-iplikcik sentezinin sağ sınırdan başladığını, 5'→3' yönünde devam ettiğini ve sol sınırın yokluğunda dahi sentezin sonuçlandığını göstermektedir (Hille *ve ark.*, 1983; de la Riva *ve ark.*, 1998).

Tablo 15.3. *Vir* genleri tarafından kodlanan proteinlerin *Agrobacterium* ve bitki hücrelerindeki fonksiyonları (Gelvin, 2000).

Vir Proteini	<i>Agrobacterium</i> 'daki fonksiyonu	Bitkideki fonksiyonu
VirA	Fenolik algılayıcı	-
VirG	Fenolik tepki regülatörü	-
VirB1- 11	T-pilusunun sentezi ve oluşumu (VirB prepropilini kodlamaktadır)	-
VirC1	Muhtemel "overdrive" bağlanma proteini; T-DNA transferinin artırılması (?)	-
VirD1	<i>In vivo</i> T-DNA prosesi ve çift sarmal T-DNA'nın sınırlarında <i>in vitro</i> çentik açılması	-
VirD2	T-DNA sınır-spesifik endonükleaz; muhtemelen T-iplikcikliğini bitkiye taşıyan "pilot proteini"	T-iplikcikliğin 5' ekzonukleolitik degradasyondan korunması ve bitki genomuna entegrasyonu
VirE1	VirE2'nin <i>Agrobacterium</i> 'dan taşınması ve korunması	-
VirE2	<i>Agrobacterium</i> 'da muhtemel T-kompleksinin oluşumu	Bitkide muhtemel T-kompleksinin oluşumu; T-iplikcikliğin nükleolitik degradasyondan korunması, nüklear hedeflenmesi ve oluşan nüklear açıklık kompleksinden geçişi
VirF	?	Konukcu duyarlılık faktörü; bitki hücresinin bölünme çemberinin düzenlenmesi için Skp1 proteinleriyle muhtemel etkileşim
VirH	Muhtemel sitokrom p450 enzimi	-

Nopalin tipi plazmidler sadece bir T-DNA bölgesi taşıdığından dolayı tek T-iplikliği sentezlenir. Öte yandan, daha karmaşık oktopin Ti plazmidler, dört ayrı T-DNA sınır dizileri tarafından çevrelenen üç ayrı T-DNA bölgesi taşıdığından, altı olası T-iplikliği üretirler (McLean *ve ark.*, 1993). VirD2 proteini, alt sarmalı sağ sınır bölgesinden kesikten sonra tek sarmalın 5' ucunda bağlı kalarak (Ward ve Barnes, 1988; Hooykaas ve Schilperoort, 1992) T-iplikliğinin serbest kalmasını ve 5'→3' yönünde oluşan ekzonukleolitik degradasyonu engellemektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992). Serbest kalan T-iplikliği, VirE operonunun ikinci açık okuma bölgesi (orf) tarafından kodlanan 69 kDa'luk tek sarmal DNA-bağlanma proteini VirE2 ile kaplanarak nükleaz enzimlerinin olumsuz etkilerinden korunur (Şekil 15.6) (Christie *ve ark.*, 1988; Hooykaas ve Schilperoort, 1992). Ayrıca, VirE2 proteini T-iplikliğini sararak, kompleksin çapını 2 nm'ye kadar düşürmekte ve bu da hücre zarı açıklıklarından geçişini kolaylaştırmaktadır (de la Riva *ve ark.*, 1998). T-iplikliğinin bitki hücrelerine aktarılmasında, VirD2 proteininin pilot görevi yaptığı bilinirken (Herrera *ve ark.*, 1990), bu işlemde VirD4 proteinine de ihtiyaç duyulmaktadır (Firth *ve ark.*, 1996). VirB proteinlerinin önemli bir kısmı bakteri ve bitki hücre zarında T-kompleksinin geçebileceği büyüklükte açıklık oluştururken (Nester ve Gordon, 1988), T-DNA transferinde gerekli olan temel elementleri de oluşturmaktadırlar (Berger ve Christie, 1994). T-DNA transferinde mutlak gerekli olmayan iki operondan VirF'nin, tek sarmal T-DNA kompleksinin taşınmasında ve bitki genomunu hedeflemesinde görev aldığı tahmin edilmektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992; de la Riva *ve ark.*, 1998). VirH operonu, VirH1 ve VirH2 proteinlerini kodlayan iki genden oluşmakta ve bakteri gelişimini etkileyen belirli bitki bileşiklerini parçalayarak gen transfer frekansını artırmaktadır (Kanemoto *ve ark.*, 1989). Bakteriden bitki hücresine T-DNA aktarımı sırasında oluşan moleküler olaylar Şekil 15.6'da şematize edilmiştir.



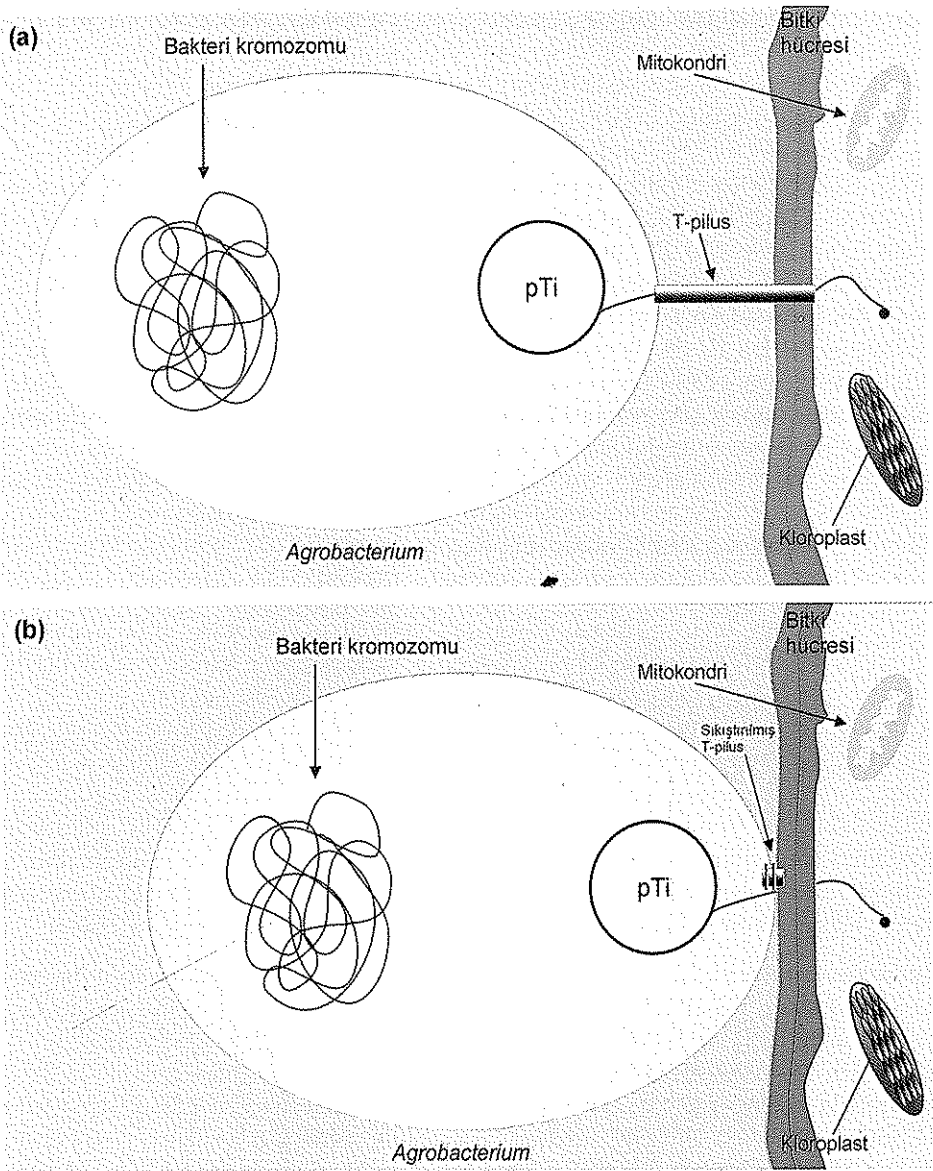
Şekil 15.6. *Agrobacterium*'dan bitki hücresine T-DNA aktarımının moleküler mekanizması (Özcan ve Özgen, 1996'dan değiştirilerek).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine T-kompleksinin aktarılmasında yukarıda belirtilen mekanizma haricinde değişik teoriler ortaya atılmıştır. Bunlardan ilkinde; "T-pilus" olarak adlandırılan bir nükleoprotein kompleksinin T-DNA aktarımında köprü görevi yaptığı belirtilmektedir (Şekil 15.7a) (Lai ve Kado, 1998; Zupan ve ark., 1998; Lai ve Kado, 2000; Kado, 2000). T-pilus 10 nm çapında olup, ortasında yaklaşık 2 nm çapında bir lumen (boşluk) bulunmaktadır (Kado, 2000). T-pilus'un oluşumu için 11 adet VirB proteinine de ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Lai ve ark., 2000). Muhtemelen, T-pilus'unun moleküler bir şırınga görevi yaparak T-kompleksini bitki hücre sitoplazmasına enjekte ettiği bildirilmektedir (Şekil 15.7a). Diğer bir teoriye göre de; T-pilus kompakt bir yapıya dönüşerek, bakteri hücrelerini bitki hücrelerine doğru çekmekte ve bakteri ile bitki hücre zarı arasında gerçekleşen füzyondan sonra, VirB proteinleri tarafından oluşturulan gözenekten T-kompleksi bitki hücrelerine aktarılmaktadır (Şekil 15.7b)(Kado, 2000).

15.4.4. T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu

Agrobacterium'dan bitki hücrelerine T-DNA transferinin en az anlaşılan kısmı belki de T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonudur. Genellikle, bitki hücrelerine aktarılan T-DNA genlerinin geçici (transient) ifade seviyesi, kararlı (stabil) olarak entegre olan T-DNA'larından daha yüksek olmaktadır. Bu ise, bitki çekirdeğine aktarılan T-DNA'ların önemli bir kısmının stabil olarak bitki genomuna entegre olmadığını göstermektedir (Janssen ve Gardner, 1990; Nam ve ark., 1997). T-DNA bitki hücre çekirdeğine tek sarmal olarak girmekte ve kromozomlarla zorunlu bir rekombinasyon sonucunda birleşmektedir (Gelvin, 2000). T-DNA çekirdeğe girdikten sonra, bir veya birkaç kopya halinde rastgele (Bevan ve Chilton, 1982), bitki kromozomlarıyla birleşmekte ve bu birleşmede kromozomların aktif kısımları tercih edilmektedir (Draper ve ark., 1988; Binns, 1988; Koncz ve ark., 1992).

Bitki hücresi içerisinde tek sarmal T-DNA kompleksinin çekirdek zarını geçerek kromozomlara yönelmesinde en önemli görevi VirD2 ve VirE2 proteinleri üstlenmektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992; de la Riva ve ark., 1998). T-DNA'nın kromozomlarla birleşme mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ortamdaki enzimlerin bu olayda önemli rol oynadıklarına ilişkin bulgular vardır (Kado, 1991). Gen aktarımı yapılmış (transgenik) bitkilerin analizleri sonucunda, T-DNA'ların %70'inde hiç bir değişikliğin olmadığı belirlenmiştir (Ream, 1989). Kromozomlarla bütünleşme genellikle sağ sınırdaki belirli bir noktadan gerçekleşirken, sol sınırda bu işlemin değişik noktalardan olabildiği saptanmıştır (Slightom ve ark., 1985; Yadav ve ark., 1988). Bu ise, T-DNA'nın kromozomlarla birleşme işleminin sağ sınırdan başladığını ve karmaşık birkaç aşamada tamamlandığını göstermektedir (Özcan ve Özgen, 1996).



Şekil 15.7. *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımında ortaya çıkan "T-pilus" teorileri. (a) T-kompleksinin T-pilus aracılığıyla bitki hücresine enjekte edilmesi. (b) T-pilus'un kompakt bir yapıya dönüşerek, bakteri hücrelerini bitki hücresine doğru çekmesi ve VirB proteinleri tarafından oluşturulan gözenekten T-kompleksinin bitki hücrelerine aktarılması (Kado, 2000'den değiştirilerek).

de la Riva *ve ark.* (1998)'na göre;

1. VirD2'nin bağlı bulunduğu T-iplikciği ile bitki DNA'sında mikro-homolog bölgeler açılmakta ve T-DNA'nın 3' ucu veya bu uca yakın bölgeler bitki DNA'sında buldukları homolog bölgelerle ilk teması (sinapsis) kurmaktadır.
2. Bitki DNA'sında 3'→5' yönünde yapısal açıklık oluşmakta ve bu açıklığın 3' ucu endonükleaz enzimleri tarafından kesilerek, T-iplikciğinin VirD2 proteinine bağlanan 5' ucundaki ilk nükleotid üst sarmal bitki DNA'sıyla 5'→3' yönünde eşleşmektedir.
3. T-iplikciğinin 3' ucundaki fazla bölgeler ve açılan bitki DNA parçası endonükleaz veya 3'→5' ekzonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır.
4. T-iplikciğinin VirD2'ye bağlanan 5' ucu ve diğer 3' ucu, kesilen bölgeden bitkinin alt sarmal DNA'sı ile birleşmektedir.
5. T-iplikciğinin 3'→5' yönündeki bitki DNA sarmalına entegrasyonu tamamlandıktan sonra, bitki DNA'sı onarılmakta ve T-iplikciği replikasyonla çift sarmal DNA'ya dönüşmektedir (Binns, 1988).

Bazı araştırmalarda birleşme sırasında T-DNA'nın sınırlarında yeni düzenlemelerin olduğu ve eksik T-DNA'ların ortaya çıktığı belirtilmektedir (Ream, 1989). 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 (Özcan ve Özgen, 1996).

15.5. Ti Plazmidlerinin Bitkilere Gen Aktarımında Kullanılması

Onkogenik Ti plazmidleri ile T-DNA aktarımı yapılan bitki hücrelerinde, kontrolsüz fitohormon üretimi meydana geldiğinden, tümör dokularından morfolojik olarak normal transgenik bitkilerin elde edilmesi oldukça güç olmakta, bitki rejenerasyonu sağlansa bile; oksin ve sitokininlerin etkisindeki hücrelerden anormal bitkiler elde edilmektedir (Klee ve Rogers, 1989). Öte yandan, belirli bitki türlerinde Ri plazmidlerinin oluşturdukları saçak köklerden normal transgenik bitkiler üretilmektedir (Tepfer, 1990). Ancak, Ri plazmidleri ile kültür bitkilerine gen aktarımı oldukça sınırlı kalmıştır (Özcan ve Özgen, 1996). Buna karşın son yıllarda sekonder metabolit üretimi için saçak kök kültürlerinin oluşturulması daha çok tercih edilmektedir. Burada amaç bağımsız olarak bitki köklerinin fermentörlerde hormon içermeyen ortamlarda kısa sürede çoğaltılması (Babaoğlu *ve ark.*, 2001) (Şekil 15.1f, i) ve bu köklerden farklı tıbbi amaçlı, etkili maddelerin saflaştırılmasıdır (Sökmen ve Gürel, 2001).

Daha önce de belirtildiği gibi, gen aktarımı için T-DNA'nın sağ sınır nükleotid dizisi ile *vir* ve *chl* genleri mutlak gereklidir. Öte yandan, T-DNA bölgesinde bulunan ve opin sentezini sağlayan genler ile tümör oluşumuna neden olan *onc* genlerinin T-DNA'nın aktarımında işlevleri bulunmamaktadır. Bu genlerin T-DNA bölgesinden kesici enzimler ile çıkartılarak yerlerine yabancı genlerin klonlanması gen aktarımını kesinlikle etkilemediği görülmüştür. Ancak, *onc* genlerinin aktarıldığı materyal *in vitro* koşullarında fitohormonlara gereksinim duyulmaksızın gelişebildiği için, fitohormon genleri transgenik materyalin belirlenmesinde oldukça faydalı işaretlerdir. Non-onkogenik (tümör oluşturmeyen) plazmidler aracılığıyla T-DNA aktarımı yapılmış bitki hücreleri, normal hücreler gibi davranmaktadırlar. T-DNA aktarımı, son derece düşük oranda gerçekleştiği için gen aktarılmış hücrelerin ve dolayısıyla transgenik bitkilerin normallerinden ayrılması hemen hemen imkansız olmaktadır. Gen aktarılmış hücrelerin ve bunlardan gelişen sürgünlerin seçimi için seçici işaret (markör) genleri geliştirilmiştir (bkz. Bölüm 16). Bu markör genler, bitki hücre ve dokularına bazı antibiyotik veya herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırmaktadırlar. Antibiyotik ya da herbisitlerin bulunduğu doku kültürü ortamlarında, normal bitki hücreleri antibiyotik ve herbisitlere karşı duyarlı olmasından dolayı gelişememekte, sadece seçici işaret genlerinin aktarıldığı bitki hücreleri gelişip çoğalabilmektedir (Özcan ve Özgen, 1996; Babaoğlu ve ark., 2000a). Dolayısıyla, gen aktarımı son derece düşük frekansta gerçekleşse dahi, gen aktarımı yapılan hücre ve dokulardan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir.

Seçici yapıdaki işaret genleri çoğunlukla bakteriyel kökenli olup, bunlar T-DNA bölgesinden veya diğer kaynaklardan elde edilen promotor ve terminatör baz dizileri arasına yerleştirilerek bitkilerde fonksiyonel duruma getirilmiştir (Özcan ve Özgen, 1996). En yaygın kullanılan promotor bölgesi ise karnibahar mozaik virüsünden izole edilen konstitütif CaMV 35S promotorudur. Son yıllarda kuşkonmaz (*Asparagus officinalis*) bitkisinden izole edilen AoPR1 promotorunun *gus* raportör genine bağlanmasıyla yapılan çalışmalarda, GUS aktivitesi sadece transgenik hücre ve dokuların seçimi safhasıyla sınırlandırılmıştır (Özcan ve ark., 1993; Firek ve ark., 1993). Bu işaret genlerden en fazla kullanılanları ise; bakteriyel Tn5 transpozonundan elde edilen (Bevan ve ark., 1983) ve kanamisine dayanıklılığı sağlayan neomisin fosfotransferaz (*npII*); *E. coli*'den izole edilen (Waldron ve ark., 1985) ve higromisine dayanıklılığı sağlayan higromisin fosfotransferaz (*hpt*); farelerden elde edilen (Eichholtz ve ark., 1987) ve methotreksata dayanıklılığı sağlayan dihidrofolat reduktaz (*dhfr*); *Streptomyces hygrosopicus*'dan elde edilen (De Block ve ark., 1987) ve bialaphosa karşı dayanıklılığı sağlayan *bar* genleridir. Seçici işaret genlerinin dışında, gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların gözlenebilmesini sağlayan raportör işaret genleri de vardır ki, bunların en önemlisi β -glukuronidaz (*gus*) genidir (Jefferson, 1987; Jefferson ve ark., 1987). *Gus* geninin aktarıldığı bitki hücre ve dokuları X-gluc ile muamele edildikleri zaman histokimyasal olarak mavi renge dönüşmektedir (Jefferson, 1987; Özcan, 1993; Gürel ve Kazan, 1999). Florometrik olarak GUS proteini aktivitesi de ölçülebilmektedir (Gartland ve ark.,

1995). Son yıllarda ateş böceği lusiferaz (*luc*) ve denizanası yeşil-flerosan protein (GFP) genleri de raportör gen olarak bitkilerde kullanılmaya başlanmıştır (Baruah-Wolff ve ark., 1999; Elliott ve ark., 1999; Kaeppler ve ark., 2000). Bitkilere gen aktarımında kullanılan işaret genleri hakkında ayrıntılı bilgi bölüm 16'da verilmiştir.

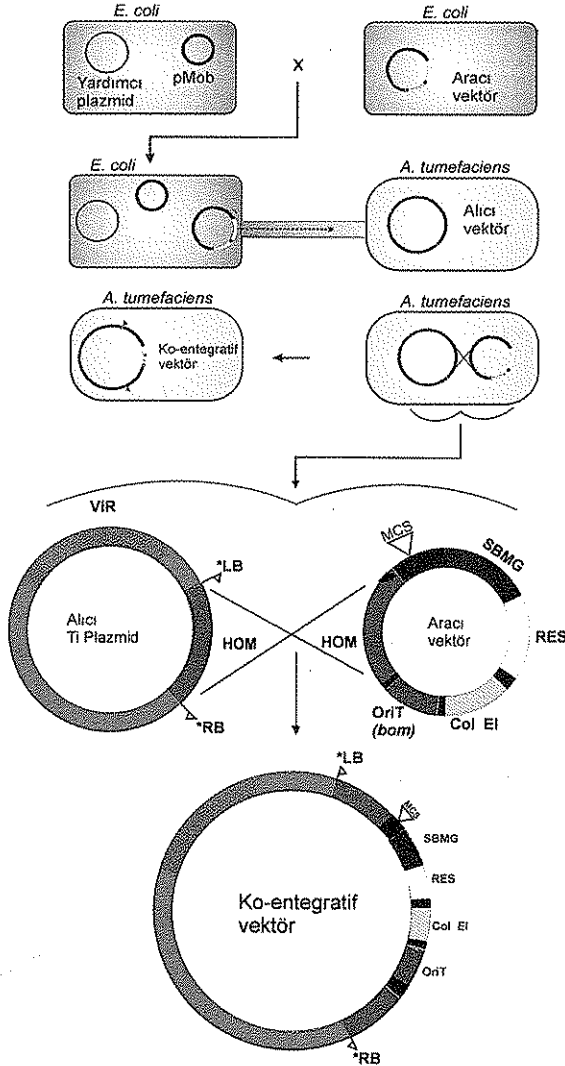
Tarımsal özelliklerini iyileştirmek amacıyla bitkilere aktarılmak istenen gen ya da genler ile işaret genlerinin doğrudan Ti plazmidlerinin T-DNA bölgesine klonlanması pratikte pek mümkün olmamaktadır. Bu durum, Ti plazmidlerinin büyüklüklerinden ve düşük kopya sayılarından kaynaklanmaktadır. Karşılaşılan 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 (Hinchey ve ark., 1994).

15.5.1. Ko-entegratif (*cis*) vektörler

Bitki hücrelerine T-DNA aktarım işleminde T-DNA bölgesinde bulunan ve tümör oluşumu ile opin sentezine neden olan genlerin rol almadıkları ve iki T-DNA sınırı arasına yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının (genlerin) bitkinin genomuna kolayca aktarılabildiği daha önce açıklanmıştır. Ko-entegratif vektör (plazmid) sisteminde, sınır bölgeleri kalacak şekilde Ti plazmidinin T-DNA bölgesinin büyük bölümü çıkartılarak (bu vektöre alıcı vektör adı verilmektedir) yerine, küçük bir *E. coli* klonlama plazmidine (aracı) homolog yapıda bir DNA parçası yerleştirilmektedir (Armitage ve ark. 1988; Walkerpeach ve Velten, 1994). Aracı vektörlerin önemli bir kısmı *E. coli*'nin ColE1 plazmidinden türetilmiştir. Bu aracı plazmid sadece *E. coli* içerisinde replike olabilme yeteneğine sahip olup, *Agrobacterium* içerisinde replike olmaması gerekmektedir. Bitkilere aktarılabilecek genler, işaret geni ile birlikte önce bu aracı plazmidlere *E. coli* içerisinde klonlanırlar. Daha sonra aracı plazmidler, alıcı (reseptör) vektörün bulunduğu *A. tumefaciens*'e aktarıldıklarında, tek homolog rekombinasyon ile Ti plazmidinin T-DNA bölgesine entegre olurlar (Özcan ve Özgen, 1996). Standart aracı vektörler şu özellikleri taşırlar (Walkerpeach ve Velten; 1994):

1. Bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolayca klonlanabileceği klonlama bölgesi.
2. *E. coli* ve *Agrobacterium*'da aktif olan seçici bakteriyel işaret geni.
3. Bitkide işlev yapabilen seçici işaret geni.
4. *E. coli* içerisinde fonksiyonel olan, ancak *Agrobacterium*'da etkili olmayan bir replikasyon orijini.

Aracı vektör *Agrobacterium* içerisine konjugasyonla aktarılmakta ve T-DNA bölgesine stabilize olarak hibrid (ko-entegratif) Ti plazmidler elde edilmektedir (Şekil 15.8) (Armitage ve ark., 1988). Ko-entegratif vektörü taşıyan *Agrobacterium* hücrelerinin seçimi ise, aracı vektörün taşıdığı olduğu seçici bakteriyel işaret



Şekil 15.8. *E. coli* içerisinde bulunan aracı vektörün konjugasyonla (tri-parental mating; *bom/mob* fonksiyonları kullanılarak) *Agrobacterium* içerisine aktararak, alıcı vektörün T-DNA bölgesine entegre olması sonucunda ko-entegratif vektörün elde edilmesi. İlk önce yardımcı ve pMob plazmidleri aracı vektörün bulunduğu *E. coli* içerisine aktarılır. Daha sonra yardımcı plazmid, pMob plazmidinin sentezlemiş olduğu trans-hareketli ürünleri kullanarak aracı vektörü *Agrobacterium* içerisine aktarır. Sonuçta, aracı vektör homolog rekombinasyonla alıcı Ti plazmidinin T-DNA bölgesine entegre olur. HOM: homolog rekombinasyon bölgeleri; LB, RB: sol ve sağ sınırlar; MCS: çoklu klonlama bölgesi; SBMG: seçici bitki işaret geni; RES: bakteri hücrelerinde vektörün seçimi için gerekli olan antibiyotik direnci kodlayan işaret geni; OriT: vektörlerin konjugasyonla transferi için gerekli olan transfer orijini ve *bom* bölgesi. Col E1: pCol E1 plazmidine ait ve yalnızca *E. coli* içerisinde plazmid replikasyonunu sağlayan replikasyon orijini (Armitage ve ark., 1988; Walkerpeach ve Velten, 1994'den değiştirilerek).

geninin kodladığı antibiyotiğe dayanıklılık sayesinde olmaktadır. Replikasyon orijini (ColE1) aracı vektörlerin çoğunda aynı olup, *Agrobacterium* içerisinde fonksiyonel değildirler. Aracı vektör *Agrobacterium* içerisinde replike olamadığından, taşıdığı genlerle birlikte alıcı vektörün T-DNA'sına entegre olmaktadır. Öte yandan, alıcı plazmidte bulunan replikasyon orijini hem alıcı Ti plazmidinin, hem de aracı vektörün ve taşıdığı genlerin replikasyonunu sağlamaktadır. Ko-entegratif vektörleri taşıyan *Agrobacterium* bitki hücreleri ile ko-kültüve edildidği zaman, T-DNA bölgesine entegre olan aracı vektör ve dolayısıyla işaret ve tarımsal öneme sahip genler *vir* genlerinin *cis* özelliği ile bitki genomuna aktarılır (Walkerpeach ve Velten; 1994). Seçici işaret geni, bitki hücrelerini antibiyotik veya herbisitlere dayanıklı kıldığından, besin ortamlarına antibiyotik veya herbisitler ilave edilerek sadece gen aktarımı yapılan hücre ve sürgünlerin gelişimi sağlanmış olur.

pGV3860 gibi bazı vektörlerde her iki T-DNA sınır bölgeleri de alıcı Ti plazmidinde bırakılırken, pGV2260 gibi vektörlerde ise 24 bp sınır dizileri aracı vektörde olabilmektedir (Debleare ve ark., 1985). Yine, pTiBS3-SE gibi diğer bazı vektörlerde ise sağ sınır aracı vektöre klonlanırken, sol sınır alıcı Ti plazmidinde kalabilmektedir (Fraley ve ark., 1985; Armitage ve ark., 1988). T-DNA sınır dizilerini hangi vektörde olursa olsun, sonuçta bitkilere aktarılmak istenen genler, alıcı vektör üzerinde T-DNA bölgesi sınır dizileri arasına entegre olmaktadır (Armitage ve ark., 1988).

Elektroporasyon ve kimyasal yöntemler geliştirilmeden önce (hem ko-entegratif hem de binari vektör sisteminde), bitkilere aktarılması istenen genlerin klonlandığı aracı vektörlerin *Agrobacterium*'a aktarılmasında konjugasyon en etkili yöntem olmuştur. Bu türler arası plazmid transfer işlemi geniş konukçu alanına sahip yardımcı plazmidler tarafından etkili bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Yardımcı plazmid, aracı vektör ile aynı *E. coli* içerisinde buluştukları zaman, *trans* olarak kodladığı transfer fonksiyonları sayesinde aracı vektör *Agrobacterium*'a aktarılmaktadır (Şekil 15.8) (Walkerpeach ve Velten; 1994). Yardımcı plazmidin aracı vektörü, etkili bir şekilde *Agrobacterium* içerisine aktarılabilmesi için, aracı vektörün ayrıca *cis*-hareketli ColE1 *bom* (vektörün konjugatif hareket bölgesi) elementini de taşıması gereklidir. *Bom* elementi (*trans* hareketle); aynı aracı vektörde, bakteri genomunda ya da başka bir *E. coli* plazmidinde bulunan ColE1 *mob* (mobiliti) operonu tarafından harekete geçirilir.

Konjugasyonla aracı vektörün *E. coli*'den *Agrobacterium* içerisine aktarılmasında üç-ebeveynli eşleştirme (triparental mating) yöntemi etkili olarak kullanılmaktadır (Van Haute ve ark., 1983; Gürel, 2001). Bu yöntemde; aracı vektörü ve yardımcı + pMob plazmidini taşıyan *E. coli* hatları ile alıcı Ti plazmidini taşıyan *Agrobacterium* hattı uygun antibiyotiklerin ilave edildiği sıvı bakteri besin ortamında çalkalayıcıda bir gece süresince ayrı ayrı büyütülürler. *Agrobacterium*'un büyütülmesi için en uygun sıcaklık 28 °C iken, *E. coli* 37 °C'de büyütülmelidir. Büyüyen üç bakteri kültüründen 100'er µl alınarak karıştırılır ve antibiyotik içermeyen katı bakteri besin ortamı üzerine yayılarak, bir gece boyunca 28 °C'de büyütülür. Daha sonra

gelişen bakteri kültüründen steril bir lup ile bir miktar bakteri alınarak, seçici antibiyotiklerin ilave edildiği katı besin ortamına yayılır ve yine 28 °C'de 2 gün süreyle inkübe edilir. İlave edilen antibiyotikler sayesinde sadece ko-entegratif vektörü taşıyan *Agrobacterium* hücreleri gelişerek koloni oluştururlar.

Üç-ebeveynli eşleştirme sırasında, önce yardımcı ve pMob plazmidleri yüksek frekansta aracı (rekombinant) vektörün bulunduğu *E. coli* içerisine aktarılır (Şekil 15.8). Daha sonra, yardımcı plazmid her üç plazmidin de *Agrobacterium*'a transferini (10^{-4} ve 10^{-5} frekansta) sağlar (Armitage ve ark., 1988). Aracı vektör, alıcı Ti plazmidinin T-DNA bölgesine entegre olurken, diğer plazmidler *Agrobacterium* içerisinde replike olamazlar (Şekil 15.8). Ko-entegratif vektörler oldukça kararlı olmalarına rağmen, istenmeyen DNA parçasının bitkilere geçişi bu sistemin en önemli dezavantajıdır.

15.5.2. İkili (binari/trans) vektörler

Vir bölgesinin *trans*-hareket özelliğinden yararlanarak ikili (binari) vektörler geliştirilmiştir (Özcan ve Özgen, 1996). İkili vektör sistemi, *Agrobacterium* içerisinde birbirinden bağımsız olarak replike olan iki plazmidten oluşmaktadır (Şekil 15.9) (Walkerpeach ve Velten, 1994). Bunlardan ilki; T-DNA bölgesinin tamamının çıkartıldığı ve yalnızca *vir* bölgesini taşıyan Ti plazmid (*vir* helper), diğeri ise T-DNA sınır bölgeleri içerisinde bitkilere aktarılmak istenen genleri taşıyan, manipulasyonu kolay olan, küçük ve hareketli bir (ikili) plazmidtir. T-DNA bölgesi çıkartılan yardımcı Ti plazmidinde bulunan *vir* genleri, *trans*-hareket özellikleri sayesinde ikili vektörde bulunan T-DNA bölgesini bitki hücrelerine aktarmaktadırlar. Yaygın olarak kullanılan yardımcı Ti plazmidler Tablo 15.4'te verilmiştir.

İkili vektör sisteminde, ko-entegratif sistemde olduğu gibi iki plazmid arasında rekombinasyon gerçekleşmemekte ve sadece binari vektör *Agrobacterium* içerisine aktarılmaktadır (Şekil 15.9). Bundan dolayı, transfer oranı daha fazla ve hızlıdır. Ayrıca, ikili vektör bağımsız olarak replike olduğundan dolayı, kopya sayısı Ti plazmidine bağlı değildir. İkili vektörlerin manipulasyonlarının daha kolay olması ve doğrudan gen aktarım tekniklerinde de kullanılmaları nedeniyle, son yıllarda geliştirilen vektörlerin hemen hemen tamamı ikilidir. Bir ikili vektörde bulunan standart özellikler şunlardır (Şekil 15.9) (Walkerpeach ve Velten, 1994):

1. T-DNA içerisinde bulunan ve bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolaylıkla klonlanabileceği bir klonlama bölgesi.
2. Hem *E. coli*, hem de *Agrobacterium*'da fonksiyonel olan replikasyon orijini (örnek: RK2).
3. *E. coli* ve *Agrobacterium*'da aktif olan seçici bakteriyel işaret geni.
4. Bitkide işlev yapabilen seçici işaret geni.

5. İkili vektörün konjugasyonla *Agrobacterium*'a aktarımı için gerekli olan transfer fonksiyonları (örnek: oriV, oriT ve trfA doğrudan DNA aktarımında gerekli değildir).
6. T-DNA sınır bölgeleri (sadece sağ sınır yeterli olabilir).

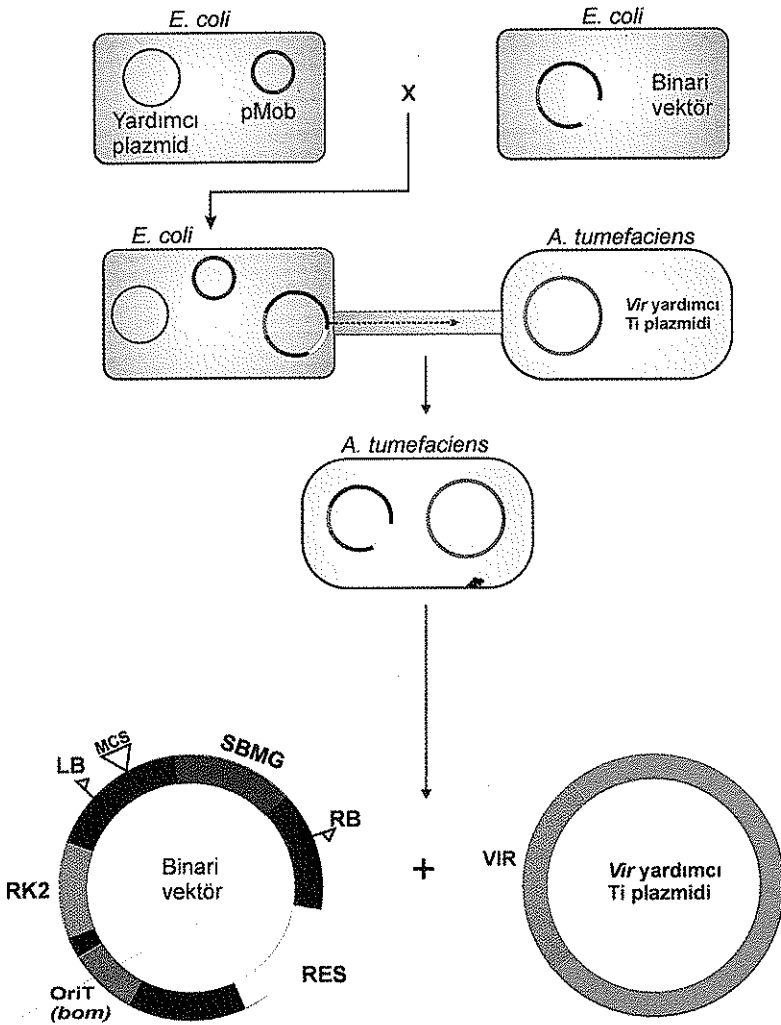
Tablo 15.4. Yaygın olarak kullanılan non-onkogenik yardımcı Ti plazmidleri (Walkerpeach ve Velten, 1994'ten alınmıştır).

Yardımcı Ti plazmidi	Ti plazmidinin kaynağı	Ti plazmidinde bulunan dayanıklılık geni
pAL4404	pTiAch5	yok
pGV3850*	pTiT37	ampisilin
pMP90RK	pTiC58	gentamisin, kanamisin
pEHA101	pTiBo542	kanamisin
pTiBo542ΔT	pTiBo542	yok
pMOG101	pTiB6	spektinomisin
pMOG301	pTiC58	spektinomisin
pEHA105	pTiBo542	yok

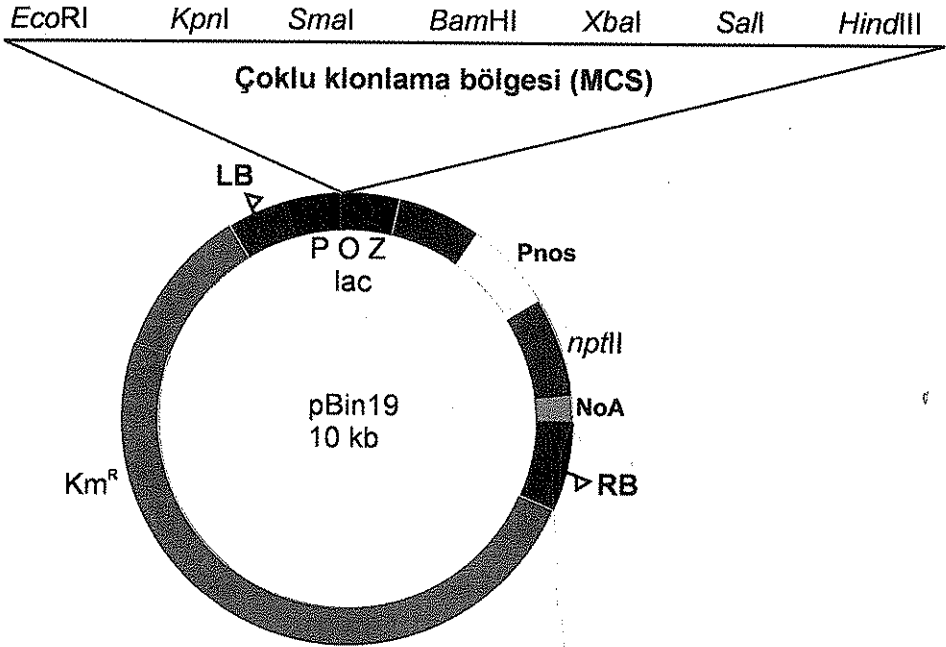
*Ko-entegratif vektör olarak tasarlanmasına rağmen, binari vektörlerle birlikte de kullanılmaktadır.

Bitki hücrelerine T-DNA aktarım frekansını artırmak için "overdrive" ve TSS (T-DNA transferini teşvik eden DNA dizisi) gibi bölgeler de ikili vektörlere klonlanabilmektedir (Walkerpeach ve Velten, 1994). İkili vektörler, ko-entegratif sistemde olduğu gibi üç-ebeveynli eşleştirme (Şekil 15.9), elektroporasyon ve kimyasal yöntemlerle *Agrobacterium*'a aktarılabilir. Uygun antibiyotikler kullanılarak da sadece yardımcı Ti plazmidi ve ikili vektörü (Şekil 15.9) taşıyan *Agrobacterium* hücreleri seçilebilmektedir.

İkili vektörler, ilk olarak Hoekema ve ark. (1983) tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde, bitkilere gen aktarımında kullanılan fazla sayıda ikili vektör mevcuttur. Ünlü RK2 replikasyon orijini ve RK2 konjugasyon fonksiyonlarının dışında, ikili vektörler büyüklük, 24 bp nükleotid dizilerinin kökeni, seçici bitki işaret genleri ve bakteriyel seleksiyon işaret genleri bakımından birbirlerinden farklılık gösterir. Örneğin, 1984 yılında pRK252 plazmidi üzerine inşa edilen pBin19 ikili vektörü (Bevan, 1984), bitkilere gen aktarımında oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Bu vektör pTiT37'den elde edilen T-DNA sınır dizilerini ve bakteriyel kanamisine dayanıklılık genini taşımaktadır. Ayrıca pBin19, T-DNA bölgesinde transgenik bitkilerin seçimi için *nos* promotor ve terminatör dizilerince yönetilen *npII* genini ve bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolayca yerleştirildiği çoklu klonlama bölgesini içermektedir (Şekil 15.10).



Şekil 15.9. *E. coli* içerisinde bulunan ikili vektörün konjugasyonla (üç-ebeveynli eşleştirme; *bom/mob* fonksiyonları kullanılarak) *Agrobacterium* içerisine aktarılması sonucunda ikili vektör sisteminin elde edilmesi. İlk önce yardımcı ve pMob plazmidleri aracı vektörün bulunduğu *E. coli* içerisine aktarılır. Daha sonra yardımcı plazmid, pMob plazmidinin sentezlemiş olduğu *trans*-hareketli ürünleri kullanarak ikili vektörü *Agrobacterium* içerisine aktarır. Sonuçta, ikili vektör RK2 bölgesi sayesinde *Agrobacterium* içerisinde Ti plazmidinden bağımsız olarak replike olur. LB, RB: sol ve sağ sınırlar; MCS: çoklu klonlama bölgesi; SBMG: seçici bitki işaret geni; RES: bakteri hücresinde vektörün seçimi için gerekli olan antibiyotige dayanıklılığı kodlayan işaret geni; OriT: vektörlerin konjugasyonla transferi için gerekli olan transfer orijini ve *bom* bölgesi. RK2: pRK2 plazmidine ait, hem *E. coli* hem de *Agrobacterium* içerisinde plazmid replikasyonunu sağlayan replikasyon orijini (Armitage ve ark., 1988 ile Walkerpeach ve Velten, 1994'den değiştirilerek).



Şekil 15.10. pBin 19 ikili vektörü (Bevan, 1984). LB, RB: sol ve sağ sınırlar; lac: lac operonunun α -komplementer bölgesi; Pnos: nopalın sentezi gen promotoru; *nptII* neomisin fosfotransferaz-II geninin kodlama bölgesi; NoA: nopalın sentezi genine ait poliadenilasyon (terminatör) bölgesi. Ayrıca, pBin 19 plazmidini bütün ikili plazmidlerde bulunması gereken transfer ve RK2 replikasyon orijinlerini de taşımaktadır. Lac bölgesi içerisinde bulunan MCS bölgesine istenilen genler klonlanarak, mavi-beyaz seleksiyonu sonucunda klonlamanın yapıldığı vektörler kolaylıkla belirlenebilmektedir (Armitage *ve ark.*, 1988'den değiştirilerek).

15.5.3. Bitkilere gen aktarımı

A. tumefaciens transgenik bitkilerin üretiminde kullanılan en yaygın araç olma özelliğini halen korumaktadır. Bu bakteri aracılığıyla her çeşit bitki hücrelerine 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 (totipotensi) 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 aktarımı 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 (Özcan ve Özgen, 1996). *Agrobacterium* aracılığıyla yüksek oranda bir gen aktarımı için gerekli olan koşulları şu şekilde sıralamak mümkündür (Birch, 1997):

1. Gen aktarımı için uygun gelişme safhasındaki eksplant devamlı olarak sağlanmalıdır.
2. Tür içerisindeki farklı çeşitlerde başarılı olmalıdır. Geliştirilen gen aktarım tekniği, kültürü yapılan yüksek verimli çeşitlerde başarılı olmadıkça hiç bir önemi yoktur.
3. Çok sayıda bireysel transgenik bitki elde edebilmek için yöntem erkili, ekonomik ve tekrarlanabilir olmalıdır.
4. Gen aktarımı yapılan hücrelerden transgenik bitkilerin elde edilebilmesi için etkili bir seleksiyon sistemi geliştirilmelidir.
5. Maliyet ve somaklonal varyasyonu en düşük seviyede tutmak için, doku kültüründe geçen süre mümkün olduğu kadar kısaltılmalıdır.
6. Gerek tohumla, gerekse vejetatif çoğaltım için stabil ve üniform transgenik bitkiler elde edilmelidir.
7. Sadece istenilen özellikleri kodlayan genler bitkilere aktarılmalı, istenmeyen DNA dizilerinin geçişi engellenmelidir.
8. Fazla kopya sayısından kaynaklanan, aktarılan genin inaktivasyonunu ve entegrasyon bölgelerinde oluşabilecek gen zararlarını engellemek için, genler düşük kopya sayısında aktarılmalıdır.
9. Aktarılan genler istenilen fizyolojik devrede ve arzu edilen seviyede aktivite göstermelidir.

Bitki genotipi, asetosiringon gibi *nir* genlerini uyarıcı bileşikler, şekerler, pH, sıcaklık, ışık, hücre konsantrasyonu, inokulasyon ve ko-kültivasyon süresi, eksplant tipi, hormon uygulaması ve yaralama gibi faktörler de *Agrobacterium* ile gen aktarımını önemli ölçüde etkilemektedir (Birch, 1997). *Agrobacterium* ile gen aktarımında çeşitli bitki kısımları (yaprak, gövde, hipokotil, embriyo, kök ve çiçek dokuları), protoplastlar, hücre süspansiyonları ve kallus dokuları eksplant olarak kullanılabilir (Özcan ve Özgen, 1996). Gen aktarımı için, önce bitkilere aktarılmak istenen genlerin klonlandığı vektörü taşıyan *Agrobacterium* sıvı bakteri büyüme ortamında (örnek: nutrient broth, NB) büyütülür. Hazırlanan bitki eksplantları sıvı bitki rejenerasyon ortamında seyreltilmiş olan bu bakteri kültürüyle belirli bir süre inokule edilir. İnokule edilen eksplantlar daha sonra, gen aktarım işleminin gerçekleşmesi için bitki büyüme düzenleyicileri içeren katı bitki rejenerasyon ortamına aktarılarak, 48-72 saat süreyle ko-kültivasyona tabi tutulurlar. Gen aktarım oranını artırmak için bazı bitki türleri için sıvı ko-kültivasyon ortamı da kullanılmaktadır. Uranbey (1999), paratense gen aktarımında

sıvı ko-kültivasyon ortamının daha etkili olduğunu bildirmiştir. Ko-kültivasyon süresinin sonunda, eksplantlar bakteri büyümesini engelleyen bir antibiyotik (örnek: augmentin, karbenisilin veya sefotaksim) ve sadece gen aktarımı yapılan hücrelerin gelişmesine izin veren seçici bir bileşik içeren aynı rejenerasyon ortamına aktarılır. Seçici bileşiğin tipini kullanılan işaret geni belirlemektedir. Örneğin, bitki hücrelerine *nptII* işaret geni aktarılmış ise kanamisin, *hpt* geni aktarıldığı durumlarda ise higromisin antibiyotığı kullanılmaktadır. *Bar* geninin aktarıldığı durumlarda ise uygun bir herbisit (fosfinotrisin) kullanılmalıdır. Seçici besin ortamına aktarılan eksplant üzerinde bulunan transgenik hücrelerden birkaç hafta sonra ya doğrudan sürgünler, somatik embriyolar veya rejenerasyon yeteneğine sahip kallus oluşumu gözlenir (Hinchey ve ark., 1994). Gelişen sürgünler, yine antibiyotik ve seçici bileşik içeren köklendirme ortamına aktarılarak köklendirilir. Köklendirme ortamına seçici bileşiğin ilave edilmesiyle gen aktarımı yapılamayan kaçak sürgünlerin köklenmesi büyük oranda engellenmiş olur. Köklenen sürgünler son olarak saksılara aktarılarak tohum elde edilir.

Aktarılan genlerin elde edilen bitkilerde kesin olarak bulunup bulunmadığı, Southern blot veya PCR gibi moleküler tekniklerle teyit edilebilmektedir. Yine, transgenik bitkilerde T-DNA kopya sayısı ve aktarılan genin ifade düzeyinin belirlenmesi de, beklenen özelliğin ortaya çıkmasında büyük önem taşımaktadır.

15.5.3.1. *Agrobacterium*'un büyütülmesi ve muhafazası

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılmasına agarlı besin ortamında büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanılabilir. Tek bakteri kolonisi steril bir lup ile alınarak 50 ml'lik steril Falcon tüpü içerisine konan ve gerekli antibiyotikleri içeren sıvı NB (nutrient broth) bakteri büyütme ortamına konur. Daha sonra bakteri kültürleri çalkalayıcı inkübatörde, 160-200 devir/d ve 28 °C'de bir gece ya da istenilen çoğaltım elde edilinceye kadar büyütülür. Bu bakteri kültürü seyreltilerek bitki eksplantlarının inokulasyonunda kullanılabilir. Yeniden bireysel koloniler elde etmek için ise çok az bir miktar bakteri kültürü, gerekli antibiyotikleri içeren katı NA (nutrient agar) besin ortamı üzerine steril bir lup ile yayılır. Bu bakteri kültürlerini içeren petri kutuları ters çevrilerek *Agrobacterium*'un büyümesi için 28 °C'de iki gün inkübe edilir. İki gün içerisinde kolonilerin oluşumu gözlenir. Petri kabı içerisinde büyütülen bakteri kültürleri ters çevrilerek 4 °C'de 6 hafta canlılıklarını koruyabilirler. Daha uzun süreli muhafaza işlemi için eşit miktarda bakteri kültürü ve %40 gliserol içeren NB, 2 ml'lik "cryogenic" tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı nitrojende hızlı bir şekilde dondurulup -80 °C'de muhafaza edilebilmektedir. Bu şekilde, bakteri kültürlerinin 10 yıl canlılığını muhafaza etmek mümkün olmaktadır. Ayrıca, bu şekilde bakteri plazmidini de güvence altına alınmış olur.

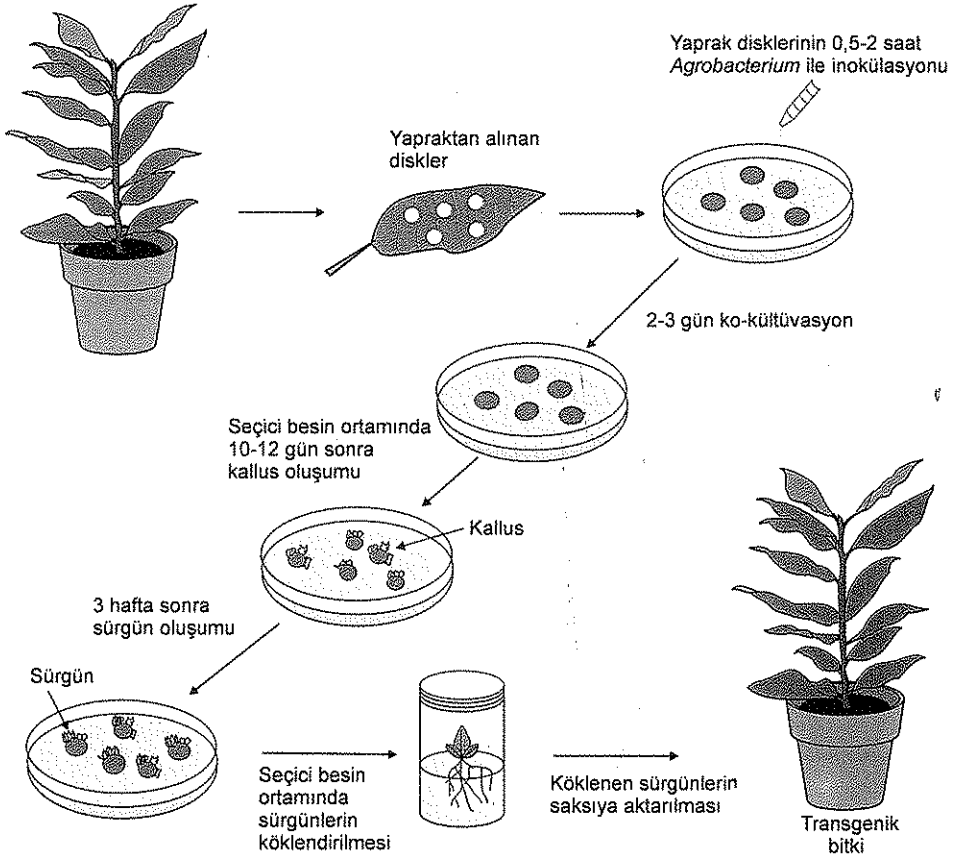
15.5.3.2. *A. tumefaciens* aracılığıyla tütüne gen aktarımı

Genel olarak *Solanaceae* familyasına ait türlerin *in vitro* rejenerasyon kabiliyetleri yüksek olup, *Agrobacterium* enfeksiyonlarına karşı da oldukça hassastırlar. Özellikle tütün, gen aktarım çalışmalarında model bitki olarak kullanılmakta (Gürel, 2001) ve değişik organizmalardan izole edilen genler öncelikle bu bitkide test edilmektedir. İlk olarak tütün yaprak disklerine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı Horsch ve ark. (1985 ve 1986) tarafından gerçekleştirilmiş olup, daha sonra değişik araştırmacılar tarafından optimize edilmiştir. Aşağıda Draper ve ark. (1988) ile Özcan ve ark. (1993) tarafından tarif edilen *A. tumefaciens* aracılığıyla tütün yaprak disklerine gen aktarım yöntemi verilmiştir (Şekil 15.11). *A. tumefaciens* hatları olarak ise GV2260 (p35SGUS-INT) ve GV2260 (AoPR1GUS-INT) kullanılmıştır.

GV2260 (p35S GUS-INT) hattı binari vektör sisteminden oluşmaktadır. pGV2260 vektörü (Debleare ve ark., 1985) sadece *vir* genlerini taşıırken, pBin19 (Bevan, 1984) vektöründen türetilen p35S GUS-INT ise T-DNA bölgesine sahip olan ikili vektördür. p35S-GUS-INT vektörünün T-DNA bölgesinde seçici *np/II* (neomisin fosfotransferaz) ve raportör *gus* (β -glukuronidaz) işaret genleri bulunmaktadır. *np/III* geni NOS (napolin sentezi) promotor ve terminatör dizileri tarafından kontrol edilirken, *gus* geni ise CaMV (karnıbahar mozayik virüsü) 35S promotor ve terminatör dizileri tarafından kontrol edilmektedir. *Agrobacterium* içerisindeki gen ifadesinin engellenmesi için de *gus* geninin kodlama bölgesine bitkisel bir intron yerleştirilmiştir (Vancanneyt ve ark., 1990). Ayrıca, bakteri kromozomları üzerinde rifampisin ve p35S-GUS-INT vektörü üzerinde de kanamisin antibiyotiklerine dayanıklılığı kodlayan bakteriyel genler bulunmaktadır. GV2260 (AoPR1GUS-INT) bakteri hattının GV2260 (p35SGUS-INT)'dan tek farkı ise GUS geninin AoPR1 (*Asparagus officinalis* patojen-ilgili gen) promotoru tarafından kontrol edilmesidir. Bu promotor sadece yaralanmış hücre ve kallus dokuda aktif iken, bitkinin diğer doku ve organlarında inaktif haldedir (Özcan, 1993; Özcan ve ark. 1993; Firek ve ark., 1993).

Tütün yaprak disklerine gen transferi için ilk olarak GV2260 (p35S GUS-INT) ve GV2260 (AoPR1GUS-INT) *A. tumefaciens* hatları büyütülür. Bunun için, 50 ml'lik steril Falcon tüplerine 5-10 ml sıvı NB besin ortamı konur ve bu ortama 100 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin ilave edilir. Daha sonra steril bir lup yardımıyla petri kutularında muhafaza edilen bakteri kültürlerinden bir miktar alınarak bu ortama aşılanır ve 160-200 devir/d ve 28 °C'de bir gece ya da istenilen çoğaltım elde edilinceye kadar büyütülür. Aşılama için, -80 °C'de muhafaza edilen veya daha önce büyütülmüş olan bakteri kültürleri de kullanılabilir.

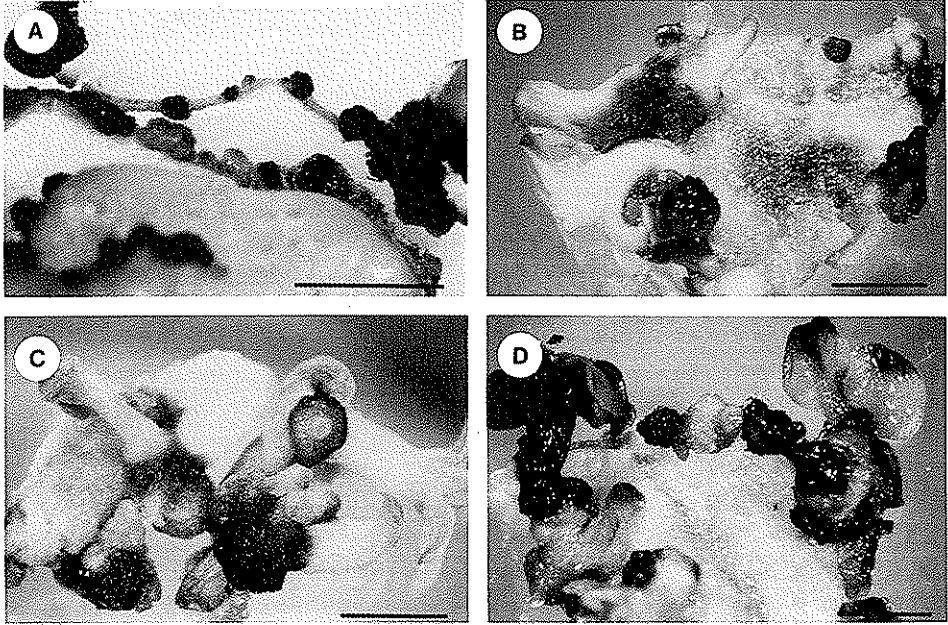
Yaprak disklerinin kaynağı olarak sera veya *in vitro* şartlarda büyütülen yaklaşık 4-6 haftalık fidelerden elde edilen yapraklar kullanılmaktadır. Sera şartlarında büyütülen bitkilerden elde edilen yapraklar %20'lik çamaşır suyunda 15 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra, steril su ile 3 defa durulanır. *In vitro*'da



Şekil 15.11. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla tütün yaprak disklerine gen aktarımı ve transgenik bitkilerin elde edilmesi (Alberts ve ark., 1994'den değiştirilerek).

yetiştirilen bitkilerden izole edilen yapraklar için bu işleme gerek yoktur. Sterilizasyondan sonra yapraklar steril şartlar altında, steril bistüri ve pens kullanılarak 0.5 cm çapında disklerle ayrılırlar (Şekil 15.11). Kesilen bu yaprak diskleri 1/50 oranında (1×10^8 hücre/ml) seyreltilmiş bakteri kültürü içeren sıvı MSD4x2 (0.1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP ve 30 g/l sakkaroz içeren MS besin ortamı) ortamında 30 dakika süreyle inoküle edilir. İnokülasyondan sonra yaprak diskleri katı MSD4x2 besin ortamına aktararak 2 gün süreyle 25 °C'de ko-kültüvasyona tabi tutulurlar. Bu sürenin sonunda eksplantlar 50 mg/l kanamisin ve 400 mg/l augmentin içeren seçici MSD4x2 ortamına aktarılır (Şekil 15.11). İnokülasyondan yaklaşık 10-12 gün sonra yaprak diskleri etrafında kanamisine dayanıklı kallus gelişirken (Şekil 15.12a; Şekil 15.13a), 3 hafta sonra da bu kalluslar üzerinde kanamisine dayanıklı sürgünler oluşur (Şekil 15.12b, c ve d; Şekil 15.13b ve c). Sürgünler 1-2 cm büyüklüğe erişince kesilerek 50 mg/l kanamisin ve 500 mg/l

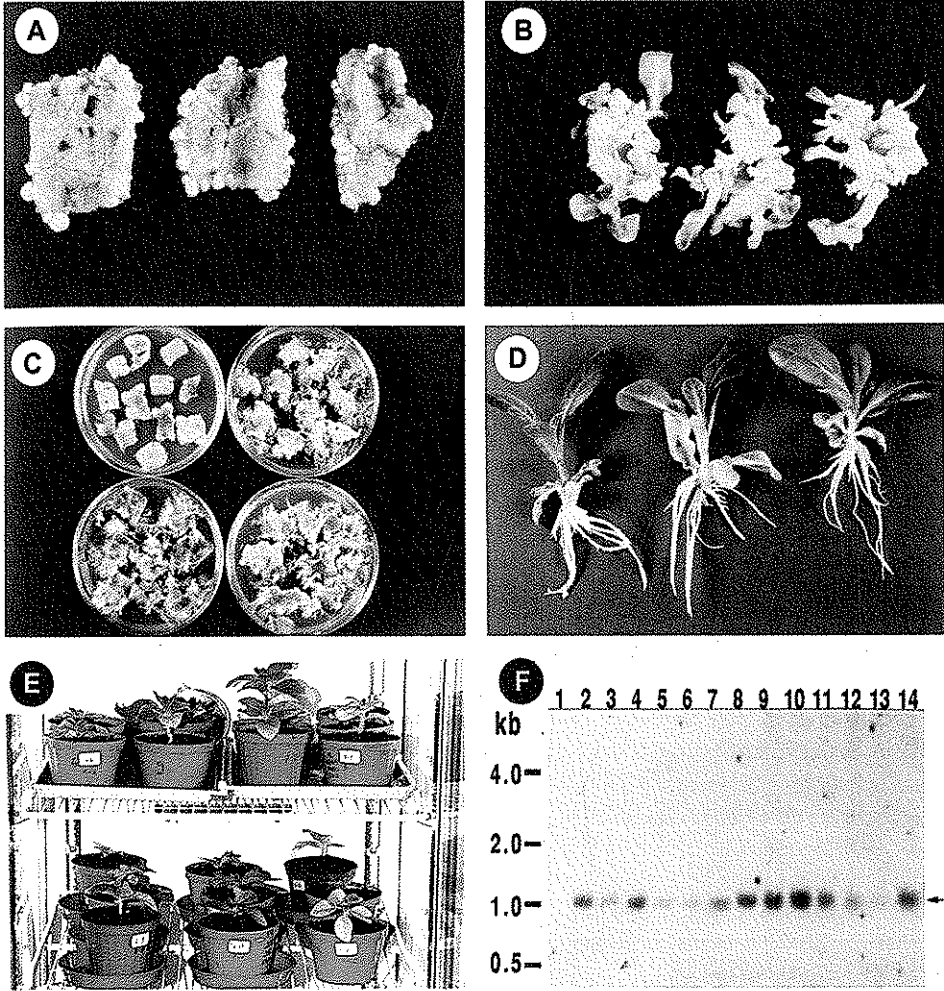
augmentin içeren katı köklendirme ortamına (30 g/l sakkaroz içeren MS besin ortamı) aktarılır (Şekil 15.11). Köklenen sürgünler (Şekil 15.13d) son olarak saksılara aktararak dış şartlara alıştırlırlar (Şekil 15.13e). Bu şekilde, tek bir yaprak diskinden çok sayıda transgenik tütün bitkisi elde etmek mümkündür. Saksılarda gelişen bitkilerin transgenik olup olmadıkları GUS, PCR ve Southern blot (Şekil 15.13f) gibi analizlerle teyit edilir. Gerekirse tohumlarında mendel açılımı gözlenir.



Şekil 15.12. *A. tumefaciens* ile inokülasyondan sonra tütün yaprak diskleri üzerinde kanamisine dayanıklı kallus ve sürgün gelişiminin GUS analizi ile belirlenmesi. GV2260 (pAoPR1-GUS-INT) bakteri hattı ile inokülasyondan 12 (A), 22 (B) ve 25 (C) gün sonra yaprak diskleri üzerinde gelişen kanamisine dayanıklı kallus ve sürgünlerde GUS geninin ifadesi. (D) GV2260 (p35S-GUS-INT) bakteri hattı ile inokülasyondan 25 gün sonra yaprak diskleri üzerinde gelişen kanamisine dayanıklı kallus ve sürgünlerde GUS geninin ifadesi. Bar = 5 mm. (Özcan, 1993'den alınmıştır).

15.5.3.3. *A. tumefaciens* aracılığıyla lüpen bitkisine gen aktarımı

Apikal meristeme dayalı bu gen aktarım sistemi değişik doku, organ ve protoplastlardan (Babaoğlu ve Özcan, 2001) organogenesis (Gürel ve Türker, 2001) veya somatik embriyogenesis (Özcan ve ark., 2001) yoluyla bir adventif sürgün rejenerasyonu metodunun geliştirilemediği, ancak organize meristemlerden çoğaltılabilen bitki türleri için uygun bir yöntemdir. Lüpenler, nohut, fasulye ve



Şekil 15.13. *A. tumefaciens* ile inokulasyondan 14 (A), 26 (B) ve 28 (C) gün sonra tütün yaprak diskleri üzerinde kanamisinine dayanıklı kallus ve sürgün gelişimi. (D) Kanamisine dayanıklı sürgünlerin seçici köklendirme ortamında köklendirilmesi (Özcan, 1993'den alınmıştır). (E) Kanamisine dayanıklı sürgünlerden gelişen transgenik bitki adaylarının iklim dolabında dış şartlara alıştırılması (Mirici, 2000'den alınmıştır). (F) Southern blot analizi ile transgenik bitkilerin teyit edilmesi. Transgenik bitki adaylarının genomik DNA'ları *Bam*HI enzimiyle kesildikten sonra, *Bam*HI ile kesilen 1 kb'luk *nptII* geni prob olarak kullanılmıştır. 1. kulvarda, gen aktarımı yapılmamış; 2-14. kulvarlarda gen aktarımının yapıldığı transgenik bitki adaylarına ait genomik DNA'lar görülmektedir. Görüldüğü gibi bütün transgenik adayları 1 kb uzunluğundaki *nptII* genini taşımaktadırlar (Özcan ve ark., 1993'ten alınmıştır).

mercimek gibi yemeklik tane baklagiller *Agrobacterium*'a hassas olmalarına karşın, meristematik dokular dışında kalan somatik dokulardan uygun ve tekrarlanabilir bir adventif sürgün rejenerasyonu metodunun geliştirilmesi çoğu durumda zor olmakta (Babaoğlu, 1997) ve gen transferi için bu tür apikal meristemlerin kullanımı zorunlu olabilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2000b). Organize meristem içeren dokulardaki meristematik hücreler hızlı büyür, bölünür ve değişime (morfogenesise) hazırdırlar. Bu yöntemde, önce *Agrobacterium* aracılığıyla gen ya da genler meristematik hücrelere aktarılır, daha sonra seleksiyon ortamında bu hücrelerden sürgün ve sonuçta transgenik bitkiler elde edilir (Şekil 15.14) (Babaoğlu, 1996; Babaoğlu ve ark., 2000a).

Gen aktarımı için, lüpen tohumları *in vitro*'da MS0 besin ortamında çimlendirilerek 5-7 günlük fideler elde edilir (kullanılan bütün besin ortamlarının içeriği Tablo 15.5'de verilmiştir). Bu aşamada, olgunlaşmamış yaprak uçları kotiledonların üzerinde henüz görülebilir durumdadır. Önce, fideler kotiledon boğumlarının altından 3-4 mm hipokotil kısmını içerecek şekilde kesilir. Daha sonra da kotiledonlar ve yeni gelişen yaprakçıklar aşağıya bastırılarak uzaklaştırılır ve apikal meristem binoküler mikroskop altında açığa çıkarılır. Apikal meristem uçları (0.2-0.4 mm) kesilip, uç kısımları yukarı gelecek şekilde sürgün rejenerasyon (SR) ortamına yerleştirilerek 22 °C'de ve 1800 lüks ışık şiddetinde bir gün süreyle kültüre alınır. Bir gün sonra eksplantlar, bir gece boyunca büyütülen ve seyreltilen ($OD_{600}=1.0-1.2$) *A. tumefaciens* 1065 (pVDH65) hatı ile 10-12 dakika süreyle inokulasyona tabi tutulur. İkili vektör pVDH65, T-DNA bölgesinde *nptII* ve *gus* işaret genlerini taşımaktadır (Şekil 15.14i). İnokulasyondan sonra, filtre kağıdı üzerinde eksplantların ıslaklığı giderilir ve 48-72 saat boyunca SR ortamda ko-kültüvasyona bırakılır. Ko-kültüvasyondan sonra da eksplantlar, 300 mg/l sefotaksim ve 15 mg/l kanamisin içeren SR ortamına aktarılır.

Tablo 15.5. Lüpen bitkisine gen aktarımda kullanılan doku kültürü ortamları (Babaoğlu, 1996; Babaoğlu ve ark., 2000a)

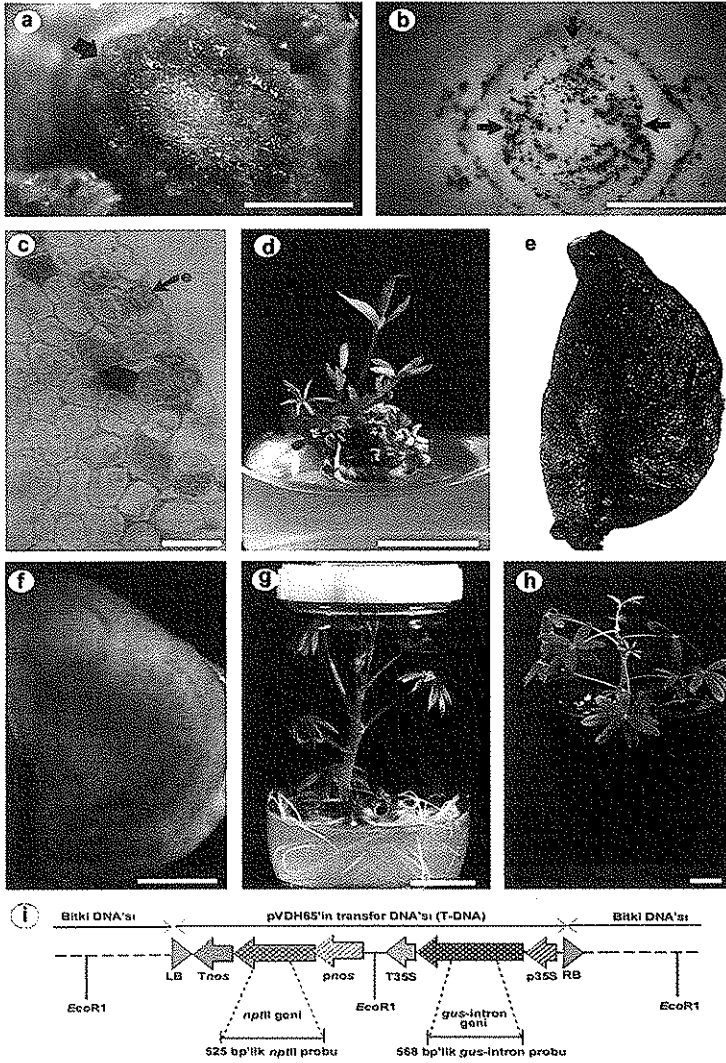
Ortam	İçeriği
MS0	MS makro, mikro tuzları ve vitaminleri, 30 g/l sakkaroz, 8 g/l agar, pH 5.6
SR	MS makro ve mikro tuzları, B5 vitaminleri, 20 g/l sakkaroz, 0.7 µM NAA, 6.2 µM BAP, 4.44 µM CPPU, 2 g/l Sea-Kem agaroz, pH 5.6
SÇ	MS makro ve mikro tuzları, 20 g/l sakkaroz, 0.4 mg/l thiamin, 100 mg/l myo-inositol, 0.49 µM IBA, 4.44 µM BAP, 2 g/l Sea-Kem agaroz, pH 5.6
SA	MS makro ve mikro tuzları, 20 g/l sakkaroz, 0.4 mg/l thiamin, 100 mg/l myo-inositol, 0.98 µM IBA, 1.33 µM BAP, 2 g/l Sea-Kem agaroz, pH 5.6
KO	¼ oranında B5 makro-mikro tuzları ve vitaminleri, 20 g/l sakkaroz 4 g/l Sea-Kem agaroz, 5.37 µM NAA, pH 5.6

Gen aktarımına başlamadan önce yapılan testlerde, 10 mg/l ve daha yüksek konsantrasyonlarda kanamisin içeren ortamda apikal eksplantların canlılığını yitirdiği görülmüştür. Daha etkili seleksiyon yapmak ve kaçak sürgün gelişimini engellemek amacıyla seçici ortama 15 mg/l kanamisin ilave edilmiştir.

Seleksiyon baskısından kurtulup uzayan sürgün kümeleri daha sonra 20 mg/l kanamisin ve 250 mg/l sefotaksim içeren sürgün çoğaltma (SÇ) ortamına alınır (Şekil 15.14). SÇ ortamında, her alt kültürde sefotaksim konsantrasyonu azaltılırken (200, 150, 100, 50 ve 0 mg/l), kanamisin oranı artırılır (15, 20, 30 ve 40 mg/l). SÇ ortamında uzayan sürgünler, 40 mg/l kanamisin ve 200 mg/l sefotaksim içeren sürgün alıştırma (SA) ortamına, oradan da 40 mg/l kanamisin ve 150 mg/l sefotaksim içeren köklendirme (KO) ortamına alınır (Şekil 15.14g). Köklendirilen bitkiler, eşit oranda perlit ve kompost karışımı içeren saksılara aktararak dış şartlara alıştırılır (Şekil 15.14h).

Kanamisin içeren besin ortamında canlılığın devamı ve sürgün oluşumu *npII* geninin bitki hücrelerinin kromozomlarına entegre olduğunu ve kendisini ifade ettiğini göstermektedir. *npII* protein aktivitesi kantitatif olarak ta belirlenebilir ve ng *npII* protein/mg toplam protein olarak ifade edilir. β -glukuronidaz (GUS) aktivitesi ise histokimyasal (X-gluc solüsyonunda GUS testi, Jefferson *ve ark.*, 1987) veya florometrik olarak (Gartland *ve ark.*, 1995) tespit edilebilmektedir. X-gluc solüsyonuna verilen tepki ile dokuların mavi renk alması da *gus* geninin başarıyla bitki genomuna entegre olarak işlevsel hale geldiğini kanıtlamaktadır. Kantitatif sonuç veren florometrik yöntemde GUS aktivitesi pmol 4-MU/saat/ μ g protein olarak ifade edilir (Babaoglu *ve ark.*, 2000a).

Bu analizlerin sonuçları ilgili genlerin bitki genomuna entegre olduğunun bir belirtisi olmakla birlikte, üretilen bitkilerin %100 transgenik olduklarını göstermeyebilir. Bu nedenle, bu durumdaki bitki veya dokulara transgenik aday (putative) denir. Gen entegrasyonunun moleküler düzeyde teyit edilmesi Southern blot veya PCR teknikleriyle teyit edilebilir. Southern blot yönteminde; bitki genomik DNA'sı izole edilerek restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra jel elektroforezde koşuturulur. Koşuturulan genomik DNA daha sonra "blot" yöntemiyle membran filtreye transfer edilerek, radyoaktif-etiketlenmiş *gus* veya *npII* problemleriyle hibridize edilir. Hibridizasyondan sonra membran filtre X-ray filmine ekspoz edilerek, genomik DNA'nın aktarılan geni taşıyıp taşımadığı gözlenir. PCR tekniğinde ise; önce aktarılan genlere yönelik çift taraflı başlangıç primerleri dizayn edilir. Daha sonra, izole edilen bitki genomik DNA'sı ile primerler Taq DNA polimeraz enziminin bulunduğu solüsyonda PCR reaksiyonuna tabi tutulur. Reaksiyondan sonra DNA solüsyonu jel elektroforezde koşutularak UV ışık altında amplifiye edilen DNA bantlarına göre gen aktarımı teyit edilir.



Şekil 15.14. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404'e dayalı 1065 hattı ile *Lupinus mutabilis* bitkisine gen aktarımı. (a) inoküle edilmiş apikal eksplantlardan sürgün rejenerasyonu (28 gün sonra) (bar=0.5 cm), (b) inoküle edilmiş apikal meristem eksplantlarında GUS geninin ifadesi (gövdenin etrafı oklarla gösterilmiştir) (bar = 0.25 cm), (c) inoküle edilen bir eksplantın GUS analizi sonrası enine kesiti (e = epidermal hücre, enfekte olan hücreler mavi renklidir) (bar = 100µm), (d) kanamisin seleksiyonuna dayanıklı transgenik aday sürgünler (bar = 2 cm), (e) kanamisine dayanıklı bir sürgün yaprağının GUS analizi görüntüsü (bar = 0.25 cm), (f) kanamisine dayanıklı bir sürgün gövdesinin GUS analizi sonrası enine kesiti (bar = 0.13 cm), (g) kanamisin içeren köklendirme ortamda köklenen ve gelişen transgenik bitki adayı (bar = 2 cm), (h) saksıda ve sera şartlarında gelişen transgenik bitki (Southern blot ve PCR teknikleriyle teyit edilmiştir), (i) pVDH65 vektörünün T-DNA'sı aracılığıyla bitkiye aktarılan *nptII* ve *gus* genlerinin pozisyonu (Babaoğlu ve ark., 2000a'dan değiştirilmiştir).

15.5.3.3. *A. tumefaciens* aracılığıyla mısır gen aktarımı

İlk önceleri *A. tumefaciens* ile buğdaygillere yapılan gen transferi başarısızlıkla sonuçlanırken, son yıllarda geliştirilen süper-virülent ikili vektörler sayesinde bu bitkilere de kolaylıkla gen aktarımı yapılabilmektedir. Aşağıda, Ishida ve ark. (1996) tarafından geliştirilen *A. tumefaciens* aracılığıyla mısır gen aktarım yöntemi buğdaygillere örnek olarak verilmiştir.

Bu çalışmada LBA4404 (pSB131) ve LBA4404 (pTOK233) bakteri hatları kullanılmış olup; pSB131 ikili vektörü T-DNA bölgesinde *bar* ve *gus* genlerini taşırken, pTOK233 T-DNA bölgesinde *hpt*, *npII* ve *gus* genlerini bulundurmaktadır. Bu bakteri hatları 3 gün uygun antibiyotikleri içeren katı YP (5 mg/l maya ekstraktı, 10 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar ve pH 6.8) ortamında büyütüldükten sonra, platin bir lup ile bakteriler toplanarak 1×10^9 hücre/ml yoğunlukta LS-inf veya N6-inf ortamında süspansiyon haline getirilir (kullanılan bütün besin ortamlarının içeriği Tablo 15.6'da verilmiştir). Tozlanmadan yaklaşık 9-14 gün sonra yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan mısır tohumlarından izole edilen, 1.0-1.2 mm büyüklüğündeki olgunlaşmamış embriyolar, LS-inf veya N6-inf ortamında yıkandıktan sonra hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisine konur. Süspansiyon 30 saniye vorteks-karıştırıcı ile karıştırılarak 5 dakika beklenir. Daha sonra olgunlaşmamış embriyolar, embriyo eksenine ortama temas edecek şekilde LS-AS veya N6-AS ortamlarında kültüre alınarak, 25 °C'de 3 gün süreyle karanlıkta ko-kültivasyona bırakılır. Ko-kültivasyondan sonra embriyolar 5 mg/l fosfotrisin (PPT) (pSB131 için) veya 10 mg/l higromisin (pTOK233 için) içeren LSD1.5 veya N6D1.5 ortamlarına aktarılır. Karanlıkta, 25 °C'de 2 hafta inkübe edilen eksplantlar daha sonra 10 mg/l PPT veya 30 mg/l higromisin içeren LSD1.5 veya N6D1.5 ortamlarında, yine karanlıkta ve 25 °C'de 3 hafta süreyle altkültüre alınır. Bu süre içerisinde olgunlaşmamış embriyolar üzerinde gelişen ve tip II özelliği gösteren kalluslar bistüri ile kesilerek aynı ortam ve koşullarda 3 hafta daha bekletilir. Çoğalan kalluslar tekrar kesilerek, bu defa 5 mg/l PPT veya 30 mg/l higromisin içeren LSZ ortamına aktararak, 25 °C'de devamlı ışık altında inkübe edilir. *A. tumefaciens*'in gelişmesini engellemek için bütün rejenerasyon ve seleksiyon ortamlarına 250 mg/l sefotaksim ilave edilir. Rejenere olan bitkiler son olarak 1/2 LSF ortamına aktararak, aynı koşullarda 2 hafta süreyle kültüre alındıktan sonra saksılara dikilerek serada büyütülürler.

Ishida ve ark. (1996) geliştirdikleri bu yöntemle elde ettikleri 120 bağımsız transgenik mısır bitkisinde detaylı araştırmalar yapmışlardır. Bu bitkilerin %70'inin tamamen fertil olduğunu, yaklaşık %70'inin tek T-DNA taşıdığını ve üçten daha fazla sayıda T-DNA kopya sayısına sahip bitkiye rastlanmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca; embriyo gelişim safhası, *A. tumefaciens*'in yoğunluğu, kullanılan rejenerasyon ortamının içeriği, işaret geni, vektör tipi ve mısır genotipi gibi etmenlerin gen aktarım oranını önemli ölçüde etkilediğini de belirtmişlerdir.

Tablo 15.6. Mısıra gen aktarımında kullanılan doku kültürü ortamları (Ishida ve ark. 1996'dan alınmıştır).

Ortam	İçeriği
LS-inf	LS makro ve mikro tuzları, 0.5 mg/l nikotinik asit, 0.5 mg/l pridoksin HCl, 1.0 mg/l thiamin HCl, 100 mg/l myo-inositol, 1.0 g/l kasamino asit, 1.5 mg/l 2,4-D, 68.5 g/l sakkaroz, 36 g/l glikoz, pH 5.2
LS-AS	LS makro ve mikro tuzları, 0.5 mg/l nikotinik asit, 0.5 mg/l pridoksin HCl, 1.0 mg/l thiamin HCl, 100 mg/l myo-inositol, 700 mg/l L-prolin, 1.5 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz, 10 g/l glikoz, 500 mg/l MES, 100 µM asetosrington, 8 g/l agar, pH 5.8
LSD1.5	Glikoz ve asetosrington içermeyen LS-AS ortamı + 250 mg/l sefotaksim, pH 5.8
LSZ	2,4-D içermeyen LSD1.5 ortamı + 5.0 mg/l zeatin, pH 5.8
½ LSF	½ oranında LS makro tuzlarını içeren, ancak 2,4-D içermeyen LSD1.5 ortamı + 5.0 mg/l zeatin, pH 5.8
N6-inf	N6 makro-mikro tuzları ve vitaminleri, 1.0 g/l kasamino asit, 1.5 mg/l 2,4-D, 68.5 g/l sakkaroz, 36 g/l glikoz, pH 5.2
N6-AS	N6 makro-mikro tuzları ve vitaminleri, 700 mg/l L-prolin, 1.5 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz, 10 g/l glikoz, 500 mg/l MES, 100 µM asetosrington, 8 g/l agar, pH 5.8
N6D1.5	Glikoz ve asetosrington içermeyen N6-AS ortamı + 250 mg/l sefotaksim, pH 5.8

Sonuç

1980'li yıllarda *Agrobacterium*'un tümör oluşturma mekanizması anlaşıldıktan sonra bitki genetik mühendisliğinde çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir. İlk olarak, işaret genleri *Agrobacterium*'un T-DNA bölgesine klonlanarak bitki hücrelerine aktarılmıştır. Daha sonra tarımsal öneme sahip çok sayıda gen *Agrobacterium* aracılığıyla bitki hücrelerine başarılı bir şekilde aktarılmıştır. Başlangıçta, tek çenekli bitkilere *Agrobacterium* ile gen aktarımı mümkün olmazken, son yıllarda geliştirilen süper-virulent ikili vektörler aracılığıyla bu bitkilere de gen aktarımı kolaylıkla yapılabilmektedir. Günümüzde, *Agrobacterium* aracılığıyla hemen hemen tüm kültür türlerine gen aktarımı yapılabilmektedir. Doğrudan gen aktarım teknikleriyle karşılaştırıldığında, *Agrobacterium* ile gen aktarımı daha kolay, ekonomik ve güvenilir olmaktadır. 1980'li yıllarda bitkilerin genetik mühendisi olarak adlandırılan

Agrobacterium'un bu işlevine 2000'li yıllarda da devam edeceği kesin gözükmemektedir. Önümüzdeki yıllarda *Agrobacterium* ile gen aktarımının zor olduğu türlere dahi rutin olarak gen aktarımının yapılabilceği açıktır.

Teşekkür

Katkılarından dolayı Doç. Dr. Kemal Kazan'a (Queensland Üniversitesi, Avustralya) teşekkür ederiz. Şekillerin çizimi Doç. Dr. Cengiz Sancak tarafından yapılmıştır.

Kaynaklar

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) Recombinant DNA technology. In: Molecular Biology of the Cell, pp: 291-334, Garland Publishing, New York.

Armitage P, Walden R, Draper J (1988) Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (eds), Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory manual, pp.1-67, Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

Babaoğlu M, McCabe MS, Power JB, Davey MR (2000a) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lupinus mutabilis* using shoot apical explants Acta Physiol. Plant. 22: 111-119.

Babaoğlu M (1996) Genetik Manipulation of Lupins. Doktora Tezi, Nottingham Üniversitesi, İng.

Babaoğlu M (1997) Tissue culture and plant regeneration in grain legumes: A review. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(11): 1-13.

Babaoğlu M, Özcan S. (2001) Protoplast kültürü ve somatik melezleme. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (eds), Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 89-136.

Babaoğlu M, Power JB, Davey MR (2000b) Genetic engineering of grain legumes: key transformation events. AgbiotechNet Vol. 2, June, ABN 050, pp. 1-8.

Babaoğlu M, Power JB, Davey MR, Sporer F, Wink M. (2001) Hairy root cultures of *Lupinus mutabilis*: Induction, culture and their isoflavone contents (yayına hazırlanmaktadır).

Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Mol. Biol., 2: 335-337.

Baruah-Wolff J, Harwood WA, Lonsdale DA, Harvey A, Hull R, Snape JW (1999) Luciferase as a reporter gene for transformation studies in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Rep., 18: 715-720.

- Beijersbergen A, Hooykaas PJJ (1993) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Nester EW, Verma PS (eds), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 37-49.
- Berger BR, Christie PJ (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon, virB2 through virB11 are essential virulence genes. *J. Bact.*, 176: 3646-3660.
- Bevan M, Chilton M-D (1982) Multiple transcripts of T-DNA detected in nopaline crown gall tumors. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 539.
- Bevan M, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304: 185-187.
- Bevan WM (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nuc. Acid Res.*, 12: 8711-8721.
- Binns AN (1988) Cell Biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 575-606.
- Binns AN, Thomashow MF (1988) Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu. Rev. Microbiol.*, 42: 575-606.
- Birch RG (1997) Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 297-326.
- Bornhoff G, Klapwijk PM, Kester HCM, Schilperoort RA, Hernalsteens JP, Schell J (1976) Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, *Mol. Gen. Genet.*, 145: 177-181.
- Bradley LR, Kim JS, Matthyse AG (1997) Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and Arabidopsis wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. *J. Bact.*, 179: 5372-5379.
- Braun AC (1958) A physiological basis for autonomous growth of crown gall tumor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44: 344-349.
- Cangelosi GA, Martinetti G, Leigh JA, Lee CC, Theines C, Nester EW (1989) Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2 glucan. *J. Bact.*, 171: 1609-1615.
- Caplan A, Herrera-Estrella L, Inze D, Van Haute E, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1983) Introduction of genetic material into plant cells. *Sci.*, 222: 815-821.
- Chang CH, Winans SC (1992) Functional roles assigned to the periplasmic, linker and receiver domains of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein. *J. Bact.*, 174: 7033-7039.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Cuncan DR, Conner TW, Wan Y (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.*, 115: 971-980.
- Chilton MD (1982) Integration and transcription of Ti plasmid fragments. In: Kahl G, Schell JS (eds), *Molecular Biology of Plant Tumours*, pp. 299-319, Academic Press, New York.

Chilton MD, Saiki RK, Yadav N, Gordon MP, Quetier F (1980) T-DNA from *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 4060-4064.

Christie PJ, Ward JE, Winans SC, Nester EW (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* VirE product is a single stranded DNA binding protein that associates with T-strands. J. Bact., 170: 2659-2667.

De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Rao Movva, N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J., 6: 2513-2518.

De la Riva GA, Gonzalez-Cabrera J, Vazquez-Padron R, Ayra-Pardo C (1998) *Agrobacterium*: a natural tool for plant transformation. Elect. J. Biotech., 1: 2-16.

De Paolis A, Mauro ML, Pomponi M, Cardarelli M, Spano L (1985) Localization of agropine synthesising functions in the TR region of root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. Plasmid, 13: 1-7.

Debleare R, Bytebier B, De Greve H, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nuc. Acids Res., 13: 4777-4788.

Deblock M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. EMBO J., 3: 1681-1689.

Dillen W, De Clercq J, Kapila J, Zambre M, Van Montagu M, Angenon G (1997) The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. Plant J., 12: 1459-1463.

Douglas CJ, Halperin W, Nester EW (1982) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. J. Bacteriol., 152: 1265-1275.

Douglas CJ, Staneloni RJ, Rubin RA, Nester EW (1985) Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. J. Bacteriol., 161: 850-860.

Draper J, Scott R, Hamil J (1988) Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. In: Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (eds), Blackwell Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual, pp.71-160, Scientific Publishers, Oxford.

Eichholtz DA, Rogers SG, Horsh RB, Klee HJ, Hayford M (1987) Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. Somat. Cell. Mol. Gen., 13: 67-76.

Elliott AR, Campbell JA, Dugdale B, Brettell RIS, Grof CPL (1999) Green-fluorescent protein facilitates rapid *in vivo* detection of genetically transformed plant cells. Plant Cell Rep., 18: 707-714.

Firek S, Özcan S, Warner SA, Draper J (1993) A wound-induced promoter driving npt-II expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic plants. Plant Mol. Biol., 22: 129-142.

- Firth N, Ippen-Ihler K, Skurray RA (1996) Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In: Neidhart FC, Curtis R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HC (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, pp. 2377-2401, American Society for Microbiology, Washington.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB (1986) Genetic transformation in higher plants. *Cri. Rev. Plant Sci.*, 4:1-46.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Eichholtz DA, Flick CL, Hoffman NL, Saunders PR (1985) The SEV systems: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Biotech.*, 3: 629-635.
- Gartland KMA, Phillips JP, Vitha S, Benes K (1995) Fluorometric GUS analysis for transformed plant material. In: Gartland KMA, Davey MR (eds) *Methods in Molecular Biology*, Volume 44, *Agrobacterium* protocols. Humana Press Publications, Totowa, USA, pp. 195-199.
- Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 223-256.
- Gheysen G, Angenon G, Montagu MV (1992) Transgenic plants: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and its use for crop improvement. In: Murray JAH (ed), *Transgenesis*, pp. 187-232, John Wiley & Son Ltd., London.
- Gielen J, De Beuckeleer M, Seurinck J, Deboeck F, De Greve H, Lemmers M, Van Montagu M, Schell J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.*, 3:835-836.
- Gürel E (2001) Insertion of an antimicrobial gene into *Agrobacterium* and its further use in transforming tobacco. *Tr. J. Bot.*, 25: (baskıda).
- Gürel E, Kazan K (1999) Evaluation of various sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Tr. J. Bot.*, 23: 171-177.
- Gürel E, Türker AU (2001) Organogenesis. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (eds) *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 36-70.
- Herrera-Estrella A, Van Montagu M, Wang K, (1990) A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* VirD2 protein directs a b-galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 9534-9537.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 35: 205-218.
- Hille J, Wullems G G, Schilperoort RA (1983) Non-oncogenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* do transfer T-DNA into plant cells. *Plant Mol. Biol.*, 2: 155-163.
- Hinchey MAW, Corbin DR, Armstrong CHL, Fry JE, Sato SS, Deboer DL, Petersen WL, Armstrong TA, Connor-Ward DV, Layton JG, Horsch RB (1994) Plant transformation. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds), *Plant Cell and Tissue Culture*, pp 231-270, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RAA (1983) Binary vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180.

Hooykaas PJJ, den Dulk-Ras H, Schilperoort RA (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene *6b* is an *onc* gene. *Plant Mol. Biol.*, 11: 791-793.

Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1984) The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. In: Scandalios JG, Caspari EW (eds), *Advances in Genetics*, Volume 22, *Molecular Genetics of Plants*, pp. 209-283.

Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.*, 19: 15-38.

Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A, Hoffmann N, (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223: 496-498.

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rodgers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.

Horsch RB, Klee H, Stachel S, Winans S, Nester E, Rogers S, Fraley R (1986) Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf disc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 2571-2578.

Huang Y, Morel P, Powel B, Kado CI (1990) VirA a coregulator of Ti-specified virulence genes is phosphorylated *in vitro*. *J. Bact.*, 172: 1142-1144.

Huffman GA, White FF, Gordon MP, Nester EW (1984) Hairy root inducing plasmid physical map and homology to tumour-inducing plasmids. *J. Bact.*, 157: 269-276

Inze D, Follin A, Van Lijsebettens M, Simoens C, Genetello M, Van Montagu M, Schell J (1984) Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Genet.*, 194: 265-268.

Ishida Y, Saito H, Ohto S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.*, 14: 745-750.

Jannseen B-J, Gardner RC (1990) Localised transient expression of GUS in leaf discs following co-cultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.*, 14: 61-72.

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5: 387-405.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Mol. Biol. Org. J.*, 6: 3901-3907.

Jin S, Prusti RK, Roitsch T, Ankenbauer RG, Nester EW (1990) The VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* is phosphorylated by the autophosphorylated VirA protein and this is essential for its biological activity. *J. Bact.*, 172 : 4945-4950.

- Jin S, Song Y, Pan T, Nester EW (1993) Characterization of a vir G mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Microbiol., 7:555-562.
- Joos H, Inze D, Caplan A, Sormann M, Van Montagu M, Schell J (1983) Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline grown galls. Cell, 32: 1057-1067.
- Kado CI (1991) Molecular mechanism of crown gall tumorigenesis. Plant Sci., 10: 1-32.
- Kado CI (2000) The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. Curr. Opin. Microbiol., 3: 643-648.
- Kaeppler HF, Menon GK, Skadsen RW, Nuutila AM, Carlson AR (2000) Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. Plant Cell Rep., 19: 661-666.
- Kanemoto RH, Powell AT, Akiyoshi DE, Regier DA, Kerstetter RA, Nester EW, Hawes MC, Grodon MP (1989) Nucleotide sequence and analysis the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bact., 171: 2506-2512.
- Karakaya A, Özcan S (1998) Susceptibility of lentils (*Lens culinaris* Medik.) cultivars to *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) conn. Tr. J. Bot., 22: 313-316.
- Klee HJ, Rogers SG (1989) Plant gene vectors and genetic transformation: Plant transformation systems based on the use of *A. tumefaciens*. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 6: 1-23, Academic Press, London.
- Koncz C, Nemeth N, Redei GP, Schell J (1992) T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. Plant Mol. Biol. 20: 963-976.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet., 204: 383-385.
- Lai EM, Chesnokova O, Banta I, Kado CI (2000) Genetic and environmental factors effecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 182: 3705-3716.
- Lai EM, Kado CI (1998) Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 180: 2711-2717.
- Lai EM, Kado CI (2000) The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. Trends Microbiol., 8: 361-369.
- Leemans J, Langenakens J, De Greve H, Deblaere R, Van Montagu M, Schell J (1982) Broad host range cloning vectors derived from the W-plasmid *Sa*. Gene, 19: 361-364.
- Leroux B, Yanofsky MF, Winans SC, Ward JE, Ziegler SF, Nester EW (1987) Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. EMBO J., 6: 849-856.
- Matthysse AG (1995) Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 177: 1069-1075.
- Matthysse AG (1983) Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. J. Bacteriol., 154: 906-915.

- McLean BG, Thorstenson Y, Citovsky V, Zupan JR, Greene E, Zambryski PC (1993) *A. tumefaciens* T-DNA transport: roles for VirB, VirD2 and VirE2. In: Nester EW, Verma PS (eds), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. pp. 37-49, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Messens E, Dekeyser R, Stachel SE (1990) A nontransformable *Triticum monococcum* monocotyledonous culture produces the potent *Agrobacterium vir*-inducing compound ethyl ferulate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4368-4372.
- Messens E, Lenaerts A, Van Montagu M, Hedges RW (1985) Genetic basis for opine secretion from crown gall tumour cells. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 344-348.
- Mirici S (2000) Kolza (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) Bitkisinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nam J, Matthysse AG, Gelvin SB (1997) Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell Rep.*, 9: 317-333.
- Neff NT, Binns AN, Brandt C (1987) Inhibitory effects of a pectin-enriched tomato cell wall fraction on *Agrobacterium tumefaciens* binding and tumor formation. *Plant Physiol.*, 83: 525-528.
- Nester EW, Gordon M (1988) Early events in the transformation of higher plants by *Agrobacterium*. In: Keen NT, Kosuge T, Walling LL (eds), *Physiology and Biochemistry of Plant-Microbial Interactions*, p.1-10, The American Society of Plant Physiologists.
- Nester EW, Gordon MP, Amasino RM, Yanofsky MF (1984) Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 387-413.
- Özcan S (1993) Tissue Culture in Pea and Engineering a Marker Gene for Specific Expression in Target Cells for Plant Transformation. Doktora Tezi, Leicester Üniversitesi, İng.
- Özcan S (1995) *Agrobacterium*: Bitkilerin doğal genetik mühendisi. *Bilim-Teknik*, 332:98-99.
- Özcan S (1995) Assesment of the susceptibility of different pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens*. *Tr.J. of Botany*, 19: 417-422.
- Özcan S (1997) Effect of marker gene location in T-DNA on gene transfer from *Agrobacterium* to plant cells. *Tr.J. of Botany*, 21: 189-195.
- Özcan S, Babaoğlu M, Sancak C (2001) Somatik embriyogenesis. In: Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (eds), *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 89-136.
- Özcan S, Firek S, Draper J (1993) Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *Bio/Technology*, 11: 218-221.
- Özcan S, Özgen M (1996) Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi*, 1: 69-95.

- Pan SQ, Charles T, Jin S, Wu ZL, Nester EW (1993) Performed dimeric state of the sensor protein virA is involved in plant-*Agrobacterium* signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 9939-9943.
- Parkinson J (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, 73: 857-871.
- Peralta EG, Helmiss R, Ream W (1986) Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the A. Tumefaciens tumor-inducing plasmid. *EMBO J.*, 5: 1137-1139.
- Potrykus I (1990) Gene transfer to cereals: an assessment, *Bio/Tech.*, 8: 535-542.
- Ream W (1989) *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 27: 583-618.
- Reuhs BL, Kim JS, Matthysee AG (1997) Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and Arabidopsis wound sites is correlated with the presence of cell-associated, acidic polysaccharide. *J. Bacteriol.*, 179: 5372-5379.
- Salomon F, Deblaere R, Leemans J, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1984) Genetic identification of functions of TR-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J.*, 3: 141-147.
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 188: 439-456.
- Schafer W, Görz A, Kahl G (1987) T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature*, 327: 529-532.
- Schell J, Van Montagu M (1983) The plasmids as natural and as practical gene vectors for plants. *Bio/Technol.*, 1: 75.
- Shaw C, Watson M, Carter G, Shaw C (1984) The right hand copy of nopaline Ti-plasmid 25 bp repeat is required for tumor formation. *Nucl. Acids Res.*, 12: 6031-6041.
- Sheikholeslam SN, Weeks DP (1987) Acetosyringone promotes high efficiency transformation of Arabidopsis thaliana explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 8: 291-298.
- Shimado N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katamaya M, Sakagami Y, Machida Y (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 6684-6688.
- Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D (1986) Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.*, 261: 108-111.
- Slightom JL, Jouanin L, Leach F, Drong RF, Tepfer D (1985) Isolation and identification of TL-DNA/plant junctions in *Convolvulus arvensis* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *EMBO J.*, 4: 3069-3077.
- Smith EF, Townsend CO (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25: 671-673.

- Song YN, Shibuya M, Ebizuka Y, Sankawa U (1991a) Identification of plant factors inducing virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. Chem. Pharm. Bull., 39: 2347-2350.
- Song YN, Shibuya M, Ebizuka Y, Sankawa U (1991b) Synergistic action of phenolic signal compounds and carbohydrates in the induction of virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. Chem. Pharm. Bull., 39: 2613-2616.
- Sökmen A, Gürel E (2001) Sekonder metabolit üretimi. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (eds), Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 211-261.
- Spencer PA, Towers GHN (1988) Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. Phytochem., 27: 2781-2785.
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 318: 624-629.
- Stachel SE, Nester E (1986) The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J., 5: 1445-1454.
- Stachel SE, Timmerman B, Zambryski PC (1987) Activation of *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression generates multiple single stranded T-strand molecules from pTiA6 region: requirement for the 5' *vir* D gene product. EMBO J., 6: 857-863.
- Stachel SE, Zambryski PC (1986b) *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. Cell, 47: 155-157.
- Stachel SE, Zambryski PG (1986a) *VirA* and *VirG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. Cell, 46: 325-333.
- Tempé J, Casse-Delbart F, (1989) Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 6: 25-49, Academic Press, London.
- Tempe J, Goldmann A (1982) Occurrence and biosynthesis of opines. In: Kahl G, Schell J (eds), Molecular Biology of Plant Tumors, pp. 427-449, Academic Press, New York.
- Tepfer D, (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiol. Plant., 79: 140-146.
- Thomashow MF, Karlinsey JE, Marks JR, Hurlbert RE (1987). Identification of new virulence locus in *A. tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant-cell attachment, J. Bacteriol., 169: 3209-3216
- Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. Cell, 19: 729-739.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*- mediated barley transformation. Plant J., 11: 1369-1376.

Tora N, Datta A, Carmi OA, Young C, Prusti RK, Nester EW (1989) The *Agrobacterium tumefaciens* VirC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. J. Bacteriol., 171: 6845-6849.

Türk SCHJ, Melchers LS, Den Dulk-Ras H, Regensburg-Tuink AJG, Hooykaas PJJ, (1991) Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the *VirA* sensor proteins. Plant Mol. Biol., 16: 1051-1059.

Uranbey S (1999) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla patatese gen aktarımı. A.Ü.Z.F., II. Ulusal Patates Kongresi, 28-30 Haziran, 207: 211, Erzurum.

Van Haute E, Joos H, Maes S, Warren G, Van Montagu M, Schell J (1983) Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for reversed genetics of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J., 2: 411-418.

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rochasosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Mol. Gen. Genet., 220: 245-250.

Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour S, Malcolm SK (1985) Resistance to hygromycin B, a new marker for plant transformation. Plant Mol. Biol., 5: 103-108.

Walkerpeach CR, Velten J (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. Plant Mol. Biol. Manual, B1: 1-19, Kluwer Academic Publishers, Belgium.

Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P (1984) Right 25 bp terminus sequence of nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. Cell, 38: 455-462.

Ward ER, Barnes WM (1988) VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of the T-strand DNA. Science, 242: 927-930

Watson B, Currier TC, Gordon MP, Chilton MD, Nester EW (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 123: 255-264.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1996) Genetic engineering of plants. In: Recombinant DNA, pp. 273-292, W.H. Freeman and Company, New York.

Whately MH, Spress LD (1977) Role of bacterial lipopolysaccharide in attachment of *Agrobacterium* to moss. Plant Physiol., 60: 765-766.

Willmitzer L, De Beukeleer M, Lemmers M, Van Montagu M, Schell J (1980) DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plants. Nature, 287: 359-361.

Yadav NS (1986) Molecular biology of plant cell transformation. In: Reinart J, Binding H (eds), Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells, pp.109-142, Berlin.

Yadav NS, Postle K, Saiki RK, Thomashow MF, Chilton MD (1988) T-DNA of a crown gall tumor is covalently joined to host plant DNA. Nature, 287: 458-461.

- Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barners, WM, Chilton MD (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on nopaline Ti Plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 6322-6326.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol., 86: 109-127.
- Zambryski P (1988) Basic process underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. Annu. Rev. Genet., 22: 1-30.
- Zambryski PC (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. Plant Mol. Biol., 43: 465-490.
- Zorreguieta A, Ugalde RA (1986) Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-Kilodalton protein intermediate in β -d(1-2) glucan synthesis. J. Bacteriol., 167: 947-951.
- Zupan JR, Ward D, Zambryski P (1998) Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Curr. Opin. Microbiol., 1: 649-655.
- Zyprian E, Kado CI (1990) *Agrobacterium*-mediated plant transformation by novel mini-T vectors in conjunction with a high-copy vir region helper plasmid. Plant Mol. Biol., 15: 245-247.

Bölüm 16

Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri

Şule Arı

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Vezneciler, 34459 İstanbul
e-posta: sari@istanbul.edu.tr

16.1. Giriş

Bitkilere gen aktarımı çalışmaları yüzyıllardan beri bitki ıslahı adı altında yapılmaktadır (Murray, 1993). Bitki ıslahı çoğunlukla kolay belirlenebilir özelliklerden yararlanılarak üstün niteliklerin aynı bitkide toplanmasını sağlayacak biçimdeki melezlemeler, bunu takibende döller boyunca üstün nitelikli tiplerin seçimi ve istenmeyen tiplerin atılması şeklinde yapılır. Günümüzde klasik ıslah, üstün tiplerin elde edilmesi amacıyla halen etkin biçimde kullanılmakla birlikte; 80'li yıllardan itibaren geliştirilen genetik mühendisliği yöntemleri, bazı uygulamalar için klasik ıslah çalışmalarına yardımcı, bazıları için ise alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır.

Klasik yöntemlerle genetik çeşitliliğin genişletilmesi için çok sayıda ve uygun özellikler taşıyan genitör bitki populasyonlarına ihtiyaç vardır. Populasyon boyutlarındaki artış ise yer, zaman ve finansman artışını da beraberinde getirmektedir. Buna karşın, doku kültürü tekniklerinin uygulanmasıyla laboratuvar koşullarında genetik müdahalelerin kültüre alınan bitki kısımlarına uygulanması mümkündür (Fraley ve Schell, 1992). Bitkilerin kök, gövde, yaprak, üreme organları ve hücreleri gibi değişik kısımları *in vitro* koşullarda besin maddeleri, hormonlar ve vitaminler gibi kimyasal; ışık, sıcaklık ve nem gibi fiziksel gereksinimleri sağlandığında kültüre alınabilmektedir (Vasil, 1988). Doku kültürü olarak tanımlanan bu yöntemler kullanılarak, kültüre alınan bitki hücreleri ya da

dokularına gen aktarımı yapılabilmekte, daha sonra da özellikle uygun besin ortamı ve hormonların varlığında gen aktarılmış bitki kısımları olgun bitki haline getirilerek (rejenerasyon), aktarılan genin özelliğini taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Laboratuvar koşullarında gen aktarım yöntemleri kullanılarak klasik ilah yöntemlerine göre çok daha küçük mekanlarda, mevsimsel ve seksüel kısıtlamalara bağımlı olmaksızın, kısa sürelerde, istenilen bitkiye istenilen genetik özellik kazandırılabilir.

Bitkilere gen aktarımı çalışmaları, 1982-1983 yıllarında başlamış ve 1983'de transgenik bitkilerde aktarılan genin ifadesinin başarılması (Lamb ve Beachy, 1989); genlerin yapı ve fonksiyonlarının analizi, düzenleme mekanizmalarının aydınlatılması gibi temel biyolojik konuların araştırılmasında yeni ve güçlü bir yöntem olarak yerini almıştır. Gen aktarım sistemleri kullanılarak bitki gelişiminin kontrolü ile ilgili süreçler araştırılabilir. Hareketli genetik elementler (transpozonlar) ve T-DNA, insersiyonel (yerleşme) mutagen olarak fonksiyon gösterdiğinde bitki genlerinin kodlayıcı ve regülatör dizilerinin tanımlanması ve izolasyonunda kullanılmaktadır (Koncz ve ark., 1989; Şahin ve ark., 1997). Transgenik bitkiler; metabolik yolların tanımlanması, genin çalışmasını kontrol eden *cis* ve *trans* etkili elementlerin belirlenmesi (Lam, 1995) ve çeşitli çevresel stress koşullarına verilen tepki mekanizmalarının anlaşılması açısından önemli araçlar haline gelmiştir.

Bu temel uygulamalara ilave olarak, gen aktarımı ile bitkilere çeşitli çevresel baskılara (kuraklık, don, yüksek asidite ve tuzluluk vb.), bakteriyel, viral ve fungal hastalıklarla, herbisitler ve pestisitler gibi çeşitli kimyasal bileşiklere dayanıklılık özelliği kazandırılabilir (Lindsey ve Jones, 1989). Ayrıca, bitkilere gen aktarım çalışmalarının diğer hedefleri arasında;

- 1) Tahılların besin kalitesinin artırılması (depo proteinleri, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi endojen ürünlerin miktar ve kompozisyonlarının değiştirilmesi) ve gıda dışındaki sektörler için hammadde olarak kullanılan nişasta, protein ve yağ kalitesinin geliştirilmesi (Bilang ve Schrott, 1995),
- 2) Bitkilerin sekonder metabolitler, antibiyotikler ve aşılarda ilaç endüstrisinde kullanılan değerli maddeleri bol miktarda üretmeleri (Flavell, 1995),
- 3) Toprak, su, ışık ve gübre gibi ucuz gereksinimleri nedeniyle mikroorganizmalar veya hayvan hücrelerine alternatif olarak yabancı kaynaklı genlerin aktarılmasıyla, bitkilerde heterolog proteinlerin üretimi (Whitelam ve ark., 1993) sayılabilir.

Yukarıda belirtilen amaçlar doğrultusunda günümüzde hem tek çenekli hem de iki çenekli gruba ait bitki türlerine; bitki (Jensen ve ark., 1986; Lawton ve ark., 1987), hayvan (Lindsey ve Jones, 1989), insan (Sijmons ve ark., 1990; Krebbers ve Vanderkerckhove, 1990), maya (Sonnewald ve ark., 1993), bakteri (Pen ve ark., 1993; Stalker ve ark., 1988) ve virüs genleri (Powell ve ark., 1986; Day ve ark., 1991)

ile laboratuvarında geliştirilmiş sentetik genlerin (Owen *ve ark.*, 1992; Arı *ve ark.*, 1997) aktarımı başarıyla yapılabilmektedir.

16.2. Gen Aktarımının Prensipleri

En genel anlamıyla 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 (competent) olup, aynı zamanda farklı doku veya tam bir bitki gelişimi gösterebilme özelliğine (totipotensi) sahiptirler. Bu şekilde gen aktarımı yapılmış olan bitki hücrelerinden kimerik veya transgenik bitkiler elde edilebilir. Transgenik bitki eldesi için yabancı DNA parçasının (gen ya da genlerin) bitki genomuna aktarılmasını takiben genom içinde stabil bir biçimde entegrasyonu ve entegre olan yeni genin kendisini ifade edip, daha sonraki döllere de yeni özelliğin taşınması gereklidir.

16.2.1. Genetik transformasyonda kullanılan alıcı hücreler

Başarılı bir genetik transformasyon, aktarılacak geni kabul edip sonra bölünme ve değişme ile tam bir bitki haline gelebilecek hedef hücrelere bağlıdır. Günümüzde, doku kültürü teknikleri kullanılarak hedef hücre yelpazesi oldukça genişletilmiştir. Transformasyon için kullanılacak hücreler; yaprak, gövde, hipokotil, kotiledonlar, embriyolar, üreme hücreleri ya da kallus, süspansiyon ve protoplast kültürüne ait hücreler olabilir.

16.2.1.1. Alıcı hücrelerin fizyolojisi

Bitki hücrelerine gen aktarımı çalışmalarında, çalışmanın amacına bağlı olarak genetik bilgiyi alacak hücrelerin farklı düzeylerde yeterlilik göstermeleri gerekir. Örneğin genlerin fonksiyonları ve düzenlemeleri ile ilgili çalışmalarda aktarılan DNA veya RNA'nın hücreye alınmasını sağlayacak düzeyde yeterlilik ve geçici (transient) ifade kafi olmaktadır. Oysa transgenik (gen aktarımı yapılmış) doku oluşturmak için, gen aktarımı yapılan hücrelerde, aktarılan nükleik asit molekülü ister epizomal şekilde (genoma bağlı olmayan) isterse genomik insert halinde (genoma dahil) olsun mutlaka replikasyon geçirmelidir. Transgenik bir bitki elde etmek için ise transgenik hücreler farklılaşma göstererek tam bir bitkiyi oluşturacak özellikte, yani totipotent olmalıdır.

Transformasyon ve rejenerasyon için bir bitki hücresinin yeterlilik göstermesi, bitkinin genotipine, fizyolojik durumuna ve gelişim evresine bağlıdır. Uygun fizyolojik durum; seçilen doku kültürü yöntemleri, potansiyel olarak yeterli olan

hücrelerin kullanımı, mekanik ya da enzimatik yaralama veya hormon uygulamasıyla elde edilebilir. Bununla beraber, bitki türlerinin rejenerasyon kabiliyeti önemli bir kısıtlama oluşturmaktadır. Örneğin, iki çenekli bitkiler çok daha kolay rejenerasyon gösterirken, tek çenekli bitkiler genellikle kültürde daha zayıf rejenerasyon cevabı verirler. Birçok iki çenekli bitki türünün yaprakları *Agrobacterium* ile, ya da izole edilmiş protoplastları doğrudan gen aktarımı yöntemleri ile transformasyon için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Tek çenekli bitkilerde ise olgunlaşmamış embriyo ya da genç dokular en uygun embriyogenik hücre kaynaklarıdır. Bu hücreler öncelikle kültürde çoğaltılarak hücre kitlelerini oluşturmaktadır. Daha sonra da mikro-enjeksiyon veya partikül bombardmanı için, ya da kimyasal ve elektriksel yöntemlerle gen aktarımı yapmak üzere protoplast kaynağı olarak kullanılmaktadırlar.

16.2.1.2. Somoklonal varyasyon

İdeal olarak hücre veya dokulardan rejenere olan tüm bitkilerin ebeveyn bitkinin aynısı (özdeş) olmaları beklenir. Oysa, bitki rejenerasyon süreci başlıbaşına hücrelerin genetik stabilitelerinin bozulması ve genetik varyasyon oluşumu için bir etkidir. Kültüre alınan hücrelerde kendiliğinden ortaya çıkan bu genetik çeşitlilik somoklonal varyasyon olarak isimlendirilir (Evans, 1989; Bürün, 2001). Yer değişimi (translokasyon), eksilme (delesyon), yerleşme (insersiyon) veya nokta mutasyon şeklinde kendiliğinden ortaya çıkan bu varyasyonlar yeni varyantların oluşturulmasında faydalı olabilmektedir (Evans, 1989). Genetik transformasyon sisteminde ise yeni aktarılan özelliğin dışında rejenere olan bitkinin tamamen gen aktarılmamış bitkinin aynısı olması istenir.

Kullanılan dokunun tipi, besin ortamının bileşimi, kültür süresi gibi faktörlerin somaklonal varyasyonu etkilediği bilinmektedir. Ayrıca, gövde veya kök meristemi gibi dokulardan rejenere olan bitkilerde, süspansiyon kültürü ya da protoplastlardan rejenere olan bitkilere göre daha az varyasyon görülmektedir (Stafford, 1991). Bu nedenle, somoklonal varyasyonu en aza indirmek için kültür ve rejenerasyon koşulları kontrol altında olmalıdır.

16.2.2. Aktarılan nükleik asit moleküllerinin özellikleri

Bitkilere aktarılan nükleik asit molekülleri basit yapıdadırlar (bkz. Bölüm 12). Genellikle aktarılacak DNA parçası, aktarılmak istenen gene ilave olarak;

- 1) Aktarılmak istenen genin bitki dokularında ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici diziler (promotorlar),
- 2) Sadece gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların seçimi için seçici bir işaret (markör) geni,

- 3) Aktarılan genin bitkide ifade edilip edilmediğinin anlaşılmasına yardımcı olmak üzere yer alan raportör gen den oluşur.

Bitkiye aktarılmak istenen genin bu gerekli dizileri içerecek hale getirilmesi için öncelikle *in vitro* rekombinasyon teknikleri kullanılarak uygun düzenlemeler yapılır.

16.2.2.1. Promotorlar

Gen aktarımı çalışmalarında kullanılan promotorlar (bkz. Bölüm 13, 14); bitki, virüs veya bakteri kökenli olabilirler. Promotorların bazıları konstitütif (sürekli ve bitkinin tüm organlarında aktif) ifade sağlarken, bazıları doku- veya organ-spesifik ifadeye sahiptirler veya ifadeleri çevresel koşullar tarafından başlatılır. Tablo 16.1'de bu üç tip promotora ait örnekler verilmiştir.

Gen aktarımı çalışmalarında promotor seçimi, aktarılan genin istenilen etkiyi gösterebilmesi (konstitütif veya geçici ifade) özelliğine göre yapılır. Stabil bir transformasyon çalışmasında 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 (Jensen *ve ark.*, 1986; Harpster *ve ark.*, 1988). CaMV 35S promotoru konstitütif olup, aynı virüsün 19S promotorundan daha yüksek düzeyde ve transgenik bitkinin çeşitli organlarında aktif olduğundan 19S promotorundan daha geniş bir kullanım alanına sahiptir. Nopalin sentaz (*Nos*) ve alkol dehidrogenaz-1 (*Adh-1*) genlerinin promotorları da bitki hücrelerinde aktarılan genlerin konstitütif ifadesi için kullanılır. Mısır ubiquitin I ve çeltik aktin promotorları tek çenekli bitkilerde yüksek ifade sağlarlar. Geçici gen ifadesi çalışmaları için ise, konstitütif ifade sağlaması nedeniyle yine CaMV 35S promotoru kullanılmaktadır. Hem stabil hem de geçici ifade çalışmaları için yaygın bir biçimde kullanılmasına rağmen, CaMV 35S'nin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. CaMV 35S promotorunun bazı kısımları duplike edilerek raportör genlerin ifadesi 100 kattan daha fazla artırılabilmiştir (Kay *ve ark.*, 1987). *Mac* diye adlandırılan ve *Agrobacterium tumefaciens* oktopin Ti plazmidinin T-DNA'sından elde edilmiş olan mannopin sentaz (*Mas*) geninin promotoru ile CaMV 35S promotorunun artırıcı (enhancer) bölgesinin birleştirildiği hibrid promotorun ise GUS ifadesini, duplike promotora göre çok daha fazla artırdığı saptanmıştır (Comai *ve ark.*, 1990). Daha yüksek düzeyde gen ifadesi elde etmek amacıyla promotorlarda yapılan manipülasyonlara bir diğer örnek *Adh-1* promotorudur. Mısır alkol dehidrogenaz-1 geninde bulunan intronların bu promotora ilavesi ile GUS raportör geninin çok daha etkin bir ifadesi elde edilmiştir.

Bitkilere gen aktarımı çalışmalarında kullanılan bazı promotorlar ise organ- veya doku-spesifik ifade sağlarlar. Organ- veya doku-spesifik promotorlar, aktarılan genlerin sadece bitkilerin tohum, yumru, meyve gibi yenen kısımlarında ifadeleri

istendiği durumlarda önemlidirler. Tohum depo protein genlerinin promotor dizileri, depo proteinlerin organellerde depolanmasını sağlayan amino asit sinyal dizileri ile biraraya getirilerek, yabancı genin organ-spesifik ifadesi sağlanabilir. Bu tip promotorların örnekleri Tablo 16.1’de verilmiştir

Bazı durumlarda aktarılan genin gerekli olduğu zaman ifade edilmesi istenir. Bu amaç için kullanılan promotorlara uyarılabilir promotorlar 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 engeleyebilir. Uyarılabilen promotorlar arasında yaralanma, patojen enfeksiyonu, anaerobik koşullar, bitki hormonları, ışık ve ısı gibi diğer fiziksel koşullar ile aktif hale gelen promotorlar sayılabilir (Williams *ve ark.*, 1992; Özcan *ve ark.*, 1993). Bunlardan ısı-şoku promotorları, ısı artışı ile uyarılabilmektedir. GUS genine soya fasulyesinin ısı-şoku protein geninin (Gmhsp 175E) m-RNA lider bölgesine ait bir dizi eklendiğinde bu promotor ile GUS ifadesi sıcaklık yükselmesiyle normal GUS kasetine (CaMV 35S -GUS) göre birim zamanda 80 kat artmıştır (Ainley ve Key, 1990).

Tablo 16.1. Bitkilere gen aktarımında yaygın olarak kullanılan promotorlar.

Konstitütif Promotorlar	Kaynak
Nos	Nopalin sentaz
Ocs	Oktopin sentaz
Man	Mannopin sentaz
CaMv 35S, 19S	Karnabahar mozayik virüsü
Doku Spesifik Promotorlar	İfade Olduğu Doku
α -amilaz	Aleuron
Glutenin	Endosperm
Patatin	Yumru
Faseolin	Kotiledon
Konglisin	Kotiledon
Uyarılabilir Promotorlar	Uyarılma Koşulları
Rubisko’nun küçük alt birimi	Işık
Klorofil a/b bağlanma proteini	Işık
Alkol dehidrogenaz-1	Anaerobik koşul
Isı-şoku proteini	Isı yükselmesi
Patates inhibitör-2	Yaralanma

16.2.2.2. Seçici işaret (markör) genleri

Bir gen aktarımı çalışmasında transformantların, yabancı DNA'yı almamış doku veya hücrelerden ayırt edilebilmesi için, aktarılan DNA parçasında seçici işaret (markör) genleri de bulunmalıdır. Bitkilerle yapılan gen aktarımı çalışmaları için kullanılan çeşitli seçici işaret genleri Tablo 16.2'de verilmiştir. İşaret genleri arasında en yaygın olarak kullanılanı bakteriyal bir transpozon olan Tn5'den elde edilen *npII* 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. İşaret genleri, çok çeşitli vektörlerde farklı promotorların kontrolü altında ve çeşitli bitki türlerinde çalışabilmektedir. *NpII* geni aktarılmış bütün 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. *Escherichia 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 kahveye 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 kazanılamayıştır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla *hpt* geni kuvvetli promotorlarla birlikte kullanılmaktadır. DNA'da oluşturduğu kırıklara bağlanabilen bir glikopeptid olan bleomisin, Tn5 kökenlidir ve seçici işaret gen olarak tütünde başarılı bir biçimde kullanılmıştır. Ayrıca, çeşitli herbisitlere karşı dayanıklılık oluşumundan sorumlu olan genler (*bar*, *aroA*, *als*) de seçici işaret gen olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında bakteriyal ya da memeli sistemine ait dihidrofolat redüktaz (*dhfr*) bazı vektörlerde işaret gen olarak kullanılmakla beraber, *npII* ve *hpt* kadar yaygın değildir (Herrera-Esterella ve Simpson, 1989). Seçici işaret gen 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.

16.2.2.3. 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 ürününün kolaylıkla ayırt

edilebileceği raportör genlerin yerleştirilmesi gerekebilmektedir. İyi bir raportör gen şu özellikleri taşımalıdır (Herrera-Esterella ve Simpson, 1989):

- 1) Ürünü bir enzim olmalı ve konakta endojen aktiviteye sahip olmamalı,
- 2) Gen ve gen ürünleri genetik ve biyokimyasal olarak iyi karakterize edilmiş olmalı,
- 3) Gen ürünü farklı fizyolojik koşullarda (organ, doku, pH, ışık vb.) stabil olmalı,
- 4) Enzimatik aktivite kolaylıkla saptanabilmeli ve ölçülebilmeli,
- 5) İfadesi gen aktarımı yapılmış hücrelerde kolaylıkla gözlenebilen bir fenotipik değişikliğe (renk oluşumu gibi) neden olmalıdır.

Çeşitli seçici işaret ve raportör genler Tablo 16.2'de verilmiştir.

Tablo 16.2. Gen aktarımında kullanılan seçici işaret ve raportör genleri.

