

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Semiha ÜNLÜ YÜCEER

**PATATES BÖCEĞİ (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'ne DAYANIKLI
BİTKİLER ELDE ETMEK AMACIYLA PATATES (*Solanum tuberosum* L.)'in
GENETİK TRANSFORMASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PATATES BÖCEĞİ (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'ne DAYANIKLI
BİTKİLER ELDE ETMEK AMACIYLA PATATES (*Solanum tuberosum*
L.)'in GENETİK TRANSFORMASYONU**

Semiha ÜNLÜ YÜCEER

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 18/02/2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç.Dr. Mukaddes KAYIM
DANIŞMAN

.....
Prof.Dr. Saadettin BALOĞLU
ÜYE

.....
Prof.Dr.Burhan ARIKAN
ÜYE

.....
Prof.Dr. Halis ARIOĞLU
ÜYE

.....
Doç.Dr. Canan CAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YİĞENGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2007D9

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**PATATES BÖCEĞİ (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)’ne DAYANIKLI
BİTKİLER ELDE ETMEK AMACIYLA PATATES (*Solanum tuberosum* L.)’in
GENETİK TRANSFORMASYONU**

Semiha ÜNLÜ YÜCEER

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman : Doç. Dr. Mukaddes KAYIM
Yıl : 2011, Sayfa:134

Jüri : Doç. Dr. Mukaddes KAYIM
: Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
: Prof. Dr. Burhan ARIKAN
: Prof. Dr. Halis ARIOĞLU
: Doç. Dr. Canan CAN

PCAMBIA1301 ve pGA482GG plazmidlerini içeren *Agrobacterium tumefaciens*’in EHA101 izolatları, iki patates çeşidinin genetik transformasyonunda kullanılmıştır. *Hpt* ve *Cry* 1A(c) genlerini taşıyan pCAMBIA1301 plazmidi higromisin B antibiyotiğine ve bazı böceklere karşı dayanıklılık sağlamaktadır. *NptII* ve *Gus* genlerini taşıyan pGA482GG plazmidi sırasıyla kanamisin antibiyotiğine dayanıklılık ve transformatlara görünebilirlik sağlamaktadır. Genetik transformasyon çalışması “Marfona” ve “Granola” patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerinin yaprak ve internodium doku parçalarında yapılmıştır. *Npt* II ve *GUS* genlerini içeren transgenik patates bitkileri 50 mg/l kanamisin, *Cry* 1A(c) genini içeren transgenik sürgünler ise 10 mg/l higromisin B içeren L ortamında sırasıyla selekte edilmiştir. β -glukuronidaz aktivitesi histokimyasal GUS analizi ile *Npt* II geni içeren bitkilerde saptanmıştır. GUS pozitif sonuç veren bitkilerden 10 tanesinde *GUS* geni için PCR yapıldığında, 9 örnek gene spesifik 660 bp DNA bandı oluştururken, *Npt* II geninin test edildiği 10 bitkinin PCR analizinde ise 7 tanesi pozitif sonuç vermiştir. Higromisin B antibiyotiğine dayanıklı olarak seçilen toplam 55 adet patates bitkisinden 35 adedinin kesin olarak *Hpt* genini içerdiği PCR analizi ile çoğaltılan spesifik 700 bp DNA fragmenti ile saptanmıştır. “Marfona” patates çeşidinde ait 5 adet transgenik yumrulara *Hpt* genin varlığı da PCR analizi ile gösterilmiştir. *Hpt* geni içeren transgenik “Marfona” ve “Granola” patates çeşitleri Patates Böceği ile biyolojik olarak testlenmiştir. Yapılan Biyolojik testlemede transgenik “Marfona” ve “Granola” bitkileri üzerinde beslenen patates böceği larvalarında % 80-85 oranında ölüm meydana geldiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik Test, *Cry* IA(c), Genetik Transformasyon, Patates Böceği, PCR

ABSTRACT

PhD THESIS

**GENETIC TRANSFORMATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) TO
PRODUCE RESISTANT PLANTS FOR POTATO BEETLE (*Leptinotarsa
decemlineata* Say.)**

Semiha ÜNLÜ YÜCEER

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Assoc. Prof. Mukaddes KAYIM

Year : 2011, Pages:134

Contributors : Assoc. Prof. Mukaddes KAYIM

: Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

: Prof. Dr. Burhan ARIKAN

: Prof. Dr. Halis ARIOĞLU

: Assoc. Prof. Canan CAN

Two different EHA 101 isolates of *Agrobacterium tumefaciens* harbouring pCAMBIA1301 and PGA482GG plasmids were used for the genetic transformation of two potato varieties. The plasmid, pCAMBIA 1301 carrying *Hpt* gene provides resistance to antibiotic of hygromycin B, and *Cry* 1A(c) gene provides resistance to some insects. The plasmid, pGA482GG carrying *Npt* II provides resistance to antibiotic of kanamycin and *GUS* provides visible transformants. Genetic transformation was conducted on leaf and tissue fragments of Marfona and Granola Potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. The transgenic potato plants containing *Npt* II and *GUS* genes in 50 mg/l kanamycin and transgenic outgrowth containing *Cry* 1A(c) gene in 10 mg/l hygromycin B, were selected in L medium. β -glucuronidase activity in plants containing *Npt* II and *GUS* genes were determined by the analysis of histochemical GUS assay. The PCR process conducted on ten plant with GUS positive resulted in nine plant samples generating specific 660 bp DNA band. The PCR process for *Npt* II gene resulted in seven positives out of eleven samples. Thirty-five plants out of fifty-five plants resistant to hygromycin B antibiotic, were determined by specific 700 bp DNA fragment reproduced with PCR analysis to have *Hpt* gene. In the five transgenic microtubers of Marfona variety was also determined to have *Hpt* gene. Transgenic Marfona and Granola potato varieties having *Hpt* gene were biologically tested with potato beetles. Testing showed that % 80-85 of larvae of potato beetles lived on transgenic Marfona and Granola varieties died.

Key words: Biological Test, *Cry* IA(c), Genetic Transformation, Potato Beetle, PCR

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda plazmid gen kaynağını sağlayan ve doktora çalışmamın tamamlanmasında her türlü destekte bulunan ve tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mukaddes KAYIM'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme sırasındaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ve Prof. Dr. Burhan ARIKAN 'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında tezimin biyolojik analiz aşamasında bilgilerinden ve her türlü laboratuvar ekipmanlarından faydalandığım Bölümümüz Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serdar SATAR'a, moleküler analiz çalışmalarımda laboratuvarın imkanını sunan Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a teşekkür ederim. Tez çalışması denemelerimde özellikle biyolojik analiz için gerekli olan böceklerden Patates Böceği (*L. decemlineata*)'nın tarla koşullarında toplanmasında her türlü desteği aldığım ve beni manevi olarak da yüreklendiren değerli ağabeyim ve aynı zamanda Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü Öğretim Üyesi olan Doç.Dr. Mustafa ÜNLÜ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında benden yardımlarını esirgemeyen Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü deneme alanlarında görevli personellere teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca sabır ve özveriyle beni her açıdan destekleyen ve yanımda olan sevgili eşim Ömer YÜCEER'e ve aileme sonsuz teşekkür eder, en içten şükranlarımı sunarım.

Bunlara ek olarak projenin yürütülmesinde maddi destek sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
EKLER.....	XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Patates Bitkisinde (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Doku Kültürü İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	5
2.2. <i>Agrobacterium</i> Aracılığı ile <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry Genlerinin Patates Bitkisine (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Aktarılması, Moleküler ve Biyolojik Analizler ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	15
3. MATERYAL VE METOD.....	37
3.1 Materyal	37
3.1.1. Kimyasallar.....	37
3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyali.....	37
3.1.3.Gen Transferinde Kullanılan Plazmid ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> İzolatları.....	37
3.2. Metod.....	39
3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....	39

3.2.2. Patates Bitkisi Yumrularının <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Vivo</i> Koşullarında Kültüre Alınması ve Bitkilerin Elde Edilmesi.....	39
3.2.3. Transformasyonda Kullanılan Bitki Doku Parçaları ve Ortamların Belirlenmesi.....	40
3.2.4. <i>A. tumefaciens</i> İzolatlarının Kültürü.....	41
3.2.5. Transformasyonda Kullanılan Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması.....	41
3.2.6. Bitki Doku Parçalarının <i>A. tumefaciens</i> ile Transformasyonu	42
3.2.7. Transgenik Bitkilerin Regenere Edilmesi.....	42
3.3 Transgenik Bitkilerde <i>İn Vitro</i> Mikro Yumru Oluşumu.....	43
3.4. <i>GUS</i> Geni Ekspresyon Analizi.....	44
3.4.1. Histokimyasal <i>GUS</i> Analizi.....	44
3.4.1.1. Örneklerin Hazırlanması	44
3.4.1.2. <i>GUS</i> Analizi.....	44
3.5. Regenere Edilen Bitkilerin Köklendirilmesi.....	44
3.6. Köklenen Bitkilerin Toprağa Aktarılması ve Adaptasyonları.....	44
3.7. Transgenik Olduğu Varsayılan Bitkilerin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi.....	45
3.7.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	45
3.7.2. PCR Analizleri.....	46
3.7.3. Agaroz Jel Elektforezi.....	47

3.8. Transgenik Patates Bitkilerinin Biyolojik Olarak Testlenmesi....	48
3.8.1. Patates Böceği Üretimi.....	48
3.8.2. Transgenik Bitkilerde Biyolojik Testleme.....	50
3.9. Transgenik Bitkilerden Elde Edilen Vejetatif Yumruların Testlenmesi.....	52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
4.1 Araştırmada Kullanılan Bitki Materyalinin Belirlenmesi.....	53
4.2. Bitki Regenerasyon Ortamlarının ve Transformasyon İçin Eksplant Örneğinin Belirlenmesi	59
4.3. Rejenere Olan Bitkilerin Köklendirme Ortamının Belirlenmesi.....	66
4.4. <i>A. tumefaciens</i> ile Patates Eksplantlarının Transformasyonu.....	67
4.5. Transgenik Bitkilerde <i>In Vitro</i> Mikro Yumru Oluşumu.....	75
4.6. Histokimyasal GUS Analizi.....	78
4.7. Transgenik Bitkilerin Köklendirilmesi ve Doğal Koşullara Adaptasyonları.....	80
4.8. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR Analizi ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	86
4.8.1. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde <i>Npt II</i> Geninin PCR Analizi.....	87
4.8.2. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde <i>GUS</i> Geninin PCR Analizi.....	88
4.8.3. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde Higromisin Dayanıklılık Geninin (<i>Hpt</i>) PCR Analizi.....	89

4.8.4. Transgenik Bitkilerden Elde Edilen Vejetatif Yumruların Higromisin Dayanıklılık Geni İçin PCR Analizi.....	94
4.9. Transgenik Patates Bitkilerinin Biyolojik Olarak Testlenmesi.....	94
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	125
EKLER.....	126

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 4.1. Yüzey Sterilizasyonu Amacıyla Kullanılan Ticari Sodyum Hipokloritin Farklı Konsantrasyonlarının ve Sürelerinin “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerine Ait Patates Eksplantlarının Canlılığı ve Bulaşıklık Oranı Üzerine Etkileri.....	55
Çizelge 4.2. MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” ve “Granola” Patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Çeşitlerinin Kültüre Alınan Bitki Eksplantlarında Kallus Oluşumu ve Sürgün Rejenerasyonunda Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Etkisi.....	62
Çizelge 4.3. Patatesin Internodium (Gövde) Doku Parçasının Rejenerasyon Esnasında Kullanılan Farklı Ortamların Tesadüf Parselleri Deneme Desenine Göre Yapılan İstatistikî Analiz Tablosu ve DUNCAN testinde % 5’lik Önem Aşamasına Göre Değerlendirilmesi	63
Çizelge 4.4. <i>A. tumefaciens</i> ’in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA 101 İzolatı İle Transforme Edilen Internodium ve Yaprak Eksplantlarında Transformasyon Sıklığı	69
Çizelge 4.5. Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarının “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerinde Mikro Yumru Sayısı ve Ağırlık Üzerine Etkisi İle İlişkin Varyans Analizi.....	77
Çizelge 4.6. Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarının Marfona ve Granola Çeşitlerinde Bitkicik Başına Mikro Yumru Sayısı ve Mikro Yumru Ağırlığına Ait Tekerrür Ortamaları ve DUNCAN Testi.....	77

Çizelge 4.7. Transgenik “Marfona” ve “Granola” Çeşidi Üzerinde 4 Gün Boyunca Beslenen Patates Böceği (<i>L. decemlineata</i> Say.) Larvalarının Ağırlıklarında Gözlenen Farklılaşma	100
Çizelge 4.8. Transgenik Patetes Bitkilerinde 4 Gün Süre İle Beslenen Patetes Böceğinin Günlük Ağırlıklarına Ait Varyans Analiz Değerleri	100
Çizelge 4.9. Transgenik “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerinde Biyolojik Testleme Esnasında Patates Böceğinde Gözlenen Ölüm Ve Gelişim Oranları.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 3.1 Bitki Transformasyonda Kullanılan pGA482GG Plazmidin de Bulunan Markör Genlerin Şeması	38
Şekil 3.2. Bitki Transformasyonunda Kullanılan pCAMBIA 1301 Plazmidinin Haritası.....	38
Şekil 3.3. Biyolojik Testlemede Kullanılan Böcek Kafesleri.....	48
Şekil 3.4. Biyolojik Testleme Amacıyla Kontrollü Koşullarda Böcek Kafesleri İçerisinde Üretimi Yapılan Kontrol Patates Bitkisi (A) Patates Böceği (<i>L. decemlineata</i> Say.) ve Yumurta Paketi (Anonim 2009)(B).....	49
Şekil 3.5. Saksıda Yetiştirilen <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren Transgenik “Marfona”(A) ve “Granola”(B) Patates Çeşitleri ile Kontrol Bitkilerin Yaprakları Üzerinde Beslenen Patates Böceği (<i>L.</i> <i>decemlineata</i> Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar.....	51
Şekil 4.1. <i>In Vivo</i> Koşullarda “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Patates Çeşitlerin Yumrularından Geliştirilmiş Patates (<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> L.) Bitkileri.....	54
Şekil 4.2. <i>In vivo</i> Koşullarda Yetiştirilen “Marfona” ve “Granola” Bitkilerinin Sürgün Uçları ve Internodium Parçalarının <i>In</i> <i>Vitro</i> Koşullarda % 2 Sakkaroz ve % 0.2 Fitojel İçeren Katı MS Ortamı Üzerinde Cam Deney Tüpleri İçerisinde Kültüre Alınması (A: “Marfona”),(B: “Granola”).....	57
Şekil 4.3. <i>In vivo</i> Koşullarda Kültüre Alınan Eksplantlardan Transformasyonda Kullanmak Üzere Cam Deney Tüplerinde % 2 Sakkaroz ve % 0.2 Fitojel İçeren Katı MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Patates Bitkilerinin Gelişimleri (A: “Marfona”),(B:”Granola”).....	58

Şekil 4.4. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonları İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Patates Yaprak Doku Parçalarında Rejenerasyon Çalışmaları.....	60
Şekil 4.5. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren Ortamlar Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” ve “Granola” Patates Çeşidi Yaprak (A) ve Internodium (gövde) (B) Doku Parçalarında Organogenesis ve Sürgün Rejenerasyonu.....	60
Şekil 4.6. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren Ortamlar Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” (Sol taraf) ve “Granola” (Sağ taraf) Patates Çeşidi Internodium Doku Parçalarından Sürgün Gelişimi (Oklarla Gösterilmiştir).....	61
Şekil 4.7. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonları İçeren Katı MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” Patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Çeşidinin Gelişimi.....	61
Şekil 4.8. <i>In Vitro</i> Koşullarda “Marfona” ve “Granola” Patates Çeşidi Internodiumlarından Gelişen Sürgünlerin Köklendirilmesinde NAA ve IBA’ın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi.....	67
Şekil 4.9. Patatesin “Marfona” Çeşidinde Internodium Eksplantlarının pGA482GG Plazmidini İçeren <i>A. tumefaciens</i> ’in EHA 101 İzolatı İle Transformasyonu Sonucu 300 mg/l Cb ve 50 mg/l Km içeren L Seçici Ortam Üzerinde Gelişen Tahmini Transgenik Bitkicikler (A), Aynı Ortam Üzerinde Kültüre Alınan Transformasyondan 2 Hafta Sonra Gelişen Tahmini Transgenik Bitkiler (B).....	68
Şekil 4.10. <i>In Vitro</i> Koşullarda Transformasyondan 5 Hafta Sonra 300 mg/l Cb ve 50 mg/l Km İçeren Seçici L Ortamında Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” Bitkileri	69

Şekil 4.11. <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren <i>A. tumefaciens</i> ile Patates Bitkisinin “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Çeşitlerinde Transformasyon Yapılarak 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından 15 Gün Sonra Gelişen Tahmini Transgenik Patates Sürgünleri.....	70
Şekil 4.12. <i>Cry</i> 1A(c) Genini Taşıyan <i>A. tumefaciens</i> ile Transformasyon Sonucunda 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” ve “Granola” Patates Sürgünleri.....	70
Şekil 4. 13. <i>Cry</i> 1A(c) Genini Taşıyan <i>A. tumefaciens</i> ile Transformasyon Sonucunda 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından 10 Gün Sonra Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” (C) ve “Granola” (A, D) Sürgünleri ve Transforme Edilmemiş Patates İnternodium Eksplantları (Kontrol:B)	71
Şekil 4.14. Transformasyondan Yaklaşık 2-3 Hafta Sonra 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Dokulardan Gelişen Tahmini “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Transgenik Sürgünleri (oklar ile gösterilmiştir).....	72
Şekil 4.15. <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren <i>A. tumefaciens</i> 'in EHA101 İzolatı İle Transforme Edilen “Granola” Patates Çeşidinden Tahmini Transgenik Bitkilerin Seçici L Ortamında Gelişimleri.....	73
Şekil 4.16. <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren <i>A. tumefaciens</i> 'in EHA101 İzolatı İle Transforme Edilen “Marfona” Patates Çeşidinden Tahmini Transgenik Bitkilerin Seçici L Ortamında Gelişimleri.....	73

Şekil 4.17. <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren <i>A. tumefaciens</i> 'in EHA101 İzolatı İle Transfome Edilen “Granola” Patates Çeşidinden Tahmini Transgenik Bitkilerin Seçici L Ortamında Gelişimleri.....	74
Şekil 4.18. Selekte Edici L Ortamı (10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb) İçeren Cam Deney Tüplerinde Kültüre Alınan Transgenik “Marfona” ve “Granola” Patates Bitkilerinde Gelişen Mikro Yumrular.....	74
Şekil 4.19. Cam Deney Tüplerinde % 90 Sakkaroz İçeren İnternodiumlardan MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Granola” Patates Çeşidi Mikro Yumru Gelişimi.....	76
Şekil 4.20. Karanlık Koşullarda Farklı Sakkaroz Konsantrasyonları İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” Patates Çeşidi İnternodiumlardan Mikro Yumru Gelişimi	76
Şekil 4.21. Transformasyondan 2 Gün Sonra (A) ve 4 Hafta Sonra (B) Patatesin İnternodium Doku Parçalarına ve Yaprak Eksplantlarına Uygulanan Histokimyasal GUS Analizi Sonucu Gözlenen Mavi Renk Oluşumu.....	79
Şekil 4.22. 10 mg/l Hg ve 1mg/l NAA İçeren MS Ortamlarında Kültüre Alınan Transgenik “Marfona” ve “Granola” Patates Çeşitlerinde Kök Gelişimleri.....	81
Şekil 4.23. <i>Cry</i> 1A(c) Genini Taşıyan pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren <i>A. tumefaciens</i> 'in EHA101 İzolatı İle Transformasyonundan 3 Ay Sonra Köklenmiş Transgenik “Marfona” ve “Granola” Bitkilerin Toprak Koşullarına Adaptasyonu.....	82
Şekil 4.24. Transformasyondan 4 Ay Sonra Toprağa Adaptasyonları Sağlanmış <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren Transgenik “Marfona” Patates Çeşitleri	83

Şekil 4.25. Transformasyondan 4 Ay Sonra Toprağa Adaptasyonları Sağlanmış <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren Transgenik “Granola” Patates Çeşitleri	84
Şekil 4.26. Transformasyondan 5 Ay Sonra Kontrollü Klima Odasında Yetiştirilen Transgenik “Granola” Çeşidi Patates Bitkileri (A); Transformasyondan 3 Ay Sonra Sera Koşullarında Çiçeklenmesi Tamamlanmış Transgenik Patates Bitkileri (B).....	85
Şekil 4.27. Transgenik “Marfona” Patates Çeşidinden İzole Edilen DNA Örnekleri.....	86
Şekil 4.28. Transgenik “Granola” Patates Çeşidinden İzole Edilen DNA Örnekleri.....	86
Şekil 4.29. “Marfona” (T1, T2, T3, T9, T10) ve “Granola” (T4, T5, T6, T7,T8) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde <i>Npt</i> II Geni İçin PCR Analizi; M; 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10; Transgenik Bitkiler, P; <i>A. tumefaciens</i> ’ in pGA482GG Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi	88
Şekil 4.30. “Marfona” (T1, T2, T3, T9, T10) ve “Granola” (T4, T5, T6, T7, T8) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde <i>GUS</i> Geni İçin PCR Analizi; M; 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10; Transgenik Bitki, P; <i>A. tumefaciens</i> ’ in pGA482GG Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi.....	89

- Şekil 4.31. “Marfona” (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10) ve “Granola” (T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Htp* İçin PCR Analizi; M; 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19; Transgenik Bitkiler, P; *A. tumefaciens*’ in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi..... 91
- Şekil 4.32. “Marfona” (T20, T21, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29) ve “Granola” (T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38, T39, T40) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Htp* İçin PCR Analiz Sonucu, M; 100bp DNA Ladder Plus, T20, T21, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38, T39, T40; Transgenik Bitki, P; *A. tumefaciens*’ in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi..... 92
- Şekil 4.33. “Marfona” (T41, T42, T43, T44, T45, T46, T47) ve “Granola” (T48, T49, T50, T51, T52, T53, T54, T55) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Htp* İçin PCR Analizi, M; 100bp DNA Ladder Plus, T41, T41, T43, T44, T45, T46, T47, T48, T49, T50, T51, T52, T53, T54, T55; Transgenik Bitki, P; *A. tumefaciens*’ in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi..... 93
- Şekil 4.34. “Marfona” Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerin Yumrularının *Htp* İçin PCR Analizi; T1, T2, T3, T4, T5; Transgenik Yumur, P; *A. tumefaciens*’ in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 Irkı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi..... 94

Şekil 4.35. Biyolojik Testleme İçin Sera Koşullarında Böcek Kafesleri İçerisinde Deneme İçin Seçilen Patates Yaprakları İle Beslenen 3. ve 4. Dönem Patates Böceği (<i>L. decemlineata</i> Say.) Larvaları	96
Şekil 4.36. <i>Cry</i> 1A(c) Genini İçeren Transgenik “Marfona” (Üstten ilk sıra) ve “Granola” (Üstten ikinci sıra) Patates Çeşidi ve Kontrol Bitkilerin Yaprakları (Üstten üçüncü sıra) Üzerinde Beslenen Patates Böceği (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar.....	97
Şekil 4.37. Transgenik “Marfona” (A), “Granola” (B) Patates Çeşidi (solda) ve Kontrol (sağda) Bitkilerin Yaprakları Üzerinde Karakteristik Beslenen Patates Böceği (<i>L. decemlineata</i> Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar.....	102
Şekil 4.38. Transgenik “Granola” Patates Çeşidi Bitkilerin Yaprakları Üzerinde Beslenen Patates Böceği (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say) Erginlerinin Uzak (A) Ve Yakından (B) Görüntüleri.....	103

EKLER**SAYFA**

Ek 1.	Patatesin kültüre alındığı bazal MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamının içeriği.....	126
Ek 2.	Bakteri kültürlerinde kullanılan antibiyotikler, bu antibiyotiklerin çözüldüğü maddeler, stok solüsyonları ve kullanma konsantrasyonları.....	127
Ek 3.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ' in geliştirilmesinde kullanılan YEP ortamı.....	127
Ek 4.	Bakteri süspansiyonunda kullanılan transformasyon solüsyonu.....	128
Ek 5.	Asetosiringone (As) ve Betain hazırlanması.....	128
Ek 6.	Patatesin internodium doku parçalarından bitki regenerasyonu için belirlenen ortam.....	129
Ek 7.	Patatesin yaprak doku parçalarının gelişimleri için belirlenen ortam.....	130
Ek 8.	Histokimyasal GUS analizinde kullanılan X-Gluk analiz bafırı (X-Gluc).....	131
Ek 9.	Histokimyasal GUS analizinde kullanılan sodyum fosfat buffer.....	131
Ek 10.	Moleküler Analiz Testlerinde Kullanılan Ortamlar ve Stok Solüsyonlarının İçerikleri.....	131
Ek 11.	TAE Bafır.....	132
Ek 12.	Loading bafırı.....	133
Ek 13.	EtBr.' ün hazırlanması.....	133
Ek 14.	Transgenik "Marfona" ve "Granola" Çeşidi Üzerinde 4 Gün Boyunca Beslenen 3. ve 4. Dönem Patates Böceği Larvaların Ağırlıklarında Gözlenen Farklılaşma.....	133

SİMGELER VE KISALTMALAR

AHAS	: Aseto hidroksi asid (Acetohydroxyacid synthase)
As	: Asetosiringon (Asetosyringone)
BAP	: 6-Benzil amino pürin (6-Benzylaminopurine)
bp	: Baz çifti (Base pair)
CaMV	: Karnabahar Mozaik Virüsü (Cauliflower Mosaic Virus)
Cb	: Karbenisilin (Carbenicillin)
Cf	: Sefotaksim (Cefotaxime)
ddH ₂ O	: Bidestile su
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELİSA	: ELİSA testi (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EtOH	: Etil Alkol (Ethyl Alcohol)
GA ₃	: Giberellik asit (Gibberellic acid)
GUS	: β -glukurinidaz (β -glucuronidase)
Hg	: Higromisin (Hygromycin B)
IAA	: İndol Asetik Asit (İndole-3-acetic acid)
IBA	: İndol bütirik asit (İndole-3-butyric acid)
Km	: Kanamisin (Kanamycin)
LS	: Linsmaier ve Skoog
ml	: Mililitre
MS	: Murashige ve Skoog
NAA	: Naftalin asetik asit (Naphthalene acetic acid)
NaOCl	: Sodyumhipoklorit (Sodium hypochlorite)
NP	: Nopalin sentez promotörü ()
NT	: Nopalin sentez terminatörü ()
NPT II	: Neomisin-fosfotransferaz II ()

PLVVR	:	Patates Yaprak Kıvrıklığı Virüsü
PXV	:	Patates X Virüsü
PVY	:	Patates Y Virüsü
PSTV	:	Patates İğ Yumru viroidi
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
rpm	:	Dakikada dönüş sayısı
STS	:	Gümüş thiosulfat
TAE	:	Tris Asetat- EDTA (Tris-Acetate-EDTA)
TE	:	Tris-EDTA
Tween-20	:	Polioksietilen Sorbitan monolurat (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate)
X-Gluc	:	5-Brom-4-klor-3-indolil- β -D-glukurinid (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl- β -D-glucuronide)
μ M	:	Mikromolar
μ l	:	Mikrolitre

1.GİRİŞ

Ülkemiz tarımı ve ekonomisi açısından önemli bir konuma sahip olan patates, anavatanı Güney Amerika olan bir kültür bitkisidir. Ülkemizde geniş alanlarda tarımı yapılan bu kültür bitkisinin ihracatımızda da önemli bir payı vardır. Yumruları, % 20-30 civarında nişasta, % 2 civarında protein, B₁, B₂ ve C vitaminleri ile bazı mineral maddeler içermektedir. Bu özellikleri nedeniyle gerek endüstri ham maddesi ve gerekse de insan beslenmesindeki kullanımı açısından tahıllardan sonra gelen önemli bir kültür bitkisidir (Alisdair ve ark. 2001).

Patates ucuzluğu, birim alandan fazla verim sağlanması, besin değerinin yüksek olması, farklı şekillerde kullanılması ve her çeşit iklimde yetiştiriciliğinin yapılmasından dolayı, bugün ülkemizin de hemen her bölgesinde yetiştirilmektedir. Doğu Anadolu ve özellikle İç Anadolu Bölgesi'nde önemli bir geçim kaynağıdır. Akdeniz Bölgesi'nde ise turfanda yetiştiricilik yapılmakta olup, bu nedenle yüksek gelir getiren bir sebze özelliğine sahiptir. Üretimi yapılan diğer patatesler hem iç piyasada tüketilmekte hem de başta Ortadoğu ülkeleri olmak üzere birçok yere ihraç edilmektedir. Ülkemizde patatesin toplam ekim alanı 1 426 843 dekar, toplam patates üretimi 4 397 711 ton, verim ise 3082.1 kg/da'dır (FAO 2009). Adana ilinde ise patates 38 630 dekar alanda ekimi yapılmakta ve ortalama verimde 3 795 kg/da olarak gerçekleşmektedir (TÜİK 2008). Bu verilere dayanarak ülkemiz, dünya ölçeğinde, üretim alanında sekizinci, üretim miktarında on birinci ve dekara verimlilikte ise yedinci sırada yer almaktadır (Anonim 2002).

Geniş alanlara ekimi yapılan, ihracatımızda önemli bir yere sahip olan patatete birçok hastalık ve zararlı üretimde önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Patatete, Patates Y virüsü, Yaprak Kıvrıcılık virüsü gibi viral; Patates Mildiyösü (*Phytophthora infestans*), Patates Kanseri (*Synchytrium endobioticum*), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, gibi fungal; Bakteriyel solgunluk (*Pseudomonas solanacearum*), Yumuşak Çürüklük [*Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (Jones)] gibi bakteriyel hastalıklar başlıca ve önemli ölçüde ürün kayıplarına neden olan hastalık etmenleridir (Anonim 2009).

Yukarıda kısaca belirtilen hastalık etmenlerinin yanı sıra birçok zararlı ekolojik koşullara bağlı olarak patatesten ürün kayıplarına neden olabilmektedir. Bu zararlılar arasında en önemlilerden birisi de Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'dir (Anonim 2009). Bu böceğin ergin ve larvaları bitkinin yapraklarını genellikle dıştan içe doğru veya, yaprakta bir delik açarak, bu deliği genişleterek yemek suretiyle, ileri aşamalarda ise çiçeklerle de beslenerek patates de zarar oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar da bu zararlının patatesten % 70-80'lere varan ürün kayıplarına neden olduğu belirlenmiştir (Oerke ve ark. 1994). Patates böceğinin beslenerek doğrudan yaptığı zararın yanı sıra patatesten Kahverengi Çürüklük, İğ Yumru Viroidi ve Patates Halkalı Çürüklüğü Hastalıkları'nın yayılmasında taşıyıcı olarak da zarar yapmaktadır. Bu zararlıya karşı kimyasal mücadele yöntemleri içerisinde, Endosülfan, Chlorpyrifos, Azinphos Methyl ve Deltamethrin gibi etkili maddeleri içeren insektisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bu kimyasallar sonucunda Patates Böceği'nde ilaçlara karşı dayanıklılık gelişmesi gibi problemler ile karşılaşmaktadır. Ayrıca kullanılan bu insektisitler sadece üretim maliyetini arttırmakla kalmayıp, insan, çevre ve doğal düşmanlar üzerinde de oldukça fazla olumsuz etkiler yapmaktadır (Anonim 2009).

Karşılaşılan bu sorunlardan dolayı kimyasal mücadeleye alternatif, zararlılara toleran veya dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Yüksek verimli hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genel olarak klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Klasik bitki ıslahı yöntemlerinden olan melezleme ve seleksiyon teknikleriyle sonuca ulaşmak oldukça yavaş olmakta; özellikle çok yıllık bitkilerde ıslah çalışmalarının tamamlanması yıllar sürebilmektedir. Sonuç olarak klasik bitki ıslahı yöntemleri ile başta dayanıklılık olmak üzere bitkilerin tarımsal özelliklerini iyileştirmede çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bunların başında, aktarılması istenilen genle birlikte istenmeyen genlerin de geçmesi, uyumsuzluk nedeniyle türler arasında gen değişiminin sınırlı kalması, türler yada cinsler arası melezlemelerde çeşitli bitkisel gen kaynaklarından geri melezleme yöntemleriyle gen aktarılması esasına dayanan bu yöntemler, uzun zaman ve emeğe ihtiyaç göstermektedir. Patates bitkisinin anfidiploid bir bitki oluşu, sterilite ve Patates Böceğine dayanıklı patates çeşitlerinin olmayışı gibi nedenlerle

söz konusu zararlıya karşı melezleme gibi klasik ıslah yöntemleri ile, bu zararlıya dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi mümkün olamamaktadır (Beaujean ve ark. 1998, Meiyalaghan ve ark. 2005, Yamaguchi ve ark. 2004). Bu sorunlara çözüm bulmada günümüzde somatik hibridizasyon, mutasyonlar oluşturma ve genetik transformasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır (De Block 1988, Imai ve ark. 1993, Benchekroun ve ark. 1995).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda tarımsal açıdan önemli karakteri belirleyen genlerin izole edilip klonlanması, bunların çeşitli gen transferi yöntemleri ile bitkilere aktarılması ve yeni bitkilerin geliştirilmesinde çok önemli aşamalar kaydedilmiştir (Tan ve ark. 1987, Imai ve ark. 1993, Benchekroun ve ark. 1995).

1980'li yıllarda özellikle böceklere karşı insektisidal etkiye sahip *Bacillus thuringiensis*'in *Cry* toksin genlerinin klonlanarak bitkilere aktarımı bu konudaki çalışmalara hız kazandırmıştır (Vaeck ve ark. 1987, Barton ve ark. 1987). *B. thuringiensis* *Cry* δ -endotoksin protoksin halinde 130 kDa büyüklüğündedir. Bu toksin böcek tarafından alındığında orta bağırsak bölgesinde çözülmekte ve proteolitik aktive sonucunda 60 kDa büyüklüğündeki aktif formlarına dönüşmektedir (Grochulski 1995). Toksinin etki mekanizması; aktif haldeki toksinlerin bağırsak epitel hücrelerinde bulunan reseptör bölgelerine bağlanmasını takiben hücre zarı üzerinde delikler oluşturması sonucu, bu hücrelerin parçalanmasına neden olmaktadır (Gill ve ark. 1992, Knowles ve Dow 1993).

Cry δ -endotoksinlerden *Cry* 1A(c) ve *Cry* 1A(b) özellikle Lepidoptera, *Cry* 2 hem Lepidoptera hem de Diptera, *Cry* 3 Coleoptera ve *Cry* 4 Diptera takımı böcek türlerine etki etmektedir (http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) Coleoptera takımına ait böcek türlerinden olup, ergin böceklerin yanı sıra 1. 2. 3. ve 4. larva dönemleri de patates yapraklarında ciddi zarar oluşturmaktadır. Lepidoptera takımı böcek türlerinde öldürücü etkisi olan *Cry* 1A(c) geninin patates böceği larvalarında da etkisi araştırılmak amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, bölgemizde turfanda olarak geniş alanlarda yetiştiriliciliği yapılan patatesin "Marfona" ve "Granola" çeşitlerine *Cry* 1A(c) geninin aktarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla patatesin uygun doku parçaları belirlenmiş ve gen transferinde A.

tumefaciens' in higromisine dayanıklılığını (*Hpt*) sağlayan markör geni ile *Cry 1 A(c)* genini taşıyan pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA101 izolatu ve kanamisine dayanıklılık geni (*Npt II*) ile β -glukurodinaz (*GUS*) genlerini taşıyan pGA482GG plazmidini içeren EHA 101 izolatını kullanarak patates bitkilerine farklı genlerin aktarılması, transgenik bitki elde edilmesi, elde edilen bu bitkilerin doğal koşullara adapte edilmesi ve transgenik bitkilerin moleküler analizleri ve biyolojik olarak testlemeleri araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Patates Bitkisinde (*Solanum tuberosum* L.) Doku Kültürü İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Quak (1972), *in vitro* şartlarında, temel bitki besin ortamında bulunan vitaminler, hormonlar ve bunların farklı kombinasyonlarının bitki ve sürgün gelişimi üzerine etkileri incelenmiş, Naftalin asetik asit (NAA) hormonunun bitkinin kök sistemi üzerinde oldukça etkili olduğu, Gibberellik asit (GA_3)'in bitkide uzamayı teşvik ettiği, potasyumun ise dormansi de olan meristem hücresinin büyüme ve gelişimini arttırdığı belirlenmiştir.

Pennazio ve Redolfi (1976), Patateste kök gelişimi üzerine ışık yoğunluğu, GA_3 ve agarın etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada ışık yoğunluğu ile bitki kök sisteminin gelişmesiyle olumlu bir ilişki olduğunu belirlemişler ve en iyi kök gelişiminin 4000 lüks ışık altında gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. GA_3 'ün kök sistemi üzerinde olumsuz bir etkide bulunduğu ve agarın ortamda bulunup bulunmamasının ise bitki gelişimi üzerinde etkili olmadığını saptamışlardır.

Novak ve ark. (1980), patatesin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve meristem ucu gelişimi üzerinde çeşitli hormonların etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında IAA hormonunun kök ve sürgün gelişimi üzerine çok az olumlu etki yaparken, İndol Asetik Asit (IAA) ve Kinetin birlikte bitki gelişimini olumlu etkilediğini belirlemişlerdir. NAA'nın değişik sitokinlerle kombinasyonlarında ise bitki gelişimini engelleyici etkisinin olduğunu görmüşlerdir. Kinetin ve 6-benzil amino pürin (BAP)'nın 0,1 μ M konsantrasyonları ve kombinasyonunun sürgün gelişimi üzerinde olumlu etkisi ve yüksek Kinetin konsantrasyonu içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan bitkilerde bitki gelişimini engelleyici etkisinin olduğu saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada 5-10 μ M IAA ve 5 μ M Kinetin içeren ortamlarda "Cira" ve "Bianik" patates çeşitlerinde en iyi meristem gelişiminin olduğunu belirlenmiştir.

Barsby ve Shepard (1983), yumru oluşturmeyen bazı yabancı *Solanum* türlerinde (*Solanum bredivedens*, *S. fernandezianum*, *S. etuberosum*) mezofil protoplastlarından bitki rejenerasyonunu başarmışlardır. Araştırma sonucunda,

protoplastlardan meydana gelen kallusların ortalama % 5'inde adventif sürgün rejenerasyonu meydana gelmiş olup, en iyi rejenerasyon ortamının 0,5 mg/l GA₃+ 0,5 mg/l NAA ve % 2 sakkaroz içeren Murashige ve Skoog 1962 (MS) besi ortamı olduğu bildirilmiştir.

