



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

cry1Ac VE *cry2A* GENLERİNE SAHİP BÖCEĞE DAYANIKLI TÜTÜN
HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

TOLGA DİNÇ

Eylül 2016

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

cry1Ac VE *cry2A* GENLERİNE SAHİP BÖCEĞE DAYANIKLI TÜTÜN
HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

TOLGA DİNÇ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH

Eylül 2016

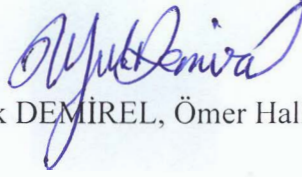
Tolga Dinç tarafından **Yrd. Doç. Dr. Allah Bakhsh** danışmanlığında hazırlanan "**cry1Ac ve cry2A Genlerine Sahip Böceğe Dayanıklı Tütün Hatlarının Geliştirilmesi**" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Genetik Mühendisliği** Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHA WAR, Ankara Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH, Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL, 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.

Tolga DİNÇ



ÖZET

cry1Ac VE *cry2A* GENLERİNE SAHİP BÖCEĞE DAYANIKLI TÛTÛN HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

DİNÇ, Tolga

Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH

Eylül 2016, 57 sayfa

Türkiye, Şark tütünü piyasasında dünyada önemli bir yere sahiptir. Tütün üretimini sınırlandıran en büyük sebeplerden biri de zararlı böceklerdir. Bu tez çalışmasında, gen piramit stratejisi kullanarak *cry1Ac* ve *cry2A* isimli iki adet böcek dirençlilik sağlayan genlerin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla, Basma ve Nail Türk tütün hatlarına aktarılarak böceklere karşı dayanıklı tütün hatları geliştirilmiştir. Çalışmada, gen aktarım amacıyla kullanılan pK2AC plazmidi, 35S promotörü, T-DNA bölgesinde ayrıca *npt-II* ve GUS-INT genlerinin de içermektedir. Elde edilen analizler sonucunda, Basma hattına ait 22 adet ve Nail hattına ait ise 3 adet bitkisinde hem GUS pozitif ekspresyonu hemde genomik PCR ile *cry1Ac*, *cry2A* ve *npt-II* genlerinin bitki genomlarında entegrasyonu teyit edilmiştir. ELISA testi de transgenik bitkilerin *cry1Ac* proteinini 0,017-0,607 µg/g konsantrasyonları arasında sentezlediğini göstermiştir. Transgenik hatlarında, yapılan biyoanaliz testleri sonucunda elde edilen transgenik hatların patates güvesi (*Phthorimea operculella*) karşı dirençli olduğu görülmüştür. Hatların her ikisine ait bitkilerde T₁ nesilde de kanamisin içeren MS ortamında antibiyotiğe karşı direnç göstererek yabancı genin başarıyla bir sonraki nesle aktarılabilildiğini göstermiştir. Transgenin varlığını sürdüren transgenik tütün hatları bir tütün ıslahı programı için mükemmel gen kaynakları olabilirler.

Anahtar kelimeler: Böceklere karşı dirençlilik, Şark tütünü, genetik transformasyon, transgenik hatlar, bitki ıslah programları

SUMMARY

DEVELOPMENT OF INSECT RESISTANT TOBACCO LINES EXPRESSING *cry1Ac* AND *cry2A* GENES

DİNÇ, Tolga

Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor : Assistant Prof. Dr. Allah BAKHSH

September 2016, 57 pages

Turkey, has an important place in the world trade of oriental tobacco. One of the main constraints in agricultural production of tobacco is huge damages incurred by insects. The study aimed to transform two tobacco lines Basma and Nail to encode insect resistance using pyramid gene transfer strategy. The plasmid pK2AC contained both genes under control of 35S promoter; that also harbored GUS-INT with in T-DNA region for earlier screening of putative transformants. Consequently, the genomic PCR results confirmed integration of *cry1Ac*, *cry2A* and *nptII* genes in 22 plants from line Basma and 3 plants from Nail. ELISA results showed variation in expression of *cry1Ac* protein among transgenic plants varying from 0,017 µg/g of fresh tissue weight to 0,607. Bioassay results with potato tuber moth (*Phthorimea operculella*) showed significant mortality of targeted pest on primary transformants. Furthermore, T₁ transgenic progeny also confirmed resistance on MS selection medium containing kanamycin. These transgenic lines can serve as an excellent source of germplasm for an efficient tobacco breeding programme.

Keywords: Insect resistance, Oriental tobacco, genetic transformation, transgenic lines, plant breeding programmes

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca, benden desteğini esirgemeyen, laboratuvarında bana çalışma imkanı sağlayan, PZR çalışmaları, istatistik analizlerinde, her türlü ekipman desteğinde ve her daim yanımda olan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH'a sonsuz teşekkür ederim.

Özellikle laboratuvarıda doku kültürü ve sera çalışmalarında yardımcı olan, değerli arkadaşım Emin Şahin'e, teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvarıda her türlü isteğimi yapan sevgili Nur Efşan Çırık'a tez arkadaşım Safa Sümer'e, değerli arkadaşım Yasin İnce ve laboratuvar arkadaşlarım Nur Sena Çolak'a, Esra Duru ve Tahira Hussain'e teşekkür ederim.

DNA izolasyonu ve PZR optimizasyonu sırasında bana yardımcı olan arkadaşım Abu Bakar Zia ve tezimi yazarken yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ayten Kübra Türkmen'e teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi bugüne gelmemde de büyük payları olan, yaptığım her şeyin koşulsuz arkasında olan ve bana inanan babam Mustafa Dinç'e ve annem İjlal Dinç'e, kardeşlerim İbrahim Dinç'e, Kerem Dinç'e ve Didem Dinç'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine ait FEB314/10-BAEP6 numaralı proje ile finansal destek sağlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xiii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	6
2.1 Agrobacterium Tumefaciens ile Bitkilere Gen Aktarım	6
2.2 Böceklerle Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi	11
2.2.1 Bacillus thuringiensis δ -endotoksin genleri	11
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	19
3.1 Materyal	19
3.1.1 Bitki materyali	19
3.1.2 Bakteri materyali	19
3.2 Metot	20
3.2.1 Besin ortamı ve doku kültürü koşulları	20
3.2.2 Tohum yüzey sterilizasyonu	21
3.2.3 Agrobacterium kültürlerinin büyütülmesi	21
3.2.4 Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla tütüne gen aktarımı	23
3.2.5 Histokimyasal GUS analizi	25
3.2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu	25
3.2.7 ELİSA testi ile cry1Ac genin ekspresyon analizi	27
3.2.8 Yaprak biyoanalizi	27

3.2.9 T ₁ bitkilerinde tohumların çimlendirilmesi	27
3.2.10 Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi.....	28
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1 Tütün Hatlarının Tohum Yüzey Sterilizasyonları	29
4.2 Tütün Hatlarının Agrobacterium Aracılığıyla Genetik Transformasyonu	29
4.3 Aday Transgeniklerin Moleküler Analizleri.....	34
4.3.1 Gen aktarımının doğrulanması.....	34
4.3.2 Histokimyasal GUS analiz.....	36
4.3.3 ELISA testi ile cry1Ac genin ekspresyon analizi	38
4.4 Yaprak Biyoanalizi	40
4.5 T ₁ Transgenik Tütün Bitkilerinin Tohum Analizi	41
BÖLÜM V SONUÇ	44
KAYNAKLAR.....	46
EKLER	55
ÖZ GEÇMİŞ.....	56
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kristalize (Cry) toksin genleri ve etkilediği böcek türleri (Bakhsh vd., 2015).....	13
Çizelge 3.1. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve miktarları (Murashige ve Skoog 1962).....	20
Çizelge 3.2. X-Gluc solüsyonu hazırlamak için kullanılan kimyasal ve miktarları.....	25
Çizelge 3.3. Tütünün basma ve nail hatlarına ait aday transgenik bitkilerin teyit edilmesinde kullanılan gen bölge, kullanılan primer baz dizileri, gen bölge uzunlukları ile primerlerin bağlanma sıcaklıkları.....	26
Çizelge 4.1. Basma ve nail tütün hatlarının transformasyon parametreleri verileri.....	30
Çizelge 4.2. cry1Ac ve cry2A genlerinin aktarıldığı basma(B) ve nail(N) aday transgenik bitkilerine ait T1 transgenlerindeki nptII geni uyumluluğunu değerlendirmek için ki-kare testi.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünün seralarında yetiştirilen (a) nail ve (b) basma tütün hatlarına ait bitkilerinin görünümü.....2
- Şekil 2.1. Farklı bitki türlerinde agrobacterium tumefaciens tarafından oluşturulan tümörler (Özcan vd., 2004 ve www.amerinusery.com/plants/plant-galls-myths-misconceptions web sayfasından alınmıştır, erişim 23.09.2016).....6
- Şekil 2.2. Agrobacterium hücresinde bulunan Ti plazmidi ve bitki hücrelerine T-DNA aktarımı (Özcan vd., 2004'den alınmıştır, erişim 23.09.2016).....7
- Şekil 2.3. Agrobacterium'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımında gerekli olan bölgeler (Özcan vd., 2004'den alınmıştır, erişim 23.09.2016).....8
- Şekil 2.4. Yaralanmış bitki hücreleri tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin vir genlerini uyarması ve bitki kromozomuna T-DNA'nın aktarımı (Özcan vd., 2004'den alınmıştır, erişim 23.09.2016).....10
- Şekil 2.5. Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla bitkilerde böceklere dayanıklılığı sağlayan cry genlerinin bacillus thuringiensis bakterisinden bitki hücresine aktarılması (Özcan 2009, erişim 23.09.2016).....12
- Şekil 2.6. (Bt) Bacillus thuringiensis δ -endotoksin (cry) genlerinin üç boyutlu yapısı (De Maagd vd., 1999).....14
- Şekil 2.7. Cry proteinlerinin etki mekanizması. (a) Cry proteinleri böcek tarafından alınarak bağırsak sıvısında çözünür, (b) mor ile gösterilen C-terminal ve sarı ile gösterilen N-terminal bölgenin bir kısmı bağırsak proteazları tarafından kesilir, (c) aktif toksin epitel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlere bağlanır, (d) 1. bölgenin yapısında bulunan 2 heliks saç tokası epitel hücrelerine yerleşir, (e) toksin hücre zarında delikler oluşturur ancak delik oluşumunun mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (De Maagd vd., 2001).....15
- Şekil 3.1. pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında cry1Ac ve cry2A gösteren bölgelerin şematik görüntüleri. Ayrıca bitki seçmek için kanamisin geni olan nptII kullanılmıştır.....19
- Şekil 3.2. Agrobacterium tumefaciens 'in LBA4404, pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında cry1Ac ve cry2A genleri içeren bakterilerin LB ortamında çoğaltılması, (a) LB besin ortamında çizilmiş bakterilerden steril

- pipet ucuyla tek koloni alınması ve rifampisin ve kanamisin antibiyotiklerinin ilave edilmesi. (b) bir gece inkübatörde çoğaltılmaya hazır bakteri. (c) bir gece sonra çoğaltılmış bakteri.....22
- Şekil 3.3. Tütün bitkisine agrobacterium tumefaciens'in LBA4404 pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında cry1Ac ve cry2A genleri içeren hattıyla gen aktarım çalışmalarının aşama aşama görünümü (a, b) steril ortamda yapsak disk eksplantların elde edilmesi ve (c, d) LB ortamında agro inokülasyonu (e, f) 30 dk sonra 3 günlük ko-kültürasyon ortamına alınması (g, h) fazla gelişmiş bakterilerin steril su ve antibiyotikle yıkanması ve ardından kurutulması.....24
- Şekil 4.1. Basma (a) ve nail (b) tütün hatlarının tohumlarının MS besin ortamında çimlendirilmesi.....29
- Şekil 4.2. Basma ve nail tütün hatlarının genetik transformasyon aşamaları. (a) basma tütün hatına ait 10 adet eksplantın seleksiyon ortamında alınması, (b) 3 haftalık basma (c) nail hatlarına ait eksplantları üzerinde kallus oluşması, (d) 5-6 haftalık basma ve (e) nail hatlarına ait yaprak diski eksplantlarında kallus oluşturmadan direk sürgün oluşumu.....32
- Şekil 4.3. Basma ve nail tütün hatlarının genetik transformasyon aşamalarının devamı (a) sürgün oluşturan eksplantların 100 mg/l kanamisin bulunduran seleksiyon ortamına aktarılması, (b) sürgünlerin büyümesi, (c) tekrar yeni seleksiyon ortamında alt kültürü ve (d) bitkilerin büyümesi.....33
- Şekil 4.4. Basma ve nail tütün hatlarının genetik transformasyona uğramış (a, b) kök ve sürgün oluşturmuş bitkilerin dış ortama aktarılmaya hazır aday bitkiler.....33
- Şekil 4.5. Basma ve nail tütün hatlarına ait genetik transformasyona uğramış bitkilerin (a) sera ortamında alıştırılması, (b, c) büyümesi ve (d) çiçeklenmesi.....34
- Şekil 4.6. Basma ve nail aday transgeniklerde nptII geninin çoğaltımı. (M):1 kb DNA marker, (B): Basma hattının aday transgenik bitkileri, (N): Nail hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol (Plazmid DNA), (NK): Negatif kontrol.....35
- Şekil 4.7. Basma ve nail aday transgeniklerde cry1Ac geninin çoğaltımı. (M): 1 kb DNA Marker, (B): Basma hattının aday transgenik bitkileri, (N): Nail hattının aday transgenik bitkileri (NK): Negatif kontrol, (PK): Pozitif kontrol (Plazmid DNA).....35
- Şekil 4.8. Basma ve nail aday transgeniklerde cry2A geninin çoğaltımı. (M): 1 kb DNA

marker, (B): Basma hattının aday transgenik bitkileri, (N) Nail hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol (Plazmid DNA), (NK): Negatif kontrol.....	36
Şekil 4.9. Yaprak, sürgün ve kesilmiş eksplantların histokimyasal GUS analizi. Mavi renkli olan bitki kesitleri aday transgenik bitkiyi gösterirken mavi renkli olmayanlar transgenik adayı değildir.....	37
Şekil 4.10. Aday transgenik bitkilerdeki cry1Ac protein konsantrasyonunu belirlemek için yapılan ELISA testinin yapım görünümü.....	38
Şekil 4.11. Basma ve nail transgenik hatlarının ELİSA testi ile cry1Ac ekspresyonu. N: Nail transgenik bitkiler, B: Basma transgenik bitkiler, NC: Negatif kontrol.....	39
Şekil 4.12. cry1Ac ve cry2A genlerinin aktarıldığı basma(B) ve nail(N) aday transgenik bitkilerine ait yapraklarda biyoanaliz test çalışmaları sonucunda zehirlenerek ölmüş olan <i>Phthorimaea operculella</i> larvaları.....	40
Şekil 4.13. cry1Ac ve cry2A genlerinin aktarıldığı basma(B) ve nail(N) hatlarına ait aday transgenik tütün bitkisinden oluşan tohumlarından gelişen bitkilerde (a, b) kanamisinli ortamda seleksiyon ve (c, d) GUS histokimyasal analizi ekspresyonu.....	43

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

Kısaltmalar	Açıklama
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	Left Border (sol sınır)
RB	Right Border (sağ sınır)
DNA	Deoksiribonükleik asit
Vir	Virülens
Ti	Tumour-inducing (tümör oluşturan)
Cry	Kristalize
Bt	Bacillus Thuringiensis
GUS	β-glukuronidaz
MS	Murashige ve Skoog
NptII	Neomysinfosfotransferaz Geni

BÖLÜM I

GİRİŞ

Bitkiler, insanlar tarafından çok uzun zamandan beri besin olarak kullanılıyor olması tarımsal ürünlerin önemini her geçen gün artırmaktadır. Bu bağlamda tarımı yapılan bitkilerin verimini her zaman artırılması hedeflenmiştir. Bu güne kadar, hedeflenen gayeye ulaşmak için, çevreye zararlı olan böcek ilaçları, sentetik gübre ve yabancı ot ilaçları kullanılmıştır (Andrews vd., 1987). Gelişmiş tarım yöntemleri son 50 yılda ve modern teknolojiler ile birlikte son derece gelişmiş ıslah süreçleri, tarımı yapılan bitkilerin verim ve kalitesinde büyük bir artışa neden olmuştur (Özcan vd.,1993).

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.), keyif verici bitkiler sınıfında olan patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasından tek yıllık bir bitkidir (Şekil 1.1). Tütün bitkisi, yapraklarının işlenmesi sonucunda oluşan tarımsal ürün, en yaygın olarak sigara yapımında kullanılmaktadır. Bahsi geçen bu ürün hem aromatik bitki hemde endüstriyel bitkiler sınıfında da yer almaktadır. Adaptasyon kabiliyeti yüksek olan ve çeşitli coğrafyalara uyum sağlayabilen tütün bitkisi, kısa sürede yetişmesi itibariyle en iyi tarımsal bitkilerden birisidir. Sigara olarak tüketilmesinin yanında tütün, pestisit yapımında ve tıpta kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Küba, Hindistan, Türkiye ve diğer ülkede önemli bir endüstri bitkisidir (Villegier vd., 2003).