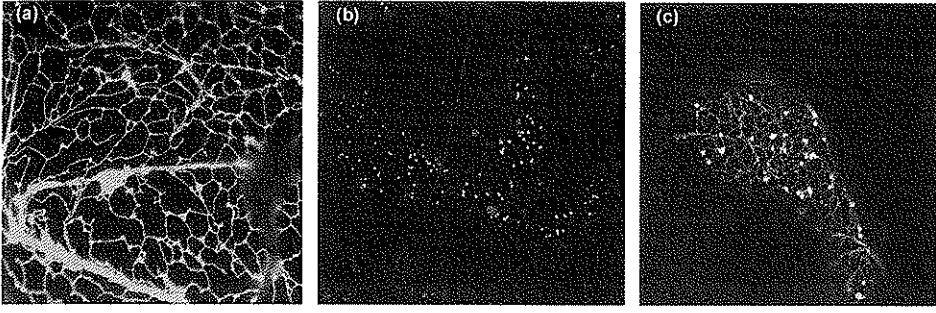
İşaret Geni	Kodladığı Enzim	Kazandırdığı Dayanıklılık
Antibiyotik		
<i>NptIII</i>	Neomisin fosfotransferaz	Kanamisin Neomisin G418 Paramomisin
<i>Hpt</i> veya <i>aph IV</i>	Higromisin fosfotransferaz	Higromisin
<i>Dhfr</i> (bakteriyel/fare)	Dihidrofolat redüktaz	Metotreksat
Herbisit		
<i>Bar</i>	Fosfinotrisin asetil transferaz	Fosfinotrisin
<i>Aro A</i>	5-fenolpirüvilsikimat-3-fosfat sentaz	Glifosat
Modifiye <i>als</i> genleri	Asetohidroksi asit sentaz	Klorosulfuron imidazolanonlar
Raportör Gen		
<i>Cat</i>	Kloramfenikol asetil transferaz	
<i>Gfp</i>	Yeşil floresan proteini	
<i>Gus</i>	β -glukuronidaz	
<i>Npt II</i>	Neomisin fosfotransferaz	
<i>Luc</i>	Lüsiferaz	
<i>Bar</i>	Fosfinotrisin asetil transferaz	
<i>β-gal</i>	β -galaktozidaz	

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 aktiviteye sahip olmayışı ve gen ifadesi sonucu oluşan ürünlerin spektrofotometrik, histokimyasal veya florimetrik metotlarla (GUS assay, Jefferson *ve ark.*, 1987) kolaylıkla belirlenebilmesidir (bkz. Bölüm 15). Bitkiler için kullanılan ilk raportör gen olan oktopin sentaz (*ocs*) *Agrobacterium* ile enfeksiyon sonucu oluşan kökboğazı tümörlerinde üretilen ve bakteri tarafından C ve N kaynağı olarak kullanılan bir opin olan oktopine aittir. *Ocs* 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. Kloramfenikol asetil transferaz (*cat*) bitki hücrelerinde başarılı bir şekilde aktivite gösteren ilk bakteri genidir. *Cat* geni bitkilerin dışında, raportör gen olarak prokaryotik canlılar ve memelilerde de kullanılmaktadır. Kloramfenikol asetil transferaz enzimi (CAT), kloramfenikolu spesifik olarak asetilleyerek, bu antibiyotiği inaktif hale getirmektedir. Tanımlanan *cat* genlerinden enzimatik raportör olarak kullanılan transpozon Tn9'da, plazmid R6 ve pBR325'de bulunmaktadır. Bu gen hayvansal sistemde, *Saccharomyces cerevisiae*'de ve *Bacillus subtilis*'de gen ifadesi çalışmaları için kullanılan bir genidir. Bitkisel sistemde de gen ifadesinin regülasyonu araştırmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. CAT aktivitesi enzimatik yolla kolay ve hassas bir şekilde saptanabilmektedir. *Cat* raportör geninin en önemli dezavantajı, bazı bitki türlerinin (domates ve bezelye gibi) spesifik olmayan asetilaz aktivitesine sahip olmalarıdır. Bitki asetilazı da kloramfenikolu asetilleyebilmektedir. Ancak, bu spesifik olmayan düşük asetilaz aktivitesi gen ifadesi çalışmalarını etkilemeyebilir (Webb ve Morris, 1992).

NpII bitkilere gen aktarımı çalışmalarında seçici işaret geni olarak kullanılmasının yanısıra, raportör gen olarak da kullanılmaktadır. Genin aktivitesi, fosforile ettiği antibiyotiklerin ölçülmesi ile belirlenir. Bitkisel sistemde kullanılan bir diğer raportör gen lusiferazdır (*luc*). Ateş böceği (*Photinus pyralis*)'ne ait olan bu gen, lusiferinin ATP'ye bağlı oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder. Bu gen ateş böceğinden izole edilip, istenilen bitki promotörü ile birleştirilebilir. Transgenik bitkinin yaydığı ışığın 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile gen aktivitesi belirlenir. Ayrıca, diğer raportör genlerden farklı olarak *in vivo* olarak da *luc* aktivitesi izlenebilir. Bitkilerin, enzim substratı olan lusiferin ile sulanması sonucu ışık oluşumu saptanabilir (Lindsey ve Jones, 1989).

Yaygın bir biçimde kullanılan yukarıdaki raportör genlere ilave olarak 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 anasından 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 nedeniyle. *Gus* ve *luc* (lusiferaz) gibi diğer raportör genlerinden farklı olarak *gfp* geninin transferinin gerçekleşip gerçekleşmediği canlı doku veya hücrelerde yeşil renk vermesiyle anlaşılabilen ve dokuların canlılığı korunmaktadır (Şekil 16.1).



Şekil 16.1. Bitkilerde *gfp* geninin ifadesi. (a) GFP-HDEL sinyal peptidinin *Nicotiana clelandii* yaprak hücrelerinde ifadesi, b) Tütün yaprak hücrelerinde bulunan golgi cisimciğinde GFP proteininin ifadesi (c) GFP-ERD2'nin *Nicotiana clelandii* yaprak hücrelerinin endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciğinde ifadesi [Fotoğraflar M. Babaoğlu aracılığıyla Oxford Brookes Üniversitesi'nden Petra Boevink ve Chris Hawes (a ve c), Claude-Saint Jore ve Chris Hawes (b) tarafından sağlanmıştır].

Gfp geni çeşitli bitkilere aktarılmış ve bu bitkilerde de benzer sonuçlar alınmıştır. *Gfp* ile ilgili daha detaylı bilgiler; Haseloff ve Amos (1995), Heim ve ark. (1995), Sullivan ve Kay (1999) tarafından bildirilmiştir.

16.2.3. Gen aktarım sistemleri

Bitki hücrelerinin transformasyonu için kullanılan teknikler, nükleik asitlerin sırasıyla bitki hücre duvarından, plazma ve nükleus zarından geçerek hücrenin canlılığına zarar vermeyecek şekilde geliştirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* gibi doğal vektörler çok sayıda iki çenekli bitki türüne başarıyla gen aktarımı için kullanılmaktadır (bkz. Bölüm 15). 80'li yılların sonlarına doğru yapılan çalışmalar, *Agrobacterium* ile etkin transformasyonun daha çok iki çenekli bitkilerde sağlanabildiğini göstermiştir (Gasser ve Fraley, 1989). Öte yandan, yapılan ilk çalışmalarda tek çenekli bitkilerde *Agrobacterium* ile gen aktarımının etkin olmadığı gösterilmiştir. *Chlorophytum*, *Narcissus*, *Zea mays* ve *Galdiolus* gibi tek çenekli bitki türlerinde *Agrobacterium* ile inokülasyon sonucunda opin salgılayan küçük tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir (Hooykas van Slogteren ve ark., 1984; Graves ve Goldman, 1986; 1987). Önceleri, T-DNA'nın tek çenekli bitkilerin genomuna aktarılması, *Liliacea* ve *Dioscorea* familyaları dışında kesin olarak saptanamamıştır. *Liliacea* familyasından *Asparagus officinalis* ve *Dioscorea bulbifera* genomlarında T-DNA transferine ilişkin belirli oranda nükleik asit miktarına rastlanmasına rağmen, bu sonuçlar diğer tek çenekli familyalarda *Agrobacterium* sisteminin kullanımı için tatmin edici bulunmamıştır (Bytebier ve ark., 1987). Öte yandan, *Agrobacterium* T-DNA'sı aracılığıyla viral DNA moleküllerinin mısır hücrelerinde replike olabildiği (Grimsley ve ark., 1987), mısır, arpa ve diğer bazı tahılların *Agrobacterium*'un T₁ ve R₁ plazmitlerini taşıyan bakteri ırkları ile enfekte olabileceği gösterilmesine rağmen T-

DNA'nın entegrasyonuna ait bir kanıt elde edilememiştir (Boulton ve ark., 1989). Çeltikte ise *Agrobacterium* ile gen aktarımı sağlanmış ve bitki genomunda T-DNA dizisinin varlığı gösterilmiştir (Hiei ve ark., 1994).

Önceleri, *Agrobacterium* ile tek çenekli bitkilere gen aktarımı, kısmen *Liliaceae*, *Amarahyllaceae* ve *Dioscorea* familyalarında uygulanabilmesine karşın, T-DNA'nın bitki genomuna aktarılma frekansının düşük olması nedeniyle bu yöntem *Gramineae* familyasında rutin olarak kullanılamamıştır. Tahılların *Agrobacterium*'un doğal konukçu sınırı içinde bulunmaması, bu transformasyon sisteminin kullanımında, en önemli engel olmuştur. Bir diğе engel ise tek çenekli bitkilerin yaralanmaya karşı tepkisiz olmalarıdır. Sonuçta, T-DNA'nın hücrelere yüksek düzeylerde aktarımının ve genoma entegrasyonunun sağlanmasına karşın, alıcı (receptor) hücrelerin ölümü nedeniyle yeni transgenik hücre klonlarının oluşumu mümkün olmamıştır (Potrykus, 1990). Ancak, son yıllarda süper binari vektörlerin geliştirilmesiyle tek çenekli bitkilere de gen aktarımında *A. tumefaciens* rutin olarak kullanılmaktadır (bkz. Bölüm 15).

Başlangıçta, *Agrobacterium* sisteminin tahılların da içinde bulunduğu tek çenekli bitkilerde kullanımının sınırlı kalması, DNA'nın doğrudan aktarımını sağlayabilecek yöntemlerin geliştirilmesi yolundaki çalışmaları hızlandırmıştır. Doğrudan gen aktarım yöntemlerinde, gen dizilerinin transferi *Agrobacterium* gibi bir aracı kullanılmadan yapılmaktadır (Walden ve Wingender, 1995). Doğrudan gen aktarımı için kullanılan yöntemlerin *Agrobacterium* sistemi ile karşılaştırılması Tablo 16.3'de verilmiştir. Doğrudan gen aktarım yöntemlerinin *Agrobacterium* sistemine göre iki temel üstünlüğü; birçok bitki türünde uygulanabilmesi ve aktarılan genlerin ifadelerinin kısa bir süre içinde saptanabilmesidir (Potrykus ve ark., 1987a; 1987b; Saul ve ark., 1987; Fromm ve ark., 1987; Bilang ve Schrott, 1995).

16.3. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri

Agrobacterium'a dayalı gen aktarım (bkz. Bölüm 15) sisteminin etkin bir biçimde kullanılmadığı bitki türlerine gen aktarımı için çoğunlukla doğrudan gen aktarım yöntemleri kullanılmaktadır. Kültüre alınan hayvan ve bakteri hücreleri içine doğrudan gen aktarım yöntemleriyle genlerin aktarılması ve bu genlerin ifade göstermeleri araştırmacıları, aynı yöntemlerin bitkiler için de kullanılabileceği fikrine yöneltmiştir. Bitkilere doğrudan gen aktarımının ilk başarılı örneği, *Agrobacterium*'a ait 120 kb'lık T₁ plazmidinin Petunya ve tütün protoplastlarına aktarılmasıdır (Draper ve ark., 1982; Krens ve ark., 1982). Bunu, işaret ve raportör genleri taşıyan daha küçük boyutlu plazmidlerin (5-10 kb) aktarımları izlemiştir (Webb ve Morris, 1992).

Doğrudan gen aktarım teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemler; kimyasal yöntem, elektroporasyon, mikro-enjeksiyon ve biyolistik (partikül tabancası veya bombardmanı)'dır. Bununla beraber bitki türüne bağlı olarak her

gen aktarım çalışması için evrensel bir gen aktarımı yöntemi olmadığından, halen bu metotlara yenileri eklenmekte ya da bazen bu yöntemlerin bazıları birlikte kullanılmaktadır. Bitkilere doğrudan gen aktarım için uygulanan teknikler topluca aşağıda verilmiştir.

Tablo 16.3. Gen aktarımında yaygın olarak kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
<i>Agrobacterium</i>	1. Yüksek derece etkinlik 2. Uzun DNA dizilerinin aktarılabilmesi 3. Çoğunlukla tek ya da az sayıda T-DNA entegrasyonu 4. Uygulama için özel bir donanım ihtiyacı olmaması	1. Sınırlı konukçu alanı 2. Genetik bilginin sadece T-DNA aracılığıyla aktarımı
Kimyasal Yöntemler ve Elektroporasyon	1. Basit kullanım 2. Tek denemede birçok örneğe uygulanabilirlik 3. Kimyasal yöntemler için özel bir donanım ihtiyacı duyulmaması	1. Aktarılan DNA'da yüksek derecede yeni düzenlemeler görülmesi ve çok sayıda kopyanın entegrasyonu 2. Kimyasal yöntemlerde transgenik bitki üretimi için protoplast kültürü ve rejenerasyon sistemlerinin kurulması 3. Somoklonal varyasyonda artış
Mikro-enjeksiyon	1. Genotipten bağımsız olarak kullanım 2. Çok çeşitli hedef hücre ve dokulara uygulanabilirlik 3. Uygulamada görsel kontrol olanağı	1. Kompleks ve pahalı donanım gereksinimi 2. Başarı için deneyim gerekliliği
Biyolistik	1. Genotipten bağımsız kullanım 2. Farklı hedef hücre ve dokulara uygulanabilirlik 3. Transgenik tahlil elde etmek için güçlü bir yöntem olması	1. Kompleks ve pahalı donanım gereksinimi 2. Aktarılan DNA'da yüksek derecede yeni düzenlemeler görülmesi ve çok sayıda kopyanın entegrasyonu.

16.3.1. Agro-enfeksiyon

Agrobacterium aracılığı ile gen transferi (Özcan ve Özgen, 1996) doğrudan gen aktarım tekniklerinin arasında yer almamasına karşın, agro-enfeksiyon tahıllara gen aktarımında kullanılan bir yöntem olduğundan burada değinilmiştir. Bu yöntem, *Agrobacterium* sistemi ile viral enfeksiyonun bir kombinasyonudur. T 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 (Grimsley, 1990). Agro-enfeksiyon ile DNA gemini virüslerinden mısır çizgi virüsü (MSV)'nün mısırdaki ve buğday cücelik virüsü (WDV)'nün de buğdayda sistemik virüs enfeksiyonuna neden olması (Grimsley ve ark., 1987), tahıllara T-DNA transferinin mümkün olabileceğini göstermiştir. Çeltikte de agro-enfeksiyon ile stabil bir gen aktarımı başarılmıştır. *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımının yapıldığı çeltik skutellum kalluslarında yüksek gen aktarım frekansı (%10-30) elde edilmiş ve bu kalluslardan rejenerasyon sonucu bitkiler üretilmiştir (Hiei ve ark., 1994).

16.3.2. Makro-enjeksiyon

Oldukça basit bir yöntem olan makro-enjeksiyonda, aktarılmak istenen DNA'yı taşıyan plazmid solüsyonunun fideciklere enjeksiyonu ile gen aktarımı gerçekleştirilir. Pena ve ark. (1987) tarafından çavdarın olgunlaşmamış çiçek meristeminin altındaki gövde bölgesine *nptIII* geni aktarılmış ve enjeksiyon yapılmış bitkiden elde edilen tohumlar kanamisinine dayanıklılık bakımından seçilmişlerdir. Kanamisinine dayanıklı fideciklerde yapılan Southern analizi ile stabil bir entegrasyon gösterilmiş, ancak bu yöntem diğer tahıllara uygulanamamış ve yeterince geliştirilememiştir.

16.3.3. Protoplastlara gen aktarımı

Enzimatik yollarla hücre duvarları uzaklaştırılmış bitki hücreleri, yani protoplastlar hücre süspansiyon kültürü, kallus kültürü ve farklılaşmış bitki dokularından izole edilebilir (Babaoğlu ve Özcan, 2001). Kimyasal maddeler yardımıyla, lipozomlarla veya membran geçirgenliğinin elektrik akımı ile değiştirilmesi (elektroporasyon) sonucunda protoplastlar gen aktarımında kullanılabilir. Protoplastların ideal eksplant olarak kullanılmasının nedenleri ise şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Hücre zarı ile çevrili olduklarından deneysel olarak belirlenmiş konsantrasyonlardaki DNA'yı içlerine almaları kolaydır.

- 2) Enzimatik veya mekanik yolla yapılan izolasyon işlemleri aynı zamanda hücre yaralanmalarını artırmakta, bu durum hücrelerin rejenerasyon yeteneğini ve entegratif transformasyonu teşvik edebilmektedir.
- 3) Hücrelerin DNA molekülleri ile teması kolay olduğundan transgenik bitki elde etme şansı fazladır.
- 4) 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 olmayışındır. Ancak, embriyonik hücre kültürlerinin kullanımı ile mısır (Rhodes *ve ark.*, 1989), buğday (Vasil *ve ark.*, 1990) ve arpada (Yan *ve ark.*, 1990) başarılı sonuçlar alınmıştır.

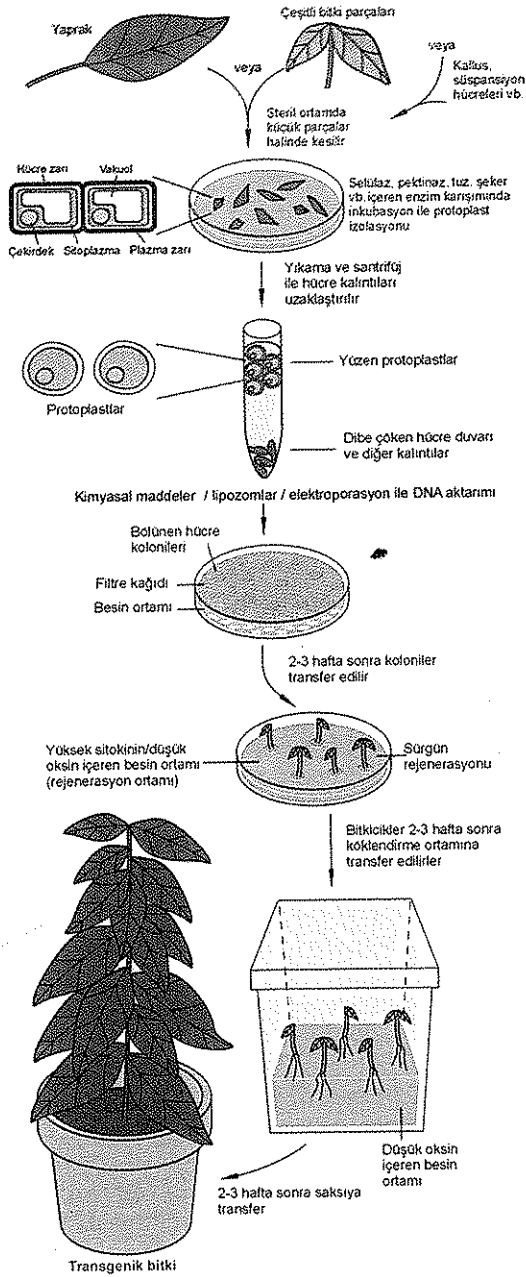
Protoplastlara kimyasal ve elektriksel (elektroporasyon) yolla veya lipozomlarla gen aktarılabilir (Şekil 16.2).

16.3.3.1. Kimyasal yöntemlerle protoplastlara gen aktarımı

Polietilen glikol (PEG), polivinil alkol veya kalsiyum fosfat gibi kimyasal maddelerle protoplastların hücre zarlarının geçirgenlikleri geri dönüşümlü olarak artırılabilir (Babaoğlu ve Özcan, 2001). Genetik transformasyon için protoplastlar, DNA ve kimyasal maddeler ile birlikte inkübe edilir. Kimyasal maddeler yardımıyla protoplastlara DNA aktarımında çeşitli parametrelerin gen aktarım frekansı üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bitki türü, kültür koşulları, protoplast kaynağı ve izolasyon için kullanılan yöntemlerin yanı sıra, transformasyon için kullanılan tampon ve katyonlar, taşıyıcı DNA'nın varlığı ve konsantrasyonu, plazmid ve taşıyıcı DNA formu, hücre döngüsü, PEG gibi gen aktarımına yardımcı kimyasal maddelerin konsantrasyonu bu parametrelerden önemli olanlardır.

16.3.3.2. Lipozomlarla protoplastlara gen aktarımı

DNA taşıyan lipozomların bitki hücrelerinin hücre zarı ile füzyonu, bitkilere gen aktarımında kullanılan yöntemlerden bir diğeridir (Caboche, 1990). DNA molekülleri, lipozomlar içinde kapsüllendikten sonra çeşitli dokulara, hücre ve protoplast kültürlerine, pollen tüplerine gen aktarımı için kullanılır (Ahokas, 1987; Gad *ve ark.*, 1990). Çıplak DNA'nın PEG veya elektroporasyon ile protoplastlara yüksek frekanstaki aktarımı bu yöntemle 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.

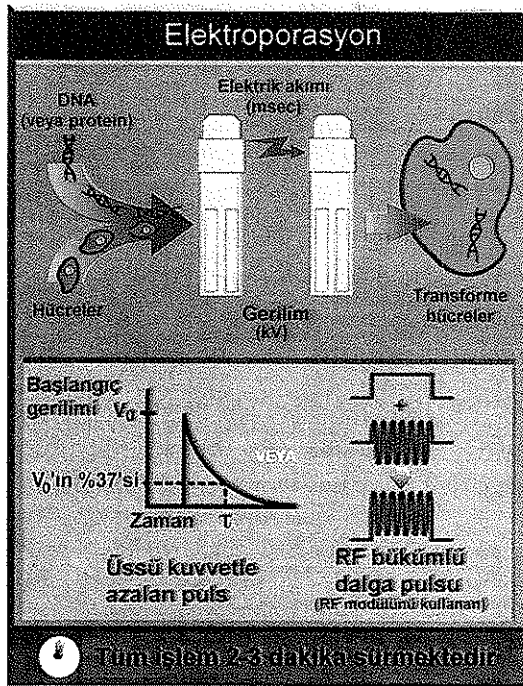


Şekil 16.2. Protoplastlara gen aktarımı (Watson ve ark., 1992'den değiştirilerek).

Lipozomların hücre zarlarıyla füzyonu (kaynaşması) yoluyla gen aktarımında kullanılmalarının yanı sıra, lipozomların vakuollerin içine mikro-enjeksiyonu da mümkündür. Lipozomların tonoplastlar ile füzyona girmesi sonucu taşıdıkları DNA molekülleri sitoplazmaya geçer. Lipozom enfeksiyonu özellikle vakuollü hücrelere gen aktarımında kullanılmaktadır (Lucas *ve ark.*, 1990).

16.3.3.3. Elektroporasyon ile protoplastlara gen aktarımı

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. Elektroporasyonda elektrik akımı hücre canlılığına zarar vermeyecek şiddette seçilmelidir. Bu kritik noktanın üzerine çıktığında hücre zarları tamamen parçalanabilir, altındaki akım şiddetlerinde ise por oluşumu gerçekleşmeyebilir. Elektroporasyonun mekanizması Şekil 16.3'de verilmiştir.



Şekil 16.3. Elektroporasyon mekanizması (Bio-Rad).

Elektroporasyon protoplastlara gen aktarımı için yıllardır başarılı biçimde uygulanmaktadır (Fromm *ve ark.*, 1986). Genellikle kullanılan elektroporasyon sistemleri ya düşük voltaj/uzun süreli elektrik akımı (pulse), ya da yüksek voltaj/kısa süreli elektrik akımı şeklindedir. Tütün mezofil hücreleri için tipik değerler düşük voltaj/uzun akım için 300-400 V/cm ve 10-50 μ s, yüksek voltaj/kısa akım için ise 1.000-15.000 V/cm ve 10 μ s'dir. Elektroporasyon ile gen aktarım frekansı plazmid konsantrasyonu, elektriksel koşullar, protoplast boyutu ve yoğunluğu ile protoplastların fizyolojik özelliklerine bağlıdır. Düşük voltaj/uzun akım genellikle geçici gen ifadesine, yüksek voltaj/kısa akım ise yüksek düzeyde stabil entegrasyona neden olmaktadır.

Elektroporasyon, protoplastlardan rejenere olabilen bitki türlerinde etkin bir biçimde uygulanabilmekte, bunun yanı sıra çimlenmekte olan polen tüpü, süspansiyon kültürleri ve çeşitli doku eksplantları için de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (D'Halluin *ve ark.*, 1992; Zaghmout, 1993).

16.3.4. Hücre ve dokulara gen aktarımı

Kültürdeki ya da bitki dokularındaki hücrelere gen aktarım teknikleri hücre duvarının ortadan kaldırılmasını gerektirmediğinden, hücre ve dokulara gen aktarımında protoplastların transformasyonunda olduğu gibi tek hücreden rejenerasyon sorunu yoktur. Bu tekniklerin bir kısmı sınırlı olarak uygulanabilmekte veya halen geliştirilmekte, bir kısmı ise başarılı bir biçimde çeşitli bitki türleri için kullanılmaktadır.

16.3.4.1. Biyolistik (partikül bombardımanı)

Bu yöntemin esası, yüksek derecede hızlandırılmış *mikro-taşıyıcı* adı verilen 1-2 μ m çapındaki metal (çoğunlukla altın ya da tungsten) partiküller aracılığıyla, bir ateşleme mekanizmasından yararlanılarak DNA'nın hedef dokulara aktarılmasıdır (Kikkert, 1993). Bu yöntemde kullanılan biyolistik cihazı ve sistemin şematik resmi Şekil 16.4'de, metodun İtalyan çimi (*Lolium multiflorum*)'nde başarılı bir uygulaması da Şekil 16.5'de verilmiştir. Mikro-taşıyıcılar *makro-taşıyıcı* olarak adlandırılan plastik bir silindir üzerinden hedef dokulara doğru bir helyum gazı basıncı ile hızlandırılır. Ateşleme gerek mikro-taşıyıcıların sürtünmesinden doğan sürüklenmeyi, gerekse yüksek basınçlı gaz şokundan doğabilecek hücre parçalanmasını ve sesi engellemek için vakum altında yapılır (Şekil 16.4b). Biyolistik yönteminde gen aktarım frekansını çeşitli faktörler etkiler: Bunlardan en önemlileri;

- 1) Partikül hızlandırmada kullanılan helyum gazının basıncı: Gaz hızlandırma tüpündeki helyum basıncı, mikro-partiküllerin hızının belirlenmesinde etkilidir. Partikülü hızlandırmak amacıyla, kullanılan dokunun özelliğine bağlı olarak 450 ile 2200 psi basınç uygulanır. Ancak, çoğu hücre tipi için optimal

basınç 1000 psi olarak belirlenmiştir. Bu değerden daha yüksek basınçlarda hücrelerde yaralanma düzeyi artar ve gen aktarım frekansı düşer.

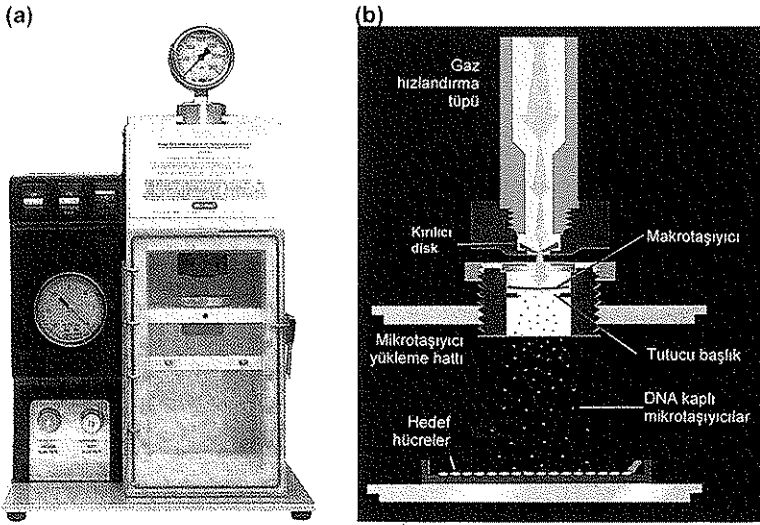
- 2) Mikro-taşıyıcının boyutu, tipi ve sayısı: Tungsten partiküllerin ortalama çapları 0.5-2.0 μm olup, optimum boyut hedef hücrelerin çapı ile ilişkilidir. Ancak 1.0 μm çaplı partiküllerin, başarılı geçici ve stabil transformasyonlar için uygun olduğu saptanmıştır. Tungsten partiküllerinin kullanımının dezavantajları; düzensiz şekil ve boyutta olmaları, belli hücre tipleri için toksik etki göstermeleri ve DNA çökmesi ile sonuçlanabilecek yüzey oksidasyonuna neden olmalarıdır. Uniform boyutta olan (1-3 μm) altın partikülleri ise tungstenden daha pahalı olmalarına karşın daha az toksik etkiye sahiptir.
- 3) Makro-taşıyıcı ile hedef doku arasındaki uzaklık: Maksimum etkinlikte transformasyon elde etmek için makro-taşıyıcı ile hedef doku arasındaki uzaklık (uçuş mesafesi) önemli bir parametredir. Her hücre tipi için bu mesafenin deneme yoluyla belirlenmesi gerekmektedir. Birlikte, pek çok örnekte 10 mm'lik uçuş mesafesi kullanılarak yüksek transformasyon frekansı elde edilmiştir.
- 4) DNA'nın mikro-taşıyıcı partiküllere yapışması için kullanılan spermidin ve CaCl_2 'ün konsantrasyonu.

Biyolistik yönteminin başlıca üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Kullanım kolaylığı,
- 2) Her ateşlemede mikro-taşıyıcıların birden fazla hücreye ulaşabilmesi,
- 3) Mikro-taşıyıcılara bağlı genlerin biyolojik aktivitelerinin bozulmaması,
- 4) Polen, hücre kültürleri, bitki organları, meristemler, kallus, olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo parçaları, yaprak parçaları, mikrosporlar gibi çeşitli hedef dokulara uygulanabilmesi,
- 5) Mikro-taşıyıcıların derin hücre katmanlarına ulaşabilmesidir.

Çeşitli bitki türlerinin dokularına etkili bir biçimde gen aktarımının yapılabilmesi için bu yöntemin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Biyolistik yöntemi başlangıçta maya ve kültüre alınan hayvan hücreleri ile kloroplastlar gibi bitki organellerine ve daha sonra çeşitli bitki hücre ve dokularının transformasyonu için kullanılmıştır. Bitkilerle yapılan çalışmalarda bu yöntemle geçici gen ifadesi ilk kez soğan epidermisinde gösterilmiş (Klein *ve ark.*, 1987) ve ardından mısır, çeltik, soya, buğday, arpa ve İtalyan çimi (Şekil 16.5) gibi çeşitli bitkilere gen aktarımı için kullanılmıştır (Klein *ve ark.*, 1988; Wang *ve ark.*, 1988; Wan ve Lemaux, 1994., Stiff *ve ark.*, 1995; Ye *ve ark.*, 1997). 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 (Kikkert *ve ark.*, 1999).

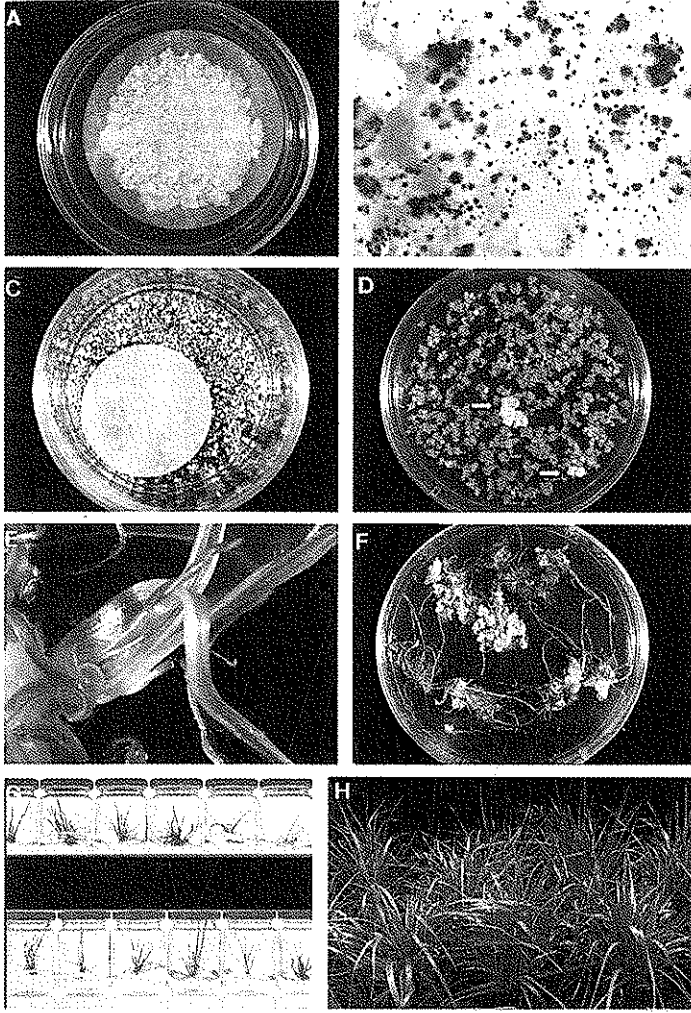


Şekil 16.4. Biyolistik (Biolistic PDS-1000/He) cinnazı (a) ve sistemin çalışma prensibi (b) (Bio-Rad).

Gus geni gibi raportör genlerin kolaylıkla izlenebilen ifadeleri nedeniyle partikül bombardımanı metodu farklı hücre ve doku tiplerinde gen ifadesi çalışmalarında kullanılan güçlü bir yöntemdir (Şekil 16.5b). Bu yöntemin uygulanmasıyla, regülatör dizilerin analizi, intronların gen ifadesi üzerindeki etkileri ve mRNA stabilitesinin incelenmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca, bu genlerle birlikte seçici markör olarak kullanılan antibiyotiklere (kanamisin, higromisin gibi) dayanıklılık genleri (sırasıyla *npII*, *hpt*) muhtemel (putative) transgenik hücre, doku ve sürgünlerin kolaylıkla seçiminde gerekli olmaktadır (Şekil 16.5d).

16.3.4.2. Mikro-enjeksiyon

Doğrudan gen aktarımı yöntemleri arasında en kesin biçimde hücrenin istenilen bölmesine DNA'nın enjekte edilmesini sağlayan mikro-enjeksiyon, kapiller mikropipetler yardımıyla ve mikroskop altında gerçekleştirilir (Şekil 16.6). Mikro-enjeksiyonla protoplastlara, izole edilmiş hücrelere, kallus, meristemler, zigotik ve mikrospor türevli proembriyolar gibi çok hücreli dokulara DNA aktarımı

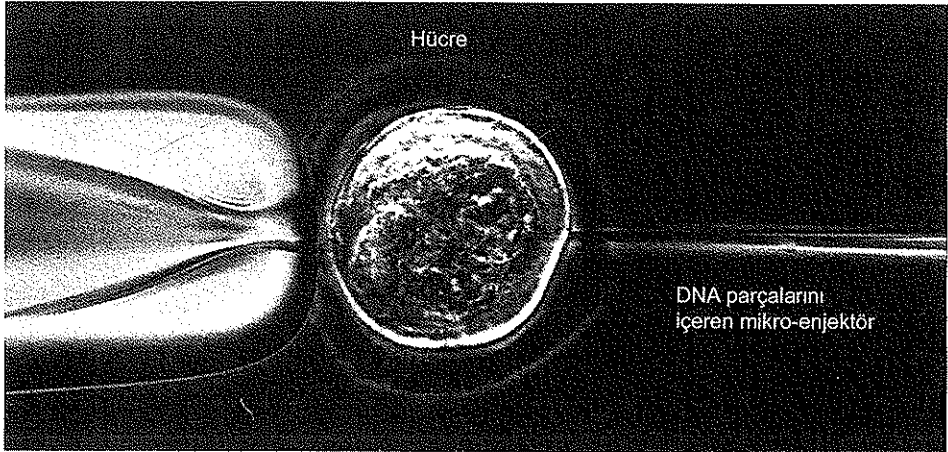


Şekil 16.5. Partikül bombardmanı ile İtalyan çimi (*Lolium multiflorum*)'ne gen aktarımı. A) *Gus* geni ile kaplanmış mikro-taşıyıcılarla bombardımandan önce filtre kağıdı üzerinde kültüre alınmış süspansiyon hücreleri, B) bombardımandan 4 gün sonra *gus* geninin ifadesini (ekspresyonunu) gösteren transgenik hücreler (mavi renkli), C) bombardıman yapılmış embriyogenik hücrelerin 25 mg/l higromisin içeren sıvı seleksiyon ortamında kültüründen 2 hafta sonraki durumları, D) seleksiyondan geçen ve higromisine dayanıklı muhtemel transgenik embriyogenik kalluslar (oklarla gösterilmiştir), E) higromisine dayanıklı kallustan sürgün rejenerasyonu (2 hafta sonra), F) bombardımandan 10 hafta sonra gelişen transgenik sürgünler, G) bombardımandan 12 hafta sonra oluşan transgenik bitkiler, H) saksıya şaşırtılmış ve bombardımandan 4 ay sonra elde edilen transgenik bitkiler (Ye ve ark., 1997'den izin alınarak).

mümkündür (Crossway *ve ark.*, 1986; Neuhaus *ve ark.*, 1987; Bilang ve Schrott, 1995). 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. Her enjeksiyonla sadece bir hücreye DNA aktarılabilmesi ve deneyim gerektirmesi gibi güçlüklerinin yanısıra; yöntemin avantajları şöyle sıralanabilir:

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

Hücre ve protoplastlara mikro-enjeksiyon yoluyla gen aktarımı tütün, yonca ve bazı *Brassica* türleri gibi çeşitli bitkilerde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ayrıca kolzanın mikrospor türevli proembriyolarına, mısır, buğday, çeltik, arpa, soya, pamuk, ayçiçeği, tütün ve *Arabidopsis thaliana* gibi çeşitli bitkilerin zigotik embriyolarına mikro-enjeksiyonla başarılı şekilde gen aktarımı yapılabilmektedir (Potrykus, 1991). Ancak, mikrospor türevli ya da zigotik embriyo gibi çok hücreli yapılardan mikro-enjeksiyonu takiben rejenere olan transgenik bitkiler arasında, kimeraların görülmesi sıklıkla rastlanan bir durumdur.



Şekil 16.6. Döllenmiş zigotik bir hücreye DNA'nın mikro-enjeksiyonu (Glick ve Pasternak, 1994'den).

16.3.4.3. Elektroforez ve mikrolazer

Elektroforez, elektroporasyonun tersine DNA'nın taşınmasına neden olan ve analitik amaçlarla kullanılan bir yöntemdir. Ancak, arpa tohumlarıyla yapılan çalışmalarda (Ahokas, 1989) elektroforezin hücre duvarından genlerin geçişini sağlayabileceği konusunda olumlu sonuçlar alınması, bu yöntemin gen aktarımında kullanılabileceğini düşüncesini doğurmuştur. 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. Elektroforez yoluyla entegratif transformasyona ait yeterli kanıt elde edilemediğinden, bu yöntem daha çok basit deneysel sistemlerde kullanılmak için uygun olmaktadır.

Lazer ışığının hücre zarı ve duvarında delik oluşumuna yol açması, vektör kullanmaksızın ortamdaki DNA'nın hücre içine aktarımı için mikrolazer uygulaması olasılığını güçlendirmiştir (Weber ve ark., 1988). Bununla beraber, bu yöntemde hücre duvarı yapısına DNA adsorbsiyonu nedeniyle, DNA'nın hücre içine girişi ile ilgili sorunlar vardır. Bu nedenle mikrolazer, mikro-enjeksiyon ve biyolistiğin uygulanamayacağı durumlarda alternatif bir yöntem olarak kullanım kapasitesine sahiptir.

16.3.4.4. Polen transformasyonu

Çimlenmekte olan polenlerin DNA ile muamele edilmesi yoluyla yapılan gen aktarım metodudur. Direkt ve basit bir yöntemdir (Hess, 1987). 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.

16.3.4.5. Polen tüpü yoluyla DNA aktarımı

Tozlanmayı takiben kesilmiş stigma yüzeyine DNA uygulaması ile DNA aktarımı yöntemi çeltik ve arpada kullanılmış (Lu ve Wu, 1988), ancak transformasyonun frekansının düşük olup, döllerde gen aktivitesi kaybolmuştur. Hücre duvarı engeli ve polen tüpü nükleazlarının etkisi, bu yöntemle transgenik bitki elde edilmesindeki yetersizliğin nedenleri arasında sayılabilir.

16.3.4.6. Zigotik embriyoya DNA emdirilmesi

İzole edilen embriyoların DNA solusyonu ile muamele edilmesi yoluyla DNA aktarımı yapılabilir. Embriyoların izolasyonu sırasında uygulanan işlemler (organik çözücülerin kullanımı gibi) belli ölçüde hücrelere zarar verdiğinden DNA'nın hücrelere girişi kolaylaştırılır. Yöntem çeşitli tahıl ve baklagillere uygulanmış ve gen aktarımı gerçekleştirilmiştir (Topfer *ve ark.*, 1989). Çimlenen embriyoların çok sayıda bitki oluşturmaları stabil gen ifadesi elde edebilmek amacıyla bu yöntemi çekici kılmakla birlikte, yeterli düzeyde geçici gen ifadesi elde edilemeyişi yöntemin geliştirilmesini gerektirmektedir.

16.3.4.7. 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 kullanılmıştır (Kaepler *ve ark.*, 1990). DNA solusyonu ile hücre süspansiyonunun, silikon karbit fiberler varlığında kuvvetli bir biçimde karıştırılması, fiberlerin mikro-enjeksiyon iğnelerine benzer şekilde hücre duvarında delikler açması neden olmakta ve DNA bu deliklerden hücre içine girmektedir. Bu yöntemle stabil bir entegrasyonun ve bitki rejenerasyonunun elde edilmesi mümkün olmamıştır.

16.3.4.8. Sonikasyon

Ses dalgalarının hücreler arası ve hücre zarında boşluklar açarak serbest DNA parçalarının hücre içine girişini sağlamak esasına dayanan bu metot (Babaoğlu, 1999) bazı durumlarda elektroporasyondan daha iyi sonuçlar vermiştir (Örnek: Pancar protoplastları).

16.3.4.9. 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.

16.4. Sonuç

Transgenik bitkilerin marketlerde satışa sunulabilir hale gelmesi, bitki biyoteknolojisindeki gelişimlerin önemli bir aşaması olarak kabul edilebilir. Günümüzde bitkilere yabancı genlerin aktarılması ve bu genlerin bitki gelişiminin belirli bir evresinde ve istenilen dokuda aktivite göstermesi mümkündür. Gen aktarım tekniklerinin bazılarının genel bir kullanım alanına sahip olmasına karşın, bir kısmı ya sadece bazı bitki türleri için uygundur, ya da rutin kullanım için fazlaca

karmaşıktır. Bununla beraber, iki çenekli bitkiler için yeterince etkin olan *Agrobacterium* sisteminin dışında, yeni gelişmelerle embriyogenik dokuların kültür koşullarının belirlenmesi ve bu dokuların gen transferi için kullanılmaları ile özellikle tek çenekli bitkilerde biyolistik yönteminin başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Bitkilere gen aktarımı alanında sınırlayıcı olan iki önemli faktör, farklı bitki çeşitlerine uygulanabilecek evrensel metodların bulunmaması ve aktarılmak üzere kullanılacak uygun dominant genlerin yetersizliğidir. Ayrıca, gen aktarım teknolojisindeki ilerlemeler için;

- 1) Meristematik dokulardaki yaralanmaya karşı tepki mekanizmasının,
- 2) Yeterlilik gösteren hücrelerin yeniden farklılaşmasının, proliferasyonunun ve rejenerasyonunun gerçekleşmesinde rol oynayan faktörlerin,
- 3) Entegratif transformasyonun nasıl gerçekleştiğinin,
- 4) Yeniden farklılaşan hücrelerin farklılaşmış hücrelerden neden daha kolay transforme olabildiklerinin,
- 5) Meristematik veya embriyogenik hücrelerin, entegratif transformasyonu engelleyen bir mekanizmaya sahip olup olmadıklarının aydınlatılmasına gerek vardır.

Tarla testleri aşamasına gelmiş birçok transgenik bitki, ticari gereksinimler nedeniyle herbisitlere veya patojenlere karşı dayanıklı olanlardır. Ancak, son zamanlarda erkek kısır bitkilerin elde edilmesi, bitkilerin stres koşullarına dayanıklılık ve arzu edilen kalitede ürün elde edilmesine yönelik olarak biyokimyasal yollarda yeni düzenlemelerin yapılması gibi diğer konulara eğilim artmaktadır. Günümüzde antikor, aşı ve biyolojik olarak yıkılabilen plastik üreten stabil transgenik bitkiler geliştirilmiştir.

Temel biyolojik araştırmalarda gen aktarım teknolojisinden yararlanılarak bitki biyolojisindeki bilgi birikimi son on yılda büyük bir artış göstermiş ve çeşitli bitkilerde DNA dizi analizleri yapılmaya başlanmıştır. Bu şekilde, dizi bilgisinin transformasyon teknolojisi ile birlikte kullanılması, yakın bir gelecekte istenilen bitki genlerinin özelliklerinin değiştirilebilmesini sağlayacaktır.

Teşekkür

Şekillerin düzenlenmesi ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Mehmet Babaoğlu'na teşekkürler.

Kaynaklar

- Ahokas H (1987) Transfection by DNA-associated liposomes evidenced at pea pollination. *Hereditas*, 106: 129-138.
- Ahokas H (1989) Transfection of germinating barley seeds electrophoretically with exogenous DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 469-472.
- Ainley WM, Key JL (1990) Development of a heat shock inducible expression cassette for plants: Characterization of parameters for its use in transient expression assays. *Plant Mol. Biol.*, 14: 949-967.
- Arı Ş, Şahin S, Gürel F, Gürel SD, Cockburn B, Gözükırmızı N (1997) Transfer of HyHel 10 scFv gene to plants. *Progress in Botanical Research, Proceedings of the 1st Balkan Botanical Congress*. Eds. I. Tsekos, M. Moustakas, p: 461-464, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. ISBN 0-7923-5305-6
- Babaoğlu M (1999) Bitkilerde gen transferi teknikleri. *Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi*, 322: 24-26.
- Babaoğlu M, Özcan S. (2001) Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.), *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya*, s. 89-136.
- Bilang R, Schrott M (1995) *Plant Cells, Genetic Manipulation of Molecular Biology and Biotechnology. A Comprehensive Desk Reference*. (RA Mayers, editor), VCH Publishers Ltd., U.K.
- Boulton ML, Bucholz WG, Marks MS, Markham PG, Davies JW (1989) Specificity of *Agrobacterium*-mediated delivery of maize streak virus to members of the *Gramineae*. *Plant Mol. Biol.*, 12: 31-40.
- Bürün B (2001) Somaklonal Varyasyon. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.), *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya*, s. 345-367.
- Bytebier B, Deboeck F, De Greve H, van Montagu M, Hernalsteens JP (1987) T-DNA organization in tumour cultures and transgenic plants of the monocot *Asparagus officinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5345-5349.
- Caboche M (1990) Liposome-mediated transfer of nucleic acids into plant cells. *Physiol. Plant.*, 79: 173-176.
- Comai L, Moran P, Maslyar D (1990) Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35 S and MAS elements. *Plant Mol. Biol.*, 15: 373-381.
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Shewmaker CK (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.*, 202: 179-185.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, Beuckeleer M, Leemans J (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *The Plant Cell*, 4: 1495-1505.

Day AG, Bejarano ER, Buck KW, Burrell M, Lichtenstein CP (1991) Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6721-6725.

Draper J, Davey MR, Freeman JR, Cocking EC, Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed petunia protoplasts. *Plant Cell Physiol.*, 23: 451-458.

Evans DA (1989) Somaclonal variation genetic basis and breeding applications. *Trends Genet.*, 5: 46-50.

Flavell RB (1995) Plant biotechnology R&D-the next ten years. *Trends Biotech.*, 13(9): 313- 319.

Fraley R, Schell J (1992) Plant biotechnology. *Curr. Opin. Biotech.*, 3:139-184.

Fromm M, Callis J, Taylor LP, Walbot V (1987) Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts. *Methods Enzymol.*, 153: 351-366.

Fromm ME, Taylor LP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 319: 791-793.

Gad AE, Rosenberg N, Altmann A (1990) Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant.*, 79: 177-183.

Gasser CS, Fraley RT (1989) Genetically engineered plants for crop improvement. *Science*, 244: 1293-1299.

Glick BR, Pasternak JJ (1994) *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C.

Graves ACF, Goldman SL (1986) The transformation of *Zea mays* seedlings with *A. tumefaciens*: Detection of T-DNA specific enzyme activities. *Plant Mol. Biol.*, 7: 43-50.

Graves ACF, Goldman SL (1987) *A. tumefaciens* mediated transformation of the monocot genus *Gallidulus*. Detection and expression of T-DNA encoded genes. *J. Bacteriol.*, 169: 1745-1746.

Grimsley NH (1990) Agroinfection. *Physiol. Plant.*, 79: 147-153.

Grimsley NH, Hohn T, Davies JW, Hohn B (1987) *Agrobacterium* mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature*, 325: 177-179.

Harpster MH, Townsend JA, Jones JDG, Bedbrook J, Dunsmuir P (1988) Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, 1' 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Mol. Gen. Genet.*, 14: 433-443.

Haseloff J, Amos B (1995) GFP in plant. *Trends in Genetics* 11: 328-329.

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995) Improved green fluorescence. *Nature*, 373: 663-664.

Herrera-Esterella L, Simpson J (1989) Foreign gene expression in plants. In: Shaw CH (ed), *Plant Molecular Biology: A practical Approach*, pp 146-157. IRL Press, Oxford, Washington.

- Hess D (1987) Pollen based techniques in genetic manipulation. *Int. Rev. Cytol.*, 107: 169-190.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumasho T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6: 271-282.
- Hooykas van Slogteren GMS, Hooykas PJJ, Schilperoot RA (1984) Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *A. tumefaciens*. *Nature*, 331: 763-764.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Mol. Biol. Organisation J.*, 6: 3901-3907.
- Jensen JS, Marcker KA, Offen L, Schell J (1986) Nodule specific expression of a chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature*, 321: 669-674.
- Kaeppeler HF, Weining G, Someus DA, Rines HW, Cockburn AF (1990) Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Rep.*, 9: 415-418.
- Kay R, Chan A, Daly M, Mc Pherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, 230: 1299-1302.
- Kikkert JR (1993) The Biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33:221-226.
- Kikkert JR, Humiston GA, Roy MK, Sanford JC (1999) Biological projectiles (phage, yeast, bacteria) for genetic transformation of plants, *In vitro Cell. & Dev. Biol.-Plant*, 35: 43-50.
- Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Bio/Technology*, 6: 559-563.
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327: 70-73.
- Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Korber H, Redei GP, Schell J (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8467-8471.
- Krebbbers SE, Vanderkerckhove J (1990) Production of peptides in seeds. *Trends Biotech.*, 8: 1-3.
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoot RA (1982) *In vitro* transformation of plant protoplast with Ti plasmid DNA. *Nature*, 296: 72-74.
- Lam E (1995) Plant Gene Expression Regulation. In: RA Mayers (ed), *Molecular Biology and Biotechnology, A Comprehensive Desk Reference*. VCH Publishers Ltd., U.K.
- Lamb CJ, Beachy RN (1989) Plant Gene Transfer. In: Lamb CJ, Beachy RN (eds), *Proceedings of a UCLA Symposium*, Utah, April 1-7, 1989. Wiley-Liss, New York.
- Lawton MA, Tierney MA, Nakamura I, Anderson E, Komeda Y, Dube P, Hoffman N, Fraley RT, Beachy RN (1987) Expression of a soybean β -conglycinin gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues. *Plant Mol. Biol.*, 9: 315-324.

- Lindsey K, Jones MGK (1989) *Plant Biotechnology in Agriculture*. John Willey and Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Lu ZX, Wu R (1988) A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 6: 165-174.
- Lucas WJ, Lansing A, Wet JR, Walbot V (1990) Introduction of foreign DNA into walled plant cells via liposomes injected into the vacuole a preliminary study. *Physiol. Plant.*, 79: 184-189.
- Murray DR (1993) Breeding plants for the twenty-first century. In: Murray DR (ed), *Advance Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, C.A.B. International, Midsomer Norton, Bath.
- Neuhaus G, Spangenberg G, Scheid OM, Schweiger HG (1987) Transgenic rape seed plants obtained by microinjection of DNA into microspore-derived proembryoids. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 30-36.
- Owen M, Gandecha A, Cochburn W, Whitlam G (1992) Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Bio/Technology*, 10: 790-794.
- Özcan S, Firek S, Draper J (1993) Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *Bio/Technology*, 11: 218-221.
- Özcan S, Özgen M (1996) Bitki genetik mühendisliği. *Kökem Dergisi*, 1: 69-95.
- Pen J, Sijmons PC, Van Ooijen AJJ, Hoekema A (1993) Protein production in transgenic crops: Analysis of plant molecular farming. In: Hiatt A (ed), *Transgenic Plants: Fundamentals and Applications*, pp. 239-251. Marcel Dekker, New York.
- Pena A, Lörz H, Schell J (1987) Transgenic plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 325: 274-276.
- Potrykus I (1990) Gene transfer to cereals: An Assessment. *Bio/Technology*, 8(6): 535-542.
- Potrykus I (1991) Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 205-225.
- Potrykus I, Pazkowski J, Shillito RP, Soul MW (1987a) Direct gene transfer to plants. *Fact and Future. Plant Biol.*, 3: 289-302.
- Potrykus I, Pazkowski J, Shillito RP, Soul MW (1987b) Direct gene transfer to plants. *Plant DNA infectious agents*. In: Horn T, Schell J (eds), pp. 230-248. *Plant Gene Research*, Springer, Wien.
- Powell AP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232: 738-743.
- Rhodes CA, Pierce DA, Mettler IJ, Mascarenhas D, Detmer JJ (1989) Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 240: 204-207.
- Saul MW, Pazkowski J, Shillito RP, Potrykus I (1987) Methods for direct gene transfer to plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 25: 361-364.

- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, Van des Elzen PJM, Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology*, 8: 217-221.
- Sonnenwald U, Van Schaeven A, Willmitzer L (1993) Subcellular manipulation of sucrose metabolism in transgenic plants. *J. Exp. Bot.*, 44: 293-296.
- Stafford A (1991) Genetic of cultured plant cells. In: Stafford A, Warren G (eds), *Plant Cell and Tissue Culture*, Biotechnology Series, pp. 25-47. Open University Press, Milton Keynes.
- Stalker DM, Mc Bride KE, Maljy LD (1988) Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science*, 242: 419-423.
- Stiff CM, Killian A, Zhou H, Kudrna DA, Kleinhofs A (1995) Stable transformation of barley callus using Biolistic Particle Bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (bar) gene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40: 243-248.
- Sullivan KF, Kay SA (1999) Green Fluorescent Proteins In: *Methods in Cell Biology* Vol. 58, 386 s.
- Şahin S, Gürle SD, Ari Ş (1997) Genetic analysis on the T-DNA insertion mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Progress in Botanical Research, Proceedings of the 1st Balkan Botanical Congress*. Eds. I. Tsekos, M. Moustakas, p: 553-556, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. ISBN 0-7923-5305-6
- Topfer R, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH (1989) Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *Plant Cell*, 1: 133-139.
- Vasil IK (1988) Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology*, 6: 397-402.
- Vasil V, Redway F, Vasil IK (1990) Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bio/Technology*, 8: 429-434.
- Walden R, Wingender R (1995) Gene transfer and plant regeneration techniques. *Trends Biotech.*, 13(9): 324-331.
- Wan Y, Lemaux PG (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.*, 104: 37-48.
- Wang YC, Klein TM, Framm M, Cao J, Sanford JC, Wu R (1988) Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Mol. Biol.*, 11: 433-439.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) *Recombinant DNA*, Second edition, Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York
- Webb KJ, Morris P (1992) Methodologies of plant transformation. In: Gatehouse AMR, Hilder VA, Boulter D (eds), *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, pp. 9-14. CAB International, Melksham.
- Weber G, Monajembashi S, Greulich KO, Wolfrum J (1988) Injection of DNA into plant cells with a UV laser microbeam. *Naturwissenschaften*, 75: 35-36.

Whitelam GC, Cockburn B, Gandecha AR, Owen MRL (1993) Heterologous protein production in transgenic plants. *Biotech. Genet. Engineer. Rev.*, 11: 1-29.

Williams S, Friedrich L, Dincher S, Carozzini N, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1992) Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology*, 10: 540-543.

Yan Q, Zhang X, Shi J, Li J (1990) Green plant regeneration from protoplasts of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Kexue Tangbao*, 35:1-6.

Ye X, Wang Z-Y, Wu X, Potrykus I (1997) Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardement of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep.* 16: 379-384).

Zaghmout MFZ (1993) Direct electroporation of plasmid DNA into wheat intact cells of embryogenic callus. *Cereal Res. Commun.*, 21(4): 301-308.

Bölüm 17

Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

Hüseyin Avni Öktem

ODTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, 06531 Ankara
e-posta: haoktem@metu.edu.tr

17.1. Giriş

Yabancı otlar, tarım alanlarında bulunan ve yarardan çok zarar veren bütün bitkiler olarak tanımlanabilir. Kültür bitkilerinde çeşitli etmenlerin (hastalık, hayvansal zararlılar gibi) meydana getirdiği ürün kayıpları ele alındığında, özellikle kurak geçen yıllarda yabancı otların etkisinin en yüksek seviyede olduğu gözlenmektedir. Dünyadaki üretim bazında hububat, meyve, sebze ve bağlarda yabancı otlara bağlı olarak gözlenen ürün kayıpları Tablo 17.1'de özetlenmektedir. Tablo'dan da görüldüğü gibi bu kayıplar toplam üretimle mukayese edildiğinde oldukça önemli boyutlara ulaşmaktadır. Yabancı otlarla tarımın ilk olarak başladığı neolitik çağdan itibaren mücadele edilmektedir. Yapılan bu mücadelede başlıca amaç yabancı otların oluşturdukları olumsuz etkileri ekonomik zarar seviyesinin altında tutmaktır.

Yabancı ot mücadelesinde kullanılan başlıca yöntemler dört grup altında özetlenebilir: **a) mekanik savaş yöntemleri:** çapalama, elle yolma, toprak işleme ve su altında bırakma, **b) fiziksel savaş yöntemleri:** ısı ve ışıklardan yararlanma, **c) biyolojik savaş yöntemleri:** bir canlı popülasyonunu; böcekler, balıklar, mantarlar ve bakteriler gibi diğer canlı organizmalar aracılığı ile azaltmak için kullanılan yöntemler ve **d) kimyasal savaş yöntemleri:** sentetik veya doğal yabancı ot öldürücüler (herbisitler) kullanılarak yürütülen mücadele yöntemleri.

Yukarıda özetlenen mücadele yöntemlerinden mekanik, fiziksel ve biyolojik savaş yöntemleri gerek uygulama alanının yaygın olmaması, gerekse de geniş alanlarda

ekonomik olmamaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle, özellikle ikinci dünya savaşı yıllarında yabancı ot öldürücü olarak kullanılabilecek kimyasalların geliştirilmesi ile birlikte özellikle geniş tarım alanlarında etkin bir yabancı ot mücadelesi yapılabilir duruma gelinmiştir. Günümüzde ise bu yöntem gerek etkinliği gerekse de ekonomik olması nedeni ile en yaygın kullanılan yabancı ot mücadele yöntemidir.

Tablo 17.1. Dünya bazında yabancı ot ve hastalık etmenlerinin oluşturduğu kayıplar (milyon ton) (Özer, 1993)

Ürün Çeşidi	Elde Edilen Ürün	Yabancı Ot Kayıpları	Hastalık Kayıpları
Hububat	433.903	54.349	50.589
Sebzeler	201.691	23.718	31.137
Meyveler	66.567	2.462	12.825
Bağlar	50.697	7.909	16.937

17.2. Herbisitler ve Etki Mekanizmaları

Tarımsal mücadele amaçlı kullanılan kimyasallar içerisinde herbisitler önemli bir yer kaplamaktadır. Herbisit olarak kullanılan bir kimyasalın ticari açıdan herbisit olarak nitelendirilebilmesi için şu faktörlerin gözönünde bulundurulması gerekmektedir

- a. Geniş bir yabancı ot popülasyonuna karşı etkin olması,
- b. Kültür bitkisine, memelilere ve omurgasız canlılara karşı toksik etki göstermemesi,
- c. Toprakta kalıcılığının kısa olması,
- d. Üretim maliyetinin düşük olması.

Herbisitler, nihai hedefi olan bitkiye zarar verdiklerinden dolayı, bitki üzerinden beslenen ve barınan tüm canlıları olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple; herbisitler, kullanılan pestisitler içerisinde doğaya en fazla zarar veren grup olarak nitelendirilmektedir. Ancak, çoğu insektisit insan ve hayvanlar için toksik olmalarına karşın herbisitler bu organizmalar üzerinde toksik etki yapmamaktadır.

Herbisitler genellikle bitkilere özgün, örneğin fotosentez aktivitesi gibi, biyokimyasal yolları etkilemektedir. Bunun dışında değişik etki mekanizmaları olan farklı grup herbisitler mevcuttur. Bu etki mekanizmaları ve herbisitlerin hedef aldığı sistem ve hedef moleküller Tablo 17.2 ve Şekil 17.1’de özetlenmektedir.

Tablo 17.2. Herbisitlerin etken maddeleri ve etki sistemleri.

Etkili Madde	Etkilediği Sistem	Hedef Protein	Spektrum
Sulfonilurea	Alifatik amino asit sentezi	Asetolaktat sentaz	seçici
Imidazolinon	Alifatik amino asit sentezi	Asetolaktat sentaz	seçici
Glifosat	Aromatik amino asit sentezi	5-enolpurivil-shikimate-3-fosfat sentaz (EPSPS)	total
Phosfinotrisin (PPT)	Glutamin sentezi	Glutamin sentaz	total
Triazin	Fotosentez (fotosistem-II)	Q _β proteini	total
Bromoxinil	Fotosentez (fotosistem-II)	Q _β proteini	total
Bipiridilumlar (paraquat)	Fotosentez (fotosistem-I)	Ferrodoksin	total
Arloksifenoksiopropionat	Lipid sentezi	Asetil coenzim-A karboksilaz (ACCase)	seçici
Fenoksiasetik asitler (2,4-D)	?	?	seçici
Dinitroanilinler	Hücre bölünmesi	Tübilin	seçici
Bipiridilumlar, paraquat, diquat	Fotosentez (fotosistem-I)	Elektron transfer sistemi	total

17.3. Herbisite Dayanıklı Bitki Elde Edilmesi

Yabancı otlarla kimyasal mücadelede kullanılan herbisitün seçiciliği ve toksisitesi önemli parametrelerdir. Başka bir deyişle, kullanılan herbisitün, yabancı otlara maksimum zararı verirken kültür bitkisini ise minimum seviyede etkilemesi istenmektedir. Ayrıca, herbisitün ekosisteme en az sevide toksik etki yapması ve toprakta mikroorganizmalar tarafından kısa sürede yıkılabilmesi de istenen özellikler arasındadır.

Son yıllarda kültür bitkilerinin genetik manipülasyonlar yoluyla herbisitlere dayanıklı hale getirilmesi yönünde çalışmalar gözlenmekte olup, bu bilgiler farklı yazarlar tarafından derlenmiştir (Botterman ve Leemans, 1988; Mazur ve Falco, 1989; Hoyle, 1993). Yapılan bu çalışmalarda başlıca amaç, kullanılan herbisitün uygulama sonrası yabancı otları etkilerken, kültür bitkilerinin bu muameleden etkilenmesini önlemektir (Şekil 17.2, Şekil 17.4, Şekil 17.5).

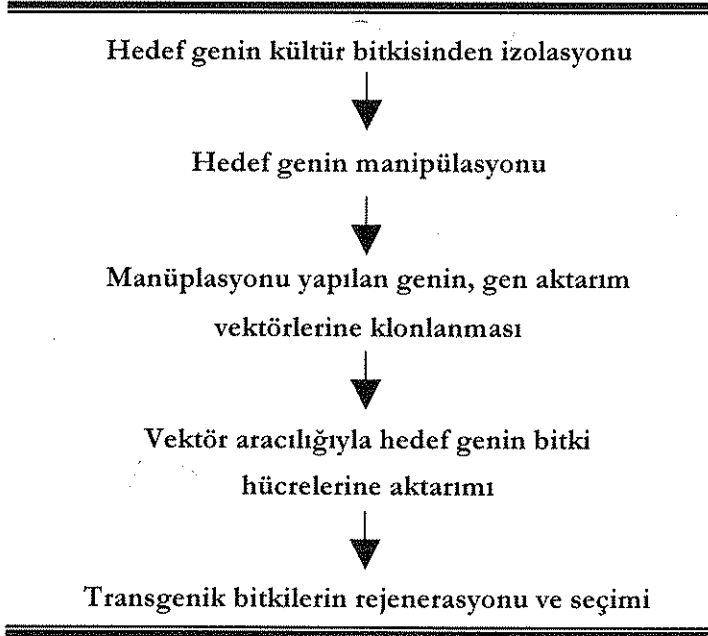
Kültür bitkilerine herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılması yönünde yapılan çalışmalarda başlıca üç değişik strateji izlenmektedir:

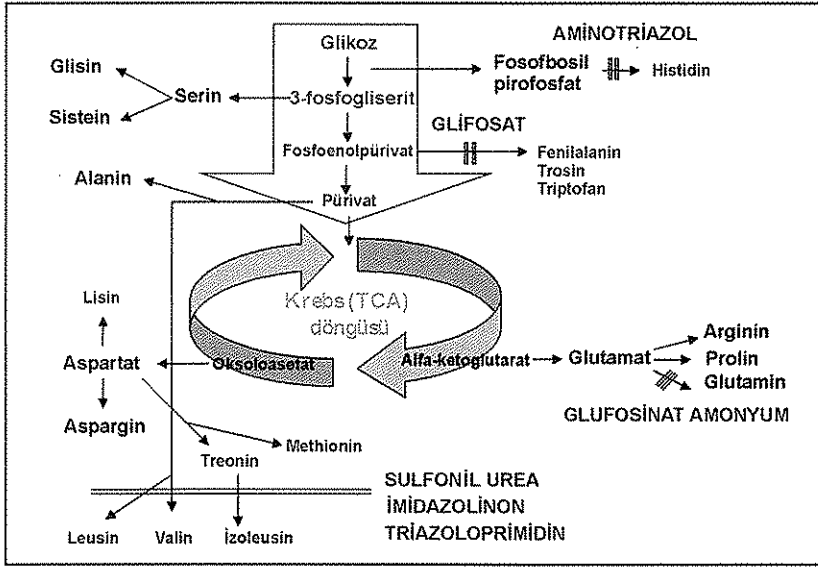
1. Hedef molekülün modifikasyonu,
2. Hedef molekülün fazla üretimi,
3. Etken maddenin detoksifikasyonu.

Bu stratejilerden ilk ikisi herbisitün etkilediği hedef molekülün aktif maddeden korunmasına yönelik olup, son stratejide ise aktif maddenin farklı bir bileşiğe çevrilerek etkenliğinin ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır. Bahsi geçen bu stratejilerin başarılı olarak uygulanabilmesi için moleküler biyoloji, özellikle de genetik mühendisliği, genetik transformasyon ve bitki doku kültürü gibi değişik yöntemlerin uygulanması gerekmektedir. Başka bir deyişle, hedef gen klonlanması, uygun bir transformasyon vektörünün oluşturulması, uygun bir gen aktarım sistemi kullanılarak kültür bitkisinin genetik transformasyonu ve rejenerasyonu gerekmektedir.

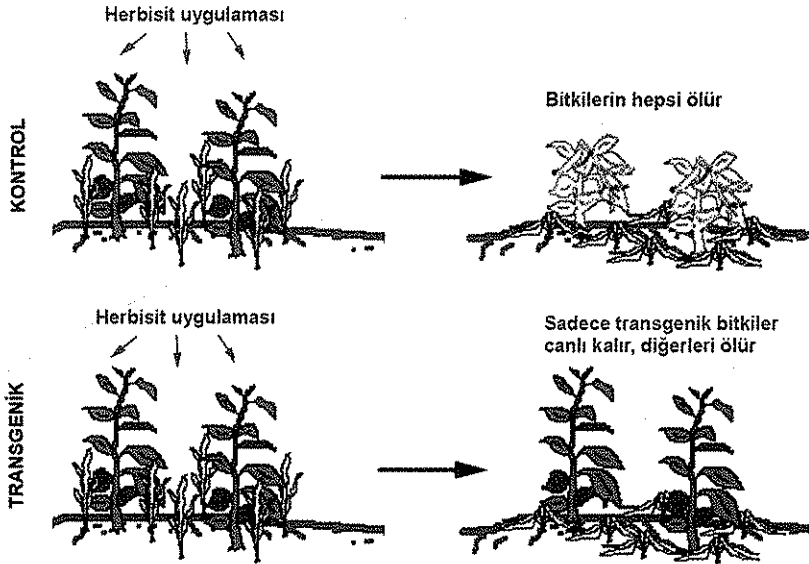
17.3.1. Hedef molekülün modifikasyonu

Bu stratejide; herbisitün aktif maddesinin hedef aldığı proteinin modifikasyonu, başka bir deyişle proteinin aktif maddeye duyarsız hale getirmesi amaçlanmaktadır. Sonuç olarak, kültür bitkilerine normal hücrel fonksiyonunu yerine getirebilen, ancak herbisitün aktif maddesince etkilenmeyen yeni bir protein sentezletilmektedir. Bu sayede, herbisitün varlığında kültür bitkisi yaşamını sürdürebilmektedir. Bu konuda yürütülen çalışmalarda iki değişik yaklaşım gözlenmektedir. Bunlardan ilkinde hedef proteinin sentezinden sorumlu gen kültür bitkisinden izole edilmekte ve gerekli manipülasyonlar sonrası tekrar kültür bitkisine aktarılmaktadır. Sistem şematik olarak aşağıdaki gibidir:



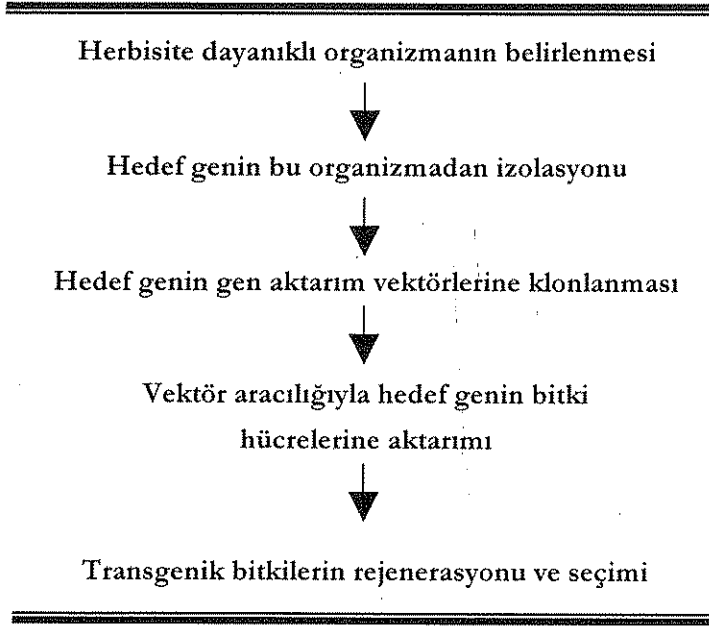


Şekil 17.1. Bitkilerde amino asit sentez yolları ve herbisit etki mekanizması.



Şekil 17.2. Herbisite dayanıklı kültür bitkilerinin geniş spektrumlu herbisit kullanımındaki etkinliğinin şematik olarak gösterimi.

İkinci yaklaşımda ise hedef proteinin sentezinden sorumlu gen, herbisite dayanıklılık gösteren bir diğer organizmadan (bakteri veya diğer bir bitkiden) izole edilmekte ve kültür bitkisine aktarılmaktadır. Sistem, şematik olarak şu şekilde ifade edilebilir:



Söz konusu strateji izlenerek ve mutant *ALS* genleri kullanılarak sulfonilurea tipi herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilerek (Bedbrook ve ark., 1988; Haughn ve ark., 1988; Fromm ve ark., 1990, Brandle ve ark., 1994) tarla denemeleri yapılmıştır (Brandle ve Miki, 1993).

Benzeri strateji fotosistem-II Q_B proteinini etikleyen triazin tipi herbisitler için de uygulanmıştır. Triazine dayanıklı yabancı otlardan ve sianobakteriden izole edilen *psbA* geni tütüne aktararak atrazine dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir (Cheung ve ark., 1988). Mutant *psbA* geni taşıyan patates hücre kültürlerinin de atrazine dayanıklılık gösterdikleri saptanmıştır (Smeada ve ark., 1993).

Yine benzer bir yaklaşımla, *Salmonella typhimurium*'dan izole edilen mutant bir *aroA* geni tütün ve domatese aktararak glifosata dayanıklı bitkiler elde edilmiştir (Comai ve ark., 1985; Della-Cioppa ve ark., 1987). Karaçamda yürütülen transformasyon çalışmalarında da, *aroA* geni aktararak herbisite dayanıklı transgenik bitki elde edilmiştir (Shin ve ark., 1994).

Bu konuda bir diğer ilginç uygulama ise, memelilerde ilaçları metabolize eden P450 monooksijenaz enziminin sentezinden sorumlu genin tütüne aktarılması ile herbisite dayanıklılık kazandırılmasıdır (Shiota ve Ohkawa, 1994).

Hedef genin modifikasyonu ile herbisite dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde son olarak uygulanan bir strateji ise, hedef molekülün yapısı, aktarılan sentetik RNA/DNA molekülleri ile değiştirilmektedir (Zhu ve ark., 2000). Bu strateji kullanılarak immidazolin bazlı herbisitlere dayanıklı transgenik mısır bitkileri geliştirilmiştir.

17.3.2. Hedef molekülün fazla üretimi

İkinci stratejide, bitkilerdeki hedef molekül bazı genetik manipülasyonlar sonucu daha fazla üretilmekte, böylece herbisit aktif maddesinin varlığında bile hedef molekülün sorumlu olduğu hücresel fonksiyonlar yerine getirilebilmektedir. Bu yönde petunya üzerinde yapılan çalışmalarda EPSPS aktivitesi 20 kez artırılarak glifosata tolerans sağlanmıştır (Shah ve ark., 1986). Başka bir çalışmada, darıdan izole edilen EPSPS geni buğdaya aktararak, elde edilen kallus dokusunun glifosata dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir (Vasil ve ark., 1991). *Brassica napus*'ta glutamin sentetaz enziminin fazla sentezlettilmesi sonucunda fosfinotrisin (PPT)'ne dayanıklı bitkiler elde edilmiştir (Downs ve ark., 1994). Aynı strateji, tütünde de uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Eckes ve ark., 1989).

17.3.3. Etken maddenin detoksifikasyonu

Üçüncü ve son stratejide ise, bitkiye herbisit aktif maddesini detoksifiye eden yeni bir enzim sentezlettilmektedir. Bu amaçla, detoksifikasyon yapan enzimin sentezinden sorumlu gen bitkilere aktarılmakta, bu sayede de herbisit aktif maddesi hedef molekülü etkileyemeyen bir bileşiğe çevrilmekte, dolayısıyla hedef molekül de herbisit varlığında bile normal hücresel işlevini yürütebilmektedir.

Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda, bitkilere 2-4,D detoksifikasyonunu mümkün kılan bakteri orijinli monooksijenaz enzimi sentezlettilerek bu herbisite dayanıklı tütün (Streber ve Willmitzer, 1989) ve pamuk (Lyon ve ark., 1989) bitkileri geliştirilmiştir. Yine, PPT'in detoksifikasyonunu sağlamak amacıyla bakteri orijinli *bar* (Murakami ve ark., 1986; Thompson ve ark., 1987) ve *pat* (Wohllenberg ve ark., 1988) genleri bitkilere aktararak bialafos ve/veya glufosinat amonyuma dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilmiş olup (De Block ve ark., 1987; Vasil ve ark., 1992), tarla denemelerinde de bu bitkilerin yüksek dozda herbisite dayanıklılık gösterdikleri saptanmıştır (De Greef ve ark., 1989; D'Halluin ve ark., 1990) (Şekil 17.4, Şekil 17.5).

Son yıllarda ise bitkilere herbisitlerin aktif maddelerine özgün antikorlar üretilerek, herbisite dayanıklı transgenik bitkilerin eldesine yönelik çalışmalara da rastlanmaktadır (Longstaff ve ark., 1996).

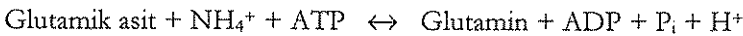
17.4. Glutamin Sentetaz İnhibitörleri

Gram pozitif toprak bakterileri olan *Streptomyces hygroscopicus* ve *Streptomyces viridochromogenes* suşları fosfonotrisil-alanil-alanin yapısında bir tripeptid üretmektedirler. Bakteriler tarafından üretilen bu bileşik Bialafos olarak adlandırılan bir antibiyotiktir. Bialaphos'un hücre içerisinde peptidaz aktivitesi ile hidrolizi sonucu ortaya çıkan fosfinotrisin (PPT), glutamin amino asidinin bir analogu olup, amino asit biyosentezinde rol alan glutamin sentetaz (GS) enziminin rakip inhibitörüdür. PPT bakteri, bitki ve hayvan hücrelerinde GS enzimlerini inhibe edebilmekte ve bu özelliğinden dolayı kontak etkili total bir herbisit olarak da kullanılmaktadır.

PPT herbisit olarak iki değişik ticari şekilde pazara sunulmaktadır. Alman Hoechst firması PPT'nin amonyum tuzu olan glufosinat amonyumu (ammonium-DL-homoalanin-4-yl(methyl)phosphinate) kimyasal olarak sentezlemekte ve BASTA® ticari adı altında pazara sürmektedir. Herbisitın diğer ticari şekli ise Japon Meiji Seika firması tarafından Herbiace® ticari ismi altında piyasaya sürülmektedir. Bu preparatta bialafos *Streptomyces hygroscopicus* suşlarından fermentasyon yoluyla elde edilmektedir.

17.4.1. PPT etki mekanizması

Bir önceki bölümde de kısaca açıklandığı gibi, PPT amino asit biyosentezinde önemli rolü olan glutamin sentetaz enzimini inhibe etmektedir. GS enzimi (E.C. 6.3.1.1.), glutamik asit ile amonyumun tepkimeye girerek glutamini oluşturduğu tepkimeyi katalizleyen enzimdir. Bitkilerde GS'in değişik izozimleri bulunmaktadır (Lee ve ark., 1993; Tingey ve ark., 1987; Pearson ve Ji, 1994; Downs ve ark., 1994; Cabello ve ark., 1994). Bu izozimler sitosolik (GS₁) ve kloroplastik (GS₂) olarak sınıflandırılmışlardır (McNally ve ark., 1983).



Bitkilerde GS enzimi, nitratin indirgenmesi, amino asit degradasyonu ve fotorespirasyon sonucu ortaya çıkan NH_4^+ 'un asimilasyonunu sağlayan tek enzimdir. GS aktivitesi durduğunda hücrelerde NH_4^+ birikimi gözlenmekte ve bu da hücrelerde dolayısıyla bitkiler üzerinde kısa sürede ölümcül etki yapmaktadır (Tachibana ve ark., 1986). Örneğin, tütünde PPT uygulamasından 24 saat sonra

herbisit uygulanmamış bitkilere kıyasla NH_4^+ yoğunluğunda 60 misli bir artış gözlenmiştir (De Block ve ark., 1987).

PPT, daha önce de açıklandığı gibi GS enziminin rakip inhibitörü olup, bu özelliği sayesinde kontakt etkili total herbisit olarak kullanılabilir. PPT bitkilerde olduğu kadar bakteri ve hayvan hücrelerinde de GS aktivitesini inhibe edebilmektedir. Ancak, hayvanlarda kan-beyin engelini (blood-brain barrier) aşamaması ve böbrekler yoluyla kısa sürede temizlenmesi bu organizmalar üstünde toksik etki yapmamasını sağlamaktadır. Ayrıca, PPT toprak bakterileri tarafından metabolize edilebildiğinden çevrede yaratabileceği toksik etkiler minimal seviyede kalmaktadır. Diğer taraftan, henüz PPT'e doğal olarak dayanıklılık sağlayan bir bitki türüne rastlanmamıştır.

17.4.2. PPT'ye dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesi

Bir önceki bölümde açıklandığı gibi PPT'in hayvanlar üzerindeki düşük toksisitesi ve topraktaki ömrünün kısa olması, yabancı ot mücadelesinde yaygın olarak kullanılabilirliğini gündeme getirmektedir. Ancak, PPT'in kontakt etkili total herbisit olması, başka bir deyişle seçiciliğinin olmaması yaygın olarak kullanımını engelleyen en büyük faktördür. Bu nedenden dolayı da PPT'ye dayanıklılık gösteren kültür bitkilerinin geliştirilmesi yönünde birçok çalışma bulunmaktadır.

Bu yönde yapılan çalışmalarda başlıca iki strateji kullanılmıştır. Bunlardan ilki önceki bölümlerde detaylı olarak açıklanan GS enziminin miktarının artırılması yönündeki çalışmalardır. İkinci ve daha yaygın olarak gözlenen yaklaşım ise PPT'in hücre içerisindeki detoksifikasyonunun sağlanmasıdır. İleriki bölümlerde PPT'e dayanıklı bitkilerin eldesi yönünde yapılan araştırmalar detaylı olarak açıklanmaktadır.

17.4.3. PPT'yi detoksifiye edebilen enzimler

Bialafos, *Streptomyces hygroscopicus* ve *Streptomyces viridochromogenes* suşları tarafından üretilmektedir. Bu suşlarda, PPT'in biyokimyasal sentez yolları detaylı olarak incelenmiştir (Murakami ve ark., 1986; Hara ve ark., 1991; Alijah ve ark., 1991). Biyosentezin 10. kademesindeki enzim, hem biyosentezin devamını sağlamakta hem de PPT'i asetilasyon yoluyla etkisiz hale getirmektedir. Başka bir deyişle, bu suşlar kendilerini ürettikleri antibiyotiğin öldürücü etkisinden korunmak amacıyla PPT detoksifikasyonunu mümkün kılan fosfinotrisin-N-asetiltransferaz (PAT) enzimini sentezlemektedirler.

PAT enziminin sentezinden sorumlu olan *bar* ve *pat* genleri sırası ile *S. hygroscopicus* (Thompson ve ark., 1987) ve *S. viridochromogenes* (Strauch ve ark., 1988) suşlarından izole ve karakterize edilmişlerdir. Her iki gen amino asit dizileri açısından %85 nükleotit dizileri seviyesinde ise %87 homoloji göstermekte, 183 amino asitlik

proteinler sentezlemekte ve PPT'yi asetile edebilmektedirler (Wohlleben ve ark., 1988). Her iki proteinin amino asit dizilerinden tayin edilen moleküler ağırlıkları 20.6 kD seviyesindedir. Her iki genin ve ürünlerinin karşılaştırması Tablo 17.3'de verilmiştir.

Her iki genin ürünü olan enzimler saflaştırılarak karakterize edilmiştir. *Bar* geninden sentezlenen PAT enzimi, SDS-PAGE analizi ile belirlenen 22-23 kD ağırlığında bir enzimdir (Botterman ve ark., 1991). Aynı şekilde, *pat* geninin ürünü olan PAT enzimi SDS-PAGE analizinde benzer bir moleküler ağırlığı göstermekte, fakat daha fazla ısı dayanıklılığı göstermektedir (Vinnemeier ve ark., 1995). Konuyla ilgili olarak çıkan son yayında ise her iki genin ürünü olan PAT enzimi karşılaştırılmalı olarak çalışılmış, ve doğal formunun 41 kD ağırlığında homodimer yapıda olduğu, ve bitkilerde eşit seviyede herbisite dayanıklılık sağlayabildikleri gösterilmiştir (Wehrmann ve ark., 1996). Buna ek olarak, her iki proteinin sindirim sistemi enzimleri tarafından parçalanabildiği ve deneklerde herhangi bir alerjik etki yapmadıkları da bildirilmiştir (Şekil 17.3).

Tablo 17.3. *Bar* ve *pat* genleri tarafından sentezlenen BAR ve PAT enzimlerinin karşılaştırılması (Vinnemeier, 1995; Wehrmann, 1996).

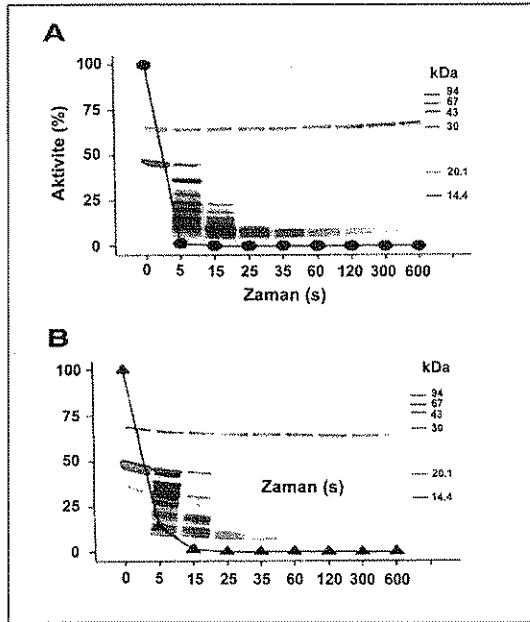
Özellik	<i>pat</i> geni ürünü	<i>bar</i> geni ürünü
İzole edildiği organizma	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Amino asit sayısı	183	183
Moleküler ağırlık	20.6	20.6
Enzimin moleküler ağırlığı	40 kD	21-23 kD
Alt ünite moleküler ağırlığı	21-23 kD	21-23 kD
Asetile Edilen bileşikler	PPT » MSO>DMPT	PPT » DMPT>MSO>Glutamat
Dönüş sayısı (22 °C)	9.2 saniye	-
(35 °C)	27.0 saniye	24.4 saniye
pH optimumu	7.0-8.0	7.5-8.5
Sıcaklık optimumu	43 °C	43 °C

17.4.4. Gen aktarım çalışmaları

Literatür incelendiğinde, PPT'e dayanıklı transgenik bitkilerin eldesinde *pat* geni ile mukayese edildiğinde *bar* geni ile yapılan çalışmaların yaygınlığı dikkat çekmektedir. Bu konudaki ilk literatür bilgisine 1987 yılında rastlanmaktadır (De Block ve ark., 1987). Bunu takip eden yıllarda, aşağıda da görülebileceği gibi birçok laboratuvar, *bar* veya *pat* genini kullanarak değişik bitki türlerinde PPT'e dayanıklı bitkiler geliştirmeyi başarmışlardır (Şekil 17.4, Şekil 17.5). Bunun yanı sıra, *bar* geni özellikle tek çenekli bitkilerde yapılan transformasyon çalışmalarında seçici gen olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır (Wilmink ve Dons, 1993). Bu çalışmalarda hedef

bitkilere *bar* geni aktarılmakta ve üretilen transgenik çeşitler PPT'yi dektoksifiye eden BAR enzimini sentezleyebildiklerinden dolayı herbisite maruz kaldıklarında PPT'den etkilenmemektedirler.

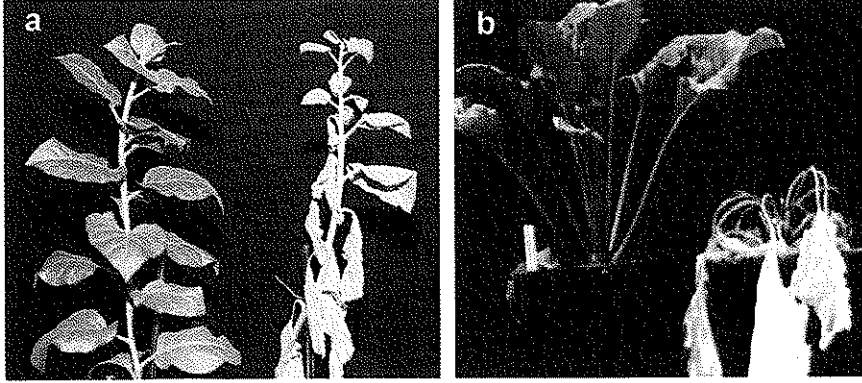
Bugüne kadar yapılan çalışmalarda PPT'e dayanıklı tütün, (De Block *ve ark.*, 1987; Van Der Hoeven *ve ark.*, 1994; Öktem, 1998), domates (De Block *ve ark.*, 1987), patates (De Block *ve ark.*, 1987; Filho *ve ark.*, 1994), şeker pancarı (Botterman *ve* Leemans, 1988; Hall *ve ark.*, 1996), *Brassica oleracea* (De Block *ve ark.*, 1989; Mukhopadhyay *ve ark.*, 1991), *Brassica napus* (De Block *ve ark.*, 1989), *Arabidopsis thaliana* (Bechtold *ve ark.*, 1993), buğday (Vasil *ve ark.*, 1992; 1993), çeltik (Datta *ve ark.*, 1990; Cao *ve ark.*, 1992; Toki *ve ark.*, 1992; Cornejo *ve ark.*, 1993; Rathore *ve ark.*, 1993; Chamberlain *ve ark.*, 1994), mısır (Fromm *ve ark.*, 1990; Gordon-Kamm *ve ark.*, 1990; Spencer *ve ark.*, 1990; 1992), arpa (Wan *ve* Lemaux, 1994), yulaf (Sommers *ve ark.*, 1992), bezelye (Grant *ve ark.*, 1995), karanfil (Zuker *ve ark.*, 1995), *Scoparia dulcis* L. (Yamazaki *ve ark.*, 1996), *Pleurotus ostreatus* (Yanai *ve ark.*, 1996) ve *Agrotis palustris* Huds (Lee *ve ark.*, 1996) transgenik bitkileri elde edilmiştir. Bu transgenik bitkilerin bazılarında tarla denemeleri de yapılmıştır (De Greef *ve ark.*, 1989; OECD, 1993).



Şekil 17.3. PAT (A) ve BAR (B) enzimlerinin mide özsuyu tarafından sindirimi. Saf enzimler mide özsuyu ile farklı sürelerde bekletilmiş ve SDS-PAGE ile analiz edilmişlerdir. Aynı sürelerde muamele edilen enzimlerin aktiviteleri de ölçülmüştür. Görüldüğü gibi mide özsuyu ile muameleden 15 saniye sonra her iki enzim de parçalanmakta ve aktivitelerini tamamen yitirmektedirler (Wehrmann *ve ark.*, 1996).



Sekil 17.4. *Bar* geninin aktarıldığı ve BASTA herbisitine dayanıklı transgenik kolzanın tarla testleri. Kontrol “Drakar” çeşidi ön planda , transgenik “Drakar” çeşidi ise arka planda verilmiştir (Salamini ve Moto, 1994’ten izin alınarak).



Şekil 17.5. a) %1 düzeyinde BASTA herbisiti uygulanmış transgenik (soldaki, *bar* geni aktarılmış) ve kontrol (sağdaki) tütün bitkilerinin 21 gün sonraki görünüşleri (Öktem, 1998). **b)** Normal dozun üç misli BASTA herbisiti uygulanmış transgenik (soldaki, *pat* geni aktarılmış) ve kontrol (sağdaki) şekerpancarı bitkilerinin 14 gün sonraki görünüşleri (Hall ve ark., 1996).

Yapılan bu çalışmalarda bitki türüne bağlı olarak farklı gen aktarım yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca, çalışmalarda *bar* geninin bitki genomunda ifadesi farklı promotor ve terminatör bölgeleri ile sağlanmıştır. Genelde kullanılan promotor

karnıbahar mozaik virüsü 35S RNA sentezini kontrol eden promotordur (CaMV 35S) (Guilley ve ark., 1982; Odell ve ark., 1985). Yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde bu promotor kullanılarak elde edilen tüm transgenik bitkilerin PPT'e dayanıklılık gösterdiği gözlenmektedir. Bunun yanısıra *bar* geninin kontrolü, Par (van der Hoven ve ark., 1994), Emu (Last ve ark., 1991) ve UBI (Christensen ve ark., 1992) gibi farklı promotor bölgelerinin kontrolü altında da denenmiştir (van der Hoven ve ark., 1994; Cornejo ve ark., 1993; Chamberlain ve ark., 1994).

17.5. Sonuç

1980'li yılların başında başlayan transgenik bitki teknolojisi günümüzde şaşırtıcı bir tempo ile gelişmeye devam etmektedir. Bu teknolojinin pazara yansıyan ilk ticari ürünleri herbisit ve böceklerle dayanıklı transgenik bitkiler olmuştur. Halen dünya genelinde yaklaşık 40 milyon hektar alanda ekimi yapılmakta olan transgenik bitkilerin %70'lik bölümünü herbisite dayanıklı transgenik bitkiler oluşturmaktadır. Bunun bir sonucu olarak da herbisite dayanıklı transgenik bitkilerin yararları kadar oluşturabilecekleri potansiyel risk ve tehlikeleri de sorgulanmaktadır.

En çok sorulan soru ise, herbisite karşı dayanıklılık sağlayan genin kültür türlerinden yabancı türlere kaçması durumunda ne gibi ekolojik etkiler oluşturabileceğidir. Bir diğer yaygın kanı ise, bu tip bitkilerin herbisit kullanımını özendirileceği dolayısı ile pestisit kullanımını arttırılabileceğidir.

Madalyonun diğer yüzünde ise, herbisite dayanıklı kültür türlerinin kullanılması ile çok daha etkin ve halihazırdaki mevcut duruma nazaran daha çevre dostu bir yabancı ot mücadelesi gerçekleştirilebileceği yönünde de görüşler bulunmaktadır.

Herbisite dayanıklı transgenik bitkiler hakkında öne sürülen görüşlerle ilgili olarak bu bölümde detaylara inilmeyecektir. Ancak, her teknolojiye olduğu gibi transgenik bitki teknolojisinin de getirdiği yararların yanı sıra, taşıdığı bazı potansiyel risklerin olduğunu da kabul etmek gerekmektedir. Bu nedenle, bahsi geçen teknoloji ele alınırken sadece yararların veya sadece zararlarının öne çıkartılmasından ziyade, gerçekçi ve sistematik bir risk değerlendirme yöntemi uygulanarak bu teknolojiden maksimum seviyede yararlanabilme yolları araştırılmalıdır.

Kaynaklar

Alijah R, Dorendorf J, Talay S, Pühler A, Wohlleben W (1991) Genetic analysis of the phosphinothricin tripeptide biosynthetic pathway of *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. Appl. Microbiol. Biotech., 34: 749-755.

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Life Sci., 316: 1-5.

- Bedbrook J, Chaleff RS, Falco SC, Mazur B, Yadav N (1988) Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase. Eur. Patent Appl., 0257993.
- Botterman J, Leemans J (1988) Engineering herbicide resistance in plants, Trends Genet., 4: 219-222.
- Botterman J, Gosselé V, Thoen C, Lauwereys M (1991) Characterization of phosphinothricin acetyltransferase and c-terminal enzymatically active fusion proteins Gene, 102: 33-37.
- Brandle JE, Miki BL (1993) Agronomic performance of sulfonylurea-resistant flue-cured tobacco grown under field conditions, Crop Sci., 33: 847-852.
- Brandle JE, Morrison MJ, Hattori J, Miki BL (1994) A comparison of two genes of sulfonylurea herbicide resistance in transgenic tobacco seedlings, Crop Sci., 34: 226-229.
- Cabello P, De La Haba P, Maldonado JM (1994) Properties of glutamine synthetase isoforms isolated from sunflower leaves. J. Plant Physiol., 144: 1-6.
- Cao J, Dyan X, McElroy D, Wu R (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. Plant Cell Rep., 11: 586-591.
- Chamberlain DA, Brettell RIS, Last DI, Witzens B, McElroy D, Dolferus R, Dennis ES (1994) The use of the emu promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. Aust. J. Plant Physiol., 21: 95-112.
- Cheung AG, Bogorad L, Van Montagu M, Schell J (1988) Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 391-395.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mol. Biol., 18: 675-689.
- Comai L, Facciotti D, Hiatt WR, Thompson G, Rose RE, Stalker DM (1985) Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature, 317: 741-744.
- Cornejo MJ, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD, Blechl AN (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. Plant Mol. Biol., 23: 567-581.
- Datta SK, Peterhans A, Potrykus U (1990) Genetically engineered fertile india-rice recovered from protoplasts. Bio/Technology, 8: 736-740.
- De Block M, Botterman J, Vandewiele MJ, Thoen C, Gosselé V, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J., 6: 2513-2518.
- De Block M, De Brouwer D, Tenning P (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. Plant Physiol., 91: 694-701.

- De Greef W, Delon R, De Block M, Leemans J, Botterman J (1989) Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Bio/Technology*, 7: 61-64.
- Della-Cioppa G, Bauer SC, Taylor ML, Rochester DE, Klein BK (1987) Targeting a herbicide resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology*, 5: 579-584.
- D'Halluin K, Botterman J, De Greef W (1990) Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Sci.*, 30: 866-871.
- Downs CG, Borst WM, Hurst PL, Stevenson DG (1994) Isoforms of glutamine synthetase in asparagus spears: the cytosolic enzyme increases after harvest. *Plant Cell Environ.*, 17: 1045-1052.
- Downs CG, Christey MC, Davies KM, King GA, Seelye JF, Sinclair BK, Stevenson DG (1994) Hairy roots of *Brassica napus*. II. glutamine synthetase overexpression alters ammonia assimilation and the response to phosphinothricin. *Plant Cell Rep.*, 14: 41-46.
- Eckes P, Schmitt P, Daub W, Wengenmayer F (1989) Overproduction of alfalfa glutamine synthetase in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.*, 217: 263-268.
- Filho ESF, Figueiredo LFA, Neshich DCM (1994) Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep.*, 13: 666-670.
- Fromm ME, Morris F, Armatrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology*, 8: 833-839.
- Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Willets NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RV, Kausch AP, Lemaux PG (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell*, 2: 603-618.
- Grant JE, Cooper PA, Mcara AE, Frew TJ (1995) Transformation of peas (*Pisum sativum* L.) using immature cotyledons. *Plant Cell Rep.*, 15: 254-258.
- Guilley H, Dudley HK, Jonard D, Balazs E, Richards KE (1982) Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences and characterization of transcripts. *Cell*, 30: 763-773.
- Hall RD, Riksen-Bruinsma T, Weyens GJ, Rosquin IJ, Denys PN, Evans IJ, Lathouwers JE, Lefebvre MP, Dunwell JM, Van Tunen A, Krens FA (1996) A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotech.*, 14: 1133-1138.
- Hara O, Murakami T, Imai S, Anzai H, Itoh R, Kumada Y, Takano E, Satoh E, Nagaoka K, Thompson C (1991) The biolophos biosynthetic genes of *Streptomyces viridochromogenes*: cloning, heterospecific expression, and comparison with the genes of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 351-359.

- Haughn GW, Smith J, Mazur B, Somerville C (1988) Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonyleurea herbicides. *Mol. Gen. Genet.*, 211: 266-271.
- Hoyle R (1993) Herbicide-resistant crops are no conspiracy. *Bio/Technology*, 11: 783-784.
- Last DI, Brettel RIS, Chamberlain DA, Chaudhury AM, Larkin PJ, Marsh EL, Peacock WJ, Dennis ES (1991) pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theor. Appl. Genet.*, 81: 581-588.
- Lee M, Villemur R, Hussey PJ, Silflow CD, Gant JS, Snustad DP (1993) Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.*, 23: 401-407.
- Lee L, Laramore CL, Day PR, Tümer NE (1996) Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplasts. *Crop Sci.*, 36: 401-406.
- Longstaff M, Newell CA, Boonstra B, Porter AJR, Leapmonth D, Hamilton WDO (1996) The production and analysis of transgenic plants expressing anti-herbicide single chain antibody fragments. In: Symposium of Engineering Crops for Industrial End Uses, 16-18 Eylül, ICAR-Long Ashton Research Station Bristol, İngiltere.
- Lyon BR, Llewellyn DJ, Huppertz JL, Dennis ES, Peacock WJ (1989) Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Mol. Biol.*, 13: 533-540.
- Mazur BJ, Falco SC (1989) The development of herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 441-470.
- McNelly SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF, Stewart GR (1983) Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol.*, 227: 97-107.
- Mukopadhyay A, Töpfer R, Pradhan AK, Steinbiss HH, Schell J, Pental D (1991) Efficient regeneration of *Brassica oleracea* hypocotyl protoplasts and high frequency genetic transformation by direct DNA uptake. *Plant Cell Rep.*, 10: 375-379.
- Murakimi T, Anzai H, Imai S, Satoh A, Nagaoka K, Thompson CJ (1986) The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.*, 205: 42-50.
- OECD (1993) Field Releases of Transgenic Plants, 1986-1992, An Analysis. OECD, Paris.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810-812.
- Öktem HA (1998) Development of phosphinotricin resistant fertile transgenic tobacco plants. *ACTA Agronomica Hungarica*, 46: 97-104.
- Özer Z (1993) Niçin yabancı ot bilimi (herboloji)? Türkiye I. Herboloji Kongresi, s. 1-7, 3-5 Şubat, Adana.
- Pearson J, Ji YM (1994) Seasonal variation of glutamine synthetase isoforms in temperate deciduous trees strongly suggests different functions for the enzymes. *Plant Cell Environ.*, 17: 1331-1337.

Rathore KS, Chowdhury VK, Hodges TK (1993) Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, 21: 871-884.

Salamini F, Motto M (1994) The role of gene technology in plant breeding. In: Hayward MD, Bolemark NO, Romagosa I (eds), *Plant Breeding: Principles and Prospects*, pp. 138-159, Chapman & Hall, Cambridge.

Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Tümer NE, Hironaka CM, Sanders PR, Aykent S, Gasser CS, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, 233: 478-481.

Shin DI, Podila GK, Huang Y, Karnosky DF (1994) Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Can. J. For. Res.*, 24: 2059-2067.

Shiota N, Ohkawa H (1994) Herbicide resistant transgenic tobacco plants expressing *cyp1a1/p450* reductase fused enzyme. In: *Proceedings of the International Congress of Pesticide Chemistry*, pp. 83-84.

Smeda RJ, Hasegawa PM, Goldsbrough PB, Singh NK, Weller SC (1993) A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. *Plant Physiol.*, 103: 911-917.

Sommers DA, Rines HW, Gu W, Kaeppler HF, Bushnell WR (1992) Fertile transgenic oat plants. *Bio/Technology*, 10: 1589-1594.

Spencer TM, Gordon-Kamm WJ, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.*, 79: 625-631.

Spencer TM, O'Brien JV, Start WG, Adams TR, Gordon-Kamm WJ, Lemaux PG (1992) Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol. Biol.*, 18: 201-210.

Strauch E, Wohlleben W, Pühler A (1988) Cloning of a phosphinothricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene*, 63: 65-74.

Streber WR, Willmitzer L (1989) Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Bio/Technology*, 7: 811-815.

Tachibana K, Watanabe T, Sekizawa Y, Takematsu Z (1986) Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pesticide Sci.*, 11: 33-37.

Thompson C, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of herbicide resistant gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.*, 6: 2519-2523.

Tingey SV, Walker E, Coruzzi GM (1987) Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.*, 6: 1-9.

Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, Ooba S, Anzai S, Iwata M, Christensen A, Uchiama H (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*Bar* chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol.*, 100: 1503-1507.

- Van Der Hoeven C, Dietz A, Landsmann J (1994) Expression of phosphinothricin acetyltransferase from the root specific par promoter in transgenic tobacco plants is sufficient for herbicide tolerance. *Plant Cell Rep.*, 14: 165-170.
- Vasil V, Brown SM, Re D, Fromm ME, Vasil IK (1991) Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology*, 9: 743-747.
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, 10: 667-674.
- Vasil V, Srivastava V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1993) Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology*, 11: 1553-1558.
- Vinnemeier J, Pistorius EK, Broer I (1995) Purification and partial characterization of the *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 phosphinothricin-*n*-acetyltransferase mediating resistance to the herbicide phosphinothricin in transgenic plants. *Z. Naturforsch.*, 50c: 796-805.
- Wan Y, Lemaux PG (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.*, 104: 37-48.
- Wehrmann A, Vilet AV, Opsomer C, Botterman J, Schulz A (1996) The similarities of *bar* and *pat* products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotech.*, 14: 1274-1278.
- Wohleberg W, Arnold W, Broer I, Hilleman D, Strauch A, Pühler A (1988) Nucleotide sequence of phosphinothricin-N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*, 70: 25-37.
- Wilmink A, Dons JJM (1993) Selective agents and marker genes for use in transformation of Monocotyledonous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11: 165-185.
- Yamazaki M, Lin S, Hayashi T, Morita N, Asamizu T, Mourakoshi I, Saito K (1996) Transgenic fertile *Scoparia dulcis* L. a folk medical plant, conferred with a herbicide-resistant trait using a Ri binary vector. *Plant Cell Rep.*, 15: 317-321.
- Yanai K, Yonekura K, Usami H, Hirayama M, Kajiwarra S, Yamazaki M, Shishido K, Adachi T (1996) The integrative transformation of *Pleurotus ostreatus* using bialaphos resistance as a dominant selectable marker. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 472-475.
- Zhu T, Mettenbutg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczyński L (2000) Engineering herbicide resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotech.*, 18: 555-558.
- Zuker A, Chang PFL, Ahroni A, Cheah K, Woodson WR, Bressan RA, Watad AA, Hasegawa PM, Vainstein A (1995) Transformation of carnation by microprojectile bombardment. *Scientia Horticulturae*, 64: 177-185.

Bölüm 18

Böceklerle Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

Hüseyin Avni Öktem

ODTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, 06531 Ankara
e-posta: baoktem@metu.edu.tr

18.1. Giriş

Tarımsal üretimde farklı etmenlerden dolayı oluşan ürün kayıpları yürütülen farklı mücadele yöntemlerine rağmen kaçınılmaz olmaktadır. Dünyada tüm etmenlere dayalı verim kayıpları 500 milyar dolar (USD) olarak tahmin edilmektedir (Oerka *ve ark.*, 1994). Yabancı ot, hastalık ve zararlı böcekler tarafından oluşturulan kayıpların ise %45 seviyesinde olduğu belirtilmektedir.

Zararlı böceklerle mücadele yapılmadığında bazı bitkilerde oldukça yüksek sayılabilecek kayıplar oluşabilmektedir (Duck ve Evola, 1997). Örneğin patatest, patates böceği ile mücadele yapılmadığında %47 olan kayıp, mücadele ile %1'e indirilebilmektedir. Benzer şekilde, buğdayda süne mücadelesi yapılmadığında %90'a varan kayıplar oluşabilmektedir. Bu nedenle de zararlı böceklerle mücadelede, kimyasal yöntemler (insektisit kullanımı) başta olmak üzere farklı uygulamalara gidilmektedir. Mücadelede kullanılan insektisitler için harcanan tutarlar Tablo 18.1'de, mücadeleye rağmen oluşan kayıplar ise Tablo 18.2'de verilmektedir. Tablolardan da görülebileceği gibi böcek mücadelesine rağmen önemli ürün kayıpları oluşmaktadır.

Günümüzde moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler sayesinde zararlılarla mücadelede gen teknolojisi yöntemleri kullanılabilir duruma gelmiştir. Bu mücadele yöntemi, böcekler üzerinde toksik etki yapan proteinlerin (insektisidal proteinler) sentezinden sorumlu genlerin bitkilere aktararak transgenik bitkilerin geliştirilmesi esasına dayanmaktadır. Günümüzde bahsi geçen teknolojide en yaygın kullanılan genler doğal ve sentetik *Bacillus thuringiensis* (Bt) δ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan *cry*¹ genleridir. Bu konuda akademik birimlerin yanı sıra, ticari şirketlerin Ar&Ge birimlerinde de yoğun araştırmaların yürütüldüğü gözlenmektedir. Bunun sonucu olarak da Bt endotoksinlerini taşıyan ilk generasyon transgenik bitkiler ticari olarak üretilmektedirler.

Tablo 18.1. Dünya genelinde insektisitlere harcanan para (Krattiger, 1997).

Bitki	İnsektisit Tutarı (milyar \$)
Meyve-Sebze	2,465
Pamuk	1,870
Çeltik	1,190
Mısır	620
Diğer	1,965
Toplam	8,110

Tablo 18.2. İnsektisit kullanımına rağmen oluşan ürün kayıpları (Krattiger, 1997).

Bitki	Kayıp (milyar \$)	Kayıp (%)
Çeltik	45,000	27
Meyve	20,000	6

Böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde Bt endotoksin genlerine ek olarak farklı stratejiler de kullanılabilmektedir. Bu insektisidal etki gösteren proteinler içerisinde en ümitvar örnekler, çeşitli proteinaz inhibitörleri, α -amilaz inhibitörleri, lektinler, kitinaz, kolesterol oksidaz enzimi, avidin ve VIP (vegetative insectisidal proteins) proteinlerini içermektedir.

İlerleyen bölümlerde, yukarıda bahsi geçen insektisidal proteinlerin etki mekanizmaları ve bu proteinlerin sentezlerinden sorumlu genlerin transferi ile elde edilen transgenik bitkiler hakkında bilgi verilecektir. Böceklerle dayanıklı transgenik bitkiler hakkında daha detaylı bilgiler, daha önce yayınlanmış muhtelif derlemelerde (Brunke ve Meeusen, 1991; Shah ve ark., 1995; Estruch ve ark., 1997; Jouanin ve ark., 1998; Schuler ve ark., 1998; Bent ve Yu, 1999; Hidler ve Boulter, 1999; Watt, 1999) ve konunun tüm boyutları ve örnekleri ile ele alındığı Carozzi ve Kozziel (1997)'de bulunabilir.

¹ *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin proteinlerinin kristal yapılarından dolayı, bu proteinlerin sentezinden sorumlu genler 'crystalline'nin kısaltması olan '*cry*' ibaresi ile gösterilmektedirler. '*Cry*' ibaresi ise ilgili proteinleri göstermekte kullanılmaktadır.

18.2. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksinleri

Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* (Bt) ilk olarak 1902 yılında Japonya'da keşfedilmiştir. Daha sonra 1911'de bir un güvesi popülasyonundan, Berlier tarafından Thüringen (Almanya)'de yeniden izole ve karakterize edilmiştir. Bu bakteriler sporülasyon esnasında insektisidal etki gösteren bazı yapılar oluşturmaktadırlar. Bu kristalize yapılar delta-endotoksin olarak adlandırılan pro-toksinlerden oluşmaktadırlar. Bt suşları sınırlı konukçu profili olan farklı kristalize (Cry) proteinler üretmektedirler.

Günümüzde farklı Bt izolatlarından 130'un üzerinde Bt endotoksin geni izole edilmiş ve nükleotid dizileri belirlenmiştir (Höfte ve Whiteley, 1989; Crickmore ve ark., 1998). Ayrıca, Bt toksininin bilimsel adlandırılması için bazı web (örnek: http://epunix.bio.sus.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html) adreslerinden de bilgi elde edilebilir. Bt endotoksin proteinleri yapısal özellikleri ve konukçu profillerine göre Cry-I, Cry-II, Cry-III ve Cry-IV olmak üzere dört farklı grupta kategorize edilmektedir. Bunlardan Cry-I toksinleri Lepidoptera üzerinde etki gösterirken, Cry-III toksinleri Coleoptera Cry-IV ise Diptera üzerinde etkili olabilmektedir. Cry-II toksinlerinin ise hem Lepidoptera hem de Diptera üzerinde etkin oldukları bilinmektedir.

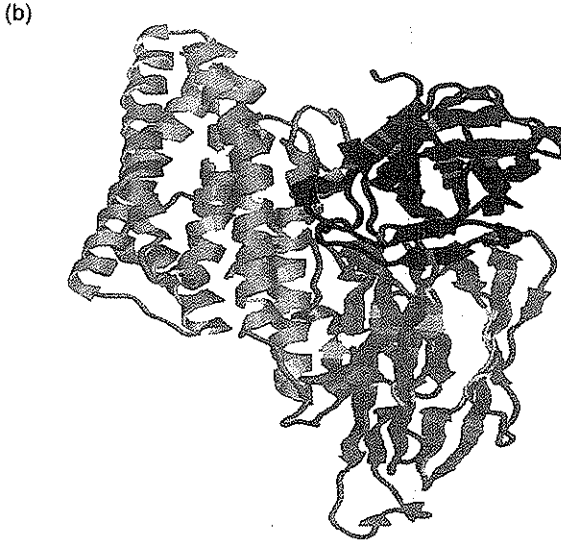
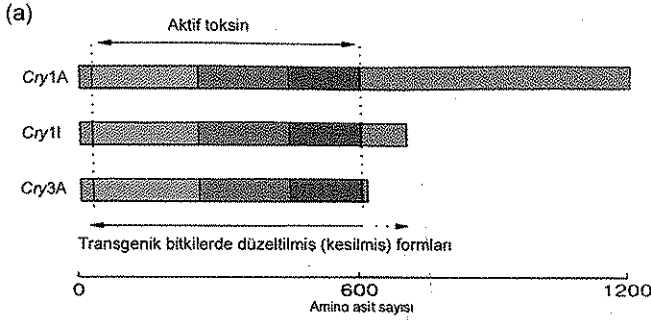
Bt delta-endotoksinleri, pro-toksin halinde 130 kDa büyüklüğündeki proteinlerden oluşmaktadır. Toksinler, böcekler tarafından alındığında, orta bağırsak bölgesinde çözülme ve proteolitik aktivite sonucu 65-70 kDa büyüklüğündeki aktif formlarına dönüşmektedirler (Şekil 18.1) (Grochulski, 1995). Toksinin etki mekanizması, aktif haldeki toksinlerin bağırsak epitel hücrelerinde bulunan reseptör bölgelerine bağlanmasını takiben hücre zarı üzerinde delikler oluşturması sonucu, bu hücrelerin patlaması ile oluşmaktadır (Gill ve ark., 1992; Knowles ve Dow, 1993). Etki mekanizması şematik olarak Şekil 18.2'de gösterilmektedir.

Bt, 40 yıldır biyo-insektisit olarak kullanılmaktadır. Bu formülasyonların insan, hayvan ve hedef dışı fauna üzerinde etkisiz olmalarına karşın sınırlı kalıcılıkları kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktördür. Halen kullanılmakta olan biyo-insektisitlerin %90'ı Bt formülasyonlarından oluşmakta olup, Bt endotoksinleri toplam insektisit pazarının %5'ini oluşturmaktadır (Lambert ve Peferon, 1992).

18.3. Bt Geni Taşıyan Transgenik Bitkiler

İnsektisidal protein üretebilen ilk Bt geninin 1981 yılında izole edilmesi ve klonlanmasından sonra (Schnepf ve Whiteley, 1981) bu ve benzeri genlerin bitkilere aktarılması konusundaki araştırmalar yoğunluk kazanmıştır (Peferon 1997; Maagd ve ark., 1999). Bt genini taşıyan ilk transgenik bitkiler 1987 yılında geliştirilmiştir (Vaeck ve ark., 1987; Barton ve ark., 1987; Fischhoff ve ark., 1987). Bunu takiben 1990'lı yılların başında 7 değişik grup Bt genlerini taşıyan transgenik bitkilerle tarla denemeleri gerçekleştirmişlerdir (Kozziel ve ark., 1993). Bu çalışmalar

sonucunda *Bt* genlerinin bitkilerde ifade (ekspres) edilebildiği gösterilmiştir. Ancak bu araştırmalar sonucu, doğal *Bt* genlerinin bitkilerde düşük olan ifade oranlarının (1-5 ng/mg protein) böceklerle dayanıklılık için yeterli düzeyde olmadığı da saptanmıştır.

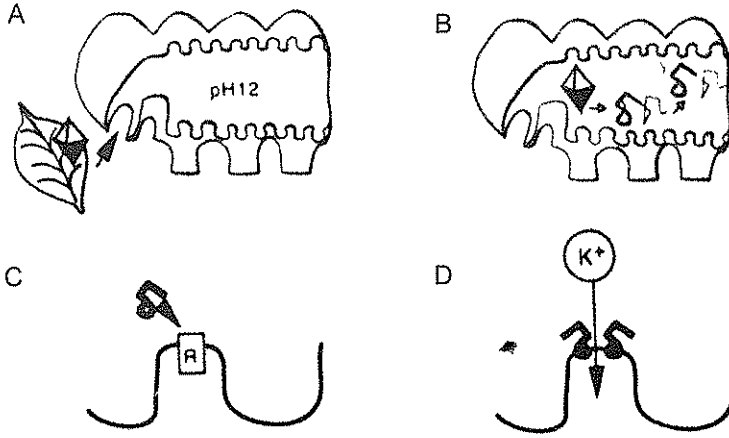


Şekil 18.1. Üstte: *Bacillus thuringiensis* delta endotoksinlerin şematik olarak gösterimi. Bar yaklaşık amino asit sayılarını göstermektedir. Şekil tüm *Bt* kristallerinde bulunan protoksin geninin ürünlerini göstermektedir. Böcek bağırsak proteazları, proteini C-terminalinde hidrolize ederek (gri bölgeler) ok ile gösterilen aktif toksinin oluşmasını sağlamaktadırlar. *Altta:* Aktive edilmiş bir Cry1A toksininin üç boyutlu yapısı. Toksinde üç fonksiyonel bölge bulunmaktadır. Mavi ile gösterilen bölge, toksinin hücre zarına giriş ve delik oluşumundan sorumlu bölgedir. Yeşil ve kırmızı kısımlar, reseptörlerin tanınmasından ve reseptörlere bağlanmadan sorumlu bölgeleri göstermektedir. (Grochulski, 1995; Maagd ve ark., 1999'dan alınarak).

Bunun başlıca nedeni *Bt* genlerinde yüksek olan adenin/timin (A/T) oranının bitkilerde yüksek olan guanin/sitozin (G/C) oranından farklı olmasıdır. Bu

nedenle, araştırmacılar daha sonraki uygulamalarda, *Bt* genlerinin kısmen modifiye veya tamamen sentetik formlarını ve farklı promotor kombinasyonlarını kullanarak, protein ifade seviyelerini 100-200 ng/mg düzeyine çıkartarak, bu sayede tarla koşullarında etkin bir böcek mücadelesini olası kılmışlardır (Koziel *ve ark.*, 1993; Williams *ve ark.*, 1993; McBride *ve ark.*, 1995; Perlak *ve ark.*, 1990, 1991, 1993).

K



Şekil 18.2. *Bt* toksinlerinin etki mekanizması. A) *Bt* geni taşıyan transgenik bitkinin böcek tarafından alınması B) Protein yapısındaki toksinin böcek orta bağırsağında proteinazlar tarafından aktif formuna döndürülmesi. C) Aktif toksinin epitel hücreleri üzerinde bulunan ilgili reseptörlere bağlanması. D) Hücre zarlarında delik oluşumu ve hücrelerin ölümü.

Halen 25'in üzerinde bitki türünde *Bt* genlerini taşıyan transgenik bitkiler geliştirilmiş durumdadır (Schuler *ve ark.*, 1998; USDA/APHIS Biotechnology Permit Database: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/>). Bu bitkiler ve taşıdıkları kristal proteinler Tablo 18.3'de özetlenmiştir. Bazı örnekler ise Şekil 18.3, Şekil 18.4, Şekil 18.5'de verilmiştir.

Bt genlerini taşıyan transgenik bitkiler üzerindeki yoğun araştırmalar sonucu, ilk ticari ürünler 1995 yılında piyasaya çıkmıştır. Bu ürünler, sırasıyla CryIA(b), CryIA(c) ve CryIIIA toksin proteinlerini üreten mısır (Maximizer™, Novartis), pamuk (Bollgard™, Monsanto) ve patates (Newleaf™, Monsanto) bitkileridir.

Tablo 18.3. *Bt* geninin aktarıldığı kültür bitkileri ve dayanıklılığın sağlandığı zararlı böcekler.

Bitki	Gen	Tipi	Hedef Böcek	Kaynak
Tütün	<i>CryIA(a)</i>	D	<i>Manduca sexta</i> ¹	Barton ve ark., 1987
	<i>CryIA(b)</i>	D	<i>Manduca sexta</i> ¹	Vaeck ve ark., 1987
	<i>CryIA(b)&(c)</i>	KS	<i>Manduca sexta</i> ¹	Perlak ve ark., 1991
	<i>CryIA(b)</i>	D	<i>Manduca sexta</i> ¹	Williams ve ark., 1993
	<i>CryIA(c)</i>	D	<i>Heliothis virescens</i> ¹ , <i>Heliothis zea</i> ¹	McBride ve ark., 1995
	<i>Cry2A42</i> (kloroplast)	S	<i>Heliothis virescens</i> ¹ <i>Helicoverpa zea</i> ¹ <i>Spodoptera exigua</i> ¹	Brandy ve ark., 2001
Domates	<i>CryIC</i>	S	<i>Spodoptera littoralis</i> ¹	Strizhov ve ark., 1996
	<i>CryIA(b)</i>	D	<i>Heliothis virescens</i> ¹	Fischhoff ve ark., 1987
	<i>CryIA(b)</i>	D	<i>Heliothis virescens</i> ¹	Delannay ve ark., 1989
Pamuk	<i>CryIA(b)&(c)</i>	S	<i>Heliothis virescens</i> ¹ , <i>Heliothis zea</i> ¹	Perlak ve ark., 1990
	<i>CryIA(b)&(c)</i>	S	<i>Heliothis virescens</i> ¹	Parker ve ark., 2000
Patates	<i>CryIA(b)</i>	D	<i>Phthorimaea operculella</i> ¹	Peferon, 1992
	<i>Cry5</i>	D	<i>Phthorimaea operculella</i> ¹	Mohammed ve ark., 2000
	<i>CryIIIA</i>	S	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> ²	Adang ve ark., 1993
Tatlı patates	<i>CryIIIA</i>	S	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> ²	Perlak ve ark., 1993
	<i>CryIIIA</i>	D	<i>Cylas formicarius</i>	Moran ve ark., 1998
Brokoli	<i>CryIA(c)</i>	S	<i>Plutella xylostella</i> ¹	Metz ve ark., 1995
	<i>CryIA(c)</i>	S	<i>Plutella xylostella</i> ¹	Tang ve ark., 1999
	<i>CryIC</i>	S	<i>Plutella xylostella</i> ¹	Zhao ve ark., 2000
Patlıcan	<i>CryIIIB</i>	KS	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> ²	Arpaia ve ark., 1997
	<i>CryIIIB</i>	KS	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> ²	Acciarri ve ark., 2000
Lahana	<i>CryIA(b3)</i>	S	<i>Plutella xylostella</i> ¹	Jin ve ark., 2000
Yonca	<i>CryIC</i>	S	<i>Spodoptera littoralis</i> ¹	Strizhov ve ark., 1996
Kolza	<i>CryIA(c)</i>	S	<i>Plutella xylostella</i> ¹ , <i>Heliothis zea</i> ¹	Stewart ve ark., 1996a
	<i>CryIA(c)</i>	S	<i>Coffea canephora</i>	Leroy ve ark., 2000
Soya	<i>CryIA(c)</i>	S	<i>Heliothis virescens</i> ¹ , <i>Heliothis zea</i> ¹ , <i>Pseudoplusia includens</i> ¹	Stewart ve ark., 1996b
	<i>CryIA(c)</i>	S	<i>Helicoverpa zea</i> , <i>Anticarsia gemmatilis</i>	Walker ve ark., 2000
Nohut	<i>CryIA(c)</i>	KS	<i>Heliothis armigera</i>	Kar ve ark., 1997
Yer fıstığı	<i>CryIA(c)</i>	KS	"Lesser cornstalk borer"	Singist ve ark., 1997

Tablo 18.3'ün devamı...

