

Tarımsal Biyoteknoloji

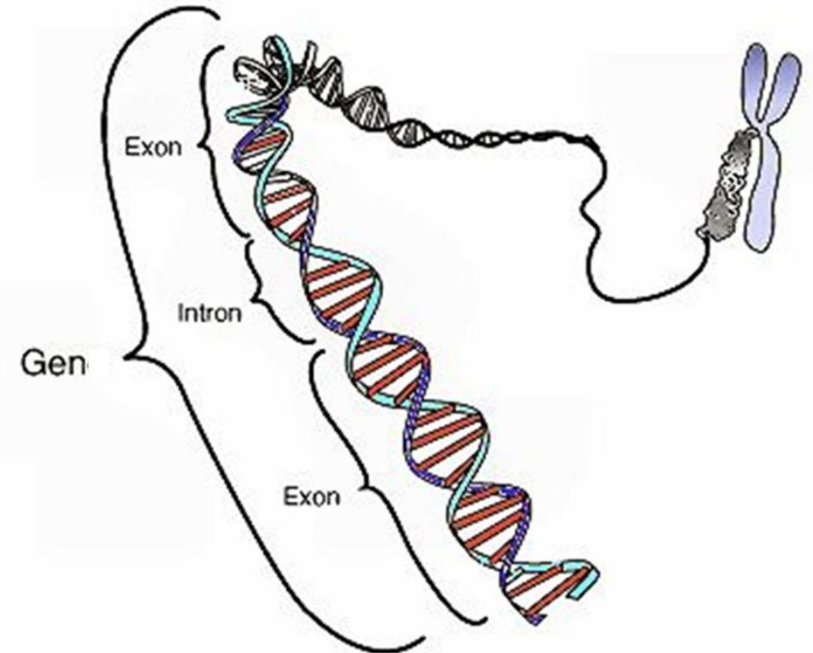
Giriřimcilik ve teknoloji... gıda güvenliği... sağlık... insan ihtiyaçları.....



24.03.2020

Genetik deęişim?

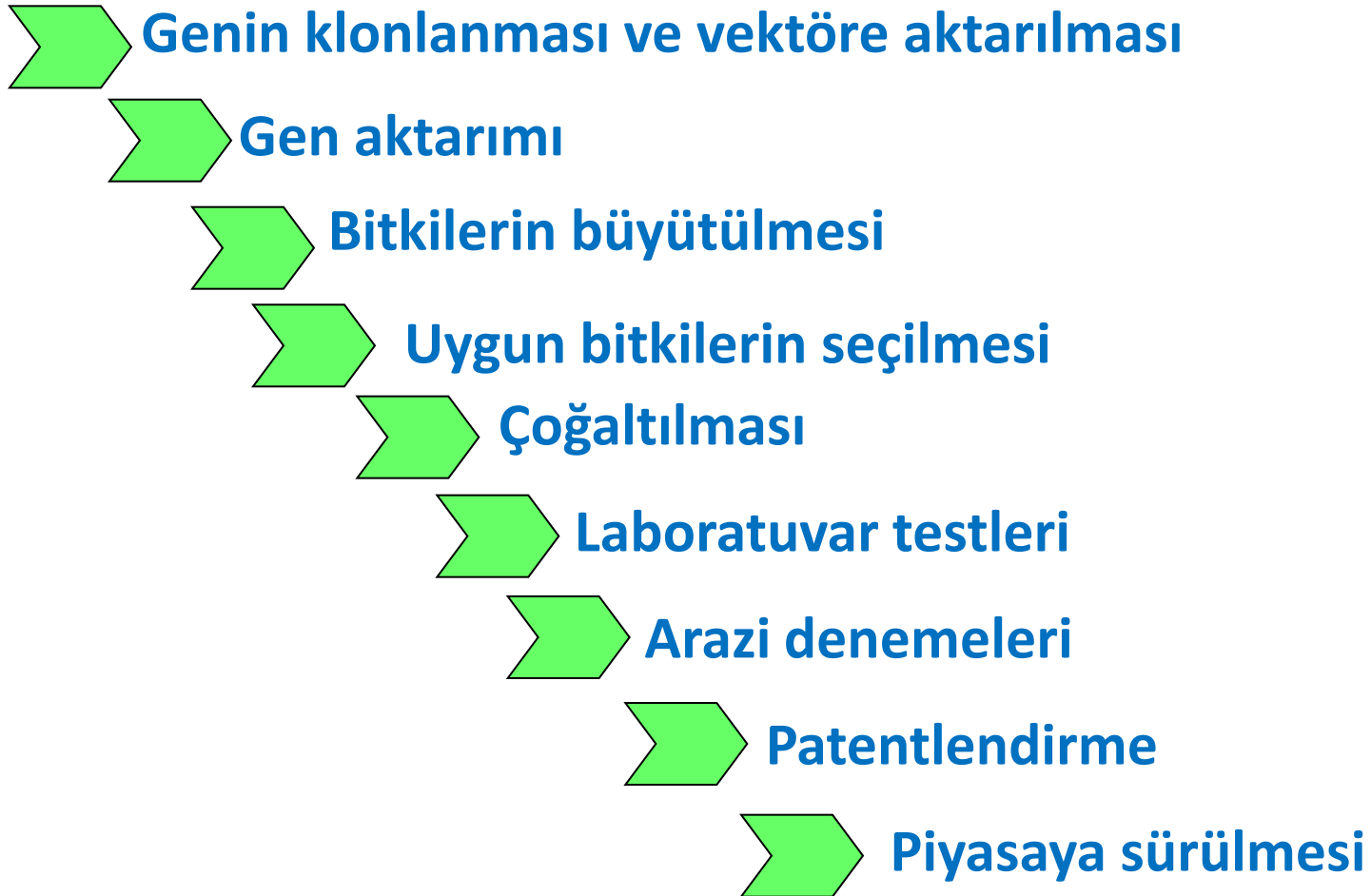
- Çaprazlama
- Doku kültürü
- Gen mühendislięi
- Gen?



Niçin?

- Verim
- Kalite
- İklim değişikliklerine karşı uyum
- Saklama ve taşıma
- Herbisitlere ve böceklere karşı direnç
- Biyomedikal uygulamalar

Ticari bir transgenik bitki



Transgenik bitkiler

- **Birinci nesil : Zirai özellikler**
- **İkinci nesil: Besin değerlerinin artırılması**
- **Üçüncü nesil : Biyo-fabrika**

Genetik Değişikliğe Uğratılmış Organizmalar (GDÖlar) nelerdir?

- GDÖlar kendi türünden ya da kendi türü dışındaki bir canlıdan gen aktarılarak bazı özellikleri değiştirilen bitki, hayvan ya da mikroorganizmalardır.



Antartika Balık
DNAsı

+



Çilek

=



Don'a dayanıklı bir çilek

GDOlar Nasıl Yapılır?

24.03.2020

- 1. – Bir bitki doku kültürü ve rejenerasyonu sistemi kurmanız gerekecektir.**
- 2. – Hedeflediğiniz amaca hizmet edecek geni bulup bu bitkide çalışacak hale getirmeniz gerekecektir.**
- 3. – Bitki hücre yada dokularına bu geni transfer etmeniz gerekecektir.**
- 4. – Gen aktarılmış hücreden “tam-bitki” büyütme için 1. aşamayı kullanmanız gerekecektir.**

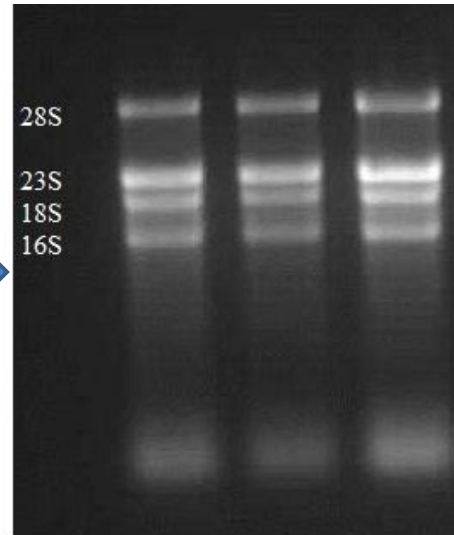
Genetiđi Deđiřtirilmiř^{24.03.2020} organizmalar_Bitki Biyoteknolojisi

Gen izolasyonu

Gen klonlanması

Gen aktarılması

Gen izolasyonu



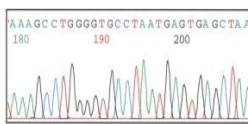
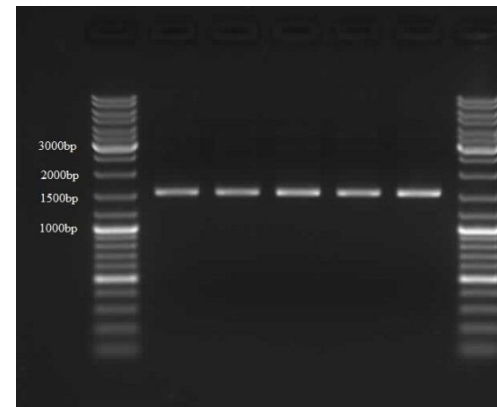
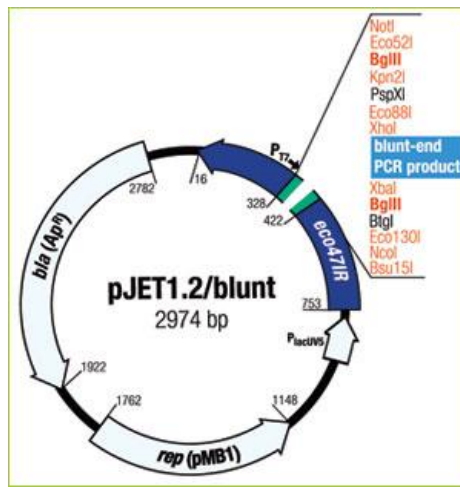
Toplam RNA



cDNA



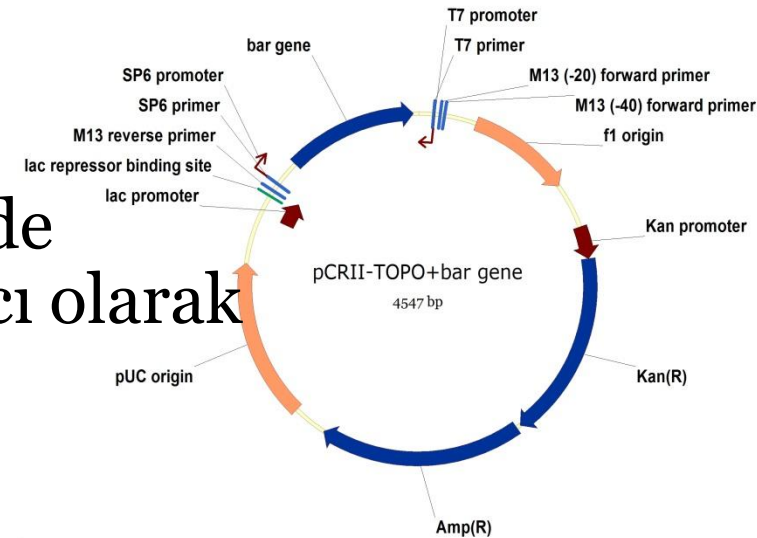
53.1 °C, 55 °C,
56.9 °C, 58.8
°C, 60.7 °C,
62.6 °C, 64.5
°C



Gen klonlanmasının bileşenleri

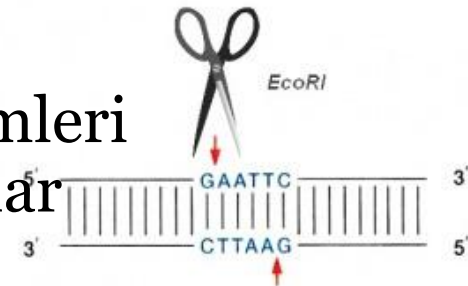
• Plazmit-Vektör

- Küçük dairesel dsDNA
- Bakteri, mantar ve organellerde
- Gen aktarımı işleminde taşıyıcı olarak
- Bağımsız replikasyon



• Enzimler

- Vektörleri ve genleri kesmek için kesim enzimleri
- DNA parçalarını birleştirmek için DNA ligazlar



• İstenilen klonların oluşup oluşmadığının kontrol edilmesi



Bitkilere Gen Transferi

24.03.2020

- Rekombinant DNA, bitki hücrelerine transfer edilir.
- Transfer edilen genin ifadesi hemen kontrol edilebilir (Geçici Gen İfadesi) yada kalıcı olarak genetik değişikliğe uğrayan hücreler seçilir ve bunlardan tam-bitkiler (Transgenik Bitkiler) elde edilir.
- DNA Transfer Metotları:

Bitki Gen Aktarım Teknikleri

Fiziksel

Kimyasal

Biyolojik

Mikroenjeksiyon
Parça bombardımanı
Elektroporasyon
Silika karbon fiber
Lazer

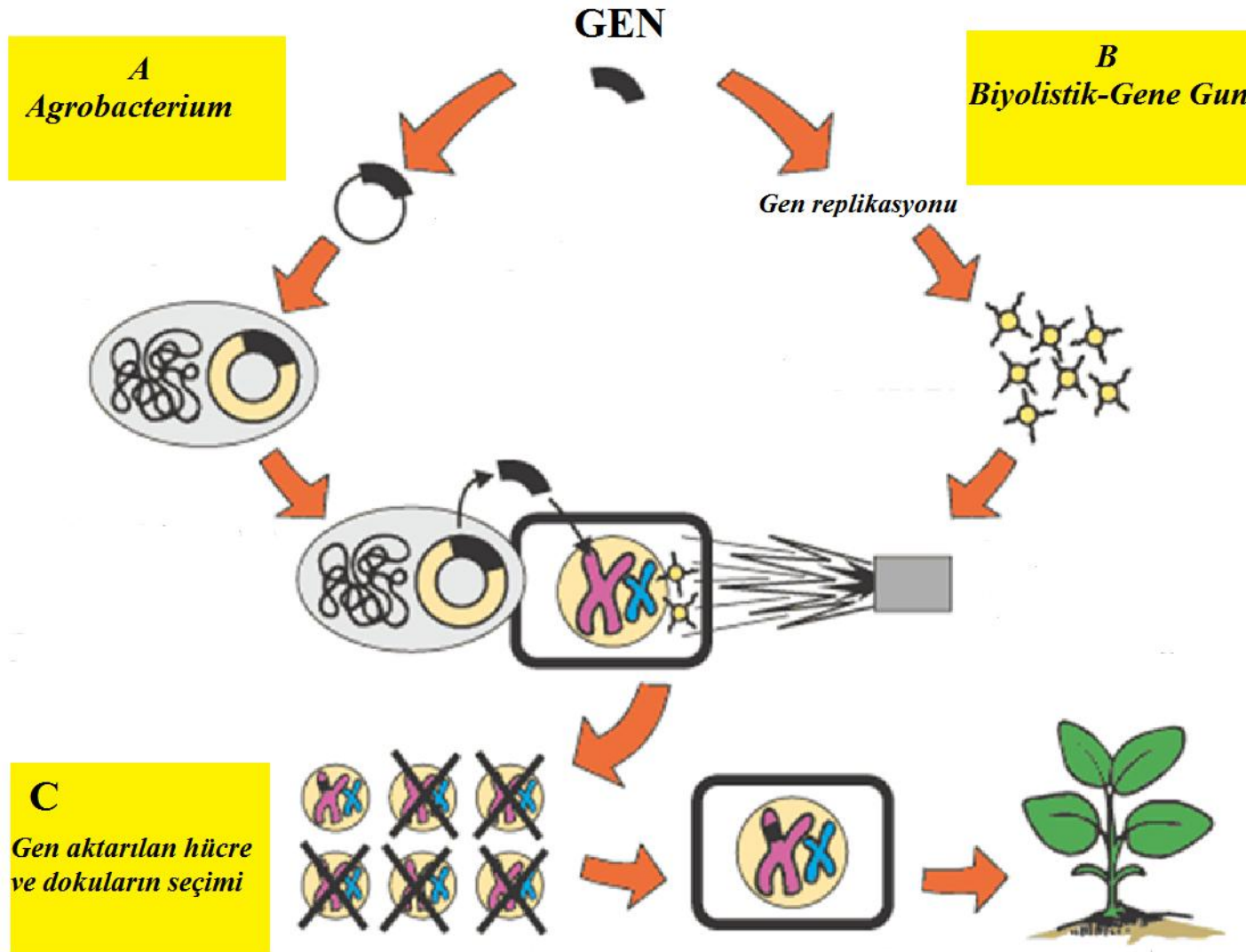
PEG
DEAE-dekstran
Kalsiyum fosfat
Yapay yağ asitleri