Eraslan ve ark. (1986), 1-2 yapraklı patates meristemlerini, 0,1 mg/l GA₃, 1 mg/l BAP ve 30 g/l sakkaroz içeren MS besi ortamı üzerinde kültüre alarak yeni bitkicikler elde etmişlerdir. Elde ettikleri bitkilerde, virüs için ELİSA testi uygulanmış ve virüsten arı klonlar seçilmiştir. Patates bitkisinin "Granola" ve "Cosima" çeşitleri için en iyi bitki gelişiminin 1 mg/l BAP içeren sıvı MS besi ortamında olduğu bildirmişlerdir.

Kayım ve Koç (1992), Patates Yaprak Kıvrıklığı virüsü (PLRV) ve Patates S virüsü (PSV) ile infekteli olduğu saptanan "Bintje", "Bright", "Diamant", "Escort" ve "Resy" patates (*S. tuberosum* L.) çeşitlerinde, doku kültürü tekniklerinden olan meristem kültürü tekniği kullanılarak, adı geçen virüslerden arındırılmış üretim materyali elde etmeye çalışmışlardır. Bu amaçla, bitkinin büyüme noktaları olan uç ve koltuk altı meristem dokuları BAP, GA₃ ve indol butirik asit (IBA) hormon kombinasyonu ve konsantrasyonlarını, MS makro, Heller (H) mikro elementlerini ve farklı vitaminleri içeren ortam üzerinde kültüre alınarak, bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Gelişen sürgünlerden daha fazla birey elde etmek amacıyla *in vitro* klonal çoğaltma ve köklendirme çalışmalarında IBA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren modifiye edilmiş MS ortamı kullanmışlardır. Meristem kültürü ile virüslerden arındırılma oranını saptamak amacıyla *in vitro* koşullarda gelişen bitkilerden ELİSA testi yapmışlardır. BAP'ın yüksek konsantrasyonu (2 mg/l) "Bintje", "Diamant" ve "Resy" çeşitlerinde sürgün uzunluğu ve boğum oluşumu açısından, IBA'nın düşük konsantrasyonları (0,1;0,2 mg/l) tüm patates çeşitlerinde etkili bulunduğunu (aynı araştırmacılar) belirlemişlerdir. *In vitro* klonal çoğaltma ve köklendirme çalışmalarında "Bintje" ve "Escort" patates çeşitleri hormonsuz MS ortamında "Bright", "Diamant" ve "Resy" çeşitleri ise 1 mg/l IBA içeren MS ortamında daha iyi sonuç vermiştir. Meristem kültürü ile elde edilen Bintje patates çeşidi klonlarından PLRV tamamen arındırılırken, diğer patates çeşitlerinde bu oranın düştüğünü saptamışlardır. PVS, "Resy" ve "Diamant" patates

çeşidi klonlarının bazılarında arınırken, “Escort” ve “Bright”a ait klonların hiçbirisinden virüsün arındırılmasının mümkün olmadığını belirlemiştir.

John ve ark. (1992), yapmış oldukları çalışmalarda; her patates genotipi için yaprak eksplantların da etkili bir rejenerasyon metodu geliştirmek için araştırma yapmışlardır. Çalışmalarında, yumru üzerinde gelişen ve 10 mm uzunluğa ulaşan sürgünler kesilerek, *in vitro* şartlarda kültüre almışlar ve 4-5 hafta sonra oluşan tek yapraklı boğum araları, 10 g/l sakkaroz içeren ve 9 g/l agar ile katılaştırılan MS besi ortamına aktarmışlardır. Yaklaşık 5-6 hafta sonra gelişen bitkicikler üzerindeki yapraklardan 0,5-1 cm² yaprak petiolu kesilerek 10 g/l sakkaroz, 80 mg/l NH₄NO₃, 147 mg/l CaCl₂, 54 µM NAA, 44 µM BAP içeren MS sıvı besin ortamında 1 gece bekletmişlerdir. Eksplantlar kallus oluşumu için 10 g/l sakkaroz, 4 g/l mannitol, 0,1 µM IAA ve 10 µM BAP içeren 8 g/l'lik agar ile katılaştırılan MS besi ortamına aktarılmıştır. Eksplantlar 7 gün sonra 15 g/l sakkaroz, 10 µM BAP, 14 µM GA₃ içeren ve 8 g/l agar ile katılaştırılan MS besi ortamına alınarak rejenerasyon teşvik edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 5 patates çeşidinde haftalık olarak rejenere olan eksplant sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı belirlenmiştir. Kullanılan 3 farklı besi ortamı sonucunda 3 adımda rejenerasyon tamamlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda tek ve iki farklı besin ortamı tavsiye eden ve aynı çeşitleri kullanan araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Araştırmada kullanılan Desiree ve Aran Banner çeşitleri için tek adımlı metodun daha etkili olduğu, kullanılan bu metod ile diğer çeşitlerin % 50 rejenerasyon oranını geçmediği görülmüştür. İki aşamalı rejenerasyon metodunda ise D31-11 çeşidinde oldukça etkili olduğu görülürken, çalışmada kullanılan “Maris Piper” ve “A25-14” patates çeşitlerinin, en yüksek rejenerasyon frekansına üç aşamada yapılan rejenerasyon metodu ile ulaşıldığı belirlenmiştir. Böylece yapılan araştırmalar ve daha önceden yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurularak, her bir patates çeşidi için yaprak eksplantlarında uygulanabilecek rejenerasyon yöntemi belirlemiştir.

Thomas ve Veilleux (1992), yaptıkları çalışmalarda yabancı bir patates çeşidi olan “*Solanum phureja*”nın “AM3-8” hattında F₁ ve F₂ generasyonunda yaprak doku parçasından adventif sürgün gelişimi ile anter ve protoplast kültürünün kalıtım ve bu özellikler arasındaki ilişkilerini incelemiştir. Araştırma sonucunda, bu özelliklerin

az sayıda gen ve farklı genler tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir. Yaprak doku parçası kullanılarak rejenere edilen bitki sayısı ile, protoplast ve anter kültürü sonrasında elde edilen bitki sayısı arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan değerlendirilmiş fakat farklılıklarının önemsiz olduğu görülmüştür.

Cardi ve ark. (1992), bazı diploid ve triploid patates hatlarında, *in vitro* sürgün rejenerasyonu ve kromozom katlanmasını incelemişlerdir. *In vivo* şartlarda bitkilerden yapraklar yüzey sterilizasyonuna tabi tutularak, 0,25 cm² çapındaki yaprak eksplantları 0,186 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 5 mg/l GA₃ ve % 2 sakkaroz içeren MS besi ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Eksplantlar 2 hafta sonra 1 mg/l BAP, 1 mg/l GA₃, 1 mg/l IAA ve % 5 sakkaroz içeren MS besi ortamına aktarmışlardır. Köklendirmek amacıyla 4 hafta sonra gelişen sürgünleri 1 mg/l IAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlar ve daha sonra büyüyen bitkilerin kök uçlarında sitolojik analizler yapmışlardır. Araştırma sonucunda diploid hatların sürgün rejenerasyonu bakımından daha iyi sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada rejenerasyonu yapılan triploid klonların diploid klonlara göre sitolojik olarak daha stabil oldukları bu çalışmada rapor edilmiştir.

Lozoyo (1992), yaptıkları çalışmada, GA₃, Kinetin ve uygulanan bazı fotoperiyodik dönemlerin patatesteki çiçek farklılaşması üzerine etkilerini incelemiş ve 1 cm uzunluğundaki apikal eksplantlar, 0,3 mg/l IAA, 0,3-3 mg/l Kinetin, 30 mg/l GA₃ ve 20, 40 ve 60 g/l sakkaroz içeren MS besi ortamı üzerinde floresan beyaz ışık altında 14-24 saatlik ışık fotoperiyodunda 24 °C’de kültüre almıştır. Ortamda GA₃ varlığı, bitki başına tomurcuk sayısını azaltırken, 0,3-3 mg/l Kinetin ve 40 g/l’lik sakkaroz en yüksek çiçek tomurcuğu ağırlığını (14 mg/tomurcuk) meydana getirdiğini bildirmiştir.

Dimitrova ve ark. (1994), *in vitro* koşullarda sıvı ve katı besi ortamının patates gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada, “Babur”, “Estima”, “Nale” ve “Vivax” patates çeşitlerine ait farklı eksplantları MS ve B₅ besi ortamında agarlı ve agarsız olarak kültüre alıp gelişimlerini izlemişlerdir. Araştırma sonucuna göre kök ve sürgünlerin sıvı besi ortamında, katı besi ortamına göre daha iyi geliştiğini ve ayrıca B₅ besi ortamının MS besi ortamına göre kök ve sürgün gelişimi bakımından daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır.

Li ve ark. (1994), *in vitro* koşullarda yetiştirilen patates fideleri üzerinde, P333, GA₃ ve BAP'ın etkilerini araştırmışlardır. *In vitro* patates sürgünlerini, 0,7 mg/l GA₃, 0,2 mg/l BAP içeren ve hormonsuz MS besi ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda GA₃ ve P333 arasında antogonistik bir etkileşim olduğu, P333'un artan dozdaki olumsuz etkilerinin GA₃ ile azaldığı görülmüştür. GA₃ ve BAP'in birlikte kullanılmasıyla bitkide yaprak klorofili, gövde çapı kalınlaşması, yan dal sayısı ve kuru madde oranının arttığı da saptanmıştır.

Melik ve ark. (1994), *in vitro* şartlarda patates bitkisi üzerine bazı fitohormonların sitogenetik etkilerini incelemişler, IBA, Kinetin, Zeatin ve BAP içeren MS ortamları üzerinde patatesi kültüre almışlardır. Buradan gelişen bitkilerin kök gelişimleri sitogenetik analizler ile incelenmiş ve alınan sonuçlara göre yüksek oranda kullanılan sitokinin miktarının meristemin çoğalmasını engellediği ve kromozomlarda yüksek frekansta sapsmalara neden olduğu belirlenmiştir. Sadece IBA'nın ise hücrenin genetik yapısında herhangi bir değişiklik yapmadığı, ancak yüksek konsantrasyonda kullanılması sonucu hücre aktivitesini engellediği bildirilmiştir.

Park ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada dört adet "Kuzey Dakota" patates çeşidine (ND860) ait yaprak eksplantları için, *in vitro* da etkili bir adventif sürgün rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Araştırma sonucuna göre "ND860" patates çeşidi için en iyi rejenerasyon ortamı 20 mM IAA içeren MS besi ortamı olarak saptanmıştır. Ayrıca *Agrobacterium tumefaciens* ile yapmış oldukları genetik transformasyon çalışmalarında dört antibiyotik sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini test etmişlerdir. Aldıkları sonuçlara göre 15 mg/l Kanamisin (Km) ve 4 mg/l Km ve daha yüksek konsantrasyonda Higromisin kullanımının sürgün oluşumunu tamamen engellediği ortaya çıkmıştır. Higromisinin 1 mg/l konsantrasyonda kullanılmasının ise sürgün gelişimini teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca kullanılan Karbenisilin (Cb) ve Sefotaksim (Cf) antibiyotiklerinin bitki gelişimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını belirlemişlerdir.

Avila ve ark. (1995), yapmış oldukları çalışmalarda, bazı azotlu bileşiklerin *in vitro* koşullarda patatesin büyüme ve morfojenetik yapısı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla 3 farklı patates çeşidini 59 mM NO₃, NH₄ ve glutamik

asit içeren ortam üzerinde kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda ortamda azotlu bileşiklerin oranındaki artış nedeniyle sürgün uzunluğu ve yaprak alanının arttığı böylece kuru madde oranında artış belirlendiği saptanmıştır.

Garcia ve Martinez (1995), patatesten sap boğumlarından somatik embriyogenesis oluşumu üzerine çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada, 4-8 mm uzunluğundaki sap boğumları, 4 mg/l 2,4-D, 2 mg/l glisin, 0,5 mg/l pridoksin, % 2 sakkaroz ve 2 g/l fitojel ile karıştırılan MS besisi ortamında eksplantlar kallus oluşumu teşvik edilmek üzere kültüre alınmıştır. Elde edilen kalluslar üç haftada bir alt kültüre alınmış daha sonra 2,4-D miktarı 2 mg/l' ye düşürülerek bu ortam üzerinde 90 gün süre boyunca kültüre alınmıştır. Buradan elde edilen kalluslar daha sonra 0,1 mg/l GA₃ ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlar ve 10 gün sonra bu kalluslarda embriyo oluşumu gözlenmiştir.

Vinterhalter ve ark. (1996), patates sürgünlerinde büyüme ve yan dalların oluşumunda 30 g/l sakkaroz ve sitokininler arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. Tek boğumlu eksplantlar 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.2 mg/l BAP ve Kinetin ile 5, 8, 10 ve 100 mg/l Adenin içeren MS besisi ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Sitokinin ilave edilmediği ortamda yan dal sayısı ve uzunluğu sakkaroz ile kontrol edildiği ve sakkarozun yan dal oluşumunu ve uzunluğunu arttırdığı belirlenmiştir. Sakkaroz ve sitokininler beraber kullanıldığı zaman ana sürgün boyu ve boğum aralarının kısaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca, sitokininlerin yumru oluşumunda önemli olan stolon oluşumunu teşvik ettiği saptanmıştır.

Alphonse ve ark. (1998), patatesten *in vitro* rejenerasyonu etkileyen faktörleri incelemişler ve araştırma sonucunda, yaprak eksplantları için en iyi ortamın, 10 mg/l GA₃, 1 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS besisi ortamı, yumru oluşumu için 0,8 mg/l Kinetin, 0,4 mg/l IAA, 0,4 mg/l GA₃, 1 mg/l Kazein içeren MS besisi ortamı ve kallus oluşumu için ise; 5 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l Kinetin içeren MS besisi ortamı olduğunu belirlemişlerdir.

Gopal ve ark. (1998), patatesten *in vitro* mikro yumru oluşumunu optimize etmek amacıyla farklı iklimlendirme şartları ve farklı BAP konsantrasyonlarının etkilerini denemişlerdir. Araştırma sonucuna göre gece 18 °C, gündüz 20 °C'lik sıcaklığın, düşük ışık yoğunluğu (6-12 µmol m⁻²s⁻¹) 10 saatlik kısa fotoperiyodun

mikro yumru oluşumunu teşvik ettiğini, BAP konsantrasyonu arttıkça da daha büyük ve ağır mikroyumru oluşturduğunu saptamışlardır.

Hamdi ve ark. (1999), patates çeşitlerinin farklı doku parçalarında (yaprak, yumru, mikro yumru ve sap), farklı hormonların rejenerasyon kabiliyeti üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kültüre alınan doku parçaları arasında yaprak doku parçaları en iyi rejenerasyon gelişimi gösterirken, yaprak ve sap doku parçaları için en iyi rejenerasyon ortamı; 2 mg/l Zeatin ve 0,01 mg/l GA₃ hormon kombinasyonunun içeren MS besi ortamı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca gen aktarımı için en uygun materyalin yaprak doku parçalarının olduğunu belirlenmiştir.

Merja ve Stasa (1999), yumru sürgünlerinin meristem eksplantlarını farklı hormonlar kullanarak rejenerasyon çalışmaları yapmışlardır. Farklı uzunluklardaki (0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 mm) yumru sürgün meristemleri için denemeler kurulmuş, Kinetin, NAA, BAP, GA₃, IAA ve IBA gibi hormonları içeren besi ortamlarının rejenerasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda GA₃, BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarının meristem rejenerasyonu üzerinde en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca 0.2 ve 0.4 mm uzunluğundaki eksplantların daha büyük eksplantlara göre virüs enfeksiyonuna karşı daha dayanıklı olduğunu saptamışlardır.

Romanov ve ark. (2000), patatesten IAA ve Kinetin hormonları uygulamasının mikroyumru oluşumu ve ağırlığı üzerine araştırmalar yapmışlardır. Araştırmada 7 farklı patates çeşidi kullanılmışlardır. Transgenik hatlarda patatin sınıf I (B33) promotör rol B ve rol C genlerinin kontrolü altında olduğunu belirlenmiştir. Bitkiler karanlık koşullar altında *in vitro* da sıvı MS ortamı üzerinde sakkarozun % 1-8 arası farklı konsantrasyonları ile büyüme düzenleyici hormonlarda ilave edilerek kültüre alınmıştır. Çalışmalarda patates bitkileri ve transforme olmuş bitkilerde kullanılan hormonlar ve farklı sakkaroz konsantrasyonlarının yumru oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda yüksek sakkaroz konsantrasyonu ve belirli oksin hormon kombinasyonlarının patatesten yumru oluşumu üzerinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca patates bitkisinde

yumru oluşumunun sakkaroz konsantrasyonu ve fitohormonların yanında bitkinin genetik özelliğinin de önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Al-Safadi ve ark. (2000), tarafından patatesten düşük dozda gama ışınının *in vitro*'da 3 farklı patates çeşidinde mikroyumru oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla gama ışınının 2.5, 5, 10, 15 Gy farklı dozlarında denemeler kurulmuştur. Patatesin "Diamont" çeşidinde 2.5 Gy gama ışını uygulaması ile en fazla mikro yumru oluşumu meydana gelmiştir. Sonra sırasıyla "Draga" ve "Spunta" çeşidi gelmektedir. Gama ışınının 2.5 Gy uygulaması ile kontrol bitkiye kıyasla % 38 oranında daha fazla mikro yumru oluşturduğunu saptamışlardır. "Draga" çeşidinde "Diamont" ve "Spunta" çeşidine göre oluşan mikro yumruların 5mm çapında olup ağırlığının daha fazla olduğu görülmüştür. Gama ışınının 2.5 Gy uygulaması ile bitkilerde genetik herhangi bir değişimi olmadığını sadece yumru oluşumunu teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

Yu ve ark. (2000), *in vitro*'da doku kültürü yöntemleri ile patatesten mikro yumru üretimi için çalışma yapmışlardır. Araştırmada fazla sayıda hızlı bir şekilde mikro yumru elde etmek için ortam içerisine bioreaktör ilave etmişlerdir. Uygulanan bioreaktör ile yumru sayısında artış olmamasına rağmen yumru ağırlığında 1 g artış olduğunu belirlemişlerdir. Kurdukları denemelerde sakkarozun farklı dozları (40-60 ve 80 g/l), glikoz ve fruktoz kullanılmasının yumru oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Yüksek konsantrasyonda sakkaroz uygulaması fruktoz ve glikoz uygulamasına göre mikroyumru sayısını arttırdığı ve hızlandırdığını saptamışlardır. Mikroyumru oluşumu üzerinde sakkaroz kullanımının oldukça etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Yıldırım ve Tugay (2002), patates bitkisinin 5 çeşidinde mikro yumru üretimi için farklı besi ortamları üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Araştırma sonucunda en iyi sonucu 2 mg/l IBA ve % 8 sakkaroz içeren MS ortamı olduğunu saptamışlardır. Patatesin "Agria" çeşidi % 68 ve "Resy" çeşidi % 71 oranlarında en fazla mikro yumru oluşturduğu saptamışlardır. "Sultan" ve "Clones" çeşidi patates bitkisinde mikro yumru oluşumu oldukça düşük olmuştur. "Resy" çeşidinde yüksek oranda mikro yumru elde edilmiş ve mikro yumru ağırlığının 0,6 g olduğunu belirlemişlerdir.

Ghaffoor ve ark. (2003), yaptıkları çalışmalarda patates bitkisi meristem kültüründe 3 farklı büyüme düzenleyici hormonların NAA, IAA, IBA etkisini araştırmışlardır. Kurdukları denemelerde bu hormonların 5 farklı seviyelerinin (0.0, 0.03, 0.15, 0.25 ve 0.35 mg/l) patatesin meristem kültürü üzerinde etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bitkilerde boy uzunluğu, elde edilen bitki sayısı, yaprak sayısı ve kök uzunluğu üzerindeki farklılaşmalar araştırılmıştır. 0.15 mg/l NAA uygulaması sonucunda bitkilerde 9 cm ile en fazla boy uzunluğunun gerçekleştiği, 0.35 mg/l IBA uygulaması ile bitki başına 9 adet ile en fazla bitki oluşumunu, 0.25 mg/l IAA uygulaması ile 6.143 ile maksimum yaprak oluşumunun meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Piao ve ark. (2003), patatesten *in vitro*' da düşük dozda büyüme düzenleyici hormon ilave edilerek elde edilen mikro yumru gelişimi için uygun bir protokol hazırlamışlardır. Araştırmada 2 aşamalı yöntemlerle mikro yumru elde etmişlerdir. Birinci aşamada; stok patateslerde bitki oluşumu ve gelişimi için ortama bioreaktör ilave etmişler 4 hafta sonunda ortam değişikliği yaparak ikinci aşamaya geçmişlerdir. Bu aşamada ise bitkinin mikro yumru oluşumunu teşvik etmişlerdir. *In vitro*' da ve *in vivo*' da bioreaktör uygulaması patatesten sürgün oluşumu ve büyümesini arttırdığı ve her bir bitki için 50 nodül oluşturduğunu saptamışlardır. Sürgün gelişim esnasında ortama ilave edilen sakkarozun yüksek dozu ve Benzil amino pürin (BAP) içeren ortamlarda ve karanlık koşullar altında kültüre almışlardır. BAP uygulaması ile yumru ağırlığının kontrol bitkilere oranla 2,1 gr arttırdığı belirlemişlerdir. Düşük konsantrasyonda BAP uygulamasının mikro yumru oluşumu üzerinde etkili bir bioreaktör olduğu saptanmıştır.

Özkaynak ve Samancı (2005), araştırmada “Concorde”, “Granola”, “Marabel”, “Marfona” ve “Velox” patates çeşitlerini materyal olarak kullanmışlardır. Farklı mini yumru büyüklüğünde verim ve verim komponentleri arasındaki ilişkileri ve mini yumruların tarla performansını belirlemeyi amaçlamışlardır. Ağır mini yumrular (11-15 g) hafif mini yumrulara (2-4 g) göre daha yüksek bitkilerde ya dallanma, bitki başına yumru sayısı ve yumru ağırlığı vermiştir. Hafif mikro yumrular bitki başına yaklaşık olarak 5-7 yumru ve 1-4 sap üretmişlerdir. Her iki mini yumru büyüklüğünde, tohumluk olarak kullanılacak yumru oranı (30 mm

den büyük yumru) yaklaşık % 80-85 olarak bulunmuştur. Genel olarak, bitki başına yumru ağırlığı ile bitki boyu, bitkilerde sap sayısı, bitki başına yumru sayısı ve ortalama yumru ağırlığı arasında olumlu ilişkiler bulunmuştur. Araştırma sonucunda mini yumruların patates tohumluk üretiminde etkili olacağını belirlenmiştir.

Rahman ve ark. (2010), *in vitro* da patatesin “Shilbilaty”, “Shepody”, “Diamant”, “Atlantia” çeşitlerinde farklı karbon (sakkaroz, glikoz ve maltoz) kaynaklarını kullanarak bitki gelişimleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sakkaroz içeren ortamlar maltoz ve glikoz içeren ortamlara göre, kültüre alınan bitkilerde; bitki oluşum ve gelişimi açısından en iyi ortam olduğunu belirlemişlerdir. Maltoz içeren ortamlar diğer ortamlara göre bitkilerde en fazla miktarda yumru oluşumuna neden olmuştur. Kültüre alınan bitkilerde en iyi yaprak gelişimini maltoz içeren ortamlar üzerinde gerçekleştirirken bunu glikoz ve sonra sakkaroz takip etmiştir. Patatesin “Atlantia” çeşidinde sakkaroz içeren ortamlar üzerinde diğer ortamlara göre internodiumlarının daha kısa olarak geliştiği gözlenmiştir. “Shepody” ve “Diamant” çeşidi patates bitkileri üzerinde maltoz içeren ortamların daha etkili olduğu saptanmıştır.

Altındal ve Karadoğan (2010), yapmış oldukları çalışmalarda *in vitro* da sakkarozun farklı konsantrasyonları (% 2, 4, 6, 8, 10 ve 12) ve maltozun patatesteki mikro yumru oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. “Agria” ve “Justine” çeşitlerinde % 4 maltoz uygulaması sonucunda en fazla mikro yumru oluşumunun gerçekleştiğini saptamışlardır. Patatesin “Justine” çeşidinde en fazla yumru ağırlığı % 4 maltoz ve %10 sakkaroz içeren ortamlarda gerçekleştiği belirlenmiştir. En fazla yumru çapı “Justin” çeşidinde % 4 maltoz, “Agria” çeşidinde ise % 6 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Yaptıkları çalışmalarda çeşit özelliği, çeşit ve ortam interaksyonu mikro yumru oluşumunu, ağırlığını ve çapının gelişimleri üzerinde oldukça etkili olduğunu belirlemişlerdir.

2.2. *Agrobacterium* Aracılığı ile *Bacillus thuringiensis Cry* Genlerinin Patates Bitkisine (*Solanum tuberosum* L.) Aktarılması, Moleküler ve Biyolojik Analizler ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Sheerman ve Bevan (1988), yaptıkları çalışmada ikili *A. tumefaciens* vektörlerini kullanarak patatesteki hızlı bir transformasyon metodu geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Araştırmada 5 farklı patates çeşidi kullanılmıştır. Patates yumruları % 20'lik ticari çamaşır suyu ile 30 dakika bekletilerek sterilizasyon işlemini tamamlandıktan sonra yumrular 1 cm çapında dilimlere ayırmışlardır. Yumru diskleri, *A. tumefaciens*'in LBA4404pBin6 izolatı ile 1 mg/l thiamine, 0,5 mg/l nikotinik asit, 0,5 mg/l pridoksin, 3 mg/l IAA, ve 30 g/l sakkaroz içeren sıvı MS besi ortamında 20 dakika inokule edilmiştir. Yumru diskleri inokulasyon sonrasında yine aynı ortama 8 g/l agar ilave edilerek hazırlanmış katı ortam üzerinde kültüre almışlar ve 48 saatlik inokulasyon sonrasında ise 100 mg/l Km, 500 mg/l Cb içeren yine aynı besi ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Eksplantlar 3 haftada bir yeni besin ortamlarına aktarılmıştır. Daha sonra 4 haftada bir alt kültür yapılarak Cb miktarı 500 mg/l'den 200 mg/l'ye kadar düşürülmüştür. Bu ortamda gelişen transgenik sürgünler 3 mg/l IAA, 100 mg/l Km, 200 mg/l Cb içeren MS besin ortamında köklendirmeye alınmıştır. Burada gelişmeye devam eden ve köklenen bitkiler, transgenik olarak ifade edilmiştir. "Maris Piper" ve "Maris Pard" çeşitlerinde transformasyon etkinliği, 0/100, "Desiree" çeşidinde 60/300, "Golden Wonder"de 28/90, "Pentlan"da ise 8/150 olarak bildirilmiştir. Transformasyon oranının kullanılan genotipe göre büyük farklılıklar gösterdiği görülmüş ve rejenerasyon kapasitesi yüksek olan çeşitlerin gen aktarımına daha iyi cevap verdiği bildirilmiştir.

De Block (1988), *in vitro* şartlarında yetiştirdiği "Bintje", "Berolina", "Desiree" ve "Russet Burbank" patates çeşitlerine ait yaprak eksplantlarını yaralayarak, plazmidinde kimerik bar ve *Npt II* genlerini taşıyan *A. tumefaciens* ile inoküle etmiştir. Her çeşite ait yaprak eksplantı kanamisin içeren besin ortamında kallus oluşturmuş, oluşan her kallusta da sürgün rejenerasyonu meydana gelmiştir. "Russet Burbank" çeşidi için etkili bir adventif sürgün rejenerasyonu sağlamak

amacıyla rejenerasyon ortamına 2 mg/l AgNO₃ ilave edilmiştir. *Npt II* ve *PAT* geni aktivitesi gösteren transgenik bitkilerin, ticari glufosinat herbisitinin yüksek dozlarına karşı oldukça dayanıklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, elde edilen transgenik bitkilerde hemen hemen hiç bir somaklonal varyasyona rastlanmadıklarını bildirmişlerdir.

Visser ve ark. (1989), *A. tumefaciens* aracılığıyla diploid transgenik patates bitkileri elde etmişlerdir. Bu amaçla yaprak ve gövde eksplantlarını, *Npt II* geni taşıyan ve pVU 1011 ikili vektörü içeren *A. tumefaciens* ile inoküle etmişlerdir. Sap eksplantlarında, kallus oluşturmaksızın direkt olarak ilk altı hafta içerisinde en etkili adventif sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirmişler ve rejenere olan sürgünler, kanamisin içeren köklendirme ortamına alındıklarında bu sürgünlerin % 90'nın kanamisine dayanıklı olduğunu saptamışlardır. Böylece, bu bitkilerde *Npt II* geninin ekspresyonu sağlanarak, bu bitkilerin transgenik olduğunu ifade etmişlerdir.

Herman ve ark. (1989), patatesteki çok sayıda transgenik bitki eldesi için etkili ve hızlı bir transformasyon metodu geliştirilmesi üzerinde çalışmışlardır. Araştırmada “Desiree”, “Russet Burbank”, “Agency”, “Antigo” çeşitleri ile “FL1607” patates hattı kullanılmıştır. Çalışmada 3 farklı eksplant (yaprak, gövde ve yumru diski) denenmiş, araştırma sonuçlarına göre sürgün rejenerasyonu bakımından en uygun eksplantın yaprak olduğu belirlenmiştir. En uygun rejenerasyon ortamı, 10 mg/l GA₃, 0.2 mg/l NAA, 2.24 mg/l BAP ve 60 g/l sakkroz içeren MS besin ortamı olarak saptanmıştır. Bütün çeşitler uygun olarak belirlenen besi ortamı üzerinde en yüksek kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonunu sağlamışlardır. Gen aktarımı için, plazmidinde CaMV 35S promotörü tarafından kontrol edilen *Npt II* ve *GUS* markör genlerini taşıyan LBA4404 *A. tumefaciens* transformasyonda kullanılmıştır. Transgenik sürgünlerin seçimi için dört farklı dozda kanamisin (37.5, 50, 75 ve 100 mg/l) antibiyotiği rejenerasyon ortamına ilave edilmiştir. En yüksek *GUS* aktivitesi gösteren sürgün sayısı (338/490; % 69) 62.5 mg/l kanamisin kullanıldığında meydana geldiği saptanmıştır. En yüksek transgenik bitki eldesi ise “FL1607” hattından elde edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, yüksek oranda transgenik bitki eldesinin öncelikle genotipe bağlı olduğu, ayrıca kullanılan

antibiyotiklerin transgenik bitki sayısını etkileyen ikinci önemli faktör olduğu vurgulanmıştır.

Vander ve ark. (1991), yaptıkları araştırmada, Patates Yaprak Kıvrıcıklığı virüsü (PLVR)'nden izole edilen protein kılıf geni, *A. tumefaciens* aracılığıyla patatese aktarılmış, elde edilen transgenik bitkilerin PLVR virüsüne dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Ancak, yapılan analizlerde transgenik bitkilerde kılıf proteinine ait mRNA tespit edilirken, kılıf protein ürününe rastlanmadığı belirlenmiştir.

Chang ve Chan (1991), yaptıkları araştırmada patatesteki (*Solanum tuberosum*) *Agrobacterium* aracılığı ile etilen aktivasyonunu inhibe eden gümüş thiosulfate (STS) geninin aktarılması üzerinde çalışma yapmışlardır. *In vitro*' da kültüre alınan patates bitkilerinde STS özellikle sürgün gelişimini arttırıcı etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. 21 gün süre ile STS uygulanan bitkilerde kontrol bitkilere göre toplam taze ağırlığın 6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bitkilerdeki yaralanma ile dokulara STS uygulaması yapılmış ve bununla birlikte *A. tumefaciens* aracılığı ile NOS ve *Npt II* kimerik genleri aktarılmıştır. STS uygulaması yapılan dokularda transformasyon sıklığı oranı % 27 ile % 31 arasında artış olduğunu belirlemişlerdir. Transgenik bitkilerdeki kimerik genlerin test edilmesi, opin analizi ve *Npt II* enzim aktivasyonu ile belirlenmiştir.

Avetisov ve ark. (1992), transgenik ve kontrol patates bitki köklerinin, *in vitro* şartlarındaki morfogenetik aktivitelerini saptamışlardır. Araştırmada, 4 patates çeşidinde *A. rhizogenes* aracılığıyla transgenik bitkiler elde edilmiştir. Besin ortamdaki IAA yokluğu ve yüksek konsantrasyondaki (3 mg/l) Zeatinin transgenik köklerden adventif sürgün rejenerasyon oranının azalmasına yol açmıştır. Ayrıca transgenik köklerin, normal köklere göre daha düşük rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, köklerden rejenerasyonun büyük ölçüde genotipe de bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Stark ve ark. (1992), patates yumrularında AGPase geninin ekspresyonunun çok önemli olduğunu, bu genin transfer edildiği patates yumrularında kontrol bitkilerinden % 35 daha fazla nişasta bulunduğunu belirlemişlerdir.

Elaine ve ark. (1992), *A. tumefaciens* aracılığıyla patatese gen aktarımı üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada sürgün uçları *in vitro* koşullarında kültüre alınmış,

5-6 haftalık tek yapraklı koltuk altı meristemleri 10 g/l sakkaroz ve 1.5 mg/l STS içeren MS besin ortamında büyütülmüştür. Burada gelişen 5 haftalık bitkilere ait yaprakların sapı kesilerek atılmış, yaprak 0.2 cm çapında iki diske bölünmüştür. Yaprak diskleri, 10 g /l sakkaroz, 80 mg/l NH₄NO₃, 147 mg/l CaCl₂, 10 mg/l NAA ve 10 mg/l BAP içeren sıvı MS besin ortamında bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün eksplantlar, NOS promotörü tarafından kontrol edilen *Npt II* ve CaMV35S promotörü tarafından kontrol edilen GUS genlerini taşıyan, p35SGUSINT plazmidini içeren *A. tumefaciens* ile 15 dakika inoküle edilmiştir. Daha sonra eksplantlar kurularak, 10 g/l sakkaroz, 4 g/l manitol, 0.175 mg/l IAA, 2.25 mg/l BAP içeren ve 8 g/l'lik agar ile katılaştırılan MS besin ortamına alınmıştır. İki günlük ortak kültürden sonra, eksplantlar 500 mg/l Cf, 50 mg/l Km ve 200 µM asetosringon (As) içeren aynı kallus teşvik ortamına aktarılmıştır. Yaklaşık 7 hafta sonra kallus üzerinde sürgünler görülmeye başlanmış, kanamisine dayanıklı olan bu sürgünlerin % 88'nin histokimyasal GUS analizi açısından pozitif olduğu görülmüştür. Bu da kanamisin içeren ortamda gelişen sürgün sayısının, transformasyon etkinliğinin tam bir yansıması şeklinde ifade edilmiştir. Transformasyon etkinliği ile rejenerasyon arasında gerçek bir ilişki tespit edilerek, rejenerasyon kapasitesi iyi olan çeşitlerin transformasyon etkinliğinin de yüksek olduğu saptanmıştır. As'nun, vir genlerinin transkripsiyon seviyesini etkilediği ve T- DNA'nın Ti-plazmidinden kesilip çıkarılma işini kolaylaştırdığı saptanmıştır. As'nin, yapraklarda transformasyon alanını, STS'nin ise rejenerasyon kapasitesini artırdığı, dolayısıyla transforme (gen geçişi olmuş) olmuş hücre sayısını arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, GUS geninin aktarılmasında, nopaline tipi pGV350 virulens plazmidin, oktopin tipi PGV2260 virulens plazmidinden daha üstün olduğu ortaya konmuştur.

Marianne ve ark. (1992), patates X (PXV), Y (PVY) ve Patates Yaprak Kıvrıklığı virüsü (PLVVR)'ne dayanıklı transgenik bitki eldesi üzerinde çalışmışlardır. Patates X virüsü (PXV)'nün kılıf protein geni (PVXCP) izole edilerek *A. tumefaciens* plazmidine CaMV 35S promotörü önüne klonlanarak ve *Npt II* geni ile birlikte "Escort" ve "Bintje" patates çeşitlerine aktarılmıştır. Elde edilen transgenik bitkilerde, Patates X virüsü (PXV)'ne yüksek oranda dayanıklılık sağlanmıştır. Aynı şekilde Patates Y virüsü (PVY) ve Patates Yaprak Kıvrıklığı

virüsü (PLVVR) kılıf proteinleri CaMV 35S promotörü önüne klonlanarak ve bir markör gen (*Npt II*) ile beraber *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aynı çeşitlere aktarılmıştır. Patates Y virüsü kılıf proteini geni (PVY CP) taşıyan transgenik bitkiler yetiştirme dönemi boyunca stabil özellik gösterirken, Yaprak kıvrıcıklığı kılıf protein geni (PLRVCP)'ni taşıyan transgenik bitkiler sera testlerinde oldukça iyi gelişmiş, ancak tarla denemelerinde stabil olmadıkları gözlenmiştir.

Dale and Mcpartlan (1992), bazı transgenik patates bitkileri ile yumrudan ve sürgün uçlarından rejenere edilen kontrol bitkilerini, tarla performansı bakımından değerlendirmişlerdir. Transgenik bitkilerde *GUS* geni patatin *Npt II* geni ise nopalın sentez promotörü kontrolü altında olup bu iki genin de bitki fenotipi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Yapılan transformasyon sonucunda transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Bu transgenik bitkilerin yumru diskleri ve kontrol bitkileri daha önceden patates yetiştirilen tarlaya dikilmiştir. Çiçeklenme döneminde bitki boyu, yumru ağırlığı ve yumru sayısı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, transgenik bitkiler arasında somaklonal bir varyasyon meydana geldiğini saptamışlardır. Ayrıca, transgenik bitkilere ait ortalama değerler bütün karakterler (boy, ağırlık ve yumru sayısı) bakımından kontrol bitkilere göre daha düşük, değişim bakımından ise daha yüksek değerler göstermiştir. Kullanılan doku kültürü metotlarının bitkinin performansını etkileyen önemli bir faktör olduğunu ortaya konmuştur. *GUS* ekspresyonu gösteren bitkilerin incelenen üç karakter bakımından da en düşük değerlere sahip olduğu görülmüştür. *GUS* ekspresyonunun bitkinin performansını etkilediği düşünülmüştür. Buna karşılık bitkilere gen aktarımında sıkça kullanılan *Npt II* geninin ise tarla performansı bakımından herhangi bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.

During ve ark. (1993), patatesten yaş çürüklük etmeni olan *Erwinia carotovora*'ya karşı dayanıklı transgenik patates bitkileri geliştirmişlerdir. Bakteriyofaj T4 lizoenzimi, birkaç bitki türünde ortaya çıkarılmış olup, bakteriyotik enzimler içerisinde en aktif olanıdır. *A. tumefaciens*'in plazmidine *Npt II* markör geni ile birlikte CaMV 35S promotörü önüne klonlanmış olan kimerik T4 lizoenzim patatese aktarılmıştır. Bakteriyofaj T4 lizoenzimi transgenik patates hücrelerinde hücreler arası salgılanması sonucu fitopatojenik bakterilere karşı patates bitkisinin

dayanıklılığının arttığı gözlenmiştir. Yapılan tarla testlerinde de, transgenik bitkilerin kontrol bitkilerine göre büyük ölçüde yaş çürüklük etmeni *E. carotovora*'ya karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır.