Anavatanı Orta Amerika olan tütün, Osmanlı İmparatorluğuna İngiliz ve İtalyan denizciler tarafından 1700'lü yılların başında getirilmiştir. Tütün, imparatorluğun sınırları içinde ilk olarak 1687 yılında, Makedonya'da yetiştirilmiştir. Daha sonra özenli ekim, doğru tarım yöntemleri ve uygun ekolojik koşulları sayesinde üretim yaygın hale gelmiştir. Türk tütününü yüksek kalitesi ile dünya pazarlarında iyi bir nam kazanmıştır. Dünya çapında 2014 yılı itibariyle 120'den fazla ülke 4.2 milyon hektarlık geniş bir alanda tütün üretimi yapılmakta ve Dünya'daki tütün üretiminin %80'inden fazlası Çin, Brezilya, Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri, Türkiye, Zimbabve ve Malavi'de gerçekleşmektedir (FAO, 2016). Türkiye 2014 yılında dünyadaki 7 milyon ton tütün üretiminin 153 bin tonluk kısmını üreterek dünya ülkeleri arasında 11. sırada yer almaktadır (FAO, 2016). Dünya üzerinde 60'ın üzerinde tütün türleri vardır ve *Nicotiana tabacum* L. bunların içerisinde en fazla yetiştirilenidir. Ülkemizde de yetiştirilen tütünler arasında en fazla paya (%95) sahiptir. Bahsi geçen bu türün yanında yetiştiriciliği yapılan bir başka tür *Nicotiana rustica* L. (Hasankeyf tütünü) olup, bu tür ülkemizde genellikle Doğu Anadolu ve Güneydoğu

Anadolu Bölgelerinde yetiştirilmektedir. Dünya piyasalarında *Nicotiana tabacum* L. Türk tütününü veya Şark (doğu) tipi tütün olarak da bilinmekte olup genellikle sigara üretiminde kullanılan tütün türüdür. *Nicotiana rustica* çoğunlukla nargile, pipo, enfiye, çiğnemelik ve zehirli dart yapmak için kullanılan, nikotin oranı yüksek tütün türleri arasındadır. Bu tür düşük kaliteli Türk tütününü olarakta geçmektedir.



a



b

Şekil 1.1. Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünün seralarında yetiştirilen (a) nail ve (b) basma tütün hatlarına ait bitkilerinin görünümü

Türk (Şark/Oriental) tütününü *Nicotiana tabacum* L. türünden olup içeriğindeki etken madde ve kalite yönünden göstergesi olan nikotin miktarı %1'e yakın olmakla birlikte ülkemizdeki tüm tütünler göz önüne alındığında bu oran %1-2 arasında değişmektedir. Sigara üretiminde içim yönünden en hafif ve nikotin oranı yüksek olan tütünler ile harmanlamada istenilen bir özellik taşımaktadır. Genel çerçevede Şark tipi tütünler; protein yönünden ve azot içeriği açısından az, nikotin oranı düşük, tadı ve kokusu yoğun olmayan 2 metreye kadar boylanabilen, ülkemiz koşullarına adaptasyonu çok iyi olan bir bitkidir. Ayrıca bunların tohumlarında %34-45 arasında nitelikli yağ içeren, yaprak ayası küçük ve kurumuş yaprakların rengi sarı olmaktadır (Er vd., 2011).

Türk ya da şark tütününü diğer tarımsal bitkilerin yetiştiriciliği için uygun olmayan fakir

topraklara uyum sağlamaktadır. Türkiye çoğunlukla küçük yapraklı şark tütün tiplerinin yetiştirilmesine uygun toprağa, iklim koşullarına ve geleneğe sahip olup, büyük yapraklı tütün tipleri çok az miktarda yetiştirilmektedir. Hasat edilen yapraklar çoğunlukla güneş ışığında kurutulur ve kendine özgü altın sarı rengi kalite özellikleri açısından dünya çapında çok ünlüdür. Şark tütünü yüksek aroması, küçük yaprakları, düşük şeker ve nikotin içeriği ile tanınmaktadır. Dünyanın en büyük sigara üreticilerin çoğu ürettikleri sigaraların aromasını ve kalitesini zenginleştirmek için Türk tütünü kullanmaktadırlar.

Türkiyede yetiştirilen tütünler arasında kalitesi en üstün ve dünya çapında üne sahip tütünlerimizden Basma, Evkaf, Samsun Canik ve Samsun Maden adlarıyla bilinen tütünlerimiz Samsun bölgesinde üretilip yetiştirilmektedir. Ege Bölgesine göre kıyaslandığında çeşitlerin homojen dağılmayıp aksine farklı bölge yerlerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bağlamda bölgede yetiştirilen tütünlerin renk, koku, tat, boyut, şekil, dış görünüşü, içim özellikleri bakımından farklılık gösterebilmektedir.

Türkiye tütünlerinin özellikleri bakımından Karadeniz Bölgesi tütünleri konumuz gereği seçilen çeşitlerin bu bölgede yetiştirilmektedir. Karadeniz Bölgesi tütünleri olan ve dünyaca tanınmış Samsun, Bafra tütünleri bu bölgede yetiştirilmektedir. Gümüşhacıköy basması hariç diğerlerinin hepsi zenepli ve hafif yaşmaklı tütünlerdir. Bu bölgedeki tütünler 5 grup altında toplanmış olup, Samsun tütünleri bu grup içinde en önemlisidir. Samsun tütünleri, küçük yapraklı, tatları hoş ve hafiftir. Hiçbir harmana lüzum kalmadan yalnız başına içilen yegane tütünlerimizdendir. Sigara randımanı yüksek, nikotin oranı çok düşüktür (%0.32-1.60). Harmanlarda ıslah gayesiyle kullanılmaktadır. Dünya literatürlerine Samsun tütünü olarak geçmiştir. Dünyanın nikotini en az tütünüdür. Tokça, tatlı, hafif kokulu ve yanması iyidir. Samsun tütününün oymakları arasına giren Samsun (Canik Oymağı) küçük yapraklı, ince dokulu, zenepli omuzsuzdur. Harmanlara koku vermek maksadıyla katılır ve Nail çeşiti bu oymak içinde yer almaktadır. Diğer oymak ise Gümüşhacıköy Basmasıdır ve araştırmamızda kullanılan diğer çeşitimiz olan Basma bu oymakta bulunur. Zeneplsiz yaşmaklı, kalın dokulu, küçük yapraklı tütünlerdir. Karadeniz tütünleri arasında yegane yaşmaklı tütündür. Karamелеmsi kokusu vardır. Harmanlara yavaşlılık verir. Sigara randımanı orta, nikotin oranı %1.00 - %1.40 arasındadır (Geçit vd., 2009).

Böcek zararlıları, tüm bitkisel üretimde olduğu gibi tütün üretiminde de dünya çapında büyük bir tehdit ve üretkenliği sınırlayan önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Bakhsh vd., 2009a; Sohail vd., 2012). Yaklaşık olarak 67.000 zararlı canlı türleri bitkilere zarar vermektedir. Bunların içinde <9000 böcekler ve akarlar bulunmaktadır (Ross ve

Lembi 1985). Bu zararlı böcekler bitkilerin meyve, kök, gövde ve yapraklarındaki hücre öz suyunu emerek veya bitkileri keserek ölmelerine sebep olmaktadır. Geçmişte yapılan çalışmalara göre böcekler ve hastalıkların bitkilere verdiği zarar üretimde %37'dir ve bu zararlarda böceklerin payı %13 olarak bildirilmiştir (Gatehouse vd., 1992) ve yeni çalışmalara göre %35-100 oranında zarar verebildiği belirtilmiştir (Gatehouse vd., 2011). Bu oran iklim koşullarına ve böcek türlerine göre değişiklik gösterebilmektedir (Bakhsh vd., 2015a).

Bol yapraklı ve etli yapıya sahip tütün bitkileri zararlı böceklerin beslenmesi, yaşaması ve üremesi için uygun koşullara sahiptir. Tütün bitkisine zarar veren yaygın böcek zararlıları çeşitli kurtlar, yaprak biti, yaprak çekirgeleri ve toprak nematodları olup, bunların içerisinde kurtlar en yaygın olanlarıdır. En yaygın kurt zararlısı tütün ya da domates boynuzlu kurdu (*Manduca sexta*)'dur. Tütündeki diğer yaygın kurtlar çizgili yaprak kurdu, bozkurt ve bazen gamma kelebeğidir. Kurt zararı doğrudan mahsulün verimini azaltır, dolayısıyla onları kontrol amacıyla güçlü önlemler alınmaktadır.

Kimyasal böcek öldürücüleri, günümüzde kullanılan en etkili ve en yaygın zararlı kontrol stratejisi olarak bilinmektedir. Ancak, insektisitlerin yaygın ve sınırsız kullanımı sonucunda böceklerde bu ilaçlara karşı direnç geliştirilmiş olup, üstelik hedef olmayan yararlı böceklere ve doğal çevreye de zararlı etkiler yapmaktadırlar. Bu nedenle, sentetik ilaçlara karşı alternatif olarak böceklere dirençli transgenik bitkiler geliştirilmektedir (Bakhsh vd., 2009b; Sohail vd., 2012).

Bitki biyoteknolojisinde en önemli ilerlemelerden birisi, böcek zararlılarına karşı dirençli bitkilerin geliştirilmesidir (Dhaliwal vd., 1998). Moleküler genetik yöntemlerin kullanılması ile böceklere dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiş ve uygulama yönünden birçok farklı yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan yöntemlerin en bilineni *B. thuringiensis* bakterisinin böcekler için ölümlü sonuçlanmasına neden olan geninin bitkilere aktarılması ile olmaktadır. Bunu bir başka bakteri olan ve bitkilerin doğal genetik mühendisi olarak tanımlanan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi aracılığıyla gerçekleştirmesidir (Özcan, 2009; İnce vd., 2013). Bu bakımdan böcek zararlılarına karşı mücadele edebilecek, böcek dirençli tütün çeşidi geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda bitkilere böceklere dayanıklı bir gen aktarılmıştır. Ancak böcekler aktarılan gene karşı dirençlilik kazandıkları için transformasyon çalışmaları uzun süreli dayanıklılık sağlamamıştır. Bu tez konusunun amacı da öncelikle gen piramitleme

teknolojisi kullanarak *cry1Ac* ve *cry2a* genlerini taşıyan geniş spektrumlu böceklere dayanıklı genleri taşıyan transgenik tütün bitkisi elde edilmesidir. Çalışmada birden fazla gen kullanılarak böceklerin direnç kazanmasını engelleyerek tütün bitkisinin böceklere karşı dayanıklı hale getirilmesi hedeflenmiştir.



BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 *Agrobacterium Tumefaciens* ile Bitkilere Gen Aktarımı

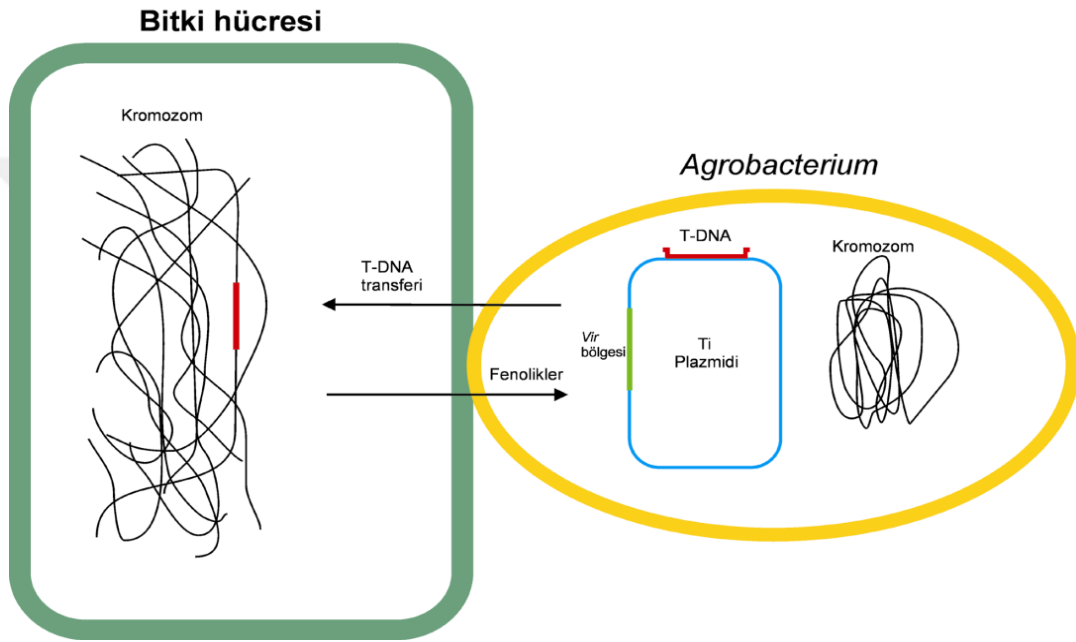
Günümüzde, bitkilere gen transferinde en yaygın olarak kullanılan araç *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. *Agrobacterium tumefaciens* baklagillerde azot fiksasyonu yapan *Rhizobiaceae* familyasına ait bir *Alpha proebacterium*'dur. Toprakta doğal olarak yaşayan çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen gram-negatif bir bakteridir. *A. tumefaciens* özellikle iki çenekli bitkilerin kök boğazında oluşan yaralardan enfekte ederek taç uru hastalığına (tümör) neden olan bir bakteri türüdür (Şekil 2.1.). Yapılan çalışmalarda bu tümürlü hücrelerin, yüksek oranlarda oksin ve sitokininleri ürettiği, bundan dolayı da hormon dengesi bozulan hücrelerin tümöre dönüştüğü belirlenmiştir. Bu tümörlerin normal bitki hücrelerinden farklı, amino asit ve opin'ler olarak bilinen şeker türevlerini sentezleyerek bakterinin bu ürünleri karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir (Hooykaas ve Schilperoort 1992; Özcan ve Özgen 1996; Özcan vd., 2004).



Şekil 2.1. Farklı bitki türlerinde (a, b) *agrobacterium tumefaciens* tarafından oluşturulan tümörler (Özcan vd., 2004 ve www.amerinnursery.com/plants/plant-galls-myths-misconceptions web sayfasından alınmıştır, erişim 23.09.2016).

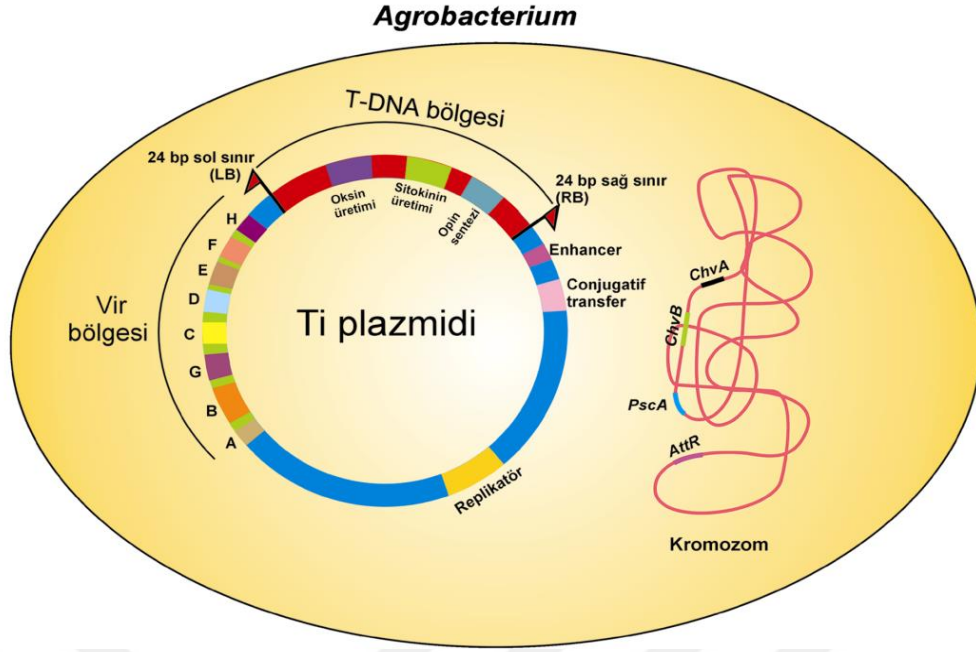
Tümör oluşumuna yapılan çalışmaların neticesinde, *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine geçen ve bitki DNA'sıyla birleşen bazı genlerin neden olduğu tespit edilmiştir. *A. tumefaciens*'in kromozomal DNA'sı yanında Ti (tumour-inducing) plazmidi olarak adlandırılan küçük bir plazmid DNA'yı da içermektedir. Bu plazmid bakterinin bitkiyi

enfekte ettiği sırada T-DNA (transfer-DNA) bölgesi olarak adlandırılan bir DNA parçasının bakteriden bitki hüresine geçtiği (Şekil 2.2.) ve bitki kromozomlarıyla birleştiğini belirlemişlerdir (Watson vd., 1975; Chilton vd., 1977 Chilton vd., 1980). Bitki hüresini enfekte ettikten sonra T-DNA bölgesinde bulunan oksin ve stokinin genleri ile opin genlerinin (Şekil 2.3.) harekete geçmesiyle hücrede aşırı bir hormon üretimi yapılarak bitki hüresi hızlı ve kontrolsüz bölünmeyle tümör oluşmaktadır. Tümörlü hücrelerin enerji kaynağı için ise opin genleri aktif hale geçerek şeker üretimi yapmaktadır (Nester vd., 1984; Özcan vd., 2004).