Agrobacterium tumefaciens
A. rhizogenes
Virüsler

Transformasyondan beklenenler

- DNA nukleusa gitmeli
- DNA genome kendini sokabilmeli (entegre edebilmeli)
- DNA stabil (kararlı) olmalı
- Doku kültürü tekniklerinin gerekmesinin nedenleri
 - DNA yı almaya uyumlu hücrelerin hazırlığı istekli
 - Transgenik hücre ve dokuların seçimi
 - Transgenik bitkilerin rejenerasyonu
 - Transgenler Mendel kurallarına göre kalıtılmalı

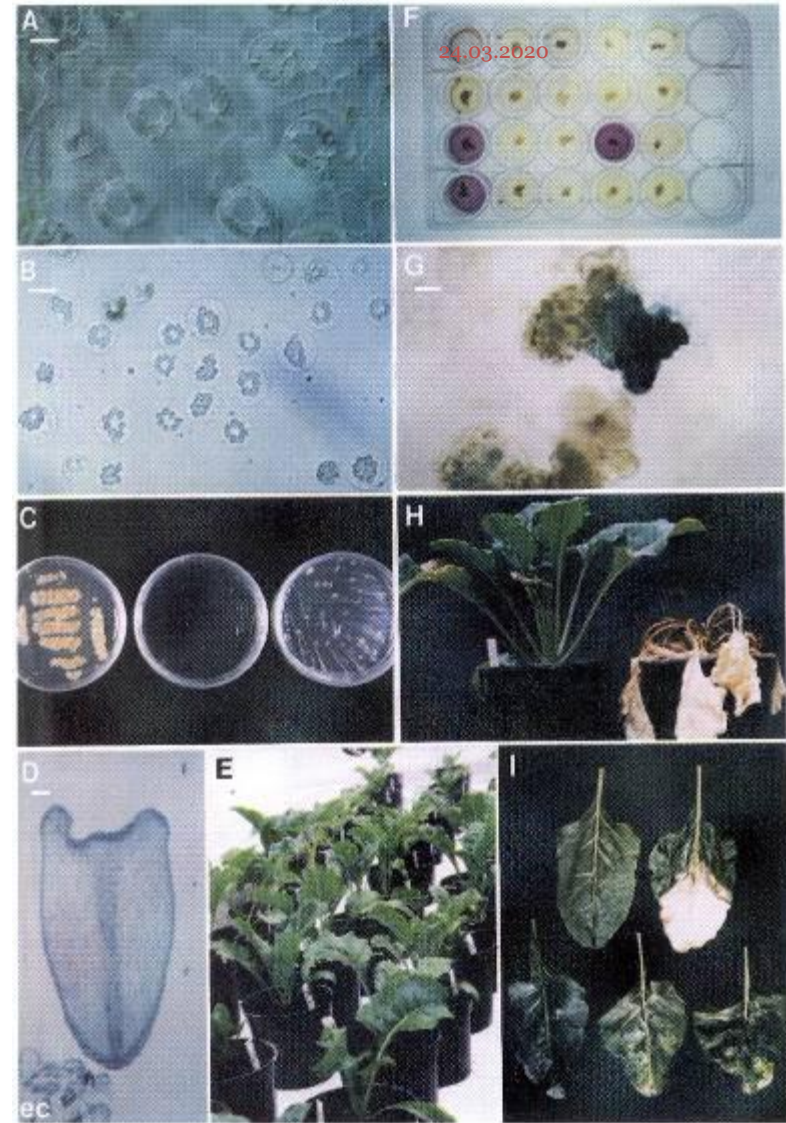
24.03.2020



Kimyasal DNA Transferi

- Genellikle hücre duvarı alınmış bitki hücrelerine (protoplast) uygulanır.
- Birçok protokol mevcuttur:
 1. DNA ve protoplastlar bir araya getirilir.
 2. Ortama yüksek polikasyon içeren bir madde eklenir (PEG ve CaCl_2).
 3. DNA endositoz yoluyla hücreye girer ve çekirdekteki kromozoma yerleşir.

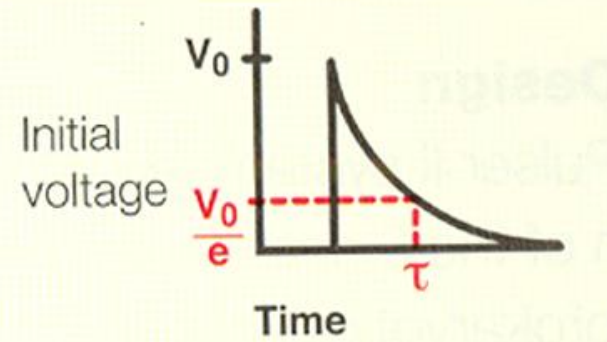
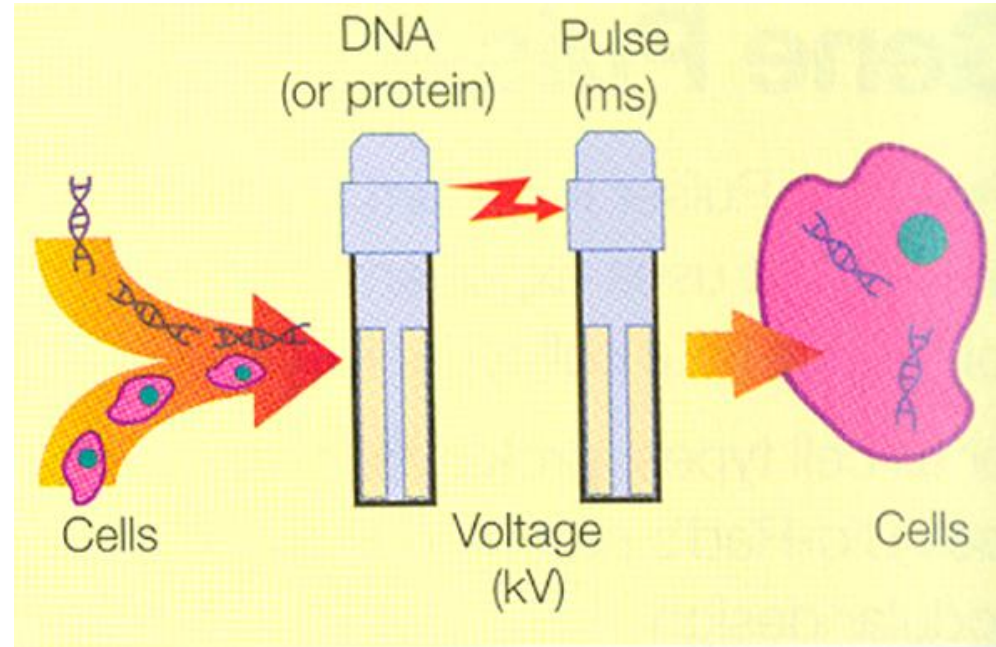
Polietilen glikol
aracılığı ile şeker
pancarı stoma
bekçi hücre
protoplastlarının
transnformasyonu



Fiziksel DNA transferi

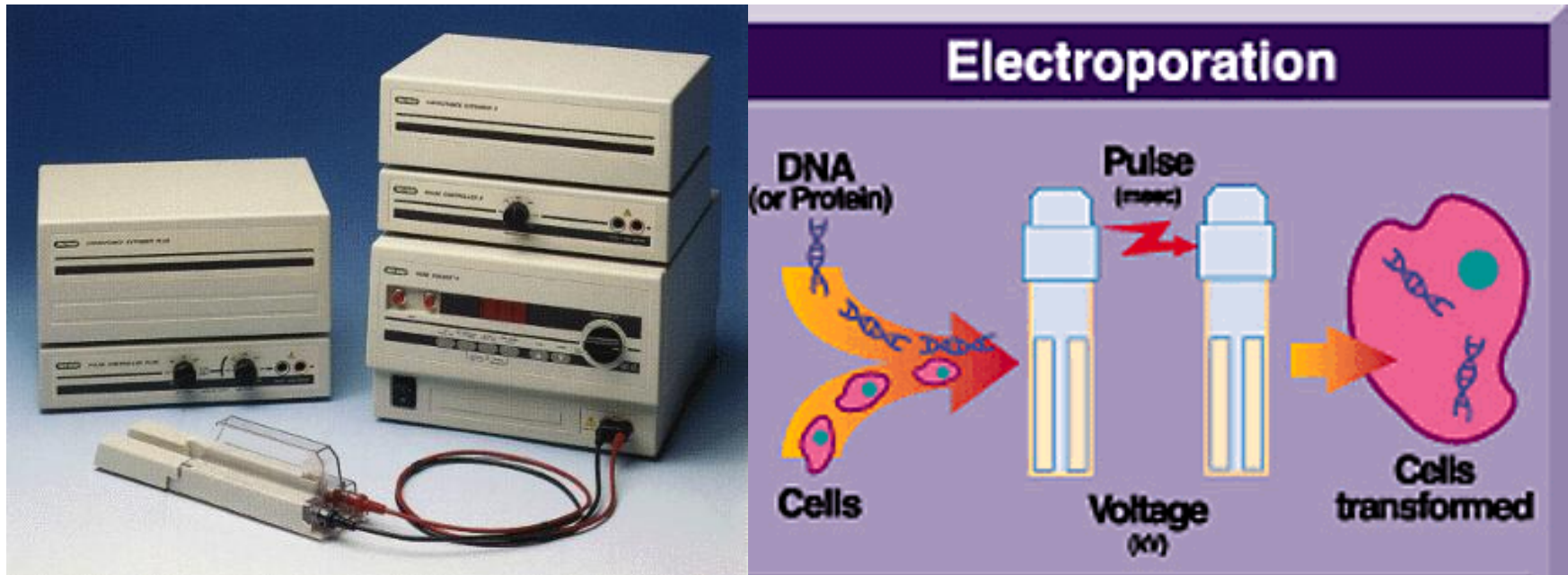
Elektroporasyon

- Genellikle protoplastlara uygulanır.
- Protoplastlar ve DNA bir araya getirilir.
- Yüksek voltaj uygulanır.
- Bu voltaj membranda geçici porlar oluşturur
- DNA bu porlardan içeri girer.

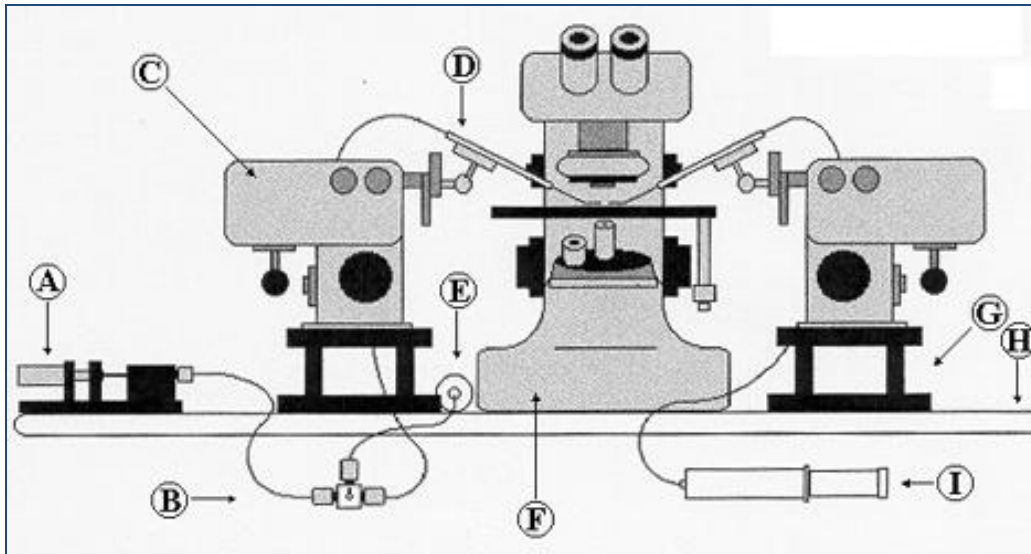


Exponential decay pulse

Elektroporasyon cihazı



Mikroenjeksiyon



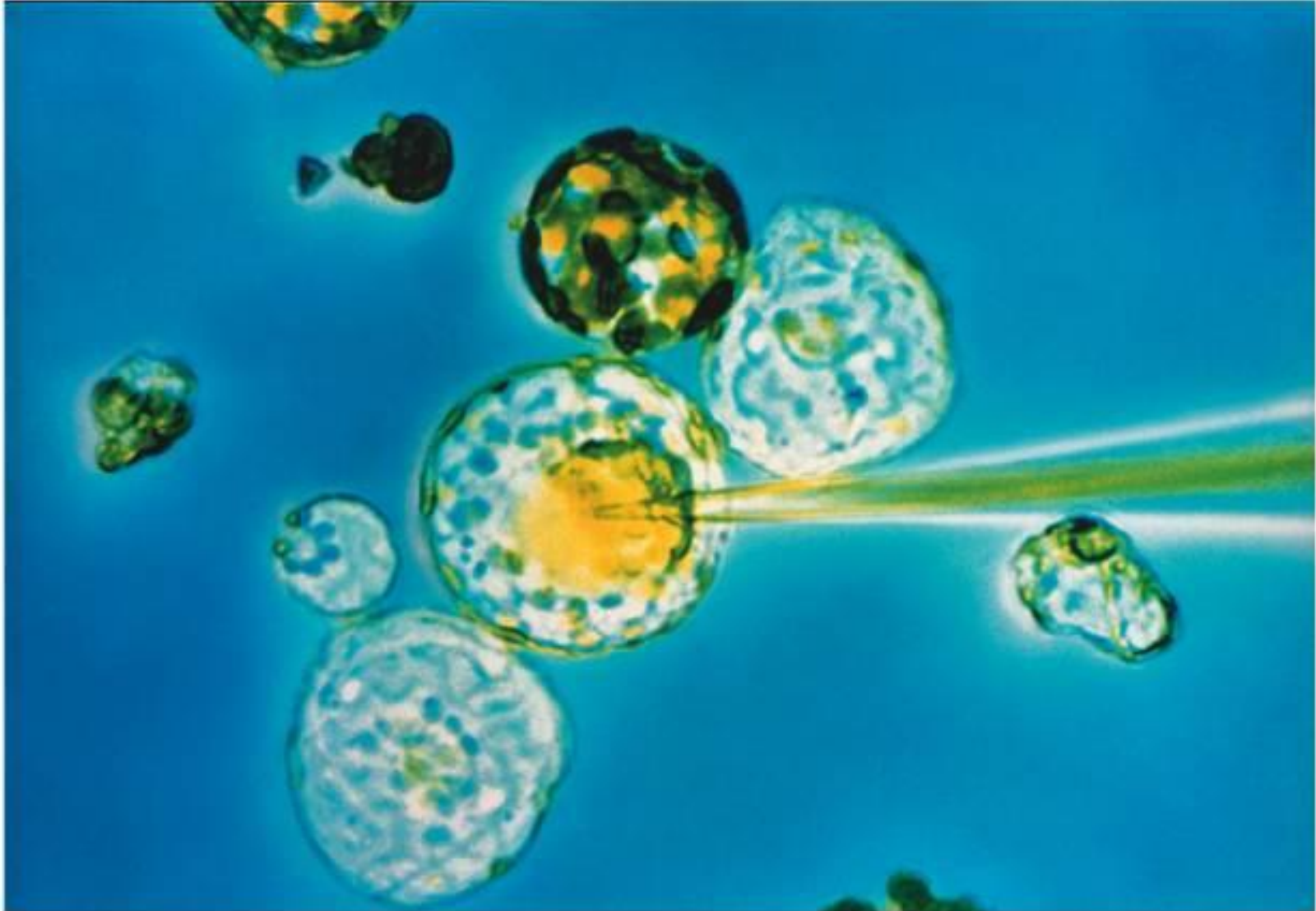
Bitkiye aktarılması istenen genleri taşıyan DNA parçası çok ince (0.5-10 μm çapında) kılcal pipetlerle veya enjektörlerle doğrudan immobilize edilmiş hedef hücrelere, kallus, meristem, mikrospor vb. içerisine steril şartlarda mikroskop altında enjekte edilir. Mikroenjeksiyon için protoplastlar poly-L-lysine üzerine yapıştırılarak veya agarose içerisine gömülerek sabit hale getirilirler.

