



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BÖCEĞE VE HERBİSİTE DAYANIKLILIK GENLERİNİ PATATESE AKTARIMI

ABDUL NASER AMİRİ

Eylül 2018

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BÖCEĞE VE HERBİSİTE DAYANIKLILIK GENLERİNİN PATATESE AKTARIMI

ABDUL NASER AMİRİ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH

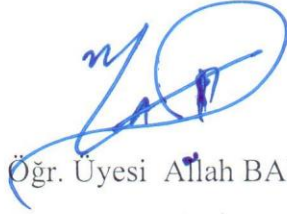
Eylül 2018

EK-C.1 Onay Sayfası Örneği

Abdul Naser AMİRİ tarafından **Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH** danışmanlığında hazırlanan “**Böceğe Ve Herbisite Dayanıklılık Genlerinin Patatese Aktarımı**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Genetik Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan :Doç. Dr. Muhammad ASIM, Necmettin Erbakan Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ufuk DEMIREL, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/....../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/....../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Abdul Naser AMİRİ



ÖZET

BÖCEĞE VE HERBİSİTE DAYANIKLILIK GENLERİNİN PATATESE AKTARIMI

AMİRİ, Abdul Naser

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH

Eylül 2018, 94 sayfa

Bu tez çalışmasında, böceklere ve herbisitlere dirençlilik sağladığı bilinen *cryIAc* ve *bar* isimli iki gen *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Marabel patates çeşidine aktarılarak böceklere ve herbisitlere dirençli transgenik patates hatları geliştirilmiştir. Çalışmada, 35S ve AoPRI olmak üzere iki farklı promotör kullanılmıştır. Yapılan PCR analizleri sonucunda, 6 adet bitkide *cryIAc* ve *bar* genlerinin genoma yerleştiği teyit edilmiştir. ELISA analiz sonucunda transgenik bitkilerin *cryIAc* proteinini 0,1-0,4 µg/g arasında sentezlediği belirlenmiştir. Transgenik bitkilerden, yapılan biyoanaliz testleri sonucunda elde edilen transgenik bitkilerin patates güvesi üçüncü dönem larvalarına karşı (ölüm oranı: %75) ve patates böceği ergin ve larvalarına karşı (ölüm oranı: %0-100) dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Ardından yapılan Glifosinat uygulamasında transgenik bitkilerin herbisite karşı dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. Transgenik bitkilerin T₁ nesillerinde de PCR, ELİZA ve yaprak analizleri yapılmış ve aktarılan genlerin genomdaki varlığı tespit edilmiştir. Geliştirilen bu transgenik hatlar, patates ıslahı programları için gen kaynağı olarak kullanılabilirler.

Anahtar kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, gen aktarımı, transgenik bitkiler, yabancı ot, böcek dayanıklılığı

SUMMARY

TRANSFORMATION OF POTATO WITH INSECTICIDAL AND HERBICIDAL GENES

AMİRİ, Abdul Naser

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor : Assistant Prof. Dr. Allah BAKHSH

September 2018, 94 pages

In present study, a potato variety Marabel was transformed with insecticidal (*cry1Ac*) and herbicidal (*bar*) genes using *Agrobacterium* mediated transformation. *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harboring binary vactory pTF101.1 containing *cry1Ac* gene under the control of 35S and AoPR1 promoter was used to infect leaf discs and intermodal explants of Marabel. Phosphinothricin (PPT) was used as selectable marker for the screening of primary transformants under in vitro conditions. The overall transformation efficiency remained 0.6 %. The gene intregation and expression of introduced gene was confirmed by PCR, ELISA; real time PCR and leaf biotoxicity assays. The primary transformants showed proper intregation and expression of *cry1Ac* and *bar* gene. Real time data showed the accumulated transcripts of *cry1Ac* gene in putative transgenic plants under the control of both constitutive and wound inducible promoter. ELISA results exhibited the expression of *cry1Ac* protein that varied between 0,1 and 0,4. The transgenic plants also showed tolerance to the application of Glufosinate. The anaylsis of first progeny (T_0) using PCR and ELISA showed the intregation and expression of *cry1Ac* and *bar* genes. Leaf botixicity assays showed the efficacy of *cry1Ac* against Colorado potato beetle (CPB) and Potato tuber moth (PTM). A ranging mortality of CPB (0% and 100%) and PTM (75%) was recorded. The results showed that these transgenic lines exhibit resistance against potato insect pests and can serve as parental material in a breeding programme.

Keywords: *Agrobacterium tumefacies*, gene transformation, transgenic plants, weeds, insect resistance

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez aşamasında her zaman yanımda olan hiçbir maddi ve manevi fedakârlıktan kaçınmayan, labratuvarında çalışma imkânı sağlayan, PCR, ELİZA ve qPCR analiz çalışmalarında, her türlü istatistiksel analizlerde tüm imkânlarını hizmetime veren saygı değer danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda analiz çalışmalarımında her daim yardımcı olan Tahira Hussain'e teşekkür ederim. Ayrıca, doku kültürü ve sera çalışmalarımında yardımı dokunan arkadaşım İlham Rahmankulov'a, ve her zaman isteğime hayır demeyen kardeşlerim her biri Muneeb'a, ve Jakir Husain'a şükranlarımı sunarım. Özellikle böcek analiz işlemlerinde sonuna kadar yardımcı olan Muhammad Nadir Naqash'a ve Muhammad Salim'e, tez arkadaşım değerli Safa Sümer'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan beni bugünlere gelmemde vesile olan, bana inanan ve bana güvenen muhterem değerli canım anneme, teşekkür ederek ellerinden öperim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER.....	9
2.1 Agrobacterium Tumefaciens Araçılıyla Bitkilere Gen Aktarımı	9
2.2 Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi	14
2.2.1 Bacillus thuringiensis δ -endotoksin genleri	14
2.3 bar Geninin Patates Bitkisine Aktarılması İle Herbisitlere Karşı Dayanıklılık Göstermesi ve ®BASTA'nın Çalışma Mekanizması	19
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	25
3.1 Materyal	25
3.1.1 Bitki materyali	25
3.1.2 Bakteri materyali	25
3.2 Metot	26
3.2.1 Bitki ifade vektörünün Agrobacterium'a aktarımı	26
3.2.2 Besin ortamı ve doku kültürü koşulları	28
3.2.3 Agrobacterium kültürlerinin büyütülmesi	29
3.2.4 A. tumefaciens aracılığıyla patates bitkisine gen aktarımı	30
3.2.5 Aday transgenik bitkilerin toprağa aktarılması	33
3.2.6 Aday transgenik patates bitkilerinin moleküler analizleri	33

3.2.6.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	33
3.2.6.1.1 DNA izolasyonu	33
3.2.6.1.2 PCR analizleri	34
3.2.6.1.3 Örneklerin agaroz jel analizi	36
3.2.6.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR)	36
3.2.6.2.1 RNA izolasyonu	37
3.2.6.2.2 cDNA sentezi	37
3.2.6.3 ELİSA testi ile cry1Ac protein ekspresyon analizi	39
3.2.7 Glufosinat uygulaması	40
3.2.8 T ₁ nesil transgenik bitkilerin üretilmesi ve moleküler analizleri	40
3.2.8.1 T ₁ bitkilerinden DNA izolasyonu	42
3.2.8.2 T ₁ bitkilerinde PCR analizi	42
3.2.8.3 T ₁ bitkilerinde ELİSA analizi	42
3.2.9 T ₁ bitkilerinde yaprak biyoanalizi	42
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1 Agrobacterium Hücrelerinin Koloni PCR ile Taranması	43
4.2 A. tumefaciens Aracılığıyla Patatese Gen Aktarımı	43
4.3 Aday transgenik bitkilerin moleküler analizleri	47
4.3.1 PCR analiz yöntemi ile gen boyutu doğrulaması	47
4.3.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR)	49
4.3.3 ELISA testi ile cry1Ac protein ekspresyon analizi	50
4.3.4 Glufosinat uygulaması	51
4.4 T ₁ Nesil Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri	52
4.4.1 PCR analizi	53
4.4.2 ELISA ile protein ölçümü	54
4.5 T ₁ Nesil Transgenik Patates Bitkilerinde Yaprak Biyoanalizi	55
4.5.1 cry1Ac transgenik patates bitkilerinin Coleoptera takımı patates böceğine etkileri	55
4.5.2 cry1Ac transgenik patates bitkilerinin Lepidoptera takımı Patates Güvesi üzerine etkileri	60
BÖLÜM V SONUÇLAR	62
KAYNAKLAR	64
ÖZ GEÇMİŞ	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kristalize (Cry) toksin proteinler ve etkilediği böcek takımları.....	16
Çizelge 2.2. Kristalize (Cry) toksin genleri ve etkilediği farklı bitkilerdeki böcek türleri	17
Çizelge 3.1. <i>cryIAc</i> gen koloni PCR reaksiyon koşulları.....	27
Çizelge 3.2. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve miktarları	29
Çizelge 3.3. Transgenik bitkilerin teyit ve tespit edilmesi için kullanılan gen bölgesi, kullanılan primer baz dizileri, gen bölge uzunlukları ile primerlerin bağlanma sıcaklıkları	34
Çizelge 3.4. <i>cryIAc</i> gen PCR reaksiyon koşulları	35
Çizelge 3.5. <i>bar</i> gen PCR reaksiyon koşulları.....	35
Çizelge 3.6. <i>ChvA</i> gen PCR reaksiyon koşulları	35
Çizelge 3.7. Tek zincirli cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği.....	38
Çizelge 3.8. qRT-PCR karışım içeriği.....	38
Çizelge 3.9. qRT-PCR sıcaklık döngüsü	39
Çizelge 3.10. qRT- PCR analizinde kullanılan primer baz dizileri, gen bölge uzunlukları ile primerlerin bağlanma sıcaklıkları	39
Çizelge 4.1. Transformasyon verimliliği ile ilgili bilgiler	44
Çizelge 4.2. Patates böceği yaprak biyoanalizi tüm dönem larva ve Ergin üzerindeki ölüm oranları	59
Çizelge 4.3. Patates güvesi üçüncü dönem larvalarının ölüm oranları.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal genetik Mühendisliği bölümü seralarında yetiştirilen Marabel patates çeşidine ait bitkilerinin görünümü.....	7
Şekil 1.2. Patates bitkisinin en büyük verim kaybına neden olan zararlılar ve mücadelesi.....	8
Şekil 2.1. Farklı bitki türlerinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> tarafından meydana gelen tümörler. (https://biologia.laguia2000.com/genetica/que-es-un-transgen ve https://arborgate.com/blog/identifying-crown-gall-disease/ web sayfasından alınmıştır, erişim (05.02.2018).....	9
Şekil 2.2. <i>Agrobacterium</i> hücresinde bulunan Ti plazmidi ve bitki hücrelerine T-DNA aktarımı (Özcan vd., 2004)	10
Şekil 2.3. Bitki hücresine gen aktarımından sorumlu olan <i>Agrobacterium</i> genom bölgeleri (Özcan vd., 2004)	11
Şekil 2.4. <i>Agrobacterium</i> aracılığıyla bitki kromozomuna T-DNA'nın aktarımı (Özcan vd., 2004)	13
Şekil 4.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisindeki cry genlerinin <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla bitki hücresine aktarılması (Özcan, 2009)	15
Şekil 2.6. (Bt) <i>Bacillus thuringiensis</i> δ -endotoksin (cry) proteinin üç boyutlu yapısı (De Maagd vd., 1999)	18
Şekil 2.7. Cry proteinlerinin böceğe karşı olan etki mekanizması	18
Şekil 3.1. pTF101.1 plazmidinin T-DNA bölgesi ve şematik gösterimi	26
Şekil 3.2. Elektroporasyon cihazı (Bio-Rad #165-2660).....	28
Şekil 3.3. <i>A. tumefaciens</i> 'in LB ortamında çoğaltılması.....	30
Şekil 3.4. Patates bitkisine <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı	32
Şekil 3.5. Agaroz jel analizinden genel görünüm	36
Şekil 3.6. ELx800-Universal-Microplate-Reader	40
Şekil 3.7. T ₀ transgenik bitkilerden hasat edilen yumrulara GA3 uygulaması.....	41
Şekil 3.8. Seradaki T ₁ transgenik bitkilerden genel bir görünüm	41

Şekil 4.1. Agrobacterium hücrelerinin koloni PCR sonuçları	43
Şekil 4.2. Gen aktarımı sonrasında seçici besi ortamında eksplantlar üzerinde kallus oluşumu.....	45
Şekil 4.3. Seçici besi ortamında kalluslardan sürgün oluşumu.....	46
Şekil 4.4. Dış ortama aktarılmaya hazır aday transgenik bitkiler	46
Şekil 4.5. Aday transgenik bitkilerin sera ortamında toprağa alıştırılması.....	47
Şekil 4.6. Aday transgenik patates bitkisinde cry1Ac geninin çoğaltımı	48
Şekil 4.7. Aday transgeniklerde bar geninin çoğaltımı.....	48
Şekil 4.8. A. tumefaciens'in bitki bünyesine yerleşmediğini belirlemek için ChvA geni PCR sonuçları	49
Şekil 4.9. qRT-PCR analizi ile cry1Ac geninin transgenik bitkilerde oransal ifadesi....	50
Şekil 4.10. ELİSA testi ile cry1Ac ekspresyonu. 35S-1 ve AoPRI-1: bitkiler	51
Şekil 4.11. Sera ortamındaki aday transgenik bitkilerin herbisit uygulamasından önceki görünümü	52
Şekil 4.12. bar geninin aktarıldığı transgenik patates bitkilerinin herbisit uygulamasından sonraki durumu	52
Şekil 4.13. T ₁ nesil transgenik bitkilerde cry1Ac geni için yapılan PCR analizi	53
Şekil 4.14. T ₁ nesil transgenik bitkilerde bar geni için yapılan PCR analizi	54
Şekil 4.15. T ₁ transgenik bitkilerinde cry1Ac protein ifade seviyeleri.....	55
Şekil 4.16. cry1Ac T ₁ transgenik patates bitkilerinde patates böceği kullanılarak yapılan yaprak biyoanalizinden genel görünüm	57
Şekil 4.17. Patates böceği larvalarının farklı instarlara göre ölüm oranları	58
Şekil 4.18. Patates güvesi üçüncü dönem larvaları üzerinde yapılan yaprak biyoanalizi	60

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
Kg	Kilogram
Mm	Milimetre
g	Gram
mL	Mililitre
Min/dk	Dakika
m	Metre
°C	Santigrat derece
mg	Miligram
g (rpm)	Yerçekimi (Dakika başına dönüş sayısı)
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
V	Voltaj
Kg	Kilogram

Kısaltmalar	Açıklama
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	Left Border (Sol Sınır)
RB	Right Border (Sağ Sınır)
DNA	Deoksiribonükleikasit
Vir	Virülens geni
Ti	Tumour-Inducing (tümör oluşturan)
Cry	Kristalize
Bt	<i>Bacillus Thuringiensis</i>
PPT	fosfinotrisin
MS	Murashige ve Skoog

BÖLÜM I

GİRİŞ

Bitkiler çok eski zamanlardan beri insanlar tarafından besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Dünya nüfusunun artması tarımın önemini her geçen gün artırmaktadır. Bu yüzden tarımı yapılan bitkilerin verimlerinin yüksek olması hedeflenmiştir. Hedefe ulaşmak için tarımda gübreleme, böceklere ve yabancı otlara karşı kimyasal ilaçlama gibi uygulamalar yapılmaktadır (Andrews vd., 1987). Bitki ıslahında ve modern teknolojilerde meydana gelen gelişmeler sayesinde son 50 yılda kültürü yapılan bitkilerin veriminde önemli verim artışları olduğu bildirilmektedir (Özcan vd.,1993).

Patates (*Solanum tuberosum L.*), anavatanı Güney Amerika olan tek yıllık bir kültür bitkisidir (Şekil 1.1). Patates İspanyollar tarafından 16.yüzyılın ikinci yarısında And Dağları Bölgesinden ülkelerine intikal edilmiş, ardından İrlanda, İskoçya ve İngiltere'ye ve daha sonra bütün Avrupa ve Kuzey Amerika'ya yayılmıştır. Patates tarımı Hindistan yarımadasında 18.yüzyılın ilk yarısında başlamış, 18. yüzyılda Hollandalılar vasıtasıyla Çine ve Endonezya'ya oradan da Japonya'ya ulaştırılmış, 19. yüzyılda ise Doğu Afrika'ya yayılmıştır. Türkiye'ye ise ilk kez 19.yüzyılın sonlarında Rusya üzerinden Doğu Karadeniz Bölgesine ve batıdan Trakya Bölgesine girdiği belirtilmiştir (İlisulu, 1957).

Dünyada bazı ülkeler hariç hemen hemen her ülkede tarımı yapılan patates, buğday ve çeltik gibi insan beslenmesinde kullanılan temel besin maddelerinden biridir. Patates yumruları nişasta halinde karbohidrat, protein, vitaminler ve demir gibi önemli besin maddelerini içermektedir. Bu yönüyle insanlar tarafından doğrudan yemeklik olarak tüketildiği gibi, yüksek oranda nişasta içeren patates işlenerek cips, dondurulmuş patates, nişasta, pudra ve çocuk maması şeklinde de kullanılmaktadır (Arıoğlu, 2002).

Patates, %12-22 nişasta, %3,3 diyet lifi, %2 protein, B1, B2 ve C vitaminleri ile fosfor ve potasyum içermektedir. Proteininin biyolojik değeri son derece yüksektir, bu yüzden besin değeri açısından ön plana alınmıştır (Warman ve Havard, 1998; Kumlay ve Onaran, 2000; Burlingame vd., 2009).

Dünyada 2016 yılında yaklaşık 19 milyon ha alanda patates tarımı yapılarak, 376,8 milyon ton patates üretilmiştir (FAOSTAT, 2018). En çok patates yetiştiren ülkeler Çin (99,1 milyon ton), Hindistan (43,8 milyon ton), Rusya (31,1 milyon ton), Ukrayna (21,8 milyon ton) ve ABD (20,0 milyon ton) olurken, dünyadaki patates üretiminin 4'te birini (%26) Çin tek başına gerçekleştirmektedir (FAOSTAT, 2018). Türkiye dünya üzerinde patates üretiminde 19'uncu sırada yerini almaktadır. Verilere göre Türkiye'de 2017 yılında 142,9 bin ha alanda patates tarımı yapılmış ve 4,8 milyon ton üretim yapılarak, 3,4 ton/da ortalama yumru üretimi meydana gelmiştir (TÜİK 2018). Patatesin besin değerinin yüksek olması, yüksek verim oluşturmaya ve farklı iklimlerde kolayca yetiştirilmesinden dolayı bugün ülkemizin hemen hemen her yerinde özellikle Orta Anadolu Bölgesinde tarımı yapılmaktadır. Türkiye'de 2017 yılında patates üretiminin en fazla yapıldığı il Niğde (835 200 ton) olup, bunu sırasıyla Konya, Afyonkarahisar, İzmir, Kayseri, Nevşehir, Adana ve Aksaray takip etmiştir (TÜİK, 2018). Belirtilen bu illerin her birinde 2017 verilerine göre 200 bin ton üzerinde patates üretimi gerçekleştirmiş ve Türkiye'deki patates üretiminin yaklaşık olarak %70'i bu illerde yapılmıştır (TÜİK, 2018).

Patates tarımında yüksek verim elde edebilmek için yüksek oranda ürün kaybına neden olan hastalıklarla, böceklerle ve yabancı otlarla mücadele etmek'te büyük önem taşımaktadır (Bilgili ve Kadioğlu, 2003). Dünyada ve Türkiye'de geniş alanlarda tarımı yapılan patatesin verim ve kalite kaybının en büyük sebebi patates hastalıkları, böcek zararlıları ve bilinçsiz kullanılan herbisitler olmaktadır. En çok görülen mantari hastalıklar; patates siğil hastalığı (*Synchytrium endobioticum*); patates mildiyösü (geç yanıklık); (*Phytophthora infestance*), bakteriyel hastalıklar; yumuşak çürüklük (*Erwinia carotovora subsp.atroseptica*); bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearum*), virüs hastalıkları ise; patates Y virüsü (PVY), yaprak kıvrıklık virüsü (PLRV), patates X virüsü (PVX) ve patates A virüsüdür (PVA) (Brunt, 2001; Bostan ve Demirci, 2001). Patateste virüslerin bulunması halinde üretimde verim kaybının %80'e ulaşabileceği tespit edilmiştir (Wang vd. 2001). Patates tarlalarından yüksek verim elde etmek için tohumluk materyalin virüslerden uzak ve temiz tutulması önerilmektedir (Çalışkan vd., 2011).

Böcek zararlıları, tüm bitkilerde olduğu gibi patates bitkisinde de büyük verim kaybına neden olan önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Bakhsh vd., 2009a; Sohail vd., 2012). Yaklaşık 67.000 farklı canlı türü bitkilere zarar vermektedir. Bunların içinde yaklaşık 9000 tür böcek ve akar bulunmaktadır (Ross ve Lembi 1985). Bu zararlılar bitkilerin yapraklarında ki hücre öz suyunu emerek, meyve, kök, gövdeyi yiyerek ya da keserek bitkilerin ölmelerine sebep olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalara göre bitkilerin hastalıklar ve böceklerden dolayı zarar görme oranı %37 olarak belirlenmiştir. Böceklerden gelen zarar ise %13 olarak bildirilmiştir (Gatehouse vd., 1992). Son dönemlerde yapılan çalışmalara göre %35-100 oranında zararın meydana geldiği gözlenmiştir (Gatehouse vd., 2011). Zarar oranı bitkilerin bulunduğu iklim ve bölge şartlarına ve farklı böcek türlerine göre değişmektedir (Bakhsh vd., 2015a).

Patates bitkisi çok yapraklı ve yapraklarından zararlı böceklerin beslenmesi, üremesi ve yaşaması için uygun koşullara sahip bir kültür bitkisidir. Patates bitkisine en çok zarar veren yaygın böcek zararlıları patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*), patates güvesi (*Phthorimaea operculella*), patates yaprak biti (*Macrosiphum euphorbiae*), kırmızı örümcek (*Tetranychus urticae* Koch.), trips (*Thrips tabaci*), pis kokulu yeşil böcek (*Nezara viridula*), toprak nematodları ve yaprak çekirgeleri olup, bunların içerisinde en yaygın olanı patates böceğidir (Kayapınar ve Kornoşor, 1990; Bakhsh vd., 2009a; Sohail vd., 2012).

Patates böceğinin (*Leptinotarsa decemlineata*) hayatı ergin, yumurta ve larva olarak devam etmektedir. Ergin 10-12 mm boyunda sırtı sert ve kuvvetlidir, sarı kırmızı renkli olup kanatlar üzeri 10 siyah banttandır, bantların 5 bir tarafta, 5 ise diğer tarafta olarak görülmektedir. Yetişkin larva başı koyu kahverengi, kambur duruşlu olup, bedeni portakal sarısı rengindedir. Böceğin kış hayatı toprakta 5-30 cm derinliğinde geçer. İlkbaharda besin aramak üzere kışlık yerlerini terk ederek patates bitkisi aramaya çıkarlar, eğer yakınlarında patates bitkisi bulamadığı takdirde uçarak başka yerlere yayılırlar. Yumurtalarını tek veya gruplar halinde yaprakların alt yüzlerine bırakırlar ve her seferinde 2-57 adet arası yumurtlamaktadırlar. Yumurtaları oval şekilde olup, renkleri koyu sarı ve uzunluğu 2 mm'dir. Patates böceğinin döllenmesi bölgelere göre farklıdır, örnek olarak Türkiye tarımsal bölgeleri incelenirse Marmara bölgesi koşullarında 3-4, Orta Anadolu bölgesi koşullarında 1,5 döl verdiği tespit edilmiştir.