Adang ve ark. (1993), yapmış oldukları araştırmada zengin bir adenin-timin nükleotid zinciri içeren *Bt Cry* genleri yerine daha az miktarda adenin-timin baz çifti bulduran yeni bir *Bt CryIII A* geni sentezlemişlerdir. Bu gen, 3 oligonükleotid zincirinden oluşan, 9 bloklu, 1.8 kb uzunluğunda bir genidir. Yeni sentezlenen bu genle birlikte, doğal *Bt* genleri elektroporasyon yoluyla monokotiledon mısır ile dikotiledon havuç bitkisine aktararak, ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Elektroporasyondan sonra mısır ve havuç protoplastlarında *Cry III A* genine ait spesifik RNA ve protein tespit edilmiştir. Bu genin önüne CaMV 35S promotörü klonlanarak patatese aktarılmış, kontrol bitkilerinde, ortalama her bitkide, 250 patates böceği larvası saptanırken, 63 transgenik hattın 56'sında larva gelişimi görülmemiştir. Yüksek delta-endotoksin ekspresyonu gösteren bu transgenik bitkilerin patates böceği larvalarına daha dayanıklı olduğu teşhis edilmiştir. Böcek kontrolü ile delta-endotoksin RNA ve protein seviyesi arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur.

Perlak ve ark. (1993), "Russet Burbank" patates çeşitine *Bt Cry III A* genini aktararak, Patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say)' ne dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Laboratuvar ve çok lokasyonlu tarla testlerine göre, elde edilen transgenik hatların bütün gelişme dönemlerinde böcek saldırılarına karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Transgenik hatlarla kontrol "Russet Burbank" patates çeşidi arasında agronomik kalite ve lezzet kriterleri bakımından hiçbir farklılığın olmadığı ortaya konmuştur.

Bayroviç ve ark. (1995a), *A. tumefaciens* ile enfekte edilen patates ve tütün bitkisinde tümör oluşumu üzerine araştırma yapmışlardır. Patates yumru ve tütün yaprak diskleri, *A. tumefaciens*'in B₆S₃ (yabani tip) izolatının bakteri solüsyonunda 15 dakika tutulduktan sonra 2 gün boyunca MS besin ortamında karanlık şartlarda ortak kültüre alınmıştır. Fazla miktarda çoğalmış olan bakterileri uzaklaştırmak amacı ile yaprak ve yumru diskleri 500 mg/l Cf içeren steril destile su içerisinde 4-5 saat yıkanmışlardır. Bu diskler, 500 mg/l Cf içeren MS besin ortamında, 16 saat

ışık/8 saat karanlık periyotta ve 25 °C'de bitki büyütme kabinine alınmışlardır. Yaklaşık 10-15 gün içerisinde, diskler üzerinde % 80 oranında tümör oluşumu gözlenmiştir. Bu sistem, yüksek bitki türlerinden elde edilen antitümör maddelerinin belirlenmesinde güvenilir bir yöntem olarak saptanmıştır.

Koivu ve ark. (1995), yumru oluşturmeyen diploid yabancı patates çeşidi (*Solunum brevidens*) ve tetraploid “Pito” çeşidine *A. tumefaciens* ile gen aktarımı üzerinde çalışma yapmışlardır. Çalışmada ko-entegratif (birbiri ile ortak çalışan) pGV2260 ve pGV3850 ile binary pGUS-INT vektörü kullanılmıştır. *S. brevidens*' in yaprak ve sap eksplantları bitki eksplantı olarak kullanılmıştır. “Pito” çeşidinin ise mikro yumruları transformasyonda bitki doku parçası olarak kullanılmıştır. Transformasyon için sıvı MS besin ortamında 1/10 oranında seyreltilmiş olan *A. tumefaciens* C58CI hattı ile inoküle edilmiştir. İnokulasyondan sonra 48 saat katı ortamda ortak kültüre alınmıştır. Eksplantlar, 500 mg/l Cf ile yıkanarak, 14 gün boyunca kanamisin içermeyen kallus teşvik ortamında bekletilmiştir. Daha sonra bir hafta süresince kanamisin içeren kallus teşvik ortamında bekletilen eksplantlar, sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmışlardır. *S. brevidens*'in yaprak eksplantlarına % 49'una, “Pito” çeşidinin mikro yumrularına ise % 57'sine gen geçişi olmuş ve sürgün meydana getirdikleri belirlenmiştir.

Bayroviç ve ark. (1995b), yaptıkları çalışmalarda yumru ve gövde eksplantlarını kullanarak patatese gen aktarımı üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada 5 patates çeşidi (“Desiree”, “Isola”, “Anaç”, “Sultan” ve “Yaylakızı”) kullanmışlardır. Patates yumruları, % 70'lik ethanol içerisinde 5 dakika ve % 1 sodyum hipoklorit içeren çamaşır suyunda 20 dakika süreyle steril edilmiştir. Sürgün uçları kesilerek MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen bitkiciğin gövdesi eksplant olarak kullanılmıştır. Yumru diskleri ve gövde eksplantları plazmidinde *GUS* ve *Npt II* markör genlerini taşıyan *A. tumefaciens* hattı ile 15-20 dakika inoküle edilmiştir. Eksplantlar 2-8 gün ko-kültivasyon aşamasında kalmış ve sonra 5 mg/l Zeatin, 1.5 mg/l IAA, 100 mg/l Km ve 500 mg/l Cf içeren rejenerasyon ortamına alınmıştır. Kültüre alınmasından 2 hafta sonra Cf konsantrasyonu 200 mg/l'ye düşürülmüştür. Eksplantlar 2 haftada bir alt kültüre alma çalışmaları yapılmıştır. Seçici ortamda rejeneren olan sürgünler, X-Gluk içerisinde 45 dakika bekletilerek, histokimyasal GUS

analizine tabi tutulmuştur. Yapılan histokimyasal analiz sonucunda GUS aktivitesi belirlenirken, PCR ve Southern blotting ile yapılan analizlerde de transformasyon ispat edilmiştir.

Kumar ve ark. (1995), bazı yabancı solanum türlerinde (*S. verrucosum*, *S. hjertngii*, *S. papita*, *S. stoloniferum* ve *S. demissum*) mikro yumrular kullanarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım yöntemi geliştirmişlerdir. Araştırmada, plazmidinde *Npt II* ve *Hpt* markör genleri taşıyan pGV3580:pKU2 plazmidini içeren *A. tumefaciens* bakterisi kullanılmıştır. *In vitro* koşullarında üretilen mikro yumrular, 8 ay + 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Mikro yumrular 1 mm'lik disklerle ayrılarak, 30 dakika süreyle bakteri solüsyonuyla inoküle edilmiştir. Daha sonra, mikro yumru diskleri 1 mg/l thiamine, 0.5 mg/l nikotinic asit, 0.5 mg/l pridoksin, 1.8 mg/l Zeatin ribosid, 0.9 mg/l IAA ve 20 g/l sakkaroz içeren ve 10 g/l agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 20 °C'de kültüre alınmıştır. İki gün sonra mikro yumrular, 150 mg/l Km ve 250 mg/l Cf içeren aynı rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Yeni besin ortamına 15 gün sonra alınan mikro yumrulardan güçlü bir biçimde gelişen ve köklenen sürgünlerde PCR analizi yapılmış olup, sürgünlerin tamamında *Npt II* ve *Hpt* geni saptanmıştır.

Arıcan ve ark. (1996), transgenik patatesten *in vitro* mikro yumru üretimini hedefledikleri çalışmalarda "Desire" ve "Isola" patates çeşitlerini pB1121 ikili vektörünü içeren *Agrobacterium tumefaciens*'in AgI-I izolatı ile 2-8 gün ortak kültüre alınmışlardır. Yumru disklerini rejenerasyon için 5 mg/l Zeatin, 1-5 mg/l IAA, 100 mg/l Km ve 500 mg/l Cf içeren MS besin ortamına aktarmışlardır. Sürgün rejenerasyonu için ise 2,4-D, 10 mg/l Kinetin, 100 mg/l Km ve 500 mg/l Cf içeren besin ortamı kullanmışlardır. Elde edilen transgenik bitkilerin gövde sürgünlerinin apikal bölgeleri 80 g/l sakkaroz içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler 10 günlük karanlık koşullardan sonra, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık periyotta ve 25 °C'de kontrollü klima odasında tutulmuşlardır. İki hafta sonra kültür başına ortalama 4-5 mikro yumru oluşturduğu belirlenmiştir.

Conner ve Dale (1996), tarlaya dikilen transgenik patates bitkileri için izolasyon mesafesinin ne kadar olması gerektiği üzerine çeşitli tarla testleri

uygulamışlardır. Araştırma sonucunda gen aktarımı yapılmış transgenik bitkilerde, 20 m'lik bir izolasyon mesafesinin güvenli olduğu rapor edilmiştir.

Teruno ve ark. (1997), yaptıkları çalışmada, çift kollu RNA ekspresyonu gösteren *pac 1* genini taşıyan transgenik patates hatları elde etmişlerdir. Bitki virüslerinin büyük çoğunluğunun RNA genomuna sahip olduğu ve çift kollu RNA ara ürünleri vasıtasıyla ile olduğu için *pac 1* geni için hedef olduğu ortaya konmuştur. Saflaştırılmış Patates İğ Yumru viroidi (PSTV), *pac 1* geni ekspresyonu gösteren ve göstermeyen *E.coli* izolatları ile inkübe edilmiştir. Devamlı *pac 1* ekspresyonu gösteren izolatla yapılan inkübasyonda, PSTV konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür. *E.coli*'den izole edilen *pac 1* geni, transformasyon plazmidine klonlanarak *A. tumefaciens* LBA 4404 hattına aktarılmıştır. Mikro yumrular, *A. tumefaciens* ile inoküle edilerek 50 mg/l Km içeren MS besi ortamında gelişen transgenik sürgünler köklendirilmiştir. Köklenme ortamında gelişen bitkiciklerin kontrol bitkilerine göre PSTV' ne % 100 oranında dayanıklı olduğu bildirilmiştir.

Beaujean ve ark. (1998), ekonomik önemi olan “Bintje”, “Desiree” ve “Kaptah Vandiel” patates çeşitlerini kullanarak etkili transformasyon protokolleri hazırlamışlardır. Transformasyonda patatesin internodiumları kullanılmıştır. Bu protokole göre kombine uygulamalar sonucunda boyuna kesilmiş internodium eksplantlarında % 90 oranında transformasyon başarısı sağlanmıştır. Transformasyonu yapılan bu dokulardan mikrokallus oluşumu için 0,8 mg/l Zeatin ilave edilmiştir. Transformasyon sonucunda 450 transgenik bitki regenere edilmiş ve bunların histokimyasal GUS analizleri ve moleküler analizleri yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda yaklaşık 7-8 hafta içerisinde yüksek oranda genotipten bağımsız ve düşük etkinlikte somaklonal varyasyon oluşumu gözlemlenmiştir.

Mohammed ve ark. (2000), patatesin tarla ve depolama dönemlerinde oldukça önemli zararlılarından olan patates böceği ve güvesi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. *Bt Cry5* geni *A. tumefaciens* aracılığı ile aktarılmış ve elde edilen bitki ve yumrular üzerinde beslenen böceklerde % 100 oranında larva ölümleri gözlenmişlerdir. Patatesin “Spunta” çeşidine aktarılan *Bt Cry5* geni ve etkili olan patatin promoter bölgesi içeren hatlarda % 25,6-31,1 düşük oranda larva ölümleri

gerçekleşmiştir. Yapmış oldukları çalışmalarda *Bacillus thuringiensis*'den izole edilen genin böcek kontrollerinde oldukça etkili olduğunu saptamışlardır.

Andersson ve ark. (2003), yapmış oldukları çalışmada herbisitler için hedef enzim olan acetohydroxyacid synthase (AHAS) enziminde A S653N de meydana gelen mutasyon sonucunda imidazolinon grubu herbisitler için toleranslık sağlayan gen izole etmişlerdir. Yaptıkları araştırmada seçici gen ile birlikte herbistlere toleranslık sağlayan gen uygun bir plazmide aktararak, patatesin transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Markör gen olarak β -glucuronidase (GUS) geni kullanılmıştır. Araştırma sonucunda, yüksek oranda transformasyon gerçekleştirilmiş ve genetik kaçışların çok düşük olduğu saptanmıştır. Elde edilen tahmini transgenik bitkiler GUS analizine tabi tutulmuş ve % 93-100 oranında GUS geninin geçtiği belirlenmiştir. Daha sonra bitkiler 0,5 μ M Imazamox (imidazolinon grubu herbisitler) içeren ortamlarda kültüre alınarak transgenik bitkilerin seleksiyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre de patatesteki yüksek oranda transformasyon sıklığının olduğu belirlenmiştir.

Johnson ve Veilleux (2003), patates fizyolojisinin modifikasyonları ve patojenlere karşı dayanıklılığın geliştirilmesi konusunda çalışmalar yapmışlardır. Yaptıkları araştırmalarda gelişmiş ülkelerde genellikle 2n-4n patates çeşidinin üretimi söz konusu iken, son zamanlarda birçok transgenik bitkilerin üretimi yapılmaya başlanmıştır. Bunlar içerisinde de özellikle patojenlere karşı dayanıklılık geni içeren bitkiler üretim materyali olarak az miktarda da olsa kullanılmaya başlanmıştır. Johnson ve Veilleux yapmış oldukları çalışmada diploid ve tetraploid patates genotiplerine *A. tumefaciens* aracılığı ile iki gen aktarmışlardır. Bu genler, *B. thuringiensis*'den izole edilmiş Patates Böceğine karşı dayanıklılık sağlayan *Cry* IIIA(a) endotoksin protein geni ve PVY kılıf protein genidir. Transgenik bitkilerden elde edilen tohumlarında çimlenmeleri ve tarımsal performansları (toplam yumru miktarı ve ortalama yumru ağırlığı) diğer bitkilerle karşılaştırıldığında herhangi bir olumsuzluk gözlenmemiştir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda ise *Cry* IIIA(a) geni taşıyan transgenik 2n-4n hibritlerinin üretim materyali olarak kullanılmasının maliyeti düşürdüğü ve bitki fenolojisi üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Hamdi ve ark (2003), patatese *A. tumefaciens* aracılığı ile higromisine karşı dayanıklılık sağlayan (*Hpt II*) marker genini aktarmak ve bitki rejenerasyonu ile ilgili protokollerin elde edilmesi konusunda çalışmalar yapmışlardır. *Nicotinia plumbaginifolia*'nın *Cat 2* geni ve *Gossypium hirsutum*'un *SU2* genleri transformasyonda katalizör olarak kullanılmıştır. İki antibiyotik konsantrasyonu (5-10 mg/l) ve seçici olmayan ortamlar üzerinde bitkiler kültüre alınmışlardır. Bakteri ile ortak kültür ortamları içerisinde 10 mg/l asetosyringon kullanılması sonucunda transformasyon etkinliğinin ve bitki rejenerasyonunun arttığı saptanmıştır. Tahmini transgenik bitkiler köklendirilmiş ve yapılan PCR analizi sonuçlarına göre elde edilen bitkilerin % 45'inin transgenik olduğu tespit edilmiştir.

Barrell ve ark. (2004), patatese (*Solanum tuberosum* L.) başarılı bir transformasyon için alternatif seçici sistemler konusunda çalışmalar yapmışlardır. Binary vektör olan PGPTV plazmidine farklı seçici markör genleri ekleyerek ve bazı modifikasyonlar yaparak pMOA1 ve pMOA5 plazmidleri transformasyonda kullanılmıştır. Seçici markör genler sağ ve sol DNA sınır bölgelerine yerleştirilmiştir. Bunlar; sırasıyla *Npt II*, *Hpt*, *dhfr* (methotrexate), *bar* (phosphothricin) ve *ble* (phleomycin) genleridir. Patates bitkisi üzerinde yapılan transformasyon çalışması sonucunda etkili bir transformasyon için uygun prosedürler geliştirilmiştir. Yapılan testlemeler sonucunda elde edilen bitkilerin % 95 oranında transgenik olduğu belirlenmiştir.

Turhan (2004), Desiree ve Maris Bard patates çeşitlerinde kallus oluşumunu teşvik ederek etkili bir transformasyon protokolü hazırlamıştır. Yapılan bu araştırmada, patates çeşitlerine oksalat oksidaz (oxalate oxidase) enzimini *Agrobacterium* aracılığı ile transformasyonu gerçekleştirilerek kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda genotip ve ortam içeriklerinin kallus oluşumu üzerine oldukça fazla etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Transformasyon sonucunda oksalat oksidaz enzimini içeren bitkilerde kallus oluşumu ve gelişimi üzerinde etkili bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Transformasyon yapılmış çeşitler ile yapılmamış çeşitler verim açısından karşılaştırılmış ve aralarında önemli farklılıklar bulunmamıştır.

Davidson ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada *A. tumefaciens*'in LBA4404 ve AGL1 izolatları kullanarak sekiz farklı patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerine kanamisine (*Npt II*) ve böceklerle karşı dayanıklılık (*Cry 1Ac9*) sağlayan genleri aktarmışlardır. Patatesin "Iwa" ve "Ilam Hardy" çeşitleri kullanılarak iki farklı bakteri izolatlarının transformasyon etkinlikleri karşılaştırılmış ve her iki izolatta da transformasyon sonrası rejenere olan sürgünlerin sayısında benzerlik olduğu belirlenmiştir. Fakat AGL1 izolatu ile yapılan transformasyon sonrasında bitkiler arasında çeşitlilik oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Daha sonra "Karaka", "Pacific", "Red Rascal", "Rua", "Russet Burbank" ve "White Delight" patates çeşitleri *A. tumefaciens*'in LBA4404 izolatu ile transformasyon yapılmıştır. Tahmini transgenik bitkiler *Npt II* için PCR analizi ile kontrol edilmiş ve toplamda 116 hattan 105 tanesi PCR analizi sonucunda pozitif sonuç vermiştir. PCR yapılmış bu bitkilerden 93 tanesinde ise *Cry1Ac9* geninin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen 77 transgenik bitkilerde sera koşullarında *Cry 1Ac9* protein genin patates güvesi (*Phthorimaea operculella*)'nin gelişimi üzerine olan etkisi açısından biyolojik testlemelere tabi tutulmuş ve 60 ng/g taze yapraklar kullanılmıştır. Sonuç olarak transgenik bitkilerin patates güvesinin larva gelişimini azalttığı anlaşılmıştır. Serada yetiştirilen ebebeyn bitkiler elde edilen transgenik bitkilerle fenolojik açıdan karşılaştırılmış ve 55 tanesinin tamamen ebebeyn bitki ile benzer özellikte oldukları belirlenmiştir. Elde edilen bitkilere Southern analizi yaparak dayanıklılık hatları ortaya çıkarılmıştır. *Cry1Ac9* geninin 2/5 oranında kopyalarının olduğu saptanmıştır. Birçok transgenik bitki hatları larva gelişimini azaltmış ve bunların ebebeyn bitki genotipine benzer olduğu belirlenmiştir.

Eliseu ve ark. (2004), Brezilya patates çeşitlerinde genetik transformasyon protokolü oluşturmak için çalışmalar yapmışlardır. Herbisit dayanıklılık geni, *Npt II* ve GUS genini içeren pGV1040 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi transformasyonda kullanmışlardır. Bitki materyali olarak, 3 tane yerel çeşit olan "Aracy", "Baronesa" ve "Montigueina" kullanmışlardır. Transformasyon ve transgenik bitkilerin elde edilmesi 2 aşamada gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkilerin doğal koşullara adaptasyonunu sağlandıktan sonra sera koşullarında geliştirmişlerdir. Gelişen bu bitkilerde ve kontrol bitkide sprey şeklinde

herbisit kullanılarak testlemeler yapılmıştır. Yapılan testlemeler sonucunda kontrol bitkide herbisitten dolayı ölümler gözlenirken, transgenik bitkilerde herhangi bir herbisit zararına rastlanmamıştır. Southern blot analizi ile histokimyasal ve florometrik analizler yapmışlardır. Araştırmada kullanılan 3 çeşit transgenik bitkilerden “Aracy” ve “Baronesa” çeşidinde yapılan bu transformasyon prosedürü ile başarı sağlanmadığı dolayısıyla transgenik bitki elde edememişlerdir. “Montigueina” çeşidi patates bitkisinde ise elde edilen bitkilerin hepsinin transgenik olduğu, yapılan analizler sonucunda belirlemişlerdir.

Yamaguchi ve ark. (2004), tatlı patatesin “Beniazuma” çeşidinde yaprak parçaları, petiol ve gövde doku parçalarında transformasyon ve rejenerasyon çalışmaları üzerine çalışmalar yapmışlardır. *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA105 izolatı transformasyonda kullanılmıştır. pIG121Hm binary vektör olarak *Npt II*, *Hpt* ve *Gus A* genlerini içermektedir. Üç dakikalık ortak-kültüvasyondan sonra üç eksplanttan oluşan kalluslar seçilmiştir. Transgenik bitkilerin selektif ortamı olarak Linsmaier ve Skoog (LS) ortamına ilave olarak 50 mg/l Km, 30 mg/l Hg kullanılmıştır. Bakterinin hücre içinden eradikasyonu amacıyla 250 mg/l Cf antibiyotiği kullanılmıştır. Ortam içerisinde 15,13 µM absisik asit (ABA) ve 2,89 µM GA₃ ilave edilerek dokulardaki kahverengileşmeyi engellemişlerdir. Elde edilen transgenik sürgünler açısından transformasyon etkinliği; gövde doku parçasında % 30.8, yaprak disklerinde % 11.2, petiollerde ise % 10.7 olduğunu belirlemişlerdir. *Gus A* ve *Htp* genleri açısından PCR analizi yapılmıştır. On sekiz bağımsız transgenik bitkilerden elde edilen genomik DNA'lardan *Gus A* geni açısından Southern hibridizasyonu yapılmış ve ¼ oranında T-DNA ya integre olduğunu belirlemişlerdir.

Meiyalaghan ve ark. (2005), yaptıkları çalışmalarda patatesin “Iwa” çeşidine *A. tumefaciens*'in CaMV35S izolatını kullanarak dört farklı *Cry* genlerini aktarmışlardır. Aktarılan tüm genlerin patates güvesi (*Phthorimaea operculella*) larvalarına karşı dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir. *CryIAc9* veya *Cry9Aa2* genlerini taşıyan transgenik hatlarının dayanıklılık seviyelerinin benzer olduğu, zararlının larva ve pupa gelişimini azalttığını belirlemişlerdir. Patatesin transgenik hatları *Cry I Ba1* geni içeren bitkiler üzerinde larva gelişimi ve ölüm oranının yüksek

olduğu ve *Cry ICa5* geni içeren bitkiler üzerinde ise patates güvesi larvalarının % 100 oranında ölümle sonuçlandığını saptamışlardır.

Okamoto ve ark. (2005), *A. tumefaciens* aracılığı ile transformasyonu yapılan bitkilerde genel olarak meydana gelen kahverengileşmeyi engellemek için indirgeyici bileşikler kullanmanın transformasyona etkisini araştırmışlardır. İndirgeyici bileşiklerden 5 tanesinde (askorbik (L-askorbik asit), sistein (L-cysteine), ditiotretol (dithiothreitol), merkaptotetal (mercaptoethale) ve glutation (glutathione)) tatlı patates transformasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. Seçilen 5 bileşiğin tatlı patatesten enzimatik kahverengileşmeyi önleyici etkisinin yanı sıra yaprak, kallus oluşumu ve vir genlerinin geçişine etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Tüm 5 bileşikte 20-60 mM konsantrasyonunda yapraklarda meydana gelen kahverengileşmeye karşı denemeler kurulmuştur. Ancak yapraklardan elde edilen kallus oluşumuna 10 mM konsantrasyonunda kullanılan glutathione hariç diğerlerinin kallus oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte yaptıkları çalışmalarda tüm bu bileşikleri düşük konsantrasyonda kullanılması sonucunda dokularda meydana gelen kahverengileşmeyi önlediğini belirlemişlerdir. Merkaptotetal'nin 1-10 mM konsantrasyonlarında kullanımı bakteriden bitki hücrelerine T-DNA molekülünün geçişi esnasında vir genlerin aktivasyonunu baskıladığını belirlemişlerdir.

Huai-Jun ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmalarda, CaMV 35S promotör bölgesinin kontrolü altında olan sınıf 1 patatin genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisine aktarmışlardır. Elde edilen transgenik bitkilerde PCR yapılarak gen çoğaltılmış ve Southern blot yöntemi ile de genin patates genomuna yerleştiği belirlenmiştir. Yaptıkları northern hibridizasyonu ile de transgenik bitkilerde normal olarak antisens gen geçişi olduğunu göstermişlerdir. Endojen sınıf 1 patatin mRNA'nın miktarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Transgenik bitkilerden elde edilen mikro yumruların toplam çözülebilir protein içeriği ve lipid aktivitesi % 36.4'den % 31.4'e gerilemiştir. Bu antisens genin genoma yerleşimi sonucunda yumru oluşumu ve yumrudan bitki oluşumunda azalma meydana geldiğini saptamışlardır.

Lafta ve ark. (2005), İzofenil transferaz (*Ipt*) geninin bitkiye aktarılması ile bitkilerde sitokinin hormon sentezinde hücre içinde katalizör olarak etki etmiş ayrıca yumru oluşumunda görevli patatin promotör bölgesini kontrol altında tutarak da bitki morfolojisi üzerine etki etmektedir. Yaptıkları çalışmalarda; İzofenil transferaz (*Ipt*) genini patatesin yaprak ve yumrularına *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile aktarmışlardır. Sürgün ve yumru oluşumu açısından elde edilen transgenik bitkiler normal bir gelişim göstermiştir. Ayrıca transgenik bitkilerde daha yaygın olarak stolon gelişimi olmasından dolayı yumru sayısı daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Toplam taze ve kuru yumru ağırlığının transgenik ve kontrol bitkilerde benzer olduğunu da belirlemişlerdir. Araştırmada kullanılan Zeatin konsantrasyonu transgenik bitkilerde yumru oluşumunu arttırdığı, yaprak oluşumu üzerinde etkisinin olmadığını saptamışlardır. Elde ettikleri transgenik bitkilerde *Ipt* geni açısından Southern blot, northern hybridizasyon analizi ile genin geçişlerini tespit etmişlerdir.

Banerjee ve ark. (2006), biyoteknolojik çalışmalar için önemli bir ürün olan patates bitkisinde genetik transformasyon çalışmaları yapmışlardır. Patatesin (*Solanum tuberosum* subspecies *andigena*) yaprak doku parçalarını kullanarak *A. tumefaciens* aracılığı ile kanamisin ve *StBEL5* genini aktarmışlardır. Transgenik bitkilerde stok materyal gelişimi ve yaprak doku parçalarından etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Araştırmalarında bazal MS ortamına ilave edilen BAP ve NAA'ın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında yaprak doku parçalarından 7 gün sonra kallus gelişimi gözlenmiş, daha sonra Zeatin, GA₃ ve NAA fitohormonlarını içeren bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınan kalluslardan 28 gün sonra sürgün gelişiminin meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Elde edilen transgenik sürgünlerden kanamisin içeren hormonsuz bazal MS ortamında kök oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Kanamisinli ortamda köklenmiş bitkilerden 5 gün içerisinde % 91 oranında seleksiyon yapılmıştır. Köklenen bitkilerde doğal koşullara adapte edilmiş ve seçilen 20 tane bitkilerde gene spesifik genlerle RT-PCR yapmışlardır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda bakteri ile inokulasyondan 4 hafta sonra transgenik bitkiler elde ederek oldukça hızlı, etkili ve basit bir şekilde patatese gen aktarım protokolü oluşturmuşlardır.

Xing ve ark. (2007), tatlı patateslerde embriyogenik kallus oluşumunu teşvik etmek ve kalluslara pTCK303 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile *GUS* genini aktararak uygun prosedür oluşturulması üzerine çalışmalar yapmışlardır. Transformasyonu optimize etmek için bakteri yoğunluğu, öncesi kültür periyodu, ortak kültürasyon periyodu, bakteri solüsyonu içinde bekletme süresi, asetosyringon konsantrasyonu ve mannitol uygulama zamanı açısından araştırma yapmışlardır. *A. tumefaciens*'in EHA105 izolatı araştırmada kullanmışlardır. Transformasyonda kullanılan bakterinin konsantrasyonu OD 600nm de 0,8 olarak ayarlanmıştır. Embriyogenik kalluslara yapılan transformasyonda ön-kültür ve ortak-kültür aşamasının 4 gün olarak belirlemişlerdir, ayrıca bakteri içerisinde 10 dakika bekletmek, 200 µM asetosyringon ve 60 dakika mannitol uygulamasının da transformasyon etkinliğini arttırdığını belirlemişlerdir. Yapılan GUS analizi ile *GUS* geninin geçişinin yüzdelерinin fazla olduğunu saptamışlardır.

Chakravarty ve ark. (2007), yaptıkları çalışmalarda patates bitkisine *A. tumefaciens* aracılığı ile transformasyon çalışmalarını yapmışlardır. Patateste genetik transformasyonun faydaları ve avantajları, geleneksel yetiştiricilik metotları araştırmış ve uygun transformasyon protokolü oluşturmuşlardır.

Kamenova ve ark. (2008), patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say) patatesin en önemli ve fazla zarar veren böcekleri arasındadır. Bu böceğin popülasyonlarının yüksek olduğu dönemlerde patates bitkisinin tamamında deformasyonlar ve zarar görülmektedir. Yoğun böcek popülasyonları olduğu zaman kontrol edilmesi oldukça zordur. Çünkü patates böceği insektisitlere karşı dayanıklılık göstermektedir. Bu zararlıyı kontrol etmek için yaptıkları araştırmada biyoteknolojik yöntemler kullanmışlardır. Sentetik elde ettikleri *Bt* genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patates bitkisine aktararak patates böceğinin kontrol altına almayı amaçlamışlardır. Üç farklı Bulgaristan çeşidi patates bitkisi ile çalışmışlardır. Elde ettikleri bitkiler kurulan tarla denemeleri ile böceğe karşı test etmişlerdir. *B. thuringiensis* (*Bt*) den izole edilen *Cry* IIIA geni *A. tumefaciens* aracılığı ile patatesin 3 farklı çeşidine aktarmışlardır. Transformasyon sonrası elde edilen bitkiler DAS-ELISA ile serolojik analizler yapmışlardır. *Cry* IIIA protein yığınlarının bulunduğunu saptamışlardır. PCR analizi ile moleküler analizlerini ve

böceklerle besleyerek de biyolojik testler yapmışlardır. Böceklerin beslenmeleri sonucunda % 100 oranında larva popülasyonların da azalma olduğunu saptamışlardır. Yaptıkları bu çalışma ile etkili gen aktarım protokolünü ortaya çıkarmışlardır.

Badr ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmalarda patatesten transformasyon ve rejenerasyon sistemini geliştirmeye çalışmışlardır. Patatesin 4 farklı çeşidine *GUS* genini *A. tumefaciens* aracılığı ile aktarmışlardır. Transformasyon yapılan dokularda yüksek oranda rejenerasyon için çalışmalar yapmışlardır. Transformasyon sonrası kültüre alınan gövde dokuları, yaprak dokularına göre oldukça fazla kallus oluşumu ve rejenerasyon meydana getirdiği belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda rejenerasyon kabiliyetinin fazla olmasının bitkinin genotipine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. *GUS* geninin pozitif geçiş oranı “Hermes” çeşidi yapraklarında % 40, “Lady Rosetta” da % 92.8, gövde eksplantlarında ise; “Hermes” çeşidi % 33.3 ve “Lady Rosetta”da % 91.6 çeşidinde olduğunu belirlemişlerdir. RAPD-PCR analizleri ile bu bitkilerde somaklonal varyasyonun varlığını da tespit etmişler ve bunun da genotipe bağlı olduğunu belirlemişlerdir.

Arif ve ark. (2009), yaptıkları çalışmalarda patates tarımının yapıldığı geniş alanlarda tarım esnasında en fazla sorun teşkil eden Patates Yaprak Kıvrıkcılığı virus (PLRV) ve patates Y virüsü (PVY)’ne karşı dayanıklı patates bitkileri elde etmek amacıyla araştırma yapmışlardır. “Desiree” çeşidi patates bitkisinde *Agrobacterium tumefaciens*’ in LBA4404pBinplus PLRV izolatı kullanılarak genetik transformasyonlar yapılmıştır. Kültüre alınan patates eksplantlarının 25 hattında Km antibiyotikine dayanıklı kalluslar gelişmiştir. 250 mg/l Cf ve 50 mg/l Km içeren ortamlarda gelişen sürgünler kültüre alınmıştır. Buradan gelişen sürgünlerden DNA izolasyonu ve spesifik primerler kullanılarak PCR yapmışlardır. Yapılan PCR analizinde transgenik bitkiler spesifik PLRV replikaz geninin varlığı açısından 449 bp’lik bant oluşturmuşlardır. “Desiree” ve “Norkotah Russet” patates çeşidinde yapılan transformasyon sonucunda 2 adet kılıf proteini (RC4pBinPAubi3P ve RC435S) içerdiğini belirlemişlerdir. RC435S kılıf proteinini içeren “Desiree” çeşidi için transformasyon etkinliği oldukça yüksekken, “Norkotah Russet” çeşidinin birkaç hattında sadece bir tane kılıf proteinini (RC4pBinPAubi3P) içerdiği belirlenmiştir.

“Desiree” çeşidi patates bitkisinin de 13 tanesinde ise sadece Km’ye karşı dayanıklılık sağlayan genin olduğu belirlenmiştir. Yaptıkları araştırmada 42 tane saf transgenik bitkinin PCR sonucunda 28 bitki pozitif bantlar oluşturmuş ve bu bitkilerin üretimi yapılmıştır. Üretimi yapılan bu bitkiler virüs izolatlarına karşı dayanıklılık göstermişlerdir. Bu bitkilerden yapılan tarla denemelerinde Patates Yaprak Kıvrıcıklığı virüsü ve Y virusüne karşı kontrol bitkiye göre çok az bir hassasiyet gösterdiğini belirlenmiştir.

Khokan ve ark. (2009), patatesten gen aktarımı için uygun bir protokol oluşturmayı amaçlamışlardır. Çalışmalarında demir stoklarında artış sağlayan ferritin genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patatesten aktarmışlardır. Patatesin *in vitro* ve *in vivo*’da gelişen yaprak ve internodium doku parçalarını ve *A. tumefaciens*’in pCAMBIA2301 plazmidini taşıyan LBA4404 izolatı transformasyonda kullanmışlardır. Plazmid içinde ferritin geni ve markör gen olan neomisin fosfotransferase (*Npt II*) genini içermektedir. Transformasyon sonucunda seleksiyon ortamı olan 50 mg/l Km ve 500 mg/l Cf içeren antibiyotikli ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. Km antibiyotiğine dayanıklı sürgünler 5-6 hafta sonra gelişmiştir. Gelişen sürgünler tekrar aynı antibiyotik içeren ortamlar üzerinde kültüre alınarak köklendirme yapmışlardır. Doğal koşullara adapte edilen bitkilerden ferritin geni için PCR ve RT-PCR analizi yapmışlardır.

Listanto ve ark. (2009), patatesten en çok zarara neden olan mildiyö hastalığına karşı mücadele yöntemlerinden biriside bu etmene karşı dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Yaptıkları çalışmada *Phytophthora infestans* hastalık etmenine karşı dayanıklılığı sağlayan RB genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patates bitkisine aktarmışlardır. Çalışmaların sonucuna göre “Merbabu” ve “Atlantic” çeşidi patates bitkisinde başarılı bir rejenerasyon gerçekleştiği görülmüştür. En fazla “Merbabu” çeşidinde ortalama 30.6, “Atlantic” çeşidinde ise ortalama 22.8 sürgün meydana geldiği görülmüştür. “Granola” çeşidinde ise 50 mg/l Kanamisin konsantrasyonunda kültüre alınması sonucunda bitkinin oldukça hassas olduğu belirlenmiştir. *A. tumefaciens*’in pCLDO4541 plazmidini taşıyan izolatı ile transformasyon sonucunda elde edilen bitkilerde PCR analizi yapılmış ve 619 bp ve 840 bp lik iki tane çoğaltılmış bölgenin meydana geldiği gözlenmiştir.

Nazarian ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmalarda *Bacillus thuringiensis* den izole edilen *Cry* genlerinden Coleoptera takımı böceklerle karşı etkisini araştırmışlardır. İzole edilen *Cry* 1b, *Cry* 2, *Cry* 3a, *Cry* 3b, *Cry* IIIc, *Cry* 7a, *Cry* 8a, *Cry* 8b, *Cry* 8c, *Cry* 14, *Cry* 18, *Cry* 26, *Cry* 28, *Cry* 29,-34 ve *Cry* 35 genler biyolojik testlemelerde kullanılmış ve ayrıca izole edilen tüm *Cry* genleri için genel 31 primer kullanılarak PCR çalışmaları yapılmıştır. *Bacillus thuringiensis*' den izole edilen *Cry* genlerinin toksin proteinleri Coleoptera takımından *Xanthogaleruca luteola* Mull. larvalarında oldukça etkili olduğunu belirlemişlerdir. *Cry* genlerinden 46 izolatın Coleoptera takımı böceklerle karşı etkili olduğu ve % 65,7 oranında larva ölümlerine sebep olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen *Cry* genlerinin etkinlik ve farklılıklarının araştırmak amacıyla PCR çalışmaları yapılmışlardır. Kullanılan genel primerler kullanılarak yapılan PCR çalışmalarında izolatlar arasında en fazla sayıda *Cry* 18 ve *Cry* 26 toksin genlerinin bulunduğu ve bulunma oranının da *Cry* 18 için % 27.1, *Cry* 26 geni için ise % 24 olduğu tespit etmişlerdir. *Cry* 14, *Cry* 3, *Cry* 28, *Cry* 34, *Cry* 35, *Cry* 7, *Cry* 8 genleri yapılan PCR sonucunda az sayıda elde edilmişlerdir. Alınan sonuçlara göre *Cry* 14 için % 14.2, *Cry* 3 için % 12.5, *Cry* 28 için % 10, *Cry* 34 için % 7, *Cry* 35 için % 7, *Cry* 7 ve *Cry* 8 için ise % 5.6 oranında bulunduğunu tespit etmişlerdir. İzolatlar arasında *Cry* 11 geni % 48.5 oranında bulunmuştur. İkili zincirler içeren Coleoptera takımına etkili *Cry* genlerinin *X. luteola* larvasına karşı *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*'den daha fazla etkili olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatlardan 30 tanesinde *Cry* 1c, *Cry* 5, *Cry* 6, *Cry* 8b, *Cry* 9, *Cry* 10, *Cry* 11, *Cry* 18, *Cry* 24 ve *Cry* 35 toksin genlerinde PCR analizi sonucunda beklenmeyen band dizilimlerinin oluşturduğunu gözlemişlerdir. İzole edilen çok fazla *Cry* genlerinin etki mekanizmalarının benzer olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar ile yeni *Cry* 1c dizilimlerinin belirlenmesi ve bilinen diğer farklı *Cry* genlerinin saptanması, klonlanması ve PCR ile çoğaltılması konusunda uygun protokoller hazırlanmıştır.