24.03.2020



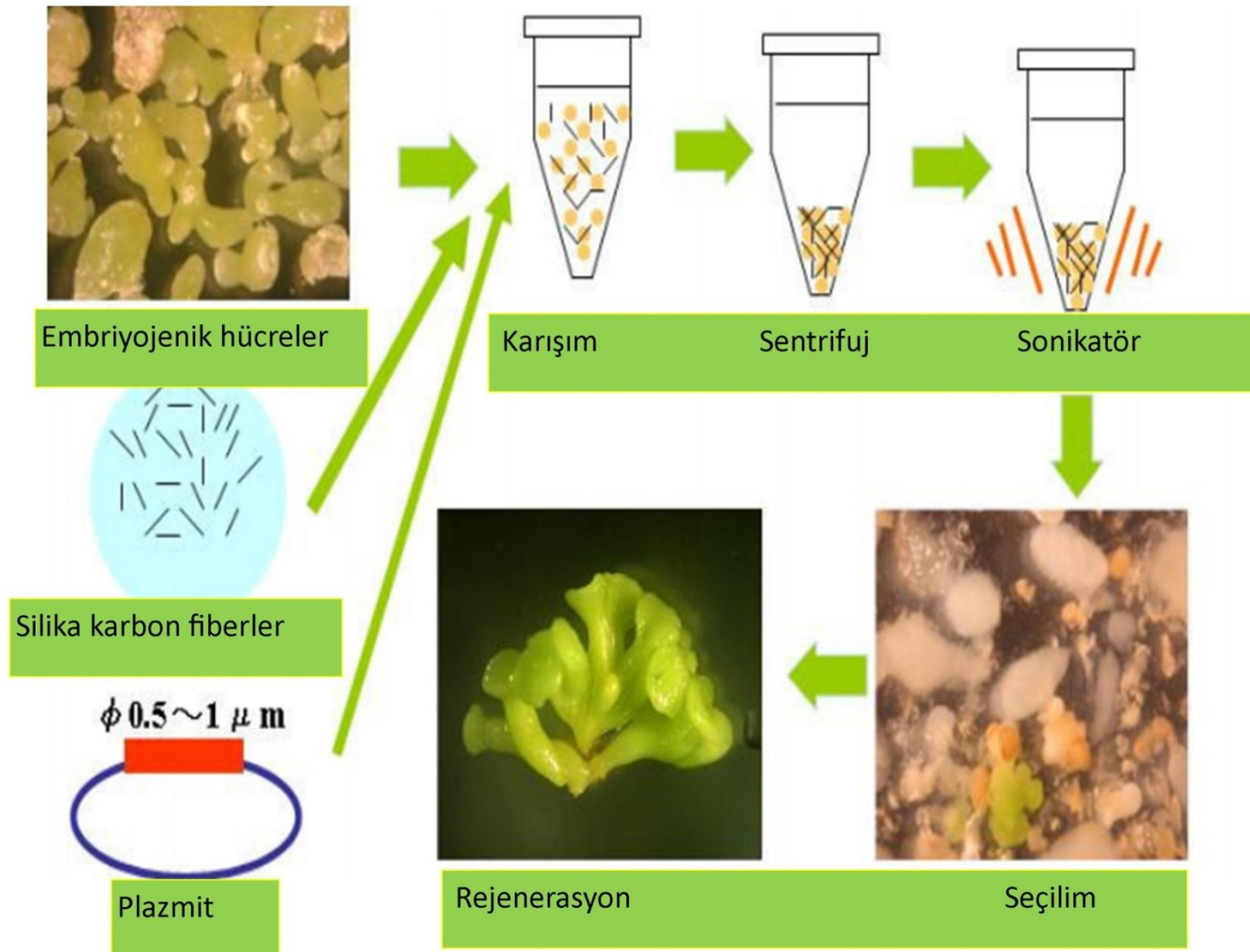
24.03.2020

Protoplast mikroenjeksiyonu



Silika karbon fiberler

24.03.2020

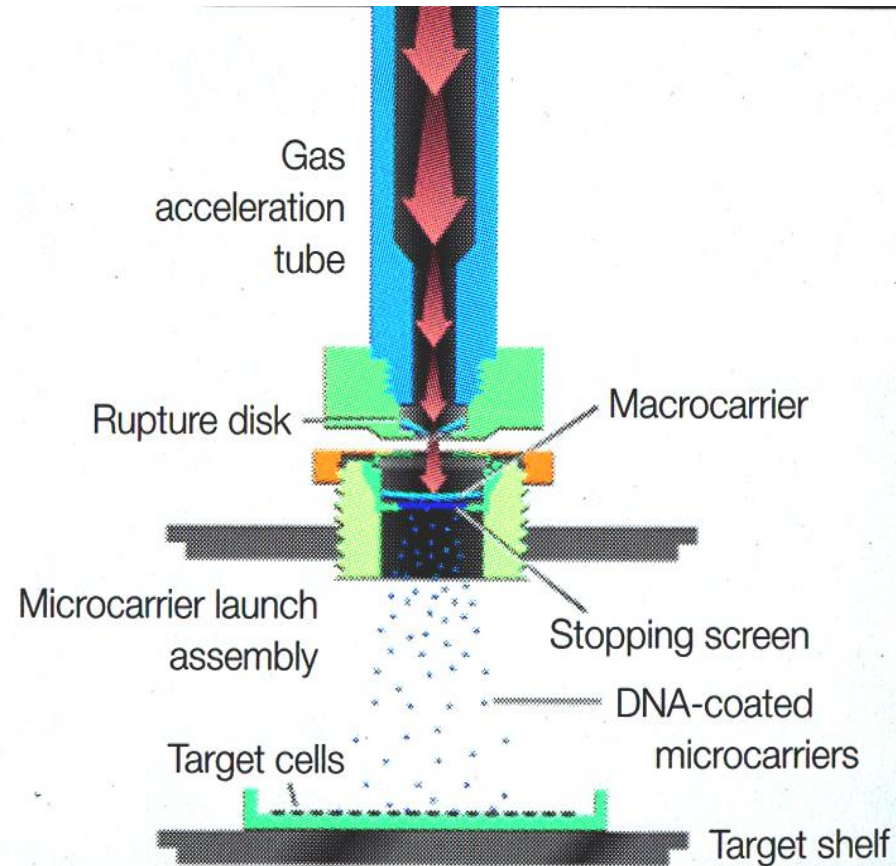


Partikül (Parça) Bombardımanı 24.03.2020 (Biyolistik)

- Organel transformasyonu yapılabilmektedir
- Yöntem :
 1. DNA altın yada tungsten partikülleri üzerine çöktürülür.
 2. Bu partiküller hücre yada dokuların içine girecek şekilde hızlandırılır.
 3. Diğer yöntemlerde olduğu gibi seçilme yolu ile tüm-bitkiler elde edilir

Bu yöntemin, olgunlaşmamış zigotik pirinç embriyolarına, mısır ve pamuk hücrelerine, buğdayın embriyonik kallus hücrelerine, başarılı bir şekilde uygulanabildiği gösterilmiştir. **Bu yöntem, basit olarak, DNA ile kaplanmış olan parçacıkların, hızlandırılarak hücre içine aktarılmasını kapsamaktadır.**

Helyum Gaz Tabancası : BioRad PDSHe1000 24.03.2020



Helyumun sıkıştırılması ve ani bir şekilde serbest bırakılmasıyla, bir çeşit şok dalgası oluşturmasını ve bu şok dalgası ile DNAyla yüklenmiş parçacıkların hızlandırılarak hücreye aktarılması işlemi

Seyyar Gaz Tabancası : BioRad

24.03.2020

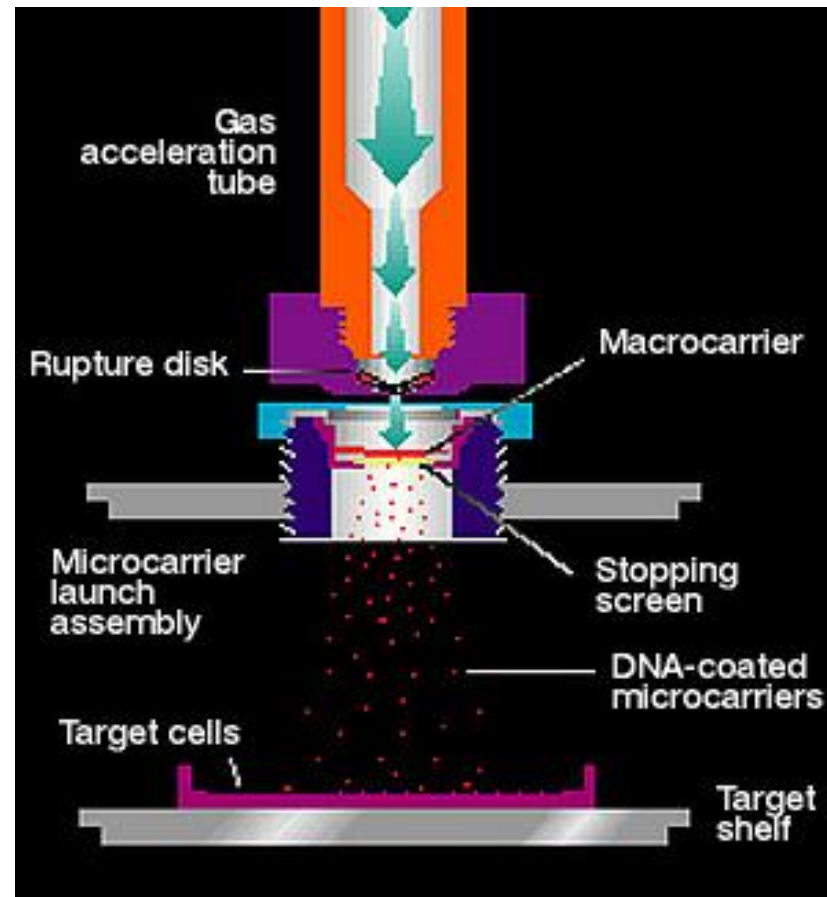


Amaç:

Laboratuvar dışında da gen transferi çalışmaları yapabilmek. Örneğin Pfizer tarafından 2006 yılında Kuş gribi aşılmasında kullanılmıştır.

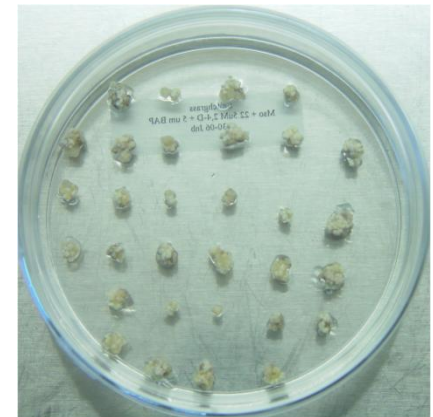
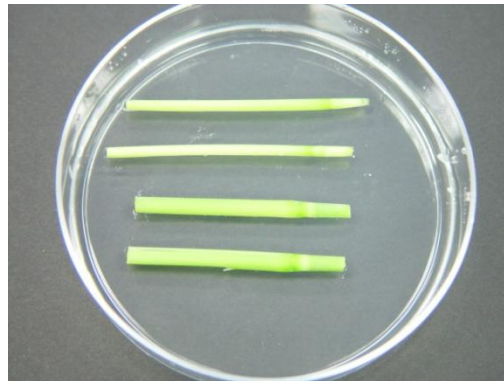
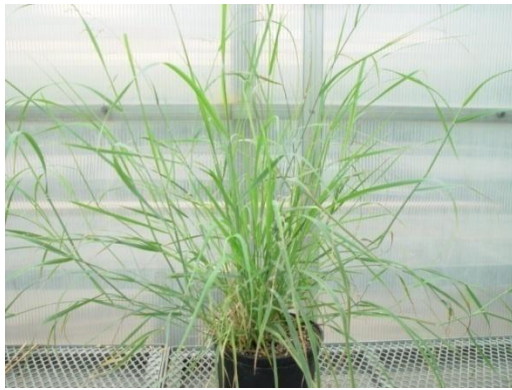
Parça bombardımanı

- Agro alternatifi
- Sanford 1987
- Altın ve tungsten
- Helyum ve azot

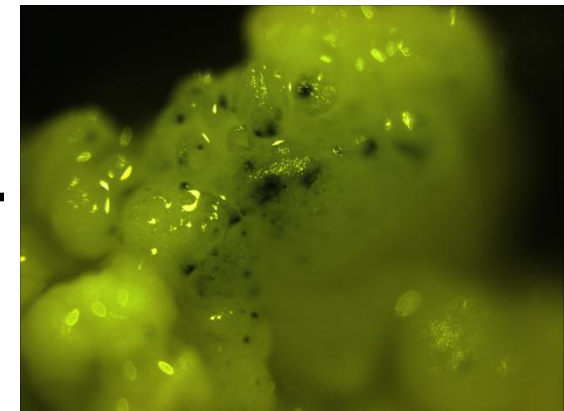
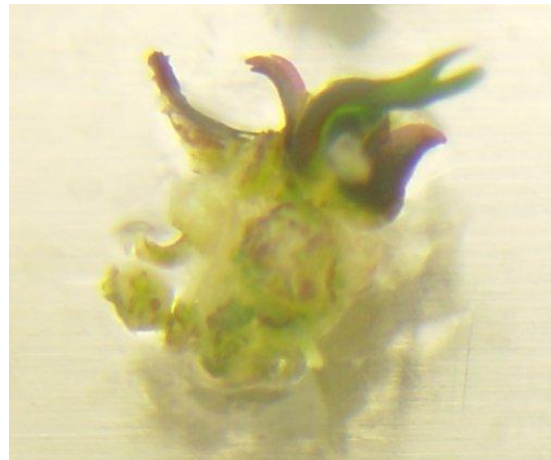


24.03.2020

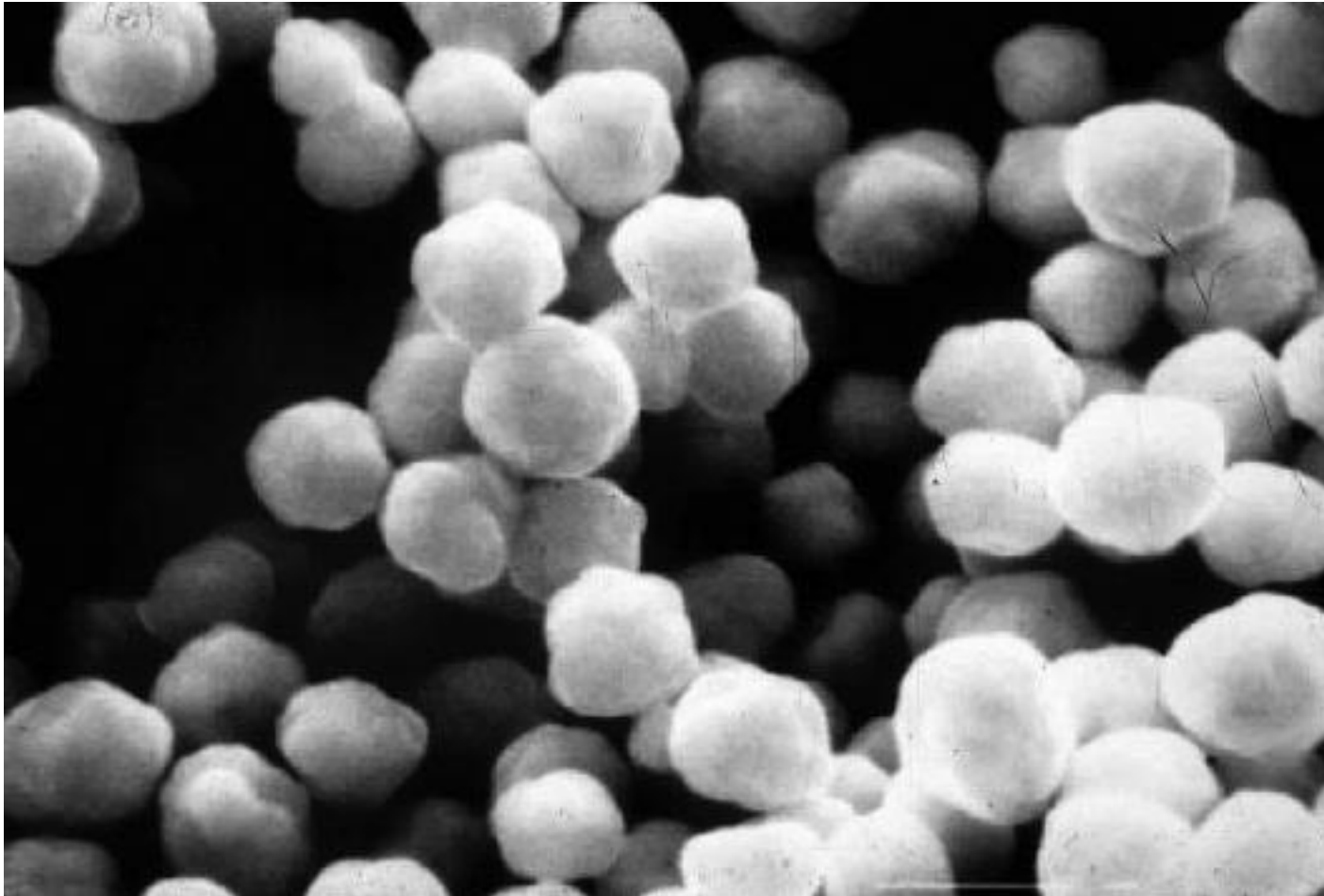
transformasyon



BANG!