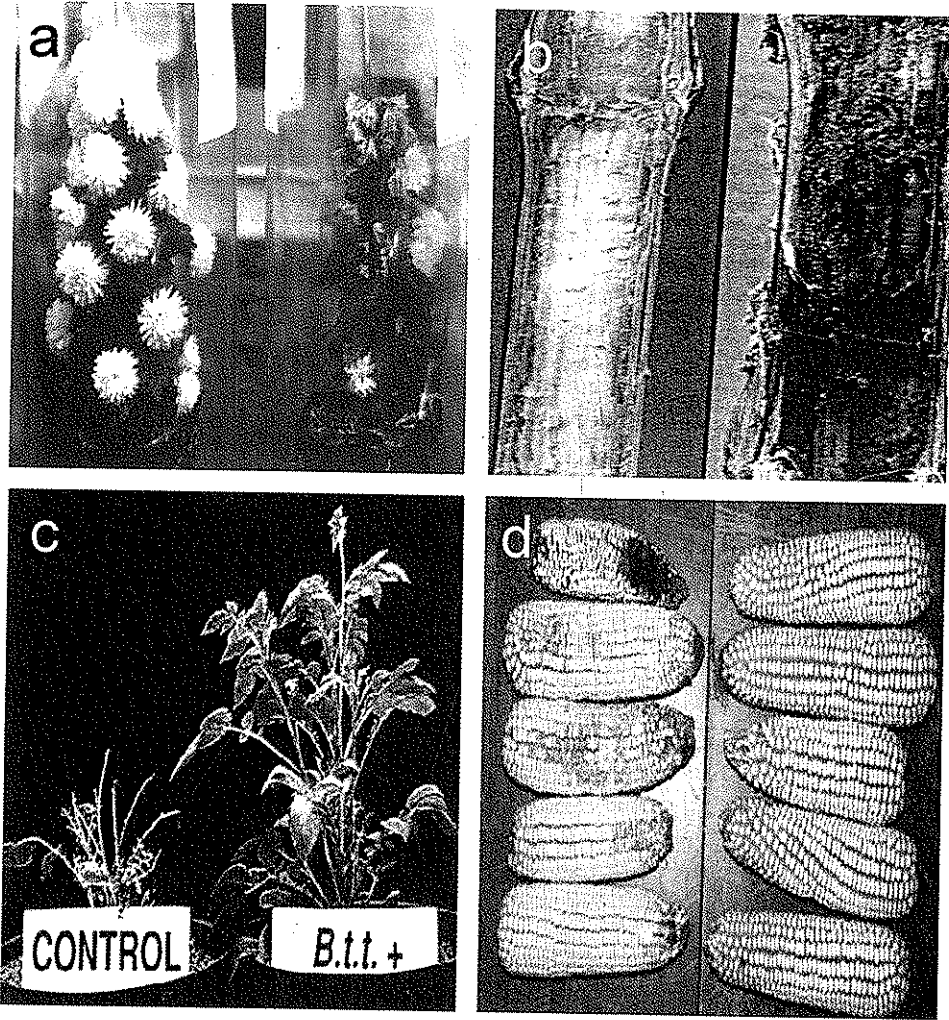
Bitki	Gen	Tipi	Hedef Böcek	Kaynak
Mısır	<i>CryIA(b)</i>	S	<i>Ostrinia nubilalis</i> ¹	Koziel ve ark., 1993
	<i>Cry9C</i>	D	<i>Diatrea grandiosella</i>	Lambert ve ark., 1996
	<i>CryIA(b)&(c)</i>	S	<i>Ostrinia nubilalis</i> ¹	Bohorova ve ark., 1999
Çeltik	<i>CryIA(b)</i>	S	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Fujimoto ve ark., 1993
	<i>CryIA(b)</i>	S	<i>Cnaphalocrosis medinalis</i> ¹	Wünn ve ark., 1996
	<i>CryIA(b)</i>	S	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Datta ve ark., 1998
	<i>CryIA(b)&(c)</i>	S	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Cheng ve ark., 1998
	<i>CryIA(b)</i>	S	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Alam ve ark., 1999
	<i>CryIB</i>	S	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Breitler ve ark., 2000
	<i>CryIA(b)&(c)</i>	S	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Tu ve ark., 2000
Kavak	<i>CryIA(a)</i>	KS	<i>Lymantria dispar</i> ¹	McCown ve ark., 1991
	<i>CryIIA</i>	D	<i>Chrysomela tremulae</i> ²	Cornu ve ark., 1996
	<i>CryIIA</i>	KS	?	Wang ve ark., 1996
Brassica	<i>CryIA(b)&(c)</i>	S	<i>Plutella xylostella</i> ¹	Xiang ve ark., 2000

D=doğal, KS=kısmen sentetik, S=sentetik, 1=Lepidopter, 2=Coleopter, ?=belirtilmemiş.

Günümüzde *Bt* genlerini taşıyan transgenik bitkilerin ekiliş alanları 1999 yılı itibariyle 11.7 Milyon hektarı bulmaktadır (James, 2000). *Bt*-transgenik mısır ve pamuk sırası ile, 7.5 ve 1.3 milyon hektarlık alanda ekilmektedirler. Bunlara ek olarak, hem herbisit hem de böceklerle dayanıklı (*Bt*) mısır ve pamuğun ekiliş alanları da sırası ile, 2.1 ve 0.8 milyon hektar olarak belirtilmektedir (James, 2000). Verilen bu değerlere önemli ölçüde transgenik bitki tarımının yapıldığı belirtilen Çin dahil değildir. Transgenik bitkilerin kullanım alanları özellikle Amerika kıtasında yoğunlaşmış olup Avrupa'da henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ülkemizde ise Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ile bazı özel şirketlerin (örnek: Monsanto, Şekil 18.4) yürüttüğü tarla denemeleri dışında herhangi bir üretim bulunmamaktadır.

Bt genlerini taşıyan transgenik bitkilerin geniş tarım alanlarında kullanımları ile ilgili karşı görüşler de bulunmaktadır. Bu görüşler iki ana başlık altında özetlenebilir; 1) toksinin hedef olmayan organizmalar (böcekler üzerinden beslenen avcılar ve parazitler) üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkiler, 2) zararlı böceklerin toksine sürekli maruz kalmaları sonucu *Bt* toksinlerine dayanıklılık oluşturmaları.

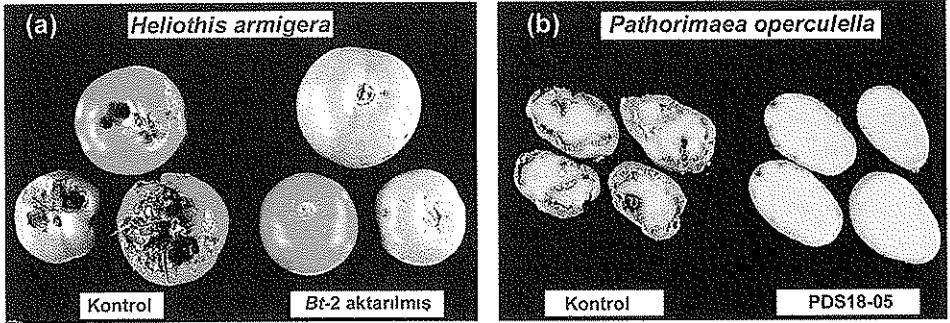
Yürütülen araştırmalar sonucunda, yukarıda belirtilen hususlar üzerinde farklı bulgular mevcut olup, konu tüm boyutları ile yeni yayınlanan derlemelerde değerlendirilmektedir (Frutos ve ark., 1999; Schuler ve ark., 1998). Buna ek olarak, ekolojik risk değerlendirmesi ve toksinlere dayanıklılık geliştirme konusunda daha detaylı bilgiler veren kaynaklar da literatürde mevcuttur (Shelton ve ark., 2000).



Şekil 18.3. a) *Bt cryIC* geninin aktarıldığı krizantem bitkisinin (soldaki) kontrol bitkisine (sağdaki) nazaran arıyarm larvasına karşı gösterdiği dayanıklılık (Maagd ve ark., 1999). b) Mısır sap kurdunun *Bt* geni taşıyan transgenik (sağdaki) ve kontrol (soldaki) mısır bitkisinin gövdeleri üzerinde oluşturdukları zarar (Shah ve ark., 1995). c) Patates böceğinin [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] *Bt-cry-IIIa* geni taşıyan transgenik (sağdaki) ve kontrol (soldaki) patates bitkileri üzerinde oluşturduğu zarar. Her iki bitki 50-100 kadar patates böceği larvası ile enfekte edilmiştir. Transgenik bitki ile beslenen larvaların 48 saat içerisinde öldüğü belirtilmektedir. Kontrol bitkilerin 7 - 10 günde gördükleri zarar gösterilmektedir (Perlak ve ark., 1993). d) Mısır kurdu zararı sonrası transgenik (sağdaki) ve kontrol (soldaki) bitkilerden elde edilen koçanlar (Iowa State University, Image Gallery, <http://www.ent.iastate.edu/imagegallery/>).



Şekil 18.4. *Bt* geni taşıyan transgenik (soldaki sıralar) ve kontrol (sağdaki sıralar) bitkilerinin, Adana'da yürütülen tarla denemelerinde mısır koçan ve sap kurduna karşı gösterdikleri tepki (Fotoğraf: Ali Tetik, Monsanto).



Şekil 18.5. *Bt* geni taşıyan domatesten elde edilen meyvelerin domates meyve korduna karşı gösterdikleri dayanıklılık (a). *Bt* geni taşıyan patatesten elde edilen yumruların patates yumru güvesine karşı gösterdikleri dayanıklılık (b) (Salamini ve Moto, 1994'ten izin alınarak).

18.4. Diğer İnsektisidal Aktivite Gösteren Proteinler

Bt toksinlerinin dışında son yıllarda insektisidal etki gösteren bitki ve bakteri orijinli diğer birçok protein üzerinde de araştırmalara ve oldukça ümitvar sonuçlara rastlanmaktadır. Bu tip insektisidal proteinlerin sentezinden sorumlu genlerin büyük bir bölümü bitki orijinli olup, proteinaz inhibitörleri, alfa-amilaz inhibitörleri, lektinler, kolesterol oksidaz ve avidini içermektedirler. Aşağıdaki

bölümlerde bu insektisidal proteinlerin etki mekanizmaları ve bunları taşıyan transgenik bitkiler hakkında daha detaylı bilgi verilmektedir.

18.4.1. Proteinaz inhibitörleri

Böcekler serin, sistein, aspartik ve metalo gibi farklı proteinaz enzimleri içermekte olup, bu enzimler gıda olarak alınan proteinlerin sindirilmesinde ve böceklerin normal büyüme ve gelişmesinde hayati rolü olan amino asitlerin salınmasında görev almaktadırlar. Böceklerde farklı proteinaz enzimlerine rastlanmaktadır. Örneğin, lepidopter larvalarında ağırlıklı olarak serin proteinazlarına rastlanırken, coleopter larvalarında daha geniş bir proteinaz spektrumuna rastlanmaktadır (Wolfson ve Murdock, 1990).

Proteinaz inhibitörleri (PI) ise birçok bitki türünde doğal olarak bulunan, protein yapısında olan ve bitkilerin doğal savunma mekanizmalarında yer alan moleküllerdir (Ryan, 1990). Son yıllarda bu moleküllerin bitkilerde programlanmış hücre ölümünden (apoptosis) de sorumlu oldukları öne sürülmektedir (Solomon ve ark., 1999). Proteinaz inhibitörlerini içeren yaklaşık 20 kadar protein familyası bulunmaktadır (Reeck ve ark., 1997). Bu değişik familyalara ait proteinler 40 ile 180 amino asit içeren polipeptidlerden oluşup oldukça kararlı yapılara sahiptirler. Bitki proteaz inhibitörlerinin büyük bir bölümü tohumlarda bulunmaktadır.

Proteinaz inhibitörlerinin böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde kullanılmalarına yönelik ilk başarılı örneğe 1987 yılında rastlanmaktadır (Hidler ve ark., 1987). Bu çalışmada, bürülceden izole edilen PI'nin tütüne aktarılması ile geliştirilen transgenik bitkilerin *Heliothis virescens*'e dayanıklı oldukları gösterilmiştir. Proteinaz inhibitörleri taşıyan transgenik bitkilerin geliştirilmesinde diğer bir öncü çalışmada ise patates ve domates proteinaz inhibitörü-II tütüne aktarılmıştır (Johnson ve ark., 1989). Geliştirilen transgenik bitkilerin *Heliothis virescens* larvalarının gelişimini engellediği gösterilmiştir. Bunu takip eden yıllarda farklı orijinli PI'lerin sentezinden sorumlu genlerin transgenik bitkilerde böceklerle karşı dayanıklılık sağladığı yönünde çeşitli çalışmalar gözlenmektedir. Son yıllarda yürütülen araştırmalar proteinaz inhibitörlerinin transgenik bitkilerde böceklerle karşı dayanıklılığın yanısıra nematoda karşı da dayanıklılık sağlayabildiğini göstermektedir (Urwin ve ark., 1995, 1997; Vain ve ark., 1998). Günümüzde, farklı proteaz inhibitör genlerini taşıyan transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Bu bitkiler ve dayanıklılık kazandıkları (hedefledikleri) böcekler Tablo 18.4'de özetlenmektedir.

Bu yönde yürütülen araştırmalar sonucu geliştirilen transgenik bitkilerde böceklerle dayanıklılık açısından olumlu sonuçlar alınırken bazı çalışmalarda böceklerin transgenik bitkilerden alınan proteinaz inhibitörlerine dayanıklılık gösterebildiği belirtilmiştir (Bonade-Bottino ve ark., 1999; Nandi ve ark., 1999).

Tablo 18.4. Proteinaz inhibitör (PI) genlerini taşıyan transgenik bitkiler.

Bitki	Gen	İnhibitör Tipi	Hedef Böcek	Kaynak
Tütün	<i>CpTI</i>	Börülce serin PI	<i>Manduca sexta</i> ¹	Hidler <i>ve ark.</i> , 1987
	<i>PPI-II</i>	Patates serin PI	<i>Manduca sexta</i> ¹	Johnson <i>ve ark.</i> , 1989
	<i>TI-II</i>	Domates serin PI	<i>Manduca sexta</i> ¹	
	<i>CpTI</i>	Börülce serin PI	<i>Heliothis virescens</i> ¹	Gatehouse <i>ve ark.</i> , 1992
	<i>OCI</i>	Çeltik sistein PI	?	Masoud, 1993
	<i>PPI-II</i>	Patates serin PI	<i>Chrysodeixis eriosoma</i> ¹	McManus <i>ve ark.</i> , 1994
	<i>MS-PI</i>	<i>Manduca sexta</i> PI	<i>Bemisia tabaci</i>	Thomas <i>ve ark.</i> , 1995a
	<i>CB-PI</i>	Mısır PI	?	Masoud <i>ve ark.</i> , 1996
	<i>SpTi-I</i>	Tatlı patates PI	<i>Spodoptera litura</i> ¹	Yeh <i>ve ark.</i> , 1997
	<i>Na-PI</i>	<i>Nicotiana glauca</i> PI	<i>Helicoverpa armigera</i> ¹	Charity <i>ve ark.</i> , 1999
	<i>SKTI</i>	Soya	<i>Spodoptera litura</i>	McManus <i>ve ark.</i> , 1999
		(Kunitz) tripsin PI		
Çeltik	<i>OCI</i>	Çeltik sistein PI	?	Hosoyoma <i>ve ark.</i> , 1994
	<i>CpTI</i>	Börülce serin PI	<i>Seramina inferens</i> ¹	Duan <i>ve ark.</i> , 1996
	<i>CC</i>	Mısır cystatin PI	<i>Sitophilus zeamais</i>	Iric <i>ve ark.</i> , 1996
	<i>PPI-II</i>	Patates serin PI	<i>Seramina inferens</i> ¹ , <i>Chilo suppressalis</i> ¹	Xu <i>ve ark.</i> , 1996
	<i>SKTI</i>	Soya	<i>Nilaparvata lugens</i>	Lee <i>ve ark.</i> , 1999
		(Kunitz) tripsin PI		
	<i>WTI-1B</i>	Fasulye tripsin PI	<i>Chilo suppressalis</i> ¹	Mochizuki <i>ve ark.</i> , 1999
Buğday	<i>BTI-CMe</i>	Arpa tripsin PI	<i>Sitotroga cerealella</i>	Altpeter <i>ve ark.</i> , 1999
Pamuk	<i>MS-PI</i>	<i>Manduca sexta</i> PI	<i>Bemisia tabaci</i>	Thomas <i>ve ark.</i> , 1995b
	<i>SKTI</i>	Soya	<i>Heliothis armigera</i>	Wang <i>ve ark.</i> , 1999
		(Kunitz) tripsin PI		
Patates	<i>OCI</i>	Çeltik sistein PI	?	Bencheckroun <i>ve ark.</i> , 1995
	<i>CpTI</i>	Cowpea serin PI	<i>Lacnobia oleracea</i> ¹	Gatehouse <i>ve ark.</i> , 1997
	<i>OCI</i>	Çeltik sistein PI	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> ²	Lecardonnell <i>ve ark.</i> , 1999
Bezelye	<i>Na-PI</i>	<i>Nicotiana glauca</i> PI	<i>Helicoverpa armigera</i> ¹	Charity <i>ve ark.</i> , 1999
Kavak	<i>PPI-II</i>	Patates serin PI	?	Klopfenstein <i>ve ark.</i> , 1993
	<i>OCI</i>	Çeltik sistein PI	<i>Chrysomela tremulae</i> ¹	Leplé <i>ve ark.</i> , 1995

1=Lepidopter, 2=Coleopter, ?=böceklere dayanıklılık araştırılmamış.

Dayanıklılık mekanizmaları ise farklılıklar gösterebilmektedir. Böcekler mevcut bağırsak proteazlarını artırabilmekte ve/veya alınan proteaz inhibitörüne dayanıklı yeni proteazlar salgılayabilmektedirler (Cloutier ve ark., 2000). Son yıllarda bu problemlerin aşılabilmesi için farklı proteaz inhibitörlerin aynı anda aktarılması veya mevcut inhibitörün hedefe afinitesinin (ilgisinin) geliştirilmesi yönünde de stratejiler geliştirilmektedir.

Yukarıda kısaca özetlenen bu problemlerden dolayı, proteaz inhibitörleri taşıyan transgenik çeşitler henüz ticari olarak kullanıma geçememiştir. Son yıllarda ise proteinaz inhibitörlerinin böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinin yanı sıra, hastalıklara dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde de kullanılabileceği belirtilmektedir (Kregar ve Strukelj, 1999).

18.4.2. Lektinler

Lektinler çoğu bitkide bulunan ve glikoprotein, glikolipid ve polisakkaridlere bağlanma özelliği gösteren proteinlerdir. Lektinler özellikle baklagil tohumlarında yoğun olarak bulunmaktadır. Farklı lektinlerin böceklerle toksitesi bilinmektedir. (Gatehouse ve ark., 1995). Oluşan bu toksik etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, lektinlerin böcek orta bağırsağındaki epitel hücreler üzerinde bulunan bazı karbonhidrat moleküllerine bağlanarak etki gösterdiği düşünülmektedir (Czapa, 1997). Kardelen (*Galanthus nivalis*) ve sarımsaktan izole edilen bazı lektinler böceklerle karşı toksik etki gösterirken, memeliler üzerinde etkin olmadığı bildirilmiştir (Boulter, 1993). Son yıllarda, lektinlerin transgenik bitkilerde antifungal etki oluşturabildikleri de bildirilmektedir (Does ve ark., 1999).

Lektin genleri aktarılmış transgenik bitkiler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda en yaygın kullanılan lektinin GNA (kardelene ait) olduğu gözlenmektedir. GNA aktarılan tütünün *Myzus persicae* (Hidler ve ark., 1995) ve *Aulacorthum solani*'ye (Down ve ark., 1996) dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir. Aynı lektin geninin aktarımı ile geliştirilen transgenik patatesin ise *Lacanobia oleracea* (Lepidopter) ve *Myzus persicae*'ye karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Gatehouse ve ark., 1996, 1997). GNA'nın aktarımı ile elde edilen transgenik buğdayın ise bir afit olan *Sitobion avena*'nın kontrolünde uygulanacak entegre mücadele yöntemlerinde kullanılabileceği bildirilmektedir (Stoger ve ark., 1999). GNA'nın transgenik çeltikte tüm dokularda (constitutive) veya dokuya özgün ifadesinin önemli bir zararlı olan *Nephotettix virescens* üzerinde sırası ile %53 ila %29 oranında ölümcül etki yapabileceği gösterilmiştir (Foissac ve ark., 2000). GNA aktarılmış çeltikle ilgili diğer bir çalışmada ise genlerin böceklerle dayanıklılık açısından etkisi çalışılmıştır (Tang ve ark., 1999). Diğer bir çalışmada, GNA ifade eden transgenik domatesin, *Myzus persicae*'ye karşı önemli oranda dayanıklılık gösterebildiği rapor edilmektedir (Wu ve ark., 2000). Son olarak yayınlanan bir çalışmada ise Bt (*CryIA(b&c)*) ve GNA

genlerinin her ikisinin aktarıldığı transgenik tütün bitkilerinin *Heliothis armigera* ve *Myzus persicae*'ye dayanıklı olduğu gösterilmektedir (Wang ve Guo, 1999).

GNA dışında böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde kullanılan diğer lektin genlerinin sınırlı olduğu gözlenmektedir. Gatehouse grubu tarafından yürütülen bir çalışmada, fasulye orijinli bir lektin olan konkanavalin A'nın (ConA) sentezinden sorumlu genin aktarıldığı transgenik patates bitkilerinin *Lacanobia oleracea* (lepidopter) ve *Myzus persicae* niflerinin gelişimini yaklaşık %40-45 oranında engellediği belirtilmektedir (Gatehouse ve ark., 1999). Bunun dışında, bezelye lektin (P-Lec) ve soya tripsin inhibitörü genlerinin ko-transformasyonu ile elde edilen transgenik pamuk bitkilerinin *Heliothis armigera*'ya dayanıklı olduğu belirtilmektedir (Wang ve ark., 1999). Bu lektinlerin dışında, buğdaydan izole edilen WGA'nın (wheat germ agglutinin) mısır kallusunda ifadesinin mısır kurdu larvaları üzerinde insektisidal etki yarattığı belirtilmektedir (Cavalieri ve ark., 1995). Farklı lektin genleri ile elde edilen transgenik bitkiler Tablo 18.5'de özetlenmektedir.

Yürütülen bu araştırmalar lektinlerin özellikle afitlere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesi konusunda ümitvar olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak GNA veya ConA gibi lektinlerin toprak mikroorganizmaları üzerinde etkisiz olduğu (Griffiths ve ark., 2000) ve GNA'nın yararlı (avcı) böceklere toksik etki yapmadığı da bildirilmektedir (Down ve ark., 2000).

Tablo 18.5. Farklı lektin genlerinin transferi ile geliştirilen böceklere dayanıklı transgenik bitkiler.

Bitki	Lektin	Lektin Orijini	Hedef Böcek	Kaynak
Tütün	GNA	Kardelen	<i>Myzus persicae</i>	Hidler ve ark., 1995
	GNA	Kardelen	<i>Aulacorthum solani</i>	Down ve ark., 1996
	GNA	Kardelen	<i>Heliothis armigera</i> , <i>Myzus persicae</i>	Wang ve Guo, 1999
Patates	GNA	Kardelen	<i>Lacanobia oleracea</i> , <i>Myzus persicae</i>	Gatehouse ve ark., 1996; Gatehouse ve ark., 1997
	ConA	Fasulye	<i>Lacanobia oleracea</i> , <i>Myzus persicae</i>	Gatehouse ve ark., 1999
Domates	GNA	Kardelen	<i>Myzus persicae</i>	Wu ve ark., 2000
Pamuk	P-Lec	Bezelye	<i>Heliothis armigera</i>	Wang ve ark., 1999
Buğday	GNA	Kardelen	<i>Sitobion avena</i>	Stoger ve ark., 1999
Çeltik	GNA	Kardelen	<i>Nephotettix virescens</i>	Foissac ve ark., 2000
Mısır	WGA	Buğday	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Cavalieri ve ark., 1995

18.4.3. Alfa-amilaz inhibitörleri

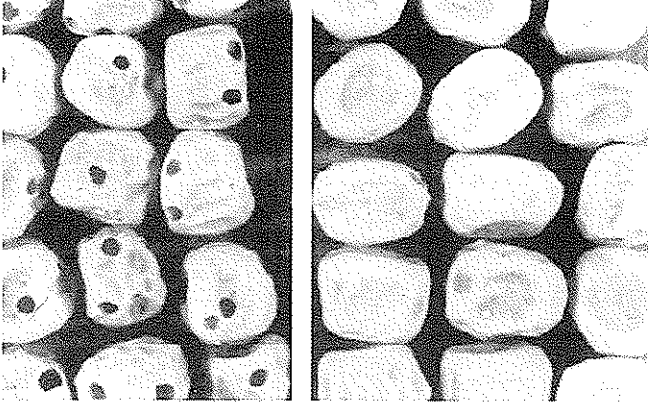
Alfa-amilaz enzimi, diğer canlılarda olduğu gibi böceklerde de sindirim sisteminde önemli işlevi olan bir enzimdir. Enzimin bloke edilmesi durumunda böceklerde bazı sindirim bozuklukları gözlenmekte ve besin yetersizliğinden böcekler ölebilmektedirler. Doğada bu enzimi bloke edebilen bazı inhibitörler bulunmaktadır. Alfa-amilaz inhibitörleri (α AI) olarak isimlendirilen ve glikoprotein yapısında olan bu moleküller özellikle bazı baklagil tohumlarında yüksek derişimlere ulaşmaktadırlar.

Yürütülen saflaştırma çalışmaları α AI-1, α AI-2 ve α AI-3 olmak üzere, üç farklı α AI bulunduğunu göstermiştir (Iguti ve Lajolo, 1991; Mirkov ve ark., 1995). Bu moleküller özellikle ısı stabiliteyi açısından farklılık göstermektedirler. Ayrıca fasulyeden izole edilen inhibitör proteinazlara karşı farklı tepki gösterirken mikroorganizma orijinli α -amilaz üzerinde etkili olmamıştır (Akyol, 2000). Fasulyeden izole edilen α AI'nın memeli ve böcek α -amilaz enzimlerini inhibe ederken bitki enzimleri üzerinde etkisiz olduğu rapor edilmektedir (Powers ve Whitaker, 1997a,b). α AI'nın farklı orijinli α -amilaz enzimleri üzerindeki etkisi en açık şekilde Ishimoto ve Kitamura (1989) tarafından yürütülen araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. Bu çalışmalarda saflaştırılmış inhibitörün, bazı böceklerin gelişmesi üzerinde de olumsuz etkisi olduğu belirlenmiştir. Benzer etki diğer araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir. (Huesing ve ark., 1991; Pittendrigh ve ark., 1997).

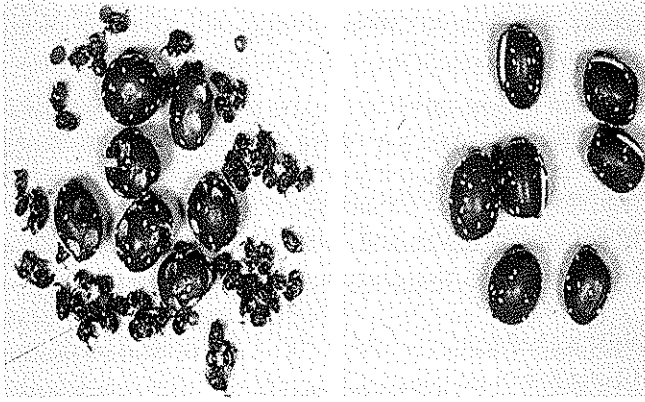
İlk α AI dizisi Moreno ve Chrispeels (1989) tarafından fasulye cDNA kütüphanesinden izole edilmiştir. Elde edilen dizinin fonksiyonel bir α AI üretebildiği, aynı araştırmacılar tarafından genin tütüne aktarılması ile gösterilmiştir (Altabella ve Chrispeels, 1990).

Yürütülen bu araştırmalar, α AI'nın özellikle Bruchidae familyasına ait böceklerle mücadele için transgenik bitkilerin geliştirilmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmasını sağlamıştır (Chrispeels, 1997). α AI genini taşıyan transgenik bitkilerin *Bruchus*'lara dayanıklılık gösterebildiği ilk olarak 1994 senesinde gösterilmiştir (Shade ve ark., 1994). Bu çalışmada fasulyeden izole edilen α AI-1 geni tohuma özgün ifade sağlayan bir promotör bölgesinin kontrolü altında bezelyeye aktarılmış ve elde edilen transgenik tohumların *Callosobruchus maculatus*'a karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 18.6).

Takip eden yıllarda, α AI kullanılarak geliştirilen transgenik bezelye hatlarının *Bruchus pisorum*'a dayanıklı olduğu, laboratuvar ve arazi denemeleriyle de gösterilmiştir (Schroeder ve ark., 1995; Morton ve ark., 2000). Bu çalışmalara ek olarak, α AI geni Adzuki fasulyesine aktarılmış ve elde edilen transgenik bitkilerin Adzuki fasulyesinin bir zararlısı olan *Callosobruchus chinensis*'den etkilenmediği gösterilmiştir (Ishimoto ve ark., 1996) (Şekil 18.7).



Şekil 18.6. α AI aktarılmış transgenik (sağdaki) ve kontrol (soldaki) bitkilerden elde edilen bezelye tohumlarının *Callasobruchus maculatus* zararına gösterdikleri dayanıklılık seviyeleri. Kontrol bitkilerin tohumları üzerinde görülen delikler olgun böceklerin tohumlardan çıktığı bölgeleri göstermektedir. Şekilden de görüleceği gibi transgenik tohumlarda herhangi bir zarar oluşmamaktadır. (Shade, 1994'ten alınmıştır).



Şekil 18.7. α AI aktarılmış transgenik (sağdaki) Adzuki fasulyesinin *Callasobruchus chinensis*'e karşı gösterdiği dayanıklılık. Kontrol tohumlarının (soldaki) üzerindeki delikler olgun böceklerin çıkış bölgelerini göstermektedir (Ishimoto ve ark., 1996'dan alınmıştır).

α AI'nın insan ve hayvan sağlığı üzerine muhtemel etkileri konusunda da detaylı bir araştırma mevcuttur (Pusztai ve ark., 1999). Bu çalışmada, 300 g/kg'a eşdeğer α AI proteini ile beslenen farelerde gelişme, metabolizma ve sağlık açısından hiçbir yan etki gözlenmediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar α AI geni taşıyan transgenik bitkilerin, belirtilen seviyede hayvan yemi olarak da kullanılabileceğini göstermektedir.

α AI'nın aktarımı ile elde edilen transgenik bitkilerden böceklerle dayanıklılık açısından oldukça ümitvar sonuçlar elde edilmesine rağmen, genin kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır. Aralık 2000 tarihi itibarı ile literatürde α AI geni taşıyan transgenik bitkiler ile ilgili sadece üç yayına rastlanmaktadır. Genin kullanımı ile geliştirilecek transgenik mercimek ve nohut bitkileri ülkemizde de büyük problem olan *Bruchus* cinsine bağlı zararlıları ile mücadelede potansiyel vadetmektedir.

18.4.4. Kitinaz

Doğrusal bir homopolimer olan kitin (β (1-4)2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl /N-asetilglukozamin) önemli bir yapısal molekül olmanın yanı sıra, böceklerde peritrofik zarların yapısında da yer almaktadır. Buna ek olarak kitin, fungus ve alglerin duvar zarlarının yapılarında da bulunmaktadır. Birçok farklı organizmada yapısal işlevi olan kitin doğada en yaygın rastlanan biyopolimerdir.

Kitinazlar (EC 3.2.1.14) kitin homopolimeri üzerinde hidrolitik aktivite gösteren enzimlerdir. Bitki orijinli kitinazların hastalıklara dayanıklılıktaki önemi net olarak gösterilmektedir (Graham ve Sticklen, 1994). Bitki ve mikroorganizma orijinli değişik kitinaz genleri aktarılarak geliştirilen transgenik bitkilerin fungal etmenlere karşı dayanıklılık gösterdiği değişik araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Shah ve ark., 1995; Lorito ve ark., 1998; Feng ve ark., 1999; Nishizawa ve ark., 1999; Bliffeld ve ark., 1999; Yamamoto ve ark., 2000).

Kitinazın hastalıklara dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmasına karşın böceklerle dayanıklılık konusundaki çalışmalar sınırlı kalmaktadır. Bitki (fasulye) orijinli kitinaz geninin patatese aktarılması ile geliştirilen transgenik bitkilerin *Lacnobia oleracea*'ya (Lepidopter) karşı etkili olmadığı, ancak bir afit olan *A. solani*'ye karşı dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir. (Gatehouse ve ark., 1997). Buna karşın, *Manduca sexta*'dan izole edilen kitinazın *Oryzaephilus mercator* üzerinde toksik etki yaptığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 1996). Takip eden yıllarda, aynı organizmadan izole edilen genin tütüne aktarılması ile geliştirilen transgenik bitkilerin *Heliothis virescens* larvaralarının gelişimini önemli ölçüde engelleyebildiği belirtilmiştir (Kramer ve ark., 1997; Ding ve ark., 1998). Son yıllarda yapılan ilginç bir araştırmada ise, bakulovirüs orijinli kitinaz geninin aktarımı ile geliştirilen transgenik tütün bitkilerinin böceklerle dayanıklılık göstermediği, fakat fungal etmenlere dayanıklı olduğu belirtilmiştir (Shi ve ark., 2000).

Diğer stratejilerle mukayese edildiğinde, kitinaz genleri ile geliştirilen transgenik bitkilerin böcek mücadelesi açısından henüz yaygınlık kazanmadığı söylenebilir. Ancak, özellikle mycoparasitik funguslardan izole edilen kitinaz genlerinin (Lorito ve ark., 1998) gelecekte böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceği gözlenmektedir.

18.4.5. Kolesterol oksidaz

Kolesterol oksidaz farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen bir enzim olup 3-hidroksiteroidlerin ketosteroidlere ve hidrojen peroksida oksitlenmesini katalizlemektedir. Kolesterol oksidazın insektisidal aktivitesi ilk olarak Purcell *ve ark.* (1993) tarafından 10.000 kadar mikrobial fermentasyon filtratlarının yapay diyetle böcek besleme testlerinde gösterilmiştir. Bu çalışmalarda iki *Streptomyces* kültüründen elde edilen fermentasyon filtratlarının pamuk üzerinde etkin olan *Heliothis zea* larvalarını etkin bir biçimde öldürdüğü gösterilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda larvaların ölümünden sorumlu olan etmenin, 52.5 kDa ağırlığındaki protein yapısında bir molekül olduğu gösterilmiştir. Belirlenen bu proteinin amino asit dizisi incelendiğinde diğer *Streptomyces* suşlarından elde edilen kolesterol oksidaz enzimleri ile büyük benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Saflaştırılmış kolesterol oksidazın; 6 günlük biyo-analizlerde 6 ppm, 16 günlük analizlerde ise 1.5 ppm'lik ölümcül doza (LD₅₀) sahip olduğu gösterilmiştir (Greenplate *ve ark.*, 1995). Ayrıca, enzimin Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera ve Homoptera üzerinde de etkin olduğu gösterilmiştir (Purcell *ve ark.*, 1993). Enzimin ölümcül etki mekanizması üzerinde yürütülen araştırmalar ise, ölümcül etkinin böcek orta bağırsağındaki epitel hücrelerinin zarlarında kolesterolün oksidasyonu sonucunda oluşan zarar sonrası epitel hücrelerin patlamasından kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 18.8) (Purcell *ve ark.*, 1993).

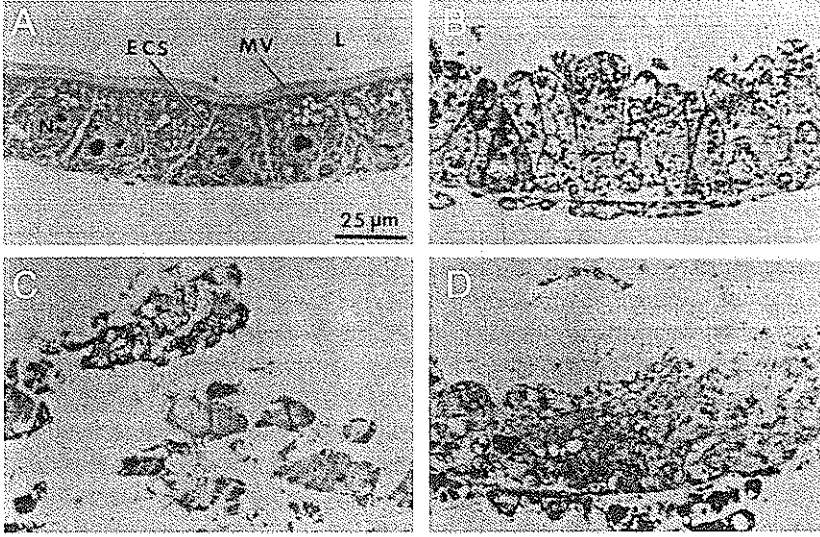
Gerçekleştirilen bu araştırmalar sonucunda, kolesterol oksidazın belirtilen dozlarda ve geniş bir spektrumda gösterdiği insektisidal aktivite, bu proteinin transgenik bitkilerde böceklerle dayanıklılık için kullanılabileceğini göstermiştir. Bu amaçla enzimin sentezinden sorumlu gen, *Streptomyces* A19249 suşundan izole edilmiş, *E. coli* ve bitki protoplastalarında ifadesiyle gösterilmiştir (Corbin *ve ark.*, 1994). Aynı çalışmada, saflaştırılan rekombinant proteinin doğal izolattan elde edilen enzime eşdeğer insektisidal aktivite gösterdiği de belirlenmiştir.

Literatürde henüz kolesterol oksidazın aktarıldığı transgenik bitkiler ile ilgili bir kayıt bulunmamaktadır. Ancak, Monsanto araştırmacılarının geni tütüne ve pamuğa aktardığı ve bazı analizlerde olumlu sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Purcell, 1997; Corbin *ve ark.*, 1998). Bu geni taşıyan transgenik bitkilerin de gelecekte böceklerle mücadelede büyük potansiyele sahip olduğu gözlenmektedir.

18.4.6. Avidin

Avidin, tavuk yumurta beyazında bulunan bir glikoproteindir. Bu protein ve *Streptomyces avidinii* bakterisinden elde edilen benzeri bir protein olan streptavidin, doğada bir ligand (biyotin) ve protein arasında gözlenen en yüksek bağlanma afinitesine ($K_a=10^{-15}$ M) sahiptirler. Biyotin tüm yaşam formları için gerekli olan bir koenzim olup, böcekler avidin veya streptavidin ile beslendiğinde bu proteinler biyotinle bağlanmakta ve böceklerde biyotin eksikliğinden kaynaklanan büyüme

eksikliği ve ölüme neden olmaktadır. Yürütülen araştırmalar avidinin kara sinek (*Musca domestica*), meyva sineği (*Drosophila melanogaster*), un akarı (*Acarus siro*) ve mısır kurdunda (*Ostrinia nubilalis*) toksik etki yaptığını göstermiştir (Levinson ve ark., 1959; Bruins ve ark., 1991; Morgan ve ark., 1993).



Şekil 18.8. *Streptomyces*'den izole edilen kolesterol oksidaz enziminin *Heliothis zea* larvalarının orta bağırsak epitel hücreleri üzerindeki etkisi. **A)** Kontrol larvaların orta bağırsak bölgesinin normal histolojisi. ECS: Hücre dışı bölge, N: hücre çekirdeği, MV: mikrovilüs. **B)** 10 µg/ml kolesterol oksidaz içeren diyetle beslenen böceklerin orta bağırsak bölgesinin görünümü. Bu dozun MV'nin ve hücrelerin yapısını etkilediği açıkça gözlenmektedir. **C-D)** Sırası ile 30 ve 100 µg/ml kolesterol oksidazın epitel hücre yapısını tamamen etkilediği gösterilmektedir (Purcell, 1997'den alınmıştır).

Son yıllarda, avidinin transgenik bitkilerde ticari seviyede üretiminin mümkün olduğu gösterilmiştir (Hood ve ark., 1997). Bir hektarlık avidin üreten transgenik mısırın değerinin 5 milyon ABD doları civarında olduğu tahmin edilmektedir (Hood ve ark., 1999). Bahsi geçen bu çalışmalarda avidin üreten transgenik mısırın böceklerle dayanıklılık açısından analizleri yapılmamıştır. Buna karşın, 2000 yılında yürütülen araştırmalar, 100 ppm avidin içeren transgenik mısırın depolama esnasında zararlılara karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir (Kramer ve ark., 2000).

Diğer insektisidal proteinlere nazaran oldukça yeni ve ümitvar olan avidinin, insan çevre ve hayvan sağlığı ile ilgili olarak risk değerlendirmelerinin tam olarak gerçekleştirilemediği gözlenmektedir. Bu yönde yürütülecek araştırmaların, avidinin herhangi bir potansiyel riski olmadığını göstermesi durumunda, geliştirilecek

avidin-transgenik bitkilerin böceklerle dayanıklılık konusunda önemli bir potansiyel olacaktır.

18.4.7. Diğer stratejiler

Önceki bölümlerde belirtilen stratejiler dışında, yaygın olmamakla beraber, böceklerle karşı dayanıklılık kazandırılması yönünde farklı genler de kullanılmıştır. Bunların arasında alkaloid sentezinden sorumlu triptofan dekarboksilaz geni (Thomas ve ark., 1995c, 1999), sitokin sentezinden sorumlu *ipt* geni (Simocki ve ark., 1993) ve tütün peroksidaz genlerinin (Dow ve Lagrimini, 1997) aktarıldığı bitkiler örnek olarak verilebilir. Son yıllarda ise *Bacillus* suşlarından izole edilen ve VIP (vegetative insecticidal proteins) olarak adlandırılan yeni generasyon inseksidal proteinlerin böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde oldukça ümitvar sonuçlar verdiği gözlenmektedir (Warren, 1997).

18.5. Sonuç

Önceki bölümlerde de belirtildiği gibi, böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde oldukça farklı stratejiler kullanılmaktadır. Bu stratejilerden bazıları bitki orijinli genleri kullanırken, diğerleri bakteri ve böcek orijinli genleri kullanmaktadır. İlk başarılı örneklerin elde edildiği ve halen en yaygın olarak kullanılmakta olan strateji ise Bt endotoksin genlerinin aktarıldığı transgenik bitkilerdir. Bu tip transgenik bitkiler halen ticari olarak da üretilmektedir.

Günümüzde böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geniş tarım alanlarında üretilmeleriyle ilgili çekinceler mevcuttur. Buna ek olarak kullanılan farklı inseksidal proteinlerin insan, hayvan ve çevre sağlığı üzerinde oluşturabilecekleri potansiyel riskler de halen değerlendirilmektedir. Ancak, gıda kaynaklarındaki artışın dünya nüfusundaki artışın oldukça gerisinde kaldığı göz önüne alındığında, böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin orta ve uzun vadede entegre mücadele yöntemlerinin kaçınılmaz bir parçası olacağı da bir gerçektir. Bu nedenle, bahsi geçen teknolojinin ülkemizde de hayata geçirilebilmesi ve bu teknolojiye kaynaklanabilecek potansiyel riskleri değerlendirebilecek bilgi birikimi, insan gücü ve teknik altyapının oluşturulması, ülkemizin bu teknolojiye minimum risk ve maksimum fayda ile yararlanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Kaynaklar

Acciarri N, Vitelli G, Arpaia S, Mennella G, Sunseri F, Rotino GL (2000) Transgenic resistance to the Colorado potato beetle in Bt-expressing eggplant fields. HortSci, 35: 722-725.

Adang MJ, Brody MS, Cardineau, G (1993) The reconstitution and expression of *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. Plant Mol. Biol., 21: 1131-1145.

- Akyol Z (2000) Isolation and Characterization of α -Amylase Inhibitors From Common Bean. Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Alam MF, Datta K, Abrigo E, Oliva N, Tu J, Virmani SS, Datta SK (1999) Transgenic insect resistant maintainer line (IR68899B) for improvement of hybrid rice. *Plant Cell Rep.*, 18: 572-575.
- Altabella T, Chrispeels M (1990) Tobacco plants transformed with the bean α AI gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. *Plant Physiol.*, 93: 805-810.
- Altpeter F, Diaz I, McAuslane H, Gaddour K, Carbonero P, Vasil I (1999) Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe. *Mol. Breed.*, 5: 53-63.
- Arpaia S, Mennella G, Onofaro V, Perri E, Sunseri F, Rotini GL (1997) Production of transgenic eggplant (*Solanum melogena* L.) resistant to colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Theor. Appl. Genet.*, 95: 329-334.
- Barton KA, Whiteley HR, Yang NS (1987) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.*, 85: 1103-1109.
- Benckekroun A, Michaud D, Nguyen-Quoc B, Overney S, Desjardins Y, Yelle S (1995) Synthesis of active oryzacytatin I in transgenic potato plants. *Plant Cell Rep.*, 14: 585-588.
- Bent AF, Yu IC (1999) Applications of molecular biology to plant disease and insect resistance. *Adv. Agron.*, 66: 251-298.
- Bliffeld M, Mundy J, Potrykus I, Futterer J (2000) Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1079-1086.
- Bohorovan, Zhang W, Julstrum P, McLean S, Luna B, Brito RM, Diaz L, Ramos ME, Estanol P, Pacheco M, Salgado M, Hoisington D (1999) Production of transgenic tropical maize with *ctyIab* and *CryIac* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 437-444.
- Bonade-Bottino M, Lerin J, Zaccomer B, Jouanin L (1999) Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacytin I. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 131-138.
- Boulter D (1993) Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Photochemistry*, 34: 1453-1466.
- Brandy C, William M, Seung-Bum L, Miller M, Henry D (2001) Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotech.*, 19: 71-74.
- Breitler JC, Marfa V, Royer M, Meynard D, Vassal JM, Vercamber B, Frutos R, Messegue J, Gabarra R, Guiderdoni E (2000) Expression of *Bacillus thuringiensis* *cry1B* synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Rep.*, 19: 1195-1202.
- Bruins BG, Scharloo W, Thöring GEW (1991) The harmful effect of light on *Drosophila* is diet dependent. *Insect Biochem.*, 21: 535-539.

- Brunke KJ, Meeusen RL (1991) Insect control with genetically engineered crops. TIBTECH, 9:197-200.
- Carozzi N, Koziel M (1997) Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants. Tylor & Francis, Bristol.
- Cavalieri A, Czalpa TM, Howard J, Rao G (1995) Larvicidal lectins and plant insect resistance based thereon. United States Patent No: 5.407.454.
- Charity JA, Anderson MA, Bittisnich DJ, Whitecross M, Higgins TJV (1999) Transgenic tobacco and peas expressing a proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* have increased insect resistance. Mol. Breed., 5: 357-365.
- Cheng XY, Sardana R, Kaplan H, Altosaar I (1998) *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer. Proc. Natl. Acad. Sci USA., 95: 2767-2772.
- Chrispeels MJ (1997) Transfer of bruchid resistance from the common bean to other strachy grain legumes by genetic engineering with the alfa-amylase inhibitor gene. In: Carozzi N, Koziel M (eds), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants, pp. 139-156. Tylor & Francis, Bristol.
- Cloutier C, Jean C, Fourniere M, Yelle S, Michaud D (2000) Adult colorado potato beetles *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behaviour and over-production of insensitive proteases. Arch. Insect Biochem Physiol., 44: 69-81.
- Corbin DR, Greenplate JT, Wong EY, Purcell JP (1994) Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and plant protoplasts. Appl. Environ. Microbiol., 60: 4239-4244.
- Corbin DR, Greenplate JT, Purcell JP (1998) The identification and development of proteins for control of insects in genetically modified crops. HortScience, 33: 614-617.
- Cornu D, Lep   JC, Bonad  -Bottino M, Ross A, Augustin S, Delplanque A, Jounanin L, Pilate G (1996) Expression of a protease inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic poplars. In: Proceedings IUFRO Meeting on Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees, pp. 131-136. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson F, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH (1998) Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 807-813.
- Czalpa TM (1997) Plant lectins as insect control proteins in transgenic plants. In: Carozzi N, Koziel M (eds), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants, pp. 123-138. Tylor & Francis, Bristol.
- Datta K, Vasquez A, Tu J, Torrizo L, Alam MF, Oliva N, Abrigo E, Khush GS, Datta SK (1998) Constitutive and tissue specific differential expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice conferring resistance to rice insect pests. Theor. Appl. Genet., 97: 20-30.
- Delannay X, LaVallee BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Marrone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JG, Fischhoff DA (1989) Field performance of transgenic

tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. Bio/Technology, 7: 1265-1269.

Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB, White FF, Wang X, Morgan TD, Kramer KJ, Muthukrishnan S (1998) Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. Transgenic Res. 7: 77-84.

Does MP, Houterman PM, Dekker HL, Cornelissen BJC (1999) Processing, targeting and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. Plant Physiol., 120: 421-431.

Dow PF, Lagrimini M (1997) The role of peroxidase in host insect defenses. In: Carozzi N, Koziel M (eds), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants, pp. 195-223. Tylor & Francis, Bristol.

Down RE, Gatehouse AMR, Hamilton WDO, Gatehouse JA (1996) Snowdrop lectin inhibits development and decrease fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered *in vitro* and via transgenic plants in laboratory and greenhouse trials. J. Insect Physiol., 42: 1035-1045.

Down RE, Ford L, Woodhouse SD, Raemaekers RJM, Leitch B, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (2000) Snowdrop lectin (GNA) has no acute toxic effects on a beneficial insect predator, the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.). J. Insect Physiol., 46: 379-391.

Duan X, Li X, Xue Q, Abo-El-Saad M, Xu D, Wu R (1996) Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. Nature Biotech, 14: 494-498.

Duck N, Evola S (1997) Use of transgenes to increase host plant resistance to insects: Opportunities and challenges. In: Carozzi N, Koziel M (eds), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants, pp. 1-20. Tylor & Francis, Bristol.

Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW, Koziel MG (1997) Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nature Biotech. 15: 137-141.

Feng DR, Xu XP, Wei JW, Li BJ, Yang QY, Zhu XY (1999) Enhancement of rice disease resistance by two antifungal protein genes. ACTA Botanica Sinica, 41: 1187-1192.

Fischhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/Technology, 5: 807-813.

Foissac X, Loc NT, Christou P, Gatehouse AMR, Gatehouse JA (2000) Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). J. Insect Physiol., 46: 573-583.

Frutos R, Rang C, Royer M (1999) Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxin. Critical Rev. Biotech., 19: 227-276.

Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto K (1993) Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology, 11: 1151-1155.

- Gatehouse AMR, Hidler VA, Boulter D (1992) Potential of plant derived genes in the genetic manipulation of the crops for insect resistance. In: *Biotechnology in Agriculture No 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, pp. 155-181, CAB International.
- Gatehouse AMR, Davidson CA, Powell KS, Puemans WJ, Van Damme EJM, Gatehouse JA (1995) Insecticidal properties of plant lectins: Their potential in plant protection. In: Pustai S, Bardocz S (eds), *Lectins: Biomedical Prospectives*, pp. 35-57. Taylor and Francis, London.
- Gatehouse AMR, Down RE, Powell KS, Puemans WJ, Van Damme EJM, Gatehouse JA (1996) Transgenic potato plants with enhanced resistans to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 79: 295-307.
- Gatehouse AMR, Davidson CA, Powell KS, Puemans WJ, Van Damme EJM, Gatehouse JA (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistans to the tomato moth *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol. Breed.*, 3: 1-15.
- Gatehouse AMR, Davison GM, Stewart JN, Galehouse LN, Kumar A, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse JA (1999) Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. *Mol. Breed.*, 5: 153-165.
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 615-636.
- Graham LS, Sticklen MB (1994) Plant chitinases. *Can. J. Bot.*, 72: 1057-1083.
- Greenplate JT, Duck NB, Pershing JC, Purcell JP (1995) Cholesterol oxidase: An oostatic and larvicidal agent active against the cotton boll weevil, *Anthonomous grandis*. *Entomol. Expt. Appl.*, 74: 253-258.
- Griffiths BS, Geoghegan IE, Robertson WM (2000) Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes. *J. Appl. Ecol.*, 37: 159-170.
- Grochulski P (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin-crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.*, 254: 447-464.
- Hidler VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker D, Boulter D (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 300: 160-163..
- Hidler VA, Powell KS, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Gatehouse LN, Shi Y, Hamilton WDO (1995) Expression of snowdrop lectin in tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgen. Res.*, 4: 18-25.
- Hidler VA, Boulter D (1999) Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. *Crop Protection*, 18: 177-191.
- Hood EE, Kusnadi A, Nikolov Z, Howard JA (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize. Characterization of transfromants, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breed.*, 3: 291-306.

- Hood EE, Kusnadi A, Nikolov Z, Howard JA (1999) Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. In: Shahidi F (ed), *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*, pp. 127-147. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Hosoyama H, Irie K, Abe K, Arai S (1994) Oryzacytin exogenously introduced into protoplasts and regeneration of transgenic rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1500-1505.
- Höfte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.
- Huesing JE, Shade RE, Chrispeels MJ, Murdock LL (1991) α -Amylase inhibitor not phytohemagglutinin explains the resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol.*, 96: 993-996.
- Iguti AM, Lajolo FM (1991) Occurrence and purification of α -amylase isoinhibitors in bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties. *J. Agri. Food Chem.*, 39: 2131-2136.
- Irie K, Hosoyama H, Takeuchi T, Iwabuchi K, Watanabe H, Abe M, Abe K, Arai S (1996) Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitor activity against insect gut proteinases. *Plant Mol. Biol.*, 30: 149-157.
- Ishimoto M, Kitamura K (1989) Growth inhibitory effects of an α -amylase isoinhibitor from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Entomol Zool.*, 24: 281-286.
- Ishimoto M, Sato T, Chrispeels M, Kitamura K (1996) Bruchid resistance of transgenic Azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.*, 79: 309-315.
- James C (2000) A global status of commercialized transgenic crops: 1999. In: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications Briefs No: 17, ISAAA, New York.
- Jin RG, Liu YB, Tabashnik BE, Borthakur D (2000) Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant*, 36: 231-237.
- Johnson KA, Narvaez J, An G, Ryan CA (1989) Expression of protease inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effect on natural defence against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9871-9875.
- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.*, 131: 1-11.
- Kar S, Basu D, Das S, Ramkrishnan NA, Mukherjee P, Nayak P, Sen SK (1997) Expression of cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis* in transgenic chickpea plants inhibits development of pod-borer (*Heliothis armigera*) larvae. *Transgen. Res.*, 6: 177-185.
- Klopfenstein N, McNabb H, Hart E, Hall R, Hanna R, Heuchelin S, Allen K, Shi N, Thornburg R (1993) Transformation of *Populus* hybrids to study and improve pest resistance. *Silvae Genet.*, 42: 86-90.
- Knowles BH, Dow JAT (1993) The crystal endotoxins of *Bacillus thuringiensis*-models for their mechanisms of action on the insect gut. *BioEssays*, 15: 469-476.

- Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carrozi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11: 194-200.
- Kramer KL, Muthukrishnan S, Johnson L, White F (1997) Chitinases for insect control. In: Carozzi N, Koziel M (eds), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*, pp. 185-193. Tylor & Francis, Bristol.
- Kramer KJ, Morgan TD, Thorone JE, Dowell FE, Bailey M, Howard JA (2000) Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature Biotech.*, 18: 670-674.
- Krattiger A (1997) Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. In: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications Briefs No: 2, ISAAA, New York.
- Kregar I, Struelj B (1999) Proteinase inhibitors offer possibility of producing disease resistant transgenic potatoes. *Food Tech. Biotech.*, 37: 39-44.
- Lambert B, Peferon M (1992) Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience*, 42: 112-122.
- Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, Seurinck J, Van Audenhove K, Van Rie J, Van Vilet A, Peferon M (1996) A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 80-86.
- Lecardonnell A, Chauvin L, Jouanin L, Beaujean A, Prevost G, Sangwan-Norfeel B (1999) Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.*, 140: 71-79.
- Lee SI, Lee SH, Koo JC, Chun HJ, Lim CO, Mun HJ, Song YH, Cho MJ (1999) Soybean Kunitz inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. *Mol. Breed.*, 5: 1-9.
- Lep   JC, Bonad  -Bottino M, Augustin S (1995) Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed.* 1: 319-328.
- Leroy T, Henty AM, Royer M, Altosaar I, Frutos R, Duris D, Philippe R (2000) Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.*, 19: 382-389.
- Levinson HZ, Bergmann ED (1959) Vitamin deficiencies in the housefly produced by antivitamin. *J. Insect Physiol.*, 3: 293-305.
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Flippone E, Muccifora S, Lawrance C, Zonia A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95: 7860-7865.

- Maagd RA, Bosch D, Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. Trends Plant Sci., 4: 9-13.
- Masoud S, Johnson L, White F, Reeck G (1993) Expression of a cystein proteinase inhibitor (orycystatin-I) in transgenic tobacco plants. Plant Mol. Biol., 21: 655-663.
- Masoud S, Ding X, Johnson L, White F, Reeck G (1996) Expression of a corn bifunctional inhibitor of serine proteases and insect α -amylases in transgenic tobacco plants. Plant Sci., 115: 59-69.
- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995) Amplification of chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. Bio/Technology, 15: 362-365.
- McCown BH, McCabe DE, Russell DR, Robinson DJ, Barton KA, Raffa KF (1991) Stable transformation of populus and incorporation of pest resistance by electrical discharge particle acceleration. Plant Cell Rep., 9: 590-594.
- McManus MT, Burgess EPJ, McGregor PG (1994) Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. Transgen. Res., 3: 50-58.
- McManus MT, Burgess EPJ, Philip B, Watson LM, Laing WA, Voisey CR, White DWR (1999) Expression of soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: Effects on larval development on *Spodoptera litura*. Transgen. Res., 8: 383-395.
- Metz TD, Roush RT, Tang JD, Shelton AM, Earle ED (1995) Transgenic broccoli expressing *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein: implication for pest management strategies. Mol. Breed., 1: 309-317.
- Mirkov TE, Evans SV, Wahlstrom J, Gomez L, Young NM, Chrispeels M (1995) Location of the active site of the bean α -amylase inhibitor and involvement of Trp, Arg, Tyr triad. Glycobiol., 5: 45-50.
- Mochizuki A, Nishizawa Y, Onodera H, Tabei Y, Toki S, Habu Y, Ugaki M, Ohashi Y (1999) Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomol. Exp. Appl., 93: 173-178.
- Mohammed A, Douches DS, Pett W, Grafius E, Coombs J, Liswidowati D, Li W, Madkour MA (2000) Evaluation of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance in tubers of Bt-cry5 transgenic potato lines. J. Econ. Entomol., 93: 472-476.
- Moran R, Garcia R, Lopez A, Zaldua Z, Mena J, Garcia M, Armas R, Somonte D, Rodriguez J, Gomez M, Pimentel E (1998) Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis. Plant Sci., 139: 175-184.
- Moreno J, Chrispeels MJ (1989) A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7885-7889.
- Morgan TD, Oppert B, Czaplá TH, Kramer KJ (1993) Avidin and streptavidin as insecticidal and growth inhibiting dietary proteins. Entomol. Exp. Appl., 69: 97-108.
- Morton RL, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E, Higgins TJV (2000) Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection

from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 3820-3825.

Nandi AK, Basu D, Das S, Sen SK (1999) High level expression of soybean trypsin inhibitor gene in transgenic tobacco plants failed to confer resistance against damage by *Helicoverpa armigera*. J. Biosci., 24: 445-452.

Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M, Hibi T (1999) Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. Theor. App. Gen., 99: 383-390.

Oerke EC (1994) Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. In: Oerke EC, Dehne HW, Schönbeck F, Weber A (eds), Crop Production and Crop Losses: Estimated Losses in Major Foods and Cash Crops, pp. 72-88. Elsevier, Amsterdam.

Parker CD, Mascarenhas VJ, Luttrell RG, Knighten K (2000) Survival rates of tobacco bud worm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae exposed to transgenic cotton plants expressing insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Entomol. Sci., 35: 105-117.

Peferon M (1992) Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. In: Biotechnology in Agriculture No: 7, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection, pp. 135-153. CAB International, London.

Peferon M (1997) Insect control with transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: Carozzi N, Koziel M (eds), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants, pp. 21-48. Tylor & Francis, Bristol.

Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TO, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fishhoff DA (1990) Insect resistant cotton plants. Bio/Technology, 8: 939-943.

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fishhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3324-3328.

Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, Fischhoff DA (1993) Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Mol. Biol., 22: 313-321.

Pittendright BR, Huesing JE, Shade RE, Murdock LL (1997) Effect of lectins, Cry1A/Cry1B Bt δ -endotoxin, PAPA, protease and α -amylase inhibitors on the development of rice weevil *Sitophilus oryzae* using artificial seed bioassay. Entomol. Experiment. Appl., 82: 201-211.

Powers JR, Whitaker JR (1997a) Effect of several experimental parameters on combination of red kidney bean α -amylase inhibitor with porcine pancreatic α -amylase. J. Food Biochem., 1: 239-260.

Powers JR, Whitaker JR (1997b) Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean α -amylase inhibitor. J. Food Biochem., 1: 217-238.

Purcell JP, Greenplate JT, Jennings MG, Ryerse JS, Pershing JC, Sims SR, Sammons RD, Stonard RJ (1993) Cholesterol oxidase: A potent insecticidal protein against boll weevil larvae. Biochem. Biophys. Res. Commun., 196: 1406-1413.

- Purcell JP (1997) Cholesterol oxidase for control of boll weevil. In: Carozzi N, Koziel M (eds), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*, pp. 95-108. Tylor & Francis, Bristol.
- Pusztai A, Bardocz GGS, Alonso R, Chrispeels MJ, Schroeder HE, Tabe LM, Higgins TJV (1999) Expression of the insecticidal bean α -amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *J. Nutr.*, 129: 1597-1603.
- Reeck GR, Kramer KJ, Baker JE, Kantos MR, Fabrik JA, Behnke CA (1997) Protease inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In: Carozzi N, Koziel M (eds), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*, pp. 157-183. Tylor & Francis, Bristol.
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defense against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28: 425-249.
- Salamini F, Motto M (1994) The role of gene technology in plant breeding. In: Hayward MD, Bolemark NO, Romagosa I (eds), *Plant Breeding: Principles and Prospects*, pp. 138-159, Chapman & Hall, Cambridge.
- Schnepf HE, Whiteley HR (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2893-2897.
- Schroeder HE, Gollasch S, Moore A, Tabe LM, Craig S, Hardie DC, Chrispeels MJ, Spencer D, Higgins TJV (1995) Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.*, 107: 1233-1239.
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm I (1998) Insect resistant transgenic plants. *TIBTECH*, 16: 168-174.
- Shade RE, Schroeder HE, Pueyo JJ, Tabe LM, Murdock LL, Higgins TJV, Chrispeels MJ (1994) Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to Bruchid beetles. *Bio/Technology*, 12: 793-796.
- Shah DM, Caius M, Rommens T, Beachy RN (1995) Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *TIBTECH*, 13: 362-368.
- Shelton AM, Tang JD, Roush RT, Metz TD, Earle ED (2000) Field test on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotech.*, 18: 339-342.
- Shi J, Thomas CJ, King LA, Hawes CR, Possee RD, Edwards ML, Pallett D, Cooper JI (2000) The expression of a baculovirus-derived chitinase gene increased resistance of tobacco cultivars to brown spot (*Alternaria alternata*). *Ann. Appl. Biol.*, 136: 1-8.
- Simocki A, Neal JW, McCanna I, Dougl L (1993) Cytokinin mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Mol. Biol.*, 23: 325-335.
- Singist C, Adang MJ, Lynch RE, Anderson WF, Wang A, Cardineau G, Ozias-Akins P (1997) Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer. *Transgen. Res.*, 6: 169-176.

- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999) The involvement of cystein proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 11: 431-443.
- Steward CN, Adang MJ, All JN, Raymer S, Ramachandran S, Parrott WA (1996a) Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(c)* gene. *Plant Physiol.*, 112: 115-120.
- Steward CN, Adang MJ, All JN, Raymer S, Ramachandran S, Parrott WA (1996b) Genetic transformation recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(c)* gene. *Plant Physiol.*, 112: 121-129.
- Stoger E, Williams S, Christou P, Down RE, Gatehouse JA (1999) Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Mol. Breed.*, 5: 65-73.
- Strizhov N, Keller M, Mathur J (1996) A synthetic *cryIC* gene encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 15012-15017.
- Tang K, Tinjuangjun P, Xu Y, Sun X, Gatehouse JA, Ronald PC, Qi H, Lu X, Christou P, Kohli A (1999) Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 208: 552-563.
- Tang JD, Collins HL, Roush RT, Metz TD, Earle ED, Shelton AM (1999) Survival, weight gain and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on broccoli expressing CryIAC toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 92: 47-55.
- Thomas JC, Adams DG, Keppenne V, Wasmann C, Brown JK, Kanost M, Bohnert HJ (1995a) *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.*, 33: 611-614.
- Thomas JC, Adams DG, Keppenne V, Wasmann C, Brown JK, Kanost M, Bohnert HJ (1995b) Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. *Plant Cell Rep.*, 14: 758-762.
- Thomas JC, Adams DG, Nessler CL, Brown JK, Bohnert HJ (1995c) Tryptophan decarboxylase, tryptamine and reproduction of the whitefly. *Plant Physiol.*, 109: 717-720.
- Thomas JC, Akroun AM, Adamus G (1999) The indole alkaloid tryptamine produced in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Physiol. Biochem.*, 37: 665-670.
- Tu JM, Zhang G, Datta K, Xu C, He Y, Zhang Q, Khush GS, Datta SK (2000) Field performance of transgenic elite commercially hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nature Biotech.*, 18: 1101-1104.
- Urwin PE, Atkinson HJ, Waller DA, McPherson J (1995) Engineered oryctocystin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *Plant J.*, 8: 121-131.

- Urwin PE, Lilley CJ, McPherson J, Atkinson HJ (1997) Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.*, 12: 455-461.
- Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 327: 33-37.
- Vain P, Worland B, Clarke MC, Richard G, Beavis M, Liu H, Kohli A, Leech M, Snape J, Christou P, Atkinson H (1988) Expression of an engineered cysteine protease inhibitor (Oryzacytin-IAD86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 266-271.
- Walker DR, All JN, McPherson RM, Boerma HR, Parrott WA (2000) Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 93: 613-622.
- Wang G, Castiglione S, Chen Y, Li L, Han Y, Tian Y, Gabriel DW, Han Y, Mang K, Sala F (1996) Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transgen. Res.*, 5: 289-301.
- Wang X, Ding B, Gopalakrishnan B (1996) Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 1055-1064.
- Wang ZB, Guo SD (1999) Expression of two insect resistance genes cryIA(b&c)/GNA in transgenic tobacco plants results in added protection against both cotton bollworm and aphids. *Chinese Sci. Bulletin*, 44: 2051-2058.
- Wang W, Zhu Z, Gao YF, Shi CL, Chen WX, Guo ZC, Li XH (1999) Obtaining a transgenic upland cotton harboring two insecticidal genes. *Acta Bot. Sinica*, 41: 384-388.
- Warren G (1997) Vegetative insecticidal proteins: Novel proteins for control of corn pests. In: Carozzi N, Koziel M (eds), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*, pp. 109-121. Tylor & Francis, Bristol.
- Watt K, Graham J, Gordon SC, Woodhead M, McNicol RJ (1999) Current and future transgenic control strategies to vine weevil and other insect resistance in strawberry. *J. Hort. Sci Biotech.*, 74: 409-421.
- Williams S, Friedrich L, Dincher S, Carozzi N, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1993) Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology*, 7: 194-200.
- Wolfson J, Murdock L (1990) Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.*, 16: 1089-1102.
- Wu CY, Ye ZB, Li HX, Tang KX (2000) Genetic transformation of tomato with snowdrop lectin gene (GNA). *Acta Bot. Sinica*, 42: 719-723.
- Wünn J, Klöti A, Burkhardt PK, Biswas GCG, Launis K, Iglesias VA, Potykus I (1996) Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* provide effective pest control. *Bio/Technology*, 14: 171-176.

Xiang Y, Wong WKR, Ma MC, Wong RSC (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica campestris* spp. *Parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis* *cry1Ab* and *cry1Ac* genes. *Plant Cell Rep.*, 19: 251-256.

Xu D, Xue Q, McElroy D, Mawal Y, Hidler VA, Wu R (1996) Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene CpTi in transgenic rice plants confers resistance to two major insect pests. *Mol. Breed.*, 2: 167-173.

Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.*, 19: 639-646.

Yeh KW, Lin ML, Tuan SJ, Chen YM, Lin CY, Kao SS (1997) Sweet potato (*Ipomea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.*, 16: 696-699.

Zhao JZ, Collins HL, Tang JD, Cao J, Earle ED, Roush RT, Herrero S, Escribete B, Ferre J, Shelton AM (2000) Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3784-3789.

Bölüm 19

Virüslere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

Ali Ergül¹, Sümer Aras², Mustafa Erayman³, Sebahattin Özcan⁴

¹Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Tarımsal Araşt. Genel Müd., Yenimahalle, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandoğan, Ankara

³Univ. of Nebraska Lincoln, Institute of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy, Lincoln, NE 68583-0915, USA

⁴Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı, Ankara
e-posta: aliergul2001@yahoo.com¹

19.1. Giriş

Dünyada tarım alanlarında bakteri, fungus ve virüs hastalıklarının neden olduğu ürün kayıpları her geçen gün artmaktadır. Bunlardan, virüslerin özellikle tropik ve subtropik bölgeler başta olmak üzere, birçok ülkede ürün kalitesi ve miktarı yönünden zararları ise önemli boyutlardadır.

Bitkilerde görülen ve kimyasal ilaçlarla zirai mücadelesinin mümkün olmadığı virüs enfeksiyon ve zararlarına karşı günümüzde değişik metotlarla korunma yollarına gidilmektedir. Bunların başında; virüslerden arı bitkilerle üretim yapılması (doku kültürü yöntemleri ve termoterapi uygulamaları) ve bulaşık bitkilerin tarım alanlarından uzaklaştırılması, virüs taşıyıcı vektörlerle (böcek, nematod vb.) mücadele edilerek bitkiden bitkiye taşınımın önlenmesi ve moleküler biyoloji teknikleri ile virüslere dayanıklı bitkilerin elde edilmesi gelmektedir.

Bununla birlikte, özellikle virüs vektörlerine yönelik yapılan mücadelelerde kullanılan vektör öldürücü pestisitlerin insan sağlığındaki yan etkileri nedeniyle kullanımının giderek azalması ve bu pestisitlere dayanıklı yeni vektör ırklarının

ortaya çıkması, virüslerden ari bitkilerin ise arazi koşullarında meydana gelebilecek bir enfeksiyona karşı dirençlilik göstermemesi araştırmacıları son yıllarda moleküler genetik çalışmalarının yaygın kullanıldığı tekniklerle virüslere dayanıklı bitkilerin elde edilmesine yönlendirmiştir.

Virüslere karşı dayanıklılık sağlamak amacıyla yapılan moleküler genetik çalışmalarında; bitkilerde var olan dayanıklılık genleri ile, esas olarak virüs genlerinde yapılan manipülasyonlarla dayanıklılıktan sorumlu farklı yapıların ortaya çıkarılması ve bunların istenilen bitkilere aktarılması amaçlanmaktadır. Bu araştırmaların bugün başarılı bir şekilde yürütülmesinde ise birçok bitkide gen aktarım çalışmalarının kolaylıkla uygulanabilmesi etkili olmaktadır.

Bitkilerde virüs enfeksiyonlarından korunmak amacıyla genetik mühendisliği uygulamaları başlatılmadan önce, klasik bir korunma yöntemi olan “çapraz korunma” ile ilgili uygulamalar ağırlık kazanmıştır. Bu yöntemde, ilgili virüsün daha az zarar yapan bir ırkıyla (koruyucu virüs) bitki inoküle edilerek, ileriki dönemlerde daha çok zarar yapan ırklara karşı bitkide bir korunma sağlanmaktadır. Bununla birlikte, koruyucu amaçla inoküle edilen ve bitkide şiddetli semptomların oluşmadığı bu yöntemde semptomların sürekliliği nedeniyle zaman içerisinde ürün kayıplarının gözlenmesi, yöntemin en önemli dezavantajını oluşturmuştur. Ayrıca, tarımsal ürünlerde zarar yapan her virüsün az zarar yapan ırkının bulunmaması, bir virüsle yapılan enfeksiyonun daha sonraki aynı veya farklı virüslerin ırklarına karşı kesin bir koruma sağlayıp sağlamayacağının bilinmemesi ve başlangıçta inoküle edilen virüsten farklı bir virüsün enfeksiyonunda daha şiddetli zararların ortaya çıkabilmesi de yöntemin dezavantajlarındandır. Bu gibi nedenler çapraz korunma yönteminin uygulanabilirliğini ortadan kaldırmaktadır (Sturtevant ve Beachy, 1993).

Günümüzde, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak virüslere tam dayanıklı bitkiler kolaylıkla elde edilebilmektedir. Bu çalışmalarda, virüs genlerinin yanlış zaman ve miktarlarda veya karışık fonksiyonel formlarda ifadeleri sağlanarak söz konusu virüsün bitki hücresinde çoğalması engellenmektedir. Bu ise virüsün hayat döngüsündeki transkripsiyon, replikasyon, protein kılıfının uzaklaştırılması ve hücreden hücreye geçişler gibi olaylara müdahale ile gerçekleşmektedir. Genetik mühendisliğindeki gelişmelerin sonucu olan bu araştırmalarla virüslere dayanıklılık amacı ile yürütülen klasik ıslah çalışmalarında karşılaşılan sorunlara çözüm sağlanmıştır. Virüs genomunun bitkininkine göre daha küçük olması nedeniyle, viral genler daha kolay belirlenebilmekte, izole edilmekte ve klonlanmaktadır (Knott ve Dvorak, 1975; Wenzel, 1985).

Bu bölümde patojen ilişkili dayanıklılık araştırmalarının virüslerdeki uygulamaları ana başlıklar altında incelenecektir.

19.2. Kılıf Proteinini

Bitkilerde kılıf proteinine bağlı dayanıklılık sağlamak amacıyla, ilgili virüsün kılıf protein genini içeren yapı, değişik gen aktarım yöntemleriyle bitkilere aktarılmaktadır. Aktarılan bu genlerin bir veya birden fazla kopyasının bitkinin genomik DNA'sıyla rasgele bütünleşmesi ve ifadesi sonucunda üretilen virüs kılıf proteini sonuçta bitkileri virüse karşı dayanıklı kılmaktadır.

Kılıf protein geninden yararlanılarak bitkilerde dayanıklılık sağlamak amacıyla yapılan ilk çalışma Powell-Abel *ve ark.* (1986) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, tütün mozayik virüsünün (tobacco mosaic virus; TMV) U1 ırkından izole edilen kılıf proteinini kodlayan gen CaMV 35S promotor ve nopalın sentezi terminatörünün kontrolü altında tütün bitkisine aktarılmıştır. Yüksek oranda TMV kılıf proteininin üretildiği transgenik bitkilerin, yapılan inokülasyonlarla TMV'ne ve bazı tobamovirüslerine karşı dayanıklılık gösterdiği gözlenmiştir. Değişik bitki virüslerine dayanıklılık sağlamak amacıyla uygulanan bu yöntemde üzerinde çalışılan virüs gruplarının başında yonca mozayik virüsü, poty, tobra, ilar, cucumo, potex, carla, luteo ve tospovirüsler gelmektedir. Kılıf protein geninin aktarıldığı transgenik bitkiler ve dayanıklılık sağlanan virüslere yönelik bazı araştırmalar Tablo 19.1'de verilmiştir.

Bazı araştırma sonuçlarında ise kılıf protein geni aktarılmış transgenik bitkilerde dayanıklılığın kılıf proteininden bağımsız olarak bu genin RNA'sına bağlı olduğu bildirilmektedir. Domates noktalı solgunluk virüsü (tomato spotted wilt virus; TSWV)'ne karşı dayanıklılık için transgenik tütün bitkilerinde çalışan Gielen *ve ark.* (1991) dayanıklılığın genin kılıf proteininden kaynaklanmadığını, gen transkriptlerine, yani RNA varlığına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, aktarılan TSWV geninin başlangıç kodonunda meydana gelen bir mutasyon sonucunda ise bu virüse yüksek oranlarda dayanıklı bireyler elde etmişlerdir. Tütün "etch" virüsü (tobacco etch virus; TEV) kılıf protein geninin tamamının aktarıldığı tütün bitkilerinde yapılan bir araştırmada ise, protein düzeyi yüksek olan bitkilerde dayanıklılığın görülmediği, buna karşın translasyona uğramayan kılıf protein RNA'sı içeren bitkilerde enfeksiyon sonucu semptom oluşmadığı, yani dayanıklılığın sağlandığı gözlenmiştir (Lindbo ve Dougherty, 1992). Bitkiye TEV'nün belli bir uzunlukta aktarılan kılıf protein geni 118 eksik amino asitli mutant bir kılıf proteini oluştururken, yapılan bir çalışmada ise gen ürününün (RNA ve kılıf proteini) düşük düzeylerde de olsa dayanıklılık sağladığı görülmüştür (Silva-Rosales *ve ark.*, 1994). Lindbo ve Dougherty (1992) transkripsiyonu engellenmiş kılıf protein geni içeren bitki protoplastlarında ise hiç bir zaman TEV replikasyonunun olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda TEV'ne karşı dayanıklılık TEV'nün replikasyon basamaklarından birinin engellenmesine (durdurulmasına) bağlanmıştır. Bu konuda yapılan bir diğer çalışmada ise, nekrotik patates Y virüsü (necrotic potato virus Y; PVY^N)'nün genini taşıyan transgenik bitkilerde, dayanıklılığın viral kılıf proteininin birikiminden daha

çok, kılıf proteinine özgü RNA transkriptlerinin varlığından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Van der Vlugt *ve ark.*, 1992).

Tablo 19.1. Virüs kılıf protein genlerinin aktarılmasıyla virüslere karşı dayanıklılığın sağlandığı bazı bitkiler (Reavy ve Mayo, 1992).

Kılıf protein geninin kaynağı	Kılıf protein geninin aktarıldığı bitki	Dayanıklılık sağlanan virüs	Kaynaklar
TMV	Tütün	TMV	Powell-Abel <i>ve ark.</i> , 1986
TMV	Tütün	ToMV, TMGMV	Stark <i>ve ark.</i> , 1990
TMV	Tütün	CMV, AIMV, SHMV	Anderson <i>ve ark.</i> , 1989
TMV	Domates	TMV, ToMV	Nelson <i>ve ark.</i> , 1988
AIMV	Tütün	AIMV	Van Dun <i>ve ark.</i> , 1987
AIMV	Tütün	PVX, CMV	Anderson <i>ve ark.</i> , 1989
AIMV	Domates	AIMV	Tumer <i>ve ark.</i> , 1987
TRV	Tütün	PEBV	Van Dun ve Bol, 1988
TSV	Tütün	TSV	Van Dun <i>ve ark.</i> , 1988
CMV	Tütün	CMV	Cuozzo <i>ve ark.</i> , 1988
PVX	Tütün	PVX	Hemenway <i>ve ark.</i> , 1988
PLRV	Patates	PLRV	Kawchuk <i>ve ark.</i> , 1990

TMV: Tütün mozayik virüsü (tobacco mosaic virus), **AIMV:** Yonca mozayik virüsü (alfalfa mosaic virus), **TRV:** Tütün "rattle" virüsü (tobacco rattle virus), **TSV:** Tütün çizgi virüsü (tobacco streak virus), **CMV:** Hıyar mozayik virüsü (cucumber mosaic virus), **PVX:** Patates X virüsü (potato virus X), **PLRV:** Patates yaprak kıvrıcıklığı virüsü (potato leaf roll virus), **ToMV:** Domates mozayik virüsü (tomato mosaic virus), **TMGMV:** Tütün yeşil zayıf mozayik virüsü (tobacco mild green mosaic virus), **SHMV:** Güneş keneviri mozayik virüsü (sunhemp mosaic virus), **PEBV:** Bezelye erkenci kahverengilik virüsü (pea early browning virus).

Kılıf proteinine bağlı dayanıklılık çalışmalarında dayanıklılığın yukarıda belirtilen faktörler dışında, virüs kılıf proteininin yapısına, virüsün nükleik asit tipine ve bitki türüne de bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Virüslerin nükleik asit yapıları dikkate alındığında günümüze kadar yapılan çalışmalarda; tek sarmal ve çift sarmal (caulimo, banda, geminivirüsler gibi) DNA virüslerine karşı bu yöntemle dayanıklı bitkilerin elde edildiği çalışmalar yok denecek kadar azdır (Wilson, 1993).

Kılıf proteinine bağlı dayanıklılık çalışmaları yalnızca dikotiledon bitkilerde uygulama alanı bulmayıp, son yıllarda monokotiledon bitkilere yönelik olarak ta sürdürülmektedir. Bu çalışmaların en güzel örneği ise mısır cücelik mozayik virüsü (maize dwarf mosaic virus; MDMV) ve mısır klorotik benek (maize chlorotic mottle virus; MCMV) virüslerine karşı dayanıklı mısır bitkilerinin elde edilmesidir (Hayakawa *ve ark.*, 1992).

Genel olarak, kılıf proteinine bağlı dayanıklılık çalışmaları tek bir yapısal kılıf proteini tarafından çevrelenen basit yapılı virüslere yönelik sürdürülmektedir. Aynı zamanda, değişik türdeki yapısal proteinlerden oluşmuş bir kapsüle (nükleokapsid) sahip virüsler için de bu yöntem kullanılmaktadır. Örneğin, bir negatif-sens RNA virüsü olan TSWV nükleokapsid geni aktarılmış bütün bitkilerinin enfeksiyonlara karşı dayanıklı olduğu yapılan çalışmalar sonucunda gözlenmiştir (MacKenzie ve Ellis, 1992). Dolayısıyla, kılıf proteinine bağlı dayanıklılık çalışmaları basit yapılı virüslerin yanında kompleks yapılı virüslere karşı dayanıklılık çalışmalarında da etkili olmaktadır.

Virüslere dayanıklı bitkiler elde etmek amacıyla kılıf proteinine bağlı dayanıklılık çalışmalarında başlıca iki sorun ile karşılaşilmektedir:

1. Elde edilen dayanıklı transgenik bitkilerin aşırı virüs enfeksiyonuna maruz bırakıldıklarında dayanıklılık düzeylerinin azalması,
2. Tam uzunluktaki kılıf protein geninin bitkiye aktarılmasıyla, transgenik bitkilerde kılıf proteininin artması sonucu dayanıklılığın azalmasıdır.

Bu nedenle ikinci soruna yönelik olarak yapılan çalışmalarda daha çok ilgili protein geninin belirli ve stop kodonu içeren dizileri bitkilere aktarılabilirdiği gibi, çerçeve mutasyonu oluşturulmuş kılıf protein genleri de çalışma konuları arasındadır.

19.3. Antisens RNA

Virüslere dayanıklı bitkilerin elde edilmesine yönelik çalışmaların yoğunlaştığı tekniklerden birini de; virüslerin kılıf protein geninin nükleotid dizilerine yönelik antisens RNA'ların oluşturulması ve bunların ifade düzeylerinin belirlenmesi oluşturmaktadır (Cuozzo *ve ark.*, 1988; Hemenway *ve ark.*, 1988; Powell *ve ark.*, 1989).

Antisens RNA teknolojisi, basit olarak bir mRNA'ya ait cDNA kopyasının tamamlayıcı (komplementer) mRNA dizisi oluşturmak üzere ilgili genomu aktarılmasıdır (Bölüm 25'de bu teknikle ilgili geniş açıklamalar verilmiştir). Tek sarmal antisens RNA'ların tek sarmal viral RNA'lar ile dupleks oluşturması sonucunda gen ifadesinin veya virüs replikasyonunun engellendiği düşünülmektedir. Bu tekniğin virüslere dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde kullanımı ile, kılıf protein geninin bitkiye aktarımı ve genin ifadesinde karşılaşılan sorunlar ortadan kaldırılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda virüs genlerine karşı oluşturulan antisens yapılarının aktarıldığı transgenik bitkilerde, dayanıklılık oranı genellikle düşük olmaktadır (Loesch-Fries *ve ark.*, 1987; Cuozzo *ve ark.*, 1988; Powell *ve ark.*, 1989). Pratiğe yönelik tam bir başarı sağlanmamakla birlikte; CMV (Cuozzo *ve ark.*, 1988), PVX (Hemenway *ve ark.*, 1988) ve TMV (Powell *ve ark.*, 1989)'ne karşı bu tekniğin kullanıldığı bitkilerde, düşük dereceli inokülasyonlarda

belli oranlarda dayanıklılığın sağlandığı görülmüştür. Bununla birlikte, zamanla semptom oluşumunun arttığı ve dayanıklılığın azaldığı izlenmiştir.

Bu teknikle yapılan çalışmalarda düşük başarı oranı muhtemelen kullanılan antisens RNA'nın fonksiyonlarına ve üzerinde çalışılan virüs grubuna bağlanmaktadır. Özellikle, bitki hücresinin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında replike olan (çoğalan) RNA virüslerine dayanıklılıkta bu teknik başarısız kalmaktadır. Buna karşın, sadece floemde bulunan PLVR'ne yönelik yapılan bir çalışmada ise kılıf protein geninin antisens RNA'sının üretildiği transgenik patates bitkilerinde, kılıf proteinine bağlı dayanıklılık yöntemine göre daha başarılı sonuçlar alınmıştır (Kawchuk *ve ark.*, 1990).

Bugün birçok bitki virüsünün replikasyonu ve bunlara ait genlerin ifadesi ile ilgili konular tam bilinmediği için antisens yapılarının oluşturulacağı dizileri belirlemekte güçlük çekilmektedir. Bu yönde sürdürülen çalışmalarda virüslerin replikasyonlarını engellemek amacıyla, bunlara özgü değişik bölgelere homoloji gösteren antisens yapılarının kullanımına gidilmektedir. Bu amaçla, Day *ve ark.* (1991) transgenik tütün bitkilerinde virüs replikasyon protein geni AL1'i de içerisine alan bölgeye yönelik antisense RNA oluşturarak domates altın sarısı mozayik virüsü (tomato golden mosaic virus; TGMV)'ne dayanıklı tütün bitkileri elde etmişlerdir. Bu çalışmada TGMV'nin enfeksiyonundan sonra semptom oluşma oranı, bu genin değişik bölgelerine yönelik oluşturulan antisens tiplerine göre değişmekle birlikte önemli ölçüde azalma göstermiştir.

TMV ve CMV virüslerinin kılıf protein geninin dışındaki bölgelere yönelik oluşturulan antisens çalışmalarında; kılıf protein genine ve genomik RNA'da tRNA-benzer (tRNA-like) 3' bölgelerine yönelik oluşturulan antisenslerin birlikte kullanımında TMV'nün düşük orandaki enfeksiyonlarına dayanıklılık sağlanırken, yalnız kılıf protein geni antisenslerini içeren bitkilerin aynı konsantrasyonlardaki enfeksiyonlara karşı dayanıklılık sağlamadığı görülmüştür. Bunda tRNA-benzer 3' ucun TMV'nün replikasyonunu engelleyici etkisi olduğu düşünülmektedir (Rezaian *ve ark.*, 1988; Powell *ve ark.*, 1989).

Rezaian *ve ark.* (1988) CMV genomunun 3 farklı bölgesine yönelik oluşturdukları antisenslerin aktarıldığı bitkilerin CMV'ne karşı dayanıklılıklarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, üç bölgeye yönelik antisenslerle kılıf protein sentezi engellenirken, yalnızca bir hatta ait transgenik bitkilerde CMV replikasyonuna karşı bir dayanıklılık sağlanmıştır. Diğer bitkilerde ise kontrollere yakın oranda RNA ifadesine rastlandığı, yani bu hatların dayanıksız bulunduğu belirlenmiştir. Bitki hatları arasında görülen bu dayanıklılık farklılığı ise antisens RNA ifadesini etkileyen somaklonal varyasyonlar gibi bilinmeyen değişik faktörlere bağlanmıştır.

Bu tekniğin kullanımında değişik geminivirüslerdeki ortak dizilere yönelik antisens yapılarının oluşturulduğu çalışmalar da ağırlık kazanmaktadır. Geminivirüslerden olan Afrika kassava mozayik geminivirüsü (African cassava mosaic geminivirus; ACMV) ve pancar tepe kıvrıcılığı virüsü (beet curly top virus; BTCV)'ne karşı

transgenik bitkilerin dayanıklılıkları tarla koşullarında test edilmiştir (Bejarano ve Lichtenstein, 1994). Çalışma sonucunda TGMV'den oluşturulan antisens RNA ile BTCV'nün replikasyonu engellenirken, ACMV'nün replikasyonu değişmemiştir. Yapılan analizlerde; DNA dizi homolojisi yönünden TGMV'nün ACMV ile %40'lık, BCTV ile ise %63'lük bir homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat AL1 bölgesinin içerisinde TGMV ve BCTV arasında bulunan 280 nükleotidlik (%82'lik dizi homolojisi bulunmaktadır) bir homoloji bölgesi BCTV'nün replikasyonunun azalmasına, yani dayanıklılığın oluşmasına sebep gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu teknik kullanılarak günümüze kadar yapılan çalışmalarda başarının düşük olmasında, çekirdekte oluşturulan antisens transkriptlerinin sitoplazmik replikasyon bölgelerine taşınamamaları neden gösterilmektedir. Ayrıca, antisens yapılarının oluşturulmasında virüsün replike döngüsünün bilinmesi kadar bitki RNA metabolizmasının da bilinmesinin gerekli olduğu vurgulanmaktadır (Timmerman, 1993). Ancak, başarının düşük olmasına rağmen antisens RNA uygulamalarının dayanıklılık sağlamak açısından kılıf proteinine dayalı çalışmalardan daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (Horn *ve ark.*, 1996).

19.4. Virüsün Haraketini Sağlayan Proteinler

Virüslere karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesi amacıyla üzerinde durulan diğer bir yaklaşım ise virüs tarafından sentezlenen ve özellikle virüsün hareketinde fonksiyonu olan proteinlerin kullanılmasıdır. Bitki hücrelerinde plazmodezmatanın geçirgenliğini artırarak (Deom *ve ark.*, 1990,1991) virüsün sistemik hareketini yani hücreden hücreye geçişini (Leisner ve Turgeon, 1993) kolaylaştıran bu proteinlere yönelik mutant proteinler oluşturularak virüsün yayılımını önlemek bu çalışmaların esasını oluşturmaktadır.

Enfeksiyonda, yani virüsün hücreden hücreye geçişinde etkili olan hareket proteinleri virüs replikasyonu ve kapsüllenmesi için gerekli olmamaktadır (Horn *ve ark.*, 1996). Transgenik bütün bitkilerinde Lapidot *ve ark.* (1993) tarafından yapılan çalışmalarda 3., 4. ve 5. amino asitleri eksik olan mutant TMV hareket proteininin (MPA 3-5) virüsün sistemik semptom oluşumunu geciktirdiği belirlenmiştir. Bu çalışmalarda yapılan gözlemlerde, yalnızca MPA 3-5 proteinini ifade eden transgenik bitkilerde semptom oluşumu durdurulmuştur. Ayrıca, bu mutant proteinin aynı gruba ait (tobamo grubu) TGMV ve SHMV virüslerinin yayılımında da azalmalara sebep olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda; inaktif hareket proteininin üretiminin yapıldığı transgenik bitkilerde, virüs yayılımının azalması hücreden hücreye virüs geçişinin inaktif hareketli protein tarafından engellenmesine bağlanmaktadır (Horn *ve ark.*, 1996).

Hareket proteinleriyle yapılan dayanıklılık araştırmalarında, elde edilen transgenik bitkilerde tek bir genin ifadesi ile oluşan fonksiyonu bozuk (mutant) proteinler ile çok geniş bir virüs grubuna dayanıklılık oluşturulabilmektedir. Malyschenko *ve ark.*

(1993), brome virüs grubundan olan brome mozayik virüsü (brome mosaic virus; BMV)'nün 32 k-Da'lık hareket proteininin üretildiği transgenik tütün bitkilerinin tobamovirüs grubundan TMV'ne karşı da dirençli olduğunu belirlemiş olup, bundaki başarıyı da heterolog hareket proteinlerinin homolog hareket proteinlerine benzer işlevler göstermesine bağlamışlardır.

Potexvirus, hordeivirus ve furovirus gruplarında virüsün hücrelerarası hareketinde, üç kısmi örtüşen gen (üçlü gen bloğu) tarafından oluşturulan setin kodladığı proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu üçlü blok proteinleri ise virüslerde korunan bir bölgede bulunan üçlü genlerden bir tanesinde meydana gelen mutasyon sonucu oluşmaktadır (Beck *ve ark.*, 1994). Bununla ilgili yapılan çalışmalarda potexvirus grubundan olan ak üçgül mozayik virüsü (WCIMV)'nün mutant hareket proteinini ifade eden transgenik bitkiler, WCIMV'nün farklı 3 değişik suşuna, potex virus grubundan PVX, narcissus mosaic virus'lerine ve bir carlavirus ırkına dayanıklılık gösterirken, tobamo grubundan olan TMV'ne karşı hassas bulunmuştur (Beck *ve ark.*, 1994).

Bu sonuçlardan da anlaşılmaktadır ki, tek bir gen ifadesi ile bir çok virüse (multiple) dayanıklılık sağlanabilmektedir. Yapılan bu çalışmalara karşın, hareket proteinleriyle virüslere dayanıklılık sağlanmasında bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Geminivirüslerden olan kabak kıvrıkcık virüsü (squash curl virus; SqLCV)'nün kodladığı BR1 ve BL1 proteinlerinden yalnızca BL1'i ifade eden transgenik bitkilerde, virüs enfeksiyonuna maruz bırakılmamalarına rağmen tipik SqLCV semptomları (yaprak kenarlarının aşağı kıvrılması ve kloroz oluşması) gözlenmiştir (Pascal *ve ark.*, 1993). Bu nedenle, yapılan dayanıklılık çalışmalarında yalnızca BR1 proteininin kullanılabileceği görülmüştür. Bununla birlikte, hareket proteinlerinin mutantlarında BL1 ve BR1 proteinlerinin herikisi birden konakçı bitkilerde dayanıklılık sağlamışlardır (Ingham *ve ark.*, 1995). Ayrıca, bir virüs grubunun hareket proteinleri diğer virus gruplarının da bitkide sistemik hareketlerine sebep olarak, enfeksiyon başlatabilmektedir. Örneğin, tobamo ve comovirus gruplarının taşınım mekanizmasındaki farklılıklara rağmen, tobamovirüsler kendiliğinden taşınamayan çayır üçgülü benek comovirüsü (red clover mottle comovirus; RCMV)'nün taşınımına yardımcı olmaktadır (Horn *ve ark.*, 1996).

19.5. Replikaz Genleri

Viral replikaz genlerinin bitki virüslerine dayanıklılık da başarılı bir şekilde kullanılması genetik mühendisliğindeki çalışmaların bir diğer sonucudur. Bu teknik ilk olarak Golemboski *ve ark.* (1990) tarafından TMV'ne karşı geliştirilmiştir. Viral genom RNA'sının 5' ucuna yakın bir bölge 126 kDa'luk bir proteini kodlarken, aynı bölgeden yine 183 kDa'luk bir proteininde okuması yapılmaktadır. 183 kDa'luk proteini kodlayan bu gen bölgesi 54 kDa'luk bir protein için de açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) içermektedir. Ancak, enfekte olmuş

dokularda 54 kDa'luk protein bulunmamaktadır. Golemboski *ve ark.* (1990), 54 kDa'luk proteini ifade eden transgenik bitkiler kullanarak bu proteinin fonksiyonlarını araştırmışlardır. 54 kDa'luk proteinin kaynağı olan TMV'nün U1 suşu ile yaptıkları enfeksiyonlarda transgenik bitkilerin U1 suşunun replikasyonuna tamamen dayanıklı oldukları gözlenmiştir. Kılıf proteini ile sağlanan dayanıklılığın tersine, artırılan inokülasyon konsantrasyonlarına karşın replikaz aracılığıyla TMV RNA ve TMV virionlarına karşıda dayanıklılık sağlanmıştır. Ancak, TMV'nün U2 suşunda ve CMV'de bu başarıya ulaşamamıştır. Carr ve Zaitlin (1992) ise yaptıkları çalışmalarında TMV'ne karşı dayanıklılığın RNA'dan değil 54 kDa' luk proteinden kaynaklandığını belirlemişlerdir.

Replikaza bağlı dayanıklılık aynı zamanda PEBV gibi tobra virüslerine yönelik olarak da kullanılmıştır (MacFarlane ve Davies, 1992). Bu araştırmacılara göre, PEBV'nin genomik RNA'sı iki kısımdan oluşmakta; büyük bölüm 201 kDa olduğu düşünülen bir proteini kodlamakta aynı bölgeden ise 141 kDa'luk başka bir proteinin okuması yapılmaktadır. 201 kDa protein aynı zamanda büyük bölümün karboksi ucuna yerleşmiş 54 kDa'luk bir başka proteini de bulundurmaktadır. 54 kDa'luk bu protein korunmuş RNA'ya bağlı RNA polimeraz sekans dizileri içermektedir. PEBV replikaz geni tarafından sağlanan replikaza bağlı dayanıklılık, PEBV'nün diğer suşlarına ve diğer bir tobravirüs olan bakla sarıbant virüsü (broad bean yellow band virus; BBYBV)'ne karşıda etkili bulunmuştur. 54-kDa'luk proteine ait RNA'nın dayanıklılıkta etkili olup olmadığı tam bilinmez iken, bu genin mutant tipleri ile yapılan çalışmalarda dayanıklılığın sağlanmadığı görülmüştür. Bu sonuç; dayanıklılıkta, proteinin sorumlu olduğunu göstermektedir.

Bu yöntemin PVX'ne karşı dayanıklılıkta da kullanıldığı bildirilmektedir. PVX RNA'sında ilk ORF'nin (ORF1) viral replikazı kodladığı düşünülmektedir. Bu ORF1 bir nükleotid bağlanma bölgesini ve korunmuş gly-asp-asp (GDD) amino asit motifli karakteristik gösteren viral RNA'ya bağlı polimerazı (örnek: RNA replikaz) kodlamaktadır. Braun ve Hemenway (1992), ORF1 geninin değişik parçalarını içeren hatları analiz etmişlerdir. Sonuçta, bitkilerde dayanıklılığın ORF1 geninin ifadesi ile sağlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca, translayona uğramayan lider bölgeyi ve ORF1'e ait ilk 674 kodonu ifade eden çok dayanıklı bir bitki elde etmişlerdir. Bununla birlikte; korunmuş nükleotid trifosfat (NTP) bağlanma bölgesini ve GDD motifini içeren ORF1 geninin sırası ile 3. ve 4. kısımlarını ifade eden diğer hatlarda PVX virüsüne dayanıklılığa rastlanmamıştır. Ayrıca, araştırmacılar PVX virüsüne karşı, kılıf proteini ile yüksek oranlarda dayanıklılık gösteren transgenik bitkilerle ORF1 bitkilerinin dayanıklılıklarını karşılaştırdıklarında, ORF1 genini taşıyan bitki hatlarının kılıf protein genini taşıyan hatlara oranla daha dayanıklı olduklarını belirlemişlerdir.

Anderson *ve ark.* (1992), CMV'nün replikaz geninde mutasyonların etkisini çalışmışlardır. Araştırmacılar, GDD motifini kodlayan nükleotidlerin uzaklaştırıldığı bir delesyon mutasyonu kullanarak, mutant CMV genini ifade eden transgenik bütün hatlarında CMV RNA'sına ve bütün vironlara karşı dayanıklılık

geliştirmişlerdir. Benzer çalışmalar PVX için de gerçekleştirilmiştir (Tenllada *ve ark.*, 1995). Bu amaçla, GDD dizileri farklı amino asitleri kodlamak üzere mutasyona uğratılmıştır. Bu virüsün transgenik tütün hatlarına inokülasyonu sonucunda, oluşturulan bütün mutasyonlar viral genomun enfeksiyonunu önlemiştir. Diğer taraftan, bitki RNA virüslerinin muhtemel replikaz ögelerinin transgenik ifadesi ile AIMV (Taschner *ve ark.*, 1991) ve BMV (Mori *ve ark.*, 1992) virüslerine karşı dayanıklılık geliştirilememiştir. Her iki virüs için de replikaz ögelerinin transgenik ifadesi virüs zararını artırmıştır.

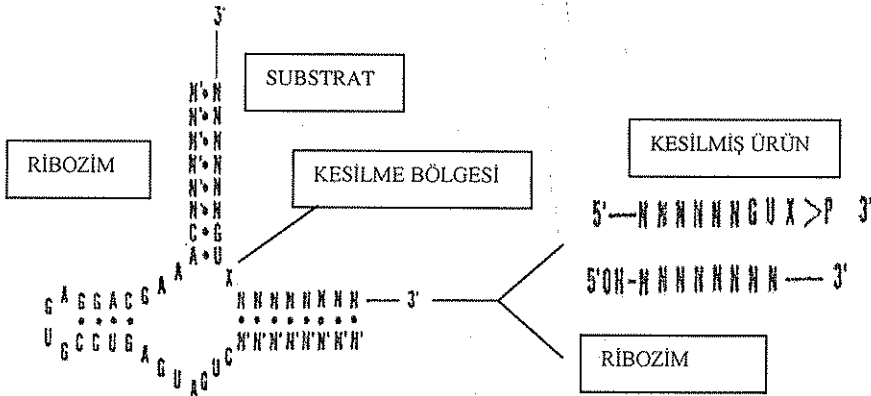
İlk çalışmalar replikaza bağlı dayanıklılığı RNA'dan çok replikaz proteinine dayandırırken, sonraki çalışmalarda dayanıklılıkta proteinden daha çok replikaz geninin kullanıldığı RNA dizilerinin etkili olduğunu belirtilmektedir. Tenllado *ve ark.* (1995), PMMV replikaz geninin 54 kDa bölgesini içeren transgenik tütün bitkilerinde viral bulaşıklıklara karşı iki tip dayanıklılığın geliştiğini gözlemişlerdir. Bunlardan birincisi bitkinin kendi gösterdiği bağışıklık, ikincisi ise virüs bulaştırılmasından sonra meydana gelen yüksek dayanıklılık olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar, dayanıklı bitkilerin PMMV izolatlarının yüksek konsantrasyonlarıyla bulaştırılması halinde dayanıklılığın değişmediğini, dolayısıyla dayanıklılığın replikaz gen ifade seviyelerine bağlı olmadığını vurgulamışlardır. Transgenik bitkilerde eksik 54 kDa proteinin ifadesi ile dayanıklılığın sağlanması, tam uzunluktaki 54 kDa proteinine ihtiyaç duyulmadığını göstermiştir (Tenllado *ve ark.*, 1996). *Cymbidium* halkalı leke tobusvirüsü (CyRSV)'ne karşı replikaza bağlı dayanıklılık, gen ifadesinin düşük olduğu durumda daha yüksek bulunmuş ve dayanıklılık söz konusu virüse yakın diğer virüslerde görülmemiştir (Rubino ve Russo, 1995). Bu durum, dayanıklılığın proteine değil RNA'ya bağlı geliştiğini göstermektedir. Diğer bir çalışmada ise replikasyona bağlı dayanıklılıkta RNA'nın tek başına ifadesi yeterli görülmüştür (Mueller *ve ark.*, 1995).

Sonuç olarak; replikaza bağlı dayanıklılığı açıklayan değişik mekanizmalar ortaya atılmıştır. Braun ve Hemenway (1992) ORF1 tarafından kodlanan proteinin viral RNA'ya bağlandığını ve böylece diğer bir viral gen ürününün transkripsiyonunu veya viral RNA'nın paketlenmesini engellediğini savunurlarken, Golemboski *ve ark.* (1990) dayanıklılıkta; replikazın esas ögesi olan 54-kDa'luk proteinin, 183-kDa'luk proteinle rekabete girmek suretiyle rol oynadığını belirtmektedirler.

19.6. Ribozimler

Ribozimler, enzimler gibi davranan RNA molekülleridir. Bunlar herhangi bir RNA'ya karşı hedeflenerek bu RNA üzerinde kesim yaparlar (Timmerman, 1993). Sekans dizisine özgü kesim yapan iki tip ribozim bulunmaktadır (Buck, 1991). Birincisi, *Tetrahimena*'nın nüklear pre-ribozomal RNA'sından bir intronu uzaklaştırma temeli üzerine kurulmuştur. Bu ribozimler 4 bazlık bir bölgeyi tanırlar ve RNA'nın *in vitro* kesim işleminde kullanılırlar (Zaug *ve ark.*, 1988; Haseloff ve Gerlach, 1988). İkinci tip ribozimler ise, bazı viroidlerin ve satelit RNA'ların

replikasyonları esnasında meydana gelen kendine-kesim olayı ile ilişkilidirler. Bu kesim işleminin, dönen çember modeli ile replike olan lineer RNA multimerlerinin birim uzunluktaki parçalara ayrılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Forster ve Symons (1987) çalışmalarında, bu kendini kesen RNA moleküllerinde korunmuş diziler ve “çekiç” benzeri bir ikincil yapı tespit etmişlerdir. Haseloff ve Gerlach (1988), *in vitro* mutagenez yaparak STobRV (+) RNA’sının kendini kesmesinde gerekli ve gerekli olmayan dizileri tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucu substrat ve nukleaz (ribozim) aktivitelerinin farklı moleküllerde olabileceği anlaşılmıştır. Substrat zincirinin dizisinde çok az bir sınırlamaya sahip olduğu ve bu sayede gerekli ribozimle baz çiftleri oluşturarak çekiç benzeri ikincil yapı oluşturabildiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 19.1).



Şekil 19.1. Haseloff ve Gerlach (1988) tarafından düzenlenmiş ribozim modeli. Çekiç benzeri yapının substrata bağlanması ve kesim ürünü görünmektedir (komplementer baz çiftleri noktalarla gösterilmiştir).

Ribozim moleküllerinin RNA’yı parçalama özelliğinden yararlanılarak, substrat RNA moleküllerine yönelik ribozimler dizayn edilmiştir. Ribozimler virüs genomunun çok değişik bölgelerine hedeflenerek dizayn edilebilirler. Bununla beraber transgenik bitkilerde ribozimlerin antiviral etkinliğini etkileyebilecek pek çok faktör bulunmaktadır (Buck, 1991):

1. Ribozimlerin *in vivo* stabilitesi.
2. Sitoplazmik virüsler için ribozimlerin sitoplazmaya taşınımı.

3. Hedef RNA'daki kararlı ikincil yapının ribozimin bağlanma kabiliyetine olan etkisi.
4. Ribozimin reaksiyondan sonra substrattan gerçek bir enzim gibi ayrılabilme kabiliyeti.
5. Ribozimin ifade düzeyi.

Transgenik bitkilerde ribozimlerin etkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlı olmasına ve yöntemin güçlüklerine karşın, yöntem virüslere dayanıklılıkta kullanılan mekanizmalara alternatif bir mekanizma olarak görünmektedir (Buck, 1991).

19.7. Satelit ve Hasarlı RNA'lar

Bazı virüs izolatları genomik RNA'larına ilaveten satelit RNA denilen ekstra bir RNA türünü de bulundurmaktadırlar. Satelit RNA'lar replikasyonları için tamamen yardımcı virüslere bağımlıdırlar. Satelit RNA ve yardımcı virüs arasındaki ilişki genelde çok spesifiktir. Belirli bir satelit RNA için sadece yakın ilişkili virüsler yardımcı virüs olabilirler. Satelit RNA'lar yardımcı virüsün replikasyonu için gerekli olmadıkları gibi bazı durumlarda yardımcı virüsün replikasyonunu engelleyebilmektedirler. Satelit RNA'lar yardımcı virüsün nükleik asit dizileri ile ilişkili olmayan diziler bulundurulur. Bir kılıf proteini kodlamazlar, ancak yardımcı virüslerin sentezlendiği kılıf proteini ile kılıf içine alınırlar (Francki, 1985).

Gerlach *ve ark.* (1987) tütün halkalı leke virüsü (tobacco ringspot virus; TobRV)'nün sateliti aktarılmış tütün bitkilerini kullanarak yöntemi ilk olarak uygulamaya koyarak virüslere karşı dayanıklılık sağlamışlardır. Bu çalışmada transgenik tütün bitkileri, satelit bulundurmayan TobRV ile enfekte edildiklerinde, aktarılan satelit dizilerinde yüksek oranlarda artış gözlenmiştir. Transgenik bitkilerin yapraklarında semptomların çok az veya hiç olmadığı, ayrıca virüs birikiminde azalmanın olduğu gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada CMV satelit RNA'sını taşıyan transgenik tütün bitkilerinde de CMV enfeksiyonlarına karşı tolerans sağlanmıştır (Harrison *ve ark.* 1987). Benzer şekilde, Masuta ve Takami (1989), CMV'nün satelit RNA'sı (Y-Sat RNA) ile bu virüse karşı dayanıklılık sağlamışlardır. Daha sonra yapılan bir çalışmada ise transgenik olmayan ve CMV'ne aşırı duyarlılık gösteren domates çeşidine aktarılan satelit T73-satRNA'nın dayanıklılık oluşturduğu belirlenmiştir (Saito *ve ark.*, 1992). Yie *ve ark.* (1992), dayanıklılıkta bu yöntemi ve kılıf proteinine dayalı dayanıklılığı kombine ederek CMV'ne dayanıklılık üzerinde çalışmışlardır. Kılıf protein yöntemi yüksek konsantrasyonlardaki CMV enfeksiyonlara karşı dayanıklılık sağlamazken, enfeksiyondaki artışla satelit dizileri çoğalarak bitkilerde korunma sağlanmıştır. Satelit RNA'ların aktiviteleri, başlangıç konsantrasyonuna bağlı olduğu için koruma etkileri belirli bir dönem sonra görülürken, kılıf proteinine bağlı koruma virüs enfeksiyonundan hemen sonra devreye girmektedir. Bu nedenle, sözü edilen yöntemlerin tek tek uygulamalarına

nazaran birlikte uygulandıklarında satelit RNA ve kılıf protein genlerinin semptom gelişimine karşı daha engelleyici olduğu görülmüştür.

Bitki virüslerine karşı satelit RNA'ların kullanımını kısıtlayan bazı faktörler bulunmaktadır (Saito *ve ark.*, 1992). Bunların başında, doğal olarak bulunan satelit sayısının oldukça kısıtlı olması ve bundan daha da önemlisi satelit RNA'ların etkilerinin konakçıya (bitki türüne) göre değişmesi gelmektedir. Örneğin CMV'nün satelit RNA'sı tütünde bu virüsün semptomlarını azaltırken domatestede semptom derecesini artırmaktadır (Devic *ve ark.*, 1989). Ayrıca, satelit RNA'nın değişik ırkları bir bitki türünde değişik etkilere sahip olabilmektedir (Saito *ve ark.*, 1992). Yine, bunlar yardımcı virüslerin belli ırklarına bağlı olarak olumsuz etki gösterebilmektedirler. Domatesteki spesifik satelit RNA'lar tarafından teşvik edilen kloroz seviyesi yardımcı virüs izolatlarına bağlı bulunmuştur (Palukaitis, 1988). Bazı satelit RNA'ların tütünde kloroz oluşturma aktivitesi CMV'nün alt grup I ırkının varlığı ile gözlenmezken, alt grup II ile birlikte kloroz oluşumu tespit edilmiştir (Sleat *ve* Palukaitis, 1990). Virüs enfeksiyonlarında satelit RNA'ların kodladığı proteinlerinde etkisi olabilmektedir. Bu konuda yapılan bir çalışmada domates nekrozisinin CMV'nün satelit RNA'sında bulunan korunmuş bir bölge ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Kaper *ve ark.*, 1988).

RNA virüslerinin mutasyona çok yatkın olmalarından dolayı (Steinhauer *ve* Holland, 1987) dayanıklılık sağlayan satelit RNA'lar birkaç bazı değiştiren mutasyonlarla (Baulcombe, 1996) virüsent satelitlere dönüşebilmektedirler. Bir kaç baz değişikliği satelitin özelliğini değiştirmekle birlikte, mutasyonlarla satelitlerin sayılarının artırılmasına ve satelit genomlarda manipulasyonlara olanak vererek satelitlerin diğer virüslere dayanıklılıkta kullanıma imkanını artırmaktadır. Örneğin, 1. ve 61. pozisyonadaki iki bazı çıkartılarak TMV satelit genomu, ToMV ve tip dışı yeşil domates mozayik virüsü (green tomato atypical mosaic virus; G-TAMV)'ne adapte edilmiştir (Yassi *ve* Dodds, 1998).

Bu konu ile ilgili diğer bir sorun ise satelitlerin yardımcı virüslerle yayılmalarıdır. Bu yayılma sonucunda yardımcı virüsün daha az virüent hale geliyor olması bir avantaj gibi görünse de, genetik yapıları değiştirilen genlerin yüksek frekanslardaki hareketi başka problemler ortaya çıkarabilmektedir. Bu nedenle yayılmaya fazla imkan vermeyen, zararsız satelitlerin kullanılması önerilmektedir (Yie *ve ark.*, 1992).

Virüslere dayanıklılıkta diğer bir strateji ise hasarlı müdahaleci RNA'ların (defective interfering RNAs; DIs) kullanılmasıdır (Baulcombe, 1996). DIs'lar delesyon mutasyonuna uğramış yardımcı virüsler olup, değişik büyüklükte olabilirler. Bu moleküller virüslerin replikasyonu sırasında, virüsün replikasyonunu engellemeyecek şekilde belirli dizilerin delesyonu sonucunda oluşurlar. Daha sonra DIs'lar, replikasyonu kendi yararlarına olacak şekilde yeniden yönlendirerek, enfeksiyona neden olan virüsün miktarını ve hastalık semptomlarını azaltırlar. Stanley *ve ark.* (1990), tek DNA zincirli bir geminivirus olan, A ve B öğelerini genomunda bulunduran ACMV'ne ait DIs'ların virüs replikasyonunu ve dolayısıyla

hastalığı azaltma kapasitelerini incelemişlerdir. Bu virüsün genomunda bulunan ve virüs replikasyonuna müdahale eden B ögesine ait cDNA kopyaları bütün bitkilerine aktarılmıştır. Gerek kontrol ve gerekse transgenik bitkiler başlangıçta hastalık semptomları gösterirken, ileriki dönemlerde transgenik bitkilerde sistemik enfeksiyonun geciktiği ve semptomların azaldığı kaydedilmiştir.

Bitki virüslerine karşı dayanıklılık için, DIs'lar yapay olarak üretilmektedirler. Marsh *ve ark.* (1991), yapay DIs'ları kullanarak virüs replikasyonunu durdurmayı başarmışlardır. Satelitler gibi DIs'lar da yanlış konakçı bitkide kullanıldıklarında ters etki göstererek hastalığın artmasına neden olmaktadır (Li *ve ark.*, 1989).

19.8. Gen İnaktivasyonu

Gen inaktivasyonu (gene silencing) veya RNA baskılanması (RNA suppression) virüslere dayanıklılık da kullanılabilecek mekanizmalar arasında görülmektedir. Gen inaktivasyonu, transkripsiyon sonrası hedef RNA dizilerinin parçalanması şeklinde yorumlanmaktadır (Goodwin *ve ark.*, 1996). Bu yöntemde, pozitif sens RNA'ları kodlayan, ancak protein birikimine neden olmayan genler kullanılmaktadır. Gen inaktivasyonu ile sağlanan bu dayanıklılık yönteminde, hücreler anormal olarak yüksek orandaki RNA sekanslarını, anormal RNA yapılarını veya modifiye olmuş nükleotidleri yakalayarak, gen transkriptlerinin nükleaz parçalanmasına neden olan bir mekanizmayı uyarırlar (Goodwin *ve ark.*, 1996). Dayanıklılıkla gen inaktivasyonu arasındaki ilişki PVX (Goodwin *ve ark.*, 1996) ve PVY (Huntley ve Hall, 1993) virüslerine karşı bitkilerin gösterdiği dayanıklılığın genetik analizi ile kanıtlanmıştır. Yapılan testler sonucunda virüslere dayanıklılığı sağlayan transgenler, transkripsiyon sonrası oluşan mekanizma sonucunda homolog transgenlerin ifadelerini de inaktif hale getirmiştir. β -glucuronidase (GUS) geni taşıyan PVX vektörü (PVX-GUS) ile yapılan çalışmalarda, viral olmayan transgenin (GUS) transkripsiyonu sonrası gen inaktivasyonunun viral RNA birikimini engellediği gözlenmiştir. Virüsün engellenmesi için, viral genom ile transfer edilen gen arasında dizilerin benzer olması gerekmektedir (English *ve ark.*, 1996).

19.9. Dayanıklılık Genleri

Virüslere karşı dayanıklı bitki elde etmek amacıyla virüslere ait genlerin esas alındığı ve diğer bölümlerde anlatılan tekniklerin yanısıra, bitkilerde varolan genlerin ortaya çıkarılması ve kullanımı ise özellikle gelecekte bu alanda yapılacak çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Virüslere dayanıklılık genleri iki grup altında toplanmaktadır:

1. Virüslere dayanıklılık genleri
2. Savunma genleri

Bunlardan birinci grup genler; yapısal genler olup belli virüs ve virüs ırklarının enfeksiyonlarında ifadeleri artmaktadır (Fraser, 1990). İkinci grup genler ise yalnızca enfeksiyon anında devreye giren ve bitkide enfeksiyon dağılımına karşı dayanıklılığı artıran genlerdir. Bazı patojen-ilişkili (PR) genler bu gruba girmektedir (Kauffmann ve ark., 1990).

Bitki ıslahı çalışmaları sonucunda virüslere dayanıklılık genlerinin elde edilebileceği yeni çeşitlere ulaşma imkanı her geçen gün artmaktadır. Moleküler biyoloji çalışmalarında bu tür genlerin kullanımını kısıtlayan en önemli neden, genlerin biyokimyasal özelliklerinin ve yeni bireylerdeki kalımlarının tam bilinmemesidir. Bu alanda yapılan çalışmaların en güzel örneği ise börülcenin Arlington çeşidinde börülce mozayik virüsü (CPMV)'nün SB ırkına karşı bir dominant allel tarafından kontrol edilen dayanıklılık gen proteininin tespit edilmesidir. CPMV poliprotein oluşumunu engelleyen bu proteinin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Ayrıca son yıllarda genomik haritaların çıkartılması, moleküler işaretler yardımıyla bağlantı (linkage) haritalarının elde edilmesi, kromozom haritalaması, otomatik nükleik asit dizilerini belirleme yöntemleri ve direkt gen izolasyonu ile ilgili gen ürünlerinden gidilerek genlerin izolasyonuna yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Bezelye tohumu-kaynaklı mozayik virüsüne karşı çamlarda yürütülen çalışmalar sonucunda virüs dayanıklılığı ile ilgili işaretlerin tespit edildiği gen haritalaması çalışmaları sürdürülmektedir (Timmerman, 1993).

19.10. Ribozomları İnaktive Edici Proteinler

Ribozomları inaktive edici proteinler (RIPs) sitotoksinler olarak bilinip, birçok yüksek bitkide doğal olarak bulunurlar. RIPs ökaryotik hücrelerde, rRNA'nın büyük alt ünitesinde 3' ucuna yakın spesifik adenosini depurinleştirerek protein sentezini engellemektedir (Hong ve ark., 1996). Bu proteinlerin gerçek rolleri bilinmemekle birlikte, patojen enfeksiyonu esnasında bunların stoplazmaya salınımı hipersensitif bir reaksiyon oluşturmakta ve doğal bir koruma gerçekleşmektedir.

RIPs'lerin transgenik bitkilerde sürekli (constitutive) ifadelerinin anormal gelişmelere neden olması üzerine, Hong ve ark. (1996) ACMV'ne dayanıklılık sağlamak amacı ile transgenik *N. benthaminana* bitkilerinde yeni bir strateji geliştirmişlerdir. Bu amaçla, araştırmacılar potansiyel bir RIP olan *Dianthus caryophyllus*'dan izole edilen "dianthin" kodlama sekansını, viral AC2 gen ürünü tarafından aktive edilen ACMV virion-sens promotörü önüne klonlayarak bütün bitkilerine aktarmışlardır. Virüs enfeksiyonu sonucunda dianthin üretiminden sorumlu viral promotörün aktif hale geçmesiyle, enfekte olan hücrelerin hipersensitif bir tepki göstererek öldükleri gözlenmiştir. Transgenik bitkilerin inoküle edilen yapraklarında tipik olmayan lezyonlar oluşmuştur. ACMV'ne dayanıklılık gösteren bu transgenik bitkilerin diğer geminivirüslerine karşı dayanıklılık göstermemesi ise araştırmacılar tarafından sözü edilen ACMV promotörünün diğer gemini virüslerde bulunan AC2 homologları tarafından

aktive edilmediği şeklinde yorumlanmıştır. Daha sonra, Hong *ve ark.* (1997) transgenik bitkilerde RIP aktivitesinin artmasının AC2 geni tarafından sağlandığını belirtmişlerdir.

RIP çalışmaları, diğer sitotoksik dizilerin virüs genomlarına ait dizilerle kombine edilmesi veya bunların değişik manipülasyonları yönünden gelecekte viral enfeksiyonlara dayanıklılık açısından oldukça ümit vermektedir. İlave olarak, diğer virüslerin sadece enfekte olmuş hücrelerde etkili olan proteinleri üretmeleri mümkün olabilecektir.

19.11. Memeli 2',5' Oligoadenilat (2-5A) Sistemi

Diğer bölümlerde, bitki virüslerine karşı patojen kaynaklı dayanıklılık mekanizmaları kullanılmıştır. Patojen kaynaklı dayanıklılık yoğun olarak kullanılmasına ve ticari üretime girmesine karşın, birçok koşulda bitkilere aktarılan viral genom dizileri dayanıklılığı belirleyici faktör olarak karşımıza çıkmakta ve dizilerdeki benzerlik oranına göre bir veya birkaç virüs ırkına dayanıklılık sağlanmaktadır. Ayrıca, aktarılan viral genlerle tam bir dayanıklılık sağlamak oldukça güç uygulamaları içermektedir. Son yıllarda memeli hücrelerinde bulunan interferonların antiviral aktiviteleri teşvik ettiği fikri ortaya konmuştur. Bu yolla virüs enfeksiyonlarına dayanıklılık interferon tarafından düzenlenen 2',5'oligoadenilat (2-5A) sisteminin RNA'yı parçalaması ile gerçekleşmektedir. Sistem, çift sarmal RNA'lar tarafından aktive olmakta ve virüs replikasyonu ile konukçu hücre çoğalması bloke edilmektedir (Mitra *ve ark.*, 1996). Bu sistemde 2',5'oligoadenilat sentez (2-5Aase) ve ribonukleaz L (RNase L) gerekli olan temel moleküllerdir.

Mitra *ve ark.* (1996), değişik konstitutif promotorların kontrolü altında insan RNase L ve insan 2-5A'nın düşük moleküler ağırlıklı formlarına yönelik cDNA'ları bir plasmid aracılığıyla tütüne aktararak, transgenik bitkilerde bu iki enzimin birlikte etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla, bu iki enzimi üreten transgenik bitkiler TMV, AIMV ve TEV ile inoküle edilmiştir. Sadece 2-5A veya RNase L üreten yapraklar ile tek başına plazmid vektörü taşıyan yapraklarda tipik enfeksiyonlar görülmüştür. Her iki geni taşıyan transgenik bitkilerde AIMV'ye karşı virüs konsantrasyonuna bağlı kalmaksızın tam bir dayanıklılık sağlanırken, TEV miktarında önemli bir azalma olduğu yapılan ELISA testleri ile anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, memelilere ait 2-5A sisteminin bitkilerdeki virüs enfeksiyonlarına karşı dayanıklılık sağladığını göstermiştir. Daha sonra yapılan bir çalışmada ise, her iki geni (RNAase ve 2-5A) taşıyan transgenik bitkilerin CMV ile inoküle edilen yapraklarında nekrotik lezyonlarla birlikte CMV'ne karşı tam bir dayanıklılık elde edilmiştir. Öte yandan, PVY ile ikübe edilen transgenik bitkiler nekrotik lezyonlar oluşturmalarına ve virüs artışı olmamasına rağmen bütün bitkiler 20 gün içinde ölmüştür (Ogawa *ve ark.*, 1996). Her iki enzimden birinin üretildiği transgenik bitkiler ise CMV ve PVY enfeksiyonlarına karşı, transgenik olmayan bitkilerin gösterdiği normal sistemik

semptomları göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre, her iki genin aktarıldığı transgenik bütün hücrelerindeki 2-5A sistemi çift sarmal RNA ile aktive olmakta ve memeli hücrelerinde görülmeyen bir şekilde enfekte olan hücreler ölmektedir. Bu ise 2',5'-fosfodiesteraz ve 5'-fosfatazin memeli hücrelerinde 2-5A'yı parçalamalarından kaynaklanmaktadır. Son yıllarda, 2-5A sistemi buğdayda çift sarmal RNA virüslerinden buğday çizgi mozayik virüsü (wheat streak mosaic virus; WSMV)'ne dayanıklılık çalışmalarında da uygulanmaya başlanmıştır (Baenziger PS, kişisel görüşme). Sonuç olarak, bu sistemin ileriki çalışmalarda virüslere karşı dayanıklı bitkilerin üretiminde etkili bir şekilde kullanılacağı düşünülmektedir.