Alejandro ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmalarda, *Bacillus thuringiensis* den izole edilen *Cry* III ve *Cry* IB genlerini *Agrobacterium* aracılığı patates bitkisine aktararak patates böceğine ve pamuk yaprak kurdu (*prodenya*)'na karşı dayanıklı çeşitler elde etmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkileri biyolojik testleme yöntemi

ile analiz yapmışlar ve yüksek oranda larva ölümlerinin meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Kumar ve ark. (2010), Hindistan çeşidi olan “Kufri Badshah” patates bitkisinde etkili bir transformasyon için çalışmalar yapmışlardır. Araştırmalarının ilk aşamasında *Cry 1Ab* geninin patates güvesine karşı etkinliğini belirlemişler daha sonra bu geni pBinCG1 vektörüne yerleştirerek transformasyonda kullanmışlardır. Plazmidde markör gen olarak *Npt II* geni eklenmiş ve transformasyon sonucu elde edilen bitkiler antibiyotikli ortamlarda seleksiyona tabi tutulmuştur. Seleksiyon sonucunda bitkiler doğal koşullara adaptasyonları sağlanmış ve PCR analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda *Npt II* geni için 713 bp, GBSSi promotör geni için 1206 bp ve *Cry 1Ab* geni için ise 713 bp lik spesifik bantlar oluşturduklarını saptamışlardır. Ayrıca transgenik bitkilerde gen interaksyonu için Southern hybridizasyonu yapmışlardır. Araştırma sonucunda gen geçişleri en fazla sırasıyla stolonlar, yumrular, olgun yaprak ve genç yapraklarda olduğu belirlemişlerdir. Elde edilen bitkilerde yapılan biyolojik testlemede yumrulara beslenen larvalarda yüksek oranda ölüm gözlemlendiğini belirlemişlerdir. RT-PCR ve Northern hybridizasyonu ile gen geçişleri tespit edilmiştir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda elde ettikleri transgenik bitkilerin böceğe karşı etkili bir dayanıklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Borna ve ark. (2010), “Diamant”, “Carinal” ve “Granola” ekonomik öneme sahip patates çeşitlerinin nodium ve internodium doku parçalarına *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyon çalışmasını yapmışlardır. Transformasyon amacıyla *Agrobacterium tumefaciens*'in GUS ve *Npt II* genlerini içeren pBI12 plazmidini taşıyan LBA4404 ırkı kullanılmıştır. “Diamant”, “Carinal” ve “Granola” patates çeşitlerinin nodium ve internodium doku parçaları kullanılarak kallus oluşumu sonrası rejenerasyon ve direkt rejenerasyon çalışmaları yapmışlardır. En fazla direkt sürgün rejenerasyonu sağlayan ortamın “Diamant” çeşidi için MS +4.0 mg/l BAP +1.0 mg/l IAA, “Cardinal” çeşidi için MS+ 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA ve “Granola” çeşidi için ise MS + 5.0 mg/l BAP +1.0 mg/l IAA olduğu tespit edilmiştir. *In vitro*'da elde edilen sürgünlerden mikro yumru oluşum için çalışmalar yapılmış en iyi mikro yumru oluşumu sağlayan ortamın ise MS ortamına 4.0 mg/l BAP +1.0 mg/l IAA ilave edilmesi ile elde etmişlerdir. Transformasyonun optimize

edilmesiyle % 87 oranında transformasyon başarısı elde etmişlerdir. Transgenik dokularda *GUS* geni içermesinden dolayı histokimyasal GUS analizleri yapılmıştır. Ayrıca elde edilen transgenik bitkilerde GUS and *Npt* II genleri için PCR analizleri yapılmışlardır.

Cingel ve ark. (2010), yapmış oldukları çalışmalarda “Dragacevka” ve “Jelica” yerli patates çeşitlerinde transformasyon çalışmaları yapmışlardır. Orizasistein genleri olan *OCI* ve *OCII* genlerini *Agrobacterium* aracılığı ile bu çeşitlerin yaprak doku parçalarına aktarmışlardır. İki farklı transformasyon yöntemleri denenmiş ve “Dragacevka” çeşidinde % 60-68 oranında, “Jelica” patates çeşidinde ise % 76-86 oranında transformasyon başarısı tespit edilmiştir. Tahmini transgenik bitkilerde *Npt* II geni için PCR analizleri yapılmıştır. *Npt* II geninin bitki genomuna yerleşme yüzdesi “Dragacevka” çeşidi için; % 90.9, “Jelica” çeşidi için ise, % 76.9 olduğu tespit edilmiştir. Yaptıkları çalışma sonucunda bitkilerde rejenerasyon ve transformasyon etkinliğinin bikri genomuna bağlı olduğunu belirlemişleridir.

3. MATERYAL VE METOD

Araştırma 2004-2011 tarihleri arasında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1 Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Araştırmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasallarla hazırlanan kültür ortamlarının içerikleri Ekler (Ek 1-13) kısmında verilmiştir.

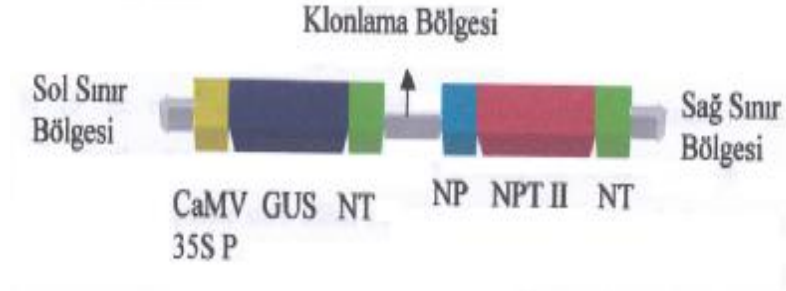
3.1.2. Transformasyonda Kullanılan Bitki Materyali

Araştırmada “Marfona” ve “Granola” patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerine ait *in vitro* bitkilerin internodium, sürgün ucu ve yaprak eksplantları transformasyonda bitki materyali olarak kullanılmıştır. Rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere istenilen bitki doku parçalarını elde etmek için patates bitkisinin “Marfona” ve “Granola” çeşitlerine ait yumrular *in vivo* da kumlu toprak ile hazırlanan saksılar içinde 5 tekerrürlü olacak şekilde ekilmiştir. Patates yumruları Toros Gübre A.Ş. ADANA’dan temin edilmiştir.

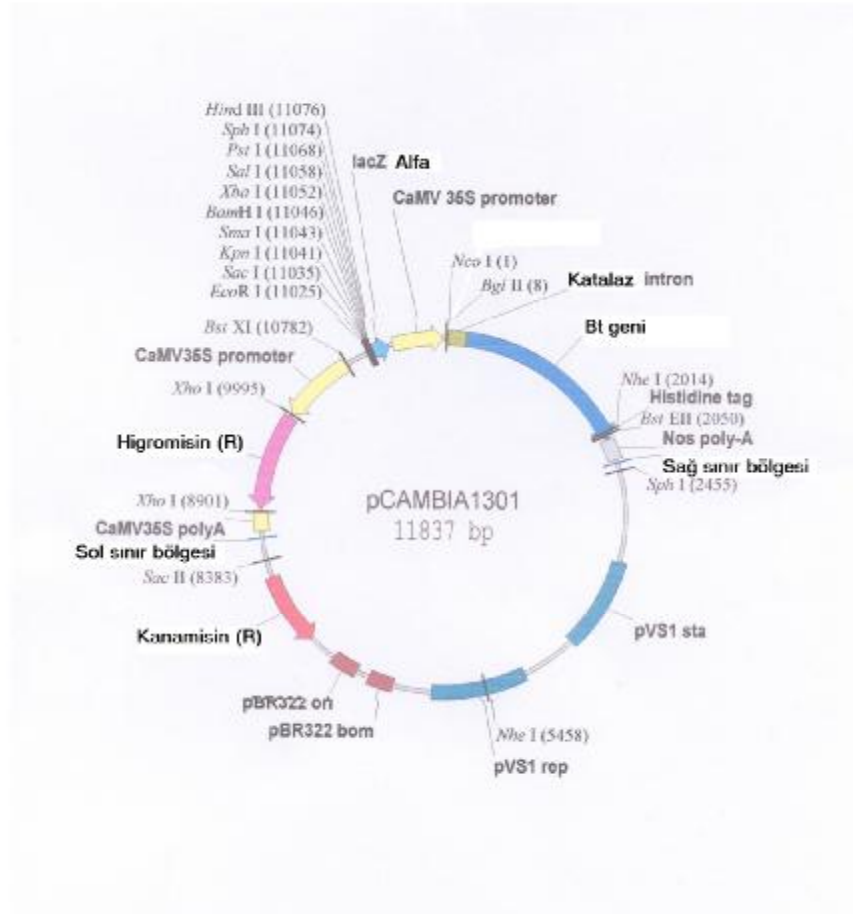
3.1.3. Gen Transferinde Kullanılan Plazmid ve *Agrobacterium tumefaciens* İzolatları

Araştırmada gen transferinde *Agrobacterium tumefaciens*’ in higromisine dayanıklılığını (*Hpt*) sağlayan markör genleri ile böceklerle karşı dayanıklılık (*Cry* 1A(c)) genini taşıyan pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA101 izolatı ve kanamisine dayanıklılık geni (*Npt* II) ile β -glukurodinaz (*GUS*) genlerini taşıyan pGA482GG plazmidini içeren EHA101 bakteri izolatı kullanılmıştır. *Cry* 1A(c) genini içeren pCAMBIA 1301 plazmidi İsrail Tarımsal Araştırma Organizasyonu,

Sebze Araştırma Bölümünden (Volcani Center, Bet-Dagan, İsrail) ve pGA482GG plazmidi Florida Üniversitesi, Turunçgil Araştırma ve Eğitim Merkezi (CREC, Lake Alfred, FL, USA)'nden temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan plazmidlerin haritası Şekil 3.1 ve 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bitki Transformasyonda Kullanılan pGA482GG Plazmidin de Bulunan Markör Genlerin Şeması



Şekil 3.2. Bitki Transformasyonunda Kullanılan pCAMBIA1301 Plazmidinin Haritası

3.2. Metod

3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Araştırmada kültür ortamı olarak Murashige and Skoog (1962) (MS) temel besi ortamı ile 500 mg/l MES ile farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonları ilave edilmiş MS besi ortamları kullanılmıştır. Bu besi ortamların içerikleri Ek 1' de verilmiştir. Kültür ortamı ve stok solüsyonlarının hazırlanmasında destile su (dH₂O) kullanılmış olup, bitki büyüme düzenleyiciler (hormonlar) ilave edilerek hazırlanan ortamların pH'sı 1-0.5 M KOH ve 1-0.5 M HCl ile 5.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan kültür ortamlarını katılaştırmak amacıyla % 0.2 fitojel ilave edilerek 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bu ortamlar otoklavda 121 °C' de 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika süre ile sterilizasyona tabi tutulmuştur.

Hazırlanan besi ortamlarına transformasyon sonrasında bakterileri öldürmek amacıyla antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Antibiyotikler ve bazı büyüme düzenleyici hormonlar (Zeatin ve GA₃) yüksek sıcaklıkta bozulmasından dolayı 0.22 µm por genişliğine sahip filtrelerden (Schleicher & Schuell) geçirilerek sterilizasyona tabi tutulmuş ve otoklavda steril edilmiş kültür ortamları 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril kabin içerisinde kültür ortamına ilavesi yapılmıştır.

3.2.2. Patates Bitkisi Yumrularının *İn Vitro* ve *İn Vivo* Koşullarında Kültüre Alınması ve Bitkilerin Elde Edilmesi

Araştırmada transformasyon çalışmalarında kullanılmak amacıyla, patates yumrularının dormansilerini kırmak için yumrular önce ortadan ikiye bölünmüş daha sonra 100 mg/l GA₃ içeren çözelti içerisinde 1 saat süre ile bekletilmiştir. Uygulamaya tabi tutulan yumrular daha sonra oda sıcaklığında (26±1 °C) karanlık koşullarda 1 hafta tutularak sürgün vermeleri sağlanmıştır. Sürgünler 1-2 cm uzunluğuna ulaştığında steril koşullarda % 70'lik etil alkol içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra % 0.1 tween-20 içeren % 5'lik ticari sodyumhipoklorit solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletilerek, 3 kez steril saf su ile yıkanmış ve daha

sonra steril filtre kağıtları üzerinde 5-10 dakika süre ile kurutularak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonu uygulanmış yumru sürgünleri steril kabin (Lamin air flow, Nüve LN,120) içerisinde sürgün meristemleri steril keskin bir bistürü ile 3-5 mm uzunluğunda kesilerek ve tüpler içerisinde % 2 sakkaroz ve % 0.2 fitojel içeren katı MS ortamı üzerinde klima odasında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda 26 ± 1 °C’ de kültüre alınmıştır (John ve ark. 1992; Sharma ve ark. 2000; Unlu Yuceer ve Koc 2006).

In vivo da yetiştirilen bitkilerinde sürgün uçları ve internodium parçaları steril koşullarda % 70’lik etil alkol içerisinde 1 dakika bekletilerek daha sonra steril saf su ile bir defa yıkanarak ön sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra farklı sürelerde (5, 10, 15 ve 20 dakika) ve farklı dozlarda (% 1, 3, 5, 10 ve 15) ticari sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonun uygulanmıştır. Sterilizasyondan sonra doku parçaları 3 kez steril saf su ile yıkanmış ve daha sonra steril filtre kağıtları üzerinde 5-10 dakika süre ile kurutularak işlem tamamlanmıştır. Sterilize edilen eksplantlar tüpler içerisinde % 2 sakkaroz ve % 0.2 fitojel içeren katı MS ortamı üzerinde 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda 26 ± 1 °C sıcaklığındaki klima odasında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan eksplantlardan 4-8 hafta sonra gelişen yaprak ve internodium doku parçaları transformasyonda kullanılmıştır.

3.2.3. Transformasyonda Kullanılan Bitki Doku Parçaları ve Ortamların Belirlenmesi

In vitro ve *in vivo* da kültüre alınarak elde edilmiş olan bitkilerin yaprak ve internodium doku parçaları kesilerek sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla bitki doku parçaları (0.1, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) BAP, (0.8, 1.0, 2.2, 3.0, 4.0, 4.78, 5.0 mg/l) Zeatin, (0.5, 1.0 mg/l) Kinetin, (0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 2.0 mg/l) GA₃, (2.0, 3.0 mg/l) 2.4-D, IBA, (0.02, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mg/l) NAA hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Bu sürenin sonunda en iyi sürgün gelişimi gözlenen ortam tespit edilmiş ve daha sonraki çalışmalarda bu ortam kullanılmıştır. Elde

edilen sürgünler en iyi kök gelişimini sağlayan uygun ortamın saptanması için farklı oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır.

3.2.4. *Agrobacterium tumefaciens* İzolatlarının Kültürü

Gen transferinde kullanılan *A. tumefaciens*' in pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA101 izolatı 50 mg/l Kanamisin (Km) içeren 10 cm çapındaki cam petri kutularında bulunan katı YEP ortamı (Ek 2-3) üzerine öze ile çizilerek 28 °C' de kültüre alınmıştır. Bakterileri taze olarak muhafaza etmek amacıyla katı ortam üzerinde gelişen bakterilerden bir ay ara ile bir koloni öze ile alınarak tekrar 50 mg/l Km içeren YEP ortamı üzerinde alt kültüre alınmış ve koloni gelişimini tamamlayana kadar bakteriler inkübatör içinde geliştirilmiştir. Koloni gelişimini tamamlamış olan bakteriler transformasyonda kullanılmaya kadar petri kutuları içerisinde +4 °C' de buzdolabında 1-1.5 ay muhafaza edilmiştir.

Her iki bakteri izolatının petri kutularında gelişen kültürlerinden birkaç koloni öze ile alınarak ve 100 ml'lik cam erlenmayerlerde bulunan, içerisinde 50 mg/l Km içeren 20 ml sıvı YEP ortamına inokule edilmiş ve 28 °C'de 200 devir/dakika' da çalkalayan bir çalkalayıcı üzerinde gece boyunca geliştirilmiştir. Gelişen bakteri kültüründen eksponensiyel safhada taze bakteri süspansiyonu elde etmek amacı ile bakteri sıvı kültüründen 500-1000 µl alınarak 100 ml' lik erlen mayer içinde 50 mg/l Km içeren 20 ml sıvı YEP ortamına tekrar inokule edilerek 5-6 saat süreyle çalkalayıcı üzerinde tekrar geliştirilmiştir (Sharma ve Ortiz 2000; Kayım 1997; Koc ve ark. 2007).

3.2.5. Transformasyonda Kullanılan Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması

Gen transferinde kullanılan *A. tumefaciens* inkübatörlü çalkalayıcı içinde 6 saat boyunca üretilerek bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyon 10 ml'lik plastik tüplere eşit miktarda dağıtılmış ve 15 dakika 2200 devir/dakika'da santrifüj (Sigma Mikro Santrifüj 1-14) edilerek bakterilerin tüplerin tabanına çökmesi ile bakteri pelleti elde edilmiştir. Pelletin üzerindeki sıvı, bir pipet yardımı ile alınmıştır.

Tüpün tabanındaki bakteri pelletinin üzerine transformasyon solüsyonu ilave edilmiştir. Transformasyon solüsyonunun içeriği Ek 4' de verilmiştir. Bakteri solüsyonunun içine pH'yı sabitlemek amacı ile MES [2(N-Morpholino) ethanesulfonic acid] ve bakterilerin virülensliğini arttırarak bitki dokusuna girişini teşvik etmek için 1 mg/l 2.4-D, 20 mg/l asetosiringon ve 5 mM Betain ilave edilmiştir (Koc ve ark. 1997) (Ek 5). Bu solüsyon ile sulandırılan bakteriler transformasyon için hazır duruma getirilmiştir. Transformasyonda kullanılacak olan bakteri yoğunluğu spektrofotometre (DİĞİLİLAB, HITACHI, U-2800) yardımı ile Optik yoğunluk (OD)=550-600 nm'de ölçülerek transformasyon için uygun değer olan OD=0.2'ye ayarlanmıştır (Banerjee ve ark. 2006; Koc ve ark. 2007).

3.2.6. Bitki Doku Parçalarının *A. tumefaciens* ile Transformasyonu

Transformasyonu optimize etmek için önce *Agrobacterium tumefaciens*'in pGA482GG plazmidini içeren EHA 101 izolatı daha önce *in vitro* da geliştirilen bitkilerin yaprak ve internodium doku parçaları ortak kültüre alınmıştır. Bunun için eksplantlar 3.2.5.'de belirtildiği gibi hazırlanan bakteri solüsyonu içinde 10, 15, 20, 30 ve 40 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda bir pens yardımı ile alınan bitki parçaları üzerindeki fazla bakteri solusyonunu almak için steril filtre kağıdının üzerinde bir süre bekletilmiştir. Daha sonra kotiledon yaprakların damarlı kısımları ortama temas edecek şekilde, internodium doku parçaları Ek 6' da verilen bitki regenerasyon ortamını üzerinde 26 ± 1 °C' deki klima odalarında karanlık koşullarda 1,2 ve 3 gün süre ile inkübe edilmiştir. Buradan alınan sonuçlar doğrultusunda *A. tumefaciens*' in pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA 101 izolatı ile aynı yöntemle inokulasyon yapılmıştır (Ooms ve ark. 1987; Visser ve ark. 1989; Kayım 1997; Kayım ve ark. 2004; Unlu Yuceer ve Koc 2006).

3.2.7. Transgenik Bitkilerin Regenere Edilmesi

Bitki doku parçalarının iki gün süre ile bakteri ile birlikte kültüre alınmasından sonra çevresinde bakteri haleleri gözlenen bitki doku parçaları üzerindeki bakterileri

uzaklaştırmak amacıyla eksplantlar 300 mg/l Karbenisilin (Cb), 250 mg/l Sefotaksim (Cf), 10 mg/l Higromisin (Hg) ve 50 mg/l Km antibiyotiklerini içeren bitki rejenerasyon ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan dokulardan bitki rejenerasyonu amacıyla farklı eksplantlar için farklı ortamlar kullanılmıştır. Yaprak ve internodium doku parçalarından rejenerasyon için antibiyotikler (Cb, Km, Cf, Hg) ilave edilmiş, Ek 7' de verilen modifiye edilmiş MS ortamları kullanılmıştır. Transformasyon sonrası elde edilen bitkilerin doku parçalarından GUS analizi (Jefferson ve ark. 1987) yapılmış ve bu sayede transformasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir. Daha sonra diğer bakteri izolatı ile de aynı yöntemlerle transformasyon yapılarak bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitki parçaları her 15 günde bir alt kültüre alınarak ortamlar tazelenip sürgün rejenerasyonu izlenmiştir. Bakteri ile inokule edilmeden antibiyotikli ortam üzerinde kültüre alınan bitki doku parçaları negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3. Transgenik Bitkilerde *İn Vitro* Mikro Yumru Oluşumu

Yaprak ve internodium doku parçalarından gelişen tahmini transgenik bitkiler bazal MS, farklı konsantrasyonlarda Kinetin (1, 1.5, 2 ve 2.5 mg/l), NAA (0.1, 0.5 ve 1 mg/l) ile sakkarozun farklı düzeyde miktarlarını içeren (0, 15, 30, 45, 60 ve 90 g/l) MS ortamı üzerinde karanlık ve aydınlık koşullara sahip klima odasında kültüre alınarak mikro yumru oluşumları teşvik edilmiştir (Romanov ve ark. (2000; Yu ve ark. 2000; Altındal ve Karadoğan 2010).

Elde edilen sonuçlar tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizi MSTAT-C paket programı kullanılarak istatistiki farklılıkları belirlenmiştir.

3.4. *GUS* Geni Ekspresyon Analizi

3.4.1. Histokimyasal *GUS* Analizi

3.4.1.1. Örneklerin Hazırlanması

Histokimyasal *GUS* analizi yapılmadan önce bitki doku parçaları (yaprak ve internodium) *A. tumefaciens*' in EHA101 izolatu ile inokule edildikten sonra bitki eksplantları antibiyotikli seçici besin ortamı üzerinde 26 ± 1 °C de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullara sahip klima odalarında kültüre alınmıştır.

3.4.1.2. *GUS* Analizi

Histokimyasal *GUS* analizi Jefferson ve ark. (1987)' nin geliştirdiği yöntem temel alınarak Kayım (1997) tarafından yapılan modifikasyona göre yapılmıştır. Bu amaçla daha önceden hazırlanan transgenik bitki dokuları Ek 8-9' da verilen X-Gluk solusyonu içinde 37 °C' de 1-24 saat karanlıkta inkube edilmiştir. Bitki doku parçaları belirli aralıklarda kontrol edilerek dokularda meydana gelen mavi renk değişimi gözlenerek dijital fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. Regenere Edilen Bitkilerin Köklendirilmesi

Yaprak ve internodium doku parçalarından gelişen bitkicikler farklı konsantrasyonlarda IBA (0.3, 0.5 ve 1 mg/l) ve NAA (0.1, 0.3, 0.5 ve 1 mg/l) içeren modifiye edilmiş MS ortamı üzerinde kültüre alınarak kök oluşumları teşvik edilmiştir.

3.6. Köklenen Bitkilerin Toprağa Aktarılması ve Adaptasyonları

In vitro koşullarda transformasyon sonucu elde edilen bitkilerden kök oluşturanlar ve yaklaşık 15 cm boyuna ulaşan bitkiler tüpler içerisinden çıkarılıp

köklerindeki ortam kalıntıları çeşme suyuyla iyice yıkanarak temizlenmiştir. Bu aşamada köklerde olacak zedelenme sonucu meydana gelecek yaralardan herhangi bir hastalık etmeninin girişini engellemek amacıyla koruyucu bir fungusit olan Captan (2 g/l) içeren su içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Bitkiler daha sonra 1:1 oranında hazırlanmış olan torf ve perlit içeren karışıma aktarılmıştır. Toprağa aktarılan bitkilerin nem kaybını engellemek amacıyla iki hafta süre ile saksılar polietilen plastik bir torba ile kapatılmıştır. Bu süre sonunda plastik torbaların ağzı açılarak, 15 dakikadan bir saate kadar değişen zaman aralıkları ile 2 hafta boyunca açık tutulmuş ve bitkilerin normal sera şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır. Serada sıcaklık 26 ± 1 °C olarak, aydınlatma ise normal floresan lambalar ile 16 saat olup, 8 saat karanlık olarak ayarlanmıştır.

3.7. Transgenik Olduğu Varsayılan Bitkilerin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi

3.7.1. Genomik DNA İzolasyonu

Saksıda geliştirilmiş olan bitkiler belli bir büyüklüğe gelince yapraklardan DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu bazı değişikliklerle Koç ve ark. (2007)'nin yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonunda, bitki yapraklarından yaklaşık 100 mg doku parçası alınarak 1.5 ml lik santrüfuj tüpler içerisine konulmuş ve üzerine sıvı nitrojen eklenerek plastik çubuklar yardımıyla bitki dokusu toz haline getirilmiştir. Toz halindeki yaprak parçalarını ekstrakte etmek amacıyla üzerine 500 µl ekstraksiyon tamponu (Ek 10) ilave edilmiş ve bir plastik uç ile karıştırılmıştır. Hazırlanan doku süspansiyonu 65 °C'deki suda 15-20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu karışım üzerine 0,7 hacim fenol 0,3 hacim 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol eklenmiş ve elde edilen bu bitki süspansiyonu nazik bir şekilde iyice karıştırıldıktan sonra +4 °C de 14.000 rpm de 10 dakika santrifuj edilmiştir. Santrifujden sonra tüpte 2 farklı faz oluşmuştur. Nükleik asitler üstteki sıvı kısımda olduğundan bu kısım yeni bir santrüfuj tüpüne aktarılmış ve kirli görünümde olanlar için bir önceki aşama

tekrar edilmiştir. İkinci kez üstteki sıvı alındıktan sonra 1 hacim 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol ilave edilerek tekrar +4 °C de 14.000 rpm de 10 dakika santrifuj edilmiştir. Aynı şekilde üstteki sıvı kısım tekrar yeni bir tüpe alınarak üzerine 50 µg/ml RNase (sigma) ilave edilerek 37 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu şekilde elde edilen DNA solüsyonunda RNA' ların yapısı RNase uygulaması ile bozulmuş olsada ortamda protein ve polisakaritler mevcut olduğundan bunları parçalamak amacı ile 50 µg/ml proteinaz K (sigma) solüsyona ilave edilmiş ve bir önceki basamakta olduğu gibi 37 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu şekilde kısmen saflaştırılmış olan DNA'yı tortu halinde çöktürmek amacıyla solüsyonun üzerine 0,6 hacim soğuk izopropanol ve 0,3 M sodyum asetat ilave edilmiştir. Solüsyon + 4 °C de 10 dakika 14.000 rpm de santrifuj edilerek DNA nın tüpün dip kısmında toplanması sağlanmıştır. Tortu halindeki DNA önce % 100' lük sonra % 70' lik etanol ile yıkandıktan sonra 10 dakika filtre kağıdı üzerinde normal hava koşullarında kurutulmuştur. Bu şekilde suyu uzaklaştırılmış tortu halindeki DNA 'yı çözmek ve solüsyon halinde saklamak amacı ile herbir santrifuj tüpüne 20 µl TAE (Ek 12) tamponu konulmuştur. Hazırlanan DNA örnekleri – 20 °C de çalışan derin dondurucuda saklanmıştır.

3.7.2. PCR Analizleri

Patates bitkisinden izole edilen DNA örnekleri *Npt II*, *Hpt* ve *GUS* genlerinin varlığı açısından PCR analizleri ile test edilmiştir (Roenhorst ve ark., 2005). Bu genlere spesifik dizayn edilmiş primerler oligonükleotid sentezi yapan firmalardan temin edilmiştir. *Npt II*, *Hpt* ve *GUS* genleri için sağ ve sol sınır olmak üzere iki adet primer kullanılmıştır. Bu primerler 21 nükleotidlik baz dizilerinden oluşmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonunda *Npt II* için (ileri primer 5' TGC GCT GCG AAT CGG GAGCG 3' ile geri primer 5' CAC GCA GGT TCT CCG GCCGC 3') primerleri, *GUS* için (ileri 5' CAT AGA GAT AAC CTT CAC CCGG 3' ile geri 5' GTG GGC ATT CAG TCT GGA TCG 3'), higromisin antibiyotiğine dayanıklılık geni için (ileri 5' CGG AGT CGT GGC GAT 3'), (geri 5' AGT TCG ACA GCG TCT 3') primerleri kullanılmıştır (Beaujean ve ark. 1998; Barrell ve ark. 2004). PCR

için ilk önce 3.7.1.'de anlatıldığı gibi DNA izolasyonu yapılmış ve her örnek için 50-100 ng DNA kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı için 0.4 µl dNTPs (10 mM), 2.5 µl PCR bafırısı (50 Mm KCl, 10 Mm Tris-HCl (25°C'de pH:9.0), 1.5 mM MgCl₂ ve 0.1 % Triton X-100) (10x), 2.5 µl MgCl₂ (15 mM), 1 µl Primer 1 (100 ng) , 1 µl Primer 2 (100 ng), 1 µl DNA (50-100 ng), 0.2 µl Taq Polimeraz (5 U/µl), karıştırılmış ve toplam hacim ddH₂O ile 25µl olacak şekilde 0.5 ml'lik santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. PCR tüpleri *Npt II*, *Hpt* ve GUS genlerinin çoğaltılması için gerekli olan ve daha önceden programlanmış PCR aleti (Techne) içerisine yerleştirilmiş ve program 94 °C'de 1 dakika 1 döngü, bunu takip eden diğer program, 94 °C'de 1 dakika, 68 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 1 dakika olmak üzere 30 döngü olarak uygulanmıştır. Döngü tamamlandıktan sonra örnekler 72 °C'de 4 dakika daha inkübe edilmiştir. *Npt II*, *GUS* ve *Hpt* genlerinin varlığı yapılan PCR analizleri ile kanıtlanmıştır. *Cry 1A(c)* geninin bazı bölgeleri mutasyonla modifiye edilerek Monsanto firması tarafından patentli olmasından dolayı baz dizilimi gizli tutulmaktadır. Bu nedenle de bu gen için PCR yapılamamıştır. PCR döngüsü tamamlandıktan sonra PCR ürünleri agaroz jelde molekül ağırlıkları bilinen markörler kullanılarak elektroforez edilmiştir.

3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jeli 1xTAE (Tris asetat) (Ek 11) elektroforez tamponu kullanarak hazırlanmıştır. Amaca göre % 1'lik agaroz 1xTAE içerisinde mikrodalga fırında eritilmiş ve 60 °C ye kadar soğutulduktan sonra iki tarafı bant ile kapatılmış, taraklı jel kalıbına dökülmüştür. Agaroz katılaştıktan sonra bantlar ve tarak çıkartılmış jel kabı 1xTAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR sonucu elde edilen DNA örnekleri içerisine loading tamponu (Ek 12) eklenerek pipet yardımı ile çukurlara yerleştirilerek 2 saat 80 volt ile elektroforez edilmiştir bu şekilde DNA'ların katota (+) doğru göçü sağlanmış ve bromofenol mavi boya DNA'dan belli bir mesafe uzaklaştıktan sonra elektroforez tamamlanmıştır. Daha sonra jel EtBr (Etidium bromid) (Ek 13) ile 10-15 dakika boyanmış ve 1xTAE tamponu ile

yıkanmıştır. Böylece EtBr ile boyanan DNA örnekleri 260 nm dalga boyunda bir UV transillimünatör üzerinde incelenerek polaroid ve dijital fotoğrafları çekilmiştir.

3.8. Transgenik Patates Bitkilerinin Biyolojik Olarak Testlenmesi

3.8.1. Patates Böceği Üretimi

Üretim çalışmaları 26-27 °C sıcaklık, % 60-65 orantılı nem 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında yapılmıştır.

Bu amaçla plastik saksılarda yetiştirilmiş patates bitkileri 30×55×70 cm boyutlarındaki kafeslerde (Şekil 3.3, Şekil 3.4 A) 1 adet olarak konulmuştur. Arazi koşullarından toplanan Patates Böceği ergin ve larvaları her kafeste 10 adet olacak şekilde patates böceği ergini ve larvaları bırakılmıştır. Günlük kontrollerde kümeler halinde yapraklar üzerine bırakılmış yumurtalar alınarak (Şekil 3.4 B) üzeri tül ile örtülü kutular muhafaza edilmiştir. Yumurta paketlerinden elde edilen larvalar hem üretimde hem de biyolojik testlemede kullanılmıştır (Meiyalaghan ve ark. 2005; Nazarian ve ark. 2009).



Şekil 3.3. Biyolojik Testlemede Kullanılan Böcek Kafesleri



Şekil 3.4. Biyolojik Testleme Amacıyla Kontrollü Koşullarda Böcek Kafesleri İçerisinde Üretimi Yapılan Kontrol Patates Bitkisi (A) Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) ve Yumurta Paketi (Anonim 2009) (B)

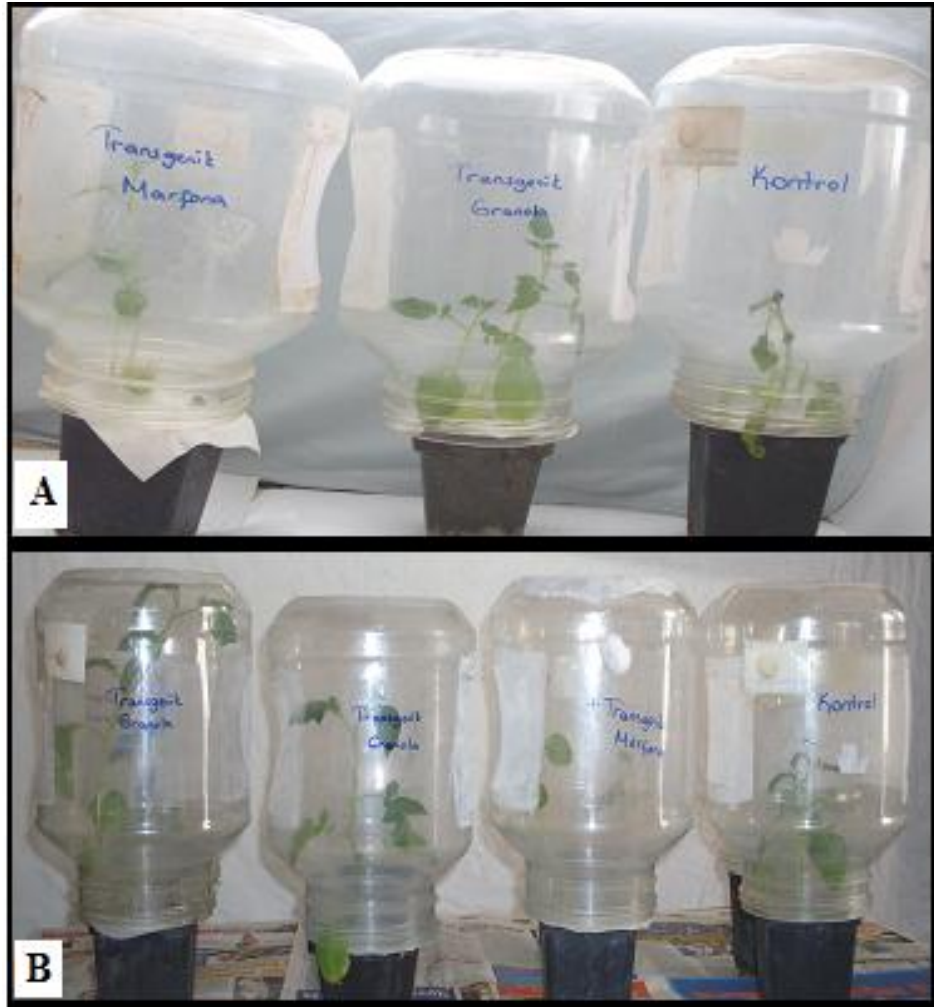
3.8.2. Transgenik Bitkilerde Biyolojik Testleme

Elde edilen transgenik bitkiler sera koşullarında böcek kafesleri içerisinde Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'nin farklı dönem (3. ve 4.) larva ve erginlerinden bitki başına 4 ve 5'er adet olacak şekilde denemeleri kurulmuş ve bu larva ve erginlerdeki ölüm oranı gözlenmiş ve elde edilen sonuçlara göre varyans analizleri yapılarak istatistiki olarak farklılıkları belirlenmiştir (Lagnaoui ve ark. 2000; Davidson ve ark. 2002; Davidson ve ark. 2004; Nazarian ve ark. 2009).

Patates böceğinin 3. ve 4. dönem larvaları transgenik "Marfona" ve "Granola" bitkileri ve kontrol ("Marfona" ve "Granola") bitkilerden alınan yapraklarla plastik petriler üzerinde 5 tekerrürlü deneme kurulmuştur. Kurulan denemede petriler üzerine steril filtre kağıtları nemlendirilerek, kontrol ve transgenik bitkilerin yaprakları konmuştur. Her bir petri üzerine 4 adet patates böceği yerleştirilmiş olup, 4 gün süre ile beslenerek bu süre sonunda larvaların ortalama ağırlığı alınarak elde edilen sonuçlar varyans analizi MSTAT-C paket programı kullanılarak istatistik analizleri yapılmıştır. Transgenik "Marfona" ve "Granola" çeşidi üzerinde 4 gün boyunca beslenen 3. ve 4. dönem patates böceği larvaların ağırlıklarında gözlenen farklılaşma verileri Ek 14'de verilmiştir. Yapılan istatistik analizlerinde alınan veriler, ana faktör günler, alt faktör olarak da uygulamada kullanılan bitkiler olacak şekilde bölünmüş parseller deneme desenine göre değerlendirilmiştir. Ortalamalar ise en küçük güvenilir fark (LSD) testine göre karşılaştırılmıştır.

Ayrıca, saksı içinde bulunan transgenik bitkiler ("Marfona" ve "Granola") ve kontrol ("Marfona" ve "Granola") bitkiler ile birlikte 26-27 °C sıcaklık, % 60-65 orantılı nem 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında biyolojik testleme için 3 tekerrürlü olacak şekilde deneme kurulmuştur. Bu denemede saksılar üzerine filtre kağıdı ile kapatılmış ve her bir saksıya patates böceğinden 5 adet 3. ve 4. dönem larva olacak şekilde konulmuş ve üzeri plastik balonlarla kapatılmış ve etrafı bantla sarılarak dışarıdan izole edilmiştir (Şekil 3.5). Her bir bitki üzerine 5 adet patates böceği yerleştirilmiş olup, 4 gün süre ile beslenerek bu süre sonunda larvaların ortalama ağırlığı alınarak yüzde ölüm ve gelişim oranları hesaplanmıştır. Yüzde ölüm oranı hesaplanması; kurulan deneme esnasında ölmüş larva, açılmayan

pupa ve ergin toplamlarının ayrı ayrı denemede kullanılan toplam beslenen larva sayısına bölünmesi ve bu çıkan değerlerin 100 ile çarpılması sonucu yüzde ölüm oranı değerleri bulunmuştur. Yüzde gelişim oranının hesaplanması ise; kurulan deneme esnasında açılan pupa, gelişen larva ve ergin toplamlarının ayrı ayrı denemede kullanılan toplam beslenen larva sayısına bölünmesi ve bu çıkan değerlerin 100 ile çarpılması sonucu yüzde gelişim oranı değerleri bulunmuştur.