24.03.2020



4.03.2020



Parça bombardımanı

- **Avantajları**

- Birçok bitki türüne uygulanabilir
- İkili vektöre ihtiyaç yoktur
- Gen kaseti kullanabilir
- Gen aktarım protokolü basittir

- **Dezavantajları**

- Tek kopyalı gen aktarımı zordur
- Cihaz ve sarf malzeme maliyeti yüksektir
- Aktarılan gen korunaklı değildir
- Sitoplazmadaki hedef rastgeledir

Biyolojik DNA transferi

Virüslerle gen aktarımı

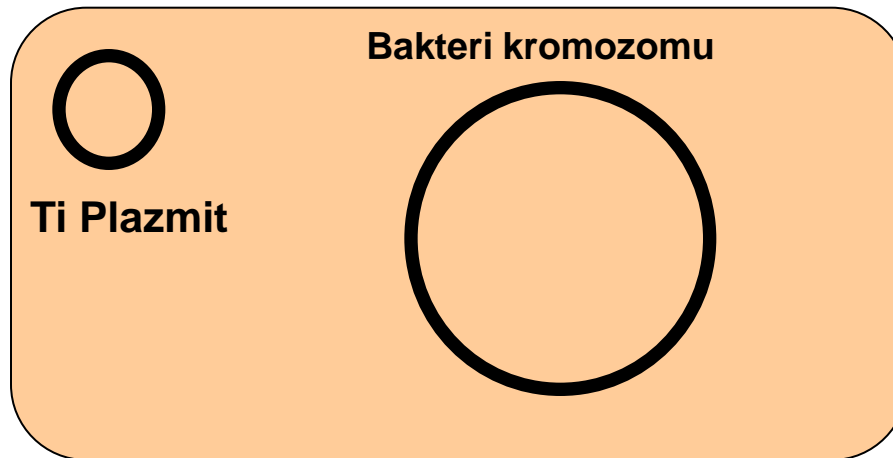
Caulimoviruses – KMV

Geminiviruses - Mısır çizgi virüsü

Bitki RNA virüsleri - TMV

Agrobacterium tumefaciens

- Doğal genetik mühendisi
- Tümör
- Ti plazmit

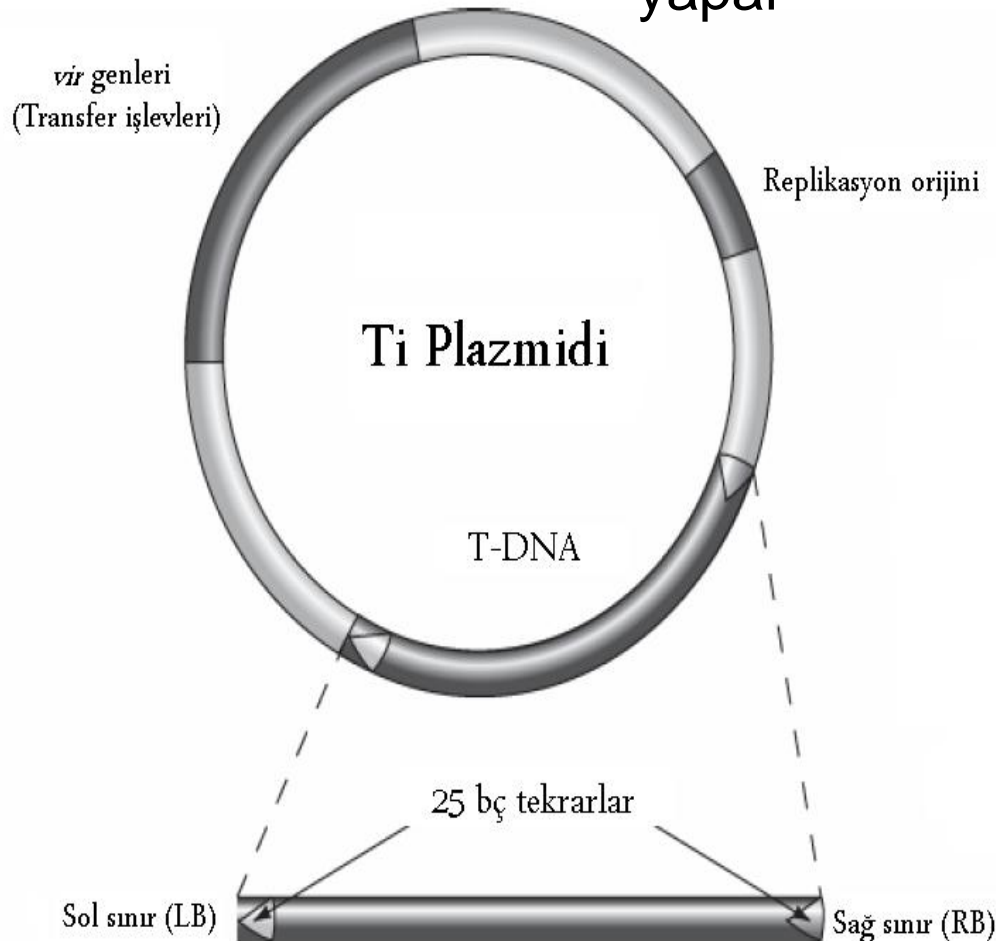


Agrobacterium tumefaciens

- *A. tumefaciens* – kök boğazı uru
- *A. rhizogenes*- saçak kök oluşumu
- Tümör hücreleri normal bitkide olmayan bazı aminoasitleri ve “opin” adlı şeker türevlerini sentezlerler.
- Tümör oluşumu ve opin sentezine *Agrobacterium*' un virü lent özellik taşıyan büyük plasmidleri neden olur (Ti plasmidi, 200 kb)
- Virülens özellik Ti plasmidin T-DNA kısmında taşınır.

Ti Plazmit

- Tümör-oluşturan plazmid
- Agrobacterium tumefaciens* bakterisinden
- Çift çenekli bitkilerde taç uru hastalığı yapar

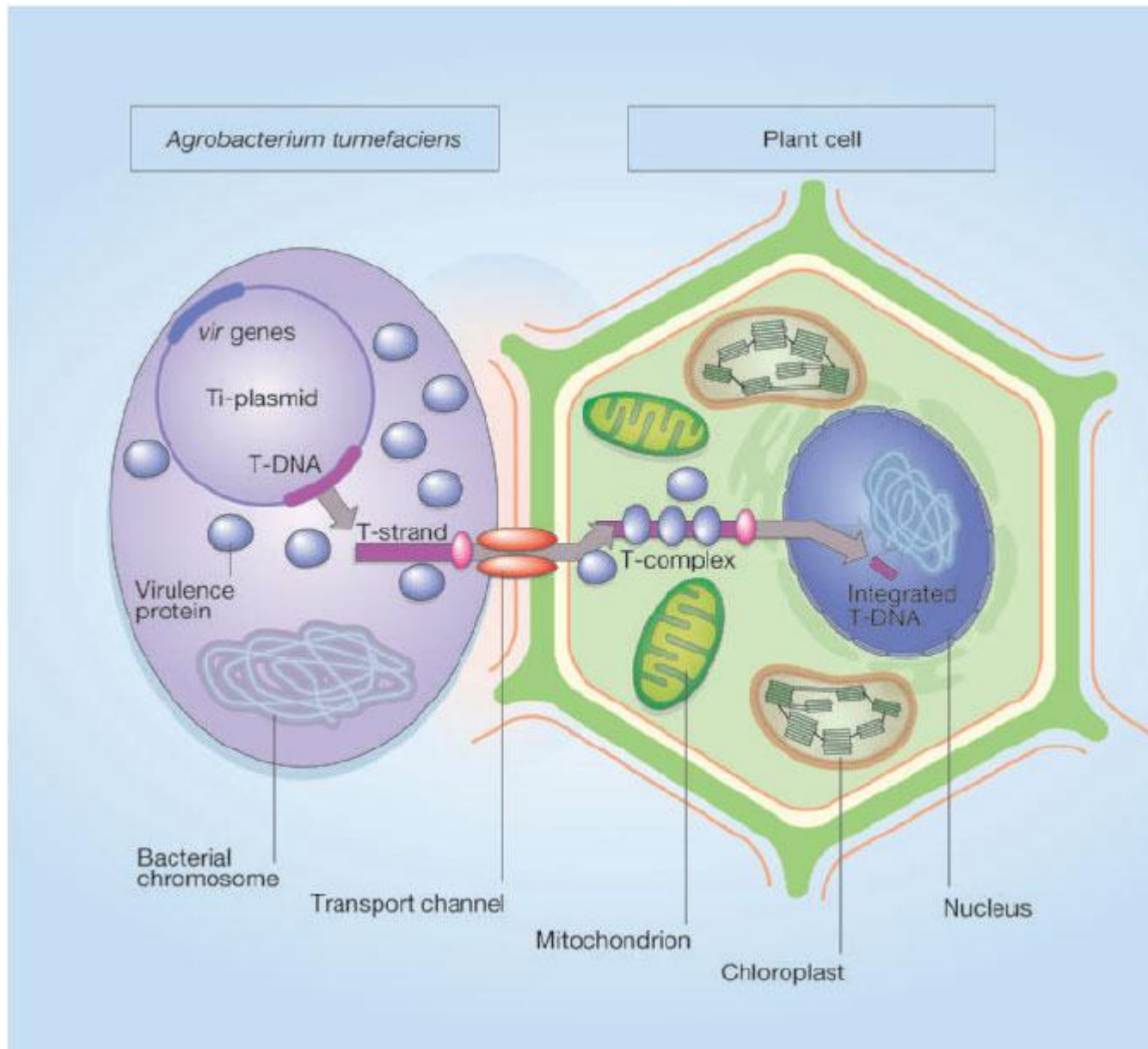


Sol ve sağ sınırlar arasındaki DNA bitkiye ssDNA;

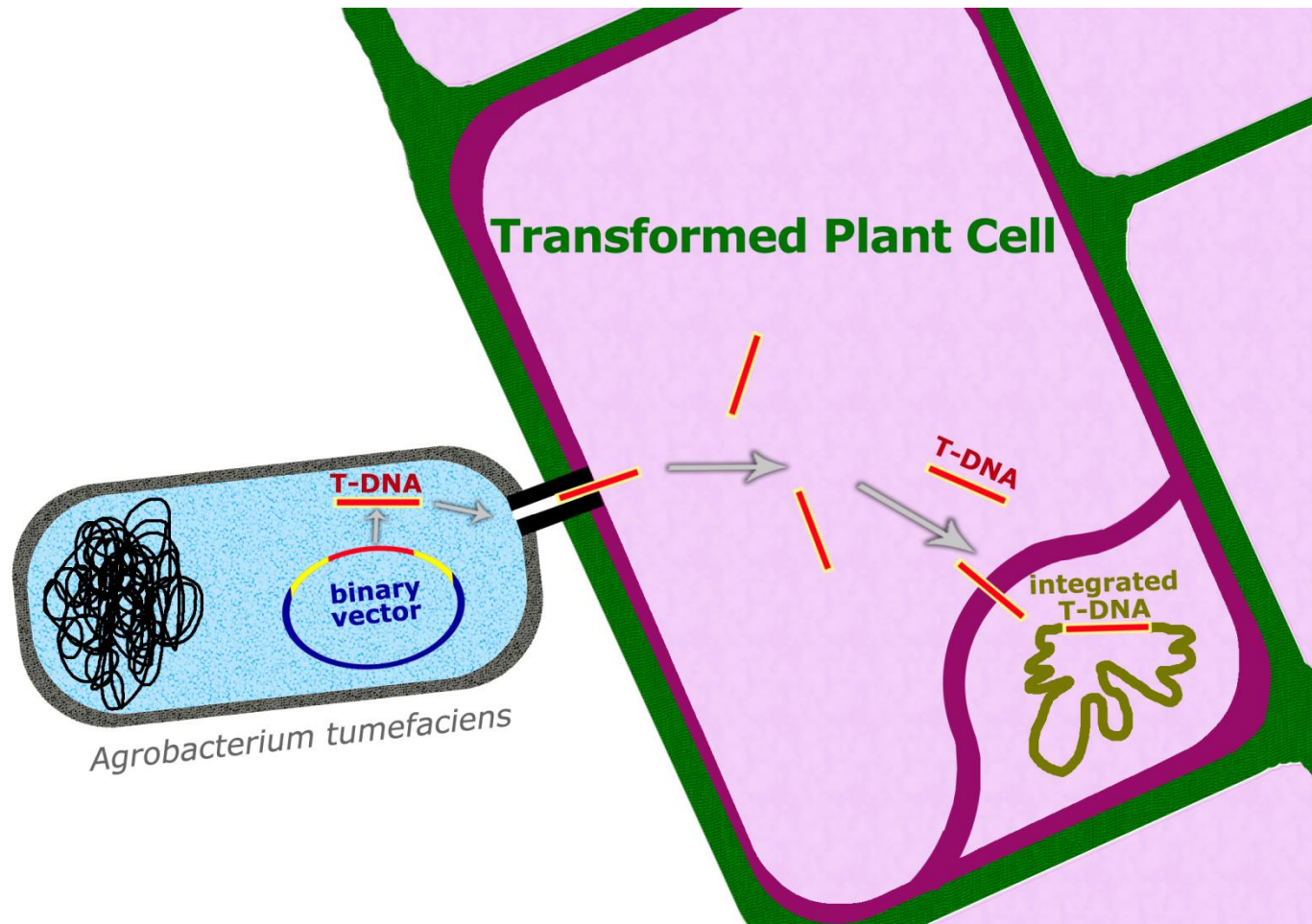
T-DNA bölgesindeki genler değiştirilebilir

- *A. tumefaciens* ile enfeksiyon sonucunda T-DNA bölgesi bitki hücrelerine geçer, kromozomuna kendini sokar ve virülens genlerin ifadesi yoluyla tümör oluşumu ve opin sentezini sağlar.
- Yaralı bitki hücrelerinden salgılanan flavanoid (asetosyringone) vir genlerini aktive eder.
- Vir A, B, C, D, E, E, F, G
- Monokotlar asetosyringon oluşturamadıklarından bu bakteri sistemi çalışmaz.