19.12. Virüs Proteinlerine Karşı Antikor Kullanımı

Virüslere dayanıklılık amacı ile kullanılan diğer bir yöntem ise virüs proteinlerine yönelik antikorların kullanımıdır. Yapılan çalışmalarla bunların bitkilerde ifade edildiği kanıtlanmıştır (Hiat ve Ma, 1996). Bunlardan tek-zincir Fv antikor scFV, küçük genomu ve daha basit olması nedeni ile bitkide ifade olanların arasından tercih edilendir. Bu antikorum transgenik bitkilerde ifadesi ile enginar benekli kıvrıcıklık virüsü (artichoke mottle crinkle; AMCV)'nün enfeksiyonu azalırken semptom oluşumu gecikmiştir (Tavladoraki ve ark., 1993). Bu yöntemle monoklonal antikorları üreten dolayısıyla hastalıklara dayanıklılık gösteren bitkilerin üretimi mümkün olabilecektir. Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde antikorlar gibi protein kompleksleri transgenik bitkilerde üretililecektir (Franken ve ark., 1997).

Kaynaklar

Anderson EJ, Stark DM, Nelson RS, Powell PA, Tumer NE, Beachy RN (1989) Transgenic plants that express the coat protein genes of tobacco mosaic virus or alfalfa mosaic virus interfere with disease development of some non-related viruses. *Phytopathol.*, 79: 1284-1290.

Anderson JM, Palukaitis P, Zaitlin M (1992) A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1820-1824.

Baulcombe DC (1996) Mechanisms of pathogen derived resistance to viruses in transgenic plant. *Plant Cell*, 8: 1833-1844.

Beck DL, Van Dolleweerd CJ, Lough TJ, Balmori E, Voot DM, Anderson MT, O'Brien IEW, Forster RLS (1994) Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10310-10314.

Bejarano ER, Lichtenstein CP (1994) Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Mol. Biol.*, 24: 241-248.

- Braun CJ, Hemenway CL (1992) Expression of amino-terminal portions of full length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *Plant Cell*, 4: 735-744.
- Buck KW (1991) Virus-resistant plants. In: Grierson D (ed), *Plant Genetic Engineering*, pp. 136-177, Blackie and Son Ltd, London.
- Carr JP, Zaitlin M (1992) Resistance in transgenic tobacco plants expressing nonstructural gene sequence of tobacco mosaic virus is consequence of markedly reduced virus replication. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 4: 579-585.
- Cuozzo M, O'Connell KM, Kaniewski W, Fang R-X, Chua N-H, Tumer NE (1988) Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technol.*, 6: 549-57.
- Day AG, Bejarano ER, Burrell M, Buck K, Lichtenstein C (1991) Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6721-6725.
- Deom CM, Schubert K, Wolf S, Holt CA, Lucas WJ, Beachy RN (1990) Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3284-88.
- Deom CM, Wolf S, Holt CA, Lucas WJ, Beachy RN (1991) Altered function of tobacco mosaic virus movement protein in hypersensitive host. *Virology*, 180: 251-256.
- Devic M, Jaegle M, Baulcombe D (1989) Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of cucumber mosaic virus (Strain Y). *J. Gen. Virol.*, 70: 2765-2774.
- English JJ, Mueller E, Baulcombe DC (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell*, 8: 179-188.
- Forster AC, Symons RH (1987) Self cleavage of plus and minus RNAs of virooid and a structural model for active sites. *Cell*, 49: 211.
- Francki RIB (1985) Plant virus satellites. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 151-170.
- Franken E, Teuschel U, Hain R. (1997) Recombinant proteins from transgenic plants. *Curr. Opin. Bio/Technol.*, 8: 411-416.
- Fraser RSS (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28: 179-200.
- Gerlach WL, Llewellyn D, Haselhoff J (1987) Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature*, 328: 802-805.
- Gielen JJJ, de Haan P, Kool AJ, Peters D, van Grinsven MQJM, Goldbach RW (1991) Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. *Bio/Technol.*, 9:1363-1367.
- Golemboski DB, Lomonossoff GP, Zaitlin M (1990) Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6311-6315.

- Goodwin J, Chapman K, Swaney S, Parks, TD, Wernsman EA, Dougherty WG (1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell*, 8: 95-105.
- Harrison BD, Mayo MA, Baulcombe DC (1987) Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature*, 328: 779-802.
- Haseloff J, Gerlach WL (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 334: 585-91.
- Hayakawa T, Zhu Y, Itoh K, Kimura Y, Izawa T, Shimamoto K, Toriyama S (1992) Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 15: 89:9865-9869.
- Hemenway C, Fang RX, Kaniewski WK, Chua N-H, Tumer NE (1988) Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.*, 7: 1273-80.
- Hiatt A, Ma JK (1992) Monoclonal antibody engineering in plants. *FEBS Lett.*, 307: 71-75.
- Hong Y, Saunders K, Hartley MR, Stanley J (1996) Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of diathin in transgenic plants. *Virology*, 220: 119-127.
- Hong Y, Saunders K, Stanley J (1997) Transactivation of diathin transgene expression by African cassava mosaic virus AC2. *Virology*, 228: 383-387.
- Horn R, Brahm L, Friedt W (1996) Recombination: Novel gene and genome combinations for resistance breeding by interspecific hybridization and genetic transformation. *Progress in Botany*, 57: 177-196.
- Huntley CC, Hall TC (1993) Minus sense transcripts of brome mosaic virus RNA 3 intercistronic region interfere with viral replication. *Virology*, 192: 290-297.
- Ingham DJ, Pascal E, Lazarowitz SG (1995) Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*, 207: 191-204.
- Kaper JM, Tousignant ME, Steen MT (1988) Cucumber mosaic virus associated RNA 5.XI. comparison of 14 CARNA variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology*, 163: 284-292.
- Kauffmann S, Legrand M, Fritig B (1990) Isolation and characterization of six pathogenesis related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 14: 381-90.
- Kawchuk LM, Martin RR, McPherson J (1990) Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol. Plant. Microbe Interac.*, 3: 301-307.
- Knott, D.R., and Dvorak, J. (1975) Alien germplasm as a source of resistance to disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 14: 211-235.
- Lapidot M, Gafny R, Ding B, Wolf S, Lucas WJ, Beachy RN (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.*, 4: 959-970.

- Leisner SM, Turgeon R (1993) Movement of virus and photoassimilate in phloem: a comparative analysis. *Bioessays*, 15: 741-748.
- Li XH, Heaton LA, Morris TJ, Simon AE (1989) Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated *de novo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9173-9177.
- Lindbo JA, Dougherty WG (1992) Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, 189: 725-733.
- Loesch-Fries LS, Merlo D, Zinnen T, Burhop L, Hill K, Krahn K, Jarvis N, Nelson S, Halk E (1987) Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.*, 6: 1845-1851.
- MacFarlane SA, Davies JW (1992) Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA1 are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5829-5833.
- MacKenzie DJ, Ellis PJ (1992) Resistance to tomato spotted wilt virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 5: 34-40.
- Malyshenko SI, Kondakova OA, Nazarova JV, Kaplan IB, Taliansky ME, Atabekov JG (1993) Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing nonfunctional viral transport proteins. *J. Gen. Virol.*, 74: 1149-1159.
- Marsh LE, Pogue GP, Connel JP, Hall TC (1991) Artificial defective interfering RNAs derived from brome mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 72: 1787-1792.
- Masuta C, Takanami Y (1989) Determination of sequence and structural requirements for pathogenicity of a cucumber mosaic virus satellite RNA (Y-satRNA). *Plant Cell*, 1: 1165-1173.
- Mitra A, Higgins DW, Langenberg WG, Nie H, Sengupta DN, Silverman RH (1996) A mammalian 2-5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6780-6785.
- Mori M, Mise K, Okuno T, Furusawa I (1992) Expression of brome mosaic virus-encoded replicase genes in transgenic tobacco plants. *J. Gen. Virol.*, 73: 169-172.
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brigneti G, Baulcombe DC (1995) Homology dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.*, 7: 1001-1013.
- Nelson RS, McCormick SM, Delannay X, Dube P, Layton J, Anderson EJ, Kaniewska M, Proksch RK, Horsch RB, Rogers SG, Fraley RI, Beach RN (1988) Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technol.*, 6:403-409.
- Ogawa T, Hori T, Ishida I (1996) Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2',5'oligoadenylate system. *Nature Biotech.*, 14: 1566-1569.

- Palukaitis P (1988) Pathogenicity regulation by satellite RNAs of cucumber mosaic virus: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1: 175-181.
- Pascal, E., Goodlove, P.E., Wu, L.C., Lazarowitz, S.G. (1993) Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell*, 5: 795-807.
- Powell PA, Stark DM, Sanders PR, Beachy RN (1989) Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6949-6956.
- Powell-Abel P, Nelson RS, De N, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232: 738-743.
- Reavy B, Mayo MA (1992) Genetic engineering of virus resistance In: Gatehouse AMR, Hilder VA, Boulter D (eds), *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, pp. 183-214, C.A.B International, Oxon, UK.
- Rezaian MA, Skene KGM, Ellis JG (1988) Anti-sense RNAs of cucumber mosaic virus in transgenic plants assessed for control of the virus. *Plant Mol. Biol.*, 11: 463-71.
- Rubino L, Russo K (1995) Characterization of resistance to cymbydidum ringspot virus in transgenic plants expressing a full-length viral replicase gene. *Virology*, 212: 240-243.
- Saito Y, Komari T, Masuta C, Hayashi Y, Kumashiro T, Takanami Y (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 679-683.
- Silva-Rosales L, Lindbo JA, Dougherty WG (1994) Analysis of transgenic tobacco plants expressing a truncated form of a poty virus coat protein nucleotide sequence. *Plant Mol. Biol.*, 24: 929-939.
- Sleat DE, Palukaitis P. (1990) Induction of tobacco chlorosis by certain cucumber mosaic virus satellite RNAs is specific to subgroup II helper strains. *Virology*, 176: 292-295.
- Stanley J, Frischmuth T, Ellwood S (1990) Defective DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6291-62-95.
- Stark DM, Register JC, Nejidat A, Beachy RN (1990) Towards a better understanding of coat protein mediated protection. In: Lamb CJ, Beachy RN (eds), *Plant Gene Transfer*, pp. 275-287, Alan R. Liss Inc., New York.
- Steinhauer DA, Holland JJ (1987) Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 409-433.
- Sturtevant AP, Beachy RN (1993) Virus resistance in transgenic plants: Coat protein mediated resistance. In: Hiatt A (ed), *Transgenic Plants*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Taschner PEM, van der Kuyl AC, Neeleman L, Bol JF (1991) Replication of incomplete alfalfa virus genome in plants transformed with viral replicase genes. *Virology*, 181: 445-450.

- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P (1993) Transgenic plants expressing functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, 366: 469-72.
- Tenllada F, Garcia-Luque I, Serra MT, Diaz-Ruiz JR (1995) *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology*, 211: 170-183.
- Timmerman GM (1993) Genetic engineering for resistance to viruses. In: Murray DR (ed), *Biotechnology in Agriculture*, No: 4, *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, CAB International, Wallingford Oxon OX108DE UK, Redwood Press Ltd. Melksham, UK.
- Tumer NE, O'Connell KM, Nelson RS, Sanders PR, Beachy RN, Fraley RT, Shah DM (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.*, 6: 1181-1188.
- Van der Vlugt RAA, Ruiter RK, Golbach R (1992) Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.*, 20: 631-639.
- Van Dun, C.M.P., Bol, J.F. (1988). Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology*, 167: 649-652.
- Van Dun CMP, Bol JF, Van Vloten-Doting L (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology*, 159: 299-305.
- Van Dun CMP, Overduin B, van Vloten-Doting L, Bol JF (1988) Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. *Virology*, 164: 383-389.
- Wenzel G (1985) Strategies in unconventional breeding for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23: 149-172.
- Wilson TMA (1993) Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance to blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3134-3141.
- Yassi MNA, Dodds JA (1998) Specific sequence changes in the 5'terminal region of the genome of satellite tobacco mosaic virus are require for adaptation to tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 79: 905-913.
- Yie Y, Zhao SZ, Liu YZ, Tien P. (1992) High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivar G-140. *Mol. Plant Microbe Interac.*, 5: 460-465.
- Zaug AJ, Crosshans CA, Cech TR (1988) Sequence-specific endoribonuclease activity of the *tetrahymena* ribozyme. *Biochemistry*, 27: 8924-892.

Bölüm 20

Hastalıklara Dayanıklılığın Artırılması

Kemal Kazan¹, Ekrem Gürel²

¹CRC for Tropical Plant Protection, The University of Queensland, Brisbane, 4072 QLD, Avustralya

²Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 14280 Bolu
e-posta: k.kazan@tpp.uq.edu.au¹

20.1. Giriş

Yerleşik yaşamın başlayıp ilk insanların tarım hayatına geçişleri bakteriyel ve fungal patojenler ile kültür bitkileri arasında yakın bir ilişkinin başlangıcını oluşturmuştur. Bu yakın ilişki bazen hastalık salgınlarının ortaya çıkarak tüm ürünün kullanılmayacak duruma gelmesine ve bunun sonucunda da birçok insanın yaşamını yitirdiği kıtlıkların görülmesine neden olmuştur. Dünya nüfusunun hızla arttığı günümüzde, ürünlerin hastalıklardan korunması daha da önemli bir konu haline gelmiştir. Ürünleri hastalık ve zararlıların verebileceği zararlardan korumak için birçok yöntem kullanılmasına rağmen bakteri ve fungus kökenli hastalıklar halen kültür bitkilerini tehdit edici boyutlardadır. Özellikle yoğun monokültür tarımın yaygın olarak yapıldığı yerlerde hastalıkların verdiği zararlar daha da büyük boyutlara ulaşmaktadır. Bazı durumlarda kültür bitkilerinin ıslahında aynı ya da benzer genetik materyalin kullanılması tüm ürünü hastalığa dayanıksız duruma getirerek, zararın daha da artmasına neden olur. Hastalıklardan dolayı ortaya çıkan ürün kayıplarının dünyadaki toplam ürünün yaklaşık %12'si civarında olduğu sanılmaktadır. Bu kayıp parasal olarak yıllık 42 milyar dolar civarındadır. Hastalıklar sadece ürün miktarını düşürmekte, aynı zamanda ürünün kalitesini de etkilemektedir. Özellikle *Fusarium* ve *Aspergillus* fungusları tarafından salgılanan toksik etkiye sahip enzimler insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etki yapmaktadırlar.

Bakteriyel ve fungal hastalıkların yaptığı zararları önlemek için birçok durumda kimyasallar kullanılsa bile bitki hastalıklarının oluşturacağı zarar tamamen önlenemez. Üstelik kimyasalların kullanımı hem ürün maliyetini artırması hem de çevreye ve öteki canlılara verebileceği olası zararlar yüzünden her geçen gün kısıtlanmaktadır. Dayanıklı bitki elde etmenin bir yolu bitki ıslahıdır. Bitki ıslahı yolu ile dayanıklılığı belirleyen birçok gen yabani bitkilerden kültür bitkilerine aktarılmıştır. Ancak, birçok durumda dayanıklılık genleri öteki bitki türlerinde veya bitki dışındaki diğer canlılarda (böcekler, fungal ve bakteriyel organizmalarda) bulunabileceğinden klasik melezleme yöntemleri ile bu genlerin kültür bitkilerine aktarılması mümkün değildir. Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda gen aktarma yöntemleri birçok bitki türü için kullanılmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerin sağladığı en büyük gelişme istenilen özelliği belirleyen tek bir genin diğer özellikleri değiştirmeden bitkiye aktarımını sağlamasıdır (Tablo 20.1). Buna ek olarak; gen aktarımı yolu ile bitkilerin ıslahı, melezleme ve seleksiyon yöntemleri ile yapılan ıslaha oranla çok daha az zaman alacağı için tercih edilecek bir yöntemdir.

20.2. Bitki-Patojen İlişkisi

Bitki patojenlerinin yaşam şeklinin ve bitki hücrelerini nasıl enfekte ettiğinin bilinmesi, patojenlerle savaşmada hangi yöntemlerin kullanılacağına karar verilmesi açısından önem taşır. Bu nedenle patojen ve bitki arasındaki temel ilişkilerden aşağıda kısaca bahsedilmiştir.

20.2.1. Hastalık yapıcı bakteriler

Bitkilerde hastalık oluşturan bakterilerin birçoğu özellikle hücreler arası boşluklarda bitki hücresinden salgılanan besin maddelerini kullanarak gelişir. Bu bakteriler genellikle enfekte ettikleri bitki hücrelerini salgıladıkları toksinler ve öteki enzimler ile öldürerek dokularda nekrotik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Bakterilerin bitki dokularına girişi genellikle bitki yüzeyindeki yara ve çatlaklar ile stomalardan olur. Bazı patojenik bakteriler değişik dokularda yaşarlar. Örneğin, *Pseudomonas solanacearum* bakterisi bitki iletim dokularını işgal eder.

20.2.2. Hastalık yapıcı funguslar

Bitkilerde hastalık oluşturan fungus kökenli etmenlerin bitki hücrelerini enfekte etme yolları da bir fungusdan ötekine değişim gösterir. Bazı fungal hastalık etmenleri bitki yüzeyindeki yaralanmış bölgelerden bitki içine girerken, bazıları doğrudan epidermis dokusunu delerek bitki içine girer. Hastalık etmeni funguslar bu bakımdan *nekrotrof* ve *biyotrof* olmak üzere iki gruba ayrılır. Nekrotrof grubuna giren patojenler kendi sentezledikleri enzim ve toksinleri kullanarak genelde hücreler arası boşluklara yerleşir. Bu gruba giren patojenler bitki hücre ve

dokularını kısa sürede öldürerek nekrotik bölgelerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Biyotrof olan patojenler (pas, külleme veya solgunluk hastalığı etmenleri gibi) doğrudan bitki epidermis dokusunu delerek veya stomaları kullanarak hücreleri enfekte ederler. Bu tür patojenlerin enfeksiyon sırasında salgıladığı enzimler bitki hücre duvarının yapısını eritici niteliktedir. Hücre içine giren hastalık etmeni, bitkiden karbonhidrat ve öteki besin maddelerini alarak beslenir. Bununla birlikte, biyotrofik patojenler bitki besin maddelerini kendi beslenmelerinde kullandıkları için enfeksiyonun erken dönemlerinde bitki hücrelerini hemen öldürme yolunu da özellikle seçmezler. İlginç olan, bazı patojenler yaşamlarının bir bölümünde biyotrof öteki bir bölümünde ise nekrotrof olarak yaşayabilirler.

Tablo 20.1. Genetik mühendisliği ile fungal ve bakteriyal hastalıklara dayanıklı bitkilerin elde edilmesi.

Protein/Gen	Kökene	Aktarılan Bitki	Hastalık	Kaynaklar
Shiva-1	İpek böceği	Tütün	<i>Rolstonia solanacearum</i>	Jaynes ve ark., 1993
MB39	İpek böceği	Tütün	<i>P.syringae</i> pv. <i>Tabaci</i>	Iluang ve ark., 1997
Attacin E	İpek böceği	Elma	<i>Erwinia amylovora</i>	Norelli ve ark., 1993
Lizozim	İnsan	Tütün	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Nakajima ve ark., 1997
Lizozim	T4 Bakteriofajı	Patates	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	During ve ark., 1993
Tachyplesin	Yengeç	Patates	<i>Erwinia carotovora</i>	Allefs ve ark., 1996
Tablotoxine	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Tütün	<i>P. syringae</i>	Anzai ve ark., 1989
Ornithine carbamyltransferase	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Fasülye	<i>P. syringae</i>	l'uente-Martinez ve ark., 1993
Pectate lyase	<i>Erwinia carotovora</i>	Patates	<i>Erwinia carotovora</i>	Wegenex ve ark., 1996
Glikoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>	Patates	<i>Erwinia carotovora</i>	Wu ve ark., 1995
Thionin	Arpa	Tütün	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Carmona ve ark., 1993
Bacteriopsin	<i>H. halobium</i>	Tütün	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Mittler ve ark., 1995
Xa21	Dayanıklı Çeltik	Dayanaksız Çeltik	<i>X. oryzae</i>	Wang ve ark., 1996
Alfa-hordothionin	Arpa	Tütün	<i>Clavibacter</i> spp.	Florack, 1994
Defensin	Turp	Tütün	<i>Alternaria longipes</i>	Terras ve ark., 1995
Kitinaz		Tütün, Kolza	<i>Rhizoctonia solani</i>	Broglie ve ark., 1991
Viscotoxin	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Holtorf ve ark., 1998
Stilben sentaz	Asma	Tütün	<i>Botrytis cinerea</i>	Hain ve ark., 1993
Peroksidad	<i>Stylosanthes</i>	Tütün, Kolza	<i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i>	Kazan ve ark., 1998 Way ve ark., 2000

20.2.3. Bitki savunma sistemleri

Bitkiler patojen saldırılarından kendilerini korumak için birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Bu savunma mekanizmaları bazı patojenler için caydırıcı bir rol oynamasına karşın öteki bazı patojenler için etkisiz kalabilir. Bunun sonucunda da hastalık ortaya çıkar. Bitkilerin hastalık etmenlerine karşı oluşturdıkları savunma mekanizmalarından aşağıda kısaca bahsedilecektir.

20.2.3.1. Genel (temel) dayanıklılık

Bilindiği gibi birçok bitki türe bazı hastalıklara karşı doğal olarak dayanıklılık gösterir. Genelde, bir bitkide hastalık oluşturabilen bir etmen başka bir bitkide herhangi bir hastalık oluşturmaz. Bu durum; *genel dayanıklılık* (general resistance), *temel dayanıklılık* (basic resistance) veya *konukçu olmayan dayanıklılık* (non-host resistance) olarak adlandırılır. Genel dayanıklılık genetik olarak karmaşık bir mekanizmaya sahiptir. Bu tip dayanıklılık genelde uzun ömürlüdür. Patojen popülasyonlarındaki olası değişimler konukçu olmayan bitkide hastalık oluşumuna neden olmaz. Genel dayanıklılığın mekanizması birçok durumda, bitkinin patojen sporlarının gelişmesini, hücre ve dokuları enfekte etmesini önleyici olmasından kaynaklanır. Bitkideki kütikula, hücre duvarının yapısı, fenolik bileşiklere ya da hastalık etmeni tarafından uyarılabilecek bir savunma sistemine sahip olması, o bitkinin hastalığa dayanıklı olmasına neden olur.

Patojenler bazı durumlarda yeni biyokimyasal silahlar geliştirerek genel dayanıklılık mekanizmasını etkisiz hale getirmeyi başarırlar. Bu durumda hastalık etmeni, bitki hücre ve dokularını sistemli bir biçimde işgal ederek sonuçta bitkinin ölmesine neden olur. Patojen tarafından kullanılan bu silahlar *patojenite faktörleri* ya da *virülens faktörleri* olarak bilinir. Hastalık etmeninin enfekte ettiği bitki böylece konukçu durumuna geçmiş olur. Bu durumda bitkinin savunma mekanizması genelde hastalık etmenini tanıyamadığından gerekli savunma sistemini harekete geçiremez. Hastalığın bitkiyi işgal ettiği anlaşıldığında, bitkinin savunma mekanizması harekete geçirilse bile bir çok durumda artık bitkinin hastalığı yenmesi mümkün olmaz.

20.2.3.2. Özel (spesifik) dayanıklılık

Konukçu bitkiler hastalıkların oluşturacağı zararlara engel olmak için dayanıklılık (resistance, R) genlerini geliştirmişlerdir. Dayanıklılık geninin ürünü olan proteinler hastalık etmeninin bitkiye girmesi sırasında salgıladığı sinyal moleküllerini tanıma yeteneğine sahiptirler. Hastalık etmeninin salgıladığı proteinler genelde *avirülens faktörleri* ya da genel olarak *elisitör moleküller* olarak bilinir. Bu tanıma işlemi, bitkinin savunma sisteminin harekete geçirilmesi bakımından zorunludur. Sonuçta, bitki savunma mekanizmasının uyarılması antimikrobiyal etkiye sahip birçok proteinin bitkide üretilmesine neden olur. Bu proteinlerin yanısıra, bitki hücreleri

enfekte olmuş hücrelerin kendilerini öldürmesi (hypersensitive response, HR) yolu ile enfekte olmuş bölümü izole etmeyi başarır. Sonuçta, bitki hastalığa yakalanmaktan kurtulur veya hastalık etmeninin yapacağı zararı en aza indirebilir. Genel dayanıklılık ile özel dayanıklılık arasındaki en büyük fark, genel dayanıklılığın özel dayanıklılığa oranla çok daha uzun ömürlü olmasıdır. Özel dayanıklılığın etkisi birçok durumda hastalık etmeninin avirülens geninin ürünlerindeki değişme sonucu kaybolur. Böylelikle hastalık etmeninin daha önce dayanıklı olan bitkiyi enfekte edebilecek yeni bir ırkı ortaya çıkması olur.

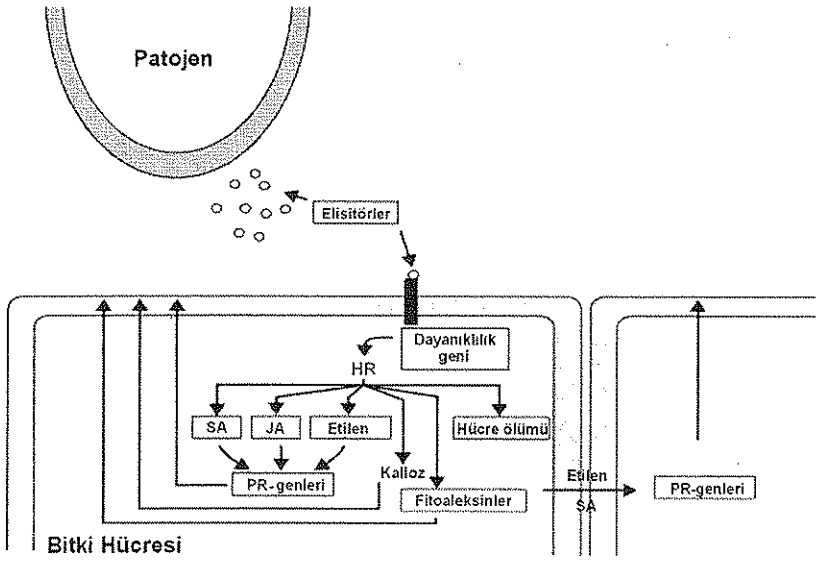
Yukarıda kısaca açıklanan ve Şekil 20.1'de genel hatları ile gösterilen bitki ile patojen arasındaki ilişki patojenlere karşı dayanıklı bitki elde edebilmek için gerekli stratejilerin saptanabilmesi bakımından önemlidir. Kısaca özetlenecek olursa, patojen saldırısının başarılı olabilmesi için aşağıdaki koşulların oluşması gerekir:

- 1) Patojen, enfekte edeceği konukçu bitkiyi tanıma yeteneğinde olmalıdır.
- 2) Patojen, konukçu dokularına girebilmek için gerekli olan silahlara (kütikulyayı delebilecek enzimlere veya toksinlere) sahip olmalıdır.
- 3) Patojen, bitki savunma sisteminin algılanmasından ya da bitki savunması sırasında salgılanan proteinlerin toksik etkilerinden kaçmayı başarabilmelidir. Bu, bazı durumlarda patojen tarafından bitki savunma proteinlerini inaktif hale getirecek proteinlerin üretilmesi ile olur. Bazı durumlarda da patojen, bitki savunma sistemini bastırabilecek özelliklere sahip proteinler kullanarak bunu gerçekleştirir.
- 4) Patojen, bitkinin besin maddelerini kullanarak gelişimini sürdürebilme, başarılı bir şekilde çoğalma ve bitki hücrelerini öldürerek sonuçta hastalık belirtileri oluşturma yeteneğine sahip olmalıdır.

Buna karşılık bitki, kendisini patojen saldırısından koruyabilmek için şu özelliklere sahip olmalıdır:

- 1) Bitki, patojenin kendisini konukçu olarak tanımasına fırsat vermemelidir.
- 2) Bitki, patojenin içeri sızmasını önleyici silahlara sahip olmalıdır.
- 3) Bitki, içeriye girmeyi başarmış patojenlerin gelişimini önleyebilecek donanıma sahip olmalıdır.
- 4) Bitki, patojen tarafından etkilense bile, patojenin daha fazla yayılarak tüm bitkiyi öldürme olasılığını en aza indirebilecek sistemlere sahip olmalıdır.

Bu bilgilerin ışığında patojenlere dayanıklılık sağlamada kullanılacak biyoteknolojik yaklaşımların neler olabileceği konusuna aşağıda genel hatları ile değinilmiştir.



Şekil 20.1. Hastalıkla enfekte olmuş bitki hücrelerinde moleküler düzeyde ortaya çıkan değişimler: Patojen saldırısının bitki hücreesindeki reseptörler tarafından anlaşılması, dayanıklı bitkilerde hipersensitif hücre ölümü ile enfekte olmuş bölgenin izole edilmesi ile sonuçlanır. Enfeksiyon aynı zamanda bitki hücrelerinde salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen gibi bitki hormonlarının sentezlenmesine yol açar. Bu hormonlar, bitki savunma sistemini uyararak aralarında fitoaleksinler, antimikrobiyal peptitler, peroksidazlar ve diğer birçok PR proteinin de bulunduğu patojen ile ilgili birçok genin ifade edilmesine yol açar. Bunun yanında, bitkinin hücre duvarının yapısı olası saldırılara karşı sağlamlaştırılır. Enfekte olmuş hücrede ortaya çıkan sinyaller enfekte olmamış (sistemik) dokuya da iletilerek patojenezis ile ilgili protein genlerinin ve dolayısıyla da dayanıklılığın oluşmasına neden olur. HR: hipersensitif tepki.

20.3. Patojenik Bakterilere ve Funguslara Dayanıklı Bitki Üretimi

Genetik mühendisliği yolu ile patojenlere dayanıklı bitki üretmek için şu genel yöntemler kullanılmaktadır:

- 1) Normalde o bitkide bulunmayan ve patojenlere karşı doğrudan toksik etkiye bulunacak genlerin bitkiye aktarılması.
- 2) Normalde bitkide bulunan ve patojen saldırısı sırasında uyarılan savunma genlerinin bitkiye aktararak daha yüksek düzeyde ifade edilmesi.
- 3) Özellikle fitoaleksin sentezi aşamasında gerekli olan enzimleri kodlayan genlerin bitkiye aktarılması.
- 4) Patojenin salgıladığı ürünleri (toksinler, hücre duvarını yıkıcı enzimler vb.) yokedici proteinleri sentezleyecek yeni genlerin bitkiye aktarılması.

20.3.1. Başka kaynaklardan izole edilen antimikrobiyal genlerin aktarımı

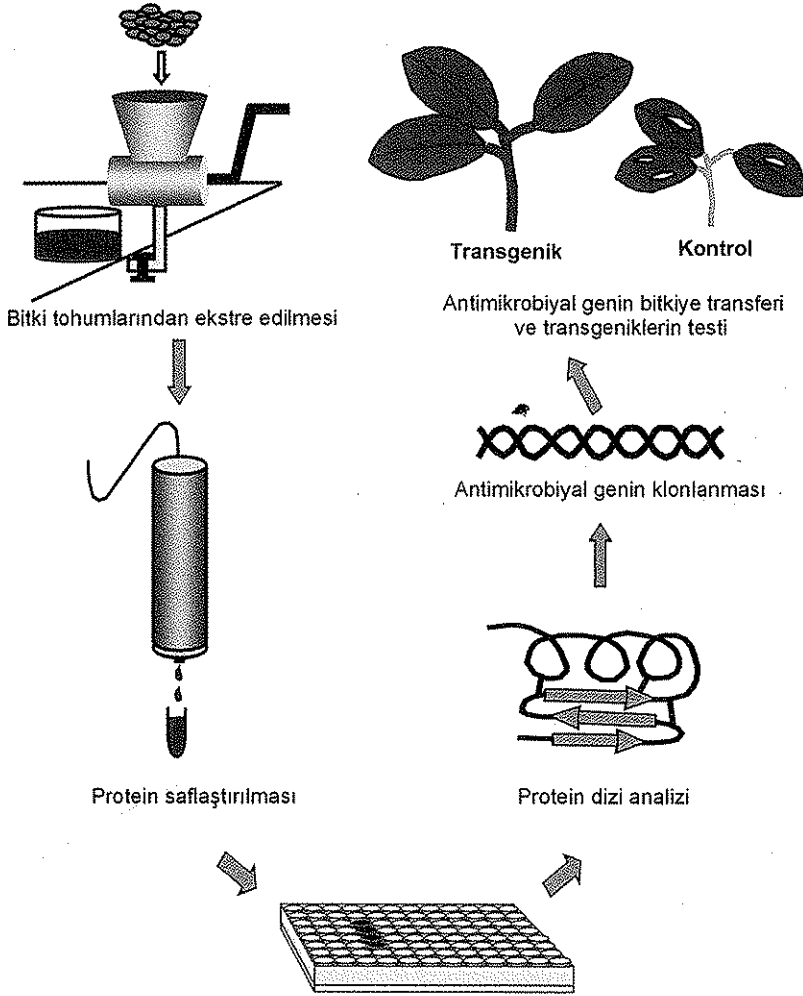
Bu gruba giren genler antimikrobiyal etkiye sahip proteinleri kodlar. Bu proteinleri bulmak için önce *in vitro* testler uygulanır. Şekil 20.2'de de gösterildiği gibi bu testlerde çeşitli kaynaklardan (bitki tohumu, böcek, bakteri veya funguslardan) izole edilerek saflaştırılan proteinler değişik patojen sporları ile inkübe edilirler. Bu inkübasyon sırasında patojenin gelişimini önleyici etki gösteren proteinler seçilerek bu proteinlerin dizisi belirlenir. Bu dizi esas alınarak sentezlenen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerleri kullanılarak, bu proteinleri kodlayan genler proteinin izole edildiği kaynaktan klonlanır. Bu genler daha sonra uygun vektörlere klonlanarak bitkilere aktarılır. Sonuçta, gen aktarılan (transgenik) bitki bu antibakteriyel ya da antifungal etkiye sahip bu proteini kendi hücrelerinde üretmeye başlar. Böyle bir transgenik bitki, yaşamının herhangi bir döneminde bu proteine karşı hassas olan bir patojen tarafından saldırıya uğradığında bitkinin bu saldırıdan etkilenme olasılığı minimuma indirilir. Bu gruba giren genlerin transgenik bitkilerde kullanımına ilişkin bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

20.3.1.1 Antimikrobiyal peptitler

Bitkide hastalık yapıcı mikropalara karşı etkin olabilecek proteinler hem bitkilerde hem de öteki canlı gruplarında mevcuttur. Bu proteinler genelde fungal patojenlere, virüslere, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkinlik gösterirler. Bu proteinler genelde antimikrobiyal, antifungal ya da antibakteriyel protein olarak bilinirler. Antimikrobiyal özelliğe sahip birçok proteinin molekül ağırlıkları küçük olduğundan *antimikrobiyal peptitler* olarak da adlandırılabilirler (Broekart ve ark., 1997). Değişik organizmalardan bu tip peptitleri kodlayan genler klonlanıp bitkilere aktarıldığında, gen aktarılan bitkinin hastalıklara dayanıklı hale geldiği görülmüştür. Aşağıda bu peptitlerin transgenik bitkilerde kullanımına ilişkin birkaç örnek verilmiştir.

Antibakteriyel peptitler genelde bakteri membranında delikler açarak bakterileri etkisiz hale getirirler. Cecropin grubu peptitler bu grup için örnek olarak verilebilir (Destefano ve ark., 1993; Cavallarin ve ark., 1998). Cecropin peptidini kodlayan gen ilk olarak ipek böceğinden izole edilmiştir. Bu gruba giren peptitlerden ikisini kodlayan genler (*Shiva-1* ve sentetik analogu olan *SB-37*) patates ve tütüne aktarılarak bu bitkilerin yanıklık hastalığı etmeni olan *Rolstonia solanacearum*'a dayanıklı hale gelip gelmedikleri test edilmiştir. Bunlardan *Shiva-1* genini ifade eden bitkiler kontrol bitkilerine oranla hastalık belirtilerini gecikmeli olarak gösterdiklerinden hastalığın öldürücü etkisinden kaçabildikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte, cecropin geni aktarılan bitkilerde cecropin peptidinin bitkilerdeki proteazlar (protein yıkıcı enzimler) tarafından etkisiz hale getirilmesinden dolayı aynı hastalığa karşı önemli bir dayanıklılık elde edilememiştir. Cecropini proteazlara karşı dayanıklı hale getirebilmek için *MB39* olarak adlandırılan sentetik bir cecropin analogu yapılmıştır (Huang ve ark., 1997). Bu sentetik gen bitkinin aynı

aminoasitleri yapmak için kullandığı kodonlar esas alınarak hazırlanmıştır. MB39 geni tütün bitkisine aktarıldığında transgenik bitkilerin *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* bakterisinin yaptığı hastalığa karşı dayanıklılığı artmıştır.



Şekil 20.2. Bitki antimikrobiyal peptitlerinin izole edilmesi.

Bakterilere karşı dayanıklılık sağlamada kullanılan öteki bazı peptitler de bilinmektedir. Örneğin, lactoferrin adlı glikoproteini kodlayan gen tütüne aktarıldığında, *Rolstania solanacearum* bakterisinin normal bitkilerde oluşturduğu

hastalık belirtilerinin ortaya çıkması, gen aktarılmamış bitkilere oranla 25 gün kadar geciktirilmiştir (Mitra ve Zhang, 1994). Benzer şekilde tacyplesin adlı peptiti kodlayan gen, bir yengeç türünden izole edilerek patates bitkilerine aktarıldığında patates yumrusunda çürüklük hastalığı etmeni olan *Erwinia caratovora* bakterisine karşı dayanıklılığı artırmıştır (Allefs ve ark., 1996).

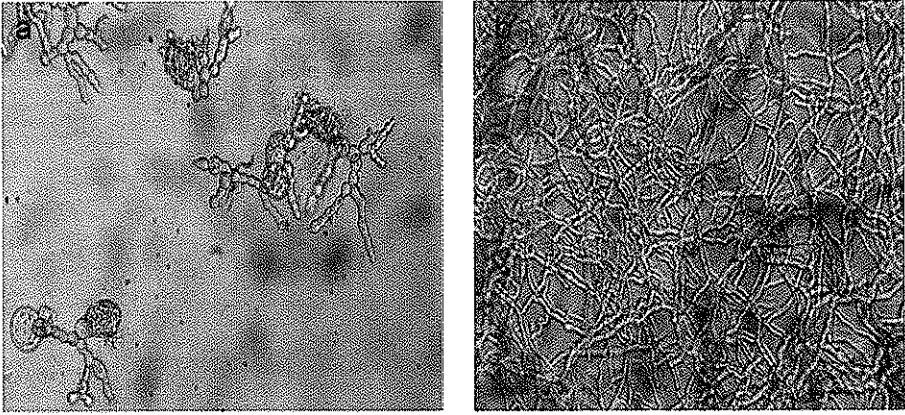
Benzer şekilde, bitkiler tarafından sentezlenen peptitler fungal patojenleri de etkileme gücüne sahiptir. Örneğin, *Macadamia integrifolia* tohumlarından izole edilen bir antimikrobiyal peptit, fungal patojenlerden *Leptosphaeria maculans* ile inkübe edildiğinde bu patojenin gelişimini durdurmaktadır (Şekil 20.3a). Peptit olmayan ortamda inkübe edilen fungus ise gelişimini normal bir şekilde sürdürmektedir (Şekil 20.3b). Bitki antimikrobiyal peptitleri içerisinde en yaygın olanları defensin grubu peptitler, lipit transfer proteinleri ve kükürt bakımından zengin albümiş grubu proteinlerdir. Bunlardan defensin grubu peptitler, bitkiler dışındaki diğer canlılardan izole edilen ve savunma fonksiyonuna sahip defensinler ile büyük benzerlik gösterir. Turp yumrularından izole edilen defensin grubu peptitleri kodlayan gen (*Rf-AFP2*) tütün bitkilerine aktarıldığında bu bitkiler *Alternaria longipes*'e karşı dayanıklı hale gelmiştir (Terras ve ark., 1995). Defensin grubuna benzer proteinler öteki bitkilerde de mevcuttur. Örneğin, defensin grubu peptitler (*AX1* ve *AX2*) şeker pancarından saflaştırılmıştır. Şeker pancarında bu peptitleri kodlayan genler mısır bitkisine aktarıldığında gen aktarılmış bitkiler *Exserohilum turcicum* patojeni tarafından oluşturulan yaprak yanıklığına karşı dayanıklı hale gelmiştir.

Günümüzde antimikrobiyal peptitler alanındaki gelişmeler bir yandan daha etkili peptitlerin bulunması ve bir yandan da bulunmuş olan peptitlerin aktivitelerinin artırılması alanında yoğunlaşmıştır. Bazı durumlarda iki değişik peptiti kodlayan genler bir bitkide ifade edildiğinde ortaya çıkacak etki her ikisinin ayrı ayrı ifade edilmelerinden daha fazla olabilmektedir (sinergistik etki). Başka bir ilgi alanı da, bu tür peptitlerin bitkilerde daha kararlı bir biçimde üretilmesine yönelik çalışmalardır. Bunlar arasında; peptitlerde mutasyonlar yaparak kararlılıklarının artırılması, veya lider diziler kullanılarak peptitlerin daha yüksek düzeyde ifade edilebilecekleri bir hücre bölümüne gönderilmeleri sayılabilir. Aşağıdaki bölümlerde bu konu hakkında daha geniş açıklamalar yapılmıştır.

20.3.1.2. Thionin grubu proteinler

Patojenlere dayanıklılık sağlayabilecek başka bir peptit grubu da thionin grubu proteinlerdir. Tahıl danelerinden izole edilen bu grup proteinlerin antifungal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Arpa danesinde thionin kodlayan genin tütün bitkilerine aktarılması sonucunda bu bitkilerin *Pseudomonas syringae* bakterisine karşı dayanıklı hale geldiği gözlenmiştir (Carmona ve ark., 1993). Thionin grubu peptidler ilk olarak tahıl danelerinden izole edilmişse de, bu grup peptidlere benzer proteinler öteki bitki gruplarında da (örneğin, dikotiledonlarda) mevcut olduğu bilinmektedir.

Örneğin, *Arabidopsis*'ten izole edilen thionin geninin 35S promotörü önüne kullanılarak yeniden *Arabidopsis* bitkisine transfer edildiğinde; bu geni ifade eden bitkilerin *Fusarium oxysporum* hastalığına karşı gösterdiği dayanıklılığı artırdığı gözlenmiştir (Epple ve ark., 1997)



Şekil 20.3. *Macadamia integrifolia* adlı ağacın tohumlarından izole edilen bir antimikrobiyal peptit, kolzada önemli bir hastalığa neden olan *Leptosphaeria maculans* fungusunun gelişimini önlemektedir. Solda (a) bu fungusun antimikrobiyal peptiti içeren bir ortamda yetiştirildiğindeki gelişimi gösterilmektedir. Görüldüğü gibi fungusun hifleri anormal olarak kısa kalmıştır. Sağda (b) aynı fungusun peptit içermeyen ortamdaki normal gelişmesi gösterilmiştir. Bu peptidi kodlayan genin izole edilerek dayanıksız kolza bitkilerine aktarılması ile bu hastalığa karşı dayanıklılığın artırılması amaçlanmaktadır.

20.3.2. Bitki savunma genlerinin bitkilerde ifadesi

Bitkiler patojenlerin saldırısından kendilerini koruyabilmek için birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Daha önce de açıklandığı gibi bitkide normalde var olan birçok savunma proteini patojenlerin vereceği zararı minimuma indirme potansiyeline sahiptir. Kitinaz (chitinase), glikonaz (glucanase), peroksidaz ve diğer patojenez ile ilgili (pathogenesis-related, PR) proteinler, bitkinin patojen tarafından saldırıya uğramasının hemen ardından yüksek düzeyde ifade edilirler. Bu genlerin ürünleri olan proteinler genelde *in vitro* koşullarda test edildiğinde patojen gelişimini engelleyici bir etkiye sahip oldukları gözlenir.

Bu proteinleri kodlayan genler normalde patojen saldırısı sırasında patojen sinyallerinin algılanması sonucunda uyarılarak, bitki hücrelerinde yüksek düzeyde protein üretimi gerçekleşir. Bunda amaç, bitkinin patojen saldırısından korunmasıdır. Ancak, bazı durumlarda patojenler bitkinin sinyal algılama mekanizması tarafından yakalanmadan bitki içine girmeyi başarırlar. Bu durumda bitki patojenlere toksik etki yapabilecek genleri uyarma gereğini duymaz. Böyle

durumlarda bitki savunma genlerinin transgenik bitkilere aktararak sürekli bir biçimde ifade edilmesi (constitutive expression), bitkiyi olası patojen saldırılarına karşı hazırlar. Aşağıda bu gruba giren genlerin bitkilerde ifade edilmelerine ilişkin bazı örnekler verilmiştir.

20.3.2.1. Patojenin hücre duvarını etkileyen genlerin kullanımı

Bitkilerde doğrudan patojenin hücre duvarını etkileyen proteinlerin olduğu bilinmektedir. Bu gruba giren proteinleri kodlayan genlerin bitkide ifade edilmesindeki amaç patojenin hayati bir unsuru olan hücre duvarını etkilemek ve böylelikle patojenin bitkiye vereceği zararını azaltmaktır. Bu proteinlerden, örneğin kitinaz ve glikonazlar, fungal hücre duvarında bulunan kitin ve glikon eritici enzimlerdir. Benzer şekilde thionin ve permatin grubu proteinler (zeamatin, thaumatin, osmotin vb.) bakteriyel membranlar üzerine etkide bulunarak (büyük olasılıkla membranlarda delikler açarak) hücre içi sıvısının dışarı akmasına neden olurlar. Lizozim grubuna giren proteinler, bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikonu eriterek etkide bulunurlar. Lektinler ya da öteki karbonhidratlara bağlanabilen proteinler özellikle fungal hastalık etmeninin hücre duvarının yapısını bozarak normal işlevini önler.

Kitinaz enzimini kodlayan genler bitkiye aktarıldığında hastalık belirtilerinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu geni taşıyan fasülye, çeltik ve tütün bitkileri topraktan bulaşan bir hastalık olan *Rhizoctonia solani*'ye karşı önemli bir dayanıklılık göstermiştir (Broglie ve ark., 1991). Kitinaz ve glikonaz genleri birlikte aynı bitkide ifade edildiğinde elde edilen dayanıklılığın daha da arttığı (sinergistik etki) gözlenmiştir (Zhu ve ark., 1994; Mauch ve ark., 1998). Bu iki enzim birlikte domates bitkisinde ifade edildiğinde, *Fusarium* tarafından oluşturulan yanıklık hastalığı önemli ölçüde azaltılmıştır. Bu iki enzimi birlikte ifade eden bitkilere, ribozomları inaktive eden proteinleri (ribosome-inactivating proteins, RIP) kodlayan üçüncü bir gen aktarıldığında bitkilerde gözlenen dayanıklılık çok daha artmıştır (Jach ve ark., 1995). RIP'ler genelde yüksek yapılı canlılarda protein sentezini önlemede fonksiyon gösterirler (Stirpe ve ark., 1992). Bitkiler, kendi ribozomlarını inaktive edecek proteinlere karşı koruyucu sistemlere sahiptir. Bu nedenle bitkide ifade edilen RIP, sadece hastalık etmeninin protein sentez mekanizmasını etkiler. Bu da etmenin yapacağı zararı azaltıcı yönde bir etkide bulunur.

20.3.1.2. Lizozimler

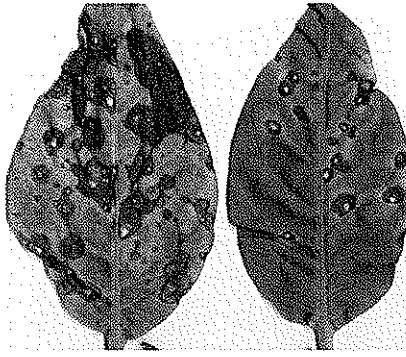
Lizozim grubu proteinler bakterilerin hücre duvarının yapısında bulunan peptidoglikonu eriterek etkilerini gösterirler (Mourgues ve ark., 1998). Lizozim enzimini kodlayan genler değişik kaynaklardan klonlanarak bitkilere aktarılmıştır. T4 bakteriyofajından klonlanan lizozim geni patates bitkilerine aktarıldığında bu bitkiler *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*'ye karşı dayanıklı hale gelmiştir.

20.3.2.2. Patojenez ile ilgili (PR) protein genlerinin bitkide ifadesi

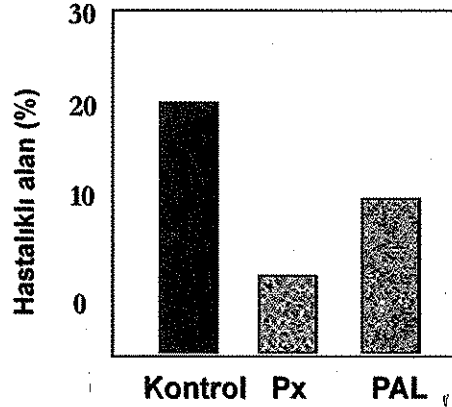
Patojenez ile ilgili (PR) proteinler, bitkilerde patojen enfeksiyonu sonrası ya da buna benzer bir stres durumundan sonra sentezlenmeye başlanan proteinlerdir. PR proteinleri 30 yıl kadar önce ilk olarak tütün mozaik virüsü tarafından enfekte edilmiş olan tütün bitkilerinde bulunmuştur (Van Loon ve Van Kammen, 1970). Benzer özelliklere sahip birçok proteinlerin öteki bitkilerde de üretildiği daha sonra ortaya çıkmıştır. PR proteinlerinin bazıları asidik bazıları da bazik pH'ya sahiptir. Asidik PR proteinleri genelde hücreler arası boşluğa salgılanır. Bazik PR proteinleri ise genelde vakuolde depolanır. Asidik PR proteinlerinden en iyi bilineni PR-1 adlı proteindir. Bu protein, enfekte olmuş tütün bitkilerinde toplam hücre proteininin %2'sine ulaşacak kadar yüksek miktarda üretilir. PR-1 proteinini kodlayan gen, 35S promotorunun kontrolü altında tütüne aktarıldığında *Peronospora tabacina* ve *Phytophthora parasitica* fungal patojenlerine karşı dayanıklılık elde edilmiştir (Alexandar ve ark., 1993).

Bazik PR proteinlerinin en iyi bilinen örneğini thaumatococcus benzer proteinler grubu oluşturur. Bu proteinler genelde hem patojen enfeksiyonundan sonra hem de ozmotik strese maruz kalmış bitkilerde üretilir. Osmotin adlı protein bu gruba girer ve bitkiden saflaştırılmış osmotin proteini *in vitro* testlerde patojen sporlarının gelişimi üzerine toksik etkide bulunmaktadır. Liu ve ark. (1994) bu proteini transgenik patates bitkilerinde ifade ettirdiklerinde *Phytophthora infestans* hastalığına karşı dayanıklılığı artırdığını gözlemişlerdir.

Bitkilerde patojen enfeksiyonu sonucu sentezlenen bazı enzimlerin de bitki savunma sisteminin bir parçası olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerden birisi fenilalanin amonyum liyaz (PAL)'dır. Bu enzim fenilpropanoid yolunun başında yer alır. Fenilpropanoid yolu; aralarında lignin, salisilik asit ve fitoaleksinlerin de bulunduğu bir dizi molekülün sentezinden sorumludur. Bu yolda yer alan son enzim peroksidaz olup, bu enzim de lignin yapımı ve aktif oksijen üretiminden sorumludur. *Sytlosanthes* bitkisinden izole edilen bir peroksidaz geninin 35S promotorunun kontrolünde tütün ve kolza bitkilerine aktarıldığında, bu bitkilerin sırasıyla *Phytophthora parasitica* ve *Leptosphaeria maculans* hastalıklarına karşı dayanıklılıklarının arttığı bulunmuştur (Şekil 20.4) (Kazan ve ark., 1998; Way ve ark., 2000). Peroksidaz genini ifade eden kolza bitkileri, hastalıklara dayanıklılığın tarla koşullarındaki düzeyini saptamak için tarla denemelerine alınmıştır. Şekil 20.5'de görüldüğü gibi, yapay inokülasyon koşulları altında *Leptosphaeria. maculans* ile enfekte olan kontrol bitkileri (gen aktarılmamış bitkiler) tamamen ölüirken, gen aktarılmış bitkiler çok az bir hastalık ile yaşamlarına devam etmiş ve verim düzeylerinde önemli bir azalma olmamıştır. Benzer biçimde, yüksek düzeyde PAL enzimi üreten tütün bitkilerinin *Cervospora nicotianae* hastalığına karşı dayanıklılığı önemli ölçüde artmıştır (Way ve ark., 2000).



Kontrol Transgenik (Px)



Şekil 20.4. Peroksidaz (Px) veya fenilalanin amonyum liyaz (PAL) geninin tütün bitkilerinde ifade edilmesi bu bitkilerin *Cercospora nicotianae* patojenine karşı dayanıklılıklarını artırmıştır. Soldaki resim bu hastalık sporlarıyla enfekte edilmiş kontrol ve Px geni aktarılmış transgenik bitkilerin yapraklarını göstermektedir. Sağdaki grafikte ise, Px ve PAL geni akarılmış bitkilerde hastalığın düzeyinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir.

20.3.2.3. Poligalaktrunazı inhibe eden proteinler (PGIP)

Nekrotik patojenler bitki dokusunu enfekte ederken bitki hücre duvarının polimer yapısını eritmek için bir dizi enzim salgırlar. Patojen tarafından salgılanan bu enzimlerin en önemlileri pektat-liyaz (pectate-lyase) ve poligalaktrunaz olarak bilinen enzimlerdir. Bu enzimlerin aktivitelerini önleyen proteinler (polygalactorunase-inhibiting proteins, PGIP) doğal olarak bitkilerde (çoğunlukla hücre duvarının yapısında) vardır. Bu yapıdaki ilk protein Albersheim ve Anderson (1971) tarafından izole edilmiştir.

20.3.3. Fitoaleksinin kodlayan genlerin bitkilerde ifade edilmesi

Bitkilerin savunma mekanizmalarının bir unsurunu da fitoaleksinin adı verilen bileşikler oluşturur. Fitoaleksinleri kodlayan genler de bitkinin patojen saldırısına uğraması sonucu uyarılır. Bu bileşikler kodlayan genlerin bitkilerden izole edilip kuvvetli promotörlerin kontrolü altında bitkilerde ifade edilmesi bazı hastalıklara karşı dayanıklılık oluşturmada kullanılmaktadır (Van Etten ve ark., 1989). Örneğin, asma yapraklarında stilbene-sentez adlı enzimi kodlayan gen resveratrol fitoaleksininin yapılmasından sorumludur. Klonlanan stilbene-sentez geni öteki bitkilere aktarıldığında, *Botrytis cinerea* adlı fungal patojenin oluşturduğu hastalığa karşı dayanıklılık sağladığı bulunmuştur (Hain ve ark., 1993). Bununla birlikte fitoaleksinin sentezi bitkilerde karmaşık birçok reaksiyon sonucu sentezlenir. Bu nedenle, bu reaksiyonlardan sadece birini katalizleyen genin manipülasyonu sistemin tümünde istenilen değişikliğin gerçekleşmesi için yeterli olmayabilir. Bu

gibi durumlarda birden fazla genin bitkiye aktarılması yeterli düzeyde fitoaleksinin üretimini için gerekli olabilir.



Şekil 20.5. Peroksidaz (Px) geni aktarılmış kolza bitkileri tarla koşullarında hastalıklara dayanıklılık bakımından denenmiştir. *Leptosphaeria maculans* hastalığı sporları ile enfekte olmuş transgenik bitkiler normale yakın bir verim düzeyine ulaşırken gen aktarılmamış kontrol bitkileri tamamen ölmüştür (boş sıralar).

20.3.4. Bitkilerde aktif oksijen türevlerinin üretimi

Bitkilerde hastalık etmenin oluşturduğu sinyalin algılanması bitkinin savunma mekanizmasını aktif hale getirir. Bitki savunmasının ilk aşamasında 'aktif oksijen' olarak adlandırılan ürünler bitki hücresi tarafından üretilmeye başlanır. Aktif oksijen ürünleri arasında hidrojen peroksit ve süper oksit anyonları sayılabilir. Aktif oksijen türevleri bitkide en az dört değişik role sahiptir:

- 1) Aktif oksijen ilk olarak hipersensitif hücre ölümüne neden olur. Hipersensitivite, bitkinin sadece patojenin enfekte ettiği bölgedeki hücrelerini öldürmesi olayıdır. Hücre ölümü, patojenin sadece enfeksiyonun olduğu bölgede lokalize olmasına neden olur ve bu şekilde hastalığın yayılması önlenir.
- 2) Aktif oksijen türevlerinin ikinci bir fonksiyonu hastalık etmenine karşı doğrudan öldürücü etkide bulunmasıdır. Bilindiği gibi hidrojen peroksit (oksijenli su) yaraların enfekte olmasını önlemek ve çevreyi mikropardan arındırmak için yaygın biçimde kullanılır.
- 3) Aktif oksijenin bir başka fonksiyonu da lignifikasyonda rol oynamasıdır. Lignin oluşumu bitkilerde enfeksiyondan sonra hücre duvarının sağlamlaştırılması bakımından önemlidir. Bitkide lignin yapılması da hidrojen peroksit kullanımını

gerektirir. Gereksinim duyulan hidrojen peroksit bitki hücresinde enfeksiyona tepki olarak üretilen hidrojen peroksittir.

- 4) Aktif oksijenin öteki bir fonksiyonu da bitkide sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (Chen ve ark., 1994; Neuenschwander ve ark., 1995). Hastalık etmeninin enfeksiyonu sonucunda bitki hücresinde üretilen hidrojen peroksit veya öteki aktif oksijen bileşikleri bitkinin dayanıklılık sistemini uyarıcı etkide bulunur. Aktif oksijen sadece enfekte olmuş bölgeledeki genleri uyarmakla kalmaz, aynı zamanda sistemik doku olarak bilinen ve bitkinin hastalık tarafından henüz etkilenmediği bölgelerine giderek oradaki genlerin de aktif hale gelmesini sağlar. Bu olay sistemik olarak kazanılmış dayanıklılık (systemic acquired resistance, SAR) olarak bilinir. SAR sistemi uyarılmış bitkide, bundan sonraki enfeksiyonlara karşı dayanıklılık son derece artar. Bu olay bir yerde bitkinin aşılınması ile eşdeğerdir.

Bitkilerde hastalıklara dayanıklılığın sağlanması amacıyla hidrojen peroksitin bitki hücresinde yüksek düzeylerde üretilmesi amaçlanmıştır. *Aspergillus niger* adlı fungusdan klonlanan glikoz oksidaz (GO) enzimini kodlayan gen bu amaçla patates ve kolza bitkilerine aktarılmıştır (Wu ve ark., 1995; Kazan ve ark., 1998). GO enzimi, glikozu okside ederek hidrojen peroksit oluşmasına neden olmaktadır. Hidrojen peroksitin bu şekilde bitki hücresinde üretimi patates bitkisinde *Erwinia carotovora* fungusuna karşı dayanıklılığı önemli ölçüde artırmıştır.

20.3.5. Patojene ait virülens faktörlerinin etkisiz hale getirilmesi

Bakterilerin salgıladığı virülens faktörlerinin etkisiz hale getirilmesi yoluyla da bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılık artırılabilir. Çeşitli toksinlerin, pektik enzimlerin, ekzopolisakkaritlerin ve hormonların virülens (hastalık yapıcı) faktörleri olarak görev yaptığının bilinmesine karşın, bu faktörlerin etkisiz hale getirilerek hastalıkların önlenmesi konusunda şimdiye değin yapılan çalışmalar nisbeten azdır. *Pseudomonas syringae* bakterisi tarafından salgılanan toksin bitkilerde klorotik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu toksin aynı zamanda antibakteriyel bir aktiviteye sahip olduğundan, başka türlere ait bazı bakteriler bu toksinden korunmak için toksini inaktif hale getirci proteinler geliştirmişlerdir. Bu proteinleri kodlayan genlerin bakterilerden izole edilerek bitkilerde ifade edilmesi durumunda ise bitkinin toksini etkisiz hale getirmesi beklenir. Gerçektende böyle bir toksini (tablotoksin) üreten bitki, *Pseudomonas syringae* bakterisine karşı dayanıklı hale gelmiştir (Anzai ve ark., 1989). Buna benzer bir başka yol ise bakteri toksinlerinin bitkide etkilediği hedeflerin değiştirilmesi yolu ile bakterinin vereceği zararın önlenmesidir. Örneğin, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* bakterisi, arginin aminoasidinin biyosentezi sırasında ornitin karbomil transferaz (ornithine carbomyl transferase) adlı bir enzimi kullanır. Bu bakterinin konukçusu olan bitkinin enzimi bu toksinden zarar görürken, bakterideki aynı enzim bu toksine karşı doğal olarak dayanıklılık gösterir (Fuente-Martinez ve ark., 1992). Ornitin karboksilaz transferaz

geni (*argK*) bakteriden klonlanıp fasülye bitkisine aktarıldığında ise fasülye bitkisi *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*'ya karşı tam dayanıklı bir hale gelmiştir (Fuente-Martinez ve ark., 1993).

20.3.6. Monoklonal antikor genlerinin bitkilerde ifade edilmesi

Bakteriler tarafında oluşturulan hastalıkların önlenmesi için başvuru bir başka yol da, monoklonal antikor (monoclonal antibody) genlerinin bitkilerde üretilmesidir. Bu stratejinin başarılı olabilmesi için önce bakterinin salgıladığı virülens faktörü proteinlere bağlanarak onları etkisiz hale getirebilecek antikor moleküllerinin bulunması gerekir. Örneğin, *Erwinia chrysanthemi* bakterisi tarafından salgılanan pektik enzimlere bağlanarak onları inaktif hale getirebilecek antikor moleküllerinin bitkilerde sentezletilmesi, bu bakteri tarafından oluşturulan çürüklük hastalıklarının başarılı bir şekilde önlenmesine yol açabilir (Wegener ve ark., 1996).

20.4. Dayanıklılık (R) Genlerinin Bitkilerden Klonlanması

Bitki ıslahçıları, dayanıklılık (R) genlerini kültür bitkilerine aktararak yeni çeşitlerin ıslahında kullanmışlardır. Ancak, dayanıklılık genlerinin yapıları ve nasıl olup da dayanıklılık sağladıkları son yıllara kadar bir sır olarak kalmıştır. 1940'lardan beri 'gene karşı gen kuramı' (gene for gene theory) olarak bilinen kavram, dayanıklılık genlerinin fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli bir role sahip olmuştur. Bu kurama göre, patojenin avirülens geninin ürünü ile bitkinin dayanıklılık geninin ürünü arasındaki ilişki hastalığın ortaya çıkıp çıkmayacağını belirler (De Wit, 1992). Daha öncede belirtildiği gibi eğer bitkideki dayanıklılık geninin ürünü patojenin avirülens geninin ürününe algılayabilirse, bitkinin genel savunma mekanizması harekete geçirileceğinden enfeksiyon başarısız olacaktır. Bu kuramdan yola çıkılarak, günümüzde çok sayıda dayanıklılık geni değişik yöntemlerle klonlanmıştır.

Bitkide hastalıklara karşı dayanıklılık oluşturan genler, R (resistance) genleri olarak bilinirler. Bu genlerin daha önce açıklanan genlerden farkı her bir genin belli bir hastalığa karşı dayanıklılık sağlamasıdır. Belli bir hastalığa karşı R genini taşıyan bitkide enfeksiyon sonucu genelde herhangi bir belirti görülmez. Dayanıklılık genleri kodladıkları proteinlere göre 5 grup altında toplanırlar:

- Patojen tarafından salgılanan toksinleri yıkıcı enzimleri kodlayan genler:* Örnek: *Hm1* geni. Bu gen, mısırdaki *Cochliobolus carbonum* patojenine karşı dayanıklılık sağlar. *Hm1* geninin ürünü olan protein bu patojen tarafından salgılanan Hc toksinini inaktif hale getirerek dayanıklılık sağlar (Johal ve Briggs, 1992).
- Protein kinaz fonksiyonuna sahip genler:* Örnek: *Pto* geni. Bu gen, domateste *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bakterisine karşı dayanıklılık sağlar. *Pto* geninin ürünü olan protein kinaz, patojen sinyallerinin iletiminde görev yapan öteki

proteinlere fosfor grubu ekleyen reaksiyonları (fosforilasyonu) katalizler (Martin ve ark., 1993).

- c) *Lösin aminoasidi bakımından zengin ve nükleotitlerin bağlanması için gerekli bölgeleri taşıyan genler*: Örnek: *Arabidopsis*'den izole edilen *RPS2* ve *RPM1* genleri, rütünden izole edilen *N* geni, domatesten izole edilen *Pto* ve *Cf2* genleri ve ketenden izole edilen *L6* geni (Whitham ve ark., 1994; Mindrinos ve ark., 1994; Bent ve ark., 1994; Grant ve ark., 1995; Dixon ve ark., 1996; Salmeron ve ark., 1996; Staskawicz ve ark., 1995). *RPS2* ve *RPM1* genleri x'e, *N* geni bütün mosaic virüsüne, *Pto* geni *Pseudomonas syringae*'ye, *L6* geni *Melanospora lini* (keten pası)'ye ve *Cf2* geni *Cladosporium fulvum* (domates yanıklık hastalığı)'a karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Jones ve ark., 1994).
- d) *Reseptör yapısına sahip (patojenin avirülens geninin ürününe direk olarak bağlanabilen) genler*: Örnek: *Cf* genleri. Domatesten izole edilen *Cf* genlerinin (*Cladosporium fulvum*'a karşı dayanıklılık sağlayan) ürünü olan proteinler hücre membranında entegre olmuş reseptör proteinleri kodlarlar (Dixon ve ark., 1996). Bu proteinler büyük olasılıkla patojen ürünü olan proteinler ile etkileşime girerek sinyal iletim zincirinin ilk halkasını oluştururlar.
- e) *Hem reseptör hem de kinaz fonksiyonuna sahip genler*: Örnek: *Xa21* geni. Çeltikten izole edilen bu gen, hem dördüncü gruptaki genler gibi reseptör aktivitesi hem de ikinci gruptaki genler gibi kinaz aktivitesine sahiptir (Song ve ark., 1995). Bu genin sitoplazma dışındaki reseptör bölgesi (receptor domain - proteinin amino ucu) patojen sinyallerini algılayarak sitoplazma içindeki kinaz bölgesine (kinase domain - proteinin karboksil ucuna) iletir. Bu da, daha önceki örnekte olduğu gibi sinyal iletim zincirinin öteki halkalarında bulunan genlerin ürünleri olan proteinleri aktif hale getirerek sinyalin hücre çekirdeğine erişerek antimikrobiyal etkiye sahip birçok genin uyarılmasını sağlar.

20.5. Dayanıklılık Genlerinin (R) Bitkilerde İfadesi

Çeşitli hastalıklara dayanıklılığı belirleyen genlerin bitkilerden klonlanması (izole edilmesi), bu genlerin dayanıksız bitkilere aktarılarak onları dayanıklı hale getirme olasılığını gündeme getirmiştir. Çeltikte yaprak yanıklığı hastalığı etmeni olan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*'ye karşı dayanıklılığı belirleyen R geni (*Xa21*) dayanıklı bir çeşitten klonlanmıştır. Bu genin dayanıksız çeşitlere aktarılması, bu çeşitleri daha dayanıklı hale getirmiştir. Son yıllardaki araştırmalar, klonlanmış dayanıklılık genlerinin dayanıksız bireylere aktarılarak tarımda kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk aşamada *Xa21* genini taşıyan transgenik çeltik bitkileri ile ekili alan Asya'da 3 milyon hektara ulaşmıştır. Bitki dayanıklılık genlerinin ne şekilde dayanıklılık sağladıklarından daha önce bahsedilmişti. Klonlanan dayanıklılık genlerinin öteki bitkilerde benzer veya farklı hastalıklara karşı dayanıklılık oluşturma olasılığı vardır. Bunun nedenlerinden birisi farklı bitkilerden klonlanan R

genlerinin kodladıkları proteinlerin yapısal olarak büyük benzerlik göstermesidir. Bakterinin avirülens genlerinin oluşturacağı sinyalleri almaya yönelik bölgeler (ki bu bölgeler lösin aminoasidi bakımından zengin olan bölgelerdir) genelde tüm R genlerinde benzerdir. Benzer biçimde, alınan sinyalin iletiminde rol oynayan nükleotid bağlanma bölgeleri de bu genlerde benzerlik gösterirler. Bu nedenle, sentetik hibrit R genlerinin bitkilerde değişik hastalıklara karşı kullanımı gündeme gelmiştir.

Şimdiye kadar bakterilere karşı dayanıklılığı sağlayabilecek biyoteknolojik uygulamalardan kısaca bahsedildi. Görüleceği gibi, gen aktarımı sonucunda elde edilen dayanıklılık birçok durumda *bağışıklıktan ziyade hastalık belirtilerinin azaltılması* şeklinde ortaya çıkar. Dezavantaj gibi görünen bu durum aslında özellikle tarla koşullarında bitkinin yararına bir duruma dönüşebilir. Bitkinin hiçbir hastalık belirtisi göstermemesi şeklinde ortaya çıkan bağışıklık, patojen popülasyonlarında hızlı bir değişime yol açabilir. Bu değişim genelde patojenin virülens faktörlerini kodlayan genlerinde mutasyonlar yaratarak bitki hücresinin tanımadığı yeni proteinlerin oluşumuna neden olur. Bu yeni ürünler, artık bitki tarafından patojen ürünü olarak tanınamayacağından daha önce dayanıklı olan bir bitki dayanıksız duruma düşer. Bu nedenle, hastalıklara karşı dayanıklı bitki elde etmek sürekli bir uğraşı gerektirir.

Bitki biyoteknolojisindeki gelişmeler bitkilerde hastalığa dayanıklılığı artırma yolunda önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Bununla birlikte, özellikle böcek ve bakteri gibi bitki olmayan kaynaklardan bitkilere aktarılan genlerin insan ve hayvanlara toksik bir etkiye bulunabileceğinin göz önünde tutulması gerekir. Özellikle, değişik organizmaları etkileyebilecek özelliklere sahip genleri taşıyan bitkiler doğal mikroflorada bulunan faydalı bakterileri de etkileyebilir. Bu nedenle, bu tip genleri taşıyan bitkilerin yaygın biçimde kullanılmalarına başlamadan önce gerekli incelemelerin titiz bir şekilde yapılması zorunludur.

20.6. Sistemik Dayanıklılık

Bir hastalık ile enfekte olmuş bitkilerin, aynı veya farklı bir hastalık enfeksiyonuna karşı bağışık hale geldiği öteden beri bilinmektedir. Bu bağışıklık, yukarıda da açıklandığı gibi, *sistemik olarak kazanılmış dayanıklılık* (SAR) olarak adlandırılır. Salisilik asit bu bağışıklığın ortaya çıkmasında rol oynayan önemli bir moleküldür (Delaney ve ark., 1994). Salisilik asit düzeyi hem enfekte olmuş bölgede hem de sistemik dokuda (enfekte olmamış bölgede) artış gösterir. Tütün ve *Arabidopsis* gibi SAR sisteminin yoğun olarak karakterize edildiği bitkilere, dışarıdan salisilik asit veya Aspirin (asetil salisilat) verildiğinde, bu bitkilerin enfeksiyona dayanıklı hale geldiği gözlenmiştir. Salisilik asit ile muamele edilmiş bitkilerde PR proteinlerinin özellikle PR-1 ve β -1-3 gluknaz genlerinin ifadesi önemli ölçüde artar. Bu özelliğinden dolayı, bitkinin bağışıklık sistemini uyaran salisilik asit benzeri kimyasallar bitki korumada kullanılmaya başlanmıştır. Bu kimyasallar,

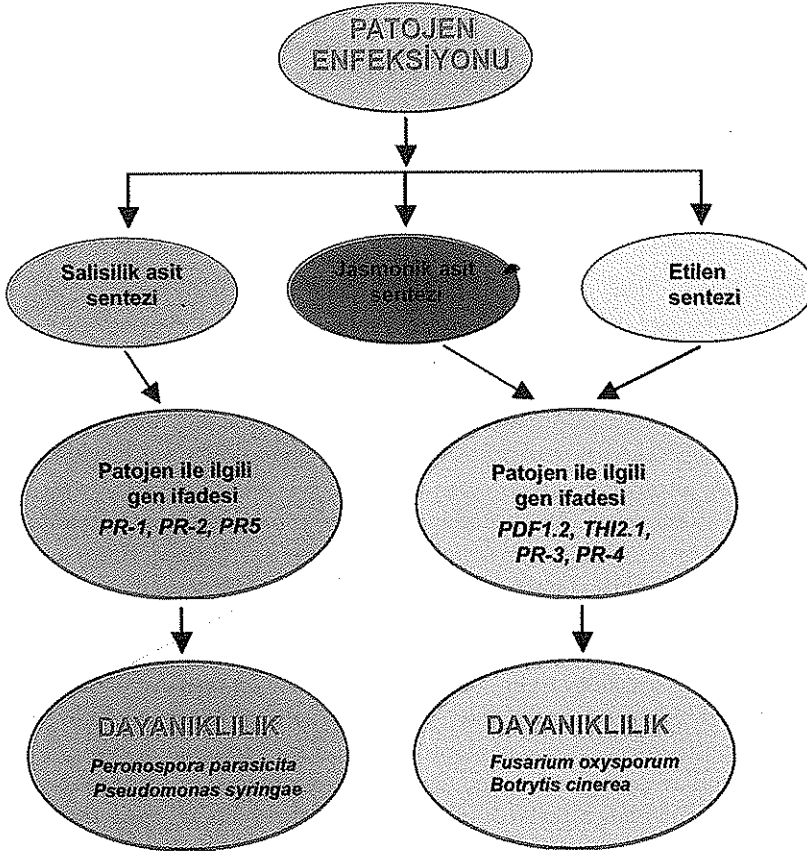
fungusitlerden farklı olarak doğrudan patojeni öldürmek yerine, bitki bağışıklık sistemini uyararak dayanıklılığın artmasına neden olurlar. Yine fungusitlerin çevre ve insan sağlığı üzerine yapabileceği olumsuz etkiler, bu kimyasal bileşiklerin kullanımı ile azaltılabilir.

Bitkilerde dayanıklılığın oluşmasına etkili diğer bir bitki hormonu da jasmonik asittir. Jasmonik asit, özellikle yaralanmış dokularda ya da böcek ve hastalık ile enfekte olmuş bitki organlarında sentezlenir. Jasmonik asitin bitki dokusunda artması aynı salisilik asitte olduğu gibi savunma ile ilgili genlerin uyarılmasına neden olur. Ancak ilginçtir ki, salisilik asit ve jasmonik asit farklı genleri uyarırlar. Bu durum, bu iki molekülün bitkiler tarafından algılanması ve taşınmasının farklı sinyal iletim mekanizmaları aracılığı ile olduğunu göstermektedir. Şekil 20.6'da salisilik asit ve jasmonik asit tarafından başlatılıp, savunma genlerinin uyarılması ile sonuçlanan kimyasal yol gösterilmiştir.

20.7. Patojen Sinyallerinin İletimi ve Bitki Korumada Yararlanılması

Patojen sinyallerinin bitki hücreleri tarafından algılanması ve bu sinyallerin birçok gen ürününü aktif hale getirerek bitkiyi patojen saldırısına karşı dayanıklı hale getirmesi konusu son yıllarda birçok araştırmacının odağı haline gelmiştir. Patojen sinyallerinin plazma membranındaki reseptör proteinler tarafından algılanması sinyal iletim mekanizmasının ilk aşamasını oluşturur. Reseptörler ile patojenden kaynaklanan moleküller arasındaki ilişki kilit ile anahtar arasındaki ilişki gibi çok spesifikdir. Reseptörler tarafından algılanan sinyal daha sonra fosforilasyon reaksiyonları ile öteki bir dizi proteine iletilir. Bu sinyallerin son durağı hücre çekirdeğidir. Hücre çekirdeğinde bulunan spesifik transkripsiyon faktörleri bitki savunmasında görev yapacak genlerin promotor bölgelerine bağlanarak uyarılmasını ya da aktif hale gelmelerini sağlarlar. Bu genler daha önce de bahsedildiği gibi antimikrobiyal proteinlerin sentezinde görev yapan genlerdir. Tüm bu olaylar sonucunda bitkinin savunma sistemi patojen saldırısına karşı alarmı geçirilmiş olur. Anlaşıldığı gibi hastalık sinyalinin iletimi ve bitki savunma sisteminin uyarılması esnasında çok sayıda gen görev yapar. Özellikle sinyalin iletimi aşamasında görev yapan genlerin klonlanması bu genlerin nasıl çalıştığının bilinmesi açısından çok önem taşır. Bu genleri klonlamanın bir yolu, bu genler bakımından mutant olan bireyleri bularak incelemektir. Bu amaçla *Arabidopsis* çok yaygın olarak kullanılan model bir bitkidir. Bunun nedenleri arasında *Arabidopsis* genomunun küçük olması önemli bir avantaj teşkil eder. Bu sayede şimdiye değin birçok gen *Arabidopsis*'den klonlanmıştır. *Arabidopsis* bitkisinin tüm genom dizisini ortaya koyacak proje yakında sonuçlanacak ve bu bitkiden gen klonlanması daha da kolaylaşacaktır. Yine, *Arabidopsis* küçük bir bitki olduğundan çok sayıda bitki kolaylıkla yetiştirilerek mutant bitkiler seçilebilir. *Arabidopsis*'in hayat döngüsünün çok kısa olması birkaç ay gibi kısa bir zamanda bu bitkiden yeni bir nesil elde edilmesine olanak sağlar. *Arabidopsis*'e gen aktarımı da öteki bitkilerde olduğundan

daha kolaydır. Kök, sap ve yaprak gibi organlar *Agrobacterium* aracılığı ile yapılacak gen aktarımı çalışmalarına uygundur. Son yıllarda doku kültürüne gerek olmadan *Arabidopsis* transformasyonu yapılabilecek sistemler de geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile istenilen geni taşıyan *Agrobacterium*, çiçeklenme döneminde bitkiye infiltre edilir. Bu bitkilerden alınan tohumlar daha sonra antibiyotiğe dirençlilik geni taşıyıp taşımadıkları bakımından antibiyotik içeren bir ortamda yetiştirilerek seçilir. Sonuçta antibiyotiğe direnç gösteren bitkiler, aynı zamanda aktarılmak istenilen geni de taşıyor olacaklarından, seçilirler.



Şekil 20.6. Önemli sinyal molekülleri olan salisilik asit, jasmonik asit ve etilen patojen ile enfekte olmuş bitkilerde sentezlenir. Bunlardan salisilik asit PR-1, PR-2 ve PR-5 gibi patojen ile ilgili genleri uyarırken, jasmonik asit ve etilen diğer bir dizi patojen ile ilgili genin uyarılmasını sağlar. Sonuçta, salisilik asit tarafından uyarılan yol ile jasmonik asit ve etilen tarafından uyarılan yol değişik patojenlere karşı dayanıklılık sağlar. Son yapılan çalışmalar bu iki yol arasında interaksiyon olduğunu da göstermektedir.

Mutajen uygulanmış *Arabidopsis* bitkilerinin incelenmesi sinyal iletimi bakımından mutant genleri taşıyan bitkilerin seçimine de olanak vermiştir. Özellikle SAR sinyalinin iletimi bakımından seçilen mutantlar *nim* ya da *npr* olarak adlandırılmıştır. Bu mutantların incelenmesi *Npr* geninin regülatör bir gen olarak sinyal iletiminde önemli bir fonksiyona sahip olduğunu ortaya koymuştur. Mutant geni taşıyan *Arabidopsis* bitkileri SAR sinyalini iletemediklerinden, normalde dayanıklı oldukları patojenlere karşı dayanıksız duruma gelmişlerdir. *Npr* geni *Arabidopsis*'den klonlanmış ve bu genin yapısının öteki proteinlerle interaksyon sağlayabilecek bir yapıda olduğu görülmüştür. *Npr* geni 35S promotorunun kontrolünde yeniden *Arabidopsis*'e aktarıldığında gen aktarılan bitkiler birden fazla patojene karşı dayanıklı duruma gelmişlerdir (Cao ve ark., 1998).

Daha önce, bitkinin enfeksiyona uğramasından sonra birçok proteinin sentezlendiğinden bahsedilmişti. Bu sentezlenen moleküller arasında etilen ve jasmonik asit, bitki savunmasını uyarması açısından önemli bir yer tutar. Etilen ve jasmonik asitin başlattığı sinyaller sonuçta bitki savunma genlerinin promotorlarında bulunan korunmuş bölgelerle interaksyona girerek bu genlerin uyarılmalarını sağlar. Uyarılan genlerin ürünü olan proteinler doğrudan patojene toksik etki yapacağından sonuçta bitki yine hastalık etmeni saldırısından kendini korumuş olur.

20.8. Hastalık Etmeni Tarafından Uyarılan Promotorların Seçimi

Patojenlere karşı dayanıklılık sağlayan genlerin bitkilerde ifade edilmesinde dikkat edilecek konulardan biri de, bu genlerin istenilen dokuda ve sadece bitkinin patojen saldırısına uğradığı zamanda ifade edilmesinin sağlanmasıdır. Birçok genin ifade edilmesinde kullanılan 35S promotoru (mozaik virüsünden izole edilen) hemen her dokuda sürekli aktif olan bir promotordur. Bu nedenle, 35S promotorunun kullanılması hastalık saldırısı olmadan bile dayanıklılık genlerinin ifade olmasına neden olur. Bu da bir yerde bitkinin enerjisinin gereksiz yere kullanılması anlamına gelir. Bunu önlemek için sadece patojen saldırısı sırasında aktif hale gelen promotorlar izole edilerek kullanılmıştır. Buna ait örneklerden birisi patatesten izole edilen *prp-1* promotorudur. Bu promotor *barnase* adı verilen genin ifade edilmesi için kullanılmıştır. *Barnase* geni bakteriyel bir gen olup ribonükleaz enzimlerini kodlar. Ribonükleazlar RNA'yı yıkıcı enzimlerdir. *Barnase* geni *prp-1* promotorunun kontrolü altında patates bitkilerine aktarılmıştır. *Barnase* genini taşıyan transgenik patates bitkileri yanıklık hastalığı etmeni olan patojen tarafından enfekte edildiği zaman *barnase* geni aktif hale gelmiş ve enfekte olmuş hücreler ribonükleazın ifade edilmesi sonucu ölmüştür. Böylelikle daha önce açıklanan hipersensitif tepki (hypersensitive response, HR - enfeksiyonun sadece enfekte olmuş hücrelere lokalizasyonu) sentetik bir sistem kullanılarak elde edilmiştir.

Bitki savunma genlerinin promotor bölgeleri incelendiğinde belirli DNA dizilerinin belirli promotorlarda korunmuş olduğu görülür. Örneğin, birçok promotorda G-

kutusu olarak adlandırılan ve CACGTG motifini içeren bir yapının olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde öteki bazı promotorlarda da AGCCGCC motifini içeren AGC-kutusu ve CCTACC(N)7CT motifini içeren H-kutusu bulunmuştur. Promotor bölgelerinde bulunan bu kutular transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgeler olarak görev yaparlar. Transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere bağlanması ile promotorlara bağlı gen aktif olarak kopya edilmeye başlanır. Sonuçta gen aktif hale getirilir.

Arabidopsis'ten izole edilen PDF1.2 genine ait bir promotor da hem enfeksiyona uğramış hem de uğramamış (sistemik) dokuda gen ifadesini uyarmaktadır (Şekil 20.7) (Manners *ve ark.*, 1998). Yine bu promotor bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı GCC motifini içeren bir bölge vardır.



Şekil 20.7. Patojenler tarafından uyarılan promotorların seçimi: *Arabidopsis* bitkisinden izole edilen PDF1.2 genine ait promotor, *Alternaria brassicicola* ile enfeksiyon sonucu GUS raportör genini hem enfekte olmuş yapraklarda (okla işaretli) hem de sistemik (enfekte olmamış) dokuda ifade etmektedir. Soldaki resim aynı bitkinin enfeksiyon öncesi durumunu göstermektedir.

20.9. Gen İfadesine Etki Eden Öteki Faktörlerin Optimizasyonu

Özellikle bitki dışındaki canlılardan, örneğin bakteri yada böceklerden, bitkilere aktarılan genlerin başarılı bir şekilde görev yapması için aktarıldıkları yeni ortamda kendilerinden beklenen proteinleri normal olarak üretebilmelerine bağlıdır. Bu nedenle bazı durumlarda aktarılan genlerin kodon kullanımı, aktarılan bitkinin kodon kullanımı dikkate alınarak yeniden düzenlenebilir. Bilindiği gibi bir aminoasidi kodlayan üçlü (triplet) kodon sayısı birden fazla olabilir. Örneğin, arginin aminoasidini kodlama olasılığı olan kodon sayısı 6'dır. Bu altı değişik olası kodondan sadece birkaçı bitkilerde arginin kodlar. Bitkide arginin kodlayan kodon bakteride arginin kodlayan kodondan farklı olabilir. Bu nedenle bakteriden izole

edilen bir gen bitkiye aktarıldığında bitki translasyon mekanizmasının, bu kodonun arginin aminoasidine kodlamasından sorumlu olduğunu anlayamaması sonucu anlamsız (nonsense) bir protein üretilir ve bu protein kısa zamanda bitki proteazları tarafından yok edilir. Sonuçta bu olay aktarılan genin bitkide hiçbir fonksiyon göstermemesine neden olur.

Öteki bölümlerde de bahsedildiği gibi bitki genleri tarafından kodlanan mRNA'da AUG kodonu translasyonun başlangıç kodonunu teşkil eder. Bununla birlikte en uygun translasyonun birçok bitki geni için UAACAAUGGC şeklinde bir motif içerdiği bilinmektedir (Kozak, 1986). Bu nedenle bu motifin bitkiye aktarılan genlerde kullanımı aktarılan genden üretilecek proteinin düzeyini ve kararlılığını olumlu olarak etkiler. Benzer şekilde translasyonu sonlandıran kodon genelde UGA, UAA yada UAG'dir. Bu diziden sonra gelecek terminatör de özellikle mRNA'nın kararlılığını etkileyebilecek bir faktördür.

Translasyon sonrası (post-translational) faktörler özellikle proteinin kararlılığını etkiler. Birçok durumda hücrede üretilen proteinin beklenen fonksiyonu gösterebilmesi, hücrenin uygun bir bölümüne gönderilmeleriyle mümkün olur. Hastalıklara dayanıklılığı sağlayan genlerden birçoğunun ürünleri hücreler arası boşluğa salgılanır. Bu sayede bu proteinler özellikle hücreler arası boşluğa girerek bitkiyi enfekte edecek patojenler için uygun olmayan bir ortam oluşturur. Dayanıklılık geni ürünlerinin hücreler arası boşluğa gitmesini sağlamak için uygun lider dizilerinin seçimi gerekir. Bu diziler proteinin nihai yerine gitmesinden sorumludur ve uygun bir gen ifadesi sisteminin elde edilmesi bakımından gereklidir. Bu amaçla, bazı genlerin bitkilerde ifade edilmesi için tütünden izole edilen *Pr1a*, *Pr1b* ve *Pr1c* genlerinden izole edilen lider diziler kullanılmaktadır (Pfitzner and Goodman, 1987).

Kaynaklar

- Albersheim P, Anderson AJ (1971) Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 68: 1815-1819.
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 7327-7331.
- Allefs SJHM, De Jong ER, Florack DEA, Hoogendoorn C, Stiekema WJ (1996) *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars expressing antimicrobial peptide tachyplesin I. Mol. Breed., 2: 97-105.
- Anzai H, Yoneyama K, Tamaguchi I (1989) Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. Mol. Gen. Gen., 219: 492-494.
- Broekart WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants. Crit. Rev. Plant Sci., 16: 297-323.

Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: Leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1859.

Brogie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Brogie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 254: 1194-1197.

Cao H, Li X, Dong X (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6531-6536.

Carmona MJ, Molina A, Fernandez JA, Lopez-Fando JJ, Garcia-Olmedo F (1993) Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.*, 3: 457-462.

Cavallarin L, Andrew D, San Segundo B (1998) Cecropin-A derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11: 218-227.

Chen Z, Silva H, Klessig D (1994) Active oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262: 1883-1886.

Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessman H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266: 1247-1250.

Destefano-Beltran L, Nagpala PG, Cetiner SM, Denny T, Jaynes JM (1993) Using genes encoding novel peptides and proteins to enhance disease resistance in plants. In: Chet I (ed), *Biotechnology in Plant Disease Control*, pp. 175-189, Wiley-Liss, New York.

De Wit PJGM (1992) Molecular characterisation of gene for gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Ann. Rev. Plant Pathol.*, 30: 391-418.

Dixon M, Jones D, Keddie J, Thomas C, Harrison K, Jones J (1996) The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine rich repeat proteins. *Cell*, 84: 451-459.

During K, Porsch P, Fladung M, Lorz H (1993) Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.*, 3: 587-598.

Eppele P, Apel K, Bohlman H (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell*, 9: 509-520.

Florack DEA, Dirkse WG, Visser B, Heidekamp F, Stiekema WJ (1994) Expression of biologically active hordothionins in tobacco. Effects of pre- and pro-sequences at the amino and carboxyl termini of the hordothionin precursor on mature protein expression and sorting. *Plant Mol. Biol.*, 24: 83-96.

Fuente-Martinez JMDL, Mosqueda-Cano G, Alvarez-Morales A, Herrera-Estrella L (1992) Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/Technology*, 10: 905-909.

- Fuente-Martinez JMDL, Mosqueda-Cano G, Alvarez-Morales A, Herrera-Estrella L (1993) Pathogen-derived strategy to produce transgenic plants resistant to the bacterial toxin phaseolotoxin. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.*, 14: 579-586.
- Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the *Arabidopsis* *Rpm1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269: 843-846.
- Hain R, Reif H-J, Krause E, Langebartels R, Kindi H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH, Stenzel K (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361: 153-156.
- Holtorf S, Ludwig-Muller J, Apel K, Bohlmann H (1998) High level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmidiophora brassicae*. *Plant Mol. Biol.*, 36: 673-680.
- Huang Y, Nordeen RO, Di M, Owens LD, McBeath JH (1997) Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Phytopathol.*, 87: 494-499.
- Kazan K, Goulter K, Way H, Manners J (1998) Expression of a pathogenesis-related peroxidase in transgenic plants: Effect of expression on disease resistance. *Plant Sci.*, 136: 207-217.
- Kazan K, Murray FR, Goulter KC, Llewellyn DJ, Manners JM (1998) Induction of cell death in transgenic plants by expression of a fungal glucose oxidase. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11: 555-562.
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44: 283-292.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.*, 8: 97-109.
- Jaynes JM, Nagpala P, Destefano-Beltran L, Huang JH, Kim J, Denny T, Cetiner S (1993) Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Sci.*, 89: 43-53.
- Johal GS, Briggs SP (1992) Reductase activity encoded by the Hm1 disease resistance gene in maize. *Science*, 258: 985-987.
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Sci*, 266: 789-793.
- Liu D, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA (1994) Osmotin overexpression in potato delays the development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1888-1892.
- Manners JM, Penninckx IAMA, Vermaere K, Kazan K, Brown R, Morgan A, Maclean DJ, Curtis MD, Cammue BPA, and Broekaert WF (1998) The promoter of the plant defensin

- gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol. Biol.*, 38: 1071-1080.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1998) Antifungal hydrolases in pea tissue. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and B-1-3 glucanase. *Plant Physiol.*, 88: 936-942.
- Mindrinos M, Katagiri F, Yu G-L, Ausubel FM (1994) *A. thaliana* disease resistance gene *PRS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine rich repeats. *Cell*, 78: 1089-1099.
- Mitra A, Zhang Z (1994) Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol.*, 106: 977-981.
- Mittler R, Shulaev V, Lam E (1995) Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *The Plant Cell*, 7: 29-42.
- Mouragues F, Brisset M-N, Chevreau E (1998) Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotech.*, 16: 203-208.
- Nakajima H, Muranaka T, Ishige F, Akutsu K, Oeda K (1997). Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. *Plant Cell Rep.*, 16: 674-679.
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessman H, Ryals J (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.*, 8: 227-233.
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Destephano-Beltran L, Jaynes JM (1993) Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica*, 77: 123-128.
- Pfützner UM, Goodman HM (1987) Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucl. Acids Res.*, 15: 4449-4465.
- Salmeron JM, Oldroyd GE, Rommens CM, Scofield SR, Kim HS, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz B (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell*, 86: 123-133.
- Song WY, Wang GL, Chen L, Kim HS, Pi LY, Gardner J, Wang B, Holsten T, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science*, 270: 1804-1806.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker B, Ellis JG, Jones JDG (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661-667.

- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology*, 10: 405-412.
- Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish : their role in host defence. *The Plant Cell*, 7: 573-588.
- Van Etten HD, Matthews DE, Matthews PS (1989) Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27: 143-164.
- Van Loon LC, Van Kammen A (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun" and "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology*, 40: 199.
- Van Loon L (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.*, 4: 111-116.
- Vernooij B, Uknes S, Ward E, Ryals J (1994) Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 275-279.
- Way H, Kazan K, Goulter KG, Birch R, Manners JM (2000) Expression of *Shp2* gene from *Stylosanthes* confers resistance to *Phytophthora parasitica* and *Cercospora nicotiana* in transgenic tobacco. *Mol. Plant Pathol.*, 1: 223-232.
- Wang GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S, Ronald PC (1996) The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 850-855.
- Wegener C, Bartling S, Olsen O, Weber J, Vonwettstein D (1996) Pectate lyase in transgenic potatoes confers preactivation of defence against *Erwinia carotovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 49: 359-376.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78: 1101-1115.
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell*, 7: 1357-1368.
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology*, 12: 807-812.

Bölüm 21

Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi

Aynur Gürel¹, Rıza Avcıoğlu

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir
e-posta: agurel@agr.ege.edu.tr¹

21.1. Giriş

21.1.1. Stres kavramı

Bitkiler, yaşadıkları çevrelerde yaşamlarını sürdürmelerini ve gelişme şanslarını kısıtlayıcı değişik olumsuz koşullara maruz kalırlar. Yeryüzünde, kurak zonlar, tuzlu topraklara sahip bölgeler, kuzey ve güney kutupları ile yüksek dağlar gibi geniş alanlar bulunmakta ve bu alanlarda bitki büyümesini kolaylaştırıcı koşullar, kısa süreli olarak gerçekleşebilmektedir.

Stres kavramı, öteden beri tam ve doğru olmayan şekilde ve terminolojik olarak da karıştırılarak kullanılmaktadır. Stres terimi, fizik bilimine ait terminolojiden alınmış, basınç veya gerilim anlamlarına gelmektedir. Bir çevrede devamlı olarak, ya da arada sırada meydana gelen çok sayıdaki olumsuz, fakat hemen öldürücü olmayan koşullar stres olarak bilinir. Bir başka yaklaşımla; bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilir. Aslında, bitkide genellikle bir dış faktörün zorlaması ile oluşan etki olarak da tanımlanabilen stres kavramı, bitki toleransı ile yakından ilişkilidir.

Türkçe’de, *baskı*, *zorlama*, *zorlanma* veya *yoğun gerginlik* gibi sözcüklerle karşılanmaya çalışılan *stres* sözcüğü, kısaca, yaşam için optimal olan koşullardan önemli sapmalar olarak açıklanabilir. Organizmanın bütün fonksiyonel düzeylerinde meydana gelen değişiklikler ve tepkiler önce geri dönüşümlü (reversible) olmalarına rağmen, daha

sonra kalıcı hale de gelebilirler. Stres olayı geçici olarak meydana gelse bile, bitki canlılığı gerilemeye başlar ve stres devam ettükçe, bu zayıflama daha da ilerler. Bitki kapasitesinin sonuna ulaşıldığında ise o ana kadar belirti göstermeden (latent) kalan zarar, kronik hastalığa veya geri dönüşümsüz (irreversible) bir zarara dönüşebilir (Çakırlar ve Topçuoğlu, 1985; Larcher, 1995; Lichtenthaler, 1996; Edreva, 1998; Taiz ve Zeiger, 1998).

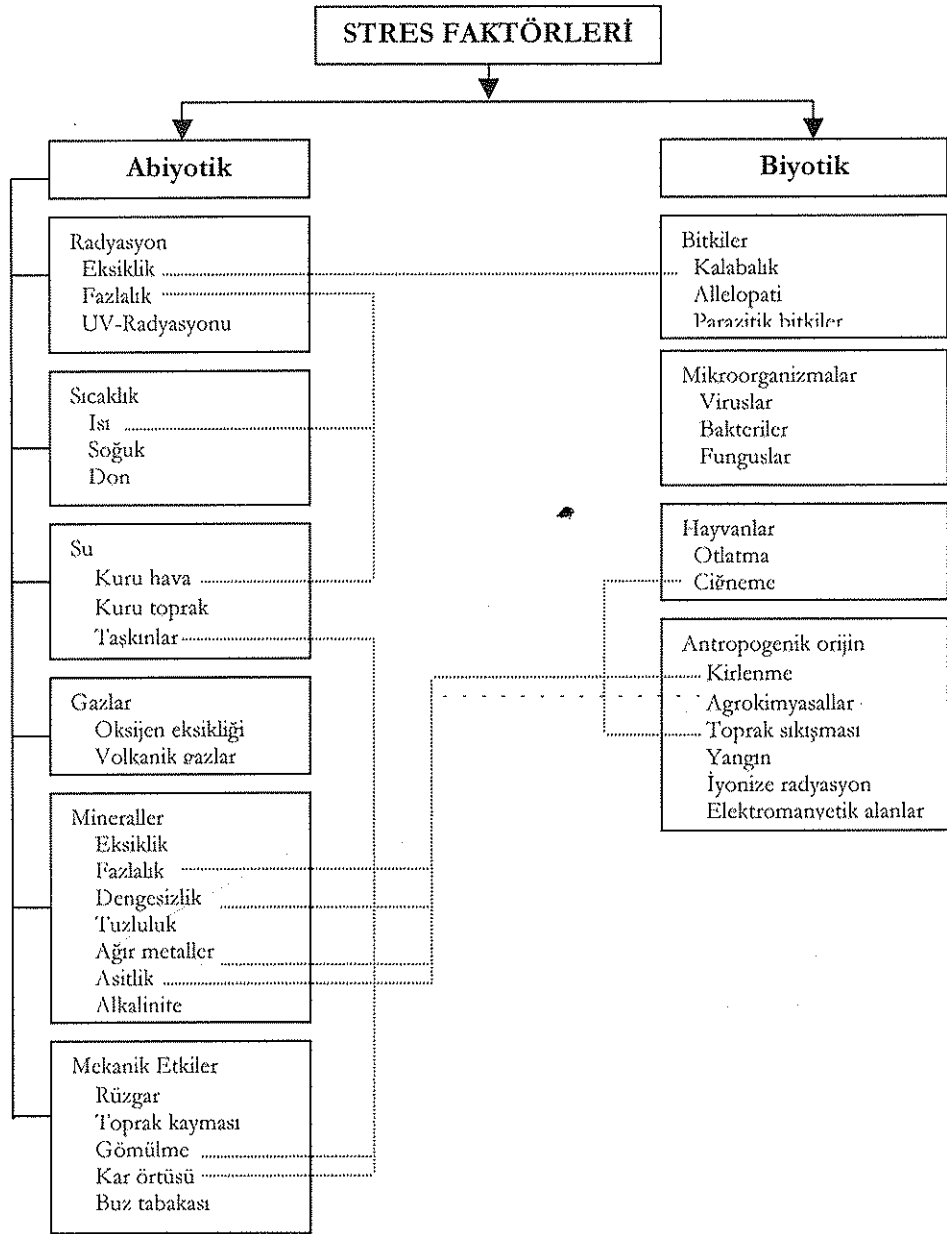
Bu bölümde, bitki biyoteknolojisi alanında son yıllarda üzerinde moleküler seviyede çok yoğun çalışmalar yapılan stres faktörleri, bunların bitkilerde etkileri ile stresin fizyolojik temelleri üzerinde durulacaktır. Bu bilgilerin biyoteknolojik uygulamalarda araştırmacılara ışık tutması ve geliştirilecek tekniklerde temel bilgi sağlaması amaçlanmaktadır. Ayrıca, stres şartlarına adapte olabilecek çeşit geliştirme konularında yapılan biyoteknolojik çalışmalar ile projeksiyonlardan da bahsedilmiştir.

21.1.2 Stres faktörleri (stresörler)

Bitkiler yaşamları sürecinde pek çok stres olayları ve çok sayıda stres faktörleri ile karşılaşmaktadırlar. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres olayları veya faktörleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Stres faktörleri, orijinlerine göre değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Stresörlerin “biyotik” ve “fizikokimyasal” olarak iki grupta ele alındığı sınıflandırmada biyotik faktörler, enfeksiyon oluşturan mikroorganizmaları (fungus, bakteri, virüs), zararlıları (böcek, nematod) ve diğer organizmalarla rekabeti içermektedir. Fizikokimyasal faktörler ise, sıcaklık, su, radyasyon, kimyasal, manyetik, elektriksel etkiler gibi çevre parametrelerindeki sapmalar olarak belirlenmektedir. Diğer bir sınıflandırma şeklinde ise stres faktörleri, “doğal” ve “antropogenik” olarak gruplandırılmaktadır. Bu durumda, doğal stres faktörleri; yüksek ışık, ısı, üşüme, don, su azlığı ve fazlalığı, mineral eksiklik ile böcek ve patojenleri kapsamaktadır. Antropogenik stres ise herbisitler, fungusitler, pestisitler, havayı kirletici maddeler, ozon, fotoooksidanlar, asit yağmurları, toprak ve su, aşırı N uygulaması, ağır metaller, artan UV radyasyonu ve CO₂ seviyesi gibi faktörleri içermektedir. Çevresel stres, çok az veya çok fazla enerji girdisi ile ya da kimyasalın çok hızlı veya yavaş olarak dolaşımı ile ortaya çıkmaktadır. (Şekil 21.1) (Larcher, 1995; Lichtenthaler, 1996; Edreva, 1998).

21.1.3. Stres tarafından teşvik edilen fazlar

Stres faktörleri veya kompleks stres olayları, bitkilerin strese karşı üç tepki fazını ve eğer zarar çok şiddetli değilse, bu stresörlerin uzaklaştırılmasından sonra dördüncü olarak da rejenerasyon fazını geçirmelerine yol açmaktadırlar. Böylelikle stres süresince organizma, karakteristik bir fazlar dizisini izlemektedir (Larcher, 1995; Lichtenthaler, 1996):



Şekil 21.1. Çevresel stres faktörleri ve bunların çoklu ilişkileri (Larcher, 1995).

a) *Tepki fazı (alarm reaksiyonu)*: Alarm fazında normal yaşamsal etkinlikler için gereksinim duyulan yapısal (protein, biyo-membranlar) ve fonksiyonel (biyokimyasal olaylar, enerji metabolizması) koşullarda sapmalar meydana gelmekte ve alarm fazı, katabolizmanın anabolizmaya üstün olduğu bir stres reaksiyonu ile başlamaktadır. Bu fazda, canlılık da gerilemektedir.

b) *Onarım fazı (dayanıklılık aşaması)*: Eğer uyarıların yoğunluğu değişmeden kalırsa, protein veya koruyucu maddelerin sentezi gibi tamir olaylarının gerçekleştiği bu faz, bitkilerde hızla başlatılmaktadır. Bu aşamada, adaptasyon ve tamir olaylarının başlaması sağlanarak, bu koşullarda 'alışma' safhası gerçekleştirilmeye çalışılmakta ve böylece de devam eden stres koşulları altında kuvvetlenmenin arttığı bir dayanıklılık fazına geçiş meydana gelmektedir.

c) *Bitiş fazı (tükenme dönemi)*: Stres dönemi, eğer çok uzun sürerse veya stres faktörünün yoğunluğu artarsa, tükenme dönemi ortaya çıkmaktadır. Tolerans limitlerinin aşıldığı ve adaptif kapasitenin aşırı yüklendiği durumlarda, kalıcı zararlar ve hatta ölüm de meydana gelebilmektedir.

d) *Rejenerasyon fazı (kısmi veya tam rejenerasyon)*: Senesens olaylarının dominant hale gelmelerinden önce ve zararın çok yüksek olmadığı durumlarda stresörler uzaklaştırılırsa, bitkide fizyolojik fonksiyonların kısmi veya tam rejenerasyonu gerçekleştirilip zararlar tamir edilebilmektedir. Stres yoğunluğu ve süresi, çok yüksek ve uzun değilse, bitkiler dayanıklılık minimumu ve maksimumu tarafından belirlenen aralık içerisinde kendilerini ayarlamaya çalışırlar (Larcher, 1995; Lichtenthaler, 1996; Edreva, 1998).

21.1.4. Stresi tanıma

Organizmalar, genetik olarak belirlenmiş reaksiyon normuna bağlı olarak özel bir stresöre farklı tepkiler verebilirler. Bitkilerin belirli bir stres faktörüne olan tepkilerinin yapısı ve yoğunluğu; yaşa, adaptasyon derecesine, mevsimsel ve hatta günlük aktiviteye bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. Bir bitkinin stresten sıkıntı çekip çekmediği, bu bitkinin normal koşullardaki davranışıyla yapılacak bir karşılaştırma ile anlaşılabilir. Stresörün spesifik etkileri, bitkide iyi tanımlanmış bir hedefi kapsamaktadır. Örneğin; yoğun radyasyon, tilakoid membranlarında doğrudan bir zarara yol açabilmekte veya iyonların ve ağır metallerin toksik konsantrasyonları, enzim proteinleri üzerinde doğrudan etki yapabilmektedirler. Bu nedenle, her bir durumda semptomlar oldukça spesifiktir.

Stres durumunun spesifik olmayan belirtileri ile ilgili örnekler ise enzim (peroksidaz, glutation redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz) aktivitelerinde, poliaminlerin biyosentezinde; sekonder metabolitlerin (polifenoller, antosiyaninler), ozmotik olarak birbirine uyumlu aktif maddelerin (prolin, betain ve polioller), stres metabolitlerinin ve antioksidanların (askorbik asit, tokoferol) *de novo* sentezleri ve birikmelerinde gözlenen değişiklikleri kapsamaktadır. Fakat bütün bunlar, stres

hormonlarının (absizik asit, jasmonik asit, etilen) ortaya çıkması ile ilişkilidir. Stresin spesifik olmayan diğer etkileri ise, membran özelliklerindeki (membran potansiyeli, madde taşınımı) değişiklikler, solunum artışı, fotosentezin engellenmesi, kuru madde üretiminin azalması, büyümedeki sıkıntılar, düşük verimlilik ve vaktinden önce senesensin oluşmasıdır.

(Larcher, 1995; Edreva, 1998). Metabolik bozulma nedeniyle, hücre içi enerji üretimindeki bir azalma veya tamir sentezleri için enerji tüketimindeki bir artış, stres durumunun erken belirtisi olarak da kabul edilmektedir.

Stres faktörlerinin birlikte etki göstermesi, bitkinin tek bir stres faktörüne olan tepkisini kuvvetlendirebilir, zayıflatabilir, örtebilir veya tersine çevirebilir. Çoğunlukla diğer faktörlerle kombinasyon halindeki bir etkinin artması gözlenebilir. Birbirine eklenen stres faktörleri, ek karışıklıklar doğurmaktadır. Etkilerin sinergistik veya antagonistik olarak meydana çıkıp çıkmadığı çoğunlukla önceden bilinmemektedir. Kışları soğuk bölgelerin odunsu bitkileri, don etkisi altında, sadece donmaya karşı toleranslı hale gelmekle kalmazlar, ayrıca kurumaya karşı da daha dayanıklı hale gelirler. Tuz stresi, ısı şoku ve kuraklık stresinde oluşan proteinler arasındaki yapısal benzerlikler, muhtemelen çapraz korumanın moleküler temelini oluşturmaktadırlar. Ayrıca flavonoidlerin birikimi veya peroksidazların aktivasyonu gibi spesifik olmayan stres reaksiyonları; UV radyasyonuna, fungal saldırıya ve olatmaya karşı da koruyucu fonksiyonlara sahiptirler (Larcher, 1995).

21.1.5. Strese karşı bitki tepkileri

Bitkilerde stres faktörlerine karşı iki farklı tepki gözlenmektedir: Bunlar; stres faktörlerinden *kaçınma* veya bunlara karşı *tolerans*tır.

Kaçınma: Stres faktörlerinin bitki dokularına girişinin önlenmesini veya azaltılmasını ifade etmektedir. Bu mekanizma, aşağıda belirtilen yollarla gerçekleşmektedir:

- a) *Bitkinin çevre ile temas halinde olduğu yüzeylerinde morfolojik ve kimyasal kompozisyondaki değişiklikler:* Yaprak ayasının alanı ve kalınlığı, stomaların büyüklüğü ve yoğunluğu, kütikulanın kalınlığı ve kimyasal kompozisyonu, yaprak ve kök salgılarında toksik ve engelleyici komponentlerin oluşumu.
- b) *Ontogenetik değişimler (stres faktörlerinden mevsimsel olarak kaçınma):* Stres olayından önce dormant ontogenetik faza (tohum, yumru oluşumu) geçiş sağlanarak, bitki üretkenliği garantili hale gelmektedir.

Tolerans: Stres faktörlerinin etkisini elimine etme, azaltma veya tamir etme mekanizmalarını ifade etmektedir. Bu tepki tipi, doku seviyesindeki değişiklikleri (sakızların, yara periderminin oluşumu gibi), subselüler seviyedeki değişiklikleri (duvar ilavelerinin; membran, kloroplast ve hücre duvarı modifikasyonlarının oluşumu gibi), moleküler (sekonder metabolitlerin, polisakkaritlerin, fenol

polimerlerinin ve stres proteinlerinin sentezi) ve submoleküler seviyedeki değişiklikleri kapsamaktadır (Edreva, 1998).

21.2. Radyasyon: Görünür Radyasyon (Işık) ve Ultraviyole Radyasyon

Bitki organlarının morfolojik ve fizyolojik özellikleri, bitkiye ulaşan ışığın yoğunluğu ve süresinden etkilenmektedir. Karanlıkta yetişen bazı bitkiler dışında kalan tüm bitkiler, büyüme, gelişme ve üremeleri için ışığa gereksinim duymaktadırlar.

Bitkiler, belirli ışık yoğunluklarına adapte olmuşlardır. Işık yoğunluğunun değiştiği durumlarda, bitkilerin normal fonksiyonları yavaşlamaya başlar, ya da devam ettirilemez hale gelir. Bitkiler, gelişmelerinin her döneminde minimum, optimum ve maksimum ışık isteklerine gereksinim duymaktadırlar (Eser, 1986).

Güneşten kaynaklanarak yeryüzüne ulaşan ışık, değişik dalga boylarına sahip farklı ışınları içermektedir. Dalga boyu 400 mμ'a kadar olan ışınlar "kısa dalgali", 400-700 mμ arasındakiler "orta dalgali" ve dalga boyu 770 mμ'dan fazla olan ışınlar ise "uzun dalgali" olarak adlandırılırlar. 390 mμ'nun aşağısındaki dalga boyları ultraviyole, X, gama, kozmik; 760 mμ'nun üzerindeki dalga boyları ise kızılötesi (infrared) ışınlardır.

Ultraviyole (mor ötesi) ışınları, bitki büyümesini düzenleyen hormonlara etki ederek bitkilerin bodur kalmasına yol açarlar. Özellikle de yüksek alanlarda bu durum daha belirgindir. Gözle görülmeyen bu ışınlar, yeryüzündeki ışın enerjisinin %2'sini oluşturmaktadırlar. Uzun dalga boyuna sahip ve yine gözle görülemeyen ışınlar ise, hava sıcaklığını sağlarlar ve biyokimyasal reaksiyonların oluşmasına da yardımcı olurlar.

Fotosentez olayının gerçekleşmesinde etkili olan ve gözle görülen orta dalga boylu ışınlar, menekşe, mavi, yeşil, sarı, portakal, kırmızı renkli ışınları kapsarlar ve toplam ışın enerjisinin %40-60'lık bölümünü oluştururlar. Yeşil renkli ışınlar (490-574 mμ) ise fotosentezde en büyük rolü üstlenirler (Eriş, 1990; Kocataş, 1999).

Bitkiler, ışık isteklerine göre iki sınıfa ayrılırlar:

- a) *Heliyofitler (güneş bitkileri)*: Büyüme ve gelişmelerini normal gerçekleştirebilmeleri için bol ışık isteyen bitkilerdir. Domates, patlıcan, biber, pamuk ve tütün bol ışık isteyen bitkiler grubuna örnek olarak verilebilirler.
- b) *Skiyofitler (gölge bitkileri)*: Az ışık koşulları altında büyüme ve gelişmelerini gerçekleştiren bitkilerdir. Bu bitkiler geniş yaprak yüzeyine sahiptirler. Yaprakları ince yapılıdır ve hücreleri, hücreler arası boşlukları ve stomaları güneş bitkilerine göre daha büyüktür. Ahududu ve çilek çok az ışıktaki, hatta gölgede de meyve verebilen bitkilerdir (Eser, 1986; Eriş, 1990).

Fotosentetik olarak aktif radyasyonun düşük veya aşırı miktarları ile UV radyasyon absorpsiyonunun artma göstermesi, bitkilerde radyasyon stresini oluşturmaktadır (Levitt, 1972; Larcher, 1995).

21.2.1. Işık azlığı ya da gölge

Işık Denge Noktası'nın altında kalan ışıklanma düzeyi, fotosentezin azalarak bitkinin yeterli asimilat oluşturmaması nedeniyle yavaş gerçekleşen ve dolaylı olan bir zarara yol açabilmektedir. Gölge bitkileri, düşük seviyedeki ışıklanmaya adapte olmuşlardır ve bu nedenle güneş bitkilerine göre gölgeye daha dayanıklıdır (ışık azlığına dayanıklılık).

21.2.1.1. Işık azlığından kaçınma

Yüksek bitkiler, hareket etmemelerinden ve ışığı yoğunlaştırıcı merceklerle sahip olmamalarından dolayı, havayla temas halindeki yüzeylerine düşen ışık yoğunluğundan daha fazlasını alamazlar. Işık fazlalığından kaçınan gölge bitkilerinde kütikula tabakaları zayıf gelişmiştir. Bu bitkiler, mum tabakalarına ve tüylere de sahip değildirler. Bu nedenlerle gölge bitkileri, güneş bitkilerine göre daha az olan yaprak yüzeyi yansınası ile karakterize edilirler. Kloroplastlar epidermal hücrelerde meydana gelebilirler. Güneş bitkilerinde ise epidermal tabaka, kloroplast içeren mezofil hücreleri ve ışık kaynağı arasında ışığı absorbe edici bir bariyer görevini üstlenmiştir. Bu adaptasyonların bir sonucu olarak gölge bitkisinin kloroplastları üzerine, aynı düşük ışık yoğunluğuna maruz kalan güneş bitkisinden daha fazla bir ışık yoğunluğu düşmektedir. Kloroplastlar, ayrıca içerdikleri daha yüksek konsantrasyondaki klorofil veya diğer fotokimyasal olarak aktif pigmentlerden dolayı, zayıf ışıklanmanın daha geniş bir bölümünü absorbe edebilmektedirler.

21.2.1.2. Işık azlığına tolerans

Gölge bitkilerinin ışık azlığına dayanıklılıkları, toleranstan kaynaklanmaktadır. Bu bitkiler, daha düşük denge noktası ile karakterize edilirler ve bu özellikten dolayı, fotosentetik ürünleri daha az ışık yoğunluklarında biriktirebilirler. Gölge bitkileri daha düşük ışık yoğunluklarında ışık doygunluğu gösterirler. Bu bitkiler, karboksidismütaz enziminin daha düşük aktivitelere sahiptirler ve bu durum, güneş bitkilerinden daha düşük olan ışık doyma değerlerinin nedenlerini açıklamaktadır. Işık azlığına olan tolerans, düşük solunum oranından da kaynaklanabilmektedir. Bitkiler, böylelikle de düşük ışık seviyelerine adapte olabilmektedirler (Levitt, 1972).

21.2.2. Güçlü ışık

Bitkilerin fotosentetik aygıtları, görünür ışığı optimal olarak etkili bir şekilde absorbe etme ve kullanma yeteneğindedirler. Fotosentetik sürecin aşırı yüklenmesi, daha az kuvantum kullanımına ve daha düşük asimilasyon verimine (fotoinhibisyon) yol açmaktadır. Ekstrem olarak aşırı olan ışık, fotosentetik pigmentleri ve tilakoid yapısını tahrip edebilmektedir (ışık zararı). Adapte olmuş alg, yosun, liken ve çiçekli bitkiler gibi canlılar arasındaki bütün gölge bitkileri ışığa duyarlıdır ve ılımlı ışığa kısa süreli maruz kaldıklarında bile zarar görebilirler. Orman ağaçlarının altında yetişen bitkiler, ağaçların devrilmesi sonucunda ortaya çıkacak bir ışık şokundan sıkıntı çekebilirler. Giren ışığın pigment kompleksi ile daha etkili yakalanması, bir bitkiyi güçlü ışığa karşı daha duyarlı kılabilir. Yüksek dağlar, nadas alanları, çöller ve deniz kıyıları gibi açık alanlarda büyüyen bitkiler, güçlü ışığa alışkındır, yüksek ışık seviyelerini daha iyi tolere edebilirler ve genellikle de ışıktaki kararlılık (fotostabil) gösterirler.

21.2.2.1. Güçlü ışığın neden olduğu zararlar

Hücre duvarı, kütikula, mum ve suberin gibi koruyucu tabakalar, normal koşullar altında, ışıktan kaçınmayı sağlayabilmektedir ve bu durumda bitkiler, aşırı ışığa dayanıklıdır. Eğer bitki düşük ışık koşullarında yetişirse, koruyucu tabakalar zayıf gelişmektedir ve yüksek ışık yoğunluklarına maruz kalma durumlarında bitki zarar görebilmektedir.

Gölge bitkileri özellikle güçlü ışığa duyarlıdır. Bu durum, fotosisteme verilen zarardan kaynaklanmaktadır. Güçlü ışık nedeniyle, stres koşullarında zarara uğrayan asıl yer, belirli protein alt birimlerinin hızlı olarak parçalandığı fotosistem II'nin reaksiyon merkezidir. Kloroplastlarda artan indirgeme kapasitesi 'ksantofil döngüsü' ile dağıtılarak, di-epoksit violaksantin zeaksantine indirgenmesi sağlanmış olmaktadır. Güçlü ışık altında, kloroplast pigmentlerini ve membran lipidlerini tahrip edebilen agresif oksijen türleri birikebilmektedir. Burada oksidoredüktazlar (superoksoid dismutaz, peroksidaz, katalaz) önleyici sistemler olarak işleve sahiptirler.

Işığın sap (gövde) üzerindeki engelleyici etkisi, gibberellin miktarındaki bir azalmadan kaynaklanmakta ve genellikle güçlü ışık, büyüme düzenleyicilerinin dengesini bozarak büyümeyi engeller görünmektedir. Işıktaki klorofil, IAA ve askorbik asidin oksidasyonu gerçekleşebilmekte, devamlı ışık nedeniyle klorofilin tahribi sonucu klorozis meydana gelebilmektedir.

Yüksek ışık yoğunluğu, bitkilerde sekonder zararlar da yol açabilmektedir. Aşırı ışık yoğunluğuna, özellikle de güneş ışığındaki gibi, yüksek kızıl ötesi ışık da eşlik ederse, iki tip sekonder stres zararı ortaya çıkmaktadır. 1) Radyasyonun teşvik ettiği yüksek ısı stresi zararı (güneş yanığı), 2) Aşırı güneş ışığı koşullarında esas olarak meydana gelen ve güneşten absorbe edilen enerjinin buharlaştırıcı etkisi nedeniyle,

radasyonun teşvik ettiği bir stres olan kuraklık zararı. Gölge bitkileri ise özellikle her ikisine de duyarlıdırlar (Levitt, 1972; Larcher, 1995).

21.2.2.2. Güçlü ışık stresine adaptasyon

Aşırı ışığın etkileri, daha az radyasyon almak amacıyla yaprak pozisyonlarının gelen ışıkla aç yapacak şekilde oluşumu gibi kaçınma davranışları yanında özellikle yosunlarda ve pteridofitlerde görülen sürgünlerin yuvarlanarak katlanmaları veya asimilat oluşturan dokunun kloroplast hareketleri ile azaltılabilmektedir. Yaprığın üst yüzeyindeki yoğun trikoma örtüsü veya epidermis ve hipodermal dokudaki kalınlaşmış duvarlar, diffusif bir filtre olarak rol oynamakta ve güçlü radyasyonun etkisini azaltıcı yönde etkiye bulunmaktadır. Katlanmamış yapraklara sahip tropik bitkilerde antosiyanin, karartıcı bir filtre olarak görev yaparak mezofili koruyabilmektedir. Ayrıca, güçlü ışıktaki, kloroplastlarda karoten ve lutein gibi koruyucu pigmentlerin miktarları artma göstermektedir (Larcher, 1995).

21.2.3. Ultraviyole radyasyonun zararları ve korunma yolları

Hücrelere giren UV radyasyonunun büyük bir kısmı, absorbe edilmekte, yüksek kuvantum enerjisi nedeniyle de akut zararların oluşmasına yol açılmaktadır. Uzun dalga boylu UV-A, esas olarak fotooksidatifdir; UV-B ise fotooksidatif faaliyetlerin yanı sıra, biyo-membranlarda fotolezyonlara neden olmaktadır. UV zararı, enzim aktivitesindeki (artan peroksidaz aktivitesi, sitokrom oksidazın engellenmesi) değişikliklerle, hücrelerin zayıf enerji durumuyla (protoplazmik akıntının durması), daha düşük fotosentetik verime ve büyümenin bozulmasıyla tespit edilebilmektedir.

Epikütikular mum ve hücre özsuyundaki çözünmüş flavonoidler tarafından UV'nin etkili absorpsiyonu nedeniyle yüksek bitkilerin protoplazmaları, radyasyon zararından büyük ölçüde korunmaktadır. Koruyucu pigmentlerin sentezinin UV tarafından uyarılması sonucu bitkiler, oluşan bu maddeleri biriktirmeye çalışmaktadır (Larcher, 1995).

21.3. Sıcaklık

Bir bitki türünün başarısını, maksimum ve minimum sıcaklıklar belirlemektedir. Bazı yüksek bitki türleri, saatlerce veya günlerce süren çöl rüzgarlarının sıcak esintilerinde canlılıklarını sürdürebilirlerken, diğer bazı türler uzun süren kutup soğuklarında bile, yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Aktif bitki büyümesi, genellikle yaklaşık 10 °C'den 40 °C'ye kadar değişen bir sıcaklık aralığı ile sınırlanmıştır (Treshow, 1970).