Şekil 3.5. Saksıda Yetiştirilen *Cry* 1A(c) Genini İçeren Transgenik “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Patates Çeşitleri ile Kontrol Bitkilerin Yaprakları Üzerinde Beslenen Patates Böceği (*L. decemlineata* Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar

3.9. Transgenik Bitkilerden Elde Edilen Vejetatif Yumruların Testlenmesi

Doğal koşullara adaptasyonları sağlanmış olan transgenik bitkilerden vejetatif dönem sonrasında elde edilen yumruların dormansilerini kırmak için 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Dormansileri kırılan yumrular *in vivo* koşullarda kontrollü sera ortamında kültüre alınarak gelişmeleri sağlanmıştır. Elde edilen bitkilerden 3.7.1'de anlatıldığı gibi DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar 3.7.2'de anlatıldığı gibi Higromisin B antibiyotikine dayanıklılık geninin (*Hpt*) varlığı açısından PCR analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Araştırmada Kullanılan Bitki Materyallerinin Belirlenmesi

Yumruların ekilmesinden 4-8 hafta sonra vejetatif gelişme olduğu gözlenmiştir. “Marfona” patates çeşidinin “Granola” çeşidine göre çıkış gücünün yüksek, hızlı ve yatık büyüdüğü saptanmıştır (Şekil 4.1).

Ayrıca patates yumrularının meristemlerinden bitki elde etmek amacıyla, yumrular 100 mg/l GA₃ içeren çözelti içerisinde 1 saat veya +4 °C’de 1 hafta süre ile bekletmek, patates yumrularının dormansilerini kırmada etkili olduğu görülmüştür.

In vivo koşullardan *in vitro* koşullara sürgün uçları ve internodium doku parçalarının sterilizasyonunda farklı dozda kullanılan dezenfektan ve süresinin patates dokularındaki canlılığı, bakteri ve fungal etmenler tarafından oluşan bulaşıklık oranları üzerine olan etkileri Çizelge 4.1. de verilmiştir.

Yüzeysel sterilizasyona maruz bırakılan her iki patates çeşidine ait sürgün uçlarında sodyum hipoklorit yüzey sterilizasyon süresi ve uygulama dozu arttırıldığında canlılık oranının azaldığı, buna karşılık sürgün ucu doku parçasında bulaşıklık oranının ise doğrusal olarak azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.1.). Sürgün uçlarına göre daha dayanıklı olan gövde parçalarında %1-3 gibi düşük konsantrasyonda sodyum hipoklorit uygulamasında bulaşıklık oranı oldukça fazla olmuştur.



Şekil 4.1. *In vivo* Koşullarda “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Patates Çeşitlerinin Yumrularından Geliştirilmiş Patates (*Solanum tuberosum* L.) Bitkileri.

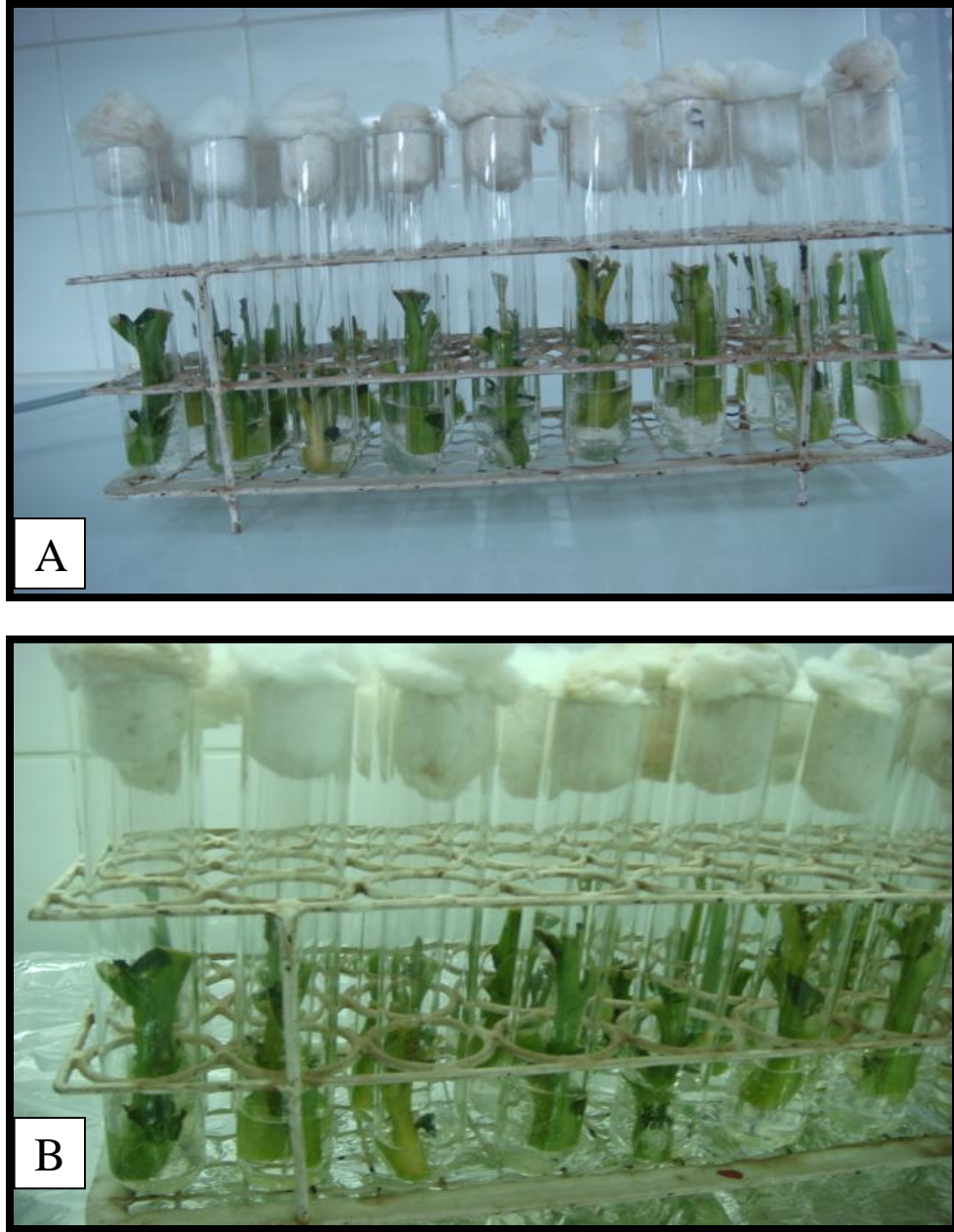
Çizelge 4.1. Yüzey Sterilizasyonu Amacıyla Kullanılan Ticari Sodyum Hipokloritin Farklı Konsantrasyonlarının ve Sürelerinin “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerine Ait Patates Eksplantlarının Canlılığı ve Bulaşıklık Oranı Üzerine Etkileri

Sodyum hipoklorit Konsantrasyonları (%)	Süre (dakika)	Bitki Eksplantlarında Canlılık Oranı		Bulaşıklık Oranı (%)
		Sürgün Ucu	Gövde Parçaları	
1	5	100	100	100
3		100	100	
5		80	80	
10		50	60	
15		40	50	
20		30	40	
1	10	100	100	50
3		100	100	
5		80	100	
10		50	70	
15		40	50	
20		30	40	
1	15	100	100	0
3		80	100	
5		50	80	
10		40	50	
15		40	40	
20		30	30	
1	20	80	100	0
3		60	90	
5		40	60	
10		20	30	
15		20	20	
20		10	15	

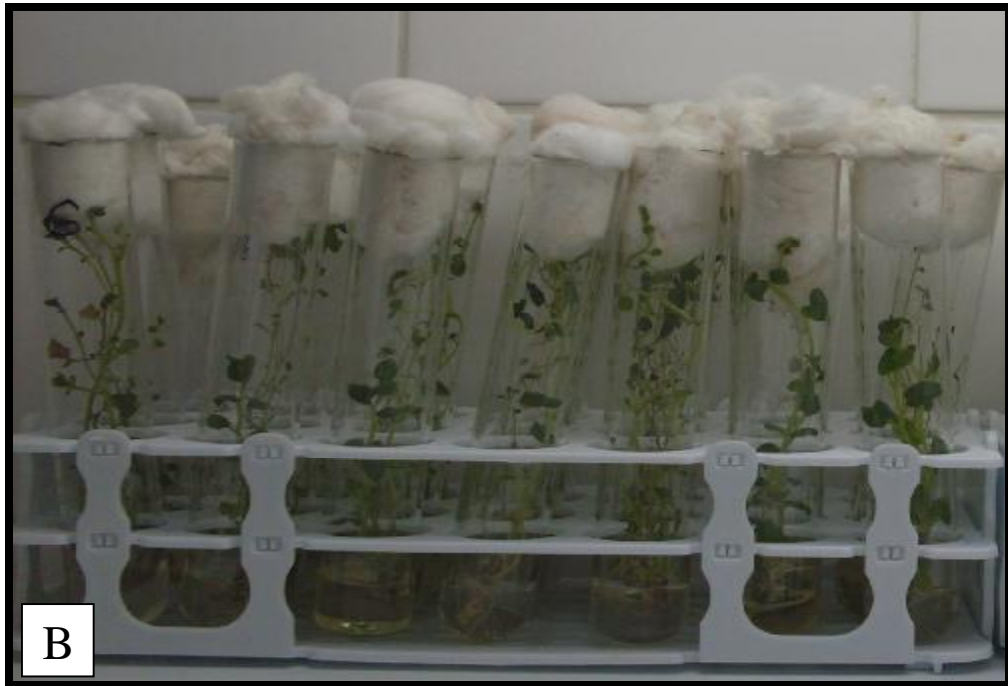
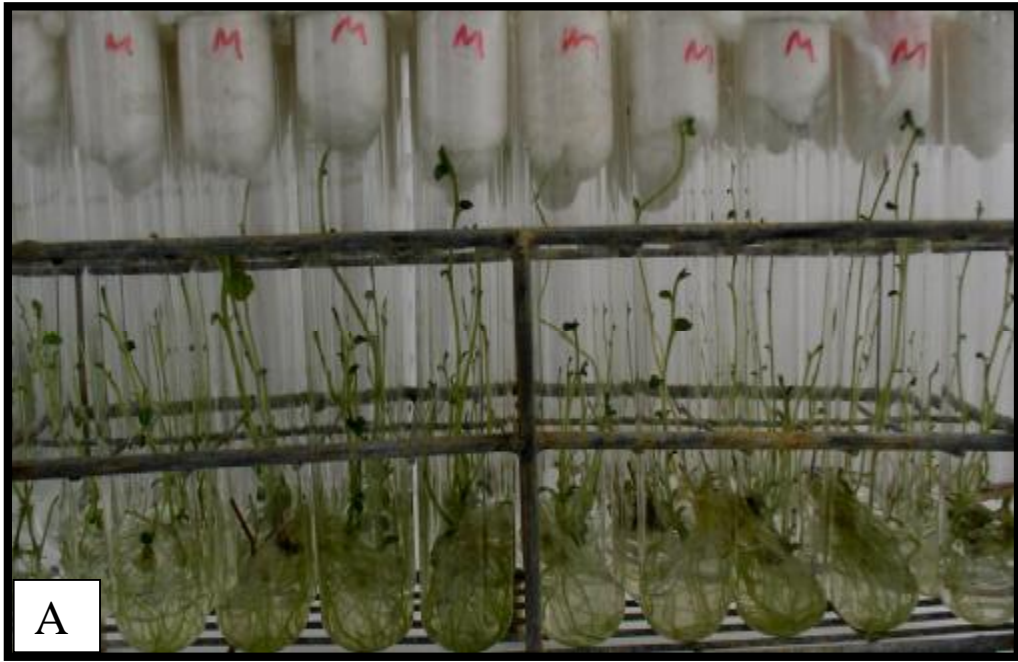
Çizelge 4.1. de görüldüğü gibi bitki doku parçalarının % 10, 15 ve 20’lik sodyum hipoklorit ve % 0.1 Tween-20 içeren çözelti içerisinde 10-15-20 dakika gibi farklı sürelerde bekletildiği uygulamalarda eksplantlardan bitki rejenerasyonunun gözlenmediği ve bitki doku parçalarının kahverengileşerek zaman içerisinde öldüğü gözlenmiştir. % 1’lik sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilen dokuların, canlılıklarının devam ettiği fakat yoğun miktarda saprofit patojenlerle bulaşık olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda en uygun sterilizasyon konsantrasyonunun % 3’lük sodyum hipoklorit olduğu belirlenmiştir. % 3’lük sodyum hipoklorit ve % 0.1

Tween-20 içeren çözelti içerisinde 10 dakika bekletilmiş, bu süre sonunda 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Kültüre alınan doku parçalarında saprofit bakteri gelişimini engellemek amacıyla bu aşama iki kez tekrarlanmıştır. Daha sonra eksplantlar steril filtre kağıtları üzerinde 5-10 dakika süre ile kurutularak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Sterilizasyon işlemi tamamlanan “Marfona” ve “Granola” bitki eksplantları 4-5 cm uzunluğunda kesilerek tüpler içerisinde % 2 sakkaroz ve % 0.2 Fitojel içeren katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı üzerinde klima odasında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda 26 ± 1 °C’ de kültüre alınmıştır (Şekil 4.2 A,B). Kültüre alınan eksplantlardan 4-8 hafta sonra normal bitki gelişimleri gözlenmiştir (Şekil 4.3 A,B). Şekil 4.3 A,B’de görüldüğü gibi *in vitro* gelişen bitkiler 2-3 hafta aralıklarla alt kültüre alınmıştır. Böylece buradan gelişen bitkiler uygun rejenerasyon ortamının belirlenmesinde ve transformasyonda kullanılmıştır.



Şekil 4.2. *In Vivo* Koşullarda Yetiştirilen “Marfona” ve “Granola” Bitkilerinin Sürgün Uçları ve İnternodium Parçalarının *In Vitro* Koşullarda % 2 Sakkaroz ve % 0.2 Fitojel İçeren Katı MS Ortamı Üzerinde Cam Deney Tüpleri İçerisinde Kültüre Alınması (A: “Marfona”), (B: “Granola”).



Şekil 4.3. *In Vivo* Koşullarda Kültüre Alınan Eksplantlardan Transformasyonda Kullanılmak Üzere Cam Deney Tüplerinde % 2 Sakkaroz ve % 0.2 Fitojel İçeren Katı MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Patates Bitkilerinin Gelişimleri (A: “Marfona”), (B:”Granola”).

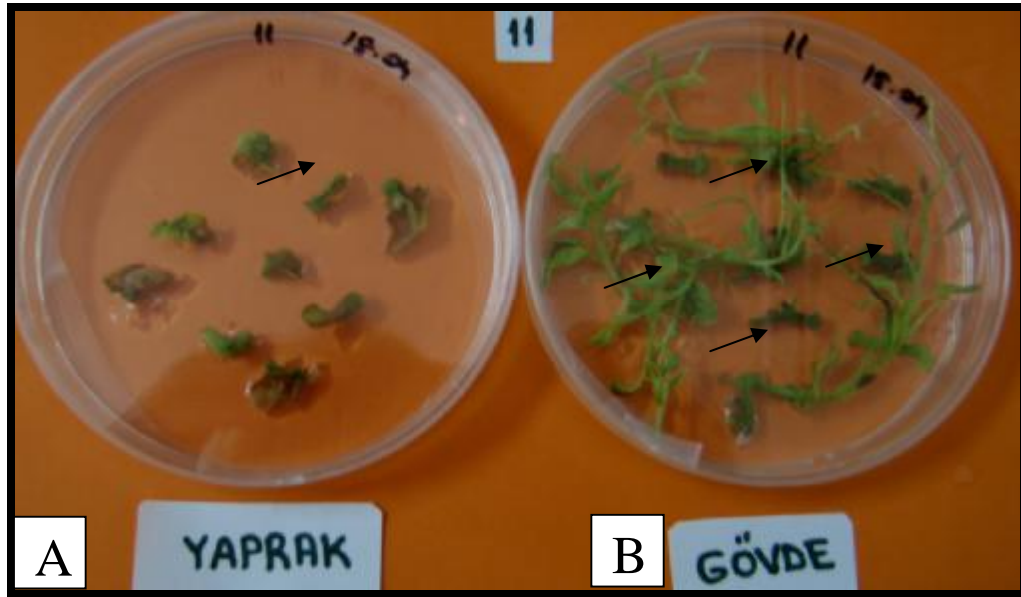
4.2. Bitki Rejenerasyon Ortamlarının ve Transformasyon İçin Eksplant Örneğinin Belirlenmesi

Materyal ve Metod bölümü 3.2.3.'de belirtildiği şekilde kültüre alınan eksplantlardan bitki rejenerasyonu, yaprak doku parçalarında diğer eksplantlara göre daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4, 4.5A). Diğer taraftan internodium ve sürgün uçlarının farklı besi ortamları üzerinde kültüre alınması sonucunda bitki rejenerasyonu açısından oldukça iyi sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.5B, 4.6). Rejenerasyon ortamlarında gelişen sürgünler daha iyi gelişim göstermesi amacıyla cam deney tüpleri içerisinde bulunan en iyi gelişim gösteren ortamlar üzerinde alt kültüre alınmıştır (Şekil 4.7). Cardi ve ark. (1992), Alphonse ve ark. (1998), Hamdi ve ark. (1999), Merja ve Stasa (1999), yapmış oldukları çalışmalarda kullandıkları patates çeşitlerinde yaprak eksplantının rejenerasyon kapasitesinin gövde eksplantına göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Elaine ve ark. (1992), yapmış oldukları transformasyon çalışmalarında yaprak doku parçalarını kullanarak etkili bir rejenerasyon sağlamışlardır. Bu literatürler ile karşılaşılan farklılığın; kullanılan genotip farklılığından ve genotip \times besi ortamı etkileşmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

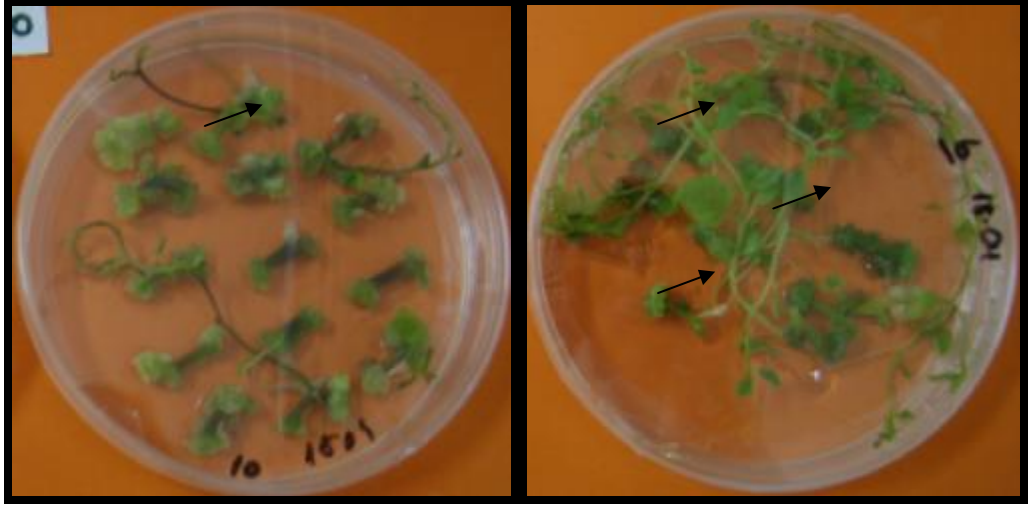
Diğer taraftan Garcia ve Martinez (1995), yapmış oldukları çalışmalarda, patatesin gövde doku parçalarında rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Kumar ve ark. (2010) yaptıkları çalışmalarında rejenerasyon ve transformasyon için en uygun doku parçasının gövde doku parçası olduğunu belirlemiş ve çok sayıda rejenere olmuş bitki elde etmeleri nedeniyle bu dokularda araştırma yapmışlardır. Yaptığımız çalışmalar bu araştırmacıların çalışması ile uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Patates Yaprak Doku Parçalarında Rejenerasyon Çalışmaları



Şekil 4.5. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren Ortamlar Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” ve “Granola” Patates Çeşidi Yaprak (A) ve İnternodium (gövde) (B) Doku Parçalarında Organogenesis ve Sürgün Rejenerasyonu



Şekil 4.6. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren Ortamlar Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” (sol taraf) ve “Granola” (sağ taraf) Patates Çeşidi İnternodium Doku Parçalarından Sürgün Gelişimi (Oklarla Gösterilmiştir)

Rejenerasyon çalışması için farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları içeren katı MS ortamları üzerinde kültüre alınan patates doku parçalarında (internodium ve yaprak), tesadüf parselleri deneme desenine göre istatistiki analizler yapılmış, analiz sonucunda çıkan farklılıklar DUNCAN çoklu karşılaştırma testi % 5’lik önem ile değerlendirilerek Çizelge 4.3’ de verilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonları İçeren Katı MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” Patates (*Solanum tuberosum* L.) Çeşidinin Gelişimi

Çizelge 4.2. MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” ve “Granola” Patates (*Solanum tuberosum* L.) Çeşitlerinin Kültüre Alınan Bitki Eksplantlarında Kallus Oluşumu ve Sürgün Rejenerasyonunda Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Etkisi

Kullanılan Ortamlar		Kullanılan Bitki Eksplantı	Kallus Oluşum	Rejenerasyon (%) *
MS ortamı+25 gr/l sakkaroz+ 1mg/l BAP+0,1 mg/l GA ₃	A	Gövde Yaprak	- -	40 efg 0
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz + 4 mg/l BAP+0,1 mg/l GA ₃	B	Gövde Yaprak	- -	18 ı 0
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz + 5 mg/l BAP+0,2 mg/l GA ₃	C	Gövde Yaprak	- -	28 hı 0
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz + 6 mg/l BAP+0,3 mg/l GA ₃	D	Gövde Yaprak	+ -	38 fgh 0
MS ortamı+25 gr/l sakkaroz + 1mg/l BAP+0,1mg/l NAA+0,1 mg/l GA ₃	E	Gövde Yaprak	+ -	40 efg 0
MS ortamı+25 gr/l sakkaroz + 0,8mg/l Zeatin+2mg/l GA ₃	F	Gövde Yaprak	+ -	50 de 0
MS ortamı+25 gr/l sakkaroz + 0,8mg/l Zeatin+2mg/l 2,4-D	G	Gövde Yaprak	+ +	22 ı 0
MS ortamı+16 gr/l glikoz+5mg/l NAA+0,1mg/l BAP **	-	Gövde Yaprak	+ +	0** 0**
MS ortamı+16 gr/l glikoz +2,2mg/l Zeatin+0,02 mg/l NAA+0,15 mg/l GA ₃	H	Gövde Yaprak	- -	82 ab 33 a
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz + 3 mg/l Zeatin+0,2 mg/l GA ₃	I	Gövde Yaprak	+ -	68 c 20 ab
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz+5 mg/l Zeatin+0,1 mg/l NAA	J	Gövde Yaprak	+ +	52 d 10 bc
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz +0,5 mg/l Kinetin+ 5 mg/l NAA **	-	Gövde Yaprak	+ +	0** 0**
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz+ 0,5 mg/l Kinetin+ 3 mg/l 2,4-D	K	Gövde Yaprak	+ +	34 gh 0
MS ortamı+20 gr/l sakkaroz + 4,78 mg/l Zeatin+0,01 mg/l IAA+0,2 mg/l GA ₃	L	Gövde Yaprak	- +	90 a 0
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz + 4 mg/l Zeatin+0,3 mg/l GA ₃	M	Gövde Yaprak	- +	72 bc 0
MS ortamı+30 gr/l sakkaroz + 1 mg/l Zeatin+0,1 mg/l GA ₃	N	Gövde Yaprak	- +	48 def 0

* Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar DUNCAN testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirlerinden istatistiksel olarak farksızdır.

** Gövde ve yaprak doku parçalarında bu ortamlar üzerinde kültüre alınması sonucunda rejenerasyon meydana gelmemesi nedeniyle yapılan istatistik analizinde değerlendirmeye alınmamıştır.

Çizelge 4.3. Patatesin Internodium (Gövde) Doku Parçasının Rejenerasyon Esnasında Kullanılan Farklı Ortamların Tesadüf Parselleri Deneme Desenine Göre Yapılan İstatistiki Analiz Tablosu ve DUNCAN testinde % 5'lik Önem Aşamasına Göre Değerlendirilmesi

Level		Least Sq Mean
L	A	90,000000
H	A B	82,000000
M	B C	72,000000
I	C	68,000000
J	D	52,000000
F	D E	50,000000
N	D E F	48,000000
A	E F G	40,000000
E	E F G	40,000000
D	F G H	38,000000
K	G H	34,000000
C	H I	28,000000
G	I	22,000000
B	I	18,000000

*Level: Kullanılan Ortamlar, Least Sq mean: Rejenerasyon oranı

Çizelge 4.2., 4.3. ve Şekil 4.8'de görüldüğü gibi gövde ve yaprak doku parçalarında yapılan rejenerasyon çalışmaları ve istatistik analiz çalışması sonucunda en iyi sürgün gelişimi % 90 oranında patatesin gövde (internodium) doku parçalarında MS ortamı + 20 gr/l sakkaroz + 4,78 mg/l Zeatin + 0,01 mg/l IAA + 0,2 mg/l GA₃ (L) ortamı üzerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Yapılan istatistik analizlere göre DUNCAN testinde ve % 5'lik önem aşamasına göre L ve H ortamında istatistiksel farklılıkların olmadığı belirlenmiştir. Bunu H, M ve I besi ortamlarının takip ettiği belirlenmiştir. E ve G ortamı üzerinde kültüre alınan gövde ve yaprak doku parçalarında kallus oluşumları meydana gelmiştir. Ancak bu kalluslardan da bitki rejenerasyonu gözlenmemiştir. En az sürgün gelişimi yine aynı eksplantta MS ortamı + 30 gr/l sakkaroz + 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA₃ (B) ortamı üzerinde gerçekleşmiştir.

Patatesin "Marfona" ve "Granola" çeşitlerinin yaprak doku parçalarını kültüre alınarak yapılan rejenerasyon çalışmalarında ise; rejenerasyon oranının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. En fazla sürgün gelişimi % 33 oranında MS ortamı + 16 gr/l glikoz + 2,2 mg/l Zeatin + 0,15 mg/l GA₃ + 0,02 mg/l NAA (H) ortamı üzerinde

geliştiği belirlenmiştir. Yaprak doku parçalarının rejenerasyon sonuçlarının istatistiksel analizlerinde aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenden dolayı ileride yapılacak olan transformasyon çalışmalarında kullanılacak olan eksplantın internodium doku parçası olmasının daha uygun olduğu belirlenmiştir.

“Marfona” ve “Granola” patates çeşitlerine yapılan rejenerasyon çalışmalarında uygulanan farklı ortamların bitki rejenerasyonu açısından her iki çeşitte de benzer gelişimler göstermiştir.

Ooms ve ark. (1987); Visser ve ark. (1989), yapmış oldukları çalışmalarda daha kolay ve kısa sürede en fazla rejenerasyon oluşumunun internodium doku parçasından meydana geldiğini, yaprak doku parçalarında rejenere olan sürgün sayılarının daha az gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Beaujean ve ark. (1998) “Bintje”, “Desiree”, “Kaptah”, “Vandel” patates çeşitlerinde yapmış oldukları transformasyon çalışmalarında internodium doku parçalarını kullanmışlar ve % 90 oranında transgenik bitki elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile literatürler uyumluluk içerisindedir.

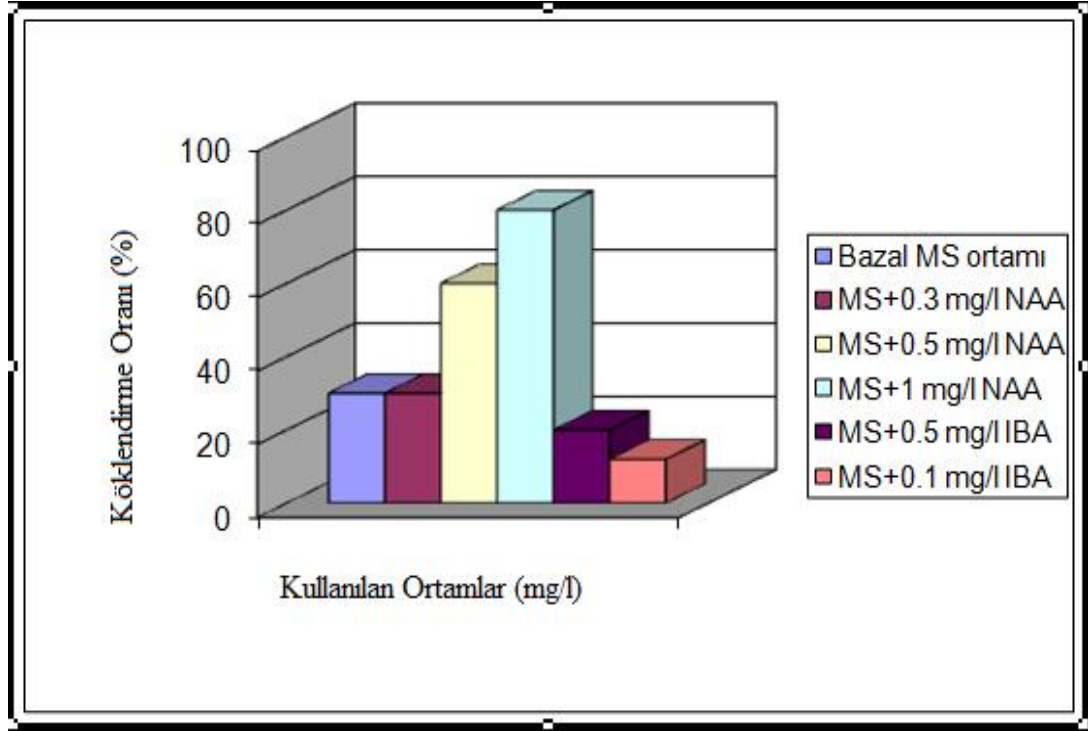
John ve ark. (1992) yapmış oldukları çalışmalarda “Desiree”, “Aran”, “Banner”, “Maris Piper”, “D31-11” patates çeşitlerinin yaprak doku parçalarını BAP ve NAA içeren ortamlar üzerinde kültüre alınması ile oluşan kalluslardan BAP ve GA₃ içeren ortamlar üzerinde bitki rejenerasyonunu gerçekleştirdiğini gözlemişlerdir. Bunun nedeninin kullanılan patates çeşitlerinin genetik özelliğinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Kurulan rejenerasyon denemelerinde kullanılan D, E, F, G, I, J, K, L, M ve N gibi farklı ortamlarda kültüre alınan doku parçalarında ise oluşan kallus oranının çok düşük olduğu görölmüşür (Çizelge 4.2.). Bu ortamlar üzerinde gelişen kallusların beyaz renkte oluştuğu ve sonradan kahverengileşmelerin meydana geldiği belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan bazal MS ortamında kültüre alınan doku parçalarının ortama temas eden kesim yerlerinde kök gelişimiyle beraber sürgün gelişimi veya organogenesis meydana geldiği saptanmıştır. İnternodium doku parçalarında ise basal MS ortamı üzerinde normal sürgün gelişiminin olduğu belirlenmiştir. Yaprak doku parçalarından elde edilen kalluslardan daha sonraki kültüre alımlarında herhangi bir bitki rejenerasyonunun

olmadığı belirlenmiştir. Kalluslardan sonraki alt kültürlerde de kahverengileşerek ölümlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Garcia ve Martinez (1995), yapmış oldukları çalışmalarda “Desiree” çeşidi patates bitkisinin internodium doku parçasını 4 mg/l 2,4-D içeren modifiye MS ortamı üzerinde kültüre aldıklarında dokulardan kallus gelişimini gerçekleştirmişler ve daha sonra aldıkları bu 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l GA₃ içeren MS ortamında alt kültüre aldıkları bu kalluslardan bitki rejenerasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Alphonse ve ark. (1998), yapmış oldukları çalışmada “Bintje” ve “Berolina” patates çeşitlerinin yaprak ve internodium doku parçalarından elde ettikleri kalluslardan bitki rejenerasyonunun gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Yapılan çalışma ile benzer sonuçların alınmamasının nedeninin farklı patates çeşitlerinin kullanılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Okamoto ve ark. (2005), yaptıkları çalışmalarda kullandıkları patates çeşitlerinde yaprak ve internodium doku parçalarında transformasyon çalışmaları yapmışlar ve internodium doku parçasından en fazla rejenerasyon oluşumunun gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Yine Ghaffoor ve ark. (2003), kullandıkları yerel patates çeşidinde internodium doku parçalarını transformasyonda kullanmışlar, sonrasında ise; bu dokularda meydana gelen rejenerasyon kapasitesinin ve transformasyon oranının oldukça yüksek olduğunu saptamışlardır. Yamaguchi ve ark. (2004), Barrell ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmalarda kullandıkları “Beniazuma” ve “Desiree” patates çeşitlerinde yaprak ve gövde doku (internodium) parçalarını transformasyon çalışmalarında kullanmışlar, transformasyon sonrası rejenerasyon ortamları üzerinde kültüre alınan dokulardan en fazla gövde doku (internodium) parçasının rejenerasyonu olduğu dolayısıyla en yüksek transgenik bitki eldesinde gövde doku parçalarının önemli olduğunu belirlemişlerdir. Bayroviç ve ark. (1995b), “Desiree” patates çeşidinde transformasyon çalışmaları yapmışlar; kullandıkları yaprak ve gövde (internodium) doku parçaları arasında en fazla rejenerasyon sağlayan dokunun gövde doku parçaları olduğu saptamışlar ve yaptıkları çalışmalarda rejenerasyon kabiliyetinin fazla olmasının bitkinin genotipine bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Khokan ve ark. (2009), yaptıkları çalışmalarda patatesin yaprak ve gövde (internodium) doku parçalarına ferritin genini transformasyon yöntemi ile aktarmışlardır. Gövde doku parçasının yaprak doku parçasına göre daha fazla

rejenerasyon sağladığını belirlemişlerdir. Tez kapsamında yapılan rejenerasyon çalışma sonuçları ile söz konusu literatürler uyum içerisindedir.

4.3. Rejenere Olan Bitkilerin Köklendirilmesinde Uygun Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarının Belirlenmesi

Yaprak ve internodium doku parçalarından rejenere olan bitkiler, 1-2 cm² olacak şekilde, NAA'in üç farklı konsantrasyonunda (0,3 mg/l, 0,5 mg/l ve 1 mg/l) ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren (0,1 mg/l ve 0.5 mg/l) MS ortamı üzerinde kültüre alınarak köklendirilmeleri teşvik edilmiştir. NAA'nın 1 mg/l içeren MS ortamında kültüre alınan sürgünlerden kök gelişiminin denenen diğer NAA konsantrasyonlarından ve IBA konsantrasyonlarına göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Benzer şekilde; Quak (1972), John ve ark (1992), Merja ve Stasa (1999), patates bitkilerinin köklendirilmesi amacıyla yapmış oldukları çalışmalarda 1 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünlerden kök gelişiminin en iyi olduğunu bildirmişlerdir.



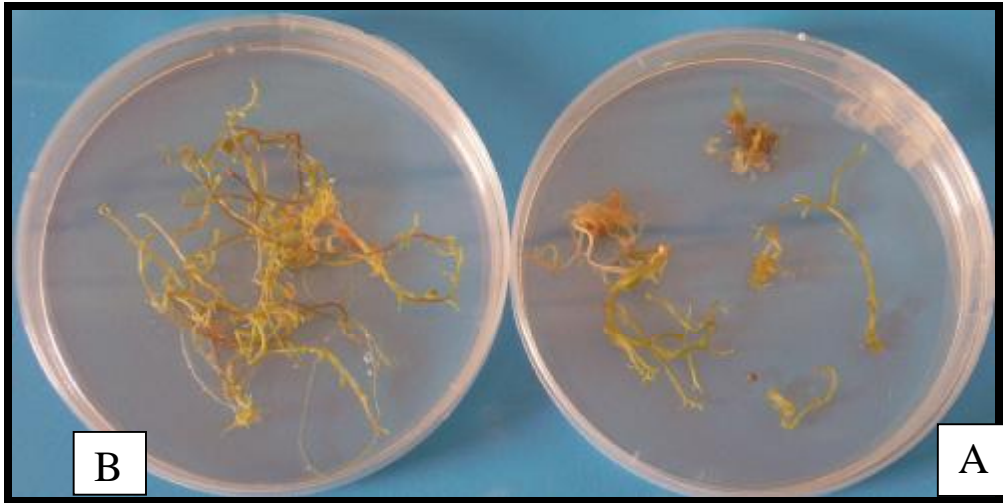
Şekil 4.8. *In Vitro* Koşullarda “Marfona” ve “Granola” Patates Çeşidi İnternodiuamlarından Gelişen Sürgünlerin Köklendirilmesinde NAA ve IBA’ın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

4.4. A. *tumefaciens* ile Patates Eksplantlarının Transformasyonu

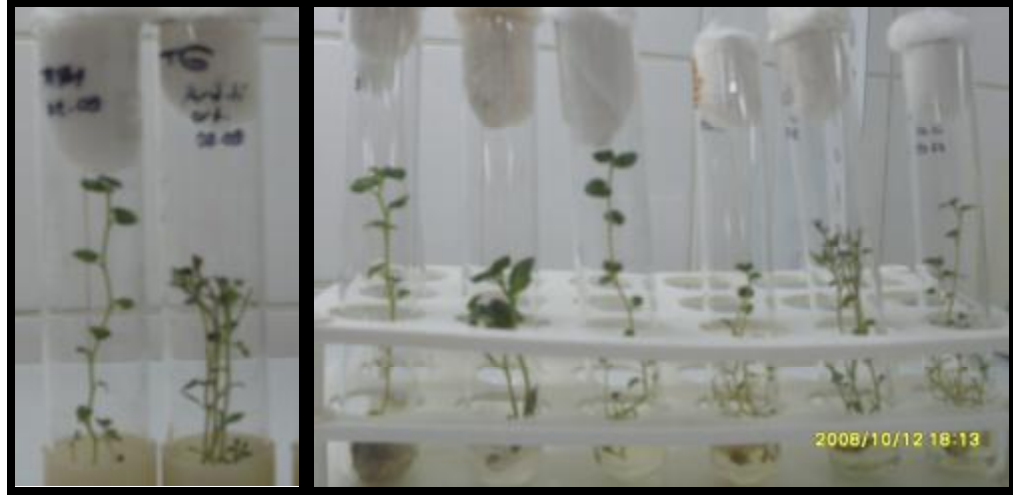
Patates bitkisinde genetik transformasyonunu optimize etmek amacıyla *A. tumefaciens*' in EHA101 izolatı ile 4.2.'de belirtilen bitki materyalleri kullanılarak transformasyonları yapılmıştır. Transformasyonun ilk aşaması olan bakteri solüsyonun hazırlanması esnasında içerisine 20 mg/l asetosiringon, 5 mM betain ve 1 mg/l 2,4-D ilave edildiğinde transformasyon sıklığının arttığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar; Elaine ve ark. (1992), Hamdi ve ark. (2003) ve Xing ve ark. (2007)'nin yapmış oldukları çalışmalarda da rapor edilmiştir. İnternodium eksplantların bakteri solüsyonunda farklı sürede (10, 15, 20, 30 ve 40 dakika) bekletilerek transformasyonun gerçekleştirildiği çalışmada eksplantların 20 dakika bekletilmesinin transformasyon sıklığı açısından en iyi sonucu verdiği saptanmıştır. Belirlenen sürelerden daha uzun süre bakteri solüsyonu içerisinde bekleyen bitki doku parçalarında kararırma ve sonrasında antibiyotikli ortam üzerinde kültüre alındığında yoğun bakteri gelişiminin devam ettiği ve bakterinin ölmediği

gözlenmiştir. Belirlenen sürenin altında bakteri solüsyonu içerisinde bekleyen bitki doku parçaları ise; antibiyotikli ortamlar üzerinde kültüre alınması sonucunda dokularda kararırma ve bir süre sonra hücre ölümleri gözlenmiştir. Antibiyotikli ortamda meydana gelen hücre ölümü ile transformasyon yapılmamış kontrol bitki parçalarının antibiyotikli ortam üzerindeki gelişimlerinin benzerlik göstermesi nedeniyle transformasyon süresinin gen aktarımı için yeterli olmadığı kanısına varılmıştır.