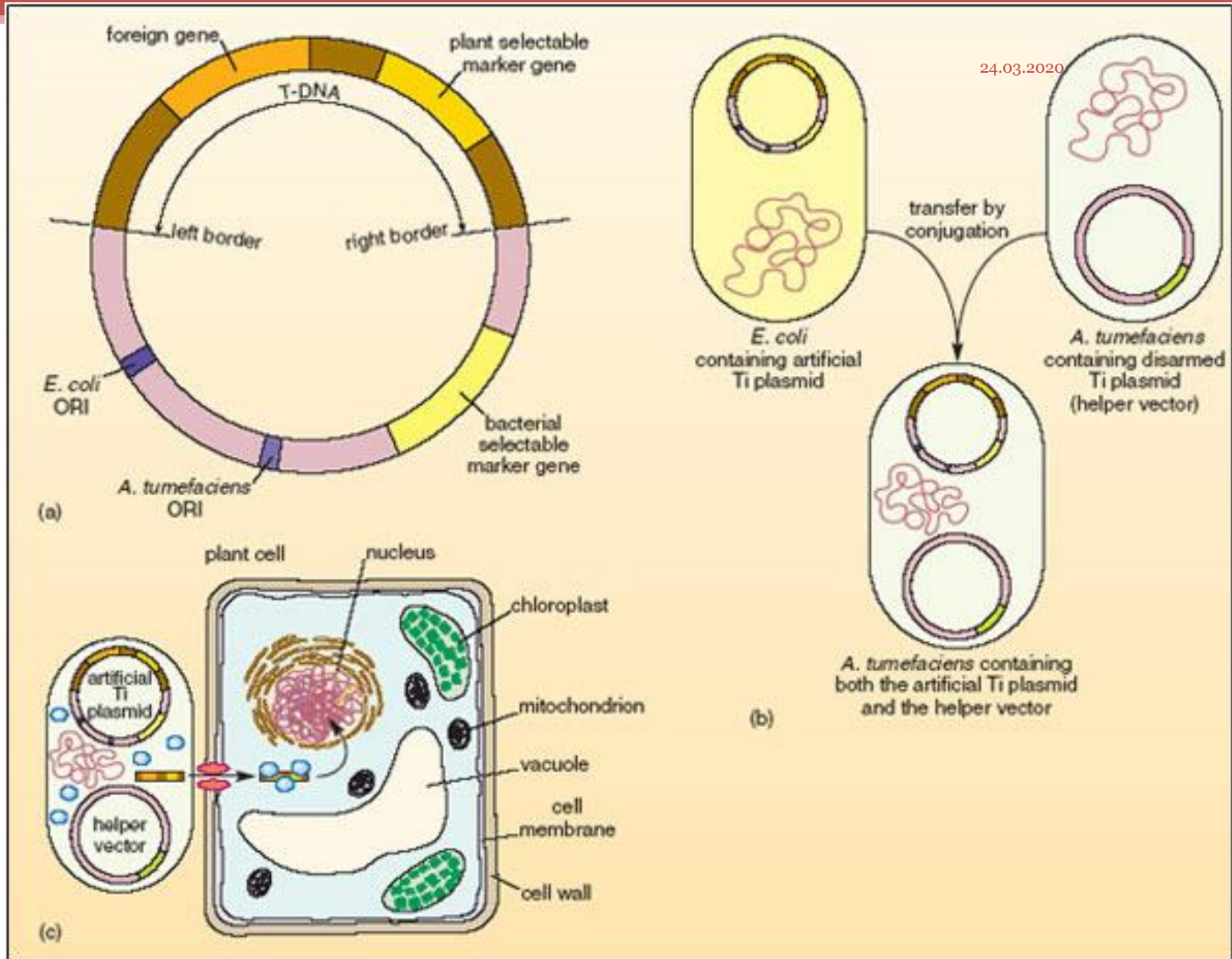
24.03.2020



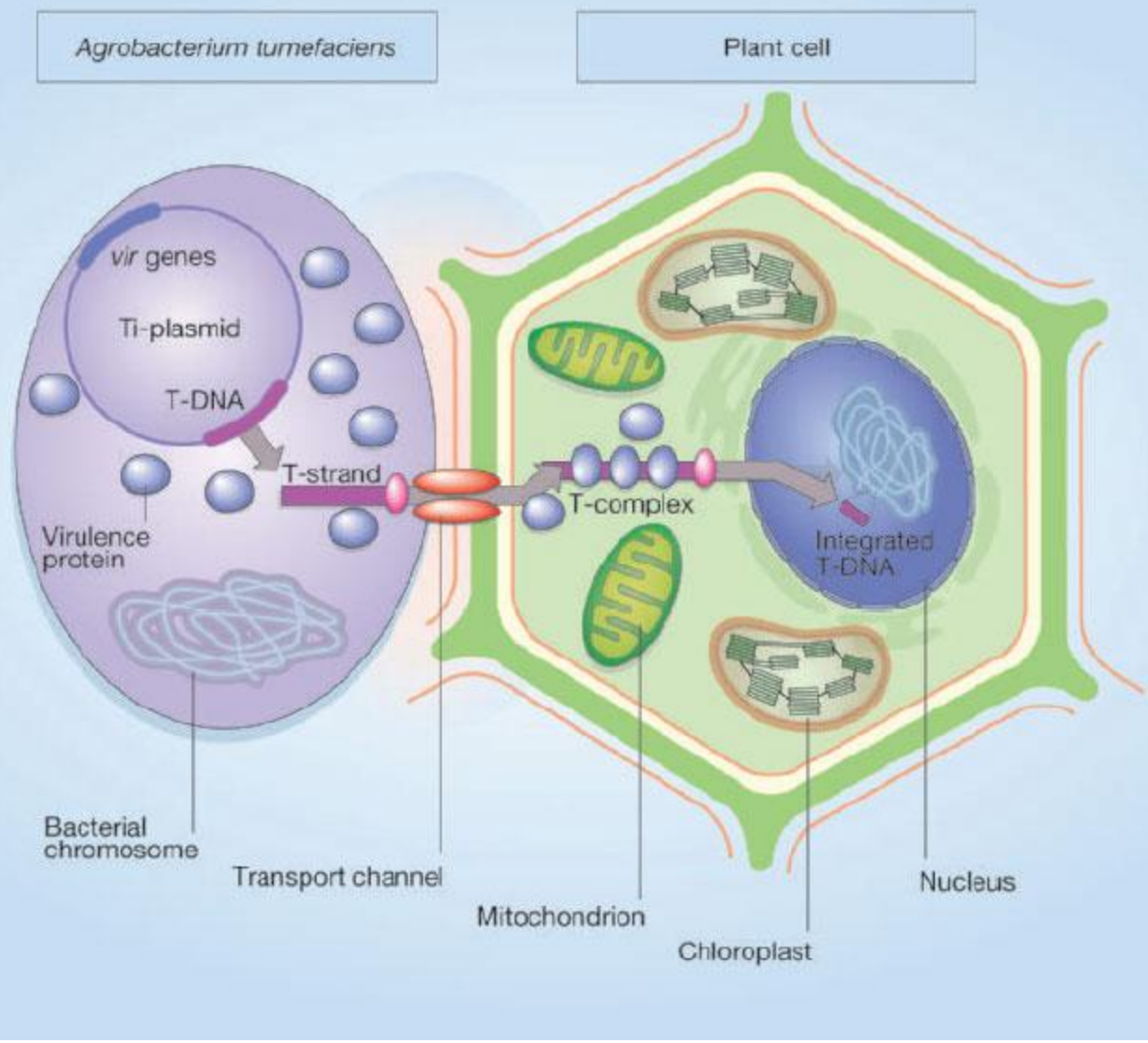
24.03.2020



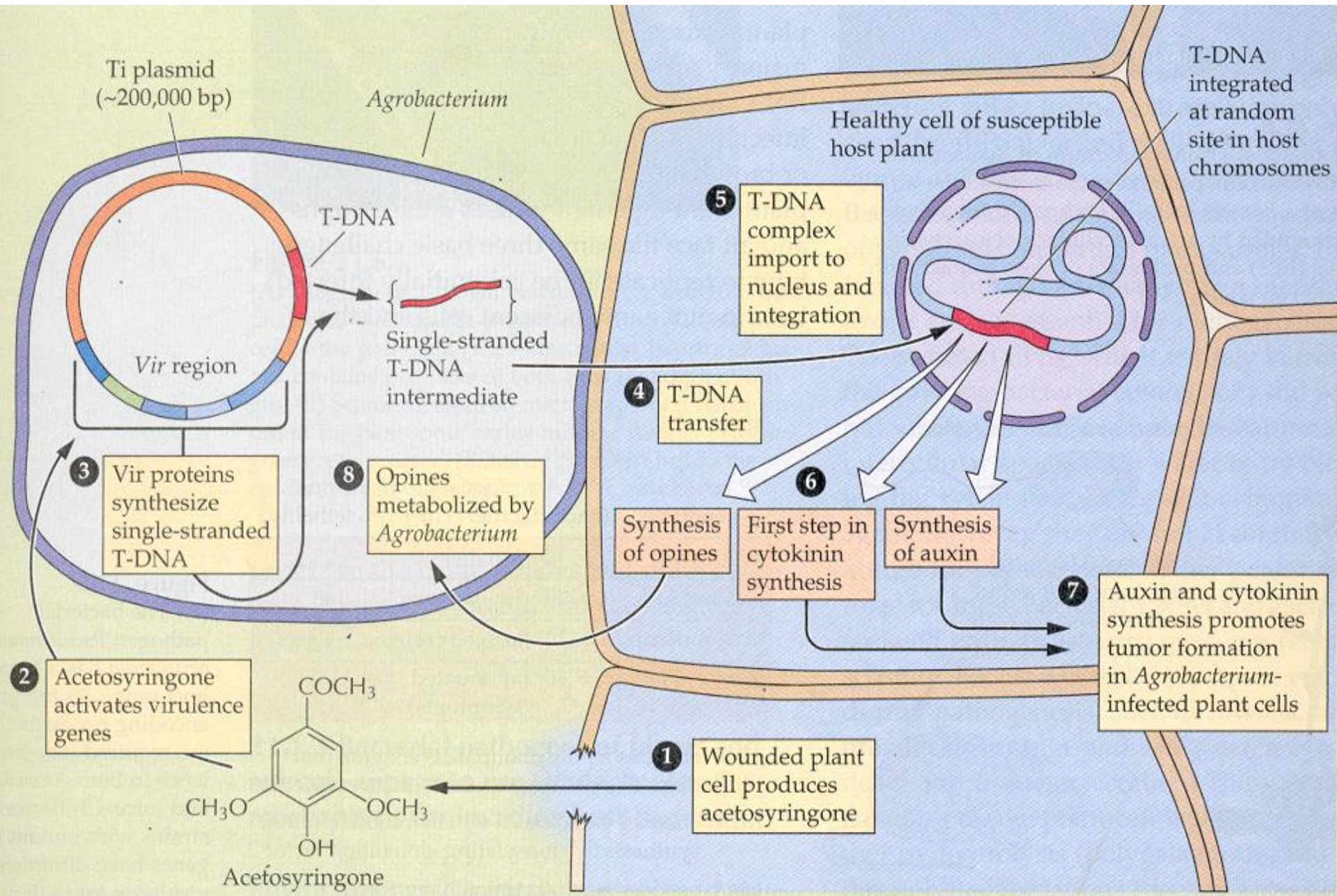
http://www.youtube.com/watch?v=L7qnY_GqytM



Agrobacterium contains a tumour-inducing (Ti) plasmid, which includes virulence (*vir*) genes and a transferred-DNA (T-DNA) region. Genes of interest can be inserted into the T-DNA. Wounded plant cells produce phenolic defence compounds, which can trigger the expression of the *Agrobacterium vir* genes. The encoded virulence (*Vir*) proteins process the T-DNA region from the Ti-plasmid, producing a 'T-strand'. After the bacterium attaches to a plant cell, the T-strand and several types of *Vir* proteins are transferred to the plant through a transport channel. Inside the plant cell, the *Vir* proteins interact with the T-strand, forming a T-complex. This complex targets the nucleus, allowing the T-DNA to integrate into the plant genome and express the encoded genes.