Isı, genellikle moleküllerin hareketini hızlandırmakta, makro-moleküller içindeki bağları gevşetmekte ve biyo-membranların lipid tabakalarını daha akışkan hale

getirmektedir. Düşük sıcaklıklarda ise biyo-membranlar, daha katı (rigid) duruma gelmektedirler ve biyokimyasal olayların aktivasyonu için gerekli enerji ihtiyaçlarında artmalar gözlenmektedir. Yüksek ve düşük sıcaklıklar, yoğunluk ve süreye bağlı olarak bitkilerin metabolik aktivitelerini, büyümelerini ve canlılıklarını bozmakta ve bir türün doğal dağılışını sınırlamaktadırlar. Aktivite sınırında yaşamsal olaylar, geri dönüşümlü olarak minimum bir hıza doğru düşme gösterirler. Kritik sıcaklık eşiği aşıldığında ise hücre yapısı ve hücresel fonksiyonlar, zarar görebilmekte; hatta protoplazma ani olarak ölebilmektedir (Larcher, 1995).

Sıcaklık ile ilgili stresin üç tipi ayrımlanabilmektedir: Isı (yüksek sıcaklık), üşüme (düşük pozitif sıcaklık) ve don (düşük negatif sıcaklık). Üşüme ve don stresleri, yaygın olarak “soğuk” terimi içinde yer alan iki kavramdır. Her bir stres tipi için bir eşik sıcaklığının belirlenmesi gereklidir, fakat bu konuda bitki düzeyinde çok sınırlı veri sağlanabilmektedir. Örneğin, soğuk-dönemde yetiştirilen yemeklik tane baklagiller için eşik seviyeleri, yaklaşık olarak aşağıdaki şekilde önerilmektedir (Wery ve ark., 1993):

Don: Kar örtüsü olmaksızın 0 °C'nin aşağısındaki günlük minimum sıcaklık.

Üşüme: 0-10 °C arasındaki günlük ortalama sıcaklık. Üşümeye-duyarlı ve dayanıklı bitkileri ayırmak için çoğunlukla 12 °C'lik sıcaklıklar kullanılmaktadır.

Isı: 25 °C'nin üzerindeki günlük maksimum sıcaklık.

21.3.1. Bitkilerde ısı ve zararları

Tarımsal bitkilerde ısı stresi, çoğunlukla kuraklık stresi ile eş zamanlı olarak meydana gelmektedir ve oldukça karmaşık bir sorundur (McKersie ve Leslem, 1994). Isı etkisi süreye bağlıdır. Diğer bir ifade ile, uzun süreli daha az ısı, kısa süreli yüksek ısı kadar çok zarara yol açabilmektedir. Sıcak günlerde bitkilerin gün içindeki dayanıklılıkları değişim gösterebilmektedir. Bitkilerin sıcak günlerdeki ısı dayanıklılıkları, öğleden sonraları sabah saatlerine göre daha fazla olmaktadır. Bitkiler, özellikle büyümelerinin en aktif periyotlarında, ısıya oldukça fazla duyarlılık göstermektedirler. Karasal bitkiler içinde dayanıklılıklarını sadece yazın arttırabilen türler de vardır. Diğer türler ise ısı dayanıklılıklarını sadece kış dormansi periyodunda kazanmaktadırlar. Isı dayanıklılığı açısından mevsimsel dalgalanmaları algılamayan türler de vardır (Larcher, 1995).

Isı stresi, protein yapısı ve aktivitesi ile membran stabilitesi üzerinde özellikle de plazmik ve kloroplastik membranlarda negatif bir etkiye sahiptir. Bu etkilerin ilk sonuçlarından biri, fotosentezde azalmaların meydana gelmesidir (Wery ve ark., 1993). C₃ fotosentez yolu, yaprak sıcaklığının 30 °C'yi aştığı sıcak ortamlarda oldukça etkisiz hale gelmektedir (Lawlor, 1994). Yüksek sıcaklıklarda fotosentez, solunumdan önce engellenmektedir (Taiz ve Zeiger, 1998). Solunum, ısıya daha

dayanıklısıdır ve sadece ölümcül (lethal) düzeye yakın sıcaklıklardan etkilenmektedir. Karbon dengesi ve solunum, büyüme ve verimi sınırlayıcı hale gelmekte ve sonuçta bitkinin ölümlü gerçekleşebilmektedir (Wery ve ark., 1993; Larcher, 1995). Yüksek sıcaklıkların fotosentezi olumsuz etkilemesi sonucunda, baklagillerde azot fiksasyonu da azalma göstermektedir (Malhotra ve Saxena, 1993).

21.3.1.1. Isı stresine adaptasyon

Bitkilerde üç tip ısıya dayanıklılık farkedilmektedir (Larcher, 1995):

1) *Isıya duyarlı türler*: Bu grup, 30-40 °C veya en fazla 45 °C'de zarar gören bütün türleri kapsamaktadır: Ökaryotik algler, su içindeki kormofitler ve hidrat durumdaki likenler gibi. Bu duyarlı türler, kendi sıcaklıklarının yükselmesini, transpirasyonal soğuma ile etkili olarak engelleyemedikleri zaman, sadece aşırı ısınmaya maruz kalmayan habitatlarda kolonize olabilmektedirler.

2) *Nispeten ısıya dayanıklı ökaryotlar*: Güneşli ve kuru alanların bitkileri, ısıya dayanıklılık kazanabilirler. Bu bitkiler, yarım saat süre ile 50-60 °C'ye kadar olan ısınmalarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Fakat hücre ve organizmalar için 60 ve 70 °C arasında mutlak bir üst sınır bulunmaktadır.

3) *Isıya tolerant prokaryotlar*: Bazı termofilik prokaryotlar, son derece yüksek sıcaklıklara dayanabilmektedirler. Siyanobakteriler, volkanik alanlarda ve sıcak su kaynaklarında 75 °C'ye, bakteriler 90 °C'ye ve hipertermofilik arkebakteriler 110 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Bu organizmalar, sıcaklığa dayanıklı olan hücre membranlarına, nükleik asit ve proteinlere sahiptirler.

Bitkiler, ısınmanın önlenmesi veya hafifletilmesi ile ve ayrıca protoplazmanın yüksek sıcaklıkları tolere etme kapasitesine de bağlı olarak, yüksek sıcaklıklarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Larcher, 1995).

21.3.1.1.1. Isıdan kaçınma

Bitkiler, fenoloji mekanizmalarını hızlandırarak ısı şokunu önlemeye çalışmaktadırlar. Isıdan kaçınmanın iki unsuru vardır: Yaprığın fotosentetik olmayan enerjiyi azaltıcı "yansıma faktörü" ve "transpirasyon". Yaprakların aşırı ısınması, yeterli su temin edildikçe, transpirasyonal soğuma yardımıyla etkili olarak önlenmektedir (Wery ve ark., 1993; Larcher, 1995). Yaprakların tehlikeli şekilde aşırı ısınmasının önlenmesi bazı bitkiler tarafından güçlü güneş ışığından kaçınma yolu ile gerçekleştirilebilmektedir. Yangına karşı korunma; ısıyı tecrit eden kabuk, kaidedeki tomurcukları örten yoğun yaprak kınları, ve toprakaltı organların (soğan ve yumru) alta doğru çekilmesi ile sağlanabilmektedir (Larcher, 1995).

21.3.1.1.2. Isı toleransı

Isı toleransı, hücresel seviyede açıklanabilmekte ve membran stabilitesine, spesifik eriyik maddelerinin (solute) birikimine ve ısı şok proteinlerini (HSPs) içeren çeşitli mekanizmalara bağımlılık göstermektedir. Lipidlerin doymamışlık derecesi ile bağlantılı olabilen membran stabilitesi, ısı stresi boyunca fotosentezdeki azalmaları önlemek açısından çok önemlidir. Prolin ve glisinbetain gibi spesifik biyokimyasalların birikimi; enzimler, membranlar ve özellikle de polenler için koruyucu bir rol oynamaktadır. Isıdan korunmanın en etkili yolu, ısı şok proteinleri ile sağlanmaktadır. Bu proteinler, hücre çekirdeği tarafından hızlı olarak kodlanırlar ve sitozolde sentezlenerek kloroplast ve mitokondrilere transfer edilirler. Isı şok proteinleri, kromatin yapılarına ve membranları stabilize edici, onarım mekanizmalarını ilerletici etkilere sahiptirler (Palavan-Ünsal, 1993; Edreva, 1998; Taiz ve Zeiger, 1998; Yüce ve Gürel, 1998).

21.3.2. Bitkilerde üşüme

Soğukta metabolik enerji daha az sağlanmakta, su ve besin alınımı sınırlanarak daha az biyosentez meydana gelmekte, asimilasyon azalmakta ve büyüme durmaktadır. Düşük sıcaklıkların daha sık, daha uzun ve daha soğuk periyotlarda oluşması, bitki açısından oldukça ciddi bir durumdur (Larcher, 1995).

Hassas türler, normal büyüme için çok düşük fakat buz oluşumu için yetersiz olan sıcaklıklarda, üşümeden dolayı zarar görebilirler. Özellikle tropik veya subtropik türler, üşüme zararına karşı oldukça duyarlıdırlar. Bitkiler nisbeten yüksek sıcaklıklarda yetiştirildiklerinde (25 ile 35 °C) ve sonra sıcaklıkların 10 ile 15 °C'ye kadar düşürüldüğü koşullarda, büyümeleri yavaşlamakta, yapraklarda renk bozulmaları ve lekeler belirmektedir. Köklerde üşüme oluşur ise, solma meydana gelmektedir.

Bitki, önce soğuk fakat zarar vermeyen sıcaklıklara maruz bırakılarak kuvvetlendirilir ve uyum sağlar hale getirilirse, dayanıklılığı artırılmış olmaktadır. Soğukun yavaş ve kademeli olarak geliştiği durumlarda, üşüme zararı en aza indirilebilir. "Soğuk şoku" olarak adlandırılan 0 °C'ye yakın sıcaklıkların ani olarak oluşması, bitkilerin zarar görme olasılığını büyük ölçüde arttırabilmektedir (Wery *ve ark.*, 1993).

21.3.2.1. Bitkilerde üşüme zararları

Bitkilerin düşük sıcaklıklarda yaşamlarını sürdürebilmeleri, genetik yapıya ve genetik yapının çevre koşulları ile olan etkileşimine bağlıdır (Kanbertay, 1984). Üşümenin neden olduğu zararlar, hücresel düzeyde gözlenmektedir. Lipidlerin ve membrana bağlı taşıyıcı proteinlerin modifikasyonu ile azalma gösteren membran stabilitesi üzerindeki bu etki daha belirgindir (Wery *ve ark.*, 1993). Üşüme-dayanıklı

bitkilerdeki membran lipidleri, çoğunlukla üşümeye-duyarlı bitkilerdekinden daha yüksek oranda doymamış yağ asitlerine sahiptirler (Taiz ve Zeiger, 1998). Hücresel seviyede gerçekleşen asıl etkiler; plazmik membran bütünlüğünün kaybı nedeni ile erimiş maddelerin (K^+ , amino asit ve karbonhidrat gibi) sızmasındaki artışları ve membran üzerindeki aynı etkiden dolayı kloroplastın fonksiyonlarındaki değişimleri kapsamaktadır. Üşüme tarafından elektron taşıyıcı zincir etkilenecek, fotosistem II'nin ışık periyodu süresince tahribi gerçekleşir (fotoinhibisyon). Böylelikle de fotosentezde azalmalar meydana gelmektedir (Wery ve ark., 1993). Değişik hücresel fonksiyonların sıcaklıklara duyarlılıkları farklı olabilmektedir. Solunum olayları tarafından sağlanan enerjiye ve yüksek enerjili fosfatların üretimine doğrudan bağlı olay olan sitoplazmik akıntının durması, aslında düşük sıcaklıkların fark edilen ilk sonucudur (Larcher, 1995).

21.3.2.2. Üşümeye adaptasyon

Üşümeye dayanıklılık mekanizmaları, membran düzeyinde gerçekleşebilmektedir. Üşüme boyunca, membran yapısındaki değişim ile birlikte membran fonksiyonundaki değişiklikler, ölçümlerle belirlenebilir. En yaygın ölçümler, elektriksel iletkenliğin ölçülmesi ile erimiş madde sızmasının ve ayrıca fotosistem II'nin azalan seviyelerinin belirlenmesi ile ilgilidir.

Polenlerin üşümeye karşı dayanıklılıkları, prolin birikimi ile gerçekleşebilir. Çimlenme sırasındaki üşümeye olan dayanıklılık ise, tohumun suyu almasını yavaşlatıcı mekanizmalarla sağlanabilmektedir. Düşük sıcaklıklarda suyun hızlı olarak alınması, membran yıkımına ve sonra da erimiş madde kaybına yol açabilmektedir (Wery ve ark., 1993).

Üşümeye-duyarlı bitkiler arasında iki tip ayrılabilir: Bitkinin her bir bölümünün zarara duyarlı olduğu, "Total Olarak Duyarlı Türler" ve soğuk zararından sadece "Kısmen Zarar Gören Türler" (çiçek primordiyası veya meyveler gibi). Üşümeye-dayanıklı bazı türlerin meyveleri ile tropikal orijinli belirli bitkiler, yaklaşık 10 ve 0 °C arasındaki sıcaklıklarda ölümcül zararlar görebilirler. Bir bitkinin organları ve dokuları arasında da duyarlılık konusunda belirgin farklılıklar vardır. Ayrıca bir bitkinin yaşam döngüsündeki tohum şişmesi, çimlenme ve senesens gibi belirli dönemler soğuğa daha yüksek duyarlılık göstermektedirler (Larcher, 1995).

21.3.3. Donma şekilleri ve zararları

Don zararı, suyun donma noktasının altındaki sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Donma işlemindeki en önemli stres, buz oluşması ve bunun neden olduğu mekanik zararlardır. İki çeşit buz oluşumu vardır:

1) *Hücre içi buz oluşumu*: Protoplastın genellikle yüksek miktarda su içerdiği ve dayanıklı olmadığı durumlarda, ya da önceden soğumanın meydana gelmediği

koşullarda, hücre içi buz oluşumları meydana gelmektedir. Bu tipteki buz oluşumu, hücrenin su kaybına (dehidrasyonuna) ve bunu takiben de hücre membranının tahrip olmasına yol açmaktadır.

2) *Hücre dışı buz oluşumu*: Buz oluşumları, eğer önce hücreler arası boşluklarda ve sonra hücre duvarı ile protoplast arasında meydana gelirse, bu “hücre dışı (ekstraselüler) buz oluşumu” olarak adlandırılır. Bitki hücresi etrafında bir matris oluşturulan hücre dışı buz oluşumu, mekanik zararlara ve oksijen azlığına yol açarak nekrotik zonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu zonlar ise, patojenin bitkiye girmesine yardım etmektedirler.

Su, hacminin üçte ikisini azaltabilen protoplasttan çekilir, bu duruma uygun olarak, tuz iyonları ve organik asitler anormal olarak, yüksek konsantrasyonlara ulaşırlar ve toksik etki göstererek enzimleri inaktif hale getirirler. Bu koşullar altında biyo-membranlar, ozmotik olarak ve hacim azalmasının her ikisi ile aşırı yüklenirler, biyo-membranların lipidleri bozulur, proteinler çözünür ve ATPaz aktivitesi de bozulur. Protoplazmadan suyun çekilmesi sonucunda, protoplazmanın ince yapısı, geri dönüşümsüz olarak tahrip edilmiş olur (Wery ve ark., 1993, Larcher, 1995; Taiz ve Zeiger, 1998).

21.3.3.1. Donmaya adaptasyon

Düşük sıcaklıklarda veya buz oluşumlarında tüm bitkiler hayatlarını sürdüremeyebilirler. Soğuğa dayanıklılık konusunda ekolojik olarak önemli gruplar vardır:

1) *Donmaya duyarlı bitkiler*: Bu bitkiler donmayı geciktirici önlemlerle sadece zararlardan korunurlar. Soğuk mevsimlerde, hücre özsuyu ve protoplazmasında ozmotik olarak aktif maddelerin konsantrasyonunda bir artış meydana gelir. Bazı algler, tropikal ve subtropikal damarlı bitkiler ve ılıman bölgelerin çeşitli türleri, tüm yıl boyunca donmaya duyarlılık gösterirler.

2) *Donmaya toleranslı bitkiler*: Bazı algler, yosunlar, kışları soğuk bölgelerdeki çok yıllık karasal türler, mevsimsel olarak donmaya toleranslıdır.

Bir bitkinin değişik organ ve dokuları, sıcaklığa karşı dayanıklılıkları bakımından oldukça farklılık gösterirler. Kış tomurcuklarındaki çiçek primordiyası ve çiçeklerdeki yumurtalıklar gibi üreme organları, dona özellikle duyarlıdır. Toprakaltı organlarının da oldukça duyarlı olmalarından dolayı, soğan, yumru ve rizomlarla elde edilen don dayanıklılığı, özellikle geofitlerin hayatta kalabilmeleri açısından yaşamsal olarak büyük önem taşımaktadır. Toprak üstü sürgünleri, bitkinin dona en az duyarlı kısımlarıdır. Bütün dokular içinde sürgün kambiyumu dona en dayanıklı olanıdır. Rejeneratif tomurcukların dayanıklılıkları ise dona maruz kalma ile orantılı olarak artma göstermektedir (Larcher, 1995).

Donmaya dayanıklılık mekanizmaları, bitkilerin vejetatif kısımları ve özellikle de sürgünleri ile ilişkilidir.

21.3.3.1.1. Donmadan kaçınma

Eğer kışlık ekilen ürünlerin çıkışları don periyodundan sonra gerçekleşirse, bu bitkiler dayanıklılık kazanmış olurlar. Bezelyede çiçeklenmenin başladığı dönem, dona en duyarlı dönemi oluşturmaktadır. Kaçış mekanizması, ancak vernalizasyon ile ve bu fenolojik dönemin geciktirilmesi ile elde edilebilmektedir. Dondan kaçınmanın diğer bir tipi ise morfolojik değişiklikler ile elde edilebilir. Yere yatık bir büyüme habitusuna sahip olan rozetsi bitkiler, kış süresince dona daha dayanıklıdır. Gerçekte, koruyucu ve kaçınmaya yarar mekanizmalar ile don zararından sakınılabilmektedir. Donun önlenmesi, ısı kayıplarını azaltıcı temel bir izolasyona dayanmaktadır. Bu ise, rejeneratif tomurcukları çevreleyen koruyucu formların oluşumu, ya da şiddetli donun meydana gelmesinden önce duyarlı organların (örneğin yapraklar) absisyonu ile gerçekleştirilebilmektedir. Tropikal alanlardaki yüksek dağlarda bulunan ıri rozetsi bitkilerin yaprakları, geceleri sürgün uçları üzerine kapanarak, bu kısımlarını donmadan korurlar.

Hücre içi buz oluşumundan iki mekanizma ile kaçınılabilir: i) Ozmotik ayar ve ii) süper soğuma. Ozmotik ayar, hücrenin donma sıcaklığını azaltabilir. Donma noktasının ve süper soğumanın (donma noktasının altındaki soğumanın) düşürülmesi, bitki dokularında suyun donmasını geciktirebilir. Çünkü donma noktası, mevcut erimiş maddeler ile düşürülebilmektedir. Donma noktasının düşürülmesi, donmaya karşı sadece ılımlı, fakat güvenilir bir korumayı sağlar. Süper soğuma, ksilemdeki buzun ilerlemesinin bir boğum ile sınırlandırıldığı, ya da su içeriğinin düşük olduğu durumlarda, özellikle meristemlerde meydana gelmektedir.

Bazı tohumlar, tomurcuklar ve kabuk dokuları, taşınabilen buz oluşumu veya ekstra doku donması olarak da bilinen üçüncü bir mekanizmaya sahip olabilirler. Bu mekanizma, suyun, dokulardan yoğun buz yığınları oluşturmak üzere donduğu hücreler arası boşluklara, ya da diğer boşluklara hareketini kapsamaktadır. Bu durumda hücre özsuyu yoğunlaşır ve hücre içi donma geciktirilebilir. Ayrıca su, *Opuntia humifusa* sürgünlerinde olduğu gibi, kışın biriktirildiği bilinen hidrofilik mukopolisakkaritler tarafından da bağlanabilmektedir (Wery ve ark., 1993; Larcher, 1995).

21.3.3.1.2. Donma toleransı

Donma toleransı; bitkinin, hücre dehidrasyonundan kaçınma ile hücre dışı buz oluşumuna, membran stabilitesinin artması ile de hücre içi buz oluşumuna dayanabilme yeteneğidir. Hücre dışı buz oluşumunun sınırlandırılması, dona karşı toleransa katkıda bulunmaktadır. Ozmotik ayar, hücrede suyun tutulması için ilginç

bir mekanizmadır, fakat etkisi sınırlı gerçekleşmektedir. Sitoplazmik olarak suyun bağlanması, dona dayanıklılığın nedeni olabilir. Donma toleransı, hücre büzülmesine ve donmadaki su kaybına olan toleransları kapsamaktadır. Şiddetli dona dayanmak zorunda olan bitkiler açısından protoplazmalarının donmaya karşı toleranslı olması gereklidir. Donma toleransının bu durumu, biyo-membranlara soğukta-stabil fosfolipidlerin bağlanması ile; çözünebilir karbonhidratların (şeker ve oligosakkaritler), poliollerin, düşük-moleküler azot içeren maddelerin (amino asit, poliaminler) ve suda çözünür proteinlerin birikmesiyle gerçekleştirilebilir. Bu maddelerin koruyucu etkinliği, kısmen sitoplazmadaki partiküllerin konsantrasyonunun artmasından kaynaklanabilmektedir (Larcher, 1995; Taiz ve Zeiger, 1998).

21.3.3.1.3. Kış kuraklığı

Toprak donduğunda, buharlaşma kayıpları çok az olsa bile, bitkiler ihtiyaçlarını karşılamak için yeterli suyu alamaz hale gelirler. Bitkiler için donmuş toprak, kuru toprak anlamına gelmektedir. Bu durum, 'don kuraklığı' ya da 'kış kuraklığı' olarak bilinmektedir.

Düşük fakat pozitif toprak sıcaklıklarında, kökler tarafından su ve besinlerin alınımı, toprak ve kökler arasındaki transfer dirençlerinin artması ve kök büyümesinin olmaması yüzünden bozulma göstermektedir. Toprakların derinlemesine donduğu ve az kar örtüsünün olduğu yerlerde, kış kuraklığına yaygın olarak rastlanmaktadır. Kış kuraklığı, iki modelden birine göre ilerlemektedir: i) Su bilançosunun "akut yıkımı", kışın dahi stomalarını kolaylıkla açan bitkilerde meydana gelen bir olaydır. Bu durumda, soğuk veya donmuş topraktan çekilenden daha fazla su kaybedilmektedir. ii) "Kronik zarar" ise, sadece kış dormansisi boyunca stomalarını hafifçe açan bitkilerde gözlenen bir durumdur. Bu bitkiler kütükula veya periderm yoluyla transpirasyon yaparlar ve suyu çok yavaş kaybederler. Koniferler ve yapraklarını döken ağaçlar, bu tipe dahildirler. Genel olarak, daha yüksek transpirasyon yapan bir bitkinin daha düşük su depolama kapasitesine sahip olduğu ve kış kuraklığına ise daha fazla duyarlı olduğu belirtilebilir. Kuruma riskini arttıran diğer faktörler; rüzgar, hayvan otlatması ve parazitik funguslar nedeniyle kütükulanın aşınmasıdır. Ağaçların hayatta kalabilmeleri açısından, kar örtüsünün süresi, kar kalınlığı ve toprak donması oldukça önemli faktörlerdir.

21.3.3.1.4. Buz veya kar altında uzun süre kalmanın zararlı etkileri

Kar örtüsü, çok düşük sıcaklıklar ile rüzgar ve kış kuraklığından korunmaya yardımcı olmasına rağmen, kar örtüsünün altında kalan bitkiler üzerlerindeki bu ağırlığı taşımak zorundadırlar. Sıkışma yoğunluğuna bağlı olarak, 20 cm kalınlığındaki bir kar örtüsü gün ışığının sadece %1-15'ini içinden geçirebilir.

Etrafı buz veya karla çevrili bitkilerin gaz değişimi, büyük ölçüde engellenmiştir. Çünkü buz tabakaları ve sıkışmış kar, düşük CO₂ ve O₂ geçirgenliğine sahiptir. Bitkilerin ve mikroorganizmaların solunumlarına ait CO₂ yüksek konsantrasyonlara ulaşırken, aynı zamanda oksijen konsantrasyonu anormal düzeyde düşme gösterir. Bu koşullar altında toksik maddeler, anormal metabolik yollarla birikirler. Etil alkolün ve CO₂ konsantrasyonlarının artması sonucunda, bu ikisinin etkisiyle zararlar meydana gelebilir. Zayıflama gösteren bitkiler, dona karşı daha düşük dayanıklılığa sahiptirler ve soğuk-seven fungusların, örneğin kar mantarlarının saldırıları açısından uygun durumdadırlar (Larcher, 1995).

21.4. Kuraklık

Sıcaklığın bitki büyümesine izin verdiği bölgelerde su, bitki verimliliğini en çok sınırlayan faktörler arasında yer alır. Uygun bir termodinamik durumda çok az su temin edilirse, kuraklık stresi meydana gelmektedir. Bu durum, yoğun evaporasyon, tuzlu topraklarda suyun ozmotik olarak bağlanması veya toprağın donması gibi bir takım nedenlerden kaynaklanabilir. Kuraklığın yol açtığı stres, birdenbire oluşmaz, yavaşça gelişir ve daha uzun süren bir yoğunlukla artma gösterir. Bu nedenle, zaman boyutu kuraklık stresine karşı hayatta kalabilmeye önemli bir role sahiptir (Pugnaire ve ark., 1994; Larcher, 1995).

Kuraklık terimi; topraktaki su içeriğinin, bitkilerin su azlığından sıkıntı çektiği miktara düşünceye kadar belirgin yağışın olmadığı bir periyodu ifade etmektedir. Toprak kuruluğu, hava kuruluğunun ve radyasyonun birlikte yol açtığı güçlü evaporasyonla bir aradadır. Su stresi, transpirasyonun kökler tarafından gerçekleştirilen su absorpsiyonunu aştığı durumlarda meydana gelmektedir (Turner ve Begg, 1981; Larcher, 1995).

21.4.1. Bitkilerde kuraklık zararları

Su eksikliği; hücre hacminin azalmasına, hücre özsuyu konsantrasyonunun artmasına ve protoplazmada artan bir dehidrasyona sebep olur. Su eksikliğinde bitkilerin büyümeyle ve özellikle de uzama büyümesiyle ilgili işlemlerde yavaşlamalar ve turgorlarında azalmalar meydana gelmektedir. Kısa süre sonra protein metabolizması ve amino asit sentezinde bozulmalar oluşur. Su eksikliğinin bir sonucu olarak, en çok engellenen enzimlerden biri nitrat redüktazdır. Protein metabolizmasında sentezin azalması, hücre bölünmesini bastırır, hatta orta şiddetteki kuraklık stresi mitozu yavaşlatabilir. Bu durumda, en fazla S fazı etkilenmektedir. Eğer su stresi polen gelişimi boyunca meydana gelirse mayoz, kromozom anormallikleri gösterir ve özellikle de metafaz ve anafazda düzensizlikler oluşur. Bu nedenlerden dolayı kuraklık, polen fertilesini düşürmektedir. Ilımlı bir su stresi, köklerdeki karotenoidlerden absizik asit sentezini tetiklemede yeterli olabilir. Bitkinin farklı kısımlarına bir "kök sinyali" olarak iletilen ABA, yapraklarda stoma kapanmasını başlatır. Kuraklığa tepki olarak yapraklarda ve köklerde sentezlenen hormonların etkisi ile asimilatların dağıtımında değişiklikler

meydana gelir, sürgütün kök büyümesine olan oranı değişir ve karakteristik morfojenetik özellikler gelişir (Larcher, 1995). Su stresine karşı bitkilerde kalın veya mumsu kütikula tabakalarının oluşması, su kaybının azalmasına yol açar (Göksoy ve Turan, 1991). Üreme ile ilgili olaylar zamanından önce başlar. Eğer dehidrasyon derecesi artma gösterirse, katabolik olaylar hakim duruma gelir, senesens hızlanır ve daha yaşlı yapraklar kuruyarak dökülür. Yaprak genişlemesi ve senesens, su eksikliğine çok duyarlıdır (Turner ve Begg, 1981; Larcher, 1995). Toprakta su azlığı, kök yüzeyine doğru iyon difüzyonunu azaltmaktadır (Alam, 1994; Eryüce ve ark., 1998).

Bu olayların bir çoğu, başlangıçta tamamen geri dönüşümlüdür. Turgor azalmaya başladığında, ozmozü düzenleyici önlemler başlatılır. Organik azot bileşiklerinin sentezi ve nişastanın çözünür karbonhidratlara dönüşümü, hücre kompartımanlarında ve sitozolde suyun ozmotik olarak içeri alınmasını teşvik ederek, düşük moleküler organik maddelerin birikmesine yol açar. Bu durum, hücre hacminin korunmasına yardım eder ve stoma açma-kapama hücrelerindeki gibi mezofilde de turgorun kaybını geciktirir. Böylelikle, karbon asimilasyonu için daha fazla zaman ayrılarak, stomalar daha uzun süre açık kalabilirler. Bitki solma gösterdiğinde, hücre kendi hacmi ile orantılı olarak farklı hücre kompartımanları ile birlikte büzülme gösterir. Hücre içi eriyiklerin ve özellikle de iyon konsantrasyonlarının artması, fotosentezin sekonder reaksiyonlarını ve mitokondriyal solunumu bozar. Merkezi vakuol, küçük boyutlu vakuollere bölünür, kloroplastlardaki tilakoidlerde ve mitokondriyal kristalarda bozulmalar meydana gelir, çekirdek membranı gerginleşir ve poliribozomlar parçalanır. Biyo-membranların adezyonu ve parçalanması da hücre ölümüne yol açan son olaylardır.

21.4.2. Kuraklığa adaptasyon

Kuraklığa dayanıklılık, bir bitkinin kurak periyotlara dayanıklılık kapasitesidir ve kompleks bir özelliktir. Kuraklıktan kaçınmada; protoplazmanın su potansiyelindeki zarar verici bir azalmanın uzun sürmesi engellenebilmektedir. Kuraklık toleransında ise, protoplazma zarar görmüş hale gelmeden daha fazla kuruma göstermektedir. Büyümelerini zamanlayarak kuraklıktan kaçan ve yeterli su sağlandığında, kısa sürede büyümeyi sağlayan türler bulunmaktadır (Larcher, 1995). Bitkilerde suyu muhafaza eden ve harcayan tiplere rastlanılmaktadır. Suyu muhafaza edenler, suyun bir kısmını yaşamlarının sonraki dönemlerinde kullanmak üzere toprakta muhafaza ederek dikkatli kullanırlarken, suyu harcayan bitkiler ise suyu aşırı şekilde ve fazla miktarda tüketirler (Taiz ve Zeiger, 1998).

Su istekleri yönünden bitkiler üç grupta yer alırlar:

1) Hidrofitler: Çok nemli topraklarda ve bataklıklarda yetişen bitkilerdir. Kökleri yüzeyssel ve az dallıdır, solunumlarını suda erimiş halde bulunan oksijenden

yararlanarak devam ettirirler. Sünger mezofilleri çok iyi gelişmiştir. Çeltik tipik bir hidrofit bitkidir.

2) *Mezofitler*: Kültür bitkilerinin hemen hepsi bu gruba dahildirler; kısmen kurak, kısmen de nemli bölgelerde yetiştirilebilirler.

3) *Kserofitler*: Kurak koşullarda yaşamlarını sürdürebilen bitkilerdir. Morfolojik ve fizyolojik açıdan farklılık gösteren üç alt sınıfa ayrılırlar.

- a) *Kısa ömürlü efemer bitkiler*: Yaşam devrelerini 20-40 gün arasında tamamlayan, çok kısa ömürlü çöl bitkileridirler.
- b) *Sukulent bitkiler*: Hücrelerarası boşluklarını genişleterek bünyelerinde suyu tutabilen özel dokuları geliştirmişlerdir. Transpirasyonları oldukça yavaş gerçekleşmektedir.
- c) *Sukulent olmayan bitkiler*: Derinlere inen, dallanan kök sistemine ve küçük, tüylü toprak üstü organlarına sahiptirler. Hücre özsuyunun ozmotik basıncı oldukça yüksek olan bitkilerdir (Eser, 1986).

21.4.2.1. Kuraklıktan kaçınma

Bitkilerin dokularındaki uygun su içeriklerini, koruyucu mekanizmalarının yardımıyla, hava ve toprak kuruluşuna rağmen, korumaları mümkün olabilmektedir. Bu ise;

- topraktan iyileştirilmiş su alımı ile,
- difüzyona dayanıklılıkta erken ve etkili bir artış ile,
- transpirasyon yüzeyinin azaltılması sonucu meydana gelebilen su kaybının azaltılması ile,
- yüksek bir su iletim kapasitesi ile veya
- su depolanması ile gerçekleştirilebilmektedir.

Kuraklıktan kaçınma için gerekli olan bu fonksiyonel önlemler, bitki morfolojisine de yansımaktadır. Yaprak alanının küçülmesi, su eksikliğine erken adapte olan bir yaklaşımdır ve savunmanın ilk adımı olarak düşünülebilir. Savunmanın ikinci adımı ise nemli toprak tabakalarına doğru derinlemesine kök gelişimidir. Stomalar su eksikliği süresince absizik asidin birikimi sonucu kapanırlar. Stomaların kapanması da kuraklığa karşı savunmanın üçüncü bir yolu olarak kabul edilebilir. Su azlığı, krassulasik asit metabolizmasını (CAM) teşvik eder. CAM, stomaların gece açık, gündüz kapalı olduğu bir bitki adaptasyonudur. CAM bitkilerinin su kullanım etkinlikleri, diğer bitkilere göre çok yüksektir. Transpirasyonun azaltılması, mevcut suyun korunmasına yardım eder. Su eksikliği durumunda, yaprak dökümü teşvik edilmekte, fotosentez sınırlanmakta ve yapraklarda enerji dağılımı değişmektedir. Su stresine karşı çok rastlanan bir gelişme tepkisi de, yaprak yüzeyinde mum birikiminin artmasıdır. Suyun depolanması yolu ile elde edilen kuraklıktan kaçınma

mekanizması, yüzey alanının azalması ve epidermisin transpirasyona olan yüksek dayanıklılığı ile birlikte olduğunda en mükemmel sonucu vermektedir. Sukulent bitkiler, nisbeten büyük ve özelleşmiş olan dokularında su rezervlerini düzenleme yoluna gitmektedirler (Larcher, 1995; Taiz ve Zeiger, 1998).

21.4.2.2. Kuraklık toleransı

Kuraklık toleransı, türe özeldir ve protoplazmanın su kaybını ciddi boyutta tolere etme kapasitesini adapte etmektedir. Bitkiler aleminde protoplazmanın kuraklık toleransı, büyük ölçüde değişim göstermektedir (Larcher, 1995). C₄ bitkileri, C₃ bitkilerine göre su stresine daha toleranslıdır ve su kullanma yetenekleri, C₃ bitkilerinden iki kat daha fazladır. Bununla birlikte, değişik C₄ bitki türlerinin su kullanma ve tolerans yeteneklerinde de büyük farklılıklar vardır. Su stresine karşı bitkilerin toleranslılıkları açısından; belli bir sürede nisbi büyüme oranlarının tespit edilerek, en uygun toprak-su koşullarında yetiştirilen kontrol bitkileriyle, su stresine maruz kalmış bitkilerin kuru maddelerinin karşılaştırılması ve bu bitkilerin stomalarını kapatarak ve yapraklarını dökerek su stresinden kaçınma yeteneklerinin belirlenmesi büyük önem taşır. Şiddetli olmayan kuraklıkta büyüme oranlarının ve şiddetli kuraklıklarda ise stresten kaçınma yeteneğinin tespiti daha yerinde olmaktadır (Yamada, 1984). Kuraklığa tam toleranslı olan organizmalar, bazı siyanobakteriler, fungal miseller, değişik yosunlar ve eğreltilerdir (Larcher, 1995).

21.5. Toprakta Oksijen Eksikliği

Suyun noksanlığı kadar, fazlalığı da bitkilerde stres oluşturan önemli bir faktördür. Su altındaki topraklarda, boşlukların suyla dolması nedeniyle, O₂ eksikliği ortaya çıkmaktadır (Eryüce ve ark., 1998). Rhizosfer içinde oksijen eksikliği yaygın gözlenen bir durumdur. Toprak atmosferinin oksijen içeriği; köklerin, toprak hayvanlarının ve aerobik mikroorganizmaların oksijeni tüketmeleri nedeniyle azalabilmektedir. Atmosferik oksijen, suyla doymuş ve sıkışarak geçirimsiz hale gelmiş topraklara çok yavaş girebilmektedir. Toprak oksijensiz hale geldiğinde, anaerobik mikroorganizmalar, Fe⁺², Mn⁺², H₂S, sülfid, laktik asit ve bütirik asidin toksik konsantrasyonlarda olduğu güçlü indirgenmiş bir ortam oluşturmaktadırlar. Bu durumda toprağın redoks potansiyeli azalma göstermekte ve toprakta azot çevrimi fark edilir şekilde gerilemektedir. İnce porlu killi topraklar, oksijen eksikliğine özellikle uygunluk göstermektedirler (Larcher, 1995; Eryüce ve ark., 1998).

21.5.1. Bitkilerde oksijen eksikliğinin yol açtığı zararlar

Kökler, anaerobik toprak suyunda zarar görerek, çalışamaz hale gelebilmektedirler. Köklerin suya olan geçirgenlikleri azalmakta, transpirasyon oranı düşmekte, mineral

besinlerin alınım oranları azalarak büyüme durmaktadır (Alam, 1994; Taiz ve Zeiger, 1998). Total ve totale yakın oksijen eksikliğinde (anoxia), solunum anaerobik disimilasyona çevrilerek, asetaldehit ve etanol birikimi meydana gelmektedir. Etanol içeriğinin artması, oksijen eksikliğinin karakteristik bir belirtisidir. Absizik asit, etilen ve etilenin öncül maddeleri, yapraklarda kısmi stomatal kapanmayı, epinastiyi ve absisyonu teşvik edecek şekilde yüksek miktarlarda oluşurlar. Membran sistemleri bozulur, mitokondrideki elektron taşınımı ve oksidatif fosforilizasyon sona erer, Krebs döngüsü çalışmaz ve ATP, sadece fermentasyon ile üretilebilir. Mitokondri ve mikrobodiler parçalanarak, bunların enzimleri de kısmen inhibe edilir (Larcher, 1995).

21.5.2. Oksijen eksikliğine adaptasyon

Birçok bitki, oksijeni az topraklarda çimlenerek büyüebilmektedir. Çünkü bitkiler, anoksik bir çevredeki koşullara karşı belirli adaptasyonları geliştirilebilmektedirler. Oksijen eksikliğine fonksiyonel bir adaptasyon, anaerobiyosis boyunca alkol dehidrogenaz (ADH) artışının olmaması ile elde edilebilmektedir. Aynı zamanda protein metabolizmasının ayarlanması ile son ürün olarak etanol yerine laktik asit, şikimik asit veya malik asit oluşumu sağlanmaktadır. Hipoksik ortamlara morfolojik adaptasyon ise aerenkimanın (hava parenkimasının) gelişmesi ile elde edilebilmektedir. Su altında kalan alanlarda kavak, söğüt, akağaç, dişbudak ağacı, ökolaptus türleri ve bazı koniferler, yoğun su kökleri oluştururlar (Larcher, 1995). Bazı bitkilerin oksijensiz koşullara daha fazla toleranslı olduğu gözlenmektedir. Çünkü bu bitkilerde sürgünlerden köklere doğru hücrelerarası boşluklar yolu ile O₂ daha hızlı difüzyona uğramakta ve kökler anaerobik solunumu böylelikle tolere edebilmektedirler (Eryüce ve ark., 1998).

21.6. Tuz Stresi

Tuz, yeryüzündeki yaşamın evrimi süresince karşılaşılan ilk kimyasal stres faktörüdür. Başlangıçtan itibaren organizmalar, iyonların düzenlenmesi ve protoplazmik yapıların stabilizasyonu için etkili mekanizmaları geliştirmek zorunda kalmışlardır. Tuzlu habitatlar, kolay çözünen tuzların anormal düzeyde yüksek içeriklerine sahiptirler. Okyanuslar, tuz gölleri ve tuzlu havuzlar, akuatik (suya ait) tuzlu habitatlar olarak kabul edilirler. Nemli ve kurak iklim koşullarının her ikisinde de tuzlu topraklar mevcuttur. Okyanuslara ait aerosol formundaki tuzlar, denizden 100 km içerilere doğru rüzgar ve bulutlarla da taşınabilmektedirler. Toprakların tuz içerikleri kışın yolların buzlanmasını önlemek için kullanılan tuzlarla da artma gösterebilmektedir.

Açık okyanuslarda tuz konsantrasyonu (ortalama 480 mM Na⁺, 560 mM Cl⁻un üzerinde) sabit kalırken, interdidal zonda ise tuzluluk çok geniş bir aralıkta (290-810

mM Na⁺) dalgalanma göstermektedir. Tuzlu bataklıklarda Na⁺ konsantrasyonu 600-1000 mM kadar fazla miktarlara zaman zaman artabilmektedir.

Tuzlar; bitkilerin vejetasyon süresince, evaporasyon ve transpirasyondan kalan kalıntılar olarak bitki bünyesinde birikebilmektedir. Yaprak ve diğer kısımların ölererek yere düşmelerinden sonra da tuzlar, yağışlarla toprağa tekrar geri dönebilmektedir. Toprak tuzluluğu, topraktan oluşan evaporasyonun yıl boyunca toprağa süzülen yağış miktarından daha fazla olduğu kurak bölgelerde büyük ölçüde artma göstermektedir. Taban suyunun yüksek olduğu veya drenajın olmadığı çukur alanlarda, sulama suyunda ve yetersiz drenaj koşullarında farkedilir derecede yüksek tuz içeriğinin olduğu gözlenmektedir. Sulamaların yoğun olarak yapıldığı alanlarda da fazla miktarda tuz birikimi olmaktadır.

Nemli bölgelerde tuzlu topraklar esas olarak NaCl içerirler. Bu tip nötral tuzlu topraklar kurak bölgelerde de meydana gelmektedir. Step ve çöl toprakları ise kendilerini daha alkalın yapan Na, Mg ve Ca'un sülfat ve karbonatlarına sahiptirler. Steplerde meydana gelen sodyum topraklarının (solonetz) yüksek pH değerleri (8.5-11), NaHCO₃, Na₂CO₃ ve NaOH gibi temel tuzların varlığından kaynaklanmaktadır. Yarı-kurak alanlarda oldukça tuzlu solonçek topraklar genellikle, yüzeydeki tuz kırıntıları ile tanınırlar. Bunlar sodyum, magnezyum ve kalsiyumun klorid, sülfat ve bi-karbonatlarından ibarettirler. Bu tip topraklar, yüksek miktarlarda jips içerirler, kuruduklarında yüzey serttir ve çatlaklara sahiptirler (Larcher, 1995).

21.6.1. Bitkilerde tuz stresinin zararları

Tuzluluğun bitki üzerindeki etkileri, nem, sıcaklık, sulama, gübreleme, hava kirliliği ve ışık yoğunluğu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Kantar ve Elkoca, 1998). Yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkilerde yarattığı sıkıntılar, suyun ozmotik olarak tutulmasından ve spesifik iyonların protoplazma üzerine olan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Su, tuz çözeltilerinde ozmotik olarak tutulmaktadır. Böylelikle tuz konsantrasyonu artarken, bitkilere suyun girişi daha az gerçekleşmektedir. Protoplazmada Na⁺ ve Cl⁻ miktarlarında artışların olması, enzim proteinleri ve membranlar üzerindeki iyonun spesifik etkilerinde olduğu gibi, iyonik dengede de (K⁺ ve Ca⁺² ile Na⁺) karışıklıklara yol açmaktadır. Solunuma ait zincirde fotofosforilizasyon ve fosforilizasyon ile çok az enerji üretilmekte, azot asimilasyonu bozulmakta, protein metabolizmasında karışıklıklar oluşmakta, ayrıca putresin, kadaverin gibi diaminlerin ve poliaminlerin birikimi gerçekleşmektedir. Fotosentez, sadece stomaların kapanması ile değil, ayrıca tuzun kloroplastlar üzerindeki özellikle elektron taşınması ve sekonder olaylar üzerindeki etkileriyle de bozulma gösterebilmektedir. Özellikle köklerdeki solunum tuzdan etkilenmektedir. Glikoliz ve trikarboksilik asit (Krebs) döngülerinin enzim sistemleri, tuza daha duyarlıdır. Toprağın NaCl içeriği yüksek olduğunda, mineral besin alınımları, özellikle de NO₃⁻, K⁺ ve Ca⁺²'un alınımları azalmaktadır.

Büyüme ile ilgili olaylar, tuza duyarlılık gösterir. Bu nedenle de büyüme oranları ve biyomas üretimi, tuz stresinin derecesini ve bitkinin buna dayanma yeteneğini belirlemek için güvenilir bir ölçüttür. Fide ve genç bitkiler, olgun halofitlere göre tuza daha duyarlılık göstermektedirler. Genç bitkiler, köklerinin en yüksek tuz konsantrasyonu içeren toprağın üst tabakaları ile çevrelenmesinden ötürü, daha büyük zararlara maruz kalırlar. Çimlenme, tuzsuz veya az tuzlu ortamlarda çok başarılı olarak gerçekleşmektedir (Larcher, 1995).

Ekstrem tuz stresi, bodurlaşmaya ve kök büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Bu stresin etkisi ile tomurcuk açması gecikmekte, sürgünlerin boyu kısalmakta, yapraklar küçülmekte ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca köklerde, tomurcuklarda, yaprak kenarlarında ve sürgün uçlarında nekrozlar oluşmakta, yapraklar sararmakta ve sürgünün tüm kısımlarında kurumalar meydana gelmektedir. Bitkilerde hormonal denge, tuzluluk tarafından etkilenen önemli bir faktördür. Sitokininin düşük seviyeleri, absizik asit ve etilenin artan miktarları, olgunlaşmanın erken başlamasında etkili olmaktadır (Poljakoff-Mayber ve Lerner, 1994; Larcher, 1995).

Tuz stresi, bitkilerde ölüme yol açabilmekte, tuz konsantrasyonu ve bitkinin dayanıklılığına göre büyümeyi engellemekte, yaprak yanıklığı gibi nekrozlara, klorozlara, dölleme bozukluklarına, meyvelerin küçük kalmasına, kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Sivritepe ve Eriş, 1996a).

21.6.2. Tuza adaptasyon

Bitkiler tuza tolerans kapasiteleri bakımından iki grupta yer almaktadırlar (Larcher, 1995; Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 1998):

1) **Halofitler (tuzcul bitkiler):** Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilirler. Tuz düzeyi düşük koşullarda yaşayamazlar. Tuzlu habitatlarla çevrelenmiş obligat halofitlerde büyüme, tuzun ılımlı miktarlarının alınımı ile ilerletilebilir. Sadece tuz yüksek seviyelere ulaştığında büyüme bozulur ve bitki, antosiyanin üretimi veya klorofil parçalanması gibi stres sinyalleri gösterir. Obligat halofitlere örnek olarak *Salicornia herbacea* ile *Atriplex vericaria* verilebilir. Fakültatif halofitler, hafif tuzlu topraklar üzerinde gelişirler; tuz miktarının arttığı durumlarda ise büyümeleri kısa sürede engellenir.

2) **Glikofitler:** Tuza duyarlı bitkilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayamazlar. Tarımı yapılan bitkiler arasında mısır, soğan, turuncgiller, ceviz, marul ve fasulye tuza yüksek oranda duyarlı, pamuk ve arpa orta derecede toleranslı, şeker pancarı ile hurma ağacı ise yüksek oranda toleranslı bitkilerdir (Taiz ve Zeiger, 1998).

Tuzlu habitatlarda büyüyen bitkiler, tuz etkilerinden kaçınmayabilirler ve bu nedenle en azından bir miktar dayanıklılık geliştirmek zorundadırlar. Tuza maruz

kalan bitkilerde büyüme ve metabolizmanın korunabilme derecesi “tuza dayanıklılık” olarak adlandırılmaktadır. Tuza dayanıklılık, bir bitkinin ya protoplazmada ulaşılan aşırı tuz miktarlarının düzenlenmesi, diğer bir ifade ile tuz regülasyonu yolu ile olan kaçınma veya alternatif olarak, artan iyon konsantrasyonu ile bir araya gelen toksik ve ozmotik etkileri tolere etme yeteneği ile sağlanabilmektedir (Levitt, 1972; Larcher, 1995; Sivritepe ve Eriş, 1996b).

21.6.2.1. Tuz içeriğinin düzenlenmesi: Tuzdan kaçınma

Halofitler kendi tuz içeriklerini birkaç yolla düzenleyerek tuzdan kaçınmaya çalışırlar. Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

21.6.2.1.1. Tuzu bünyeye almama

Bu mekanizmada kök ve sürgünlerdeki tuz taşınımının engellenmesi söz konusudur. Örneğin, bazı mangrov türlerinde köklerdeki taşınım bariyerleri tarafından oluşturulan ultrafiltrasyon, iletim sisteminde su tuzluluğunun çok yüksek hale gelmesini önlemektedir. *Prosopis farcta*'da tuz iyonları, özellikle de Na^+ , kökler tarafından alınmalarına rağmen, tuzlar yapraklara hemen hemen hiç ulaşmamaktadır. Tuz iletiminin kesilmesi, değişik ürün bitkilerinde de meydana gelebilmektedir. Özellikle de halofobik türlerde fazla miktardaki iyonlar, köklerde, sapın üst kısımlarında, yaprak ve çiçek saplarında tutulurlar. Böylelikle de tuzun meristemlere, gelişmekte olan yapraklara ve genç meyvelere ulaşan miktarı azaltılmış olur.

21.6.2.1.2. Tuz eliminasyonu

Bir bitki, tuzları kök ve sürgün yüzeyleri ile dışarı atarak, özelleşmiş bezler ve tüylerle dışarı atarak, uçucu metil halidleri serbest bırakarak ve tuz içeren bitki kısımlarını dökerek kendisini aşırı tuzdan koruyabilir. Deniz canlılarından fitoplanktonlar, makroalgler ve funguslar, S-adenozil metionin transfer mekanizması yolu ile atmosfere salınan metil klorid, bromid ve iyodid üretirler. Tuz salgılayan bezler ise aktif olarak tuzları elimine ederek, belirli sınırlar içinde yapraklardaki birikimi idare ederler. Kurak bölgelerdeki bazı *Atriplex* türlerinin ve *Halimione*'un veziküler tüyleri, kloridleri hücre özsuunda biriktirdikten sonra ölürler ve yerleri yeni tüyler tarafından alınır. Tuzu gidermenin diğer bir yolu, önemli miktarlardaki tuzu biriktiren yaşlı yaprakların absisyonudur (Munns, 1993; Larcher, 1995).

21.6.2.1.3. Tuzun seyreltilmesi

Levitt (1972)'e göre tuz seyreltilmesi; tuz konsantrasyon artışını önlemek üzere suyun yeterli miktarda absorbe edilmesi sonucu hücre özsuyunun seyreltilmesi ile elde edilebilmektedir. Larcher (1995) ise tuz seyreltiminin "tuz sukkulensi" ve "tekrar dağılım" mekanizmaları ile de gerçekleştirilebildiğini ifade etmektedir:

Tuz sukkulensi: Hücrelerin depolama hacimlerinin tuz alımı ile kademeli olarak artma göstermesi, tuz konsantrasyonunun uzun süreyle muhafaza edilmesine yol açmaktadır. Klorid iyonlarının sorumlu olduğu bu tipteki sukkulens, kurak bölgelerin kserohalofitlerinde ve nemli-tuzlu çevrelerin halofitleri arasında yaygındır.

Tuzun tekrar dağılımı: Na^+ ve Cl^- floemde kolaylıkla iletilebildikleri için aktif olarak transpirasyon yapan yapraklarda meydana gelen yüksek konsantrasyonlar, bitkinin her yerine tekrar dağılım ile seyreltilebilir.

21.6.2.1.4. Tuzun protoplastlardaki bölmelerde biriktirilmesi

Halofitler ve tuzlu topraklarda yaşayan karasal bitkiler, hücre özsularında tuz biriktirerek ozmotik potansiyellerini azaltırlar ve turgorlarını korumaya çalışırlar. Ozmotik potansiyel, tuz birikiminin yanı sıra, organik asitler ve karbonhidratlar ile de azaltılabilir. Halofitlerin hücre özsularındaki Na^+/K^+ ve $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ iyon oranları, bitki familyası ve türüne genellikle özeldir. Tuz iyonlarının çoğunluğu vakuollerde birirmektedir. Böylelikle sitoplazmanın ve en önemlisi de kloroplastların maruz kaldıkları konsantrasyonlar azaltılarak, bunların enzim sistemleri doğrudan tuz stresinden korunmuş olmaktadır (Larcher, 1995).

21.6.2.2. Tuz toleransı

Tuz toleransı, tuz stresine dayanıklılığın protoplazmik bir komponentidir. Bu, protoplazmanın ait olduğu bitki türüne, doku tipine ve dinçliğe bağlı olarak, tuz stresi ile bir arada olan iyonik dengesizliği ve artan iyon konsantrasyonlarının ozmotik etkilerini tolere edebildiği dereceyi kapsamaktadır. Familya, cins ve türler arasında, hatta aynı türe ait çeşitler arasında da tuza toleranslılık bakımından da farklılıklar bulunmaktadır (Çopur ve Oğlakçı, 1995; Larcher, 1995).

Protein ve biyo-membran gibi protoplazmik komponentlerin tuza toleransları, stres proteinlerinin ve uygun sitoplazmik ozmotik eriyiklerin aracılığı ile elde edilebilmektedir. Artan tuz konsantrasyonlarında, belirli DNA dizininin aktivasyonundan sonra ve 3-6 saat içinde stres proteinleri teşvik edilir. Kuraklık- ve ısı-şok proteinlerine olan benzerlikler, çapraz koruma olasılığını göstermektedir. Sitoplazma ve farklı hücre bölümleri arasındaki ozmotik denge, uygun ve toksik olmayan organik bileşikler tarafından muhafaza edilir. Gerçekte birçok bitki; aşırı

tuz, kuraklık ve dondan kaynaklanan strese spesifik olmayan bir reaksiyon üretmektedir ve aminoasitlerin, amidlerin, kuarternar amonyum bazlarının, değişik şeker ve poliollerin oluşumu meydana gelmektedir. Belirli bitki grupları, kendilerine ait olan stres metabolitlerinin karakteristik örneklerine sahiptirler. Çözünür karbonhidratlar ve aminoasitler, yüksek iyonik konsantrasyonlarının protein ve biyo-membranlara verecekleri zararlı etkilerinden korunulmasına katkıda bulunmaktadır (Larcher, 1995).

Bitkilerin tuzluluğa karşı toleransı, genellikle üç şekilde değerlendirilmektedir:

- a) Tuzlu topraklarda bir bitkinin yaşamını sürdürebilme yeteneği,
- b) Mutlak bitki büyümesi ve verim,
- c) Tuzlu topraklardaki tuzlu olmayan topraklarla karşılaştırılan nispi büyüme veya verim (Maas, 1986).

Tuza dayanıklılık; kurak ve subtropik alanlardaki tarıma elverişli tuzlu toprakların değerlendirilmesi açısından agronomistler, ormancılar ve bahçe bitkileri ile ilgilenen uzmanlar için büyük önem taşımaktadır (Larcher, 1995).

21.7. Antropogenik Stres

Güneş, hava, su ve toprak birlikte, bitkilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için gereken enerjiyi, besini ve ortamı sağlarlar. Aynı zamanda çevre, zarar verici konsantrasyonlarda olan fitotoksik maddeleri de içermektedir. Doğada doğal olarak mevcut kimyasal elementlerin ve bileşiklerin bazıları (volkanik püskürmelerden kaynaklanan SO_2 , bataklık alanlardaki H_2S , topraktaki mikrobiyal denitrifikasyon sonucunda ve gök gürültülü fırtınalarda elektriksel boşalmalardan meydana gelen azot oksitleri gibi) bitkiler için potansiyel zararlıdır. Bugün insan aktivitesinin bir sonucu olarak bitkiler, zararlı maddelerin çok daha fazla miktarlarına maruz kalmaktadırlar. Bunların, özellikle bitkilere yabancı maddeler (zenobiyotikler) olması ve bitkilerin bu maddelere alışık olmamalarından ötürü, durum oldukça ciddidir. Çeşitli fitotoksik maddeler; endüstriyel işlemlerin, trafiğin, tarımda ve evlerde kimyasal madde kullanımının ve özellikle de fosil yakıtların aşırı tüketiminin bir sonucu olarak atmosfer, su ve toprağa dahil olmaktadır. Ayrıca, aşırı gübre kullanımı ve yoğun hayvan yetiştiriciliği gibi uygulamalarla da NH_3 ve metan gazları atmosfere katılmaktadır.

Vejetasyon üzerinde akut zarara neden olan toksik maddelerden, fosil-yakıtlı güç santrallerindeki, metalürjik ve seramik fabrikalarındaki SO_2 ve halojenler; lağım pisliklerindeki, atık depolarına yakın çöplüklerdeki ağır metaller ve metaloidler, buz eritici tuzlar, herbisitler, yol kenarları boyunca motor trafiğinden çıkan egzoz gazları, atık sularda, nehirlerde, göllerde ve okyanuslardaki toksik kimyasallar olarak değişik alanlarla sınırlanmışlardır (Larcher, 1995).

Yağmur suyunda çözünen kirlenici gazlar 'asit yağmurları' olarak yeryüzüne ulaşır. Asit yağmurları, antropogenik kirliliğin ürünleri olarak kabul edilirler. Kirlenici gazların atmosferik koşullara göre sınırlar ötesi taşınımı kirlilik etkisini bölgesel olmaktan çıkararak, uluslararası boyutlara taşımaktadır. pH değeri 5.6'ya yakın olan ve kirlenmemiş yağmurlar, çok az asidiktir. İçinde çözünen CO₂, zayıf asit olan H₂CO₃ oluşturur. Atmosferdeki su damlacıklarında NO_x ve SO₂'in çözünmesi ise yağmur pH'sının 3-4'e kadar azalmasına neden olur. Hatta, sis içindeki kirliliğin damlacıklarda pH, 1.7'ye kadar asidik olabilir. Asit yağmurları, yaprağın yaşı, kütikulanın bütünlüğü ve yüzeyin mumsu yapısına bağlı olarak, yapraklardan mineral besinleri uzaklaştırabilmektedir. Asidin topraklara ilave olması da bitkilere zarar vericidir. Ayrıca asit, alüminyum iyonlarının toprak minerallerinden salınmasına yol açarak, alüminyum toksisitesine neden olmaktadır (Çakmak, 1992; Larcher, 1995; Stoyanova, 1998; Taiz ve Zeiger, 1998).

21.7.1. Kirlilik zararı

Yaşamsal fonksiyonların kirlenicilerden etkilenmesi ve görünür bir zararın oluşması, biyotik ve abiyotik birçok faktöre bağlıdır. Bunların en önemlileri; türler, büyüme formu, yaş, aktivite fazı, bitkinin genel büyüme gücü, iklimsel ve edafik koşullar, kimyasal yapı, konsantrasyon, zaman ve kirlenicilerin faaliyet süresidir. Bazı durumlarda kirliliğin etkisi, konsantrasyon ve maruz kalma süresi ile orantılıdır (Larcher, 1995).

21.7.1.1. Havadan gelen kirleniciler

Bitkiler için en zarar verici atmosferik kirleniciler; SO₂, azot oksitler, ozon, peroksi asetil nitrat (PAN) ve hidrojen halidlerdir. Havadan gelen daha az zararlı diğer maddeler; amonyum, hidrokarbonlar, katranlı dumanlar, is ve tozdur. Zarar ile ilgili semptomlar değişiklik gösterirler ve genellikle de spesifik değildirler. Aynı madde, farklı türlerde oldukça değişik etkilere neden olabilir ve diğer taraftan aynı semptom, çeşitli farklı maddeler tarafından da üretilebilir. Ayrıca, maddelerin ayrı ayrı yol açtığı zarar, aynı zamanda bitkiyi etkileyen diğer çevresel stres faktörleri tarafından modifiye edilebilir. Bunlar çoğunlukla, asıl kirlenicinin zararlı etkisini artırır. Bu tip streslere maruz kalan ağaçların, kuraklık ve dondan sağlıklı bitkilere göre daha fazla sıkıntı çektikleri gözlenmiştir.

Başlangıç halindeki kirlilik zararının erken tanınması için geçerli olan ölçütler şunlardır (Larcher, 1995);

- bitkide toksik maddenin veya bunun türevlerinin birikimi,
- dokuların tamponlama kapasitesinin azalması,
- asit emisyonları vasıtası ile iğne yapraklıların epikütikular mumunun erozyonu,
- belirli enzimlerin azalan veya artan aktiviteleri,

- metabolitler arasındaki kalitatif ve kantitatif kaymalar,
- stres hormonlarının özellikle de etilenin ortaya çıkması,
- solunumdaki değişiklikler,
- fotosentezdeki düzensizlikler,
- stomaların açılıp kapanmalarındaki değişimler ve
- fotosentetik ürünlerin kök sistemlerine azalan oranda aktarımı.

Akut ölümcül zarar; klorosisin oluşması, yaprak renginin kaybolması, doku ve organlarda nekroz oluşumları ve tüm bitkinin ölümü ile tanınabilir. Bu tip zarar, genellikle kirlilik kaynağının hemen yakınlarında görülmektedir. Kronik zarar ise farkedilir semptomlar olmaksızın, azalan verimliliğe ve eksik döllenmeye (örneğin, polen sterilitesi) yol açar.

Ciddi orman zararına hidrojen halidleri tarafından da neden olunabilir. Hidrojen florid, ekstrem olarak toksiktir; floridler, stoma yolu ile bitkiye girerek apoplastik yolla dağılım gösterirler. Zararın ilk görünür belirtisi, yaprak klorozisidir, bunu yaprak uçları ve kenarlarının karakteristik nekrozları takip eder.

21.7.1.1.1. Kükürt dioksit

Toksik bir gaz olan SO_2 , bitki yaşamında çok fazla zarara yol açar. Yaşam süresince yeryüzünde mevcut olan SO_2 'in bir kaynağını, volkanik emisyonlar oluşturmaktadır. SO_2 , aynen CO_2 gibi açık stomalar yoluyla yaprağa kolaylıkla girebilir. Stomalar kapalı ise SO_2 , tıpkı oksijen gibi kutikular dayanıklılığın üstesinden gelerek bu yolla da yaprağa giriş yapabilir. Düşük dışsal konsantrasyonlarda (yaklaşık $45 \mu\text{g SO}_2 \text{ m}^{-3}$) SO_2 , bekçi hücrelerini çevreleyen epidermal hücrelerde turgor kaybını tetikleyerek, stomaların açılmasına neden olur. SO_2 'in daha yüksek konsantrasyonları ise ($1300 \mu\text{g m}^{-3}$ ün yukarısı), stomaların kapanmasına yol açar. Bu, transpirasyonda bazen bir artış, diğer durumlarda ise bir azalış ile ilgili tartışılan bilimsel gözlemler için bir açıklama olabilir (Larcher, 1995)

Kükürt dioksit stresine adaptasyon

Birçok bitki, ılımlı kükürt dioksit (SO_2) toksitesine değişik pasif ve aktif yollarla dayanabilir. Bitkilerin bazı karakterleri ve fonksiyonel özellikleri, SO_2 stresinden korunma yollarını sağlamaktadır. Sonbaharda yapraklarını döken bitkiler, fosil yakıtlarla ısınma nedeni ile kış süresince oluşan SO_2 'in en güçlü emisyonlarından kaçarlar.

Stres faktörüne-özü mekanizmalar, toksik etkilerden ve asidifikasyondan kaçınma için kimyasal ve biyokimyasal yapıdadırlar. Bunlar, alkali ve alkali toprak katyonlarının artan düzeyde alınımından kaynaklanan yüksek tamponlama kapasitesini, SO_2 'nin metabolizmanın sekonder ürünlerine bağlanmasını, kükürdün

metabolik kullanımını ve oksidatif reaksiyonların toksinlerden arındırılmasını içerirler. C₄ bitkileri SO₂'e C₃ bitkilerinden daha az duyarlılık gösterirler. Bunun nedeni ise PEP-karboksilaz'ın RuBP-karboksilaz'dan daha az duyarlı olmasıdır (Larcher, 1995).

21.7.1.1.2. Atmosferik oksidanlar: Azot oksitler, ozon ve sekonder fotooksidanlar

Azot oksitler (NO, NO₂), sıcak yanma işlemlerinin sonucunda atmosfere katılırlar. Işıktaki, 300-400 nm aralığındaki UV radyasyonunun absorpsiyonundan sonra NO₂, NO'ya ve ozonu (O₃) oluşturmak üzere atmosferik moleküler oksijenle daha sonra kombine olan atomik (reaktif) oksijene ayrılır. Kirli havada en çok bulunan ozon, bitkilere çok zarar vermektedir (Eriş, 1990; Larcher, 1995). Ozon, fotolitik olarak üretilen NO ve NO₂'ye okside olur. Ozondan başka, peroksi radikaller, diğer bir sekonder emisyonudur. Bunlar, asetil ve bütül peroksidler, ve benzil nitrat gibi daha ileri maddeleri üretmek üzere reaksiyon gösterirler. Fotooksidanlar, güneş ışığına bağılıkları yüzünden, geniş bir konsantrasyon aralığında belirgin şekilde günlük ve yıllık olarak havaya bağlı dalgalanmalar gösterirler. Bu gazların hepsi SO₂ gibi kolaylıkla açık stomalardan yaprağa girebilir. NO₂, SO₂'den de daha hızlı olarak kütükula yolu ile difüzyon gerçekleştirebilir ve ozonun çoğunluğu epidermisin dış duvarında oksijeni oluşturmak üzere çözünür. Azot oksitler, hücre duvarlarında meydana gelen su ile temasa geçerek HNO₂ ve HNO₃ oluşur ve bunlar da yaşayan hücreler tarafından aktif olarak alınabilen nitrit veya nitrat iyonlarına ayrışma gösterirler (Larcher 1995).

Nitrit iyonları, nitrit redüktaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonda amino asitlere asimile edilirler. Atmosferik nitrit oksitler, bitkiler için ilave bir azot kaynağıdır, fakat yaprakların asidifikasyonu gibi negatif etkilere sahip olabilirler. SO₂, nitrit redüktazı engellemesinden ötürü, bunların toksik etkilerini artırır ve böylece nitrit oksitlerin bozulmasını engeller. Ozon, bitki dokularında peroksidleri oluşturmak üzere atmosferik oksijene hızlı olarak çözünür. Bu peroksidler öncelikle plazma membranını olumsuz olarak etkiler ve sonra diğer bütün biyo-membranlar, böylelikle de taşınım olayları zarar görür, kısa süre sonra da nekrozlar gelişir. Ağaçlar, yabani otlar ve çimlen bu gazlara maruz kaldıklarında büyüme ve verimde önemli azalmaların meydana geldiği belirlenmiştir. Peroksi asetil nitrat, birçok maddeyi özellikle de SH gruplarını içeren maddeleri, lipidleri ve büyüme hormonu olan indol asetik asidi okside etmektedir. (Larcher, 1995)

21.7.1.2. Toprak ve suyun ağır metallerle kontaminasyonu

Atık materyaller olarak, kasıt veya dikkatsizlik sonucu okyanuslardan ve sulardan topraklara geçen değişik maddeler arasında ağır metaller, özellikle uzun süreli problemler yaratırlar. Bu maddeler, sadece organizmalarda birikmekle ve böylece

gıda zincirlerini dolaşmakla kalmazlar, ayrıca ekosistemde tehlikeli konsantrasyonlarda uzun süreyle kalabilirler. Maden cevheri bulunduran kayalar veya lavlarla karışık cürufu örten topraklar, birçok bitkiye toksik olan miktarlarda ağır metalleri (özellikle Zn, Pb, Ni, Co, Cr ve Cu) ve metaloidleri (Mn, Cd, Se, As) içerirler. Ağır metal kontaminasyonu; ağır taşıt trafiğini, değersiz çöplükleri ve lağım pisliklerini içeren endüstriyel zonlarda da meydana gelir. Metal işleyen endüstrilerden kaynaklanan toz emisyonları, ağır metallerin her bir tipini içerir; fabrikaların atık suları Cd, Zn, Fe, Pb, Cu, Cr, Hg, lağım pislikleri ise Cd, Zn, Fe, Cu, Cr, Ni, Hg kapsarlar.

21.7.1.2.1. Ağır metallerin alınımı ve bunların toksik etkileri

Bitki hücreleri tarafından metalik elementlerin alınımı, özellikle de köklerdeki alımın bitkilerin mikro element olarak çeşitli ağır metallere ihtiyaç duymalarından ötürü, bu elementlerin taşınması ve birikmesi için uygun mekanizmalarla kolaylaştırılır. Bununla birlikte, bitki toksik elementlerin girmesini aynı mekanizmalarla önleyemeyebilir. Ağır metal iyonları toksitesi; başlıca solunum ve fotosentezdeki elektron transportuna olan müdahalelerin, enerji ve mineral besin alımının azaltılmasının ve büyümedeki gerilemelerin bir sonucu olarak hayati önemdeki enzimlerin inaktivasyonundan kaynaklanmaktadır.

21.7.1.2.2. Ağır metallere adaptasyon

Birçok bitki, minimal konsantrasyonların artma göstermesi ile ağır metallere duyarlı hale gelir. Belirli bitki türleri, bulaşık habitatlar üzerinde büyüyebilirler; çünkü bu bitkiler, ağır metal fazlalıklarını zararsız kılacak kaçınma mekanizmalarını geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar;

- alımının azalması; hücre duvarlarında toksik iyonların immobilizasyonu (protoplastla temas önlenir),
- protoplazmayı çevreleyen tabakaların içinden geçişin önlenmesi,
- sitoplazmada kükürt içeren polipeptitler (glutathion ve glutamil sistein türevleri), SH içeren proteinler ve metal toksisitesinden korunmayı sağlamak üzere teşvik edilen stres proteinleri ile şelat oluşumu, ve
- kompartımentalizasyon ve vakuolde organik ve inorganik asitler, fenol türevleri ve glikozitler ile komplekslerin oluşumu ve tekrar yer değiştirmesidir.

Ağır metallere dayanıklılığın genetik ve fizyolojik temelini anlaşılmaması, şiddetli kontamine olmuş alanların yeniden vejetasyona sahip olmaları için ve ayrıca biyoindikatör bitkilerin seçimi için uygun türlerin belirlenmesinde ve uygun çeşitlerin ıslahında önceden bilinmesi gereken önemli bir husustur (Larcher, 1995).

21.8. Doku Kùltürleri ve Stres

Doku kùltürleri, stresin molekùler temellerinin, stres faktörlerine olan dayanıklılık mekanizmalarının, fizyolojik ve biyokimyasal olayların, stres koşullarında ortaya çıkan değişmelerin ve seleksiyon kriterlerinin belirlenmesinde büyük avantajlar sunmaktadır. Hücre, protoplast (Babaoğlu ve Özcan, 2001) ve kallus kùltürleri, gerek somaklonal varyasyonlardan (Bürün, 2001) kaynaklanan ve gerekse de mevcut germplazm (Emeklier, 2001) içinde bulunan çeşitli stres faktörlerine dayanıklı hatların seçilmesinde önem taşıyan kùltürlerdir. Doku kùltürlerinde stres, somatik embriyogenesis (Özcan ve ark., 2001) ve organogenesisin (Gürel ve Türker, 2001) teşvik edilebilmesi ve sekonder metabolit (Sökmen ve Gürel, 2001) üretiminin sağlanabilmesi amaçlarıyla da kullanılabilmektedir.

Çevresel faktörlerin tam olarak kontrollü olduğu bu kùltürler, stres faktörlerine karşı dayanıklılık genlerinin rekombinant DNA teknikleri (bkz. Bölüm 12, 13, 14, ve 15) ile bitki hücrelerine aktararak bitkiciklerin elde edilmesinde sağladığı yararların da göz ardı edilmemesi gereklidir (Kucherenko, 1985; Lipsky ve ark., 1985; Herman, 1991; Sood, 1997, Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1998).

21.9. Genetik Mühendislik ve Stres

Kuraklık, düşük sıcaklık veya aşırı tuzluluğun oluşturduğu su potansiyelindeki azalmaya, bitki türlerinin duyarlılıkları ve tepkileri değişim göstermektedir. Bütün bitkiler stresi algılama, sinyal ve cevap verme yeteneklerine sahiptirler. Bu özelliklerin varlığı açısından önemli ipuçları elde edilmiştir. Örneğin (Bohnert ve ark., 1995);

- 1) Yoğun olarak kùltüre alınan türler, abiyotik streslere karşı mükemmel tolerans gösteren yabancı akrabalara sahiptirler,
- 2) Biyokimyasal çalışmalarla, vaskular ve vaskular olmayan bitkilerde; alg, fungus ve bakterilerde stresin teşvik ettiği olayların benzerleri ortaya konmuştur. Bilindiği üzere bu metabolitler azot içeren bileşikleri (prolin, diğer aminoasitler, kuarterner amino bileşikleri ve poliaminler) ve hidroksil bileşiklerini (sakkaroz, polioller ve oligosakkaritler) içermektedir,
- 3) Molekùler incelemeler sayesinde birçok türde, strese maruz kalındığında, genlere ve benzer proteinlere ait genel bir setin etkinleştii belirlenmiştir.

Geçmişte yapılan ve abiyotik stres toleransına ilişkin birçok çalışma, stres halindeki bitkilerin fizyolojik durumlarının kontrol bitkilerle karşılaştırılmasını içermiş ve bu tip incelemelerden hareket edilerek mekanizmalar ortaya konmuştur. Fakat, genellikle bu çalışmalar stres tolerans prensiplerinin molekùler ve genetik analizlerini içermemiştir. En önemlisi de, fizyolojik incelemelerden elde edilen bilgiler, abiyotik stres faktörlerine karşı tolerans ve duyarlılığın altında yatan

biyokimyasal mekanizmaları temel almış, ancak birkaç çalışmaya öncülük edebilmiştir (Bohnert *ve ark.*, 1995).

Bitki ıslahı yoluyla stres koşulları altında verimi iyileştirme girişimleri, esas olarak adaptif tepkilerin çokgenli orijini yüzünden başarısız olmuştur. Bu açıdan genetik mühendisliği yoluyla bitkilere gen transferi daha uygun görünmektedir. Potansiyel gen transferi için hedeflenen önemli adaptif mekanizmalar ise, tonoplast Na^+/H^+ antiportu, eriyik madde sentezi, su kanal aktivitesinin düzenlenmesi ve ifadesidir. Bunlar, hücrel osmoregülasyonda esas olan mekanizmalar olarak kabul edilmektedir (Barkla *ve ark.*, 1999).

Kuraklığa, yüksek tuzluluğa ve düşük sıcaklığa karşı bitki toleransının ıslah ve genetik mühendisliği yoluyla geliştirilmesi için geçmişte gerçekleştirilen çabaların başarısı, stres tepkilerinin genetik mekanizmasındaki güçlükler nedeniyle sınırlı olmuştur. Son zamanlarda ise, bu konularda model organizmaların evrimsel olarak farklı setlerinin karşılaştırmalı genomik incelemeleri ve çeşitli tekniklerin kullanımları ile ilerlemeler beklenmektedir (Cushman ve Bohnert, 2000). Transgenik bitkilerde ortaya çıkan mekanizmaların modellendiği, moleküler ve biyokimyasal analizleri de içeren bilgiler günümüzde çok büyük önem taşımaktadır (Bohnert *ve ark.*, 1995). Örneğin, yeni genlerin keşfi, abiyotik strese karşı tepkide bu genlerin ifade şekillerinin belirlenmesi ve strese adaptasyon konusunda bunların rollerinin iyi anlaşılması, daha fazla stres toleransına öncülük edecek etkili mühendislik stratejilerinin temellerini sağlayacak değerdedir (Cushman ve Bohnert, 2000).

Genetik farklılık, gelecekte oluşabilecek iklimsel ve diğer çevresel değişiklikler açısından yararlı fenotiplerin ve allellerin bir kaynağını sunmasından dolayı oldukça önem taşımaktadır. Bu konuyla ilişkili olarak, arpa çeşitlerindeki strese duyarlı olan genlerin polimorfizminin derecesini göstermek üzere RFLP analizlerinin kullanılabilirliği (bkz. Bölüm 23) ortaya konmuştur (Marmirdi *ve ark.*, 1998).

Ümit verici görülen diğer bir genetik yol ise performans ve verimin; kuraklık, düşük sıcaklık veya tuzluluk toleransı ile ilişkili olan kantitatif özelliklere ait lokuslarının haritalanmasıdır. Böylelikle kromozomların stres toleransını iyileştirici genleri taşıyan bölgeleri tanımlanabilecektir. Haritalanmış genleri hızlı bir şekilde klonlama ve tanımlama yolları bilinmektedir (bkz. Bölüm 13). Yakın gelecekte çeltik, mısır, buğday, patates ve arpa gibi önemli bitki türleri ile bazı model türler için bütün genetik materyaller, klonlanmış bir formda sağlanabilecektir. Ayrıca, stres toleransında işlevi olan biyokimyasal mekanizmaları anlamak, polimeraz zincir reaksiyonu ile spesifik genleri araştırmayı mümkün kılabilir (Bohnert *ve ark.*, 1995).

Moleküler teknoloji, genlerin izole edilmesini ve bunların bitkilere aktarılmasını sağlamaktadır. Hatta, stres periyotları boyunca etkileri saptanan genler izole edilerek aktarıldıkları transgenik bitkilerdeki ifadelerinin incelenmeye başlanması da çok önemli bir aşama olarak kabul edilmektedir (McKersie ve Leshem, 1994).

Bir bitkiye gen transferi yapılması için iki neden sayılabilir. Birincisi, bir bitkiye kendi tarımsal değerini iyileştirecek bir özelliği kazandırmak, ikincisi ise özel bir biyolojik olayın anlaşılmasını kolaylaştırmaktır. Bitkilerde tek bir genin veya küçük bir gen grubunun eklenmesi ile elde edilen özelliklerden bazıları; böceklerle dayanıklılık (bkz. Bölüm 18), viral enfeksiyona tolerans (bkz. Bölüm 19), herbiside dayanıklılık (bkz. Bölüm 17), meyve olgunlaşmasının ve çiçek pigmentasyonunun değiştirilmesi, besin kalitesinin iyileştirilmesi ve kendine uyumsuzlıkla ilişkili olmuştur (bkz. Bölüm 22). Son zamanlarda ise, stres faktörlerine karşı dayanıklı transgenik bitkilerin oluşturularak üretilmelerini esas alan çalışmalar yoğunlaşmıştır (Greenberg ve Glick, 1993).

21.10. Stres ile İlişkili Olarak Gerçekleştirilen Biyoteknolojik Çalışmalar

Bitkiler hareketli olmadıkları için yüksek ışık, UV radyasyonu, ısı ve kuraklık gibi streslerden kaçamazlar. Moleküler düzeyde stres, çoğunlukla oksijen radikallerinin üretimini teşvik etmektedir. Süperoksit anyonu, aktif oksijenin yaygın bir formudur ve bu, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit ve sonra peroksidaz veya katalazların herhangi biriyle de suya dönüşümü yolu ile detoksifiye edilmektedir. Son zamanlarda, karnabahar mozaik virüsü 35S promotorunun kontrolü altında, Mn-SOD geninin tününe aktarılması sonucu, aktif oksijene tolerans gerçekleştirilmiştir (Greenberg ve Glick, 1993).

Bitkilerin UV-B stresinden korunmalarının doğal bir mekanizması, epidermal hücre tabakasında flavonoidlerin sentezlenmesidir. Yapraklarda, flavonoid ile ilgili biyolojik yolda kapsanan enzimlerin sentezi, UV-B'e duyarlı promotorun kontrolü altında bulunmaktadır. Bu genlerin bir çoğu promotorları ile birlikte izole edilmektedir ve bunların bitkiye daha büyük UV korunmasını sağlamak üzere duyarlı bitkilere transfer edilmeleri ise çok önemli bir ilerlemeyi sağlayacak niteliktedir (Greenberg ve Glick, 1993).

Su eksikliği, bitki verimliliğini sınırlayan en yaygın çevresel strestir. Bitkilerin su azlığını tolere etme yetenekleri; suyun tutulmasını kolaylaştıran, kloroplast fonksiyonlarını koruyan ve iyon homeostasisini muhafaza eden çoklu biyokimyasal yollarla belirlenmektedir. Önemli mekanizmalar; iyon ve su akışını kontrol eden ozmotik olarak aktif metabolitlerin ve spesifik proteinlerin sentezine yol açan, oksijen radikallerinin yakalanmasını destekleyen yolları içermektedir. Bitkilerin su azlığı koşullarında radikalleri detoksifiye etme yetenekleri muhtemelen en kritik bir gereksinimdir. Birçok strese tolerant tür, osmoprotektanlar ve radikal yakalayıcıları olarak çok önemli iki role sahip metabolitleri biriktirmektedir.

Çoklu gen sistemlerinin transferi ve mühendislik mekanizmalarının belirlenmesi, su eksikliğine toleransın artmasıyla sonuçlanabilecektir (Bohnert ve Jensen, 1996). Yapılan bir araştırmada, arpa çeşitlerinde kuraklığa karşı gösterilen tepkide süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin, dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasında

kullanılabilir bir ölçüt olabileceği ifade edilmiştir (Acar, 1999). Kuraklığa toleranslı bitkiler, derine inen köklere, su kaybını en aza indirebilmek için daha kalın kütikula veya hücrelerindeki tuz içeriğini ayarlayabilme yeteneğine sahip olacak şekilde geliştirilmeye çalışılmışlardır. Elde edilen kuraklığa dayanıklı ilk transgenik bitkiler, trehalozu ifade (ekspres) eden ekmek mayasından bir gen kullanılarak üretilmişlerdir. Bu madde, mayanın kuru halde de hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu genle modifiye edilen tütün bitkileri, kurumaya karşı dayanıklı olmuşlardır. Kuraklığa toleranslı transgenik bitkiler, küresel ısınmada dikkate alındığında, suyun sınırlı olduğu alanlarda önemli bir yere sahip olabileceklerdir (Nottingham, 1998).

Genetik manipulasyon teknikleri, aynı transgenik bitkiye tuz toleransı ve yüksek verimle ilişkili özelliklerin kazandırılmasına izin verecek şekilde gelişme göstermektedir. Tuza toleranslı transgenik bitkiler, tuzlu ortamlarda yaşamlarını sürdürebilen bir mayaya ait bir genin aktarılması ile üretilmişlerdir. Gen, sodyumun hücrelerin dışına pompalanmasına neden olan bir proteini kodlamaktadır. Böylelikle de, toprakta yüksek sodyum düzeylerinin neden olduğu zarar azaltılmış olmaktadır. Tuza toleranslı domates, kavun ve arpa çeşitleri geliştirilme aşamasındadır (Nottingham, 1998).

Transgenik tütünde mannitol veya sorbitol miktarlarının artmasına yol açan genlerin transferi, bitkileri tuzluluk stresine daha dayanıklı kılmaktadır. Hücre bölünmesi, büyüme ve farklılaşma, senesens gibi değişik hücre fonksiyonlarına sahip olan poliaminler, bitkilerin çevresel strese karşı tepkilerinde etkilidirler. Mısırdaki olgunlaşmamış embriyolardan oluşturularak ve kontrol ile %1 NaCl içeren kültür ortamlarındaki nisbi büyüme oranlarının dikkate alındığı ve kallus hatlarının poliamin seviyeleri açısından seçildiği bir çalışmada; düşük poliamin içeren hatların tuz stresine toleranslı olduğu, yüksek poliaminli hatların ise duyarlı olduğu belirlenmiştir (Zacchini ve ark., 1997). Aynı çalışmada kallus hatları; RAPD markörleri ile analiz edildiklerinde, hatlar arasında genetik farklılık gösteren bir polimorfizm belirlenmiştir. Son zamanlarda, bakterilere ait genleri esas alan bir yöntem, tütünde glisinbetain seviyelerinin artması için kullanılmaya başlanmıştır. Glisinbetain sentezinin artırılması amacıyla çift fonksiyonlu bir enzimi kodlayan bir gen, tütüne ve *Arabidopsis*'e transfer edilmiştir. Glisinbetainin yüksek seviyelerde biriktiği bitkiler, tuzluluk stresinin etkilerine karşı belirgin ölçüde korunmuştur. Yapılan bir çalışmada, membranlardaki yağ asitlerinin doymamışlığının, tuz stresine karşı fotosentetik yapının toleransı bakımından önemli olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerde ve birçok organizmada, ısı şok proteinlerinin hücreleri ısı stresinin zararlı etkilerinden koruduğuna dair birbirleri ile ilişkili kanıtlar bulunmuştur. Isı şok proteinleri, birçok abiyotik stres tipi için yaygın bir stres toleransını da kapsamaktadır. Isı şok proteinlerinin bitkilerde üretilmeleri, ısı şok transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir ve bu faktörlerin aktivasyonları, genetik mühendisliğinde ısı şok tepkisinin değiştirilmesinde anahtar olarak gözönüne

alınmaktadır. Bir model bitki olan *Arabidopsis*'de, ısı şok genlerinin transkripsiyonunun kontrolünden sorumlu ısı şok transkripsiyon faktör geni (Aths1) izole edilmiştir. Bu gen, yapısal olarak da tanımlanmıştır. Yapılan bir başka çalışmada, karnabahar mozaik virüsünün 35S promotorunun kontrolü altında *Arthrobacter globiformis*'den choline oksidaz için *cod A* geni *Arabidopsis thaliana*'ya (Alia ve ark., 1998). Transgenik bitkilerin tohumlarında glisinbetainin yüksek miktarlarda biriktiği belirlenmiştir. *Cod A* genini taşıyan tohumların su emme, çimlenme ve genç fide dönemlerinde meydana gelen yüksek sıcaklıklara karşı toleransı arttırdığı görülmüştür. Yüksek sıcaklığa toleransın artma derecesinin, transgenik bitkilerde biriken glisinbetainin ve üretilen choline oksidazın seviyeleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Alia ve ark., 1998)

Don zararının, ekonomik açıdan yol açtığı ürün kayıplarının bir hayli yüksek olduğu saptanmıştır. Zarar, yapısal tahribe yol açan ve bitki dokularını eritip yumuşatan buz kristallerinin hücre içinde oluşumuyla ortaya çıkmaktadır. Tarladaki don zararı, çürümelere, meyve ve sebze israfına neden olabilmektedir. Bitkilerin don zararına karşı dayanıklı olabilmeleri için yakında genetiksel olarak modifiye edilebilecekleri beklentisi vardır. Dona dayanıklı meyve ve sebzeler, sıfırın altındaki sıcaklıklarda, tekstürlerini veya tatlarını kaybetmeden uzun süreli olarak depolanabileceklerdir. Bu nedenle, don dayanıklılığının özellikle çilek ve domates gibi meyvelere genetik mühendisliği ile kazandırılması ekonomik açıdan yararlı olacaktır. Tarla koşullarında dayanıklı ürün çeşitlerinin yetiştirilmeleri ile daha uzun büyüme sezonuna sahip olunacaktır ve hatta bu ürünlerin daha geniş coğrafi alana yayılmaları gerçekleştirilebilecektir (Nottingham, 1998).

Hücre membranlarındaki lipid moleküllerinin kompozisyonu, sıcaklığa göre değişim göstermektedir. Düşük sıcaklıklarda yaşamlarını sürdüren bitkiler, daha düşük sıcaklıklarda, yağ bileşimlerinin dengesini daha sıvı olan doymamış lipidlere doğru kaydırmaya çalışmaktadırlar. Bu durum ise, soğuk koşullar altında oluşan don zararını azaltarak hücre membranlarının dayanıklılığını muhafaza etmektedir. Doymuş lipidleri, doymamış lipidlere dönüştüren enzimleri kodlayan genler, birçok bitkide tanımlanmıştır. Soğuğa dayanıklı bitkiler, bu genleri çalıştırmada daha etkilidirler ve gelecekte bu tip bitkiler, genetik mühendisliği yardımıyla oluşturulabilecektir. Yapılan bir araştırmada, *Pseudopleuronectes americanus* balığında antifriz proteinini kodlayan bir gen tanımlanmıştır. Protein, su-buz kristallerinin oluşumunu engellemektedir. Bu gen dona dayanıklı transgenik domates ve tütün bitkilerini üretmek üzere de kullanılmıştır (Nottingham, 1998). Choline'den glisinbetain sentezleyen bir enzim olan choline oksidazı kodlayan *Arthrobacter globiformis*'e ait *codA* geni *Arabidopsis thaliana*'ya aktarılmıştır (Sakamoto ve ark., 2000). Transgenik bitkilerin kloroplastlarında glisinbetainin birikimini sağlamış ve böylelikle de bitkilerin donma toleransını önemli ölçüde artırmıştır.

Topraklar, metal ya da diğer bulaştırıcıların yüksek miktarlarını içerebilirler. Transgenik bitkiler, bu koşulları tolere etmek amacıyla da üretilmiştir. Örneğin, yüksek kadmium seviyelerine toleranslı olan tütün, metalothionein-bağlı proteini

kodlayan bir genin fareden izole edilip aktarılması ile elde edilebilmiştir. Bitkiler, ayrıca “biyoremeditasyon” diye bilinen bir işlem yardımıyla bulaşık alanları temizlemek için de kullanılırlar. Transgenik bitkiler, gelecekte bu alanda da önemli bir rol oynayabileceklerdir (Nottingham,1998).

21.11. Sonuç

Çevreyi olumsuz kılan stres faktörleri, giderek daha da yoğunlaşmakta, diğer canlı organizmalarda olduğu gibi, bitkilerin yaşamlarını tehlikeye sokmakta ve metabolizmalarını zayıflatmaktadır. Ekolojik dengenin bozulması ile bitki ve çevre arasındaki ilişkilerde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Tarımcılar açısından, bitki yetiştiriciliğinin gerçekleşebileceği alanların en akılcı olarak kullanılmaları büyük önem taşımaktadır. Bu durum; stres faktörlerinin moleküler temellerinin, dayanıklılık mekanizmalarının ve metabolizmada meydana gelen değişikliklerin öncelikli olarak incelenmesini gerektirmektedir.

Kaynaklar

- Acar O (1999) Kurağa Dayanıklı Bazı Arpa (*Hordeum spp.*) Çeşitlerinde Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktivitelerinin Araştırılması. E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir.
- Alam SM (1994) Nutrient uptake by plants under stress conditions. In: Pessaraki M (ed), Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker Inc., NewYork.
- Alia H, Sakamoto A, Murata N (1998) Enhancement of the tolerance of Arabidopsis to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. Plant J., 16(2): 155-61.
- Babaoğlu M, Özcan S (2001) Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 89-136.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O (1999) Towards the production of salt-tolerant crops. Adv. Exp. Med. Biol., 464: 77-89.
- Bohnert HJ, Jensen RG (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Tibtech., 14: 89-97.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to Environmental Stresses. The Plant Cell, 7: 1099-1111.
- Bürün B (2001) Somaklonal Varyasyon. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 345-367.
- Cushman, JC, Bohnert HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. Curr. Opin. Plant Biol., 3(2): 117-24.

- Çakırlar H, Topcuoğlu ŞF (1985) Stres terminolojisi. Çölleşen Dünya ve Türkiye Örneği Simpozyum 7, 13-17 Mayıs, Erzurum.
- Çakmak L (1992) Sanayi tesislerinin çevre ve tarıma verdiği zararlar. Tar. Müh., 42.
- Çopur O, Oğlakçı M (1995) Tarımsal üretimde tuzluluk sorunu ve öneriler. HÜZF Dergisi 1(13): 18.2
- Edreva A (1998) Molecular bases of stress in plants. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, 22-26 Haziran, İzmir.
- Ellialtıoğlu Ş, Tıprıdamaz R (1998) Doku kültürünün tuz stresine dayanıklılıkta kullanımı. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, 22-26 Haziran, İzmir.
- Emekler Y (2001) Germplasm Muhafazası. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 282-323.
- Eriş A (1990) Bahçe Bitkileri Fizyolojisi, UÜZF Ders Notları, No: 11, Bursa.
- Eryüce N, Gürel A, Hakerler H (1998) Farklı su stresi koşullarının bitkilerde besin alımını üzerine etkileri. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, 22-26 Haziran, İzmir.
- Eser D (1986) Tarımsal Ekoloji, AÜZF Yayınları Ders Kitabı, No: 287, Ankara.
- Göksoy AT, Turan ZM (1991) Kuraklığın bitki morfolojisi ve fizyolojisi üzerine etkileri. UÜZF Dergisi, 8: 189-199.
- Greenberg BM, Glick BR, (1993) The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants. In: Glick BR, Thomson JE (eds), Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, London.
- Gürel E, Türker AU (2001) Organogenesis. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 36-70.
- Herman EB (1991) Recent Advances in Plant Tissue Culture Regeneration, Micropropagation and Media. Agritech Consultants Inc., Shrub Oak.
- Kanbertay M (1984) Buğday Soğuk Zararının Oluşumu Belirtileri ve 1983 Yılında Ege Kıyı Kesiminde Üretime Etkileri. EBZAE Yayınları, No: 44, İzmir.
- Kantar F, Elkoca E (1998) Kültür bitkilerinde tuza dayanıklılık. Atatürk ÜZF Dergisi, 29(1): 163-174.
- Kocataş A (1999) Ekoloji ve Çevre Biyolojisi. EÜ Su Ürün. Fak. Ders Kitabı, No:20, İzmir.
- Kucherenko LA (1985) *In vitro* selection for stress factors resistance. In: Butenko RG (ed), Plant Cell Culture, Mir Publishers, Moscow.
- Larcher W (1995) Physiological Plant Ecology, Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups, Springer-Verlag, Berlin.
- Lawlor DW (1994) Physiological and biochemical criteria for evaluating genotypic responses to heat and related stresses. In: Saunders DA, Hettel GP (eds), Wheat in Heat-

Stressed Environments: Irrigated Dry Areas and Rice-Wheat Farming Systems, United Nations Development Programme (UNDP), Mexico.

Levitt J (1972) Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York.

Lichtenthaler HK (1996) Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. J. Plant Physiol., 148: 4-14.

Lipsky AKH, Nosov AM, Paukov VN, Karanova SL (1985) Growth and metabolism of the *Dioscorea deltoidea* cell culture on submerged cultivation. In: Butenko RG (ed), Plant Cell Culture, Mir Publishers, Moscow.

Maas EV (1986) Salt tolerance of plants. Appl. Agri. Res., 1(1): 12-26.

Malhotra RS, Saxena MC (1993) Screening for cold and heat tolerance in cool-season food legumes. In: Singh KB, Saxena MC (eds), Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes, ICARDA, A Wiley-Sayce Co-Publication, New York.

Marmirdi N, Malcevski A, Maestri E, (1998) Application of stress responsive genes RFLP analysis to the evaluation of genetic diversity in plants. In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds), Molecular Tools for Screening Biodiversity Plants and Animals, pp. 464-470, Chapman Hall, London.

McKersie BD, Leshem YY (1994) Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherland.

Munns R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. Plant Cell Environ., 16: 15-24.

Nottingham S (1998) Eat Your Genes - How Genetically Modified Food is Entering Our Diet. Zed Books Ltd, London, New York.

Özcan S, Babaoğlu M, Sancak C (2001) Somatik Embriyogenesis. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 71-88.

Palavan-Ünsal N (1993) Bitki Büyüme Maddeleri. İÜ Yayınları, No: 3677, İstanbul.

Poljakoff-Mayber A, Lerner HR (1994) Plants in saline environments. In: Pessarakli M (ed), Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker Inc., New York.

Pugnaire FI, Endolz LS, Pardos J (1994) Constraints by water stress on plant growth. In: Pessarakli M (ed), Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker Inc., New York.

Sakamoto A, Valverde R, Alia Chen TH, Murata N (2000) Transformation of *Arabidopsis* with the cod A gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. Plant J., 22(5): 449-53

Sivritepe N, Eriş A (1996a) Tuz stresi. UÜZF Dergisi, 12: 209-222

Sivritepe N, Eriş A (1996b) Bitkilerde tuza dayanım mekanizması. UÜZF Dergisi, 12: 223-234.

Sood N (1997) *In vitro* completion of vegetative and floral phase of salt-stressed *Brassica juncea* var. BN.I. Plant Tiss. Cult. Biotech., 3(3):.

- Sökmen A, Gürel E (2001) Sekonder Metabolit Üretimi. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 211-261.
- Stoyanova D (1998) Effects of simulated acid rain on anatomy of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Biol. Plant., 40(4): 581-588.
- Taiz L, Zeiger E (1998) Plant Physiology. Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts.
- Treshow M (1970) Environment Plant Response. Mc Graw-Hill Book Comp., New York.
- Turner NC, Begg JE (1981) Plant-water relations and adaptation to Sstress. Plant Soil, 58: 97-131.
- Wery J, Turc O, Lecoeur J (1993) Mechanisms of resistance to cold, heat and drought in cool-season legumes with special reference to chickpea and pea. In: Singh KB, Saxena MC (eds), Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes, ICARDA, A Wiley-Sayce Co-Publication, New York.
- Yamada Y (1984) Plant nutrition under water stress conditions. Technica Bulletin, No: 80.
- Yüce S, Gürel A (1998) Isı şoku proteinleri ve kontrol mekanizması. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, 22-26 Haziran, İzmir.
- Zacchini M, Marotta A, Agazio M (1997) Tolerance to salt stress in maize callus lines with different polyamine content. Plant Cell Rep., 17: 119-122.

Bölüm 22

Erkek Kısır Bitkilerin Üretimi

Kenan Turgut

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, PK 510, Antalya
e-posta: kenan@agric.akdeniz.edu.tr

22.1. Giriş

Bitkilerde yabancı döllenmeyi zorunlu kılan nedenlerden biri de erkek kısırılıktır. Erkek kısırılık bitki ıslahı ve özellikle hibrit bitki üretiminde çok önemlidir. Kalıtsal olan erkek kısırılık, ya kromozomlar üzerindeki bazı genler ya da stoplazmanın kalıtsal mekanizması tarafından kontrol edilmektedir.

Kültür bitkilerinin çoğunluğu erkek ve dişi organlarını aynı bitki üzerinde, aynı çiçekte (buğday, pamuk, kolza, domates vb.) veya farklı çiçeklerde (mısır, kenevir vb.) taşırlar. Bu durum ise özellikle geniş ölçekli hibrit tohum üretiminde büyük bir sorun teşkil etmektedir. Hibrit tohum üretiminde, kendine döllenmeyi önlemek için dişi hatlarda erkek organların mekanik olarak veya elle kısırlaştırılması (emaskülasyon) gerekmektedir, bu da maliyeti büyük ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle, erkek kısırılık bitki ıslahçıları ve tohum üreticilerinin en çok arzuladığı karakterlerden birisidir. Hibrit tohum üretimi yapan tohum firmaları, erkek kısır hatların elde edilmesi için büyük yatırımlar yapmaktadırlar.

Yukarıdaki nedenlerden dolayı, bazı araştırma grupları, angiosperm bitkilerde üreme biyolojisi ve özellikle de anter gelişmesi üzerine moleküler çalışmalar yürütmüşlerdir. Böylece, anter gelişmesi süresince ifade edilen genler klonlanmaya çalışılmıştır.

22.2 Angiosperm Bitkilerde Anter Gelişmesi

Angiosperm bitkilerde çiçekler erkek (anter) ve dişi (pistil) organları taşırlar. Bunların fonksiyonları, sperm hücrelerini ve yumurta hücresini üretmek ve döllenmeyi sağlamaktır. Karmaşık bir yapıda olan anter birkaç farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Bunların en önemlileri, mikrosporlar ve tapetum hücreleridir. Mikrosporlar mayoz hücre bölünmesi sonucunda polen tanelerini oluştururlar. Mayoz başlamadan önce mikrosporlar, selüloz hücre duvarı ile plazma membranı arasında kalloz (β -(1,3)glukan) duvarını sentezlerler (Heslop-Harrison, 1968). Mayoz süresince de kalloz birikimi devam eder ve böylece mikrospordan oluşan tetradlar kalloz ile çevrelenir. Böylece mayoz II'nin tamamlanmasından hemen sonra mikrosporların gelişmesi kalloz duvarı içerisinde başlar. Tapetum hücreleri tarafından sentezlenen ve polen kesesi (lokulus) içerisine salgılanan kallaz enzimi kalloz duvarını parçalayarak mikrosporların lokulus içerisine serbest bırakılmalarına neden olur (Mephram ve Lane, 1969). Bu aşamada, kallaz enziminin sentezinin zamanlaması mikrospor gelişmesinde önemlidir. Mikrosporogenesis süresince erken veya geç kallaz aktivitesi erkek kısırlığa neden olabilmektedir (Izhar ve Frankel, 1971). Tapetum, kallaz enziminin salgılanması yanında gelişmekte olan mikrospora besin ve yapısal komponentler sağlar (Nave ve Sawhney, 1986). Bitkilerde doğal erkek kısırlığın çoğunlukla tapetumdaki anormalliklerle ilişkili olması (Kaul, 1988) tapetum hücrelerinin anter gelişmesindeki önemini açıkça ortaya koymaktadır. Koltunow *ve ark.* (1990) ile Mariani *ve ark.* (1990), tapetumun erken dönemlerdeki parçalanmasının erkek kısırlığa neden olduğunu göstererek tapetum hücrelerinin mikrosporların gelişmesinde doğrudan rol oynadıklarını bildirmişlerdir. Worrall *ve ark.* (1992), transgenik tütün bitkilerinde anterde kalloz duvarının erken çözülmesinin erkek kısırlığa neden olduğunu bildirmişlerdir. Tapetum-spesifik bir promotor ile birlikte modifiye edilmiş glukanaaz (PR β -1,3-glukanase) geni ifade edilen tütün bitkilerinde erkek fertilitesi kısmen ya da tamamen azaltılmıştır. Bu bitkilerde mikrosporların hücre duvarları anormal bir şekilde incelmıştır.

22.3. Anter Gelişmesi Süresince İfade Edilen Genlerin Klonlanması

Anter gelişmesindeki kompleks görünüm gen ifadesi programlarına da yansımıştır. Kamalay ve Goldberd (1980), tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinde anter gelişmesinin erken dönemlerinde yaklaşık 26.000 farklı transkript bulmuşlardır. Bunların 11.000 kadarının organ-spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

Anter mRNA'sından çekilen cDNA kütüphanelerinin oluşturulması, anter-spesifik genlerin klonlanmasına olanak sağlamaktadır. McCormick *ve ark.* (1987), aminoasit düzeyinde Zmc13'e benzerlik gösteren LAT52 cDNA klonunu domates bitkisinin olgun anter kütüphanesinden izole etmişlerdir. Hanson *ve ark.* (1989), mısır bitkisinde olgunlaşmış polen safhasında ifade edilen Zmc13 transkriptini karakterize etmişler ve bunun polen çimlenmesi, polen tüpü büyümesi ile polen

olgunlaşması devresinde ifade edildiğini göstermişlerdir. Koltunow ve ark. (1990), tütünde tapetumda lokalize olan 3 adet cDNA (TA26, TA29 ve TA32) bulmuşlardır. Ayrıca bir çok anter-spesifik genin sıcaklığa bağlı olarak düzenlendiğini ortaya koymuşlardır. Smith ve ark. (1990), domates bitkisinden üç tane tapetum-spesifik cDNA klonu izole etmişlerdir. Scott ve ark. (1991) kolza (*Brassica napus* L.) bitkisinde anter büyüklüğü ile mikrogametogenesis safhaları arasında bir ilişki kurmuşlardır. Böylece kolza bitkisinden birisi 1.2-1.8 mm uzunluğundaki çiçek tomurcuklarından (sporogenesis kütüphanesi) ve diğeri ise 1.8-4.0 mm uzunluğundaki tomurcuklardan (mikrospor gelişmesi kütüphanesi) olmak üzere iki adet anter kütüphanesi oluşturmuşlardır. Sporogenesis kütüphanesinden izole edilen üç adet cDNA klonunun (A3, A8 ve A9) tapetum-spesifik olduğu *in situ* hibridizasyon tekniği ile gösterilmiştir. Bu bulgular, çok sayıda ve yüksek seviyelerde tapetumun-spesifik mRNA'ların üretildiğini ortaya koymaktadır.

Farklı bitkilerden izole edilen genlerin fonksiyonlarının araştırılması için bazı yöntemler uygulanmaktadır. Öncelikle yeni elde edilen DNA dizilerinin daha önce yayınlanmış olan DNA dizileri ile karşılaştırılması gereklidir. Daha sonra uygulanabilecek moleküler biyoloji teknikleri ise şunlardır (Turgut ve ark., 1994):

- 1) İlgili proteinin hücrel lokalizasyonunu belirlemek için antikor üretilmesi,
- 2) İlgili gene ait promotor bölgesinin raportör genlere (*gus*, *barnase* vb.) bağlanması ve böylece ilgili genin gerçek doku spesifitesinin ve geçici regülasyonunun bulunması,
- 3) Antisens RNA teknolojisinden yararlanarak, mutant fenotip elde edilmesi.

22.4 Erkek Kısır Bitkilerin Üretilmesi

Genetik mühendisliği yoluyla elde edilen erkek kısırlığın doğal sitoplazmik erkek kısırlığa göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar:

- 1) Bitkilere gen aktarılması ile bitki genotipinde oluşacak değişim yeni bir sitoplazmanın transferinden çok daha düşüktür,
- 2) Genetik mühendisliğinde sterilite özel bir sitoplazmaya bağlı olmadığından herhangi bir olumsuzlukla bağlantı (linkage) oluşturma riski çok daha azdır. ABD'de hibrid mısır üretiminde yaklaşık 20 yıl kadar CMS-T (sitoplazmik erkek kısır-T) sistemi kullanılmıştır. Fakat *Bipolaris maydis* T ırkının neden olduğu mısır yaprak yanıklığı hastalığı epidemik düzeylere ulaşmış ve ABD'de mısır üretimini sekteye uğratmıştır. CMS-T'nin yaprak yanıklığı hastalığı ile doğrudan ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Çünkü, erkek kısırlık ve hastalığa duyarlılık, mitokondriyal bir bağlantı göstermektedir (Levings, 1990).

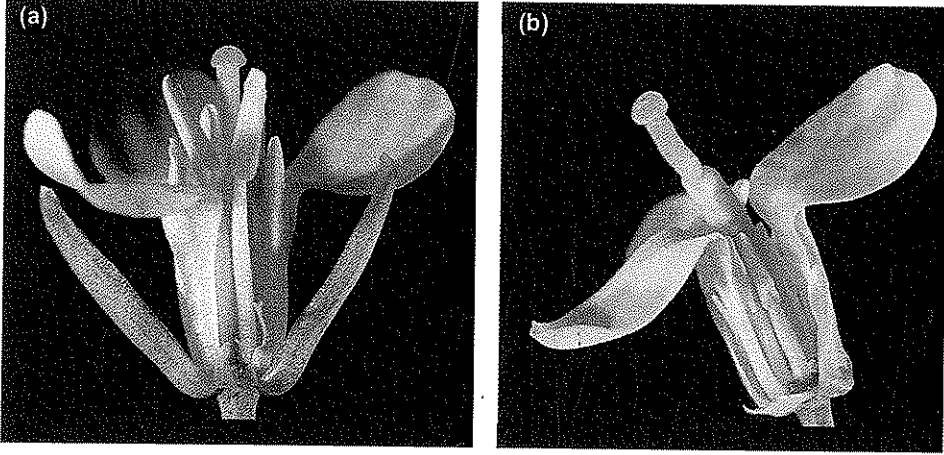
- 3) Tek bir sterilite genini genetik çeşitlilik gösteren bitki türlerinde kullanmak olasıdır. Çünkü, genin ifade spesifitesini kontrol eden elementlerin farklı türlerde çarpıcı bir şekilde korunduğu bilinmektedir.

Yukarıdaki nedenlerden dolayı araştırmacılar değişik bitki türlerinde erkek kısır hatlar elde edebilmek için genetik mühendisliği çalışmalarına başlamışlardır. Bu amaçla, engelleyici bir genin önüne anter-spesifik bir promotorun yerleştirilmesi ve ifadesi ile anterlerde polen üretiminin engellenmesi yoluna gidilmiştir. Doğal olarak bu engelleyici gen ürünlerinin anterdeki bazı canlı komponentleri parçalama yeteneğinde olması gereklidir (Turgut, 1993). Doğal erkek kısırlığın çoğunlukla tapetumdaki noksanlıklarla ilişkili olması (Kaul, 1988) nedeniyle araştırmacılar tapetum-spesifik promotor kullanarak tapetumun parçalanması ve böylece erkek kısır bitkilerin oluşturulması konusuna yoğunlaşmışlardır.

Bacillus amyloliquefaciens RNase (*barnase*) enzimi bitkilerde RNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. Mariani ve ark. (1990), *barnase* genini tütün bitkisinden izole edilen ve tapetum-spesifik olan TA29 promotorunun önüne klonlayarak *A. tumefaciens* aracılığıyla kolza bitkisine aktarmışlardır. RNase *barnase* geninin bitkide tapetum oluşumu aşamasında ifade edilmesiyle, tapetum-spesifik RNA yapımı ve dolayısıyla fonksiyonel çiçek tozlarının üretimi tamamen engellenmiştir (Şekil 22.1). En önemlisi de bu transgenik erkek kısır bitkilerde dişi fertilitenin etkilenmemiş olmasıdır. Ancak, melez bitkilerin tohum veya meyveleri için yetiştirilmelerinden dolayı fertilitenin yeniden kazandırılması gerekmektedir. Doğal sistemlerde fertilité hücre çekirdeğindeki genler tarafından restore edilmektedir. Mariani ve ark. (1992) genetik mühendisliği yoluyla elde ettikleri erkek kısır kolza bitkilerinde fertilitéyi başarılı bir şekilde restore etmişlerdir. *Barnase* genini taşıyan erkek kısır bitkilerin, homozigot tapetum-spesifik ribonükleaz inhibitör (*barstar*) genini taşıyan fertil tozlayıcılarla melezlenmiştir. Her iki genin de ifade edildiği F1 generasyonunda, hücre-spesifik *Rnase/Rnase* inhibitör kompleksinin bulunması ile anterlerde sitotoksik ribonükleaz aktivitesi bastırılmış ve fertilité restore edilmiştir. Yani burada dişi hatlara *barnase* (ribonükleaz), erkek hatlara ise *barstar* (ribonükleaz inhibitör) geni aktarılmaktadır. Benzer bir çalışmada ise tapetum-spesifik kolza A9 promotoru *barnase* genine eklenerek *A. tumefaciens* ile tütün bitkisine aktarılmıştır (Paul ve ark., 1992). Sonuçta, tamamen erkek kısır olan tütün bitkileri elde edilmiştir.

Erkek kısır bitkilerin elde edilmesi için izlenen diğer bir yol da antisens RNA yaklaşımıdır. Petunya bitkisinin anterlerinde flavonoid biyosentezinin engellenmesi bitkilerde erkek kısırlığa neden olmuştur (Van der Meer ve ark., 1992). Bu çalışmada araştırmacılar, içerisinde anter kutusu olan ve CaMV 35S promotoru tarafından kontrol edilen antisens-CHS (chalcone sentaz) genini petunya bitkisine aktararak anterlerde pigmentasyonu engellemişlerdir. Beyaz renkte anterlere sahip olan transgenik bitkiler aynı zamanda erkek kısır olmuşlardır. Turgut ve ark. (1994), tapetum-spesifik olan A9 genini A9 promotorunun kontrolü altında ve antisens yönde yine kolza bitkisine aktarmışlar fakat fenotipte herhangi bir mutasyon

meydana gelmemiştir. Bu da, tapetumda bulunan bazı genlerin fertilite ile ilişkili olmadığını göstermiştir.



Şekil 22.1. Kolzanın “Drakar” çeşidinde kontrol (a) ve *TA29-Rnase* geninin aktarıldığı erkek kısır transgenik bitkiye (b) ait çiçeklerin yapıları (Salamini ve Moto, 1994’ten izin alınarak).

Aarts *ve ark.* (1993), mısır bitkisi transpozon elementlerini *Arabidopsis* bitkisine aktararak erkek kısır olan bir mutant elde edip, daha sonra bu fenotipten sorumlu olan geni izole etmişlerdir. Araştırmacılar, erkek kısır fenotipi ilk transgenik bitkilerin (T1) kendilenmesi sonucu elde edilen üçüncü (T3) generasyonda gözlemişlerdir. Genetik analizler, kendilenen erkek kısır mutantların 3:1 oranında fertil:steril açılımını göstermiştir. Tamamen gelişmiş olan erkek kısır anterlerin enine kesitleri incelendiğinde hiçbir polen bulunamamıştır. Bu çalışma, transposon etiketlemesinin erkek kısırlık genlerinin klonlanmasında başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

22.5. Sonuç

Ticari hibrit tohum üretimindeki öneminden dolayı erkek kısırlık üzerindeki çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. Hibrit üretiminde erkek kısır hatlar kullanılmadığı zaman, kendilenmeyi önlemek için dişi hatlarda erkek organların (anterler) mekanik olarak uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu ise, büyük bir işgücünü gerektirmekte ve maliyeti artırmaktadır. Ayrıca, doğal sitoplazmik erkek kısırlık sisteminin yukarıda açıklandığı gibi bazı önemli olumsuzlukları beraberinde getirmesi, genetik mühendisliği çalışmalarının önemini artırmıştır.

Bugüne kadar, genetik mühendisliği çalışmalarıyla bazı türlerde erkek kısır bitkiler elde edilmiştir. Özellikle kolza bitkisinde yapılan çalışmalar başarıyla sonuçlan-

miştir. Bundan sonraki aşama ise bu bulguların diğer önemli bitki türlerinde de yaygınlaştırılmasıdır.

Kaynaklar

- Aarts MGM, Dirkse WG, Stiekema WJ, Pereira A (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature*, 363: 715-717.
- Hanson DD, Hamilton DA, Travis JL, Bashe DM, Mascarenhas JP (1989) Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *zea mays* and its expression. *Plant Cell*, 1: 173-179.
- Heslop-Harrison J (1968) Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. *New Phytol.*, 67: 779-786.
- Izhar S, Frankel R (1971) Mechanism of male sterility in *Petunia*: the relationship between pH, callase activity in the anthers, and breakdown of microsporogenesis. *Theor. Appl. Genet.*, 41: 104-108.
- Kamalay JC, Goldberg RB (1980) Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell*, 19: 934-946.
- Kaul MLK (1988) Male sterility in higher plants. In: Frankel R, Grossman M, Linskens HF, Maliga P, Riley R (eds), *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*, Volume 10, pp. 15-19, Springer Verlag.
- Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RB (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*, 2: 1201-1224.
- Levings CS (1990) The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. *Science*, 250: 942-947.
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RG (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 347: 737-741.
- Mariani C, Gossele V, De Beuckeleer M, De Block M, Goldberg RG, De Greef W, Leemans J (1992) A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, 357: 384-387.
- McCormick SM, Smith C, Gasser CS, Sachs K, Hinchey M, Horsch R, Fraley RT (1987) Identification of genes specifically expressed in reproductive organs of tomato. In: Nevins DJ, Jones RA (eds), *Tomato Biotechnology*, pp. 255-265, Alan R. Liss, New York.
- Mepharm RH, Lane GR (1969) Formation and development of the tapetal plasmodium in *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma*, 68: 175-192.
- Nave EB, Sawhney VK (1986) Enzymatic changes postmeiotic anther development in *Petunia hybrida*. I. Anther ontogeny and isozyme analyses. *J. Plant Physiol.*, 125: 451-465.
- Paul W, Hodge R, Smartt S, Draper J, Scott R (1992) The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Mol. Biol.*, 19: 611-622.

- Salamini F, Motto M (1994) The role of gene technology in plant breeding. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (eds), *Plant Breeding: Principles and Prospects*, pp. 138-159, Chapman & Hall, Cambridge.
- Scott R, Dagless E, Hodge R, Paul W, Soufleri I, Draper J (1991) Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 17: 195-207.
- Smith AG, Gasser CS, Budelier K, Fraley RT (1990) Identification and characterization of stamen- and tapetum-specific genes from tomato. *Mol. Gen. Genet.*, 222: 9-16.
- Turgut K (1993) A Study of Anther Gene Function in *Brassica napus* Using an Antisense RNA Approach . Doktora Tezi, Leicester Üniversitesi, İngiltere.
- Turgut K, Barsby T, Craze M, Freeman J, Hodge R, Paul W, Scott R (1994) The highly expressed tapetum-specific A9 gene is not required for male fertility in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 24: 97-104.
- Van der Meer IM, Stam ME, Van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitje AR (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell*, 4: 253-262.
- Worrall D, Hird D, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 4: 759-771.

Bölüm 23

Genetik Markörler ve Analiz Metodları

Ahmet Yıldırım¹, Nejdet Kandemir

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 60240 Tokat
e-posta: yasin@gop.edu.tr¹

23.1. Giriş

Kalıtım şekilleri, morfolojik (çiçek rengi gibi), biyokimyasal (izoenzimler gibi) ve DNA düzeyinde (moleküler markörler) izlenebilen karakterlere genetik markörler denir. Bu karakterlerin markör (işaret) olarak isimlendirilmesinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetiği hakkında, dolaylı da olsa, bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markörler DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler.

Genetik markör kavramı aslında hiç de yeni değildir. Mendel'in 19. yüzyılın sonlarında kalıtım biliminin temellerini ortaya koymasından sonra, bazı karakterlerin nesilden nesile birlikte aktarıldıkları ve Mendel'in rasgele açılım ilkesine uymadığı gözlenmiştir. 20. yüzyılın başlarında meyve sineği *Drosophila* üzerinde çalışan Morgan (1910) ve öğrencileri yapay olarak ortaya çıkardıkları çok sayıda mutant karakterin birbirleriyle birlikte hareket etmelerini incelemişler ve doğrusal (linear) genetik harita kavramını geliştirmişlerdir. Kalitatif açılım gösteren karakterlerin kantitatif açılım gösteren karakterlerle bağlantısı, yani gerçek anlamda markör anlayışı, Sax'ın (1923) fasülye tohum pigmentasyonu ile tohum iriliği arasındaki bağlantıyı gözlemesiyle şekillenmiştir. Bu çalışmada tohum pigmentasyonu fasülye tanesinin ağırlığını belirleyen bir markör olarak kullanılmıştır.

Kalitatif özellik gösteren ve kolayca gözlenebilen bu markörlerin sayısı fazla değildir. Mutasyon çalışmaları ile elde edilen mutant karakterler kalitatif açılım gösterip kolayca gözlenebilmelerine rağmen doğal populasyonlarda bulunmadıkları için pratikte kullanılamamaktadırlar. Morfolojik markörlerin kullanım potansiyelleri uzun bir süredir bilinmesine rağmen sınırlı sayıda olmaları nedeniyle pratikte uygulanabilirlikleri kısıtlı kalmıştır (Paterson, 1996a).

Biyokimya alanındaki gelişmeler son 20 yılda markörler konusunda da yeni bir çağ açmıştır. Öncelikle birbirinden ayrılabilir formları olan enzimlerin (izoenzimler) veya depo proteinlerinin markör olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Daha sonra DNA'nın kendisinin doğrudan markör olarak kullanılma fikri ortaya çıkmıştır. DNA markörleri, teorik olarak genomun her noktasını temsil etme yeteneğine sahiptirler ve sonsuz sayıdadırlar. Günümüzde moleküler DNA markörleri ile yapılan bağlantı haritaları birçok kültür bitkisi için geliştirilmiş olup, arzulanan genlerin doğrudan takibi ve seleksiyonu mümkün olmaktadır. Çevrenin baskısından bağımsız olan bu işlem genlerin kolayca takip edilebilen markörlerle bağlantı durumları incelenerek yapılabilmektedir. Moleküler DNA markörleri tekniklerinin bitki ıslahına entegrasyonu:

- 1) Arzulanan genlerin çeşitler veya türler arasındaki hareketini hızlandırmış,
- 2) Akraba yabancı türlerden yeni genlerin aktarılmasına izin vermiş,
- 3) Çok gen tarafından idare edilen karmaşık karakterlerin analizini mümkün kılmış,
- 4) Genlerin klonlanması çalışmalarını kolaylaştırarak hızlandırmış ve
- 5) Birbiriyle çaprazlanamayan bitkiler arasındaki genetik ilişkileri açığa çıkarmıştır.

Gelecekte ise genetik haritaların daha detaylı yapılması sayesinde bitki türlerindeki aktif bütün genlerin yerlerinin kesin olarak belirlenmesi ve ürünleri bilinmeyen birçok genin (hastalıklara dayanıklılık veya stres şartlarına tolerans gibi) klonlanması mümkün olabilecektir.

Bu bölümün ilk kısmında genetik markörlerin kullanım alanları ve markörlerle ilgili temel kriterler incelenecektir. Son kısımda ise değişik markör tipleri tanıtılacak ve temel kriterler açısından birbirleriyle karşılaştırılacaklardır.

23.2. Genetik Markörlerin Kullanım Alanları

23.2.1. Genetik haritaların hazırlanması

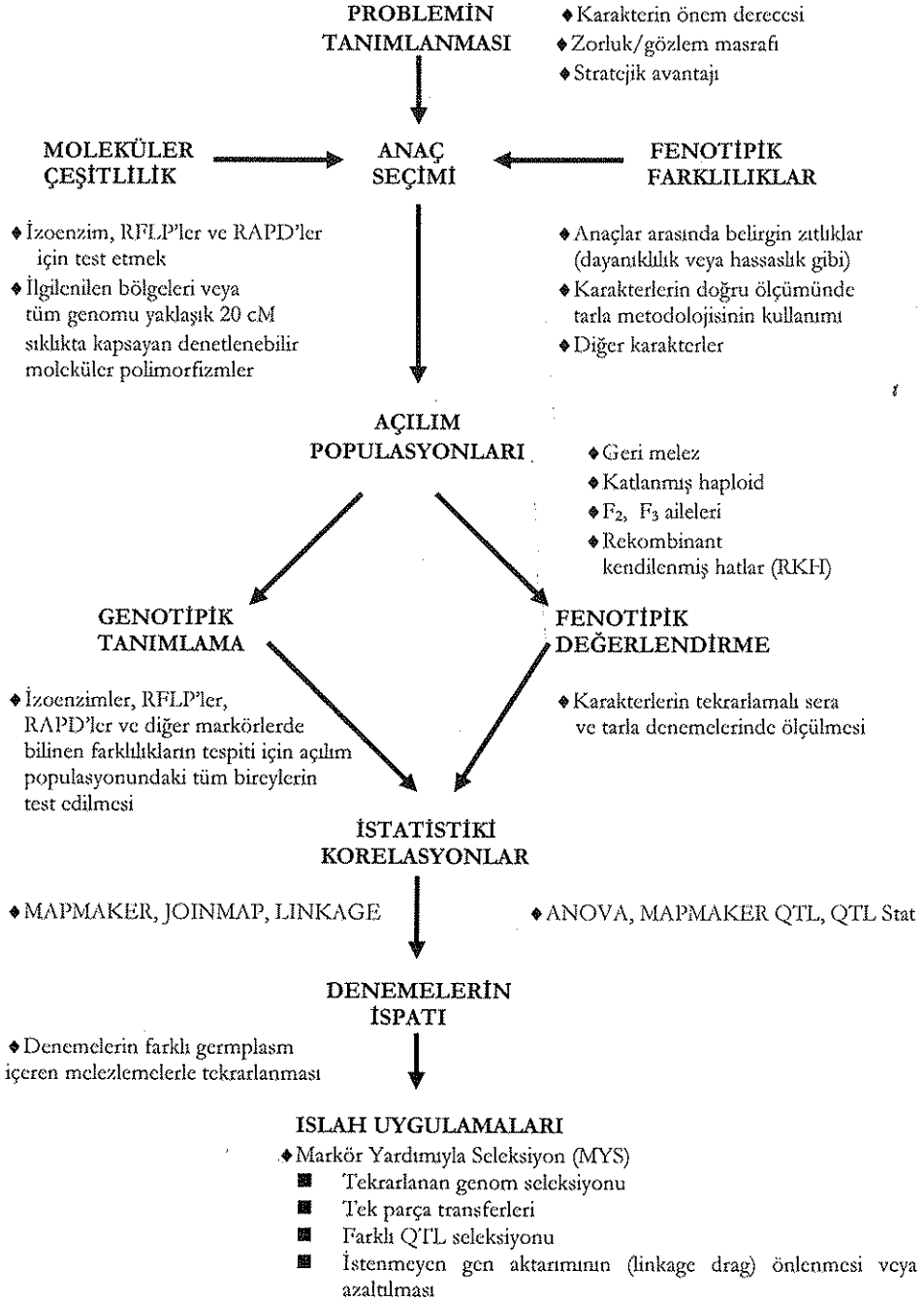
Genetik markörlerin en önemli kullanım alanı genetik haritaların hazırlanmasıdır. Genetik haritalar bir haritalama populasyonunda (F_2 , geri melez, katlanmış haploid, rekombinant kendilenmiş hat vs.) çok sayıda markörün analiz edilerek bağlantı (linkage) ilişkilerinin bulunması ile hazırlanır. Bir genetik bağlantı haritası iki

markörün ne kadar sıklıkla birlikte hareket ettiklerinin belirlenmesiyle oluşturulur. İyi bir genetik harita bütün genom üzerinde büyük boşluklar olmaksızın birçok markörlere sahiptir. Bağlantı analizinde bağlantı grup sayısının sitolojik gözlemlerde elde edilen kromozom sayısına eşit olması, haritanın bütün genomu kapsadığını göstermektedir (Paterson, 1996a). Genetik haritanın tamamlanması için telomerlerin de haritalanması gerekir. Telomerlerin haritalanması bağlantı gruplarının uçlarında yer alan markörlerin gerçekten de kromozomların uçlarında bulunup bulunmadığını göstermektedir.