Transformasyonu yapılan dokular antibiyotik içeren rejenerasyon ortamı üzerinde kültüre alınması sonucunda tahmini transgenik bitkilerin 2-3 hafta sonra geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.9A, B). Elde edilen tahmini transgenik bitkilerin daha iyi gelişimlerini sağlamak amacıyla, bitkiler deney tüplerinde kültüre alınmışlardır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Patatesin “Marfona” Çeşidinde İnternodium Eksplantlarının pGA482GG Plazmidini İçeren *A. tumefaciens*'in EHA 101 İzolatı İle Transformasyonu Sonucu 300 mg/l Cb ve 50 mg/l Km içeren L Seçici Ortam Üzerinde Gelişen Tahmini Transgenik Bitkicikler (A), Aynı Ortam Üzerinde Kültüre Alınan Transformasyondan 3 Hafta Sonra Gelişen Tahmini Transgenik Bitkiler (B).

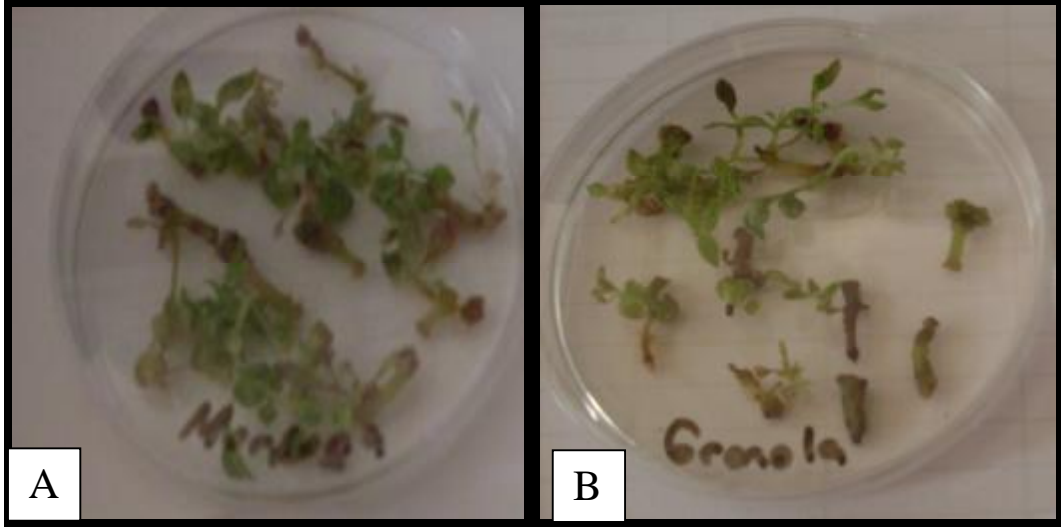


Şekil 4.10. *In Vitro* Koşullarda Transformasyondan 5 Hafta Sonra 300 mg/l Cb ve 50 mg/l Km İçeren Seçici L Ortamında Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” Bitkileri

Transformasyonun optimize edilmesinden sonra alınan sonuçlar doğrultusunda *A. tumefaciens*'in pCAMBIA 1301 plazmidini içeren EHA101 izolatı ile aynı yöntemle bitki eksplantlarına inokulasyon yapılmıştır (Şekil 4.11., 4.12.). Transformasyonda kullanılan 90 adet internodium doku parçasından 81, 30 adet yaprak doku parçalarından ise 6 adet birbirinden bağımsız tahmini transgenik bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Böylece yaprak doku parçasında transformasyondan sonra oldukça düşük rejenerasyon meydana gelirken, internodium doku parçalarından daha yüksek rejenerasyon seviyesinde transgenik sürgün gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *A. tumefaciens*'in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA 101 İzolatı İle Transforme Edilen İternodium ve Yaprak Eksplantlarında Transformasyon Sıklığı

	Kullanılan Eksplant Sayısı	Elde Edilen Sürgün Sayısı	Transformasyon Başarısı (%)
İternodium	90	81	90
Yaprak	30	6	20
Toplam	120	87	110

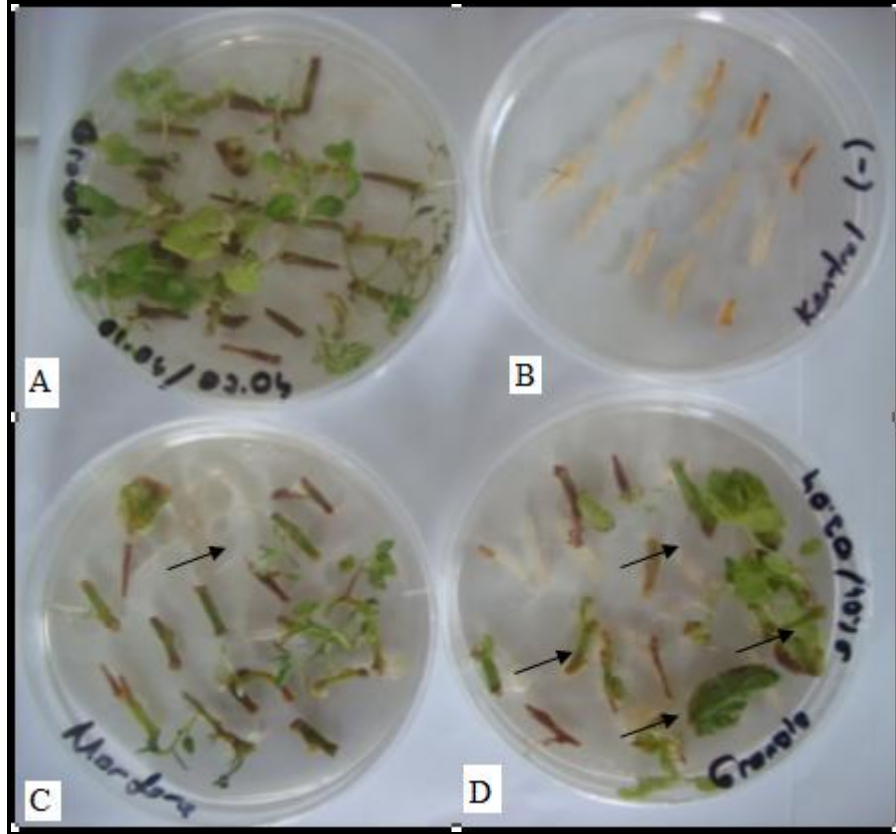


Şekil 4.11. *Cry 1A(c)* Genini İçeren *A. tumefaciens* ile Patates Bitkisinin “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Çeşitlerinde Transformasyon Yapılarak 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından 15 Gün Sonra Gelişen Tahmini Transgenik Patates Sürgünleri



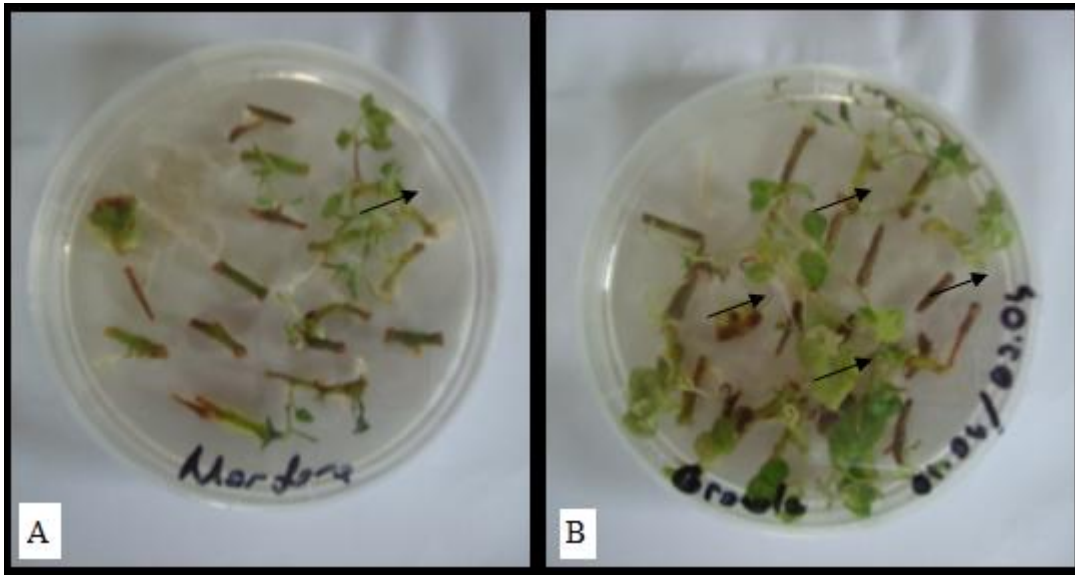
Şekil 4.12. *Cry 1A(c)* Genini Taşıyan *A. tumefaciens* ile Transformasyon Sonucunda 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” ve “Granola” Patates Sürgünleri

Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 13A,C,D'den de anlaşıldığı gibi yapılan transformasyon çalışmalarından sonra tahmini transgenik doku parçalarında antibiyotikli ortamlar üzerinde rejenerasyonun oldukça iyi olduğu gözlenmiştir. Araştırmada bakteri ile gen transferi yapılmadan antibiyotik içeren ortamlar üzerinde kontrol amacıyla patatesin internodium doku parçaları kültüre alınmıştır. Kontrol amaçlı kültüre alınan internodium doku parçaları ilk haftalarda normal gelişimlerini sürdürürken daha sonraki haftalarda doku parçaların da sararma, klorofilsiz renk açılımları ve ilerleyen zamanda ise bitkilerde ölüm meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.13B).



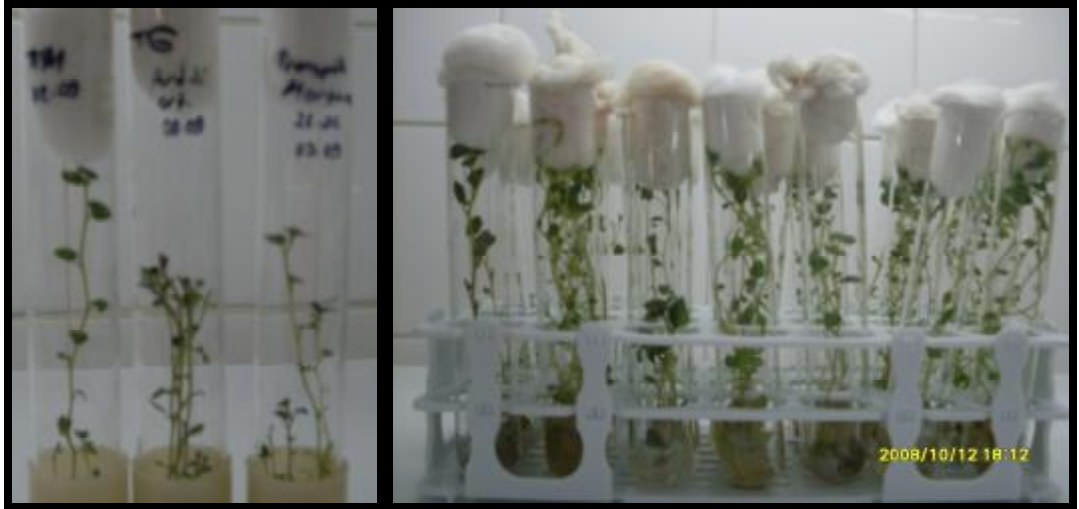
Şekil 4.13. Cry 1A(c) Genini Taşıyan *A. tumefaciens* ile Transformasyon Sonucunda 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan İternodium Doku Parçalarından 10 Gün Sonra Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” (C) ve “Granola” (A, D) Sürgünleri ve Transforme Edilmemiş Patates İternodium Eksplantları (Kontrol:B)

Transforme edilen doku parçaları, rejenerasyon çalışmaları ve istatistik analiz sonucunda belirlenen en yüksek rejenerasyon sağlayan L Ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan yaklaşık 20 gün sonra transformasyon yapılan eksplantlar üzerinde tahmini transgenik sürgünlerin geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.14.). “Marfona” çeşidi patates bitkisinin, “Granola” çeşidi patates bitkisine göre daha kısa sürede ve daha fazla sayıda bitki rejenerasyonu gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Belirlenen bu farklılığın çeşit özelliğinden kaynaklandığı; ayrıca, transformasyon oranının kullanılan genotipe göre büyük farklılıklar gösterdiği ve regenerasyon kapasitesi yüksek olan çeşitlerin gen aktarımına daha iyi cevap verdiği bildirilmiştir (Sheerman ve Bevan 1988; Bayroviç ve ark. 1995b; Khokan ve ark. 2009).

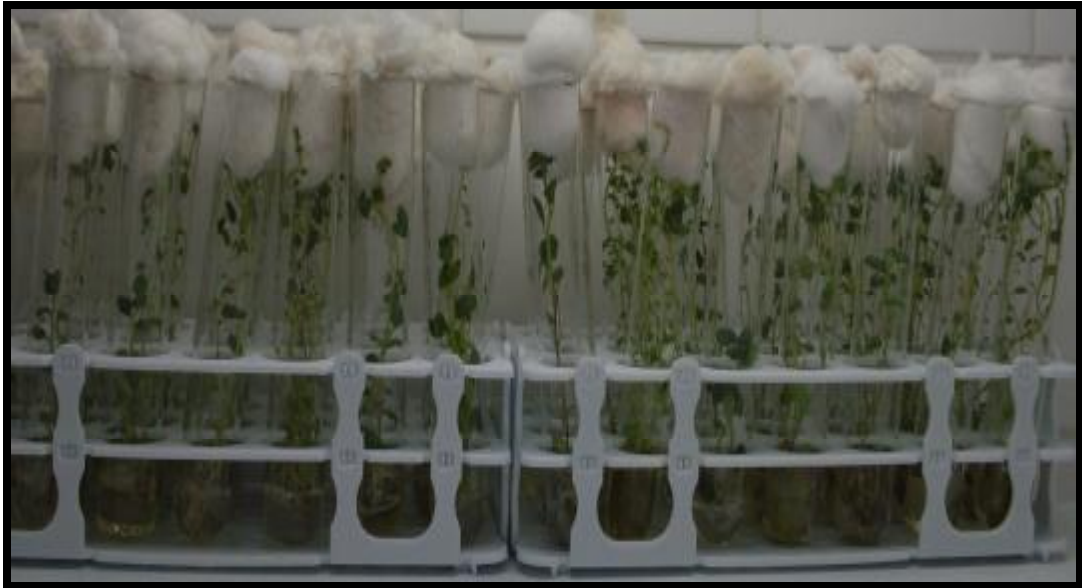


Şekil 4.14. Transformasyondan Yaklaşık 2-3 Hafta Sonra 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren L Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Dokulardan Gelişen Tahmini “Marfona” (A) ve “Granola” (B) Transgenik Sürgünleri (oklar ile gösterilmiştir)

Transformasyon yapılan dokulardan gelişen 5 haftalık tahmini transgenik sürgünler daha iyi gelişimlerini sağlamak için 15 ml katı L ortamı içeren cam deney tüplerine aktarılmıştır (Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17).



Şekil 4.15. *Cry 1A(c)* Genini İçeren *A. tumefaciens*'in EHA101 İzolatı İle Transforme Edilen “Granola” Patates Çeşidinden Tahmini Transgenik Bitkilerin Seçici L Ortamında Gelişimleri

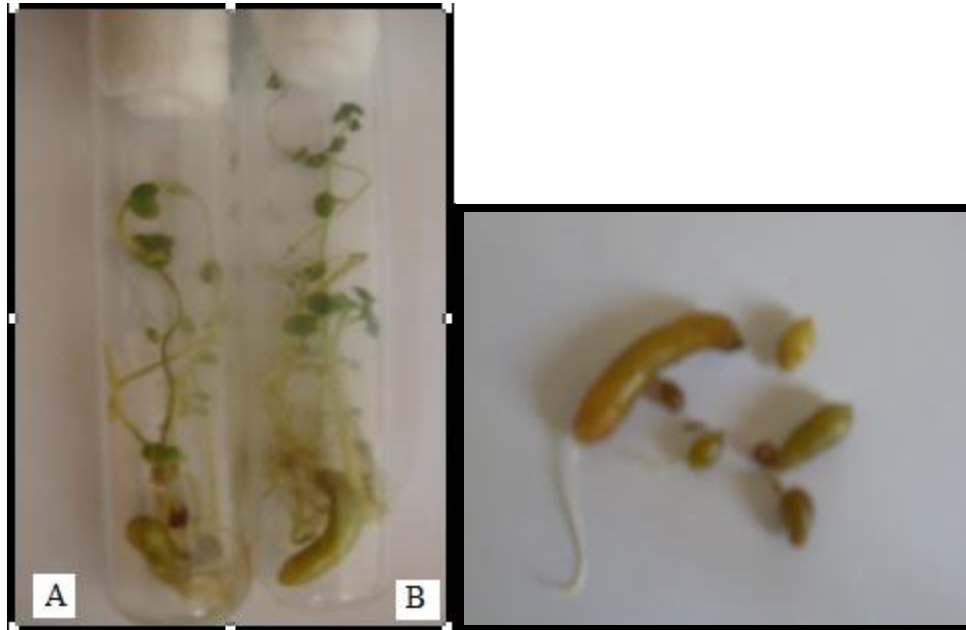


Şekil 4.16. *Cry 1A(c)* Genini İçeren *A. tumefaciens*'in EHA101 İzolatı İle Transforme Edilen “Marfona” Patates Çeşidinden Tahmini Transgenik Bitkilerin Seçici L Ortamında Gelişimleri



Şekil 4.17. Cry 1A(c) Genini İçeren *A. tumefaciens*'in EHA101 İzolatı İle Transfome Edilen "Granola" Patates Çeşidinden Tahmini Transgenik Bitkilerin Seçici L Ortamında Gelişimleri

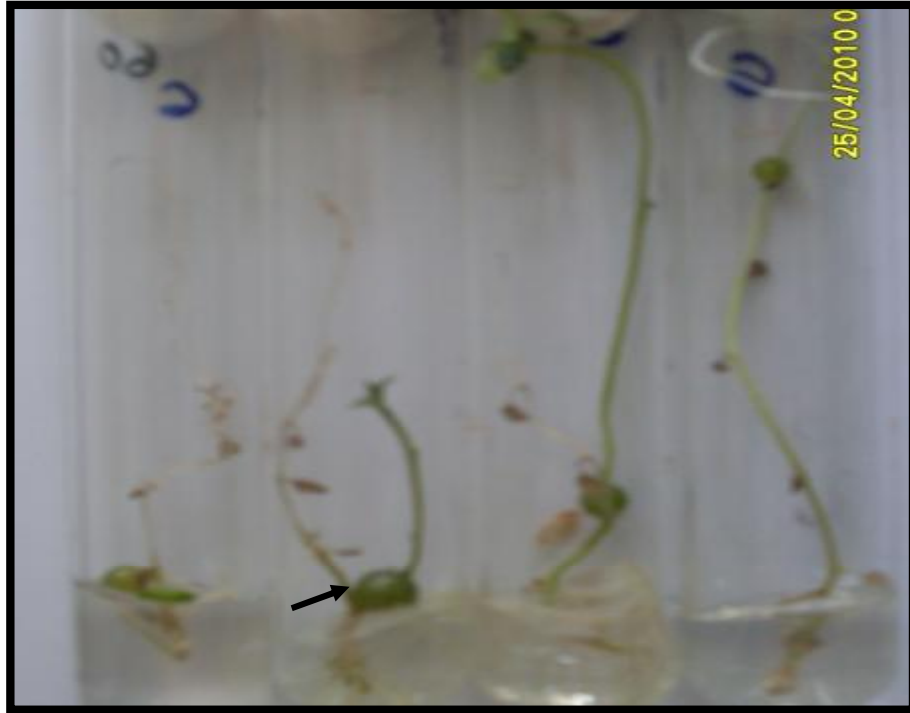
Cam deney tüpleri içerisinde kültüre alınan tahmini transgenik bitkilerden transformasyondan 45 gün sonra mikro yumru oluşumları meydana gelmiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Selekte Edici L Ortamı (10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb) İçeren Cam Deney Tüplerinde Kültüre Alınan Transgenik "Marfona" (A) ve "Granola" (B) Patates Bitkilerinde Gelişen Mikro Yumrular

4.5. Transgenik Bitkilerde *In Vitro* Mikro Yumru Oluşumu

Antibiyotikli ortamlar üzerinde kültüre alınan tahmini transgenik bitkilerden yumru oluşumunu teşvik etmek için bitkiler farklı sakkaroz ve hormon konsantrasyonları içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmış ve yumru oluşumları gözlenmiştir. Kinetin (1, 1.5, 2 ve 2.5 mg/l), NAA (0.1, 0.5 ve 1 mg/l) içeren MS ortamları üzerinde karanlık ve aydınlık koşullara sahip klima odasında kültüre alınması sonucunda en iyi mikro yumru oluşumunu sağlayan ortamın 2.5 mg/l kinetin içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19.). Diğer hormon konsantrasyonlarında mikro yumru oluşumu çok az ve küçük olmuştur. Çalışmalarda Karanlık *in vitro* koşullarında Transgenik “Marfona” ve “Granola” çeşidinde sakkarozun farklı düzeyde mikro yumru oluşumu için kurulan denemede 20 gün sonra ilk yumrular görülmeye başlanmış ve 45 gün sonra mikro yumru sayımı ve tartımı yapılmıştır. Elde edilen yumruların ağırlıkları ve büyüklükleri karşılaştırılmış bu sonuçlara göre en iyi yumru oluşumu 90 g/l sakkaroz içeren MS ortamında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5, 4.6), (Şekil 4.20.). Bunu sırasıyla 60 g/l, 45 ve 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamları takip etmiştir. Sakkarozun 0-15 g/l konsantrasyon aralığı MS ortamında mikro yumru oluşumu gözlenmemiştir. Kurulan denemede mikro yumru oluşumunda sakkaroz dozunun oldukça etkili olduğu görülmüştür. Kullanılan farklı konsantrasyonlarda (1, 1.5, 2 ve 2.5 mg/l) Kinetin ve (0.1, 0.5 ve 1 mg/l) NAA içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınan “Marfona” ve “Granola” patates çeşitlerinde yumru oluşumu düşük olmuştur. Romanov ve ark. (2000), yapmış oldukları çalışmalarda en iyi mikro yumru oluşum ortamının sakkaroz konsantrasyonlarına bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışma da benzer sonuçlar alınmıştır. Ayrıca, Gopal ve ark. (1998); Al-Safadi ve ark. (2000); Yu ve ark. (2000); Piao ve ark. (2003) ve Huai- Jun ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmalarda farklı hormon ve sakkaroz konsantrasyonları kullanarak *in vitro* mikro yumru üretimini gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 4.19. Cam Deney Tüplerinde % 90 Sakkaroz İçeren İnternodiumlarında MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Granola” Patates Çeşidi Mikro Yumru Gelişimi



Şekil 4.20. Karanlık Koşullarda Farklı Sakkaroz Konsantrasyonları İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan “Marfona” Patates Çeşidi İnternodiumlardan Mikro Yumru Gelişimi

Yapılan varyans analizi sonucunda kullanılan farklı sakkaroz konsantrasyonlarının (0, 15, 30, 45, 60 ve 90 g/l), bitki başına mikro yumru sayısı ve ağırlığı üzerinde yüzde 0.01 düzeyinde istatistiki olarak önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5). Farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla DUNCAN testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.6’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarının “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerinde Ortalama Mikro Yumru Sayısı ve Ağırlık Üzerine Etkisi İle İlişkin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	SD	Mikro yumru sayısı/ Bitki			Mikro yumru ağırlığı		
		KT	KO	F	KT	KO	F
Tekerrür	3	0.105	0.053	4.200	886.167	443.083	1.3347
Dozlar	5	0.660	0.220	17.6*	3099.667	1033.222	3.1124*
Hata	15	0.075	0.013		1991.833	331.972	
Toplam	23	0.840			5977.667		

(*) 0.01 düzeyinde önemli

KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, F: F testi, SD: Standart Sapma

Çizelge 4.6. Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarının “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerinde Bitkicik Başına Mikro Yumru Sayısı ve Mikro Yumru Ağırlığına Ait Tekerrür Ortamaları ve DUNCAN Testi

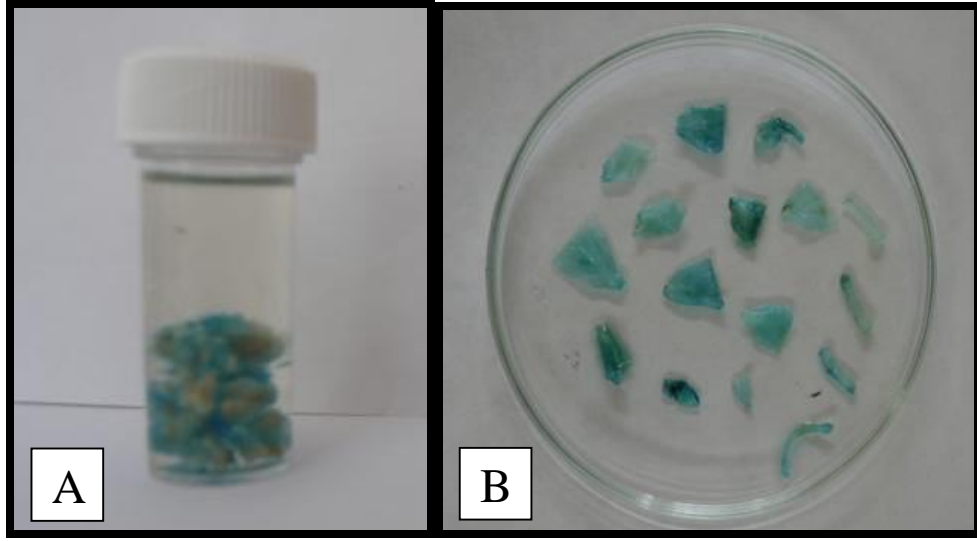
Sakkaroz Konsantrasyonu (g/l)	Mikro yumru sayısı/ Bitki (adet)		Ortlama Mikro yumru ağırlığı (mg)	
	Ortalama	%5	Ortalama	%5
0	0	d	0	c
15	0	d	0	c
30	0.2333	c	85.67	b
45	0.3333	c	89.67	b
60	0.6000	b	125.0	a
90	0.8333	a	100.3	ab

Çizelge 4.6.'da görüldüğü gibi farklı sakkaroz konsantrasyonlarına ait bitkicik başına ortalama yumru adedi, 0-0.833 adet arasında değişmiştir. Ortalama en fazla mikro yumru sayısı, 0.833 adet ile 90 g/l sakkaroz konsantrasyonundan elde ediliken, 0 ve 15 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında hiç mikro yumru oluşmamıştır. Sakkaroz konsantrasyonları, eksplant başına yumru sayısı bakımından 0.05 düzeyinde 4 farklı grup içerisinde yer almışlardır. Sakkarozun 90 g/l konsantrasyonu mikro yumru sayısı bakımından diğer konsantrasyonlara göre 0.05 düzeyinde farklı ve üstün olduğu görülmektedir.

Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında, bitkicik başına ortalama mikro yumru ağırlığı 0-125.0 mg arasında değişmiştir. 0 ve 15 g/l'lik sakkaroz konsantrasyonlarında mikro yumru gelişimi olmadığından dolayı bu konsantrasyonlar en düşük değeri (0 mg) alırken, en yüksek mikro yumru ağırlığı 125 mg ile 60 g/l'lik sakkaroz konsantrasyonundan elde edilmiştir. Bu değeri 100,3, 89,67, 85,67 mg ile sırasıyla 90, 45 ve 30 g/l'lik sakkaroz konsantrasyonları izlemiştir. Sakkaroz konsantrasyonları mikro yumru ağırlığı bakımından 0.05 düzeyinde 3 farklı grup içerisinde yer almıştır. Sakkarozun 60 ve 90 g/l'lik konsantrasyonları 0.05 düzeyinde aynı grup içerisinde yer alırken, diğer sakkaroz konsantrasyonlarından daha üstün olduğu görülmüştür.

4.6. Histokimyasal GUS Analizi

A. *tumefaciens* ile transformasyonu yapılarak kanamisin içeren bitki rejenerasyon ortamı üzerinde gelişmesini sürdüren patates bitkisinin doku parçalarına istenilen genlerin aktarıldığını kanıtlamak amacı ile uygulanan histokimyasal GUS analizinde bitki doku parçaları X-gluk solusyonunda 37 °C' de inkübe edildikten 1-12 saat sonra transgenik dokularda mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.21 A, B). Ayrıca bu dokulardan PCR analizleri de yapılmıştır.



Şekil 4.21. Transformasyondan 2 Gün Sonra (A) ve 4 Hafta Sonra (B) Patatesin Internodium Doku Parçalarına ve Yaprak Eksplantlarına Uygulanan Histokimyasal GUS Analizi Sonucu Gözlenen Mavi Renk Oluşumu

GUS analizinde kullanılan doku parçalarının % 80'nin de mavi renk oluşumu belirlenmiştir. Bu doku parçalarının mavi renge boyanması transgenik bitki dokusunda *GUS* gen ürünü β -glukuronidaz enziminin sentezlenerek 4-Brom-3-Klor-5-glukuronid substratı ile reaksiyona girmesi sonucunda mavi renkli protein çökeltisi oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Bu doku parçalarının mavi renge boyanması transgenik bitki dokusunda *GUS* geninin aktarıldığının bir göstergesidir (Şekil 4.21 (A)). Herman ve ark. 1989, Elaine ve ark. (1992), Koivu ve ark. (1995), Bayroviç ve ark. (1995), Beujean ve ark. (1998), Andersson ve ark. (2003), Yamaguchi ve ark. (2004), Xing ve ark. (2007) *GUS* A geni içeren plazmidleri kullanarak yaptıkları transformasyon çalışmalarında farklı patates çeşitlerinde doku parçalarına yapmış oldukları GUS analizi sonucunda dokuların % 75-85 oranında mavi renk oluşturduğunu belirleyerek benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Transformasyon sonrasında geliştirilen transgenik patates bitkilerinin internodium ve yaprak parçalarının histokimyasal GUS analizi sonucunda kullanılan bitki materyallerinden % 80' ninde mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.21 B).

4.7. Transgenik Bitkilerin Köklendirilmesi ve Doğal Koşullara Adaptasyonları

Internodium (boğum arası gövde parçası) ve yaprak doku parçalarından elde edilen tahmini transgenik bitkiler köklendirmek amacıyla Higromisin B (Hg) antibiyotiği içeren 4.2.'de verilen yönteme göre denemeler kurulmuştur. Kontrol bitkilerden alınan sonuçlarla antibiyotik içeren transgenik bitkilerden alınan sonuçlar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. En iyi kök gelişiminin 1 mg/l NAA içeren MS ortamında meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.22). Kök oluşumu için 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan bitkilerde % 50 oranında köklenme olduğu belirlenmiş ve oluşan köklerin kısa ve zayıf kılcak köklerden meydana geldiği gözlenmiştir. Diğer köklendirme ortamında bitkilerde oluşan köklerin zayıf köklerden oluştuğu saptanmıştır. NAA'ın 1 mg/l konsantrasyonunu içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan bitkilerde 3 hafta sonra 15 cm uzunluğunda kök oluşturduğu gözlenmiştir. Bu transgenik bitkiler toprağa aktarılarak, doğal koşullara adaptasyonları sağlanmış ve normal büyüme göstermişlerdir. Gelişen bitkiler üzerinde çiçek ve yumru oluşumu bakımından herhangi bir anormallik gözlenmemiş, normal bitkiler gibi gelişim gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.22. 10 mg/l Hg ve 1mg/l NAA İçeren MS Ortamlarında Kültüre Alınan Transgenik Patates Çeşitlerinde Kök Gelişimleri

In vitro koşullarda transformasyon sonucu elde edilen bitkilerden 15 cm uzunluğa ulaşan ve kök oluşturan bitkiler toprağa aktarmadan önce köklerde herhangi bir zedelenme sonucu meydana gelecek yaralardan fungal hastalık etmeninin girişini engellemek amacıyla koruyucu bir fungusit olan Captan (2 g/l) içeren su içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Bitkiler daha sonra 1:1:1 oranında hazırlanmış olan torf, kum ve perlit içeren karışıma aktarılmıştır. Toprağa aktarılan bitkilerin nem kaybını engellemek amacıyla iki hafta süre ile saksılar polietilen plastik bir torba ile kapatılmıştır. Bu süre sonunda plastik torbaların ağzı yavaş yavaş açılarak içerisindeki nem azaltılmış ve daha sonra bitkiler torba içinden çıkartılarak toprağa ve doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır (Şekil 4.23)



Şekil 4.23. *Cry 1A(c)* Genini Taşıyan pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren *A. tumefaciens*'in EHA101 İzolatı İle Transformasyonundan 3 Ay Sonra Köklenmiş Transgenik “Marfona” ve “Granola” Bitkilerin Toprak Koşullarına Adaptasyonu

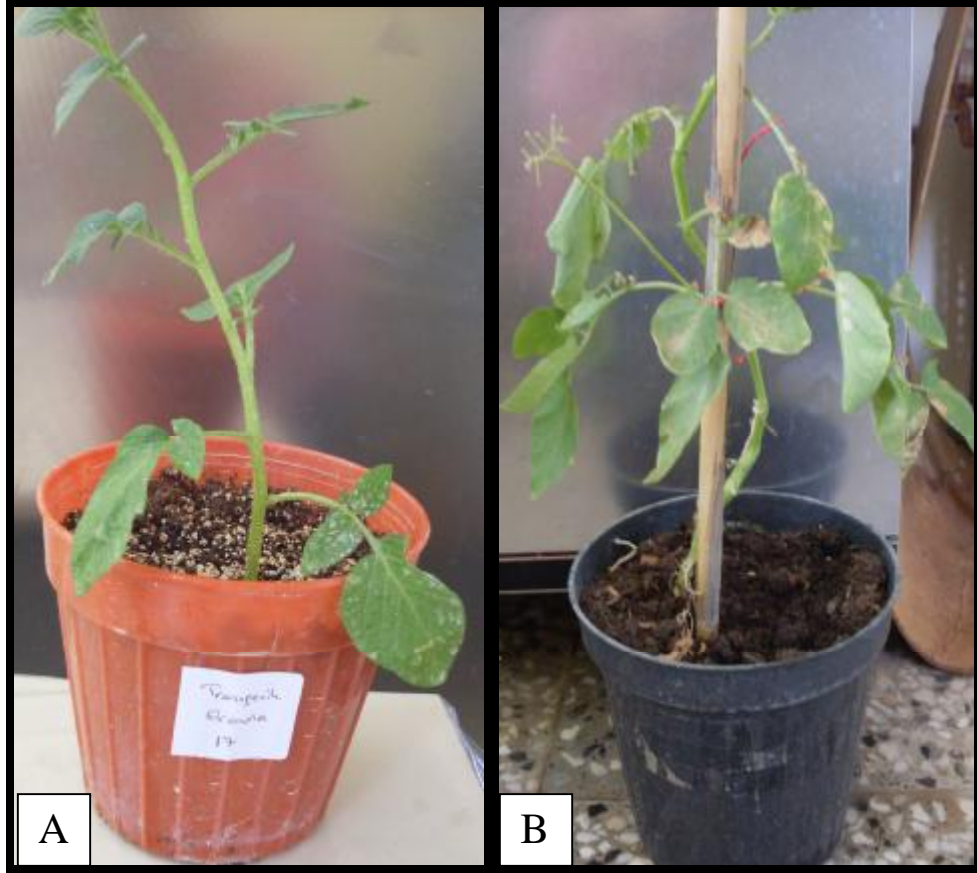
In vitro bitkilerin doğal koşullara adaptasyon çalışmasında, patates bitkilerinden “Marfona” ve “Granola” çeşitleri arasında Granola çeşidinin doğal koşullara adaptasyonunun oldukça zor gerçekleştiği saptanmıştır. *In vitro* koşullardan *in vivo* koşullarına adaptasyon esnasında yaklaşık % 40 “Granola”, % 20 “Marfona” bitkisinde kayıplar meydana gelmiştir. Bitkilerin doğal şartlara uyumu ve daha iyi gelişimlerini sağlamak amacıyla 10-15 günde bir yaprak gübresi verilerek daha iyi gelişimleri sağlanmıştır (Şekil 4.24, 25). Saksılarda gelişen transgenik bitkiler ile kontrol bitkilerin gelişimi arasında herhangi bir farklılık meydana gelmemiştir. Ayrıca transgenik bitkilerde normal çiçek oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.26A, B). Çiçek oluşumu sonrasında ise vejetasyon dönemini tamamlayan transgenik bitkilerin köklerinde yumru oluşumları meydana gelmiştir. Böylece gen aktarımı yapılan transgenik bitkiler ile transformasyon yapılmamış kontrol bitkiler arasında fenolojik olarak herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.24. Transformasyondan 4 Ay Sonra Toprağa Adaptasyonları Sağlanmış *Cry 1A(c)* Genini İçeren Transgenik “Marfona” Patates Çeşitleri



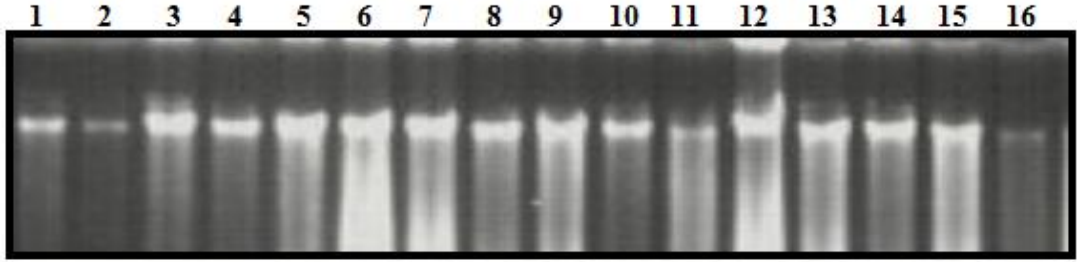
Şekil 4.25. Transformasyondan 4 Ay Sonra Toprağa Adaptasyonları Sağlanmış *Cry 1A(c)* Geni İçeren Transgenik “Granola” Patates Çeşitleri



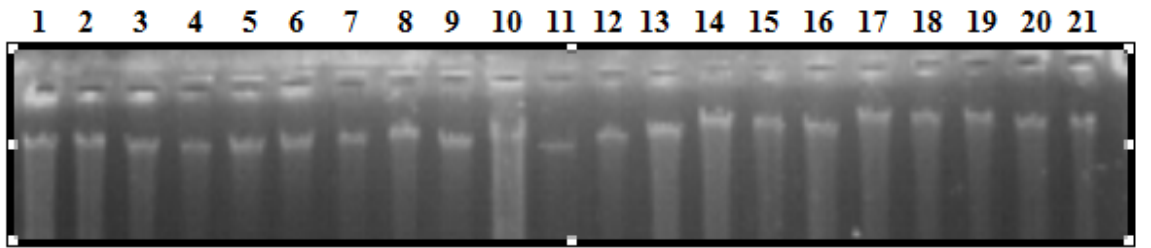
Şekil 4.26. Transformasyondan 5 Ay Sonra Kontrollü Klima Odasında Yetiştirilen Transgenik “Granola” Çeşidi Patates Bitkileri (A); Toprağa Aktarıldıktan 3 Ay Sonra Sera Koşullarında Çiçeklenmesi Tamamlanmış Transgenik Patates Bitkileri (B)

4.9. Transgenik Bitkilerin İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR Analizi ve Agaroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyonları yapılan transgenik bitkilerden ve transgenik olmayan kontrol bitkilerden PCR analizleri 3.5.2.'de verilen yönteme göre yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezi yapılarak oluşan bantlar ile DNA yoğunluğu belirlenmiştir. Farklı transgenik bitki yapraklarından izole edilen DNA miktarlarının 50 ile 500 ng arasında değiştiği λ DNA ağırlık markörleri ile tespit edilmiştir (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.27. Transgenik "Marfona" Patates Çeşidinden İzole Edilen DNA Örnekleri



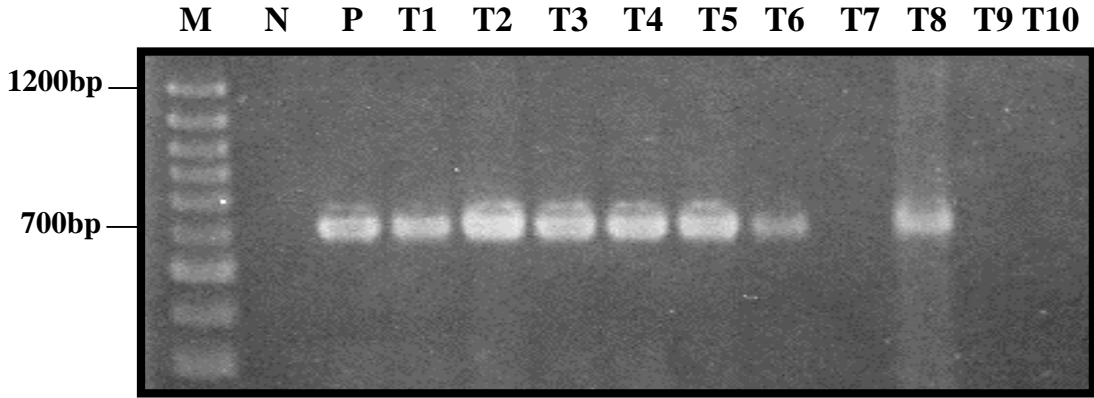
Şekil 4.28. Transgenik "Granola" Patates Çeşidinden İzole Edilen DNA Örnekleri

4.9.1. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde *Npt II* Geninin PCR Analizi

Transformasyonu optimize etmek amacıyla pGA482GG plazmidini içeren EHA 101 bakteri izolatu ile transformasyon yapılması sonucunda elde edilen transgenik patates bitkilerinde markör gen olan *Npt II* geni için PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.29). Yapılan PCR analizleri sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan bakteriyel plazmidten çoğalan DNA fragmenti büyüklüğü ile transgenik bitki DNA örneklerinden çoğalan PCR ürünü DNA bandı büyüklüğü ile aynı uzunlukta oldukları agaroz jel elektroforez ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 29.).

Şekil 4. 29.' de görüldüğü gibi PCR ürünlerinin elektroforezi sonucunda transgenik olmayan kontrol bitkiden izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı PCR sonucunda herhangi bir bant oluşmaz iken, antibiyotikli ortam üzerinde seçilen transgenik bitkilerin PCR ürünlerinde pozitif kontrolün oluşturduğu *Npt II* (700 kb) genine spesifik DNA bantlarının oluşumu gözlenmiştir.

Antibiyotikli ortamlar üzerinde seleksiyonu yapılan transgenik bitkilerden 7, 9 ve 10 nolu (3 adet) bitkilerin PCR analizi sonucunda herhangi bir bant oluşmadığı, 6 nolu transgenik bitkide bant oluştuğu fakat diğer bantlara göre daha zayıf bir bant oluşturduğu, 7 adet transgenik bitkilerde spesifik bant oluşumlarının olduğu belirlenmiştir. Zayıf bant oluşumunun PCR analizinde şablon olarak kullanılan DNA'nın optimum konsantrasyonda kullanılmadığını göstermektedir. Veya PCR sonrası sentezlenen DNA'nın elektroforez sırasında kayba uğradığı yada dejenere olduğu düşünülmektedir. 7, 9 ve 10 nolu bitki DNA örneklerinde de bant oluşmamasının ise; bazen antibiyotikli ortam üzerinde transgenik olmayan bitkilerinde gelişebileceğini göstermektedir (Davidson ve ark. 2004; Kayım ve ark 2004; Huai-Jun ve ark 2005; Unlu Yuceer ve Koç, 2006; Kumar ve ark., 2010).



Şekil 4.29. “Marfona” (T1, T2, T3, T9, T10) ve “Granola” (T4, T5, T6, T7,T8) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Npt* II Geni İçin PCR Analizi; M; 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10; Transgenik Bitkiler, P; *A. tumefaciens*’ in pGA482GG Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi

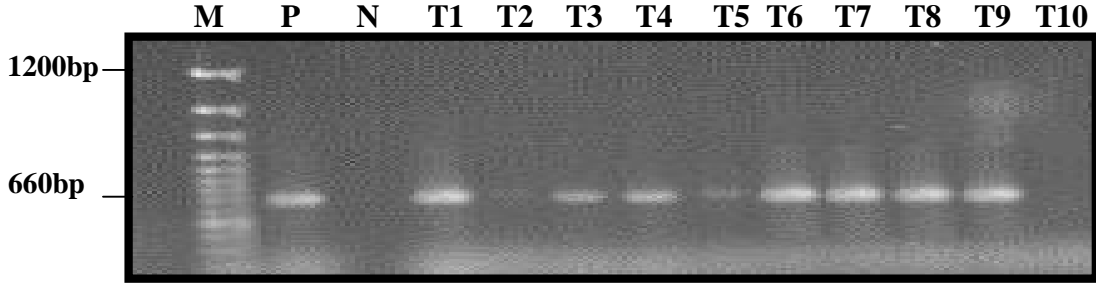
4.9.2. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde *GUS* Geninin PCR Analizi

Optimizasyon amacıyla pGA482GG plazmidini içeren EHA101 bakteri izolatu ile yapılan transformasyon sonucunda elde edilen transgenik patates bitkilerinde markör gen olarak *GUS* geni için PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.30). PCR analizinde pozitif kontrol olarak bakteri kullanılmıştır. Bakterinin oluşturduğu bantın büyüklüğü ile transgenik bitki DNA örneklerinden çoğaltılan DNA bant Şekil 4. 31’de verilmektedir.

Şekil 4. 30’da görüldüğü gibi PCR ürünlerinin elektroforezi sonucunda transgenik olmayan kontrol bitkiden izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı PCR sonucunda herhangi bir bant oluşmaz iken, antibiyotikli ortam üzerinde seçilen transgenik bitkilerin PCR ürünlerinde ise pozitif kontrolün oluşturduğu *GUS* (660 kb) geni ile aynı büyüklükte DNA bantlarının oluşumu gözlenmiştir.

Antibiyotikli ortamlar üzerinde seleksiyonu yapılan transgenik bitkilerden dokuz tanesinde bant oluşumu gözlenmiştir. 2 ve 5 nolu DNA örneğinde, PCR sonucunda çok hafif bant oluşumu meydana geldiği gözlenmiştir. 10 nolu DNA örneğinde ise bant oluşumu gözlenmemiştir. Bant miktarındaki yoğunluk DNA

miktarındaki orandan meydana geldiği veya DNA'nın elektroforez sırasında kayba uğradığı yada dejenere olduğu düşünülmektedir.



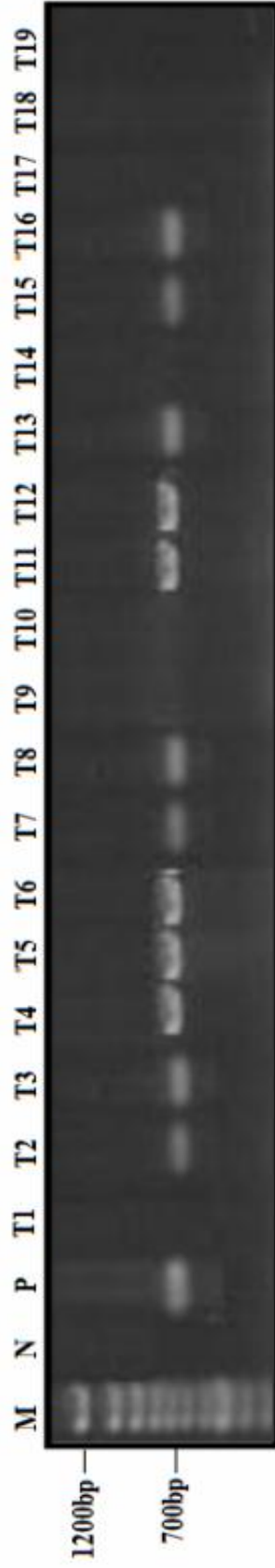
Şekil 4.30. “Marfona” (T1, T2, T3, T9, T10) ve “Granola” (T4, T5, T6, T7,T8) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *GUS* Geni İçin PCR Analizi; M; 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10; Transgenik Bitkiler, P; *A. tumefaciens*' in pGA482GG Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi

4.9.3. Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde Higromisin Dayanıklılık Geninin (*Hpt*) PCR Analizi

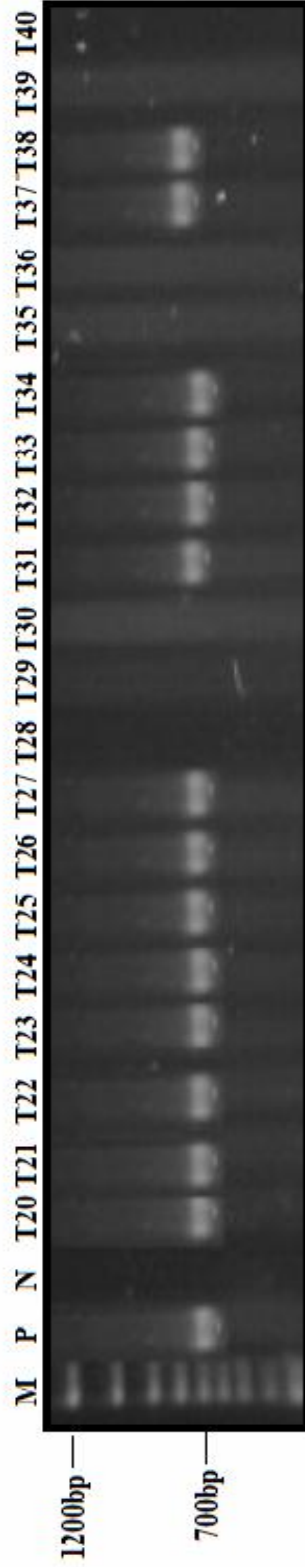
Optimizasyondan sonra alınan sonuçlar doğrultusunda *Agrobacterium tumefaciens*'in pCAMBIA 1301 plazmidini içeren EHA 101 izolatı ile transformasyon yapılması sonucunda elde edilen transgenik patates bitkilerinde markör gen olan *Hpt* geni için PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.31). PCR analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılan bakterinin oluşturduğu DNA bandının büyüklüğü ile transgenik bitkilerden elde edilen DNA bandı büyüklüğü ile aynı büyüklükte spesifik band oluşturdukları Şekil 4. 31.'de görülmektedir.

Şekil 4. 31.'de görüldüğü gibi PCR ürünlerinin elektroforezi sonucunda transgenik olmayan kontrol bitkiden izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı PCR sonucunda herhangi bir bant oluşmaz iken, antibiyotikli ortam üzerinde seçilen transgenik bitkilerin PCR ürünlerinde ise pozitif kontrolün oluşturduğu *Hpt* (700 kb) genine spesifik DNA bantlarının oluşumu gözlenmiştir.

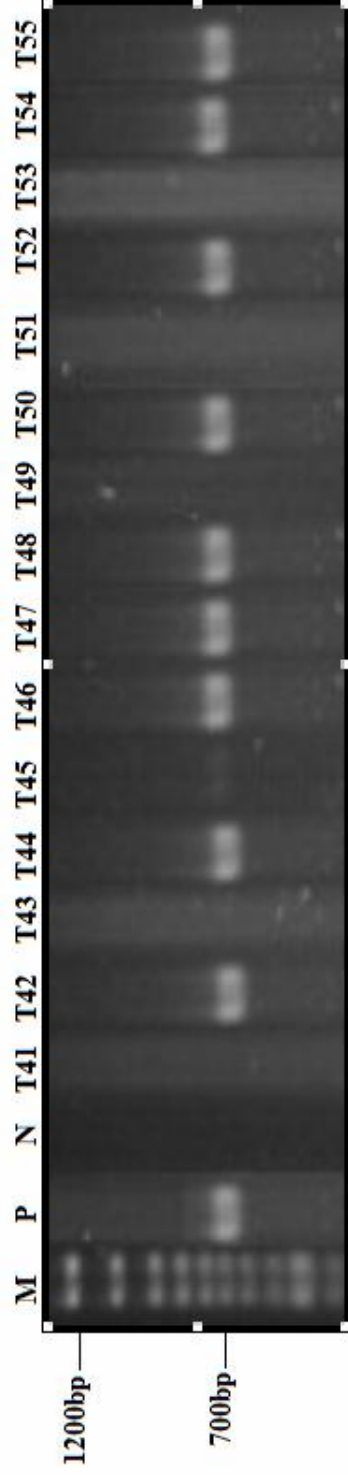
Antibiyotikli ortamlar üzerinde seleksiyonu yapılan transgenik bitkilerden 1, 9, 10, 14, 17, 18 ve 19 nolu bitkilerin PCR analizi sonucunda herhangi bir DNA bandı oluşmadığı belirlenmiştir. Buda bazen antibiyotikli ortam üzerindeki gen kaçışlarının olduğunu göstermektedir (Davidson ve ark. 2004; Yamaguchi ve ark. 2004; Huai-Jun ve ark. 2005; Arif ve ark. 2009; Khokan ve ark. 2009; Kumar ve ark. 2010). Şekil 4. 31., Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.'de görüldüğü gibi elde edilen transgenik bitkiler arasından tesadüfi olarak seçilen 55 adet transgenik bitkilerin *Hpt* geninin varlığı açısından yapılan PCR analizinde 35 tane transgenik bitkilerin PCR sonucunda spesifik bantlar oluşturduğu belirlenmiştir. Spesifik bantlar oluşturmayan bitkilerde gen kaçışlarının da olabileceği veya PCR sonrası sentezlenen DNA'nın elektroforez sırasında kayba uğramış olabileceği yada DNA örneklerinin dejenere olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.31. "Marfona" (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10) ve "Granola" (T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Htp* İçin PCR Analizi. M: 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19: Transgenik Bitkiler. P: *A. tumefaciens*' in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı, N: Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi.



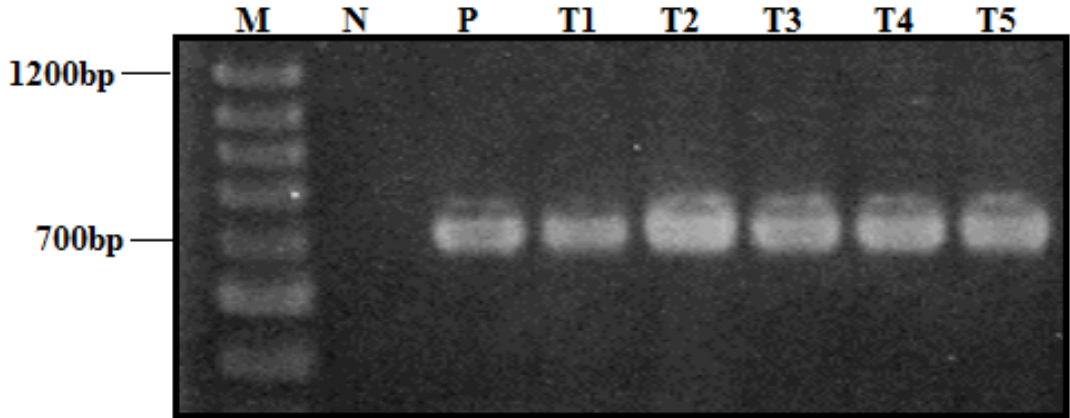
Sekil 4.32. "Marfona" (T20, T21, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29) ve "Granola" (T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38, T39, T40) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Htp* İçin PCR Analiz Sonucu. M: 100bp DNA Ladder Plus, T20, T21, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38, T39, T40: Transgenik Bitki P: *A. tumefaciens*, in pCAMBIA1301 Plazmidini İceren EHA101 İzolatı, N: Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi



Sekil 4.33. "Marfona" (T41, T42, T43, T44, T45, T46, T47) ve "Granola" (T48, T49, T50, T51, T52, T53, T54, T55) Patates Çesitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Htp* İçin PCR Analizi. M: 100bp DNA Ladder Plus. T41, T41, T43, T44, T45, T46, T47, T48, T49, T50, T51, T52, T53, T54, T55: Transgenik Bitki P. *A. tumefaciens* in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 İzolatı. N: Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi

4.9.4. Transgenik Bitkilerden Elde Edilen Vejetatif Yumruların Higromisin Dayanıklılık Geni (*Hpt*) İçin PCR Analizi

Transgenik patates bitkilerinden elde edilen vejetatif yumruları saksılara dikilmiş ve çıkışları gözlenmiştir. Dikimi yapılan 10 adet “Marfona” yumrularından 5 tanesinde bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerden DNA izolasyonları yapılmış ve *Hpt* geni için PCR analizleri yapılmış ve spesifik 700 bp. büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir. Böylece aktarılan genin stabil olarak yumrulara geçtiği kanıtlanmıştır (Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. “Marfona” Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerin Yumrularının *Htp* İçin PCR Analizi;T1, T2, T3, T4, T5; Transgenik Yumru, P; *A. tumefaciens*’ in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 Irkı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi

4.8. Transgenik Patates Bitkilerinin Biyolojik Olarak Testlenmesi

Yapılan transformasyon sonucunda elde edilen transgenik “Marfona” ve “Granola” çeşidi patates bitkilerinde higromisin geninin varlığı açısından PCR analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda pozitif bant oluşumu gösteren transgenik bitkiler seçilerek *Cry 1 A(c)* geninin varlığını tespit etmek için biyolojik testlemeler yapılmıştır. *Cry 1 A(c)* geni içeren transgenik patates bitkilerinde *B. thuringiensis*

kristal proteinin etkinliğini test etmek için sera koşullarında böcek kafesleri içerisinde 3. ve 4. dönem patates böceği (*L. decemlineata* Say.) larvalarının bitkiler üzerinde beslenmeleri sağlanmıştır (Şekil 4.35.).

Kurulan deneme sonrasında kontrol bitki ile transgenik bitkinin yaprakları ve transgenik bitkilerden alınan yapraklar ile beslenen patates böceği larvalarının 4 gün sonra % 80-85 oranında larva ve % 50 oranında pupa ölümü meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.36.). Kontrol olarak kullanılan patates bitkisinin yaprakların üzerinde beslenen larvalar canlılıklarını korumuşlardır (Şekil 4.36.). Lagnaoui ve ark. (2000), *Cry* 1a genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patates çeşitlerine aktarmışlardır. Elde ettikleri transgenik bitkilerin patates güvesine karşı testlemelerini yapmışlar ve transgenik bitkilerle beslenen larvalarda yüksek oranda ölümlerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Davidson ve ark. (2002), Davidson ve ark. (2004), *Cry* 1 Ac9 genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patates bitkilerine aktararak Lepidoptera takımından olan patates güvesine karşı dayanıklı bitkiler elde etmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkilerin zararlı böceğin larvalarında yüksek oranda ölümlere neden olduğunu saptamışlardır. Kamenova ve ark. (2008) *Cry* 3 A geni ile üç farklı patates çeşitlerine gen aktarımı yapmışlar ve patates böceğine (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkileri biyolojik testleme amacıyla transgenik bitki yaprakları üzerinde patates böceği'nin farklı dönemlerindeki larvalarının beslenmelerini sağlamışlar ve larvaların dönemlerine göre 2-9 gün içerisinde öldüklerini tespit etmişlerdir. Literatürlerde yapılan çalışmalarda aktarımı yapılan *B. thuringiensis* kristal proteinin etkinliği farklı *Cry* genlerinin toksik etkisinden dolayı zararlı böceklerin larvalarında oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmalarda da Lepidoptera takımı zararlılar üzerinde etkili olan *Cry* 1A(c) geninin patates bitkisine aktarılması sonucunda elde edilen transgenik patates bitkilerinin *Cry* genlerinin toksik etkisinden dolayı patates böceğinin larvalarına karşıda etkili olabileceği gözlenmiştir.



Şekil 4.35. Biyolojik Testleme İçin Sera Koşullarında Böcek Kafesleri İçerisinde Deneme İçin Seçilen Patates Yaprakları İle Beslenen 3. ve 4. Dönem Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) Larvaları

Transgenik bitkiler üzerinde beslenen patates böceklerinde % 10-15 oranında bir zarar meydana gelirken, transformasyon yapılmamış kontrol olarak kullanılan bitkinin yaprakları üzerinde beslenen patates böceği % 90 oranında bir zarar meydana getirmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. *Cry 1A(c)* Genini İçeren Transgenik “Marfona” (Üstten İlk Sıra) ve “Granola” (Üstten İkinci Sıra) Patates Çeşidi ve Kontrol Bitkilerin Yaprakları (Üstten Üçüncü Sıra) Üzerinde Beslenen Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar

Kurulan deneme sonucunda transgenik “Marfona” ve “Granola” çeşidi üzerinde beslenen patates böceğinin ağırlıklarında ilk günlerde fazla miktarda farklılaşma olmadan diğer 3. ve 4. günlerde ağırlıklarında azalma meydana gelmiştir. Dört günlük takiplerde böceklerin % 80-85’inde ölüm gözleendiği bazı böceklerde ise pupa oluşumunun meydana geldiği gözlenmiştir. Daha sonraki kontrollerde ise oluşan pupalarda kurumalar meydana gelmiş ve ergin çıkışına rastlanmamıştır. Kontrol bitkiler, Transgenik “Marfona” ve “Granola” bitkileri ile beslenen larvaların ortalama değerleri incelendiğinde, kontrole göre transgenik bitkiler ile beslenen böceklerde önemli düzeyde ağırlık kaybı saptanmıştır. İki çeşit arasında özellikle “Marfona” çeşidinde diğer çeşide göre daha da düşük ağırlık saptanmasına karşın bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.7. ve 4.9.).

Bölünmüş parseller deneme desenine göre yapılan istatistik analizi sonucunda oluşturulan varyans analiz çizelgesi (Çizelge 4.8.) incelendiğinde, Kontrol “Marfona” ve “Granola” bitkileri, transgenik “Marfona” ve “Granola” bitkileri ile beslenen böceklerin ağırlık artışı üzerine günler ve Gün x Uygulama interaksyonu üzerine önemli etkide bulunmadığı, ancak uygulamaların p:0,01 olasılık düzeyinde önemli etki yaptığı görülmektedir.

Kontrol bitki yapraklarında gelişen böceklerde ise; 4 günlük gözlem sırasında böceğin ağırlıklarında artış meydana geldiği ve pupa oluşturduğu ve daha sonrasında ise pupadan ergin çıkışlarının meydana geldiği gözlenmiştir.

Cry 1A(c) geni Lepidoptera takımı böcekler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bizim yaptığımız çalışmalarda aktarılan bu gen ile Coleoptera takımına bağlı patates böceği larvalarında da etkili olabileceği düşünülmektedir. Nazarian ve ark. (2009) yapmış oldukları araştırmalarda *Cry 1b*, *Cry 1i*, *Cry 3a*, *Cry 3b*, *Cry 3c*, *Cry 8a*, ve *Cry 14-35* arasında çok sayıda *Cry* genlerinin izole edildiği ve bunların etki mekanizmalarının benzer olduğunu saptamışlardır. Araştırmalarında aktardıkları *Cry 1i* genlerini içeren transgenik bitkiler üzerinde besledikleri Coleoptera takımı böceklerin larvalarında % 66 oranında ölümlerin meydana geldiği belirlemişlerdir. Coleoptera takımı, Chrysomellidae familyasından *Xanthogaleruca luteola* Muller larvalarının *Cry* geni içeren bitkiler üzerinde beslenmesi sonucunda 4 gün sonra larvalarda ölüm meydana geldiğini saptamışlardır.

Yaptığımız çalışmada alınan sonuçlar ile literatürde yapılan çalışma sonuçları ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür. *Cry* kristal proteinlerinin *Bacillus thuringiensis* den izole edilmiş ve 200 den fazla grup ve en az 50 tane alt gruptan oluşmaktadır. İzole edilmiş farklı *Cry* genleri arasında yapısal bazı farklılıkların olması nedeniyle farklı *Cry* genleri meydana gelmiştir. *Cry* genlerinin yapısında (domain I, II ve III) 3 farklı domain bölgelerinden meydana gelmiş ve bu Domain II ve Domain III bölgeleri konukçu ile reseptör bölgesini tanıyarak bağlanıp konukçu hücreye toksik etkili olabilmektedir (Peferon ve ark. 1997; Maagd ve ark. 1999; Davidson ve ark. 2002; Davidson ve ark. 2004; Bravo ve ark. 2007). Domain II ve Domain III bölgesinde oluşturulan mutasyonlar veya bu kısımlara bağlanan farklı proteinler ile *Cry* genlerinin insektisidal etkisi arttırılmış ve farklı böceklere de toksik etkisi ortaya çıkmıştır. Wang

ve ark. (2002) yapmış oldukları çalışmada ise *Cry 1A(c)* geninin daha çok Lepidoptera takımı böceklerde zararlı olarak düşünülmesine rağmen; yaptıkları biyolojik analizler ve sonra PCR çalışmalarında Coleoptera takımı böceklere de *Cry 1A* genlerin etkili olduğunu gözlenmiştir.

Taylor ve ark. 1992; Zhong ve ark. 2000 yaptıkları biyolojik testlemelerde *Cry 2* geninin Lepidoptera ve Coleoptera takımlarında etkili olduğu, *Cry 1b* geninin ise, Coleoptera, Lepidoptera ve Diptera takımları böceklerine karşı etkili olduğu, *Cry 1A* ve *Cry 2* genleri kullanılarak yaptıkları biyolojik testlemelerde bu genlerin kodladığı aktif proteinlerin Lepidoptera ve Coleoptera takımı böceklere etkili olduğu tespit etmişlerdir. Böylece araştırma sonucunda bazı *Cry* proteinlerinin birden fazla böcekleri öldürücü etkisinin olduğu rapor etmişlerdir.

Davidson ve ark. 2004 yapmış oldukları çalışmalarda elde ettikleri transgenik bitkilerde sera koşullarında *Cry 1Ac9* protein genin patates güvesi (*Phthorimaea operculella*)'nin gelişimi üzerine olan etkisi açısından biyolojik testlemelere tabi tutulmuş ve 60 ng/g taze yapraklar kullanılmıştır. 4 günlük larva beslenmesi sonucunda transgenik bitkilerin patates güvesinin larva gelişimini azalttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Transgenik “Marfona” ve “Granola” Çeşidi Üzerinde 4 Gün Boyunca Beslenen Patates Böceği (*L. decemlineata* Say.) Larvalarının Ağırlıklarında Gözlenen Farklılaşma

Uygulama	GÜNLER				Ortalama
	1	2	3	4	
Konrol	76.0	81.4	96.0	113.0	91.60 a*
Transgenik Granola	58.0	51.8	48.0	38.0	48.45 b*
Transgenik Marfona	46.0	42.4	35.0	24.4	36.95 b*
Ortalama	60.0	58.5	59.7	58.5	59.17
LSD					16.18

* Aynı harf ile gösterilen ortalamalar LSD 0.05 olasılık düzeyinde benzerdir.

Çizelge 4.8 Transgenik Patetes Bitkilerinde 4 Gün Süre İle Beslenen Patetes Böceğinin Günlük Ağırlıklarına Ait Varyans Analiz Değerleri

	Sd	KT	KO	F değeri	Olasılık
Blok	4	9072.167	2268.042	62.0484	0.0000
Gün (A)	3	27.533	9.178	0.2511	
Hata-1	12	438.633	36.553		
Uygulama (B)	2	32997.63	16498.82	26.145	0.0000
AxB	6	6514.767	1085.794	1.7206	0.1482
Hata-2	32	20193.6	631.05		
VK (%)		42.46			

KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, F: F testi, SD: Standart Sapma

Kurulan saksı denemesinde yapılan gözlemlerde transgenik bitkiler üzerinde 3. ve 4. dönem patates böceği larvası beslenmesi sonucunda ilerleyen zamanlarda böcekte beslenme azalması ve sonrasında larva ölümleri meydana gelmiştir. Transgenik bitkiler üzerinde ölmeyen böceklerde ise pupa oluşumu gözlenmiş, fakat daha sonra pupadan ergin çıkışları gerçekleşmemiştir. Kontrol bitkilerde beslenen patates böceklerinde ise bitki üzerinde yaprak kalmayncaya kadar beslendiği ve normal gelişimlerine devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.37 A, B), (Çizelge 4.9). Kurulan biyolojik testleme çalışmalarında transgenik “Marfona” patates çeşidi

üzerinde beslenen patates böceğinin larva ve erginlerinde % 85 oranında ölüm meydana geldiği gözlenmiştir. Transgenik “Granola” patates çeşidi üzerinde beslenen böceğin larva ve erginlerinde ise, % 80 oranında bir ölüm meydana geldiği belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Transformasyon yapılmamış kontrol bitkiler üzerinde bitki yapraklarında beslenen böceğin ergin ve larvalarında ise ölüm meydana gelmemiş, patates böceği tüm gelişim evreleri olan pupa ve ergin oluşumunu tamamlamıştır. Transgenik “Marfona” ve “Granola” patates çeşitlerinde pupa oluşturan patates böceğinde % 50 oranında kuruma olmuş ergin çıkışlarına rastlanmamıştır.



A



B

Şekil 4.37. Transgenik “Marfona” (A), “Granola” (B) Patates Çeşidi (solda) ve Kontrol (sağda) Bitkilerin Yaprakları Üzerinde Karakteristik Beslenen Patates Böceği (*L. decemlineata* Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar

Çizelge 4.9. Transgenik “Marfona” ve “Granola” Çeşitlerinde Biyolojik Testleme Esnasında Patates Böceğinde Gözlenen Ölüm ve Gelişim Oranları

	Ölüm Oranı			Gelişim Oranı		
	Larva (%)	Pupa (%)	Ergin (%)	Larva (%)	Pupa (%)	Ergin (%)
Transgenik Marfona	85	-	85	10	5	5
Transgenik Granola	80	50	80	15	5	5
Kontrol	0	0	0	100	100	100

Patates böceği erginleri ile transgenik “Marfona” ve “Granola” bitkileri larvalarla kurulan aynı deneme kurulmuştur ve orada da alınan sonuçlar larva denemesinde alınan sonuçlarla benzerlik göstermiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Transgenik “Granola” Patates Çeşidi Bitkilerin Yaprakları Üzerinde Beslenen Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Erginlerinin Uzak (A) ve Yakından (B) Görüntüleri

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada patates bitkisine *Agrobacterium* aracılığı ile gen transferi yapmak için önce patateste *in vitro* koşullarda bitki regenerasyonu sistemi kurulmuştur. Bu amaçla temel MS ortamında farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonları denenmiş ve optimum regenerasyon ortamı saptanmıştır. Ayrıca *in vitro* da gelişen patates bitkilerinden mikro yumru oluşumlarını gözlemek amacıyla farklı sakkaroz konsantrasyonları denenmiştir. *Agrobacterium*'un higromisin antibiyotiğine dayanıklılık geni (*Hpt*) ve böceklerle dayanıklılığı sağlayan *Bacillus thuringiensis Cry* genlerinden *Cry 1A(c)* genini taşıyan pCAMBIA 1301 plazmidini içeren EHA101 *A. tumefaciens* izolatı ile gen transferinin yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca transformasyonu optimize etmek için kanamisine dayanıklılık sağlayan *Npt II* geni ile β -glukurodinaz (*GUS*) genlerini taşıyan pGA482GG plazmidini bulduran EHA101 izolatı ile de gen transferi yapılmıştır. Daha sonra 50 mg/l kanamisin içeren ortam üzerinde gelişen doku parçalarından gelişen transgenik olduğu varsayılan sürgün parçaları histokimyasal GUS analizi ile test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre böceğe dayanıklılık genini taşıyan plazmidi içeren diğer bakteri ile transformasyon yapılmıştır. Antibiyotikli ortam üzerinde transgenik olduğu varsayılan sürgünler köklendirme ortamı üzerinde kültüre alınmış ve gelişimini tamamlayan bitkilerin doğal koşullara adaptasyonlarını sağlanmıştır. Bu bitkilerde genlerin varlığı moleküler analizler ve biyolojik testleme ile ispat edilmiştir.

Bu sonuçları elde etmek için;

1) Araştırmada regenerasyon ve transformasyon çalışmalarında kullanılmak amacıyla, ilk olarak patates yumruları 100 mg/l GA₃ içeren çözelti içerisinde 1 saat veya +4 °C de 1 gece bekleterek dormansisi kırılmıştır. *In vivo* da yetiştirilen bitkilerinde sürgün uçları ve internodium parçaları steril koşullarda % 70'lik etil alkol içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra % 3'lük sodyum hipoklorit (NaOCl) ve % 0.1 tween-20 içeren çözelti içerisinde 10 dakika bekletilerek, sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

2) Transformasyon için en iyi regenerasyon ortamını belirlemek için yapılan ön çalışmalarda internodium doku parçaları için en uygun bitki regenerasyon ortamının

% 90 oranında 4.78 mg/l Zeatin, 0.2 mg/l GA₃ ve 0.01 mg/l IAA içeren bazal MS ortamı olduğu ve bunu % 82 oranında 2.2 mg/l Zeatin, 0.02 mg/l NAA ve 0.15 mg/l GA₃ içeren MS ortamının takip ettiği belirlenmiştir. Yaprak doku parçalarında ise en iyi sürgün gelişiminin % 33 oranında 2.2 mg/l Zeatin, 0.02 mg/l NAA ve 0.15 mg/l GA₃ içeren MS ortamında meydana geldiği belirlenmiştir. Araştırılan diğer hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarının bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınan bitki doku parçalarında istenmeyen kallus gelişimleri ve anormal sürgün gelişimleri gözlenmiştir. Kullanılan farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren ortamlar üzerinde gelişen sürgün sayısındaki farklılıkları belirlemek amacıyla istatistik analizler yapılmış ve Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde yorumları yapılmıştır. Bu analize göre aynı harfi taşıyan ortamların birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

3) Araştırmada kullanılan her iki patates çeşidine ait bitki doku parçalarından en fazla sürgün regenerasyonun internodium doku parçalarından meydana geldiği saptanmıştır. Yaprak doku parçasında ise çok az sürgün gelişiminin olduğu ve çoğunlukla kallus gelişimi meydana geldiği belirlenmiştir. Oluşan bu kallusların kültüre alınması sonucunda ise bitki regenerasyonu gözlenmemiştir.

4) Gen transferi çalışmalarında, bitki doku parçalarının uzun süre ve yoğun bakteri ile ortak kültürü durumunda antibiyotik içeren ortam üzerinde kültüre alınan bitki dokuları üzerinde bakterilerin ölmediği saptanmıştır. Ayrıca gen transferi yaparken bakteri solüsyonunun hazırlandığı ortam içerisine 20 mg/l Asetosiringon, 5 mM Betain ve 1 mg/l 2.4-D ilave edildiğinde transformasyon sıklığının arttığı gözlenmiştir. Antibiyotikli ortam üzerinde gelişen doku parçalarına uygulanan histokimyasal GUS analizi sonucunda aktarılan GUS geninin etkisi ile dokuların % 80'inin mavi renge boyandığı böylece bitki transformasyonunun gerçekleştiği kanıtlanmıştır.

5) *A. tumefaciens* ile gen aktarımı yapılan internodium ve yaprak doku parçalarında transformasyon başarısının en fazla % 90 oranında internodium doku parçasında gerçekleştiği belirlenmiştir. Yaprak doku parçasında ise % 20 oranında transformasyon başarısının gerçekleştiği gözlenmiştir.

6) Rejenere edilen transgenik olduğu varsayılan sürgünler modifiye edilmiş MS ortamına 1,0 mg/l NAA içeren ortam üzerinde kültüre alınmasından 3 hafta sonra sürgünlerin yaklaşık 15 cm uzunluğunda kökler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu şekilde gelişen bitkiler saksılara aktarıldığında doğal koşullara adaptasyonları daha kolay olmuştur. Gelişen transgenik bitkilerin normal yeşil aksam, çiçek ve yumru oluşturdıkları gözlenmiştir.

7) Elde edilen transgenik bitkilerde *in vitro* üretim materyali olan mikro yumru oluşumunu teşvik etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici hormonlar ve farklı oranlarda sakkaroz içeren ortamlar üzerinde denemeler kurulmuştur. Kurulan sakkaroz denemelerde; karanlık koşullara sahip klima odasında en fazla mikro yumru oluşum oranının % 90 sakkaroz içeren ortam da gerçekleştiği, daha sonra % 60'lık sakkaroz içeren ortamların bitki başına yumru sayısı ve ağırlığı üzerinde oldukça fazla etkili olduğu belirlenmiştir. Kullanılan Kinetin ve NAA hormonlarında da mikro yumru oluşumu gözlenmiş fakat 90 gr/l sakkaroz içeren ortama göre daha az oluşturduğu belirlenmiştir.

8) Elde edilen transgenik bitkilerden DNA izolasyonları yapılmış *Hpt*, *Npt II* ve *GUS* geni açısından PCR analizleri yapılmıştır. PCR ürünlerinin elektroforezi sonucunda transgenik bitkilerde higromisin antibiyotikine dayanıklılık geni için testlenen 55 adet tahmini transgenik bitkilerin 35 tanesinde 700 bp'lik spesifik DNA bantlarının meydana geldiği belirlenmiştir. Optimizasyon çalışması amacıyla aktarılan markör genleri için yapılan PCR sonuçları ise; transgenik bitkiler arasından tesadüfi seçilen 10 adet bitkinin *Npt II* geni için yapılan PCR analizinde 7 tane bitkide 700 bp'lik spesifik bant oluşumu gözlenmiştir. *GUS* geni için ise, transgenik bitkiler arasından tesadüfi seçilen 10 adet bitkinin *GUS* geni için yapılan PCR analizinde 9 tane bitkide 660 bp'lik spesifik bant oluşumu gözlenmiştir. Aktarılan genlerin varlığını ispat etmek açısından yapılan PCR analizlerinde, spesifik bant oluşumu göstermeyen bitkilerin olduğu gözlenmiştir. Bu DNA'ların bant oluşturmaması gen aktarımında bazı kaçışların olabileceğini veya PCR sonrası sentezlenen DNA'nın elektroforez sırasında kayba uğradığı yada dejenere olduğu sonucuna varılmıştır.

9) Toprak koşullarına adaptasyonları sağlanmış transgenik bitkiler biyolojik olarak test edilmişlerdir. Böcek kafesleri içerisinde Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) ergin ve larvaları beslenmiştir. Bu deneme sonrasında transgenik olduğu düşünülen bitkinin yaprakları ile beslenen zararlılarda 3-4 gün sonra % 80-85 oranında larva ölümleri meydana geldiği gözlenmiştir. Her ne kadar kullanılan gen özellikle Lepidoptera takımı böceklere toksik olsada Patates Böceği'nde ergin öncesi dönemleri larva olduğundan *Cry 1A(c)* geni ürünü kristal proteinleri toksik etkisini Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'nde de göstermiştir. Transgenik bitkilerle beslenen larvaların bazılarında pupa oluşumları gözlenmiş fakat pupadan ergin çıkışlarına rastlanmamıştır. Kontrol olarak kullanılan patates bitkisinin yapraklarında ise larvalar beslenmiş ve gelişim evrelerini tamamladıkları belirlenmiştir. *Cry 1A(c)* geni bu tez kapsamında ilk olarak Coleoptera takımına bağlı Patates Böceği'nin larva safhalarında etkili olduğu gösterilmiştir.

10) Transgenik patates bitkilerinden elde edilen yumrular saksılara dikilmiş ve çıkışları gözlenmiştir. Dikimi yapılan 10 adet yumrularından 5 tanesinde gözler sürmüş ve bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerden DNA izolasyonları yapılmış ve *Hpt* geni için PCR analizleri yapılmış ve DNA izolasyonları yapılan bitkilerde 700 bp *Hpt* geni için spesifik bantlar elde edilmiştir. Böylece aktarılan markör ve diğer genin yumrulara geçtiği kanıtlanmıştır.

Yapılan araştırma ile *Cry 1A(c)* geninin *Agrobacterium* aracılığıyla aktarılması sonucu elde edilen transgenik bitkiler biyolojik testlemede patatesin en önemli zararlısı olan Coleoptera takımına ait Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) ile beslenmiştir. Ancak *Cry 1A(c)* geninin Lepidoptera takımı zararlılara karşı etkili bir gen olduğu bilinmesinden dolayı çalışmada pozitif kontrol olarak bu takıma bağlı patates zararlılarından Patates Güvesi (*Phthorimaea operculella*), polifag bir zararlı olan Yeşil Kurt (*Heliothis armigera*) ve Prodenya (Pamuk yaprak Kurdu) (*Spodoptera littoralis*) ile beslenmesi yapılabilir.

Ayrıca elde edilen transgenik patates bitkilerine ait yumrular Biyogüvenlik yasası çerçevesinde etik izinler alınıp, Patates Araştırma Enstitülerinin deneme alanına ekilip tarla koşullarında transgenik bitkilerin söz konusu zararlıya karşı etkinlikleri değerlendirilebilir.

Transgenik bitkiler GDO kapsamında insan sağlığına olan etkileri tartışılan bir konudur. Bu bitkiler için birçok araştırmacıların yaptığı olumlu ve olumsuz birçok tartışma vardır. Ancak patatesin önemli zararlısı olan Patates Böceğine karşı en az 4-5 veya yoğunluğuna bağlı olarak daha fazlada ilaçlama yapılabilmektedir. Kullanılan bu ilaçların toprakta ve bitki depoları olan yumrulara kalıntı oluşturması sonucu transgenik bitkilerden daha fazla insan ve çevre sağlığını tehdit ettiğini düşünmekteyim.

Sonuç olarak biyoteknolojik çalışmaların ilk başladığı bitkilerden biri olan patatesten yapılan bu çalışmada gen aktarma sistemine uygun bir adventif sürgün oluşumu ve yüksek oranda transgenik bitki elde edilmeye çalışılmış olup, çok sayıda transgenik patates bitkisi elde edilmiştir. Araştırma sonucunda alınan bilgiler ışığında patates bitkisinde yapılacak tarımsal açıdan önemli diğer farklı genlerin aktarılması için uygun bir protokol oluşturulmuştur. Daha sonraki yapılacak çalışmalarda farklı patates çeşitleri ele alınarak bitki rejenerasyon kapasiteleri saptanıp, en yüksek kapasiteye sahip çeşitler seçilebilir. Çalışmada doku kültürü, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile etkin bir şekilde gen aktarımı ile ilgili bulgular bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır. Ayrıca, bu araştırma ışığı altında hastalık, zararlı, herbisitlere veya stres koşullarına dayanıklılık genleri çalışmada belirlenen yöntemlere göre bitkiye aktarılarak test edilebilir. Böylece, elde edilen transgenik bitkiler diğer mücadele yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- ADANG, M.J., BRODY, M.S., CARDINEAU, G., EAGEN, N., ROUSH, R.T., SHEWKAR, C. K., JONES, A., CAKES, J.V., and MCBRIDEI, K.E., 1993. The Reconstruction and Expression of a *Bacillus thuringiensis cry IIIA* Gene in Protoplast And Potato Plants. *Plant Mol.Bio.*Kluwer Academic Pub. 6: 1131-1148.
- ALEJANDRO, S., EDUARDO, J., and ALONSO, J., 2009. *Cry 1B* and *Cry 3A* are Acetive Against Hypothenemus Hampei Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 242-245.
- AL-SAFADI, B., AYYOUBI, Z., and JAWDAT, D., 2000. The Effect of Gamma Irradiation on Potato Microtuber Production *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61: 183-187.
- ALISDAIR, R., FERNIE R., and WILLMITZER, L., 2001. Update on Tuber Formation, Dormancy, and Sprouting Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development. *Plant Physiol.*, December 2001, Vol. 127:1459-1465.
- ALPHONSE, M., BADAWI, M., ELDEEN, T. M., and ELFAR, M., 1998. Factors Effecting Regeneration Ability of Potato Plants *In Vitro*. *Field Crops Abs.* 52: 379.
- ALTINDAL, D., ve KARADOĞAN, T., 2010. The Effect of Carbon Sources on *In Vitro* Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, 15 (1):7-11.
- ANDERSSON, M., TRIFONOVA, A., ANDERSSON, A.-B., JOHANSSON, M., BÜLOW, L., and HOFVANDER, P., 2003. A Novel Selection System for Potato Transformation Using a Mutated AHAS Gene. *Plant Cell Reports*. Vol:22 (4): 261-267.
- ANONİM, 2002. <http://www.fao/statistics>.
- ANONİM, 2009. Patates Hastalık ve Zararlıları İle Mücadele, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü.

- ARICAN, E., ARI, Ş., GÖZÜKIRMIZI, N., BAYRAMOVIÇ, K., ve OĞRAŞ, T., 1996. Transgenik Patateste *in vitro* Microtuber Eldesi. Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi. pp.: 2091-2094.
- ARİF, M., THOMAS, P.E., CROSSLIN, J.M., and BROWN, C.R., 2009. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Potato Using PLRV-REP. and PVY CP Genes and Assessment of Replicase Mediated Resistance Against Natural Infection of PLRV. Pak. J. Bot., 41(3):1477-1488.
- AVETİSOV, V.A., STEFANOVIÇ, A.M., and SARKİSOV, O.S., 1992. Morphogenetic Activity of The Transgenic and Normal Roots Of Potatoes in *In Vitro* Culture. Biotechnologia 2:6-9.
- AVILA, A., PEREYRA, S., COLLINO, D.J., and ARGUELLO, J. A., 1995. Effect of Nitrogen Source on Growth and Morhogenesis of Three Micropropagated Potato Cultivars. Field Crops Abst., vol:48, p. 335.
- BADR, E., MABROUK, Y., RAKHA, F., and GHAZY, A-H., 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Potato and Analysis of Genomic Instability by RAPD. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4(1):16-25.
- BANERJEE, A.J., PRAT, S., and HANNAPEL, D.J., 2006. Efficient Production of Transgenic Potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) Plants via *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. Plant Science 170: 732-738.
- BARTON, K.A., WHITELEY, H.R., and YANG, N.S., 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. Plant Physiol., 85: 1103-1109.
- BARRELL, P. J., YONGJİN, S., COOPER, P.A., and CONNER, A.J., 2004. Alternative Selectable Markers for Potato Transformation Using Minimal T-DNA Vectors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol:70 (1): 61-68.
- BARSBY, T., and SHEPARD, J., 1983. Regeneration of Plants from Mesophyll Protoplast of Solanum Species of the Etuberosa Group. Plant Sci. Let., 31:101-105.

- BAYROVİÇ, E., ARICAN, E., ve GÖZÜKIRMIZI, N., 1995 (a). *Agrobacterium tumefaciens* ile Patates ve Tütünde Crown Gall Oluşumu. Wokshop Biyoteknoloji ve Bitki Islah. 17-19 Nisan 1995, 191-194, Bornova-İzmir.
- BAYROVİÇ, E., ARI, Ş., ARICAN, KAZAN, K., and GÖZÜKIRMIZI, N., 1995 (b). Transformation of Potato (*Solanum tuberasum* L.) Using Tuber Discs Stem Explants. Wokshop Biyoteknoloji ve Bitki ıslahı. 17-19 Nisan 1995, 191-194, Bornova-İzmir.
- BEAUJEAN, A., SANGWAN, R.S., LECARDONNEL, A., and SANGWAN-NORREEL, B.S., 1998. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Three Economically Important Potato Cultivars Using Sliced Internodal Explants: An Efficient Protocol of Transformation. Journal of Experimental Botany, Vol.49:1589-1595.
- BENCHEKROUN, A., MICHAUD, D., NGUYEN-QUOC, B., OVERNEY, S., DESJARDINS, Y., and YELLE, S., 1995. Synthesis of Active Oryzacystatin I in Transgenic Potato Plants. Plant Cell Reports 14: 585–8.
- BORNA, R.S., HOQUE, M.I., and SARKER, R.H., 2010. Rita Sarah Borna, M. I. Hoque and R. H. Sarker., 2010. *Agrobacterium* - mediated Genetic Transformation for Local Cultivars of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Marker Genes. Plant Tissue Cult. & Biotech. 20(2): 145-155.
- BRAVO, A., GİLL, S.S., and SOBERON, M., 2007. Mode of Action of *Bacillus thurigiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for İnsect Control. Toxicon 49: 423-435.
- CARDÍ, T., CARPUTA, D., and FRUSCIANTE, L., 1992. *In vitro* Shoot Regeneration and Chromosome Doubling in 2n and 3n Potato Clones. Am.Potato J.,69:1-11.
- CHAKRAVARTY, B., WANG-PRUSKÍ, G., FLİNN, B., GUSTAFSON, V., and REGAN, S., 2007. Genetic Transformation in Potato: Approaches and Strategies. Amer. J. of Potato Res. 84:301-311.
- CHANG, H., and CHAN, M., 1991. Improvement of Potato (*Solanum tuberasum* L.) Transformation of *Agrobacterium* in Presence of Silver Thisulphate. Bot. Bull. Academia Sinica, 32:63-70.

- ČINGEL, A., VINTERHALTER, B., VINTERHALTER, D., CALIĆ-DRAGOSAVAC, D., SMÍGOCKÍ, A., and NINKOVIĆ, S., 2010. Agrobacterium-Mediated Transformation of Two Serbian Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.cv.Dragacevka and cv. Jelica). African Journal of Biotechnology. Vol.9 (30):4644-4650.
- CONNER, A.J., and DALE, P.J., 1996. Reconsideration of Pollen Dispersal Data from Field Trials of Transgenic Potatoes. Theor., Appl. Genet. 92: 505-508, Berlin, Germany.
- DALE, P.J., and MCPARTLAN, H.C., 1992. Field Performance of Transgenic Potato Plants Compared with Controls Regenerated from Tuber Disc and Shoot Cuttings. Theor. Appl. Genet., 84:585-591, Berlin, Germany.
- DAVIDSON, M.M., JACOBS, J.M.E., READER, J.K., BUTLER, R.C., FRATER, C.M., MARKWICK, N.P., WRATTEN S.D., and CONNER, A.J., 2002. Development and Evaluation of Potatoes Transgenic for a *cry1Ac9* Gene Conferring Resistance to The Potato Tuber Moth. Journal of the American Society for Horticultural Science 127, 590-596.
- DAVIDSON, M.M., TAKLA, M.F.G., JACOBS, J.M.E., BUTLER, R.C., WRATTEN, S.D., and CONNER, A.J., 2004. Transformation of New Zealand Potato Cultivars with a *cry1Ac9* Gene Confers Resistance to The Potato Tuber Moth. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 32, 39-50.
- DE BLOCK, M., 1988. Genotype-Independent Leaf Disc Transformation of Potato (*Solanum tuberosum*) Using *Agrobacterium tumefaciens*. Theoretical and Applied Genetics 76, 767-774.
- DIMITROVA, D., DIMANOV, D., and RUSEVA, R., 1994. The Effect of MS and B5 Medium on Potato *In Vitro*. Field Crop Abst. 1:53.
- DURING, K., PORSH, P., FLADUNG, M., and LÖRZ, H., 1993. Transgenic Potato Plants Resistant to The Phytopathogenic Bacterium *Erwinia caratovora*. The Plant J. 3:587-598.

- ELAİNE, S., HİGGİNS, J., and HULME ROBERTT, S., 1992. Early Events Transformation of Potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci. 82:109-118.
- ELİSEU, S., FİLHO, F., FİGUEİREDO, L.F.A., and MONTE-NESHİCH, D.C., 2004. Transformation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Mantiqueira Using *Agrobacterium tumefaciens* and Evaluation of Herbicide Resistance. Plant Cell Reports.13:666-670.
- ERASLAN, F., KULMAN, N., ÇİÇEK, N., ve ERASLAN, M., 1986. Meristem Kültürü ve Tekniğinin Patates Islahında Kullanma Olanakları ve Ülkesel Patates Araştırma Projesindeki Uygulanması. Bitki Islahı Simpozyumu TÜBİTAK. TOAG, Ekim, İzmir.
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization of The United Nations Resmi İnternet Sitesi Verileri: <http://www.fao/org>.
- FLETCHER, P.J., FLETCHER, J.D., and CROSS, R.J., 1998. Potato Germplasm: *in vitro* Storage and Virus Reduction. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol.26:249-252.
- GARCÍA, E., and MARTÍNEZ, S., 1995. Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from Stem Nodal Sections. Journal of Plant Physiology. Field Crops Abst. 48: 850.
- GİLL, S.S., COWLES, E.A., and PİETRANTONİO, P.V., 1992. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Endotoksins. Ann. Rev. Entomol., 37:615-636.
- GHAFFOOR, A., SHAH, G.B., and WASEEM, K., 2003. *In vitro* Response of Potato (*Solanum tuberosum* L.) to Various Growth Regulators. Biotechnology, 2(3): 191-197.
- GROCHULSKİ, P., 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry IA(a) İnsecticidal Toxin-Crystal Structure and Channel Formation. J. Mol. Biol., 254:447-464.
- GOPAL, J., MİNOCHA, H.S. and DHALİWAL, S. 1998. Microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Rep. 17:794-798.

- HAMDI, M., CEBALLOS, E., RITTER, E. and GALERETTA, J.I., 1999. Evaluation of Regeneration in *Solanum tuberosum* L. Field Crops Abs.52:379.
- HAMDI, M., ROUVIERE, C., ROJAS-BELTRAN, J., and JARDIN, P., 2003. Optimization of Potato Genetic Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* Using Hygromycin Resistance as Selective Marker. Biotechnologie, Vol:7:183-188.
- HERMAN, W., MIGNERYG., GREGORY, M., and WILLIAM, P., 1989. A Rapid and Efficient Transformation Method for the Production of Large Numbers of Transgenic Potato Plants. Plant Sci. 63: 79-85. Ireland.
- HUAI-JUN, S., JUN, L., and CONG-HUA, X., 2005. Transformation of Potato Using an Antisense Class I Patatin Gene and Its Effect on Microtuber Formation. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2:7-11.
- IMAI T., AIDA, R., and ISHIGE, T., 1993. High Frequency of Tetraploidy in *Agrobacterium*-mediated Transformants from Tuber Discs of Diploid Potato Lines. Plant Cell Reports 12, 299–302
- JEFFERSON RA., 1987. Assaying Chimeric Genes in Plants: the GUS Gene Fusion System. Plant Molecular Biology Reporter 5, 387– 405.
- JOHNSON, A.T., and VEILLEUX, R. E., 2003. Integration of Transgenes into Sexual Polyploidization Schemes for Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica* 133: 125–138.
- JOHN, S., HULME, S., HIGGINS, S., and ROBERT, S., 1992. An Efficient Genotype-Independent Method for Regeneration of Potato Plants from Leaf Tissue. Plant Cell, Tissue and Culture, 31:161-167.
- KAMENOVA, I., BATCHVAROVA, R., FLASINSKI, S., DIMITROVA, L., CHRISTOVA, P., SLAVOV, S., ATANASSOV, A., KALUSHKOV, P., and KANIEWSKI, W., 2008. Transgenic Resistance of Bulgarian Potato Cultivars to the Colorado Potato Beetle Based on Bt Technology. Agron. Sustain. Dev. 28:481-488

- KAYIM, M., and KOÇ, N.K., 1992. Obtainning of Virus-Free Potato (*Solanum tuberasum* L.) Planting Stock Material Through Meristem Culture. Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi. vol:16:2 pp: 380-391.
- KAYIM, M., 1997. Kütdiken Limon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) Çeşidinde Genetik Transformasyon ve Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi. Doktora Tezi Ç.Ü. Fen Bilimleri Enst. Adana, 176.
- KAYIM, M., CECCARDİ, T.L., BERRETTA, M.J.G., BARTHE, G.A., and DERRİCK, K.S., 2004. Introduction of a Citrus Blight-Associated Gene İnto Carrizo Citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbc.x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by *Agrobacterium*-Mediated Transformation. Plant Cell Reports 23:377-385.
- KHOKAN, E.H., HAYDAR, A., ARA, T., ALAM, M.K., and SHARMA, M.D., 2009. Enhancement of *Agrobacterium*-Mediated Transformation Method for the Production of Heme-Protein (Ferritin Protein) Rich Potato. Int. J. Sustain. Crop Prod. 4(4):17-22.
- KNOWLES, B.H., and DOW, J.A.T., 1993. The Crystal Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*-Models For Their Mechanisims of Action on the İnsect Gut. BioEssays, 15:469-476.
- KOÇ, N.K., KAYIM, M., YETİŞİR, H., SARI, N., UNLU YUCEER, S., and ARICI, Ş. E., 2007. The İmprovement of Resistance to Bacterial Speck in Transgenic Tomato Plants by *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation. Russian Journal of Plant Physiology. Vol:54 (1) pp:89-96.
- KOİVU, K., VALKONEN, JP., SUPMAA, S., TAVAZA, R. and PEHU, E., 1995. *Agrobacterium tumefaciens* –mediated transformation of *Solanum brevidens*, *Solanum tuberasum* cv. Pito. Soil and Plant Sci. 45:78-79.
- KUMAR, A., MİLLER, M., WHİTTY, P., LYON, J., and DAVİE, J., 1995. *Agrobacterium*-mediated Transformantion of wild Solanum Species Using *In Vitro* Micro Tubers. Plant Cell Rep. 14:324-328.

- KUMAR, M., CHIMOTE, V., SINGH, R., MISHRA, G.P., NAIK, P.S., PANDEY, S.K., and CHAKRABARTI, S.K., 2010. Development of Bt Transgenic Potatoes for Effective Control of Potato Tuber Moth by Using *Cry 1Ab* Gene Regulated by GBSS Promoter. *Crop Protection* 29:121-127.
- LAGNAOUI, A., CANEDO, V., and DOUCHES, D.S., 2000. Evaluation of Bt-*cry11a1 (cryV)* Transgenic Potatoes on Two Species of Potato Tuber Moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmerischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. CIP Program Report, 2000.
- LAFTA, A., WU, J., and LORENZEN, J., 2005. Transformation of Potato Plants With The Isopentenyltransferase Gene Leads to Enhanced Stolon Development and Precocious Tuber Sprouting. *ISHS Acta Horticulture* 625: XXVI International Horticultural Congress:Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations.
- LI, Y., Q., ZHU, L., and LIU, M., 1994. A Study of the Effects of The Growth Regulators PP333, GA3 and BAP on Potato Seedlings Cultured *In Vitro*. *Field Crops Abs*, 47:758.
- LİSTANTO, E., WATTİMENA, G.A., ARMİNİ, N.M., SİNAGA, M.S., SOFARİ, E., and HERMAN, M., 2009. Regeneration on Some Potato Cultivars and Potato Transformation with RB Gene Through *Agrobacterium tumefaciens*. Indonesian Centerfor Horticulture Research and Development
- LOZOYO, H., 1992. Photoperiod Gibberellic Acid and Kinetin in Potato Flower Differentiation *In Vitro*. *American Potato J.*69: 265-274.
- MAAGD, R.A., BOSCH, D., and STIEKEMA, W., 1999. *Bacillus thuringiensis* Toxin-Mediated Insect Resistance in Plants. *Trends Plant Sci.*, 4: 9-13.
- MARIANNE, J., CORNELİŞSENİ, H., and JONGEDİJK, E., 1992. Transgenic Potato Plants to Resistant to Viruses. *Euphytica* 63:187-192.
- MERJA, D., and STASA, A., 1999. *In vitro* Regeneration and Propagation of Potato and Its Genetic Homogeneity Determination by Means of Protein Polymorphizm of Tuber. *Field Crops Abst.* 52:66.

- MEIYALAGHAN, S., DAVIDSON, M.M., TAKLA, M.G.F., WRATTEN, S.D., and CONNER, A.J., 2005. Effectiveness of Four *Cry* Genes in Transgenic Potato for Conferring Resistance to Potato Tuber Moth. 4th International Crop Science Congress.
- MELİK, S., CHEREZHANOVA, L.V., and OVCHINKOVA, V.N., 1994. Exogenous Phytohormones as a Factor in The Cytogenetic Variability of Potato Cells in *In Vitro* Cultures. *Field Crops Abs.* 47:1048.
- MURASHIGE, T., and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- MOHAMMED, A., DOUCHES, D.S., PETT, W., GRAFIUS, E., COOMBS, LISWIDOWATI, J., LI, W., and MADKOUR, M.A., 2000. Evaluation of Potato Tuber Moth (Lepidoptera:Gelechiidae) Resistance in Tubers of Bt-*Cry5* Transgenic Potato Lines. *J. Econ.Entomol.* 93(2):472-476.
- NAZARIAN, A., JAHANGIRI, R., JOUZANI, G.S., SEIFINEJAD, A., SOHEILIVAND, S., BAGHERI, O., KESHAVARZI, M., and ALAMISAEID, K., 2009. Coleopteran-Specific and Putative Novel *Cry* Genes in Iranian Native *Bacillus thuringiensis* Collection. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 101-109.
- NOVAK, F., ZADINA, J. and MOSKOVA, I. 1980. The Effect of Growth Regulators on Meristem Tip Development and *In Vitro* Multiplication of *Solanum tuberosum*. *Potato Res.*23:155-166.
- OERKE, E.C., DEHNE, H.W., SCHONBECK, F., and WEBER, A., 1994. *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops.* Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 808 pp.
- OKAMOTO, S., TSURUDA, K., YAMAGUCHI, N., MATSUO, T., and NAKAMURA, Y., 2005. Effects of Reducing Compounds on *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Sweet Potato. *ISHS Acta Horticulturae* 682: V International Postharvest Symposium
- OOMS, G., BURELL, M.M., KARP, A., BEVAN, M., HILLE, J., 1987. Genetic Transformation in Two Potato Cultivars with T-DNA from Disarmed *Agrobacterium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 73:744-750.

- ÖZKAYNAK, E., ve SAMANCI, B., 2005. Determining Relationships Among Plant and Tuber Components in Potato. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9 (1): 53-58.
- PARK, Y. D., RONİS, D.H., BOE, A., and CHENG, Z.M., 1995. Plant Regeneration from Leaf Tissues of Four North Dakota Genotypes of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ame. Potato J.* 72: 329-338.
- PEFERON, M., 1997. Insect Control with Transgenic Plants expressing *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins. In: Carozzi N, Koziel M (eds), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*, pp. 21-48. Tylor & Francis, Bristol.
- PENNAZIO, S., and REDOLFI, M., 1976. Effects of NAA on Potato Meristem Tip Development. *Potato Res.*19: 257-261.
- PERLAK, F.J., STONE, T.B., MUSKOPF, Y.M., PETERSEN, L.J., PANKER, G.B., MEPHERSON, S.A., WYMAN, J., LOVE, S., REED, G., and BIEVER, D., 1993. Genetically Improved Potatoes Protection From Damage by Colorado Potato Beetles. *Plant Mol., Bio., Kluwer Academic Pub.* 22:313-321.
- PIAO, X.C., CHAKRABARTY, D., HAHN, E.J., and PAEK, K.Y., 2003. A Simple Method for Mass Production of Potato Microtubers Using a Bioreactor System. *Curr Sci* 84:1129–1132
- QUAK, E., 1972. *Viruses of Potatoes and Seed Production*. Edi. J.A. p.158-166. Wageningen-Holland.
- RAHMAN, M.H., ISLAM, R., HOSSAIN, M., and ISLAM, M.S., 2010. Role of Sucrose, Glucose and Maltose on Conventional Potato Micropropagation, *Journal of Agricultural Technology* . 2010 Vol. 6(4): 733-739
- ROENHORST, J.W., JANSEN, C. C. C., KOX, L. F. F., DE HAAN, E. G., VAN DEN BOVENKAMP, G. W., BOONHAM, N., FISHER, T., and MUMFORD R. A., 2005. Application of Real-Time RT-PCR for Large-Scale Testing of Potato for *Potato spindle tuber pospiviroid* . *EPPO Bulletin* 35 (1), 133–140.

- ROMANOV, G.A., AKSENOVA, N.P., and KONSTANTİNOVA, T.N., 2000. Effect of İndole-3-Acetic Acid and Kinetin on Tuberization Parameters of Different Cultivars and Transgenic Line of Potato *In Vitro*. *Plant Growth Regul* 32: 245–251.
- SHARMA, H.C., SHARMA, K.K., SEETHARAMA, N., and ORTIZ, R., 2000. Prospects for Using Transgenic Resistance to Insects in Crop Improvement. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458.
- SHARMA, K.K., and ORTIZ, R., 2000. Program for The Application of The Genetic Engineering for Crop Improvement in The Semi-Arid Tropics. *In vitro Cellular and Developmental Biology (Plant)*, 36: 83-92.
- SHEERMAN, S., and BEVAN, M.W., 1988. A Rapid Transformation Method for *Solanum tuberosum* L. Using Binary *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 7:13-16.
- STARK, D.M., TIMMERMAN, G.F., BARRY, F., PREİSS, J., and KISHORA, J.M., 1992. Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Sci.* 258:287-292.
- TAN, M.M.C., RIETVELD, E.M., MARREWİJK, G.A.M.V., and KOOL, A.J., 1987. Regeneration of Leaf Mesophyll Protoplasts of Tomato Cultivars: Factors Important for Efficient Protoplast Culture and Plant Regeneration. *Plant Cell Reports*.6:172-175.
- TERUNO, S., AKİHIRO, N., OGAWA, T., ISHİDA, I., and OKADO, Y., 1997. Transgenic Potato Expressing a Double Stranded RNA-Specific Ribonuclease is Resistant to Potato Spindle Tuber Viroid. *Nature Biotechnology*. 14:1290-1294.
- TURHAN, H., 2004. Callus Induction and Growth in Transgenic Potato Genotypes. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (8), pp. 375-378.
- TÜİK, 2008. Türkiye Ulusal İstatistik Kurumu. İnternet Sitesi Verileri
- THOMAS, E., and VERİLLUX, R., 1992. Inheritance of Competencies for Leaf Disc Regeneration, Anther Culture, and Protoplast Culture in *Solanum phureja* and Correlations Among Them. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cul.*, 31:95-103.

- UNLU YUCEER, S., and KOC, N.K., 2006. *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Regeneration of Cotton Plants. Russian Journal of Plant Physiology, Vol:53, pp. 413-417.
- VAECK, M., REYNAERTS, A., and HÖFTE, H., 1987. Transgenic Plants Protected from Insect Attack. Nature, 327: 33-37.
- VANDER WILK, F., POSTHUMUS-LUTKE WILLINK, D., HUISMAN, D., HUTTINGA, H., and GOLDBACH, R., 1991. Expression of the Potato Leafroll Luteovirus Coat Protein Gene in Transgenic Potato Plants Inhibits Viral Infection. Plant Mol. Biol. 17:431-439.
- VINTERHALTER, D., VINTERHALTER, B., and CALOVIĆ, M., 1996. The Relationship Between Sucrose and Cytokinins in the Regulation of Growth and Branching in Potato cv. Desire Shoot Cultures. In Proceedings of the first Balkan symposium on vegetables and potatoes. Belgrade, Yugoslavia 4-4 June, 1:319-323.
- VISSER, R., JACOBSEN, E., HESSELING MEINDERS SCHANS, A., WITTHOLT, B., and FEENSTRA, W.J., 1989. Transformation of Homozygous Diploid Potato with an *Agrobacterium tumefaciens* Binary Vector System by Adventitious Shoot Regeneration on Leaf and Stem Segments. Plant Mol. Biol. 12:329-338.
- XING, Y., YANG, Q., JI, Q., LUO, Y., ZHANG, Y., GU, K., and WANG, D., 2007. Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Transformation Parameters for Sweet Potato Embryogenic Callus Using β -glucuronidase (GUS) as a Reporter. African Journal of Biotechnology Vol.6(22) :2578-2584.
- YAMAGUCHI, K., SONG, G., and HONDA, H., 2004. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM.) From Stem Explants Using A Two-Step Kanamycin-Hygromycin Selection Method. *In vitro* cellular and developmental biology. Plant., Vol:40: 359-365.
- YILDIRIM, Z., and TUGAY, E., 2002. A Study On Microtuberization of Five Potato Genotypes Under *In Vitro* Conditions. Journal of The Faculty of Agriculture, Ege University, pp: 41-45.

YU, W.C., XING,Y., and LUO, Y., 2000. Sucrose Utilization During Potato Microtuber Growth in Bioreactor. *Plant Cell Reports*, 19:407-413.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Niğde’de tamamladı. 1996 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandı ve 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü tarafından açılan Yüksek Lisans sınavına girerek Bitki Koruma Bölümünün Fitopatoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. 2001 yılında ise Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi oldu. 2004 yılında Yüksek lisans’ını tamamladı. Aynı yıl Doktora sınavına girerek Bitki Koruma Bölümünün Fitopatoloji Anabilim Dalında Doktora yapmaya hak kazandı. 01.09.2006 tarihinde Tarım ve Köy İşleri Bakanlığına Ziraat Yüksek Mühendisi olarak geçiş yaptı. Evliyim ve 2 çocuk annesi.

EKLER

Ek 1. Patatesin kültüre alındığı bazal MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamının içeriği

Kimyasallar	Miktarları (mg/l)
İnorganik Maddeler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl 6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,3
Organik Maddeler	
Myoİnositol	100
Nikotinic asit	1
Piridoksin HCl	1
Thiamin HCl	10
MES	500
Sakkaroz	% 2
Phytojel	% 0,2

Ek 2. Bakteri kültürlerinde kullanılan antibiyotikler, bu antibiyotiklerin çözüldüğü maddeler, stok solüsyonları ve kullanma konsantrasyonları.

Kullanılan		Stok Solüsyon	Kullanılan
Antibiyotikler	Çözücü Madde	(mg/ml)	(mg/ml)
Kanamisin	H ₂ O	10	25-50
Higromisin	H ₂ O	10	10
Karbenisilin	H ₂ O	20	200-600
Sefotaksim	H ₂ O	25	250

Ek 3. *Agrobacterium tumefaciens*' in geliştirilmesinde kullanılan YEP ortamı

Kimyasallar	Miktarları (gr/l)
NaCl	5
Yeast Extract (Difco)	5
Tryptone (Difco)	10
Agar (Bacto-Agar)	15

pH 7.0 olmalıdır.

Ek 4. Bakteri süspansiyonunda kullanılan transformasyon solüsyonu

Kimyasallar	Miktarları (litreye)
MS ortamının tuzları	
Gamborgs B5 vitaminleri	
Glikoz	30 g
2.4-D	1 mg
Betain	5 mM
Asetosiringon	20 mg
MES	500 mg

pH'sı 5,75' e ayarlanır.

Ek 5. Asetosiringone (As) ve Betain hazırlanması

Asetosiringone

Asetosiringone	50 mg
Dimetil sulfoksit (DMSO)	0.5 ml
ddH ₂ O	9.5 ml

Solüsyon filtre ile steril edilir.

Betain

Betain	5 mM
ddH ₂ O	9.5 ml

Solüsyon filtre ile steril edilir.

Ek 6. Patatesin internodium doku parçalarından bitki regenerasyonu için belirlenen ortam

Kimyasallar	Miktarları (mg/l)
İnorganik Maddeler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl 6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,3
Organik Maddeler	
Myoİnositol	100
Nikotirik asit	1
Piridoksin HCl	1
Thiamin HCl	10
MES	500
Sakkaroz	% 2
Phytojel	% 0,2
GA3	0,2
IAA	0,01
Zeatin	4,78

Ek 7. Patatesin yaprak doku parçalarının gelişimleri için belirlenen ortam

Kimyasallar	Miktarları (mg/l)
İnorganik Maddeler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl 6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,3
Organik Maddeler	
Myoİnositol	100
Nikotinik asit	1
Piridoksin HCl	1
Thiamin HCl	10
MES	500
Glikoz	% 1,6
Phytojel	% 0,2
Zeatin	2,2
NAA	0,02
GA3	0,15

Ek 8. Histokimyasal GUS analizinde kullanılan X-Gluk analiz bafırı (X-Gluc)

Kimyasallar	Miktarları
5-Brom-4-klor-3-indolil-B-D-glukurnid	1 mM
NaHPO ₄	100 mM pH 7.0
Triton X-100	% 0.1
K + ferricyanide	4 mM
Kloramfenikol	100 µg/ml

Ek 9. Histokimyasal GUS anlizinde kullanılan sodyum fosfat buffer

Kimyasallar	Miktarları
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (A)	0.05 M
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (B)	0.05 M

pH 7.0 olmalıdır.

0.05 M konsantrasyonunda hazırlanan A solüsyonundan 39 ml, B solüsyonundan 61 ml alınarak karıştırıldığında elde edilen solüsyonun pH'sı 7.0 olur.

Ek 10. Moleküler Biyoloji Testlerinde Kullanılan Ortamlar ve Stok Solüsyonlarının İçerikleri

a) DNA Ekstraksiyon bafırı 1 (500 ml için)

Kimyasallar	Miktarı
Trisma-base	0,1 M
Sorbitol	0,35 M
EDTA-Na ₂	5 mM

dd H₂O içerisinde Trisma-base çözülür HCl ile pH 8.0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim ddH₂O ile 500 ml'ye ayarlanarak otoklav edilir.

b) Nüclei lysis bafır (100 ml için)

Kimyasallar	Miktarı
Trisma-base	0,2 M
EDTA	0,05 M
NaCl	2 M
% 2 CTAB	2 g

pH: 7,5 olmalıdır. Solüsyon otoklav edilerek sterilizasyonu yapılır.

c) % 5 Sarcosyl

DNA Ekstraksiyon Bafırı 2

DNA Ekstraksiyon Bafırı 1	1 vol
Nüclei Lysis Bafır	1 vol
% 5 Sarcosyl	0,4 vol

d) RNaz' ın hazırlanması

RNaz (10 mg/ml)	
RNaz A (Sigma)	10 mg
1XTAE	1 ml

15 dakika steril bidestile su içerisinde kaynatılır ve -20°C 'de saklanır.

Ek 11.

TAE Bafır

Tris-HCl (10 mM)	1,21 gr.
Na ₂ -EDTA (1 mM)	0,37 gr.
ddH ₂ O	1000 ml.

HCl asit ile pH 8.0'a ayarladıktan sonra ddH₂O ile toplam hacim 1000ml'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

Ek 12. Loading bafırı

Loading bafırı	100 ml için
Ficoll 400	0,25 gr
Bromofenol blue	0,25 mg

Ficoll 400 65 °C' de eritilip üzerine bromofenol blue ilave edilir.

Ek 13. EtBr.' in hazırlanması

Etidiumbromid (EtBr) (0,8mg/ml)	
Etidiumbromid	4 µl
ddH ₂ O	50 ml

Ek 14. Transgenik “Marfona” ve “Granola” Çeşidi Üzerinde 4 Gün Boyunca Beslenen 3. ve 4. Dönem Patates Böceği Larvaların Ağırlıklarında Gözlenen Farklılaşma

1. Gün

Tekerrür	Marfona (mg)	Granola (mg)	Kontrol Marfona (mg)
1	20	60	30
2	60	40	100
3	40	80	60
4	50	60	70
5	60	50	120

2. Gün

Tekerrür	Marfona (mg)	Granola (mg)	Kontrol Marfona (mg)
1	18	56	35
2	57	35	110
3	37	75	65
4	45	53	73
5	55	40	124

3. Gün

Tekerrür	Marfona (mg)	Granola (mg)	Kontrol Marfona (mg)
1	15	50	50
2	50	30	120
3	30	70	80
4	40	50	80
5	40	40	150

4. Gün

Tekerrür	Marfona (mg)	Granola (mg)	Kontrol Marfona (mg)
1	12	40	80
2	30	20	125
3	20	60	95
4	30	40	85
5	30	30	180