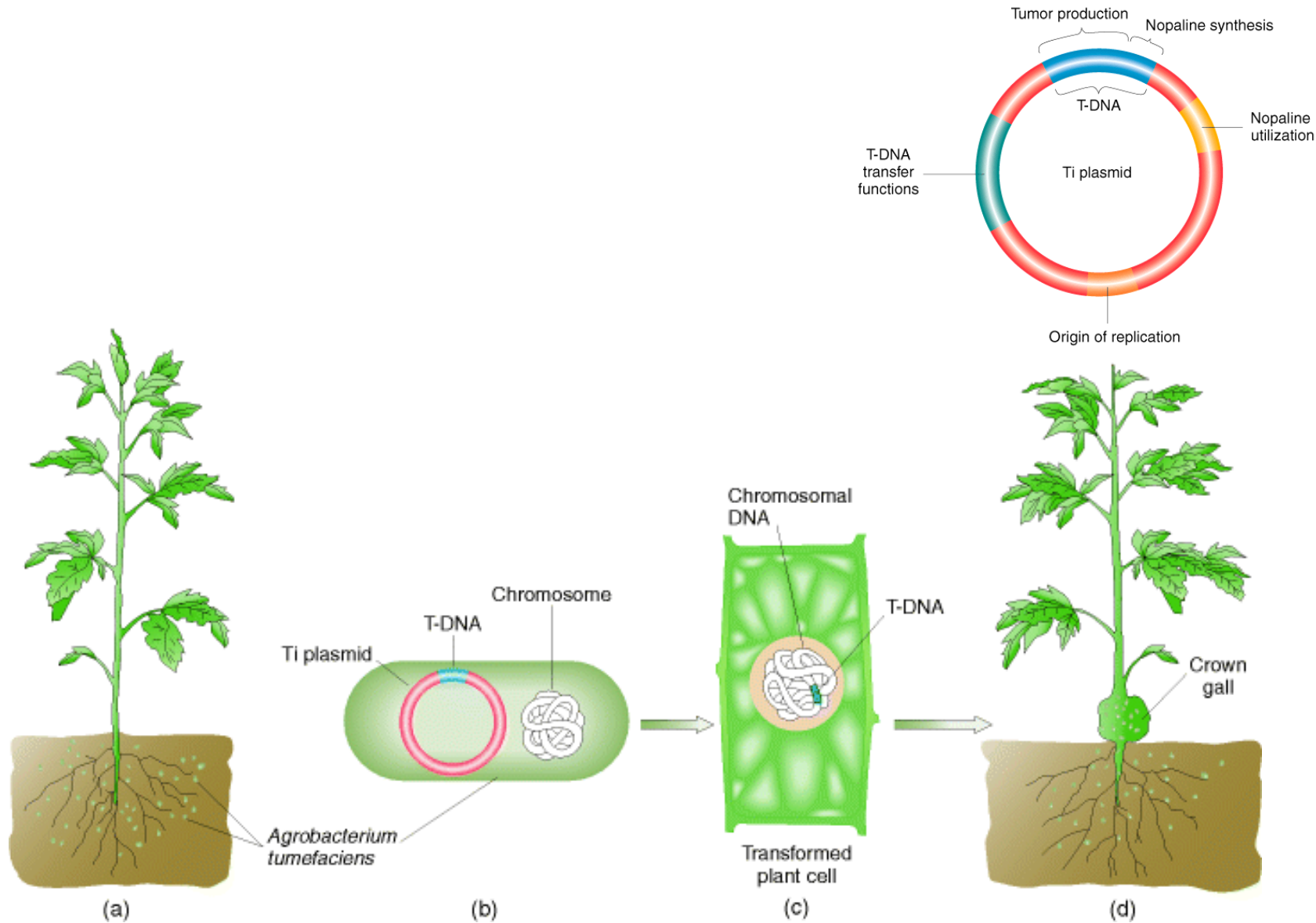


Enfeksiyon sürecinin özeti



24.03.2020

Agrobacterium tumefaciens Yöntemi

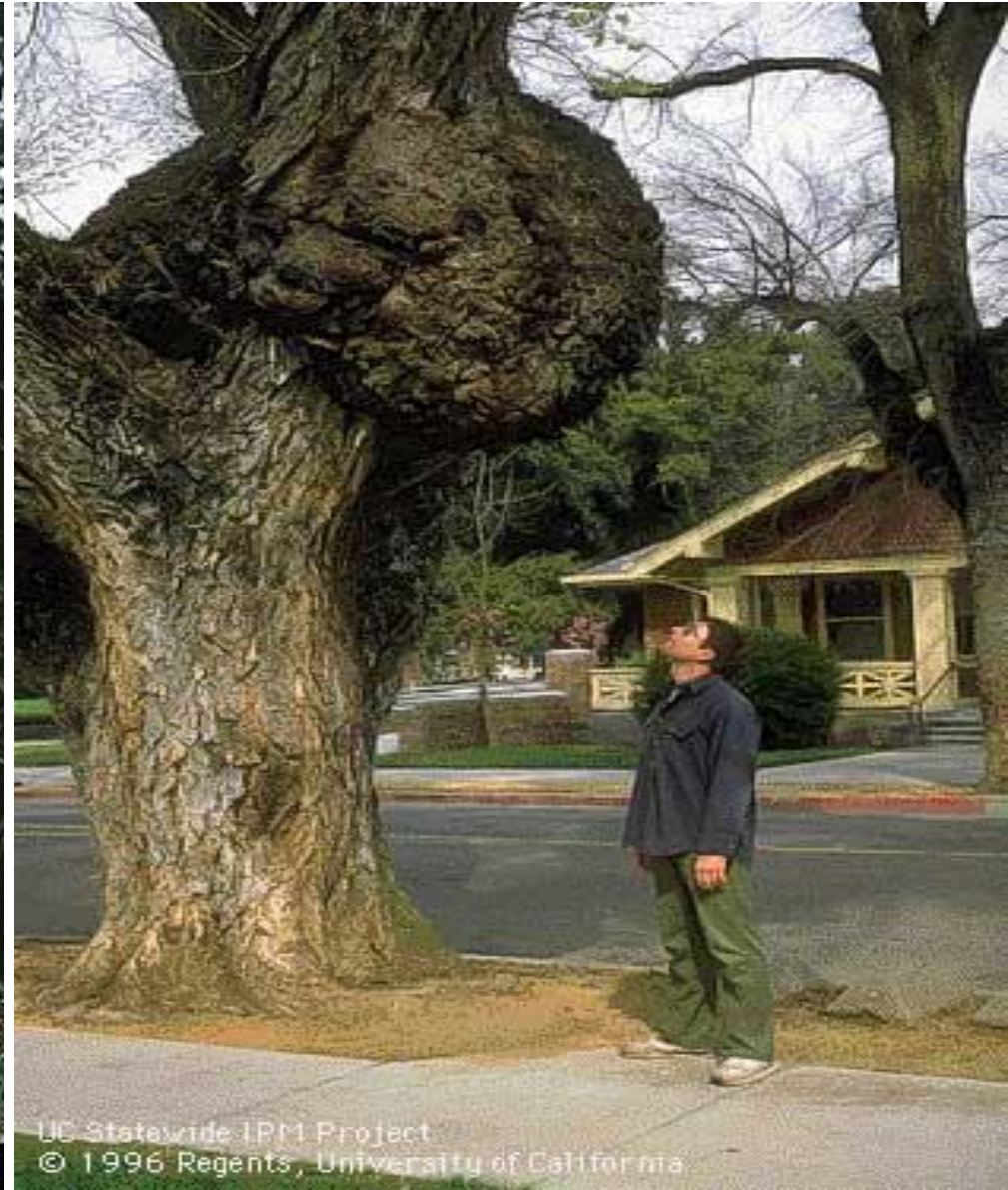


A. tumefaciens taç uru

24.03.2020

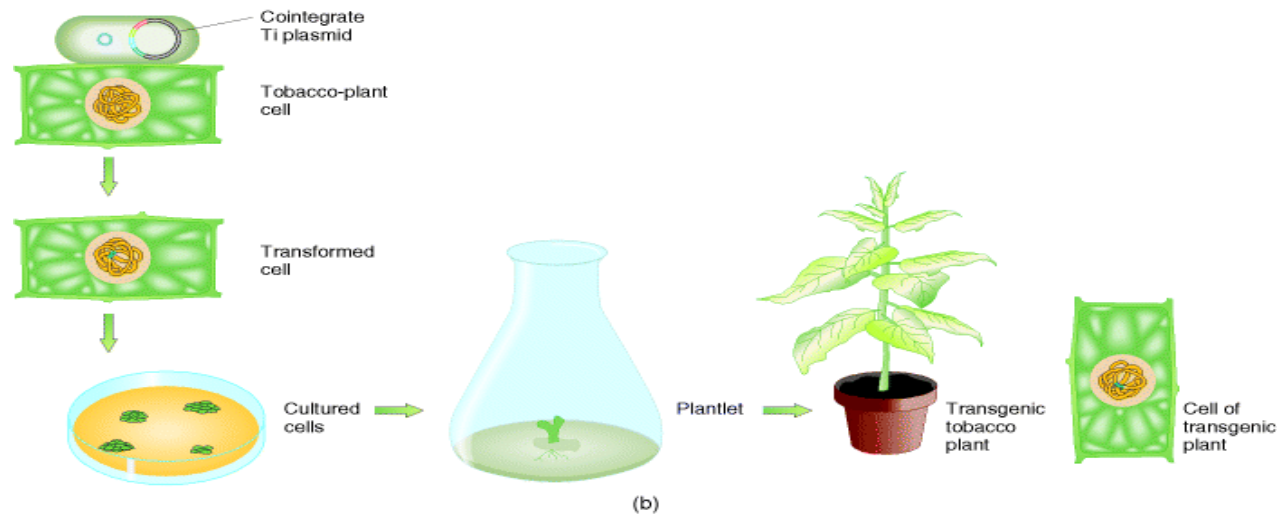
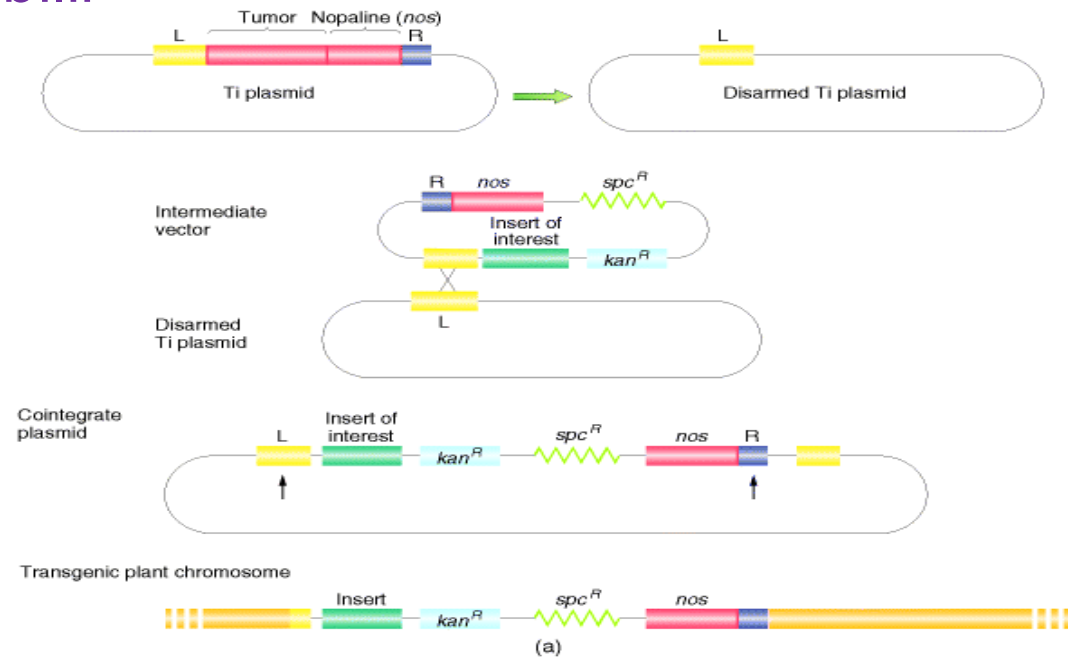


copyright: IFFF (BOKU)

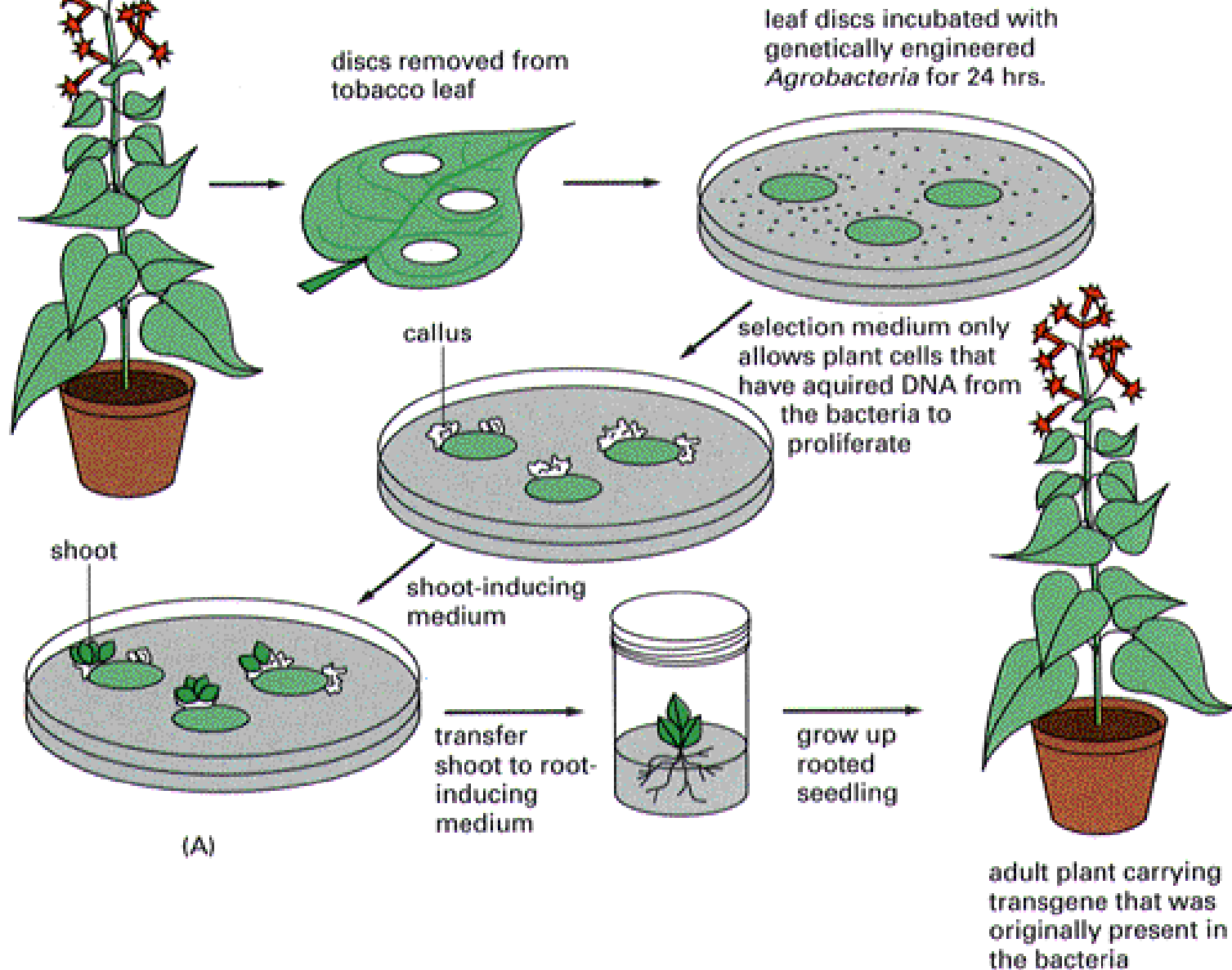
UC Statewide IPM Project
© 1996 Regents, University of California

Ti plazmitleri Transgenik Bitki Elde Etmek İçin Bir Vektör Olarak Kullanılabilir

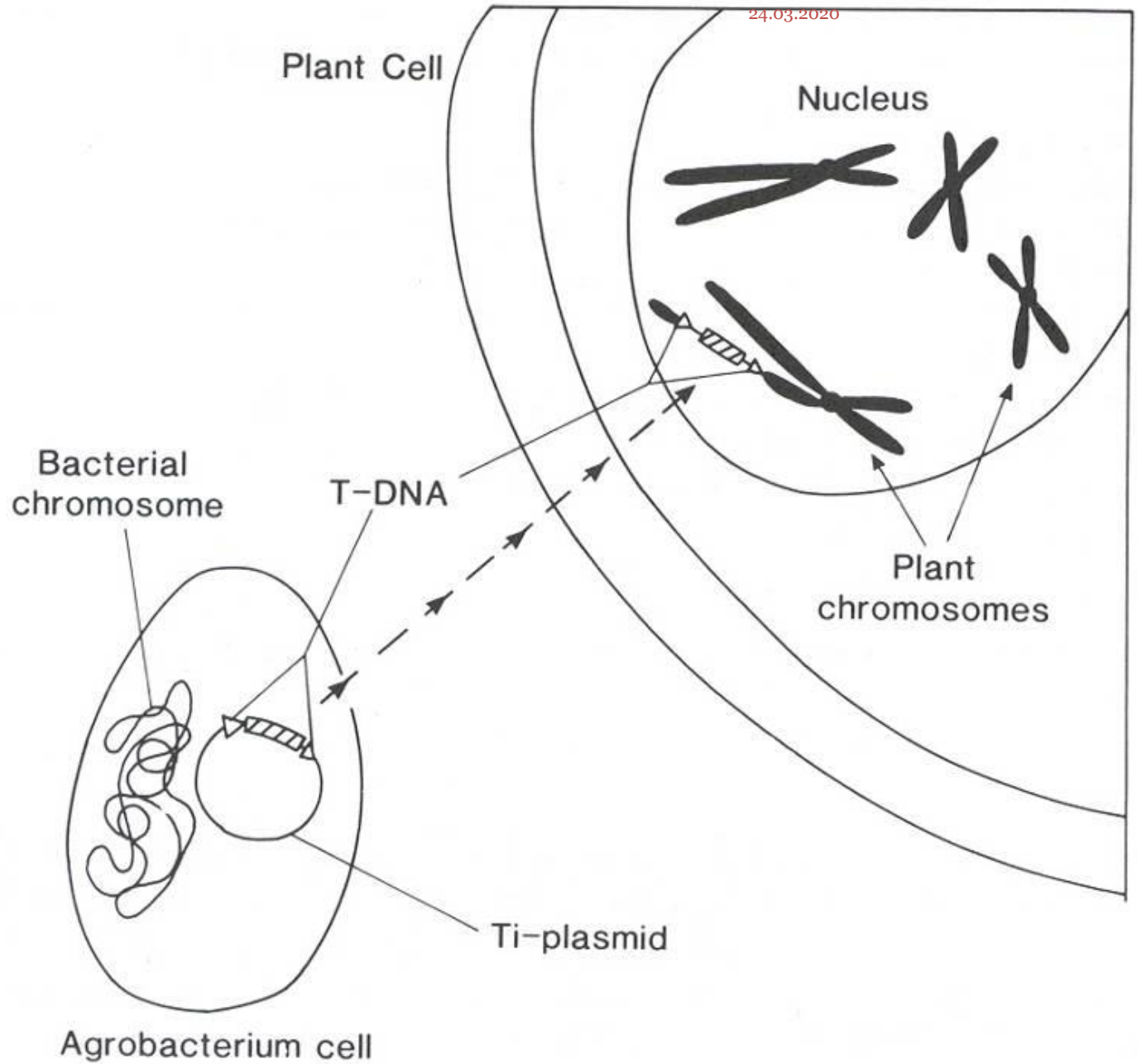
24.03.2020



Agrobacterium transformasyonu

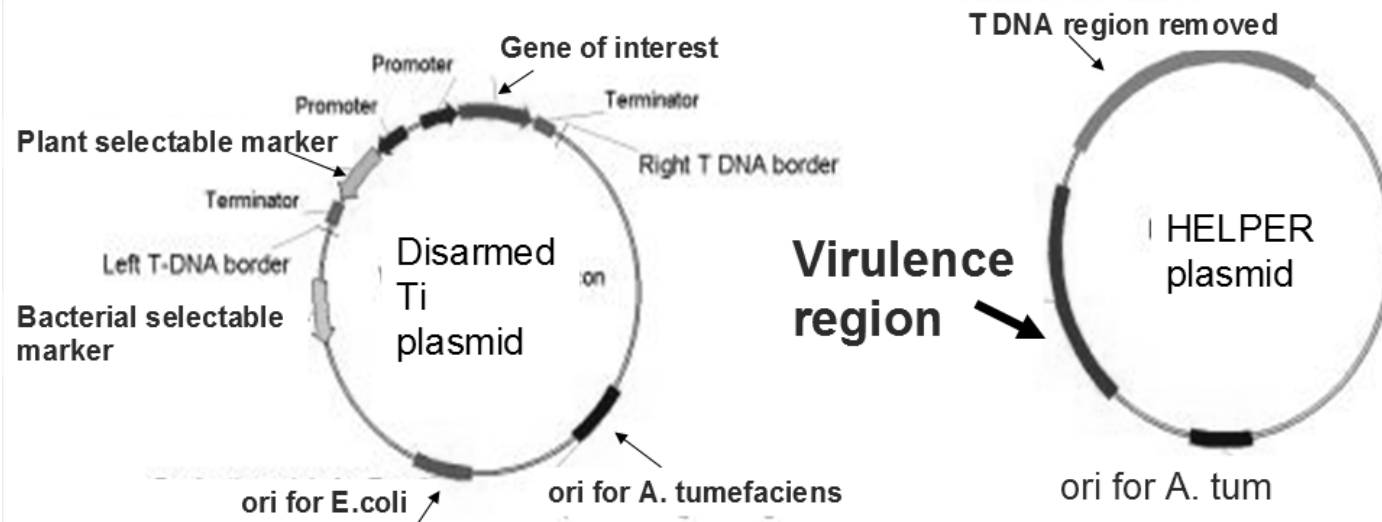


24.03.2020



Klonlamada kullanılan sistem-1

Ti plasmid vector systems are often working as binary vectors

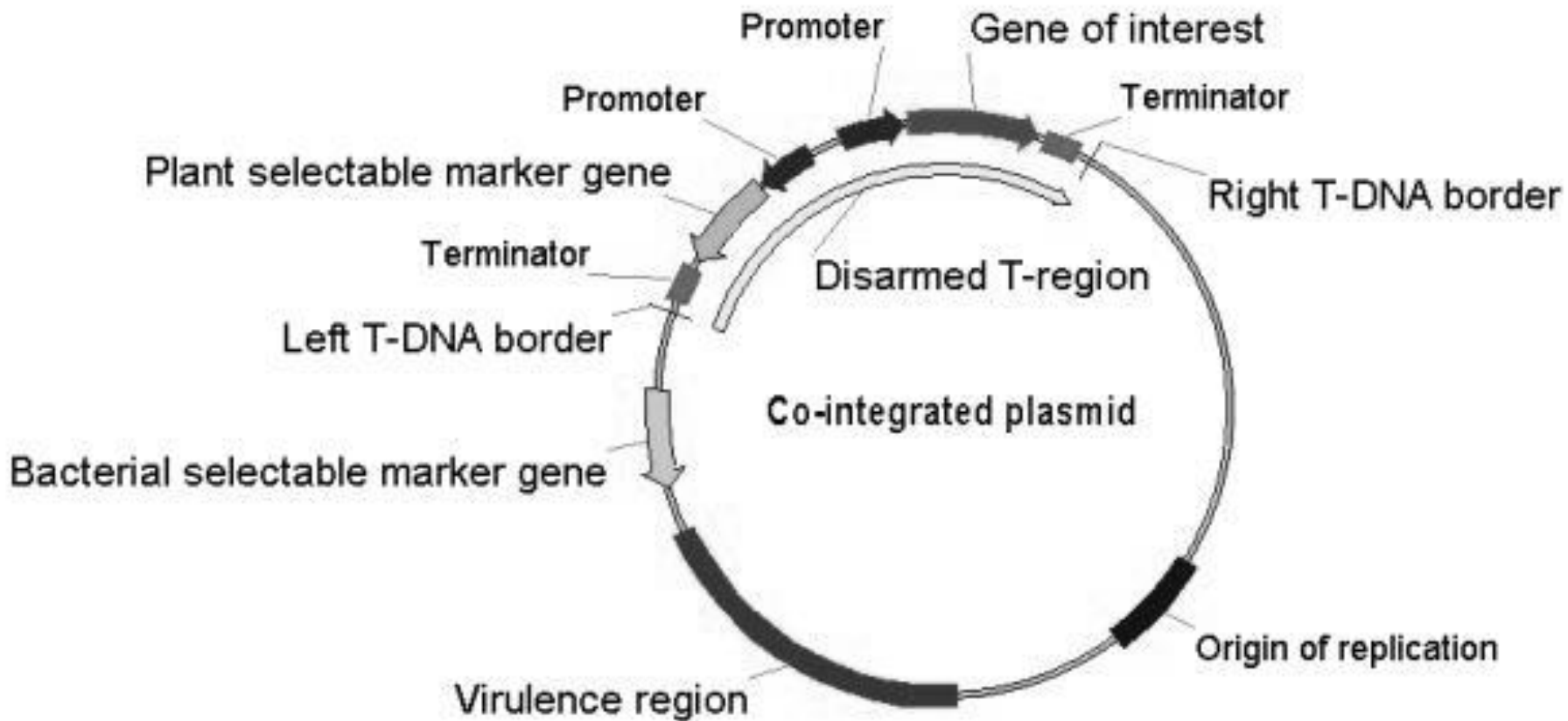


DISADVANTAGE: Depending on the orientation, plasmids with two different origins of replication may be unstable in *E. coli*

ADVANTAGE: small vectors are used, which increases transfer efficiency from *E. coli* to *Agrobacterium*.

No intermolecular recombination is needed

Klonlamada kullanılan sistem-2



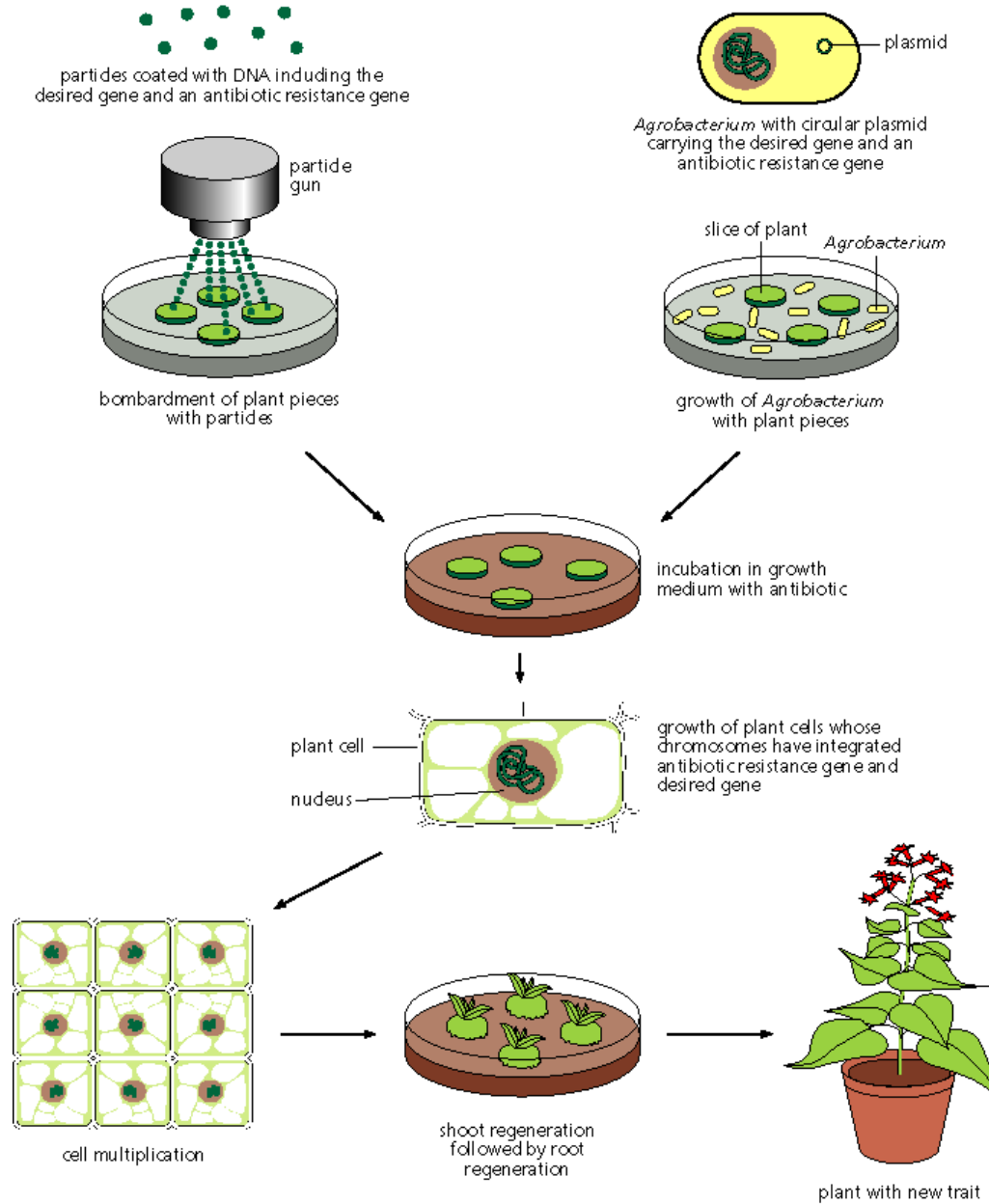
Agrobacterium transformasyonunun sınırları

- Çoğu monokot bitkiyi enfekte etmez
- Farklı *A. tumefaciens* izolatları farklı bitki türleri üzerinde farklı virülens seviyelerine sahiptirler

Parça bombardımanı metodu

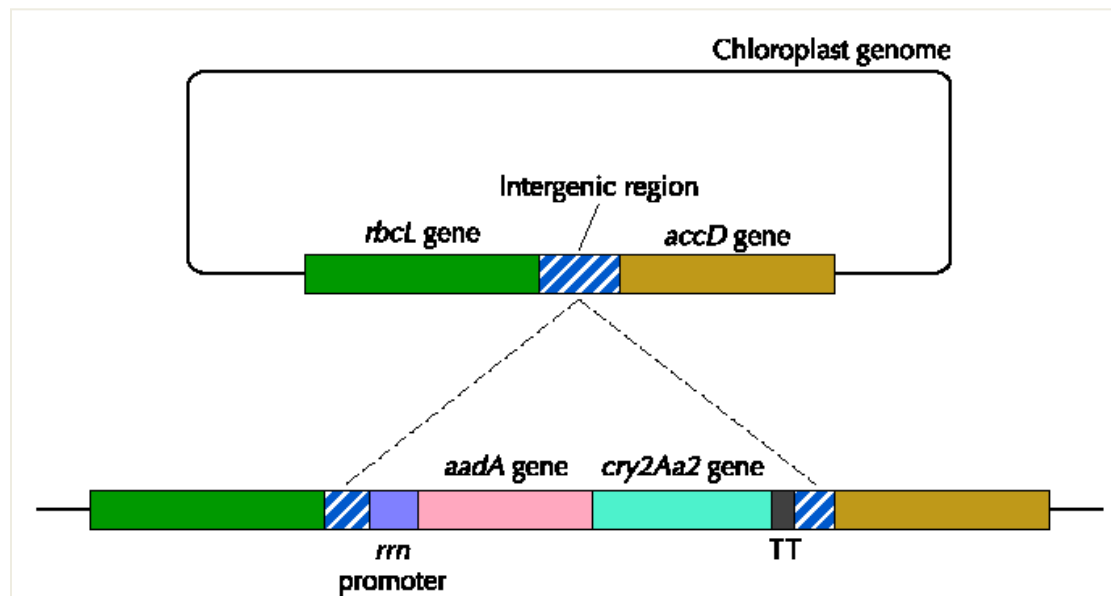
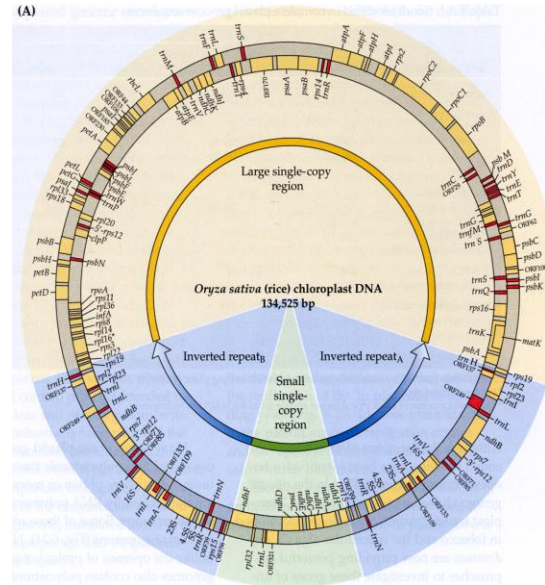
Agrobacterium metodu

24.03.2020



Kloroplast transformasyonu

24.03.2020



Kloroplast transformasyonu

- Kloroplast transformasyon teknolojisi bitkilerde nükleer genom yerine kloroplast genomuna transgenlerin aktarılmasıyla oluşan bir teknolojidir.
 - Epigenetik etkilerinin olmaması,
 - yüksek seviyede transgen ifadesi ve protein birikimi,
 - çoğu türlerde plastidler maternal kalıtım gösterdiğinden dolayı polen kaçıışı olmaması ve
 - aktarılacak olan gen bölgelerinin kontrol edilebilmesi
- gibi bir çok avantajı bulunmaktadır.

Kloroplast transformasyonu

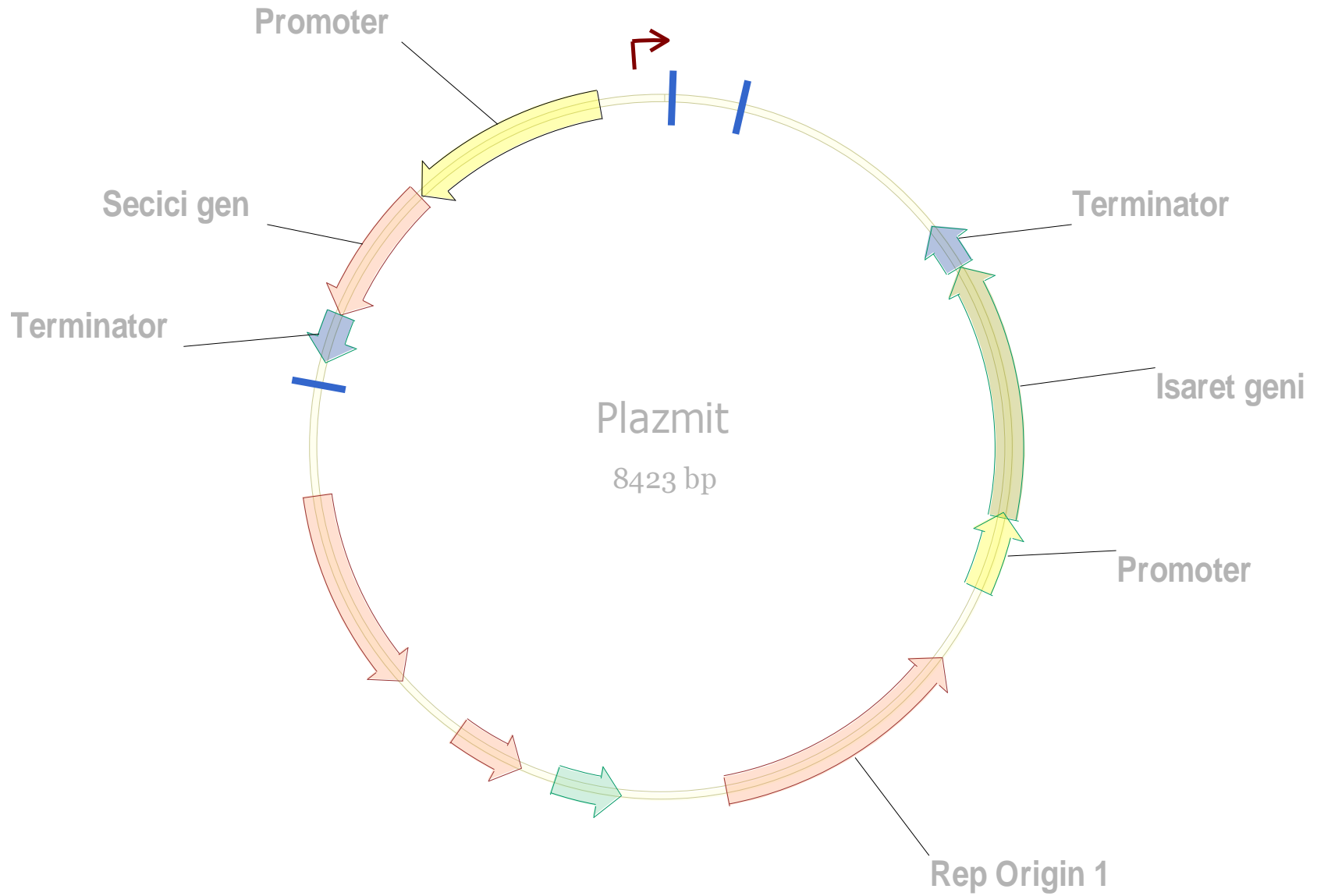
- Kloroplast teknolojisi ile bugüne kadar en çok kullanılan ve en çok başarı elde edilen tür tütün olmasının yanında domates, pamuk, mısır, patates, pirinç ve şeker pancarı bitkilerinde başarı elde edilmiştir.
- Herbisitlere dirençlilik, böceklere dirençlilik, patojenlere dirençlilik, kuraklık soğuk ve tuzluluğa dirençlilik gibi tarımsal özelliklerin iyileştirilmesi potensiyel ümit verici uygulamalardır.
- Kloroplast mühendisliğinin diğer bir uygulama alanında aşı antijenleri, farmasötik proteinler (insan somatotropin, insan serum albumin, insan interferon, monoklonal antibodi) ve endüstriyel proteinler (avidin, beta kazein, sıvı kristal polimerleri, xylanase) gibi ürünlerin geniş anlamda üretilebilmekte ve bakteri kültürlerine göre daha ekonomiktir.

- Kloroplast transformasyonunda en çok kullanılan yöntem PEG ve biolistik yöntemidir ancak son zamanlarda *Agrobacterium* aracılı transferde yapılabilmektedir

- Stabil plastid gen aktarımı neredeyse 20 yıl önce ilk olarak tek hücreli alg olan *Chlamydomonas* da başarılmıştır. Bundan hemen sonra, plastid gen aktarımı gelişmiş bitkiler için başarılı şekilde rapor edilmiştir.
- Sonra, bu organizmalar spektinimiysin ve streptomiyisin resistansını sağlamak için *aadA* ile transforme edilmiştir
- Plastid transformasyonu; hedefin seçici marker genlerini içeren plastid gen aktarım vektörleri biolistik DNA taşıması yada PEG uygulamasıyla kloroplastda ifade edilir,
- Ardından homolog rekombinasyon ile transforme edilen DNA'nın plastid genomuyla birleşmesi ve sonunda tekrar eden hücre bölünmesi süreci sırasında yabancı tip plastid genom kopyalarının selekte edilerek eliminasyonunu gibi çok adımlı bir işlem içerir.

Transformasyonda aktarılabacak kaset

- Bitkiye aktarılabilmek istenen gen promotor ve terminatör dizileri arasına klonlanmalı
- Raportör ya da seçici markör gen (yine promotor ve terminatör kısımları ile birlikte) plasmide aktarılabilmeli



İdeal bir promotorun özellikleri

- Farklı türlerde ifade olabilmeli
- Bitki orjinli olmalı
- Konstitutif olabilir
- Yüksek oranda ifade olunmalı
- Dokuya özgü olmalı
- İndüklenebilmeli
- Kompakt-kısa diziden oluşmalı

Seçili markörler

- Tipik olarak transgenik olmayan hücre yığınınından transgenik bitki hücrelerini ayırt edebilmek için kullanılır
- Antibiyotik direnç markörleri ve herbisit direnç markörleri en yaygın olanlarıdır

Scorable markörler (raportör genler)

- Kısa süreli ifadeyi görmeye yardım edebilir
- Eğer doku kararlı şekilde transgenik ise bunu gözlemlemeye yardım edebilir
- Hücresel ve ekolojik çalışmalar için faydalıdır

Antibiyotik seçilimi

- Transforme ve transforme olmayan kalluslar antibiyotik içeren bir ortama konulursa, antibiyotik seçilim kasetini taşıyan transforme kalluslar yařayabilir ve buyebilir.
- Çoğu kez, transforme olmayan kalluslar ölür ve T-DNA yı taşıyan kallusları seçmek kolaylaşır.

24.03.2020

AMAÇ	Kullanılan Genler
Abiyotik Stres Toleransı	<i>gpat, sod, MtID, sod</i>
Tuz Toleransı	<i>betA, p5cs, hval, codA, afp, imt 1</i>
Tohum depo proteinleri	Phaseolin, phytohemagglutinin, conglycinin, patatin, zein glutenin
Gıda Kalitesi	<i>psy, crtI, lcy</i>
Erkek Döl-verim Yenilemesi	Ribonuclease (barnase)*, Ribonuclease inhibitor (barstar) *
Fotosentez	Chlorophyll a-b binding protein, rubisco ss
Nodülasyon	Lectin, leghemoglobin
Transpozonlar	Ac, Ds, Tam, En-I
Fungal Direnç	Chitinase, ribosome inactivation protein (RIP)
Virüs Koruması	Coat protein genes*, antisense-coat protein*, satelit RNA *
Böcek Direnci	Bt toxin*; <i>cryIA(a), cryIA(b), cryIA(c), cryIC, cryIIIA</i> , proteinase inhibitor (CpTi), corn cystatin (CC), rice cystatin
Nematot Direnci	1 (OCI) <i>a' ai, gna</i> , chicken avidin gene*
Bakteriyal Direnç	<i>Mi, Hs1 Attasin*, HEWL*, T4L*</i>
Renk Değişimi	β -glucuronidase*, luciferase*, β -galactosidase *
Opin Sentezi	Octopine synthase*, nopaline synthase*
Kimyasal Direnç	<i>[neo, nptII, (aphA2), nptI (aphA1), aaC3, aaC4,6_gat, aadA, SPT, hph (aphIV), Ble, sull, sat3, cat]* DOG, BADH*, DHPS, ocs, TDC*, DHFR</i>
Herbisit Toleransı Pigmentasyon Pro-Vitamin A	<i>Pat*, bar*, EPSP synthaseA*, cp4 epspsgox*, csr1-1, csr1-2, bnx*, hemL*, Cah*, tfda*</i> Dihydrocueretin reductase, chalcone synthase <i>psy</i> (phytoene synthase), <i>crt*</i>
Diğerleri	Polygalacturonase, heat-shock proteins (HSP), tubilin, ATP synthase, isopentenyl transferase, metallothionein, pathogenesis-related proteins (PR), phytochrome

Seçici genler

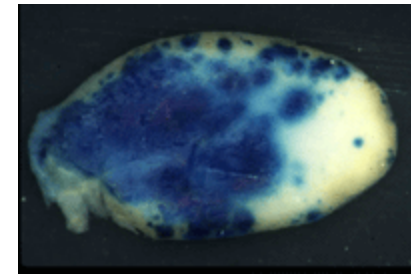
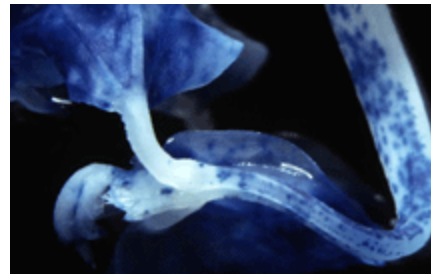
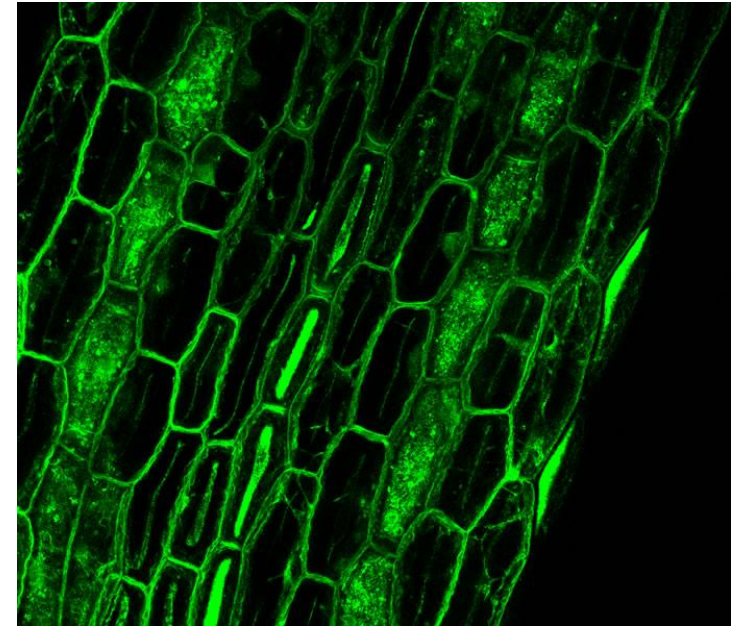
24.03.2020

Gen (ürün)	Kaynak
aad (aminoglycoside adenyltransferase)	<i>Shigella flexneri</i>
ble (glycopeptide-binding protein)	<i>Streptalloteichus hindustantus</i>
dhfr (dihydrofolate reductase)	Mouse
sul 1 (dihydropteroate synthase)	<i>E. coli</i>
epsps (enolpyruvylshikimate phosphatesynthase)	<i>Petunia hybrida</i>
hpt (hygromycin phosphotransferase)	<i>Klebsiella</i>
manA (mannose-6-phosphate isomerase)	<i>E. coli</i>
neo/nptll/aphll (neomycin phosphotransferaze)	<i>E. coli</i>
bar (phosphinothricin acetyltransferase)	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>

İşaret genleri

24.03.2020

- Lusiferaz- Ateş böceği
- Yeşil Floresan Proteini- deniz anası
- GUS – glukoronidaz-X Gluc



Yaygın raportör genler

- Beta glururonidase (GUS) *uidA* protein (*E. coli*'den)– mavi renk için substrat olarak X-gluc a ihtiyaç duyar
- Lusiferaz proteinleri (bakterilerden ve ateşböceklerinden) substrat olan lusifein ortamda olduğunda ışık saçar
- Deniz anasından Yeşil floresan protein (GFP) belli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında renk değiştiren otofloresan proteine bir örnektir

Figure 9.8

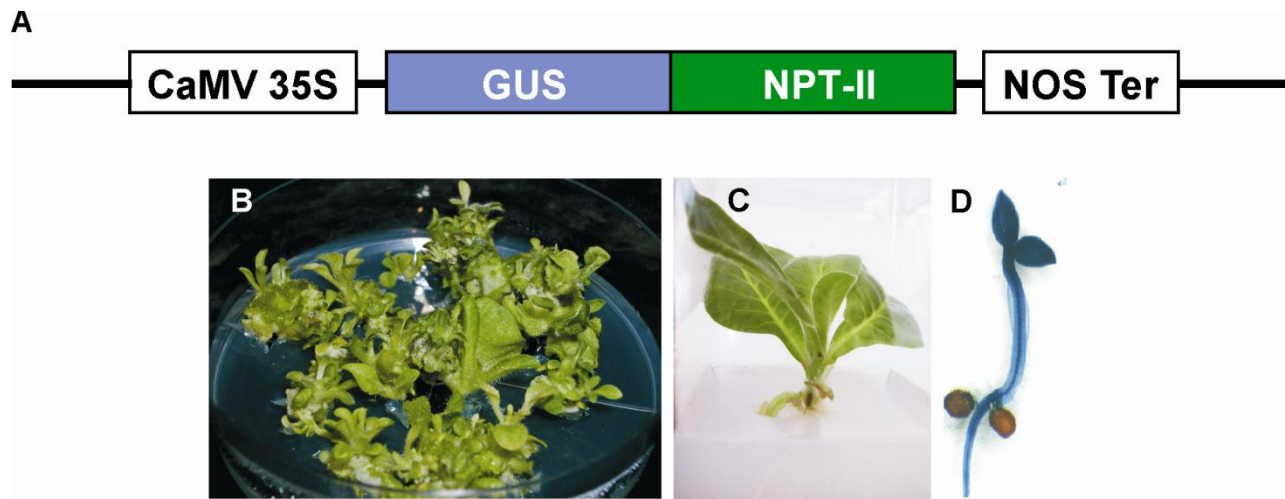


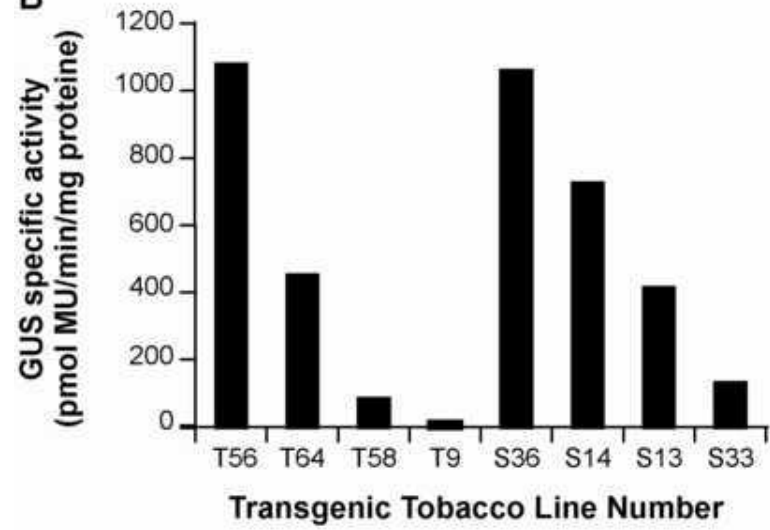
Figure 9.4

GUS pozitif bitki ve hücreler

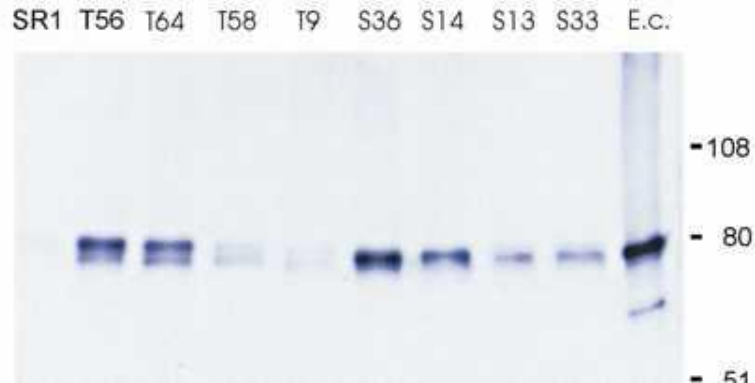
A



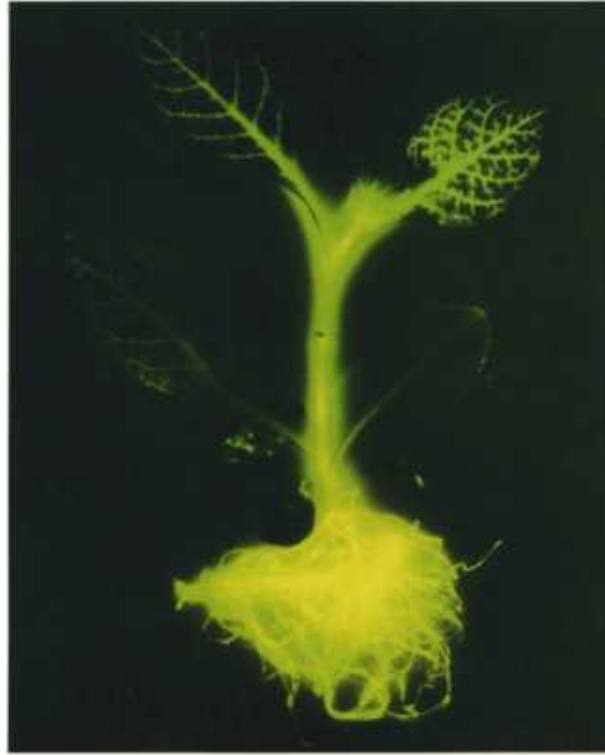
B



C



Tütünde ateşböceği lusiferazı



35S:GFP kanola



Beyaz ışık



karanlık odada UV ışığı

