

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI PAMUK ÇEŞİTLERİNDE *IN VITRO* SÜRGÜN REJENERASYONU
VE *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI**

Emine ANAYOL

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

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

11.12.2014

Emine ANAYOL

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI PAMUK ÇEŞİTLERİNDE *IN VITRO* SÜRGÜN REJENERASYONU VE *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI

Emine ANAYOL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Diğer birçok bitki türüyle karşılaştırıldığında pamuk bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve gen aktarımı oldukça zordur. Bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak üretilen pamuk çeşitlerinin farklı eksplantları farklı besin ortamlarında kültüre alınarak gen aktarımına uygun adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarım yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu BAP içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Çeşitler arasında önemli farklılıklar kaydedilirken, en yüksek rejenerasyon oranı Coker 312 ve GSN-12 çeşitlerinin sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilmiştir. İlave olarak, *A. tumefaciens* ile gen aktarımı için sürgün uçları en iyi eksplant olarak belirlenmiştir. Yine bu çalışmada *cryIAc* ve *bar* genlerinin pamuk çeşitlerine *A. tumefaciens* ile aktararak böceklere dayanıklı ve herbisite toleranslı bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle pJIT61 klonlama plazmidinde AoPR1-Cry1Ac ve CaMV 35S-Cry1Ac ekspresyon kasetleri oluşturulmuştur. Daha sonra bu kasetler restriksiyon enzimleriyle kesilerek pTF101.1 binari transformasyon vektörlerinin *bar* genini de içeren T-DNA bölgesine klonlanmıştır. Klonlamadan sonra bu plazmidler elektroporasyon ile farklı *Agrobacterium tumefaciens* hatlarına aktararak pamuk çeşitlerine gen aktarımında kullanılmıştır. pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac, pTF101.1 35S-Cry1Ac, pk2Ac 35S-Cry1Ac ve pRD400 AoPR1-Cry1Ac vektörlerini taşıyan GV2260 ve LBA4404 *A. tumefaciens* hatlarıyla STN 468, Özbek 100, Ayhan 107 ve GSN 12 çeşitlerinin sürgün ucu eksplantlarının inokülasyonu sonucunda toplam 133 adet transgenik aday bitki elde edilmiş ve bunlarında 48 adedinin kesin transgenik olduğu PCR analizleriyle teyit edilmiştir. Biyotest çalışmalarında elde edilen bitkilerin bir kısmının *Spodoptera exigua* ve *S. littoralis* larvalarına karşı %100 oranında dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Aralık 2014, 140 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Gossypium hirsutum*, sürgün rejenerasyonu, doku kültürü, *Agrobacterium tumefaciens*, gen aktarımı

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IN VITRO SHOOT REGENERATION AND *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED GEN TRANSFER IN DIFFERENT COTTON CULTIVARS

Emine ANAYOL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Adventitious shoot regeneration and gene transfer in cotton is difficult compared to many other plant species. The aim of this study was to develop adventitious shoot regeneration system suitable for gene transfer using different explants and nutrient media and gene transfer methods by *Agrobacterium tumefaciens* in cotton cultivars commonly produced in Turkey. The highest shoot regeneration was achieved from shoot apex and cotyledonary node explants of cooker and GSN-12 cultivars on BAP containing medium and shoot apex was also found to be the best explants for gene transfer by *A. tumefaciens*. After optimization of regeneration and gene transfer, *cy1Ac* and *bar* genes were aimed to transfer to different cotton cultivars by *A. tumefaciens*. Therefore, AoPR1-Cry1Ac and CaMV 35S-*cry1Ac* expression cassettes were created in pJIT61 cloned plasmid. Thereafter, these cassettes were cut off with restriction enzymes and cloned into the T-DNA region of pTF101.1 binary plant expression vector containing *bar* gene. After cloning, these plasmids were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strains by electroporation and used for gene transfer to different cotton cultivars. After inoculation of shoot apex explants of STN 468, Özbek 100, Ayhan 107 and GSN 12 cultivars with *A. tumefaciens* GV2260 and LBA4404 strains carrying pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac, pTF101.1 35S-Cry1Ac, pk2Ac 35S-Cry1Ac and pRD400 AoPR1-Cry1Ac vectors, 133 putative transgenic plants were produced and 48 of them were confirmed as transgenic plants by PCR. Bioassay studies indicated that some transgenic plants showed 100% resistance against *Spodoptera exigua* and *S. littoralis* larvae.

December 2014, 140 pages

Key Words: *Gossypium hirsutum*, shoot regeneration, tissue culture, *Agrobacterium tumefaciens*, gene transfer

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

“Farklı Pamuk Çeşitlerinde *in vitro* Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı” konulu araştırmada bana çalışma imkanı sunan ve çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen ve her zaman desteğini gördüğüm, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN a; (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D)’

Çalışmalarım süresince bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa YILDIZ ve Prof. Dr. Serkan URANBEY’e, (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D) kendisinden çok şey öğrendiğim ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Allahbakhsh JOIYA (Niğde Üniv. Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü)’ya, bioassey denemelerinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Levent ÜNLÜ (Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü), Yrd. Doç. Dr. Ömer Cem KARAKOÇ (Çankırı Karatekin Üniversitesi Yapraklı MYO)’a, çalışmalarım da bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Khalid M. KHAWAR (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D), Doç. Dr. