



β -1,3- GLUKANAZ GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* SUŞLARINA TRANSFORMASYONU
Beyza REİSOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

2020
Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**β -1,3- GLUKANAZ GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* SUŞLARINA
TRANSFORMASYONU**

Beyza REİSOĞLU

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2020

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**β -1,3- GLUKANAZ GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* SUŞLARINA
TRANSFORMASYONU**

Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Beyza REİSOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 24 / 01 / 2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Özlem BARIŞ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Doç. Dr. Emre İLHAN	<i>İmza</i>	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU	<i>İmza</i>	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

24 / 01 / 2020

Beyza REİSOĞLU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

β -1,3- GLUKANAZ GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* SUŞLARINA TRANSFORMASYONU

Beyza REİSOĞLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Fungal patojenler tarımsal alanlarda ciddi bir tehlike oluşturmaktadırlar. Hastalıklarla mücadelede fungal hastalıklara karşı direnç oluşturmak için gen izolasyonu ve gen aktarım teknikleri kullanılarak transgenik bitki geliştirilmektedir. Fungal hücre duvarının en bol bileşeni olan β -1,3-glukanın, β -1,3-glukanaz ile yoğun hidrolizi, hücre duvarlarının mekanik kuvvetini zayıflatarak hücre lizisine yol açmaktadır. Bu nedenle bitkilerde β -1,3-glukanaz, patojenik fungus istilasına karşı savunma sisteminde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, bitki hastalıklarıyla mücadelede fungal patojenlere karşı direnç oluşturmak için *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen aktarım tekniğiyle pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitleri içerisindeki *Paenibacillus* sp'dan klonlanmış 1793 amino asitlik rekombinant DNA fragmanına sahip β -1,3-glukanaz geninin aktarımını içermektedir.

2020, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: β -1,3 glukanaz, Gen aktarımı, *Agrobacterium tumefaciens*, Koloni PCR

ABSTRACT

MS. Thesis

TRANSFORMATION OF β -1,3- GLUCANASE GENE TO *Agrobacterium tumefaciens* STRAINS

Beyza REİSOĞLU

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Fungal pathogens causes a serious danger in agricultural field. Most of the cultivated species show significant data losses due to fungal attacks. These diseases reduce not only yield loss but also quality features. Although plant diseases caused by fungal pathogens are generally tackled with the application of chemical drugs, the fight against chemicals is not effective for every disease. Therefore, the best way to protection against plant diseases is to develop new cultivars disease resistant. Transgenic plants are developed by using gene isolation and gene transfer techniques to create resistance against fungal diseases. Transgenic plants are developed by using gene isolation and gene transfer techniques to create resistance against fungal diseases in the fight against diseases. Intense hydrolysis with β -1,3-glucan, β -1,3-glucanase, the most abundant component of the fungal cell wall, weakens the mechanical strength of the cell walls, leading to cell lysis. For this reason, β -1,3-glucanase is used in the defense system against pathogenic fungus infestation in plants. This research provides the transfer of the beta-1,3-glucanase gene including 1793 amino acid recombinant DNA fragments cloned from *Paenibacillus* sp in pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plasmids, using gene technique through *Agrobacterium tumefaciens*.

2020, 54 pages

Keywords: β -1,3 glucanase, gene transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, colony PCR

TEŞEKKÜR

Öncelikle lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU'na teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmamın yapılmasında her türlü bilgi ve yardımı sağlayan OMÜ Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Zafer SEÇKİN ve doktora öğrencisi Gökhan GÖKDEMİR'e teşekkürlerimi arz ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Fatma BÖKE, Serap KARAMAN, Abdul Saltuk Buğra DAŐ ve Büşra YAZICILAR'a teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağlayan ve hayatımın her aşamasında benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Altan REİSOĞLU, kardeşim Azra REİSOĞLU, babaannem bildiğim Suzan ŐİMŐEK ve Őu an hayatta olmasa da benimle her zaman gurur duyan, her zaman arkamda olan annem Tülay REİSOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beyza REİSOĞLU
Ocak / 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Gen Aktarım Teknikleri.....	2
1.1.1. Doğrudan Gen Aktarım Tekniği.....	7
1.1.2. Dolaylı Gen Aktarım Tekniği.....	8
1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
1.2.1. Transgenik Bitkilerin Üretimi için Kullanılan Vektörler.....	11
1.2.1.1. Ti Plazmiti.....	12
1.2.1.2. İkili Vektör.....	14
1.2.1.3. Ko-Bütünleştirici Vektör.....	14
1.3. Hastalıklara Karşı Direncin Arttırılması.....	15
1.4. Fungal Patojenlere Karşı Mücadele.....	15
1.5. Fungal Patojenlerle İlgili Proteinler.....	16
1.5.1. Kitinazlar.....	17
1.5.2. Glukanazlar.....	18
1.5.3. Diğer Antifungal Proteinler.....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.1.2. Gen Tranferinde Kullanılan Plazmit ve Bakteri Suşları.....	26
3.1.3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Yöntemleri.....	26
3.1.4. Kültür Ortamlarının ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	26
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1 Elektrokompotent Hücre Hazırlanması.....	28
3.2.2. Elektroporasyon.....	29
3.2.3. Plazmit İzolasyonu.....	29
3.2.4. Koloni PCR.....	31

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	32
3.2.6. Bitki Transforrmasyonu Çalışmaları.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ.....	54



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°	Derece
%	Yüzde
bp	Baz çifti
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
L	Litre
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
mM	Milimolar
kbp	kilobaz çifti
kDa	Kilodalton
w/v	Kütle/Hacim
atm	Atmosfer
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
PEG	Polietilen glikol
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
Ti	Tümör İndükleyici
Ri	Tüylü Kök İndükleyici
T-DNA	Transfer Deoksiribo Nükleik Asit
Vir	Virülans
Chv	Kromozom

PR	Patojenez ile İlgili Protein Genleri
PGIP	Poligalakturonazı İnhibe Eden Protein Genleri
R	Dayanıklılık Genleri
Glu	Glukanaz Geni
Chi	Kitinaz Geni
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
qRT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CMC	Karboksimetil Selüloz
GUS	β -glukuronidaz
T ₀ -T ₁ -T ₂ -T ₃	Trasformasyon sonrası jenerasyon
BA	Benzil Adenin
IBA	İdol-3-Bütirik Asit
BAP	6- Benzil Aminopurin
NAA	α -Naftalin Asetik Asit
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani Agar
SOC	Katabolit Baskılı Süper Optimal Broth
RNase	Ribonükleaz
EtBr	Etidyum Bromür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
dNTP	Nükleozit Trifosfat
dH ₂ O	Distile Su
TAE	Tris-Asetat-EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Bitkilerde gen aktarım tekniğinin şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2 <i>Agrobacterium</i> aracılığıyla gen dönüşümünün şematik genel görünümü	9
Şekil 1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> şematik görünümü	11
Şekil 1.4 Ti plazmit T-DNA transkriptlerinin şematik gösterimi	13
Şekil 1.5 Fungal hücre duvarı şeması.	17
Şekil 3.1 Plazmit izolasyonunda bakterilerin büyümesi için falkonlara hazırlanan LB besiyeri	30
Şekil 3.2 Bitki materyaline gen aktarım metodu.....	32
Şekil 4.1 <i>Paenibacillus</i> sp‘dan izole edilen β -1,3-glukanaz geni içeren pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitlerinin şematik çizimleri.....	33
Şekil 4.2. Koloni PCR sonucu elektroforez görüntüsü	34
Şekil 4.3 Elektroporasyon sonrası yapılan plazmit izolasyonu PCR sonucu elektroforez görüntüsü	35
Şekil 4.4 <i>Cucumis melo</i> L'nin çeşitli türlerine transformasyonu için antibiyotik optimizasyonu çalışması	36
Şekil 4.5 β -1,3-glukanaz gen aktarımı sonrasında <i>Cucumis melo</i> L'nin çeşitli türlerine transformasyonun optimizasyon çalışması	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Bitkilerde en çok kullanılan transformasyon teknikleri; avantajları ve dezavantajları.	4
Çizelge 3.1 Sarf malzemeler	25
Çizelge 3.2 β -1,3 glukanaz için kullanılan primerler	31
Çizelge 3.3. Koloni PCR için kullanılan maddeler ve miktarları	31
Çizelge 3.4 Koloni PCR şartları.....	31



1. GİRİŞ

Günümüzde, insanların karşılaştığı en önemli problemlerden birisi nüfus artışıyla birlikte beslenme ihtiyacının karşılanamamasıdır. İnsan nüfusu 2015 yılına kadar 7 milyara ulaşmış ve 2050 sonunda 10 milyarı aşacağı tahmin edilmektedir (Low et al. 2018). Bu nedenle, nüfusun artması, tarım alanlarının kısıtlı olması, bu kısıtlı alandan daha fazla mahsul elde edilmesi gerektiği ve bunu gerçekleştirmek için yeni yöntemlerin araştırılması gerekli olmuştur (Kumlay vd. 2003). Gelecekte dünya nüfusunun artışıyla birlikte ekilebilir arazilerin azalmasıyla gittikçe artan gıda ihtiyacının karşılanması için biyoteknolojinin çok önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir (Arlı Sökmen 2005; Shamim et al. 2013).

Bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler dahil, verimliliği ve kaliteyi olumsuz etkileyecek çok miktarda sınırlayıcı faktör bulunmaktadır (Macar vd. 2017). Tarımsal üretimi tehdit eden en önemli unsurların başında bitki patojenleri gelmektedir. Bitki hastalıklarının çoğunu funguslar oluşturmaktadır. Bitki hastalıklarına karşı mücadele yapılmadığında tarımsal ürünleri ciddi verim kayıplarına maruz kalmaktadır. Patojenlerden kaynaklanan bu kayıplara hasat sonrası kayıplar da eklenirse verim kayıp oranı yaklaşık %48'e kadar çıkabilmektedir (Akbaş, 2018). Klasik ıslah yöntemlerinin imkân verdiği ölçülerde bitki ıslahında çok önemli ilerlemeler olmuş ve ürünlerde hem verim hem de kalite açısından önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Geleneksel bitki ıslahı yöntemleriyle çeşitli bitki hastalıklarına karşı dayanıklı çeşitler geliştirmek mümkün olmuştur. Fakat geleneksel bitki ıslahı yöntemi çok zaman almakta ve bu yöntemle ıslaha devam edildiğinde de genetik kaynakların yok olmasına neden olmaktadır (Kumlay vd. 2003). Bu da geleneksel bitki ıslahı yönteminin en önemli dezavantajlarından. Melezleme yapılabilen çeşit sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen özelliklerle birlikte istenmeyen karakterlerin de birlikte aktarılmasının engellenememesi, istenmeyen özelliklerin geri melezleme yöntemiyle elemanın çok zaman alması geleneksel bitki ıslahının dezavantajlarından (Özcan ve Özgen, 1996).

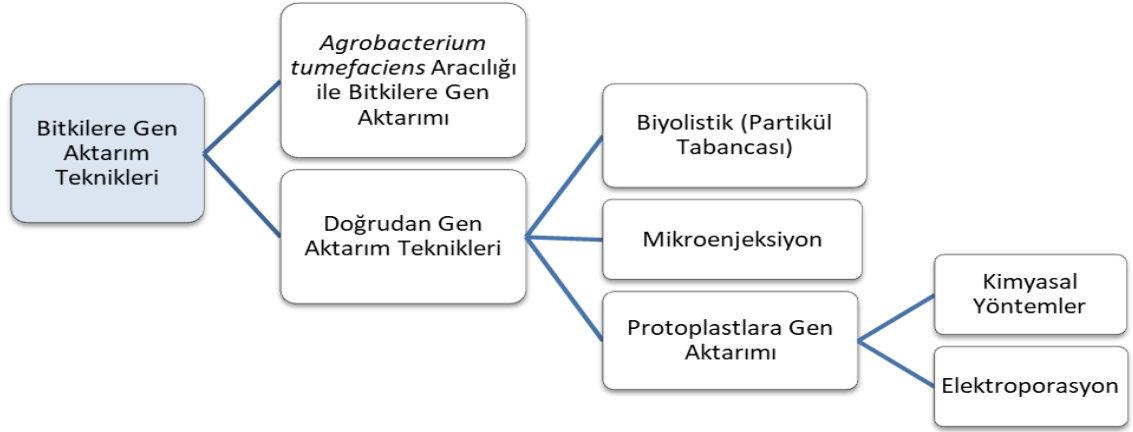
Kimyasal ilaçlar kullanılarak hastalıklara karşı etkili bir şekilde mücadele yapıldığı, fakat bu yolla yararlı mikroorganizmaların da yok olması ve ayrıca bu insan ve çevre sağlığını da etkileyerek olumsuz etkilere yol açtığı bilinmektedir. Kimyasal ilaç kullanılarak kayıpları engellemek için dünyada yaklaşık 3,5 milyon ton pestisit kullanılmaktadır, bu da yaklaşık 45 milyar ABD doları mali tutarındadır. Artık bitki

zararlı organizmalarıyla mücadelede insan sağlığı ve çevre dostu mücadele yolları arzu edilen ve kabul gören mücadele yollarının başında gelmektedir (Akbaş, 2018).

Modern ıslah yöntemleri olarak da adlandırılan biyoteknolojik yöntemler veya bitki genetik mühendisliği uygulamaları sayesinde, geleneksel yöntemlerin getirdiği engellemeler ortadan kaldırılabilen, geleneksel ıslaha göre ıslah süresi kısaltılarak para ve zamandan tasarruf edilmekte, melezlemede karşılaşılan problemler, genetik bağlılık sorunları ve gen havuzundan yararlanmadaki engellemelerin kolayca üstesinden gelinebilmektedir (Kumlay vd. 2003). Bitki patojenlerine karşı biyoteknolojinin kullanımıyla dayanıklı bitki çeşitleri geliştirilerek hem mahsul kayıplarının engellenmesi hem de çevrenin korunması hedeflenmiştir (Akbaş 2018). Bitki genetik mühendisliği çalışmaları sayesinde, spesifik bir genetik bilgiyi kodlayan yabancı bir DNA parçasının verici organizmalardan alıcı bitki türlerine bir virüs, bakteriyel plazmit veya farklı türde bir vektör aracılığıyla transferi olası olmuştur (Gasser and Fraley 1989). Böylece, sadece akraba türler arasında gen alışverişi sınırlaması ortadan kalkmış, doğal olarak mümkün olmayan gen alışverişleri veya gen etkileşimleri mümkün hale gelmiş, klonlanan doğal ya da sentetik nükleik asit dizileri bitki hücrelerine aktarılabilir duruma gelmiştir.

1.1.Gen Aktarım Teknikleri

Gen aktarım teknikleri; transgenler oluşturularak akraba olmayan türler arasında rekombinasyon ve genetik değişim yapabilmek için biyolojik engelleri aşabilen ve bu sayede ıslah edilmiş bitki ve hayvanların geliştirilmesinde kullanılmıştır (Holst-Jensen 2009). Bu teknikler (Şekil 1.1); bitkilere, besin değerlerinin, kirleticilere karşı toleransının, patojenlere karşı direncin geliştirilmesi ya da bitki metabolizmasıyla ilgili çalışmaları yapmayı amaçlar, böylece çeşitli genler aktarılmakta ve bitkilerde ürün ve kalite artışını sağlamak için geleneksel bitki ıslah metotlarına katkıda bulunmaktadır (Rivera et al. 2012; Barampuram and Zhang 2011).



Şekil 1.1 Bitkilerde gen aktarım tekniğinin şematik gösterimi (Bezirganoğlu 2017).

Genetik mühendisliği, hastalık direncini iyileştirmek için herhangi bir türden herhangi bir ürüne direnç proteinleri üreten genlerin dahil edilmesi avantajına sahiptir (Van der Biezen 2001).

Rekombinant DNA teknikleri sayesinde herhangi bir kromozom üzerindeki belirli bir genin, genin belirli bir kısmının izole edilmesi mümkün hale gelmiştir (Algur 1992). Herhangi bir gen transfer sisteminin esasını; tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi oluşturur (Özcan ve Özgen 1996). DNA, RNA, genom ve kromozom üzerinde yapılan bütün bu işlemler; yani kesmeler, koparmalar, moleküler klonlama işlemleri, tamirat ve birleştirmeler gibi manipülasyonlar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir (Watson et al. 1992).

Vektörlerin veya DNA'nın kullanıldığı, klonlanmış genler veya daha az spesifik DNA sekansları olan tüm gen aktarma yöntemleri için ana gereksinim, verimli transgenik bitkilerin hücrelerden yenilenmesidir. Transgenik bitki üretiminde başarılı transformasyon yöntemlerinin uygulanması en zorlu noktalardan biridir. Uygun transformasyon tekniğinin seçilmesi ve geliştirilmesi gibi transgenik bitkilerin yenilenmesi da yıllar süren teknolojik gelişmelerden sonra bile hala aşılması gereken bir problem olarak bilinmektedir (Altpeter et al. 2016).

1. GİRİŞ

Genetik transformasyonun tekrarlanabilir olması, başarılı olmasından daha önemlidir. Bu nedenle tekrarlanabilir bir metodoloji ile genetik dönüşüm elde etmek için çeşitli gereksinimler dikkate alınmalıdır. Bunlar şöyle sıralanabilir;

- Etkinlik başına çok sayıda dönüşüm sağlayan düşük maliyetli ve kolay prosedürlerin kullanılması,
- Tehlikeli prosedürlerden veya maddelerden kaçınarak kullanıcı güvenliğinin korunması,
- Tekniğin asgari manipülasyonları içeren basitlikte olması,
- İstenmeyen vektör sekansları olmaksızın istenen DNA'nın stabil bir şekilde hücreye sokulabilmesi, böylece gen entegrasyonu veya ifadesinin sağlanması ve ifade edilmesi,
- Her bir hücreye sokulan az sayıda genetik kopya olması,
- Transgenik bitkilerin tek bir transforme edilmiş hücrelerden rejenere edilmesi (Rivera et al. 2012).

Bitkilerde gen aktarımı; bir bitkinin tamamını oluşturabilme kabiliyetinde olan hücrelerin kromozomlarına istenilen gen veya genleri taşıyan bir DNA parçası yardımıyla yerleştirilmesi ve gen aktarımı yapılmış hücrelerden yeni bir bitkinin elde edilmesi yöntemidir. Bitkilere gen aktarımı, doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki grup altında toplanabilmektedir (Arı 2001). Bitkilerde kullanılan transformasyon teknikleri Çizelge 1.1'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 1.1 Bitkilerde en çok kullanılan transformasyon teknikleri; avantajları ve dezavantajları (Macar vd. 2017)

Teknik	Metot	Avantajlar	Dejavantajlar
<i>Agrobacterium</i> aracılığı ile	Alıcıya transfer edilecek geni taşıyan bir plazmiti aktarmak için bitki patojeni bir bakteri kullanılır.	Yüksek transformasyon etkinliğine sahiptir. Farklı bitki türlerinde uygulanabilir ve tekrarlanabilmektedir.	Yöntemi uygulamak zaman almaktadır. Bitkide bilinmeyen genetik ifadelere sebep olabilecek istenmeyen vektörler de aktarılabilir.

1. GİRİŞ

Elektroporasyon	Çok güçlü elektrik akımı ile hücre zarında geçici porlar oluşturularak DNA hücre içine sokulmasıdır.	Farklı hücre tipleri ve bitki protoplastlarına uygulanabilir. Kolay, hızlı ve ucuzdur.	Bu protokol zahmet gerektirir. Genellikle protoplastlara uygulanır. Transformasyon başarısı azdır.
Biyolistik	DNA ile kaplanmış yüksek yoğunluktaki taşıyıcı macropartiküllerin hücrelere doğru hızla atılması ve bir emilim mekanizmasıyla DNA'yı hücre içine bırakmasıdır.	Yöntem kolaydır. Hücre duvarına herhangi bir ön işlem gerekmez. Farklı hücre tiplerine uygulanabilmektedir. Tek ateşlemede birden fazla hücreye ulaşabilmektedir.	Pahalı bir yöntemdir. DNA ve hücreler hasar görebilir. Transformasyon başarısı düşüktür. Başarılı yöntem için sürekli denemelerin ve optimizasyonun sağlanması gerekmektedir.
Vakum infiltrasyon	<i>Agrobacterium</i> aracılığıyla aktarımı kolaylaştırmak için, mitotik ve mayotik bölünmelerin çok olduğu bitki kısımlarına doğrudan gen aktarılmasıdır.	Kolay ve hızlı bir yöntemdir. Transformasyon başarısı ne yüksektir ne de düşüktür. <i>In vitro</i> kültüre ihtiyaç yoktur.	<i>Agrobacterium</i> suşları bütün hücrelerde kullanılamamaktadır. Bir genin çoklu kopyası bitkiye aktarılabilir.
Ultrason	Ses dalgalarının hücreler arası ve hücre zarında geçirgenliği değiştirerek boşluklar açarak DNA parçalarının hücre içerisine girişini kolaylaştırır.	Yüksek transformasyon etkinliğine sahiptir. Çok maliyetli bir yöntem değildir. Farklı hücre tiplerine uygulanabilir.	Hücre zarını parçalayarak hücrelere zarar verebilmektedir.

1. GİRİŞ

Mikroenjeksiyon	Mikroskop altında bir micropipet aracılığıyla DNA'nın doğrudan bitki hücresinin içine sokulmasıdır.	Transformasyon başarısı oldukça yüksektir. Çeşitli hücelere uygulanabilir.	Bitki hücrelerine uygulamak zordur. Bu yöntem pahalıdır. Tek seferde bir hücreye aktarım sağlandığı için yavaş bir yöntemdir.
Silikon karbid fiberler	Silikon karbid fiberler içeren tampon ile DNA süspansiyonu edilir ve çarpışmalar sonucu DNA'nın içeri girmesini sağlanmaktadır.	Bu yöntem kolay, hızlı ve ucudur. Hücre duvarını uzaklaştırmaya gerek yoktur. Farklı hücre tiplerine uygulanabilmektedir.	Transformasyon etkinliği düşüktür. Hücrelerde meydana gelen hasar ile rejenerasyon yetenekleri olumsuz etkilenebilmektedir.
Cam boncuklarla çalkalama	Hücrelerin, DNA ile cam boncuklarla çalkalanması sonucu DNA'nın içeri girmesidir.	Bu yöntem ucuz ve hızlıdır. Kısa sürede uygulanabilmektedir. Karmaşık cihazlara, özel kimyasallara ve enzimlere gerek duyulmadan aktarım sağlanabilmektedir.	Çalkalama sırasında meydana gelebilen DNA hasarından dolayı transformasyon etkinliği düşüktür.
PEG	Polietilen glikol hücre zarında dönüşümlü geçirgenliğe sebep olmasıyla DNA'nın aktarımı sağlanmaktadır.	Kolaydır. Pahalı ekipmana ihtiyaç duyulmadığı için ucuzdur. Çok sayıda transforme hücre elde edilebilmektedir. Çeşitli bitki türlerine uygulanabilmektedir.	Transformasyonda protoplast kullanıldığı için bu yöntem elverişsizdir. Bitki rejenerasyon gerçekleşmemektedir. Transformasyon etkinliği düşüktür.

1.1.1. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri

Doğrudan gen transferi, adından da anlaşılacağı gibi, dış kaynaklı bir DNA' nın bitki çekirdeğine doğrudan sokulmasını içerir. Yabancı DNA' yı bitki hücresine sokmak için önce hücrenin zarı bozulur ve yabancı DNA' nın girmesine izin verilir. Doğrudan gen transferi altındaki yöntemlerin çoğu basit ve etkilidir. Bununla birlikte, bu transgenik bitkilerdeki gen ekspresyonu geçici veya stabil bir şekilde transforme edilebilir. (Low et al. 2018).

Doğrudan gen transferi iki ana gruba ayrılabilir: fiziksel gen transferi ve kimyasal gen transferi. Fiziksel gen transferi, mekanik yollarla hücre duvarını ve hücre zarını bozar. Bu yöntemler arasında, partikül bombardımanı (biyolistik) ilk olarak Sanford et al. (1990) tarafından tanıtıldığı için bitki dönüşümünde en yaygın kullanılanıdır. Altın veya tungsten parçacıkları ile kaplı DNA, bir gen tabancası kullanılarak yüksek basınç altında hedef bitki hücresine gönderilir. Hızlı hareket eden parçacıklar, kaplanmış DNA' nın kalın bitki hücre duvarından nüfuz etmesine izin verir ve yabancı DNA' yı çekirdeğine yönlendirir. Kaplanan DNA daha sonra metal parçacıklardan ayrılacak ve kendini bitki hücresinin çekirdeğindeki kromozomlara entegre edecektir. Bu yöntemin, daha az toksiktir ve hemen hemen tüm bitki hücrelerine uygulanabilir (Lai et al. 2011). Bununla birlikte, bu yöntemin en büyük aksaklıkları özel aletlerin mevcudiyetinin yanı sıra DNA fragmanlarının diğer organeller yerine bitki çekirdeğine verim etkinliğindedir (Furth 1997).

Diğer fiziksel gen transfer yöntemleri, yabancı DNA'nın bitki hücrelerine transferini kolaylaştırmak için elektriksel impulsları kullanan elektroporasyonu içerir. Bitki hücreleri ilk önce yabancı DNA içeren bir tampon çözeltisinde inkübe edilir, ardından tampon içine elektriksel uyarılar uygulanır ve bu da yabancı DNA'nın girmesine izin vermek için bitkinin hücre zarında geçici gözeneklerin oluşmasına neden olur. Bu yöntem nispeten kolay ve zamandan tasarruf sağlar, ancak sadece protoplastlar (hücre duvarı olmayan hücre) için geçerlidir. Bu nedenle, bu yöntem bitki transformasyonunda yaygın olarak uygulanmaz (Low et al. 2018).

Kimyasal gen transferi yaklaşımları, yabancı DNA' nın girişini sağlayan hücre zarını bozmak için kimyasalın kullanılmasını içerir. Bu özel yöntem, sadece protoplastlara uygulandığında etkili olduğu için bitki transformasyonunda tercih edilmez. Bu yaklaşımda kullanılan en önemli kimyasallardan biri, iki değerlikli bir katyon varlığında hücre zarının dengesini bozmak, böylece hücre zarının geçirgenliğini arttırmak

ve yabancı DNA' nın alınmasına izin vermek için kullanılan polietilen glikoldür (PEG). Kimyasal gen transferi için kesin mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır, ancak PEG' nin ozmotik basıncı arttırdığı ve protoplastta kasılmaya neden olduğu varsayılmıştır; bu iki değerlikli katyon DNA kompleksinin endositozunu kolaylaştırır (Lazzeri et al. 1991). Bunların yanı sıra lipozom, bitkinin protoplast hücrelerinin dönüştürülmesinde kullanılan başka bir kimyasal yöntemdir. Lipozomlar, yabancı genetik materyalleri protoplast içine kapsüllemek ve iletmek için araç görevi görür. Lipozomların lipofilik özelliği, hücrenin dönüştürülmesinde protoplasta kolay erişim sağlar (Caboche 1990).

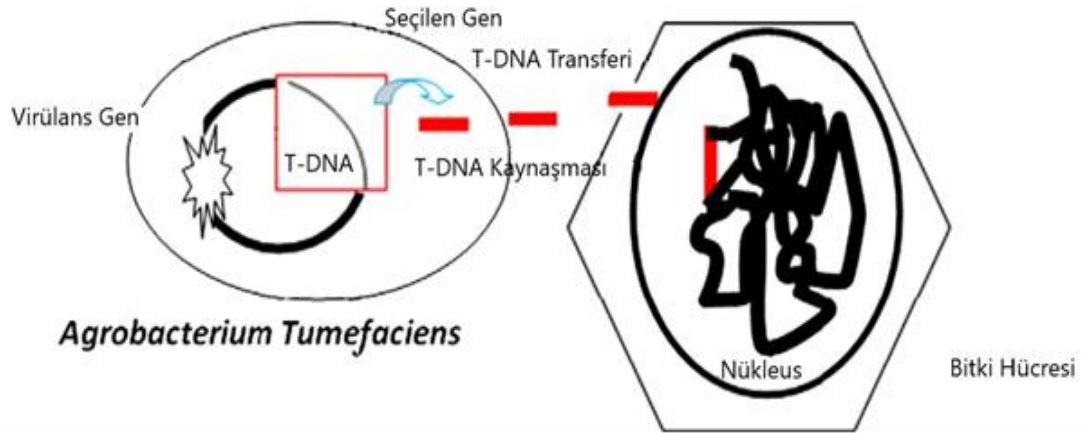
1.1.2. Dolaylı Gen Aktarım Tekniği

Agrobacterium aracılı transformasyon, çok çeşitli bitkilerde etkili ve etkili olduğu için bitki transformasyonunda kullanılan en yaygın tekniktir. *Agrobacterium* toprak ekosistemine özgüdür. Bitkilerde taç yara veya tüylü kök hastalığına neden olan patojenik gram-negatif bakterilerdir. Tümör büyümesi için genetik bilgi, bu bakterilerin genomunda bir tümör indükleyen plazmit (Ti plazmit) veya tüylü kök indükleyen plazmit (Ri plazmit) üzerinde kodlanır. Genellikle bitki transformasyonunda yaygın olarak kullanılan iki tip *Agrobacterium* türü vardır; *Agrobacterium tumefaciens* ve *Agrobacterium rhizogenes*. *A. tumefaciens*, taç tümörü hastalığına neden olan Ti plazmiti içerirken, *A. rhizogenes* tüylü kök hastalığına neden olan Ri plazmitini içerir. Bu iki türün keşfi, *Agrobacteria*' daki zararlı genler uzaklaştırıldığında transgenik bitkilerin gelişimi için etkili vektör sistemleri sağlar. Bu yöntem çeltik, mısır, arpa ve tütün gibi çok çeşitli bitkileri başarıyla dönüştürmüştür (Low et al. 2018).

Bitkilerde dolaylı gen aktarım tekniği, *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* gibi istenilen geni plazmit içerisinde bulunduran bakteriler aracılığıyla hedef hücreye taşınması yöntemidir (Rakoczy-Trojanowska 2002; Patnaik and Khurana 2001). Günümüzde, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan *A. tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri aracılığı ile tütün, domates, patates ve birçok kültür bitkisine başarıyla ve sürekli gen aktarımının yapıldığı bilinmektedir (Özcan ve Özgen 1996). *Agrobacterium* türleri üzerine yapılan ilk çalışmalar uzun yıllar önce bitkilerdeki taç tümörü hastalığı etkeninin araştırılması sırasında başlamış ve *A. tumefaciens* ilk kez 1897 yılında asma bitkisinden izole edilmiştir. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım tekniği bakteri kolonizasyonu, bakterilerdeki hastalık yapıcı sistemin aktifleşmesi, T-DNA

1. GİRİŞ

aktarım kompleksinin oluşması, T-DNA aktarımı ve T-DNA'nın bitki genomuna birleşmesini içeren basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 1.2) (Barampuram and Zhang 2011). *A. tumefaciens* yaralanmış bitki hücrelerine tutunduğu zaman fenolik bileşiklerin uyarıcı etkisi ile Ti plazmitinin T-DNA bölgesi sağ ve sol sınırlarından kesilerek bitki hücrelerine gönderilmekte ve bitki kromozomlarıyla birleşmektedir (Chilton et al. 1980). Bu birleşmeden sonra, T-DNA bölgesinde bulunan tümör genleri aktif hale gelmekte ve üretmiş oldukları oksin ve sitokininler bitki hücrelerinin hormon dengesini bozarak hızlı ve kontrolsüz bölünen tümör doku oluşmaktadır. Yapılan araştırmalarda bu tümör oluşumuna bakteriden bitki hücrelerine geçen bazı genlerin neden olduğu ortaya konulmuştur. Bir kez tümör oluşumu başladıktan sonra, tümör izole edilerek steril kültür koşullarında bakteri olmadan ve yardımcı hormonlara ihtiyaç duymadan büyütülebilmektedir (Zupan and Zambryski 1995). Yapılan araştırmalarda, enfeksiyon sonucu oluşan dokunun normal bitkilerde bulunmayan bazı amino asitleri ve opinler olarak bilinen şeker türevlerini sentezlediği görülmüştür. Bu bileşikler bakteri tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Özcan ve Özgen 2001).