Genetik harita hazırlanmasında ilk aşama uygun anaçların seçimi ve açılım popülasyonunun hazırlanmasıdır (Şekil 23.1). En yaygın olarak kullanılan açılım popülasyonları; rekombinant kendilenmiş hat (RKH), katlanmış haploid (KH), F_2 ve geri melez (GM) popülasyonlarıdır.

Genetik haritaların üretim hızı bu bilginin bitki ıslahı programlarında kullanılma oranı çoğaldıkça artmıştır. Basit ve karmaşık kalıtıma sahip olan genlerin her ikisi de DNA markörleri tarafından kolayca belirlenebilmektedir. Basit şekilde tek gen tarafından idare edilen birçok karakter (bazı hastalıklara dayanıklılık gibi), önce genetik haritaları yapılmak şartıyla, DNA markörleri sayesinde çok kısa sürede farklı genotiplere transfer edilmiştir. Bu amaçla en fazla kullanılan klasik ıslah metodu olan geri melezleme ıslahıyla DNA markör teknolojisinin kombinasyonu sayesinde hem gen çok kısa bir sürede transfer edilebilmekte hem de tekrarlanan anacın genotipik özellikleri arzulanan oranda geri kazanılabilmektedir (Tanksley ve ark., 1989).

Moleküler markörlerin en etkili kullanıldığı alan karmaşık kalıtıma sahip olan ve birden çok gen tarafından idare edilen kantitatif karakterlerin ıslahı olmuştur. Bitki boyu, çiçeklenme zamanı, kardeşlenme, verim ve verim unsurları, kalite, bazı hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık gibi birçok karakter kantitatif olarak idare edilmektedir ve bitki ıslahı çalışmaları açısından oldukça büyük öneme sahiptirler. Kantitatif karakterlerin birden fazla lokustaki genler (QTL) tarafından idare edilmeleri, her bir lokusun etki derecesinin farklı olması ve çevre şartlarından fazla etkilenmeleri nedeniyle klasik metodlarla ıslah çalışmalarında belirlenmeleri ve aktarılmaları oldukça zor ve uzun yıllar gerektiren bir uğraştır. Oysa moleküler markörler ile yapılan detaylı genetik haritalar sayesinde özellikle katlanmış haploid ve rekombinant kendilenmiş hatlar gibi homozigot popülasyonların farklı çevre şartlarında yetiştirilmeleri sonucu her bir lokusun etki derecesi belirlenebilmiş ve bu lokusların 10-30 cM (Paterson ve ark., 1988; Lander ve Botstein, 1989) gibi bir aralığa sahip muhtemel yerleri kromozomlar üzerinde tespit edilmiştir. Ayrıca her bir QTL'in fenotipik varyans üzerindeki etki dereceleri, farklı gen dozlarının etkileri ve QTL'ler arasındaki epistasi ilişkileri (Paterson ve ark., 1991; Lark ve ark., 1995) genetik haritalama çalışmaları sayesinde belirlenmiştir. Sonuçta QTL'ler gibi karmaşık karakterlerin başarılı şekilde transferleri ve etki derecelerinin belirlenmesi moleküler markörler sayesinde nispeten daha kolay bir şekilde gerçekleşmiştir.



Şekil 23.1. Bir genetik harita hazırlığında genel olarak takip edilen yöntem ve ıslah çalışmaları ile entegrasyonu.

23.2.2. Genetik parmak izi (fingerprinting) analizi

Parmak izi analizi genetik materyallerin birbiriyle benzerlik veya farklılıklarının saptanması amacını güder. Genetik markörlerdeki varyasyonun genlerdeki varyasyonu temsil ettiği varsayımından (Brown ve Kresovich, 1996) hareketle parmak izi analizinde markörlerin kullanımı fikri doğmuştur. Parmak izi analizinde aynı anda genomun pek çok yerine dair bilgi sağlayan markörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuçta genetik materyaller arasında farklılık gösteren lokusların oranı belirlenir. Farklılığın hangi lokusta olduğuna bakılmaz. Bu tip bir analiz bitki ıslahı programına alınacak materyallerin seçiminde kullanılır ve varyasyonu yüksek olan hatların kullanımı ile ıslahçı daha geniş bir değişim içinden istediklerini seçme şansına sahip olur.

Parmak izi analizi ayrıca çeşit teşhisinde de kullanılır (Smith ve Helenjaris, 1996). Adli tıpta da genetik markörlere dayalı parmak izi analizi gittikçe yaygınlaşan bir kullanım alanına sahiptir. Bu tip kullanımlarda mikrosatellitler gibi çok sayıda allellere sahip olan markör tipleri kullanılmaktadır.

23.2.3. Doğrudan gen etiketlenmesi

Bitki ıslahında kullanılan yeni karakterler çoğu zaman az bilinen genotiplerden gelmektedir. Burada bitki ıslahçısının istediği, bütünüyle tamamlanmış bir genetik harita hazırlamadan karakteri etiketleyecek bir markör bulmaktır. Bu işlem kolayca hazırlanan bir F₂ veya GM populasyonunda karıştırılmış açılanlar analizi (bulkcd segregant analysis) (Michelmore *ve ark.*, 1991; Wang ve Paterson, 1994) veya yakın izogenik hat (near isogenic lines, NIL) (Tanksley *ve ark.*, 1995) analizi ile gerçekleştirilebilir. Bu şekilde karakteri belirleyen gen veya kantitatif karakter lokusunun yakınında bulunan bir markör veya bunları çevreleyen iki markör belirlenir. İslah çalışmasının ileri safhalarında veya başka ıslah programlarında, fenotip sınıflarına ayrılması güç olan karakter yerine, kolayca gözlenebilen marköre bakılarak seçim yapılır. Kullanılan markörlerin DNA markörü olması durumunda seçim bitki henüz fide devresinde iken yapılır. İstenen birkaç bitki seçilirken diğerleri atılır.

23.2.4. Genlerin klonlanması

Haritayı temel alan klonlama yöntemi doğal olarak oluşan mutasyonları kullanılmaktadır. Genetik bağlantı analizi bir genin bir genomun %0.1 veya daha az aralıklı bir bölgesinde yerinin belirlenmesinde ve daha sonra geni içeren DNA kısmının fiziksel haritalama yöntemiyle klonlanmasında kullanılmaktadır (Paterson, 1996b). Bu bölgeden çıkarılan diziler, çeşitli yollarla izole edilmekte ve son olarak hedef gen mutant tamamlanması (mutant complementation) gibi bazı yöntemlerle tanımlanmaktadır (Bölüm 14'e bakınız). Haritayı temel alan klonlama yöntemi

tamamen haritalara bağımlı olan tek yöntem olmasına rağmen, genetik haritalama birçok gen izolasyonu stratejilerinin ana unsurlarından birisidir.

Genetik markörler yukarıda bahsedilen kullanımları yanında genom analizlerinde, evrimsel gelişmeler ve kromozomlarda oluşan yapısal değişmelerin belirlenmesinde, genetik kaynakların ve çeşitlerin korunması çalışmalarında ve genetik varyasyonun artırılması gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır.

23.3. Genetik Markörlerle İlgili Önemli Kriterler

Genetik markörleri birbiriyle karşılaştırmak için kullanılan birçok kriter vardır. Bunlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

23.3.1. Farklılık gösterme (polimorfizm)

Farklılık gösterme, kullanılan bir markörün farklı genotipleri ayırt edebilme yeteneğidir. Markörlerin haritalamada kullanılabilmeleri için polimorfik olmaları zorunludur. Yani, bir melezleme sonucu oluşan yavru döllerde kontrol edilebilmeleri için alternatif formlarının bulunması gerekir. Polimorfizm DNA dizisinde yaklaşık her 300 veya 500 nükleotidte bir oluşan varyasyonlardır. Eksonlar (kodlayan dizi) içerisinde oluşan varyasyonlar gözle görülebilir değişikliklere (tohum rengi, bitki boyu, hastalığa dayanıklılık gibi) neden olurlar. Oysa, varyasyonların çoğu intronlar (herhangi bir özelliği kodlamayan dizi) içerisinde gerçekleşir ve bir organizmanın dış görünüşü veya fonksiyonu üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Ancak, bunlar DNA düzeyinde belirlenebilirler ve markör olarak kullanılırlar. Markörlerin farklılık gösterme oranları markör tipine ve bitki türüne göre büyük ölçüde değişmektedir.

23.3.2. Lokus sayısı

Bazı markörler bir lokusa ait bilgi verirken bazı markörlerden bir analiz sonucunda çok sayıda lokusa ait bilgi alınabilir. Çok lokuslu olma özelliği bir avantaj gibi görünse de farklılıkların hangi lokusa ait olduğunu belirlemek güçtür. Bu tip çok lokuslu markörlerin farklı haritalar arasında transferi de oldukça güçtür. Bu güçlükle poliploid türlerde her lokusun tekrarlanması nedeniyle daha da artmaktadır (Wu *ve ark.*, 1992).

23.3.3. Haritalar arasında transfer edilebilme

Değişik organizmalara ait genomlar üzerinde yapılan araştırmalar, akraba türlerin yanında birbirinden çok uzak organizmalarda dahi kromozom üzerinde gen sıralarının korunduğunu göstermiştir. Aynı durum DNA veya diğer tip markörler

için de geçerlidir. Bu gerçek, karşılaştırmalı haritalama fikrinin doğmasına yol açmıştır. Bu anlayışa göre bir organizmada haritalanan bir gen veya markör onunla akrabalığı olan organizmalarda da aynı bölgeye haritalanacaktır. Karşılaştırmalı haritalamanın bir sonucu olarak herhangi bir genomun istenilen bir bölgesi için markör bulmak kolaylaşmıştır. Bunun için başka haritalardan istenen bölgeye haritalanacağı tahmin edilen markörler getirilmektedir. Ancak, böyle bir yaklaşımın başarılı olabilmesi için markörlerin haritalar arasında transfer edilebilme özelliği taşıması gerekmektedir. Morfolojik ve izoenzim markörlerinde transfer oranı yüksek iken DNA markörlerinde bu oran kullanılan markörün tipine sıkı sıkıya bağlıdır.

23.3.4. Güvenilirlik

Güvenilirlik, aynı genetik materyal üzerinde yapılan bir markör analizinin her zaman ve koşulda aynı sonuçları vermesi şeklinde basitçe özetlenebilir. Güvenilirlik, markör tipine göre değişebilmektedir. Morfolojik ve izoenzim markörlerinin güvenilirlikleri yüksek iken, DNA markörlerinde değişik markör tipleri farklı güvenilirliklere sahiptir.

23.3.5. Eşbaskınlık (ko-dominanslık)

Markörlerin eşbaskın olması, yani her iki allelinin de ayırt edilebilmesi, bitki ıslahında aranan bir özelliktir. İzoenzim markörleri ile bir kısım DNA markörleri eşbaskın özellik taşımaktadır.

23.3.6. Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenme

Morfolojik markörler üzerinde çevrenin ve bazen de diğer lokusların etkili olması onların genetik analizde etkili bir şekilde kullanılabilmesini kısıtlamaktadır. Aslında bu gerçek, morfolojik markörlerin sayısının sınırlı olmasında büyük rol oynamaktadır.

23.3.7. Fenotipi etkileme

Her bir bitki türüne ait çok sayıda mutant karakterler belirlenmesine ve bunların pek çoğunun haritalanmış olmasına rağmen, bitki fenotipi üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı bunlar markör olarak rağbet görmezler. Bunlara örnek olarak, bitkilerde bodurluk, albino, erkek kısırlık mutantları verilebilir. Bu markörler agronomik açıdan önemli genlere bağlı olsalar bile, bitki performansı üzerine olan olumsuz etkilerden dolayı bitki ıslahı programlarında kullanılmazlar.

23.3.8. Bütün dokularda gözlenebilme

Her dokuda gözlenebilen DNA markörlerinin aksine, morfolojik ve izoenzim markörleri ancak belli gelişme dönemlerinde belli dokularda gözlenebilirler. Bu durum genetik analizin erken bir dönemde veya belli bir dokuyu tahrip etmeden gerçekleştirilmesini imkansız kılabilir.

23.3.9. Allel sayısı

Bazı markör tiplerinde aynı lokusta çok fazla sayıda allel olabilir. Bu durum markörün farklılık derecesini (polimorfizm) yükseltebilir. Bu tip markörler genetik parmak izi tayininde çok kullanışlıdır.

23.3.10. Otomasyona uygunluk

Gelecekte genetik analizin tarlada, doğrudan bitkilerden alınan küçük bir doku parçası üzerinde otomasyona dayalı cihazlar kullanılarak çok kısa bir sürede gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Bu tip analizlerde, gerekli işlemleri çok az olan ve el değmeden gerçekleştirilebilecek markör analiz yöntemleri ön plana çıkacaktır.

23.3.11. Genomdaki dağılım

Değişik tiplere ait markörler genom üzerinde farklı dağılım göstermektedirler. Bu farklılığın asıl sebebi, genomlarda genlerin ve diğer kopya sayısı az olan DNA dizilerinin kromozomların belli bölgelerinde yoğunlaşmaları gerçeğidir. Bu nedenle doğrudan gen veya gen ürünlerine dayanan markör sistemleri, genom üzerinde üniform dağılan markörler veremezler.

23.4. DNA Markörlerinin Moleküler Esasları

DNA markörleri birçok farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkarlar. Bunun en basit örneği iki genotipi birbirinden ayıran tek bir nükleotidin (bazın) yer değişmesi kadar küçük bir farklılıktır (Paterson, 1996a). Tek bir bazın yer değiştirerek bir enzimin kesim noktasını değiştirmesi, DNA parçasının uzunluğunu değiştirerek ilgili gözlem metodunda direkt olarak bir bireyin genotipini temsil eden farklı bir markör ortaya çıkarır. PCR metodunu temel alan gözlemlerde PCR primerinin (başlatıcı DNA) bağlanacağı bölgedeki bir bazdaki değişiklik de aynı şekilde bir etkiye sahiptir. Alternatif olarak iki kesim bölgesi arasındaki veya iki primer bölgesi aralığındaki yeni düzenlenmeler DNA markörlerini meydana getirirler. Bu gibi yeni düzenlenmeler hareketli DNA elementlerinin (transposable elementler) katılmasını, çıkarılmasını veya ardışık olarak tekrarlanan sıraların kopyalanmasındaki hataları içerebilmektedir. Yeniden

düzenlenmeler birçok farklı enzimler veya aynı bölgenin karşılıklı kıyılarında bulunan farklı PCR primerleri tarafından ortaya çıkarılabilen DNA markörlerini meydana getirme eğilimindedirler. Öte yandan, taban yer değiştirmeleri sadece belirli kesici enzimler veya PCR primerlerine özeldir. Bir kesici enzim tarafından belirlenen DNA markörlerinin diğer kesici enzimler tarafından da belirlenebildiğinin bulunması, birçok bitki türlerindeki DNA markörlerinin çoğunun DNA'nın bölgesel reorganizasyonunun sonucu olduğunu göstermektedir.

23.5. Genom Analizi İçin Kullanılan DNA Markörleri

Botstein *ve ark.* (1980) bitkiler ve hayvanların moleküler genetik analizinde takip edilecek temel prensipleri belirlemişlerdi. Bu çalışmanın sonucunda, ana kesim bölgelerindeki mutasyonlar veya komşu kesim bölgeleri arasındaki uzaklığın değişmesine neden olan mutasyonların DNA markörleri olarak gözlemlenebileceği belirtilmişti. Bu teknik RFLP (restriction fragment length polymorphism = kesilmiş parça uzunluğu farklılığı) olarak adlandırılmış ve genetik haritalama faaliyetlerinin temelini oluşturmuştur. RFLP'ler insan genomunun ilk moleküler haritasının yapılmasında kullanılmıştır. Ancak çok fazla miktarda DNA istemesi ve allelik zenginliğinin kısmen düşük olması insanlarda ve deney hayvanlarında yeni tekniklerin bulunmasını zorunlu kılmıştır. Bitkilerde ise RFLP nispeten daha önemli bir teknik olarak kalmış ve birçok ana kültür bitkilerinin detaylı genetik haritalarının temeli olmuştur.

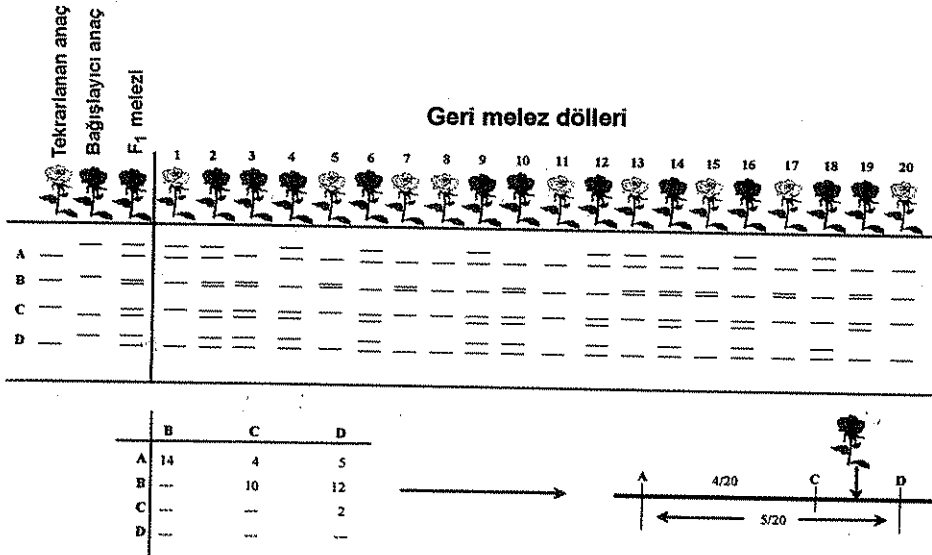
Genom haritalarının hazırlanmasında DNA'nın temel alınması iki önemli avantaj sağlamaktadır. Bunlar; 1) kalıtım bilgisinin elde edilmesinde markörler açısından sınırsız bir potansiyel kaynak olması ve 2) haritalar üzerindeki spesifik bazı markörlerin fonksiyonel genlerin kendisi olmasından ötürü, doğrudan belirli genlere ulaşmayı temin etmesidir.

Son olarak genlerin dizilerinin korunması nedeniyle organizmalar arasındaki benzerlikler farklı organizmalardaki aynı genlerin DNA markörleri olarak kullanılmalarını sağlamışlardır. Bu şekilde 'karşılaştırmalı haritalama' (comparative mapping) yoluyla sadece genlerin içerdiği bilginin değil, aynı zamanda kromozom üzerindeki dizilimlerinin de uzun evrimsel faaliyetlere nazaran sabit kaldığı gösterilmiştir. Karşılaştırmalı haritalama genom analizinde olağanüstü bir potansiyel etkinlik önermektedir. Çünkü bir organizmadaki genlerin fonksiyonu ve yeri hakkındaki yeni bir bilginin diğer ilgili organizmalardakinin büyük oranda bir benzeri olduğu kabul edilir.

DNA klonlama vektörlerinin kullanılması fiziksel haritaların geliştirilmesini sağlamıştır. Böylece bitki kromozomları üzerinde geniş bir bölgeye dağılmış olan ve birbiriyle çakışan DNA klonlarının belirlenmesi sonucu bütün bitki kromozomlarının tam dizisinin (DNA taban dizilimi) çıkarılmasını sağlayacak önemli bir adım atılmıştır.

23.6. Genetik Markörler Arasındaki İlişkiler

Genetik haritalama yüksek organizmaların genomlarının kromozom olarak adlandırılan doğrusal (linear) üniteler halinde organize olması ve taşınması gerçeğinin tespit edilmesiyle mümkün olmuştur. Aynı kromozom üzerindeki birbirine yakın genetik markörlerin ebeveynlerden döllere birlikte hareketi veya 'genetik bağlantı' olayı kromozom boyunca bulunan markörlerin diziliminin belirlenmesini sağlamıştır. Örneğin, Şekil 23.2 dört genetik markörün bir geri melezleme sonucu elde edilmiş 20 adet döldeki durumunu göstermektedir. Şekil incelendiğinde B markörünün diğer markörlerdeki herhangi bir genotiple ilgili olmadığı görülmektedir. Yani B markörü A, C ve D'ye bağlantılı değildir. Bununla birlikte A, C ve D markörlerindeki genotipler bazı benzerlikler gösterir. Yalnızca dört birey (1, 3, 10 ve 13) A ve C markörleri bakımından farklı genotipe sahiptirler. İki birey (18 ve 19) C ve D markörleri bakımından farklı genotip gösterir. Benzer şekilde beş birey A ve D markörleri açısından farklı genotipe sahiptirler. Bu durum C markörünün A ve D markörleri arasında bulunduğunu ve kısmen D'ye daha yakın olduğunu göstermektedir. Böyle bir analiz yüzlerce veya binlerce marköre genişletilerek, markörler arasındaki ilişkiyi gösteren bir bağlantı haritası yapmak mümkündür. Hatta bu basit geri melezleme populasyonunda gösterilen prensipler geliştirilerek diğer populasyon yapıları da bağlantı analizi için kullanılabilirler. Bu populasyonlara örnek olarak heterozigot bireylerin karşılıklı melezlenmesi veya kendilenmesi sonucu elde edilen F_2 populasyonları, rekombinant kendilenmiş populasyonlar, katlanmış haploit populasyonlar veya açık tozlanmış populasyonlar verilebilir.



Şekil 23.2. Çiçek rengi geninin bir geri melez populasyonunda 4 adet polimorfik markör kullanılarak haritalanması (Paterson, 1996a'dan değiştirilerek uyarlanmıştır).

23.7. Gen Haritalarının Hazırlanmasında Kullanılan Populasyonların Seçimi

Bitkilerin genetik haritalarının yapılmasında kendilerine has avantaj ve dezavantajlara sahip olan birçok farklı populasyon kullanılmaktadır (Tablo 23.1). Bitkilerdeki birçok genetik haritalama populasyonları homozigot anaçlar arasında yapılan çaprazlamalardan elde edilmiştir. Ancak, şekerkamışı, patates ve yonca gibi kendilenmeye karşı toleranslı olmayan birçok bitki türleri heterozigot bireyler arasındaki çaprazlanmaya dayanmak zorundadır. Bu tip bitki populasyonlarının genetik analizi 'kesilmiş parçacıkların tek dozu'nun dağılımına bağlıdır (Wu ve ark., 1992). F_1 melezinin anaçlardan birine (tekrarlanan) melezlenmesi ile sadece bağışlayıcı anaçtan gelen alleller açısından dağılım gösteren bir geri melez populasyonu çabucak üretilebilir. Geri melez bireylerinden her biri homolog kromozom çiftlerinden yalnızca biri açısından rekombinanttır ve yalnızca bir mayoz bölünme geçirir. Dolayısıyla bir genel anaçtan gelen markör allelleri arasındaki ilişki oldukça kuvvetli bir şekilde devam eder (bağlantı dengesizliği). Geri melez populasyonları genellikle zorunluluk durumunda üretilir ve kullanılırlar.

Tablo 23.1. Farklı genetik haritalama populasyonlarının özellikleri.

Populasyon çeşidi	Her bir birey için bilgi verici gamet sayısı	Her bir gamette gerçekleşen rekombinasyon sayısı	Her bir lokusta muhtemel genotip sayısı	Üretmek için gerekli generasyon sayısı	Tekrarlamalı teste uygunluğu
KH	1	x	2	2	Uygun
Geri melez	1	x	2	2	Uygun değil
F_2	2	x	3	2	Uygun değil
RI	1	2x	2	6-8	Uygun
Intermated	2	$x + (xn/2)$	3	n^*	Uygun değil

*Tipik olarak $n=4$ 'dür, fakat bazı özel durumlar için başka sayılar kullanılabilir.

F_1 hibridi kendilenerek veya kardeşi ile çaprazlanarak F_2 populasyonu üretilebilir. Herbir F_2 bireyi homolog kromozomların her iki çifti açısından rekombinanttır. Ancak, aynı geri melezlerde olduğu gibi yalnızca bir mayoz bölünme geçirmiştir. Herbir homolog kromozomun farklı rekombinasyon olayı içermesi gerçeğinin bir sonucu olarak bir F_2 bireyi bir geri melez bireyinden iki kat fazla bilgi içermektedir. Bütün muhtemel anaç allellerinin kombinasyonlarını (AA, Aa, aa) içermesi, kolayca üretilmeleri ve daha fazla bilgiye sahip olması nedeniyle F_2 populasyonları, bitkilerde en yaygın kullanılan genetik bağlantı haritalama populasyonları olmuşlardır.

Katlanmış haploidler (doubled haploids) anter kültürüne uygun olan bazı bitki türlerinde ve *Hordeum bulbosum* tekniğine uygun olan arpa bitkisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Katlanmış haploidler (KH) tek bir polen tanesinden bitkilerin çoğaltılması ve kromozom katlanmasının teşviki ile üretilmektedirler.

Bitkinin iki aynı homologa sahip olmasından dolayı rekombinasyona ait bilgi miktarı bir geri melezinki ile aynıdır. Bununla birlikte, KH bireyleri tamamen homozigot olup, kendileme yolu ile genetik olarak birbirinin aynısı çok fazla miktarda döl üretilebilir. Bu, fenotiplerin tekrarlamalı testine imkan verir ve aynı zamanda KH populasyonlarının birçok farklı araştırmacılara dağıtılarak genotipler hakkında oldukça detaylı bilgi toplanmasını mümkün kılar.

Homozigot populasyonlar rekombinant kendilenmiş (RI) hatlar üretilerek de elde edilebilir. Bu durumda bitkilerde F_2 bireyleri defalarca kendilenerek ve tek tohum nesil (single seed descent) yöntemi ile RI populasyonları üretilmektedir (Taylor, 1978). Kendileme sonucu heterozigot bireylerin kaybedilmesiyle homozigotluğa ulaşmakta ve dolayısıyla yeni rekombinantların oluşma şansı azalmaktadır. RI bitki populasyonları F_2 populasyonlarına nazaran homolog başına iki kat daha fazla rekombinasyona ait bilgi içermektedir. Ancak yukarıda da ifade edildiği gibi RI bireylerde iki homolog birbirinin aynı olmasına karşılık, F_2 bireyleri her biri farklı bilgi taşıyan iki homologa sahiptirler. Dolayısıyla RI bitkileri yakın bağlantıların ortaya konması açısından F_2 bitkileriyle hemen hemen aynı miktarda bilgi sağlarlar. Ancak, RI populasyonlarının en büyük avantajları KH'de olduğu gibi çok sayıda birey elde edilebilmesi, homozigot bireylerin tohumlarının farklı araştırmacılara gönderilebilmesi, farklı çevre koşullarında fenotiplerin gözlenebilmesi ve çalışmaların tekrarlanabilmesidir.

Farklı amaçlar için farklı genetik haritalama populasyonları tercih edilir. Eğer daha önce üzerinde çalışılmamış bir organizmanın ilk genetik haritasının yapılması amaçlanıyorsa, F_2 ve geri melez populasyonları geniş aralıklara sahip markörlerle bu amaca kolayca hizmet ederler. Eğer detaylı bir genetik haritada yakın bulunan markörlerin sırası ve mesafeleri belirlenmek isteniyorsa F_2 'ler arası melezlemeler (intarmated) yoluyla üretilmiş populasyonlar en uygun tercihtir. Çevreden fazlaca etkilenen kompleks yapıya sahip fenotiplerin genetik analizinde ise rekombinant kendilenmiş ve katlanmış haploid populasyonlar tekrarlanabilir araştırmalara fırsat tanımları ve genetik olmayan faktörlerin veri üzerindeki etkilerini en aza indirmeleri nedeniyle idealdirler. Farklı haritalama populasyonlarının bazı avantaj ve dezavantajları Tablo 23.1'de özetlenmiştir.

23.8. Genetik Haritalar İle Fiziksel Haritaların Yakınlığı

Bitkilerin birçoğunda kromozomlar mikroskopla incelendiklerinde; büyüklüklerine, farklı kromozom kollarının nispi uzunluklarına, bazı spesifik boğum ve yumrulara veya kimyasal olarak saptanabilen bant yapılarına göre sınıflandırılabilirler. Moleküler markörler yoluyla oluşturulan genetik haritaların bulunmasında, anormal kromozomların bulunduğu genetik stoklar üzerinde yapılan çalışmalar, bu kromozomlar üzerinde bulunan genlerin yapıları hakkında oldukça fazla bilgi sağlamıştır. Bu bilgiyi daha iyi kullanabilmek için moleküler haritaların bağlantı gruplarını sitolojik olarak tanınan kromozomlarla ilişkilendirmek önemlidir. Bu

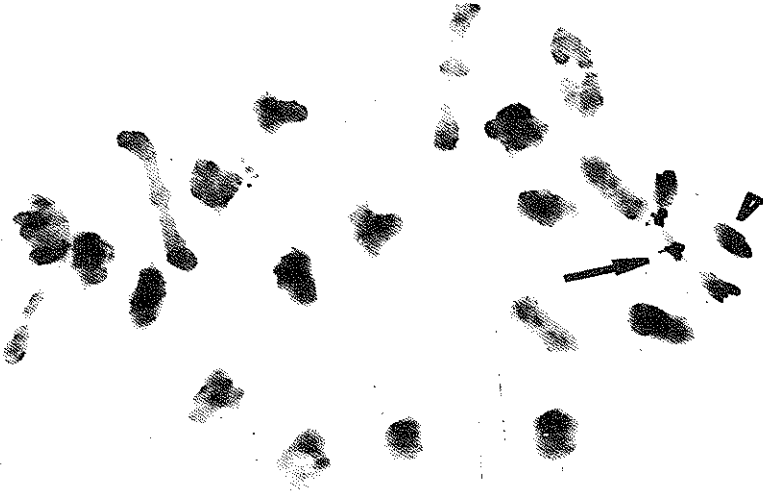
amaca yönelik en yaygın yaklaşım yolu anöploid (aneuploid) genetik stokların kullanılması olmuştur. Örneğin, domateste 12 kromozomdan herbiri için trizomik olan bir genetik stok serisi DNA markörleriyle birlikte farklı bağlantı gruplarını haritalamada kullanılmıştır. Bir trizomik kromozoma bağlanan DNA markörleri normal bir kromozoma bağlanan marköre nazaran %50 daha fazla yoğunluğa sahip sinyal vermiştir (Tanksley, 1993).

Polioid olan bitkiler genellikle kromozom kayıplarını tolere edebilirler. Örneğin, buğdayda nulizomik (nullisomic) veya daha geniş bir ifadeyle anöploid stoklar kullanılarak bir çok DNA markörleri kromozomlara yerleştirilmiştir (Anderson *ve ark.*, 1992). Pamuk kültür türlerinde 26 kromozomun herbiri başka bir türe yerleştirilmiş ve bu yer değiştiren kromozom üzerinde bulunan DNA markörleri RFLP yöntemiyle belirlenmiştir (Paterson *ve ark.*, 1996). Kısmen yeni bir yaklaşım ise sitolojik özellikleri bakımından kolayca ayırt edilemeyen kromozomların moleküler haritalar yöntemiyle belirlenmesidir. İn-situ hibridizasyon işlemi (ISH) DNA problemlerinin kromozomlara direkt olarak uygulanışı olup, bir DNA elementinin bir organizmanın kromozomları boyunca dağılımını araştırmak için kullanılan kuvvetli bir metottur. Bu teknik ardışık olarak tekrarlanan DNA elementlerinin yerlerini belirlemede kullanılmaktadır. Bu elementlerin binlercesi bir lokasyonda bulunur ve oldukça yoğun bir sinyal üretirler (Şekil 23.3). Zor olmasına rağmen ISH aynı zamanda tek kopyaya sahip elementlerin yerinin bulunmasında da kullanılır. Bu teknik sadece genetik bağlantı gruplarını belirli kromozomlara atfetmekte kalmaz, aynı zamanda tekrarlamalı DNA elementlerinin genom boyunca dağılımının çalışmasında da oldukça etkindir.

23.9. Farklı Türlerin Haritalarının Birbiriyle Olan İlişkisi (Synteny veya Karşılaştırmalı Haritalama)

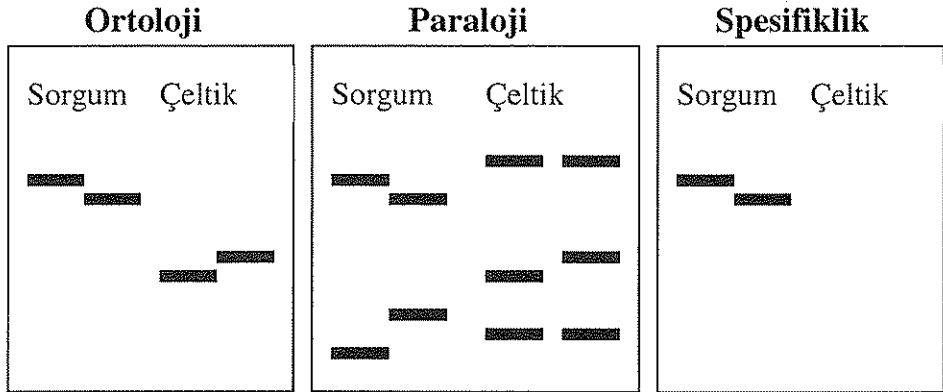
Son 20 yılda yapılan moleküler genetik çalışmaları, milyonlarca yıl önce birbirinden ayrılmış türler arasında gen repertuarları açısından oldukça büyük benzerlikler ortaya çıkarmıştır. Farklı türlerdeki genlerin benzerliği, mısır ve sorgum gibi birbirine yakın olmasına rağmen birbiriyle melezlenemeyen ve dolayısıyla bağlantı analizine tabi tutulamayan türlerde genlerin kromozomlar boyunca organizasyonundaki benzerlikler ve farklılıkların belirlenmesini temin etmektedir.

Karşılaştırmalı haritalama birbiriyle melezlenemeyen türlerin kromozomlarında gen dizilişindeki benzerlik ve farklılıkların çalışılmasıdır. Birçok ana ürünlerin ve model sistemlerin birbirlerinden ayrılmasını şaşılabilecek derecede küçük kromozom değişikliklerinin (inversiyon ve translokasyon gibi) sağladığını göstermede kullanılmıştır. Aynı zamanda karşılaştırmalı haritalar bir türün haritalanmasından elde edilen bilgilerin hızlı ve etkili bir şekilde akraba türlere de uygulanmasını sağlamıştır.



Şekil 23.3. CS+4V adisyon hattı ile 'Yangmai-5' (4V(4D)) substitisyon hattının melezlenmesi sonucu elde edilmiş olan F1 bitkisinin mitotik polen ana hücrelerinin bir *Dasyphyrum villosum* spesifik prob (p380) ile melezlenmesinden elde edilen in-situ hibridizasyon motifi. Eşleşmiş olan 4V kromozomları ok ile, univalent 4D kromozomu ise içi boş ok başı ile gösterilmektedir (Yıldırım ve ark., 1998).

Karşılaştırmalı haritalama iki farklı türdeki genetik markörlerin genel bir setinin (ortolog) analizini ve bunların kromozomlar üzerindeki dizilimlerinin değerlendirilmesini içermektedir. Kullanılmak zorunda olunan genetik markörler iki spesifik kritere sahip olmalıdır (Şekil 23.4). Birincisi, karşılaştırmalı haritalama farklı bitki türlerindeki ortolog genetik lokusların analizi üzerinde olmalıdır. Ortolog olması için genetik lokuslar genel bir ata lokusundan elde edilmek zorundadır. Ortoloji allelizme benzerdir, aradaki fark türlerdeki bahsedilen lokusların seksüel olarak melezlemesinin yapılamamasıdır. Dolayısıyla, klasik anlamda bir direkt allelizim testi mümkün değildir. Karşılaştırmalı haritada karşılaşılan en yaygın sorun DNA dizilerinin, üstünde çalışılan türlerin her birinin genomunda yalnızca bir yerde bulunmasıdır. Bu kritere uyan bir DNA dizisi radyoaktif veya floresans tekniği ile etiketlenerek her bir türden alınmış olan genomik DNA'ya uygulaması yoluyla kolayca belirlenir. Eğer etikenlenmiş prob yalnızca tek bir genomik DNA parçası ortaya çıkarırsa genom içerisinde yalnızca bir bölgede bulunması muhtemeldir. Karşılaştırmalı haritalama için kullanılan genetik markörlerin ikinci problemi farklı türlerde benzer şekilde korunmuş olarak bulunmak zorunluluğudur. Böylece genomdaki ortolog lokuslar değerlendirilebilir. Bu amaçla özellikle cDNA'lar ortolojinin belirlenmesi için kullanışlıdır.



Şekil 23.4. DNA markörlerinde karşılaştırmalı haritalama için ihtiyaç duyulan ortoloji ve korunmuşluk kriterleri. Ortolog lokuslar genel bir atadan miras alındığı bilinen lokuslar olup karşılaştırmalı haritalamada tercih edilirler. Bunun en önemli nedeni Sorgum ve Çeltik gibi farklı iki taksondan gelen bitkilerin herbirinde yalnızca bir lokusu belirleyen DNA markörleri tarafından ortaya çıkarılmalıdır. Paralog lokuslar da genel bir atadan miras alınmışlardır ancak birbiriyle kesişen duplikasyonlara sahiptirler. Farklı taksonlardaki bu tip lokuslar arasında ilişkinin tesisi oldukça zordur çünkü lokuslar arasında bir çok farklı kombinasyon ihtimali mevcuttur. Son olarak, yalnızca bir taksonda bulunan genetik lokuslar da (spesifiklik) karşılaştırmalı haritalama için uygun değildir (Paterson, 1996a).

Etkisi görülen genler bitkilerdeki spesifik fonksiyonlardan sorumlu olduğu için, gen veya genlerin yapısında meydana gelen mutasyonlar fenotipteki bir değişiklik yoluyla hızlıca belirlenebilmektedirler. Mutasyonlar büyük oranda tesadüfî bir işlem olduğu için, çoğu orijinal allele nazaran daha az adapte olmuşlardır ve böylece gen havuzundan doğal veya suni seleksiyon yoluyla hızlı bir şekilde elimine edilirler. Bu nedenden ötürü etkisini gösteren diziler yavaşça gelişme eğilimindedir ve karşılaştırmalı haritalama için özellikle kullanışlıdır.

Yalnızca, bir kısım DNA markör teknolojisi karşılaştırmalı analiz için uygundur. Bugüne kadar yapılan karşılaştırmalı haritaların çoğu DNA probu olarak cDNA'ların kullanıldığı RFLP analizine dayanmaktadır. Karşılaştırmalı haritalama için PCR'yi temel alan en uygun teknik bölünerek çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS) tekniğidir. CAPS markörleri cDNA'lardan elde edilebilir. Böylece, hem ortoloji hem de koruma kriterine uygundur. PCR'yi baz alan tekniklerden olan ve lokusa spesifik DNA primerlerini kullanan 'basit dizi tekrarları (SSR veya mikrosatelitler)' ve 'dizisi etiketlenmiş alanlar (STS)' karşılaştırmalı haritalama için bazen uygun olsalar da, RFLP veya CAPS'tan daha az sıklıkta kullanılırlar. Bu tip sistemler lokusa spesifik oldukları için prensipte ortoloji tespit edilebilir. Bununla birlikte CAPS'ların aksine rasgele primer dizileri genellikle korunmuş dizilerin içinde bulunmadığı için farklı türlerin DNA'sında homolojiye sahip olmaları pek mümkün değildir.

PCR'yi temel alan ve 'tesadüfî' primerleri kullanan RAPD, AP-PCR (rasgele primer kullanımına dayanan PCR), DAF (DNA çoğaltımıyla parmakizi) ve AFLP teknikleri karşılaştırmalı haritalama için uygun değerlerdir. Karşılaştırmalı haritalamada bu tekniklerin uygulanmasındaki zorluk her birinin eş zamanlı olarak birbirinden bağımsız birçok genetik lokusları ortaya çıkarmalarından kaynaklanmaktadır.

Bununla birlikte prensipte bireysel RAPD çoğaltma ürünleri, lokus spesifik PCR primerleri (SCAR-ES veya karakterize edilmiş dizilerin çoğaltıldığı bölgeler) geliştirilerek karşılaştırmalı analiz için daha uygun hale getirilebilirler. Karşılaştırmalı haritalama açısından düşünüldüğünde SCAR, klonlanan elementin genellikle bir cDNA olmadığı mikrosatelitlere benzemektedir. Böylece, SCAR bölgeleri tür boyunca korunmuş olabilir veya olmayabilir.

23.10. Genetik Markör Tipleri ve Analiz Metotları

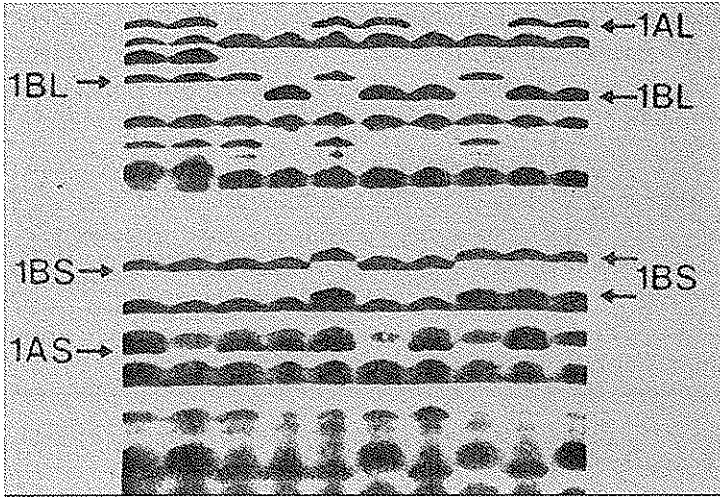
Bu bölümde genetik markörlerden en çok kullanılan bazılarının tanıtımı ve analiz metodlarının incelenmesinden sonra, yukarıda tartışılan kriterler bakımından değerlendirilmeleri yapılacaktır. Ayrıca markörlerin kullanımlarını etkileyen işgücü, masraf ve zaman gereksinimleri incelenecektir.

23.10.1. Morfolojik markörler

Çok uzun zamandır bilinmelerine rağmen sayılarının az oluşu yanında çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmeleri nedeniyle fazlaca kullanılmamaktadırlar. Ayrıca çoğunlukla dominant özelliktedirler yani sadece dominant fenotipi (AA ve Aa) resesif fenotipten (aa) ayırabilirler. Heterozigotları (Aa) homozigot dominantdan (AA) ayırt edemezler. Asıl avantajları analizlerinin kolay olmasıdır. Haritalama popülasyonunda yapılacak bir gözlem ile kolayca belirlenirler. Genetik haritalarda kullanılan morfolojik markörlere örnek olarak arpada gövde mumluluğu, kılıçğın kaba veya düz olması, rachilla tüylülüğü verilebilir (Kleinhofs *ve ark.*, 1993).

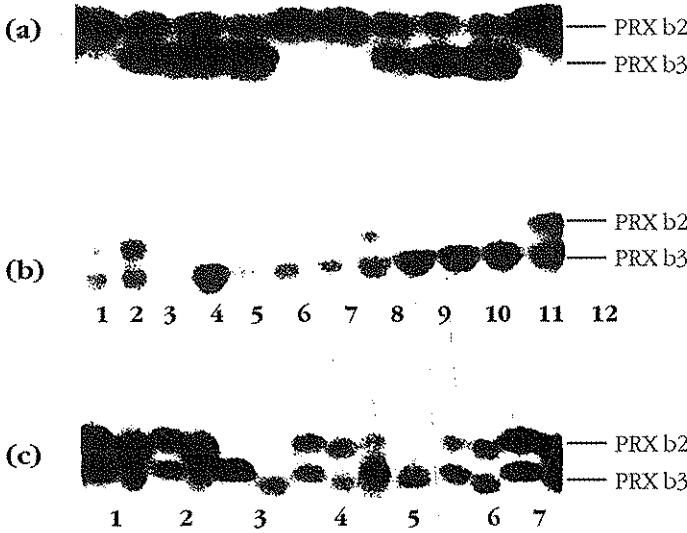
23.10.2. Protein markörleri

Protein markörleri, depo proteinleri ve enzim proteinleri olarak iki ana gruba ayrılırlar. Depo proteinleri bir jel üzerinde hareket ettirilip boyandıklarında, farklı genotiplerde ortaya çıkan yapı farklılıkları genetik markör olarak kullanılabilir. Buğday tohumunda bulunan iki depo protein grubu olan gliadin ve glutenin bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 23.5). En önemli avantajları analizlerinin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasıdır. En büyük dezavantajları ise, sayıca çok az olmalarıdır.



Şekil 23.5. (Hope x Cappelle-Desprez) x (Highburry) melezlemesinden elde edilen 10 adet dölde HMW glutenin (1AL, 1BL) ve *w*-gliadin (1AS, 1BS) bant yapıları (Payne *ve ark.*, 1982).

Enzim markörleri kendi içinde iki ana grup altında incelenebilir. Alloenzim, birbirinden ayırt edilebilen allelleri bulunan enzimleri ifade etmektedir. Alloenzimler aynı genin farklı allelleri tarafından meydana getirilmektedir. Ancak pratikte bu kavram için yanlışlıkla izoenzim tabiri kullanılmaktadır. İzoenzim, farklı genler tarafından üretilen, ancak birbirine çok benzeyen enzimleri ifade etmektedir. Bu kavram kargaşası literatürde çok yaygın olarak bulunmakta ve birbirleriyle yer değiştirilerek kullanılmaktadır. Alloenzim veya izoenzimlerin birbirinden ayırt edilmeleri için de elektroforez tekniği kullanılır. Bir jel içine yüklenip elektrik ortamında tutulduklarında proteinler taşıdıkları yük ve kütlelerinin oranına (toplam yük/kütle) göre farklı hızlarda hareket ederler. Daha sonra ilgili proteine ait seçici boyama teknikleri kullanımıyla proteinin jel içinde bulunduğu pozisyon belirlenir. Bu pozisyona göre farklı alleller tanınır (Şekil 23.6). Enzim markörlerinin temel avantajları analizlerinin çabuk, ucuz ve güvenilir olmasıdır. Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmezler. En büyük dezavantajları sayılarının çok az olmasıdır. Diğer bir önemli dezavantaj ise bazı alloenzimlerin ancak özel dokularda ve belli bir gelişme döneminde gözlenebilir olmasıdır (van den Berg *ve ark.*, 1983).



Şekil 23.6. *Petunia* bitkisinde *prxB2* ve *prxB3* allellerinin *Rp1* geni (trans-acting regülasyon geni) açısından değişik gelişme dönemlerindeki açılımlarını gösteren izoenzim jeli. (a) Çiçeklenme döneminde olgun bitkilerden alınan örneklerde, (b) genç bitkilerin yeni yapraklarından alınan örneklerde ve (c) genç bitkilerin erken ve geç dönemde alınan yaprak örneklerinde belirlenen değişik izoenzim bantlarının görünümü (van der Berg *ve ark.*, 1983).

23.10.3. DNA markörleri

DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markörlerdir. Bunlar; a) DNA melezleme markörleri ve b) polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım markörleri olmak üzere iki grup altında incelenirler.

23.10.3.1. DNA melezleme markörleri (RFLP markörleri)

Bu markörler çeşitli şekillerde etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA) araştırılan bir DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA'ya melezlenebilmesini baz almaktadır. Bu teknik, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) analizi ile çok yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Her ne kadar başka formlarda kullanımı söz konusuysa da, en önemli kullanım alanı RFLP olduğu için bundan sonraki tartışmalarda bu grup için sadece RFLP markörleri terimi kullanılacaktır.

RFLP analizi, dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın meleziendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır. Genomik DNA'nın kesimi tipik olarak 4-6 nükleotid tanıyan enzimlerce yapılır. Kesim sonrasında DNA bir jel destek sistemi içinde elektroforeze tabi tutulduğunda taşıdığı negatif yüklerden dolayı pozitif yöne doğru hareket edecektir. DNA'nın bu hareketi kütesinin logaritmasıyla ters orantılıdır. Yani küçük parçacıklar daha hızlı hareket edeceklerdir. Kesilen parçalar elektroforez sonucunda jel içinde büyüklüklerine göre sıralanırlar. Bu sıralanma sonrası DNA jel ortamdan daha kullanışlı olan naylon filtrelelere tek ipçik halinde Southern transfer metoduyla transfer edilir (Şekil 23.7a).

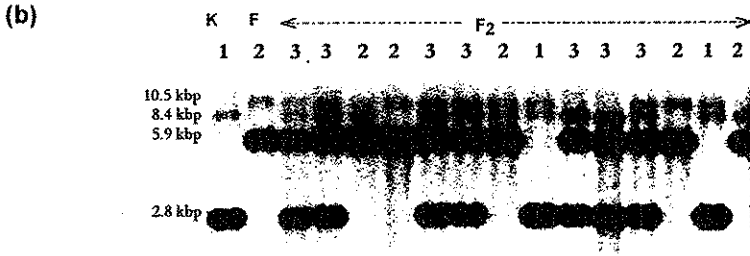
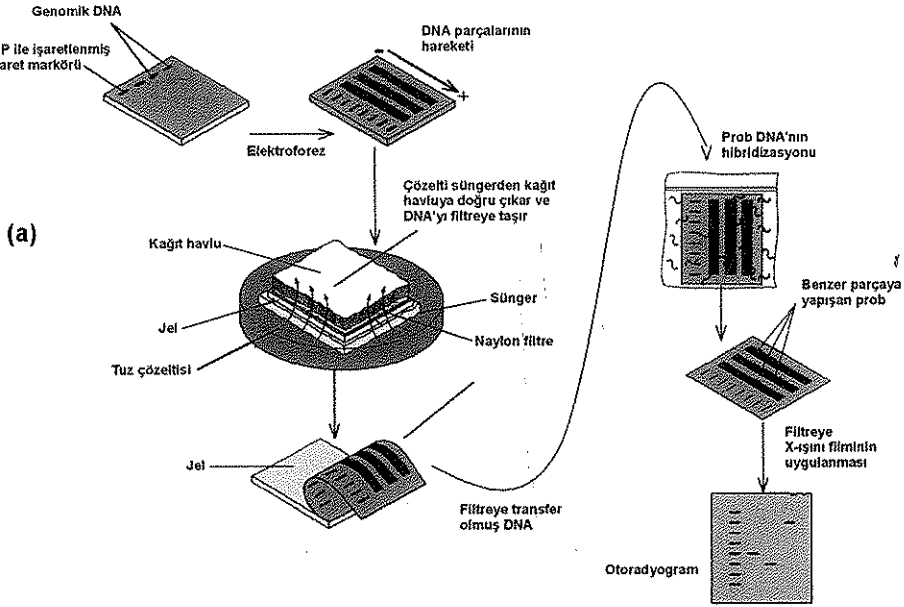
DNA'yı jel üzerindeki dizilişinin aynı şekliyle tek iplik halinde taşıyan filtreler üzerine çeşitli biçimlerde (çoğunlukla radyoaktif ^{32}P ve radyoaktif olmayan chemiluminescent sistem ile) etiketlenmiş ve tek iplik haline getirilmiş prob DNA uygulanır. Eğer prob DNA ile filtredeki DNA birbirinin aynı veya benzeri ise prob DNA kendisine benzer dizilişi taşıyan parçanın üzerine yapışır. Karşılaştırılan iki genotip arasında prob DNA'nın yapıştığı bölge etrafında DNA kesim enziminin kesme motifi bakımından bir farklılık (polimorfizm) varsa probun yapıştığı parça büyüklüğü iki ebeveyn arasında değişiklik gösterecektir. Prob DNA üzerindeki etiketin gözlenmesiyle iki ebeveyne ait DNA'lar birbirinden ayırt edilir. Bu ayırt etme bir açılma popülasyonunda yapıldığında açılım gösteren bireylerin prob DNA'nın temsil ettiği lokus bakımından genotip analizi tamamlanmış olur (Şekil 23.7 b).

Prob DNA'nın membran üzerindeki genomik DNA'ya melezienebilmesini ikisi arasındaki nükleik asit baz dizilişi benzerliği belirler. Bu durum melezienebilmenin yapıldığı ortam şartlarının (sıcaklık, tuz konsantrasyonu vs.) değiştirilmesi ile farklılık gösterebilir. Prob DNA ile membrandaki DNA arasındaki benzerlik aynı tür içinde bir problem değildir. Hatta çoğu zaman farklı türler arasında da melezienebilmeye yetecek kadar benzerlik bulunmaktadır.

RFLP tekniği kesim enziminin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini dahi tanır. Tanıma yerinin baz dizilişi değişikliği farklı genotipler arasındaki polimorfizmin bir sebebidir. Ancak, bu polimorfizm daha yaygın olarak kesim enziminin tanıdığı iki kesim bölgesi arasında parça eklenmesi (insertion) veya çıkmasından (deletion) kaynaklanır.

RFLP tekniği ile kullanılan prob DNA'nın temsil ettiği lokus analiz edilmektedir. RFLP prob'u olarak genellikle 200-2000 baz uzunluğunda DNA parçaları kullanılır. Prob DNA'nın en önemli özelliği genomda az sayıda kopyasının bulunmasıdır. Genomda tekrarlanan dizilişleri taşıyan DNA parçaları prob olarak kullanıldığında membran üzerindeki pek çok yere yapışır ve sonuçta analizleri imkansızlaşır. Pratikte RFLP probu olarak gen ürünleri olan mRNA'nın DNA'ya çevrilmiş hali olan cDNA'lar kullanılır. Genler çoğunlukla az kopya olup kendilerine özgü

dizilişler taşıdıkları için cDNA'lar da az kopya olurlar. cDNA'lar dışında az kopye olduğu belirlenmiş olan genomik DNA parçaları da RFLP prob'u olarak kullanılırlar.



Şekil 23.7. (a) Jel elektroforezi ve Southern transfer metodunun şematik gösterimi (Griffiths ve ark., 1996'dan uyarlanmıştır). **(b)** Kishimoto ve ark., 1994'ten alınan ve çeltik bitkisinde *ADP-ribosylation* faktörü homolog genlerinin bir F₂ popülasyonundaki açılımını gösteren bir RFLP jeli. K,F: anaçlar (Kasalath ve FL134); F₂: açılım gösteren popülasyon; 1: Kasalath tipi bant; 2: FL134 tipi bant, 3: her iki bant (heterozigot bireyler).

RFLP markörlerinin çok önemli iki avantajı vardır. Bunlardan birincisi türler, cinsler ve hatta familyalar arasında transferleri mümkündür. Böylece, bir bitki

türünde bir RFLP markörü bir kez haritalandığında akraba pek çok bitki sistemi için o haritalama bölgesinde potansiyel bir markör bulunmaktadır. Tahıl cinsleri arasında bu şekilde RFLP markörü transfer etmek çok rutin bir işlem olmuştur. RFLP markörlerinin diğer önemli avantajı ise güvenilir olmalarıdır. Farklı laboratuvarlarda ve araştırmacıların elinde tamamen aynı sonuçlar elde edilebilmektedir. RFLP markörlerinin eşbaskın (ko-dominant) özellikte olması diğer bir avantajdır. Böylece heterozigot bireylerin de karakterize edilmesi mümkün olmaktadır. Polimorfizm oranları ise orta düzeydedir.

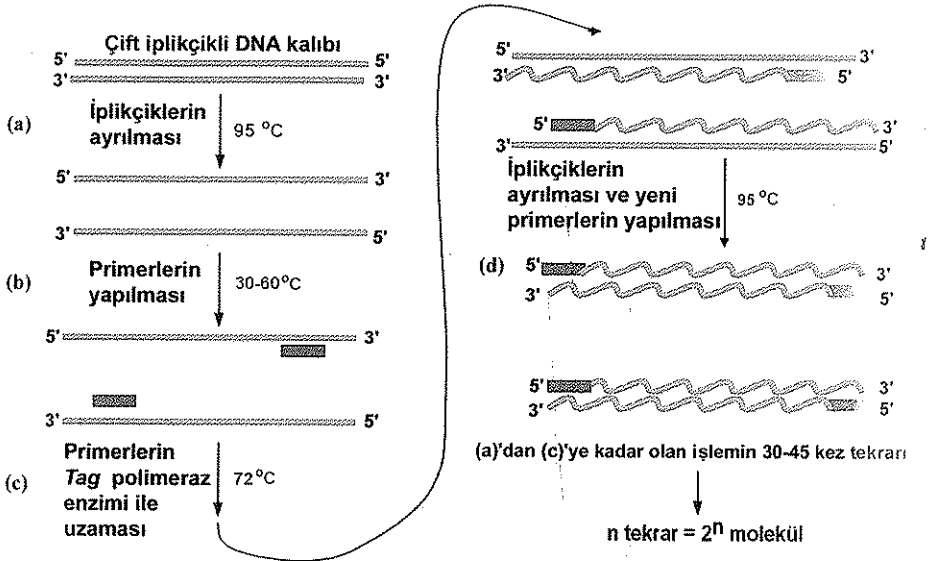
RFLP markörlerinin en önemli dezavantajları arasında analizlerinin pahalı olması, fazlaca zaman ve işgücü gerektirmesi gelmektedir. Bitkiden doku alındığı günden itibaren ilk sonuçların alınması 10 günden önce mümkün olmamaktadır. Ayrıca yaygın olarak radyoaktif etiketleme yapılması önemli bir dezavantajdır. Etiketleme kimyasal olarak yapılabiliyorsa da henüz radyoaktif etiketleme kadar etkin değildir. RFLP analizi için fazla miktarda (10-20 µg) ve yüksek kalitede DNA gereklidir. Tekniğin son bir dezavantajı ise RFLP markörlerinin genomlarda dağılışı ile ilgilidir. Genomlarda az kopya olan dizilişler belli noktalarda kümelandikleri için RFLP markörleri genom üzerinde rasgele dağılışı göstermezler. Bu markörlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülebilir (Walton, 1993).

23.10.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan markör teknikleri

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla suni şartlarda DNA üretilmesini ifade etmektedir. Bu üretim için 6-25 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar (primerler) gerekir. Reaksiyon ortamında ayrıca pH'yı ve tuz konsantrasyonunu optimum hale getiren tampon çözelti, polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu MgSO₄ ve DNA üretiminde kullanılacak A, T, G, C nükleotidlerinden her biri bulunur. Polimeraz enzimi, bu başlatıcı DNA'nın bir kalıp DNA üzerine bağlanmasından sonra, onu bir uçtan uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir. DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri çok spesifik sıcaklık devrelerinde yapılır. Önce 95 °C civarında bir sıcaklık kullanımıyla kalıp DNA'nın çift sarmal yapısı açılır ve DNA tek iplik haline getirilir. Sonra 30-60 °C arasında bir sıcaklıkta başlatıcı DNA'nın kalıp DNA'ya yapışması sağlanır. Son olarak da 72 C°'de DNA üretimi yapılır. Bu devrelerin her birinde sadece 1-2 dakika kullanılır. Bu üç devre isteğe bağlı olarak defalarca (normalde yaklaşık 30-45 defa) tekrarlanır ve DNA üretimi tamamlanmış olur (Şekil 23.8).

PCR reaksiyonu ile hangi diziliş üzerinde DNA üretimi yapılacağını belirleyen iki faktör vardır. Bunlardan en önemlisi başlatıcı DNA'nın kendi dizilişidir. Yeterli uzunlukta spesifik dizilişler kullanılması durumunda genomun çok spesifik bir bölgesine ait DNA üretilir. Kısa ve rasgele dizilişte başlatıcılar kullanılması durumunda ise rasgele bölgelere ait DNA üretilir. DNA üretiminin yapılacağı yeri belirleyen ikinci faktör başlatıcı DNA'nın yapışmasının gerçekleştirildiği sıcaklık

derecesidir. 30-40 °C gibi düşük sıcaklıklara inildiğinde başlatıcı DNA pek çok yere kolayca yapışacağı için pek çok yere ait spesifik olmayan DNA üretimi yapılır. Yapışma sıcaklığının yüksek tutulmasıyla (55-60 °C) ise başlatıcı DNA sadece spesifik bölgelere yapışır ve buradan üretim yapar.



Şekil 23.8. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi. (a) Başlangıç materyali olan çift iplikli DNA molekülü ısıtılarak, ipliklerin birbirinden ayrılması sağlanır. (b) Reaksiyon sıcaklığı düşürülerek başlatıcı DNA parçalarının (primerlerin) DNA ipliklerine 3' kısmından yapışmaları temin edilir. (c) *Taq* polimeraz enzimi kalıp DNA'yı tamamlayıcı DNA ipliklerini sentezlemeye başlar. Bu uzama işlemi diğer primerin bağlandığı noktadan daha ileriye gidebilir. (d) Reaksiyon karışımı tekrar ısıtılarak işlem yeniden başlatılır. Bu aşamada hem orijinal hem de kopyalanmış olan iplikler ayrılarak, iki orijinal DNA ipliği ve iki tane de yeni DNA ipliği elde edilir. Daha sonra bu ipliklerin her birine yeni primerler eklenerek tekrar DNA üretimi gerçekleştirilir. Yeni üretilen DNA ipliklerine bağlanan primerler iki primer arasında kalan bölgeyi tamamladıkları için oldukça spesifik DNA parçasının üretimi sağlanmış olur. Aynı zamanda orijinal DNA'dan değişik uzunlukta DNA üretimi de devam etmektedir. Bu işlem defalarca tekrarlanarak hedef DNA parçasının üretimi sağlanmış olur. Örneğin bu işlem 40 kez tekrarlandığında bir DNA molekülü $2^{40} \approx 10^{12}$ kez çoğaltılmış olur.

Farklı genotiplerde DNA dizilişinin farklı olması nedeniyle aynı başlatıcı DNA kullanılması ile farklı DNA üretimleri elde edilir. Bu farklı üretimler genetik markör olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde çok değişik tipte DNA markör tipleri geliştirilmiştir.

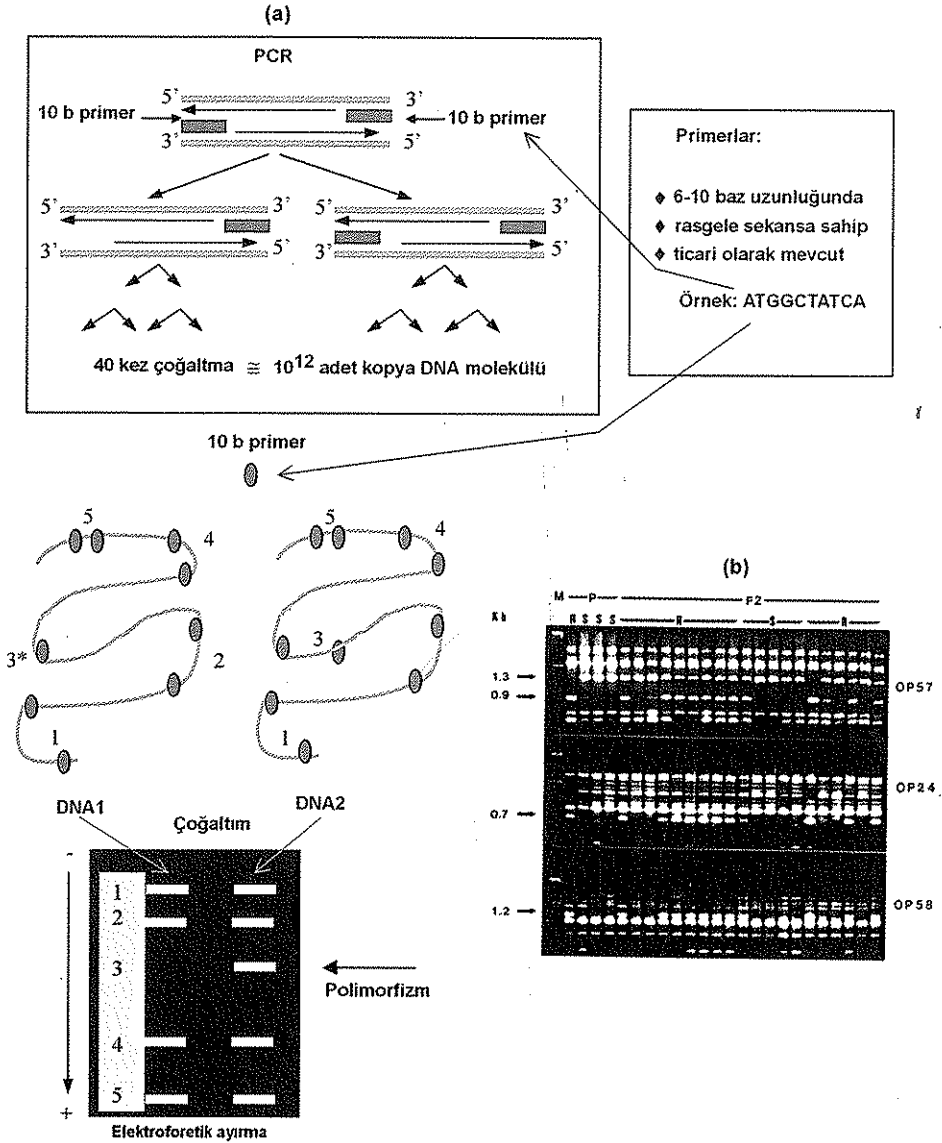
23.10.3.2.1. Rasgele çoğaltılmış DNA farklılığı (RAPD)

RAPD (olarak adlandırılan bu teknikte 6-10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rasgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon şartlarının spesifik olmaması rasgele çoğaltıma izin verir. Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir başlatıcı kullanılır. Ancak bu başlatıcı her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılır. Dolayısıyla kullanılan başlatıcının DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. Üretimi yapılan DNA parçaları bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduğunda bazı parçaların bazı genotiplerde üretilip bazılarında üretilmediği gözlenir (Şekil 23.9). Bu işlem açılan bir popülasyonda yapıldığında ebeveynlere ait üretim motiflerine bakarak döllerin genotip analizi gerçekleştirilir (Welsh ve McClelland, 1990).

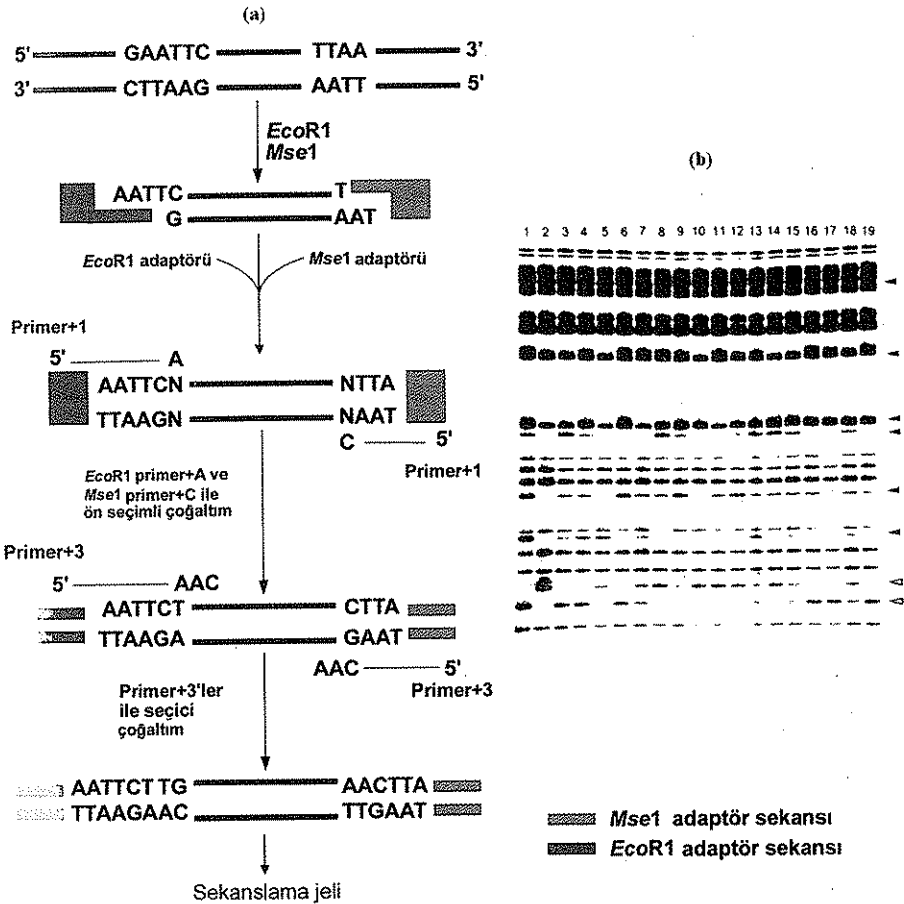
RAPD tekniğinin avantajları arasında çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az iş gücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyması gelmektedir. Ayrıca polimorfizm oranı çok yüksektir. Bu özellikleri itibarıyla otomasyona uygundur. Ancak tekniğin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi güvenilirliğinin çok sınırlı olmasıdır. Farklı laboratuvarlarda, farklı araştırmacıların elinde ve hatta bir termocycler cihazından diğerine farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Tekniğin diğer dezavantajları arasında dominant özellikte markör vermesi ve bu yolla elde edilen markörlerin diğer haritalara transfer edilememesi gelmektedir (Walton, 1993).

23.10.3.2.2. Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte genomik DNA önce birisi altı, diğeri dört taban tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'lar kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltıma iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim yapılır. Asıl üretimde ön üretimde elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur (Zabeau, 1993). Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğu farklarını dahi ayırt edebilen poliakrilamid jel (dizileme/sekanslama jeli) üzerinde hareket ettirilerek farklı genotiplere ait farklılık gösteren parçacıklar tespit edilir (Şekil 23.10).



Şekil 23.9. (a) RAPD tekniğinin şematik gösterimi. (b) Chunwongse *ve ark.*, 1994'ten alınan ve domatestde mildiyö hastalığına dayanıklı hatlar (R) ile hassas hatlar (S) arasında polimorfik markörlere sahip bir RAPD jeli. Anaçlar P harfiyle, hastalığa dayanıklılık açısından açılım gösteren populasyon F₂ ile gösterilmiştir. M harfi ise 1 kb'lık DNA büyüklük skalasını simgelemektedir.



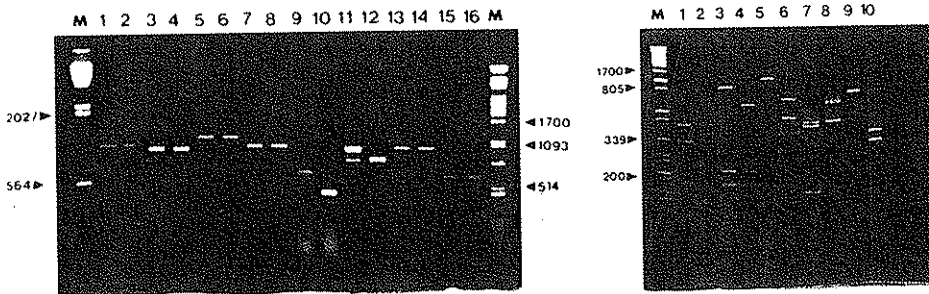
Şekil 23.10. (a) AFLP tekniğini gösteren şematik gösterimi. İlk olarak genomik DNA *Eco*R1 ve *Mse*I enzimleri ile kesildikten sonra, bunlara ait olan adaptörler eklenmekte ve adaptörlerin dizisine ve seçici olarak 1-3 arasında değişen rasgele nükleotidlere sahip primerler kullanılarak seçici bir şekilde çoğaltılmaktadır. Seçici şekilde çoğaltılan bu parçalar arasındaki polimorfizm dizileme jeli ile belirlenmektedir. **(b)** Maughan ve ark., 1995'den alınan ve soya fasülyesinde AFLP'nin genetik markör olarak kullanımını gösteren bir AFLP jeli. 1 ve 2 anaçlara, 3-19 sütunları ise F₂ bitkilerine aittir. Dolu ok başları dominant markör olarak ayrıışan polimorfik AFLP parçalarını ve içi boş ok başları da eşbaskın (ko-dominant) markör olarak ayrıışan AFLP parçalarını göstermektedir.

Tekniğin polimorfizm oranı çok yüksektir. RAPD tekniği kadar hızlı olmasa da RFLP'den çok daha hızlıdır. Masraf, işgücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer almaktadır. Çok sayıda lokusu aynı anda ve etkili bir şekilde taraması nedeniyle parmak izi analizine çok uygundur. AFLP tekniğinin önemli dezavantajları arasında çoğunlukla dominant markörler vermesi ve farklı genetik

haritalar arasında transferinin güç olması gelmektedir (Walton, 1993). AFLP ile elde edilen markörler kullanılan 6-nükleotid tanıyan kesim enziminin özelliğine göre farklı genom dağılışı gösterirler. Genomun çok kopya olan ve metillenmiş sitozin taşıyan kısımlarını kesmeyen *Pst*I enzimi kullanımıyla elde edilen markörler çoğunlukla genomun az kopyalı bölgelerini temsil ederken, metillenmeye hassas olmayan *Eco*RI enzimi kullanımıyla elde edilen markörler tekrarlanan DNA'larca zengin bölgeleri temsil etmektedir.

23.10.3.2.3. Dizisi etiketlenmiş alanlar (STS)

STS (Sequence-Tagged Sites) tekniği RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını bir araya getiren bir tekniktir. Nükleotid dizilişi bilinen az kopyalı RFLP problemlerinden yeterli uzunlukta (16-24 nükleotid) başlatıcı DNA'lar geliştirilmekte ve bu başlatıcılarla genomik DNA üzerinde çok spesifik şartlarda DNA üretimi yapılmasıyla RFLP probunun temsil ettiği lokus çoğaltılmaktadır. Başlatıcı DNA'ların seçildiği bölgeler az kopya olup, genomlar arasında yüksek oranda korunduğu için farklı genotiplerin çoğunda DNA üretimi yapılmakta, ancak üretilen DNA parçaların uzunluğu arasında genellikle fark olmamaktadır. Öte yandan, farklı genotiplerden üretilen DNA'ların 4-nükleotid tanıyan bir seri kesim enzimiyle kesilmesi sonucunda üretilen parçaların içindeki tek nükleotid değişikliği bile tanınabilmektedir (Talbert *ve ark.*, 1994) (Şekil 23.11).



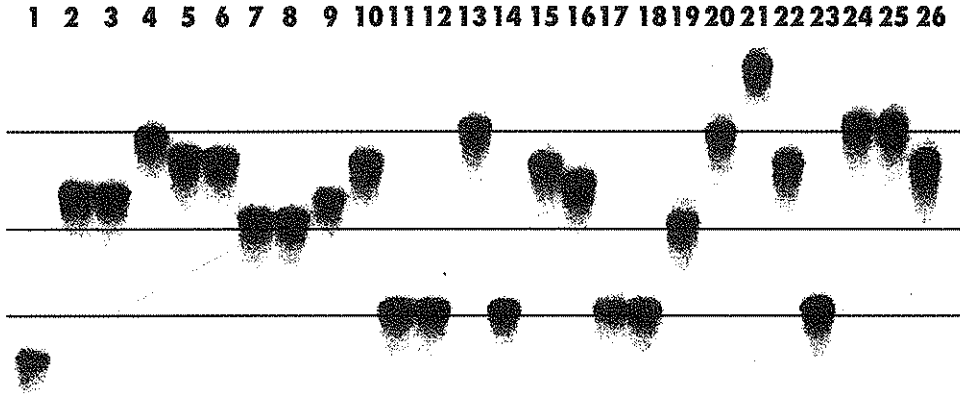
Şekil 23.11. Arpada, genom haritalanmakta kullanılmış olan enzimle kesilmiş (a) ve 4001 nükleotid tanıyan farklı enzimlerle kesilmiş (b) tipik STS jelleri. M, işaret markörün simgelemekte olup, bp cinsinden ifade edilmiştir (Tragoonrung *ve ark.*, 1992'den alınmıştır).

STS tekniği çoğunlukla eşbaskın özellikte markör üretmektedir. Kullanımı RFLP'ye nazaran çok daha kolay, ucuz ve hızlıdır. RAPD gibi az miktarda DNA gerektirir, yani teknik otomasyona uygundur. Tekniğin bir diğer avantajı başlatıcı DNA'ların iyi seçilmesi şartıyla farklı haritalar arasında transferinin mümkün olmasıdır. Tekniğin en önemli dezavantajı, ilgili RFLP probunun nükleik asit dizilişinin bilinmesini ve buna göre bir çift başlatıcı DNA geliştirilmesini gerektirmesidir. Polimorfizm oranı orta düzeydedir (Walton, 1993).

23.10.3.2.4. Basit dizi tekrarları (SSR veya mikrosatelitler)

SSR (Simple Sequence Repeat) veya mikrosatelitler ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar örneğin (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Mikrosatelitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarların sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir (Gupta ve ark., 1994). SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir (Şekil 23.12).

SSR primerlerinin üretiminde genel olarak üç farklı yaklaşım tercih edilmektedir. Bunlar; (1) genomik DNA kütüphanelerinin SSR oligonükleotidleri ile hibridizasyonu yoluyla gözlenmesi, (2) DNA veribankalarında SSR'ların araştırılması ve (3) akraba bitki türlerinde geliştirilmiş olan SSR-spesifik primerlerinin kullanımıdır. SSR-spesifik primer çiftleri (ileri ve geri çalışan primerler) PCR çoğaltımı için mikrosatelitleri çevreleyen diziler temel alınarak dizayn edilirler.



Şekil 23.12. Soya fasülyesinde tesadüfi olarak seçilmiş 26 genotipin *PRP1* lokusunda görülen mikrosatelit polimorfizmi (Maughan ve ark., 1995). Şekilde de görüldüğü gibi, bu lokustaki allel sayısının çokluğu dikkat çekmektedir.

Mikrosatelitlerin en önemli dezavantajı yeni markör geliştirilmesinin güçlüğüdür. Yeni markörlerin geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problemlerle melezlenme yoluyla bulunması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş

yerlerinden özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da oldukça fazla işgücü gerektiren pahalı bir işlemdir.

SSR tekniğinin bitkilerde genetik haritalama çalışmalarındaki kullanımı avantajlarından ötürü her geçen gün artmaktadır. SSR'lar yüksek oranda polimorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi verici bir özellik gösterirler. Ayrıca eşbaskın markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması da kullanım oranını artırmaktadır. Son olarak, SSR'lar bitki genomlarında oldukça bol olup üniform bir dağılıma sahiptirler. Örneğin, buğday genomu her 704 kb'de bir (GT)n grubu ve her 440 kb'de bir (GA)n grubu içermektedir. Herhangi iki dinükleotid grubu arasındaki ortalama uzaklık yaklaşık olarak 271 kb dolayındadır. Buğdayın herbir haploid genomunun 16×10^6 kb büyüklüğünde olmasından ötürü, (GA)n için mikrosatelit lokuslarının toplam sayısı 3.6×10^4 ve (GT)n için 2.3×10^4 'tür (Roder ve ark., 1995). Günümüzde buğday, mısır, arpa, soya fasulyesi ve ayçiçeği gibi bir çok bitki türü için SSR markörleri geliştirilmiş bulunmaktadır.

Kaynaklar

- Anderson JA, Ogihara Y, Sorrells ME (1992) Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 1035-1043.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.
- Brown SM, Kresovich S (1996) Molecular characterization for plant genetic resources conservation. In: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*, p. 85-91, Academic Press, New York.
- Chunwongse J, Bunn TB, Crossmann C, Jaing J, Tanksley SD (1994) Chromosomal localisation and molecular tagging of the powdery mildew resistance gene (Lv) in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 89: 76-79.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1996) *An Introduction to Genetic Analysis*, p. 443, WH Freeman and Company, New York.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 998-1006.
- Kishimoto N, Higo H, Abe K, Arai S, Saito A, Higo K (1994) Identification of the duplicated segments in rice chromosomes 1 and 5 by linkage analysis of cDNA markers of known functions. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 723-726.
- Kleinhofs A, Kilian A, Saghai-Marroof MA (1993) A molecular, isozyme, and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 705-712.

- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121: 185-199.
- Lark KG, Chase K, Adler F, Mansur LM, Orf JH (1995) Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 4656-4660.
- Maughan PJ, Saghai-Maroo MA, Buss GR (1995) Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*, 38: 715-723.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of Markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 9828-9832.
- Morgan TH (1910) Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32: 120-123.
- Payne PI, Holt LM, Worland AJ, Law CN (1982) Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *Theor. Appl. Genet.*, 63: 129-138.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335: 721-726.
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, 127: 181-197.
- Paterson AH (1996a) Making genetic maps. In: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*, p. 23-37, Academic Press, New York.
- Paterson AH (1996b) Physical mapping and map-based cloning: Bridging the gap between DNA markers and genes. In: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*, p. 55-61, Academic Press, New York.
- Paterson AH, Stelly DM, Wendel JF, Zhao X (1996) Status of genome mapping in the *malvaceae* (cottons). In: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*, p. 239-242, Academic Press, New York.
- Roder MS, Plaschke J, König SU (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.*, 246: 327-333.
- Sax K (1923) The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 8: 552-560.
- Smith S, Helentjaris T (1996) DNA fingerprinting and plant variety protection. In: Paterson AH (ed), *Genome Mapping in Plants*, p. 95-107, Academic Press, New York.
- Talbert LE, Blake NK, Chee PW, Blake TK, Magyar GM (1994) Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 789-794.
- Tanksley SD (1993) Linkage map of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) (2n=14). In: O'Brien SJ (ed), *Genetic Maps, Sixth Edition*, p. 39-90, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 257-263.
- Tanksley SD, Ganai MW, Martin GB (1995) Chromosome landing: A paradigm for map based gene cloning in plant species with large genomes. *Trends in Genet.*, 11: 63-68.
- Taylor B (1978) Recombinant inbred strains: use in genetic mapping. In: Morse H (ed), *Origins of Inbred Mice*, p. 423-438, Academic Press, New York.
- Tragoonrun S, Kanazin V, Hayes PM, Blake TK (1992) Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 1002-1008.
- Van den Berg BM, Wijsman HJW, Bianchi F (1983) Genetics of the peroxidase isoenzymes in *Petunia*. *Theor. Appl. Genet.*, 66: 173-178.
- Walton M (1993) Molecular markers: which ones to use? *Seed World*, July 1993, p: 23-29.
- Wang G, Paterson AH (1994) Prospects for using DNA pooling strategies to tag QTLs with DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 355-361.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213-7218.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 294-300.
- Yıldırım A, Jones SS, Murray TD (1998) Mapping a gene conferring resistance to *Pseudocercospora berpotrichoides* on chromosome 4V of *Dasyphyrum villosum* in a wheat background. *Genome*, 41: 1-6.
- Zabeau M (1993) Amplified fragment length polymorphism (AFLP). European Patent Application 92402629.7.

Bölüm 24

Proteinler ve Protein Mühendisliği

Nejdet Kandemir¹, İbrahim Halil Kavaklı²

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 60250 Tokat

²Washington State University, Institute for Biological Chemistry, Pullman, WA 99164 USA

e-posta: kandemir@gop.edu.tr¹

24.1 Giriş

Proteinler, bir hücrenin kuru madde ağırlığının yarısından fazlasını oluşturan ve bütün yaşamsal aktivitelerde rol oynayan moleküllerdir. Biyolojik moleküller içinde en karmaşık yapıya sahip olan proteinler, bu özelliklerinden dolayı çok geniş bir görev yelpazesine sahiptirler. Proteinleri meydana getiren amino asit dizilişleri onların fonksiyonları ile yakından ilgilidir. Birbirine benzer özellikteki çok sayıda proteine ve bunların işlevlerine ait elde edilen verilerden hareketle, bazı amino asitlerin değiştirilmesi ile proteinin fonksiyonunda değişiklikler olabileceği fikri, *protein mühendisliği* bilim dalının ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Rekombinant DNA teknolojisindeki son gelişmeler bu yeni bilim dalına uygulanabilirlik kazandırmıştır.

Proteinler ve protein mühendisliğini tanıttak olan bu bölüm iki ana kısımdan oluşmaktadır. İlk kısımda proteinlerin canlı sistemlerdeki fonksiyonları, tanıma ve saflaştırma teknikleri, yapısal özellikleri ve yapı-fonksiyon ilişkileri incelenecek, ikinci kısmında ise protein mühendisliği metotları hakkında bilgi verilecektir.

24.2. Proteinlerin Canlı Sistemlerdeki Fonksiyonları

24.2.1. Büyüme ve farklılaşmanın kontrolü

Canlı organizmaların tek hücre düzeyinden tam organizma haline gelmesine kadar geçen süreçte genetik bilgi tüm aşamalarda kademeler halinde kullanılmaktadır. Belli bir zaman diliminde genetik bilginin ancak çok küçük bir bölümü fonksiyon meydana getirmektedir. Büyüme esnasında genlerin kontrollü olarak aktif hale geçmesi büyüme faktörleri denen proteinler aracılığıyla olmaktadır.

24.2.2. Aktivitelerin koordinasyonu

Bir organizmadaki önemli hayati olaylarda farklı hücreler arasındaki koordinasyonu sağlayan hormonların çoğu proteindir. İnsanlarda insülin hormonu bu tip bir proteindir.

24.2.3. Enzim aktivitesi

Enzimler, basit anlamda organizmadaki kimyasal olayların katalizörleridirler. Dünyadaki hayat, kimyasal anlamda havadaki CO₂'i biyolojik materyaller haline dönüştüren karbon fiksasyon enzimleri ile inorganik haldeki azotu organik hale dönüştüren azot fiksasyon enzimleri sayesinde gerçekleşmektedir. Yine, nükleik asit dizisi halindeki genetik bilginin kopyalanması, yazılması (transkripsiyon) ve çevrilimi (translasyon) protein yapısındaki bir seri enzimlerle gerçekleşmektedir. Canlı sistemlerdeki sayısız kimyasal olayları katalize eden enzimlerin birkaçı hariç neredeyse tamamı protein yapısındadır.

24.2.4. Destek ve koruma

Canlılık fonksiyonlarıyla doğrudan ilgili olmayıp; hücreler, organeller ve hatta bütün organizma düzeyinde destek veya koruyuculuk fonksiyonuna sahiptirler. Organizma düzeyinde hayvanlarda mekanik yapı kollagen ve elastin adı verilen proteinler sayesinde ayakta durmaktadır. Bitkilerde ise destek, proteinlerle değil selüloz ve lignin gibi karbonhidrat yapılar tarafından sağlanmaktadır.

24.2.5. Taşıma ve depolama

Pek çok kimyasal moleküllerin hücre içine seçici olarak taşınması kendilerine özel olan ve hücre zarı içinde gömülü halde bulunan özel proteinler sayesinde olmaktadır. Başka bir taşıyıcı protein formu ise hayvanlarda oksijen taşıyıcısı olan hemoglobin ve myoglobin proteinleridir. Bitkilerde sentez esnasında yağ asitlerini taşıyan *acyl* taşıyıcılar bu tip proteinlere örnektir.

24.2.6. Algılama

Hayvanlarda çeşitli faktörlere karşı sinir hücrelerinin reaksiyonu reseptör adı verilen proteinler sayesinde olur. Her ne kadar hayvanlarda olduğu gibi merkezi sinir sistemi olmasa da bitkilerde de çevre sinyallerini alan ve bu sinyallere bitkinin göstereceği tepkileri başlatan reseptörler vardır. Bu reseptörler tamamen veya kısmen proteinlerden oluşmaktadır. Bitkilerde kırmızı/kırmızı-ötesi ışık reseptörü olan fitokromun bir kısmı proteindir. Hücre düzeyinde de hücre zarında bulunan ve hücre içine bilgi aktarımı sağlayan proteinler vardır.

24.2.7. Hareket

Hayvanlarda kasların hareketi aktin ve miyozin proteinleri sayesinde olmaktadır. Hücre düzeyinde ise mitoz bölünme esnasındaki kromozom hareketleri, iç ipliklerini oluşturan tübülün proteinleri sayesinde gerçekleşmektedir.

24.2.8. Savunma sistemi

Hayvanlarda hastalık yapıcı yabancı etmenlere karşı geliştirilen antikorlar immunoglobülin proteinleridir. Bitkilerde bu tip bir savunma sistemi yoktur, ancak farklı hastalık ırklarını tanıyan ve onları bitki savunma mekanizmasına bildiren proteinler bulunmaktadır.

24.2.9. Besin olarak proteinler

Proteinler doğrudan besin olarak da kullanılmaktadırlar. Bir gram proteinin parçalanması ile yaklaşık 5.5 KCal enerji açığa çıkmaktadır. Hayvanlarda sütte bulunan kazein ve yumurtada bulunan ovalbümin yeni gelişen canlı yavrusu için üretilen besin konumundadırlar. Benzer şekilde bitkiler yeni nesli meydana getirecek embriyonun ilk gelişmesi esnasında kullanılmak üzere tohumlarında bir miktar protein depo ederler. Buğdayda gluten, mısırdaki ise zein tanede depolanan proteinlerdir.

24.3. Proteinlerin Analizi ve Saflaştırılması

Çoğu modern biyokimya çalışmaları yüksek derecede saflaştırılmış proteinlerin çok özel ortamlarda incelenmesi üzerine kuruludur. Saflaştırma, hücre düzeyinde ihmal edilebilir bir oranda bulunan proteinlerin %98'in üzerinde saflığa ulaştırılmasını ifade etmektedir. Saflaştırma esnasında ilgili proteinin bütün fiziksel ve kimyasal özellikleri kullanılarak onun diğer organik maddeler ve diğer proteinlerden ayırt edilmesi sağlanır.

Bir proteinin saflaştırılmasından önce onu tanımayı sağlayan analiz metotları geliştirilmelidir. Bu analiz metotları sayesinde proteine ait temel özellikler saptanır ve izlenecek saflaştırma stratejileri belirlenir. Analiz metotları saflaştırma sırasındaki her işlemten sonra atılan ve elde tutulan materyal içerisinde istenen proteinin miktarını göstereceği için saflaştırma işleminin doğru ve etkin bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlar. Eğer belli bir aşamada saflaştırmanın etkin olmadığı saptanırsa alternatif metotlar aranır.

24.3.1. Protein tanıma metotları

Protein tanıma metotlarının çoğu aslında proteinlerin saflaştırılmasında da kullanılmaktadır. Ancak, tanıma işleminde amaç proteinin diğer maddelerden ayırt edilmesi değil belli bir karışım içinde varlığının ve miktarının tespit edilmesidir. Yaygın olarak kullanılan protein tanıma metotları arasında enzim ve hormonal aktiviterin saptanması, immünokimyasal metotlar ve elektroforez gelmektedir.

a) Enzim aktivitesi tespiti

Enzim niteliğindeki proteinlerin varlığının tespit edilmesinin en kolay yollarından biri enzim aktivitesinin tespitidir. Bir örnek içindeki enzim proteinin varlığı enzimatik reaksiyonda kullanılan substratın (reaksiyona giren madde) örnek ile reaksiyona sokulması ile belirlenir. Eğer enzim varsa ve aktivitesi devam ediyorsa bu, substratın azalmasının veya enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen ürün artışının titrasyon veya spektrofotometrik yollarla gözlenmesiyle ortaya konur. Bazı enzimatik protein sistemlerinde ürün veya substratın kolayca tanınma imkanı olmayabilir. Bu gibi durumlarda bazen ürün veya substratı, sonuçları kolayca tanınabilen ikinci bir reaksiyona sokmak yoluyla bilgi edinmek mümkündür.

b) Hormonal etkinin tayini

Hormon niteliğinde olan proteinlerin tanınması, proteini taşıdığı varsayılan materyalin hormondan etkilenen organizmaya uygulanması ile sağlanır. Ancak bu işlem çoğu kez zaman alıcıdır ve karmaşık canlı sistemlerle ilgili olduğu için her zaman uygun sonuç alınamayabilir.

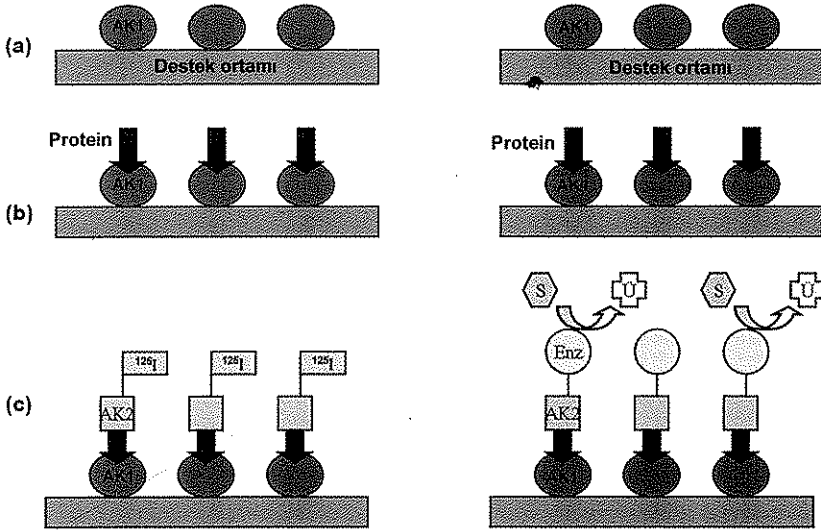
c) İmmünokimyasal metotlar

İmmünokimyasal metotlar protein tanınmasında çok yüksek hassasiyet ve etkinlikle kullanılırlar. Tekniğin esası yabancı proteinlere bağlanarak onları tanıyan bağışıklık sistemi proteinlerine (antikor) dayanır. Araştırılan proteinin çok küçük bir miktarı tavşan veya fareye enjekte edildiğinde tavşan veya farede bu proteine karşı antikor üretilir. Bu antikorlar izole edilip daha sonra bilinmeyen örneklerle muamele edildiğinde araştırılan proteini tanıma ve ona bağlanma özelliğine sahiptirler. Bu bağlanma işlemi ELISA testi olarak bilinen bir enzim aktivitesi testi (Crowther, 1998) veya radyoaktif etiketleme yoluyla (Javois, 1998) saptanır (Şekil 24.1). İmmünokimyasal metotlar, proteinlerin tanınmasında çok yaygın olarak

kullanılmakta olup çok küçük protein miktarlarını bile belirleyebilirler. İmmüno-kimyasal metotlardan ELISA testi çok hızlı sonuç verme avantajına sahiptir.

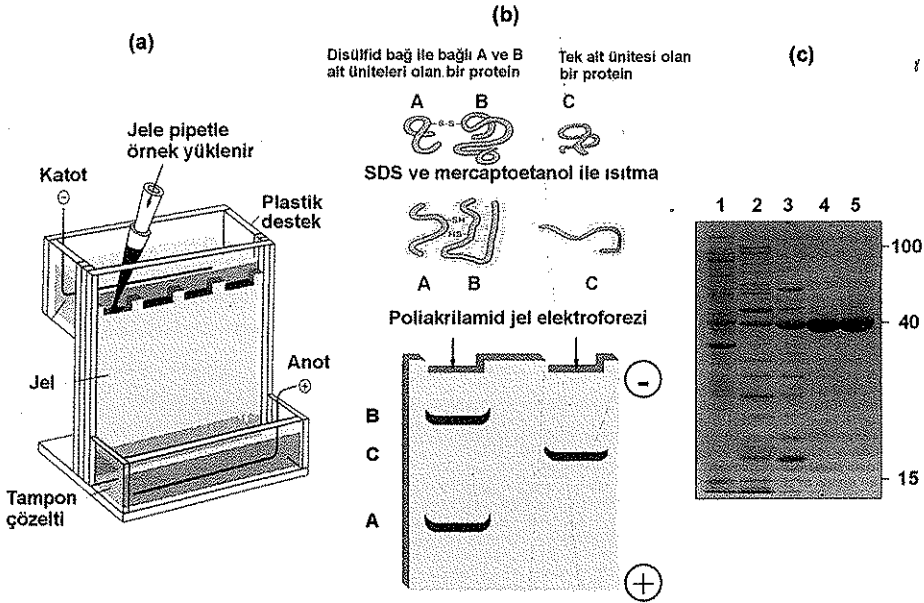
d) Elektroforez

Elektroforez, bir elektrik alanında yüklü parçacıkların bir destek ortamında (çoğunlukla jel) hareket ettirilmesi işlemidir. Hareket esnasında parçacıklar jeldeki porlardan geçmektedir. Parçacıkların hareketi parçacığın kendisi ve hareketin gerçekleştiği ortamla ilgili faktörlerce belirlenir. Parçacığın kendinden kaynaklanan faktörler arasında elektriki yük ve kütle ön plandadır. Küçük parçacıklar porlardan kolayca geçip hızla ilerlerken büyük parçalar yavaş ilerlemektedir. Kullanılan jel materyali (nişasta, agaroz, poliakrilamid vs.) ve jellerin hazırlanma yoğunluğu da parçacık hareketini belirler. Elektroforezde hareketi etkileyen diğer faktörler arasında kullanılan elektrik alanının gücülüğü, kullanılan tampon çözeltinin pH'sı ve iyonik gücü gelmektedir (Richards, 1998). Bu faktörler, çalışılan materyalin daha iyi bir şekilde ayırt edilmesini sağlayacak şekilde düzenlenebilir.



Şekil 24.1. Radyoaktif immunoassay (solda) ve ELISA (sağda) analizleri. a) Çalışılan proteini özel olarak tanıyan antikör (AK1) katı bir destek ortamına bağlanır, b) içinde çalışılan proteinin bulunduğu örnek bu sistemin üzerinden geçirilir ve ilgili protein antikora bağlanır. c) İlgili proteine bağlanan ikinci bir antikör (AK2) uygulanır. Proteinin varlığının belirlenmesi radyoaktif immunoassayde bu ikinci antikora bağlanmış olan radyoaktif etiketlenmiş iyot muamelesinden sonra radyoaktivite miktarının saptanması, ELISA'da ise yine ikinci antikora bağlı olan bir enzimin aktivitesinin substrat veya ürün miktarındaki değişimin saptanması yoluyla belirlenir.

Proteinler taşıdıkları elektrik yükü nedeniyle elektroforezde yaygın olarak analiz edilmektedirler. Proteinlerin elektroforezdeki hareketleri yük yoğunlukları (toplam net yük/protein kütlesi) ve kütleleri ile doğrudan ilişkilidir. Elektriksel yük yoğunluğu fazla olan ve moleküler kütlesi az olan proteinler daha fazla hareket ederler. Kütlelerine göre proteinlerin ayırt edilmesinde önce protein disülfid bağları açılarak farklı alt üniteler serbest bırakılır. Sonra poli zincirlerin elektriksel yükleri negatif yük taşıyan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile reaksiyona sokulmaları suretiyle homojenize edilir ve proteinler poliakrilamid jel ortamında sadece kütlelerine göre ayırt edilirler. Bu teknik, SDS poliakrilamid-jel elektroforezi olarak bilinmektedir (Şekil 24.2).

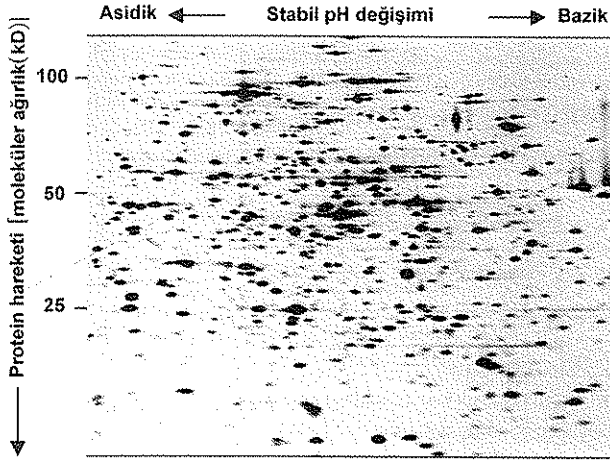


Şekil 24.2. SDS poliakrilamid-jel elektroforezi. a) Elektroforez ünitesi. Alta ve üste tampon çözelti hazneleri arasında jel bulunur. Alt kısımda anot, üst kısımda katot yer almıştır. Örnekler jel içindeki kuyucuklara pipetle yüklenir. b) Yükleme öncesi proteindeki disülfid bağları kırmak için mercaptoetanol ile ve protein yüklerini homojen bir şekilde negatif hale getirmek için SDS ile muamele edilir. Böylece, proteinler elektrik ortamında + yöne doğru hareket eder ve sadece moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar, küçük protein (A) jel içindeki porlardan daha kolay geçtiği için daha uzağa giderken büyük protein (B) daha az ilerler. c) Protein karışımı içeren bir örneğin SDS poliakrilamid-jel elektroforezi. Birinci kolon başlangıçtaki hücre ekstrelerini, diğer kolonlar ise 40 kD büyüklüğündeki bir protein için her bir ardışık saflaştırma işlemi sonrası elde edilen ekstreleri taşımaktadır. Her defasında 10 µg protein yüklenmiştir. Beşinci aşamada saflaştırma nedeniyle istenen proteinin miktarındaki artış açıkça görülmektedir (Alberts ve ark., 1994'den).

Proteinler taşıdıkları elektriki yüke göre de elektroforezde ayrılabilirler. İzoelektrik noktası bir proteinin net yükünün sıfır olduğu noktadır. Bu noktada proteinin elektroforezde hareketi durur. Kademeli pH değişiminin sağlandığı bir jelde protein elektroforez edilirse izoelektrik noktasının bulunduğu uzaklığa kadar ilerler ve burada durur. Bu teknik izoelektrik odaklaması adıyla bilinir.

SDS poliakrilamid-jel ve izoelektrik odaklama tekniklerinin birlikte kullanıldığı ve iki boyutlu jel elektroforezi olarak adlandırılan teknikte, proteinler önce izoelektrik odaklamasına göre yatay olarak elektroforez edilir. Daha sonra bu jel SDS poliakrilamid jel üzerine konarak dikey bir elektroforez yapılır. Sonuçta, çok sayıda proteinin yüksek bir çözünürlükte görünmesi sağlanır (Şekil 24.3).

Elektroforez sonrasında proteinler seçici olmaksızın bazı boyama yöntemleriyle gözlenebilirler. Bu amaçla en yaygın olarak Coomassie parlak mavisini adı verilen bir boya kullanılır. Jel boyanın asit ve alkol içeren bir çözeltisinde tutulursa protein denatüre olarak jelde sabit kalır ve boya da protein ile kompleks oluşturur. Fazla boya yıkama ile uzaklaştırılır. Bu şekilde mikrogram düzeyinde protein miktarları tespit edilir. Daha az düzeyde protein bantlarının gözlenmesi için yaklaşık 50 kat daha hassas olan gümüş boyaması tekniği kullanılır. Ancak gümüş boyaması tekniği daha zordur. Proteinlerle reaksiyona girdiğinde ultraviyole ışık altında parlayan bir madde oluşturan fluorescamin de protein jellerindeki bantların gözlenmesinde kullanılmaktadır.



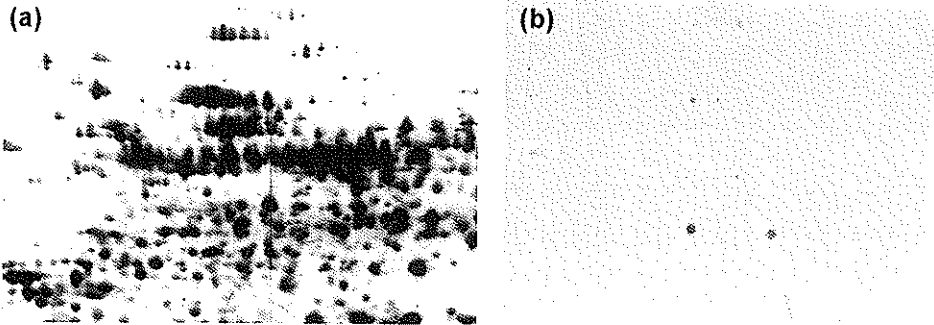
Şekil 24.3. İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi. *E. coli* bakteri hücresindeki bütün proteinlerin ayrımı yapılmıştır. Proteinler önce stabil bir pH değişim ortamında izoelektrik noktalarına göre ayrılmışlardır. Yük nötralizasyonlarına tabi tutulmadıklarında her protein kendi elektriki yüküne göre jel üzerinde sol-sağ doğrultusunda yayılır. Bu proteinler daha sonra SDS ortamında elektroforeze tabi tutulduğunda proteinler yukarı-aşağı doğrultusunda sadece moleküler ağırlıklarına göre yayılırlar. Bütün proteinlerin görülebilmesi için protein örneğinin alındığı bakteriler radyoizotoplarla işaretlenmiş amino asitlerle beslenmiştir (Alberts ve ark., 1994'den).

Jel üzerinde elektroforezle sıralanmış proteinler Western aktarımı tekniği ile özel membranlara aktarılabilirler (Şekil 24.4). Membranlar daha sonra radyoaktif olarak etiketlenmiş veya enzime bağlı antikorlarla muamele edilerek özel proteinlerin analizleri yapılabilir.

24.3.2. Proteinlerin saflaştırılması

Bir proteinin saflaştırılmasında proteinleri birbirinden ayırt eden özellikler kullanılır. Proteinler kütle, elektrik yükü, bağlanma afinitesi ve değişik çözücülerde eriyebilirliklerinden faydalanılarak saflaştırılabilirler. Saflaştırma işlemi bu metodların bir kombinasyonu halinde uygulanır ve uygun metot deneme yanılma yolu ile bulunur. Bu esnada ilgili proteinin varlığını gösteren bir tanı metodu gereklidir. Böylelikle farklı metodların istenen proteini saflaştırma başarısı karşılaştırılır ve en uygun metot seçilir. Her bir aşamada toplam protein miktarı da ölçülür ve saflaştırma yüzdesi bulunur.

Büyüklik esasına göre proteinler yarı geçirgen membranların kullanıldığı diyaliz metodu ile veya belli büyüklükte porların meydana getirildiği bir kolondan proteinlerin geçirildiği jel filtrasyon kromatografisi ile birbirlerinden ayırt edilebilirler. Ultrasantrifüj, proteinlerin yoğunluk esasına göre saflaştırılmalarında kullanılan bir metottur. Bu amaçla, farklı proteinlerin santrifüj sonrası çözeltide kolayca ayırt edilebilir bantlar oluşturmaları için santrifüj tüpündeki çözeltide yukarıdan aşağıya doğru yoğunluk artışı (örneğin sakkaroz kullanılarak) sağlanır. Santrifüj sonrası tüp alttan delinerek çözelti damla damla farklı tüplere alınır ve her bir tüp içinde istenen proteinin içeriği tespit edilir. İstenen proteini en fazla oranda içeren tüp ile diğer saflaştırma aşamalarına devam edilir.



Şekil 24.4. Western blot veya immunoblot tekniği. a) Bölünen bir tütün hücresindeki bütün proteinler önce iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrılmış ve bir protein boyası ile boyanmıştır. b) Bu jeldeki proteinler bir nitroselüloz membrana aktarılmış ve özel bir proteini tanıyan bir antikor ile muamele edilmiştir. Bu proteinlerin yerleri enzim bağlanmış ikinci bir antikor ile gözlenmiştir (Alberts *ve ark.* 1994'den).

Proteinlerin eriyebilirliklerinden hareketle saflaştırılmalarında onların değişik tuz konsantrasyonlarında çökeltme meydana getirme özelliklerinden faydalanılır. Her protein ancak belli bir tuz konsantrasyonunda çökeltir. Örneğin, 1.5 M amonyum sülfat konsantrasyonunda çökelen bir protein saflaştırılmak istendiğinde, tuz konsantrasyonu 1.4 M'a getirilerek 1.5 M konsantrasyon altında çökelen tüm proteinler örnekten uzaklaştırılır. Bir sonraki aşamada tuz konsantrasyonu 1.6 M'a çıkartılır ve istenen protein (muhtemelen benzer bazı proteinler de) çökeltir ve 1.5 M üzerinde çökelen proteinler örnekten uzaklaştırılmış olur. Bu işlemlerde değişik tuz çözeltileri kullanılarak saflaştırma başarıları artırılabilir.

Proteinler, net yüklerine göre iyon alış-veriş kromatografisi ile ayırt edilebilirler. Negatif yüklü proteinlerin pozitif yüklü materyal kullanılarak hazırlanan kolonlardan, pozitif yüklü proteinlerin ise negatif yüklü materyalden hazırlanan kolonlardan geçirilmesi ile istenen protein kolonda tutulmuş olur. Tutulmayan proteinler bir tampon çözelti ile yıkanır. İstenen protein ise kolon hazırlanmasında kullanılan materyalin konsantre bir çözeltisi ile kolondan alınır. Diğer saflaştırma aşamalarına devam edilir.

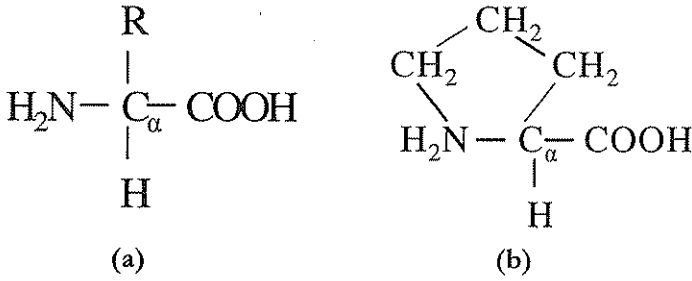
Proteinlerin diğer maddelere bağlanma afinitelerine göre saflaştırılması işleminde afinite kromatografisi kullanılır. Bu metot iyon alış-veriş kromatografisine çok benzemektedir. Tek farklılık proteinlerin elektrik yüklerine göre değil de bazı özel kimyasal gruplara yüksek bağlanma afinitesine dayanarak tutulmalarıdır.

24.4. Proteinlerin Yapısal Özellikleri

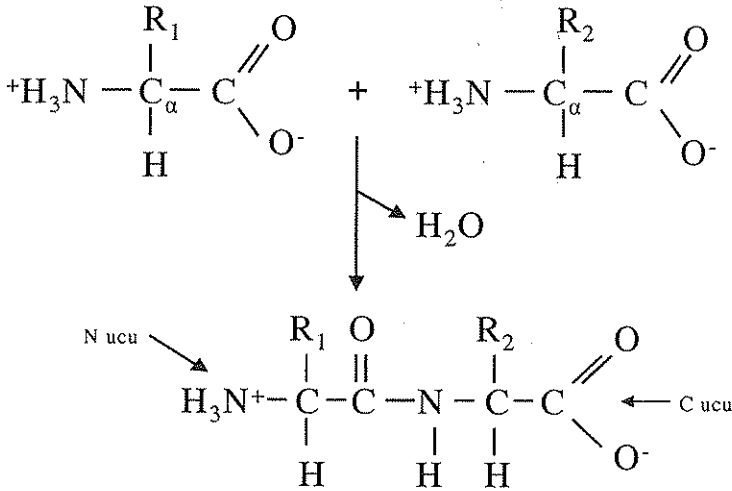
Proteinlerin yapısal özellikleri birbirleriyle yakından ilişkili olan ve birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı olarak adlandırılan dört farklı düzlemde incelenir.

24.4.1. Proteinlerin birincil yapısı

Proteinleri meydana getiren amino asit dizilişleri onların birincil yapısını oluşturur. Prolin istisna olmak üzere, amino asitler genel olarak Şekil 24.5'deki formülle karakterize edilirler. Amino asit formülündeki R, yan zincir olarak da adlandırılır. R zinciri glisinde sadece bir hidrojen atomu taşıırken diğer amino asitlerde daha karmaşık yapılar içerir. İki amino asit peptid bağıyla bir araya gelir. (Şekil 24.6). Peptidlerin yapısı esnek olmayan bir karakter taşımaktadır. Amino asidin yapısında COOH, H, NH₃ ve R gruplarının bağlandığı merkezi alfa karbon atomunun iki yanındaki bağlar dışındaki bütün bağlar sabittir. Birbirine peptid bağıyla bağlanan iki amino asidin meydana getirdiği yapıda iki alfa karbon arasında kalan ve esnemeyen bir levha şeklindeki düzleme amid düzlemi denir (Şekil 24.7). Alfa atomunun iki yanındaki bağ ise amino asitlere göre değişmekle birlikte bir miktar esneyebilir.

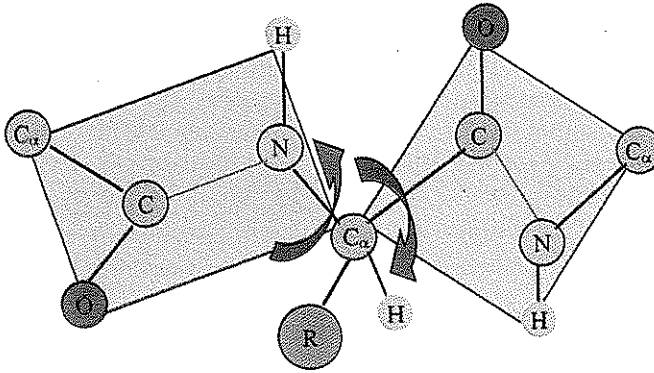


Şekil 24.5. a) Amino asitlerin genel formülü ve b) prolin. R yan zinciri göstermektedir.



Şekil 24.6. İki amino asit birleşerek kırmızı renkle gösterilmiş olan peptid bağı oluşur. Diğer tüm amino asitler bu şekilde bağlanarak tüm peptid oluşur. Peptid'in uçları N (veya amino) ucu ve C (veya karboksil) ucu olarak adlandırılır.

Bu şekilde bir araya gelen amino asit zincirine polipeptid veya kısaca peptid denir. Proteinler bu polipeptidlerden bir veya daha fazlasını içermektedir. Polipeptidlerin uzunluğu 40 ile 4000 amino asit arasında değişmektedir. Polipeptidlerin ve proteinlerin kütleleri Dalton ile (D) ifade edilir (1000 Dalton= 1 kilodalton, kD). Bir Dalton yaklaşık olarak bir hidrojen atomu kütlesine eşittir.



Şekil 24.7. Alfa karbonunun iki tarafındaki iki bağ hariç yukarıdaki dörtgenler içindeki bağlar esnek değildir. Bu durum alfa karbonu etrafında amid düzlemi olarak adlandırılan iki levha meydana getirir (Voet ve Voet, 1995'den).

Amino asitleri birbirinden farklı kılan R zincirinin yapısıdır. R zincirinin proteinin yapısını etkileyen karakterleri arasında polaritesi, elektrik yükü taşıması, büyüklüğü ve kükürt atomu taşıması gelmektedir. Yirmi yaygın amino asidin polarite ve elektrik yüklerine göre gruplanan moleküler formülleri Şekil 24.8'de gösterilmiştir. Bunlardan apolar olanlar suyu sevmezler yani hidrofobiktirler. Polar ve elektrik yükü taşıyanlar suyu severler, yani hidrofilitirler. Yaygın 20 amino aside ait tek harfli ve üç harfli semboller ile bunların kütleleri, proteinlerde bulunma oranları ve özellikleri Tablo 24.1'de verilmiştir.

Proteinlerin üç boyutlu şekilleri fonksiyonları ile doğrudan ilişkilidir. Destek ve koruma fonksiyonuna sahip olan proteinler genellikle lif şeklinde, enzim ve diğer fonksiyonlara sahip proteinler ise küresel şekildedir. Küresel proteinler reaksiyona giren maddeleri uygun bir şekilde bir arada tutan kısımlar içermektedir. Bu kısımlar polipeptid zincirlerin çeşitli şekillerde kıvrılma, sarılma ve katlanmaları ile konformasyon adı verilen belli bir üç boyutlu şekil meydana getirmeleriyle oluşur.

Amino asitlerin suya olan ilgileri proteinlerin şeklini belirleyen en önemli unsurdur. Hidrofobik amino asitlerin proteinin çevre şartlarına (çoğu zaman suya) açık dış yüzeylerinde değil, suyla temas etmeyen iç kısımlarında bulunması gerekir. Glisin, alanin, valin, lösin, izolösin, metionin, fenilalanin, prolin ve triptofan bu tip amino asitlerdir. Proteinin iç kısmında bulunan bu amino asitler eğer büyüklüklerine göre uygun bir şekilde bir araya gelirlerse daha iyi bir şekilde yumulurlar ve daha stabil olurlar. İki büyük veya iki küçük amino asidin karşı karşıya gelmesi heterojenliğe sebep olacak ve proteinin stabilitesi azalacaktır.

Elektrik yükü taşımasalar da polar özellikteki yan zincirlere sahip olan serin, treonin, tirozin, asparagin, glutamin ve sistein proteinin suya açık dış yüzeylerinde bulunabilirler. Bunlardan sistein özellikle önemlidir. Polipeptid zincirler, hidrofobik

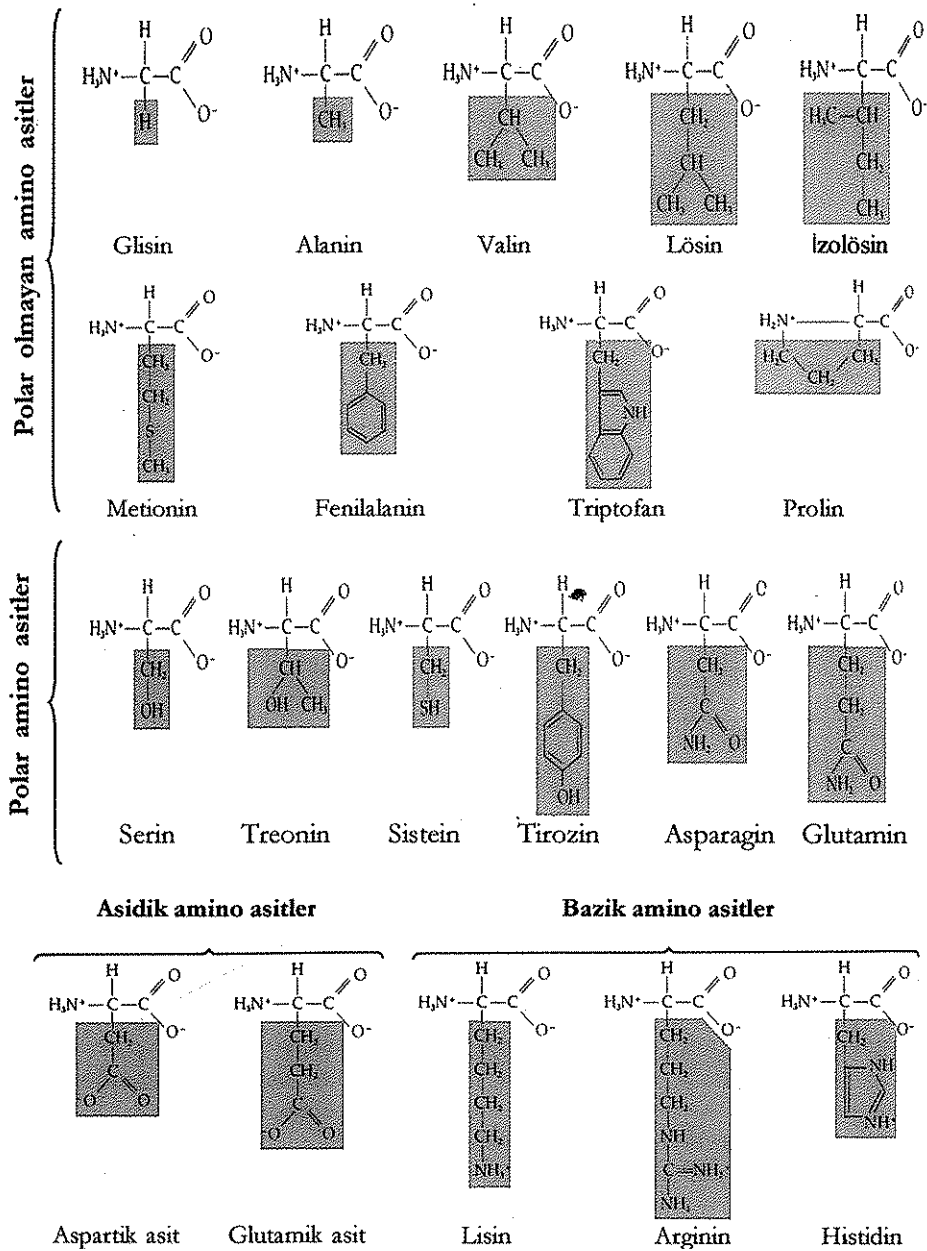
amino asitler iç yüzeye gelecek şekilde yumulduktan sonra dış kısımda yer alan iki sistein amino asidi farklı polipeptidleri veya aynı polipeptidin iki kısmını disülfid bağı ile birbirine bağlarlar. Disülfid bağları proteinin stabilitesinde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Elektrik yükü taşıyan amino asitler de yaygın olarak proteinin dış kısmında yer alırlar. Bunlar ayrıca enzim işlevi gören proteinlerde reaksiyon bölgesini oluştururlar. Üç amino asit (histidin, lizin ve arginin) bazik özellikte, iki amino asit ise (aspartik asit ve glutamik asit) asit özelliktedir. Ayrıca yüksek pH ortamlarında asidik özellik kazanan sistein ve tirozin de yük taşıyan amino asitler grubunda değerlendirilebilirler.

Proteinlerin birincil yapılarındaki, yani amino asit dizilişindeki bir amino asidin değişmesi dahi bütün proteinin yapısını değiştirebilir ve proteinin fonksiyonunu etkileyebilir. Kanda oksijen taşıyan hemoglobin proteininin dış yüzeyinde yer alan yüklü özellikteki glutaminin hidrofobik valine çevrilmesini sağlayan mutasyon proteinin fonksiyonunu etkilemekte ve "Sickle Cell" Anemia hastalığına yol açmaktadır.

O halde proteinlerin amino asit dizilişlerini bilmek proteinin üç boyutlu yapısı ve nasıl çalıştığı hakkında ipuçları verecektir. Ayrıca, bu tür bir bilgi farklı organizmalardaki birbirine benzer proteinlerin tanınması ve karşılaştırılmasına imkan verecektir. Amino asit dizilişleri proteini kodlayan gen hakkında da bilgi verecek ve bu bilgi ilgili genin klonlanması ile sonuçlanabilecektir.

Besin olarak kullanılan ve depo edilen proteinlerde bütün amino asitlerin dengeli olarak bulunması önemlidir. Bazı amino asitler yalnızca bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bu amino asitleri sentezleyemeyen memeliler ve benzeri canlıların, bu amino asitlerce zengin proteinler taşıyan gıdalar alması gerekir. Bu tip amino asitlere *esansiyel* amino asitler denir. İnsan vücudunda sentezlenemeyen ve besin yoluyla alınması gerekli olan esansiyel amino asitler lösin, izölösin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valindir. İnsanlar aldıkları proteinlerin çoğunu bitkisel kaynaklardan karşılamaktadırlar. Tahıl taneleri lizin, baklagil taneleri ise metionin bakımından fakir olduğu için tahıl ve baklagil kaynaklı gıdaları tek başına yemek yeterli miktarda alındıklarında dahi dengesiz beslenmeye sebep olmaktadır. Dolayısıyla diyetlerde baklagil ve buğdaygil kaynaklı gıdaları birlikte almak, daha da iyisi bunlara hayvansal kaynaklı gıdaları da dahil etmektir.