Şekil 2.2. Agrobacterium hüresinde bulunan Ti plazmidi ve bitki hücrelerine T-DNA aktarımı (Özcan vd., 2004'den alınmıştır, erişim 23.09.2016)

Agrobacterium tumefaciens bakterisinin bitki hücrelerine gen aktarımı yapabilmesi için üç temel bölge gereklidir (Şekil 2.3). Bunlar, T-DNA bölgesi, virülens (vir) bölgede ve kromozomda bulunan genlerdir. Bakterinin Ti plazmidi üzerinde bulunan T-DNA bölgesi sağ (RB/right border) ve soldan (LB/left border) 24 baz çifti (bç) uzunluğunda belirli baz dizinleri ile sınırlandırılmıştır (Yadav vd., 1982; Özcan vd., 2004). Ti plazmid den bitki kromozomuna aktarılan DNA bölgesi bu sınırlar içerisinde kalan kısım olup, aktarım için sağ sınır mutlak gereklidir. T-DNA bölgesinde 2 adet oksin ve 1 adet sitokinin sentezini sağlayan genler ile opin sentezine kodlayan genler bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bu DNA parçaları bakteri hüresinde aktif değilken, bitki kromozomlarına aktarıldığı zaman aktif hale geçmesinin nedeni, bu genlerin promotör (başlama noktası) bölgelerinin bitki genlerinin promotör bölgeleriyle benzerlik göstermesidir.



Şekil 2.3. *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımında gerekli olan bölgeler (Özcan vd., 2004'den alınmıştır, erişim 23.09.2016).

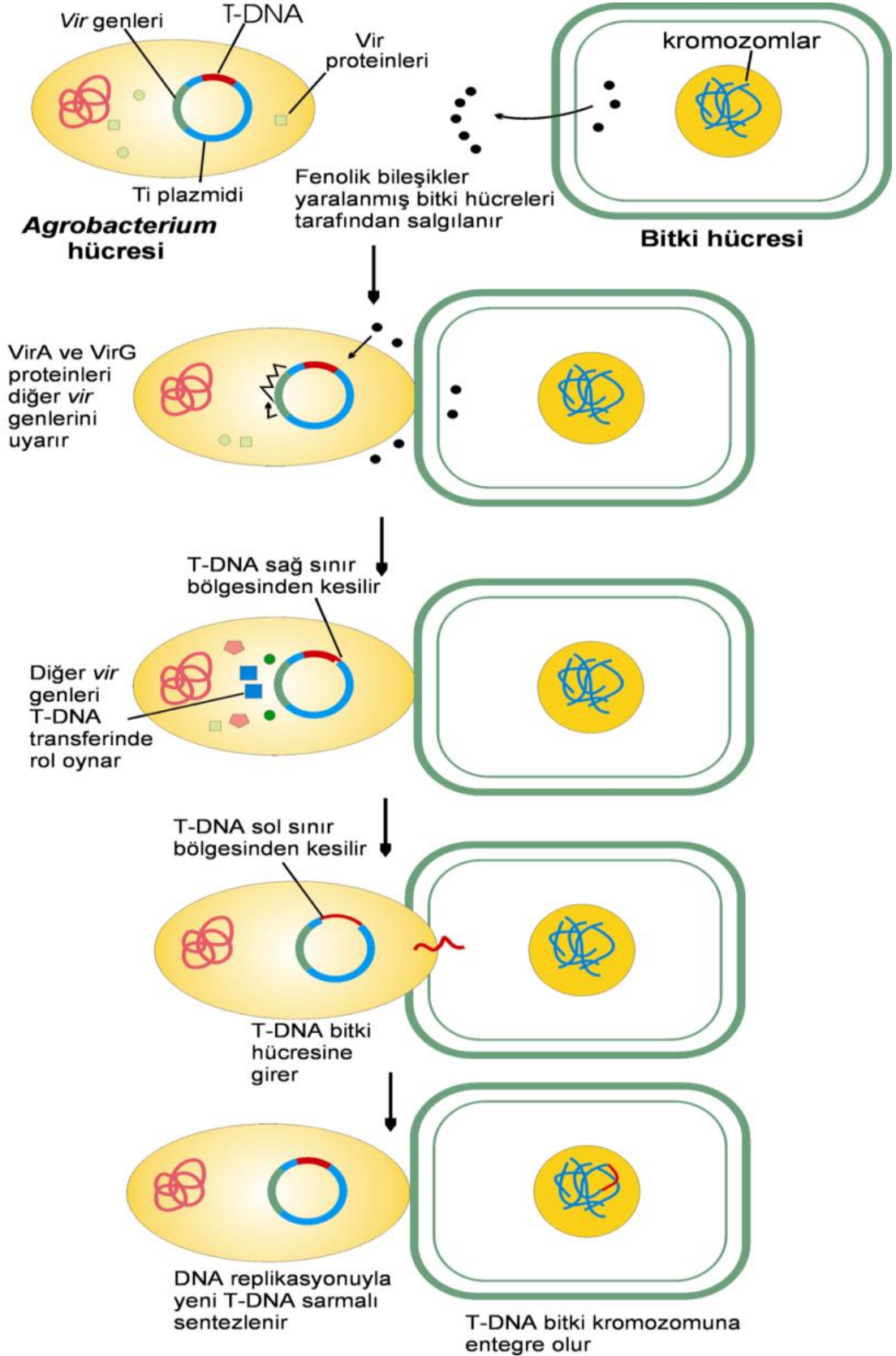
T-DNA transferinde gerekli olan ikinci bölge ise virülens genlerin olduğu bölgedir. Bu bölgede 8 adet gen bölgesi (VirA, B, C, D, E, G, F, H) bulunmaktadır (Şekil 2.3). Bu genler yaralanan bitki hücrelerinden gelen fenolik bileşikler algılayıp üretmiş oldukları enzim sayesinde T-DNA bölgesini sınırlardan keserek, bitki hücrelerine hareketini ve bitki kromozomal genleriyle birleştirilmesinde etkili olmaktadır. Bitki hücrelerine T-DNA bölgesi birden fazladan aktarılabilmektedir (Tora vd., 1989; Zambryski, 1992; Özcan vd., 2004).

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

T-DNA transferinin aktivasyonunda etkili olan ilk protein olan VirA, bakteri hücrelerinde daima aktiftir. Yaralanmış bitki hücrelerinden salgılanan asetosiringon (AS) gibi fenolik bileşiklerin bakteri hücrelerine girmesiyle VirA proteini uyarılır bu sırada VirG proteini de uyarılarak bütün *vir* proteinlerinin aktif hale getirilmesi sağlanmaktadır. Aktif hale gelen *vir* genlerinin ürettiği enzimler de T-DNA kesilerek tek iplik DNA olarak bitki hücrelerine aktarılır ve bitki kromozomuyla birleşmektedir (Şekil 2.4) (Stachel ve Zambryski, 1986; Gelvin, 2000; Özcan vd., 2004).

Modern teknolojinin gelişmesiyle birlikte *Agrobacterium* hatlarında bulunan Ti plazmidin üzerindeki T-DNA bölgesinin tümör oluşumuna neden olan sağ ve sol sınır bölgeleri arasındaki genler kesici enzimler yardımıyla çıkartılarak yerlerine herhangi bir canlıdan (bitki, hayvan, mikroorganizma gibi) alınıp izole edilmiştir. İzole edilen tarımsal açıdan önemli genler aktarıldığında in vitro şartlarda gelişen hücre ve dokular bu *A. tumefaciens* bakterisiyle enfekte edilmektedir. Böylece istenilen özelliklere sahip bir veya birden fazla genler bitki hücrelerine aktararak in vitro doku kültürü yöntemleriyle bazı özellikler kazandırılmış transgenik bitkiler elde edilmiştir (Özcan vd., 2004).





Şekil 2.4. Yaralanmış bitki hücreleri tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin vir genlerini uyarması ve bitki kromozomuna T-DNA'nın aktarımı (Özcan vd., 2004'den alınmıştır erişim 23.09.2016).

2.2 Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

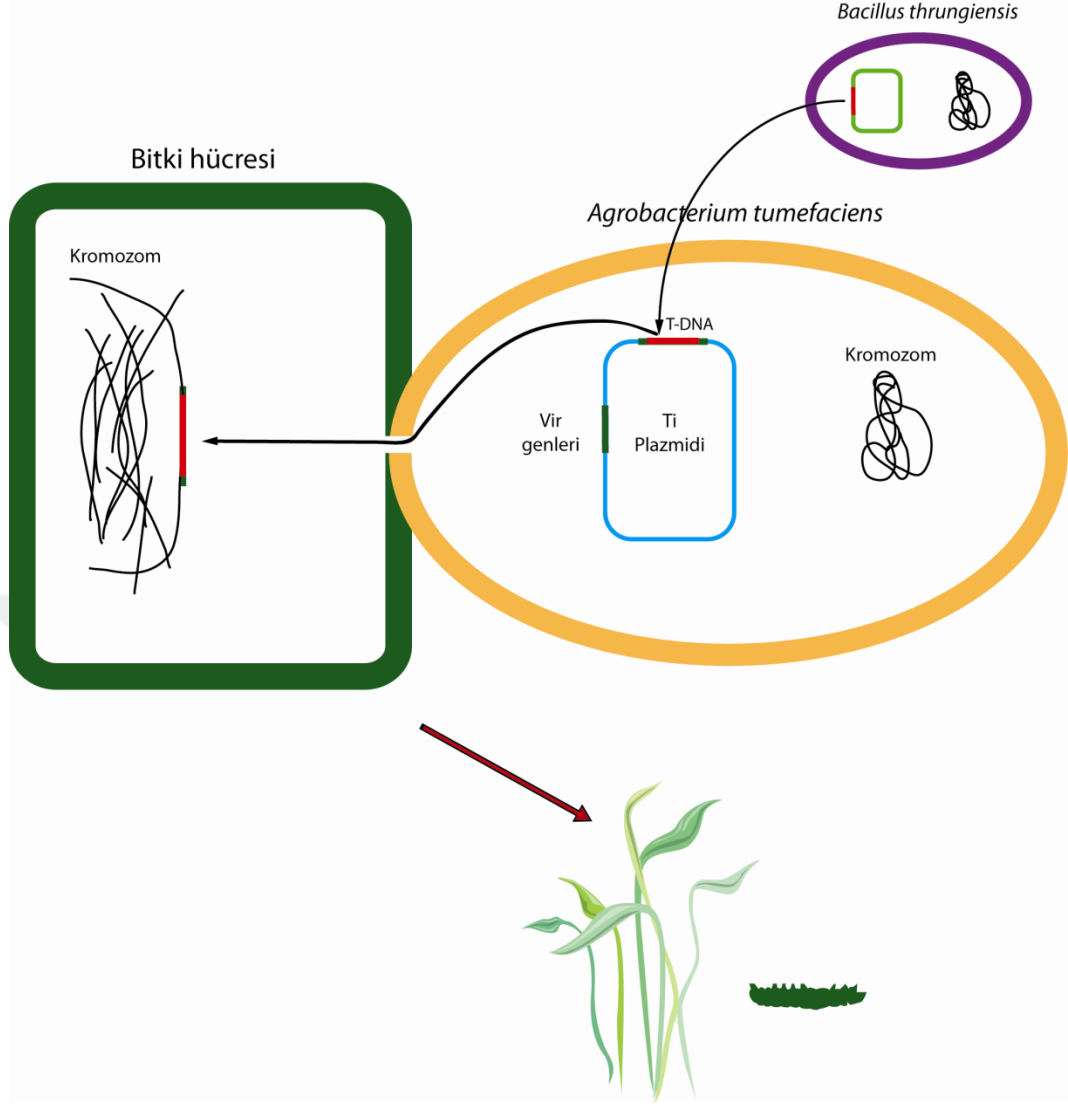
Moleküler biyoloji önemli çalışma alanlarından biri de, zararlılarla mücadeledir. Yöntemin başlıca prensibi, böcekler için toksik etkisi bulunan proteinlerin üretilmesinden sorumlu genlerin bitki hücrelerine aktararak genetiği değiştirilmiş bitkilerin geliştirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla doğadan veya yapay yolla üretilen genlerin en çok ve en yaygın *Bacillus thuringiensis* (Bt) δ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan kristalize (cry) genleri olmasıdır (Öktem 2004).

2.2.1 *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin genleri

Bacillus thuringiensis (Bt) spor oluşturan, aerobik, gram pozitif ve 20 türden fazla bakteri türü içeren genel biyolojik özellikleri birbirine benzer *Bacillus* cinsidir (Lal ve Lal, 1993). İlk olarak 1901 yılında baygınlık hastalığının rastlandığı ipekböceği (*Bombyx mori*) larvalarında, Japonya'da keşfedilerek *Bacillus sotto* olarak isimlendirilmiştir (Ishiwata 1901). Sonrasında 1911 yılında bir un güvesi (*Ephetia kuhniella*) popülasyonu içerisinde, Almanya'nın Thuringia kentinde yeniden keşfedilerek ismini oraya izafen almış olup insektisit etkiside bu yılda belirlenmiştir (Berliner, 1911). Bu bakteriler sporülasyon esnasında insektisidal etki gösteren sınırlı konukçu profiline sahip, delta-endotoksin, Cry toksin veya insektisidal Cry proteinleri (ICP) olarak adlandırılan bazı kristalize yapılar oluşturmaktadır. İlk defa Fransa'da 1938 yılında geniş miktarlarda üretilen Bt'nin, *O. nubilalis* (mısır kurdu) hasarını önlemek amacıyla mısır tarlalarında spreyi kullanılmıştır (Aronson vd., 1986).

Cry proteini üretebilen ilk Bt geni, 1981 yılında klonlandıktan sonra *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin gen aktarım için özelleşmiş T-DNA'sı aracılığıyla (Şekil 2.5) bakteriye aktarılmıştır. Sonrasında Bt genini taşıyan ilk transgenik bitkiler 1987 yılında Belçika'daki bir biyoteknoloji şirketi tarafından, tütün ve domatese aktarılmasıyla elde edilmiştir (Schnepf ve Whiteley 1981; Ecevit ve Tuncer, 1991; Lal ve Lal, 1993). İlk Bt geni taşıyan transgenik ürünler 1995 yılında piyasaya çıkarılmıştır.

Bacillus thuringiensis (Bt), böcek direnç genlerinin belki de en önemli kaynağıdır. *B. thuringiensis*'den elde edilen genler lepidopteralar (Hofte ve Whitely 1989; Cohen vd., 2000), koleopteralar ve dipteralar gibi farklı böceklerin larvaları için zehirli olan kristal proteinleri kodlamaktadırlar (Krieg, vd., 1983; Herrnstadt vd., 1986).



Şekil 2.5. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla bitkilerde böceklere dayanıklılığı sağlayan cry genlerinin *Bacillus thuringiensis* bakterisinden bitki hücrelerine aktarılması (Özcan, 2009 erişim 23.09.2016) .