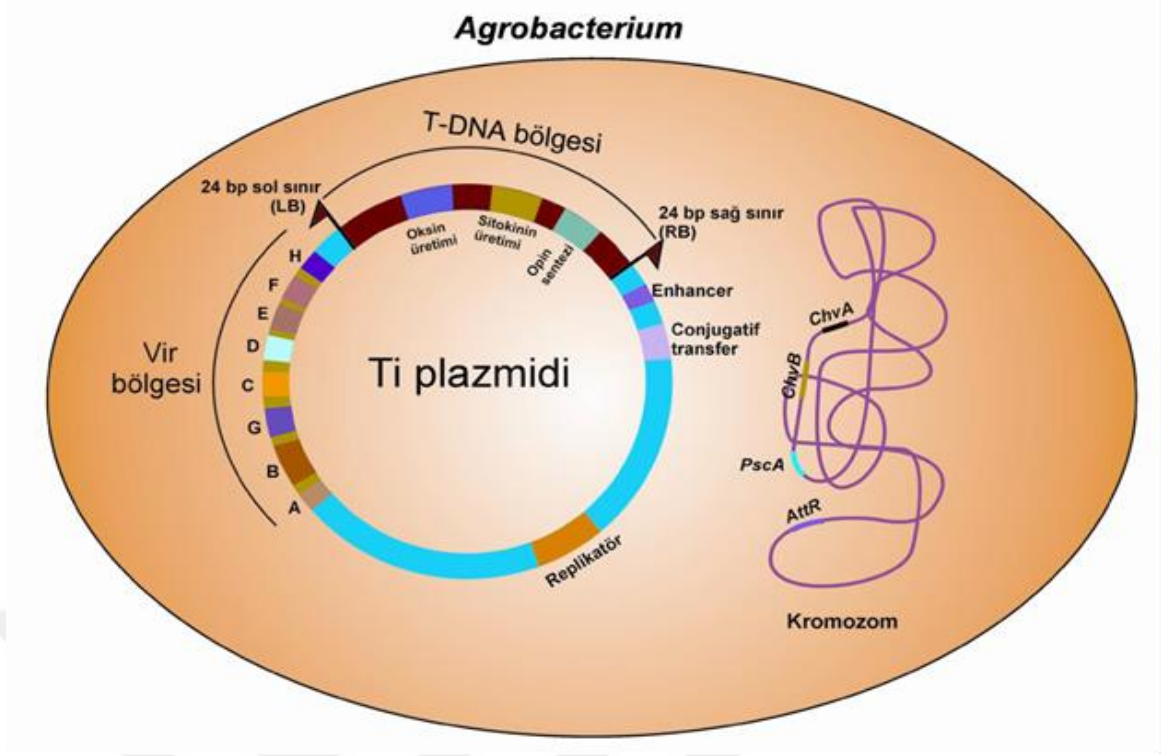
Şekil 1.2 *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımının şematik genel görünümü (Rao et al. 2009)

A. tumefaciens üzerine yapılan yoğun çalışmalar sonucunda T-DNA bölgesindeki tümör oluşumuna neden olan genler kesici enzimler aracılığıyla çıkartılarak yerlerine değişik kaynaklardan izole edilen tarımsal öneme sahip genler yerleştirildiğinde ve *in vitro* gelişen bitki doku ve hücreleri bu *Agrobacterium* hatlarıyla enfekte edildiklerinde, istenilen özellikleri taşıyan genler bitki hücrelerine aktarılmış olur. Sonuçta, bu hücrelerden daha önce anlatılan *in vitro* kültürü yöntemleriyle bazı özellikleri iyileştirilmiş transgenik bitkiler rejenere edilebilmektedir (Özcan ve Özgen 2001).

Basit ve etkili olmasından dolayı, *A. tumefaciens* aracılığı ile aktarım yöntemi sayesinde çok sayıda dengeli transforme bitki üretmek mümkün olmaktadır (Michielse et al. 2005). Ayrıca büyük, tek DNA parçalarının aktarılabilmesi, düşük kopya sayılarına sahip basit transgenlerin sokulabilmesi, kararlı birleşme ve aktarılan genlerin kuşaklar boyunca kalıtımı olması gibi nedenlerden *Agrobacterium* aracılığıyla aktarımı hem diğer bakteri suşlarıyla gerçekleştirilen dolaylı yöntemlere göre de doğrudan aktarım yöntemlerine göre daha çok kullanılmaktadır (Broothaerts et al. 2005; Barampuram and Zhang 2011). Doğrudan gen transfer metotlarına göre *A. tumefaciens* ile gen transfer yönteminin daha kolay ve ekonomik olması ve başarı şansının daha yüksek olması, bu yöntemi daha popüler kılmıştır. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferinin yaptığı büyük katkılara karşın, bu metodun en zayıf tarafı, dünyada gıda ihtiyacının karşılayan buğdaygillere gen transfer yeteneğinin bulunmamasıdır (Barampuram and Zhang 2011).

1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens toprakta yaşayan gram-negatif bir bakteri olup, bitkileri genelde kök boğazında oluşan yaralardan enfekte etmekte ve kök boğazında düzensiz bölünmeler sonucu tümör oluşumuna neden olmaktadır. Gram-negatif bitki patojeni olan *A. tumefaciens* içerisinde virülans etkisi olan bir Ti plazmiti taşımaktadır (Şekil 1.3). Ti plazmiti yabancı DNA'yı bitkiye transfer etmek için olanak sağlayan genler içermektedir (Madigan and Martinko 2012). *Agrobacterium*'un patojen suşları, $95-156 \times 10^6$ dalton arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip büyük Ti plazmiti taşır. *Agrobacterium* Ti plazmiti üzerinde bulunan vir bölgesi, bakteri tarafından T-DNA'sını üretmek ve bitki hücrelerine vermek için kullanılan bakteriyel virülans (vir) proteinlerinin çoğunu kodlar. Avirulent *Agrobacterium* suşları, Ti plazmitinin alınmasından sonra patojenik hale gelir ve benzer şekilde Ti plazmitin kaybolması, patojenite kaybı ile ilişkilidir (Nester and Kosuge 1981). *A. tumefaciens* taşıdığı DNA'nın bir kısmını yani transfer DNA'sını bitkilere aktarabilmekte ve böylece üretilmiş çok sayıda transgenik bitki bulunmaktadır (Safitri et al. 2016; Harst et al. 2015; Mozsár et al. 2015; Hiei et al. 2014). T-DNA'nın uçlarındaki gen dizilimleri transfer için önemlidir ve transfer edilecek yabancı DNA bu uçlar arasındadır (Madigan and Martinko 2012).



Şekil 1.3 *Agrobacterium tumefaciens* şematik görünümü (Aycan 2014)

1.2.1. Transgenik Bitkilerin Üretimi İçin Vektörler

Vektör, ilgili geni çoğaltma ve ekspresyon için hedef hücreye taşıyan bir araç görevi görür. Ortak vektör üç bileşenden oluşur: bir replikasyon kaynağı, çoklu-klonlama bölgesi veya rekombinasyon bölgesi ve seçilebilir markör. Çoğaltma orijini, bir protein kompleksine bağlanarak, vektörün açılmasını, vektörün replikasyonunu ve böylece polimerazların yardımıyla çoğaltılması sağlayan adenin-timin açısından zengin bir bölgedir. Multiklonlama bölgesi, spesifik gen kısıtlama enzimi ile kesilebilen ve ilgili genin sokulmasına izin veren, kısıtlama bölgesi olarak da bilinen çok sayıda benzersiz dizi içeren bir bölgedir. Rekombinasyon bölgesi, iki plazmit arasında bölgeye özgü rekombinasyonun gerçekleşmesine izin veren bölgedir. Bitki transformasyonunda, yaygın olarak kullanılan vektörler Ti plazmit bazlı vektör ve bitki viral bazlı vektördür (Low et al. 2018).

1.2.1.1. Ti Plazmit

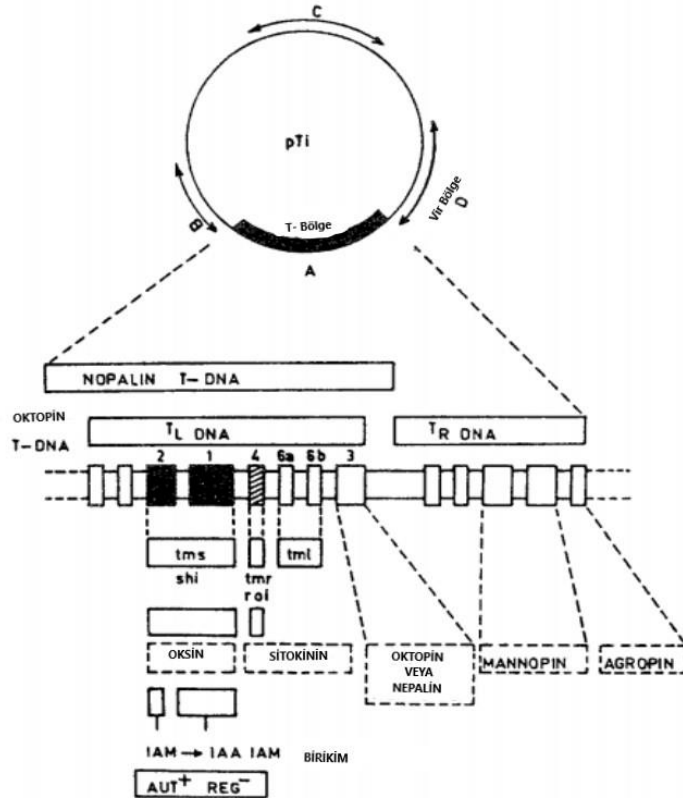
Ti plazmit, transgenik bir bitkinin üretiminde en yaygın kullanılan vektördür. Ti plazmit, Ti plazmit sınıflarına bağlı olarak 200 ila 800 kbp arasında değişen tahmini bir boyuta sahiptir. Ti plazmit üç ana bölgeye ayrılır: T-DNA bölgesi, virülans bölgesi ve opin katabolizma bölgesi. Bitki genomuna aktarılan T-DNA bölgesi yaklaşık 24 kbp büyüklüğündedir (Barker et al. 1983). Bu bölge, genel olarak sol ve sağ sınırlar olarak bilinen her bir uçtaki tekrar dizileri ile sınırlanmıştır. Sağ sınır, DNA'ya neden olan tümör oluşumunun transferi için gerekli olan kritik kısımdır. Bununla birlikte, virülans bölgesi, T-DNA'nın transferine yardımcı olan vir genlerinin kodlanmasından sorumludur. T-DNA dizisi ayrıca opin ve fitohormonların (oksin ve sitokin) biyosentezini de kodlar. T-DNA içindeki üç onkogen (opin, sitokin ve oksin biyosentez geni), bitkide tümör oluşumunun ana nedenleridir ve bu, taç tümörü hastalığına yol açar (Christie et al. 2014).

T-DNA üretimi ve konakçı hücreye taşınması için gereken moleküler mekanizmalar, bir dizi bakteriyel kromozomal (chv) ve Ti-plazmit virülans (vir) genleri tarafından kodlanan proteinleri içerir. Ek olarak, çeşitli konakçı proteinlerin *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon sürecine, çoğunlukla sürecin sonraki aşamalarında (yani T-DNA hücre içi taşıma ve entegrasyon) katıldığı bildirilmiştir. *Agrobacterium*, konakçısını dönüştürmek için mevcut hücrel süreçleri benimsediğinden, bitki hücresinin bu genel biyolojik mekanizmalarını anlamak, *Agrobacterium*'un konak aralığını genetik bir mühendislik aracı olarak genişletmeye yardımcı olabilir ve ayrıca transgenik bitkilerin üretimi sırasında transformasyon sürecinin ve sonucunun kontrolünü kolaylaştırmaktır (Tzfira and Citovsky 2002; Gelvin 2003).

A. tumefaciens ve *A. rhizogenes* için kromozomal haritalar yayınlanmıştır (Hooykaas et al. 1982; Pischl and Farrand 1984). Hem oktopin hem de nopalin tip Ti (Depicker et al. 1983) ve Ri (Huffman et al. 1984) plazmitlerinin genetik haritaları yapılmıştır. Oktopin ve nopalin plazmitleri arasında A, B, C ve D olarak adlandırılan dört ana homoloji bölgesi tanımlanmıştır (Şekil 1.4). Bu bölgelere atfedilen ana işlevler şunlardır: (A) T-DNA bölgesi içindedir ve onkojenik özellikleri ve opin sentezini belirler. Ayrıca T-DNA fonksiyonları altında, (B) plazmit replikasyonu ve uyumsuzluğu, (C) konjugatif fonksiyonlar ve (D) vir bölgesi tartışılmaktadır. Bu Ti plazmitinin yaklaşık

1. GİRİŞ

%14'ünü oluşturur ve T-DNA'nın transferi ve muhtemelen entegrasyonu için gerekli bakteri fonksiyonlarını sağlar. Nopalin ve oktopin Ti plazmitlerinde sırasıyla en az 6 ve 7-10 lokus olarak tanımlanmıştır (Hagiya et al. 1985). Vir A, B, C ve D lokuslarında mutasyonları olan suşlar, T-DNA'yı bitki hücrelerine transfer etme yeteneğinden yoksundur (Gardner and Knauf 1986). Vir E, T-DNA'nın transferi için gerekli değildir, ancak T-DNA'nın entegrasyonunda rol oynadığı görülmektedir. Vir bölgesindeki vir C ve D genlerine karşılık gelen hdv lokusunda 13, 15, 28 ve 29 kDa'lık dört polipeptit tanımlanmıştır (Hagiya et al. 1985).



Şekil 1.4 Ti plazmit T-DNA transkriptlerinin şematik gösterimi (Bhatia et al. 1986).

Ti plazmiti büyüktür ve ilgili genler ve seçilebilir markerler ile daha büyük hale gelir. Büyük boyutlu plazmitlerin kullanımı zahmetlidir ve doğada düşük kopya sayısına sahiptir. Bununla birlikte, bu dezavantaj, sonunda büyük boyutlu plazmitler için problemi çözen ikili vektör sistemi ile birlikte ko-bütünleştirici bir sistemin geliştirilmesine yol açmıştır (Low et al. 2017).

1.2.1.2. İkili vektör

İlgilenilen genleri (goi) *Agrobacterium*'a sokmak için başlangıç teknolojileri, bu genleri büyük bir tümör indükleyen plazmitlerin (Ti-plazmitler) transfer DNA (T-DNA) bölgesine sokan karmaşık mikrobiyal genetik metodolojileri içermektedir. Bununla birlikte, bilim adamları sonunda T-DNA transferinin ve T-DNA işlenmesi için gerekli virülans (*vir*) genlerinin iki replikona bölünmesi durumunda T-DNA transferinin hala gerçekleştirilebileceğini öğrenmişlerdir (Lee and Gelvin 2008). Yabancı genlerin bitkiye aktarılması için oluşturulan ve yaygın olarak kullanılan ikili vektör sistemi, iki plazmit içeren Ti-plazmit sistemidir (Madigan and Martinko 2012). T-DNA transferinin ve işlenmesi için gerekli virülans genlerinin iki replikona bölünmesi durumunda T-DNA transferinin hala gerçekleştirilebilmektedir. İkili vektör sistemi, yardımcı vektör ve mini vektör olan iki plazmit içermektedir. Mini vektör, T-DNA'dan ve plazmitin *Escherichia coli* ve *Agrobacterium tumefaciens* içinde klonlanmasına izin veren hem *E. coli* hem de *A. tumefaciens*' in replikasyon kaynağından oluşan daha küçük boyutlu bir plazmiti ifade etmektedir. Yardımcı vektör, T-DNA bölgesi olmayan yabancı tip Ti plazmiti belirtmektedir. Yabancı tip Ti plazmit, gen aktarımı ve entegrasyonu için gerekli tüm genler için şablon sağladığından yardımcı bir plazmit olarak da bilinmektedir. Bu yardımcı ve mini vektörlerin her ikisi de *Agrobacterium* içine eklenir ve dönüştürülmüş *Agrobacterium* bitki transformasyonunda kullanılır (Low et al. 2018).

1.2.1.3. Ko-bütünleştirici vektör

Ko-bütünleştirici vektör, bir ara vektör ile silahsız Ti plazmit arasındaki homolog rekombinasyon yoluyla geliştirilir. Ara vektör normal olarak ilgilenilen geni barındıran *E. coli* plazmididir. Hem ara vektör hem de silahsız Ti vektörü, iki plazmitin homolog rekombinasyonunun gerçekleşmesine izin veren bazı yaygın sekanslardan oluşur. Rekombinasyon, birleştirilmiş *E. coli* plazmiti ve silahsız Ti plazmiti içeren büyük bir ko-bütünleştirici vektör ile sonuçlanacaktır. Bu ko-bütünleştirici vektör daha sonra transgenik bitki dönüşümü için *Agrobacterium*' a geri sokulacaktır. Böylece, ikili vektör sistemi tanıtıldığından beri bu vektörün kullanımı kesilmiştir (Low et al. 2017).