Şekil 24.8. Yaygın 20 amino asidin formülleri. Amino asitler yan zincirlerinin (R) özelliklerine göre gruplanmıştır. Elektrik yükler pH=7 için verilmiştir. Sistein ve tirozin bazı şartlarda asidik özellik kazanabilmektedir (Campbell, 1990'dan).

Tablo 24.1. Yaygın amino asitler ve bazı özellikleri (Voet ve Voet, 1995'den).

Amino asit	Sembolü	Kütle (D)	Proteinlerde bulunma (%)	Proteinlerdeki yapısal özelliği
Alanin	Ala (A)	71.0	9.0	Apolar, küçük
Arginin	Arg (R)	157.2	4.7	Bazik, büyük
Asparagin	Asn (N)	114.1	4.4	Polar
Aspartik asit	Asp (D)	114.0	5.5	Asidik
Fenilalanin	Phe (F)	147.5	3.5	Apolar, büyük
Glutamik asit	Glu (E)	128.1	6.2	Asidik
Glutamin	Gln (Q)	128.1	3.9	Polar
Glisin	Gly (G)	57.0	5.7	Apolar, küçük
Histidin	His (H)	137.1	2.1	Bazik, büyük
İzolösin	Ile (I)	113.1	4.6	Apolar
Lisin	Lys (K)	129.1	7.0	Bazik, büyük
Lösin	Leu (L)	113.1	7.5	Apolar
Metionin	Met (M)	131.1	1.7	Apolar, kükürtlü
Prolin	Pro (P)	97.1	4.6	Apolar, esnek değil
Serin	Ser (S)	87.0	7.1	Polar
Sistein	Cys (C)	103.1	2.8	Polar, kükürtlü, bazen asidik
Treonin	Thr (T)	101.1	6.0	Polar
Triptofan	Trp (W)	186.2	1.1	Apolar, büyük
Tirozin	Tyr (Y)	163.1	3.5	Polar, büyük, bazen asidik
Valin	Val (V)	99.1	6.9	Apolar

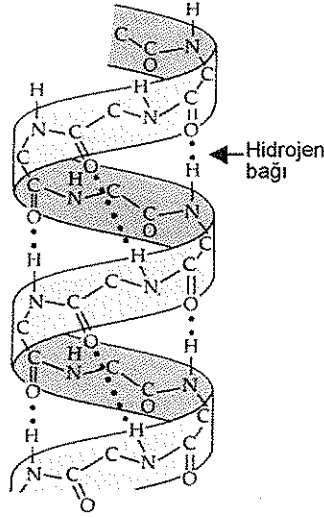
24.4.2. Proteinlerin ikincil yapısı

Proteinlerin çoğunda polipeptid zincir, tekrarlanan kıvrılmış veya katlanmış bölümler taşır. Polipeptid ana eksenini boyunca karşı karşıya gelen amino asitlerin NH ve CO grupları arasında meydana gelen hidrojen bağları nedeniyle ortaya çıkan bu tip oluşumlar proteinlerin ikincil yapısını meydana getirir. Hidrojen bağları aslında zayıf bağlar olmalarına rağmen çok sayıda bulunmaları nedeniyle proteinin üç boyutlu şekline önemli katkıda bulunurlar. Proteinlerin ikincil yapıları alfa sarmalı, beta pilesi ve diğer şekiller halinde olabilir.

a) Alfa sarmalı

Polipeptid zincir alfa karbon etrafında sürekli olarak sağa doğru kıvrılıyorsa alfa sarmalı olarak adlandırılan ikincil yapı meydana gelir. Alfa sarmalında her 3.6 amino asit bir dönüşü tamamlar ve her dönüş dikey ekseninde 5.4 angström (Å) mesafede tamamlanır. Peptid zinciri üzerindeki n numaralı amino asidin NH grubu ile n+4 numaralı amino asidin (yani 1 ile 5, 2 ile 6, 3 ile 7 vb gibi) CO grubu arasında

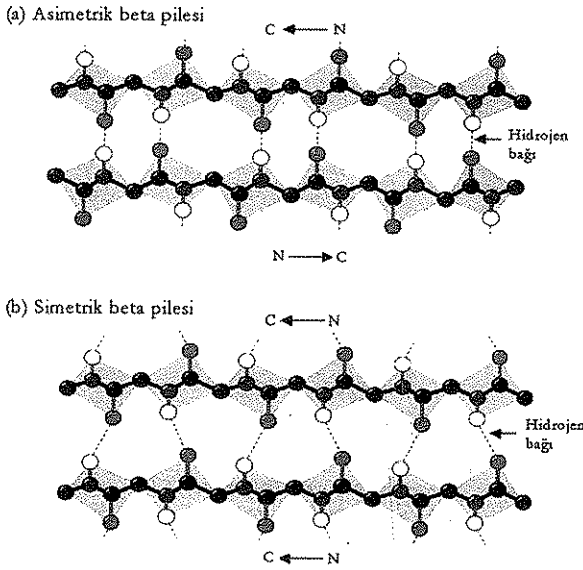
hidrojen bağı oluşur (Şekil 24.9). Alfa sarmalları proteinin iç kısmında veya dışında yer alabilirler. Proteinin iç kısmında yer aldıklarında sarmal üzerindeki amino asitler hidrofobik özellikler taşıyacaktır. Eğer sarmal proteinin dış kısmında yer alıyorsa o taktirde bir kısmında bulunan amino asitler hidrofobik, diğer kısmındakiler ise hidrofilik olacaktır.



Şekil 24.9. Alfa sarmalı. Amino asitlerin R yan zincirleri gösterilmemiştir.

b) Beta pilesi

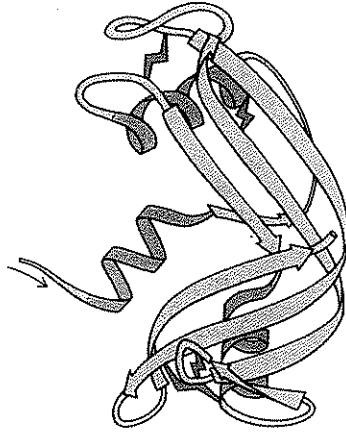
Beta pilesi diğer bir yaygın ikincil yapı şeklidir. Beta pilesinde polipeptid zincir kendi üzerine katlanır ve karşılıklı zincirler üzerindeki amino asitler arasında hidrojen bağları meydana gelir. Amid düzlemlerinin levha şeklinde alfa karbon etrafında yer alması nedeniyle bu yapılar bir pile görüntüsü verir (Şekil 24.10). Beta pilesi karşılıklı olarak gelen katlarda zincirin ilerleme yönüne göre iki şekilde olabilir. Eğer üst üste olan iki zincir aynı yönde ilerliyorsa (örneğin her ikisi de N- uç C- uç doğrultusunda) simetrik beta pilesi, katlardaki zincir farklı yönde ilerliyorsa asimetrik beta pilesi olarak adlandırılır. Hidrojen bağlarının daha düzenli olması nedeniyle asimetrik beta pilesi daha stabildir.



Şekil 24.10. β pilelerinde hidrojen bağı ilişkileri. Amino asit yan zincirleri gösterilmemiştir. N ve C harfleri arasındaki oklar peptid uçlarının ilerleme doğrultusunu belirtmektedir (Voet ve Voet, 1995'den).

c) Tekrarlanmayan yapılar

Proteinler çoğu zaman alfa sarmalı ve beta pilesi gibi düzenli yapılar yanında tekrarlanmayan yapıların da bulunduğu bir karışım halindedirler (Şekil 24.11). Alfa sarmalı ve beta pilesi yapıları küresel proteinlerin yarısından biraz daha az bir kısmını oluştururlar. Proteinlerin çoğunda amino asitlerin yarıdan fazlası at nalını andıran ilmek veya kıvrım olarak uzanan peptid zinciri halindedir. Aslında bunlar rasgele yapılar değildir, ancak şekilleri sarmal veya pile gibi basit formlarda tarif edilemezler. Kıvrımlar sarmal ve pile gibi düzenli yapıları birbirine bağlarlar ve bu nedenle çoğunlukla küresel proteinlerin dış kısmında bulunurlar. At nalı şeklindeki ilmek yapıları ise daima proteinin dış kısmında bulundukları için reaksiyona giren moleküllerin tanınması işlevinde rol oynayabilirler. İlmek veya kıvrımlar dışında bazı proteinlerde tamamen rasgele konumda polipeptid zincirler bulunabilir. Bazı proteinler ana protein kütesinin dışında çıkıntı olarak duran yüklü amino asitler taşıyan peptid zincirlere sahiptir. Bu çıkıntuların bazı moleküller ile temas kurulmasında rol oynadıkları düşünülmektedir.



Şekil 24.11. Ribonükleaz S'nin kurdela modeli gösterimi. Sarmallar pembe, pileler yeşil, diğer yapılar gri ve disülfid bağları sarı ile gösterilmiştir (Stryer, 1988'den).

Proteinlerin ikincil yapılarının kesin olarak belirlenmesi, x-ray kristalografisi veya nükleer magnetik rezonans (NMR) teknikleri ile gerçekleştirilebilir. Ancak bu teknikler ile ikincil yapının çözülmesi oldukça pahalı ekipman ve yüksek düzeyde teknik bilgi gerektirir. Oysa protein çalışmalarında çoğu zaman araştırmacının istediği proteinin ikincil yapısı hakkında çabuk ve genel bir bilgi sahibi olmaktır. İkincil yapıları x-ray kristalografisi ile çözülmüş proteinler incelendiğinde her bir amino asidin sarmal ve pile formlarında bulunma oranları bir katsayı haline getirilmiştir. Bu katsayılara göre amino asitler sarmal ve pile yapıları meydana getirme bakımından sınıflanmışlardır. Benzer özellikteki belli sayıda amino asidin yan yana gelmesiyle sarmal veya pile meydana geleceği tahminine dayanan bu metot Chou-Fasman tekniği olarak anılmaktadır. Amino asit dizilişinden hareketle ikincil yapıların pozisyonunu oldukça kolay bir şekilde tespit eden bu metot ortalama %50, bazı durumlarda %80 doğruluk derecesine sahiptir.

24.4.3. Proteinlerin üçüncül yapısı

Proteinlerin üçüncül yapıları ikincil yapı elementlerinin (alfa sarmallarının, beta pilelerinin ve diğer yapıların) bir araya gelme şeklidir. Üçüncül yapının oluşmasında daha önce gördüğümüz üzere hidrofobik amino asitlerin iç yüzeylerde olacak şekilde proteinin kıvrılmasını takiben amino asitlerin R grupları arasında meydana gelen hidrojen bağları ve iyonik bağlar önemli rol oynamaktadır. Proteinin nihai şekli disülfid bağı olarak adlandırılan kuvvetli kovalent bağlar ile daha da pekiştirilir. Disülfid bağları, proteinin katlanmasıyla birlikte birbirine yaklaşan iki sisteindeki kükürt atomları arasında olur. Disülfid bağları hücre dışına salgılanan proteinlerde

yağgındır ve proteine çok değişken olabilecek dış şartlar için ilave bir stabilite kazandırılırlar.

Yaklaşık olarak 200'ün üzerinde amino asit taşıyan polipeptid zincirleri çoğu zaman iki veya daha fazla küresel bölgeden oluşmaktadır. *Domain* adı verilen bu bölgeler arasında polipeptid zincir nispeten esnek bir veya bazen iki bağlantı kordonu halinde bulunur (Şekil 24.12). Her ne kadar aynı polipeptid zincirden yapılsalar da domainler yapısal olarak birbirlerinden farklı karakterde olup genellikle farklı işlevlere sahiptirler. Örneğin, her biri farklı bir molekül için bağlanma noktası taşıyabilir.

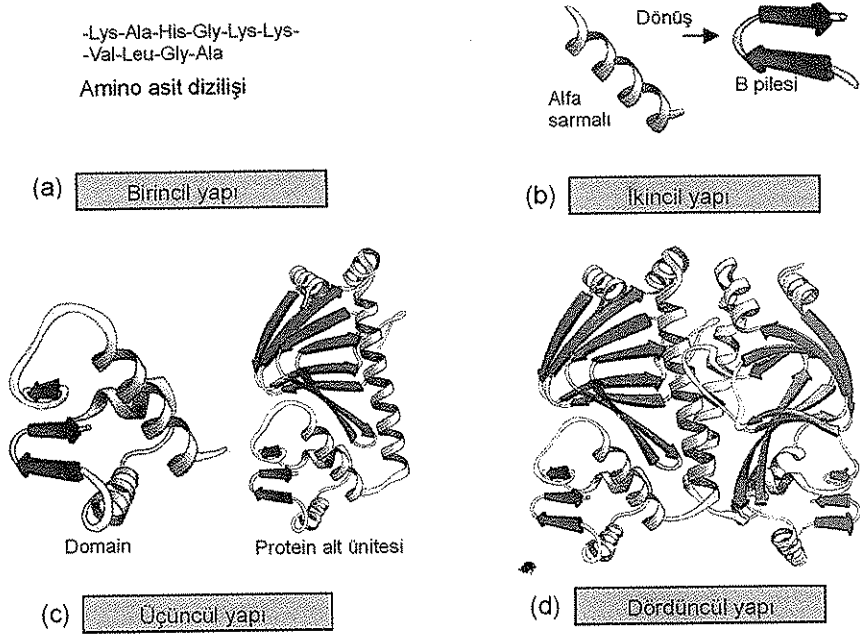
Proteinlerin üç boyutlu yapısının oluşmasında stabiliteyi artıracak şekilde bağların oluşması asıl faktördür. Proteinlerin yapılarının bozulması da aynı prensip doğrultusunda işler, yani bağlar stabiliteyi azaltacak şekilde bozulur. Isıya maruz kalan proteinlerde zayıf olan bağlar bozulur. Bir kez proteinin belli bir kısmında bağların bozulması domino etkisi meydana getirerek bütün proteinin çok kısa bir zamanda doğal halini kaybetmesine sebep olur. Isıdan başka ekstrem pH dereceleri, deterjanlar ve yüksek konsantrasyondaki suda eriyebilir organik maddeler proteinin kimyasal bağlarını etkileyerek denatürasyona sebep olurlar.

Denatüre olan proteinlerin bazıları tekrar eski şeklini kazanıp fonksiyonel olabilir. Ancak, pek çok protein bir kez denatüre olduğunda tekrar eski doğal halini kazanamaz. Üretiltikten sonra modifikasyona uğrayan (örneğin bazı kısımları kesilen) proteinler denatüre olduklarında doğal hallerini yeniden kazanamazlar.

24.4.4. Proteinlerin dördüncül yapısı

Kütleleri yaklaşık olarak 100 kilodaltonun (kD) üzerinde olan hemen hemen tüm proteinler birden fazla polipeptid zincir içerirler. Bu polipeptidlerin her biri proteinin bir alt ünitesi olarak adlandırılır. Protein alt ünitelerinin proteini meydana getirmek üzere bir araya gelmeleri durumu proteinin dördüncül yapısını oluşturur. Proteinin büyük bir tek parçadan oluşması yerine küçük parçalardan oluşması sentezlenmesinden katlanmasına kadar olan işlemlerin daha kolay gerçekleşmesini sağlar. Alt ünitelerin olması pek çok enzimatik proteinde enzim aktivitesinin kontrolüne imkan sağlar. Son olarak da aynı alt üniteyi birden fazla taşımakla protein aktivitesinin artması sağlanır.

Proteinler, birbirinin aynı alt üniteler taşıyabildikleri gibi farklı alt üniteler de taşıyabilirler veya hemoglobin proteininde olduğu gibi farklı alt ünitelerden birden fazlasını taşıyabilirler. Hemoglobin iki alfa ve iki de beta alt ünitesi taşımaktadır (Şekil 24.12).



Şekil 24.12. Proteinlerin değişik düzeylerde yapıları. a) Birincil yapı (bir polipeptid zincirinin amino asit dizilişi), b) İkincil yapı, c) Üçüncül yapı (bir polipeptid zincirinin belli bir kısmının meydana getirdiği domain ve farklı domainlerin meydana getirdiği tek bir polipeptid zincirden oluşan bir alt ünite ve d) iki alt üniteli bir proteinde alt ünitelerin bir araya gelmesiyle oluşan dördüncül yapı (Alberts *ve ark.*, 1994'den).

24.5. Polipeptid Zincirden Fonksiyonel Proteine: Protein Katlanması

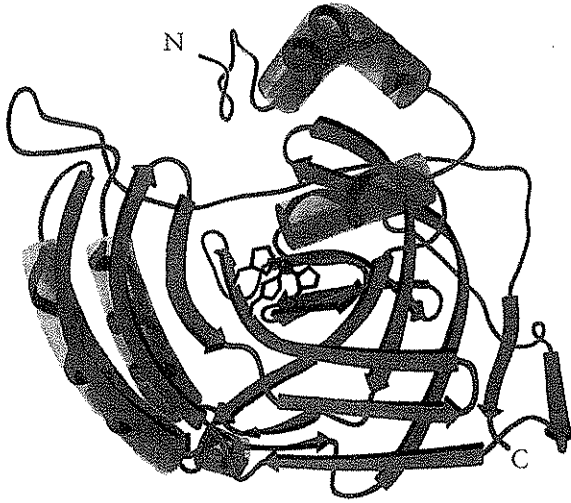
Proteinlerin yapısal özellikleri kısmında tartıştığımız üzere, polipeptid zincirlerinin fonksiyonel protein haline gelebilmesi için sentezlenmelerinden hemen sonra art arda safhalardan geçerek nihai şekillerine ulaşmaları gerekmektedir. Bu süreç ilk anda amino asit dizilişlerinin bir sonucu olarak hidrofobik interaksyonlar etkisiyle polipeptid zincirde katlanmalar meydana gelmesiyle başlar. Bu katlanmalar ile şekillenen ikincil yapılar yine hidrofobik interaksyonlar ve R grupları arasında meydana gelen hidrojen ve iyonik bağların etkisiyle bir araya gelirler. Bu anda sistein amino asitleri arasında güçlü kovalent bağlar olan disülfid bağları ortaya çıkar. Birden fazla domain taşıyan proteinlerde domainler oluşur. Alt üniteleri olan proteinlerde alt üniteler bir araya gelerek dördüncül yapı tamamlanır. Son aşamada da küçük değişikliklerle proteinin son şekline ulaşılır. Bu işlemlerin çoğu bir defada oluşmaz, çok kısa aralıklarla meydana gelen deneme-yanılma olayları şeklinde en stabil yapının bulunması olarak gerçekleşir.

Doğal şartlarda pek çok polipeptid doğru katlanmak için *chaperon* adı verilen proteinlere ihtiyaç duymaktadır. Chaperonlar protein sentezlenirken veya yeni sentezlendiğinde onlara bağlanırlar. Böylece sentezlenen proteinlerin nihai hedeflerine gidip doğru bir şekilde katlanana kadar başka proteinlerle interaksiyona girmeleri önlenir. Hsp60 ve Hsp70 yaygın olarak bilinen iki chaperon proteindir.

24.6. Proteinlerin Diğer Molekülleri Bağlama Özelliği

Proteinler çok farklı özellikteki molekülleri tanır ve onlarla etkileşime girerler. Enzim tabiatındaki proteinlerin fonksiyon meydana getirmelerinde ilk aşama, diğer moleküllerin spesifik bir şekilde bağlanmasıdır. Proteinlerin etkileşime girdiği moleküller arasında diğer proteinler, karbonhidratlar, DNA, metaller ve iyonlar da bulunmaktadır. Proteinlerin bu kadar farklı özellikteki moleküllerle interaksiyona girebilmesi proteinlerin özel yüzeyler ve girintiler meydana getirebilme yeteneği nedeniyle. Yapı taşları olan amino asitlerin çeşitliliği nedeniyle, proteinler diğer moleküllerle hidrojen bağları, elektrostatik bağlar, Van der Waals bağları ve hatta kovalent bağlar oluşturabilmektedir. Daha da ötesi, bu interaksiyon-ların güçlülüğü ve süresi de kontrol edilebilmektedir. Enzim proteinler katalize ettikleri reaksiyondaki molekülleri uygun pozisyonda tutarak kimyasal bağ oluşumunu veya var olan bağların kırılmasını kolaylaştırırlar. Örnek olarak, CO_2 'in suyla birleşmesini bir milyon kat hızlandıran karbonik anhidraz enzim proteinini inceleyelim. Protein yüzeyinin 15 angström altındaki bir oyukta üç histidin amino asidine entegre halde bulunan bir çinko iyonu katalitik etkiyi sağlamaktadır (Şekil 24.13). Bu oyukun etrafında CO_2 'i taniyan ve bağlayan amino asitler bulunur. Çinko iyonuna bağlanan su molekülü çabucak hidroksit iyonuna dönüştürülür ve bu hidroksit iyonu derhal hemen yanı başında tutulan CO_2 molekülüne saldırır. Burada karbonik anhidraz enzim proteini reaksiyonu iki yolla hızlandırmaktadır: a) hidroksit iyonunun oluşumunu sağlar ve b) hidroksil iyonunun hemen yanı başında uygun pozisyonda yüksek CO_2 konsantrasyonu sağlar. Yani, reaksiyon için her şeyi bir araya getirir.

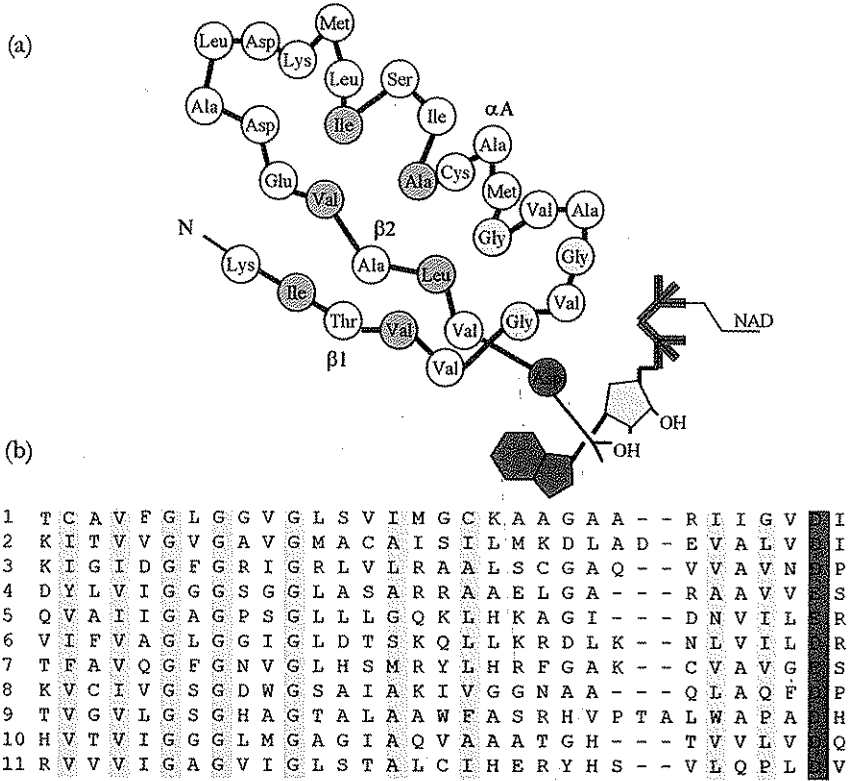
Bazı proteinler birden fazla bağlanma yeri taşırlar ve bu bağlanma yerleri birbirleriyle haberleşme içindedir. Bağlanma yerinin birine bir molekülün bağlanması diğer yerde değişikliğe yol açar. Allosterik kontrol adı verilen bu mekanizma ile proteinler, moleküler açma-kapama düğmeleri olarak çalışırlar ve reaksiyonun hızını kontrol ederler. Örneğin, kanda O_2 taşıyan hemoglobinin proteinindeki heme grubuna O_2 bağlanması proteinin uzaktaki diğer bölgelerine H^+ ve CO_2 bağlanması ile ilgilidir. Çalışan bir adale gibi fazlaca CO_2 üretmiş ve asitliği yükselmiş bir ortamda hemoglobine H^+ ve CO_2 bağlanır. Bu durumda hemoglobin taşıdığı O_2 'yi çabucak bırakır. Benzer şekilde, O_2 oranının çok yüksek olduğu akciğerde O_2 bağlanmasıyla H^+ ve CO_2 kolayca bırakılır ve hemoglobinin daha fazla O_2 yükler. Bu şekilde ilgili adaleye daha fazla oksijen gitmesi sağlanmış olur.



Şekil 24.13. İnsan karbonik anhidraz proteini. Alfa sarmallar silindir, beta pileler ok şeklinde çizilmiştir. Ortadaki gri top Zn^{++} iyonunu göstermektedir. Zn^{++} iyonu etrafındaki üç histidin yan zinciri mavi renkle gösterilmiştir (Voet ve Voet, 1995'den).

24.7. Proteinlerdeki Kritik Amino Asitler

Farklı türlerde bulunan ve benzer işlevler meydana getiren proteinlerin amino asit dizileri karşılaştırıldığında bazı noktalardaki amino asitlerin hiç değişmediği, bazı bölgelerdekilerin ise ancak benzer amino asitlere değişebildiği gözlenmektedir (Şekil 24.14). Buna göre anılan değişiklikler dışındaki değişikliklerin çoğu fonksiyonel olmayan veya fonksiyon açısından dezavantajlı proteinler meydana getirmektedir. Bu proteinler muhtemelen negatif seleksiyonla yok olup gitmektedir. Farklı proteinlerde korunan yani değişiklik göstermeyen amino asitler çoğunlukla proteinlerin fonksiyonu ile ilgilidir. Örnek olarak, farklı türlerdeki myoglobin proteinlerinde korunmuş olan amino asitler ve bunların fonksiyonları Tablo 24.2'de verilmiştir. Kritik bölgelerdeki amino asit değişiklikleri proteinleri üç şekilde etkileyebilir: a) proteinin ikincil yapısı ve bunun sonucu olarak da diğer seviyelerdeki yapılar bozulabilir, b) enzim proteinlerde diğer moleküllerin bağlanma yerlerinde veya enzimatik aktivite bölgelerinde (Şekil 24.15) değişiklik meydana gelebilir veya c) sistein-sistein disülfid bağları engellenir veya yeni bağlar meydana gelebilir. Böylece proteinin stabilitesinde farklılıklar meydana getirilir. Bu duruma verilebilecek iyi bir örnek, Wetzel ve Perry (1988)'nin yeni bir disülfid bağ meydana getirerek T4 lizozim enziminin ısıya dayanıklılığını artırmasıdır. Bazı amino asitler ikincil veya üçüncül yapının oluşumunda hayati role sahip olduklarından değişimleri proteinlerde ciddi sonuçlar meydana getirebilir. Örneğin, hemoglobinin proteinindeki C2 pozisyonundaki prolin amino asidi C sarmalının sona ermesi için zorunludur. B6 pozisyonunda B ve E sarmallarının birbiriyle yakın temasta olması



Şekil 24.14. (a) Dinükleotid bağlayan bir proteinde (laktat dehidrojenaz) $\beta 1$ - αA - $\beta 2$ motifinin şematik gösterimi. (b) Farklı dinükleotid bağlama proteinlerinde korunan amino asitler. Belli pozisyonlarda yeşil renkle gösterilen hidrofobik amino asitler beta tabakalarını alfa sarmallarına sıkıca paketlemek için gereklidir. Bu pozisyonlardaki amino asitler hidrofobik olmak kaydıyla değişiklik gösterebilirler. Değişmeksizin her zaman bulunması gereken ve sarı renkle gösterilen glisin amino asitleri sıkı bir ilmek oluşturmak ve ko-enzim NAD'nin ADP kısmını bu ilmeğin ana zincirine sıkıca yaklaştırmak için gereklidir. Eflatun renkle gösterilen pozisyon 52'deki aspartik asit veya glutamik asit adenozin ribozun 2' pozisyonundaki OH ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Amino asit dizilişi karşılaştırılan proteinler; 1. At karaciğer alkol dehidrojenaz (194-224), 2. Köpekbalığı kas laktat dehidrojenaz (22-53), 3. Istakoz gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz (2-32), 4. İnsan alyuvar glutation redüktaz (22-51), 5. *Pseudomonas fluorescens* p-hidroksibenzoat hidroksilaz (4-32), 6. Meyve sineği alkol dehidrojenaz (9-38), 7. Büyükbaş hayvanlar glutamat dehidrojenaz (246-275), 8. Tavşan kası gliserol-3-fosfat-dehidrojenaz (4-33), 9. *Agrobacterium tumefaciens* nopalın sentaz (34-66), 10. Domuz L-3-hidroksiasil-CoA-dehidrojenaz (17-45), 11. Domuz D-amin oksidaz (2-31) (Branden ve Tooze, 1991'den).

nedeniyle küçük bir yan zincire sahip olan glisin bulunmak zorundadır. HC2 pozisyonundaki tirozin H ve F sarmallarını birbirine bağlamaktadır. (Şekil 24.16). Bu şekildeki kritik pozisyonlar haricinde bir sarmal veya pilenin orta yerinde

bulunan bir amino asidin o yapıyı en ciddi şekilde bozacak bir amino aside dönüşmesi (örneğin bir sarmaldaki bir amino asidin prolin veya glisine dönüşmesi veya bir pilde bulunan bir amino asidin aspartik asit, glutamik asit veya proline dönüşmesi) ile ikincil yapı ve diğer seviyelerdeki yapılar bozulur, protein fonksiyonunu kaybedebilir. Bu gibi amino asitler için *kısmi korunmuşluk* söz konusudur, yani bu amino asitler belli amino asitlere dönüşemez.

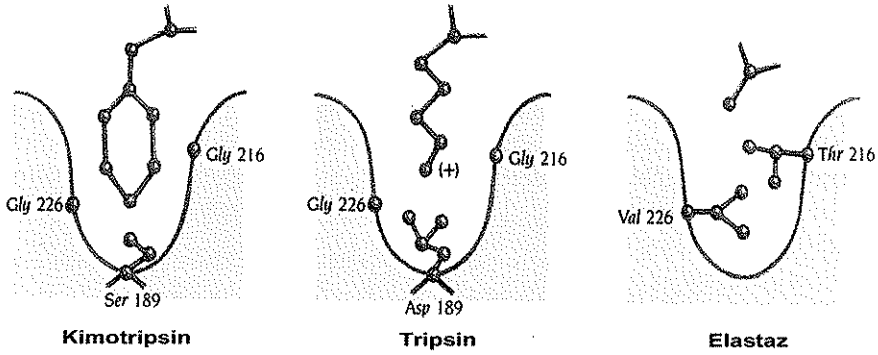
Tablo 24.2. Farklı canlılardaki hemoglobinlerde değişmeyen amino asit pozisyonları (Stryer, 1988).

Pozisyon	Amino asit	Fonksiyon
F8	Histidin	Heme grubuna bağlı fonksiyonla ilgili yakın histidin
E7	Histidin	Heme grubunun yanındaki uzak histidine
CD1	Fenilalanin	Heme grubu ile temas
F4	Lösin	Heme grubu ile temas
B6	Glisin	B ve E sarmallarının yakın teması
C2	Prolin	Sarmalın sonlandırılması
HC2	Tirozin	H ve F sarmallarını bir arada tutulması
C4	Treonin	Bilinmiyor
H10	Lisin	Bilinmiyor

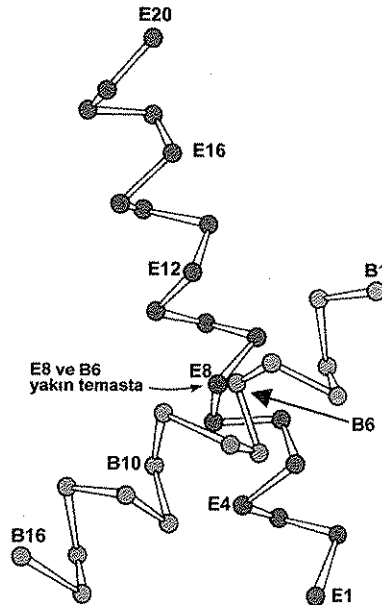
Proteinlerde değişiklikleri kritik olabilecek bir başka grup amino asitler de iyonik bağlarla ilgili olan amino asitlerdir. Bu tür bağlarda rol alan ve elektrik yükü taşıyan amino asitler benzer amino asitlere dönüşmedikçe (örneğin negatif yük taşıyan Asp, Glu, Cys ve Tyr veya pozitif yük taşıyan His, Lys ve Arg birbirlerine dönüşmedikçe) iyonik bağlar ortadan kalkar ve protein stabilitesini, yapısını ve hatta fonksiyonunu kaybedebilir. Bu tip bağlar, genellikle proteinlerin birbirleriyle ve diğer moleküllerle bağlanma noktalarını, enzim proteinlerde ise aktif reaksiyon bölgesini oluşturdıkları için değişikliğe karşı son derecede hassastırlar.

Daha az etkili olmakla birlikte hidrofobik interaksiyonları ve hidrojen bağlarını değiştirebilecek amino asit değişiklikleri de protein katlanması esnasındaki önemlerinden dolayı ikincil ve diğer yapıları değiştirebilmektedir.

Proteinlerde değişikliğe hassas olan son grup amino asitler protein stabilitesinde önemli rol oynayan disülfid bağlarını oluşturan sistein amino asididir. Bir sistein amino asidinin bir başka amino aside dönüşmesi böyle bir bağı ortadan kaldırır. Herhangi bir amino asidin sisteine dönüşmesi de proteinde yeni bir disülfid bağ meydana getirebilir veya var olan disülfid bağlarının yerini değiştirebilir. Her iki durum da protein yapı ve fonksiyonunu ciddi olarak etkileyebilir.



Şekil 24.15. Bazı protein kesen enzimlerin (proteazlar) enzimatik aktivite yerleri olan kespe ceplerinin şematik gösterimi. Bu üç enzim de çok benzer üç boyutlu yapıya sahiptir fakat farklı şekillerde fonksiyon meydana getirirler. Kırmızı renkle gösterilen moleküller cebeye giren amino asit yan zincirlerini göstermekte olup, proteaz enzimleri bu amino asitin hemen ardından peptidi kesmektedir. Fonksiyon farklılıklarını cebin içindeki 216 ve 226 pozisyonundaki amino asitler, yan zincirlerinin büyüklüğü ve cep fiziksel özelliği ile 189 numaralı pozisyonundaki amino asit de kimyasal bağ oluşturma özelliği ile belirlemektedir. Bu pozisyonlardaki amino asitlerde değişiklik meydana gelmesi protein fonksiyonunda ciddi değişiklikler meydana getireceği için pek mümkün değildir (Branden ve Tooze, 1991'den).



Şekil 24.16. Myoglobin proteininde B ve E sarmallarının teması. B6 pozisyonundaki amino asit yer darlığı nedeniyle neredeyse her zaman küçük yan zincire sahip olan glisin olmak zorundadır (Stryer, 1988'den).

Bütün bu gerçekler dikkatle incelendiğinde başlangıçta, yani proteinin amino asit dizilişinde meydana gelebilecek tek bir amino asit değişikliğinin bile sonraki aşamalarda gittikçe katlanan bir etki meydana getireceği ve sonuçta protein fonksiyonunu çok önemli derecede değiştireceği anlaşılabacaktır. Amino asit dizilişinden itibaren proteinin doğal formunu kazanana kadar geçen olaylar ve zincirinin iyi anlaşılması, proteinleri yeniden biçimlendirebileceğimiz fikrinin doğmasına sebep olmuştur. Bu bölümün bundan sonraki kısmında protein mühendisliğinin nasıl yapıldığı incelenecektir.

24.8. Protein Mühendisliği

Protein mühendisliği, daha uygun çalışma şartlarına sahip olacak şekilde var olan proteinlerin geliştirilmesi veya tamamen yeni proteinlerin dizayn edilmesidir. Proteinlerin çoğunlukla hücredeki kimyasal olayları katalize eden enzimler olarak çalıştıkları göz önüne alınırsa değişik kimyasal reaksiyonların kullanıldığı endüstri ortamlarında da proteinlerin çok geniş kullanım potansiyelleri olduğu anlaşılabacaktır. Bugün için sanayide kullanılan sentetik orijinli maddelerle karşılaştırıldığında daha kolay biçimde parçalanmaları çevre bilincinin artmaya başladığı bugünlerde proteinlerin endüstride kullanımlarının önemini daha da artırmaktadır. Bu yolla doğa tarafından parçalanması uzun süreler alan veya bazen mümkün olmayan sentetik bileşiklerin doğa üzerindeki yükü azalacaktır.

Proteinlerin bugüne kadar endüstride yaygın olarak kullanılamamasının başlıca nedenleri şöyle özetlenebilir:

- 1) Proteinlerin molekül ağırlıkları diğer bileşiklere oranla çok daha yüksektir. Moleküler ağırlıklarının ortalama olarak 5,5-220 kg arasında olması onların birim reaksiyon başına çok yüksek miktarda kullanılmalarını gerektirir ki bu maliyeti yükselten bir durumdur.
- 2) Proteinlerin çoğu hücre içerisinde çok spesifik şartlarda işlev yaptığından hücre dışı şartlarda özellikle fabrika çalışma ortamlarında dayanıksızdırlar.
- 3) Proteinler yaptıkları işlerde çok spesifik olduklarından benzer işlerde kullanılamazlar.

Bu problemler, moleküler biyolojinin 1980'li yılların başında hızlı bir şekilde gelişmeye başlamasıyla çözülme aşamasına girmiştir. Ökaryot genlerinin klonlanması ve mikroorganizmalar içinde çalıştırılması ile endüstriyel önemi olan proteinlerin yeniden biçimlenip tüketicinin kullanımına sunulması mümkün olmuştur.

Protein mühendisliği ile bitkilerde bulunan enzim özelliğindeki proteinler fonksiyonları açısından geliştirilebilirler. Besin niteliğindeki proteinlerin besin kalitesi düzeltilebilir. Biyokimyasal olaylarda sınırlayıcı konumda olan proteinlerin üretim miktarları artırılabilir. Yine, üretim miktarları azaltılması istenen proteinlerin

üretimi azaltılır veya biyokimyasal sentez kademelerinde bazı yollar engellenerek veya teşvik edilerek sentezin istenen maddelere kayması sağlanır. Ayrıca, kendilerinde daha önce hiç bulunmayan proteinlerin aktarılması ile bitkiler biyolojik fabrikalar olarak kullanılabilirler.

Protein mühendisliği dört temel yaklaşımla gerçekleştirilebilir:

- a) Proteinlerin üretim miktarlarının değiştirilmesi,
- b) Protein yapısında makro değişiklikler yapılması,
- c) Protein yapısında rasgele küçük değişiklikler yapılması ve
- d) Protein yapısında bilinçli küçük değişiklikler yapılması.

Protein değişikliğinin doğrudan çalışılan organizmada rasgele mutasyon ile yapıldığı yaklaşım dışındaki yaklaşımların tümü proteini kodlayan genin izole edilmesini ve bir vektör mikroorganizmaya (çoğunlukla bakteri) aktarılmasını gerektirir. Vektör mikroorganizmada bu genin ifade edilebilmesi ve hatta fonksiyon meydana getirmesi çok önemli bir avantajdır. Bu şekilde; mühendisliğin başarısı, çalışılması daha kolay olan mikroorganizma sistemlerinde incelenebilir.

24.8.1. Proteinlerin üretim miktarlarının değiştirilmesi

Doğrudan bir proteinin yapısının değiştirilmesi şeklinde olmasa da bitkilerde proteinlerin üretilme miktarları ile ilgili değişiklikler de protein mühendisliği kavramı içinde incelenebilir. Bu yolla bitkilerde var olan proteinlerin üretim miktarları artırılabilir, azaltılabilir veya bitkilerde normalde hiç bulunmayan bazı proteinlerin üretilmesi sağlanabilir. Tarımsal açıdan istenmeyen proteinlerin sentezi *antisens* tekniği ile azaltılabilir. Örneğin, domatestede olgunluğu hızlandıran poligalakturonaz enzimini kodlayan gen antisens yönünde klonlanıp bitkiye geri kazandırıldığında normal genin ürettiği mRNA ters olarak yerleştirilen genin ürettiği mRNA tarafından bloke edilir ve sonuçta enzimin üretiminin azaltılması yoluyla olgunlaşma yavaşlatılır (Sheehy *ve ark.*, 1988; Smith *ve ark.*, 1988) (bkz. Bölüm 25). Domatesler tarlada daha uzun süre kalabilir ve satış bölgesine daha kolay taşınır. Domatestede olgunlaşmayı hızlandıran bir başka unsur olan etilen hormonunun biyosentezinde rol alan iki anahtar enzim üretiminin *antisens* RNA tekniği ile engellenmesi yoluyla domatesin raf ömrü uzatılmıştır (Hamilton *ve ark.*, 1991; Oeller *ve ark.*, 1991). Yine, domatesin olgunlaşmasının geciktirilmesi amacını taşıyan bir başka yaklaşımda etilen hormonu sentezinde bir ara kademe ürününü parçalayan bir enzim kodlayan bir bakteriyel gen domatese aktarılmıştır (Klee *ve ark.*, 1991).

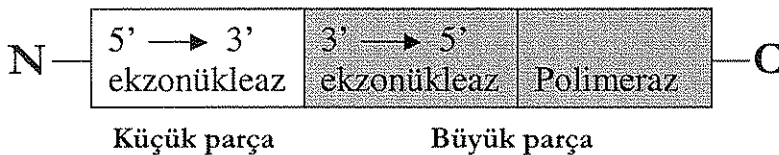
Biyosentez kademelerinde işlev gören enzimlerin üretim miktarları değiştirilerek daha değerli ürünlerin üretimi teşvik edilebilir. Antisens tekniği ile sentezleri birbirile ilişkili olan bitkisel maddelerin üretim miktarları da değiştirilebilir. Örneğin, stearil-ACP'yi oleoil-ACP'ye dönüştüren $\Delta 9$ stearil ACP desaturaz

enzimini kodlayan gen antisens orijinli olarak kolza bitkisine kazandırıldığında üretilen enzim miktarı azalır (Knutzon *ve ark.*, 1992). Sonuçta kolza tohumlarında oleik asit yerine daha değerli bir ürün olan stearik asit içeriği artırılır. Başka bir yaklaşımda bu kez bir biyosentez yolunu teşvik şeklinde yine kolza bitkisinde deterjan yapımında çok kullanışlı olan 12 karbonlu yağ asitleri üretimi teşvik edilmiştir. Yağ asidi sentezi işlemi esnasında yağ asidini taşıyıcı proteinden ayıran thioesteraz enzimi her yağ asidi için farklıdır. Normalde çok aktif C18 thioesteraz enzimi bulunan kolzaya Kaliforniya defne ağacı bitkisinin C12 thioesteraz geni kazandırıldığında kolza yağ asidinin %25'i C12 yağ asidi olarak gerçekleşmiştir.

Son olarak, daha önce hiç bulunmayan genler aktarıldığında bitkilere çok kullanışlı yeni agronomik özellikler kazandırılabilir. Son zamanlarda önem kazanan bir yaklaşımda normalde bitkinin kendisiyle veya performansı ile hiç ilgisi olmayan bir takım proteinlerin bitkide üretiminin sağlanmasıyla bitkiler bir biyolojik fabrikaya dönüştürülmektedir. Bu şekilde bitkilerde aşılarda yanında tıbbi veya endüstriyel kullanımı olan diğer maddeler de üretilebilecektir. Hayvansal kaynaklı olan interferon, insan serum albümini ve bazı antikorların bitkilerde üretimi söz konusudur.

24.8.2. Protein yapısında makro değişikliklerin yapılması

Protein mühendisliği çalışmalarında çoğu kez bir veya birkaç amino asit değiştirilmektedir. Ancak, bazen bir genin bir kısmının kesilip uzaklaştırıldığı, büyükçe bir gen parçasının eklendiği veya başka bir organizmadan söz konusu gene çok benzeyen bir genin organizmaya entegre edildiği durumlar da olabilir. Örneğin, iki farklı domainden oluşan DNA polimeraz I enzimini üreten genin iki domaini kesilerek ayrıldığında birinci domainin meydana getirdiği enzim sadece DNA kesme yeteneğinde iken Klenow parçası adı verilen ikinci kısım hem DNA kesme ve hem de uzatma yeteneğindedir (Şekil 24.17). Klenow parçası moleküler DNA çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Proteinlerin fonksiyon açısından gerekli olmayan kısımları bu şekilde tespit edilip yok edildiğinde, söz konusu proteinin moleküler ağırlığında büyük düşüşler olacağından bu teknik proteinlerin endüstride kullanım şansını artıracaktır.



Şekil 24.17. DNA polimeraz enziminin kesilmesiyle yalnızca 3'-5' ekzonükleaz ve polimeraz özelliklerini taşıyan Klenow parçası elde edilir (Stryer, 1988'den).

Bazı proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştırmak veya mikroorganizmalardaki üretimini stabil hale getirmek için belli uzunlukta peptidler kodlayan DNA dizileri eklenerek de değişiklikler yapılmaktadır. Örneğin, His-X-X-X-His şeklinde bir amino asit dizisinin bulunması (burada X herhangi bir amino asidi ifade etmektedir) proteinlerin metallere afinitesini artırır ve proteinler bu yolla saflaştırılabilirler. Benzer şekilde çoklu arginin amino asit dizisi eklenmiş proteinler iyon alış-veriş kromatografisi ile diğer proteinlerden kolayca ayrılırlar. En ilginç büyük değişiklik tipi, bir genin kısmen veya tamamen bir başka gene veya gen parçasına eklenmesidir. Farklı proteinlerin istenen kısımları bir araya getirilerek fonksiyonları geliştirilmiş olan füzyon proteinleri oluşturulur. Suni antikör üretimlerinde bu teknik fazlaca kullanılmaktadır.

Proteinlerin hücrede bulunacakları yerler onların taşıdığı belli uzunlukta polipeptidlerce belirlenir. Bu amaçla proteinleri hücrede belli kısımlara göndermek için ilgili proteini kodlayan gene istenen polipeptidi ekleyecek şekilde DNA entegre edilir. Bu polipeptidler ilgili proteinin belli hücre kısımlarına ulaştırılmasını sağlar. Örneğin, hücre zarında bulunması gereken proteinler 7-13 hidrofobik amino asitlik bir merkez taşıyan 13-36 amino asitlik bir sinyal peptid taşımaktadır. Endoplazmik retikulumda bulunan memeli proteinleri C uçlarında Lys-Asp-Glu-Leu şeklindeki dördü bir polipeptid taşımaktadır. Belli hücresel kısımlara gönderilmeleri planlanan proteinlerin mühendisliğinde ilgili organelle yönlendirmeyi sağlayan peptidleri kodlayan bir DNA parçası ilgili gene bir bütün olarak entegre edilmelidir.

Bir organizmada bulunan bir proteine başka bir organizmadan aynı proteinin daha iyi özellikte olduğu düşünülen bir başka formunun kazandırılması da protein makro değişikliği adı altında incelenebilir. Patateste nişasta sentezinin ilk aşaması ADP glukoz pirofosforilaz (AGPaz) enzimince gerçekleştirilmektedir. Nişasta sentezinin hızı bu enzimin miktarıyla değil fakat allosterik kontrolüyle (proteinin bir kısmına bir madde bağlanmasıyla diğer kısmının aktivitesinin değişimi) belirlenmektedir. Aynı enzimin *E. Coli*'de bulunan ve allosterik kontrol özelliğini kaybetmiş bir mutant formu nişastanın depolandığı yer olan plastidlerde bulunacak şekilde patatese aktarıldığında enzimin katalize ettiği reaksiyon hızı sınırlanmamakta ve sonuçta patates yumrularında normalden %35 daha fazla nişasta birikmektedir (Stark ve ark., 1992). Bu işlemin iki faydası vardır:

- 1) Daha fazla nişasta; cips veya kızartmalarda patatesin daha az yağ emmesine neden olmaktadır,
- 2) AGPaz enzimi nişastanın şekerlere parçalanması şeklinde ters yönde de işlev gördüğünden allosterik kontrol özelliğini kaybetmiş AGPaz uzun süreli depolamalarda nişastanın şekere dönüşmesini sınırlayacak ve böylece depolarda patatesin sürmesini bastıran kimyasalların kullanımı gerekmeyecektir.

24.8.3. Protein yapısında rasgele küçük değişikliklerin yapılması

Aslında uzun süredir mutasyon çalışmaları ile protein mühendisliği yapılmaktaydı. Çok sayıda mutant birey arasında istenen bir karakter bakımından gelişmiş özelliğe sahip fertler seçildiğinde aslında ilgili proteinin değiştirilmesi yani mühendisliği söz konusuydu. Rasgele mutasyon tekniği günümüzde klonlanan genlerin nükleik asit dizilişinde gelişigüzel değişiklikler yapmak şeklinde kullanılmaktadır. Gen üzerinde yapılan seri rasgele değişiklikler ile yapı-fonksiyon ilişkisinin çalışılması mümkündür. Ayrıca, çeşitli nedenlerden dolayı protein yapısı hakkında bilgi edinme imkanı olmayan veya protein fonksiyonunun modelleme ile çalışamadığı durumlarda rasgele dizayn yöntemi ile mühendislik yapılabilir. Bu teknik mutantlar için iyi bir seleksiyon sistemi bulunduğunda başarı şansına sahiptir. Tekniğin en büyük dezavantajı değişiklikler şansa bağlı olduğu için çok fazla sayıda mutant ile çalışılması gereğidir. Çoğu kere kontrolsüz olarak birden fazla noktada mutasyon meydana getirilebilmekte olup, başarı da kesin değildir.

Rasgele dizayn yönteminde mutasyonlar *in vivo* veya *in vitro* olarak yapılabilir. *In vivo* mutasyonlar klasik mutasyon çalışmalarında olduğu gibi doğrudan bitki üzerinde gerçekleştirilebilir. *In vitro* mutasyonlarda doğrudan bitki değil ilgili genin klonlandığı vektör organizma olan bakteri mutasyona tabi tutulur. Bu işlem mutasyonun başarı oranını oldukça yükseltir. Green ve ark. (1998) bitkilerde nişasta sentezinde önemli bir rol oynayan ADP-glukoz pirofosforilaz enzimini bu yolla incelemişlerdir. İlgili genin üzerinde bulunduğu plazmidi taşıyan bakteri bir mutajen olan hidroksilamin HCl içinde büyütülmüş ve daha sonra mutantlar izole edilmiştir. Araştırmacılar farklı mutantları inceleyerek enzim fonksiyonunda önemli olan amino asitleri belirlemişlerdir. Bu uygulama için ön şart söz konusu proteinin vektör sistemde bir işlev meydana getirmesidir.

In vitro mutasyon daha kolay bir şekilde klonlanan gen üzerinde PCR tekniği ile gerçekleştirilir. Bu tekniğin esası ideal (spesifik) olmayan PCR şartlarında DNA üretiminin yapılması durumunda kalıp olarak kullanılan DNA'nın aynen kopyalanmamasıdır. Bu amaçla üretilen DNA'yı okuyup düzeltme özelliği bulunmayan polimeraz enzimi kullanılır. Polimeraz reaksiyonu esnasında normal olmayan iyon şartları ve nükleotidlerin oransız kullanımı (A, T, C veya G'den birinin diğerlerine nazaran çok düşük konsantrasyonda olması) yanlış kopyalamaya yol açtıklarından mutasyon meydana getirirler.

PCR tekniği kullanımının mutajen kullanımına nazaran bazı üstünlükleri vardır. Öncelikle etkinliği daha yüksektir ve bu nedenle daha az sayıda mutant ile çalışmak yeterli olabilir. Ayrıca, klasik mutajenlerin büyük çoğunluğu nükleik asit dizilişinde ancak belli değişiklikleri yapabilmektedir. Oysa, PCR tekniğinin kullanılması ile bazılar arasında her türlü değişiklikler yapmak mümkündür.

PCR tekniğinin diğer bir avantajı da kısmen bilinçli bir protein mühendisliğinin yapılabilmesidir. İlgili proteinin yapısal ve fonksiyonel modellemesi tam olarak yapılamamış olsa da proteinin farklı organizmalardaki formlarına ait amino asit

dizileri bilindiğinde (Şekil 24.14 ve Tablo 24.2’de gösterildiği gibi) farklı formlarda benzerlik gösteren amino asitler muhtemelen fonksiyonla ilgili olduğundan bu amino asitlere karşılık gelen nükleik asit parçasında PCR ile mutasyonlar meydana getirilir ve başarı şansı artırılır.

Aranılan özellikte proteini taşıyan mutantların bulunması rasgele geliştirme tekniğinin en kritik safhasıdır. Eğer proteinin etkisi gözle görünebiliyorsa bu işlem çok kolaydır. Enzim özelliğindeki proteinlerde mühendisliğin başarısı yaygın olarak değiştirilen proteinin reaksiyondaki başarısının normal proteinle karşılaştırılması ile bulunur. Hormon niteliğindeki proteinlerde ise bu daha da güçtür ve değiştirilmiş proteinle normal proteinin hormonsal etkilerinin karşılaştırılması uzun zaman alabilir.

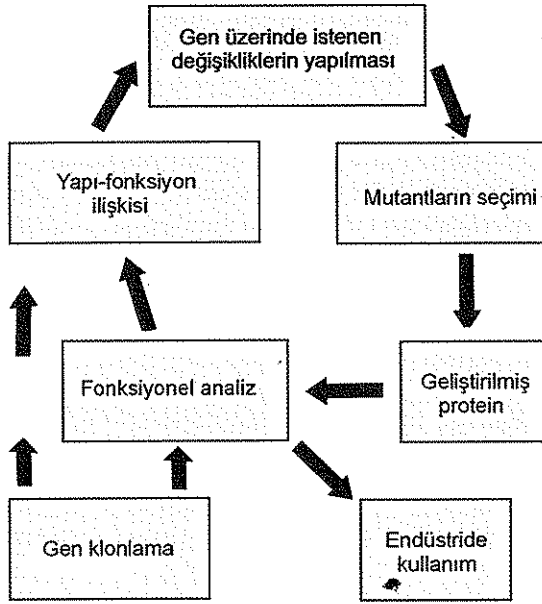
24.8.4. Protein yapısında bilinçli küçük değişikliklerin yapılması

Rasgele değişiklik tekniğinde istenen değişikliklerin elde edilme olasılığı oldukça düşük ve şansa bağlıdır. Proteinde istenen gelişmeyi sağlayacak amino asit değişikliklerini elde etmenin en kolay yollarından biri yapı-işlev ilişkisinin kurulması sonrasında değişiklikleri yapmak anlamına gelen bilinçli dizayn tekniği ile gerçekleştirilir (Şekil 24.18). Proteinlerin üç boyutlu yapısı ya doğrudan x-ray kristalografisi veya NMR teknikleri ile ya da proteinin amino asit dizilişinden üç boyutlu yapılarının bilgisayarla moleküler modellemesi yoluyla belirlenir. Yapı fonksiyon ilişkisinin belirlenmesinden sonra gen üzerinde istenen değişiklikler yapılır. Elde edilen mutantların seçimi ve karakterizasyonu ile geliştirilmiş protein elde edilir ve kullanıma sunulur. Geliştirilmiş protein, ilave değişiklikler için yeniden bu döngüye sokulabilir.

Bilinçli değişiklikler yapma tekniği dört safhadan oluşmaktadır. Bunlar, aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

24.8.4.1. Proteini kodlayan genin izolasyonu, klonlanması ve ifadesi

Gen izolasyonu ve klonlanması bu kitabın 14. bölümünde anlatılmıştır. Çalışılan proteini kodlayan genin klonlanması rasgele mühendisliğin çoğu uygulamalarında da gereklidir. Genin bir taşıyıcı organizmada ifade edilebilmesi her zaman mümkün olmayabilir ve işlem zorlaşabilir. Gerekli mutant proteinin ifade edilememesindeki önemli nedenlerden biri mutant proteinin vektör organizmada uygun bir biçimde katlanamamasıdır. Diğer bir neden ise ilgilenilen proteinin vektör organizma için yabancı bir protein niteliğinde olması nedeniyle vektör organizmadaki proteaz enzimleri tarafından parçalanmasıdır. Son bir neden de ilgili proteinin ifadesi çok yüksek seviyede olduğunda aktivite kaybıdır.



Şekil 24.18. Bilinçli protein mühendisliği şeması.

24.8.4.2. Yapı-işlev ilişkisinin kurulması

Bu amaçla ilk yapılması gereken şey söz konusu proteinin üç boyutlu yapısının belirlenmesidir. Yapı-işlev ilişkisi, daha önce tartışıldığı üzere, ya x-ray kristallografisi veya NMR teknikleriyle doğrudan, ya da amino asit dizilişini kullanarak ikincil yapı üzerinden üç boyutlu yapının bilgisayar modellemesi yoluyla dolaylı olarak yapılır. Üç boyutlu yapının belirlenmesinden sonra yine bilgisayar kullanımıyla ve daha önce benzer proteinlerden elde edilen veriler yardımıyla proteinin fonksiyonunda kritik olan amino asitler bulunur. Ayrıca, yapılacak değişikliğin teorik olarak ne tip bir etki meydana getireceği de bilgisayar modellemesi ile test edildikten sonra mühendisliğin diğer aşamalarına geçilir.

24.8.4.3. İstenen değişikliklerin gerçekleştirilmesi

Vektörler içine klonlanan genin nükleik asit dizilişi üzerinde istenen amino asitlere karşılık gelen bazlar belirlenmiş nokta mutasyonu adı verilen teknikle değiştirilir. Bu teknik 1970'lerin sonunda M. Smith tarafından bulunmuş ve kendisine 1993 yılında Nobel Ödülü kazandırmıştır. Bu teknığe göre istenen değişiklikler sentetik bir DNA üzerinde yapılır ve daha sonra bu sentetik DNA genin üzerinde istenen kısımla değiştirilir. Daha sonra değiştirilmiş olan bu DNA'dan protein

üretilmektedir. Tarihsel gelişim içinde istenen değişikliği daha kolay elde etmek için belirlenmiş nokta mutasyonunun farklı versiyonları geliştirilmiştir. Bunlar:

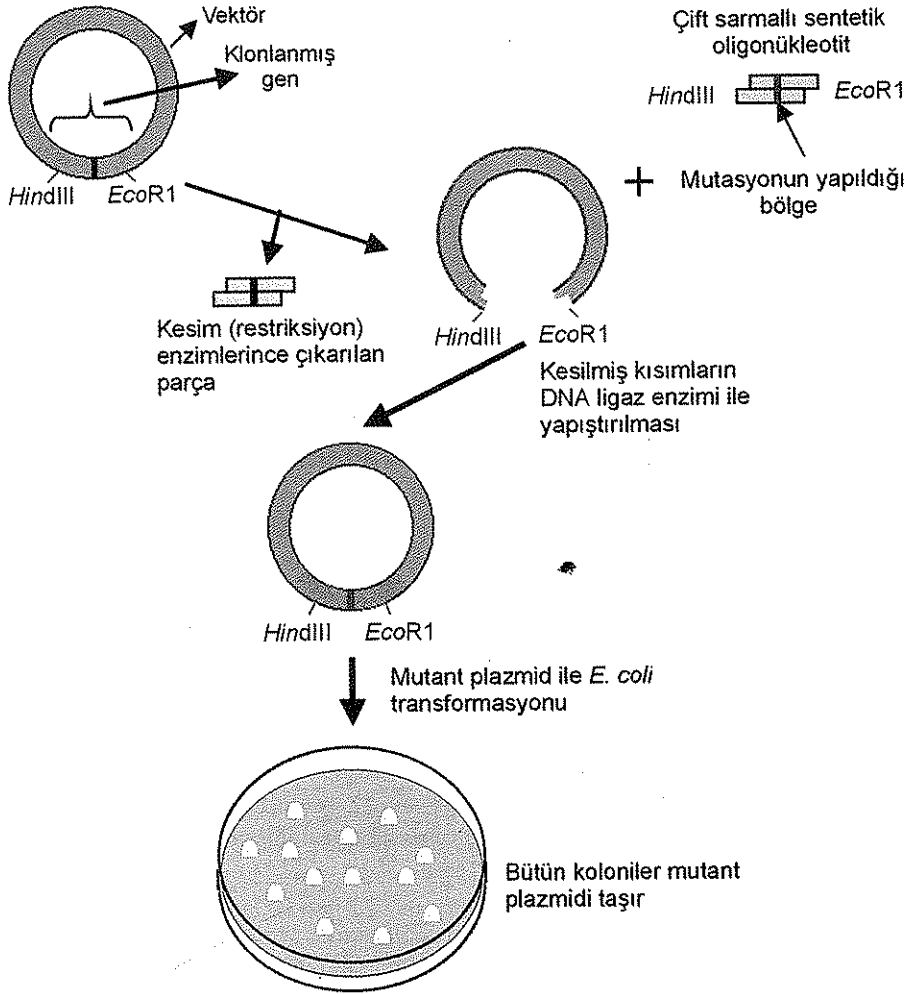
a) Kaset mutagenesis

Gen üzerinde değişiklik yapılması istenen bölge DNA kesim enzimleriyle kesilerek çıkarılır. Kesilen yere istenen mutant baz sırasını taşıyan sentetik DNA yerleştirilir (Şekil 24.19). Bu metot ilk defa subtilisin enziminin mühendisliğinde Wells *ve ark.* (1985) tarafından kullanılmıştır. Bir proteaz olan bu enzim çamaşır deterjanlarında kirleri parçalayıcı olarak kullanılmaktadır. Ne var ki, bu enzim çamaşır suyu ile yan yana geldiğinde aktivitesinin büyük kısmını kaybetmektedir. Biyokimyasal analizler enzimin aktivitesini 222 numaralı pozisyonadaki metionin amino asidinin oksitlenmesi nedeniyle kaybettiğini ortaya koymuştur. Bilim adamları bu pozisyonadaki amino asidi değiştirerek çamaşır suyuna dayanıklı enzim yapabileceklerini anlamışlardır. Subtilisin enziminin kodlayan gende 222 numaralı pozisyonu iki tarafından kesim enzimleri ile kesip çıkarılmış, yerine 222 numaralı amino asitte mutasyon taşıyan, uçları aynı enzimlerin tanıdığı dizilerine sahip olan sentetik oligonükleotidler konulmuştur. Bu işlemi 222 nolu pozisyonunda doğal olarak bulunan metionin amino asidi haricindeki 19 amino asit için de yapmışlardır. Sonuçta, 222 nolu pozisyona sistein konulduğunda enzimin normalden daha da aktif olduğu ancak çamaşır suyuna hala hassas olduğu anlaşılmıştır. Bu pozisyona alanin amino asiti konduğu durumda ise enzim doğal formunun ancak %53 aktivitesine sahip olmuş, fakat çamaşır suyundan etkilenmemiştir. Bu değiştirilmiş enzim bugün için deterjanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kaset mutagenesis metodunun en büyük dezavantajlarından biri mutasyon yapılması istenen bölgeyi keserek çıkaracak, ancak genin diğer kısımlarında kesim yapmayacak enzimlere ait kesim bölgeleri olması zorunluluğudur.

b) Primer uzatılması (tek primer metodu)

En kolay belirlenmiş nokta mutasyonu elde etme yoludur. İstenen bölgede değişikliği taşıyan 7-20 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotid dizisi çift sarmal halinde değil fakat M13 vektörü içine tek ip halinde klonlanmış geni taşıyan plazmid DNA ile bir araya getirilir (Traboni *ve ark.*, 1983). DNA polimeraz, dNTP ve ligaz enziminin bulunduğu şartlarda bütün plazmid DNA kopyalanır ve çift sarmallı heterodupleks bir DNA elde edilir (Şekil 24.20). Bu DNA'nın bir ipliği mutant geni, diğeri doğal geni taşımaktadır. Bu haldeki plazmid, *E. coli*'ye transfer edildiğinde teorikte her iki ipin de çoğaltılıp hem doğal ve hem de mutant geni taşıyan farklı plazmidler halinde açılım göstermesi gerekirdi. Ancak, pratikte *E. coli* hücresinde DNA düzeltme mekanizması sayesinde DNA çoğaltımı esnasında iki tipten biri düzeltilir. Mutant geni taşıyan klonlar ³²P ile işaretlenmiş oligonükleotid kullanılarak seçilir.

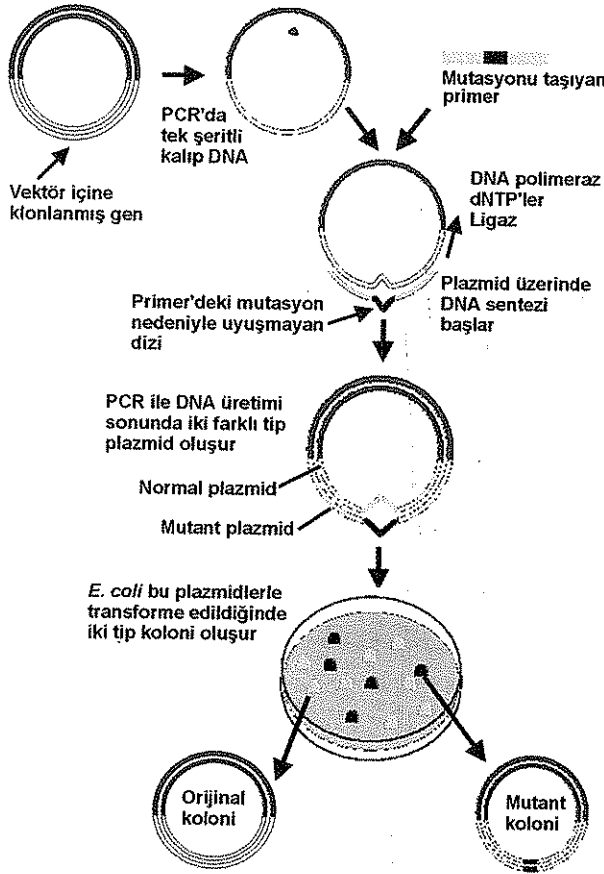


Şekil 24.19. Kaset mutagenesis ile belirlenmiş nokta mutasyonu yapılması (Watson ve ark., 1992'den değiştirilerek).

c) PCR tekniği ile belirlenmiş nokta mutasyonu yapılması

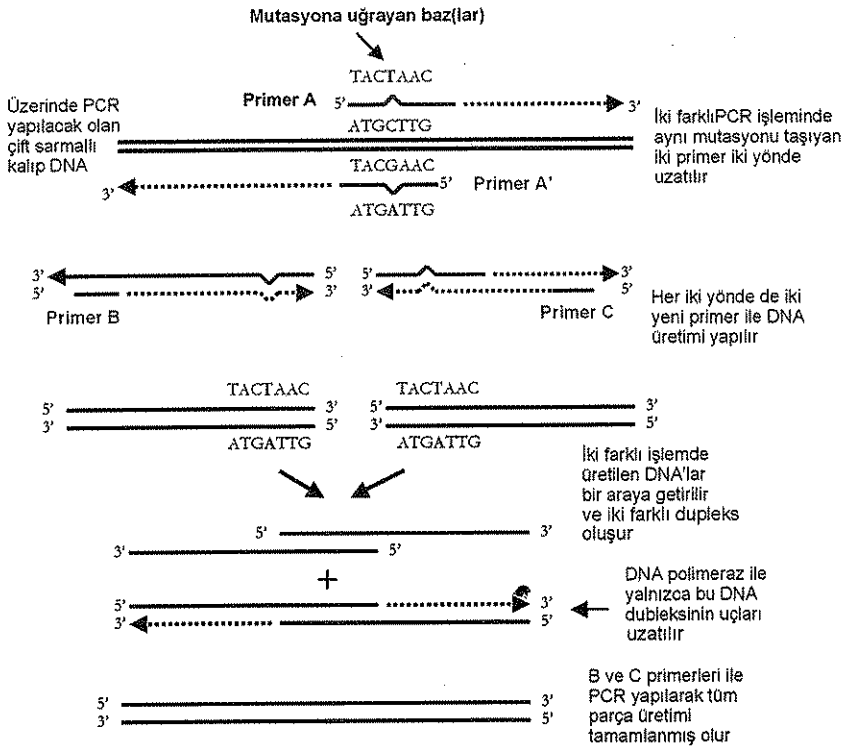
Mutasyona uğratılmak istenen amino asitlere karşılık gelen baz sırasından iki yönde DNA üretimi yapacak şekilde aynı mutasyon özelliğini taşıyan ve birbirine tamamlayıcı olan iki primer (A ve A') geliştirilir (Higuchi ve ark., 1988). Bu primerler ve ayrı iki primer (B ve C) daha kullanılarak her iki yönde DNA üretimi yapılır (Şekil 24.21). Daha sonra çoğaltılan bu iki DNA bir araya getirildiğinde birbirine tamamlayıcı özellikte olan ve mutasyonu taşıyan primer dizileri birbirine

yapışıklar. Dupleks yapının eksik olan kısımları PCR ile tamamlanır. B ve C primerleri kullanılarak üretim tamamlanır. Bu metot dört primerin kullanıldığı üç PCR işlemi gerektirmektedir.



Şekil 24.20. Primer uzatılması (tek primer) metodu ile belirlenmiş nokta mutasyonu (Watson ve ark., 1992'den değiştirilerek)

Günümüzde yaygın olarak kullanılan bu teknik kaset mutagenesis ve primer uzatılması ile karşılaştırıldığında oldukça kısa sürede gerçekleştirilir, ucuzdur ve %100 başarı ile mutasyonlar meydana getirebilmektedir. En önemli dezavantajları arasında üretilen parçanın daha sonra bir vektöre ligasyon ile entegre edilmesi ve DNA üretiminde kullanılan *Taq* polimeraz'ın belli ölçüdeki hata oranı nedeniyle genin mutasyona uğratılacağı kısmı dışındaki yerlerinde de mutasyon meydana getirebileceği için mutantların dikkatli bir şekilde analiz edilmesinin gerekmesidir.



Şekil 24.21. PCR yöntemi ile belirlenmiş nokta mutasyonu yapılması (Old ve Primrose, 1994'ten değiştirilerek)

24.8.4.4. Mutantların incelenmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

Elde edilen mutantların öncelikle doğru dizilişleri taşıyıp taşımadıkları mutant genlerin dikkatli bir şekilde nükleik asit dizi analizlerinin yapılması ile belirlenir. Uygun diziyi taşıyanların fonksiyonlarında beklenen gelişme olduğunun gözlenmesi için diğer testlere geçilir. Gerekirse yeniden üç boyutlu protein analizleri yapılır.

Son aşamada mutant protein vektör organizmada ekspres edilir ve saflaştırılır. Mutant ve normal proteinler ilgilenilen reaksiyonlar bakımından karşılaştırılır. Eğer ilgili protein ancak orijinal organizmada ekspres oluyorsa mutant gen orijinal organizmaya transformasyon yoluyla aktarılır ve fonksiyon testlerine devam edilir.

24.9. Sonuç

Daha 1940'larda, şekilsiz ve kolloidal madde olarak tanımlanan proteinleri bugün biçimlendirip şekillendirebiliyoruz. Hatta bugünkü teknoloji, teorik proteinler yapma kapasitesine de ulaşmıştır. Ne var ki, şu andaki kapasitemiz ve ufkumuz

bugüne kadar çözebilmiş olduğumuz proteinlerin davranışları ile sınırlıdır. Pek çok proteinin yapısını ve davranışını ise hala anlayabilmiş değiliz. Örneğin, proteinlere dayanıklılık özelliğini kazandıran mekanizmayı hala tam olarak bilmiyoruz. Her ne kadar geliştirilmiş bilgisayar modelleme programları ile amino asit dizilişinden ve hatta nükleik asit dizilişinden proteinlerin üç boyutlu yapısını ve fonksiyonel niteliklerini tanımlayabilirsek de bu teknik henüz her türlü protein için aynı sonucu vermemektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi ve protein analiz metotları yan yana gelişmektedir. Çoğu kez protein analiz metotları sonucunda elde edilen veriler rekombinant DNA teknolojisine uygulanarak protein mühendisliği gerçekleştirilmektedir. Ancak, bazen önce DNA düzeyinde değişiklik yapıp sonra bunun protein üzerine etkisini incelemek yoluyla protein analizine katkıda bulunmaktadır. Yine de, metot ne olursa olsun, sonuçta ihtiyacımız olan proteinleri doğada var oldukları durumdan çıkarıp, kendi menfaatimize daha uygun hale getirip hayatımızı kolaylaştırma yolunda adımlar atıyoruz. Bu gerçek, biyoteknoloji bilimini yeni bin yılın en önemli bilim alanlarından biri yapmaya ve dünya gıda probleminin çözümü için en büyük umut yapmaya yetmektedir.

Kaynaklar

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Third Edition. Garland Publishing Inc., New York.

Branden C, Tooze J (1991) *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing Inc., New York.

Campbell NA (1990) *Biology*, Second Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., New York.

Crowther JR (1998) Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA. In: Rapley CR, Walkers JM (eds), *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, New York.

Green TW, Kavakli İH, Kahn M, Okita TW (1998) Generation of up-regulated allosteric variants of potato ADP-glucose pyrophosphorylase by reversion genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:10322-10327.

Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7434-7437.

Higuchi R, Krummel B, Saiki S (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acid Res.*, 16: 7351-7367.

Javois LC (1998) Immunocytochemistry. In: Rapley CR, Walkers JM (eds), *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, New York.

Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell*, 3: 1187-1193.

Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Johnson WB, Knauf VC, Kridl JC (1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89: 2624-2628.

Oeller PW, Miw-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) Reverse inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 254: 437-439.

Old RW, Primrose SB (1994) Principles of Gene Manipulation. An Introduction to Genetic Engineering. Blackwell Science.

Richards P (1998) Protein Electrophoresis. In: Rapley CR, Walkers JM (eds), *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, New York.

Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR (1988) Reduction of polygalacturonase in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 8805-8809.

Smith C, Watson C, Ray J, Bird C, Morris P, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334: 724-726.

Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM (1992) Regulation of the amount of the starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science*, 258: 287-292.

Stryer L (1988) *Biochemistry*, Third Edition. WH Freeman and Company, New York.

Traboni C, Cortese R, Ciliberti G, Cesarini G (1983) A general method to select M13 clones carrying base pair substitution mutants constructed *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 9: 3647-3656.

Voet D, Voet JG (1995) *Biochemistry*, Second Edition. John Wiley and Sons Inc., New York.

Wells JA, Vasser M, Powers DB (1985) Casette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at definite sites. *Gene*, 34: 315-323.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) *Recombinant DNA*, Second Edition. WH.Freeman and Company, New York.

Wetzel R, Perry LJ, Baase WA, Becktel WJ (1988) Disulphide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 401-405.

Bölüm 25

Antisens RNA Teknolojisi

Kenan Turgut¹, Serkan Uranbey², Sebahattin Özcan²

¹Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 07058 Antalya

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı, Ankara
e-posta: kenan@agric.akdeniz.edu.tr¹

25.1. Giriş

Günümüzde, bitki doku kültürleri ve gen aktarım tekniklerindeki hızlı gelişmeler neticesinde kültür bitkilerinin önemli bir kısmına gen aktarmak mümkün olmaktadır. Ayrıca, ileri bitki genetik mühendisliği tekniklerinin kullanılmasıyla da tarımsal öneme sahip birçok gen değişik organizmalardan izole edilerek kültür çeşitlerine aktarılabilir. Genetik mühendisliğindeki başlangıç çalışmaları daha çok böceklerle, virüslere ve herbisitlere karşı dayanıklı çeşitleri üretilmesi yönünde olmuştur. Son yıllarda bitki gelişme aşamalarının değiştirilmesi yönünde de önemli çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde artık bitki genetik mühendisliği çalışmalarının sonuçları uygulama aşamasına geçmeye başlamış, özellikle son 15 yıldan beri bitki ıslahında uygulanmakta olan biyoteknolojik yöntemler hem zaman hemde kesinlik açısından çok iyi sonuçlar vermeye başlamıştır. Bitkilere gen aktarımının başarılması ile tarımsal biyoteknoloji açısından büyük ufuklar açılmıştır. Halen sınırlı sayıda bitkide uygulamaya yönelik sonuçların alındığı bu çalışmaların, rekombinant DNA teknolojisinin hızla ilerleme göstermesi nedeniyle, kısa sürede yaygın olarak tüm bitkilerde kullanılabilir duruma geleceği konusunda bilim adamları görüş birliğindedir.

Son yıllarda üzerinde durulan önemli tekniklerden biri olarak “antisens RNA teknolojisi” ise bitki genetik mühendisliğinin en yeni ve ileri tekniklerinden birisidir. Bu teknoloji sayesinde, belirli protein veya enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin etkileri kolayca ortadan kaldırılabilmektedir.

Genetik mühendisliği çalışmalarında, bir genin fonksiyonunun belirlenmesi iki farklı yöntem ile sağlanabilmektedir. Bunlardan klasik olan “forward genetics” (ileri genetik)’de önce bitkide mutasyon meydana getirilir ve daha sonra mutant gen klonlanmaya çalışılır. Bu teknik oldukça uzun zaman alarak yoğun bir çalışmayı gerektirmektedir. Bu şekilde çalışmanın en önemli avantajı ise, gen klonlamasına başlamadan önce ilgili mutantın belirlenebilmesidir. Diğer taraftan “reverse genetics” (ters genetik) klasik genetiğin tersine, önce klonlanmış gen ile başlar ve daha sonra bu genin bitkideki gerçek rolünü araştırır. Bu teknikte, genetik transformasyon yoluyla bitkide mevcut olan genetik fonksiyonlar engellenir. Ters genetik yaklaşımının en önemli avantajı, yararlı bir mutasyon elde edildiği zaman bu mutasyona neden olan genin elde mevcut olmasıdır. Yani, ayrıca gen klonlama işlemlerine gerek yoktur.

Antisens teknolojisi mutasyon oluşturmada önemli bir alternatif haline gelmiştir. T-DNA yerleşimi ve homolog rekombinasyon ile bazı hedef genlerin bozulmasıyla mutant bitkiler elde edilebilmektedir. Antisens teknolojisi ve mutasyon ıslahı ile mutasyon elde edilmesi Tablo 25.1’de karşılaştırılmıştır.

Tablo 25. 1. Antisens yaklaşım ile diğer mutasyon elde etme yöntemlerinin karşılaştırılması (Anja ve ark., 1997).

Antisens yaklaşım	Mutasyon
- Gen spesifik bir yöntemdir.	- İndirekt bir yöntemdir.
- Hedef gen ifadesi üzerinde değişken etki sözkonusudur.	- Gen ifadesi tam olarak bloke edilir.
- Ploidi seviyesinden bağımsızdır.	- Ploidi seviyesi etkilidir.
- Gen ailelerinin inaktivasyonu sözkonusudur.	- Gen aileleri için uygulanabilir değildir.
- DNA dizinine ihtiyaç duyulur.	- DNA dizinine ihtiyaç duyulmaz.
- Rejenerasyon ve transformasyon sistemlerine ihtiyaç vardır.	- Doku kültürü yöntemleri gerekli değildir.
- Toplum tarafından kabulü henüz bilinmemektedir.	- Toplum tarafından kabul görmüştür.

Antisens genlerinin kararlı olarak bitki genomuna aktarılması, gen aktarım sistemine bağlıdır. Genel olarak antisens genlerin bitki genomuna aktarılmasında, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi kullanılmaktadır. İlk olarak elektroporasyon yoluyla antisens kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) geni ve granül bağlayıcı nişasta sentez (GBSS) genleri çeltik protoplastlarına aktarılmıştır (Ecker ve Davis, 1986).

25.2. Antisens RNA Teknolojisinin Tanımı ve Temeli

Antisens RNA teknolojisinin uygulamasında, gen-protein-enzim ilişkilerinin çok iyi bilinmesi ve gen aktarım tekniklerinin kullanılması gereklidir. Bilindiği gibi, hücre yönetimi, hücrede meydana gelen kimyasal olaylara yön vermekle olur. Birçok kimyasal olayın yön ve hızı proteinlerin, özellikle enzimlerin etkisi altındadır. Buna göre, protein sentezini yöneten ve yapılacak enzimlerin gerek tipini ve gerekse miktarını kontrol altında tutan bir mekanizmanın hücre içerisindeki tüm yapılara ve fonksiyonlara hükmetmesi gerekir. Hücre içi temel direktiflerin çekirdekteki DNA'da şifrelendiği, her canlıda kendine özgü olan DNA'nın hücre organellerinin nasıl davranacaklarını bildirdiği ve bir canlıya ait tüm bilgilerin DNA moleküllerinin helezonları üzerinde kayıtlı olduğu çok iyi bilinmektedir. Çekirdekte yer alan DNA hücresel olaylara doğrudan katılmamakta, biyokimyasal olaylar sitoplazmada meydana gelmektedir. Bu nedenle, DNA'daki emirleri sitoplazmaya aktaracak aracı moleküllere ihtiyaç vardır. Bu aracı moleküller mRNA molekülleri olup, hücre mRNA ile sitoplazmaya taşınan emirlere uygun olarak istenilen cins ve miktarda proteinleri sentezler. Sentezlenen proteinler hücrede yapı maddesi, enzim, hormon ve antikor olarak hücrenin tüm fonksiyonlarını bir hiyerarşi (düzen) içinde yürütür.

Protein sentezi DNA'nın kontrolü altında sitoplazmada hücreler içerisinde gerçekleşir. DNA'nın birinci görevi, yeni DNA sentezlenmesi, yani replikasyonudur. İkinci görevi ise protein sentezini gerçekleştiren mRNA'ların sentezidir (transkripsiyondur). DNA hücrede yapılması gerekenleri kendisi yapmaz, mRNA'ya devreder. mRNA ise DNA molekülünden aldığı şifreyi sitoplazmaya iletir. Daha sonra alınan şifreye göre tRNA'lar gerekli aminoasitleri sitoplazmadan toplayarak, ribozomlar aracılığıyla birbirine bağlayarak proteinleri üretirler (bkz. Bölüm 13).

Antisens RNA yapılarının kullanılması da bir "ters genetik" yöntemidir. Antisens RNA teknolojisi, hedef mRNA dizinine tamamlayıcı olan bir RNA kolunun bitki genomuna girişi ile DNA'dan RNA yoluyla proteine kadar olan bilgi akışının bloke edilmesi temeline dayanmaktadır (Mol ve ark., 1990). Antisens RNA yoluyla gen ifadesinin düzenlenmesi ilk defa doğal olarak bakterilerde keşfedilmiştir (Simons, 1988). Bakterilerde, kısa antisens RNA bölgelerinin değişik aşamalarda gen ifadesinin kontrolünde rol oynadığı belirlenmiştir. Fakat ökaryotik canlılarda böyle bir gen düzenlenmesine rastlanmamıştır.

Antisens RNA yaklaşımından günümüzde temel olarak iki şekilde yararlanılmaktadır:

1. Bitkilerde ifadesi istenmeyen genlerin engellenmesi ve böylece yararlı fenotiplerin ortaya çıkarılması,
2. Daha önce fonksiyonu bilinmeyen bir genin bitkideki rolünün veya geni tanımlanmış olan bir proteinin bitkideki fonksiyonunun araştırılmasıdır.

İlk kez, antisens RNA yapılarının ökaryotik hücrelerde kullanılması Izant ve Weintraub (1984) tarafından bildirilmiştir. Ökaryotlarda antisens yaklaşımı, günümüzde moleküler ve uygulamalı genetik alanına iyice entegre olmuştur. Ökaryotlarda antisens yaklaşımın hayvan ve bitki sistemlerinde kullanılabilirliği Tablo 25.2'de verilmiştir.

Tablo 25.2. Ökaryotlarda antisens yaklaşımları ve bitki ile hayvan sistemlerinde uygulanabilirliği (Anja ve ark., 1997).

Yaklaşım	Hayvan Sistemlerind Uygulanabilirliği	Bitki Sistemlerinde Uygulanabilirliği
Sentetik oligonükleotidlerin genoma girişi	+	-
Kopyalanan <i>in vitro</i> antisens RNA'ların genoma girişi	+	-
Transgenik organizmalarda antisens genlerin ifadesi	+	+

Bitkilerde antisens tekniği uygulamasının tercih edilen yönü, bitki genomuna kararlı bir şekilde entegre olmuş genlerin içsel (endogenous) ifadesidir. Bu genlerin içsel ifadeleri, *in vivo*'da kopyalanan hedef mRNA'lar ile etkileşimi olduğu düşünülen antisens RNA'ların oluşumu ile sonuçlanır. Bu oligonükleotidler, kimyasal değişikliğe uğratarak veya olduğu gibi hücre yüzeyinde alıcılar yardımıyla aktif olarak alınmış (Shuttleworth ve Colman, 1988) ve kültür hücrelerine enjekte edilmişlerdir (Harland ve Weintraub, 1985). Hücre içinde antisens oligonükleotidlerin spesifik bir mRNA'nın tamamlayıcı bölgesi ile etkileşimi amaçlanmıştır. Antisens oligonükleotidler bitki hücresine etkili bir biçimde sokulamadığı için bitkilerdeki gen ifadesinin inaktivasyonu sınırlıdır. *Drosophila* hücrelerinde, mikronjeksiyon ile aktarılmış antisens RNA'lar bir kaç hedef geni geçici olarak inaktive ederken, oligonükleotidler bakımından *in vitro*'da kopyalanan RNA'ların bitkilere enjeksiyonunun ise çok uygun olmadığı görülmüştür (Rosenberg ve ark., 1985).

Transgenik bitkilerdeki antisens genlerin ifadesi; çoğunlukla mRNA sabit durum seviyesi, protein sabit durum seviyesi ve enzim aktivitesinin azalması ile fenotipik değişikliklerin bir kombinasyonu şeklinde sonuçlanır. Antisens genleri ifade eden klonlarda, mRNA sabit durum seviyesi her bir organdan mRNA izole edilerek çeşitli bitki dokularında incelenebilir. Northern hibridizasyon yöntemi kullanılarak hedef mRNA ve antisens RNA'nın varlığı ya da yokluğu ispatlanabilir. Tek sarmal spesifik problemler kullanarak antisens RNA ve hedef mRNA'yı ayırt etmek mümkündür.

25.3. Antisens RNA Regülasyonunun Mekanizması

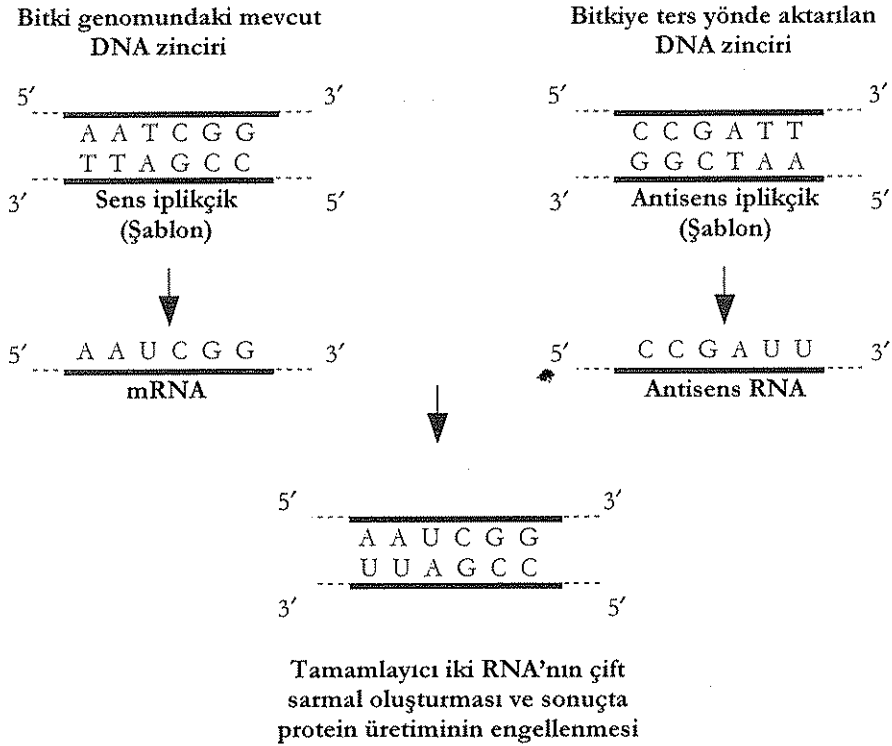
Antisens RNA yöntemi, bitkilerde gen ifadesinin istenildiği şekilde idare edilebilmesi bakımından önemli bir yaklaşımdır. Bu teknik, bitki genomunda bulunan hedef genin ürettiği mRNA dizinine tamamlayıcı (komplementer) olan bir mRNA molekülünün bitki hücresinde üretilmesi temeline dayanmaktadır. Bilindiği gibi, hücrelerin protein yapımında kullandıkları bilgiyi çift sarmal DNA'dan sadece bir tanesi taşımakta, bilgiyi taşıyan bu sarmala "sens"; ötekine "antisens" iplikcik adı verilmektedir. Bitkilerin yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi organlarında geçici etki gösteren birçok gen belirlenerek izole edilmiştir. İzole edilen bu genler, mRNA'nın oluşumunda antisens iplikcik şablon olacak şekilde bitkilere tekrar aktarılarak antisens mRNA'lar üretilmektedir. (Özcan ve Özgen, 1996). Antisens RNA düzenlemesinin mekanizması tam anlamıyla bilinmemekle birlikte, bitki hücresine sonradan kazandırılan antisens RNA ile bitkide mevcut mRNA arasında gerçekleşen dubleks oluşumun neden olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 25.1). Şekilde görüldüğü gibi, bitki genomuna aktarılan antisens RNA ile bitki hücresinde mevcut olan mRNA birbirine tamamlayıcı olduğundan bitki hücresinde RNA dubleksi oluşmaktadır. Bu durum ise mRNA'dan protein oluşumunu engellemektedir. Bu engellenmenin nasıl gerçekleştiği konusunda bazı hipotezler ortaya atılmıştır (Turgut, 1993). Bunlar:

1. Dubleks RNA, RNaz enzimi tarafından indirgenir,
2. Antisens RNA, mRNA'da mevcut Poly(A) sinyalinin bloke eder ve bu durum dubleks RNA'nın hücre çekirdeğinden sitoplazmaya geçişini engelleyebilir,
3. Antisens RNA, transkripsiyon başlangıç bölgesini bloke ederek transkripsiyonu engeller,
4. Antisens RNA, mRNA'da AUG bölgesini bloke ederek protein sentezini engeller,
5. Antisens RNA, ekzon-intron çakışma bölgesini örtterek bağlanma reaksiyonlarını engeller.

Görüldüğü gibi bütün hipotezler inaktivasyonun, antisens RNA ile mRNA'nın dubleks oluşturması sonucu meydana geldiğini bildirmektedir.

Antisens RNA'nın başarılı bir şekilde uygulanarak gen ifadesinin indirgendiği bütün araştırmalarda, hedef gen mRNA'sının seviyesinde bir azalma gözlenmiştir. Şekil 25.2'de de görüldüğü gibi transgenik olmayan kolza bitkilerinde A9 mRNA seviyeleri normal iken, antisens A9 geninin aktarıldığı transgenik bitkilerde önemli ölçüde azalmıştır. Yine, Smith *ve ark.* (1988) domates bitkisinde yaptıkları çalışmalarda, antisens PG (poligalakturonaz) geninin aktarıldığı transgenik bitkilerden elde edilen olgun meyvelerde, PG mRNA seviyesinde ve enzim aktivitesinde %90 düşüş gözlemlenmiştir. Olgunlaşmış domates meyvesinde, gözlenebilir antisens seviyesi yeşil meyvede bulunanın yaklaşık %30'u kadar

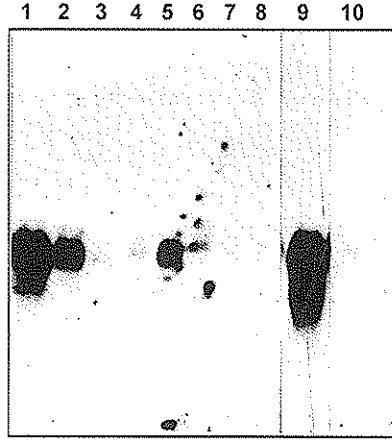
bulunabilmektedir. Bu sonuç, RNA'nın üretiminin veya nükleusdan taşınmasının translasyonun engellenmesine göre daha büyük rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, sens ve antisens RNA seviyelerinin düşük olması, dubleks yapıdaki RNA'nın indirgenmeye karşı daha duyarlı olduğunu işaret edebilir (Bird ve Ray, 1991).



Şekil 25.1. Antisens RNA düzenlemesinin mekanizması.

Van der Krol *ve ark.* (1988), yaprak dokularında aynı seviyelerde antisens CHS (Chalcone sentez) RNA bulunan bağımsız transgenik petunya bitkilerinin çiçeklerinde farklı pigmentasyon örneği elde etmişlerdir. Ayrıca, çok düşük seviyelerde antisens CHS RNA içeren bitkilerde de çiçek pigmentasyonu değişmiştir. Yine, Sheehy *ve ark.* (1988), domates bitkisinde sens ve antisens PG RNA'sının transkripsiyon miktarlarını araştırmışlardır. PG mRNA'sının transkripsiyon seviyesinin antisens RNA'dan çok daha düşük olduğunu göstermelerine rağmen, PG geninin transkripsiyon miktarının transgenik ve kontrol meyvelerinde aynı olduğu sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlar da, antisens düzenlemesinin transkripsiyon sonrası olabileceğini ortaya koymaktadır (Bird ve Ray, 1991). Günümüze kadar yapılan çalışmalar, antisens RNA düzenlemesini tam

olarak açıklayamamaktadır. Bununla beraber, inaktivasyonun transkripsiyon sonrası olduğu ve RNA'nın sitoplazmaya geçişinin engellenmesinin etkili olduğu sanılmaktadır.



Şekil 25.2. Antisens A9 (tapetum-spesifik) geninin aktarıldığı transgenik *Brassica napus* bitkilerinde Northern hibridizasyon analizi. A9 cDNA prob olarak kullanılmıştır. 1. ve 9. kulvarlar kontrol bitkileri, diğerleri ise transgenik bitkilerdir (Turgut, 1993).

25.4. Antisens Tekniği ile Gen İnaktivasyonunu Etkileyen Faktörler

25.4.1. Antisens DNA dizininin büyüklüğü ve yapısı

Antisens düzenlemesinin olabilmesi için gerek duyulan en önemli faktör, bitki hücrelerinde mevcut mRNA ile bitkiye sonradan kazandırılan antisens RNA arasında belirli oranda bir tamamlayıcılığın olmasıdır. Fakat bu iki RNA arasında gerekli olan nükleotid benzerliğinin miktarını araştırmak çok zordur. Yapılan bir çalışmada, CHS mRNA'sının 3' bölümünün yarısı veya 1/4 kısmının tamamlayıcı antisens RNA ile bloke edilmesi transgenik bitkilerde çiçek pigmentasyonunu değiştirmiştir (Van der Krol *ve ark.*, 1990). Ancak, yine aynı çalışmada mRNA'nın 5' bölümüne tamamlayıcı antisens RNA kullanıldığında bitkilerin fenotiplerinde bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, antisens düzenlemesi için DNA dizininin tam büyüklükte olmasının zorunlu olmadığını ortaya koymuştur (Anja *ve ark.*, 1997).

25.4.2. Promotor seçimi

Antisens çalışmalarında, kullanılacak olan promotor büyük önem taşımaktadır. Çünkü, antisens genin bitkide hedef genle aynı yerde (hücre, doku, organ) ve aynı zamanda ifade göstermesi gereklidir. Aksi durumda, antisens regülasyonu gerçekleşemez. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda genellikle CaMV 35S promotoru kullanılmıştır (Anja ve ark., 1997). Bu promotorun bitkilerin bütün organlarında ve her zaman ifade gösterdiği sanılmaktaydı. Fakat yapılan çalışmalarda, CaMV 35S promotorunun anterde bulunan tapetum ve mikrosporlarda aktif olmadığı anlaşılmıştır (Van der Meer ve ark., 1992; Plegt ve Bino, 1989). Bu nedenle, Van der Meer ve ark. (1992) CaMV 35S promotor bölgesine “anter kutusu” adı verilen dizini ekleyerek değiştirmişlerdir. Bu “anter kutusu” CaMV 35S promotorunun petunya bitkisinin anter bölgesinde ifade göstermesini sağlamıştır. Yirmisekiz nükleotidden oluşan bu “anter kutusu”, farklı CHS promotorlarında bulunan homolog bölgedir.

25.4.3. T-DNA kopya sayısı

Antisens genin kopya sayısı da antisens inaktivasyonun derecesini etkileyebilmektedir (Anja ve ark., 1997). Genler bitki genomuna T-DNA'nın bir parçası olarak aktarıldıklarından, antisens genlerin kopya sayısı T-DNA kopya sayısı kadardır. Rodermeel ve ark. (1988), 5 transgenik tütün klonunda Rubisco enziminin antisens inaktivasyonunu analiz etmiş, en düşük Rubisco RNA ve protein içeriğinin en azından dört T-DNA kopyasını taşıyan bir klonda bulunduğunu göstermişlerdir. Daha düşük antisens etkili klonların, sadece birkaç T-DNA kopyası içerdiği görülmüştür. Transgenik patateslerde yapılan başka bir çalışmada ise, değişen derecelerde GBSS inaktivasyonu gösteren GBSS genine ait T-DNA kopya sayısı Southern hibridizasyon yöntemi ile belirlenmiş, GBSS geni cDNA'sının 1.1 kb'lık 5' parçası prob olarak kullanıldığında, değişik band büyüklüklerinde hibridize bandlar olarak bireysel T-DNA yerleşimleri görülmüştür. Bir ya da iki T-DNA kopyası içeren klonlarda antisens inaktivasyonu meydana gelmezken, üç ya da daha fazla T-DNA içeren klonlarda değişen derecelerde antisens inaktivasyonu saptanmıştır (Kuipers, 1995). Bu çalışmalar antisens genin kopya sayısının, o genin inaktivasyonunu etkileyen önemli faktörlerden biri olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

25.4.4. Heterozigotik dizinler

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, antisens engellemenin sağlanabilmesi için hedef gen ile antisens gen arasında %100 homolojiye ihtiyaç olmadığı belirlenmiştir (Anja ve ark., 1997). Van der Krol ve ark. (1990), petunya antisens CHS-A geninin petunya ve tütünde CHS geninin ifadesini engellediğini, ancak antisens

inaktivasyon etkinliğinin farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Petunya için %52'lik antisens inaktivasyon gözlenirken, transgenik tütün için bu değerin %10 olduğu görülmüştür. Yoncadan izole edilen glutamin sentaz geni ile tütündeki glutamin sentaz geni arasında %81'lik homoloji ile inaktivasyon başarılmıştır (Temple *ve ark.*, 1993). Bu konudaki diğer bitkilerle yapılan çalışmalar Tablo 25.3'de özetlenmiştir. Tabloda görüldüğü gibi heterozigotik genlerle antisens inaktivasyonu başarılabilmekte, ancak antisens düzenleme etkinliğinin homozigotik genlere göre daha düşük eğilimde olduğu düşünülmektedir.

Tablo 25.3. Heterozigotik dizinlerle antisens inaktivasyon çalışmaları (Anja *ve ark.*, 1997).

Antisens Gen	Kaynak Bitki	Hedef Bitki	Homoloji (%)	Engelleme (%) ^a
Chalcone sentaz (CHS)	Petunya	Tütün	80	Tam ^b
Glutamin sentaz	Yonca	Tütün	81	40
Granül-bağlayıcı nişasta sentaz	Kasava	Patates	74	97
NADH-hidroksipirüvat redüktaz	Hıyar	Tütün	79	50
Kafeik asit O-metil-transferaz	Yonca	Tütün	77	80

^aEnzim aktivitesinin azalması

^bÇiçek pigmentasyonunun tam olarak engellenmesi

25.4.5. Diğer faktörler

Yapılan bazı çalışmalarda, fiziksel koşullar ve bazı dış faktörlerin antisens düzenlemesini etkilediği ortaya konmuştur (Anja *ve ark.*, 1997). Petunya bitkisinde Chalcone sentaz geni (CHS) inaktive edilerek çiçek pigmentasyonu değiştirilmiş, fakat aynı klondan çoğaltılan transgenik bitkilerin bazılarında değişik çiçek fenotipleri görülmüştür. Çiçek pigmentasyonunun GA₃ ve ekstra ışık uygulamalarıyla etkilendiği ortaya konmuştur (Van der Krol *ve ark.*, 1990). *Arabidopsis thaliana*'da hastalıklara dayanıklılık çalışmasında, hastalık etmeni olan *Botrytis cinerea* fungusu ile inokulasyondan önce transgenik bitkilerde kitinaz seviyesinin azaltılmasıyla antisens etkinliğinin azaldığı görülmüştür (Samah *ve Shah*, 1994). Bu çalışmalar, ışık, sıcaklık, hastalık etmeni ve GA₃ gibi dış faktörlerin, antisens inaktivasyon derecesini etkilediğini açıkça ortaya koymaktadır.

25.5. Bitkilere Aktarılan Bakteri Genlerinin Antisens Düzenlenmesi

Bilindiği gibi gen aktarılmış hücre ya da dokuların seçiminde kolay gözlenebilir bakteriyel kökenli genlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tip çalışmalarda da, transgenik bitkilerde gözlenmesi kolay olan bazı bakteri genleri başarıyla kullanılmıştır. Öncelikle, bakteri genleri normal yönde (sens) bitkilere aktarılmış ve daha sonra bu

genler aynı (transgenik) bitkilere ters yönde (antisens) ikinci defa aktarılmıştır. Bu genlerin ürettiği enzimlerin bitki hücrelerindeki aktiviteleri gözlenerek antisens RNA'nın etkisi araştırılmıştır.

Bitkilerde gen ifadesinin antisens düzenlenmesini ilk olarak Ecker ve Davis (1986) başarmışlardır. Bu araştırmacılar, havuç protoplastlarında kloramfenikol asetil transferaz (CAT) enziminin geçici engellenmesini gözlemişlerdir. Bu çalışmada inaktivasyon seviyesi antisens genin ifade seviyesine bağlı bulunmuştur. Sens ve antisens genleri arasındaki oran 1:100 olduğunda CAT aktivitesinde %95'ten fazla azalma olmuştur. Bu çalışma bitkilerde genlerin düzenlenmesinde antisens RNA'nın başarıyla kullanılabileceğini göstermiş ve böylece daha sonraki çalışmalar için de örnek olmuştur.

Tütün bitkisinde nopalin sentaz (*nos*) aktivitesi engellenmiştir (Rothstein ve ark., 1987; Sandler ve ark., 1988). Rothstein ve ark. (1987), daha önce yabani tip *nos* geninin aktarıldığı tütün bitkisine, CaMV 35S promotorunun kontrolü altında olan bir *nos* antisens genini aktarmışlardır. Transgenik tütün bitkilerinin *nos* aktivitesi 8 ile 50 kat azalmıştır. Buna paralel olarak *nos* mRNA seviyesinde de 8-10 kat düşüş gözlenmiştir. Antisens genin ve fenotipinin kalıtımı, transgenik tütün bitkilerinin yabani-tip (transgenik olmayan) tütün bitkileri ile geri melezlenmesiyle incelenmiştir. Döllerde *nos* aktivitesindeki azalma antisens gen ile birlikte açılıma uğramıştır. Antisens RNA etkisinin bu şekilde kalıtımının gösterilmesi, bu tekniğin kültür bitkilerine uygulanma potansiyeli açısından çok önemlidir.

Transgenik tütün bitkilerinde, bakteriyel CAT geninin ekspresyonu %99 oranında azaltılmıştır (Delauney ve ark., 1988). GUS (β -glukuronidaz) geni kolaylıkla izlenebilen bir enzimi kodladığından, transgenik bitkilerde gen ifadesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı şekilde, tütün bitkisinde antisens etkisini araştırmak için GUS geninden de yararlanılmış olup, GUS aktivitesi %90'ın üzerinde azaltılmıştır (Robert ve ark., 1989).

Bütün çalışmalarda, bağımsız transgenik bitkiler arasında gen ifadesinin engellenme seviyesi bakımından önemli farklılıklar bulunmuştur. Maksimum engelleme seviyesi sadece birkaç bağımsız transgenik bitkide gözlenebilmiştir. Bazı transgenik bitkilerde enzim aktivitesinde hiçbir azalma olmamıştır. Antisens transgenik bitkilerde bu şekilde varyasyonun olması belki de antisens genin ifade seviyesindeki varyasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Antisens RNA teknolojisi ile işaret genlerinin ifadesinin başarı ile engellendiği çalışmalar Tablo 25.4'de özetlenmiştir.

Antisens RNA genlerinin, ifadesi değişmiş hedef genle birlikte açılıma uğraması fenotipteki değişmeden bitkiye aktarılan genin sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu durum CAT ve antisens-CAT genlerinin açılıma uğradığı geri melez döllerinin analizi ile gösterilmiştir. CAT genini içeren fakat antisens geni taşımayan döllerde CAT aktivitesi tamamen yeniden kazandırılmıştır. Antisens gen ifadesinin iki generasyon boyunca kararlılık göstermesi ve bu özelliğin melezleme yoluyla diğer bitkilere aktarılması ticari ıslah programları açısından önemli olmaktadır.

Tablo 25.4. Antisens RNA teknolojisi ile işaret gen ifadesinin başarı ile engellendiği çalışmalar (Anja ve ark., 1997).

Hedef Gen	Hedef Gen Promotoru	Antisens Gen Promotoru	Antisens Gen Uzunluğu	Bitki Türü
Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)	35S CaMV, pal, nos	35S CaMV, pal, nos	Tam	Havuç protoplastı
Nopalin sentaz (nos)	nos	35S CaMV	5' sonu (%65)	Tütün
Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT))	35S CaMV	35S CaMV	Tam, 5' sonu (172 bp)	Tütün
Nopalin sentaz (nos)	nos	Cab22R (petunya)	Tam, parçalı	Tütün
Fosfinotrisin asetiltransferaz (PAT)	TR'2	35S CaMV	Tam	Tütün
β -Glukuronidaz (uidA)	35S CaMV	35S CaMV	Tam	Tütün
β -Glukuronidaz (uidA)	35S CaMV	ca/b (<i>A. thaliana</i>)	Tam, 5' sonu (41 bp)	<i>N. plumbagni folia</i>
Chalcone sentaz (CHS)	35S CaMV	35S CaMV	Tam, kısmi	Yonca protoplastı
Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)	35S CaMV	35S CaMV	Tam 5' sonu (154 bp), 5' sonu (432 bp), 3' sonu (341 bp)	Havuç protoplastı
β - Glukuronidaz (uidA)	35S CaMV	35S CaMV	Tam	Tütün
β - Glukuronidaz (uidA)	35S CaMV	35S CaMV	Tam, 5'sonu (647 bp) 5'sonu (583 bp) 5'sonu (68 bp) 3'sonu (1239 bp) 3'sonu (723 bp)	Petunya protoplastı

25.6. Bitki Genlerinin Antisens Düzenlenmesi

Bitki hücrelerinde bulunan ve DNA dizinleri mevcut olan genlerin ifadelerinin, bu genlerin antisens RNA'lar aracılığı ile engellenmesi tarımsal açıdan çok önemlidir. Böylece, kültür bitkilerinde istenmeyen fenotipleri ortaya çıkaran genlerin ifadelerinin engellenmesi mümkün olabilmektedir. Öncelikle, hedef genlerin klonlanabilmesi için cDNA kütüphanelerinin kurulması gereklidir. Daha sonra bu kütüphanelerden cDNA klonları çekilerek hedeflenen genler belirlenir (bkz Bölüm 14). Bu cDNA klonları ters yönde uygun promotor ve poly (A) sinyali arasına ve daha sonra da bitki gen aktarım vektörüne klonlanırlar. Burada özellikle hangi

promotorun kullanılacağı konusu önem kazanmaktadır. Çünkü, kullanılan promotorun doğru zamanda ve yerde (hücre, doku veya organ) aktif olması antisens düzenlemesi bakımından çok önemlidir (Turgut *ve ark.*, 1994).

Bu konuda son 10 yıldır önemli çalışmalar yapılmıştır. İlk defa antisens RNA yoluyla engellenmesi başarılan bitki geni, Chalcone sentaz (CHS) enzimini kodlayan gendir (Van der Krol *ve ark.*, 1988). CHS enzimi bitkilerde flavonoid biyosentezinde anahtar bir role sahiptir. Antisens CHS RNA (CaMV 35S promotorunun kontrolü altında) genininin aktarıldığı petunya ve tütün bitkilerinde enzim aktivitesinin engellenmesi sonucu çiçek pigmentasyonları değiştirilmiştir. Burada CHS mRNA ve enzim seviyelerindeki değişme sabit olarak gerçekleşmemiştir. Transgenik bitkilerde üç farklı pigmentasyon tipi gözlenmiştir:

- a) Birinci tip bitkilerin çiçekleri yabani-tip (kontrol) çiçeklerden farksız bulunmuştur.
- b) İkinci tip bitkilerde, taç yaprakları pigmentasyonunda azalma ile birlikte renkli ve beyaz parçalar gözlenmiştir.
- c) Üçüncü tip bitkiler büyük oranda beyaz taç yapraklara sahip olmuştur

Ayrıca, beyaz bölgelerde flavonoid pigmentlerinin olmadığı gösterilmiştir. a ve b tipi çiçeklerde CHS mRNA ve protein seviyeleri ile pigmentasyon seviyeleri arasında ilişki bulunmuştur. Transgenik bitkilerde antisens etkisinin kalıtımı geri melezleme çalışmaları ile izlenmiş ve tam bir açılım olduğu bildirilmiştir. Yine, petunya CHS antisens geni aynı zamanda tütün bitkisinde de çiçek rengini engellemiştir. Bu iki türün CHS genlerindeki değişim %20 olarak tahmin edilmiştir. Bu da antisens RNA'nın aynı cins içerisindeki türler arasında etkili olabildiğini göstermiştir.

Homolog CHS promotorunun kontrolü altındaki CHS antisens geni petunya bitkisine aktarıldığında çiçeklerde antisens CaMV 35S-CHS geninin ürettiği renklere benzer renklenme örnekleri gözlenmiştir (Van der Krol *ve ark.*, 1990). Ancak, iki promotorun (CaMV 35S ve CHS) ifade seviyelerinin farklı olmasından dolayı transgenik bitkilerde çiçeklenme üzerine olan etki, CHS promotoru kullanıldığında daha düşük gerçekleşmiştir. Başlangıçta, CHS antisens bitkilerinde farklı pigmentasyon durumlarının oluşması açıklanamamıştır. Fakat daha sonraları bu durumun antisens genin farklı ifade örneğinden kaynakladığı ileri sürülmüştür. Transgenik bitkilerde CHS mRNA seviyesi ile çiçek rengi arasında pozitif bir ilişkinin gözlenmesi bunu desteklemektedir.

Domates hücre duvarında yer alan poligalakturonaz (PG) enziminin meyve yumuşamasında önemli rolü bulunmaktadır. Bu enzim olgunlaşma sırasında hücre duvarındaki pektini parçalayarak meyvenin yumuşamasına neden olmaktadır. İki farklı araştırma grubu tarafından PG antisens genleri, yaklaşık tam büyüklükteki bir cDNA'dan alınan 730 bp'lik bir parça (Smith *ve ark.*, 1988) ile PG açık okuma çerçevesinin (ORF) tamamını içeren 1.6 kb büyüklüğündeki bir cDNA parçasından

(Sheehy *ve ark.*, 1988) oluşturulmuştur. Bu parçalar, CaMV 35S promotorunun kontrolü altında, antisens yönünde vektörlere klonlanmış ve *Agrobacterium* aracılığı ile domates bitkisine aktarılmıştır. Her iki çalışmada da transgenik bitkilerin olgunlaşan meyvelerinde, PG mRNA seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Smith *ve ark.* (1988), PG mRNA seviyesi sadece %6 olan bir transgenik bitki tanımlamışlardır. Bu bitkinin meyvelerindeki PG aktivitesi normalin %10'u olarak bulunmuştur. Sheehy *ve ark.* (1988), PG mRNA seviyesi %10 ve PG enzim aktivitesi %20 olan bir bitki elde etmişlerdir. Her iki çalışmada da, bağımsız transgenik bitkiler arasında PG aktivitesinin azaltılma seviyeleri bakımından önemli varyasyonlar bulunmuştur. İzole edilmiş çekirdeklerdeki transkripsiyon miktarları analiz edildiğinde antisens genin domates PG geninden daha yüksek oranda transkripsiyona uğradığı belirlenmiştir (Sheehy *ve ark.*, 1988).

Transgenik bitki (%10 PG aktivitesi gösteren) kendilendiğinde, PG antisens geniyle PG aktivitesindeki azalma açılma uğramıştır (Smith *ve ark.*, 1988). Bu bitkinin daha önce tek bir lokusta antisens gen taşıdığı gösterilmiştir. Antisens gen bakımından homozigot olan bitkilerde PG aktivitesi normal aktiviteye göre %1'den daha düşük ve heterozigot bitkilerde ise yaklaşık %20 olarak bulunmuştur. Böylece PG antisens genin fenotipi iki generasyon boyunca döllere geçmiştir.

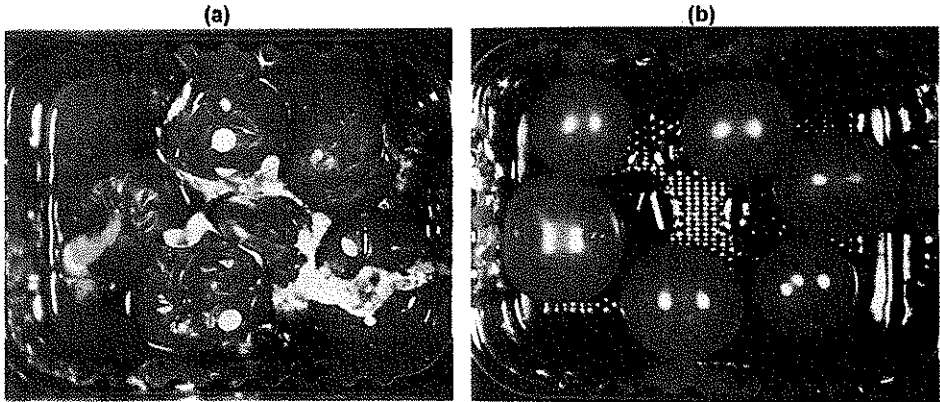
Olgunlaşma süresince PG aktivitesindeki azalma, olgunlaşma ile ilişkili diğer olayları (etilen üretimi, invertaz aktivitesi, pektin esterase aktivitesi) etkilememiştir (Smith *ve ark.*, 1988). Antisens bitkilerde olgun meyvelerde çözünabilir pektin seviyesi değişmemiş, ancak çözünabilir pektinin ortalama ağırlığı önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu da, PG'nin çözünabilir pektinin depolimerizasyonunda etkili olduğunu göstermiştir. PG aktivitesinin normalin %1'ine düşmesi olgunlaşan meyvenin fenotipinde gözlenebilir bir farklılığa neden olmamıştır. Ayrıca, çok sayıda meyve üzerinde yapılan analizler, taze ve depolanmış meyvelerin sertliğinde önemli farklılıklar olmadığını göstermiştir. Bunun yanında PG antisens meyveleri, depolama sırasındaki çatlama ve enfeksiyonlara, taşıma sırasındaki zararlara karşı önemli ölçüde daha dayanıklı bulunmuştur (Gray *ve ark.*, 1992) (Şekil 25.3). Bu nedenlerden dolayı, antisens bitkilerin hasat sonrası kayıpların azaltılması bakımından önemli bir potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir.

Antisens RNA tekniği ayrıca, diğer bir domates hücre duvarı enzimi olan pektin esterase (PE) geninin ifadesini engellemek amacıyla da kullanılmıştır (Hall *ve ark.*, 1993). PE, pektinin demetilasyonunu katalize etmektedir, fakat bu aktivitenin bitkideki rolü anlaşılamamıştır.

Domateste meyve olgunlaşmasını anlamak için yapılan başka bir çalışmada ise olgunlaşma ile ilişkili olarak bilinen pTOM13 cDNA klonu kullanılmıştır (Hamilton *ve ark.*, 1990). Bitkide pTOM13 RNA seviyesinin artması, etilen biyosentezi ile yakından ilişkilidir. Antisens pTOM13 RNA ifadesi gösteren transgenik domates bitkilerinde, olgunlaşmakta olan meyvede ve yaralanmış olan dokularda etilen biyosentezi önemli ölçüde azalmıştır (Hamilton *ve ark.*, 1990).

Etilen biyosentezinin kimyasal ve biyokimyasal analizi sonunda, ACC oksidaz aktivitesinin büyük oranda azaldığı gözlenmiştir. Antisens pTOM13 meyveleri, normal olgunlaşan meyveler kadar hızlı kızarmamıştır. Benzer bir çalışmada da domateste olgunlaşma ile ilişkili diğer bir cDNA klonu olan pTOM5 kullanılmıştır (Bird ve ark., 1991). Bu bitkilerde, olgunlaşma sırasında meyveler sarı renge dönüşmüş ve karotinoyit seviyesinde önemli azalmalar gözlenmiştir. Bu son iki çalışmanın sonuçları, antisens RNA teknolojisinin bitki gelişmesinde fonksiyonu bilinmeyen genlerin ve dolayısıyla proteinlerin tanımlanmasında büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Antisens tekniği ile, kloroplastta lokalize olan rubilaz bifosfat karboksilaz (*rbc*) mRNA miktarı azaltılarak, bitki hücrelerindeki *rbc* büyük ve küçük alt ünitelerinin işlevleri araştırılmıştır (Roderick ve ark., 1988). *Rbc* küçük alt ünitesi, hücre çekirdeğindeki çoklu bir gen ailesi tarafından, büyük alt ünitesi ise kloroplasttaki tek bir gen tarafından idare edilmektedir. Tütün bitkisinde, *rbc* küçük alt ünitesinin mRNA seviyesindeki azalma, kloroplastlarda kodlanan *rbc* büyük alt ünitesinin mRNA seviyesine küçük bir etki yapmıştır. Ancak, her iki alt ünite polipeptit seviyeleri eşit olarak %60'a kadar azaltılmıştır. Bu holoenzimin toplanmasının büyük alt ünite mRNA seviyesinden çok küçük alt ünite mRNA seviyesi ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Antisens RNA ile *rbc* proteinindeki azalma bitkilerin büyüme hızına etkili olmuştur. Bitkilerde büyüme hızı ile *rbc* küçük alt ünitesi arasında açık bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 25.3. Hasattan sonra 21 gün süreyle 12 °C depo sıcaklığında depolanan normal (a) ve antisens PG geninin aktarıldığı transgenik (b) domates bitkisinin meyvesi (Gray ve ark., 1992'den izin alınarak).

Antisens RNA teknikleri, normal anter fonksiyonunun değiştirilmesinde de başarıyla uygulanmıştır. Örneğin, flavonoid biyosentezinin engellenmesi petunya

anterlerinde erkek kısırlığa neden olmuştur (Van der Meer *ve ark.*, 1992). Petunyada, CHS enziminin çoklu gen ailesi tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Koes *ve ark.*, 1987). Buna göre yukarıdaki çalışmada antisens RNA'ların, gen ailelerinin ifade edilmelerini de engelleyebildiklerini göstermektedir.

Stearoyl-acyl taşıyıcı desaturaz enzimini kodlayan genin antisens ifadesi ile kolza (*Brassica napus*) yağının yağ asitleri kompozisyonu değiştirilmiştir (Knutzon *ve ark.*, 1992). Bu enzim tohum yağ biyosentezinin ilk desaturasyon basamağını katalize ederek stearoyl-ACP'yi oleoyl-ACP'ye dönüştürür. Elde edilen transgenik bitkilerin tohumlarında stearate seviyeleri önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Bu araştırma, antisens teknolojisinin yağlı tohumların genetik mühendisliğinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Aynı şekilde, antisens tane bağlayıcı nişasta sentaz geninin aktarılması ile nişastasında amiloz oranı düşük patates elde edilmiştir (Visser *ve ark.*, 1991). Amiloplastlarda amiloz sentezi, tane bağlayıcı nişasta sentaz tarafından katalize edilmektedir. Transgenik yumrulara nişasta üretimi ve nişasta tane kompozisyonunun analizi, enzim aktivitesindeki azalma ile amiloz üretiminde düşme olduğunu göstermiştir. Domates bitkisine, antisens asit invertaz geninin aktarılmasıyla olgunlaşan meyvelerde çözünebilir ve hücre duvarı fraksiyonlarındaki invertaz aktivitesi büyük ölçüde engellenmiş ve böylece meyvelerin sakkaroz içerikleri artırılmıştır (Ohyama *ve ark.*, 1995).

Bazı çalışmalarda ise hedef mRNA'lar başarıyla indirgenmelerine rağmen bitkilerin fenotiplerinde açık bir değişim gözlenememiştir (Neuhaus *ve ark.*, 1992; Turgut *ve ark.*, 1994). Turgut *ve ark.* (1994), kolzada anter-spesifik bir genin ifadesini engellemelerine rağmen bunu fenotipik olarak gözleyememişlerdir. Bu durum adı geçen genin belki de bitkinin savunma mekanizmasında aktif olduğu ve bu özel durumlar ortaya çıkmadan ilgili genin de aktif olmayacağı şeklinde açıklanmaktadır.

25.7. Viral Genlerin Antisens Düzenlemesi ve Virüslerin Engellenmesi

Bitkilerde viral kökenli hastalıklar, tarımı yapılan bitkilerde büyük ekonomik kayıplara neden olmakta, bu yüzden viral hastalıklara dayanıklı bitkilerin elde edilmesi hem tarımsal ve hem de ticari açıdan çok önemli olmaktadır. Çünkü, kimyasal ilaçlar virüslere karşı çok etkili olmamakta, bu da büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Viral genlerin antisens düzenlemesi ile bazı bitkilerde değişik seviyelerde bazı virüslere dayanıklılık kazandırılmıştır (bkz. Bölüm 19).

Virüslere karşı dayanıklılık mekanizmasının bitkilere kazandırılması için birkaç yöntem kullanılmıştır. Bitkilerde virüs enfeksiyonlarından korunmak amacıyla genetik mühendisliği uygulamaları başlatılmadan önce, klasik bir korunma yöntemi olan "çapraz koruma" ile ilgili virüsün daha az zarar yapan bir ırkı (koruyucu virüs) bitkiye inoküle edilmiş, ileriki dönemlerde daha çok zarar yapan ırklara karşı bitkide bir korunma sağlanmıştır.

Virüslere dayanıklı bitkiler elde etme çalışmalarının yoğunlaştığı tekniklerden birisi de; virüslerin kılıf protein geni dizilerine yönelik antisens RNA'ları oluşturularak transgenik bitkilerde dayanıklılığın sağlanmasıdır. Bunlardan ilk başarılı yöntem virüs kılıf proteinin ifadesidir (Powell *ve ark.*, 1986). Transgenik tütün bitkilerinde, hıyar mozayik (Cuozzo *ve ark.*, 1988) ve patates X virüsü kılıf proteinine karşı antisens RNA'ların ifadesi (Hemenway *ve ark.*, 1988) ile düşük inokulum konsantrasyonlarında dayanıklılık gözlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda transgenik tütün bitkilerinde, tütün mozayik virüsü kılıf proteinine karşı antisens RNA'nın ifadesi ile düşük inokulum konsantrasyonlarında dayanıklılık gözlenirken (Powell *ve ark.*, 1989), domates altın mozayik virüsü proteinine karşı antisens RNA ifadesi ile hiç bir semptomla rastlanmamış, sadece azalmış DNA replikasyonu saptanmıştır (Day *ve ark.*, 1991).

S-adenozilhomosistein hidrolaz (SAHH), transmetilasyon reaksiyonlarında anahtar bir enzim olup, S-adenozilmethionini metil verici olarak kullanır. SAHH enziminin hayvan virüslerine karşı antiviral bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Bu enzimin bitki virüslerine karşı etkisini araştırmak için, antisens SAHH geni tütün bitkisine aktarılmıştır (Masuta *ve ark.*, 1995). Transgenik bitkiler çeşitli virüs enfeksiyonlarına karşı dayanıklılık göstermiştir. Ancak, bu transgenik bitkilerin bir kısmı morfolojik farklılıklar sergilemiştir. Transgenik bitkiler üzerinde yapılan fizyolojik analizler, bu bitkilerde sitokinin seviyesinin normalin üzerinde olduğunu ortaya koymuştur. Bu bitkilerde gözlenen virüslere dayanıklılığın büyük bir olasılıkla sitokinin ile teşvik edildiği bildirilmiştir (Masuta *ve ark.*, 1995).