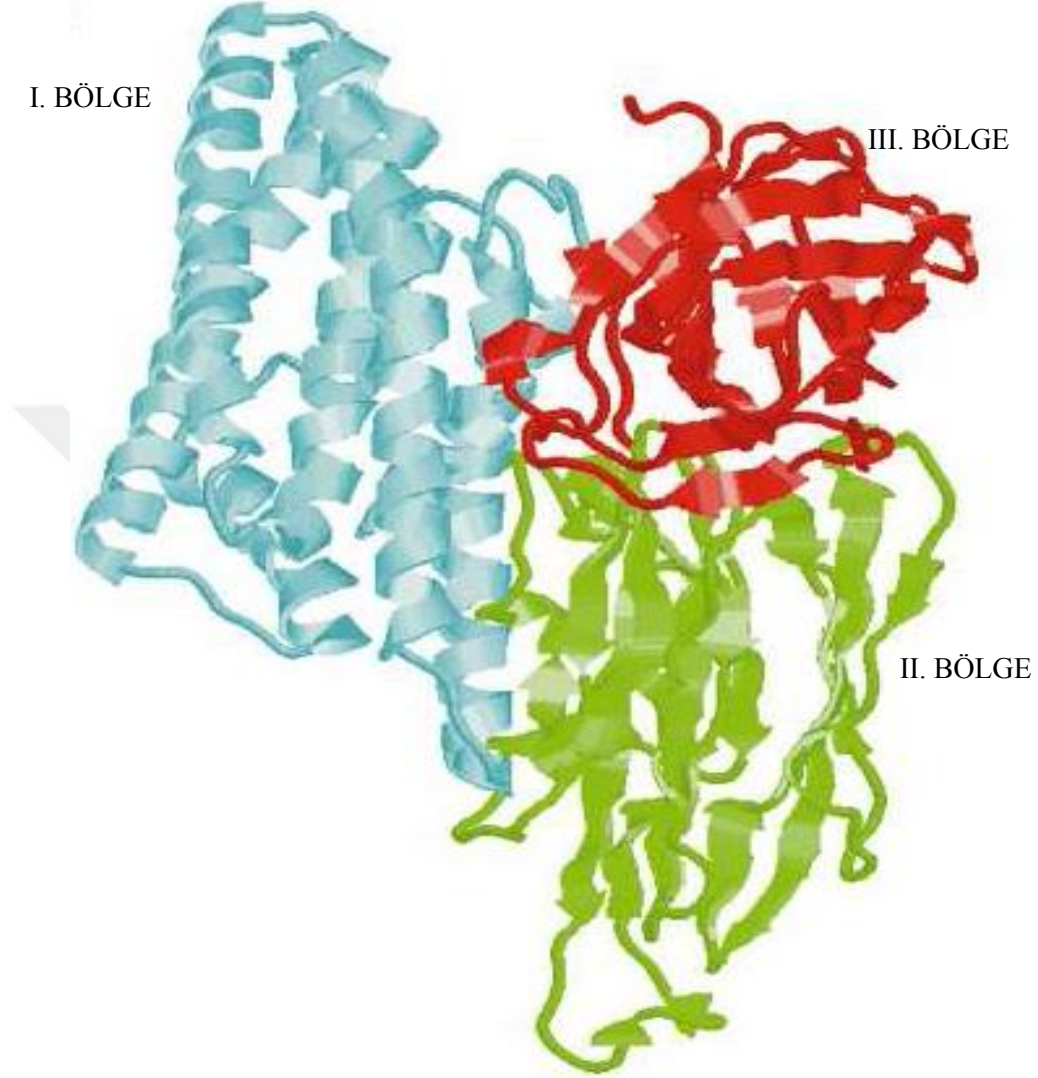
B. thuringiensis 'in değişik özelliklere sahip olan 200'den fazla Cry proteini bulunmaktadır. Bunlar böceklerde etkili olma durumlarına göre dört gruba ayrılmıştır. Bunlardan Cyr-I toksinleri Lepidoptera larvalarına özgü olanlara etki gösterirken, Cry-II toksini hem Lepidoptera hem de Diptera larvaları, Cry-III toksini Coleoptera larvalarına özgü olanlara ve Cry-IV toksinide Diptera larvalarına karşı etki göstermektedirler (Öktem, 2004; Bravo vd., 2007). Bu genlerin diğer gruplandırılmış olanları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kristalize (Cry) toksin genleri ve etkilediği böcek türleri (Bakhsh vd., 2015)

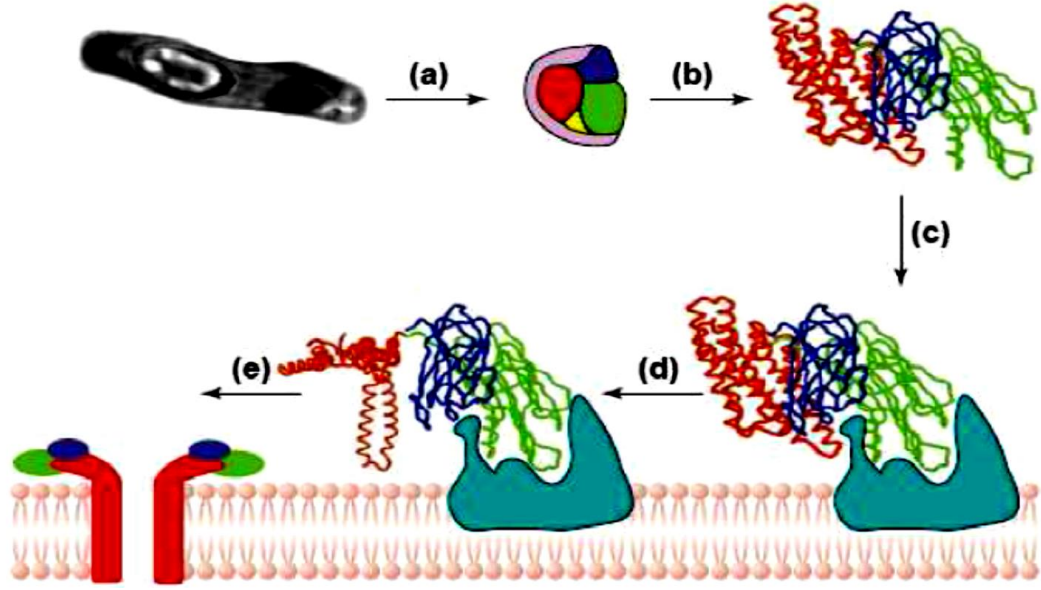
Cry geni	Hedef böcek türleri	Böcek sınıfı
<i>cryIA(a)</i>	İpek böceği, tütün boynuzlu kurdu, Avrupa mısır kurdu	Lepidoptera
<i>cryIA(b)</i>	Tütün boynuzlu kurdu, pamuk kurdu, lahana solucanı, sivrisinek	Lepidoptera ve Diptera
<i>cryIA(c)</i>	Tütün tomurcuk kurdu, lahana piresi, pamuk kurdu	Lepidoptera
<i>cryIA(e)</i>	Tütün 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, Tütün 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, tütün boynuzlu kurdu	Lepidoptera
<i>cryIIC</i>	Tütün 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 genlerinin etki şekli 3 farklı bölgeden meydana gelmektedir (Şekil 2.6). I. bölge, böceğin bağırsağına yapışma ve hücreleri parçalamaya neden olmaktadır. II. ve III. bölgeler ise böceğin bağırsağındaki epitel hücrelerinin reseptörlerini tanıması ve bağlanma özelliği taşımasıdır (De Maagd vd., 1999). Bu, Bt Cry proteinlerinin etki mekanizması, böceğin orta bağırsağındaki kristalin çözülmesine neden olması şeklindedir. Bu proteinler larva tarafından yenildiğinde, zehirli proteinler orta bağırsak bölgesinde spesifik reseptörlere bağlanmakta ve duyarlı böceklerin orta bağırsak epitel dokusunu parçalamaktadır. Böylece genel zehirlenme etkisine neden olur ve sonunda larvalar ölmektedir (Kranthi vd., 2005). Bu zehirlenmenin aktif kısmı, böceğin orta bağırsak florası ve Cry proteinlerinin istenilen uygun reseptörü barındıran zara bağlanması ile oluşmaktadır (Şekil 2.7). Günümüzde, sırasıyla *cryIAb*, *cryIAc* ve *cryIIIA* genlerini barındıran pamuk, mısır ve patates bitkileri geliştirilmiş. Günümüzde ticari olarak *cryIAb*,

cryIAc, cryIFa, cryIIIBb, cry34Ab, cry35Ab genlerini bulunduran mısır, cryIAc ve cryIIAb genlerini bulunduran pamuk ile cryIIIAa genlerine sahip patates ticari çeşitleri piyasada bulunmaktadır.



Şekil 2.6. (Bt) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin (cry) genlerinin üç boyutlu yapısı (De Maagd vd., 1999)



Şekil 2.7. Cry proteinlerinin etki mekanizması. (a) Cry proteinleri böcek tarafından alınarak bağırsak sıvısında çözünür, (b) mor ile gösterilen C-terminal ve sarı ile gösterilen N-terminal bölgenin bir kısmı bağırsak proteazları tarafından kesilir, (c) aktif toksin epitel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlere bağlanır, (d) 1. bölgenin yapısında bulunan 2 heliks saç tokası epitel hücrelerine yerleşir, (e) toksin hücre zarında delikler oluşturur ancak delik oluşumunun mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (De Maagd vd., 2001)

Günümüzde ve geçmişte birçok bitkiye ve tütünde Bt geni aktarılarak böceklerle mücadele konusunda çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bir kısmı aşağıda kaynak özetlerinde verilmiştir.

Barton vd. (1987), *B. thuringiensis* bakterisinden izole edilen δ endotoksin genini tütün bitkisine aktarmışlardır. 100'den fazla transformat bitki denemesinden yaklaşık olarak % 25'inde transformasyon görülmüş ve bununla beslenen *M. sexta* larvalarının tamamının 4 gün içinde öldüğü gözlenmiştir. Daha dayanıklı bitkilerde denemenin ilk birkaç saatinde larva beslenmesinin çok az olduğu gösterilmiştir.

De Maagd vd. (1996), *cryIAb*, *cryIC* genlerinin hibrit ve hibrit olmayan arasındaki etkiyi yönünden araştırma yapmışlardır. Bu bağlamda *Spodoptera exiqua* (pancar kurdu) zararlısına karşı etkisi belirlenmiş. Yapılan çalışma sonuçlarına göre yapay genlerin etkisi doğal genlere (*cryIAb* ve *cryIC*) oranla yüksek ve ölüm oranı istenilen düzeyin üstünde çıkmıştır.

Stewart vd. (1996), kanolada yaptıkları çalışmalarında, *cryIAc* genine dayanıklı çeşitler elde etmişler. Gen aktarım yöntemi olarak *A. tumefaciens* aracılığıyla yapılmış. *Plutella xylostella* ve *Trichoplusiani* zararlılarına karşı yapılan çalışmada, toplamda 57 adet bitki

materyali kullanılıp 23 adet trasgenik adayı bitkide Southern analizi sonucunda belirlenmiştir. Protein konsantirasyonu seviyesini % 0-0.4 arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Christov vd. (1999), tütünde yaptıkları çalışmalarında, yabani tip genler ve sentetik genlerden oluşan *cryIC* (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bakterisi hattı kullanılmış) genleri ile *rbcS* promotörü kullanılarak genetiği değiştirilmiş bitkiler elde edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Spodoptera litura'ya dirençli bitkiler belirlemişlerdir. Yabani tip gene göre sentetik genlerin (*cryIC*) etkili daha çok olduğu belirlenmiştir. Daha sonrasında bitkilerden 23 tanesinde 3 gün sonrasında % 80-100 arasında zehirlenme belirtisi gösterip ölüm meydana gelmiştir. Protein konsantrasyonu en yüksek RSC23 bitkisinde % 0.01 olarak bulunmuştur.

Wang ve Guo'e (1999) göre *cryIA* (*b&c*) ve GNA genlerini taşıyan pGW4BAI vektörü barındıran *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) hattı ile yapmış olduğu çalışmada, tütün bitkisine gen aktarımı yapılarak transgenik tütün bitkisi elde edilmiştir. Çalışmada kanamisine dirençli 28 bitki belirlenmiş ve PCR, Southern blot analiz yöntemleriyle kesinleştirmiş olup cotton bollworm (Pamuk kılıfı kurdu) (*H. armigera*) karşı yaprak diski analizlerinde tütün bitkilerinin, çok iyi aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Cao vd. (2005), lahana (*Brassica oleracea*)'da *Plutella xylostella*'ya karşı *cryIAc* (*npt- II* ile birlikte) ve *cryIC* genlerini kullanarak hedef böceğe dayanıklı bitkiler elde etmeye çalışmışlardır. 30 adet kanamisin antibiyotiğine dayanıklı, 28 adette higromisin antibiyotigine dayanıklı bitki elde etmişlerdir. Bu bitkilerin bir kısmı yüksek (%0.1'in üzerinde) düzeyde toksin üretmiştir ve *P. xylostella*'ya karşı yüksek oranda dayanıklılık sağlanmıştır. Elde edilen bütün bitkilerde duyarlı larvalara karşı %100 dayanıklılık elde etmişlerdir.

Chen vd. (2005), *cry2A* genini çeltiğe *Agrobacterium* aracılığıyla aktarmışlardır. Yapılan PCR analizinde 102 adet tek bitkiden 71 tanesinin *cry2A* genini içerdiğini belirlemişler. Transgenik bitkilerde *cry2A* protein miktarı 9.65 – 12.11 µg/g arasında değişim göstermiştir. Transgenik bitkilerin Lepidoptera takımına ait çeltik zararlılarına karşı önemli ölçüde koruma sağladığını gözlemişlerdir.

Sanyal vd. (2005), nohutta yaptıkları çalışmada *CryIAc* geninin kullanarak *A. tumefaciens* ile böceklere dayanıklı transgenik bitkiler elde etmeye çalışmışlardır.

Transformasyon frekansını %1.12 olarak belirlemişler. T0 ve T1 bitkilerinde *cryIAc* protein miktarı 14.5-23.5 27 ng/mg olarak belirlemişler. 10 ng/mg'dan daha yüksek ekspresyon seviyelerinde *Helicoverpa armigera*'ya karşı yüksek oranlarda koruma sağlamışlardır.

Zaidi vd. (2005), yaptıkları çalışmalarında Tütünde ST-LS1 (sap ve yaprak spesifik) promotörünün *cry2Aa2* geninin değişik dokulardaki ekspresyon seviyesi ile *Heliothis virescens* larvalarına karşı etkisini araştırmışlardır. Toplamda 30 adet kanamisine dayanıklı bitki elde etmişler bunun 27 tanesinin PCR sonuçları pozitif bulunmuştur. Bioassay sonuçlarında ise yaprakla beslenen larvalarda ölüm oranı % 100, sapla beslenenlerde sırasıyla %41, 44, 35 ve 22, kökte ise %1-5 ölmüştür. Yeşil dokularda belirlenen bu değişik protein oranlarının bitkiye zarar veren böceklerin devamlı toksine mahzur kalma durumunda kazanacakları dayanıklılığa karşı engel oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Bakhsh'a (2010) göre *A. tumefaciens* aracılığıyla NIAB-846 çeşidinin olgun embriyolarının sürgün ucu meristemlerine *cryIAc* genini aktarmıştır. Transformasyon için Rbcs promotör ve *cryIAc* genini içeren pRb-Ac ve 35S promotör ve *cryIAc* genini içeren pk2Ac plazmidlerini taşıyan LBA4404 bakteri hattı kullanılmış. Sürgün ucu meristemleri kökültivasyon ortamına alındıktan sonra sürgün oluşturma ve köklendirme ortamlarına alınmıştır. Daha sonra toprağa alınan aday transgenik bitkiler GUS, PCR, ELİSA ve Southern Blot analizleri ile transgenik bitkiler doğrulanmıştır. Sonuçlar *cryIAc* geninin bitkilerin genomuna entegre olduğunu göstermiştir.

Chuan vd. (2012), *Agrotis ypsilon* böceğine karşı tütün bitkisinin genetik transformasyon yöntemiyle dirençli hale getirilmesi çalışması yapılmış. Önce *cry2Ab4* geni ve *Vip3Aa11* geninin, *Bacillus thuringiensis*'den klonlanmıştır. Sonrasında iki bitki ifade vektörleri pCS2Ab ve pCSvip3A içerisine *cry2Ab4* ve *Vip3Aa11* genlerini aktarımı yapılarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla tütün (*Nicotiana tabacum* L.) içine transfer edilmiştir. Oluşturulan transgenik bitkiler 32 ile 35 arasında pozitif aktivite gösterdiği belirlenmiş ve sonuçlar PCR, RT-PCR ve Western blot analiz yöntemleriyle doğrulanmışlar. Çalışma sonucunda *Agrotis ypsilon* larvalarına karşı dirençlilik %82 oranında öldürücü etki yaptığı tarla ve yaprak analizlerinde gözlemlenmişlerdir. Ayrıca *Vip3Aa11* geninin *cry2Ab4* genine göre daha etkin olduğunu belirlemişlerdir.

Sohail vd. (2012), böceklere dayanıklı tütün bitkisi elde etmek için yapılan çalışmada, *cryIAc* ve *cry2Ab* iki tanesinin aynı zamanda aktarılması yapılmak için tütün bitkisinde denemeler yapılmış olup bitki ekspresyon vektörü kullanılarak tütün bitkisine aktarılmıştır.

Bu bitkilerden 58 tanesinde gen aktarımında başarı sağlanmış olup PCR yöntemiyle de genlerin aktarımı doğrulanmış. Toplam RNA izole edilip çoğaltılmıştır. Daha sonrasında yapraklar üzerine *Helicoverpa armigera* ve *Spodoptera exigua* larvaları konularak 24 saat sonra *S. exigua* larvasında %12 *H. armigera* larvasında ise %62 oranın dirençlilik göstermişlerdir.

Yüceer'e (2012) göre *cryIAC* genin taşıyan EHA101 Pcambia 1301 *A. tumefaciens* hattı ile yapmış olduğu çalışmada, Marfona ve Granola patates çeşitlerinin yaprak ve boğum arası eksplantlarını kullanarak transgenik patates bitkileri elde etmiştir. Transgenik bitkiler PCR ile doğrulanmış olup, yapılan böcek biyotestlerinde transgenik bitkiler üzerinde beslenen patates böceği larvalarında % 80-85 oranında ölüm oluşturduğunu belirtmiştir.

Negawo vd. (2013), *B. thuringiensis* ' den izole edilen *cryIAC* geni bezelyeye gen aktarım çalışması yapılmış olup bitkinin bir sonraki jenerasyonunda (T1) analiz edilmiş ve PCR, Southern blot, RT-PCR ve protein analiziyle tespit edilmiştir. tobacco budworm tütün kurduna karşı yapılan yaprak denemelerinde %85 oranında transgenik bezelye bitkisinin direnç gösterdiği belirlenmiştir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

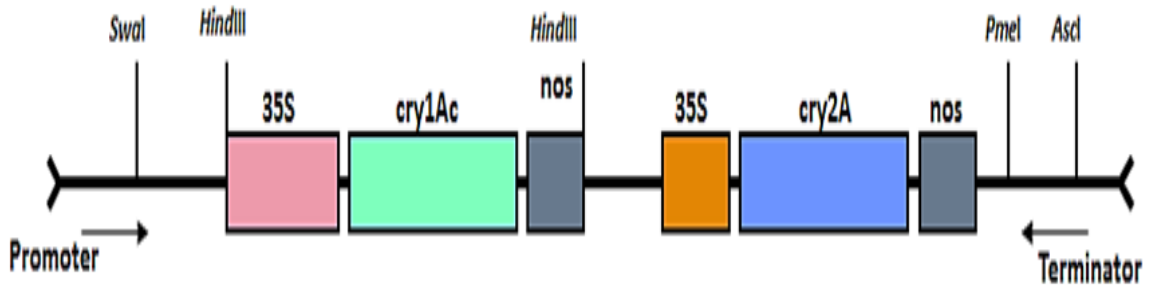
3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Çalışmada Basma ve Nail tütün hatları bitki materyali olarak kullanılmıştır. Deneme materyali olarak kullanılan hatlar Samsun il tarım müdürlüğünden temin edilmiştir. Basma ve Nail hatları yüksek verime sahiptirler ve tütün üretim bölgelerinde ticari olarak yetiştirilmektedirler; ancak her ikisi böcek saldırılarına karşı hassastırlardır.

3.1.2 Bakteri materyali

Bakteri materyali olarak pK2AC plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404 hattı kullanılmıştır. pK2AC plazmid, iki böcek öldürücü gen *cry1Ac* ve *cry2a* ile GUS-INT genini içermektedir. Böcek öldürücü genlerin ikisi de iki kat artırılmış 35S promotör ve nos terminatör tarafından yönetilmektedir (Bakhsh vd. 2009b; Şekil 3.1). Ayrıca plazmid de bitki besin ortamında seçilmesi amacıyla kanamisine dayanıklılığı sağlayan neomisin fosfotransferaz II (*npt-II*) genini ve bitkide solüsyon yardımıyla mavi renk oluşturan GUS (β -glukuronidaz) genide bulunmaktadır. *Agrobacterium*'da ifadesini engellemek için GUS geninin kodlama bölgesine bitkisel bir intron yerleştirilmiştir.



Şekil 3.1. pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında *cry1Ac* ve *cry2A* gösteren bölgelerin şematik görüntüleri. Ayrıca bitki seçmek için kanamisin genini olan *nptII* kullanılmıştır

3.2 Metot

3.2.1 Besin ortamı ve doku kültürü koşulları

Çalışmalarda %3 sakkaroz içeren ve %0,7'lik agar ile katılaştırılan MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962; Çizelge 3,1) temel besin ortamı olarak kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında distile su kullanılmış, duruma göre besin ortamlarına farklı konsantrasyonlar da bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, NAA) ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra, 1.2 atmosfer basınç altında ve 121 °C'de 20 dk otoklavda tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler beyaz floresan ışık altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulanıp 24 ± 2 °C'de tutulmuştur. Yüze sterilizasyonu ve tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Kapların, metal ekipman (bistüri, pens ve makas), cam petri, saf su ve ortamın sterilizasyonunda 1.2 atmosfer, 121°C ve 20 dakikaya ayarlı otoklav kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve miktarları (Murashige ve Skoog 1962)

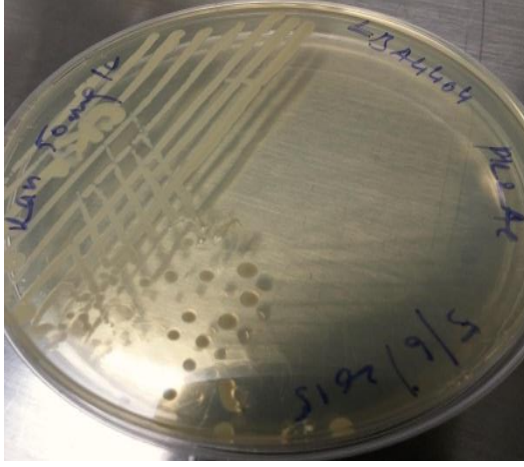
Besin Maddeleri	Miktarı (mg/l)	
Makro besin elementleri	NH ₄ NO ₃	1650,00
	KNO ₃	1900,00
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
	KH ₂ PO ₄	170,00
Mikro besin elementleri	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025
	CoCl ₂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

3.2.2 Tohum yüzey sterilizasyonu

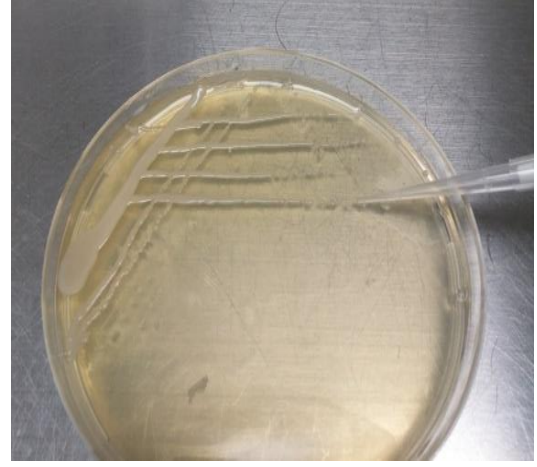
Her iki tütün hattına ait tohumlar % 2 Tween 20 içeren % 30 çamaşır suyu (%5 sodyum hipoklorit içeren çözeltisi) ile 10-15 dk çalkalanarak yüzey sterilizasyonları yapılmıştır. Sterilize edilmiş tohumlar, steril saf su ile 5-7 defa durulanmıştır. Tohumlar kurutulmuş, ardından katılaştırılmış ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. Bu tohumların çimlenmesi sonucu oluşan bitkilerin yaprakları gen transferinde eksplant olarak kullanılmıştır.

3.2.3 Agrobacterium kültürlerinin büyütülmesi

Çalışmada kullanılan *A. tumefaciens* LBA4404 hatları -80°C'de muhafaza edilen gliserol stoklardan alınarak 10 ml'lik steril tüplerde, sıvı LB (Lysogeny broth) besin ortamında, 28°C'de, çalkalamalı inkübatörde 200 rpm'de bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültürleri örnekler alınarak petri kapları içerisinde seçici antibiyotikleri içeren katı LB besin ortamına yayılarak, petri kapları ters çevirmek suretiyle 2 gün süreyle 28°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Katı besin ortamlarında gelişen bakteri kültürleri 2 ay boyunca +4°C'de muhafaza altına alınarak, ihtiyaç durumunda kullanılmıştır. Tütüne gen aktarımında kullanılmak üzere katı besin ortamında gelişen bakteriler, içerisinde seçici antibiyotik olarak 20 µl rifampisin ve 10 µl kanamisin içeren 10 ml'lik sıvı LB besin ortamında, 50 ml'lik steril tüplerde, 28 °C'de ve 200 rpm devirde çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca tekrar büyütülerek, gen aktarımında kullanılmıştır (Şekil 3.2). Seçici antibiyotikler steril stok solüsyonlardan alınıp kullanıldıktan sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir.



a



b



c



d



e



f

Şekil 3.2. *Agrobacterium tumefaciens* 'in LBA4404, pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında cry1Ac ve cry2A genleri içeren bakterilerin LB ortamında çoğaltılması, (a) LB besin ortamında çizilmiş bakterilerden steril pipet ucuyla tek koloni alınması ve rifampisin ve kanamisin antibiyotiklerinin ilave edilmesi. (b) bir gece inkübatörde çoğaltılmaya hazır bakteri. (c) bir gece sonra çoğaltılmış bakteri

3.2.4 *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla tütüne gen aktarımı

Gen aktarımında, *in vitro* kültürde 4-6 hafta büyütülen steril Basma ve Nail tütün çeşitlerine ait fidelerinden alınan yaprak eksplantları kullanılmıştır. Tütüne gen aktarımı aşağıdaki gibi yapılmıştır (Şekil 3.3).

1. pK2AC vektörlerini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı, 50 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin ihtiva eden 10 ml LB sıvı besin ortamı içerisinde bir gece boyunca büyütülmüştür.
2. İnokülasyon için sıvı LB besin ortamı, ko-kültivasyon için katı MS bitki besin ortamı ve tütün seleksiyon için MSD4X2 ortamı (1 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA) + 30 g/l sakkaroz + geniş spektrumlu Duocid (Pfizer İstanbul - *A. tumefaciens*'in gelişimini engellemek amacıyla) + kanamisin (gen aktarımı yapılan bitki seleksiyon için) kullanılmıştır.
3. Steril ortamda gelişen Basma ve Nail tütün çeşitlerinin uygun büyüklükteki yaprakları steril kabin içerisinde ortalama; 0.5 cm çapında kesilerek her 35 adet yaprak eksplantlar üzerine 2 ml *cryIAc* ve *cry2A* genleri içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattına ait sıvı bakteri süspansiyon eklenerek 30 dk süreyle ara ara hafif çalkalanarak inokülasyon yapılmıştır.
4. İnoküle edilen eksplantlar daha sonra katı ko-kültivasyon ortamına aktarılarak 3 gün boyunca büyütme kabininde ko-kültivasyona tabi tutulmuştur.
5. Üç gün sonra eksplantların steril kabin içerisinde steril saf su ve 500 mg/l duocid kullanılarak 10 dk yıkama işlemi yapılarak steril kağıt üzerinde kuruması sağlanmıştır. Yıkama işlemi eksplantların kenarındaki bütün bakterileri ortamdaki uzaklaştırmak için yapılmıştır.
6. Daha sonra eksplantları seleksiyon ortamına her bir petri kabında 10 adet eksplant olacak şekilde 3 tekerürlü olarak yapılarak büyütme kabininde tutulmuştur.
7. Yaklaşık 6 hafta sonra yaprak eksplantları üzerinde hem kanamisine dayanıklı kallus sayımı hemde kanamisine dayanıklı sürgün sayımı yapılmıştır.
8. Gelişen transgenik aday sürgünleri daha sonra 100 mg/l kanamisin ve 500 mg/l duocid içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir.
9. Köklendirilmiş sürgünler (10-15cm) dış ortama alıştırmak amacıyla 3:1 oranında torf ve perlit içeren saksılara şaşırtılarak sera ortama aktarılmıştır.
10. Sera ortamda geliştirilmiş bitkilerden yaprak örnekleri alınarak histokimyasal GUS analizi, PCR analizi, ELİSA testi ve yaprak biyoanalizi ile teyit edilmiştir.



Şekil 3.3. Tütün bitkisine *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404 pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında cry1Ac ve cry2A genleri içeren hattıyla gen aktarım çalışmalarının aşama aşama görünümü (a, b) steril ortamda yapsak disk eksplantların elde edilmesi ve (c, d) LB ortamında agro inokülasyonu (e, f) 30 dk sonra 3 günlük ko-kültivasyon ortamına alınması (g, h) fazla gelişmiş bakterilerin steril su ve antibiyotikle yıkanması ve ardından kurutulması

3.2.5 Histokimyasal GUS analizi

pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi GUS genini içeriyor olması nedeniyle, transgenlerin erken dönemde taranması nispeten kolay olmaktadır. Gen aktarım çalışmalarında sonra, yaprak disklerinde histokimyasal GUS analiz yapılmıştır.

Etki mekanizması, X-gluc (5-Brom-4-klor-3-indolyl glucoronide)'ın β -glukoronidaz enzimi tarafından hidrolizi sonucu renksiz indoksil türevinin oksidatif dimerizasyonu vasıtasıyla güçlü çivit (indigo, mavi) rengi oluşturmaktadır. Histokimyasal gen analizi Jefferson (1987)'in tarif ettikleri şekilde yapılmıştır. X-Gluc solüsyonu için Çizelge 3.2'de gerekli kimyasallar verilmiştir.

Çizelge 3.2. X-Gluc solüsyonu hazırlamak için kullanılan kimyasal ve miktarları

Kimyasallar	Miktar
X-Gluc (5-Brom-4-klor-3-indolyl glucoronide)	1 mM
NaHPO ₄ (pH 7.0)	100 mM
Triton X-100	% 0.1
EDTA	10 mM
Methanol	% 50
Kloramfenikol	100 µg/ml

X-Gluc solüsyonu hazırlandıktan sonra yaprak disk eksplantları solüsyon içerisine daldırılarak 38 °C'de 1-12 saat inkübe edilmiş meydana gelen mavi renk değişimi gözlenmiştir. Sonrasında muamele edilmiş yaprakları çözelti ortamından uzaklaştırılıp %95'lik etanol içerisinde 24 saat bekletildikten sonra GUS gen ekspresyonu belirlenmiştir.

3.2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu

DNA izolasyonu

Transgenik aday bitkilerden genç yaprak örnekleri alınmış olup, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu yaprak dokularından DNA izolasyonu, NucleoSpin Plant II ticari kiti yardımıyla sağlayıcı firmanın kiti ile protokolü doğrultusunda yapılmıştır.

Primer dizileri

Transgenik tütün bitkilerini belirlemek amacıyla *npt-II*, *cryIAc* ve *cry2A* gen dizileri PCR ile çoğaltılmıştır. Çizelge 3.3.'te transgenik tütün bitkileri belirlemek amacıyla *npt-II*, *cryIAc* ve *cry2a* genlerinin çoğaltımında kullanılan primer dizileri görülmektedir.

Çizelge 3.3. Tütünün Basma ve Nail hatlarına ait aday transgenik bitkilerin teyit edilmesinde kullanılan gen bölge, kullanılan primer baz dizileri, gen bölge uzunlukları ile primerlerin bağlanma sıcaklıkları

Gen bölgesi	Primer baz dizini	Çoğaltılan gen bölgesi uzunluğu (bç)	Primerlerin bağlanma sıcaklığı
<i>npt-II</i>	5'-TTG CTC CTG CCG AGA AAG-3' 5'-GAA GGC GAT AGA AGG CGA-3'	780	58
<i>cryIAc</i>	5'-ATGGACAACCCAAACATC-3' 5'-TCATGTCGTTGAATTGAATACG-3'	690	58
<i>cry2A</i>	5'-AGATTACCCCAGTTCAGAT-3' 5'-GTTCCCGAAGGACTTTCTAT-3'	600	58

PCR reaksiyon koşulları ve analizi

Tütün bitkisinden izole edilen DNA örnekleri *npt-II*, *cryIAc* ve *cry2a* genlerinin varlığı açısından PCR analizleri ile test edilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu için gen spesifik primerler kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı, 2 µl 1X PCR tamponu (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ ve 10 mM Tris-HCl), 0.2 µl dNTP (200 µM), 1 µl ileri primer (50 pmol/ul), 1 µl geri primer (50 pmol/ul), 0.1 µl Taq DNA Polimeraz (10 µM), 1 µl genomik DNA (50 ng/ul) ve 14.7 µl ddH₂O kullanılarak 20 µl toplam hacimde olacak şekilde 0.2 ml'lik santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır.

Örneklerin agaroz jel elektroforezi

PCR sonuçları, %1 agaroz jel ve 0.5X TBE (Tris- borat EDTA) tamponu kullanarak jel elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir. Buna göre %1'lik agaroz 0.5X TBE çözeltisi içerisinde mikrodalga fırında eritilmiş ve 50-60°C ye kadar soğutulduktan sonra DNA'nın UV'de görüntülenebilmesi için 4 µl etüdyum bromit eklenmiştir. Sonrasında iki tarafı bant ile kapatılmış, taraklı jel kalıbına dökülmüştür. Agaroz katıldıktan sonra bantlar ve tarak çıkartılmış, jel kabı 0.5X TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR sonucu elde edilen örnekler üzerine 2 µl yükleme tamponu eklenmiş ve karışım kuyulara

yüklenerek 6,7V/cm gerilimde, 45 dk koşturulmuştur. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilerek fotoğraflanmıştır.

3.2.7 ELİSA testi ile *cry1Ac* genin ekspresyon analizi

Aday transgenik tütün bitkilerinde *cry1Ac* geninin ifadesini yaprak örneklerinde belirlenmesi için Envirologix (Cat # AP051) kiti kullanılarak ELİSA testi yapılmıştır. ELİSA testi için 20 mg taze yaprak örneğine 200 µl ekstraksiyon tamponu ilave edilerek ELİSA kitinde tarif edildiği şekilde ölçümler yapılmıştır. OD₄₅₀ değeri ayarlandıktan sonra ELİSA okuyucusu ile *cry1A*'nin protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.8 Yaprak biyoanalizi

Transgenik tütün bitkilerdeki böcek öldürücü genlerin toksit potansiyelini belirlemek için laboratuvarında böcek biyoanalizi yapılmıştır. Hedef böceklere karşı dayanıklılık sergileyen aday bitkileri belirlemek için önceden aç olan 2. instar safhasındaki patates güvesi (*Phthorimaea operculella*) larvaları aday transgenik tütün bitkilerinin yaprakları ile beslenmiştir. Kontrol amacıyla transgenik olmayan tütün yapraklarında kullanılmıştır. Larva sayısı az olduğu için bir kez yapılmıştır ve bir yaprak için bir larva kullanılmıştır. Larvaların ölüm oranları 48 saat sonra kaydedilmiştir.

3.2.9 T₁ bitkilerinde tohumların çimlendirilmesi

Aday transgenik tütün bitkilerin sera ortamında büyütülerek oluşturduğu çiçeklerin kendi polen ve yumurtasıyla döllenmesi (kendilenmesi) sonucu tohum oluşturmuştur. Kendilenmiş transgenik bitkilerin tohumları, %2 Tween 20 den %30 çamaşır suyu (%5 sodyum hipoklorit içeren çözeltisi) ile 10-15 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sonrasında tohumlar steril saf su ile 5-7 defa durulanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan LBA4404 pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesi içindeki 35ScaMV altında *cry1Ac* ve *cry2A* genleri ve *nptII* geni bulunmaktadır. Bitki besin ortamında seçilimi mümkün olduğu için (*nptII*) kanamisin dirençlilik geninin olup olmadığı test edilmiştir. Toplam 20 adet Nail ve Basma aday transgenik hatlar kullanılarak 100 mg/l kanamisin içeren MS besi ortamı hazırlanmış ve her hattan 50'şer adet steril tohum kanamisin içeren seçici ortama 3 tekrarlı olarak ekilmiştir. Petri kapları iklim odasında/ kabininde 24 °C altında büyümeye bırakılmıştır. 2 hafta sonra ekilen tohumlar çıkış yapıp yapmadığına

bakılarak sonuçlar ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca ıkış yapan tohumlardan rastgele bir tohum seçilerek histokimyasal GUS analizi yapılmıştır.

3.2.10 Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak yapılmış olup, her bir tekerrürde 10 eksplantın kültüre alındığı 100×10 mm’lik petri kutuları kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayarda “SPSS for Windows” ki kare programı ile analiz edilmiştir.

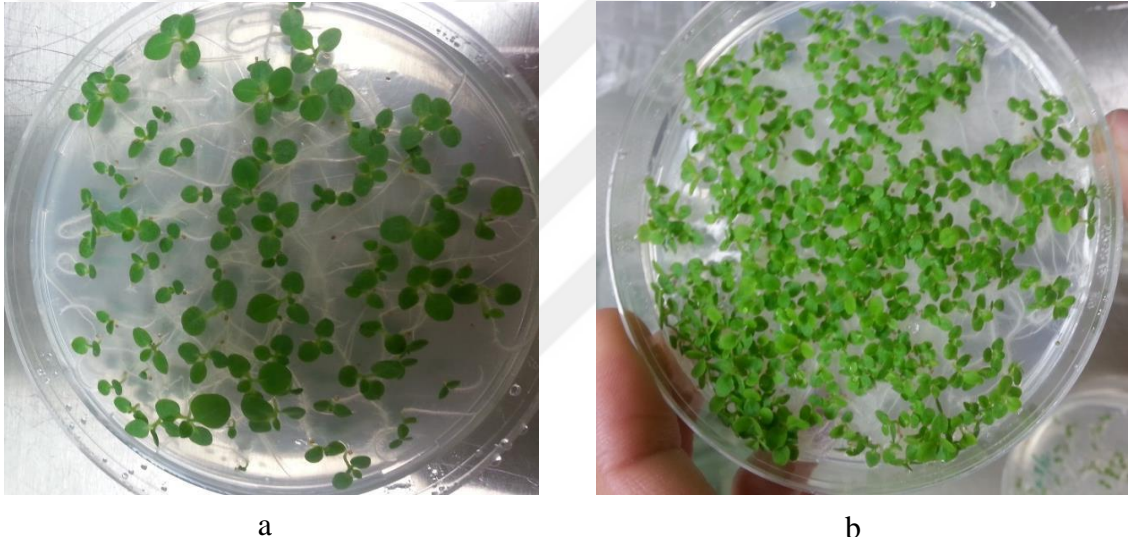


BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Tütün Hatlarının Tohum Yüzey Sterilizasyonları

Her iki çeşidin tohumları, %1.5 sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15-20 dk çalkalanarak sterilize edilmiştir. Tohumlar, steril distile su ile 5-7 kez durulanmış ve MS besin ortamı içeren petrilerde kültür alınmıştır. Kontaminasyon ve çimlenme oranlarına ilişkin veriler 6-7 gün sonra toplanmıştır. Sonuç olarak, Basma hattına ait tohumlarda % 80; ve Nail hattına ait tohumlarda % 90 oranında çimlenme meydana gelmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Basma (a) ve nail (b) tütün hatlarının tohumlarının MS besin ortamında çimlendirilmesi

4.2 Tütün Hatlarının Agrobacterium Aracılığıyla Genetik Transformasyonu

Basma ve Nail tütün hatlarının yaprak diskleri kullanılarak yapılan transformasyon büyütme aşamasına bırakıldıktan sonra kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşumu genlerin (*npt-II*, *cryIAc* ve *cry2A*) bitki hücresinin kromozomuna bağlanması sonucunda oluşan hücrelerde gerçekleşmiştir. Kromozomda değişikliğe uğramamış yaprak diskleri ise 4-6 gün sonra sararmış, ardından 6-12 günlük süre boyunca kararmış ve kallus oluşturmamıştır. Kallus oluşturmuş yaprak disklerinden 20-25 gün sonra sürgünler meydana gelmiştir. İnokülasyondan 5 hafta sonra tütün yaprak eksplantları üzerinde kanamisine dayanıklı transgenik aday sürgünlerin sayımı yapılmıştır (Şekil 4.2). Kanamisine dayanıklı sürgünler kesilerek, kanamisin içeren MS besin ortamında köklendirilmiş (Şekil 4.3) ve iyi

bir büyüme gerçekleştiren (Şekil 4.4), köklenen sürgünler toprağa aktarılacak sera ortamında büyütülmüştür (Şekil 4.5). Tüm bu kanamasına dirençli bitkiler normal bir fenotip oluşturmuşlardır. Seçicilik sağlayan kanamisin ile *Agrobacterium* arasında iyi bir dengenin, antibiyotiye dirençli bitkilerin oluşmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir (Silva ve Fukai, 2001). Saksıya aktarılan bitkiler iyi bir şekilde büyümüş ve kendi çiçeklerinden polen ve yumurta hücresinin döllenmesi ile tohum oluşturmuştur. Bu çalışma sonucunda kallus oluşumu, eksplant başına sürgün oluşumu, kök/sürgün oranı verileri ve transformasyon verimliliği ile ilgili bilgiler Çizelge 4.1’de toplanmıştır.

Çizelge 4.1. Basma ve nail tütün hatlarının transformasyon parametreleri verileri

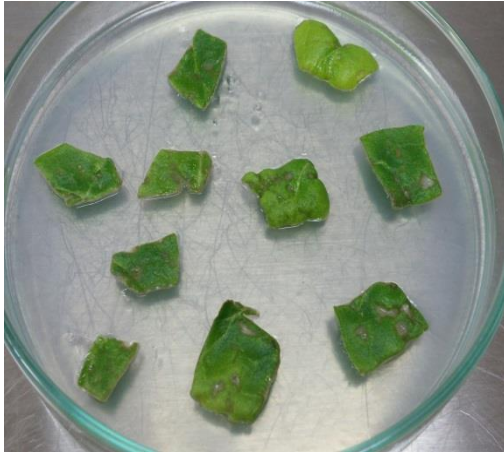
Hatlar	Kullanılan Toplam Eksp lant sayısı (adet)	Elde edilen dirençli kallusların oranı (%)	Elde edilen eksplant başına Sürgün sayısı	Elde edilen sürgünler başına Kök sayısı	Toprağa aktarılan bitki sayısı (adet)	Elde edilen PCR pozitif Transgenik bitki sayısı (adet)	Elde edilen PCR pozitif Transgenik bitki oranı (%)
Basma	800	85,625	105	105	40	22	55
Nail	800	63,75	53	53	40	3	7,5

Çizelge 4.1’de gösterilene göre her bir hattın 800 adet yaprak eksplantı kesilmiştir ve her eksplant başına sürgün Basma çeşitinden 105 adet elde edilirken Nail çeşidinde 53 adet sürgün elde edilmiştir. Sürgünler 10-15 cm boyuna geldiklerinde köklendirme ortamına aktararak uygun koşullarda sürgünlerin tamamı kök oluşturarak Basma çeşitinden 105 adet, Nail çeşitinden ise 53 adet tam teşekküllü aday transgenik tütün bitkileri geliştirilmiştir. Elde edilen bitkilerden her birinden 40’ar adet toprağa aktararak büyüme ve gelişmesi sağlanmıştır.

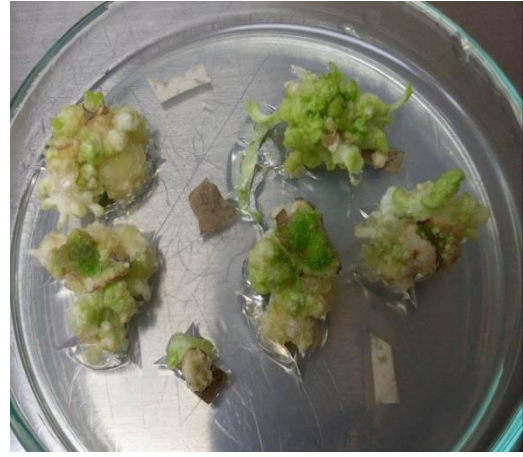
Bölgesel alanda yetiştirilen iki tütün çeşidi Basma ve Nail *Agrobacterium* aracılığıyla genetik olarak değişikliğe uğratılmıştır. Bu çalışmada, tütünde genetik değişiklik için bazı düzenlemeler yapılarak Horch vd., (1985)’nin daha önce tarif ettiği yöntem takip edilmiştir. Genel olarak Solanaceae familyasına ait türlerin *in vitro* rejenerasyon kabiliyetleri yüksek olup, *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı oldukça hassastırlar. Özellikle tütün, gen aktarımı çalışmalarında model bitki olarak kullanılmakta ve değişik organizmalardan izole edilen

genler öncelikle bu bitkide test edilmektedir (Gürel 2001; Özcan vd. 2004). Transformasyon işleminde *Agrobacterium* suşları da hem enfekte etmesi hem de gen transferindeki etkisi bakımından oldukça önemli rol oynamaktadır (Chetty vd., 2013; Bakhsh vd., 2014). Transformasyon için en uygun *Agrobacterium tumefaciens* suşunun LB4404 olduğu tespit edilmiştir (Bakhsh vd., 2015b).

Bitki transformasyonu genlerin işlevsizleştirilmesi ya da bitkiye yeni bir gen aktarılması için oldukça güçlü bir tekniktir. Bitki transformasyonu tekniği farklı türlerdeki istenilen özelliğin veya geleneksel yöntemlerle böcek dirençliliği, herbisit dirençliliği ya da donma veya kuraklık gibi abiyotik streslere tolerans gibi aktılması oldukça zor hatta imkansız özelliklerin hedef bitkiye aktarılmasına imkan sağlamaktadır. Türler arası gen transferinde doğal engellerden dolayı üretkenlikte düşme gibi zorluklar da ortaya çıkmaktadır (Ribas vd., 2006).



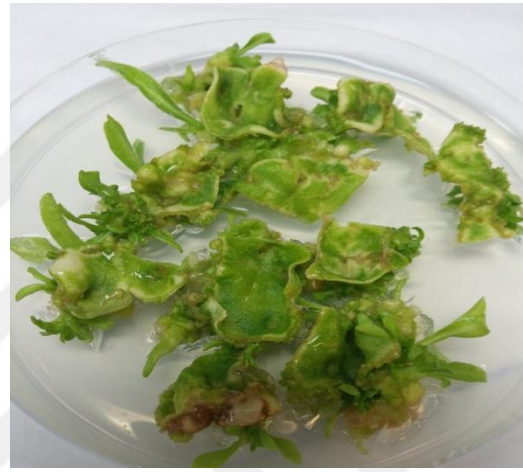
a



b



c

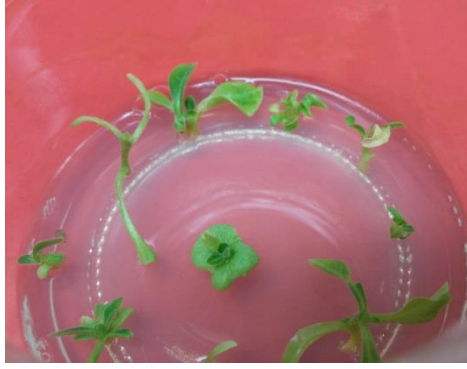


d



e

Şekil 4.2. Basma ve nail tütün hatlarının genetik transformasyon aşamaları. (a) basma tütün hatına ait 10 adet eksplantın seleksiyon ortamında alınması, (b) 3 haftalık basma (c) nail hatlarına ait eksplantları üzerinde kallus oluşması, (d) 5-6 haftalık basma ve (e) nail hatlarına ait yaprak diski eksplantlarında kallus oluşturmadan direk sürgün oluşumu



a



b



c



d

Şekil 4.3. Basma ve nail tütün hatlarının genetik transformasyon aşamalarının devamı. (a) sürgün oluşturan eksplantların 100 mg/l kanamisin bulunduran seleksiyon ortamına aktarılması, (b) sürgünlerin büyümesi, (c) tekrar yeni seleksiyon ortamında alt kültürü ve (d) bitkilerin büyümesi



a



b

Şekil 4.4. Basma ve nail tütün hatlarının genetik transformasyona uğramış (a, b) kök ve sürgün oluşturmuş bitkilerin dış ortama aktarılmaya hazır aday bitkiler



Şekil 4.5. Basma ve nail tütün hatlarına ait genetik transformasyona uğramış bitkilerin (a) sera ortamında alıştırılması, (b, c) büyümesi ve (d) çiçeklenmesi

4.3 Aday Transgeniklerin Moleküler Analizleri

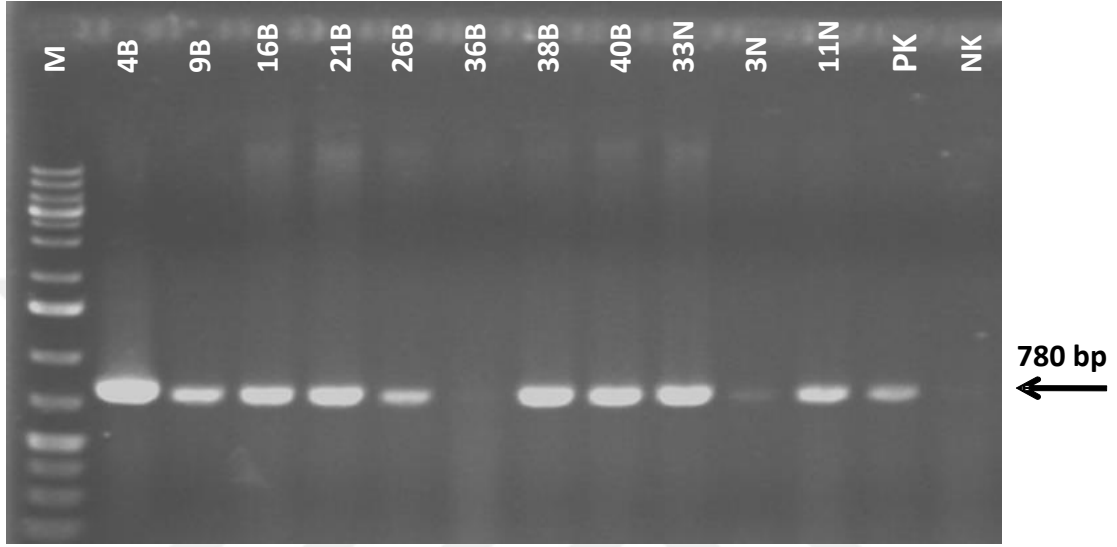
Serada yetişen her iki çeşidin birincil transgeniklerde böcek öldürücü genlerin yerleştiğini doğrulamak amacıyla çeşitli moleküler analizler yapılmıştır.

4.3.1 Gen aktarımın doğrulanması

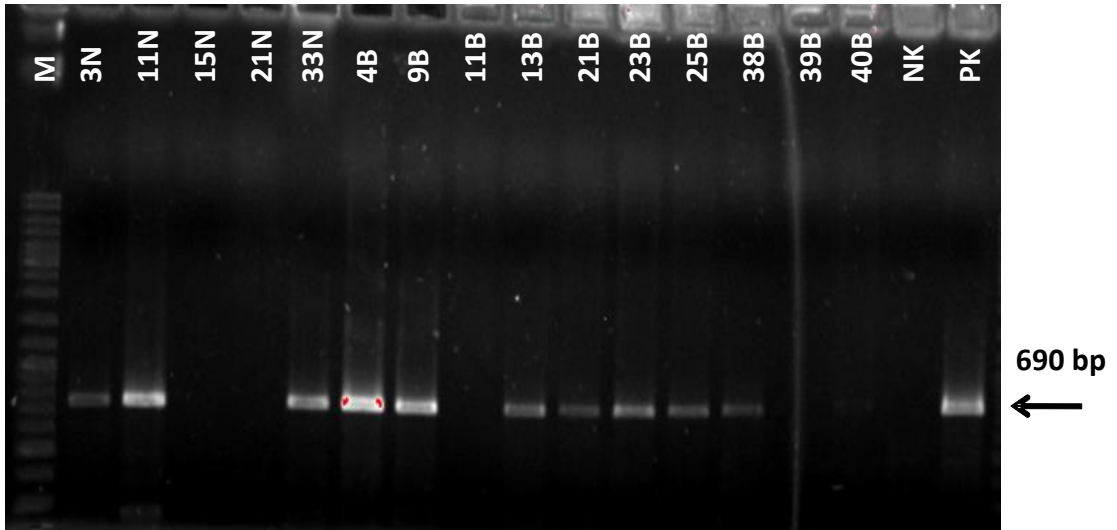
Aday transgenik bitkilerde yapılan PCR analizi *nptII*, *cryIAc* ve *cry2A* genlerinin bu tütün hatlarına dengeli bir şekilde girdiğini doğrulamıştır. Transgenik bitkilerde *nptII*, *cryIAc* ve *cry2A* genlerinin sırasıyla 780 bp, 690 bp ve 600 bp uzunluğundaki parçaları PCR ile

çoğaltılmıştır (Şekil 4.6-8). PCR analizi sonucunda negatif kontrolde her hangi bir çoğalma belirlenmemiştir.

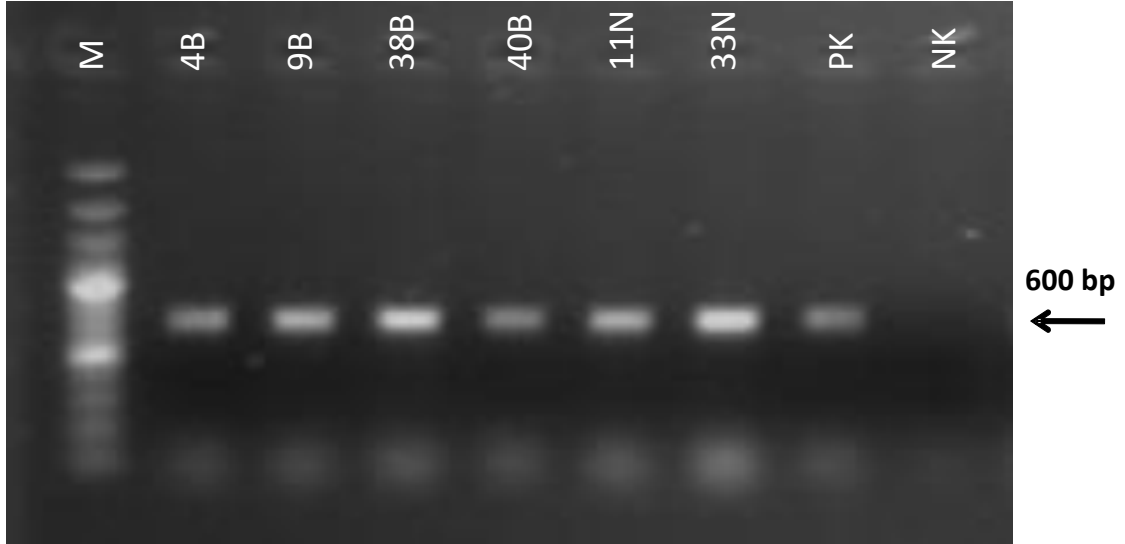
Toprağa aktarılan toplam 80 adet aday transgenik bitkilerin hepsi *cry1Ac*, *cry2A* ve *nptII* genlerinin varlığını doğrulamak için PCR analizine tabi tutulmuştur. Sonuçlar yabancı genlerin uygun bir biçimde tütün bitkilerine yerleştiğini göstermiştir.



Şekil 4.6. Basma ve nail aday transgeniklerde *nptII* geninin çoğaltımı. (M):1 kb DNA marker, (B): Basma hattının aday transgenik bitkileri, (N): Nail hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol (Plazmid DNA), (NK): Negatif kontrol



Şekil 4.7. Basma ve nail aday transgeniklerde *cry1Ac* geninin çoğaltımı. (M): 1 kb DNA Marker, (B): Basma hattının aday transgenik bitkileri, (N): Nail hattının aday transgenik bitkileri (NK): Negatif kontrol, (PK): Pozitif kontrol (Plazmid DNA)



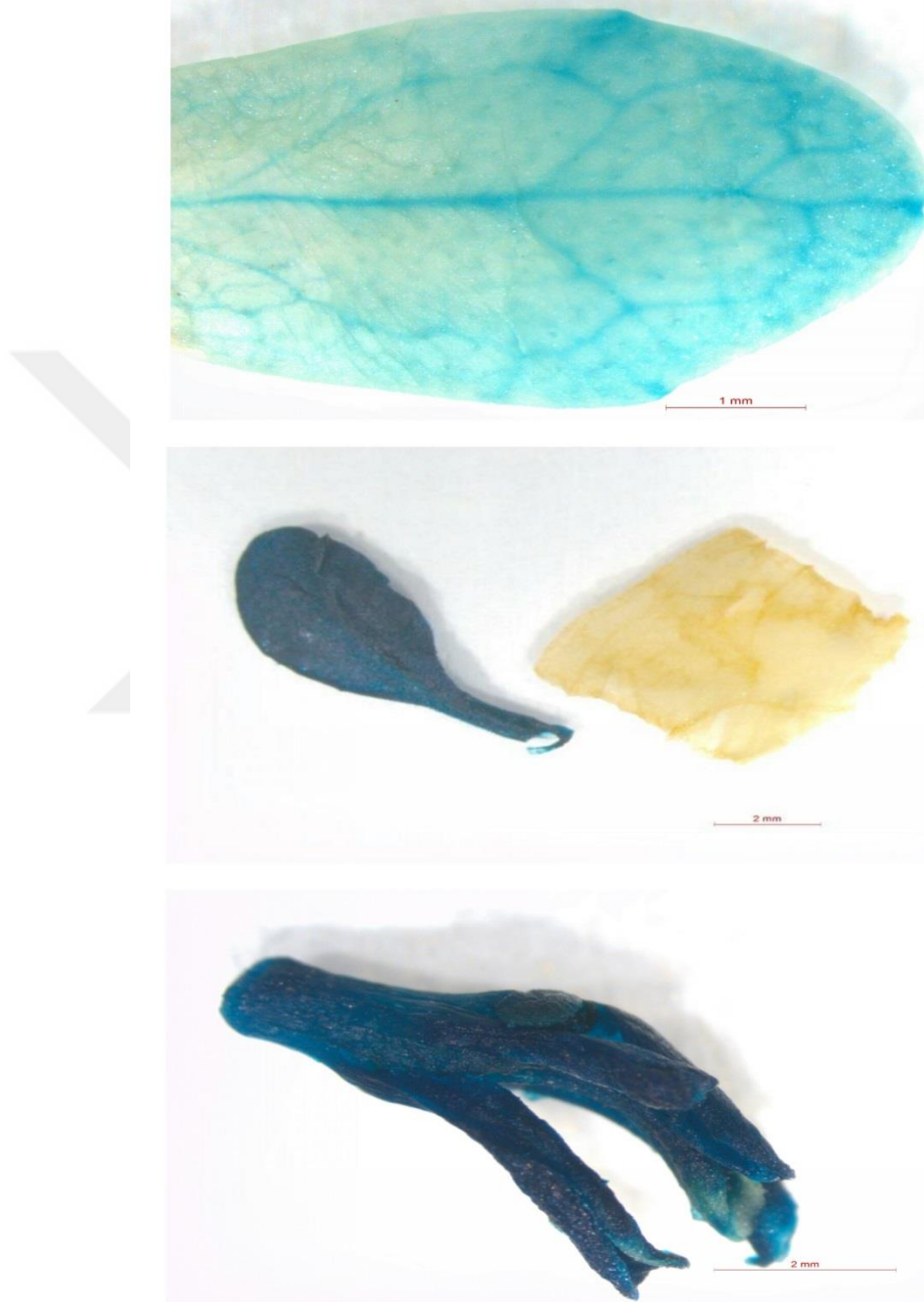
Şekil 4.8. Basma ve nail aday transgeniklerde *cry2A* geninin çoğaltımı. (M): 1 kb DNA marker, (B): Basma hattının aday transgenik bitkileri, (N) Nail hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol (Plazmid DNA), (NK): Negatif kontrol

PCR analizi sonuçlarına göre *nptII*, *cryIAc* ve *cry2A* genlerinin 3'ünü birden aynı bitkiye aktarıldığını göstermiştir. Bu bakımından PCR pozitif olan aday transgenik bitki sayısı Basma hattında 22 adet olarak kaydedilirken, bu sayı Nail hattında 3 adet olarak belirlenmiştir. Transformasyon oranı ise Basma hattında %55, Nail hattında %7.5 olarak belirlenmiştir. Her 2 hattın genotip arasındaki farklılığı bitki transformasyonuna belirgin şekilde etkilenmiştir. Her ne kadar Nail hattında transformasyon oranı düşük çıksa da ortamlarda kanamisin kullanılması bitkilerin rejenerasyonu için iyi bir seleksiyon sistemi olduğu sonucunu değiştirmemiştir. Ayrıca bitkilere gen aktarım çalışmalarında, seleksiyon ortamından transgenik olmayan bitkilerin kaçtığına dair sonuçlar daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (McCormick vd., 1986; Maqbool vd., 2010; Khan vd., 2011; Bakhsh vd., 2015b). Öte yandan Sohail vd., (2012)'nin yaptıkları çalışmalarında tütün bitkisine *cryIAc* ve *cry2Ab* genlerinin aktarılması çalışması yapılmış, toprağa 58 adet bitki aktarılmış ve transformasyon oranı %77 olarak ölçmüşlerdir. Gulbitti-Onarici vd., (2009)'nin tütün bitkisinde *cryIAc* transformasyonu çalışmasında toprağa 20 bitki aktarılmış ve PCR sonucunda 14 tanesinin pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

4.3.2 Histokimyasal GUS analiz

pK2AC plazmidinin T-DNA bölgesinde GUS genini içeriyor olması nedeniyle, transgenik bitkilerin erken dönemde taranması nispeten kolay olmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada transgeniklerin taranması için histokimyasal GUS analizi uygulanmıştır. Bu amaçla, yaprak diskleri ve sürgünleri X-Gluc çözeltisine daldırılmış ve 37 °C'de gece boyu inkübe

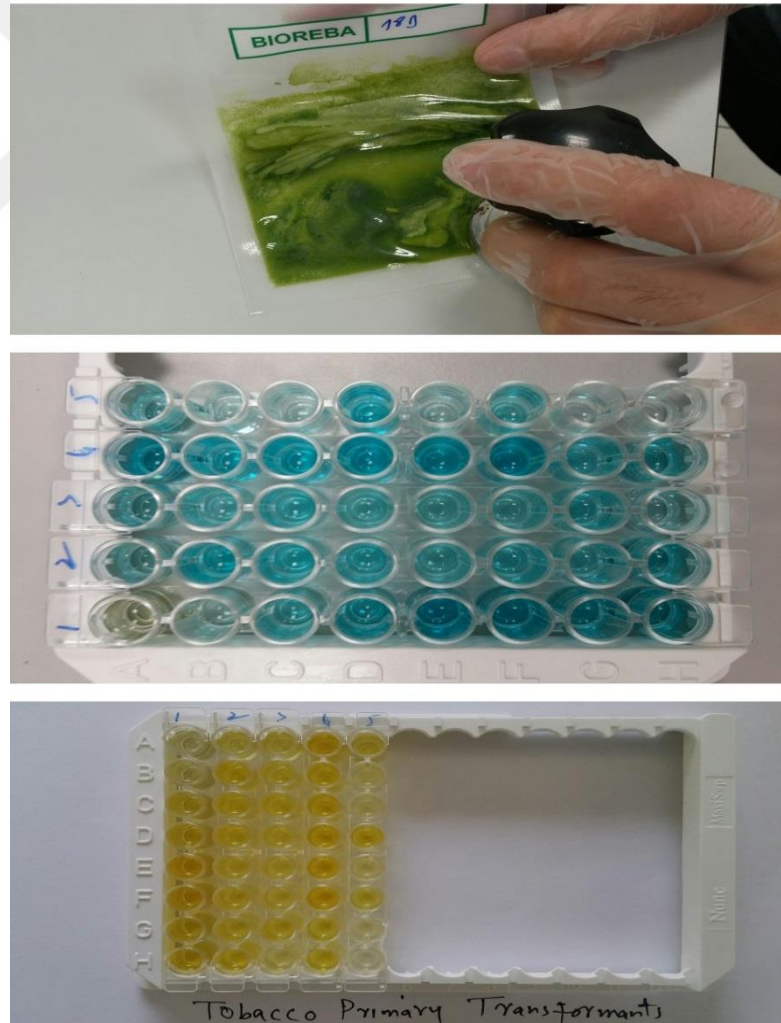
edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kontrolle mukayese edildiğinde aday bitkilerinden kanamisine dirençli yaprak örneklerinde mavi boyaması ile GUS ekspresiyon gözlenmiştir (Şekil 4.9). Ardından, boyama çözeltisi ortamdaki uzaklaştırılmış ve dokular daha berrak hale gelene kadar %95 etanol ile yıkanmıştır.



Şekil 4.9. Yaprak, sürgün ve kesilmiş eksplantların histokimyasal GUS analizi. Mavi renkli olan bitki kesitleri aday transgenik bitkiyi gösterirken mavi renkli olmayanlar transgenik adayı değildir

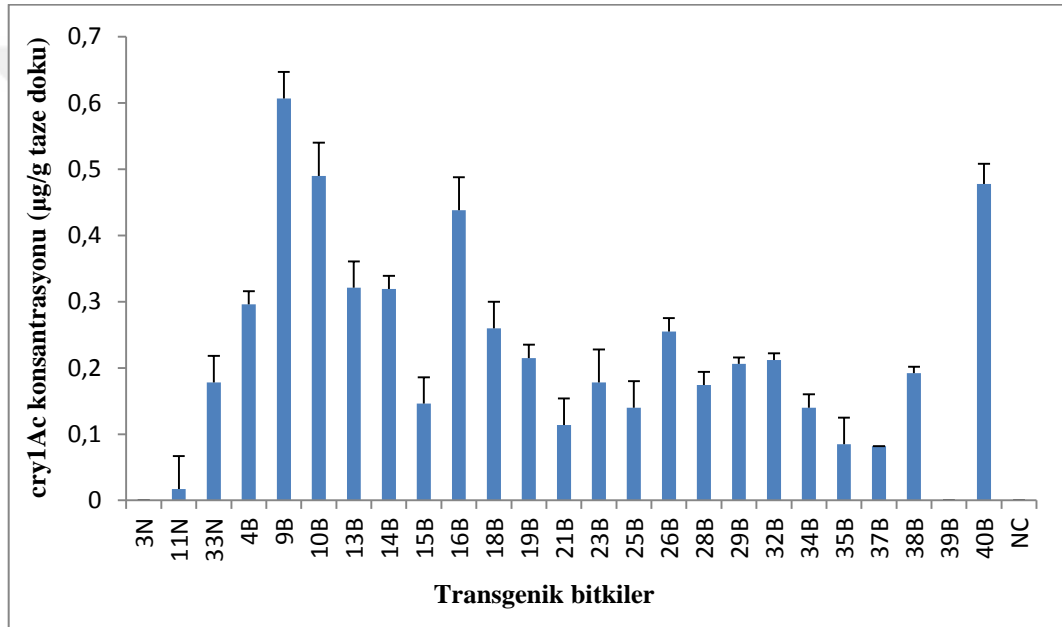
4.3.3 ELISA testi ile cry1Ac genin ekspresyon analizi

Her iki hattan geliştirilen aday transgenik bitkilerin yapraklarında ifade edilen *cry1Ac* proteinin miktarının belirlenmesi için Envirologix kiti (Cat# AP051) kullanılarak çift sandviç antikor enzim ilintili immün test (double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) yöntemi kullanılmıştır (Şekil 4.10). ELISA sonuçları, aday transgenik bitkilerin PCR sonucu pozitif çıkmış bitkilerde yapılarak toplam 23 adet bitkilerde *cry1Ac* proteinin ifade edildiğini göstermiş fakat *cry1Ac* proteinin ifade düzeyleri bitkilere göre farklı oluşturdukları (Şekil.4.11)'de gösterilmiştir. Bulgular ve çizelge hali (Ek-A) verilmiştir. Şekil 4.11'de gösterildiği üzere en yüksek *cry1Ac* protein konsantrasyon içeriği 9B çeşidinde kaydedilirken, en düşük konsantrasyon 11N çeşidinde belirlenmiştir. Yapılan testte iki hat için (3N ve 39B) protein konsantrasyonu hiç üretilmediğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Aday transgenik bitkilerdeki cry1Ac protein konsantrasyonunu belirlemek için yapılan ELISA testinin yapım görünümü.

cryIAc proteininin ekspresyon sonuçlarına göre her iki hattan geliştirilen farklı transgenik hatlarda ifade seviyeleri değişiklik göstermiştir (Şekil 4.11). *cryIAc* proteininin transgenler arasındaki bu değişiklik Karanthi vd. (2005), Xia vd. (2005), Olsen vd. (2005), Bakhsh vd. (2009b) ve Adamczyk vd. (2009), tarafından yapılan farklı çalışmalarda da belirtilmiştir. Protein ifadesindeki bu seviye farklılığı genin nükleotid sekansı, promotor ve genin DNA’da girdiği bölge, transgen kopya sayısı, bulunduğu hücrenin çevresi ve çevresel faktörlerden kaynaklı olabilir (Hobbs vd., 1993; Guo vd., 2001; Rao, 2005). Bu sebeple, fizyolojik seviyelerin yanı sıra moleküler genetik araştırmaların da yürütülmesiyle transgenlerin ifadesindeki seviye farklarının ve transgenik bitkilerdeki insektisit proteinlerdeki kantitatif değişimlerin sebepleri anlaşılabilir.



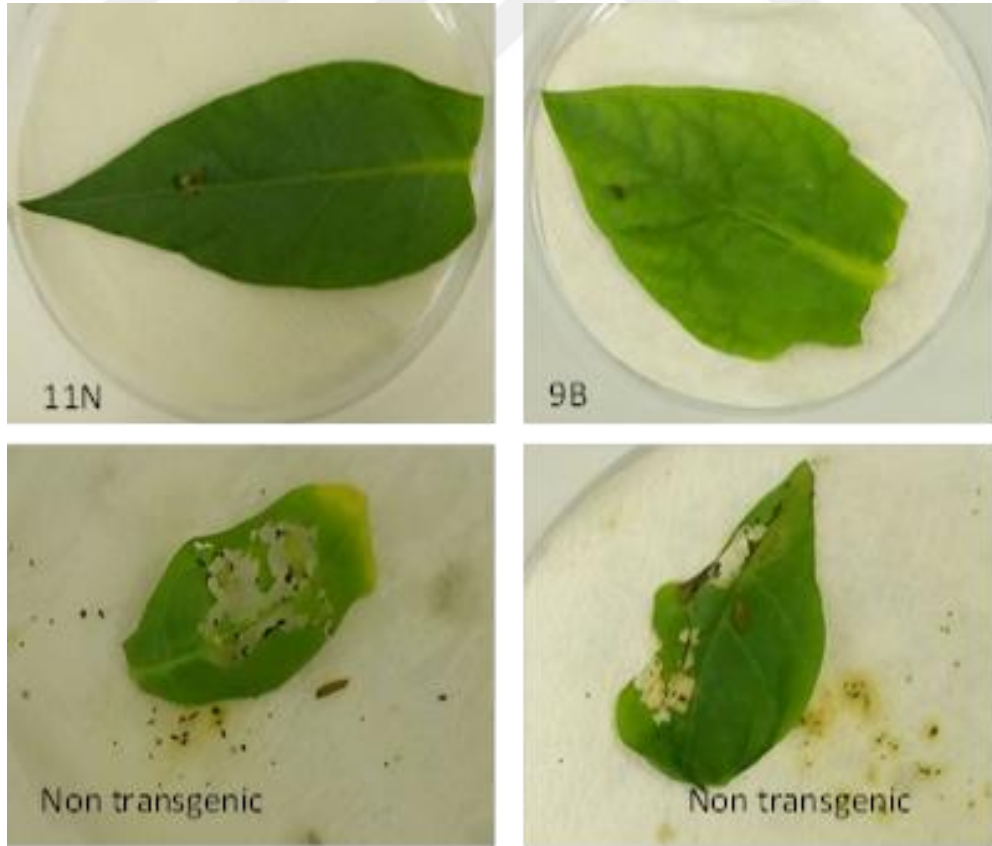
Şekil 4.11. Basma ve nail transgenik hatlarının ELİSA testi ile *cryIAc* ekspresyonu. N: Nail transgenik bitkiler, B: Basma transgenik bitkiler, NC: Negatif kontrol

Bundan önceki çalışmalarda, Gulbitti-Onarici vd. (2009), tütün bitkisine AoPR1Ac promotor ile *cryIAc* gen aktarımında yaptıkları çalışmada, *Heliothis virescens* ve *Manduca sexta* larvalarının yaprağı ısırmasında 72 saat sonrasında ölçmüşler ve %0.083 en yüksek konsantrasyon oranına ulaşmışlardır. Yun vd., (2008)’de yaptıkları bir diğer çalışmalarında, tütün bitkisine *cryIAc* ve *cryIIe* genlerinin transformasyonu yapılmış. Yaptıkları çalışmasında ELİSA test sonucuna göre *cryIAc* protein içeriği %0,182 olarak, *cryIIe* %0,124 olarak bulmuşlardır.

4.4 Yaprak Biyoanalizi

Transgenik tütün bitkilerdeki böcek öldürücü genlerin toksit potansiyelini belirlemek için laboratuvarında böcek biyoanaliz yöntemi kullanılmıştır. Hedef böcekler patates güvesi (*Phthorimaea operculella*) larvaları Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölüm serasından 2. instar safhasında alınmıştır. Larva sayısı az olduğu için yaptığımız çalışmada Basma ve Nail'den rastgele 10 aday transgenik bitkiler test edilmiştir. 11N, 33N, 9B ve 40B aday transgenik bitkiler *Phthorimaea operculella* larvalarına karşı dayanıklılık sergileyerek larvaların bitki yapraklarıyla beslenmeye başlamasından 48 saat ile 72 saat arasında zehirlenerek %100 ölümlü sonuçlanmıştır (Şekil 4.12). Kontrol bitkilerde yapılan denemede de larva ölümü gerçekleşmiştir.

Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde önceki çalışmalarda da olduğu gibi (Baksh, 2010; Khan vd., 2011; Mogali vd., 2011; Hussain vd., 2014), elde edilen bireysel transgenik bitkilerde T-DNA pozisyon etkisi ve kopya sayısına bağlı olarak (Özcan vd., 2004) böcek ölümlerinde önemli bir varyasyon yaşanmıştır.



Şekil 4.12. cry1Ac ve cry2A genlerinin aktarıldığı basma(B) ve nail(N) aday transgenik bitkilerine ait yapraklarda biyoanaliz test çalışmaları sonucunda zehirlenerek ölmüş olan *Phthorimaea operculella* larvaları

4.5 T₁ Transgenik Tütün Bitkilerinin Tohum Analizi

Sera ortamında büyütülen birincil transgenik Basma ve Nail tütün hatlarının oluşturduğu çiçeklerinden oluşan tohumlar kullanılmıştır. Tohumların yüzeyi %1.5 sodyum hipoklorit içeren çözeltisi yardımıyla steril edilmiştir. *nptII* geninin (kanamisin dirençlilik geni) transgenlerde kalıtımını belirlemek amacıyla Nail ve Basma bitkilerinin 20'şer adet hattında ki-kare testi uygulanmıştır.

Ki-kare analizlerine göre, çimlenen tohumlarda *nptII* geni Mendel dağılımına göre ayrılma göstermiştir. Sadece beş hat (10B, 19B, 29B, 32B ve 35B) beklenen 3:1 oranındaki Mendel açılımını göstermiştir, geri kalan hatlar orantısız bir dağılım Çizelge 4.2'de göstermiştir. Ekilen tohumlardan rasgele seçilen ve iyi gelişen hatlardan histokimyasal GUS analizine tabi tutularak mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Transgenik bitkilerde yabancı genin alfalfa (Micallef vd., 1995), çeltik (Duan vd., 1996), mısır (Fearing vd., 1997), pamuk (Canming vd., 2000; Xia vd., 2007; Daud vd., 2009) ve börülcede (Ivo vd., 2008) Mendel'e göre kalıtım gösterdiği gözlenmiştir. Fakat çoğu durumda yabancı gen Mendel dağılımından daha ziyade orantısız bir dağılım göstermiştir (Spencer vd., 1992; Somers vd., 1994; Altman vd., 1996; Wu vd., 2002; Rashid vd., 2008; Bakhsh 2010).

Bu orantısız Mendel dağılımının sebebi, transgenlerde yabancı genlerin farklı birden fazla bölgede bulunarak farklı dağılım göstermesi olabilir (Hashmi vd., 2011). Çizelge 4.2'deki sonuçlara göre, beş hat tekbir dominant gen içermektedir ki bunlardan birisi de ıslah programları için umut verici bir aday olarak görülebilir.

Çizelge 4.2. cry1Ac ve cry2A genlerinin aktarıldığı basma(B) ve nail(N) aday transgenik bitkilerine ait T1 transgenlerindeki nptII geni uyumluluğunu değerlendirmek için ki-kare testi

T1 Transgenleri (Tekrar başına her hatta 50 tohum kullanılmıştır)	Gözlenen (G)		Beklenen (B)		χ^2 değeri $=\sum (G-B)^2/B$
	Kanamisine dirençli	Kanamisine duyarlı	Kanamisine dirençli	Kanamisine duyarlı	
11 N (Nail)	45	5	37,5	12,5	6,00
4B (Basma)	50	0	37,5	12,5	16,66
9B (Basma)	17	33	37,5	12,5	44,82
10B (Basma)	32	18	37,5	12,5	3,22
13B (Basma)	48	2	37,5	12,5	11,76
15B (Basma)	16	34	37,5	12,5	49,3
16B (Basma)	21	29	37,5	12,5	29,06
18B (Basma)	50	0	37,5	12,5	16,66
19B (Basma)	40	10	37,5	12,5	0,66
21B (Basma)	26	24	37,5	12,5	14,1
23B (Basma)	46	4	37,5	12,5	7,7
25B (Basma)	29	21	37,5	12,5	7,7
26B (Basma)	31	19	37,5	12,5	4,5
28B (Basma)	50	0	37,5	12,5	16,66
29B (Basma)	34	16	37,5	12,5	1,3
32B (Basma)	39	11	37,5	12,5	0,24
34B (Basma)	50	0	37,5	12,5	16,66
35B (Basma)	42	8	37,5	12,5	2,38
37B (Basma)	46	4	37,5	12,5	7,7

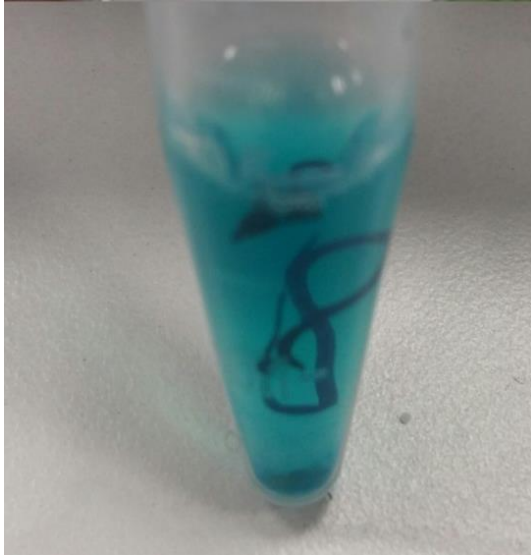
Ki kare testine ($df=1$) göre belirlenen %5'lik olasılık önemine göre değer 3,84 çıkmıştır.



a



b



c



d

Şekil 4.13. cry1Ac ve cry2A genlerinin aktarıldığı basma(B) ve nail(N) hatlarına ait aday transgenik tütün bitkisinden oluşan tohumlarından gelişen bitkilerde (a, b) kanamisinli ortamda seleksiyon ve (c, d) GUS histokimyasal analizi ekspresyonu

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Tütün, tarım ve sanayi açısından doğal olarak Türkiye ekonomisi için stratejik bir role sahiptir. Bunun yanında, tütün tarımında çeşitli sorunlar bulunmakta ve bunlardan birisi de tütün üretiminde önemli kayıplara neden olan böcek zararlılarıdır. Tütün bitkisine zarar veren yaygın böcek zararlıları çeşitli kurtlar, yaprak biti, yaprak çekirgeleri ve toprak nematodları olup, bunların içerisinde kurtlar en yaygın olanlarıdır. Tütün bitkisi hayat döngüsünün her aşamasında ve depolarda çeşitli böcek türlerinin saldırısına uğramakta ve zarar görmektedir. Bu böceklere karşı ilaç kullanmasına rağmen tarımı yapılan tütünde yılda 100 milyon dolar ve son yıllarda depolanan ve mamul tütün ürünlerinde 5 ile 10 milyon dolar civarında kayıplar olduğu tahmin edilmektedir.

Bu tez çalışmasında yerel tütün hatlarında zararlı böceklere dayanıklılığın artırılması hedeflenmiştir.

- i. Birinci denemede, her 2 çeşidine ait tohumları 60 dk %100 konsantrasyonda ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit-%5 NaClO içeren etken madde) ile belirtilmiş çeşitlerin tohumları steril edilmiştir.
- ii. Çalışmada, Basma ve Nail hatlarına *Agrobacterium* aracılığıyla iki böcek öldürücü gen (*cryIAc* ve *cry2A*) aktarılmıştır ve seleksiyon amacıyla MSD4X2 + duocid ve kanamisin içeren ortamı kullanılmıştır.
- iii. Elde edilen sügünler MS ortamı + duocid ve kanamisin da köklendirilmiştir.
- iv. Seleksiyon ortamda gelişen GUS pozitif bitkilerin PCR analizleri sonucunda, Basma hattından 22 adet pozitif transgenik tütün hattı, Nail hattından ise 3 adet transgenik tütün hattı geliştirilmiştir.
- v. Daha sonra yapılmış olan çalışmada protein içeriklerinin belirlenmesinde ELİSA testinin kullanılmış olması transgenik tütün bitkisi üretiminde güvenilir bir sonuç elde etmemizi sağlamıştır.
- vi. Yaprak biyoanaliz sonucuna göre lepidoptera larvalarına dayanıklı böcek dirençli tütün hatları geliştirilmiştir.
- vii. Birincil transgenik tütün hatlarının bu çalışma sonucunda, aday transgenik bitkilere aktarılan böcek dirençli genlerin birincil T₁ hatlara geçtiği yapılan kanamisin (*npt-II*) ortamlı testi ile belirlenmiştir olup bunlardan birisinin ıslah programları için umut verici bir aday olarak görülebilir.

- viii. Daha sonraki dönemlerde, böceklere dirençli olarak geliştirilen bu transgenik tütün hatlarının müteakip soylarında, tütün ıslah programında kullanılacak homozigot hatların geliştirilmesi amacıyla başka yeni çalışmalar yürütülecektir.
- ix. Bu sonuçlara göre tütün transformasyon genotip spesifik olup, farklı oranda transgenik bitki elde edilmiştir.
- x. Böceklere karşı geniş spektrumlu dirençli tütün çeşitlerinin geliştirilmesi, tarımsal üretim girdilerinin önemli düzeyde azaltılması vasıtasıyla zararlı böceklerle mücadele edebilmeyi sağlayacak, sonuç olarak verimin artması ve ekonomik gelirin yükselmesi şeklinde tütün üreticilerine avantajlar sağlayacaktır.



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/Technology* 6, 163-232, 1987.

Anonim, "Plant Galls: Myths and Misconceptions", American Nurseryman, <http://www.amerinursery.com/plants/plant-galls-myths-misconceptions>, 23 Eylül 2016.

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

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.

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.

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.

Canming, T., Jing, S., Xiefei, 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.

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. and Uchimiya, H., “Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants”, *Plant Biotechnol* 15, 1-10, 1998.

Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A. and Nester, E.W., “Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region”, *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.

Ecevit, O. ve Tuncer, C., “Gen Transferi İle Böceklere Karşı Dayanıklı 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/>, 23 Eylül 2016.

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.

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.

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.

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 (*cryIAc*) in insect resistant cotton progeny”, *Emir. J. Food Agric.* 26(8), 706-715, 2014.

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”, *Neveşehir*

Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2(1), 78-89, 2013.

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

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.

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.

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.

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

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., Babaoğlu, 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.

Rao, C.K., “Transgenic Bt Technology: 3. Expression of Transgenes”, Monsanto, <http://www.monsanto.co.uk/news/ukshowlib.phtml?uid/49304>, 23 Eylül 2016.

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.

Sayed, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 *CryIA* 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.

Ek-A : Basma ve Nail çeşitlerinin birincil transgenik bitkilerindeki ELISA testinin *cryIAc* konsantrasyonu

Bitki çeşit no	<i>cryIAc</i> konsantrasyonu (µg/g taze doku)	Bitki çeşit no	<i>cryIAc</i> konsantrasyonu (µg/g taze doku)
3N	0	23B	0,178
11N	0,017	25B	0,14
33N	0,178	26B	0,255
4B	0,296	28B	0,174
9B	0,607	29B	0,206
10B	0,49	32B	0,212
13B	0,321	34B	0,14
14B	0,319	35B	0,085
15B	0,146	37B	0,082
16B	0,438	38B	0,192
18B	0,26	39B	0
19B	0,215	40B	0,478
21B	0,114		

N: Nail çeşidinin birincil transgenikleri ifade ederken, B: Basma çeşidinin birincil transgeniklerini ifade etmektedir.

ÖZ GEÇMİŞ

Tolga Dinç 09.06.1990 tarihinde Niğde'nin Ulukışla ilçesinde dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini Ulukışla'da lise öğrenimini Niğde Merkez'de tamamladı. 2009 yılında Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nü kazandı. 2011 ve 2012 yıllarında staj programı için Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında yaptı ve 2013 yılında okulu bitirdi. Yüksek öğreniminin bir sene ardından Niğde Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2015-2016 yılları arasında "Patateste Topraklı ve Topraksız Mini Yumru Üretim Sistemlerinin Tarımsal ve Ekonomik Verimliliğinin Karşılaştırılması" adlı projede proje bursiyeri olarak çalışmıştır.

TEZ ÇALIŞMASINDA ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet ulusal bildiri üretilmiştir. Bu üretilen çalışma aşağıda sunulmuştur.

Bakhsh, A., Dinç, T., Zia, M. A. B., Hussain, T., Demiral. U, ve Çalışkan, M. E., “Gene pyramiding strategy to develop broad spectrum insect resistant tobacco cultivars”, **11th Tarla Bitkileri Kongresi**, Çanakkale, s.118, 7-10 Eylül, 2015.