1.3. Hastalıklara Karşı Direncin Arttırılması

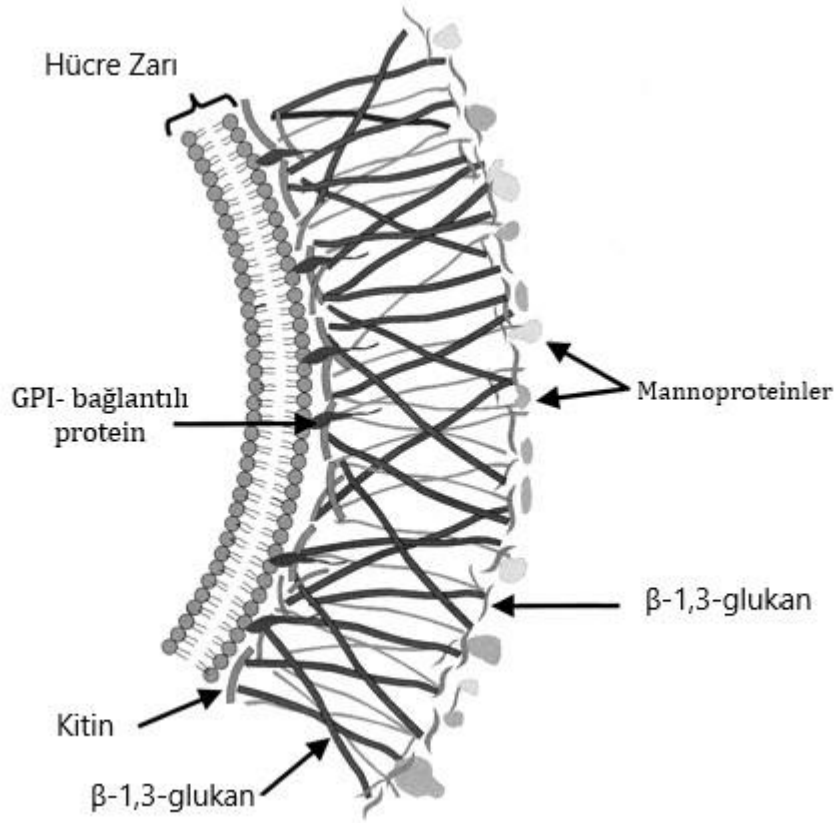
Bitkiler patojen saldırılarından kendilerini korumak için birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Bu savunma mekanizmaları bazı patojenler için caydırıcı bir rol oynamasına karşın, diğer bazı patojenler için etkisiz kalabilir. Bunun sonucunda da hastalık ortaya çıkar. Hastalık, duyarlı bir bitki, o konakçı bitkinin bir patojeni ile temas ettiğinde ve çevresel koşullar enfeksiyon için uygun olduğunda gelişir (Hammerschmidt 2018). Herhangi bir hastalığa dayanıklı transgenik bitki üretiminde çeşitli kaynaklardan (bitki tohumu, böcek, bakteri veya funguslardan) izole edilerek saflaştırılan proteinler değişik patojen sporlarıyla inkübe edilirler. Daha sonra proteinler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak klonlanır ve uygun vektörlerle bitkilere aktarılır. Neticede transgenik bitkiler antifungal veya antibakteriyel etkiye sahip proteinleri kendi hücrelerinde üretmeye başlarlar. Transgenik bitkiler hayatının herhangi bir döneminde, bu proteine karşı hassas olan bir patojen tarafından saldırıya uğradığında, bitkinin bu saldırıdan etkilenme olasılığı minimuma indirilir (Kazan ve Gürel 2001).

1.4.Fungal Patojenlere Karşı Mücadele

Fungal hastalıklar, birçok tahıl bitkisinde önemli miktarda verim kaybına neden olur. İstilacı fitopatojenik mantarların hücre duvarlarını parçalayabilen enzimlerin üretimi, bitkilerde savunma yanıtının önemli bir bileşenidir. Bu doğal konak savunma mekanizması fungus dirençli transgenik bitkilerde gelişmiştir. Bu doğal konakçı savunma mekanizması, funguslara dirençli transgenik bitkilerde geliştirilmiştir. Hastalığa karşı direnci genetik olarak iyileştirmek için bitki yetiştirme teknikleri de kullanılmıştır (Rommens and Kishore 2000). Patojen enfeksiyonuna yanıt olarak bitkilerde gelişen birçok karmaşık mekanizma tanımlanmıştır. Fungus istilasından sonra bağışıklık yanıtlarında yer alan çoklu genlerin rolü ve buna dahil olan çeşitli yollar açıklanmıştır (Islam 2006). Bu savunmaya duyarlı genler funguslara dirençli transgenik bitkiler üretmek için kullanılmıştır (Grover and Gowthaman 2003). Bu amaçla kullanılan genler kitinazlar, glukanazlar ve diğer antifungal genlerdir.

1.5.Fungal Patojenlerle İlgili Proteinler

Kitinaz, glukanaaz, peroksidaz ve diğer patojenez ile ilgili proteinler, bitkinin patojen tarafından saldırıya uğramasının hemen ardından yüksek düzeyde ifade edilirler. Bu genlerin ürünleri olan proteinler *in vitro* şartlarda test edildiklerinde, patojen gelişimini engelleyici bir etkiye sahip oldukları görülür. Bitki hücre duvarının dayanıklılığında önemli bir enzim olan kitinaz enzimini kodlayan genler fasulye, çeltik ve tütün bitkilerine aktarılmış, bunların *Rhizoctonia solani*'ye karşı dayanıklılıklarının arttığı gözlenmiştir. Kitinaz ve glukanaaz genleri birlikte aynı bitkide ifade edildiğinde, elde edilen dayanıklılığın sinerjistik etkisinden dolayı daha da arttığı gözlenmiştir. Bunların dışında patojenez ile ilgili (PR) protein genleri, poligalakturonazı inhibe eden protein (PGIP) genleri ve monoklonal antikor genlerinin transgenik bitkilerde tezahürü sağlanmıştır. Ayrıca, gen transfer metotlarıyla patojen sinyallerinin artırılması ve bitkilerde aktif oksijen türevlerinin üretimi yoluyla da hastalıklara dayanıklılığın artırılması mümkün olmuştur (Kazan ve Gürel 2001). Biyoteknoloji, bitki hastalıkları ile mücadeleye yeni bir yaklaşım getirmiştir. Bitkiler, patojenlere karşı çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptir. Bitkiler, dayanıklılık genleri (R) aracılığı ile patojen saldırısını algılayıp bir savunma oluşturabilmektedir. Bunlar enfeksiyondan önce ürettikleri proteinler ve organik moleküller ile gerçekleşir. Şimdiye kadar çok sayıda R-geni karakterize edilmiştir ve bazıları bitki ıslahında başarıyla kullanılmaktadır. Böylece ıslah programlarından elde edilen dayanıklı bitkilerin kullanımı ile pestisit gibi uygulamalara iyi bir alternatif oluşturulmuştur. Patojen bağlantılı proteinler biyotik strese karşı biriken farklı proteinlerden oluşan bir protein grubudur. PR proteinleri salisilik asit, jasmonik asit, systemin ve etilen gibi farklı uyarıcılardan teşekkül eder. PR proteinlerinin bazıları antifungal aktivite gösterir. Bazı PR proteinlerine β -1,3-glukanaaz, kitinaz ve fungal membran per-metaboliz örnektir (Şekil 1.5) (Kazan ve Gürel 2001).



Şekil 1.5 Fungal Hücre Duvarı Şeması (Selitrennikoff 2001)

En sık tarif edilen antifungal proteinler muhtemelen kitinazlar ve β -1,3-glukanazlardır. Bu enzimler, kitin ve β -1,3-glukanın hidrolizini, birçok mantarın hücre duvarlarının her iki ana bileşenini katalize eder. Bu bileşenlerin parçalanmasıyla, iki hidrolazın mantar büyümesini engellediği düşünülmektedir. Çoğu mantar enfeksiyonu hücreler arasındaki boşluklarda başlatılır ve daha sonra hücrelere nüfuz eder. Bu nedenle, bitkileri bu tür mantarlara karşı korumak için, hücrelerin içinde değil, hücreler arası boşluklarda antifungal bileşiklerin bulunması gerekebilir (Wessels and Sietsma 1981).

1.5.1. Kitinazlar

Kitinaz genini eksprese eden transgenik bitkiler, birçok çalışmada fungus hastalığına karşı artan direnç göstermiştir. Bunun nedeni, kitinazın aşırı ekspresyonu yoluyla mantar hücre duvarı materyali olan kitinin hemen parçalanmasıdır. *Rhizopus oligosporus*' tan kitinaz geni (chi) Terakawa et al. (1997) tarafından tütünde ifade edilmiştir. Gri küfe dirençli transgenik bir kasımpatı, Takatsu et al. (1999) tarafından,

pirinçten bir kitinaz geni (RCC2) aktarılmasıyla geliştirilmiştir. Kitinaz geninin tütün ve pirince aktarılması ile fungal hastalıklara karşı bitkilerde direncin arttığı görülmüştür. Kitinaz ve glukanaz enzim genlerinin tütün ve domates bitkilerine birlikte aktarılması sonucu bitkilerdeki direncin daha fazla olduğu saptanmıştır (Bezirganoğlu 2017).

Mantara dayanıklı bitkiler üretmek için aynı kitinaz geni (RCC2) ile diğer gruplar tarafından başka çalışmalar da yapılmıştır. Yamamoto et al. (2000) transgenik asma üretti ve Kishimoto et al. (2002) transgenik salatalık geliştirdi, bunların her ikisi de aynı kitinaz (RCC2) genini eksprese eder. Bu gen (RCC2) ayrıca Mitani et al. (2006) tarafından üç yapraklı portakaldaki fungus direncini arttırmak için kullanılmıştır. Bir tütün kitinaz geni (chi) eklenerek funguslara karşı dirençli bir yer fıstığı geliştirilmiştir (Rohini and Rao 2001).

1.5.2. Glukanazlar

Kitinazın yanında, glukanaz genine, fungus dirençli bitkiler geliştirmek için transgenik çalışmalarda öncelik verilmiştir. Kendini savunma sistemlerinde çalışmasına ek olarak, β -1,3-glukanazlar mikrosporogenez, dölllenme, tohum çimlenmesi, çiçek oluşumu ve somatik embriyogenez gibi çeşitli fizyolojik ve gelişimsel süreçlerde yer almıştır (Antony Ceasar and Ignacimuthu 2012). Nishizawa et al (2003), pirinçte hastalık direncini arttırmak için β -1,3 ve 1,4-glukanaz genini (Gns1) pirinçte tanıtmıştır.

β -1,3-1,4 glukanlar, yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarlarının yapısında bulunan hem β -1,3 hemde β -1,4 bağlı D-glukoz içeren lineer polisakkarit olduğu bildirilmiştir (Beckmann et al. 2006). β -(1,3-1,4)-glukanlar, *Poaceae* (buğdaygiller) familyası bitkilerinin hücre duvarı polisakkarit bileşikleri olup özellikle ticari öneme sahip arpa, pirinç ve buğday gibi tahılların endosperm hücre duvarında bulmuştur (Stone et al. 1992). Ayrıca bakteri, fungus gibi birçok organizmalar β -(1,3-1,4)-glukanaz enzim kaynağı olduğu bilinmektedir. Ancak bitki ve mikrobiyal kaynaklı glukanazlar birbirinden farklı aminoasit dizileri ve üç boyutlu yapılarında farklılık gösterir. Bitki β -(1,3-1,4)-glukanazları glikosil hidrolaz 17 familyasına ait iken, mikrobiyal kökenli β -(1,3-1,4)-glukanazlar glikosil hidrolaz 16 familyasına aittir (Henrissat 1991; Henrissat and Bairoch 1993, 1996). Bu enzimler arasında endo β -(1,3)-(1,4)-glukanazlar (likenazlar), endosperm hücrelerinin nişastasına α -amilazların ulaşımını kolaylaştırdığından dolayı içki mayalama endüstrisinde spesifik uygulamalara sahiptirler (Beckmann et al. 2006).

Bitki β -1,3-glukanları, en sık kitinaz izozimleri ile kombinasyon halinde mantar patojenlerinin hücre duvarlarını hidrolize ederek doğrudan savunmaya katılırlar. İn vitro analizler, β -1,3-glukanların, β -1,3 / 1,6-glukanları parçalayarak doğrudan mantar patojenlerine etki ettiğini ve kitinaz, fungal hücre duvarındaki kitinlerin ardışık iki N-asetil glukoz amininin C1 ve C4 arasındaki bağa saldırarak etki göstermiştir. Patojenik mantarların hiphal hücre duvarının bozulması, sadece hücre parçalanmasına karşı değil aynı zamanda mantar savunma yanıtlarının diğer bileşenlerinin eylemleri için de duyarlı olmasını sağlar (Mohammadi and Karr 2002).

Mantar hücre duvarlarını hidrolize etme potansiyeli göz önüne alındığında, β -1,3-glukanaz birçok uygulama yönünde yararlıdır. Temel araştırmalarla ilgili olarak, β -1,3-glukanaz, maya protoplastlarını elde etmek ve mantar hücresi duvarı yapısının mimari özelliklerini tanımlamak için bir reaktif olarak kullanılmıştır. Endüstriyel uygulamalarda, β -1,3-glukanaz, maya ekstraktı üretme işlemlerinde, potansiyel bir immünoaktivatör olan çözünen β -1,3-glukan işlemlerinde ve şarap ekstraktının netleştirilmesinde kullanılabilir. Tarımsal uygulamalarla ilgili olarak, bitkileri çok sayıda yayında gösterildiği gibi mantar istilasından korumakta bir biyo-kontrol maddesi olarak görev yapabilir (Cheng et al. 2009).

Kitinaz ve glukanaz genleri, maksimum mantar direnci elde etmek için birkaç transgenik projede birlikte eksprese edildi. Bu genlerin kombine ekspresyonu, tek başına her iki genin ekspresyonundan daha yüksek seviyede direnç göstermiştir. Sonuç olarak, kitinaz ve glukanaz gibi antifungal genlerin, transgenik bitki bitkilerinde fungal hastalıkların etkin kontrolü için potansiyel aday genler oldukları kanıtlanmıştır. Bu genler, gelecekte daha fazla mantar dirençli mahsul bitkileri geliştirmek için kullanılmalıdır. Bu, ekin bitkilerini mantar hastalıklarından koruyarak tarımsal üretimi arttırmaya büyük ölçüde yardımcı olacaktır.

1.5.3. Diğer Antifungal Proteinler

Kitinaz ve β -1,3-glukanaz dışında, genler başka antimikrobiyal proteinler veya peptitler de transgenik bitkilerde hastalık direnci kazandırmada etkili olmuştur. Fitoaleksinler, bitkiler tarafından çeşitli biyolojik olmayan streslere veya mikroorganizmalarla karşılaştıklarında sentezlenen antimikrobiyal özellikteki düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler olarak bildirilmiştir. Bakteri ve fungal patojenlere

1. GİRİŞ

karşı dirençli bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde kullanılmışlardır. Yani hidrojen peroksit içeren aktif oksijen türleri patojen enfeksiyonunda bitki savunmasında önemli bir etkidir (Hain et al. 1993). Fitoaleksinler hem fungal hem de bakteriyel patojenlere karşı, özellikle *verticillum* hastalığına karşı savunma sağlamıştır. (Wu et al. 1995). Ayrıca transgenik bitkilerde savunmayla ilgili genlerin aşırı ifadesi birçok patojene karşı direnci arttırmıştır. Antimikrobiyal proteinlerle ilgili lipid transferaz protein homologisi, transgenik sardunyada ifade edildiğinde *Botrytic cinerea*'nın gelişimini azalttığı gösterilmiştir (Bi et al. 1999). Antimikrobiyal peptitler küçük molekülleri üretmek için sentezi sağlanıp fungusla karşı direnç arttırmak için kullanılmışlardır. Transgenik bitkilerde tioniin, defensinin aşırı ifadesi *Alternaria*, *Fusarium* ve *Plasmodiophara* içeren birkaç patojenin gelişmesini azalttığı gösterilmiştir ve tarla şartlarında patatesten *verticillum* hastalığına karşı direnç sağlanmıştır (Bezirganoğlu 2017). Ribozom inaktif proteinleri, bitki enzimleri olup azot glukozidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Ribozom inaktif proteinleri, yabancı ribozom veya birkaç spesifik proteini inaktive ettiği gösterilmiştir. Bu yüzden protein sentezini durdurup, fungus gibi ökaryotların yabancı ribozomlarını inaktif ettiği bildirilmiştir (Logemann et al. 1992).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Krishnamurthy et al. (2000), nohut (*Cicer arietinum L.*) bitkisinin çeşitli hatlarına *Agrobacterium tumefaciens*'in "p35S GUS-INT" plazmitini barındıran C58C1/GV2260 suşu ve pIBGUS plazmitini barındıran EHA101 suşu ile β -glukuronidaz genini aktarmışlardır.

Ünver vd (2000) yaptığı çalışmada *in vitro* şartlarda yetiştirilen Samsun tütün çeşidinin yaprak diski eksplantlarına onkogenik olmayan *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 p35S GUS-INT aracılığıyla farklı sıcaklık derecelerinde (18, 20, 22, 24 ve 28°C) gen aktarımı yapmıştır ve gen aktarım çalışmalarında 22°C sıcaklığın en etkin olduğunu bildirilmiştir.