Antisens RNA tekniği ile virüslere dayanıklı bitki üretilmesinin en büyük dezavantajı; çok sayıda hastalığa neden olan pek çok virüsün replikasyonu ve bunlara ait genlerin ifadesi ile ilgili bilgiler yeterince mevcut olmadığı için antisens yapılarının oluşturacağı dizileri saptamakta bazı güçlüklerle karşılaşılmasıdır.

25.8. Sonuç

Antisens RNA teknolojisi, genetik mühendisliğinin son yıllarda üzerinde durulan en önemli konularından biri haline gelmiştir. Bilindiği gibi klasik ıslah yöntemleri ile gerçekleştirilmesi mümkün olmayan veya çok uzun süre alan çalışmalar, antisens RNA teknolojisi gibi genetik mühendisliği teknikleriyle kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir.

Belirli genlere veya gen dizilerine yönelik olarak antisens oligonükleotidlerin hazırlanması, hücrelere aktarımı ve ifadelerinin sağlanması ileri moleküler tekniklerin başında gelmektedir. Antisens teknolojisindeki bu gelişmenin başlaması klinik farmakolojide de bir devrim olarak görülmektedir. Çok yeni bir teknik olduğundan genetik kökenli her hastalık için kullanılmamaktadır. Virüsler ve istenmeyen gen ifadeleri nedeniyle oluşan hastalıkların tedavisi için arzu edilen bir tekniktir. Özellikle kanser için onkogenlerin ifadelerinin inaktivasyonunda antisens

oligonükleotidlerin kullanıma olanakları üzerinde yoğun çalışmalar devam etmektedir.

Antisens RNA ile bitkilerdeki hedef genlerin indirgenmeleri de çok yararlı fenotipler ortaya çıkarmıştır. Gerçekten de bu teknoloji kültür bitkilerin ıslahı bakımından büyük bir potansiyele sahiptir. Bunun için öncelikle hedef genin klonlanması ve dizin analizlerinin yapılması gereklidir. Bundan sonra da gen aktarım teknikleri kullanılarak hedef genin antisens olarak bitki transformasyon vektörüne klonlanması ve daha sonra bitkilere aktarılması işlemleri yerine getirilir. Bitkilere gen aktarımından sonra transgenik bitkiler üzerinde fenotipik gözlemler yapılarak antisens etkileri araştırılır.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, yukarıda da anlatıldığı gibi petunya bitkisinin çiçek rengi değiştirilmiş ve erkek kısır bitkiler elde edilmiştir. Sert kabuklu ve dolayısıyla raf ömrü daha uzun olan meyve üreten domates çeşitleri geliştirilmiştir. Yine, kolzanın tohumunun yağ kompozisyonu değiştirildiği gibi, amilozsuz patates yumruları üreten patates bitkileri de elde edilmiştir. Ayrıca, bazı viral hastalıklara karşı dayanıklı bitkiler elde etme çalışmaları yoğunlaşarak virüslerin kılıf protein geni dizilerine yönelik antisens RNA'ları oluşturmak suretiyle transgenik bitkilerde virüslere dayanıklılık sağlanmıştır. Bu transgenik bitkilerin daha sonraki generasyonlarda Mendel kurallarına göre açılım gösterdikleri bildirilmiştir. Ancak, bazı özel durumlarda, bu açılımlardan sapmalar olabilmektedir. Bitki genomunun farklı bölgelerine bir defada birden fazla DNA entegrasyonu olduğunda, bunların gelecek generasyonlardaki frekansları beklenenden fazla olmuştur.

Kültür bitkilerinin ıslahı açısından, önümüzde daha birçok hedef bulunmaktadır. Antisens teknolojisi; yağlı tohumlarda yağ kalitesinin iyileştirilmesi, hibrid çalışmaları için erkek kısır bitkilerin elde edilmesi, yumrulu bitkilerin nişasta kalitesinin artırılması, hassas olan meyvelerin sertliklerinin artırılması ve daha birçok kalite unsurlarının iyileştirilmesinde kullanılabilecek bir potansiyele sahiptir. Son yıllarda protein kalitesi ile miktarını, sıcaklığa, kurağa ve tuza dayanıklılığı belirleyen birçok gen izole edilmiş olup, üzerlerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, antisens teknolojisi ile, çok sayıda genden oluşan gen ailelerinin ifadeleri de engellenebilmektedir. Antisens teknolojisinin diğer bir avantajı ise, bir bitki türü için uygun olan antisens RNA'nın homoloji olması koşuluyla başka bitki türleri için de uygulanabilir olmasıdır.

Kaynaklar

- Anja G, Kuipers J, Evert J, Richard V (1997) Applications of antisense technology in plants. In: Lichtenstein C, Nellen W (eds), *Antisense Technology - A Practical Approach*, pp. 191-219.
- Bird CR, Ray JA (1991) Manipulation of plant gene expression by antisense RNA. *Biotech. and Genet. Eng. Rew.*, 9: 207-227.
- Bird CR, Ray JR, Fletcher JD, Boniwell JD, Boniwell JM, Bird AS, Teulieres C, Blain I, Bramley PM, Schuch W (1991) Using antisense RNA to study gene function; inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomato. *Bio/Technology*, 9: 635-639.
- Cuozzo M, O'Connell KM, Kaniewski W, Fang RX, Chua NH, Tumer NE (1988) Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology*, 6: 549-557.
- Day AG, Bejerano ER, Buck KW, Burrell M, Lichtenstein CP (1991) Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6721-6725.
- Delauney AJ, Tabaeizadeh Z, Verma DP (1988) A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4300-4304.
- Ecker JR, Davis RW (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5372-5376.
- Gray J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W, Grierson D (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.*, 19: 69-87.
- Hall LN, Tucker GA, Smith CJS, Watson CF, Seymour GB, Bundick Y, Boniwell JM, Fletcher JD, Ray JA, Schuch W, Bird CR, Grierson D (1993) Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant J.*, 3: 121-129.
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibit synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346: 284-287.
- Harland R, Weintraub H (1985) Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *J. Cell. Biol.*, 101: 1094.
- Hemenway C, Fang RX, Kaniewski WK, Chua NH, Tumer NE (1988) Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.*, 7: 1273-1280.
- Izant JG, Weintraub H (1984) Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell*, 36: 1007-1015.
- Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Johnson WB, Knauf VC, Kridl JC (1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearylacyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2624-2628.

Koes RE, Spelt CE, Mol JNM, Gerats AGM (1987) The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): sequence homology, chromosomal localization and evolutionary aspects. *Plant Mol. Biol.*, 10: 159-169.

Kuipers AGJ, Soppe WJJ, Jacobsen E, Visser RGF (1995) Factors affecting the inhibition by antisense RNA of granule-bound starch synthase gene expression in potato. *Mol. Gen. Genet.*, 246: 745-755.

Masuta C, Tanaka H, Uehara K, Kuwata S, Koiwai A, Noma M (1995) Broad resistance to plant viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6117-6121.

Mol JNM, Van der Krol AR, Van Tunen AJ, Van Blokland R, De Lange P, Stuitje AR (1990) Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett.*, 268: 427-430.

Neuhaus JM, Flores S, Keefe D, Ahl-Goy P, Meins FJ (1992) The function of vacuolar β -1,3-glucanase investigated by antisense transformasyon. Susceptibility of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants to *Cercospora nicotiana* infection. *Plant Mol. Biol.*, 19: 803-813.

Ohyama A, Ito H, Sato T, Nishimura S, Imai T, Hirai M (1995) Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Plant Cell Physiol.*, 36: 369-376.

Özcan S, Özgen M (1996) Bitki genetik mühendisliği. *Kökem Dergisi*, 1: 69-95.

Plegt L, Bino RJ (1989) β -Glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and nontransgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 216: 321-327.

Powell PA, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232: 738-743.

Powell PA, Stark DM, Sanders PR, Beachy RN (1989) Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6949-6952.

Robert LS, Donaldson PA, Ladaique C, Altosaar I, Arnison PG, Fabijanski SF (1989) Antisense RNA inhibition of β -glucuronidase gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.*, 13: 399-409.

Rodermel SR, Abbott MS, Bogorad L (1988) Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate caboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell*, 55: 673-681.

Rosenberg UB, Preiss A, Seifert E, Jackle H, Knipple DC (1985) Production of phenocopies by Kruppel antisense RNA injection into *Drosophila* embryos. *Nature*, 313: 703-706.

Rothstein SJ, DiMaio J, Strand M, Rice D (1987) Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8439-8443.

- Samah DA, Shah DM (1994) Effect of chitinase antisense RNA expression on disease susceptibility of Arabidopsis plants. *Plant Mol. Biol.*, 25: 587-596.
- Sandler SJ, Stayton M, Townsend JA, Ralston ML, Bedbrook JL, Dunsmuir P (1988) Inhibition of gene expression in transformed plants by antisense RNA. *Plant Mol. Biol.*, 11: 301-310.
- Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR (1988) Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8805.
- Shuttleworth J, Colman A (1988) Antisense oligonucleotide-directed cleavage of mRNA in *Xenopus oocytes* and eggs. *EMBO J.*, 7: 427.
- Simons RW (1988) Naturally occurring antisense RNA control: a brief review. *Gene*, 72: 35-44.
- Smith CJS, Watson CF, Ray JA, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in ripening tomatoes. *Nature*, 33: 724-726.
- Temple SJ, Knight TJ, Unkefer PJ, Sengupte-Gopalan C (1993) Modulation of glutamine synthetase gene expression in tobacco by the introduction of an alfalfa glutamine synthetase gene in sense and antisense orientation: molecular and biochemical analysis. *Mol. Gen. Genet.*, 236: 315-325.
- Turgut K (1993) A Study of Anther Gene Function in *Brassica napus* Using an Antisense RNA Approach. Doktora Tezi, Leicester Üniversitesi, İngiltere.
- Turgut K, Barsby T, Craze M, Freeman J, Hodge R, Paul W, Scott R (1994) The highly expressed tapetum-specific A9 gene is not required for male fertility in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 24: 97-104.
- Van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, Van de Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR (1988) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, 333: 866-869.
- Van der Krol AR, Mur A, de Lange P, Mol JNM, Stuitje AR (1990) Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol. Biol.*, 14: 457-466.
- Van der Meer IM, Stam ME, Van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitje AR (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell*, 4: 253-262.
- Visser RGF, Somhorst I, Kuipers GJ, Ruys NJ, Feenstra WJ, Jacobsen E (1991) Inhibition of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.*, 225: 289-296.

Bölüm 26

Teknoloji Koruma Sistemi (Terminatör Teknolojisi)

Gökhan Özertan¹, Yüksel Bölek²

¹Texas A&M University, Dept. Agricultural Economics, College Station, Texas, U.S.A

²Texas A&M University, Dept. Soil & Crop Sciences, College Station, Texas, U.S.A

e-posta: ag-eco.gozertan@taexgw.tamu.edu¹

26.1. Giriş

Bu çalışma, Fikri Mülkiyet Hakları'nın sıkça konuşulduğu son yıllarda dünya tarımını önemli ölçüde etkileyecek bir gelişme olan, 'Teknoloji Koruma Sistemi' (TKS) veya diğer adıyla 'Terminatör Teknolojisi'ni kapsamaktadır. Hem gelişmiş, hem gelişmekte olan ülkelerde geniş yankı uyandıran ve oldukça tartışılan bu konu farklı yönleriyle incelenecektir. Teknolojinin teknik olarak işleyiş prensiplerinin yanı sıra ekonomik ve hukuksal yönleri de çalışmamızda ele alınacaktır. Fikri Mülkiyet Hakları'nın ön planda olduğu son dönemlerde özellikle bilgisayar (yazılım), eğlence (müzik sektöründeki Napster örneği gibi) endüstrilerinde gelişmelere tanık olmaktadır. Literatürdeki yayınlar ağırlıklı olarak bilgisayar sektöründeki Fikri Mülkiyet Hakları üzerinde yoğunlaşmıştır. Genetik mühendisliği uygulamaları ile son yıllarda geliştirilen özellikle tohumlar gibi çeşitli ticari tarımsal ürünlerin kopyalanması; kaset, CD ya da yazılı yayınların kopyalanmasından çeşitli yönleri ile ayrılmaktadır. Bu nedenle "Biyo-korsanlık" ve 'Teknoloji Koruma Sistemi (Terminatör Teknolojisi)'nin sonuçları diğer sektörlerden aşağıda açıklanacağı gibi farklılıklar göstermektedir.

26.2. Dünya Transgenik Tohum Sektörü ve Teknoloji Koruma Sisteminin Geliştirilmesi

Dünya transgenik tohum sektörü satış hacmi 1998'de 1.4 milyar dolara (\$) ulaşmıştır. Yapılan projeksiyonlar bu sektörün 2005 yılında 6 milyar dolar seviyesine, 2010'da ise 20 milyar dolara varacağını göstermektedir. Şu anki ticari tohum piyasası ise 23 milyar dolar olarak hesaplanmaktadır (RAFI, 1999). James (2000)'e göre 1995'deki 75 milyon dolarlık transgenik tohum piyasası 1999 yılında tahmini olarak 2.1 milyar dolar seviyesine gelmiştir. Ayrıca, dünya genelinde, 1996 yılında 1.7 milyon hektarlık alanda transgenik tohumlarla ekim yapılmışken, bu alan 1999'da 39.9 milyon hektara yükselmiştir. 2000 yılında ise tahmini olarak dünya üzerinde altı kıtada 44.2 milyon hektar alanda transgenik tohum kullanılmıştır. Bu alanın %59'unda herbiside dayanıklı soya, %15'inde ise böceklerle dayanıklı Bt-mısır ekilmiştir (James, 2000).

1995 yılında Amerikan Tarım Bakanlığı (USDA) ve Mississippi menşeli dünyanın en büyük pamuk tohumu üreticisi Delta & Pine Land şirketi yeni bir patent için başvuruda bulunmuştur. 3 Mart 1998 tarihinde 3.723.765 sayılı ve 'Plant Gene Expression' isimli patent kendilerine tahsis edilmiştir. Bu patentin kendine has özelliği genetik olarak değişime uğramış bitkilerde filizlenmeyi önleyici bir mekanizmaya sahip olmasıdır. Delta & Pine Land'in yönetim kurulu başkanı Murray Robinson'a göre bu teknolojiyi dünya üzerinde 400 milyon hektarlık bir alanda kullanmak mümkün olacaktır.¹ Patent alındığı sırada Monsanto² şirketi Delta & Pine Land'in % 8 azınlık hissesine sahipken, aynı senenin Mayıs ayında Monsanto, Delta & Pine Land'i satın almak için başvuruda bulunmuştur³ (Guidetti, 1998). Ancak, bu birleşme gerçekleşmemiştir.⁴ Delta & Pine Land, Ekim 1998'de Terminatör patenti almak için 87 ülkede başvuruda bulunacağını açıklamıştır (Sparks Companies, 1998).

Monsanto ve USDA tarafından 'Gen Koruyucu (Gene Protector)' ya da 'Teknoloji Koruma Sistemi (Technology Protection System)' olarak adlandırılmasına karşın, bu teknoloji öncülüğünü RAFI'nin⁵ yaptığı sivil toplum örgütleri tarafından 'Bitirici, Yok edici veya Terminatör (Terminator)' ismiyle kullanılmaktadır.

26.3. TKS'nin Çalışma Sistemi⁶

Bitki biyoteknolojisi kısaca yeni bir genetik bilginin (genlerin) bitkilere aktarılması için kullanılan teknik ve yöntemler olarak tarif edilebilir. Transformasyon ise yabancı DNA'nın, bir genoma aktarılması ve entegrasyonudur.

Genlerin bitkiye transfer edilmesinde çeşitli yöntemlere başvurulabilir. Bunlardan en çok kullanılanları şöyle sıralanabilir:

1. Mikroenjeksiyon yöntemiyle hücrelere doğrudan gen transferi (Gad ve ark., 1990; Potrykus ve ark., 1985; Neuhaus ve Spangenberg, 1990).

2. Mikroprojektil bombardıman yöntemiyle gen transferi (Maeenpaeae ve ark, 1999; Ingram ve ark, 1999).
3. Çeşitli bakteri (örnek: *Agrobacterium*) ve virüslerde özel olarak dizayn edilmiş yapıların kullanılması yoluyla gen transferi (Hooykaas ve Schilperoort, 1992; Zupan ve Zambryski, 1995).

Bütün gen transferi tekniklerinde amaç, özel olarak dizayn edilen DNA'nın hücre çekirdeğine girerek, bitkinin kromozomlarına katılması ve orada istenilen fenotipi kodlayabilmesi, yani kendini ifade ederek ilgili özelliği bitkide ortaya çıkarabilmesidir. Tabii ki, transformasyon işleminin başarılı olup olmadığı (mesela DNA'nın kaç kopyasının aktarıldığı, bitkinin hangi kısımlarına aktarıldığı, dizayn edilen genin uygun çalışıp çalışmadığı) bilinemediğinden dolayı bir çok araştırma ve incelemelerin yapılması zorunludur. Transgenik bitki üretimi için, öncelikle çeşitli doku kültürü yöntemleriyle (Gürel ve Türker, 2001; Özcan ve ark., 2001; Babaoğlu ve Özcan, 2001) hedef dokuların tespit edilmesi, hücrelerin çoğaltılması ve uygun bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Hücrelere DNA'yı aktaracak özel yöntemler (bkz. Bölüm 15, 16) belirlendikten sonra, yine doku kültürü yoluyla amaca uygun DNA'yı içeren hücrelerin seçilmesi, seleksiyon ve bitkilerin çoğaltılması için değişik stratejilerin belirlenmesi gerekir. Aynı ayrı hatlara aktarılan genlerin, bitkilerde istenilen fonksiyonları yerine getirdiği tespit edildikten sonra, değişik kombinasyonlarla melezlemeler yapılarak, istenilen karakterleri taşıyan ve hedeflenen amaca uygun karakterler bir hatta toplanabilir.

Transgenik bitki teknolojisinin kurulabilmesi, çalışabilmesi ve başarılı olabilmesi için, değişik branşlarda uzmanlaşmış bilim adamlarının bir araya gelmesi ve ortak bir çalışma yapması gerekir. Örneğin, bitkilerin gelişmesini ve agronomik özelliklerini değerlendirmek ve seleksiyon yapmak için bitki ıslahçısının, bitkinin fizyolojik olarak ele alınıp, transformasyon ve doku kültürü çalışmalarını yapacak bir bitki fizyologunun, ve genetik testler için bir moleküler biyologun bir araya gelmesi gereklidir. Ayrıca, üzerinde çalışılan karakterin özelliğine göre bir entomolog veya fitopatoloğun da çalışmaya katılması gerekebilir. Bütün bu unsurlar ticari şirketlerde bir araya getirilerek ve üzerinde daha birçok ilave yatırımlar yapılarak 'transgenik bitki' üretimi etkin bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Fakat bitkinin geliştirilmesi için biyoteknolojinin kullanımı bazı problemlerden dolayı gerileme göstermektedir. Bu problemlerden bazıları şunlardır (Horsch, 1993):

1. Gen klonlanması ve ekspresyonu.
2. Ürünün geliştirilmesi.
3. Tarla denemeleri.
4. Elit çeşitlerin elde edilmesi için yapılacak ıslah programları.
5. Elde edilen ürünün karakterize edilmesi ve düzenlemeler.
6. Halkın kabulü.
7. Pazarlama.

Bunlara ilave olarak iki önemli hususa daha değinebiliriz. Birincisi, izole edilen ve istenilen çeşitlere aktarılan transgenlerin çeşitli teknikler kullanılarak yabancı türlerle geçmesinin (gene escape) engellenmesidir. Bu sayede yabancı türlerin sahip oldukları değişik fenotipik karakterleri kodlayan ve bitki ıslahçılarının birçok amaçlarla başvurabilecekleri genlerin orijinal yapısı korunmuş olur. İkinci olarak, biyoteknoloji ile uğraşan ticari şirketlerin veya devlet kurumlarının uzun uğraşlar ve birçok masraflar yaparak elde ettikleri transgenik tohumların uygun bir şekilde kullanılmasını sağlamak ve bu bitkilerin geliştirilmesi için yapılan harcamaların tekrar geriye alınabilmesidir. Ticari şirketlerin bu teknolojileri geliştirmeleri ve devam ettirebilmeleri için yapmış oldukları yatırımların karşılığını almaları gerekmektedir. Aksi takdirde, gelecekte ulaşılacak çeşitli teknolojik gelişmelerin önüne geçilmiş olunacaktır. Mesela üstün verimli, biyotik ve abiyotik şartlara dayanıklı ve istenilen agronomik karakterlere sahip çeşitlerin biyoteknolojik metotlar kullanılarak daha kısa zamanda geliştirilmesi gecikecektir. Bu, özellikle şirketlerden bir defa tohumluk alıp sonraki yıllarda tekrar bir ödeme yapmaksızın aynı tohumluğun çiftçiler tarafından kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle bu gibi problemler yabancı tozlanan bitkilerde bir ölçüde çözüme kavuşturulmuş, kendine tozlanan bitkilerde ise henüz çözülememiştir. Melez tohumlarda ikinci yıldan itibaren fenotipik bir açılma olacağı için, bitkilerin üniform olmayacakları ve tarımsal mekanizasyon açısından problem yaratacakları açıktır. Ayrıca, bu durumda bitkilerin tekrar ekilip ekilmediği de tespit edilebilir. Fakat kendine tozlanan bitkilerde bunu söylemek çok zordur. Bundan dolayı, yukarıda bahsedilen problemleri çözebilecek bir teknolojik sistem üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Teknolojiyi Koruma Sistemi adı verilen bu sistem üç unsurdan meydana gelmektedir:

1. Zehirli bir proteinin sentezlenmesini kodlayan, tohum gelişmesinin son aşamasında etkili olup bitkinin diğer kısımlarına etki etmeyecek bir gen,
2. Bu teknolojiyi geliştiren bitki ıslahçılarının ellerindeki hatları birçok generasyon üretmelerine imkan verecek ve aynı zamanda da içerisinde zehirli molekülü oluşturacak geni taşımaya elverişli bir metot (bu özellikle ıslahçıların, çiftçiye dağıtılmak üzere, yeterli miktarda tohumluk üretmesi için gereklidir), ve;
3. Tohumların ekilmesinden sonra, söz konusu geni aktif hale geçirecek bir metot (bu şekilde, çiftçinin aynı tohumluğu iki kez kullanması önlenmiş olacağı için, şirketlerin ayrıca bir denetleme yapmalarına gerek kalmayacak ve projeden zarar etmemiş olacaklar).

Bahsedilen bu amaçları gerçekleştirebilmek için yapılan araştırmalarda kullanılan genetik yapı ve yöntemleri şöyle sıralayabiliriz:

1. Kimyasal bir etkileşme sonucu aktif hale gelebilen, bütün hücrelerde ve her zaman aktif bir promotor (Gatz ve Lenk, 1988).

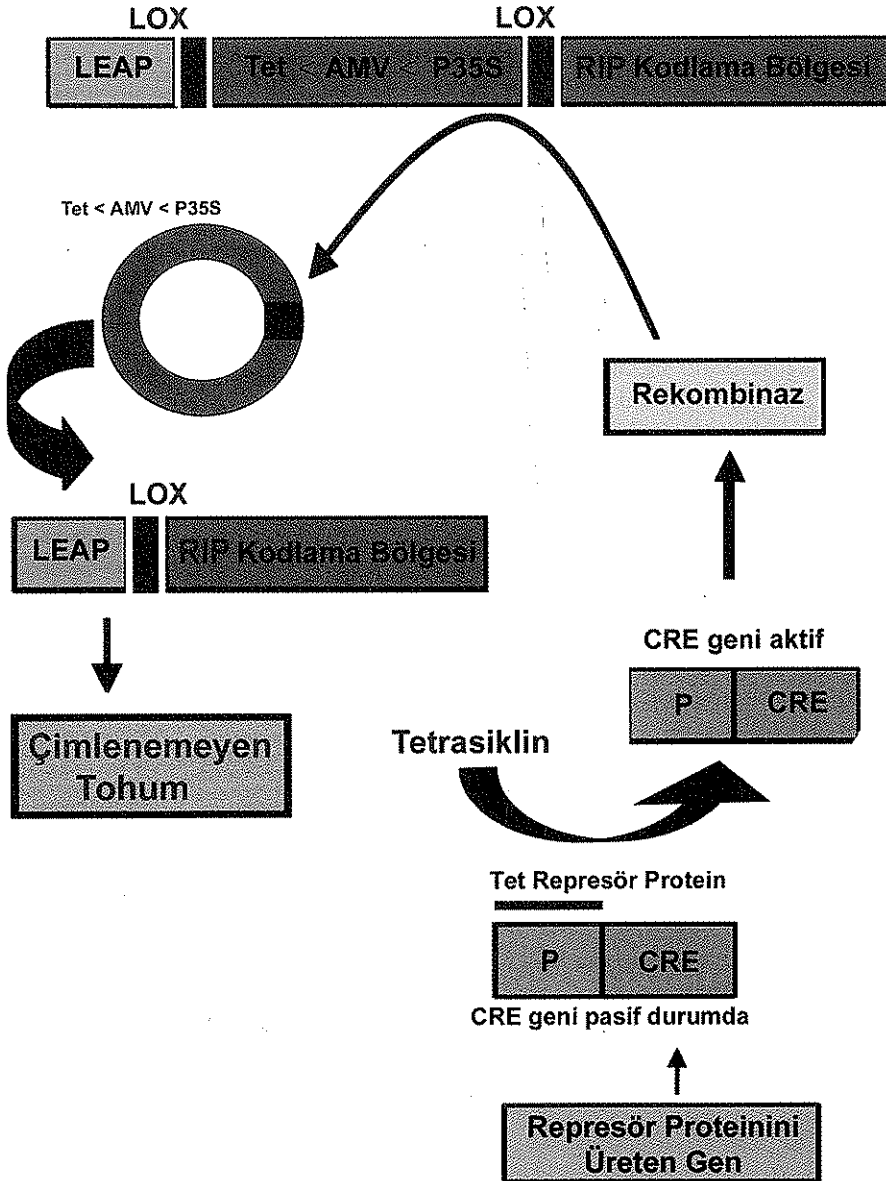
2. Özel bir DNA dizisini, belirli bir bölgeden kesebilen bir enzim (Site-specific recombinase, CRE). CRE'nin bitki hücrelerinde de çalıştığı deneysel olarak gösterilmiştir (Dale ve Ow, 1990; Odell *ve ark.*, 1990).
3. Embriyolojik gelişmenin sonlarında etkili olan bir promotor (late embryogenesis-specific promotor). Bu promotor pamuk bitkisinden elde edilmiş olup bitkide en son aktif hale gelen genlerden biri olan LEA (late embryogenesis abundant) genini aktif hale getirmektedir. Bu genin oluşturduğu protein, tohum tam büyüklüğüne ulaşana, yağ ve protein depolamasını tamamlayıp dormant hale geçeceği safhaya kadar sentezlenmemekte, ancak tohumun olgunlaşma devresinin sonunda sentezlenebilmektedir. Eğer genetik mühendisliği kullanılarak elde edilen transgenler buna benzer bir fenotip oluştursa, yani aynı genetik etkiyi yaparlarsa, bu halde LEA promotor (LEAP)'un bu zehirli proteinleri, sadece tohumda ve tohum olgunlaşmasının sonlarına doğru yüksek miktarlarda sentezlemesi gerekir. Özellikle pamuk gibi tohum, lif ve diğer kısımlarından ayrı ayrı faydalanılan bitkiler için bunun önemi daha da fazladır. Çünkü, liflerin oluşması ve olgunlaşması tohumun canlı olmasına bağlıdır. Ayrıca, pamuk tohumları hem insanlar tarafından hem de hayvan yemi olarak tüketilmesinden dolayı tohumun tam olgunluğa ulaşması ve zehirli proteinin zararlı etkisinin olmaması çok önemlidir.

Araştırmada, zehirli protein olarak sadece bitkilerde etkili olan, *Saponaria officinalis* bitkisinden elde edilen, 'saporin' adı verilen ve ribozomların çalışmasını engelleyen bir protein (ribosome inhibitory protein, RIP) kullanılmıştır (Barthelemy *ve ark.*, 1993). Bu proteinin çok az bir miktarı sentezlemeyi durdurmaya yeterli olduğu için, hücreler hayati fonksiyonlarını devam ettirebilecek protein sentezlemesini yapamayacaklar ve çok çabuk bir şekilde öleceklerdir. Ayrıca, bu proteine ilave olarak *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinden elde edilen bir ribonuclease 'Barnase' de aynı zamanda test edilmektedir. Projenin birinci safhası genel genetik mühendisliği metotları kullanılarak, seçilen hatlara transformasyonu yapılacak genetik yapının (promotor + zehirli proteini oluşturacak bir gen) laboratuvarda dizayn edilmesi ve yapısı değiştirilen genin bakteri kullanılarak bitkilere aktarılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar bu iş projenin sonu gibi görünsün de, bu metotla üreticilerin elinde çiftçilere satacak tohumları kalmayacağı için, projenin esas önemli kısmını oluşturan ikinci safhasına geçilmiştir.

Burada amaç, zehirli proteini oluşturacak genin, tohumun ekimine kadar aktif hale gelmemesidir. Bunu başarabilmek için bir DNA parçası (engelleyici DNA - blocking DNA), LEAP ile zehirli protein geni arasına yerleştirilmiş ve zehirli proteinin oluşması engellenmiştir. Böylece, oluşacak tohum olgunlaşmasını tamamlayacak ve embriyo tam olarak gelişeceği için ekildiğinde yeni bir bitki oluşturabilecektir. Burada kullanılan engelleyici DNA'nın her iki ucuna ise rekombinaz enzimi tarafından tanınabilecek özel DNA dizileri (LOX) yerleştirilerek, DNA'nın daha sonra bu noktalardan kesilmesi planlanmıştır (Bayley

ve ark., 1992; Medberry ve ark., 1995; Odell ve ark., 1994). Kenarlarından kesilen engelleyici DNA, kesim noktalarından bir araya gelerek yapışacak ve sonuçta dizayn edilen genetik yapıdan uzaklaştırılmış olacaktır. Dolayısıyla LEAP ve zehirli protein geni bir araya gelerek, zehirli proteinin sentezlenmesini başlatacaktır. Fakat bu, tohum gelişmesinin sonlarına doğru LEAP'nin aktif hale geçmesinden sonra olacaktır. Rekombinaz enzimi çalıştıktan sonra, bitki çimlenmesinden tohumun olgunlaşmasına kadar (kök, gövde, yaprak, çiçek ve tohumların oluşması) olan bütün hayati fonksiyonlarını yaptıktan sonra, tohumlar ölecektir. Bütün bunlar başarıldıktan sonra geriye bir problem daha kalmaktadır; o da tohumlar ölünce bir sonraki yıl için üretilecek tohum nasıl elde edilecek? Üreticiler bu durumda, tohumları çiftçiye satmak için nasıl bir yöntemle başvuracaklardır? Bu problem de şu şekilde çözüme kavuşturulmaktadır: Tohumun ekimine kadar rekombinaz enziminin aktif hale geçmesi engellenecektir. Kullanılan metot ise rekombinaz enzimini kodlayan DNA parçasını her hücrede ve her zaman aktif halde bulunan bir promotorun yanına yerleştirmek ve de bu promotoru aynı zamanda kontrol altında (repressed) tutabilmektir. Aktif (de-repressed) hale geçebilmesi için kimyasal bir maddeyle muamele edilmesi yeterlidir. Böylece, tohumculuk yapan firmalar, tohumu satarken kimyasal bir madde püskürterek rekombinaz enzimini aktif hale geçirebilirler. Bu amaçla, araştırmada kullanılan promotor sistemi bir antibiyotik olan *tetrasiklin* tarafından kontrol altına alınabilmektedir (Gatz ve Quail, 1988; Gatz ve ark., 1992; Gatz, 1995; Roder ve ark., 1994). Bu sistemin çalışabilmesi için, her zaman represör proteinini üretecek bir gen, üretilcek bu represör proteinle inaktif hale gelecek ve rekombinaz genine bağlı bir promotorun bitkiye yerleştirilmesi gerekir. Böylece, LEAP normal olarak aktif olmasına rağmen, represör, rekombinaz geniyile interaksyona geçecek, rekombinaz enzimi üretilmeyecek, zehirli gen çalışmayacak ve zehirli protein oluşamayacaktır. Zehirli geni aktif hale getirebilmek için, tohumlara az bir miktarda tetrasiklin ile muamele edilmesi yeterlidir. Bu şekilde represör proteinin rekombinaz üretimini engellemesi önlenmiş olacaktır. Engelleyici DNA kesilerek promotor ile zehirli genin arasından çıkarılacak ve zehirli protein oluşumu gerçekleşecektir (Şekil 26.1). Böylece, bir sonraki generasyon ölmüş olacak. Çünkü oluşan protein, bitkide yeni gelişen embriyo üzerinde ve tohum gelişmesinin son safhalarında etkili olmaktadır. Yani tohum ticari açıdan olgunluğa ulaştıktan sonra içindeki embriyo ölmektedir. Sonuç olarak, "terminatör" sistemiyle ticari olarak kullanılabilir tohumluk üretilir. Fakat tohumların çimlenme gücü yoktur. Pratik yönden meseleyi ele alacak olursak, kimyasal maddeyle muamele edilmiş tohumlar çimlenebilir ve gelişebilir, ancak ikinci sene kullanıldıklarında bitki üretemezler. Buna ilave olarak, çimlenme gücünü yitirmiş tohumluk üretimi yöntemiyle, bitkilerde meydana getirilen genetik değişikliklerin, tohumların başka yerlere taşınması sonucu başka bitkilere sıçraması da önlenmiş olacaktır. Özellikle, bitki rotasyonunun uygulandığı bölgelerde, bu tohumların kullanımı üreticilere büyük avantaj sağlayacaktır. Ayrıca, bu sistemle aktif hale getirilmiş polenler de çimlenmeyi önleyici dominant karakteri ve buna bağlı olarak değişik genetik karakterleri taşıyacağı için, bu genetik karakterlerin

kültür bitkilerinden filogenetik olarak yakın bitki türlerine taşınması ve hibridizasyonu önlenmiş olacaktır. Eğer herhangi bir şekilde hibridize olmuş ise, o da çimlenmeyecektir.



Şekil 26.1. Terminator (TKS) sisteminin genetik mekanizması (Oliver ve Velten, 2000).

Sistemin en önemli kullanım alanı olan kendine döllen bitkilerde deneme çalışmaları devam etmektedir. Özellikle pamuk konusunda yapılan çalışmalar detaylı bir şekilde açıklanmıştır (Oliver *ve ark.*, 1998).

Kimyasal madde uygulamasıyla birlikte, tohumlar fazla tetrasiklin'den temizlenip kurutulduktan sonra satışa hazırdır. Tohumlar çimlenir ve normal bitkiler üretir. Çimlenme ve normal gelişme döneminden olgunlaşma döneminin sonlarına doğru, tohumlar çimlenme güçlerini yitirmelerine rağmen normal görünürler ve ticari olarak satışta herhangi bir problem oluşturmazlar. Buna ilave olarak sistemin aktivasyonu, tohumun su alarak şişmesi sırasında olduğu ve embriyonun meristem hücrelerini etkilediği için, bu bitkiden oluşan polenler aktif hale gelmiş 'LEAP-zehirli protein' genetik yapısına sahip olacaklardır. Daha öncede değindiğimiz gibi, bu bitkilerin polenleri başka bir bitkiye taşınacak olursa üretilecek tohum fonksiyonel olmayacaktır. Bu husus, sistemin bir çok faydalarından birisidir. Ayrıca, değişik çimlenmeyi önleyici genlerin denenmesi, farklı indüksiyon metodlarının bulunması gibi daha birçok yararlı konularda çalışmalar devam etmektedir.

Bu güne kadar bütün bitkisinde hayli fazla çalışmalar yapılmış ve TKS tam olarak geliştirilebilmiştir. Bu bitkilerden elde edilen tohumlar, tetrasiklin ile muamele edilerek sistemin değişik varyasyonları test edilmiştir. Tohumlara tetrasiklin uygulanarak elde edilen ve sistemin aktif hale geldiği bitkilerde, yapılan deneyler sonucu normal bitkilerden görünüş olarak farklı olmadığı gösterilmiştir. Bitkilerin hepsi normaldir ve de hepsi normal tohum üretmektedirler. Bu bitkilerden elde edilen DNA analizleri (PCR yöntemiyle) sonucu DNA'nın kesim noktalarından ayrıldığı ve bu şekilde LEAP ve çimlenmeyi önleyici genin birleştiği gösterilmiştir. Değişen miktarlarda tetrasiklin uygulaması sonucu elde edilen fidelerde yapılan Northern analizi sonucu 50-100 µg/ml tet represör genetik yapısı (tetrasiklin kesmesi sonucu) birçok fide hücrelerinde elde edilmiştir. Bu şöyle ifade edilebilir; bütün bir fideden elde edilen RNA örneği önemli bir miktarda tet represör birikimi göstermemiştir. Bu datadan şöyle bir sonuç çıkarabiliriz; tet represör/tet promotor sistemi ve CRE/LOX rekombinasyonu fonksiyonel ve etkindir. Halen tohumların bu şekilde elde edilmesi ve çimlenme güçleri analiz edilmektedir.

Pamuk bitkisinde, yukarıda bahsedilen her iki genetik yapının da mevcut olduğu bitkiler bulunmakta, ancak henüz teknolojiyi koruma sisteminin tam kombinasyonu elde edilememiştir. Şu anda homozigot hatların üretilmesi aşamasında olup, melezlemeler yaparak tüm sistemin elde edilmesine çalışılmaktadır.

Sistemin genetik mekanizması kompleks olup (Şekil 26.1), zorunlu olarak iki ayrı bitkiye aktarılmış farklı genetik yapıların ayrı ayrı test edilmesinden sonra, seçilen bitkiler melezlenerek istenilen özelliklere sahip (iki ayrı genetik yapının bir bitkide toplanması) bitki elde edilmiştir.

Ayrı ayrı hatlarda dizayn edilen genetik yapılar:

1. LEAP-LOX-tet represör geni-LOX-protein sentezini önleyen enzimi kodlayan DNA dizisi (protein synthesis inhibitor protein coding sequence)/PolyA
2. Tet represör kısmını içeren 35S promotor - CRE (site specific recombinase) LOX: CRE rekombinaz bölgesini tanıır. CRE: bakteriyofajdan elde edilmiş bir enzim olup LOX dizisini belirli yerlerden keser (Tet: tetrasiklin).

Bu iki genetik yapı içerisinde ayrıca iki değişik LEAP (US patent #5,723,765) ve protein sentezini önleyen protein kullanılmaktadır.

26.4. Teknolojinin Etkileri

Genel olarak TKS'ne yöneltilen eleştirileri iki kısma ayırmak mümkündür. Birincisi genetik olarak değişikliğe uğramış organizmalarla ilgili olanlar, ikincisi ise özellikle TKS'ne yöneltilen eleştiriler. Bu çalışmada sadece TKS'ne yöneltilen eleştiriler ele alınacaktır.

TKS'nin geliştirilmesi temel olarak biyoteknoloji şirketlerinin Fikri Mülkiyet Hakları'nın korunması prensibine dayanmaktadır. Örneğin; kimyasal bir pestisidin geliştirilmesi ortalama olarak 11 yıl sürmekte ve maliyeti 50-70 milyon doları bulmaktadır. Aynı şekilde, genetik mühendisliği ile üretilmiş bir bitkinin geliştirilmesi 6 yıl sürmekte ve 10 milyon dolara mal olmaktadır. (Fernandez-Cornejo *ve ark.*, 1999; Guidetti, 1998). Yeni bir ürün çeşidinin geliştirilmesi ise 10 yıllık bir süreye ve yaklaşık 1 milyon dolarlık bir maliyete ihtiyaç duymaktadır.⁷ Swanson ve Goschl (2000), bilgisayar yazılımı, bitki geliştirme ve eczacılık endüstrilerinde şirketlerin brüt gelirlerinin %10'unun araştırmaya ayrıldığını belirtmektedirler. Bir bitkinin *tohum-korsanlığı* ile üretilmesine karşı geliştirilmiş olan TKS⁸ özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki *biyo-korsanlığı* hedeflemektedir (Rifkin, 1998). Kaldı ki gelişmiş ülkeler de bile çiftçiler satın aldıkları tohumları saklayıp tekrar kullanmayı tercih etmektedirler. Örnek olarak, Kanada'da en fazla ekilen tahıl olan buğdayın üretiminin %75'i saklanan ya da sertifikasız tohumlarla yapılmaktadır. Ontario'da soya ekilen alanın yarısında ise saklanan tohumlar kullanılmaktadır (Country Guide, 1998). Dolayısıyla, biyoteknoloji şirketleri TKS sayesinde geliştirdikleri tohumlara yaptıkları yatırımları karşılayabileceklerdir. Lesser'in belirttiğine göre 1970'lerin tohum istatistiklerine göre soya, buğday ve pamuk tohumlarını çiftçiler bir yıl arayla satın almaktaydılar. Eğer bu *kopyalama* önlenbilseydi, 1975 fiyatlarıyla çiftçilere 400 milyon dolarlık bir ek maliyet gelecekti (Lim, 1992).

Biyoteknoloji şirketlerinin yaptıkları açıklamalara karşılık, teknolojiyi geliştiren Mel Oliver, "Bilim adamının önceliği transgeniklerin yabani bitkilere, zararlı otlara veya diğer canlı topluluklarına geçişini önleyecek bir sistem oluşturmaktır. Biz yerel çiftçilerin tohum saklamaları ile ilgilenmiyoruz. Bizim önceliğimiz transgeniklerin

etrafa yayılmasını ve Amerikan teknolojisini korumaktır” şeklinde görüş bildirmektedir (Schuttrow, 1999).

Collins’e⁹ göre “Çiftçinin her sene tohum satın alması kaliteyi güvence altına alacak, yeni ve gelişmiş ürünlere yönelik araştırmalara kaynak sağlayacaktır. Hibrid tohumları üretmedeki zorluklar, yüksek maliyetler ve zayıf ürün performansı bu teknolojilerdeki yatırımı düşük seviyede tuttu. TKS, sadece geliştirilmiş yüksek teknolojiyi kullanan çiftçilerin her sene satın almasına değecek özellikteki ürünlerde kullanılacaktır. Şirketler sistemi eski ürünlere uygulamayacaklardır, çünkü bu çok pahalı ve fazlasıyla karışık bir sistemdir” (Schuttrow, 1999).

Monsanto’ya göre bu teknolojinin en büyük avantajlarından biri, biyoteknoloji ile geliştirilmiş tohumlarla biyoteknoloji-dışı tohumların çapraz tozlaşması sonrası çoğalmalarını önleme potansiyeline sahip olmasıdır. Sistem sayesinde bir çapraz tozlaşmanın etkileri sadece ilk kuşakta görülecek ve ikinci kuşağa taşınmayacaktır. Biyoteknoloji şirketleri benzer sistemlerin tarımsal biyoteknoloji üzerindeki en büyük faydasının ek makineye ihtiyaç duyulmadan girdilerin azalması, ürünün artması ve üretim maliyetlerinin azalması olduğunu bildirmektedir.¹⁰

TKS’ni savunanlar, bu teknolojinin sağladığı “açma-kapama” mekanizmaları ile çiftçilerin arzu ettikleri özelliklere sahip tohumları sipariş etmelerinin mümkün olacağını belirtmektedirler. Bu teknoloji vasıtasıyla çiftçiler, bedelini ödemek karşılığında, her sene “temiz” tohum kullanabileceklerdir. Öncelikle kendine tozlanan bitkilerde kullanılması planlanan bu teknoloji ile Collins’e göre çiftçiler geçimlik çiftçilikten daha fazla üretime yöneleceklerdir (TIME, 1999).

Teknolojiye, ekonomik olarak yöneltilen en büyük eleştiri, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki çiftçileri maddi yönden büyük sıkıntılara sokacak olmasıdır. Örneğin, Hindistan’da 100 milyon çiftçi ailesi bulunmakta ve bunların %80’i tohum saklamayı tercih etmektedirler (RAFI, 1999). Gıda ve Tarım örgütü FAO’ya göre, yeryüzünde 1,4 milyar insan tarladan saklanan tohumlarla geçinmektedir (RAFI, 1999). Iler¹¹ ise, TKS benzeri sistemler uygulamaya geçtiğinde, biyoteknoloji-dışı tohum kullanmayı tercih eden çiftçilerin, tohum şirketlerinin arzı kontrol etmeleri nedeniyle zaman içinde ekecek tohum bulamayacaklarını bildirmektedir (Country Guide, 1998). Hansen ve Knudson (1996), yaptıkları bir araştırmada, tohum şirketlerinin uyguladıkları mevcut fiyat politikaları ile zaten saklama ihtimaline karşı kendilerini koruduklarını belirtmektedirler.

Rifkin’e göre TKS, “Pazarlama açısından bakıldığında mükemmel bir teknoloji, ancak sosyal açıdan bakıldığında endişe verici. Hayatın tohumlarını kimin kontrol ettiğinin sorusu bu” (TIME, 1999). Buna karşılık biyoteknolojinin etkilerine tüketici açısından yaklaşan Falck-Zepeda ise biyoteknoloji ile yapılan tarımda rantın büyük bölümünün firmalar ve çiftçiler arasında paylaşıldığını, ancak tüketicinin çok düşük bir kazancının olduğunu belirtmektedir (Falck-Zepeda ve ark., 1998).

Stanford Üniversitesi'nden Miller'e göre; "Bir patent kimseyi bir şey yapmaya zorlamaz. Sadece geliştiren kimseye ürün için zamana ve kaynaklara yaptığı yatırımı karşılaması için geçici monopollük verir. Bu (yani TKS), iyi bir sosyal pazarlıktır" (Nixon, 1999). Ancak, RAFI tipik bir patentin geçerlilik süresi 20 sene olmasına karşı, TKS benzeri bir biyolojik patente zaman kısıtlaması getirilmediği şeklinde görüş bildirmektedir (RAFI, 2000).

Eleştirilerin büyük çoğunluğu, TKS'nin dünya tarımını biyoteknoloji şirketlerinin monopolü altına alacağını öne sürmektedir. Bir karşılaştırma yapmak gerekirse, hibrid tohumlar için de benzer bir durum söz konusudur. TKS'nin hibrid tohumlardan farkı şöyle açıklanabilir: Hibrid tohumlarda her ne kadar özelliklerinin kontrolü zor olsa da ikinci kuşak tohumlara sahip olmak mümkündür. TKS ile üretilen tohumlarda ise ikinci kuşak tohumlara sahip olmak çok zorlaşmaktadır.

ABD'nin güneyinde, çiftçiler soyanın %50'sini saklamakta ama hibrid mısırın %100'unu satın almaktadırlar (Schuttrow, 1999). Berlan'a göre hibrid mısırın kullanıma geçmesi, tohumu bir ticari mala dönüştürmüştür. Özellikle 1934-1944 yılları arasında hibrid mısır 60-70 milyon dolarlık bir piyasa haline gelmiştir. 1988'de ise toplam satılan tohumların %30'unu oluşturarak, 1,6 milyar dolarlık bir hibrid tohum piyasası oluşmuştur (Lim, 1992). Ancak, TKS'ne getirilen eleştirilerde, çiftçi üzerindeki etkileri hakkında hibrid tohumlarla olan benzerlikten bahsedilmemektedir.

26.5. TKS'nin Bugünkü Konumu ve Amerikan Tarımındaki Uygulamalar

1970 yılında yürürlüğe giren ve Kasım 1994'de düzenlemeye tabi tutulan Bitki Çeşitlerini Koruma Kanunu (Plant Variety Protection Act)'na göre tohum saklayan çiftçiler, tohum üreticilerinin gördüğü zararın üç katına kadar tazminat ödemek zorunda kalabilirler.¹² Ancak, Monsanto "Roundup Ready" ürünlerinin patentini almış durumdadır. Patent Kanunu'na göre çiftçilerin patenti alınmış ürünlere ait tohumları saklaması yasa dışıdır. Ne var ki, yasadışı uygulamada bulunan çiftçilerin takibi yüksek maliyetleri beraberinde getirmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki yasal uygulamalarda sorunlar çıkabileceği düşünülürse, TKS'nin çiftçiyi takip etme ve yasal uygulamalardan doğacak maliyet ile diğer sorunlara karşı geliştirildiği ortaya çıkmaktadır.

Monsanto'nun 1996 yılına ait "Roundup Ready" Soya Sözleşmesi'ne göre yetiştirici torba başına 5 dolar "teknoloji ücreti" ödeyecektir (hektar başına 35 dolar). Yetiştirici, 3 sene boyunca tarlasında tohum sakladığından şüphelenilirse araştırma yapılmasına izin verecektir. Yetiştirici sözleşme hükümlerine aykırı davranışta bulunursa, teknoloji ücretinin 100 katını, yasadışı kullanılan tohum ücretlerini ve tüm hukuki masrafları karşılayacaktır. Yetiştirici satın aldığı tohumu saklama ya da yeniden ekme hakkından vazgeçecektir. Ancak, gelen tepkiler neticesinde

Monsanto 1997 ve 1998 anlaşmalarında tarlada araştırma yapılmasına yönelik maddeyi kaldırmıştır (Reimann, 1998; Guidetti, 1998).

Yine, Monsanto'nun 2000 yılı Teknoloji Anlaşması'na¹³ göre yetiştirici tohum saklarsa, anlaşma hükümleri dışında yetiştirme amaçlı tohum satar ya da elde ederse, uygulanan teknoloji ücretini 120 katını ödemeyi kabul edecektir. Benzer şekilde yetiştirici gelecekte de anlaşma yapma hakkından vazgeçecektir. Monsanto'nun uygulamaya koyduğu bir başka korunma yöntemi de, "Roundup Ready" tohum kullanılarak ekilen ürünlerin sadece "Roundup Ready"e dayanıklı herbisitlerle ilaçlanabilmesidir. Anlaşma bu konuda da Monsanto ürünlerinden başka bir herbisit kullanıldığında ürün ve performans garantisi verilmeyeceğini vurgulamaktadır. 1999 yılında Monsanto'nun "teknoloji ücretleri"nden 200 milyon dolar gelir elde etmesi beklenmektedir.¹⁴

Monsanto'nun ücretsiz telefon hattına yasadışı tohum kullandığından şüphelenilen kişileri "şikayet etmek" mümkündür. Yasa dışı tohum kullananlara savaş açan Monsanto, anlaşma hükümlerine uymayan üreticiler hakkında ABD ve Kanada'da 600'e yakın dava açmış bulunmaktadır (Financial Times, 1999).

Rockefeller Vakfı başkanı Conway, Monsanto'ya hitaben şöyle demektedir: "Tarımsal tohum endüstrisi, tohum kısırlaştırmasını hedefleyen Terminatör Teknolojisinin kullanımını kabul etmemelidir... Fakirleri dürüst bir diyalogla eşit ortaklar olarak kabul etmek daha iyi olacaktır... Yatırımlarınızın getirisi, yeni piyasalara giriş, sürekli büyüme ve ticari konularla ilgilendiğinizi kabul edin."¹⁵

RAFI'nin bildirdiğine göre 1999 yılında en az 7 yeni Terminatör patenti alınmış durumdadır. Panama, Hindistan, Gana ve Uganda hükümetleri Terminatör Teknolojisine karşı olduklarını açıkladılar. Aynı şekilde FAO direktörü Diouf da Terminatör genlerine karşı olduklarını bildirmektedir (RAFI, 2000).

26.6. Sonuç

4 Ekim 1999'da Monsanto'nun yönetim kurulu başkanı Shapiro, Rockefeller Vakfı başkanı Conway'e gönderdiği mektupta; Size Terminatör benzeri steril tohum teknolojilerini ticarileştirmeyeceğimiz konusunda kamuoyuna taahhütte bulunduğumuzu söylemek için yazıyorum" demektedir. Daha sonra Shapiro şöyle devam ediyor: "...Monsanto tohumların sterilize edilmesini gerektirmeyen teknolojik yaklaşımlar üzerinde patentlere sahiptir, bunlar sadece biyoteknolojik katma-değer özelliği sağlayan genleri hareketsiz duruma geçirecektir. Şu an için bu teknolojileri geliştirmeye yönelik kaynaklara yatırım yapmıyoruz, ancak bu teknolojilerin gelecekteki gelişmelerini ve gen koruması ya da muhtemel tarımsal yararları için kullanımlarını iptal etmedik" (Monsanto, 1999). Collins ise "TKS üzerinde çalışmaya devam ediyoruz. Aslında hiç yavaşlamadık. TKS'ni ticarileştirme hedefi üzerindeyiz. Aslında hiç geri çekilmedik." (Agra/Industrial Biotechnology Legal Letter, 2000) şeklinde görüşünü bildirmektedir. Bir diğer gelişme ise, 26-27

Temmuz 2000 tarihlerinde USDA'nın danışma kurulu yaptıkları toplantıda Delta & Pine Land ile olan anlaşmalarını yasal olarak hakları olduğu halde, tek taraflı olarak iptal etmemeye karar vermeleridir (RAFI, 2000).

Bu yorumlar ve gelişmeler ışığında her ne kadar Monsanto kamuoyunda geri adım atmış gibi gözüktense de, aslında sadece "ortalığı yatıştırmaya" yönelik bir politika izliyor bir konumda gözükmektedir. Bugün için Terminatör Teknolojisi uygulamadan henüz uzaktır. Böyle bir teknolojinin tohum sektöründe kullanılmaya başlamasından önce uzun bir deneme aşamasında geçmesi gerekmektedir. Yukarıda belirttiğimiz gibi özellikle Fikri Mülkiyet Hakları açısından, biyoteknoloji şirketleri yaptıkları yatırımları ve harcamaları karşılamaları için böyle bir teknoloji gerekli görünmektedir. Saklanan tohumlar çiftçilere haksız bir kazanç sağlamaktadır. Gelişmekte olan ülkelerdeki yasaların Fikri Mülkiyet Haklarını korumaktan uzak olması da, biyoteknoloji şirketlerinin tezlerini güçlendirmektedir. Her ne kadar biyoteknoloji şirketlerinin mevcut fiyat politikaları ile zaten kar ettikleri öne sürülse de, kesin karar vermeden önce bu alanlarda detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Duruma TKS'nin negatif yönleri açısından baktığımızda, genel olarak genetik değişime uğramış organizmalar için de söylendiği gibi, teknolojinin uzun vadeli etkilerini kestirmek şu an için mümkün değildir. "Etiketlendirme" benzeri tüketiciye seçme hakkının tanındığı uygulamalarda bulunmak gıda maddeleri için mümkündür. Ancak, yukarıda belirtildiği gibi eğer biyoteknoloji şirketleri biyoteknoloji-dışı tohumların arzını azaltırlarsa, böyle bir uygulama da fazla yarar sağlamayacak gibi gözükmektedir. Seçim hakkı mevcut olduğu müddetçe çiftçiler kendileri için en uygun tohumu seçebileceklerdir. Ne var ki biyoteknoloji şirketleri de kar maksimizasyonu amacıyla sadece TKS benzeri sistemlere sahip tohumları üretmede ısrar edebilirler.

Yukarıdaki bilgiler ışığında TKS ve benzeri sistemler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmasının gerekli olduğuna inanıyoruz. Sistemin etkilerini; ekonomik, biyolojik ve hukuksal açılarından incelemek gerekmektedir. Bugün için bir sonuca varmak oldukça zor gözüktense de, yeni gelişmeler ve araştırmalar TKS hakkında daha belirgin görüşler edinmemize yardımcı olacaktır.

TKS ve Fikri Mülkiyet Hakları hakkında ek bilgi için bkz. Crouch (1998), Goss (1996), Spillane (1999), Santaniello ve ark. (2000)

Dipnotlar Listesi

- ¹<http://www.rafi.org>, "The Monster Strikes Again", 6 Haziran 1998
- ²Monsanto'nun kullanıma sunduğu ürünlerden bazıları: 1976 yılında Roundup herbisitleri ve ilk biyoteknoloji ürünü olan Posilac bovine somatotropin (BST)
- ³Daha sonra da Monsanto ve Pharmacia & Upjohn birleşerek Pharmacia'yi oluşturdular.
- ⁴<http://www.monsanto.com/monsanto/gurt/default.htm>
- ⁵<http://www.rafi.org>
- ⁶Terminator sisteminde kullanılan özel genetik yapılar ve çalışma sistemine ait açıklamalar için bkz. Oliver ve Velten, 2000.
- ⁷<http://web.css.orst.edu/Resources/Vendors/Seed/RSI/Producers.html>, 26 Şubat 2000 tarihinde indirilmiştir.
- ⁸TKS'nin üretim maliyeti ise USDA'nin 190,000 dolar ve Delta and Pine Land'in 530,000 dolarlık katkısı ile gerçekleşmiştir (bkz. Guidetti, 1998).
- ⁹Harry Collins, Delta and Pine Land şirketi teknoloji transferinden sorumlu başkan yardımcısı.
- ¹⁰http://www.biotechknowledge.com/showlib_biotech.php3?621, 8 Nisan 2000 tarihinde indirilmiştir.
- ¹¹Ontario (Kanada) Soya Yetiştiricileri Kurulu Yöneticisi
- ¹²<http://www.ams.usda.gov/science/PVPO/pvpa~1.htm>, Bölüm:124, 9 Kasım 2000 tarihinde indirilmiştir.
- ¹³Monsanto Technology Value Package. 2000 Technology Agreement.
- ¹⁴<http://www.ghorganics.com/Seedviolator.html>, 8 Kasım 2000'de indirilmiştir.
- ¹⁵<http://www.rockfound.org>, 9 Kasım 2000'de indirilmiştir.

Kaynaklar

- Agra/Industrial Biotechnology Legal Letter. Terminator technology not terminated, Ocak 2000, Vol. 1, No. 1, Sayfa 4.
- Babaoğlu M, Özcan S (2001) Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 89-136.
- Barthelemy I, Martineau D, Ong M, Matsunami R, Ling N, Benatti L, Cavallaro U, Soria M, Lappi DA (1993) The expression of saporin, ribosome-inactivating protein from the plant *Saponaria officinalis*, in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 268(9): 6451-6548.

Bayley CC, Morgan M, Dale EC, Ow DW (1992) Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the CRE-LOX site-specific recombination system. *Plant Mol. Biol.*, 18(2): 353-361.

Country Guide, <http://www.agcanada.com>, Kasım 1998.

Crouch ML (1998) How the terminator terminates: an explanation for the non-scientist of a remarkable patent for killing second generation seeds of crop plants. <http://www.bio.indiana.edu/people/terminator.html>

Dale EC, Ow DW (1990) Intra-and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, 91(1): 79-85.

Falck-Zepeda JB, Traxler G, Nelson RG (1999) Rent creation and distribution from biotechnology innovations: the case of Bt cotton and herbicide-tolerant soybeans. <http://agecon.lib.umn.edu/ne165.html#transit>, Haziran 1999.

Fernandez-Cornejo J, Klotz-Ingram C, Jans S (1999) Farm-level effects of adopting genetically engineered crops in the U.S.A. <http://agecon.lib.umn.edu/ne165.html#transit>, Haziran 1999.

Financial Times, 13 Temmuz 1999.

Gad AE, Rosenberg N, Altman A (1990) Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant.*, 79(1): 177-183.

Gatz C (1995) Novel inducible/repressible gene expression systems. *Methods in Cell Biol.*, 50:411-424.

Gatz C, Froberg C, Wendenburg R (1992) Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promotor in intact transgenic tobacco plants. *Plant J.*, 2(3): 397-404.

Gatz C, Lenk I (1988a) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci.*, 3(9): 352-358.

Gatz C, Quail PH (1988b) Tn10-encoded Tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(5): 1394-1397.

Goss, PJ (1996) Guiding the hand that feeds: toward socially optimal appropriability in agricultural biotechnology innovation. *California Law Review*, 84: 1395-1436.

Guidetti G (1998) <http://www.homehealthresource.net/terminator.html>, 5 Haziran 1998 sayfa 3.

Gürel E, Türker AU (2001) Organogenesis. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 36-70

Hansen L, Knudson M (1996) Property right protection of reproducible genetic material. *Rev. Agr. Econ.*, 18(3): 403-414.

Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.*, 19(1): 15-38.

- Horsch RB (1993) Commercialization of genetically engineered crops. *Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci.*, 342 (1301): 287-291.
- Ingram HM, Power JB, Lowe KC, Davey MR (1999) Optimisation of procedures for microprojectile bombardment of microspore derived embryos in wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 57 (3): 207-210.
- James C (2000) <http://www.isaaa.org/briefs/Brief21.htm>, 24 Aralık 2000.
- Lim PW (1992) The Privatization of Species: An Economic History of Biotechnology and Intellectual Property Rights in Living Organisms. Doktora Tezi, Stanford Üniversitesi, Aralık 1992.
- Maenpae P, Gonzalez EB, Ahlandsberg S, Jansson C (1999) Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment. *Mol. Biotechnol.*, 13(1): 67-72.
- Medberry SL, Dale E, Qin M, Ow DW (1995) Intra-chromosomal rearrangements generated by CRE-LOX site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.*, 23(3): 485-490.
- Monsanto (1999) <http://www.monsanto.com/monsanto/gurt/default.htm>, 8 Kasım 2000.
- Neuhaus G, Spangenberg G (1990) Plant transformation by microinjection techniques. *Physiol. Plant.*, 79(1): 213-217.
- Nixon L (1999) Knight Ridder News Service, <http://www.kri.com>, 8 Ağustos 1999.
- Odell J, Ciani P, Sauer B, Russell S (1990) Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 223(3): 369-378.
- Odell JT, Hoopes JL, Vermerris W (1994) Seed-specific gene activation mediated by the CRE/LOX site-specific recombination system. *Plant Physiol.*, 106(2): 447-458.
- Oliver MJ, Trolinder NLG, Keim DL, Quisenberry JE (1998) Control of plant gene expression. US Patent #5,723,765.
- Oliver MJ, Velten J (2000) Development of a genetically based seed technology protection system. In: Wilson RF (ed), *GMO Proceedings*, AOCS Press.
- Özcan S, Babaoğlu M, Sancak C (2001) Somatik Embryogenesis. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed.) *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s. 71-88.
- Potrykus I, Paszkowski J, Saul M, Kruger-Lebus S, Muller T, Schocher R, Negrutiu I, Kunzler P, Shillito RD (1985) Direct gene transfer to protoplasts: An efficient and generally applicable method for stable alterations of plant genomes. *UCLA. Sym. Mol. Cell Biol.*, 35: 181-199.
- RAFI (1999). *Traitor Technology: The Terminator's Wider Implications*. <http://www.rafi.org>, Ocak 1999
- RAFI (2000). Terminator two years later, <http://www.rafi.org>, 12 Mayıs 2000.
- Reimann S (1998) <http://stratsoy.ag.uiuc.edu/archives/experts/production/0028.html>, 18 Mayıs 1998.

Rifkin J (1998) *The Biotech Century*, Tarcher/Putnam, sayfa 48.

Roder FT, Schmulling T, Gatz C (1994) Efficiency of the tetracycline-dependent gene expression system: complete suppression and efficient induction of the *rolB* phenotype in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 243(1): 32-38.

Santaniello V, Evenson RE, Zilberman D, Carlson GA (2000) Agriculture and intellectual property rights: economic, institutional and implementation issues in biotechnology. CABI Publishing (<http://www.cabi.org>).

Schuttrow C (1999) *Twin States Farmer Dergisi*, Mayıs 1999.

Sparks Companies, Inc. (1998) *Biotechnology: fundamentally reshaping the agriculture, food and fiber industry*, Kasım 1998.

Spillane C (1999) *FAO Commission on Genetic Resources For Food and Agriculture: Recent Developments in Biotechnology as They Relate to Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Background Study Paper No: 9.*

Swanson T, Goschl T (2000) Property right issues involving plant genetic resources: Implications of ownership for economic efficiency. *Ecol. Econ.*, 32: 75-92.

TIME (1999) <http://www.time.com/time/magazine/articles/0,3266,18814-2,00.html>, 1 Şubat 1999.

Zupan JR, Zambryski P (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.*, 107(4): 1041-1047.

Bölüm 27

Biyoteknolojinin Ahlaki ve Hukuki Yönleri

Nazimi Açıkgoz¹, Nevin Açıkgoz², Muzaffer Tosun³

¹Ege Üniversitesi, Tohum Teknolojisi Araştırma ve Uygulama Merkezi, Bornova, İzmir

²Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir

³Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir
e-posta: acikgoz@agr.ege.edu.tr¹

27.1. Giriş

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru biyoloji biliminin tüm bulguları birleştirilerek insanoğlunun tarımsal ürün gereksiniminin karşılanmasında büyük adımlar atılmıştır. Eldeki koşullara göre ve amaca yönelik tarımsal üretim için gerekli olan genetik materyalin oluşturulmasında, yakın zamana kadar ağırlıklı olarak klasik bitki ıslahı yöntemleri kullanılmıştır. Klasik bitki ıslahı bundan sonra da doğal olarak kullanılacak olmakla birlikte, kişi başına düşen tarımsal alanın giderek azalması nedeniyle tarımsal ürünü artıracak verim artışının sağlanmasında yeterince hızlı olamayacağı bir gerçektir. İşte bu aşamada, 20. yüzyılın son yarısında öne çıkan ve genetik mühendisliğini kullanan bitki biyoteknolojisi, klasik bitki ıslahının görevini üstlenmeğe başlamıştır. Biyoteknoloji, bitki ıslahında arzu edilen gen kombinasyonları için yepyeni bir çıkış açmış; tür, cins, takım ve sınıfların yanında başka alemlerden veya canlılardan da gen transferini mümkün kılmıştır.

1980'li yılların sonuna doğru, çoğu "aile şirketi" olan tohumculuk firmalarının (özellikle ilaç firmalarınca) satın alınmaları veya birleşmeleri başlamıştır. Aynı süreçte, ağırlığın kamu ve üniversitelerde olduğu, bitkiye yönelik temel ve uygulamalı araştırmalar, özel sektöre doğru yönelenmeğe başlamıştır. Bu doğa bilim

firmaları, 1981-82 yıllarında tarımsal araştırmalara ayırdıkları 4 milyar dolarlık (\$) meblağı, 1993 yılında 7 milyara çıkarmışlardır. Aynı süreçte kamu kesiminin biyoteknolojik yatırımlara ayırdığı miktarda ise bir değişiklik olmamıştır. Örneğin, **CGIAR** (Consultative Group on International Agricultural Research: Uluslararası Tarımsal Araştırmalar Danışma Grubu)'ın 340 milyon dolarlık yıllık bütçesinin ancak %7'si biyoteknolojiye yöneliktir.

Aynı dönemde teknolojinin diğer dallarında da benzer yenilikler ve firma birleşmeleri izlenmiş, ticari bulguların kopyalanması söz konusu olmuş ve yeni fikri gelişmelerin yasal olarak koruma altına alınması zorunluluğu ortaya çıkmıştır. İşte bu aşamada kamuoyunun pek bilmediği fikri eserlerin korunması ile ilgili olarak Dünya Ticaret Örgütü (World Trade Organization: **WTO**) ile birlikte Uluslararası Yeni Çeşitleri Koruma Birliği (International Union for the Protection of New Varieties: **UPOV**), Dünya Fikri Mülkiyet Hakları Organizasyonu (The World Intellectual Property Organization: **WIPO**) ve Ticari Fikri Mülkiyet Hakları (Trade Related Intellectual Property Right: **TRIPS**) gibi uluslararası örgütler oluşturulmuştur. Fikri eserlerle ilgili kopyalamaların ortadan kaldırılması veya bundan doğan zararların giderilmesine yönelik uluslararası yasaların hazırlanması ve uygulanması söz konusu bu örgütlerin ana uğraş alanını oluşturmıştır.

Tarımsal biyoteknolojideki gelişmelerin (özellikle yasal boşluklardan yararlanarak) ticari bakımdan teknoloji sahiplerinin aleyhine işlemesi, olayın ahlaki yönüne dikkatleri çekmiş; bu ahlaki olaya bu kez başka bir ahlaki olayla (Terminatör Teknolojisi veya Teknoloji Koruma Sistemi, bkz. Bölüm 26) yanıt verilmesi *biyoteknolojide ahlak* kavramının çok iyi irdelenmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

WTO' nun dünya pazarlarında serbest ticaretle ilgili kararlarının (Uruguay kararları-transgenik çeşitlerin pazarlanmasında bilimsel gerekçe olmadan hayır denemez !) ve canlılara yönelik patentleme işlemlerinin her ülke veya toplumda farklı şekillerde uygulanması, "**biyoetik**" adında bir bilim dalının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Aslında bu olay transgenik çeşitlerin geliştirilmesinden çok önce başlamıştır. Melez mısır geliştirmelerinde ana-baba hatlarla ilgili mahkemeler bundan 70 yıl önce gündeme gelmiş olup halen de güncelliğini korumaktadır.

Biyoteknolojideki gelişmelerin tarlaya aktarılması da bir seri sorunu beraberinde getirmiştir. Çevrede, organik (ekolojik) tarıma yönelik bir uygulamanın olması veya bir türün yabancı formlarının varlığı durumlarında, özellikle yabancı döllenlen transgenik çeşitlerde "**gen kirliliği**" diye tanımlanan kavram öne çıkmıştır. 2000 yılında Kanada'dan değişik ülkelere (İngiltere, Fransa, Almanya ve İsveç) ihraç edilen klasik kolza tohumlarının düşük oranda da olsa, transgenik çeşit tarlalarından kaçan genlerle bulaşık olması; olayın ticari, hukuki, biyolojik ve ahlaki sorunlar yumağının ilk örneklerini oluşturmakta ve "**Biyo-güvenlik Anlaşması**"nın önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

2000 yılında Kanada'nın Montreal kentinde son şekli verilen ve Nairobi (Kenya)'de Mayıs 2000'de 64 ülke tarafından imzalanan biyo-güvenlik anlaşmasının maddelerinden birini oluşturan “**etiketleme**”, biyoteknolojide ahlakın ön plana çıktığının bir göstergesidir. Aslında etiketleme olayı, Avrupa'nın biyoteknoloji ürünlerine hayır diyemeyeceği bir formül olmasının yanı sıra, “tüketicinin ne yediğini bilmesinin en doğal hakkı olduğunun” yansımasıdır. İşte bu nedenlerle, yıllarca bilinçsizce **transgenik** ürün tüketen ABD ve Kanada'da oldukça yeni bir hareketin başlaması söz konusu olmuştur. Bu yönde uluslararası örgütler, sorunları küresel olarak ele almakta ve çözüm üretmektedir. Nitekim FAO ve WHO örgütlerinin ortak komisyonu (**Codex Alimentarius**) etiketleme ile ilgili teknik işlevi, biyo-güvenlik sözleşmesi çerçevesinde ele almaktadır.

Uluslararası ve çok-uluslu şirketlerin, tarımsal biyoteknolojiye yaptıkları yatırımların böylesine öne çıkması karşısında bilinçlenen “**Greenpeace**”, “**Friends of the Earth**”, “**RAFI**” (Rural Advancement Foundation International), “**GRAIN**” (Genetic Resources Action International) gibi sivil toplum örgütleri, biyoteknolojinin ahlaki ve hukuki yönlerinin tartışma ortamına taşınmasında öncülük yapmışlardır. Diğer taraftan; konu, “Biyo-güvenlik”, “Gıda güvenliği” ve “Fikri Eserler Kanunu-İslahçı Hakları” gibi üç başlıkta toplanmaya çalışılırken, bunlar farklı bilimlere, mesleklerle, sorumlu bakanlıklara odaklanmış ve sonuçta 21. yüzyıla girerken çözülmemiş bir seri sorunlar yumağı ile karşı karşıya kalınmıştır.

Biyoteknolojide ahlakın en çarpıcı biçimde öne çıkacağı başka bir kavram da *biyo-korsanlık*tir. Sahibi olan şahıs, şirket veya ülkenin bilgisi dışında yasal boşluklardan yararlanarak biyolojik materyalin herhangi bir şekilde tescili veya patenti yoluyla ticari avantaj sağlamak, ne yazık ki çok yeni bir uygulama olarak yetkilileri düşündürmektedir.

27.2. Fikri Mülkiyetle İlgili Gelişmelerin Tarihçesi

Fikri eserlerin korunmasına yönelik haklar; buluş sahiplerinin veya yeni bir bilgi üretenlerin, haklarının korunması veya ödüllendirilmesine yönelik olarak çıkarılan kanunlar dizisi olarak tanımlanabilir. Bilgi; tüketilen maddelerden farklı olarak çok sayıda kişi tarafından her hangi bir kısıtlama olmaksızın rahatlıkla paylaşıldığından, fikri eserlerin korunması için girişimler zaman içinde giderek artmış ve büyük ilgi görmüştür. Fikri mülkiyet, yaratıcı çalışmaların ekonomik olarak korunmasını sağlayan geniş kapsamlı bir terimdir. Fikri mülkiyet hakları genellikle her ülkede ulusal yasalarla düzenlenmektedir. Bu yasaların amacı, buluşu yapan kişinin belirli bir sürede kişisel olarak istismar edilmesini önlemek, yaratıcılığı teşvik etmektir. Fikri mülkiyet kavramı, dünyada uzun bir süredir kullanılmaktadır. Fikri eserlerin korunmasına yönelik girişimler çok eskilere (MÖ 2000) kadar uzanmaktadır. Bu hakkın, patent olarak ilk korunması 14. yüzyılda İngiltere’de ve 15. yüzyılda Venedik’te başlamıştır. 18. yüzyıldan itibaren endüstri devrimi ve ulusal pazarlardan uluslararası pazarlara geçilmesiyle, fikri mülkiyetin korunması uluslararası yasaların

konusunu oluşturmuştur. Endüstriyel devrimle beraber birçok ülkede patent korumaya yönelik uygulama başlatılmıştır. 1877 yılında Almanya'da patent korumaya yönelik kanunlar devreye girerek, gıda, ecza ve benzeri ürünlerin dışında kalan yeni buluşlara patent hakkı verilmiştir. Endüstriyel tasarımlar, ticari markalar ve patent haklarının düzenlenmesi için 1883'te Paris Antlaşması; telif hakları, fikri ve sanat eserlerinin korunması için de 1886'da Bern Antlaşması imzalanmıştır. Bununla beraber, teknolojik gelişmeler sonucunda, mevcut kurallara kolaylıkla uymayan çok sayıda fikri mülkiyet hakkı ortaya çıkmıştır. Bitki ıslahı tekniklerindeki yenilikler, 1961 yılında imzalanan UPOV ve 1992 Rio Dünya Zirvesi'nde biyo-çeşitlilik kaynaklarının korunmasına yönelik görüşlerde, fikri mülkiyet hakları sürekli ön planda tutulmuştur.

1988 yılında, patent koruma hakkının uygulandığı ülke sayısı 115'e ulaşmıştır. Ancak, bu ülkelerin 50'den fazlasında bitki ve hayvan çeşitlerine yönelik biyolojik buluşlar, patent koruma kapsamı dışında tutulmuştur.

Bitki ıslahının günden güne gelişim göstermesiyle, bitki ıslahçılarındaki emek vererek geliştirdikleri çeşitlerinin koruma kapsamında olması gerektiği görüşü oluşmuş ve bu konudaki girişimler sonucunda, 1930'larda ABD'de yeni geliştirilen bitki çeşitlerinin korunması konusunda bazı düzenlemelere gidilmiştir. Avustralya'da uygulanan patent sistemine göre de, yeni geliştirilen bir çeşide patent hakkı ödenmesi şansı doğmuştur. Fikri eser haklarının, endüstriyel ve tarımsal boyutu birbirinden ayrı olarak gelişim göstermiş olmakla beraber, zaman içinde her iki sektörde de çarpıcı gelişmeler olmuştur. Amerika ve Avustralya'da patent ve benzeri sistemler hem endüstriyel ve hem de tarımsal alanlarda uygulanırken, başta Avrupa ülkeleri olmak üzere diğer birçok ülkede tarımsal alanda fikri mülkiyet hakları UPOV'un ıslahçı hakları kapsamında ele alınmıştır. Son zamanlarda, bu alanda biyoteknolojide yeterince gelişmenin sağlanamaması nedeniyle, tarımsal alanda patent uygulamalarının başlatılması için yasal düzenlemelere gidildiği bilinmektedir.

27.3. Biyoteknoloji ve Fikri Mülkiyet Hakları - Patent Sistemi

ABD ve Avustralya'da kullanılan patent ve benzeri sistemler değişik şekillerde tarımsal amaçlı buluşların korunmasını mümkün kılmaktadır. Bunlar:

a) Patent sistemi:

Buluşlara, araştırma veya ticari tipte patent verilmesidir. Böylece genetik materyal de artık lisans almış ve koruma altına alınmaya başlanmıştır.

b) Materyal transfer anlaşmaları:

Bu tip anlaşmalar genelde CGIAR'ın ilgi alanına giren araştırma kuruluşları veya gen merkezleri ile tohum ıslah firmaları arasında güvence dayalı depolama, araştırma

ve ticarete yönelik birçok maddeyi içeren sözleşmeler olarak tanımlanır. Bu maddelerde ticari gizlilik veya tescil gibi koruyucu hükümlere ek olarak kullanım hakkını araştırmaya veya tekrar satmaya ve ticarileştirmeye izin verilmesi gibi hususlar da eklenebilir.

c) Çuval-etiket sistemi:

Tanımı yapılmış bir genetik materyalin bulunduğu çuval-paket ve bunların etiketlerinde belirtilen içeriğin, korunma altına alınmış bir genetik materyal olduğunun belirtilmesi şeklinde olması, dolaylı bir yasal koruma biçimidir.

d) Teknoloji kullanma anlaşması:

Bir firmanın ürettiği bir teknolojinin, bölgede hakim olan bir başka firmaca kullanılabilmesi için yapılan anlaşma şeklidir. Örneğin, A firmasının tuza dayanıklı bir çeşidinin, B firmasının hakim olduğu bölgede, yine B firmasının üretiminin yapılması için böyle bir anlaşmanın varlığı gerekir. Bu tip korumalarda genelde, yeni bir çeşit geliştirilmeyeceği doğrultusundaki maddeler sözleşmeye konmaktadır.

e) Ticari gizlilik:

Firmalar arası özellikle yasal olmayan eleman değişimi sırasında genetik materyal transferleri (kaçırmaları) de olabilmektedir. Parmak izi gibi biyoteknolojik yöntemlerle, yasal olmayan bu tür teknoloji kaçırımları ispatlanabilmektedir. Böylece ticari gizliliğin kontrolü mümkün olabilmektedir.

Biyoteknolojideki ilerlemelerle beraber, fikri eserler kanununun öne çıkmasına neden olan gelişmeler yaşanmıştır. Gerek yasal gerekse teknik açıdan, yeni geliştirilen bir çeşidin üçüncü şahısların kullanımına açılması durumunda, çeşit sahibinin ticari geleceğinin olumsuz etkilenebileceği bir gerçektir. İşte bu nedenle, dünya varlıkları olarak kabul edilen canlıların patentlenmesi konusundaki görüşler değişmeye başlamış ve 1980 yılında General Electrics firması, petrol yiyen bir bakteri türü için patent almıştır. 1985 yılında artık tohum, bitki ve dokular da patentlenebilir olmuştur. Araştırma ve yatırım sahiplerinin lehine alınan bu tür kararlar sonucunda; 1985 yılında ABD’de, 1988 yılında da Avrupa’da transgenik bir çeşide patent verilmiştir. Patentleme işinde öylesine bir patlama yaşanmıştır ki, ABD’de bir yılda milyonlarca patent başvurusu olmuştur. Zaman içinde, patent bürolarının bazı onayları mantık dışına taşmaya başlamıştır. Örneğin, Amerika’da genetik mühendisliği tekniğiyle elde edilen pamuk genetik materyalinin bir firmaya patentlenmesi gibi. 1991 yılında gerçekleşen bu olay memnuniyetle belirtmek gerekir ki mahkemelerce iptal edilmiştir. Diğer taraftan rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle; biyoteknolojik araştırmalarda, kamu araştırmacılarının araştırma sonuçları da hızla özelleştirilmeye başlamıştır. İşte bu aşamada, biyoteknolojide ahlak kavramı ön plana çıkmıştır. Biyoteknolojinin ahlaki boyutunun en çarpıcı örneğini, 1992 yılında talep edilen bir patent oluşturmaktadır.

Daha sonra başka bir firma tarafından satın alınan bir firma, biyoteknolojik yöntemlerle pamukta geliştirdiği dayanıklılığı takiben, bundan sonra pamukta yapılacak tüm biyoteknolojik buluşların patentini de almıştır. Bu patent 1993 yılında mahkeme kararıyla iptal edilmiştir.

Uluslararası kurallarla bütünleştirilen TRIPS ile, WTO'ya üye ülkelerin zorunlu olarak kabul ettikleri bir sözleşme oluşturulmuştur. Bu sözleşme, fikri mülkiyet yasaları ve uygulama rejimleri için asgari standartları ortaya koymaktadır. 1995 yılında imzalanan TRIPS sözleşmesine uymaları için gelişmiş ülkelere 1, gelişmekte olan ülkelere 4, az gelişmiş ülkelere ise 10 yıllık bir süre tanınmıştır.

Fikri mülkiyet haklarının en önemlisi patent hakkı olup, bu korunmanın sağlanabilmesi için aşağıdaki koşullar gereklidir:

1) **Patentlenebilirlik:** Buluşların uluslararası korunmasını sağlayan TRIPS antlaşmasının 27. maddesinde, patentlerin bütün teknoloji alanındaki buluşlara uygulanabileceği; buluşların çevre, hayvan, insan ve bitki sağlığını olumsuz yönde etkilememesi ve ahlaki olması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca, "*mikroorganizmalar dışındaki bitki ve hayvanların, biyolojik olmayan veya mikrobiyolojik süreçler dışındaki bitki ve hayvanların elde edilmesinde kullanılan biyolojik işlemlerin*" patent dışında tutulması ise antlaşmayı onaylayan devletlerin insiyatıfine bırakılmıştır. Yani antlaşmayı imzalayan devletler isterlerse, bitki çeşitlerinin korumasını, ya patent, ya da çeşit tescili veya kombine bir sistemle yapabileceklerdir.

2) **Buluş olması:** Bir biyoteknolojik yeniliğin patentlenebilmesi, bu yeniliğin bir buluş olmasına bağlıdır. Biyoteknolojideki yeni gelişmeler, araştırmacıların buluşları sonucu ortaya çıkmıştır, yani yeni buluş niteliğini taşımaktadır. Ancak Amerikan Yüksek Mahkemesi, 1948'de bir bilim adamının bakteriyel hat kombinasyonunu buluş olarak yorumlamamış, bir ürünün yeni ve faydalı olmasından ziyade patentlenebilir yapıda olması gerektiğini ifade etmiştir. Daha sonra aynı yüksek mahkeme 1980 yılında petrol kirliliğine karşı kullanılan bir melez bakterinin, insan buluşu olduğunu ve araştırma sonucunda elde edildiğini, bu nedenlerle de patentlenebileceğini belirtmiştir. Böylece yüksek mahkeme, bakterinin tabii yollarla meydana gelmesi sonucunda farklı olmasıyla, genetik müdahale yoluyla bakterinin değiştirilmiş olmasını ayrı değerlendirmiştir. Bunun üzerine ABD Patent Ofisi, melezleme ve genetik mühendisliği yolu ile oluşturulan mikroorganizmalar için patentler hazırlamıştır. Son zamanlarda Agreetus firmasına, pamuk bitkisine "*br*" geninin aktarılmasına ilişkin bir patent verilmiştir. Ancak bu patent, bunun bir yöntem olduğu ve bu yöntemin diğer bitkilere de uygulanabileceği görüşüyle oldukça fazla eleştiri almıştır.

3) **Yenilik olması:** Yenilik, bir buluşun pazara sunulması durumunda onun daha önceden icat edilmemiş olması demektir. Koruma, buluşun diğer kişiler tarafından bir daha icat edilmesine kısıtlama getirmektedir. Bitki çeşitlerinin patentlenmesinde,

bu konu ayrıcalık gösterebilmektedir. *Phytophytora* kök çürüklüğüne dayanıklı bir soya çeşidi için patent talep edildiğinde bu konu ABD Patent Ofisinin dikkatini çekmiştir. Çünkü patentlenen soya bitkisinin *Pyhtophyotora* kök çürüklüğüne dayanıklılığının, bilinen dayanıklılık sisteminden farklı olduğu iddia edilmiştir.

4) *Endüstriyel uygulanabilirlik*: Patentlenebilmenin önemli bir koşulu da bir buluşun endüstriyel uygulanabilirliğinin olması, ürünlerin veya sonuçların bir işlemle elde edilebilmesidir. Tarımsal patentlerde de bunların dikkate alınması gerekir. Bahçe tarımı endüstrisinde yabancı ot öldürme işleminin endüstriyel bir uygulama olduğu, Avustralya Yüksek Mahkemesi tarafından kabul edilmiştir.

Biyoteknolojik olarak elde edilen yeni transgenik bitki ve organizmaların patentlenebilmesi için yukarıda sayılan özellikleri kapsamı gereklidir. Patentler, bir patent bürosu tarafından gerçekleştirilen tescil işlerinden sonra onaylanmaktadır. 1970 yılında Uluslararası Patent İşbirliği Antlaşması hazırlanmış ve bunu imzalayan ülkelerde bu antlaşmaya uygun olarak onaylanan patentlerin, imza koyan diğer ülkelerde de geçerli olacağı belirtilmiştir.

27.4. Biyoteknoloji ve Fikri Mülkiyet Hakları - İslahçı Hakları

Araştırma çalışmaları sonucunda gerçekleştirilen buluşların patentlenme yoluyla koruma altına alınması, önceleri her ülkenin kendi iç hukuk düzenlemesi şeklindeyken, günümüzde tüm ülkelerin katıldığı uluslararası antlaşmalara konu olmaktadır. Buna bağlı olarak biyoteknoloji konusunda yapılan çalışmalara da patent konmasına ilişkin yasal düzenlemeler gerek ülkesel patent kanunları ve gerekse TRIPS gibi uluslararası antlaşmalarla gerçekleştirilmektedir.

Biyoteknoloji ürünlerinden kar bekleyen sektörler yelpazesinin genişliği, konuya ilgiyi artırırken, aynı zamanda sektörler arası hukuki ilişkilerin yoğunlaşmasına da neden olmaktadır. Örneğin transgenik soya uygulaması ile sağlanan fazla kazanç 1998 yılı için 840 milyon US\$ olarak tahmin edilirken, bunun %45'i çeşit sahibine, %20'si çiftçiye ve %25'i de fabrikatöre yansıdığı belirtilmiştir. Diğer taraftan 1996 yılında ekilen Bt pamukla ilgili bir tahmin ise toplam 240 milyon US\$ olarak, bunun %59'u çiftçiye, %21'i tohumluk firmasına, %9'u tüketiciye, %5'i genetik materyal sağlayan Delta-Pine'a ve %6'sı da diğer sektörlerle (tüccar vs) yansıyan bir dağılımdan söz edilmektedir. İşte pastadan pay almakta olanların sayısı da arttıkça, gelişen biyoteknoloji ile paralellik içinde, hukuk savaşları da bir yükseliş gösterecektir.

Ülkemizde fikri mülkiyet haklarının patentle korunması için son yasal düzenlemeler 27 Haziran 1995 tarihli 551 Sayılı Kanun Hükmünde Kararnameyle gerçekleştirilmiştir. Bu kararnamenin 5. Maddesi "*yeni, tekniğin bilinen durumunu aşan ve sanayiye uygulanabilir olan buluşlar, patent verilerek kanunun...*" hükmünü getirmiştir. Buradan bir buluşun yeni olması, bilinen durumdan farklı olması ve endüstriyel

uygulanabilirliğinin bulunması gerektiği anlaşılmaktadır. Aynı kararnamenin 6. maddesinde ise patent verilmeyecek durumlar sayılmış ve “*bitki veya hayvan türleri veya önemli ölçüde biyolojik esaslara dayanan bitki veya hayvan yetiştirilmesi usulleri*” patent koruması dışında bırakılmıştır. Bu madde TRIPS’in 27. maddesindeki “*mikroorganizmalar dışında bitki ve hayvanlar ile esas olarak biyolojik olmayan ve mikrobiyolojik olmayan ve mikrobiyolojik usuller dışında bitki veya hayvanların üretimi ile ilgili biyolojik usullerin patent koruması dışında tutulabileceği*” hükmüne benzemektedir. Ancak bu madde, mikroorganizmalar ve mikrobiyolojik usullere ilişkin olarak açık bir hüküm koymamıştır. Kanun hükmündeki kararnamenin gerekçesinden bu hüküm dayanağının, 27 Kasım 1963 tarihli Strazburg Anlaşması olduğu anlaşılmaktadır. Bu anlaşmada ise sadece “*bitki ve hayvan türleri ile biyolojik esaslara dayanan bitki ve hayvan yetiştirme usulleri*” koruma dışında bırakılmıştır. Bütün bu hükümler bir arada değerlendirildiğinde mikroorganizmalara ilişkin olan buluşlar ile mikrobiyolojik usulle elde edilen bitki ve hayvan yetiştirme usullerinin patent kapsamında olduğu sonucuna varılabilir.

Burada dikkate alınması gereken husus “*patent alınacak mikroorganizmaların patentlenebilirlik koşullarına uyması ve aynı zamanda doğada biyolojik olarak kendiliğinden oluşmamış*” olmasıdır. Yani, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak doğada önceden mevcut olmayan bir mikroorganizmanın geliştirilmiş olması gerekmektedir.

Yine 551 sayılı kararnamenin 6. maddesi dikkatle incelenirse “*bitki veya hayvan türleri*” ifadesinde tür yerine “*çesit*” kelimesinin konması ya da anlaşılması gerektiği açıktır. Ayrıca bu maddede sadece biyolojik olarak bitki ya da hayvanların yetiştirme usullerinin patentlenemeyeceği belirtilmektedir. Oysa biyoteknolojik yöntemlerle, bitki ya da hayvan çeşitleri doğal yollarla kazanamayacakları özelliklere sahip olmaktadır. Kamu düzenine, ahlaka veya çevreye zarar vereceğinin saptanması durumunda patent korumasına alınamaz. Aynı şekilde madde sadece yetiştirilme usullerinin patentlenemeyeceğine işaret etmekte ve bu yollarla elde edilecek bitki veya hayvanların patentlenemeyeceğini belirtmemektedir. Doğadaki mevcut ya da kendiliğinden oluşmuş olan bitki veya hayvanların patent kapsamına alınmaması doğaldır. Klasik yollarla geliştirilen bitki çeşitleri için ise ülkemizde 19 Eylül 1997 tarihinde “*Bitki Çeşitlerinin Tescili*”ne ilişkin yönetmelik çıkarılmıştır. Tescilli çeşitlere ait ıslahçı haklarının korunmasına ilişkin yönetmelik ise 28 Eylül 1994 tarihinde kabul edilmişse de uluslararası geçerliliği için, bunun kanun değil de yasa biçiminde olması gereği bir işlerlik kazanmamıştır. Fakat Türkiye’nin bu konudaki iyi niyeti konunun Meclis gündemine taşınmasından anlaşılmaktadır.

Bitki ıslahçı haklarını ortaya koyan bu yönetmelik incelendiğinde, “*yosun ve bakteriler*” dışındaki bitkileri geliştiren kişi ya da kurumların bu haklardan yararlanabileceği görülmektedir. Tescil edilecek çeşidin; yaygın olarak bilinen diğer bir çeşitten açıkça “*farklılık*” göstermesi, çoğaltımı esnasında çoğaltma metoduna bağlı olarak beklenen varyasyonunun dışında, ilgili özellikler yönünden yeterince homojen (yeknesak, tekdüze) olması ve üretimden sonra veya üretimin herhangi bir aşamasında, ilgili özellikleri yönünden değişiminin olmaması yani “*durulmuş*”

olması gerekir. Çeşit koruma hakkı bu özelliklerin tespit edilmesidir. Türkiye’de; ıslah edilen çeşitlerin, yurt dışında ıslah edilmiş, ancak ıslah edildiği ülkede tescil edilmemiş yabancı çeşitlerin, testler sonucunda tescili yapılmaktadır. Çeşidi ıslah eden kişi ya da kurumlara tanınan haklar ise; çeşidini satmayı, bu çeşidi başkasına satabilme yetkisini vermeyi, çeşidinin üretim materyalini satmayı ve bunları başkalarının satabilmeleri için yetki vermeyi ve çeşidini satabilmek için üretmeye ve başkalarının üretmesine yetki vermeyi kapsamaktadır.

Yine bu yönetmelikle, daha önce tescil edilmiş çeşitlerin tescil başvurusundan önce Türkiye’de ticari amaçla satışı yapılan veya başka bir ülkede 4 yıldan önce satışı yapılmış çeşitlerin tescil edilemeyeceği belirtilmektedir. Ülkemizde biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilen “transgenik çeşitler” için henüz ticari üretim amaçlı tescil ve üretim izni verilmemektedir. Ancak bu çeşitlerin “alan denemeleri” (field trials) hakkında talimat hazırlanmış ve uygulamaya konmuştur.

Patent hakkı ile bitki çeşitlerinin korumasına bir alternatif olarak, bitki çeşitlerinin korumasına ait uluslararası sözleşmeye göre oluşturulan bitki ıslahçı hakları yasalarıyla koruma sağlanabilir. Bir bitki ıslahçısı kendisine ait çeşidin, üretimi, çoğaltılması, fiyatlandırılması, satışı, ithali, ihracatı ve depolanması konusunda haklara sahiptir. Bitki ıslahçı haklarının geçerlilik süresi türe göre değişmektedir.

Islahçı haklarını konu alan oluşumlar aşağıda belirtilmiştir:

a) UPOV

Islahçı hakları konusunun uluslararası boyutta ele alınması ilk kez, 1956 yılında Avusturya’da düzenlenen ASSINSEL kongresinde gerçekleşmiş ve bu kongredeki girişimler ve alınan kararlar, 1961 yılında imzalanan ve Fransızca’daki adının kısaltılmış şekliyle bilinen UPOV sözleşmesini gündeme getirmiştir. Bu sözleşmede 1971, 1978 ve 1991 yıllarında yenileme çalışmaları yapılmıştır. 1978 yılındaki yenileme çalışmalarındaki, 5 bitki türü için öngörülen koruma; 1991’deki çalışmalarla tüm bitki cins ve türleri için geçerli olacak şekle dönüştürülmüştür. Korumanın süresi ağaç ve bağlar için 25 yıl, bunun dışındaki bitkiler için 20 yıl olarak değiştirilmiştir. Üretim materyalinin yanı sıra hasat edilen materyal de koruma kapsamına alınmıştır. Bununla beraber, çiftçinin geleneksel olarak “kendi tohumluğunu ayırma” ayrıcalığı ıslahçı hakkı dışında tutulmuştur. Yine 1978 sözleşmesine göre bitki çeşitlerinin sadece ıslahçı haklarıyla korunması söz konusu iken, 1991 sözleşmesiyle birden fazla koruma sistemine izin verilmiştir. UPOV’a imza atan ülke sayısı ise 1997 yılı itibarıyla 34 olup, 2000 yılı itibarıyla bu sayının 80 olması beklenmekteydi. 1994 yılında çıkarılan bir yönetmelikle Türkiye’nin UPOV’a üyeliği için başvuru yapılmışsa da, olayın bir yasa işi olduğu ve bir yasa taslağının hala meclis gündeminde beklediği bilinmektedir.

b) TRIPS

Dünyada fikri eserlerin korunması ve kapsamının genişletilmesi konusundaki yoğun çabalar 1995 yılında Ticari Fikir Eserleri Hakkının yürürlüğe girmesine neden olmuştur. Böylece tartışmalar ve anlaşmalar, WIPO'nun teknik boyutunun ötesine taşınarak, WTO'nun gündemine getirilmiştir. TRIPS tarafından 1995 yılından itibaren; gelişmiş ülkelere 1 yıl, gelişmekte olan ülkelere 5 yıl, geri kalmış ülkelere de (uzatılma şansı verilerek) 11 yıllık bir süre içinde başta ıslahçı hakları olmak üzere tüm fikri ve patentli eserlere izinsiz olarak kopyalama, kullanma ve üretme yasağı getirilmiştir. Bitki ve hayvanla ilgili patent olayının dünyada kabul görmemesi üzerine TRIPS'in 27.b(3) maddesinde bitki ve hayvanlara yönelik başvuruların patent kapsamı dışında tutulması kabul edilmekle beraber, mikroorganizmaların (Bt - *Bacillus thuringiensis*) patentlenmesi konusunda ısrarcı davranılmıştır.

c) WIPO

Dünya Fikri Eser Hakları Organizasyonu (WIPO) 1967 yılında gerçekleştirilmiş olup, 1974'de Birleşmiş Milletler'in bir alt birimi şeklinde çalışmalarını yürütmüştür. Özellikle gelişmekte olan ülkelere fikri eser hakları konusunda kapsamlı hizmet vermektedir. Bu hizmetler, fikri eser haklarının lisans alması ve bu haklar konusunda gerekli organizasyonun yapılmasına yönelik olarak; hükümetlere, kamu ve özel kuruluşlara bu anlamda danışmanlık yapılması, eğitim verilmesini içermektedir. WIPO, 1996 yılında WTO ile bir görüş birliğine varmıştır. Buna göre WIPO gelişmekte olan ülkelere yaptığı teknik hizmet ve işbirliğine devam etmesinin yanı sıra, WTO'nun üyesi olup da WIPO'nun üyesi olmayan gelişmekte olan ülkelere de TRIPS çerçevesinde hizmet verecektir. WTO'ya üye ülke sayısı çok fazla olduğu için, WTO ve dolaylı olarak TRIPS, neredeyse tüm dünya ülkeleri tarafından benimsenmiştir. WTO görüş birliği çerçevesinde, WTO'ya üye ülkelere bitki ve hayvanların patentlenebilmesi pek çok tartışmaları ve toplantıları da gündeme getirmiştir.

Türkiye'de transgenik çeşitlerle ilgili tescil düzenlemeleri kesin şeklini almak üzeredir. Başlangıçta 29.09.1997 tarihli tescil yönetmeliğine bazı maddelerin monte edilmesiyle düzenleme yapılması düşünülmüşse de mevzuat açısından ayrı bir yönetmelik hazırlanmasında yarar görülmüştür. Bu hazırlıklarda konu ile ilgili dünyadaki son gelişmeler göz önünde bulundurulmuştur. Transgenik çeşitlerin üretim, pazarlama ve tüketimine yönelik yönetmeliğinin de yakın bir gelecekte tamamlanacağı beklenmektedir.

d) CPVO

Avrupa topluluğu bünyesindeki çeşit geliştiren kişi ve kuruluşların ıslahçı haklarının korunmasını üstlenen bu kuruluş (Community Plant Variety Office - Topluluk Islahçı Hakları Ofisi), 1996 yılında kurulmuştur. Angers (Fransa) merkezli bu örgüt

teknik, mali, idari ve hukuk birimleri ile hizmet vermektedir. Avrupa Birliği (AB) üyesi olmayan fakat UPOV üyesi olan ülkelerin de üyelik talebinde bulunabileceği bu örgüt üyelerinin korunmasını istedikleri çeşitlerin FYD (Farklı, Yeknesak, Durulmuş; DUS: distinctness, uniformity, stability) özellikleri ile işe başlamaktadır. 25 yıllık bir koruma süresi (bağ, patates ve ağaçsı türlerde 30 yıl) ile yola çıkan ofis iki aylık periyotlarla bültenler çıkararak olayların şeffaflığını sağlamaya çalışmaktadır.

Korunması istenen çeşidin “yeni” olma koşulu CPVO’nun bir diğer ilkesidir. Yenilik kavramı ise “AB içinde çeşidin bir yıldan daha eski bir tarihte pazarlanmaması, birlik dışı ülkelerde ise çeşidin dört yıldan daha eski bir sürede pazarlanmamış olmasıdır URL: <http://www.cpvo.fr>.

27.5. Teknoloji Koruma Sistemi (TKS) veya Terminatör Teknolojisi

Teknoloji Koruma Sistemi (TKS), genetik olarak değiştirilmiş bitkilerden ertesi yılın ekimi için tohum almayı imkansız kılmaya yönelik olup, transgenik bitkilerin patentini koruma çabalarının sonucunda ortaya çıkmıştır (teknik yönden daha fazla bilgi için, bkz. Bölüm 26). Karşı görüşte olanların “terminatör (yok edici)” teknolojisi olarak tanımladıkları bu sistem Delta&Pine ve Amerika Tarımsal Araştırma Kuruluşu uzmanlarının ortak araştırmaları sonucu olarak ortaya çıkmış ve patent başvuru sayısında bir anda patlama olmuştur. Terminatör teknolojisi genelde bütün dünyada büyük tepkiyle karşılanmıştır. Ülkemizde henüz hiçbir yazılı belgede yer almayan bu teknolojinin ortaya çıkışında başlıca iki neden yatmaktadır:

1. Kendine döllen bitkilerde yüksek maliyetlerle geliştirilen tohumluğun her yıl yeniden satışını sağlamak amacıyla çiftçinin yetiştirdiği tohumun tekrar kullanımını engellemek,
2. Gen kirlenmesini önlemek yani biyo-güvenliği sağlamaktır.

Biyoteknolojik yöntemlerle genetik yapısı değiştirilmiş çeşitlerin geliştirilmesi ve üretim alanlarında yerini alması yıllar süren milyonlarca dolarlık araştırma yatırımı gerektirmektedir. Firmaların çalışmalarına devam etmeleri için, bu çeşitlerden yeterince yarar sağlayabilmeleri gerekir. Bu da, tohumluk satışlarının devamlılığının sağlanmasıyla mümkün olabilir. Bunun için firmaların arzusu terminatör teknolojisinin kullanılması doğrultusundadır.

Terminatör teknolojisinin başlangıçtaki hedefi kendine döllen transgenik bitkilerdi. Fakat apomiksi sayesinde allogamlarda F₁ elde etme masraflarının minimuma indirilmesi sağlandıktan sonra, terminatör teknolojisi **allogamlar’da da kullanılabilir hale gelmiştir**. Apomiktik mısır (*Tripsacum dactyloides*’den aktarılan bir genle elde edilmiştir), Amerika ve CIMMYT’de patent almıştır. İngiltere ve Fransa’da bu yönde başka bitkilere de patent verilmiştir. Bu durumda tüm transgenik tüm bitkilerde terminatör teknolojisi kullanımının gündeme gelmesi

beklenmelidir. Böyle olunca da söz konusu teknoloji 2010'larda yılda 30 milyar dolara ulaşması beklenen tohumluk piyasasından payını alacaktır.

Terminatör teknolojisi ile ilgili patentler UPOV'a üye ülkelerde geçerli olabilecektir. Ayrıca bu teknolojinin; FAO'nun Gıda ve Tarım için Genetik Kaynaklar Komisyonu (CGRFA), Uluslararası Tarımsal Araştırmalar Danışma Kurulu (CGIAR), Birleşmiş Milletler Bilim ve Teknoloji Komisyonu (UNCSTD), Biyolojik Çeşitlilik Anlaşma Örgütü (CBD) gibi uluslararası kurum ve kuruluşlarca kabul görmesi durumunda tüm Dünya Ticaret Örgütü üyesi ülkelerde geçerli olması beklenmektedir.

27.6. Biyo-güvenlik Protokolü

Tarımsal biyoteknolojide; "çevresel değerlendirme", "gen kaçması", "etiketleme" gibi öne çıkan birçok konunun ulusal ve uluslararası yasal düzenlemesi 64 ülke tarafından imzalanan "**Biyo-güvenlik Protokolü**" ile bir temele oturtulmuştur. Bu protokol 1990'lı yılların başlarında devreye giren "Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi"nin bir aşaması olup; UPOV, TRIPS, WIPO ve UNEP (United Nation Environmental Program: Birleşmiş Milletler Çevre Programı) sözleşmeleri gibi WTO'nun amaçlarının gerçekleştirilmesine yönelik olarak oluşturulmuş uluslararası anlaşmalardan biridir. WTO, dünya ticaretinin serbestleştirilmesi ve fikri eser hakları konularında, tüm dünya ülkelerinin katılımını sağlamaya yönelik çalışmaları yürütmektedir. Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi ise, biyolojik çeşitliliğin korunmasının yanı sıra, tarımsal ürün dolaşımını düzenleyen mevzuatı yürütme görevini de üstlenmiştir. WTO, herhangi bir ürünün ithalinin yasaklanabilmesi için, o ürünle ilgili bilimsel olarak kabullenilebilir bir olumsuzluğun saptanması gerekir görüşündedir. Bu yaklaşımda, özellikle (tarımsal üretimi biyoteknoloji ve sair girdilerle adeta fabrikasyon üretime kavuşturan) Miami gurubu ülkelerin (genetik olarak değiştirilmiş çeşitlerin üretimini yapan ABD, Kanada, Avustralya, Arjantin, Şili ve Uruguay) görüşü hakimdir. Bu grup, tarımsal ürün ihracatındaki engellerin, Biyo-güvenlik (Cartegena) Protokolüyle aşılabileceği beklentisindedir. Montreal'de, karşı görüşlerin tartışıldığı bir toplantıyla protokol son şeklini almıştır. Ancak, protokoldeki detay maddelere rağmen, tarafların tüm endişelerinin giderildiği söylenemez. Özellikle transgenik çeşitlerle ilgili ticarete, sağlıklı bir çözüm getirilmemiştir. Transgenik çeşitler diye tanımlanan tarımsal ürünlerin uluslararası ticaretinde, biyolojik çeşitlilik ve insan sağlığına olası olumsuz etkileri devreden çıkartacak mevzuatı içeren "biyo-güvenlik protokolü" Türkiye tarafından da imzalanmıştır.

27.7. Etiketleme

Mayıs 2000'de Nairobi'de 64 ülke tarafından imzalanan biyo-güvenlik anlaşmasının maddelerinden birini oluşturan "etiketleme", biyoteknolojide ahlakın en öne çıktığı

bir yönüdür. Etiketlemeye, Avrupa'nın biyoteknoloji ürünlerine hayır diyemeyeceği bir formül olarak bakılabilirse de tüketicinin ne yediğini bilmesi de en doğal hakkıdır. Bu görüş yıllarca bilinçsiz bir şekilde transgenik ürün tüketen ABD ve Kanada'da oldukça yeni bir hareketin başlamasına neden olmuştur. Bu yönde uluslararası örgüt çalışmaları, sorunları evrensel olarak ele almakta ve çözüm üretmektedir. Nitekim FAO ve WHO örgütlerinin ortak komisyonu olan Codex Alimentarius'un etiketleme ile ilgili teknik işlevi biyo-güvenlik sözleşmesi çerçevesinde ele alınmaktadır.

27.8. Refüj

Genetik olarak değiştirilmiş çeşitlerin üretimde yerini almasıyla doğal dengede bazı değişiklikler olabilir. Örneğin, böceklerle dayanıklı transgenik çeşitlerin çiftçiye ulaşımıyla, sap kurduna dayanıklı mısır veya pembe kurda dayanıklı transgenik pamuk çeşitlerinin ekildiği tarlalarda bu kelebeklerin yaşam şansı kendiliğinden sınırlanacaktır. İşte bu sakıncayı ortadan kaldırmak, bu tür değişiklikleri en aza indirmek için bazı düzenlemeler gerekir. Yönetmelikler çerçevesinde ele alınan bu düzenlemelerde, yukarıdaki örnek için adeta “kelebeklere ayrılmış” bir alan belirlenir. ABD'de bu alanın; ilaçlanıyor olması durumunda, transgenik ekim alanının %20'si, ilaçlanmıyor olması durumunda ise %5'i kadar olması öngörülmüştür. Ancak bazı çevreci örgütlerin, bu alanların daha da genişletilmesi doğrultusunda baskıları vardır. Bu olay biyoteknoloji kullanımında çevreye saygının ve biyoteknolojide ahlakın çarpıcı bir örneğidir.

27.9. Biyo-korsanlık

Tescil ve ıslahçı hakkı ile ilgili işlemleri tamamlanmış veya tamamlanmamış bitki çoğaltım materyalin; materyale tarih boyu sahip çıkmış, hatta o çoğaltım materyalinin geliştirilmesine katkıda bulunmuş bir ülkenin veya toplumun izni olmadan, ticari amaçla kendi üzerine tescil ettirmek, patentlemek ahlaki bir konudur. Binlerce yıldır Hindistan ve Pakistan'da populasyon olarak kabul edilen “BASMATI” çeltiğine “TEXMATT” adı altında patent alan bir Texas firmasının patenti işte bu nedenle iptal edilmiştir. Bu ve benzeri uygulamaların sayısı hiç de az değildir. Bir Meksika fasulye çeşidine ABD'de patent alınma aşamasına gelinmesi, Hindistan'daki Nohut Gen Kaynakları Merkezinden sağlanan materyalin Avustralya'da patentlendiği duyuları bu konudaki diğer bazı örneklerdir. Ayrıca, Arjantin'den Brezilya'ya kaçırılan ve 800.000 ha alanda ekilen transgenik soya tohumluğu uluslararası sorunlara neden olmuştur. Zengin bitki genetik kaynakları materyaline sahip Türkiye'nin benzer olaylarla karşılaşmaması için, Bitki Genetik Kaynakları varlığının bir an önce tanımlanmasını (karakterizasyon) tamamlayarak en azından tescile götürmesinde yarar vardır.

Biyoteknoloji firmaları biyo-korsanlığın, biyoteknolojide çok daha yoğun olarak kullanılacağı endişesini taşımaktadır. ABD’de, tohumluğun ertesi sene kullanılmaması için çiftçilerle sözleşmeler yapıldığı bir gerçektir.

27.10. Sonuç

Bitkisel biyoteknolojide; hayvan ve insan biyoteknolojisi kadar ahlaki derinlik olmamasına rağmen, özellikle belirli inançlara yönelik uygulamalar (örneğin, bir domuz geninin bitkiye aktarılması durumunda bu transgenik ürünün müslümanlarca yenmesi) etiketleme yoluyla önlenebilmektedir.

Patent veya tescille ilgili ticari sorunlar, yasa ve yönetmeliklerin hızla güncelleştirilmesi ile kolayca aşılabilecek niteliktedir. Ancak, işin ahlaki boyutu için aynı şeyler kolayca söylenemez. Serbest rekabet ortamında hizmet vermek durumunda olan bir tohum firmasının sattığı tohumluğun, gelecek yıllarda bir başka firma tarafından başka bir isimle piyasaya çıkarılması durumunda olay ticari olmanın ötesinde ahlaki boyut kazanmaktadır. Topluma hizmet için yapılan araştırmaların ve bunların ticari uzantılarının ancak güvenilir bir ortamda gelişebileceği bir gerçektir.

Biyoteknoloji ile birlikte gelen zorunlu bazı kurallara uymak gerekliliği transgenik çeşit tarımı yapanlarca mutlak göz önünde bulundurulmalıdır. Gen kaçması ile ilgili biyo-güvenlik uygulamaları, zararlılarla ilgili üremenin devamını sağlayacak transgenik olmayan ekimlerin (refuj) belirlenen yönetmeliklere uygun olarak yapılması gibi.

Transgeniklerle ilgili uygulamalardan doğacak zararların karşılanmasında, ilgili kuruluşların tazminatta ne oranda ve nasıl devreye girecekleri de yine yönetmeliklerle belirlenmelidir.

Hızlı bir başlangıçla topluma mal olan bitkisel biyoteknolojinin teknik ve biyolojik sorunlarının tümüyle bir anda çözüm bulması mümkün değildir. Gıda üretiminde bir araç olan biyoteknolojinin; başından sonuna, araştırmacıdan üreticisine kadar, yeniliğin neden olduğu bir seri oturmamışlığın kötüye kullanım olasılığı vardır. İşte biyoteknoloji ahlakı, bu gibi boşlukların kötüye kullanımının engellenmesi şeklinde özetlenebilir.

Kaynaklar

Açıkgöz N (2000) Biyoteknolojide yasal ve etik yaklaşımlar. “Küreselleşme Sürecinde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik” sempozyum bildirisi. 23-24/10/2000, Ankara.

Açıkgöz N. (2001) Birinci Generasyon Transgenik Çeşitlerde Karlılık Karşılaştırmaları; AGBİYOTEK, Sayı 15, <http://bornova.ege.edu.tr/~totem/>

Brenner C (1998) Intellectual property rights and technology transfer in developing country agriculture: Rhetoric and reality. OECD Development Centre, Technical Papers No. 133 (<http://www.oecd.org/dev/cendev>).

Elenita CD (2000) Socio-economic impact of agricultural modernization. In: Sustainable Agriculture in the New Millennium: The Impact of Biotechnology on Developing Countries, 28-31 May 2000, Brussels.

Geier B (2000) Organic farming approaches and biotechnology. In: Sustainable Agriculture in the New Millennium: The Impact of Biotechnology on Developing Countries, 28-31 May 2000, Brussels.

Smith FB (2000) The biosafety protocol: The real losers are developing countries. National Legal Center for the Public Interest (www.nlcpi.org).

Tansey G (2000) Technology, power, marginalisation and food insecurity. In: Sustainable Agriculture in the New Millennium: The Impact of Biotechnology on Developing Countries, 28-31 May 2000, Brussels.

Thompson, PB (1996) Report of the NABC Ad-Hoc Committee on Ethics. The NABC Executive Committee Report. Rutgers University.

Wright DB (1998) Public germplasm development at a crossroads: Biotechnology and intellectual property. *California Agriculture*, 52(6): 8-13.

İndeks

AFLP..... 111, 116, 379, 387, 389, 394
Agrobacterium..... 2, 116, 122, 125, 126,
 129, 133, 150, 154, 159, 161, 169
A. rhizogenes..... 123, 125, 128, 185
 aktif oksijen..... 300
alfa sarmalı..... 409, 410, 411
 alfa-amilaz enzimi..... 243
 alfa-amilaz inhibitörleri..... 237
 allel..... 50, 277, 371, 391
 amino asit ... 8, 29, 52, 57, 58, 67, 68,
 71, 75, 76, 89, 90, 97, 101, 180,
 210, 230, 330, 395, 409, 414, 425,
 431
 antijen..... 21
 antikor..... 89, 90, 200, 279, 301, 357,
 398, 399, 403, 423, 436
 antisens RNA... 91, 92, 267, 268, 434,
 436, 439, 448, 449, 451
Arabidopsis..... 2, 23, 35, 42, 88, 91, 99,
 107, 133, 170, 196, 259, 304, 305,
 349, 359, 360, 443, 455
 arpa..... 99, 106, 115, 123, 185, 194,
 196, 218, 338, 346, 348, 375, 392
 asetosiringon..... 150
Aspergillus..... 286, 288, 301
 avidin..... 247, 256
avirülens faktörleri..... 290
Bacillus thuringiensis 206, 228, 229, 230,
 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255,
 256, 257, 258, 259, 260, 484
 bakteriofaj..... 4
bar geni..... 151
 basit dizi tekrarları..... 390
 başlangıç safhası 62, 77
beta pili..... 410
 binari vektör..... 146
 biyoetik..... 476
 biyo-güvenlik Anlaşması 477
 biyo-korsanlık 487
 biyolistik..... 186, 192, 193, 200
Botrytis cinerea..... 289, 299, 443

Bt genleri..... 230, 231, 232, 234
 buğday 101, 106, 110, 123, 189, 196,
 218, 279, 346, 355, 391, 466
cat geni..... 183
 cDNA .. 92, 95, 97, 99, 101, 106, 111,
 118, 120, 243, 267, 278, 312, 356,
 360, 379, 383, 392, 441, 446, 448
 çeltik... 2, 37, 91, 101, 123, 179, 188,
 194, 218, 297, 303, 346, 384, 436
 dayanıklılık (R) genleri..... 302
 delesyon..... 27, 92, 103, 178, 271, 275
 dizi analizi..... 97
E. coli. 4, 7, 15, 18, 21, 26, 47, 64, 66,
 77, 85, 103, 107, 116, 142, 143,
 144, 145, 147, 148, 183, 402, 427
EcoRI... 25, 26, 37, 115, 222, 224, 389
 ekson..... 82, 369, 439
 elektroforez 89, 90, 113, 115, 197,
 380, 382, 398, 400, 401
 elektroporasyon..... 123, 145, 147, 186,
 188, 189, 192
 ELISA..... 278, 399, 431
 elisitör moleküller..... 290
 entegrasyon ... 102, 106, 150, 177, 188
 enzim 8, 17, 21, 23, 27, 55, 57, 61, 62,
 63, 75, 88, 103, 107, 115, 184, 214,
 246, 287, 297, 301, 318, 323, 339,
 350, 372, 380, 398, 406, 413, 418,
 421, 422, 436, 439, 449, 461, 466
 epistasi..... 365
 erkek kısırılık..... 355
 EST 99
 eşbaskınlık 370
 etiketleme 477
 FISH..... 41, 42
 fikri mülkiyet hakları.... 457, 466, 470,
 476, 478, 481
 fitoaleksin 133, 292, 299
 flowsitometri..... 33
 fungus 44, 52, 245, 262, 286, 287,
 294, 310, 316, 345

- Fusarium*..... 286, 295, 297, 310
 gen inaktivasyonu..... 276
 gen izolasyonu 88, 425
 genel dayanıklılık 289
 genetik harita. 109, 116, 118, 363, 365
 gen klonlaması 435
 genetik markörler 363, 377
 genetik parmak izi 368
 genom 23, 34, 103, 109, 111, 372
 gentamisin 147
 GISH..... 41, 42, 46
 glifosat..... 183, 210
 glikonaz..... 296, 297
 glutamin sentetaz..... 214, 215
 guanin 5, 6
 GUS 133, 142, 152, 155, 159, 165,
 167, 180, 197, 203, 276, 308, 444
 gus proteini..... 142
 helikaz 18
 heterozigot..... 105, 373, 375, 384, 447
 HindIII..... 25, 105
 histon..... 38
 ineksidial proteinler 248
 insersiyon..... 177, 178
 intron..... 97, 98, 99, 152, 172, 439
 işaret genleri .. 142, 147, 152, 161, 181
 kanamisin..... 107, 147, 151, 153, 154,
 157, 158, 159, 181, 194
 kantitatif karakterler..... 365
 kaset mutagenesis 427, 428
 katlanmış haploid 364, 365, 375
 Kitinaz..... 245, 288, 296, 297
 kloroplast... 12, 31, 36, 233, 319, 326,
 347
 kloroplast DNA..... 36
 kodon. 29, 59, 68, 70, 73, 78, 97, 101,
 309
 ko-entegratif vektör 143
 kolesterol oksidaz..... 246
 konjugasyon 4, 143, 145, 147
 konukçu olmayan dayanıklılık 289
 kromozom..... 1, 4, 32, 33, 34, 38, 40,
 41, 42, 51, 61, 87, 102, 112, 116,
 118, 277, 332, 365, 369, 372, 376,
 377, 397
 kromozom yürüyüşü..... 112, 113
 lektinler 228, 237, 240
 ligaz 16, 17, 18, 19, 24, 26, 28, 115,
 427
 lipozom..... 190
 lizozim 288, 296, 297
 lokus 44, 130, 132, 379, 382, 383, 389
 lusiferaz..... 142, 184
 markör gen 141
 maya 90, 96, 113, 160, 177, 194
 mısır.... 7, 35, 103, 104, 179, 228, 234,
 235, 238, 241
 mikro-enjeksiyon.. 178, 186, 195, 197,
 199
 mitokondri 10, 31, 36, 37
 mitokondriyel DNA 31, 36
 mısır.... 7, 35, 103, 104, 179, 228, 234,
 235, 238, 242
 moleküler markörler 363, 376
 monoklonal antikor 301
 mRNA . 30, 57, 61, 64, 66, 71, 72, 76,
 77, 78, 84, 91, 93, 95, 118, 194,
 267, 309, 356, 383, 421, 436, 440,
 446, 447, 453
 nematod..... 1, 262, 316
 neomisin fosfotransferaz 142, 149,
 152, 181, 183
 Northern hibridizasyon..... 438, 441
 nükleotid..... 2
 nükleozom..... 38
 Okazaki fragmenti..... 17
 ornitin karboksilaz transferaz..... 301
 ökaryot..... 103, 420
 pancar..... 268
 patent sistemi..... 478
 patojenez 297
 PCR..... 89, 93, 94, 97, 100, 118, 151,
 154, 160, 292, 371, 378, 384, 389,
 390, 391, 393, 424, 428, 430, 464
 PCR primeri..... 371

- peroksidaz.....248, 296, 298, 318, 322, 323, 347
- Phytophthora infestans*.....298
- plastid.....10, 31, 36, 37
- plazmid.....12, 20, 23, 107, 115, 125, 126, 130, 143, 146, 148, 183, 188, 192, 197, 278, 427
- polietilen glikol189
- polimeraz.....16, 17, 18, 19, 21, 24, 28, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 82, 135, 158, 271, 292, 347, 382, 384, 386, 422, 424, 427, 430
- polimorfizm.....110, 348, 369, 371, 382, 383, 386, 389
- polipeptid.....57, 74, 77, 79, 405, 406, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 423
- primaz19
- primer.....16, 20, 40, 93, 97, 101, 102, 371, 379, 386, 391, 427, 429
- primidin51
- prob.....41, 43, 96, 100, 101, 104, 106, 118, 156, 377, 382, 383, 441, 442
- prokaryot62, 85
- promotor.....62, 63, 65, 82, 97, 99, 118, 142, 148, 152, 179, 180, 220, 231, 243, 264, 305, 307, 308, 356, 357, 358, 442, 446, 461, 462, 464, 466, 472
- protein mühendisliği.....56, 395, 420
- Pseudomonas syringae*.....117, 293, 295, 301, 311
- pürin.....5
- QTL.....365
- RAPD.....111, 116, 348, 379, 386, 387, 388, 389, 390
- raportör gen142, 182, 183, 184
- refüj486
- rekombinant kendilenmiş hat.....364
- replikasyon.....15, 17, 18, 20, 21, 23, 26, 57, 107, 143, 147, 177, 263, 265
- replikon.....22, 23
- reseptör.....101, 143, 229, 303, 305, 397
- restriksiyon endonükleaz.....37, 47
- RFLP.....100, 111, 120, 346, 352, 372, 376, 378, 382, 383, 384, 389, 390, 392, 393
- RFLP markörleri.....382, 384
- ribozom.....58, 74, 77, 78, 80, 81, 91
- RNAz98
- rRNA34, 57, 68, 82, 277
- rubisco37, 442
- seçici işaret geni.....145, 182
- silikon karbit199
- SAR304
- sitogenetik2, 41
- sitozin.....5, 8
- sonikasyon.....199
- Southern blot.....112, 151, 154, 158, 160
- β -glukuronidaz.....142
- stres faktörleri.....316
- STS379, 389, 390
- synteny.....376
- TATA kutusu.....63, 64, 82
- T-DNA.....106, 125, 128, 130, 133, 135, 136, 138, 140, 144, 146, 148, 152, 160, 161, 185, 188, 442
- teknoloji koruma sistemi.....457
- temel dayanıklılık.....289
- terminatör.....142, 148, 149, 152, 220, 309, 463, 484, 485
- Ti plazmidini126, 129, 130, 145, 146, 147
- ticari gizlilik479
- timin5
- TMV.....3, 4, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 275, 278, 313
- tolerans318, 319
- topoizomeraz19
- transformasyon.....107, 177, 178, 458
- transgenik.....91, 92, 122, 139, 141, 148, 150, 156, 159, 176, 185, 189, 194, 196, 213, 218, 228, 230, 237, 240, 246, 266, 271, 277, 292, 293, 296, 307, 347, 350, 356, 439, 444, 447, 451, 458, 476, 481, 485, 486
- transkripsiyon60, 61, 91, 308

translasyon..58, 66, 68, 70, 72, 74, 79,
81, 83, 85, 91, 98, 263, 309, 396
transpozon.....,102. 103, 105, 176
tRNA 8, 34, 57, 58, 66, 70, 74, 75,
76, 81, 91, 115, 268, 436
tuz stresi..... 335
tütün3, 37, 44, 68, 106, 133, 152, 154,
181, 196, 214, 241, 245, 266, 279,
297, 303, 348, 356, 403, 446, 464
urasil.....5
uzama safhası..... 77

vektör.....99, 107, 116, 142, 143, 144,
145, 146, 148, 152, 157, 161, 189,
197, 262, 421, 424, 425, 430
vir genleri..... 130, 135, 146
virülens faktörleri..... 289
virüs.... 3, 10, 177, 179, 188, 262, 263,
264, 265, 266, 267, 269, 270, 271,
272, 273, 274, 275, 276, 277, 278,
279, 316, 450
yalpalama hipotezi.....74
yeşil floresan proteini 184