Böceğin zararı yanı sıra virüs ve bakteri etmenlerinin yayılmasında da rol oynadığı bilinmektedir (kayseri.tarim.gov.tr). Patates böceğinin erginleri ve larvaları bitkilerin yeşil kısmından, özellikle yapraklarından beslenerek en büyük zarara yol açmaktadır. En büyük zarar ise son dönem larvalarından gelmektedir. Böcekler yüksek popülasyona ulaştığında larvalar bitkilerin erken dönemlerinde yüksek oranda zarara yol açmaktadırlar. Yoğun varlık döneminde herhangi bir mücadele gösterilmediği takdirde zarar oranı % 100'e kadar çıkabilmektedir. Patates böceği aynı zamanda çürüklük hastalığının vektörüdür. İklimsel koşullar uygun olduğunda patateslerde bakteriyel halka çürüklüğü hastalığına yol açmakta ve bu nedenle ürün kaybı fazla olmaktadır (Christie vd., 1991).

Patates tarımında verimi olumsuz yönde etkileyen bir diğer etmen yabancı otlardır. Bitkisel üretimde ve tarım alanlarında yabancı otlar faydadan daha çok neden oldukları, verim kaybına yol açtıkları için tarlada istenmemektedirler. Yabancı otlar kültür bitkiler ile CO₂, ışık, su, mineral maddeler yönünden rekabet ederek kalite ve verim kaybına yol açarlar. Bunun yanında çeşitli hastalık etmenleri ile böceklere konukçuluk ederler (Günçan, 2006; Özer vd., 2001; Tepe, 1997). Dünyada 7000 tane, Türkiye'de ise 1800 tane yabancı ot türü bulunmaktadır. Yabancı otlar bitkinin zamanında büyüme ve gelişmesini engelleyerek verim kaybına neden olmaktadır (Uluğ vd., 1993; Patterson vd., 1985).

Yabancı otlara karşı mücadele yapılmayan bir patates tarlalasında verim kaybının %43 olduğu tespit edilmiştir (Banaras,1993). Patates alanlarında bulunan yabancı otlar hasadı zorlaştırıp, yumru büyüklüğü ile ağırlığının azalmasına neden olarak, birim alandan alınan verim miktarını önemli ölçüde azaltmaktadır. (Zengin ve Günçan, 1993). Scholz (1966), bir patates tarlasında 100 kg yeşil aksamli yabancı otun bulunması sonucunda tarlada 400 kg ürün kaybı ortaya çıktığını belirlemiştir. Neururer (1968), çalışmasına göre patates tarlasında normal derecede bulunan yabancı otun zarar oranının %10 olduğunu belirlemiştir.

Yabancı otların genel olarak dikim öncesinde ve çıkış sonrasında patates tarlasından uzaklaştırılması tavsiye edilmektedir. (Arnold vd., 1997). Yabancı otlara karşı mücadelede yürütülen başlıca yöntemler kültürel, fiziksel, biyolojik ve kimyasal mücadelelerdir. Yabancı otlar için kimyasal herbisitlerin kullanılması, diğer mücadele

yöntemlerine göre zor olmayan, daha kolay uygulanabilen, mücadelesinde zorluk çekilen bazı yabancı otlara dahi kolay ulaşılabilen bir yöntemdir (Zoschke, 1994; Serim ve Özdemir, 2012). Patates tarlasında yetişen melez horozibiği, domuz pıtrağı, yabani hardal gibi yabancı otların çıkış öncesi ile çıkış sonrasına mücadelesinde yaygın olarak kullanılan rimsulfuron ve metribuzin etken maddeli hebisitlerin etki oranı % 100 olduğu belirlenmiştir. (Robinson vd., 1996). Geniş yapraklı ve dar yapraklı yabancı otlara karşı metolachlor herbisit, pentimethalin herbisit, metribuzin herbisit, patates tarlasında çıkış öncesi uygulanmasında etkili gösterdiği bildirilmiştir (Zollinger, 2001). Ghosh (1998), en yüksek yumru veriminin 4,21-4,26 ton/da ile metribuzin ve metolachlor herbisitlerin kullanıldığında parsellerde elde edildiğini rapor etmiştir. Phogat vd., (1991) ise aynı uygulamayı deneyerek verimde 302 kg/da artış ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Shalender vd. (1998) ise % 69-81 verim kaybı meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Zarara neden olan yabancı otların gösterdiği tepki, herbisitlerin etki mekanizmalarına ve ekolojik faktörlere göre değişmektedir. (Medd vd., 2001). MCPA ve 2,4D- acid dimethylamin herbisitlerinin kullanımı ile ilk kimyasal mücadele 1947 yılında başlamıştır (Hopkins, 1989). Herbisitlerin fazla kullanımı 1970'li yıllardan itibaren başlamış olup, bu kullanım sonucunda çevre kirliliği, yabancı otların dayım kazanması ve üretim maliyetlerinde dengesiz artışlar gibi problemler gözlenmiştir. (Reed vd.,1989; Cotterman ve Saari, 1992; Perkins ve Patterson,1997; Kudsk ve Streibig, 2003; Doğan vd., 2004).

Harper 1956 yılında, yabancı otların herbisitlere karşı zamanla direnç kazanmasıyla ilgili bir açıklama yapmıştır.(Avcı, 2009; Heap, 2000). Yabancı otların herbisitlere karşı dayanıklılık sorunları herbisitlerin sürekli ve kontrolsüz olarak uygulanması neticesinde meydana gelmektedir. İlk olarak 1970'li yıllarda dayanıklılık problemleri Washington'da triazine herbisit grubuna karşı dayanıklı *Senecio vulgaris L.* biyotipi olarak bulunan yabancı otun gelişmesiyle ortaya çıkmıştır.

Dünya genelinde 85 tek çenekli ve 116 geniş yapraklı, toplamda 201 adet yabancı ot bitkisinde dayanıklılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar ABD, Kanada, Fransa, İspanya, İngiltere, Avustralya gibi ülkelerde gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2010). Türkiye'de herbisitlere dayanıklılık ile ilgili ilk çalışma buğday tarlasında yabancı yulaf (*Avena sterilis L.*) ile başlamıştır (Uludağ vd., 2001).

Genetik mühendisliği aracılığıyla bitkilere herbisite dayanıklılık karakterinin kazandırılması için 3 farklı strateji izlenmektedir.

I) Bitkinin herbisitlere karşı dayanıklılık kazandıran etkili enzimi bitkinin bünyesinde fazla üretmesi.

II) Bitki bünyesinde herbisite karşı etki gösteren enzimin yerine aynı faaliyeti gerçekleştiren farklı ve başka bir enzim sentezlemesi.

III) Bitkinin kendi metabolizma faaliyetini yükseltip bünyesindeki herbisit detoksifikasyonunu yapması.

Bu stratejiler sonucunda herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Moss, 2002).

Genel olarak 1982-1983 yıllarında bitkilerde gen aktarım çalışmaları başlayarak genlerin etki mekanizmaları üzerinde incelemeler başlatılmıştır (Arı 2001). İlk gen aktarımı tütün bitkisine yapılmış ve böylece tütüne antibiyotiğe karşı dirençlilik kazandırılmıştır (Fraley et al. 1983). ABD ve Fransa'da tütün bitkisine herbisit dayanıklılık geni aktarılmış ve transgenik bitkilerle ilgili ilk tarla denemeleri 1986 yılında başlamıştır (James, 1996). 1996 yılında transgenik bitkilerin ekim alanı 1,7 milyon ha iken, 2017 yılında 189,8 milyon ha olmuştur. Transgenik bitkiler 26 farklı ülkede, 18 milyon çiftçi tarafından ekilmiştir. Modern Biyoteknoloji, tarım tarihinde en hızlı kabul edilen teknoloji olmuştur (ISAAA, 2017). Günümüzde 75,0 milyon hektar ekim alanıyla ABD, dünyada en fazla transgenik bitki yetiştiren ülke durumundadır. Transgenik bitkilerin ekim alanı bakımından ABD'yi sırasıyla Brezilya (50,2 milyon

ha), Arjantin (23,6 milyon ha), Kanada (13,1 milyon ha), Hindistan (11,4 milyon ha), Paraguay, Pakistan, Çin, Güney Afrika ülkeleri takip etmektedir. Tarım alanlarında transgenik olarak en fazla tarımı yapılan bitki 94,1 milyon ha ekimi ile soyadır. Geniş alanda tarımı yapılan diğer transgenik bitkiler sırası ile mısır (59,7 milyon ha), pamuk (24,1 milyon ha) ve kanoladır (10,2 milyon ha). 2017 yılı raporuna göre böceğe dayanıklı transgenik bitkilerin tarımı 88.7 milyon hektar ve herbisite dirençli transgenik bitkilerin tarımı ise 23.3 milyon hektar alanda yapılmıştır (ISAAA, 2017).

Günümüzde bitkilerin gen transformasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan bakteri, gen aktarımını kolay ve başarılı bir şekilde gerçekleştiren *Agrobacterium tumefaciens*'dir (Özcan ve Özgen,1996). Böylece böceklere ve herbisitlere dayanıklı transgenik bitkilerle bitki bünyesinde bulunması gereken hedef genin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla bitkiye aktarılmasıyla elde edilmektedir (Padgett et al. 1995).

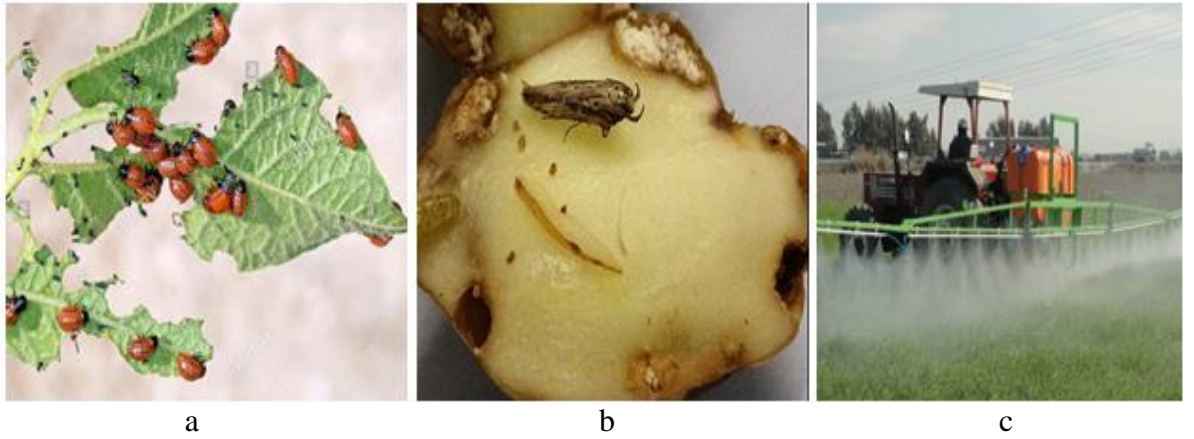


Şekil. 1 Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünün seralarında yetiştirilen Marabel patates çeşidine ait bitkilerinin görünümü

Patates tarımında yabancı otların yanında yüksek verim kaybına neden olan bir diğer etmen patates böceği (*Loptinotera disemlineta*) ve patates yumru güvesi (*Phthorimaea operculella*) gibi böcek zararlılarıdır (Şekil 1.1). Günümüzde en etkili ve en yaygın zararlı kontrol stratejisi olarak kullanılan kimyasal böcek, yabancı ot, bakteri ve fungus öldürücüleri pestisit olarak bilinmektedir. Ancak tarımda pestisitlerin kullanımı her ne kadar verim artışı sağlasa da, pestisitlerin insanlar ve doğal çevre üzerine potansiyel zehir etkileri bulunmakta olup ve bu nedenle bazı sorunlara sebep olabilmektedirler. Örneğin, insektisitlerin yaygın ve sınırsız olarak kullanılması nedeniyle zararlı böcekler bu ilaçlara karşı direnç geliştirmektedir ve aynı zamanda faydalı böcekler ve doğal çevre zarar görmektedir. Bu sebeple, sentetik ilaçla mücadele yöntemine alternatif olarak, biyoteknoloji sayesinde böceklere ve herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilmektedir (Bakhsh vd., 2009b; Sohail vd., 2012).

Zararlı böceklere ve herbisitlere karşı dirençli bitkilerin geliştirilmesi, bitki biyoteknolojisindeki en önemli ilerlemelerden biri sayılmaktadır (Dhaliwal vd., 1998). Moleküler genetik yöntemleri kullanarak böceklere ve herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmişve uygulama açısından birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan yöntemlerden en önemli olanı, *B. thuringiensis* bakterisinde bulunan *cry* genlerinin ve herbisitlere dayanıklılığı sağlayan *bar* geninin bitkilere bir arada aktarılmasıdır. Bunun sonucunda, I) bu transgenikler insektisit kullanmadan onları yiyen böceklerin ölümüne neden olmakta ve II) total herbisit kullanılması durumunda transgenik bitkiler olumsuz etkilenmeden yabancı otlar öldürülmektedir. Bu sebepten patates böceği ve yabancı otlarla mücadelede hem böceğe hem de herbisite dayanıklı yeni patates çeşitlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda böceklere ve herbisitlere tolerans genlerinden sadece bir tanesi dayanıklılık kazandırma amacıyla bitkilere aktarılmıştır. Bu tez çalışmasının amacı, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla patatese *cryIAc* ve *bar* genlerini aktararak, böceklere ve glufosinat total herbisidine toleranslı transgenik patates bitkilerinin geliştirilmesidir.



Şekil 1. 2 Patates bitkisinde büyük verim kaybına neden olan zararlılar ve mücadelesi *Leptinotarsa decimlineata* (a), *Phthorimaea operculella* (b) ve Herbisit uygulama (c) <http://www.alamy.com/stock-photo-leptinotarsa-decemlineata-colorado-beetle-larvae-feeding-on-potato> <https://www.4mevsimtarim.com>, erişim (01.02.2018)

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 *Agrobacterium tumefaciens* araçılıyla Bitkilere Gen Aktarımı

Gen transformasyon çalışmaları bitkiler üzerinde 1982-1983 yıllarında başlamasıyla başarılı çalışmalar sonucunda genlerin fonksiyonları ve etki mekanizmaları incelenmiştir. Günümüzde, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi modern tarımsal araştırmalarda bitkilere gen aktarma metodu olarak en yaygın kullanılan araçtır (Arı, 2001). Baklagillerde azot fiksasyonu yapan *Rhizobiaceae* familyasına ait bir proebakterilerin alfa grubunda olan *Agrobacterium tumefaciens* toprakta çubuk şeklinde doğal olarak yaşayan, gram negatif ve spor oluşturmeyen bir bakteridir. *A. tumefaciens* iki çenekli bitkileri kök boğazında oluşan yaralardan enfekte ederek tümör (taç uru hastalığı) oluşumuna sebep olmaktadır (Şekil 2.1). Yürütülen çalışmalara göre bu tümürlü hücrelerin, oksin ve sitokininleri yüksek oranda ürettiği, bu yüzden hormon dengesi bozulan hücrelerin tümöre dönüştüğü belirlenmiştir. Oluşan tümör hücreleri normal bitki hücrelerinden farklı, opinler olarak bilinen şeker ve amino grup asit türevlerini sentezlemekte ve *A. tumefaciens* opinleri azot ve karbon kaynağı olarak kullanmaktadır (Hooykaas ve Schilperoort 1992; Özcan ve Özgen 1996; Özcan vd., 2004).

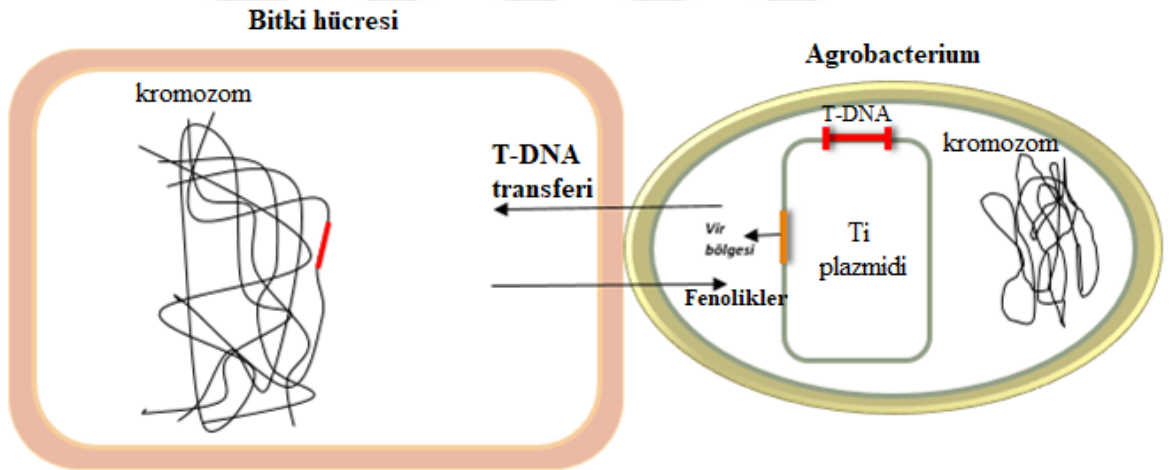


a

b

Şekil 2. 1. Farklı bitki türlerinde *Agrobacterium tumefaciens* tarafından meydana gelen tümörler. (<https://biologia.laguia2000.com>) [comgeneticaque-es-un-transgen](https://arborgate.com/blog/identifying-crown-gall-disease/) ve <https://arborgate.com/blog/identifying-crown-gall-disease/> web sayfasından alınmıştır, erişim (05.02.2018)

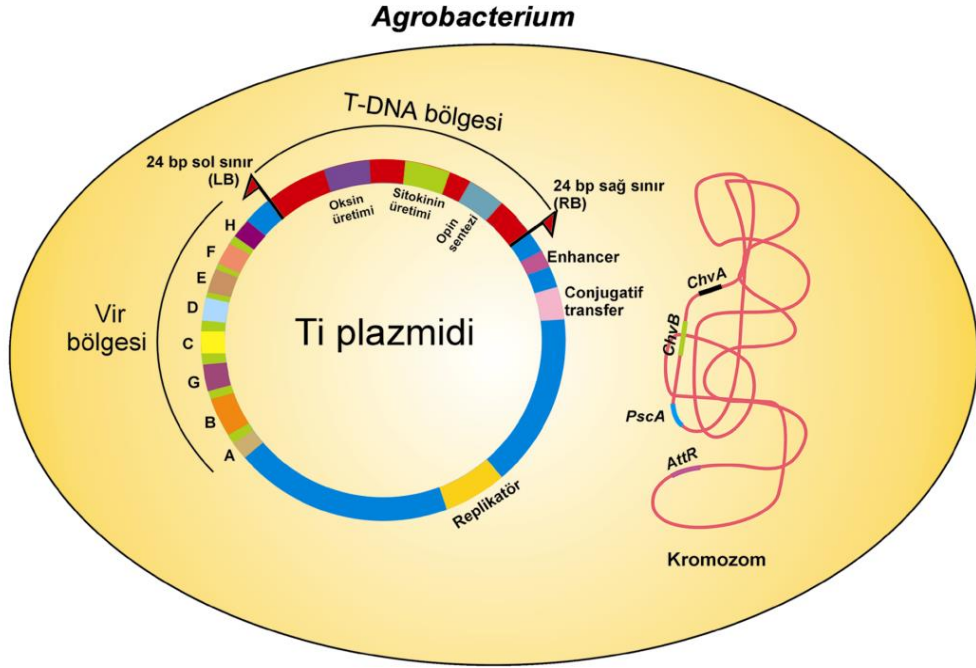
Tümörün oluşumu ile ilgili çalışmalar sonucunda, *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine intikal eden ve bitki DNA'sıyla bir araya gelen bazı genlerin sebep olduğu belirlenmiştir. *A. tumefaciens* kromozomal DNA ile birlikte Ti (tumour-inducing) plazmidi olarak isimlendirilen küçük bir plazmid DNA'yı da içermektedir. Ti plazmidi üzerinde T-DNA (transfer-DNA) bölgesi olarak isimlendirilen bir DNA parçası bulunmaktadır ve bakteri bitkiyi enfekte ettiği sırada T-DNA bölgesinden aktarılan gen, bakteriden bitki hücrelerine geçerek (Şekil 2.2.) bitki kromozomlarına yerleşmektedir (Watson vd., 1975; Chilton vd., 1977 Chilton vd., 1980). T-DNA bitki hücrelerine aktarıldıktan sonra T-DNA bölgesinde bulunan stokinin, oksin ve opin genleri (Şekil 2.3.) faaliyete geçmekte, bu genlerin faaliyete geçmesinden dolayı bitki hücrelerinde aşırı bir hormon üretimi ve hızlı bir şekilde kontrolsüz hücre bölünmesiyle tümör oluşmaktadır. Opin genleri aktif hale geçerek bitki hücrelerinde opinler sentezlenmekte ve bunlar *A. tumefaciens* tarafından azot ve şeker kaynağı olarak kullanılmaktadır (Nester vd., 1984; Özcan vd., 2004).



Şekil 2. 2. Agrobacterium hücresinde bulunan Ti plazmidi ve bitki hücrelerine T-DNA aktarımı (Özcan vd., 2004)

Agrobacterium tumefaciens aracılıyla bitkilere gen aktarımının gerçekleşmesi için bakteride 3 önemli bölgenin olması şarttır (Şekil 2.3). Bu üç bölge şunlardan ibarettir: T-DNA bölgesi, kromozomda bulunan genler bölgesi ve virülens (vir) bölgesidir. T-DNA bölgesi, sağdan (RB/right border) ve soldan (LB/left border) 24 baz çifti (bç) uzunluğunda belirli baz dizinleri ile sınırlandırılmış olan Ti plazmidi üzerinde bulunan bir bölgedir (Yadav vd., 1982; Özcan vd., 2004). Ti plazmidinden bitki kromozomuna

aktarılan DNA bölgesi bu sınırlar içerisinde kalan kısım olup, gen aktarımı için sağ sınırın olması mutlaka gereklidir. T-DNA bölgesinde bir adet sitokin ve iki adet oksin sentezini gerçekleştiren genler ile opin sentezini kodlayan genler bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bu DNA parçaları bakteri hücrelerinde aktif değildir fakat bitki kromozomu ile birleştiğinde aktif hale geçmektedirler. Bunun sebebi, bu genlerin başlama noktası (Promotör) bölgelerinin bitki genlerinin promotör bölgeleriyle benzerlik göstermesidir.



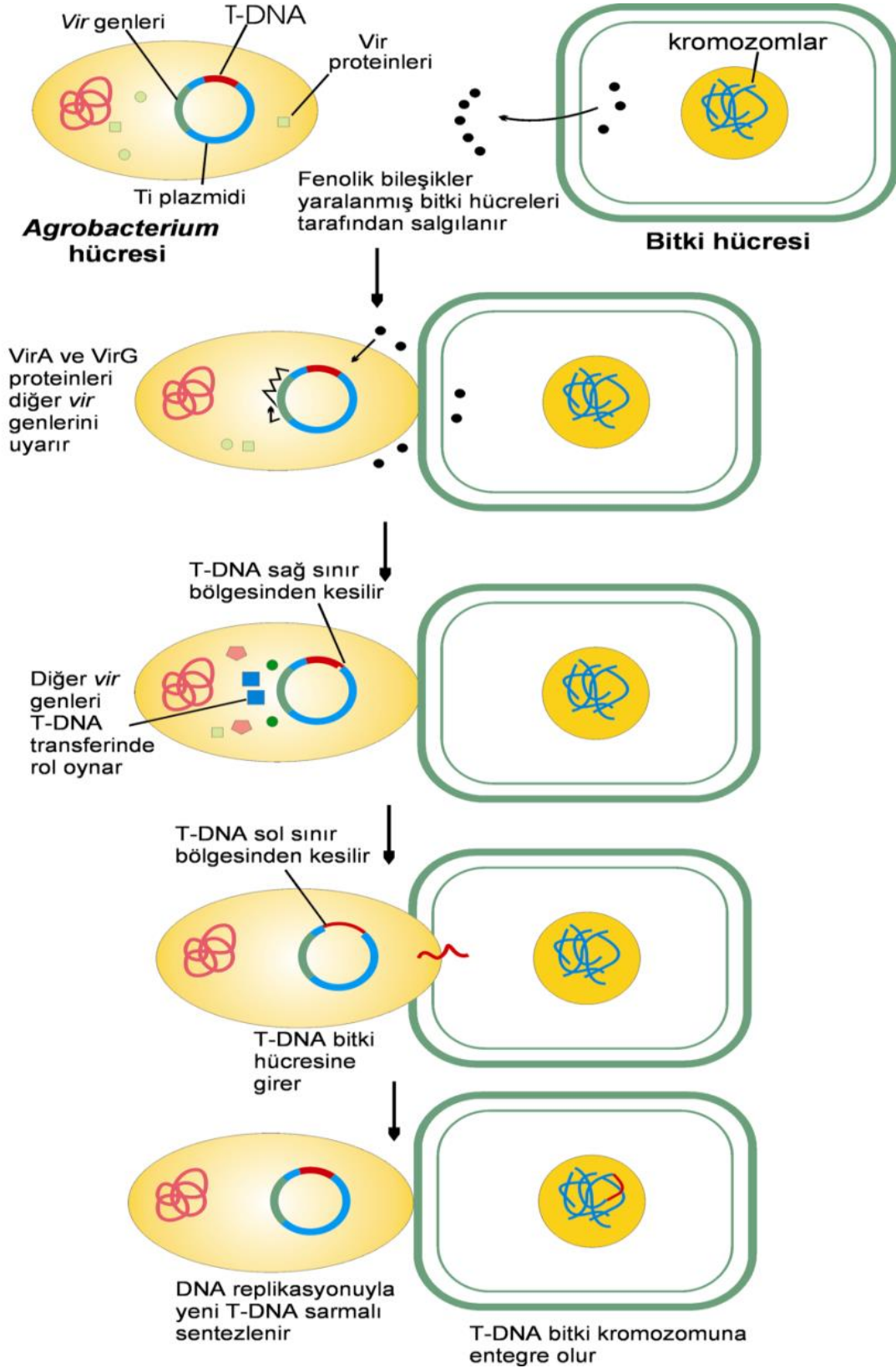
Şekil 2. 3. Bitki hüresine gen aktarımından sorumlu olan *Agrobacterium* genom bölgeleri (Özcan vd., 2004)

T-DNA aktarımında önemli bölgelerden bir diğeri Ti plazmidini üzerinde yer alan ve virülens genleri içeren Vir bölgesidir. Bu bölgede 8 adet virülens operonun (VirA, B, C, D, E, G, F, H) varlığı bilinmektedir (Şekil 2.3). Vir genleri bitki hücrelerinin yaralı bölgelerinden gelen fenolik bileşikleri algılayarak çeşitli proteinler üretmektedirler. Bu proteinler, T-DNA bölgesinin sınırlardan kesilmesinde, T-DNA'nın bitki hüresine taşınmasında ve bitki kromozomuyla birleşmesinde rol alırlar. Bakteri hüresinde daima faaliyette olan VirA, T-DNA transferinin aktivasyonunda tesirli ilk proteindir. Yaralanmış bitki hücrelerinden asetosrington (AS) gibi fenolik bileşikler salgılanmakta ve bakteri hüresine giren bu fenolik bileşiklere VirA proteini bağlanmaktadır. Ardından VirA proteini VirG proteinini uyararak tüm Vir proteinlerinin aktif hale getirilmesini sağlamaktadır. Vir genlerinin ürettiği enzimler, T-DNA'nın kesilmesinde,

kesilen T-DNA'nın tek zincirli halde bitki hücresine aktarılmasında ve bitki kromozomuyla birleşmesinde rol almaktadırlar (Şekil 2.4) (Stachel ve Zambryski,1986; Gelvin, 2000; Özcan vd., 2004). T-DNA bölgesi ile bitki hücresine birden fazla gen aktarım işlemi gerçekleşebilmektedir. (Tora vd., 1989; Zambryski, 1992; Özcan vd., 2004).

Üçüncü bölge, *Agrobacterium* bakterisinin kromozomunda bulunan 4 adet gen bölgesidir (*chvA*, *chvB*, *pscA* ve *attR*) (Şekil 2.3). Bu genler, bakterinin bitki hücrelerine bağlanmasında, yaralanmış bitki dokularında bakterinin çoğalmasında ve Ti plazmidini üzerinde bulunan *vir* genlerinin düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadır (Douglas vd., 1985; Kado, 1991).

Modern teknolojinin gelişmesiyle birlikte *Agrobacterium*'da bulunan Ti plazmidin üzerindeki T-DNA'daki tümör oluşumuna neden olan genler ve bölge farklı enzimler yardımıyla kesilerek çıkartılmakta ve yerlerine herhangi bir canlıdan (bitki, hayvan, mikroorganizmalar) alınan bir gen yerleştirilebilmektedir. Tarımsal genetik mühendisliği açısından önemli genler aktarıldığında gelişen doku ve hücreler *in vitro* şartlarda *A. tumefaciens* bakterisiyle enfekte edilmektedir. Böylece istenilen yeni karakterlere sahip transgenik bitkilerin elde edilebilmektedir (Özcan vd., 2004).



Şekil 2. 4. *Agrobacterium* aracılığıyla bitki kromozomuna T-DNA'nın aktarım (Özcan vd., 2004)

2.2 Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

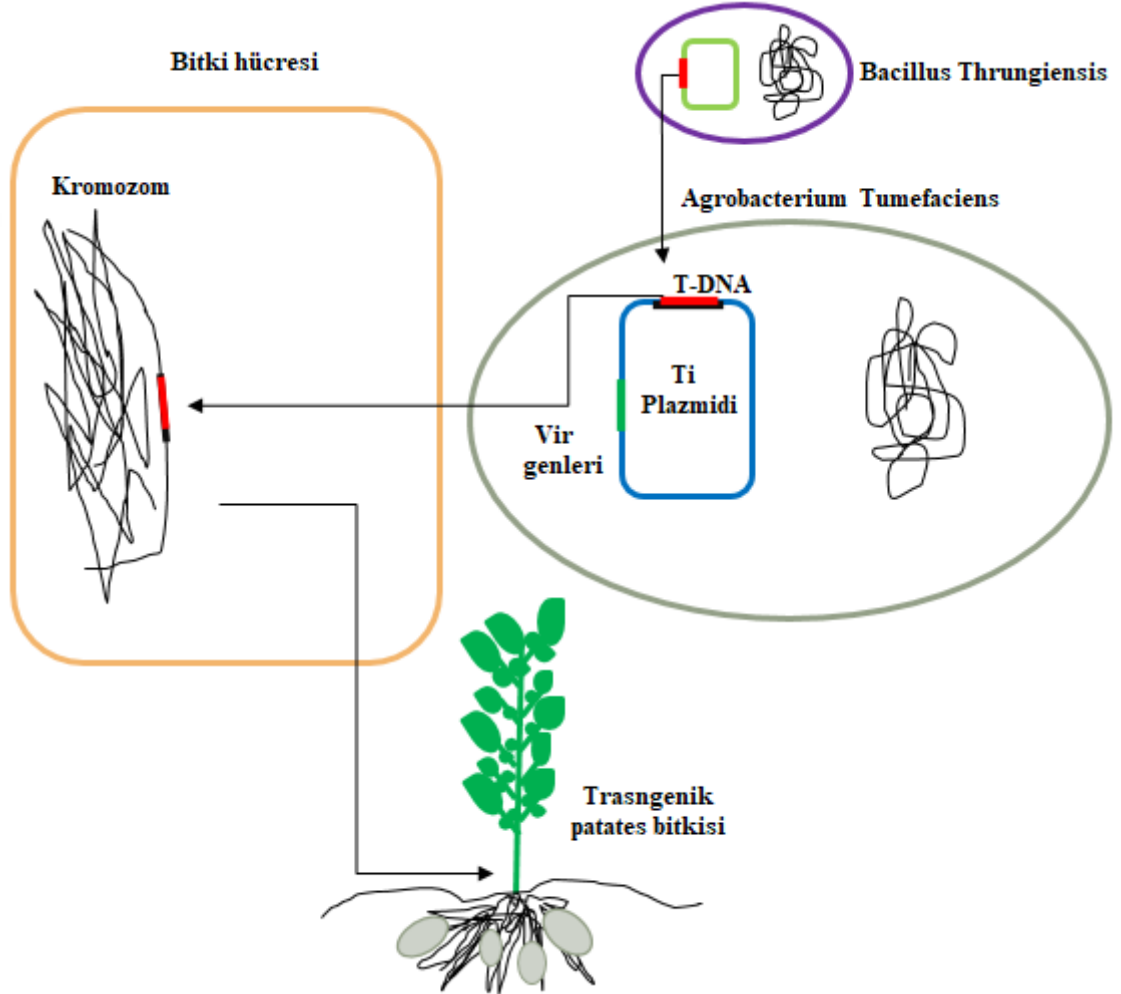
Moleküler biyolojinin önemli çalışma alanlarından biri de tarımda zararlılarla mücadele amacıyla zararlı böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesidir. Yöntemin esas prensibi, böceklere toksik etki gösteren proteinlerin üretilmesinden sorumlu olan genlerin tespit edilmesi ve belirlenen genlerin bitkiye aktararak transgenik bitkilerin geliştirilmesi esasına dayanmaktadır. Cry genlerinin *Bacillus thuringiensis* (Bt) bakterisinde δ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu Cry genleri bitkilere böceklere dayanıklılık kazandırılması amacıyla doğadan veya yapay yolla üretilen genlerin içerisinde en fazla kullanılan ve en geniş etkiye sahip olanıdır (Öktem 2004).

2.2.1 *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin genleri

Bacillus thuringiensis (Bt), 20 den fazla bakteri türü içeren *Bacillus* cinsine ait spor oluşturan, gram pozitif özelliklerine sahip ve aerobik bir bakteridir (Lal ve Lal, 1993). Bu bakteri ilk olarak 1901 yılında Japonya'da, baygınlık hastalığının rastlandığı ipekböceği (*Bombyx mori*) larvalarında keşfedilerek *Bacillus sotto* olarak adlandırılmıştır (Ishiwata 1901). Bundan sonra 1911 yılında bir un güvesi (*Ephetia kuhniella*) popülasyonu içerisinde, Almanya'nın Thuringia kentinde yeniden keşfedilerek *Bacillus* isminin yanında *thuringiensis* ilave edilmiştir ve bakterinin insektisit etkisi de bu yılda tespit edilmiştir (Berliner, 1911).

Böcek dirençli genlerin en önemli kaynağı *Bacillus thuringiensis* (Bt) olarak bildirilmektedir. Bu bakteriler sporlanma zamanında insektisidal (böcek öldürücü) etki gösteren sınırlı konukçu profiline sahip, delta-endotoksin, Cry toksin veya insektisidal Cry proteinleri (ICP) olarak isimlendirilen bazı kristalize yapılar oluşturmaktadır. *Bacillus thuringiensis*'den (Bt) elde edilen genler lepidopteralar, diptera takımı ve coleoptera takımına dahil böcek türlerinin larvaları için zehirli olan kristal proteinleri kodlayan genlerdir (Krieg, vd., 1983; Herrnstadt vd., 1986; Hofte ve Whitely 1989; Cohen vd., 2000). Fransa'da mısır kurdu (*O. Nubilalis*) zararına engel olmak amacıyla ilk kez 1938 yılında mısır tarlalarına Bt püskürtülmüştür (Aronson vd., 1986).

Cry proteini üretme kabiliyetine sahip olan ilk Bt geni 1981 yılında klonlanmıştır. Daha sonra bu gen *A. tumefaciens* bakterisine aktarılmıştır (Şekil 2.5). Belçika'daki bir bioteknoloji şirketi tarafından ilk Bt genini taşıyan transgenik bitkiler 1987 yılında patates ve domatase aktarılarak geliştirilmiştir. (Schnepf ve Whiteley 1981; Ecevit ve Tuncer, 1991; Lal ve Lal, 1993). Bt geni taşıyan transgenik bitkiler ilk olarak 1995 yılında pazara sunulmuştur.



Şekil 2. 5. *Bacillus thuringiensis* bakterisindeki cry genlerinin *A. tumefaciens* aracılığıyla bitki hücresine aktarılması (Özcan, 2009)

B. thuringiensis her biri farklı özelliklere sahip 200'den fazla Cry proteini barındırmaktadır. *B. thuringiensis* Cry proteinleri etkiledikleri böcek takımlarına göre beş gruba ayrılarak Cyr-I, Cry-II, Cry-III, Cry-IV ve Cry-V olarak gruplandırılmaktadır (Çizelge 2.1-2). Birinci grubun toksinleri (Cyr-I) lepidoptera larvalarına, ikinci grubun

toksinleri (Cry-II) hem Lepidoptera hem de Diptera larvalarına, üçüncü grubun toksinleri (Cry-III) Coleoptera larvalarına, dördüncü grubun toksinleri (Cry-IV) Diptera larvalarına ve beşinci grubun toksinleri hem Lepidoptera hem de Coleoptera takımı larvalarına karşı etki göstermektedir. Bu genlerin diğer gruplandırılmış olanları ise Çizelge 2.2’de verilmiştir .(Öktem, 2004; Bravo vd., 2007).

Çizelge 2.1. Kristalize (Cry) toksin proteinler ve etkilediği böcek takımları
(Bakhsh vd., 2015)

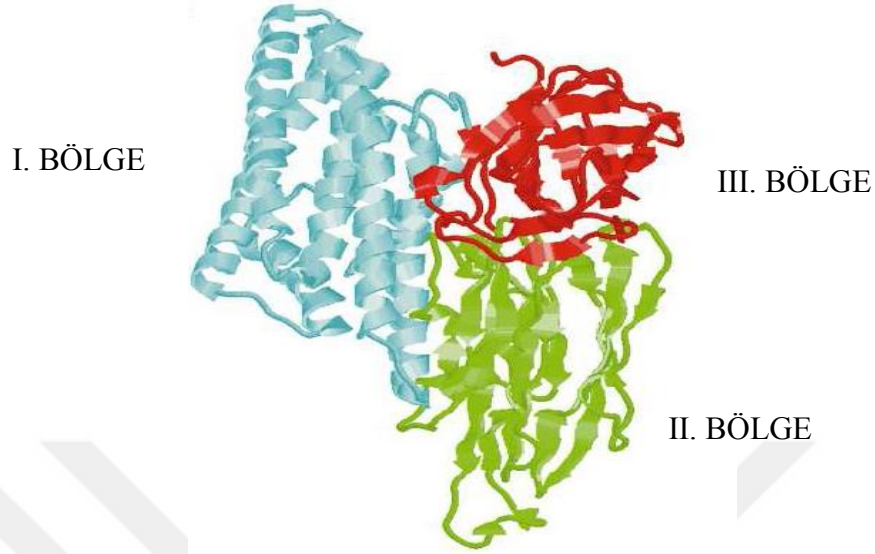
Cry Proteini	Böcek Takımı	Dönem
Cry-I	Lepidoptera	Larva
Cry-II	Lepidoptera ve Diptera	Larva
Cry-III	Coleoptera	Larva
Cry-IV	Diptera	Larva
Cry-V	Lepidoptera ve Coleoptera	Larva

Çizelge 2.2. Kristalize (Cry) toksin genleri ve etkilediği farklı bitkilerdeki böcek türleri (Bakhsh vd., 2015)

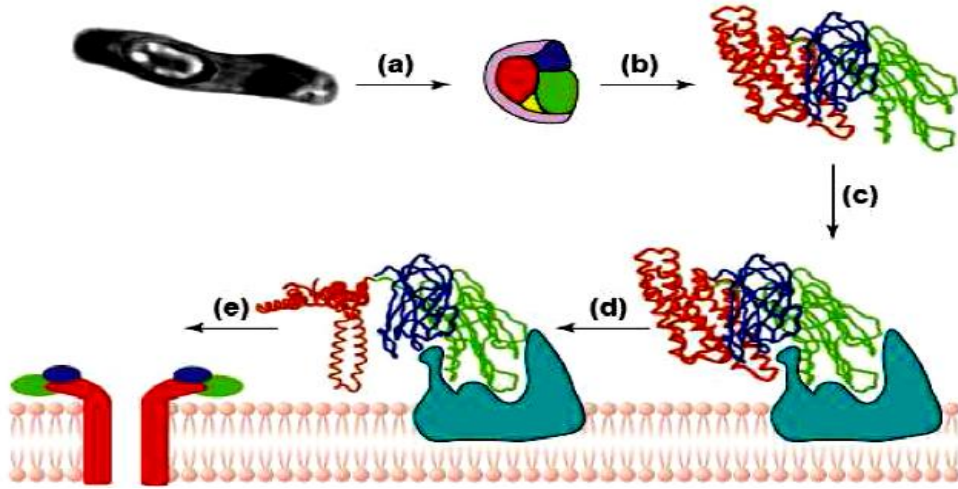
Cry geni	Hedef böcek türleri	Böcek sınıfı
<i>cryIA(a)</i>	İpek böceği, patates boynuzlu kurdu, Avrupa mısır kurdu	Lepidoptera
<i>cryIA(b)</i>	Patates boynuzlu kurdu, pamuk kurdu, lahana solucanı, sivrisinek	Lepidoptera ve Diptera
<i>cryIA(c)</i>	Patates tomurcuk kurdu, lahana piresi, pamuk kurdu	Lepidoptera
<i>cryIA(e)</i>	Patates tomurcuk kurdu	Lepidoptera
<i>cryIB</i>	Lahana solucanı	Lepidoptera
<i>cryIC</i>	Pamuk yaprak kurdu, sivrisinek	Lepidoptera ve Diptera
<i>cryIC(b)</i>	Pancar ordu solucanı	Lepidoptera
<i>cryID</i>	Pancar ordu solucanı, Patates boynuzlu kurdu	Lepidoptera
<i>cryIE</i>	Pamuk yaprak kurdu	Lepidoptera
<i>cryIF</i>	Avrupa mısır kurdu, pancar ordu solucanı	Lepidoptera
<i>cryIG</i>	Büyük mum kurdu	Lepidoptera
<i>cryIIA</i>	Çingene güvesi, sivrisinek, pamuk kurdu	Lepidoptera
<i>cryIIB</i>	Çingene güvesi, lahana piresi, patates boynuzlu kurdu	Lepidoptera
<i>cryIIC</i>	Patates boynuzlu kurdu, çingene güvesi	Lepidoptera
<i>cryIIIA</i>	Patates böceği	Coleoptera
<i>cryIIIA(a)</i>	Patates böceği	Coleoptera
<i>cryIIIB</i>	Patates böceği	Coleoptera
<i>cryIIIC</i>	Benekli salatalık böceği	Coleoptera
<i>cryIVA</i>	Sivrisinek (<i>Aedes</i> ve <i>Culex</i>)	Diptera
<i>cryIVB</i>	Sivrisinek (<i>Aedes</i>)	Diptera
<i>cryIVC</i>	Sivrisinek (<i>Culex</i>)	Diptera
<i>cryIVD</i>	Sivrisinek (<i>Aedes</i> ve <i>Culex</i>)	Diptera
<i>cryV</i>	Avrupa mısır kurdu, benekli salatalık böceği	Lepidoptera ve Coleoptera

B. thuringiensis δ -endotoksin proteinlerinde böcekleri etkileyen 3 farklı bölge bulunmaktadır. Birinci bölge, Cry porteinleri ilk olarak böcek tarafından alınması bağırsağına yapışma ve bu şekil’de hücreleri parçalamaya neden olmaktadır (Şekil 2.6). ikinci ve üçüncü bölgeler ise böceğin bağırsağındaki epitel hücrelerinin reseptörlerini tanıması ve bağlanma özelliği taşımasıdır (De Maagd vd., 1999; 2001). Bu durum, böceklerin genel zehirlenmelerine ve sonunda larvaların ölümüne neden olmaktadır (Kranthi vd., 2005; Şekil 2.7). Günümüzde, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIFa*, *cryIIIBb*, *cry34Ab*,

cry35Ab genlerini barındıran mısır, *cryIIIAa* genine sahip patates ile *cryIAc* ve *cryIIAb* genlerini içeren pamuk bulunmaktadır.



Şekil 2. 6. (Bt) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin (cry) proteininin üç boyutlu yapısı (De Maagd vd., 1999)



Şekil 2. 7. Cry proteinlerinin böceğe karşı olan etki mekanizması. Böcek tarafından yenilen Cry proteinleri ve böceğin bağırsağındaki sıvı kısımda çözünür olması (a), mor renk ile belirtilen C-terminalı sarı renk olan bölge ise N-terminal bölgenin bir kısmı bağırsak proteazları tarafından kesilir olması (b), epitel hücreleri üzerinde bulunan aktif toksin reseptörleri tanıması ve bağlanması (c), 1. bölgenin yapısında bulunan 2 heliks saç tokası epitel hücrelerine yerleşir (d) ve böceğin bağırsağında delik oluşturma mekanizması (e) (De Maagd vd., 2001)

2.3. *bar* Geninin Patates bitkisine Aktarılması İle Herbisitlere Karşı Dayanıklılık Göstermesi ve ®BASTA'nın Çalışma Mekanizması

®BASTA aktif madde olarak, fosfotrisin (PPT) molekülünün kimyasal olarak sentezlenmiş bir formu olan glufosinat amonyum içermektedir. Glufosinat bitkide amonyum asimilasyonundan sorumlu anahtar enzim olan glutamin sentetaz (EC: 6.3.1.1) (Li 1993) enzimini inhibe etmektedir. Bu nedenle glutamin sentazın aktivitesinin durması sonucu bitki hücrelerinde amonyum birikmekte ve biriken amonyum bitkilerde ölümcül etki oluşturmaktadır. Phosphotrisin asetil transferaz (PAT) enzimi PPT'yi asetilasyon vasıtasıyla detoksifiye edebilen bir enzimdir ve PAT *bar* geni tarafından sentezlenmektedir. PAT ilk olarak *Streptomyces hygroscopicus* bakterilerden 1987 yılında izole edilmiştir. *bar* geni içeren ve böylece PAT sentezi yapan bir bitki üzerine ®BASTA herbisiti uygulandığında PAT enzimi ®BASTA herbisitinin etken maddesi olan glifosanatu detoksifiye etmekte ve bu şekilde bitki hayatta kalmaktadır (Thompson ve ark., 1987).

Bugüne kadar patatesin de içinde yer aldığı birçok bitkiye *Bt* ve *bar* genleri aktarılmış olup, böceklerle ve herbisitlere dayanıklılık konusunda çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan bir kaç aşağıdaki kaynak özetlerinde belirtilmiştir.

Barton vd. (1987), *B. thuringiensis* bakterisinden izole edilen Cry δ endotoksin genini 100'den fazla tütün bitkisine aktarmış ve bu bitkilerin yaklaşık % 25'inde transformasyon gözlenmiştir. Bu transgenik tütün bitkileriyle beslenen *M. sexta* larvalarının tümünün 4 gün içerisinde öldüğü gözlenmiştir.

Smeda vd. (1993), Siano bakterilerden ve Triazine dayanıklı yabancı otlardan izole edilen psbA genini tütün bitkisine transfer ederek, atrazin herbisitlerine dayanıklı transgenik tütün bitkileri elde etmişlerdir.

De Maagd vd. (1996) tarafından hibrit ve hibrit olmayan bitkiler arasındaki *cryIAb*, *cryIC* genlerinin *Spodoptera exigua* (pancar kurdu)'na etkisi yönünden bir araştırma yapılmıştır. Bu yapılan çalışma sonucunda *cryIAb* ve *cryIC* yapay genlerinin etkisi doğal genlere göre daha yüksek oranda çıkmıştır ve böceklerde yüksek düzeyde ölüm oranı belirlenmiştir.

Öktem vd. (1997), pDHB321.1 vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* LBA4404 hattı kullanarak *bar* genini tütün bitkisine aktarmışlardır. Transgenik bitkilere 4 mg/l konsantrasyonun'da Glufosinat amonyum herbisiti uygulanmış ve bitkilerde dirençlilik tespit edilmiştir.

Tingay vd. (1997), uygun vektör sayesinde Golden Promise arpa çeşidine *A. tumefaciens* bakterisi aracılığıyla *bar* genini aktarmışlardır. Bu çalışmada herbisit dayanıklı bitkilerin kontrolü yapılarak % 4,2 başarıya ulaşılmıştır. Araştırmanın önemi ise bir monokotiledon olan arpa bitkisine ilk kez *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımının gerçekleştirilmiş olmasıdır.

Enríquez-Obregón vd. (1998), *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile şekerkamışı bitkilerine *bar* genini aktararak amonyum glufosinata dayanıklı transgenik şekerkamışı bitkileri elde etmişlerdir. Elde edilen aday transgenik şekerkamışı bitkilerinin amonyum glufosinata direnç seviyeleri, ticari herbisit olan BASTA'nın uygulanmasıyla incelenmiştir. Sonuçta %10-35 düzeyinde başarı elde edilmiştir.

Cheng vd. (1998), *cryIc* genini aktararak lahanada, tütünde ve soğanda *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua* ve *Spodoptera litura* gibi zararlı böceklere karşı dirençli transgenik bitkiler geliştirilmiştir.

Christov vd. (1999), *A. tumefaciens* LBA4404 suşunu kullanarak *rbcS* promotörü eklenen bir yabancı tip *CryIAc* genini ve aynı promotörü içeren bir sentetik *CryIAc* genini tütün bitkisine aktarmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda *Spodoptera litura* kurduna karşı dirençli tütün bitkileri elde edilmiştir. Yabancı tip *CryIAc* genine kıyasla sentetik *CryIAc* geninin etkisinin daha çok olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkiyle besleme analizinin üçüncü gününde bitkilerin 23 tanesinde *Spodoptera litura*'lar % 80-100 oranında zehirlenmiş ve ardından ölmüşlerdir. En yüksek *CryIAc* protein konsantrasyonu RSC23 bitkisinde % 0.01 olarak bulunmuştur.

Wang ve Guo'e (1999), pGW4BAI vektörü barındıran *A. tumefaciens* (LBA4404) aracılığıyla tütün *CryIA (b&c)* ve GNA genlerini aktararak transgenik tütün bitkileri elde etmişlerdir. Yapılan PCR, Southern blot analiz sonuçlarında 28 adet bitki pozitif olarak belirlenmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre transgenik bitkinin yeşil kurt (*H.*

armigera) ve bollworm (Pamuk kılıfı kurdu)'na karşı biyoyaprak analizi üzerinde çok iyi sonuca ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Falco vd. (2000), parçacık bombardımanı aracılığıyla Brezilya şeker kamışına (*Saccharum officinarum* L.) *bar* genini aktararak amonyum glufosinata dayanıklı Brezilya şeker kamışı bitkisi geliştirmişlerdir. Transgenik bitkilere ticari bir amonyum glufosinat uygulanıp herbisite dayanıklılığı gözlenmiştir. PCR analizleri sonucunda dirençli bitkilerde *bar* geninin ifadesi belirlenmiştir.

Uludağ vd. (2001), herbisitlerde dayanıklılık konusunda Türkiye'deki ilk çalışmayı yapmışlardır. Herbisitlere dayanıklılık amacıyla yapılan bu araştırmada, buğday bitkisinde problem olan *Avena sterilis* yabancı otunun ACCase inhibitörlerinden fenoxaprop-p-ethyl ve clodinafop-propargyl herbisitlerinin farklı dozlarına karşı dirençliliği gözlemlenmiştir.

Davidson vd. (2002), Ilam Hardy ve Iwa isimli iki patates çeşidine *A. tumefaciens* aracılığıyla CaMV 35S promotörü altında *CryIAC9* genini aktarmışlardır. PCR analizi sonucunda tüm hatlarda bir markör gen olan *npII*'nin varlığı tespit edilmiştir. PCR analizleri sonucunda Iwa çeşidine ait 15 transgenik bitkiden 14'ünde ve Ilam Hardy'e ait 8 transgenik hatta *CryIAC9* geninin olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada transgenik hatların patates yumru güvesinin (*Phthorimaea operculella* Zeller) larvalarının büyümesini önemli derecede engellediği bulunmuştur. Iwa çeşidinin transgenik soylarının yalnızca % 60'ı fenotipik olarak normal bitkiler üretmiş, ancak *CryIAC9* geni için pozitif olan tüm hatlar patates yumru güvesi larvalarının büyümesini önemli ölçüde engellemiştir. Tarla koşullarında Ilam Hardy'den geliştirilen üç hat ve Iwa'dan geliştirilen iki hat fenotipik olarak nontransgenik veya kontrollere eşdeğer normal görünümünü korumuşlardır. Normal görünümünü koruyan bu 5 transgenik hattın yapraklarında patates güvesinin larvalarının büyümesi önemli derecede engellemiştir. Southern analizi sonucunda bu beş transgenik patatesin *CryIAC9* genini bir ya da iki kopya olarak içerdikleri belirlenmiştir.

Hu vd. (2003), *Agrobacterium* suşundan izole edilen *CP4-EPSPS* genini *A. tumefaciens* aracılığıyla buğday bitkisine aktarmışlardır. Aday transgenik buğday hatlarının glifosata dayanıklılık durumları moleküler çalışmalar ile değerlendirilmiş

olup, %46 oranda pozitif sonuç alınmıştır. Elde edilen sonuçlar ELİSA testi ile doğrulanmış ve ayrıca transgenik bitkiler'e Roundup Ready® herbisiti uygulanarak dayanıklılıkları doğrulanmıştır.

Chen vd. (2005), *A. tumafaciens* aracılığıyla çeltiğe *cry2A* genini aktarmışlardır. PCR analizi sonucunda 102 adet bitkiden 71 adetinin *cry2A* içerdiğini tespit etmişlerdir. Elde edilen transgenik çeltik bitkilerinin Lepidoptera takımındaki zararlı böceklere karşı önemli derecede dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir. Transgenik bitkilerde *cry2A* protein seviyesi 9,65 – 12,11 µg/g taze yaprak dokusu arasında değişim göstermiştir.

Zaidi vd. (2005), yaprak ve boğum arası eksplantları kullanılarak *cry2Aa2* genini türün bitkisine aktarmışlardır. Toplam 30 adet kanamisine dayanıklı bitki elde edilmiş ve 27 adet bitkinin PCR analizi sonucunda pozitif olduğu belirlenmiştir. Bioassay analiz sonucunda yaprakla beslenen armigera larvalarının oranı %100 olarak ve sapla beslenen larvaların ölüm oranları sırasıyla %41, %44, %35 ve %22, son olarak kökle beslenen ölüm sonucu %1-%5 olarak belirlenmiştir.

Tan vd. (2006), *S. viridochromogenes* ve *Streptomyces hygroscopicus* 'tan izole edilen *bar* ve *pat* genlerini bitkilere transfer etmişler ve bu şekilde glufosinatın detoksifiye edildiğini tespit etmişlerdir. Yine *Ororobactrum anthropi*'den izole ettikleri GOX genini bitkilere aktarmışlar ve glifosati detoksifikasyon etmek için kullanmışlardır.

Gibum vd. (2007), *bar* genini *A. tumafaciens* yöntemi ile tatlı patates bitkisine aktarmışlardır. Bu araştırmada seleksiyon markörü olarak *nptII* ve gen aktarım vektörü olarak pCAMBIA3301 kullanılmıştır. β-glukuronidaz geni (*gusA*) raportör gen olarak ve fosfinotrisin (PPT) ise seçim için kullanılmıştır. Transgenik bitkilerde histokimyasal analiz sonucunda GUS genlerinin var olduğu tespit edilmiştir. Yapılan PCR analiz sonucunda transgenik bitkilerin bünyesinde veya genomik DNA'sında *bar* geninin var olduğu belirlenmiştir. Bitkilerin herbisite dayanıklılığının doğrulanması için Glufosinat amonyum etken maddesi içeren ticari BASTA herbisiti kullanılmıştır.

BASTA herbisiti uygulanan transgenik bitkilerin büyüme ve gelişmelerine normal olarak devam ettiği gözlenmiştir. Transgenik olmayan kontrol bitkilerde ise 1-2 hafta sonra yapraklarında sararmalar ve büyümede yavaşlama belirlenmiştir.

Bakhsh vd. (2010), *A. tumefaciens* yöntemi kullanılarak *cryIAc* geni NIAB-846 pamuk çeşidinin sürgün ucu meristemlerine aktarmıştır. Transformasyon için Rbcs promotör ve *cryIAc* genini içeren pRb-Ac vektörünü ve 35S promotör ile *cryIAc* genini içeren pk2Ac vektörünü ayrı ayrı taşıyan LBA4404 bakteri hattı kullanılmıştır. Sürgün ucu meristemleri ko-kültivasyon ortamına alındıktan sonra sürgün oluşturma ve köklendirme ortamlarına alınmıştır. Daha sonra toprağa alınan aday transgenik bitkilerin GUS, PCR, ELİSA ve Southern Blot analizleri sonucunda transgenik bitkiler belirlenmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre *cryIAc* geninin pamuk bitkilerinin genomuna başarılı bir şekilde entegre olduğu belirlenmiştir.

Chuan vd. (2012), gen aktarım yöntemiyle tütün bitkisine *Agrotis ypsilon* böceğine karşı dayanıklılık kazandırmışlardır. Bunun için ilk olarak, *Vip3Aa11* ve *Cry2Ab4* genleri *Bacillus thuringiensis*'den izole edilmiş ve klonlanmıştır. Ardından bu genler iki bitki ifade vektörüne (pCSvip3A ve pCS2Ab) eklenmiş ve daha sonra *Vip3Aa11* ve *Cry2Ab4* genleri *A. tumefaciens* aracılığıyla tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisine aktarılmıştır. PCR, RT-PCR ve Western emdirme analiz sonuçlarına göre 32 ile 35 arasında aday transgenik bitkide pozitif aktivite gözlenmiştir. Transgenik bitkilerin yaprakları ile besleme analizi sonucunda, transgeniklerin (*Agrotis ypsilon*) larvalarına karşı %82 oranında etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *Vip3Aa11* geninin *Cry2Ab4* genine göre etki oranının daha yüksek olduğunu gözlenmiştir.

Sohail vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada *CryIAc* ve *Cry2Ab* genleri birlikte tütün bitkisine aktararak transgenik tütün bitkileri elde edilmiştir. Yapılan çalışmada 58 adet bitkide gen aktarımı başarılı olmuş ve bu durum PCR analizi ile genlerin varlığı tespit edilerek doğrulanmıştır. Ayrıca *Helicoverpa armigera* ve *Spodoptera exigua* larvaları transgenik yapraklar ile beslenmiş ve sonuç olarak 24 saat sonra *H. armigera* larvalarında %62, *S. exigua* larvalarında ise %12 oranında toksik etki gözlenmiştir.

Yüceer vd. (2012), pCAMBIA1301 plazmidini içeren *A. tumefaciens*'in EHA101 izolatu kullanılarak, Marfona ve Granola patates çeşitlerine *CryIAc* genini aktarmışlardır. Gen aktarımı patates bitkilerinin yaprak ve boğum arası eksplantlarına yapılmıştır. *CryIAc* genini içeren transgenik sürgünler 10 mg/l higromisin B içeren ortamda seçilmişlerdir. Higromisin B antibiyotikine dayanıklı olarak seçilen toplam 55 adet patates bitkisinden 35 tanesinin *Hpt* genini içerdiği, PCR analizi ile çoğaltılan

spesifik 700 bp DNA parçasıyla saptanmıştır. *Hpt* geni içeren transgenik patates hatları patates böceği ile biyolojik olarak testlenmiştir. Yapılan biyolojik testlerde transgenik bitkiler üzerinde beslenen patates böceği larvalarında % 80-85 oranında ölüm meydana geldiği gözlenmiştir.

Bakhsh vd. (2018), gen piramitleme stratejisi kullanarak böceğe dirençlilik sağlayan *CryIAc* ve *Cry2A* genlerini *A. tumefaciens* LBA4404 hattı aracılığıyla, Basma ve Nail Türk tütün çeşitlerine aktararak böceklere dayanıklı tütün hatları geliştirmişlerdir. Gen aktarım amacıyla kullanılan pK2AC plazmidi 35S promotörünü, T-DNA bölgesinde ayrıca *uidA* ve *nptII* genlerini barındırmaktadır. Yapılan PCR analizleri sonucunda, Basma çeşidinden geliştirilen 40 adet transgenik hattın ve Nail çeşidinden geliştirilen 16 adet transgenik hattın *CryIAc*, *Cry2A*, *uidA* ve *nptII* genlerini barındırdığı belirlenmiştir. ELİZA sonucunda Cry proteinin 0,017 ile 0,607 µg/g taze doku arasında sentezlediği belirlenmiştir. Transformasyon oranı Basma çeşidinde %30,7 ve Nail çeşidinde ise %18,8 oranında gerçekleşmiştir. Transgenik Basma ve Nail tütün yaprakları ile yapılan besleme analizi sonucunda patates güvesi (*Phthorimaea operculella* Zeller) birinci dönem larvalarında önemli derece ölüm gözlenmiştir. T1 nesil bitkilerde yapılan çalışma sonuçları, bu taransgenik tütün hatlarının ıslah programlarında gen kaynağı olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

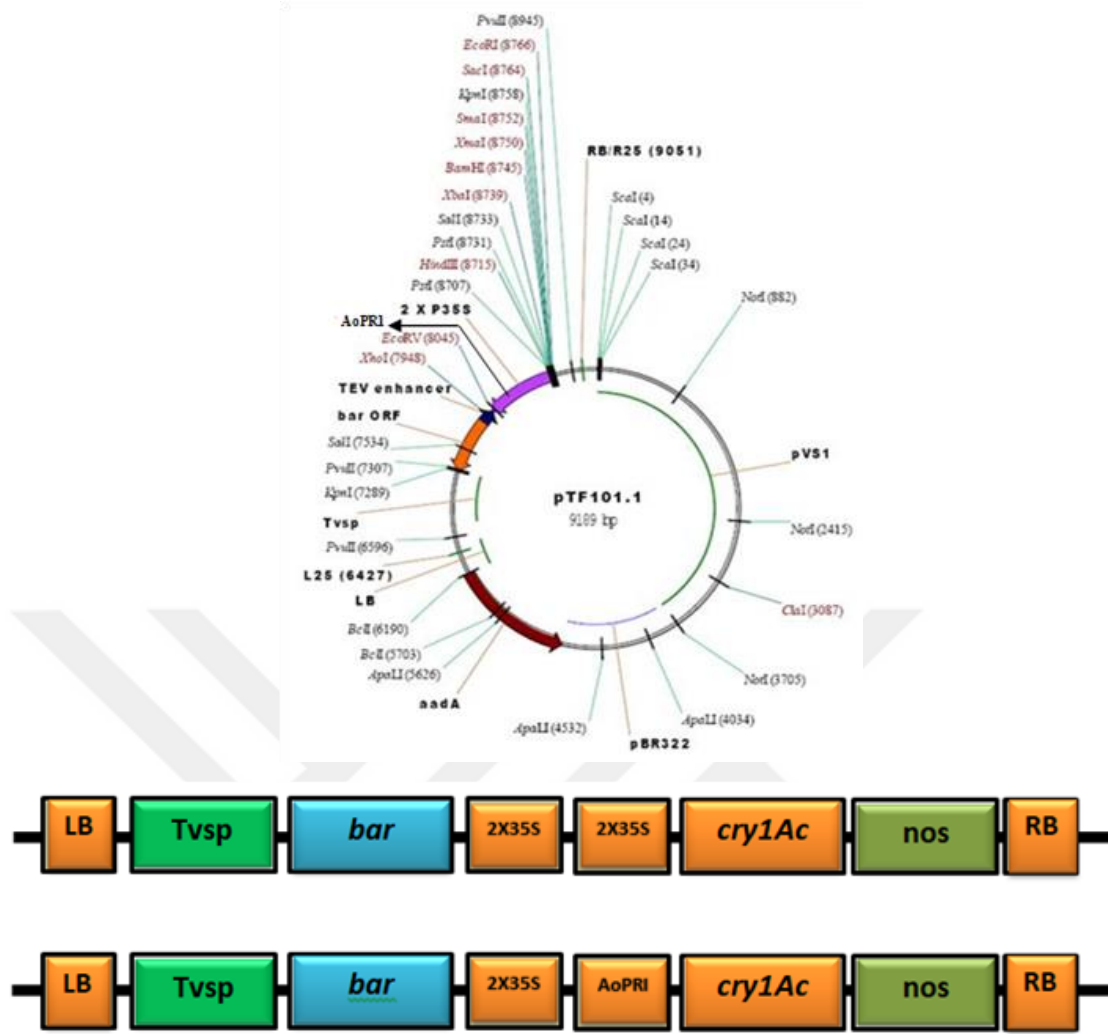
3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Bu çalışmada “Marabel” patates (*Solanum tuberosum L.*) çeşidine ait *in vitro* bitkilerin boğum arası (internod) ve yaprak dokuları gen aktarımında bitki materyali olarak kullanılmıştır. Bu çeşit laboratuvarımızda mevcut olup doku kültürü şartlarında olumlu sonuçlar vermektedir. Marabel patates bölgelerinde ticari olarak yetiştirilmesine ve yüksek yumru verime sahip olmasına rağmen, böcek saldırılarına ve herbisitlere karşı hassas bir çeşittir.

3.1.2 Bakteri materyali

Gen aktarımı için bakteri materyali olarak Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri bölümünde geliştirilen pTF101.1 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA105 hattı kullanılmıştır. pTF101.1 plazmidi, böcek öldürücü gen *cryIAc* ve herbisit dayanıklılığı sağlayan *bar* genini içermektedir. Böcek öldürücü ve herbisite dayanıklılık genlerinin ikisi de iki kat artırılmış 35S (2x 35S) ve AoPRI promotörleri ve nos terminatörü tarafından yönetilmektedir (Bakhsh vd. 2009b; Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. pTF101.1 plazmidinin T-DNA bölgesi ve şematik gösterimi. 2X35S ve AoPRI promotörleri, bar ve cry1Ac genini yürütür.

3.2 Metot

3.2.1. Bitki ifade vektörünün Agrobacterium'a aktarımı

35S pTF101.1 ve AoPRA1 pTF101.1-cry1Ac bitki ifade vektörü, elektroporasyon cihazı (Bio-Rad #165-2660) kullanılarak, elektroporasyon yöntemiyle *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 soyuna aktarılmıştır (Şekil 3.2). Elektroporasyon işlemi için 100 µl *A. tumefaciens* EHA105 kompetent hücresi ile 2µl bitki ifade vektörü (100ng/µl) üzerine ilave edilerek pipet yardımıyla hafifçe karıştırılmış ve karışım soğuk küvete aktarılmıştır. Plazmit vektörünün *Agrobacterium*'a aktarılma işlemi elektroporasyon cihazı (Bio-Rad #165-2660) kullanılarak, 2200V elektrik gerilim, 200 ohms direnç ve 5

mili saniye koşullarında yapılmıştır. Elektroporasyon işleminin ardından hücreler 1.5 ml tüplere alınıp, üzerine 1 ml LB besi ortamı ilave edilmiş ve 28°C'de 200 rpm hızda çalkalanarak 2 saat çoğaltılmıştır. Bakterinin 200 µl'si alınıp sepectinomycin (30 µg/ml), streptomycin(10 µg/ml) ve rifampisin(30 µg/ml) içeren katı LB besi ortamına ekilmiştir. Kültür ortamı gece boyunca 28°C'de inkübe edilip koloniler geliştikten sonra +4 dereceye alınmıştır. Elektroporasyon sonrasında *Agrobacterium* bakterilerinde *cryIAc* geninin varlığını doğrulamak için koloni PCR yapılmıştır. Bu amaçla, elektroporasyon ile vektörün aktarıldığı bakteriler seçici sıvı LB besi ortamında 28 °C'de gece boyu büyütülmüştür. Üzerinde çok sayıda koloniler gözlemlenmiş ve kolonilerin bir kaçı rasgele seçilerek PCR yöntemiyle taranmıştır. Seçilen kolonilerden minik paça alınarak *cryIAc* geninin iç bölgesini çoğaltmak için ileri IF ve geri IR primerlerini kullanarak koloni PCR yapılmıştır Çizelge 3.1. PCR taramasının ardından PCR ürünü % 1 agaroz jel üzerinde koşturulmuş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Pozitif koloni 30 µg/ml spectinomycin, 10 µg/ml streptomysin ve 30 µg/ml rifampisin içeren sıvı LB besi ortamına inoküle edilmiş ve 28 °C'de, 200 rpm döngüde çalkalanarak gece boyu inkübe edilmiştir. pTF101.1- *cryIAc* bitki ifade vektörünü içeren bu *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerinin gliserol stokları yapılmış ve patatese gen aktarım çalışmalarına kadar -80 °C'de bekletilmiştir. Bu plazmid, böceğe ve herbisite dayanıklılığı sağlayan *cryIAc* geni ile *bar* genini içermektedir.

Çizelge 3.1. *cryIAc* gen koloni PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	20 sn	35
Bağlanma	58°C	30 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	7 dk	1



Şekil 3. 2. Elektroporasyon cihazı (Bio-Rad #165-2660)

3.2.2 Besin ortamı ve doku kültürü koşulları

Bu çalışmada MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962; Çizelge 3.2) ile %3 sakkaroz ve %0,8 agar içeren temel MS besi ortamı kullanılmıştır. Transformasyon koşullarında bitkilerin kallus oluşturması için BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l+ Trans zeatin 2 mg/l + GA3 0,1 mg/l + PPT 1 mg/l + Ascorbic acid 0,1 mg/l + 30 g/l sakkaroz + 500mg/l geniş spektrumlu sulcide kullanılmıştır. Kallus oluşturan bitkilerin süğün vermesi için farklı alt kültürü yapılması için BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l + GA3 1 mg/l+ PPT 1 mg/l+ 500 mg/l geniş spektrumlu Sulcid içeren ortam kullanılmıştır. Besi ortamlarının pH'sı 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanılarak 5,6'ya ayarlanmıştır. Besi ortamları 121 °C'de 1.2 atmosfer basınç altında 20 dk otoklavda tutularak sterilize edilmiştir. Tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüş ve kullanılan kaplar, metal ekipmanlar makas, pens, lanset ve doku kültürü için kullanılan başka ekipmanların hepsi yukarıda belirtildiği gibi otoklavda steril edilmiştir. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C de inkübe edilmiştir.

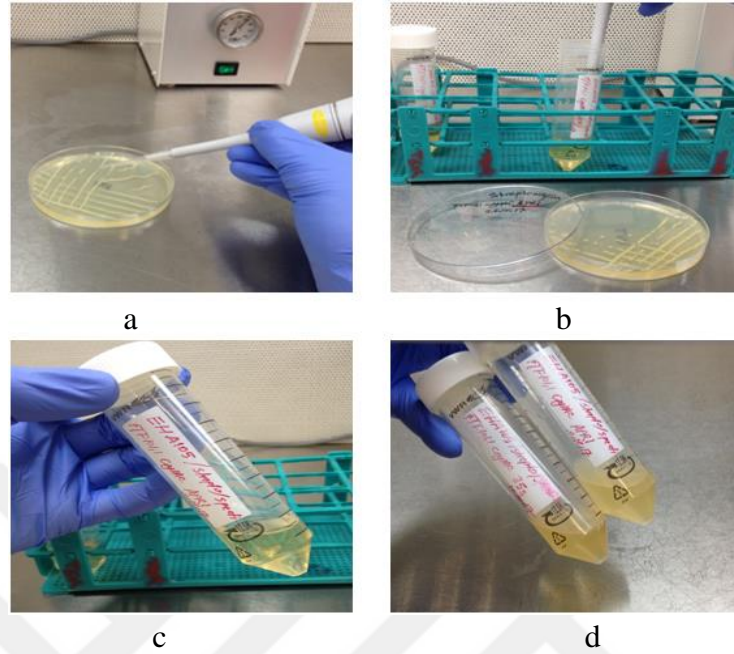
Çizelge 3.2. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve miktarları
(Murashige ve Skoog 1962)

Besin Maddeleri	Miktarı (mg/l)	
Makro besin Elementleri	NH ₄ NO ₃	1650,00
	KNO ₃	1900,00
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
	KH ₂ PO ₄	170,00
Mikro besin Elementleri	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30	
Vitaminler	Inositol	100,00
	Nicotinik Asit	0,50
	Pyridoksin-HCl	0,50
	Thiamin-HCl	0,10
	Glisin	2,00

3.2.3 Agrobacterium kültürlerinin büyütülmesi

Tez çalışmasında kullanılan *A. tumefaciens* EHA105 hattı -80°C’de muhafaza edilen gliserol stoklardan alındıktan sonra 10 ml’lik steril tüplerde, sıvı LB (Luria-Bertani Broth) besin ortamında, 200 rpm’de bir gece boyunca 28°C’de, çalkalayıcı inkübatörde çoğaltılmıştır. Çoğalan bakterilerden örnekler alınarak petri kapları içerisinde seçici antibiyotikleri içeren katı LB ortamının üzerinde çizerek (streaking) ekim yapılmış ve petri kapları 2 gün boyunca 28°C’de ters konularak inkübe edilmiştir. Bu petri kaplarının üzerinde gelişmiş olan bakteri kültürleri 1 ay boyunca +4°C’de muhafaza altına alınarak lazım olduğu durumda kullanılmıştır. Katı LB besi ortamında oluşan kolonilerden örnek alınmış ve bakteri örnekleri 20 µl rifampisin, 10 µl spectinomycin ve 30 µl streptomycin içeren 10 ml’lik sıvı LB besin ortamında, 28 °C’de ve 200 rpm devirde çalkalayıcı inkübatörde bir gece boyunca çoğaltılmıştır (Şekil 3.3). Çoğaltılan

ve gen aktarım vektörünü içeren *A. tumefaciens* EHA105 suşu gen aktarımı amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3. 3. *A. tumefaciens*'in LB ortamında çoğaltılması. LB besin ortamında çizilmiş bakterilerden steril pipet ucuyla tek koloni alınması ve rifampisin, streptomycin ve spectinomycin antibiyotiklerinin ilave edilmesi (a,b), bir gece boyunca 28 °C'de çalkalayıcı inkübatörde çoğaltılmaya hazır bakteri (c) ve bir gece sonra çoğaltılmış bakteriler (d)

3.2.4 Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla patates bitkisine gen aktarımı ve transgenik bitkiciklerin büyütülmesi

In vitro kültürde 4-6 hafta büyütülen steril Marabel çeşidine ait bitkiciklerden alınan yaprak ve boğum arası eksplantlarına gen aktarımı yapılmıştır (Şekil 3.4). Gen aktarım işlemi aşağıdaki protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir:

1. pTF101.1 vektörünü içeren *A. tumefaciens* EHA105 hattı, 20 mg/l rifampisin, 30 mg/l spectinomycin ve 10 mg/l streptomycin ihtiva eden 10 ml LB sıvı besin ortamı içerisinde 28 °C'de bir gece boyunca çoğaltılmıştır.
2. Patates bitkisine ait yaprak ve boğum araları steril kabin içerisinde kesilmiştir. Ardından eksplantların üzerine *cryIAC* ve *bar* genlerini barındıran *A. tumefaciens* EHA105 hattına ait 2 ml sıvı bakteri süspansiyon ilave edilmiş ve

ara ara karıştırılarak 45 dk inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyon için sıvı LB besin ortamı kullanılmıştır.

3. İnoküle edilen eksplantlar acetosyringone (100 mM) içeren katı MS bitki besin ortamında 3 gün boyunca inkübe edilmiştir (ko-kültivasyon).
4. 3 günün ardından eksplantlar, steril kabin içerisinde steril saf su ve 1000mg/l sulcid kullanılarak 15 dk yıkanmış ve % 75 Ethanol ile steril edilen kâğıt üzerinde kuruması sağlanmıştır. Yıkama işlemi eksplantların etrafındaki tüm bakterileri ortamdaki uzaklaştırmak ve tekrardan büyümeme amacıyla yapılmıştır.
5. Antibiyotik içeren seleksiyon ortamına (RSM) bakterilerden temizlenmiş 15 adet eksplant ekilmiştir. Gen aktarımı yapılan eksplantlar kallus oluşumu için üç tekerrürlü olarak büyütme kabininde beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24°C de kültüre alınmıştır. Seleksiyon amacıyla RSM ortamı olarak 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + 2 mg/l Trans zeatin + mg/l GA3 0,1 + 1 mg/l PPT + 0,1 mg/l Askorbik asit + 30 g/l sakkaroz + 500mg/l geniş spektrumlu Sulcid içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Seçici besin ortamında yer alan Sulcid, *A. tumefaciens*'in gelişimini engellemek amacıyla, PPT (fosfinotrisin) ise gen aktarımı gerçekleşen bitkilerin seçimi için kullanılmıştır.
6. Eksplantlar seçici besin ortamında yaklaşık 5-7 hafta sonra yaprak ve boğum arası eksplantları üzerinde PPT'ye dayanıklı kallus ve sürgün sayımı yapılmıştır.
7. Aday transgenik bitkilerin oluşturduğu sürgünler daha sonra kesilerek 1 mg/l PPT ve 500 mg/l sulcid içeren MS besin ortamı üzerinde köklendirilmiştir.
8. Gelişen ve köklenen 10-15 cm uzunluğundaki sürgünler sera ortamında alıştırmak amacıyla torf ve perlit içeren saksılarda aktarılmıştır.
9. Sera ortamında yetiştirilen bitkilerin yaprak örneklerinde DNA ve RNA izolasyonu, PCR analizi, ELİZA testi, qRT-PCR ve transgenik bitkiler üzerinde yaprak biyoanalizi yapılarak transgenik bitkiler gözlenmiştir.



Şekil 3. 4. Patates bitkisine *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Steril ortamda yaprak ve boğum arası eksplantların elde edilmesi(a), LB ortamında *Agrobacterium* inokülasyonu (b-c), eksplantların acetosyringone içeren ko-kültürasyon ortamına alınması (d), Ekplantların steril su ve antibiyotikle yıkandıktan sonra steril % 75'lik Ethanol sıkılmış kağıt üzerinde kurutulması (e) ve gen aktarılmış eksplantların RSM ortamında aktarılması (f)

3.2.5. Aday transgenik bitkilerin toprağa aktarılması

Yaklaşık 10-15 cm boyundaki köklenmiş aday transgenik bitkiler, köklerin hasar görmemesi için besin ortamından dikkatlice çıkarılmıştır. Bitkilerin kökleri ilk önce normal su ile iyice yıkanıp temizlendikten sonra 2:1 oranında torf ve perlit karışımı içeren saksılara dikilmiştir. Toprağa aktarılan bitkiler uygun zamanlarda sulanıp ve gübrelenerek sera koşullarında büyütülmüştür.

3.2.6. Aday transgenik patates bitkilerinin moleküler analizleri

Serada yetiştirilen aday transgenik bitkilerde böcek öldürücü *cryIAc* ve herbisite dayanıklılığı sağlayan *bar* genlerinin varlığını doğrulamak amacıyla çeşitli moleküler analizler yapılmıştır.

3.2.6.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

3.2.6.1.1 DNA izolasyonu

Sera ortamındaki her bir saksıdan aday transgenik bitkilerden taze ve genç yaprak örnekleri alınmış olup -80°C'de muhafaza edilmiştir. Yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu, ticari NucleoSpin PLANT II REF 740770.250 kiti kullanılarak firmanın önerdiği protokol doğrultusunda yapılmıştır. Yaprak örnekleri sıvı azotla parçalanarak 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur. Kit protokolüne göre her bir örnek üzerine 400 µl PL1 eklenerek vorteks yapılmış ve ardından 10µl RNase A eklenmiştir. Örnekler bir saat 65 °C'de inkübe edildikten sonra 11000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üst faz yeni filitereli tüplere aktarılarak her bir tüp üzerine 450 µl PC tamponu eklenmiştir. Ardından bir iki kez yavaşça alt-üst karıştırılmış ve 15 dk oda sıcaklığında beklettikten sonra 11000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj yapıldıktan sonra alta geçen sıvı kısım uzaklaştırılmış ve membrana bağlanan DNA'ların saflaştırılması için yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama için her tüp üzerinde 400 µl PW1 tamponu eklenerek 11000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Ardından her tüpe iki kez 200 µl PW2 tamponu eklenmiş ve birer dakika çöktürme yapılmıştır. DNA örneklerini membrandan kazanmak için membranlı tüpler 1.5 ml'lik tüplerin içerisine yerleştirilmiş

ve üzerlerine, önceden 65°C’de ısıtılmış 50 µl PE tamponu eklenmiştir. Örnekler bu şekilde 45 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 11000 rpm’de 2dk santrifüj yapılarak saf DNA örnekleri elde edilmiştir. DNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi spektrofometre (BioSpec-SHIMADZU) yöntemi ile ölçülmüştür. DNA örnekleri, analiz işlemlerinin gerçekleşmesi için 50 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş ve –20 °C’de saklanmıştır.

3.2.6.1.2 PCR analizleri

PCR analizi *cryIAc* ve *bar* genlerini içeren transgenik patates bitkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Transgenik patates bitkilerini belirlemek amacıyla *cryIAc*, *bar* genlerinin çoğaltımında kullanılan primer bilgileri ve transgenik bitkilerin *Agrobacterium* kontaminasyonu olup olmadığını doğrulanması için *ChvA* genine özgü primerleri Çizelge 3.3.’te görülmektedir.

Çizelge 3.3. Transgenik bitkilerin teyit ve tespit edilmesi için kullanılan gen bölgesi, kullanılan primer baz dizileri, gen bölge uzunlukları ile primerlerin bağlanma sıcaklıkları

Gen bölgesi	Primer baz dizini	Çoğaltılan gen bölgesi uzunluğu (bp)	Primerlerin bağlanma sıcaklığı
<i>cryIAc</i>	5’-ATGGACAACCCAAACATC-3’ 5’-TCATGTCGTTGAATTGAATACG-3’	690	58°C
<i>bar</i>	5’-GCACCATCGTCAACCACTA-3’ 5’-ACAGCGACCACGCTCTTGAA-3’	310	60°C
<i>Chv A</i>	5’- CGAAACGCTGTTCGGCCTGTGG-3’ 5’- GTTCAGCAGGCCGGCCTCCTGG-3’	890	65°C

Amplifikasyon reaksiyonu karışımı için gen spesifik primerler kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı, 1 µl ileri F primer (10 pmol/µl), 1 µl geri R primer (10 pmol/µl), 10 µl 2XPCR karışımı, 2 µl genomik DNA (50 ng/µl) ve 6 µl dH₂O kullanılarak toplam 20 µl hacim

olacak şekilde 0,2 ml’lik santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. İncelenen gene özgü PCR sıcaklık döngülerine ait bilgiler Çizelge 3.4, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da sunulmuştur.

Çizelge 3.4. *cryIAc* gen PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	20sn	35
Bağlanma	58°C	30 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	7 dk	1

Çizelge 3.5. *bar* gen PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	20sn	35
Bağlanma	60°C	30 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	7 dk	1

Çizelge 3.6. *ChvA* gen PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	20sn	35
Bağlanma	65°C	30 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	7 dk	1

3.2.6.1.3 Örneklerin agaroz jel analizi

PCR sonuçları, 0,5X TBE (Tris- borat EDTA) tamponu ve %1 agaroz jel kullanarak jel elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir. Buna göre %1'lik agaroz 0,5X TBE çözeltisi içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla en yüksek güçte berrak bir çözelti elde edilinceye kadar eritilmiştir. Ardından çözelti 50-60 °C'ye kadar soğutulmuş ve içerisine 4 µl etidyum bromür (EB) (10 mg/ml) eklenmiştir. Bu çalışmada %1'lik agaroz jel hazırlanması için 0,5 g agaroz, 50 ml 0.5X TBE tamponu çözeltisi içerisine yaklaşık 1-2 dk mikrodalga fırınında eritilerek sonrasında agaroz jel kalıbına dökülmüştür (Şekil 3.5). Daha sonra dökülmüş olan agaroz jel katılaşması için 15–20 dk bekletilmiş ve üzerindeki taraklar çıkartılarak, jel kabı 0,5X TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel kuyularına 10'ar µl PCR örneği yüklenmiş ve 6V/cm gerilimde 35-45 dk koşturulmuştur. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel UV ışığı üzerinde kontrol edilerek fotoğraflanmıştır.



Şekil 3. 5. Agaroz jel analizinden genel görünüm. Agoroz jel kalıbı (solda), agoroz jel ünitesi (ortada), jel görüntüleme sistemi (sağda).

3.2.6.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT –PCR)

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), genlerin bitki hücrelerinde protein ifade edilip edilmediğini kanıtlama amacıyla günümüzde çok hassas ve standart bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır (Maqbool vd 2010; Rao vd 2011; Anayol vd., 2016). qRT-PCR analizi *cryIAc* geninin ifade düzeyini belirlemek için yapılmıştır.

3.2.6.2.1 RNA İzolasyonu

Aday transgenik bitkilerin gelişimini tamamlamış en genç yaprakları hasat edilmiş ve hemen sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Sıvı azotta dondurulan yaprak örnekleri RNA izolasyonu için $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Yaprak örneklerinden RNA izolasyonu TRIzol[®] yöntemine göre yapılmıştır. RNA izolasyonu için ≈ 100 mg yaprak örneği sıvı azot ile parçalanıp 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Örnek barındıran her tüpün içerisine 1500 μl TRIzol[®] eklenerek vorteks yapılmıştır. Vorteks yapılan örnekler 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üst kısım alınıp önceden hazırlanmış 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpteki örneklere 400 μl kloroform eklenip karıştırıldıktan sonra 5-7 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oda sıcaklığında beklemiş olan örnekler 15 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra üst kısım alınarak yeni hazırlanmış olan 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Ardından örneklerin üzerine 500 μl izopropanol eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk 11000 rpm'de santrifüj yapılarak sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Tüp içerisinde kalan pelet %75'lik etanol ile yıkanmış ve kuruması için 30 dk streil kabinde bekletilmiştir. Örnekler kurutulduktan sonra tüplere 50 μl DEPC-dH₂O ilave edilerek RNA çözdürülmüştür. RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi spektrofometre (BioSpec-SHIMADZU) yöntemi ile ölçülmüş ve örnekler $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.2.6.2.2 cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezi, Fermentas cDNA synthesis kiti kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen RNA'nın çöktürülmesi için %75'lik alkol ile iki kez yıkanmış ve DNaz I kullanılarak RNA örneklerinden DNA uzaklaştırılmıştır. Toplam RNA örneklerinden cDNA sentezlendikten sonra qRT-PCR analizi yapılmıştır. cDNA sentezi için toplam RNA'lardan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım için ilk olarak 10 μg toplam RNA (DNaz uygulanmış), 1 μl oligo dT primer (100 μM) ve 12 μl 'ye tamamlayacak hacimde DEPC suyu uygulanmıştır. Daha sonra bu karışım, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk inkübe edilmiş ve 3 dk buz üzerine alınarak soğutulmuştur. Soğutulan karışım üzerine 4 μL 5 \times reaksiyon tamponu, 1 μl ribonukleaz inhibitör (20U/ μl) ve 2 μL dNTP karışımı (10mM)

eklenmiştir ve arkasından 37 °C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Karışıma 1µl H minus M-MuLV ters transkriptaz (200U/µL), 1 µl dH₂O eklenmiş ve karışım 42 °C’de 60 dk inkübe edilerek cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. Tek zincirli cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği

İçerik	Kullanılan miktar
RNA (100 ng/µl)	10 µl
Oligo dT Primer (100 µM)	1 µl
5X Reaksiyon Buffer	4 µl
RiboLock Rnaes İnhibitörü(20U/ul)	1 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ul)	1 µl
H ₂ O	1 µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyonun son aşamasında ise karışım 70 °C’de 10 dk bekletilmiş ve cDNA örnekleri gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizi için 1:10 seviyesinde seyreltilmiştir. Transgenik bitkilerde *cryIAc* geninin ifade düzeyini belirlemek amacıyla qRT-PCR analizi yapılmıştır (Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.10). Aday transgenik bitkiler için qRT-PCR çalışması 2 teknik tekrarlamalı olarak yürütülmüş ve analizden sonra sadece tek bir PCR ürünü oluşup oluşmadığını kontrol etmek için erime eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.8. qRT-PCR karışım içeriği

qRT-PCR içeriği	Miktar (µl)
Total mix (2X)	5
F primer (5µM)	0.4
R primer (5µM)	0.4
Ultra saf su	1.7
cDNA (1:100)	2.5

Çizelge 3.9. qRT-PCR sıcaklık döngüsü

İşlev	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü
DNA denatürasyonu	95	15 dk	1
DNA denatürasyonu	95	10 sn	40
Primer bağlama	60	15 sn	
Yeni DNA zincir sentezi	72	20 sn	
Erime eğrisi analizi	70°C'den 90°C'ye,1°C aralık	5 sn	1

qRT-PCR analizi çalışmaları Rotor-Gene Q cihazı (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. Cihazın kendi otomatik yazılımı sayesinde her bir örneğin Ct değeri ile birlikte bunlara ait standart sapma ve standart hata değerleri belirlenmiştir. Transgenik bitkideki *cryIAc* genini kontrol *efl α* genine göre oransal ifade düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplama yöntemine göre belirlenmiştir. Çizelge 3.10'da qRT- PCR analizinde *cryIAc(RT)* ve *efl-a* genlerine özgü primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.10. qRT- PCR analizinde kullanılan primer baz dizileri, gen bölge uzunlukları ile primerlerin bağlanma sıcaklıkları

Gen bölgesi	Primer baz dizini (5'-3')	Çoğaltılan gen bölgesi uzunluğu (bp)	Primerlerin bağlanma sıcaklığı
<i>cryIAc(RT)</i>	ATCGGTATCAACAACCAGCA AACCTGTGGGAGAATCCTTG	173	60°C
<i>efl-a</i>	TAGCCTTGTGCCAATTTCGG CCTTCAGCATTACCGTCC	110	60°C

3.2.6.3. ELİSA testi ile *cryIAc* protein ekspresyon analizi

Aday transgenik bitkilerde aktarmış olduğumuz *cryIAc* geninin bitki yaprak örneklerindeki protein miktarının belirlenmesi için Envirologix (Cat # AP051) kiti kullanılarak ELİSA testi yapılmıştır. Aday transgenik bitkilerden alınan 20 mg taze yaprak örnekleri sıvı azot ile parçalanarak 1.5 ml'lik tüpler alınmıştır. Örneklerin

üzerine 200 µl ekstraksiyon tamponu ilave edilerek ELİSA kitinde tarif edildiği gibi analiz yapılmıştır.

cryIac'nin protein miktarı mikropłaka okuyucusunda (ELx800-Universal-Microplate-Reader) OD_{450} değerine göre belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6. ELx800-Universal-Microplate-Reader

3.2.7 Glufosinat uygulaması

Serada büyütülen transgenik bitkilerin *bar* geninden kaynaklanan Glufosinat amonyuma dirençliliğini tespit etmek için bitkiler üzerine etken maddesi glufosinat ammonium olan ticari BASTA (glufosinate ammonium 200 g/l) yabancı ot ilacı uygulanmıştır. Herbisitinin uygulanma konsantrasyonu firmanın etikette belirttiği gibi uygulanmıştır.

3.2.8 T₁ nesil transgenik bitkilerin üretilmesi ve moleküler analizleri

T₀ nesil aday transgenik bitkiler sera koşullarında büyütülmüş ve bu bitkilerden yumru hasadı yapılmıştır. Hasat edilen yumruların dormansisini kırmak için yumrular Gibberellik asit (GA₃) çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Transgenik T₀ neslinden hasat edilen patates yumruları ilk önce temizlenerek keskin bıçakla yarı kısmına kadar ikiye bölünmüştür. Daha sonra 10 ppm GA₃ çözeltisinde 30 dakika süreyle daldırılmıştır (Şekil 3.7). GA₃ uygulamasının hemen ardından yumrular karanlık ortamda 48 saat 20 °C'lik sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir (Rappaport ve Wolf., 1969).

Dormansisi kırılan yumrular, 2:1 oranında torf ve perlit karışımı içeren saksılara 3 tekerrürlü olarak dikilmiş ve bunlardan T₁ bitkileri elde edilmiştir (Şekil 3.8). Büyütülen T₁ bitkilerinde *cryIAc* ve *bar* genlerinin varlığını belirlemek için bu bitkilerin yaprak örneklerinden DNA izole edilmiş ve ardından PCR analizleri yapılmıştır. T₁ bitkilerinde ayrıca ELISA ve yaprak biyoanalizleri yapılmıştır.



Şekil 3. 7. T₀ transgenik bitkilerden hasat edilen yumrulara GA₃ uygulaması.



Şekil 3. 8. Seradaki T₁ transgenik bitkilerden genel bir görünüm.

3.2.8.1. T₁ bitkilerinden DNA izolasyonu

T₁ nesilde *cryIAc* ve *bar* genlerinin var olduğunu belirlemek için DNA izolasyonu yapılmıştır. Sera ortamındaki T₁ nesil transgenik bitkilerden taze ve genç yaprak örnekleri alınarak -80°C’de muhafaza edilmiştir. Yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu, ticari NucleoSpin PLANT II REF 740770.250 kiti kullanılarak firmanın önerdiği protokol doğrultusunda yapılmıştır.

3.2.8.2. T₁ bitkilerinde PCR analizi

T₁ nesil transgenik bitkilerinde *cryIAc* ve *bar* genlerinin varlığını belirlemek için PCR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, T₀ transgenik bitkilerinde yapılan PCR analizlerinin aynısı T₁ bitkilerinde uygulanmıştır.

3.2.8.3. T₁ bitkilerinde ELİSA analizi

T₁ transgenik bitkilere aktarmış olduğumuz *cryIAc* geninin bitki yaprak örneklerindeki protein miktarının belirlenmesi için Enviroligix (Cat # AP051) kiti kullanılarak ELİSA testi yapılmıştır. Aday transgenik bitkilerden alınan 20 mg taze yaprak örnekleri sıvı azot ile parçalanarak 1.5 ml’lik tüpler alınmıştır. Örneklerin üzerine 200 µl ekstraksiyon tamponu ilave edilerek ELİSA kitinde tarif edildiği gibi analiz yapılmıştır. *cryIAc*’nin protein miktarı mikropilaka okuyucusunda (ELx800-Universal-Microplate-Reader) OD₄₅₀ değerine göre belirlenmiştir.

3.2.9 T₁ bitkilerinde yaprak biyoanalizi

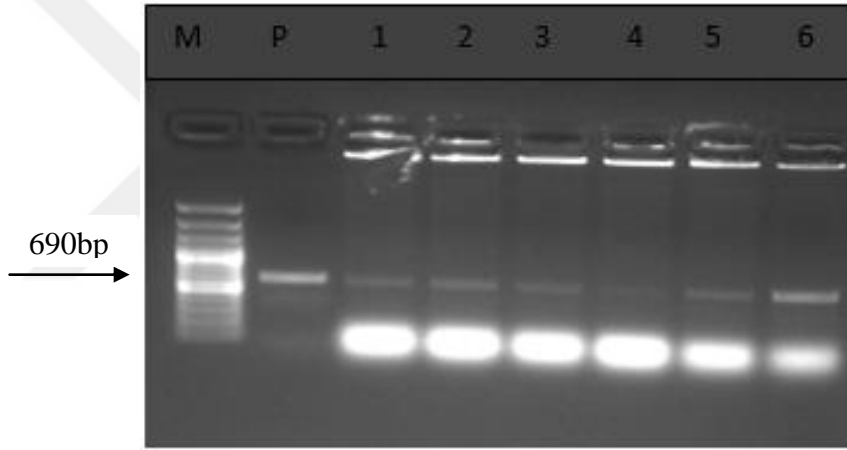
PCR, qRT-PCR ve ELİSA analizleri sonucunda pozitif çıkan transgenik bitkilerin toksin potansiyelini belirlemek için laboratuvarında böcek biyoanalizi yapılmıştır. Bunun için tüm dönem patates böceği (CPB) (*L. decemlineata* Say.) ergin ve larvaları ilk önce tartılarak ağırlığı alınmıştır. Analizden önce ağırlığı belli olan böceklerin analizden sonra tartılmasıyla sonuçlara ulaşılmıştır. Ardından ikinci ve üçüncü dönem patates güvesi (potato tuber moth) larvaları ikiyeşer olarak transgenik yapraklardan beslenmiş olup neticesi belirlenmiştir. Yapılan denemede kontrol amacıyla transgenik olmayan Marabel patates bitkisinin yaprakları da kullanılmıştır.

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Agrobacterium* Hücrelerinin Koloni PCR İle Taranması

Önceden hazırlanmış *A. tumefaciens* EHA105 hatına ait bakteri materyali olan gliserol stok -80°C ' de bekletilerek gerekli olduğunda çoğaltılması için LB besin ortam içerisinde 28°C ' de gece boyunca çoğaltılmıştır. Daha sonra LB besin ortamı üzerinde oluşan bakterilerden tesadüfi 6 adet bakteri seçilerek koloni PCR yapılmıştır (Şekil 4.1). Yapılan PCR sonucunda pozitif koloniler jel üzerinde tespit edilerek transformasyon için kullanılmıştır.



Şekil 4. 1. *Agrobacterium* hücrelerinin koloni PCR sonuçları. M: 100 bp DNA ladder, P: pozitif kontrol, 1- 6: test edilen koloniler.

4.2. *A. tumefaciens* Aracılığıyla Patatese Gen Aktarımı

Marabel patates çeşitlerinin yaprak ve boğumarası explantları gen aktarım işleminde kullanılmıştır. Gen aktarım çalışmasının ardından bitkiler büyüme kabininde seçici besi ortamın'da kültüre alınmış ve bazı explantlarda kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Gen aktarımı gerçekleşmeyen yaprak ve boğumarası eksplantları 3-5 gün içerisinde sararmış, iki hafta sonra ölmüşlerdir. Kültüre aldıktan 4 hafta sonra gen aktarımı gerçekleşen bitkiler yeşil kalluslar oluşturmaya başlamıştır. Kültüre aldıktan 6 hafta sonra gelişen

kalluslar sürgün gelişimi için 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + 1 mg/l GA3 + 1 mg/l PPT + 500 mg/l Sulcid içeren besi ortamına aktarılmıştır. Gen aktarım çalışmaları sonrasında elde edilen transformasyon verimliliği ile ilgili bilgiler Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Transformasyon verimliliği ile ilgili bilgiler

RSM Ortamı	Kallus Besi Ortamı		Sürgün Besi Ortamı		PCR pozitif bitki sayısı (adet)	İki Gen		Promotor	
	BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l+ Trans zeatin 2 mg/l + GA3 0,1 mg/l+ PPT 1 mg/l + Ascorbic acid 0,1 mg/l + 30 g/l sakkaroz + 500mg/l geniş spektrumlu sulcide		BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l + GA3 1 mg/l+ PPT 1 mg/l+ 500 mg/l			<i>cryIAc</i>	<i>bar</i>	AoPRI	35S
Marabel	Eksplant Sayısı	Kallus Oluşumu (%)	Sürgün oluşturan kallu Sayısı (adet)	Toprağa aktarılan bitki sayısı adet					
Yaprak	400	10	3	3	0				
Boğum arası	600	70	7	6	6	6	6	3	3

Bu çalışmada, gen aktarımı yapılan toplan eksplant sayısından elde edilen toplam transgenik bitki sayısına göre yapılan hesaplama sonucunda boğum arası transformasyon etkinliği % 0,6 ve yapraktan ise % 0 olarak belirlenmiştir. Patatese gen aktarımının yapıldığı başka bir çalışmada, burada kullanılan gen aktarma yönteminin aynısı uygulanmış ve sonuç olarak transformasyon etkinliğinin Lady Olympia için % 0,3, Desiree için ise % 0,7 olduğu belirlenmiştir (Sümer 2018). İki farklı tütün bitkisinde yapılan bir gen aktarım çalışmasında kullanılan eksplant sayısına göre hesaplandığında transformasyon oranı Basma için %2,8 ve Nail çeşidi için %0,4 olmuştur (Dinç 2017). *B. thuringiensis* bakterisinden izole edilen Cry δ endotoksin geninin 100’den fazla tütün explantına *A. tumefaciens* aracılığıyla aktarıldığı bir çalışma sonucunda aday transgenik bitkilerin % 25’inin Lepidoptera takımına etki gösterdiği belirlenmiştir (Barton vd., 1987).

Genel olarak, Solanaceae familyasına ait tüm türlerin *in vitro* rejenerasyon kabiliyetleri yüksektir ve bu familyaya ait türlerin *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı hassas olmaları nedeniyle gen aktarım çalışmalarında model bitkiler olarak kullanılmadıkları (Gürel 2001; Özcan vd. 2004). *Agrobacterium* suşları transformasyon işlemlerinde hem enfekte etmesi hem de gen aktarımındaki etkisi bakımından oldukça önemli rolü oynamaktadır (Chetty vd., 2013; Bakhsh vd., 2014). Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi patates eksplantları karşılaştırıldığında, eksplant başına sürgün sayısı bakımından boğum arasından elde edilen sürgünlerin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yaprak eksplantından 3 adet ve boğum arası eksplantından 6 adet olmak üzere toplam 9 adet aday transgenik bitki seraya aktarılmıştır. Yapılan PCR analizi sonucunda 6 adet bitkinin transgenik olduğu belirlenmiştir. Gen aktarımı sonrasında elde edilen kallus ve sürgünlere ait resimler sırasıyla (Şekil 4.2 - 3)’te sunulmuştur. Elde edilen sürgünlerden boğum eksplantları alınarak doku kültürü koşullarında, PPT ve sulcide içeren MS0 besi ortamında aday transgenik bitki çoğaltımı yapılmıştır (Şekil 4.4). Doku kültüründe çoğaltılan tam teşekküllü aday transgenik bitkiler toprağa aktarılmıştır (Şekil 4.5). Toprağa aktarılan bitkiler sık sık kontrol altında tutularak sera koşullarında büyütülmüştür.



Şekil 4. 2. Gen aktarımı sonrasında seçici besi ortamında eksplantlar üzerinde kallus oluşumu



Şekil 4. 3. Seçici besi ortamında kalluslardan sürgün oluşumu



Şekil 4. 4. Dış ortama aktarılmaya hazır aday transgenik bitkiler



Şekil 4. 5. Aday transgenik bitkilerin sera ortamında toprağa alıştırılması

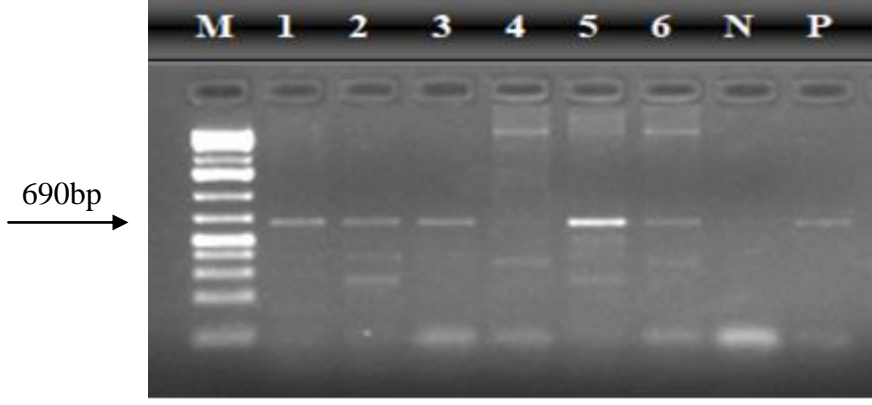
4.3. Aday transgenik bitkilerin moleküler analizleri

Serada yetiştirilen aday transgenik bitkilerde böcek öldürücü *cryIAc* ve herbisit dayanıklılık sağlayan *bar* geninin varlığını doğrulamak amacıyla PCR, qPCR, ELİSA analizleri ve yaprak biyoanalizi yapılmıştır.

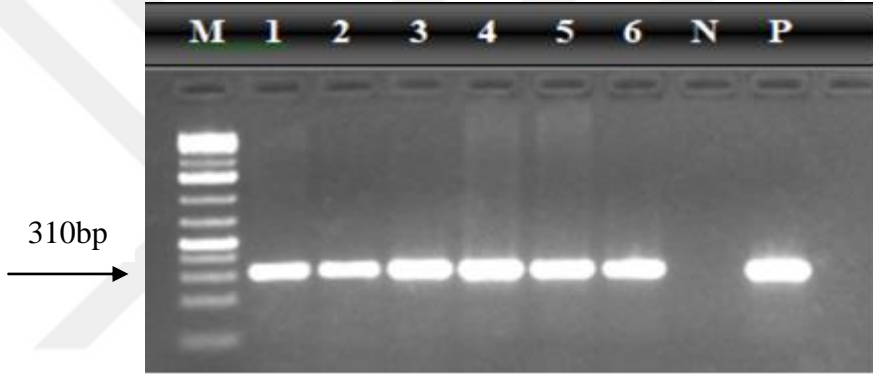
4.3.1 PCR analiz yöntemi ile gen boyutu doğrulaması

Aday transgenik bitkilerden DNA izolasyonu yapılarak elde edilmiş bitki DNA'ları kullanılarak PCR yapılmıştır. Yapılan PCR analizi sonucunda transgenik bitkilerde *cryIAc* ve *bar* genlerinin varlığı ile ilgili primerler kullanılarak sırasıyla 690 bp ve 310 bp uzunluğundaki parçaların çoğaltılmasıyla belirlenmiştir (Şekil 4.6-7). PCR analizi için kullanılan negatif kontrollerde hiçbir bant oluşmadığı net bir şekilde tespit edilmiştir.

Toprağa aktarılan toplam 9 adet aday transgenik bitkiden 6 tanesinde hem *cryIAc* hem de *bar* genleri olduğu belirlenmiştir. Böylece, 4 numaradaki bant çok zayıf olduğu gözlenmiş olup transfer edilmiş yabancı genlerin bitki bünyesine uygun bir biçimde yerleştiği gösterilmiştir.

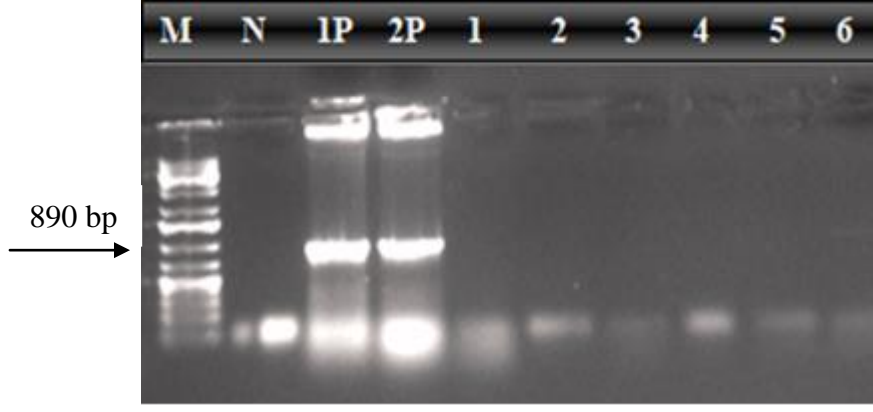


Şekil 4. 6. Aday transgenik patates bitkisinde *cryIAC* geninin çoğaltımı. (M):1 kb plus DNA ladder, (1-6): Marabel aday transgenik bitkiler, (N): Negatif, (P): Pozitif kontrol (Plazmid DNA)



Şekil 4. 7. Aday transgeniklerde *bar* geninin çoğaltımı. (M):1 kb plus DNA ladder, (1-6): Marabel aday transgenik bitkiler, (N): Negatif, (P): Pozitif kontrol (Plazmid DNA)

Agrobacterium'un konak bitkiyi enfekte edebilmesi Chv genleri ile birlikte Vir genlerinin aktive edilmesine dayalıdır. Bakterinin konak hücreye tutunmasından sorumlu gen ChvA genidir (Nester 2015). Bu sebeple, transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu olup olmadığı ChvA genine özgü primerler kullanılarak PCR analizleri ile doğrulanması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'de görünen PCR analiz sonuçlarına göre transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu görülmemiştir.



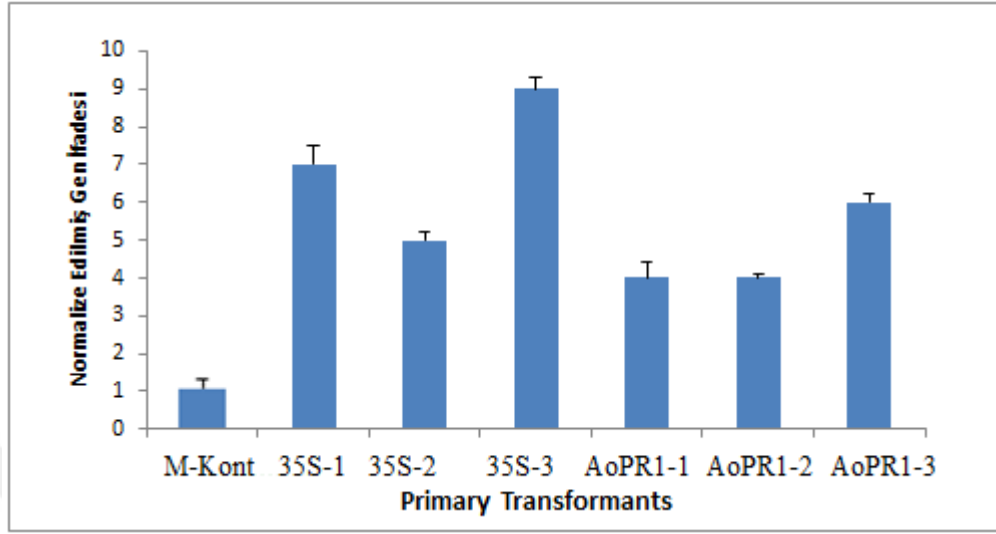
Şekil 4. 8. *A. tumefaciens*'in bitki bünyesine yerleşmediğini belirlemek için ChvA geni PCR sonuçları (M):1 kb plus DNA ladder, (N): Negatif kontrol, (1P-2P): Pozitif kontrol, (1-6): Transgenik bitkiler

PCR analizi sonuçlarına göre, *cryIAc* ve *bar* genleri patates bitkisine başarıyla aktarılmıştır. Transgenik bitkiler iki farklı promotor (35S ve AoPR1) tarafından yönetilmektedir. PCR sonuçlarına göre pozitif 6 adet transgenik bitkinin 3 adedi AoPR1 ve 3 adedi ise 35S promötörüne bağlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada eksplant başına transformasyon oranı %0,6 olarak belirlenmiştir. Transformasyon oranı her ne kadar düşük olsa bile hedef sonuca ulaşmamızı sağlayarak, seçici besisi ortamında kullanılan PPT'nin bitkilerin rejenerasyonu için iyi bir seleksiyon sistemi olduğu belirlenmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda bitkilerin gen transformasyonunda, seleksiyon ortamından transgenik olmayan bitkilerin kaçtığına dair sonuçlar rapor edilmiştir (McCormick vd., 1986; Maqbool vd., 2010; Khan vd., 2011; Bakhsh vd., 2015b).

4.3.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR)

Gen ifadelerini belirlemek amacıyla qRT-PCR günümüzde en hassas ve standart bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır (Maqbool vd 2010; Rao vd 2011; Anayol vd., 2016). qRT-PCR analizi *cryIAc* geninin ifade düzeyini belirlemek için yapılmıştır. Oransal gen ifadesi Şekil 4.9. da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *cryIAc* geninin transgenik patates hatlarında işlevsel var olduğu ve transgenik bitkilerin gen ifade düzeyinin çok yüksek olduğu kontrol bitkiye kıyaslanarak tespit edilmiştir. qRT-PCR analizine göre gen ifadeleri transgenik bitkilerde farklı olarak gözlenmiştir. Aktarılan genlerin bitki genomunda yerleştiği yere, nükleotid sekansı değişikliğine, aktarılan

genin kopya sayısına bağılı olarak gen ifade seviyesi değişebilmektedir (Hobbs vd., 1993; Guo vd., 2001; Rao, 2005).

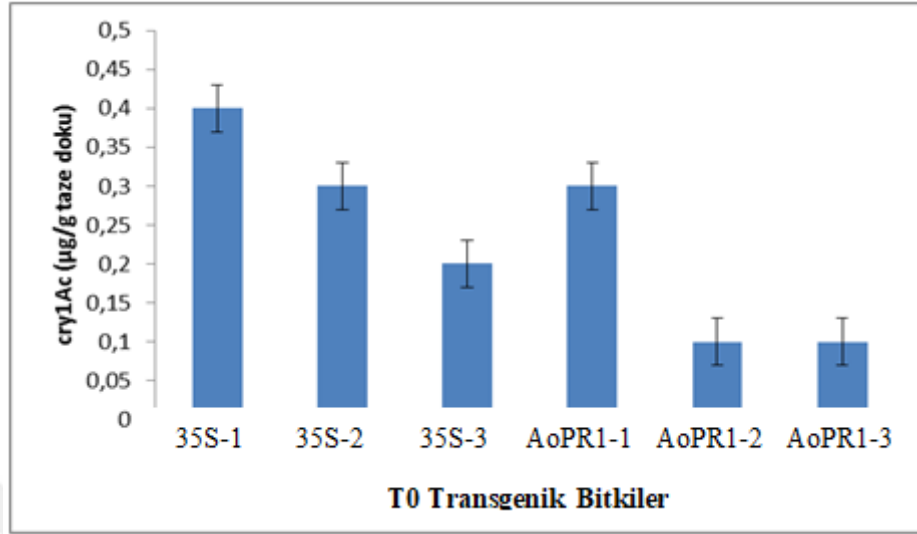


Şekil 4. 9. qRT-PCR analizi ile *cryIAC* geninin transgenik bitkilerde oransal ifadesi. Verilerin normalizasyonun için *ef1 α* geni kullanılmıştır.

4.3.3 ELISA testi ile *cry1Ac* protein ekspresyon analizi

Transgenik patates bitkilerinde *cryIAC* geninin protein miktarının belirlenmesi için bitkilerden yaprak diskleri alınmış, ardından örnekler sıvı azotla paçalanmıştır. Bu analizde transgenik bitkilerin *cry1Ac* proteinini üretip üretmediklerinin belirlemek için Envirologix kit for Cry1AB/Cry1Ac (Kit lot: AP051) (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) protokol yöntemi kullanılmıştır. PCR sonucunda pozitif çıkmış toplam 6 adet aday transgenik bitkilerin ELISA analizi yapılmıştır. Bitkilere göre farklı düzeyde *cry1Ac* protein ifadesi belirlenmiştir (Şekil 4.10). Böylece, aktarılan *cryIAC* geninin transgenik bitkilerde protein seviyesinde ifade edildiği doğrulanmıştır. Transgenik patates bitkilerinde yapılmış olan ELISA testi sonucunda, *cry1Ac* protein ifadesinin en yüksek 35S-1 transgenik hattında ve en düşük ise AoPRI-1 transgenik hattında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). *cry1Ac* protein ifadesinin transgenik bitki hatları arasındaki farklılık bilim insanları tarafından farklı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Karanthi vd. 2005, Xia vd. 2005, Olsen vd. 2005, Bakhsh vd. 2009b ve Adamczyk vd. 2009). Protein ifadesindeki bu seviye farklılığının önemli faktörleri ise genin nükleotid sekansı, promoter ve genin DNA'da girdiği bölge, transgen kopya sayısı, bulunduğu hücrenin etrafı ve çevresi olabilir (Hobbs vd., 1993; Guo vd., 2001; Rao, 2005). Ayrıca farklı

promötörlerin kullanılmış olmasında cry proteinlerinin ifade seviyesinde farklılıklara neden olabilir.



Şekil 4. 10. ELİSA testi ile *cry1Ac* ekspresyonu. 35S-1 ve AoPRI-1: bitkiler

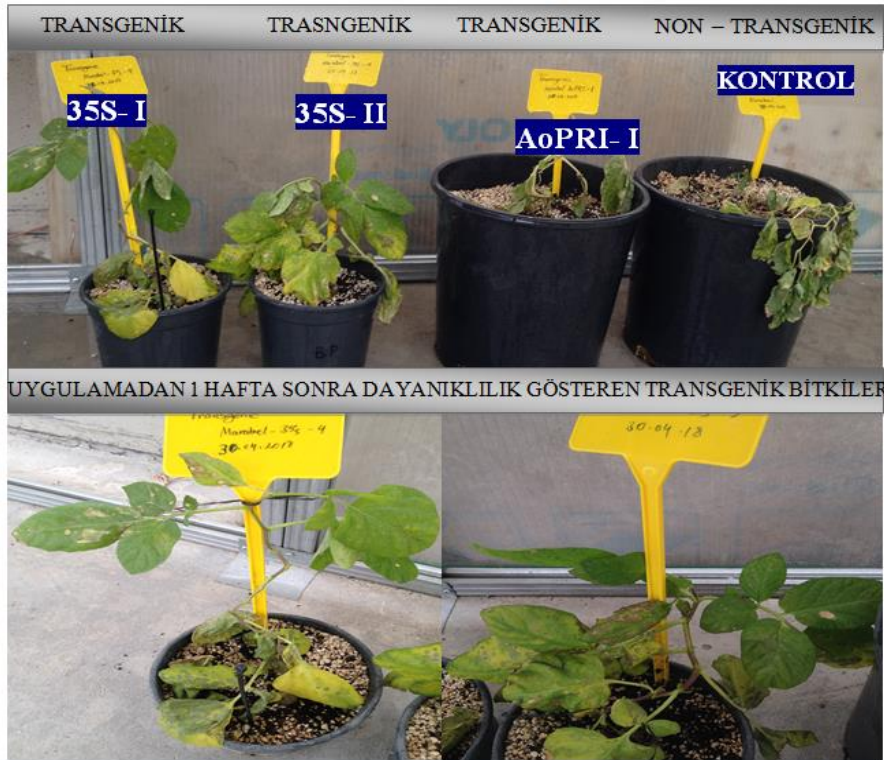
Önceki bilimsel çalışmalarda *cry1Ac* geni tütün bitkisine aktarılmış ve ELİSA sonucuna göre *cry1Ac* protein oranı 0,01 ve %0,18 arasında değişmiştir (Christov vd. 1999; Yun vd. 2008). Başka bir çalışma sonucunda, iki farklı tütün bitkisine *cry1Ac*, *cry2A* genleri aktarılmış ve yapılan ELISA sonucunda cry protein miktarının 0,017 ve 0.607 µg/g taze doku arasında sentezlediği belirlenmiştir (Bakhsh vd. 2018).

4.3.4. Glufosinat uygulaması

Sera ortamındaki transgenik bitkilerde (Şekil 4.11) *bar* geninin Glufosinat amonyuma dirençliliğini belirlemek için bitkilerin her birine glufosinat etken maddeli herbisit uygulanmıştır (Şekil 4.12). Glufosinat uygulaması için 200 g/l glufosinat amonyum etken maddesi içeren ticari [®]BASTA yabancı ot ilacı kullanılmıştır. Kullanılan herbisit konsantrasyonu firmanın etikette belirttiği gibi uygulanmıştır.



Şekil 4. 11. Sera ortamındaki aday transgenik bitkilerin herbisit uygulamasından önceki görünümü



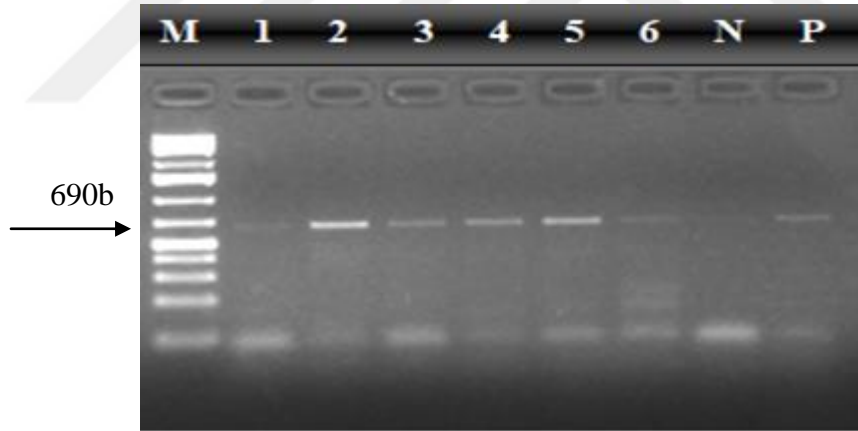
Şekil 4. 12. *bar* geninin aktarıldığı transgenik patates bitkilerinin herbisit uygulamasından sonraki durumu. Transgenik bitkiler üzerinde gerçekleşen herbisit uygulaması sonucunda bitkilerin glufosinat ammonium herbisitine karşı dayanıklı olduğu 3-5 gün içinde belirlenmiş ve kontrol bitkiler ise bu süre içerisinde kuruyarak ölmüştür

4.4. T₁ Nesil transgenik bitkilerin moleküler analizleri

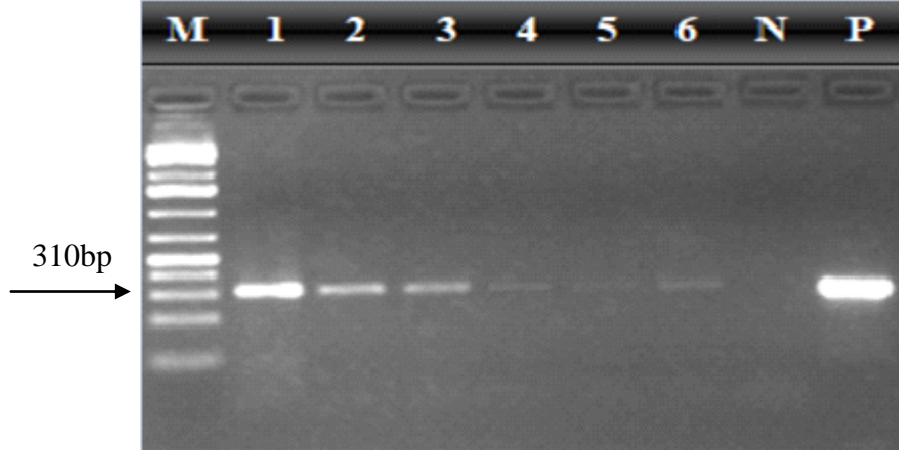
T₀ nesil transgenik bitkilerden yumru hasadı yapılarak GA₃ içerisinde 30 dk bekletilmiş ve yumruların dormansisi kırılmıştır. Dormansisi kırılan mini yumrular sera koşullarında toprağa dikilmiş ve bunlardan T₁ nesil transgenik patates bitkileri elde edilmiştir. T₁ nesilde *cryIAc* ve *bar* genlerinin bir sonraki nesilde yerleşip yerleşmediği belirlenmesi için DNA izolasyonu yapılarak ardından PCR, ELISA ve yaprak biyoanalizi yapılmıştır.

4.4.1. PCR analizi

T₁ nesil transgenik bitkilerde *cryIAc* ve *bar* genlerinin varlığını belirlemek amacıyla PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.13-14). PCR analiz sonuçlarına göre, toplam 6 adet T₁ nesil transgenik bitkinin 6 tanesinde hem *cryIAc* hem de *bar* genine ait bant tespit edilmiştir.



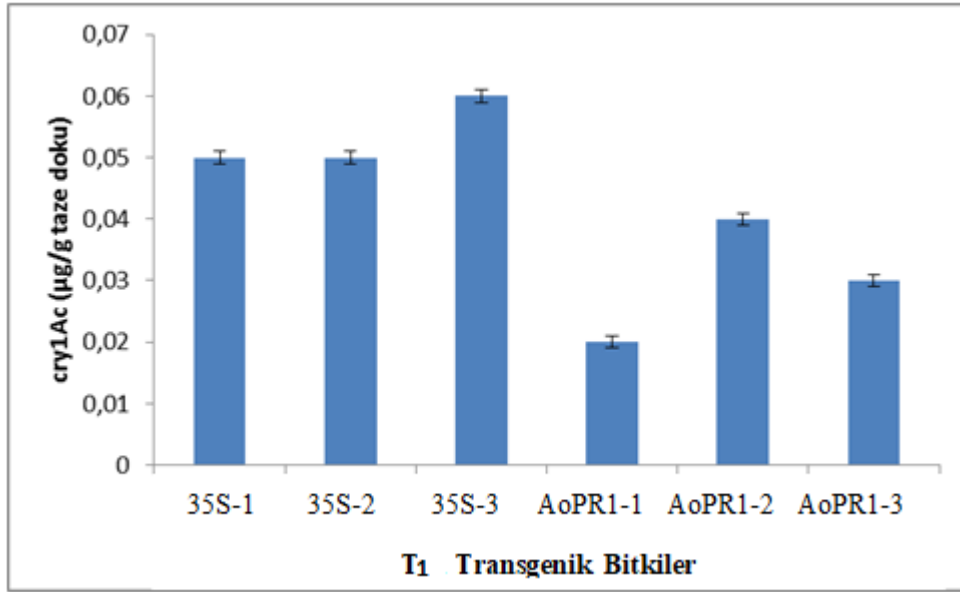
Şekil 4. 13. T₁ nesil transgenik bitkilerde *cryIAc* geni için yapılan PCR analizi. (M):1 kb plus DNA markörü (ThermoScientific), (1-3): Marabel 35S promotör hattının T₁ transgenik bitkileri, (4-6): Marabel AoPR1 promotör hattının T₁ transgenik bitkileri, (N): Negatif kontrol, (P): Pozitif kontrol.



Şekil 4. 14. T₁ nesil transgenik bitkilerde *bar* geni için yapılan PCR analizi. (M):1 kb plus DNA markörü (ThermoSceintific), (1-3): Marabel 35S promotör hattının T₁ transgenik bitkileri, (4-6): Marabel AoPR1 promotör hattının T₁ transgenik bitkileri, (N): Negatif kontrol, (P): Pozitif kontrol.

4.4.2. ELISA ile protein ölçümü

T₀ bitkilerinde yapılan ELİSA analizinin aynısı T₁ nesil için tekrardan yapılarak aday transgenik patates bitkilerinde *cry1Ac* geninin protein ekspresyonu bir sonraki nesil de başarılı bir şekilde protein üretip üretmediğini belirlenmesi için bitkilerden yaprak diskleri alınmış, ardından örnekler sıvı azotla paçalanmıştır. Bu analizde Envirologix kit for Cry1AB/Cry1Ac (Kit lot: AP051) (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) protokol yöntemi kullanılmıştır. Aday transgenik T₁ nesil bitkilerin ELİSA analizi T₀ nesil bitkilere göre çok az düzeyde *cry1Ac* protein ifade farklılığı gözlenmiştir. Yapılan T₁ nesil aday transgenik bitkilerin ELİSA sonucunda Cry1Ac protein ifadesinin en yüksek 35S1 transgenik hatt olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. T₁ transgenik bitkilerinde cry1Ac protein ifade seviyeleri.

4.5. T₁ nesil transgenik patates bitkilerinde yaprak biyoanalizi

Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda, *cryIAc* geninin Coleoptera ve Lepidoptera böcek takımları üzerinde öldürücü etkisi olduğu belirlenmiştir (Barton vd. 1987; Valderrama 2017; Christov vd. 1999; Yücer 2012; Zhou 2016). Bu çalışma kapsamında, patatese aktarılan *cryIAc* geninin Coleoptera takımına bağlı patates böceğine ve Lepidoptera takımına bağlı patates güvesi üzerine etkisini incelemek amacıyla yaprak biyoanalizleri gerçekleştirilmiştir.

4.5.1. *cryIAc* transgenik patates bitkilerinin Coleoptera takımı patates böceğine etkileri

Bu tez çalışmasında aday transgenik patates bitkilerinde böcek öldürücü Bt toksit etki potansiyelini belirlemek için Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojiler Fakültesi Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü entomoloji laboratuvarında yaprak biyoanalizi yapılmıştır. Bu bölümde yaprak biyoanalizleri T₁ nesil transgenik bitkiler üzerinde gerçekleştirilmiştir. T₁ transgenik bitkilerin hedef böceklerle karşı dayanıklılığını testpit etmek için tüm dönem patates böceği (*L. decemlineata* Say.) larvaları ve erginleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Böcekler ilk

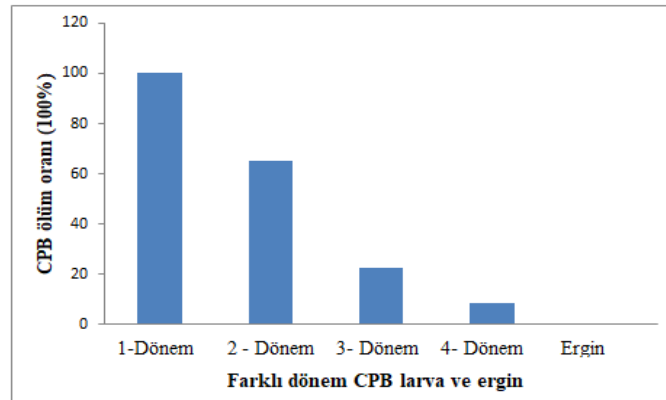
nce tartılarak ağırlığı alınmıştır. Analizden önce ağırlığı belli olan böceklerin analizden sonra da tartılmasıyla sonuçlara ulaşılmıştır. T₁ transgenik bitkilerin yaprakları ile beslenen farklı gelişim dönemlerindeki böceklerde ölümler gözlenmiştir (şekil 4.16). Çalışmada sonuçların doğrulanması amacıyla kontrol Marabel eşidi üzerinde de analiz gerçekleştirilmiş ve kontrol bitkiler üzerinde beslenen larvaların hepsinin hayatta kaldığı gözlenmiştir.





Şekil 4. 16. *cryIAc* T₁ transgenik patates bitkilerinde patates böceği kullanılarak yapılan yaprak biyoanalizinden genel görünüm

Yaprak biyoanaliz sonuçlarına göre, bitki yapraklarıyla beslenmeye başlamasından 24 saat ile 72 saat arasında birinci dönem larvaların ölüm oranı %100, ikinci dönem larvaların ölüm oranı % 65, üçüncü dönem larvaların ölüm oranı %22,5, dördüncü dönem larvalarında ise % 8,3 ölüm oranı gözlenmiştir (Şekil 4.17 ve Çizelge 4.2). Buna karşın, transgenik patatesle beslenen ergin patates böceklerinde 72 saate kadar ölüm meydana gelmemiştir. Fakat ergin böceklerin transgenik bitki yapraklarını az yediği ve 24 saat sonra hareketsiz kaldıkları gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, önceki yapılan çalışmalarda (Bakhsh, 2010; Khan vd., 2011; Mogali vd., 2011; Hussain vd., 2014), olduğu gibi transgenik bitkilerde T-DNA pozisyon etkisi ve kopya sayısına bağlı olarak (Özcan vd., 2004) böcek ölümlerinde önemli bir varyasyon yaşanmıştır. Bundan önceki çalışmalarda birçok farklı bitkiye cry genleri aktarılması sonucunda böceklere dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bugün dünya üzerinde ticari olarak cry genlerini içeren soya, mısır, pamuk ve diğer bitkiler geliştirilmiş olup 88,7 milyon hektar alanda ekilmektedir. Bu çalışmada *cryIAc* geninin patates bitkisine aktarılmasıyla, transgenik patates hatlarının Coleoptera takımına ait olan patates böceğine karşı etki gösterdiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada aynı *cryIAc* genini patates bitkisi Marfona ve Granola çeşitlerine Adana Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesin’de gerçekleştirilmesiyle Coleoptera takımı üzeri patates böceği üzerinde % 85 oranda ölümü gözlenmiştir (Yücer 2012). Benzer şekilde, çeltik bitkisine aktarılan *CryIAc/CryIAb* genlerinin Coleoptera takımına ait *Micraspis discolor* üzerinde etki gösterdiği belirlenmiştir (Zhou 2016).



Şekil 4. 17. Patates böceği larvalarının farklı instarlara göre ölüm oranları

Çizelge 4.2. Patates böceği yaprak biyoanalizi tüm dönem larva ve Ergin üzerindeki ölüm oranları

Bitkiler	Birinci Dönem Patates Böceği			İkinci Dönem Patates Böceği			Üçüncü Dönem Patates Böceği		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	0.00b	0.00b	0.00b	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b
1-35S	100.00a	100.00a	100.00a	40.00ab	40.00ab	50.00b	40.00a	65.00a	65.00a
2-35S	100.00a	100.00a	100.00a	20.00bc	60.00a	80.00ab	0.00b	20.00b	20.00b
3-35S	100.00a	100.00a	100.00a	60.00a	60.00a	100.0a	0.00b	20.00b	20.00b
1-APR01	100.00a	100.00a	100.00a	10.00bc	10.00bc	50.00b	0.00b	10.00b	10.00b
2-APR01	100.00a	100.00a	100.00a	0.00c	20.00bc	50.00b	0.00b	10.00b	10.00b
3-APR01	100.00a	100.00a	100.00a	20.00ab	30.00abc	60.00b	0.00b	10.00b	10.00b
Bitkiler	Dördüncü Dönem Patates Böceği			Ergin Patates böceği					
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat			
Kontrol	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b			
1-35S	20.00a	20.00a	20.00a	0.00b	0.00b	0.00b			
2-35S	10.00ab	10.00ab	10.00ab	0.00b	0.00b	0.00b			
3-35S	10.00ab	10.00ab	10.00ab	0.00b	0.00b	0.00b			
1-APR01	10.00ab	10.00ab	10.00ab	0.00b	0.00b	0.00b			
2-APR01	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b			
3-APR01	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b			

4.5.2. *cryIAc* transgenik patates bitkilerinin Lepidoptera takımı Patates Güvesi üzerine etkileri

T₁ nesil transgenik bitkileri üzerinde patates güvesi kullanılarak yaprak biyoanaliz denemesi yapılmıştır. Denemede her transgenik patates üzerinde iki adet üçüncü dönem patates güvesi larvaları kullanılmıştır. Yapılan biyoanaliz sonucu patates güvesi larvaları üzerinde %75 oranında ölüm meydana gelirken, kontrol bitkiler üzerinde hiçbir ölüm meydana gelmemiştir (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.3). Daha önce yapılan bir çalışmada, *B. thuringiensis* bakterisinden izole edilen Cry δ endotoksin geni tütün bitkisine *A. tumefaciens* aracılığıyla aktarılmış ve bu transgenik tütün bitkileriyle beslenen Lepidoptera takımına bağlı olan *M. sexta* larvalarının 4 gün içerisinde %100 oranında öldüğü rapor edilmiştir (Barton vd. 1987). Lepidoptera takımı için yapılan başka bir çalışmada, *cryIAc* geninin patates bitkisine aktarılması sonucunda patates güvesine karşı % 83,7- %100 oranda etki gösterdiği belirlenmiştir (Valderrama 2017). Valderrama (2017)'nin patates güvesinin ölüm oranı değerleri ile bu çalışmadan elde edilen sonuç bir birine yakın olmuştur. Tütün bitkisine *cryIAc* geninin aktarıldığı başka bir çalışmada, transgenik tütün bitkileri ile beslenen Lepidopteralarda %80-100 oranında ölüm gözlenmiştir Christov vd. (1999).



Şekil 4. 18. Patates güvesi üçüncü dönem larvaları üzerinde yapılan yaprak biyoanalizi

Çizelge 4.3. Patates güvesi üçüncü dönem larvalarının ölüm oranları

Bitkiler	Üçüncü Dönem Patates Güvesi		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	0.00b	0.00b	0.00b
1-35S	0.00b	50.00b	100.00a
2-35S	0.00b	50.00b	100.00a
3-35S	0.00b	100.00a	100.00a
1-APR01	0.00b	0.00b	50.00b
2-APR01	0.00b	0.00b	50.00b
3-APR01	0.00b	0.00b	50.00b

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Patates, beslenme ve Türkiye ekonomisi için stratejik bir role sahip bir gıda hammadesidir. Bunun yanında, patates tarımında çeşitli sorunlar bulunmakta ve bunlardan birisi de patates üretiminde önemli kayıplara neden olan böcek zararlıları ve yabancı otlardır. Patates bitkisi hayat döngüsünün her aşamasında ve depolarda çeşitli böcek türlerinin saldırısına uğramakta ve zarar görmektedir. Bu böceklere karşı ilaç kullanılmasına rağmen tarımı yapılan patateste yüksek kayıplar olduğu tahmin edilmektedir. Yabancı otlarla kimyasal mücadelede uygulanan bazı herbisitler patatesin büyüme gelişmesi geriletmekte ve hatta patates bitkilerinin ölümüne dahi neden olabilmektedir.

Bu tez çalışmasında Marabel patates çeşidi kullanarak zararlı böceklere ve herbisitlere karşı dayanıklı yeni patates hatlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda:

- Kullanılan eksplant sayısına göre gen aktarım etkinliği % 0,6 olarak gerçekleşerek, *cryIAc* ve *bar* genlerini barındıran toplam 6 adet transgenik bitki elde edilmiştir. Bunların 3 tanesi 35S promotörü taşıyan ve diğer 3 tanesi ise AoPR1 promotörünü barındıran transgenik bitkilerdir.
- Transgenik T₀ nesil bitkilerde *cryIAc* geninin mRNA ve protein seviyelerinde ifade edildiği sırasıyla qRT-PCR analizi ve ELISA ile doğrulanmıştır. Kontrol ve T₀ nesil transgenik bitkilere Glufosinat-amaonyum etken maddeli ticari bir herbisit uygulanmış ve sonuç itibarıyla transgenik bitkiler kullanılan herbisite dayanıklılık gösterirken, transgenik olmayan kontrol bitkileri 3-5 gün içinde ölmüştür.
- T₀ nesil transgenik bitkilerin yumrularından büyütülen T₁ nesil transgenik patates bitkilerinde *cryIAc* ve *bar* genlerinin varlığı PCR analizi ile doğrulanmıştır. Ayrıca, T₁ transgenik bitkilerin *cryIAc* proteinini sentezlediği ELISA ile ispatlanmıştır.
- T₁ nesil transgenik bitkiler ile beslenen farklı dönemdeki patates böceği larvalarının 72 saat içinde öldüğü gözlenmiştir. Patates böceği ölüm oranları larvanın gelişim dönemine göre farklılık göstermiştir. Bu transgenik bitki ile

beslenen ergin patates böceklerinin 72 saat içerisinde ölmediği, fakat hareketlerinin yavaşladığı veya uzun süre hareketsiz kaldığı belirlenmiştir.

- T₁ nesil transgenik bitkiler ile beslenen üçüncü dönem patates güvesi larvalarının %75'i 72 saat içinde öldüğü gözlenmiştir
- *cryIAc* genini taşıyan transgenik patates hatlarının hem Lepidoptera ve hem de Coleoptera takımına etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitkilerin Coleoptera takımına ait patates böceğine olan etkisinin, Lepidoptera takımına bağlı patates güvesine etkisinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Böceklere ve herbisitlere dirençli olarak geliştirilen bu transgenik patates hatları ile gelecekte patates ıslah programında yeni çalışmalar yürütülecektir. Burada geliştirilen transgenik hatların zararlı böceklerle mücadelede tarımsal üretim girdilerini önemli düzeyde azaltma ve yabancı otlarla mücadeleyi kolaylaştırma potansiyeli bulunmaktadır. Sonuç olarak, verimin artması ve ekonomik gelirin yükselmesi şeklinde patates üreticilerine avantajlar sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

Adamczyk, J.J., Perera, J.O. and Meredith, W.R., “Production of mRNA from the *CryIAc* transgene differs among Bollgard lines which correlate to the level of subsequent protein”, *Transgenic Res.* 18, 143-149, 2009.

Altman, D.W., Benedict, J.H. and Sach, E.S., “Transgenic plants for the development of durable insect resistance, a case study for cotton and *Bacillus thuringiensis*”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 792, 106-114, 1996.

Andrews, R.W., Fausr, R., Wabiko, M.H., Roymond, K.C. and Bulla, L.A., “Biotechnology of *Bt*: A critical review”, *Bio/Tech.* 6, 163-232, 1987.

Arnoğlu, H., “Nişasta ve şeker Bitkileri Ders Kitabı”, *Genel Yayın No:188, Ders Kitapları* Yayın No:A-57. Adana, 234 s, 2002.

Aronson, A.I., Beckman, W. and Dunn, P., “*Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens”, *Microbiol Rev.* 50 (1), 1–24, 1986.

Arnold, R.N., Murrary, M.W., Gregory, E.J., Smeal, D., “Weed Control in Field Potatoes Agricultural Experiment Station”, *Research Report 723 College of Agriculture and Home Economics* 6, 1997.

Arnoğlu, H.H., “Nişasta ve Seker Bitkileri”, Ders Kitabı. Genel Yayın Mo 188, *Ders Kitapları* Yayın No. A-57. Adana, 234, 2002.

Arı, ř., “Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri”, *Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları* (Ed. S. Özcan, E. Gürel ve M. Babaoğlu)”, 160-189, 2001.

Avcı, M.Ç., Çukurova Bölgesi Buğday Ekim Alanlarında Sorun Olan phalaris brachystchys Link (Kanlı Çayır)'in Bazı Buğday Herbisitlerine Karşı Oluşturduğu Dayanıklılık Sorunlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 2009.

Bakhsh, A., Rao, A.Q., Shahid, A.A., Husnain, T. and Riazuddin, S., “Insect Resistance and Risk Assessment Studies in Advance Lines of Bt Cotton Harboring Cry1Ac and Cry2A Genes”, **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences** 6, 01-11, 2009a.

Bakhsh, A., Rao, A. Q., Shahid, A. A., Husnain, T and Riazuddin, S. “CaMV35S is a Developmental Promoter Being Temporal and Spatial in Expression Pattern of Insecticidal Genes (*Cry1Ac* & *Cry2A*) in Cotton”, **Research Journal of Cell and Molecular Biology** 4(1), 37-44, 2009b.

Bakhsh, A., Expression of two insecticidal genes in Cotton, PhD Thesis, **University of the Punjab**, Pakistan, s. 112-113, 2010.

Bakhsh, A., Emine, A., and Sancar, F., “Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L.”, **J. Food Agric.** 26, 259–264, 2014.

Bakhsh, A., Khabbazi, S.D., Baloch, F. S., Demirel, U., Çalışkan, M.E., Hatipoğlu, R., Özcan, S. and Özkan, H., “Insect-resistant transgenic crops: retrospect and challenges”, **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 39, 1408-69, 2015a.

Bakhsh, A., Anayol, E. and Özcan, S., “Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L.”, **Emirates Journal of Food and Agriculture** 26, 259–264, 2015b.

Banaras, M., “Impact of Weed Competition on Poststo Production”, **Pakistan Journal of Agricultural Research** 14(1), 64-71, 1993.

Barton, K.A., Whiteley, H.R. and Yang, N.S., “*Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects”, *Plant Physiol* 85, 1103-1109, 1987.

Berliner, E. “Über Die Schlaftsucht Der Nehl Mottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell) unihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n.sp”, *Zeitschrift fur angewandtes Entomol* 21, 29-56. 1911.

Bilgili, A., Kadioğlu İ., “Tokat ili ve çevresinde Patates tarlalarında ortaya çıkan yabancı ot türlerinin yoğunlukları, dağılımları ve yöredeki yabancı ot florasının belirlenmesi”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 20(2),17-24,2003.

Bostan, H., Demirci E., “Patates X ve Y virüslerinin bazı patates çeşitlerinde neden olduğu simptomlar”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 31(1), 1-4,2001.

Bravo, A., Gill, S.S. and Soberon, M., “Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxin and their potential for insect control”, *Toxicon* 49, 423-435, 2007.

Brunt, A.A., “The main viruses infecting potato crops”, In: Loebenstein, G., P.H. Berger, A.A. Brunt, and R.H. Lawson (eds), *Virus and Viruslike Diseases of Potatoes and Production of Seed-potatoes. Kluwer Academic Publishers* Dordrecht 65-67, 2001

Burlingame, B., Mouille, B., Charrondiere, R., “Nutrients, Bioactive Non-Nutrients and Anti-Nutrients in Potatoes”, *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 494–502, 2009

Canming, T., Jing, S., Xiefi, Z., Wangzhen, G., Tianzhen, Z., Jinlian, S., Congfen, G., Weijun, Z., Zhiian, C. and Sandui, G., “Inheritance of resistance to *Helicoverpa armigera* of 3 kinds of transgenic *Bt* strains available in upland cotton in china”, *Chinese Science Bulletin* 45(90), 363-367, 2000.

Chetty, V.J., Ceballos, N., Garcia, D., Narvaez-Vasquez, J., Lopez, W. and Orozco-Cardenas, M.L., “Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom.”, ***Plant Cell Rep*** 32, 239–247, 2013.

Chilton, M.D., Drummond, M. H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M. P. and Nester, E.W., “Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis”, ***Cell*** 11(2), 263–271, 1977.

Chilton, M.D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P. and Qetier, F., “T-DNA from *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells”, ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** 77, 4060-4064, 1980.

Cohen, B.M., Gould, F. and Bentur, J.C. “*Bt* rice: practical steps to sustainable use”, ***International Rice Research Notes*** 2, 4-10, 2000.

Cotterman, J.C., Saari, L.L., “Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) Biotype SR4/84”, ***Pesticide Biochemistry and Physiology*** 43, 182-192, 1992.

Christie R.D., Sumalde A.C., Schutz J.T. and Gudmestad N.C., “Insect transmission of the bacterial ring rot pathogen”, ***Am. Potato Journal***, 68: 363-372, 1991

Çalışkan, M.E., Karaat, E.F., Çelen, H., “Türkiye ve bazı ülkelerin tohumluk patates üretim ve sertifikasyon sistemlerinin karşılaştırılması ” ***Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi*** 14-17 Haziran 2011, s. 37-47, Samsun, 2011.

Daud, M.K., Variath, M.T., Ali, S., Jamil, M., Khan, M.T., Shafi, M. and Shuijin, Z., “Genetic transformation of *bar* gene and its inheritance and segregation behavior in the resultant transgenic cotton germplasm (br001)”, ***Pak. J. Bot.*** 41(5), 2167-2178, 2009.

De Maagd, R.A., Bosch, D. and Stiekema, W., “Bacillus thuringiensis toxin mediated insect resistance in plants”, *Trends Plant Sci.* 4, 9-13, 1999.

De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N., “How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world”, *Trend in genetics* 17(4), 193-199, 2001.

Dhaliwal, H.S., Kawai, M. abd Uchimiya, H., “Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants”, *Plant Biotechnol* 15, 1-10, 1998.

Dounglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A. and Nester, E.W., “Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence rigion”, *J. Bacteriol* 161, 850-860, 1985.

Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-El-Saad, M., Xu, D. and Wu, R., “Transgenic rice plants harbouring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant”, *Nature Biotechnol* 14, 494-498, 1996.

Doğan, M.N., Boz, Ö., Albay, F., “Tarım Alanlarında Sorun Olan Yabancı Otların Kimyasal Mücadelesinde Azaltılmış Herbisit Dozlarının Etkinliğinin Araştırılması” *TÜBİTAK*, Proje No:2688, 2004.

Ecevit, O. ve Tuncer, C., “Gen Transferi İle Böceklere Karşı Dayanımlı Bitki Elde Etme Çalışmaları”, *Türkiye Entomoloji Dergisi* 15(2), 117-127, 1991.

Er, C., Başalma, D., Ekiz, H. Ve Sancak, C., Tarla Bitkileri II, *T.C. Anadolu Üniversitesi Yayın*, Eskişehir, 2011.

Estela, A., Escriche, B. and Ferre, J., “Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)”, *Appl Environ Microbiol* 70, 1378–1384, 2004.

FAO., “Agriculture Statistics”, Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics Division, <http://faostat.fao.org/>, 25 Temmuz 2018.

Fearing, P.L., Brown, D., Vlachos, D., Vlachos D., Meghji, M. and Privalle, L., “Quantitative analysis of *CryIA(b)* protein expression in Bt maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations”, *Mol Breed* 3, 169-176, 1997.

Figueira E, Figueiredo L, MonteNeshich D., “Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance”, *Plant Cell Reports* 13, 666-70, 1994

Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woos C., “Expression of bacterial genes in plant cells”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 4803-4807, 1983

Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. and Boulter, D., “Potential of plantderived genes in the genetic manipulation of the crops for insect resistance”, *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection* 3, 155–181, 1992.

Gatehouse, A.M.R., Ferry, N., Edwards, M.G. and Bell, H.A, “Insect resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods”, *Philos T Roy Soc B* 366, 1438–1452, 2011.

Geçit, H.H., Çiftçi, C.Y., Emeklier, H.Y., İkincikarakaya, S., Adak, M.S., Kolsarıcı, Ö., Ekiz, H., Altınok, S., Sancak, C., Sevimay, C.S. ve Kendir, H., Tarla Bitkileri, *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 2009.

Gelvin, S.B., “*Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration”, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 223-256, 2000.

Güncan, A., “Yabancı Ot Mücadelesi. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi”, **Konya ISBN: 975-448-178-4**, 2006.

Gürel, E., “Insertion of an antimicrobial gene into Agrobacterium and its further use in transforming tobacco”, **Tr. J. Bot.** 25, 169-175, 2001.

Gulbitti-Onarici, S., Zaidi, M.A., Taga, İ., Özcan, S. ve Altosaar, İ., “Expression of Cry1Ac in Transgenic Tobacco Plants Under the Control of a Wound-Inducible Promoter (AoPR1) Isolated from Asparagus officinalis to Control Heliothis virescens and Manduca sexta”, **Mol Biotechnol** 42, 341–349, 2009.

Guo, W.Z., Sun, J., Guo, Y.F. and Zhang, T.Z., “Investigation of different dosage of inserted Bt genes and their insect-resistance in transgenic Bt cotton”, **Acta Genet. Sin.**, 28, 668-676, 2001.

Güncan, A., “Yabancı Otlar ve Mücadele Prensipleri.”, **Selçuk Üniversitesi, Konya** 238, 2002.

Ghosh, R.K., “Integrated weed management in paddy-potato irrigated crop sequence in the gangetic alluvial plains of West Bengal”, **Journal of the Andoman Science Association**, 14, 22-32, 1998.

Green, J.M., “The benefits of herbicide-resistant crops”, **Pest Management Science** 68, 1323-1331, 2012.

Hashmi, J. A., Zafar, Y., Arshad, M., Mansoor, S. and Asad, S. “Engineering cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for resistance to cotton leaf curl disease using viral truncated AC1 DNA sequences”, **Virus Genes** 42, 286–296, 2011.

Herrnstadt, G., Soares, R.W., Edward, L. and Edwards, D. “A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects”, **Bio/Technology** 4, 305-308, 1986.

Hernandez-Martinez, P., Ferre, J. and Escriche, B., “Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*”, *J Invertebr Pathol* 97, 245–250, 2008.

Hobbs, S.L.A., Warkentin, T.D. and Delong, C.M.O., “Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression”, *Plant Mol. Biol.* 21, 17–26, 1993.

Hofte, H. and Whitely, H.R., “Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*”, *Microbiological reviews* 53, 242-255, 1989.

Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A., “*Agrobacterium* and plant genetic engineering”, *Plant Molecular Biology* 19, 15-38, 1992.

Horsch, R., Fry, B.J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G.R. and Fraley, T., “A simple and general method for transferring genes into plants”, *Science* 227, 1229–1231, 1985.

Hussain, T., Bakhsh, A., Munir, B., Hassan, S., Rao, A.Q., Shahid, A.A., Rashid, B. and Husnain, T., “Mendelian segregation pattern and expression studies of insecticidal gene (*cryIIAc*) in insect resistant cotton progeny”, *Emir. J. Food Agric.* 26(8), 706-715, 2014.

Haughn, G.W., Smith, J., Mazur, B., and Somerville, C., “Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides”, *Molecular and Molecular Genetics* 211, 266-271, 1988

Heap, I., “International survey of herbicide-resistant weeds, the occurrence of herbicides resistant weeds by country”, *P.o. Box* 1365, Corvallis, OR, 97339 HRAC, 2000.

Hopkins, W.L., “A global evaluation of new herbicide activity: 1984-1988 It is changing dynamics and look at it’s future direction”, *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference* Weeds 1: pp. 231-236, 1989.

ISAAA. “Global Status of Commercialized Biotech/GM”, Crops: 2018.

ISAAA. “GMO approval data base, Retrieved on August”, 2018.

Ishiwata, S., “On a kind of severe flacherue (sotto disease)”, *Dainihan Sanshi, Kaiho* 114, 1-5, 1901.

Ives, A.R., Alstad, D.N. and Andow, D.A., “Evolution of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* transformed plants”, *Sci.* 273, 1412-1413, 1996.

İnce, H.Ö., Bahadıroğlu, C., Toroğlu, S. ve Bozdoğan, H., “Genetiği Değiştirilmiş Mısır Bitkisinin Bazı Böcek Türlerine Karşı Direnci Üzerine Değerlendirmeler”, *Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2(1), 78-89, 2013.

İlisulu, K., “Nişasta,şeker Bitkileri ve Islahı”, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi* Yay. No: 960, 1957.

James C., “Global status of commercialized biotech/GM crops”, Brief No. **ISAAA** Ithaca, NY, 1996.

Kudsk, P., Streibig, J.C., “Herbicides-a two-edged sword EWRS”, *Weed Research* 43, 90-102, 2003.

Kado, C.I., “Molecular mechanism of crown gall tumorigenesis”, *Plant Sci.* 10, 1-32, 1991.

Kayapınar, A., Kornoşor, S., “Çukurova Bölgesi’nde Mısır Tarımıyla Birlikte Gelişen Entomolojik Sorunlar ve Çözüm Yolları”, *I. Tarım Kongresi* 9-13 Ocak. Adana. 595, 1990.

Khan, G.A., Bakhsh, A., Riazuddin, S. and Husnain, T., “Introduction of cry1Ab gene into cotton (*Gossypium hirsutum*) enhances resistance against Lepidopteran pest (*Helicoverpa armigera*)”, *Spanish J Agr Res.* 9, 296-300, 2011.

Kranthi, K.R., Naidu, S., Dhawad, C.S., Tatwawadi, A., Mate, K., Patil, E., Bharose, A.A., Behere, G.T., Wadaskar, R.M. and Kranthi, S., “Temporal and intraplant variability of *CryIAc* expression in Bt-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*”, ***Curr. Sci***, 89, 291-298, 2005.

Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. and Schnetter, W., “*Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of coleopteran”, ***Journal of Applied Entomology*** 96, 500-508, 1983.

Kumlay, A.M. ve Dursun, A., “Bitki Genetik Mühendisliği ve Ekonomik Öneme Sahip Bazı Bitkilerde Genetik Mühendisliği Uygulamaları”, ***Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*** 34(2), 209-216, 2003.

Kumlay, A., Onaran, H., “Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Sanayi Bitkileri Alt Komisyon Raporu”, ***Ankara Üniv. Patates, DPT.*** 2648, ÖİK: 656, 306-348, 2000.

Lal, R. and Lal, S., “Genetic engineering of plants for crop improvement”, ***CRC Press. USA*** 246, 1993.

Maqbool, A., Abbas, W., Rao, A.Q., Irfan, M., Zahur, M., Bakhsh, A., Riazuddin, S. and Husnain, T., “*Gossypium arboreum GHSP26* enhances drought tolerance in *Gossypium hirsutum* L.”, ***Biotechnol Progress*** 26, 21-25, 2010.

McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R. and Fraley, R., “Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. sculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*”, ***Plant Cell Rep*** 5, 81–84, 1986.

Micallef, M.C., Austin, S. and Bingham, E.T., “Improvement of transgenic alfalfa by backcrossing”, ***In Vitro Cell Dev Biol Plant*** 31, 187-192, 1995.

Medd, R.W., Van De Ven, R., Pickering, D.I. and Nordblom, T.L., “Determination of Environment-Specific Dose Response Relationships for Clodinafop-propargyl on *Avena* spp”, ***Weed Research*** 41: 351-368, 2001.

Mogali, S.C., Khadi, B.M. and Katageri, I.S., “Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and a sensitive bioassay for the detection of cry toxin expression”, *ACT-Biotechnology Research Communications* 2(1), 60-65, 2011.

Moss, S.R., “Herbicide resistant weeds”, *Weed microgement handbook* 225-252, 2002.

Murashige, T. and Skoog, F. A., “Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Physiol. Plant.* 15, 473-497, 1962.

Neururer, H., “A Die Konkurrenz zwischen Kulturpflanzen und Unkareuter als w’chtiger und beeinflussbarer Foktor in der Fortschrittlichen Agricultur Z”, *Pflanzenkrankhciten.Sonden.* 4: 31-36, 1968.

Nain, V., Jaiswal, R., Dalal, M., Ramesh, B., Kumar A., “Polymerase chain reaction analysis of transgenic plants contaminated by *Agrobacterium*”, *Plant Molecular Biology Reporter* 23, 59-53, 2005.

Olsen, K.M., Daly, J.C., Holt, H.E. and Finnegan, E.J., “Season-long variation in expression of *CryIAc* gene and efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxin in transgenic cotton against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)”, *J. Econ. Entomol* 98, 1007-1017, 2005.

Öktem, H.A., Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Özcan S., Gürel E., Babaoglu, M., *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, Konya, 2001.

Özcan, S., Firek, S. and Draper, J., ‘‘Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation’’, *Bio/Technology* 11, 218–221, 1993.

Özcan, S., “*Agrobacterium*: Bitkilerin doğal genetik mühendisi”, *Bilim-Teknik*, 332, 98-99, 1995.

Özcan, S. ve Özgen, M., “Bitki Genetik Mühendisliği”, *Kükem Dergisi*, 6, 69-95, 1996.

Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, **Selçuk Üniversitesi Basımevi**, Konya, 2004.

Özcan, S., “Modern Dünyanın Vazgeçilmez Bitkisi Mısır: Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Mısırın Tarımsal Üretime Katkısı”, **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 2, 01-34, 2009.

Özer, Z., Kadioğlu, Ğ., Önen, H. ve Tursun, N., 2001, “Herboloji Yabancı Ot Bilimi”, **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, No:20 Kitap seri No:10 Tokat, 2001.

Padgette, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.R., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylorand, N.B., Kishore G.M., “Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line”, **Crop Science** 35:1451-1461, 1995.

Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., van Amerongen A., “Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey”, **Analytical and bioanalytical chemistry** 393(2), pp.569-582, 2009

Paterson, D.T., “Comparative Ecophysiology of Weeds and Crops. (Editör: S.O.,DUKE) Weed Physiology”, **Vol.:I., Boca Raton, Florida**, CRC Pres, pp.101-129, 1985

Uluğ, E., Kadioğlu, D., Üremis, D., “Türkiye’nin Yabancı Otları ve Bazı Özellikleri”, **T.K.B. Adana Zirai Mücadele Arastırma Enstitüsü**, Yay. No: 78, 513s. 1993

Reed, W.T, Saladini, J.L, Cotterman, J.C, Primiani, M.M., Saari L.L., “Resistance in weeds to sulfonylurea herbicides”, **Weed Science** 37, 295-300, 1989.

Robinson, D.K., Monks, D., Monaco, T., “Potato (Solanum tuberosum) tolerance and susceptibility of eight weeds to Rimsulfuron with and without metribuzin”, **Weed Technology** 10, 29-34, 1996.

Rao, C.K., "Transgenic Bt Technology: 3. Expression of Transgenes", Monsanto, <http://www.monsanto.co.uk/news/ukshowlib.phtml?uid/49304>.

Rashid, B., Zafar, S., Husnain T and Riazuddin, S., "Transformation and inheritance of Bt genes in *Gossypium hirsutum*", *Journal of Plant Biology* 51(4), 248-254, 2008.

Ribas, A.F., Pereira, P.F.L. and Vieira, L.G.E., "Genetic transformation of coffee", *Braz J Plant Physiol* 18(1), 83-94, 2006.

Ross, M.A. and Lembi, C.A., *Applied Weed Science*, Minneapolis, M.N., **Burgess Publishing Co**, USA, 1985.

Rowe, R.C., "Potato Health Management", A Holistic Approach. pp. 3-10 in: *Potato Health Management* R.C. Rowe ed., APS Press, St. Paul, MN, 1993.

Rappaport, L., and Wolf, N., "The problem of dormancy in potato tubers and related structures. In: *Dormancy and Survival*. (ed. H.W. Woolhouse)", Cambridge: University Press. *Symp Soc Exptl Biol* 23:219-240, 1969.

Soto, N., Enriquez, G.A., Ferreira, A., Corrada, M., Fuentes, A., Tiel, K., Pujol M., "Efficient transformation of potato stem segments from cv. Desiree using phosphinothricin as selection marker", ***Biotechnología Aplicada***, 24, 139-144, 2007.

Sayyed, A.H. and Wright, D.J. "Cross-resistance and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth (*Plutella xylostella* L) from lowland Malaysia", ***Pest Manag Sci***, 57, 413-421, 2001.

Schnepf, H.E. and Whiteley, H.R., "Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*", ***Proc Natl Acad Sci*** 78(5), 2893-2897, 1981.

Silva, J.A.T. and Fukai, S., "The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth", ***J Appl Hort*** 3, 3-12, 2001.

Sohail, M.N., Karimi, S.M., Asad, S., Mansoor, S., Zafar, Y. and Mukhtar, Z., “Development of broad-spectrum insect-resistant tobacco by expression of synthetic cry1Ac and cry2Ab genes”, *Biotechnol Lett*, 34, 1553–1560, 2012.

Scholz, B., “Mechanische Kartoffel und Anwendung von Herbiziden, Kurz und Bündig”, *BASF Limburger Hof/Pfalz* 12, 219, 1996.

Somers, D.A., Torber, K.A., Pawlowski, W.P and Rines, H.W., Genetic engineering of oat, Enry, R.J. and Ronald J.A., *Plenum Press*, New York, 1994.

Sönmez, S., “Bolu ilinde Patateslerde Yabancı Ot Rekabeti ve Savaşı Üzerinde Araştırmalar”, *Dizer Konca Matbaası* İstanbul, 1976.

Spencer, T.M.O., Brien, J.V., Start, W.G. and Adams, T.R., “Segregation of transgene in maize”, *Plant Mol Biol* 18, 201–210, 1992.

Stachel, S.E. and Zambryski, P.C., “*Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation”, *Cell* 47, 155-157, 1986.

Tepe, I., “Türkiye’de tarım ve tarım dışı alanlarda sorun olan yabancı otlar ve mücadeleleri”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları* No:32, Ziraat Fakültesi Yayınları No:18, Van, 1997.

Thompson, C.J., M. De Block, J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gosselé, N.R. Movva, M. Van Montagu, and J. Leemans., “Characterization of the herbicide resistant gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*”, *EMBO J.* 6: 2519-2523, 1987

Thakral, K.K., Pandita, M.L., Khurana, S.C. and Kallogo, G., “Effect of Time of Weed Removal on Growth and Yield of Potato”, *Weed Research* 29: 33-38, 1989.

Tora, N., Datta, A., Carmi, O.A., Young, C., Prusti, R.K. and Nester, E.W., “The *Agrobacterium tumefaciens* VirC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer”, *J. Bacteriol* 171, 6845-6849, 1989.

Uludağ, A., Nemli, Y., Rubin, B., “Yabani Yulafta (*Avena sterilis* L.) Cladinofop’a Dayanıklılık Üzerine Çalışmalar”, *Türkiye II. Herboloji Kongresi Bildiri Özetleri* Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 2001.

Üstüner, T., Güncan A., “Mekanik, Kimyasal ve Entegre Yabancı Ot Mücadelesi Yöntemlerinin Patates Verimi ve Yumru Çapı Üzerine Etkisi”, *Türkiye Herboloji Dergisi* 6(2), 9-20, 2003.

Valkonen, J.P.T. 2004. Potato scab in Scandinavian countries. In Novel Approaches to the Control of Potato Scab. Proceedings of the International Potato Scab Symposium (IPSS 2004), pp. 76-81. Sapporo, Japan: Hokkaido University.

Villegier, A.S., Blanc, G., Glowinski, J. And Tassin, P., “Transient behavioural sensitization to nicotine becomes long-lasting with monoamine oxidases inhibitors”, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 7, 267-74. 2003.

Wang, B., Ma, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Wu, Y., Wang, Q., Li M., “Potato viruses in China”, *Crop Protection* 30, 1117-1123, 2011.

Warman, P. R., Havard, K.A., “Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn”, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 68: 207–216. 1998.

Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D. and Nester, E.W. “Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*”, *J. Bacteriol.* 123, 255-264, 1975

Wu, G., Cui, H., Ye, G., Xia, Y., Sardana, R., Cheng, X., Li, Y., Altosaar, I. and Shu, Q., "Inheritance and expression of the cry1Ab gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice.", *Theoretical and Applied Genetics* 104(4), 727-734, 2002.

Xie, R., Zhuang, M., Ross, L. S., Gomez, I., Oltean, D. I., Bravo, A., Soberon, M. and Gill, S.S., "Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins", *J. Biol. Chem.* 280(9), 8416-8425. 2005.

Xia, L.H., He, Y.R., Chun, L.U., Yang, Z.Y. and Hong, Z.J., "Inheritance and resistance to insects in *CryIA(c)* transgenic cabbage", *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 4, 57-61, 2007.

Yadav, N.S., Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Barners, W.M. and Chilton, M.D., "Short direct repeats flank the T-DNA on nopaline Ti Plasmid", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 6322-6326, 1982.

Yun, L., ZhiWei, J., KangLai, H.E., YunJun, L., FuPing, S., BaoMin, W. and GuoYing, W., "Transgenic tobacco plants expressing synthetic *CryIAc* and *CryIIe* genes are more toxic to cotton bollworm than those containing one gene", *Chinese Science Bulletin* 53(9), 1381-1387, 2008.

Zambryski, P.C., "Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story", *Plant Mol. Biol.* 43, 465-490, 1992.

Zengin, H ve Güncan, A., "Erzurum ve yöresi patates dikim alanlarında sorun oluşturan yabancı otlar ve önemlilerinin topluluk oluşturma durumları üzerinde araştırmalar", *Türkiye I. Herboloji Kongresi* 3-5 Şubat, Adana, s: 193-201, 1993.

ÖZ GEÇMİŞ

Abdul Naser Amiri 28.12.1987 tarihinde Afganistan'nın Faryab vilayeti Meymene şehrinde dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini Meymene de lise öğrenimini Mezar – i Şerif Merkez'in de tamamladı. 2006 yılında Balh Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvansal Bölümü'nü kazandı. 2009 yılında bölümü bitirdi. 2010-2012 yılları Asia Foundation NGO ve 2012-2015 yılları TİKA sağlık bölümlerine çalıştı Yükseköğreniminin altı sene ardından Niğde Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.