Ming-Mei Chang et al. (2002) ayrı *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) klonlarında iki bağımsız plazmitte (pChit ve pGlu) çoğalan bir bezelye kitinaz ve β -1,3-glukanaz genlerini, aynı anda, *in vitro* yetiştirilen patateslerin (*Solanum tuberosum L.* cv Russet Burbank) internot eksplantlarına transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Transgenik patatesten, eş mRNA'ları üretmek için intronsuz kitinaz ve intron içeren bezelye β -1,3-glukanaz genlerini eksprese edebildiğini göstermiş; NPT II genini, tek seçim markörü olarak kullanarak, patateslerde etkili bir ko-transformasyon sıklığı elde etmenin mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Kim et al. (2002), *Bacillus circulans*'dan, endo- β -(1,3-1,4)-glukanazı kodlayan geni *Escherichia coli*'de klonlamışlardır. Klonlanan enzim, likenan ve arpa β -glukanını hidrolize ederken karboksimetil selüloz (CMC), laminarin ve ksilan üzerinde aktif olmadığını belirtmişlerdir. Endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi amino asit dizisinin, endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi üreten *Bacillus N-137* ve *Brevibacillus brevis* ile sırasıyla %68 ve 51 oranında homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir.

Zeng Yu et al. (2003) yeni bir tam uzunlukta β -1,3-glukanaz cDNA'sını, *Tibet hulless* arpa ve DNA Walking ile elde edilen komple geninin dizisinden qRT-PCR ve RACE teknikleri ile elde edilmiştir. BLAST programı ile sekans hizalaması, cDNA'nın arpa β -1,3-glukanaz II ile yüksek benzerliğe sahip olduğunu göstermiştir. Gen, fonksiyonel olarak *Escherichia coli* içinde eksprese edilmiş ve rekombinant protein, β -1,3-glukanın bir karakteristik bir aksiyon paterni β -1,3-glukan endohidrolazla (EC 3.2.1.39) hidrolizini katalize ettiği bildirilmiştir. Southern blot analizi, genin küçük bir

gen ailesinin bir üyesi olduğunu göstermiştir. qRT-PCR ve Northern blot analizi, bunun yapısal olarak arpa sürgünlerini ifade ettiği bildirilmiştir.

Zhang et al. (2005), karanfilde (*Dianthus caryophyllus* ve *D. chinensis*) gen aktarımı yapılmış hücreleri seçebilmek amacıyla uygun seleksiyon ortamını belirlemek amacıyla kanamisin, mannose ve PPT (fosfonitrisin)'nin farklı dozlarını *Agrobacterium* ile muamele edilmiş ve edilmemiş materyalde denemişlerdir. Sonuçlar bakteriyel enfeksiyonun gerçekten yaprak eksplantlarının seçici ajanlara toleransını arttırdığını ve bu artışın genotip-bağımlı olduğunu göstermiştir. Genel olarak, bakteriyel enfeksiyon olmadan, filiz oluşumu için en yüksek konsantrasyonlar, genotipe bağlı olarak kanamisin için 25-50 mg/L, mannoz için 3-4 g/l ve PPT için 0 mg/L olmuştur. Bakteriyel enfeksiyondan sonra, sürgün oluşumu çeşide bağlı olarak ya 100 mg/L kanamisin, 4-6 g/L mannoz ya da 1-2 mg/L PPT'de bildirilmiştir.

Moravčíková et al. (2004), salatalık sınıf III kitinaz ve *Nicotianaplumbaginifolia* sınıf I glukanaz kodlayan genler, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Slovak patates (*Solanum tuberosum* L.) 116/86 üreme hattına birlikte aktarımını sağlamıştır. Her iki transgen için entegre kopyaların sayısı ve RNA ekspresyon seviyesi belirlenerek, sokulan transgenlerin ekspresyonunda düşük varyasyon ve anlamlı korelasyon olduğunu göstermiştir. Transgen ekspresyonunun transformantların mantar duyarlılığına etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Hifal deneyleri sonucunda, transformantlar ile dönüştürülmemiş patates eksplantları karşılaştırıldığında *Rhizoctonia solani* 'nin büyümesini inhibe etme kabiliyetinde belirgin bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur.

Moravčíková et al. (2007), aynı genleri farklı bir plazmit pJL06 kullanarak birlikte eksprese etmişlerdir. Transgenik mikrotüplerden izole edilen ham protein ekstraktları ile yapılan deneyler, *Rhizoctonia solani hyphae*'nin büyüme inhibisyonunu göstermiştir.

Sridevi et al. (2008), *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla mısır ubikuitin promotörü altında çeltik kitinaz (*chi11*) genini ve aynı T-DNA'da CaMV 35S promotörü altında tütün β -1,3-glukanaz geni barındıran ikili vektör pNSP3 kullanılarak kılıf (zarf) yanıklığına dirençli transgenik çeltik hatları geliştirmişlerdir. Bu iki geni ifade eden transgenik bitkiler, kontrole kıyasla kılıf yanıklığına karşı oldukça dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Yueh-Mei Cheng et al. (2009) çalışmasında 1793 amino asitlik bir proteini kodlayan bir β -1,3-glukanaz geni, bir *Paenibacillus* sp suşundan klonlamıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yadav (2010), ilk kez susam (*Sesamum indicum*) bitkisinin kotiledon eksplantını *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla pCAMBIA2301 ikili vektörünü kullanarak bir neomisin fosfotransferaz geni (*nptII*) ve kesintiye uğramış bir β -glukuronidaz (GUS) geni (*uidA*) aktarımı yapmıştır. Seçim ortamında (25.0 μ M benziladenin (BA), 25 mg/L kanamisin ve 400 mg/L sefotaksim içeren MS) *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte olmuş eksplantlardan geri kazanılan yeşil filizler, 2.0 μ M indol-3-bütirik asit (IBA) ve 5.0 mg/L kanamisin içeren MS ortamda köklendirmiş. Köklü sürgünler toprağa aktarılıp tohum için büyütülmüştür. Varsayılan T₀ bitkilerinde transgenlerin varlığı, entegrasyonu ve ekspresyonu, sırasıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Southern blot hibridizasyonu ve GUS histokimyasal analizi ile doğrulanmıştır. T₀ ve T₁ bitkilerinin vejetatif ve üreme kısımlarında GUS aktivitesi tespit edilmiştir. T₁ bitkilerinin qRT-PCR analizi, *uidA* geninin transkriptlerinin varlığını doğrulanmıştır. Analizler sonucu dönüşüm sıklığı %1,01 olarak bulunmuştur.

Girhepuje et al. (2011), çeşitli kitinazların, *in vitro* koşullarda fungus patojenlerinin büyümesini inhibe ettiği göstermiştir. 33-kDa kitinaz proteinini kodlayan bir buğday kitinaz geni olan *chi194*, mısır ubikuitin 1 promotörünün kontrolü altında domates bitkilerinde aşırı eksprese edildiğini gözlemlemiştir. Transgenin domates bitkilerine entegrasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Southern blot analizi ile teyit etmiştir. T₁ ve T₂ nesillerindeki transgenin kalıtımı, moleküler analiz ve higromisin duyarlılık testi ile gösterilmiştir. T₀'daki transgenik çizgiler arasında geniş kitinaz aktivitesi gözlemlendi ve T₁ ve T₂ nesillerinde benzer bir aralık korunduğunu bildirmiştir. En önemlisi, yüksek kitinaz aktivitesine sahip transgenik domates hatlarının, mantar patojeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*' ye karşı oldukça dirençli olduğu bulunmuştur. Bu nedenle sonuçlar, domates bitkilerindeki buğday endokitinaz *chi194*'ün ekspresyonunun, mantar patojeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*' nin neden olduğu *Fusarium* solgunluk hastalığına karşı direnç verdiğini göstermiştir.

Satabdi Ghosh et al. (2016) çeltik oksalat oksidaz 4 genini (Osoxo4) aşırı ifade eden transgenik patates çeşitlerinin gelişimini rapor etmiştir. Osoxo4'ün aşırı ekspresyonu, agronomik performans çalışmalarıyla transgenik patates bitkilerinin morfolojisi ve verimi üzerinde herhangi bir etki göstermediğini bulmuşlardır. Bu nedenle, Osoxo4' ün kurucu ifadesi, patateslerde geç küf direncinin mühendisliği için etkin bir stratejiyi temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Khan et al. (2016), saflaştırılmış rekombinant kitinaz proteini, kalitatif bir *in vitro* antifungal analizde *Alternaria solani* dahil fitopatogenik mantarların büyümesini önemli

2. KAYNAK ÖZETLERİ

ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, endo-kitinaz genini aşırı eksprese eden transgenik patatesler *Agrobacterium* aracılı transformasyon yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde geliştirmişlerdir. Transgenik patates bitkilerinden elde edilen ham protein özleri, kantitatif *in vitro* analizde *A. solani*'nin %39,5 ila 60,5 arasında hifal büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. *In vitro* deneylerde, transgenik patates bitkilerinin *A. solani* enfeksiyonuna karşı yeşil ve sağlıklı kalarak güçlü bir direnç sağladıkları gösterilmiş, transgenik olmayan kontrol bitkileri sararmaya başladığını ve enfeksiyondan 3 hafta sonra öldüğünü gözlemlemişlerdir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan cihazlar çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Sarf Malzemeler

CİHAZ	MARKA
Buzdolabı	Arçelik
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-Zhwy-2102c
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik
Derin Dondurucu (-80)	Harris, İngiltere
Elektroforez tankı	Biorad-yatay
Güç kaynağı	Biorad, PowerPac
Hassas Terazı	Shimadzu
Masaüstü Ph Metre	WTW inilab pH 7110
Elektroporasyon Cihazı	Gene Pulser Xcell Electroporation Systems
Mikrodalga Fırın	Vestel
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Otoklav	JSR, Jsac-60
PCR Cihazı	Sensoquest
Saf Su Cihazı	GFL
Santrifüj	Hettich Micro 22 R
Masa santrifüjü	Hettich EBA 21
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Steril Kabin	Esco NordicSafe™ Class II Biological Safety Cabinet
Terazi	Desis, NHB
Manyetik Karıştırıcı	Chiltern HS31
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3w

3.1.2. Gen Transferinde Kullanılan Plazmit ve Bakteri Suşları

Meng et al. (2009) daha önce *Paenibacillus* sp'dan kültür ortamında saflaştırılan β -1,3-glukanaz içeren pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitleri bu çalışmada kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* suşları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nden temin edilen AGL1 (NCBI:txid227409) ve GV3101 (BacDive ID:24823) suşları kullanılmıştır.

3.1.3. Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyali

Transformasyonun optimizasyonu sağlamak için 3 farklı Kavun (Kırkağaç, Kış ve Ananas) çeşidi çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Tohumlar ticari olarak satın alınmıştır (Yaprak Quality Seeds).

3.1.4. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Yöntemleri

Besiyerlerinin ve kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu yapılırken otoklavda 1,5 atm basınçta 121°C 'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. %96' lık etanol içinden 730 ml mezürle ölçülerek alındı ve hacmi 1000 ml 'ye tamamlanarak hazırlanan %70'lik EtOH çalışma yüzeylerinin dezenfeksiyonu için kullanılmıştır.

Steril kabinin içi kullanmadan 10-15 dakika önce %70' lik EtOH ile silinerek UV lambası açılmıştır. Bench ve diğer yüzeyler kullanmadan önce %70' lik alkolle dezenfekte edilmiştir.

3.1.5.Kültür Ortamlarının ve Çözeltilerin Hazırlanması

Luria Bertani (LB) Broth: 1000 ml' lik erlen içerisine 25 gr toz LB besiyeri tartılarak konulmuştur. Üzerine bir miktar steril distile su konularak, pH' ı ayarlanarak üzerine distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Erlen içine manyetik balık atılıp ve manyetik karıştırıcıda çözünene kadar karıştırılmıştır (Bertani, 1951).

Luria Bertani (LB) Agar: 1000 ml'lik erlen içine 25 gr toz LB besiyeri tartılarak konulmuştur. Üzerine bir miktar steril distile su konularak, pH'ı ayarlanmıştır. Daha sonra 15 gr agar tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavla steril edildikten sonra steril petriker içine her birine yaklaşık 20-25 ml olacak şekilde dökülüp ve katılaşımaya bırakılmıştır (Bertani, 1951).

Karbolit baskılı Süper Optimal Broth (SOC) Besiyeri: 100ml'lik erlen içerisine %2 (w/v) tripton, %0,5 (w/v) yeast extract, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2,5mM KCl, 20mM glukoz eklenerek hazırlanmıştır (Hanahan 1983).

Murashige ve Skoog ortamı (MS): 1000ml'lik erlen içerisine 10 ml demir şelat, 1ml mikroelemetler, 50ml makroelementler ölçülerek konulmuştur. Üzerine 20 gr sakkaroz tartılarak konulmuş ve çözünmesi sağlanmıştır. pH 5,6-5,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 7 gr Agar tartılarak distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanmıştır. Otoklavla steril edildikten sonra steril petriker içine her birine yaklaşık 20-25 ml olacak şekilde dökülüp ve katılaşımaya bırakılmıştır (Murashige and Skoog 1962).

Makro Bitki Besin Elementleri: 1000ml'lik erlen içerisine 1650mg NH₄NO₃, 1900mg KNO₃, 332,2 mg CaCl₂, 180,4 mg MgSO₄, 170mg KH₂PO₄ tartılarak üzeri distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (Bolat ve Kara 2017).

Mikro Bitki Besin Elementleri: 1000ml'lik erlen içerisine 37,25 mg Na₂EDTA, 27,8 mg Fe₂(SO₄).7H₂O, 15,1 mg MnSO₄, 0,83mg KI, 6,2 mg H₃BO₃, 8,6mg ZnSO₄.7H₂O, 0,25 mg Na₂MoO₄.2H₂O, 0,25mg CuSO₄.5H₂O, 0,25 mg CoCl₂.6.H₂O tartılarak üzeri distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır (Bolat ve Kara 2017).

Etidyum bromür çözeltisi: 1 g etidyum bromür (10 mg/ml), 100 ml dH₂O içerisinde çözdürülerek hazırlanmış ve hazırlanan karışım karanlıkta oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Garfinkel and Nester 1980)

1X TAE tamponu (Tris-Asetat tamponu): 100 ml 10X TAE tamponu 900 ml steril dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Brody and Kern 2004)

%30'luk Gliserol: 70 ml dH₂O üzerine 30 ml gliserol ilave edilerek hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (Gökdemir 2017).

%70'lik Etil alkol (EtOH): 70 ml saf etil alkol dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Bezirganoğlu vb 2013).

%1 NaClO: 10ml ticari çamaşır suyu (NaClO) üzerine 9ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır (Bezirganoğlu vb 2013).

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrokompotent Hücre Hazırlanması

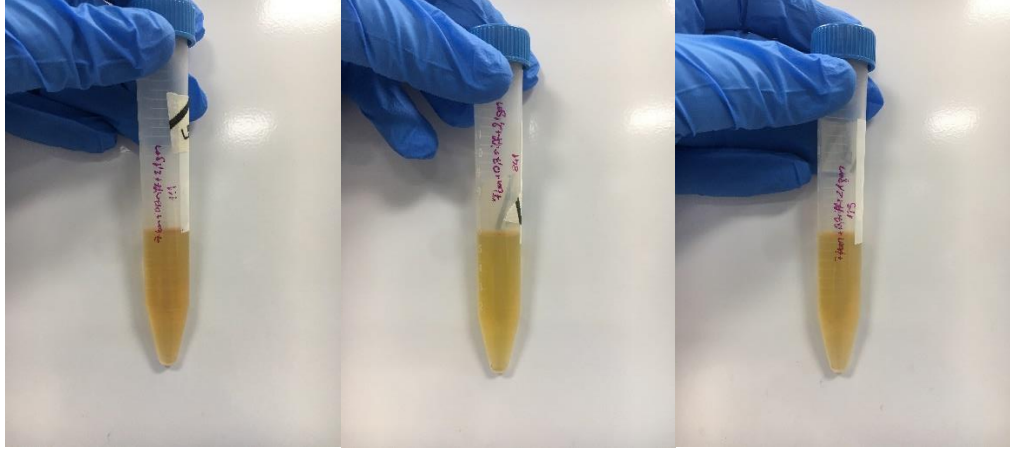
Stokta bulunan rifamisin ve karbenisilin içeren LBA besiyerinde büyütülmüş olan, içerisinde plazmit bulunmayan *A. tumefaciens*'in AGL1 ve GV3101 suşlarından tek koloni alınarak LB besiyerine ekilmiştir. Bir gece boyunca 28° C'de 200-220 rpm'de çoğaltılmıştır. LB besiyerinde gelişen bakteri kültüründen spektrofotometre kuvetine konulmuş, OD₆₀₀= 0,5-0,8 oluncaya kadar büyütülmüştür. Daha sonra erlen içerisinde büyütülmüş olan bakteriler steril 50 ml 'lik falkonlara eşit miktarlarda konulmuştur ve buz üzerine alınmıştır. 4°C 'de 4000 rpm 'de 10 dakika tutularak santrifüj yapılmıştır. Tüpün üzerindeki süpernatant kısmı atılarak dipte kalan pellet üzerine 2 ml soğuk steril distile su eklenmiştir. Pellet pipet yardımıyla süspanse edilmiştir. Daha sonra her bir falkon 50 ml olacak şekilde üzerine soğuk steril distile su eklenmiştir. Tekrar 4°C 'de 4000 rpm 'de 10 dakika tutularak santrifüj yapılmıştır. Tüpün üzerindeki süpernatant kısmı atılarak dipte kalan pellet üzerine 10 ml soğuk steril distile su eklenmiştir. Pellet pipet yardımıyla süspanse edilmiş ve 4°C 'de 4000 rpm 'de 10 dakika tutularak santrifüj yapılmıştır. Tüpün üzerindeki süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 1 ml %10'luk steril gliserol eklenerek, çözdürülmüştür. -20°C'de soğutulan buz üzerindeki 0.5'lik tüplere 100 µl olacak şekilde bölüştürülmüş ve ardında sıvı azotta dondurularak -80°C'de muhafaza edilmiştir (Gökdemir 2017).

3.2.2. Elektroporasyon

Liyofilize olarak saklanan plazmitlerin üzerine 30 µl steril su eklenerek, çözdürülmüştür. Elektroporasyonda kullanılacak küvetler önceden buz üzerine yerleştirilip soğutulmuştur. Kompetent *A. tumefaciens*, -80°C'den buz içerisine alınmıştır. 50 µl kompetent *A. tumefaciens* üzerine pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitlerinin her birinden ayrı ayrı 3 µl eklenmiştir. Süspansiyon edildikten sonra buz üzerinde bekletilmiştir. Karışımın tamamı alınarak elektroporasyon küvetlerine aktarılmıştır. Elektroporasyon cihazında elektrik verilmiştir (25/2400 µF/V kapasitans, 200 Ω yükleme rezistans). Elektrik şoku uygulanan küvetinin içerisine 1 ml SOC besiyeri eklenmiştir. Elektroporasyon küvetindeki tüm sıvı 1.5 – 2 ml'lık tüplere aktarılmıştır. Sıvı konulan tüpler 28°C' de 200 rpm'de 2,5-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üzerindeki süpernatant kısmı atılarak, pellet üzerine 70 µl LB Broth besiyeri konulmuştur. Tüp içerisindeki tüm sıvı antibiyotik (rifamisin, kanamisin, karbenisilin veya sefotaksim) içeren LB Agar besiyerine yayma plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler inkübatör içerisinde 28°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Gökdemir 2017).

3.2.3. Plazmit İzolasyonu

EcoSpin plazmit izolasyon kit (EcoTech Biotechnology, Türkiye) kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle 7 ml LB içerisine 10 mg/ml rifamisin, 50 mg/ml karbenisilin, 50 mg/ml kanamisin ve gen aktarımı yapılan bakterilerden tek koloni bir falkon içerisine konulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: Plazmit izolasyonunda bakterilerin büyümesi için falkonlara hazırlanan LB besiyeri

Bakteriler 16 saat boyunca 37°C’de 200-250 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oda sıcaklığında 6000 rpm’de 2 dakika mikrosantrifüj yapılmıştır. Bu aşama iki kez tekrarlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kit içerisinde bulunan resüspansiyon tamponundan 250 µl pellet üzerine eklenerek hiçbir hücre topağı kalmayacak şekilde yeniden süspanse edilmiştir. Süspanse edilen karışıma 1 µl kit içerisinde bulunan RNase A eklenmiş karıştırılmıştır. Üzerine 250 µl liziz tamponu eklenmiş ve 6-7 kez tüp ter yüz edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra 3 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 350 µl bağlama tamponu eklenmiş ve 6-7 kez tüp ter yüz edilerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika 12000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Bir toplama tüpüne EcoSpin kolonu konulmuş ve süpernatant kolona aktarılmıştır. Bir masa üstü mikrosantrifüjde maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpündeki sıvı atılarak, kolona 400 µl yıkama tamponu 1 eklenmiştir. Mikrosantrifüjde maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak, kolona 400 µl yıkama tamponu 2 eklenmiştir. Toplama tüpü yenisiyle değiştirilerek kolon üzerine konulmuştur. Daha sonra kolonun ortasından 30 µl elüsyon tamponu ilave edilmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Mikrosantrifüjde maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Tekrar sonra kolonun ortasından 20 µl elüsyon tamponu ilave edilmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Mikrosantrifüjde maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Kolon atılmış, tüp içerisinde kalan sıvı eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorflar muhafaza edilmesi için -20° C’ye konulmuştur.

3.2.4. Koloni PCR

Gen aktarım çalışmalarında kullanılan pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitlerinin varlığını teyit edebilmek için İki gün boyunca büyütülmüş olan bakterilerden pozitif koloniler seçilmiştir. Koloni PCR yapılarak PCR işlemi için β -1,3 glukanaaz genine özgü primerler kullanılmıştır (Meng et al. 2009). Kullanılan primer dizisi Çizelge 3.2 gibidir;

Çizelge 3.2 β -1,3 glukanaaz için kullanılan primerler

β-1,3 glukanaaz F	5' CTCCGGATCCCCGAGAGGCCA 3'
β-1,3 glukanaaz R	5' CAGTTAAGCTTCTGGTGCAGCACGC 3'

Çizelge 3.3'de verilen maddeler PCR tüplerine koyularak seçilmiş kolonilerden alınan bakteriler eklenmiş ve Çizelge 3.4'de verilen koşullara göre PCR yapılmıştır.

Çizelge 3.3 Koloni PCR için kullanılan maddeler ve miktarları (Chang et al. 2002)

Madde	Miktar
Taq buffer	2 μ l
dNTP	1,6 μ l
Primer F	0,3 μ l
Primer R	0,3 μ l
Taq DNa Polimeraz	0,1 μ l
dH₂O	15,7 μ l

Çizelge 3.4 Koloni PCR şartları (Girhepuje and Shinde 2011)

Sıcaklık	Süre	Döngü
94°C	2 dakika	-
94°C	40 saniye	35
55°C	40 saniye	35
72°C	1 dakika	35
72°C	5 dakika	-

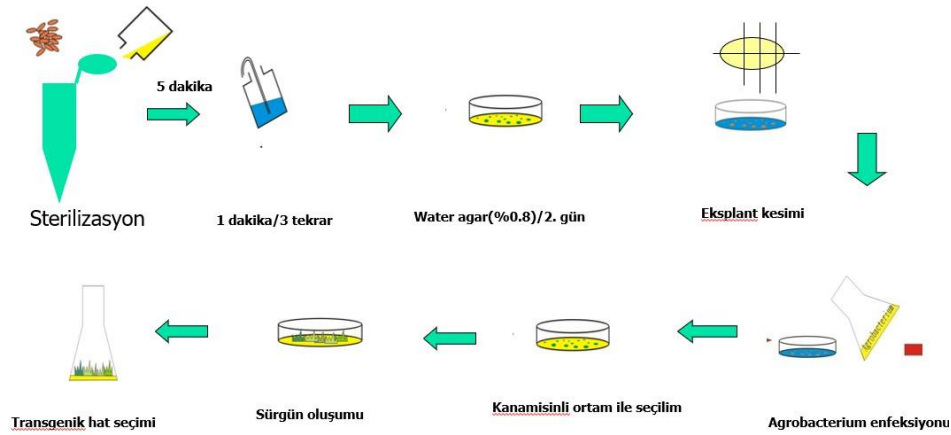
Her plazmit için ayrı PCR karışımına tek koloni konulmuştur. Pozitif kontrol olarak koloni yerine 2 µl plazmit, negatif kontrol için ise koloni yerine 2 µl dH₂O konulmuştur.

3.2.5. Agaroz Jel Elektforezi

Elde edilen PCR ürünlerin üzerine 2,5 µl yükleme boyası eklenmiş ve %1 lik agaroz jel (0,6 gr agaroz ve 60 ml 1x TAE solüsyonu) hazırlanmış ve 2 µl EtBr solüsyonu eklenerek 90 volt 45 dakika elektroforez cihazında koşturulmuştur. Koşturma işlemi sonrasında UV ışık altına jel görüntüleme sisteminde sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.6. Bitki Transformasyon Çalışmaları

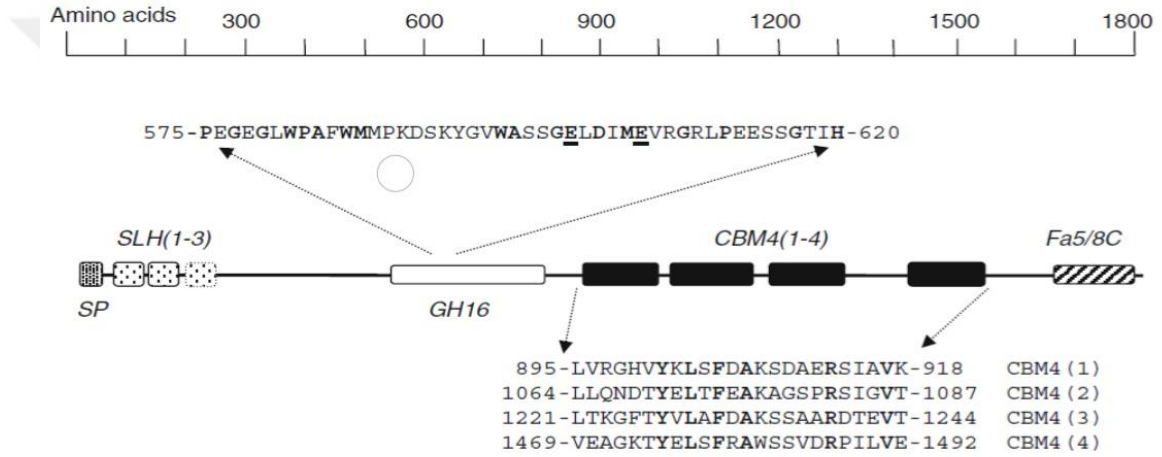
Tohum kabukları çıkarıldıktan sonra tohumlar 3 dakika %1 NaClO yüzey sterilizasyonu yapılarak 3 kez, otoklav edilmiş su ile durulanmıştır. Steril tohumlar %0,8 agar ortamında 2 gün boyunca oda sıcaklığında karanlığa maruz bırakılmıştır. Kotiledon eksplantlar sekiz parçaya ayrılarak transformasyon için kullanılmıştır (Bezirganoğlu vb. 2013). Bitki doku kültürü için MS (Murashige and Skoog, 1962) ortamı içerisinde bitki büyüme düzenleyicisi olarak 40 mg/ml BAP ve 40 mg/ml NAA içeren ortam kullanılmıştır. Transformasyon optimizasyonu için 30 mg/ml karbenisilin veya sefotaksim, 100 mg/ml kanamisin ve 10 mg/ml rifamisin eklenmiştir ve kavun bitkisine gen aktarım metodu aşağıdaki Şekil 3.3 de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Bitki materyaline gen aktarım metodu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Paenibacillus sp'dan klonlanmış 1793 amino asitlik rekombinant DNA fragmanına sahip β -1,3-glukanaz geni; pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitleri kullanılarak elektroporasyon ile kompetant *Agrobacterium tumefaciens*'in AGL1 ve GV3101 suşlarına aktarılmıştır. Meng et al. (2009) yaptığı çalışmada bu amino asit dizisinin analizini (Şekil 4.1), bu kompleks proteinin varsayılan bir glikozit hidrolaz artı S-katmanı homolog (SLH) tekrarları, karbonhidrat bağlama modülü (CBM) tekrarları ve bir pıhtılaşma faktörünün bir analogu dahil çeşitli yardımcı modüller içerdiği şeklinde ortaya çıkarmıştır.



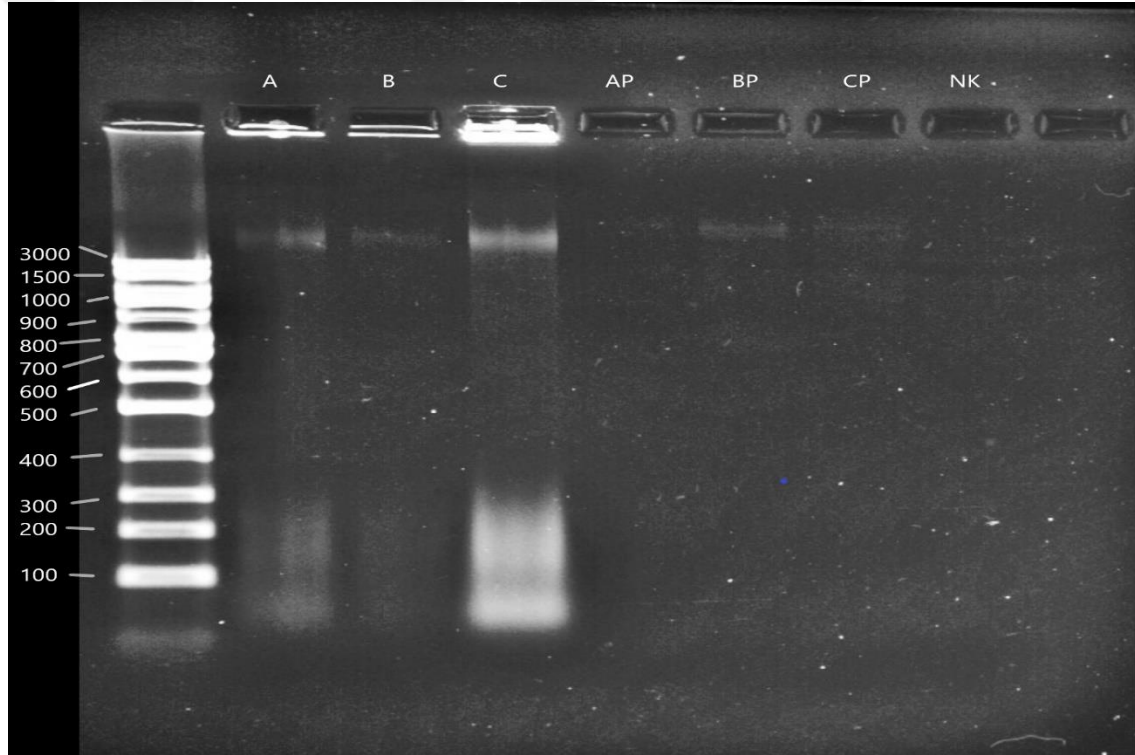
Şekil 4.1 *Paenibacillus sp* dan izole edilen β -1,3-glukanaz geni içeren pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitlerinin şematik çizimleri (Meng et al. 2009)

Tang et al. (2001), pPCV6NFHygGUSINT plazmitini barındıran *A. tumefaciens* GV3101 suşu aracılığıyla, β -glukuronidaz genini başarılı bir şekilde aktarmayı başarmışlardır. Leal et al. (2004), *P. brasiliensis*'in (ATCC-60855) maya fazının pAD1625 vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* (GV3101) ile dönüşümünün başarısını rapor etmişlerdir. Chen et al. (2018) *Dendrobium catenatum* için *A. tumefaciens* aracılı transformasyon sistemini rapor edilmiştir. Üç *A. tumefaciens* suşu, GV3101, LBA4404 ve EHA105, *D. catenatum*'u dönüştürme yetenekleri açısından test edildi. 0.6'lık bir OD₆₀₀'de GV3101 suşu ile enfeksiyonun %56,5'lik en yüksek dönüşüm sıklığını sağladığı bulunmuştur. Fakat çalışmada kullanılan GV3101 suşunun elektroporasyondan sonra

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

besiyeri içerisinde büyümediği gözlemlenmiş ve sonraki aşamalarda bu yüzden kullanılmamıştır.

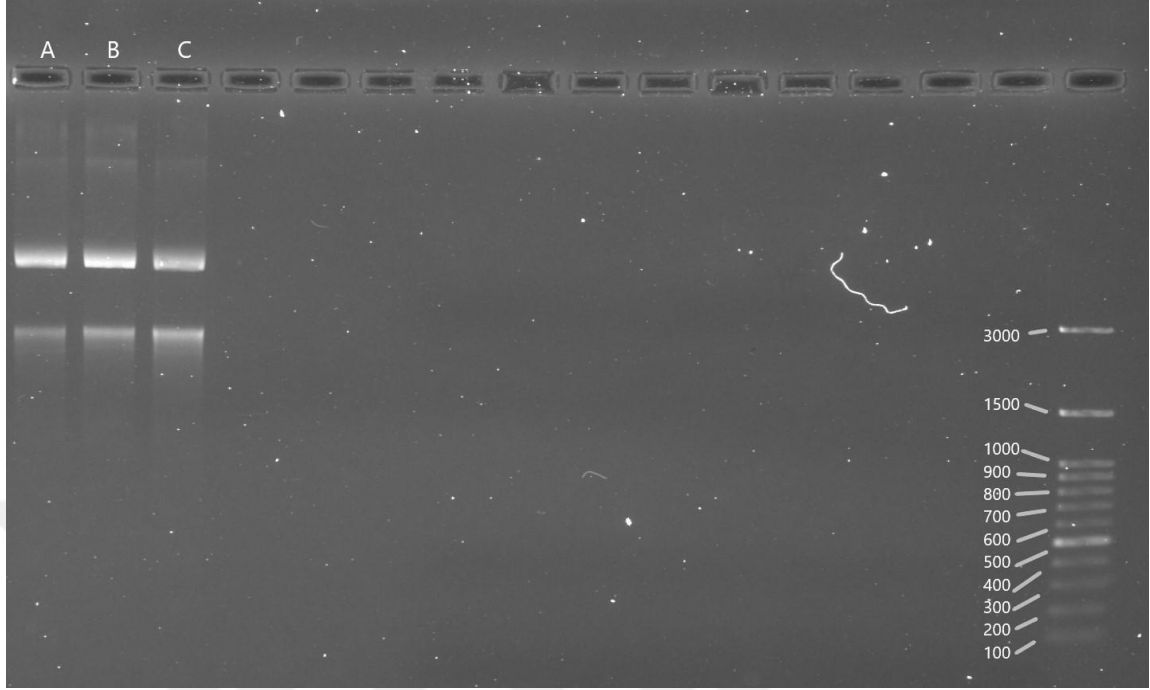
Elektroporasyon sonucu yapılan koloni PCR jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmiştir. A, B, C diye adlandırılan kuyucuklarda tek bir bant görülmektedir. Ayrıca üç kuyucukta bulunan bant aynı konumda yer aldığı için bu üç DNA molekülünün boyut olarak 3000 bp üzerinde ve yaklaşık olarak birbirlerinin aynısı olduğu söylenebilir. Bu da beklenen 1793 amino asitlik rekombinant DNA fragmanına sahip bantı göstermektedir. AP, BP ve CP olarak adlandırılan pozitif kontroller A, B, C kuyucuklarındaki bantlarla yaklaşık aynı hizada çıkması bantların doğruluğunu göstermektedir. NK olarak adlandırılan kuyucuk negatif kontrolü göstermektedir ve bu kuyucukta bant görülmemektedir.



Şekil 4.2 Koloni PCR sonucu elektroforez görüntüsü (A: pKn-glucanase B: pKn-sig-glucanase C: pSiCiKn AP, BP, CP: pozitif kontrol NK: negatif kontrol)(Ladder: Geneaid 100bp)

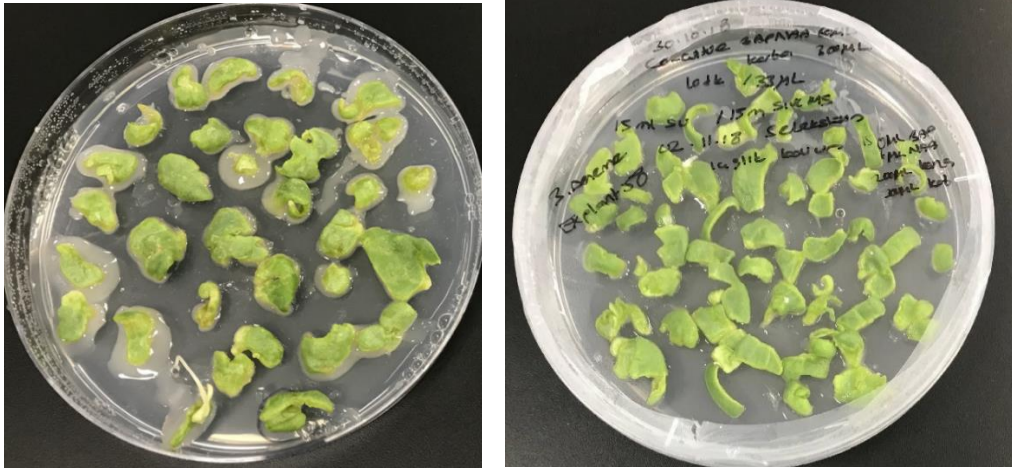
Elektroporasyondan sonra büyütülen bakteriler kontrol amaçlı plazmit izolasyonu yapılmış ve ürünler nanodropla miktarları ölçülüp daha sonra PCR yapılmış, PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezi ile yürütülüp görüntülenmiştir. Şekil 4.4'de görülen A, B, C diye adlandırılan kuyucuklardaki bantlar *A. tumefaciens*'e ve aktarılan plazmitlere ait DNA'yı içermektedir. Ayrıca üç kuyucukta bulunan bant aynı konumda

yer aldığı için bu üç DNA molekülünün boyutları yaklaşık olarak birbirlerinin aynı olduğu söylenebilir.



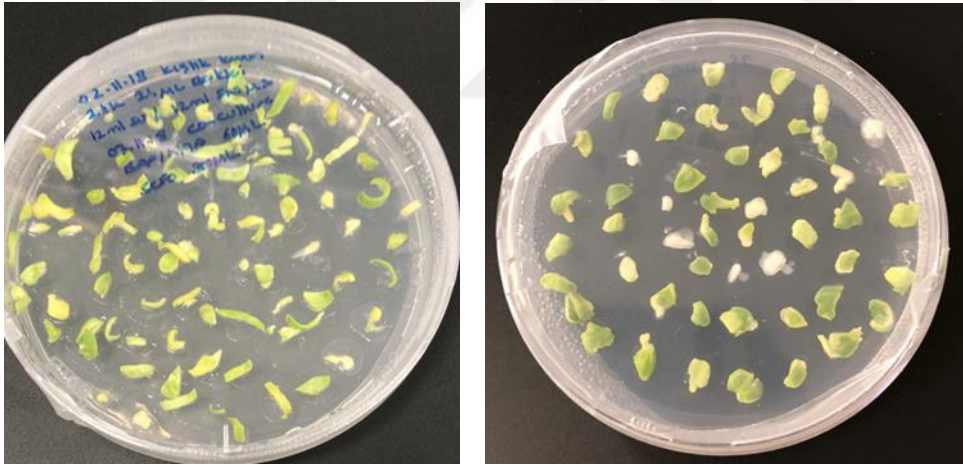
Şekil 4.3 Elektroporasyon sonrası yapılan plazmit izolasyonu PCR sonucu elektroforez görüntüsü (A: pKn-glucanase B: pKn-sig-glucanase C: pSiCiKn) (Ladder: Geneaid 100bp)

Gen aktarımı sonrasında *Cucumis melo* L'nin Kırkağaç, Kış ve Ananas türlerine transformasyonu çalışması yapılmıştır. Transformasyon esnasında ko-kültivasyon çalışmalarında kültür ortamının 5. gününden itibaren hem sefotaksim hem de karbenisilin içeren ortamda aşırı miktarda bakteri büyümesi gözlemlenmiştir. Bu yüzden transformasyon çalışmasında *Agrobacterium*'un aşırı büyümesine karşı farklı antibiyotiklerin farklı dozları uygulanmıştır. Bu yüzden bakteri büyümesini kontrol altına alabilmek için her iki antibiyotik dozu artırılarak (150 mg/ml karbenisilin ve sefotaksim) kültür ortamına eklemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 *Cucumis melo* L'nin çeşitli türlerine transformasyonu için antibiyotik optimizasyonu çalışması

Kültür ortamına 150 mg/ml antibiyotik eklendikten sonra bakteri büyümesini kontrol altına alınmasına rağmen eksplantların rejenerasyon gün açısından gecikmiş ve eksplantlar da küçülme gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 β -1,3-glukanaz gen aktarımı sonrasında *Cucumis melo* L'nin çeşitli türlerine transformasyonun optimizasyon çalışması

Yalçın-mendi vb. (2003) yılında karpuz bitkisinde yaptıkları çalışmada en uygun antibiyotik dozunun 750 mg/ml olduğunu belirlemişlerdir. Bu, çalışmada kullanılan antibiyotik dozunun çok üzerindedir. Bu durum bitki türü farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bezirganoğlu vb. (2013) yılında kavun bitkisine (*Cucumis melo* Silver light) kitinaz geninin aktardıkları çalışmada optimum antibiyotik dozu 200 mg/ml olarak belirlemişlerdir.

Bu transformasyon çalışmasında kullanılan bitki eksplantları içerisinde 150 mg/ml sefotaksim ve 150 mg/ml karbenisilin bulunan ko-kültivasyon ortamı bitkiler için en uygun kültür ortamı olarak belirlenmiŐtir. Kullanılan her iki antibiyotik bakteri gelişimini engellemiŐ fakat karbenisilin içeren ortamın eksplantların büyümesi için daha uygun olduğu gözlemlenmiştir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitleri kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 ve GV3101 suşu içerisinde elektroporasyon ile aktarımı sağlanmaya çalışılan β -1,3-glukanaz ve kanamisine dayanıklılık (*npt II*) genini varlığı PCR analizlerinden önce besiyerinde bakteri büyümesi ile teyit edilmiştir. GV3101 suşu elektroporasyondan sonra besiyeri içerisinde büyümesi göstermediği gözlemlenmiştir.

pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitleri vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* AGL1 suşu gerek antibiyotik içeren gerekse antibiyotik içermeyen LB agar ortamında morfolojik olarak test edilmiş, pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn plazmitleri vektörünü almış olan bakterilerin antibiyotikli LB agar ortamında ürettiği, buna karşılık vektör aktarılmamış olan kontrol grubu LB agar ortamında üremediği gösterilmiştir.

Antibiyotik olarak kullanılan karbenisili, sefotaksime göre besiyerinde bakterileri daha az etkilediği ve tranforme bakterilerin daha çok koloni oluşturduğu morfolojik olarak gözlemlenmiştir.

Morfolojik olarak antibiyotikli LB ortamında ürettiği test edilen *A. tumefaciens* kolonileri β -1,3-glukanaz genine uygun primerler kullanılarak PCR yapılmış ve PCR ürünleri %1' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenmesinde *A. tumefaciens*' in moleküler olarak da aktarılan geni içerdiği tespit edilmiştir.

Morfolojik olarak antibiyotikli LB ortamında ürettiği test edilen *A. tumefaciens* hücrelerinden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra uygun primerler kullanılarak PCR hazırlanmış ve %1' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenmesinde bant görülmemiş, fakat nanodrop ölçümlerinde izolasyon sonucu elde edilen ürün içerisinde plazmit varlığı tespit edilmiştir. Nanodrop ölçümleri sonucu pKn-glucanase, pKn-sig-glucanase, pSiCiKn sırasıyla 39,71; 47,06; 26,04 ng/ μ l değerleri bulunmuştur.

Çalışma sonucu elde edilen tranforme *A. tumefaciens* sonraki çalışmalar için çeşitli hastalıklara hassas bitki türlerine aktarılabilir ve böylece hastalıklara karşı dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Akbaş, B. 2018. Bitki Hastalıklarının Yönetiminde Biyoteknoloji. TÜRKTOB Dergisi 25:30-33
- Akiyama, T., Pillai, M.A., Sentoku, N. 2004. Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3-beta-glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. *Planta* 220:129–139
- Algur, Ö. F. 1992. Temel Biyoteknoloji Ders Notları. Ata. Üni. FEF Biyoloji Bölümü Yayın No: 149, Erzurum.
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell T. P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Jr. 2016. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*. 28(7):1510-20
- Antony, Ceasar S., Ignacimuthu, S. 2012. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. *Biotechnol Lett.*34:995–1002
- Arı, Ş. 2001. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları (Ed. S. Özcan, E. Gürel ve M. Babaoğlu). Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 160-169, Konya
- Arlı Sökmen, M. 2005. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitkiler ve Bitki Koruma Amaçlı Kullanımı, OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(3):105-109
- Aycan, M. 2014. Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuynun ketende (*Linum usitatissimum* L.) sürgün rejenerasyonunu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Barampuram, S. and Zhang, Z. J., 2011. Recent advances in plant transformation. *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols*, 1-35.
- Barker, R. F., Idler, K. B., Thompson D. V., Kemp, J. D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*, 2(6): 335–350

- Beckmann, L., Simon, O., Vahjen, W. 2006. Isolation and identification of mixed linked β -glucan egrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characteriation of respective 1,3-1,4-glucanase activities. J Basic Microbiol. 46 (3): 175-185.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. J Bacteriol. 62(3):293-300.
- Bezirganoğlu, İ. 2017. Genetiđi Değiştirilmiş organizmalar ve Biyogüvenlik, Pegem Akedemi, Ankara
- Bezirganoğlu, İ. 2013. Transgenic lines of melon (Cucumis melo L. Var. Makuwa cv. "Silver Light") expressing antifungal protein and chitinase genes exhibit enhanced resistance to fungal pathogens. Plant Cell Tiss Organ Cult. 112:227-237
- Bhatia, C. R., Viegaz, P., Bhagwat A., Mathews H., Notani N.K. 1986. Genetic transformation of plants. Plant Sciens, 96(2):79-112.
- Bi, Y. M., Cammue, B. P. A., Goodwin, P. H., KrishnaRaj, S., Saxena, P. K. 1999. Resistance to *Botrytis cinerea* in scented geranium transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AMP1. Plant Cell Reports 18: 835–840
- Bolat, İ., Kara, Ö. 2017. Bitki Besin Elementleri: Kaynakları, İşlevleri, Eksik ve Fazlalıkları. Bartın Orman Fakultesi Dergisi. 19(1): 218-228
- Brody, J. R., Kern, S. E. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal Biochem. 333(1):1-13.
- Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M. A., Yang, W., Mayer, J. E., Roa-Rodriguez, C., Jefferson, R. A. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature 433, 629-633.
- Bushnell, W. R., Somers, D. A., Giroux, R.W., Szabo, L. J., and Zeyen, R. J. 1998. Genetic engineering of disease resistance in cereals. Can. J. Plant Pathol. 20: 137–149.
- Caboche, M. 1990. Liposome-mediated transfer of nucleic acids in plant protoplasts. Physiologia Plantarum. 79(1):173-176

- Carstens, M., Vivier, M. A., Pretorius, I. S. 2003, The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1–2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Res* 12:497–508
- Castresana, C., de Carvalho, F., Gheysen, G., Habet, s M., Inze, D., van Montagu, M. 1990. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* β -1,3-glucanase gene. *Plant Cell* 2:1131–1143
- Chang, M., Culley, D., Choi, J. J., Hadwiger, L. A. 2002. *Agrobacterium*-mediated co-transformation of a pea b-1,3-glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science*. 163:83-89
- Chen, J., Wang, L., Chen, J., Huang, J., Liu, F., Guo, R., Yang, L., Grabon, A., Zhao, K., Kong, F., Liu, C., Tian, M. 2018. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the important medicinal plant *Dendrobium catenatum* Lindl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 54:228–239
- Chen, S. C., Liu, A. R., Zou, Z. R. 2006. Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Sci* 5:2134–2140
- Cheong, Y. H., Kim, C. Y., Chun, H. J., Moon, B. C., Park, H. C., Kim, J. K., Lee, S. Y., Cho, M. J. 2000. Molecular cloning of a soybean class III b-1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Sci* 154:71–81
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E. W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis, *Cell*, Vol. 11, No. 2, pp. 263-271.
- Christie, P. J., Gordon, J. E. 2014. The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Microbiol Spectrum*. 2(6): 295-313.
- Crute, I. R., Pink, D. A. C. 1996. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell*, 8: 1747–1755
- Datta, K., Tu, J., Oliva, N., Ona, I., Velazhahan, R., Mew, T. W., Muthukrishnan, S., Datta, S. K. 2001. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive

expression of infection- related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci* 160:405–414

Depicker, A., Herrera-Estrella, L., Montagu, V. M., Schell, J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*. 303:209–213

Evans, C. T., Conrad, D. 1987. An improved method for protoplast formation and its application in the fusion of *Rhodotorula rubra* with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 148:77–82

Ferrer, P. 2006. Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeastlytic β -1,3-glucanases toolbox: a review. *Microb Cell Fact* 17:5– 10

Furth, P. A. 1997. Gene transfer by biolistic process. *Molecular Biotechnology*. 7(2):139-143

Gacto, M., Vicente-Soler, J., Cansado, J., Villa, T. G. 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. *J Appl Microbiol* 88:961–96

Gardner, R. C., Knauf, V. C. 1986. Transfer of *Agrobacterium* DNA to plants requires a T-DNA border not the *vir E* locus. *Science*. 231:725-727

Garfinkel, D. J., Nester, E. W. 1980. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology*. 144(2): 732-743

Gasser, C. S., Fraley, R. T., 1989. Genetically Engineering Plants of Crop Improvement. *Science*, 244:1293-1299.

Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the ‘gene-jockeying’ tool, *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 67(1):16-37.

Girhepuje, P. V., Shinde, G. B. 2011. Transgenic tomato plants expressing a wheat endochitinase gene demonstrate enhanced resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 105:243–251

- Grenier, J., Potvin, C., Asselin, A. 1993. Barley pathogenesis-related proteins with fungal cell wall lytic activity inhibit the growth of yeasts. *Plant Physiol* 103:1277–1283
- Grover, A., Gowthaman, R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr Sci* 84:330–340
- Gökdemir, G. 2017. Tuz Toleransına Sahip Fasülye Genotipinde Tolerans ile İlgili Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi
- Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stöcker, R. H. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*. 14;361(6408):153-6
- Hagiya, M., Close, T. J., Tait, R. C., Kado, C. I. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2669–2673.
- Hammerschmidt, R. 2018. How glyphosate affects plant disease development: it is more than enhanced susceptibility. *Pest Manag Sci*. 74(5):1054-1063.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 5;166(4):557-80.
- Harst, A., Soufi, B., Krug, K., Macek, B. 2015. Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress. *Front Microbiol*. 6:103.
- Hassan, F., Meens, J., Jacobsen, H., Kiesecker, H. 2009. A family 19 chitinase (Chit30) from *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238 expressed in transgenic pea affects the development of *T. harzianum* *in vitro*. *J Biotechnol* 143:302–330
- He, X., Miyasaka, S. C., Fitch, M. M., Moore, P. H., Zhu, Y. J. 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) with a rice chitinase gene for improved tolerance to a fungal pathogen *Sclerotium rolfsii*. *Plant Cell Rep* 27:903–909
- Hellens, R., Mullineaux P., Klee, H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors, *Trends in Plant Science*. 5(10):446-448.

- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 280:309–316
- Henrissat, B., Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293:781–788
- Henrissat, B., Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 1(316 (Pt 2)):695-6.
- Hiei, Y., Ishida, Y., Komari, T. 2014. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci.* 7(5):628
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykas, P. J. J., Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid, *Nature*,303:179-180
- Holst-Jensen, A., 2009. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances.* 27(6):1071-1082
- Hong, T. Y., Meng, M. 2003. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:472–478
- Hooykaas, P. J. J., Snijdwint, FG.M., Schilperoort, R. A. 1982. Identification of the sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other Rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 8(1): 73-82
- Huffman, G. A., White, F. F., Gordon, M. P., Nester, E. W. 1984. Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *J Bacteriol.* 157(1):269-76
- Ignacimuthu, S., Ceasar, S. A. 2012. Development of transgenic finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) resistant to leaf blast disease. *J Biosci.*
doi:10.1007/s12038-011-9178-y
- Islam, A. 2006. Fungus resistant transgenic plants: strategies, progress and lessons learnt. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 16:117–138

- Izgü, F., Altınbay, D., Türeli, A. E. 2007. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to panomyocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Microbiol Immunol* 51:797–803
- Kazan, K. ve Gürel, E. 2001. Hastalıklara dayanıklılığın artırılması. *Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. S.Ü. Vakfı Yayınları. s: 261-287.
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Müller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van den Ende, H., Klis, F. M. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell walldefective mutants. *Mol Microbiol* 35:601–611
- Khan, A., Nasir, İ. A., Tabassum, B., Aaliya, K., Tariq, M., Rao, A. Q. 2016. Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 128:563–576
- Kim, J. K., Duan, X., Wu, R., Seok, S. J., Boston, R. S., Jang, I-C. 1999. Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance bar gene. *Mol Breed* 5:85–94
- Kim, J. K., Jang, I. C., Wu, R., Zuo, W. N., Boston, R. S., Lee, Y. H., Ahn, I. P., Nahm, B. H. 2003. Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res* 12:475–484
- Kishimoto, K., Nishizawa, Y., Tabei, Y., Hibi, T., Nakajima, M., Akutsu K. 2002. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Sci* 162:655–662
- Klis, F. M. 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10:851–869
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh H.J., Ashwell G., Drgonov á J., Kapteyn J.C., Klis F.M., Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall: β (1,6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1,3)- glucan, and chitin. *J Biol Chem* 272:17762–17775

- Krishnamurthy, K. V., Suhasini, K., Sagare, A. P., Meixner, M., de Kather, A., Pickardt, T., Schieder, O. 2002. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum L.*) embryo axes. *Plant Cell Reports* (2000) 19: 235–240
- Kumar, K. K., Poovannan, K., Nandakumar, R., Thamilarasi, K., Geetha, C., Jayashree, N., Kokiladevi, E., Raja, J. A. J., Samiyappan, R., Sudhakar, D., Balasubramanian, P. 2003. A high throughput functional expression assay system for a defense gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Plant Sci* 165:969–976
- Kumlay, A. M., Dursun, A. 2003. Bitki Genetik Mühendisliği ve Ekonomik Öneme Sahip Bazı Bitkilerde Genetik Mühendisliği Uygulamaları. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 34(2):209-216
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, Y., Komari, T. 2007. Current status of binary vectors and super-binary vectors, *Plant Physiology*, Vol. 145, No. 4, pp. 1155-1160.
- Lai, K. S., Abdullah, P., Yusoff, K., Mahmood, M. 2011. An efficient protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Centella asiatica* callus. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33(6):2547-2552
- Lazzeri, P. A., Brettschneider, R., Lührs, R., Lörz, H. 1991. Stable transformation of barley via PEG induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*. 81(4):437-444
- Leal, C. V., Montes, B. A., Mesa, A. C., Rua, A. L., Corredor M., Restrepo, A., McEwen, J. G. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*. 42(4):391–395
- Lee, L. and Gelvin, S. B. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol.* 146(2): 325–332
- Li, H. Y., Zhu, Y. M., Chen, Q., Conner R. L., Ding, X. D., Zhang, B. B. 2004. Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via *Agrobacterium* and particle bombardment. *Biologia Plant* 48:367–374

- Logemann, J., Jach, G., Tommerup, H., Mundy, J., Schell, J. 1992. Expression of a Barley Ribosome-Inactivating Protein Leads to Increased Fungal Protection in Transgenic Tobacco Plants. *Bio/Technology*. 10:305–308
- Low, L. Y., Yang, S. K., Kok, D. X., Andrew, Janna O. A., Tan, N. P., Lai, K. S. 2018. Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method. doi: 10.5772/intechopen.79369
- Macar Kalefetoğlu, T., Macar, O., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K. 2017. Gen Teknolojisi ve Bitkilerde Genetik Transformasyon Yöntemleri, *AKÜ FEMÜBİD* 17: 021004 (377-392)
- Mackintosh, C. A., Garvin, D. F., Radmer, L. E., Heinen, S. J., Muehlbauer, G. J. 2006. A model wheat cultivar for transformation to improve resistance to fusarium head blight. *Plant Cell Rep* 25:313–319
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*, Palme Yayıncılık, Ankara, 989-990
- Melchers, L. S., Stuiver, M. H. 2000. Novel genes for disease resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 147–152.
- Meng, M., Cheng, Y., Hong, Tang-Y., Liu, C. 2009. Cloning and functional characterization of a complex endo- β -1,3-glucanase from *Paenibacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:1051–1061
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J. J., Van den Hondel, C. A. M. J. J., Ram, A. F. J. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics.* 48:1–17
- Mitani, N., Kobayashi, S., Nishizawa, Y., Kuniga, T., Matsumoto, R. 2006. Transformation of trifoliolate orange with rice chitinase gene and the use of the transformed plant as a rootstock. *Sci Hortic* 108:439–441
- Mohaghehpour, N., Dawson, M., Hobbs, P., Judd, A., Winant, R., Dousman, L., Waldeck, N., Hokama, L., Tusé, D., Kos, F. 1995. Glucans as immunological adjuvants. *Adv Exp Med Biol* 383:13–22
- Mohammadi, M., Karr, A. L. 2002. B-1,3-Glucanase and chitinase activities in soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 159:245-256

- Mondal, K. K., Bhattacharya, R. C., Koundal, K. R., Chatterjee, S. C. 2007. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) expressing tomato glucanase leads to arrested growth of *Alternaria brassicae*. *Plant Cell Rep* 26:247–252
- Moravčíková, J., Matušíková, I., Libantová, J., Bauer, M., Mlynárová, L. 2004. Expression of a cucumber class III chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* class I glucanase genes in transgenic potato plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 79:161–168
- Moravčíková, J., Libantová, J., Heldak, J., Salaj, J.M., Matušíková, I., Galova, Z., Mlynárová, L. 2007. Stress-induced expression of cucumber chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* β -1,3- glucanase genes in transgenic potato plants. *Acta Physiol Plant* 29:133–141
- Mozsár, A., Boros, G., Sály, P., Antal, L., Nagy, S. A. 2015. Relationship between Fulton's condition factor and proximate body composition in three freshwater fish species. *J. Appl. Ichthyol.* 31:315–320
- Murai, N., Sutton, D. W., Murray, M. G., Slightom, J. L., Merlo, D. J., Reichert, N. A., Sengupta-Gopalan, C., Stock, C. A., Baker, R. F., Kemp, J. D., Hall, T. C. 1983. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors, *Science*, Vol. 222, No. 4623, pp. 476-482.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473–497.
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol Res* 159:73–81
- Nester, E. W., Kosuge, T. 1981. Plasmid specifying plant hyperplasias, *Ann. Rev. Microbiol.* 35:531-565
- Neuhaus, J.M. 1999. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In *Pathogenesis-related proteins in plants*. Edited by S.K. Datta and S. Muthukrishnan. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 77–105.
- Neuhaus, J.-M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S., and Meins, F., Jr. 1991. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of

- transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.* 16: 141–151.
- Neuhaus, K., Grsic-Rausch, S., Sauerteig, S., Ludwig-Müller, J. 2000. *Arabidopsis* plants transformed with nitrilase 1 or 2 in antisense direction are delayed in clubroot development. *J. Plant Physiol.* 156: 756–761.
- 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. Appl. Genet.* 99: 383–390.
- Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Yoshida, T., Nakajima E, Hibi T (2003) Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene Gns1. *Plant Mol Biol* 51:143–152
- Özcan, S., Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kökem Dergisi.* s:69-95
- Patnaik, D., Khurana, P. 2001. Weath biotechnology: a mini review. *Electron J. Biotechnol.* 4:74-102
- Pischl, D. L., Farrand, S. K. 1984. Characterization of transposon Tn5-facilitated donor strains and development of a chromosomal linkage map for *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 159(1):1-8.
- Raham, S. K., Rinaldi, S., Ikuo, N., Masahiro, M. 2008. Production of transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal infections and herbicide applications. *Plant Biotechnol Rep* 2:13–20
- Rakoczy-Trojanowska, M. 2002. Alternative methods of plant transformation--a short review. *Cell Mol Biol Lett.* 7(3):849-58.
- Rao, S. C., Northup, B. K. 2009. Capabilities of four novel warm-season legumes in the southern Great Plains: grain production and quality. *Crop science*, 49 (3): 1103-1108
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A. M., 2012. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews.* 9(3), 308-345.

- Rohini, V. K., Rao, K. S. 2001. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci* 160:889–898
- Rommens, C. M., Kishor, G. M. 2000. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 120–125.
- Ryan, E. M., Ward, O. P. 1985. Study of the effect of β -1,3-glucanase from basidiomycete QM 806 on yeast extract production. *Biotechnol Lett* 7:409–412
- Safitri, H., Purwoko, B. S., Dewi, I. S., Ardie, S. W. 2016. Morpho-physiological response of rice genotypes grown under saline conditions. *J. ISSAAS.* 22(1): 52-63.
- Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum.* 79(1):206-209
- Selitreffnikoff, C. P. 2001. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):2883-94.
- Shah, D. M. 1997. Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 208–214.
- Shah, D. M., Rommens, C. M. T., Beachy, R. N. 1995. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotechnol.* 13: 362–368.
- Shamim, M., Pandey, P., Singh, A., Yadav, P., Bhowmick, P. K., Srivastava, D., Kumar, D., Khan, N. A., Dwivedi, D. K., Singh K. N. 2013. Role of Biotechnology in Plant Diseases Management: An Overview. *Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation*,1(1):215-221.
- Sheng, J., Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel, *Plant Cell*, Vol. 8, No. 10, pp. 1699-1710.
- Smith, E. F., Townsend, C. O. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science.* 25(643):671- 673.
- Smits, G. J., Van den Ende, H., Klis, F. M. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147:781–794
- Sridevi, G., Parameswari, C., Sabapathi, N., Raghupathy, V., Veluthambi, K. 2008. Combined expression of chitinase and b-1,3-glucanase genes in indica rice

- (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. *Plant Sci.*175:283–290
- Stone, E. F., Stone, D. L., Dipboye, R. L. 1992. Stigmas in organizations: Race, handicaps, and physical unattractiveness. In K. Kelley (Ed.), *Issues, theory, and research in industrial and organizational psychology*: 385-444.
- Swords, K. M. M., Liang, J., Shah, D. M. 1997. Novel approaches to engineering disease resistance in crops. In *Genetic engineering*. Edited by J.K. Setlow. Plenum Press. 19:1–13
- Takakura, Y., Ito, T., Saito, H., Inoue, T., Komari, T., Kuwata, S. 2000. Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 42:883–897
- Takatsu, Y, Nishizawa, Y, Hibi, T, Akutsu, K. 1999. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Sci Hortic* 82:13–123
- Tang, W., Sederoff, R., Whetten, R. 2001. Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta*. 213:981–989
- Terakawa, T., Takaya, N., Horiuchi, H., Koike, M., Takagi, M. 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 16:439–443
- Tobias, D. J., Manoharan, M., Pritsch, C., Dahleen, L. S. 2007. Cobombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv.Conlon). *Plant Cell Rep* 26:631–639
- Tohidfar, M. M., Mohammadi, T., Ghareyazie, B. 2005. *Agrobacterium*- mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 83:83–96
- Tzfira, T., Citovsky V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol*, 121-129

- Tzfira, T., Citovsky, V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17:147–154
- Ünver, T., Khawar, K. M., Parmaksız, İ., Açıık, L. 2000. Tütüne (*Nicotiana tabacum*) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarımında sıcaklığın etkisi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*. (9). 1-2 2000
- Van der Biezen E. A. 2001. Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops. *Trends Plant Sci* 6:89–91
- Van Loon, L. C., Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85–97
- Watanabe, T., Kasahara, N., Aida, K., Tanaka, H. 1992. Three N-terminal domains of β -1,3-glucanase A1 are involved in binding to insoluble β -1,3-glucan. *J Bacteriol* 174:186–190
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M., 1992. *Recombinant DNA*. Scientific American Books, New York, USA
- Wessels, J. G. H., Sietsma, J. H. 1981. *Fungal Cell Walls: A Survey*. *Plant Carbohydrates II* pp 352-394
- Wrobel-Kwiatkowska, M., Lorenc-Kukula, K., Starzycki, M., Oszmian~ski, J., Kępczyn~ska E., Szopa J. 2004. Expression of β -1, 3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi: *Physiol Mol. Plant Pathol* 65:245–256
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C., Shah, D. M. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7(9):1357-68.
- Yadav, M. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,377-386.
- 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

- Yalçın-Mendi, N. Y., İpek, M., Kaçan, H., Cürük, S., Sarı, N., Çetiner, S., Gaba, V. 2003. A Histological analysis of regeneration in watermelon. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*. 12:147-150
- Yi, S. Y., Hwang, B. K. 1997. Purification and antifungal activity of abasic 34 kDa β -1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. *glycines*. *Mol Cells* 7:408– 413
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains, *Journal Molecular Bi-ology*, Vol. 86, No. 1, pp. 117-127.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity,” *EMBO Journal*, Vol. 2, No. 12, pp. 2143-2150.
- Zhang, S., Zhu, L., Li, X., Ahlman, A. and Welander, M. 2005. Infection by *Agrobacterium tumefaciens* increased the resistance of leaf explants to selective agents in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinensis*). *Plant science*, 168:137-142
- Zupan, J. R., Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell, *Plant Physiology*, Vol, 107, No. 4, pp. 1041-10
- Zupan, A., Savrin, R., Erjavec, T., Kralj, A., Karcnik, T., Skorjanc, T., Benko, H., Obreza, P. 1997. Effects of respiratory muscle training and electrical stimulation of abdominal muscles on respiratory capabilities in tetraplegic patients. *Spinal Cord*. 35(8):540-5

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Beyza REİSOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 19.04.1994/ Yenimahalle
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90 545 792 06 48
e-mail : beyzareisoglu@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2020
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Beypazarı Anadolu Öğretmen Lisesi	2012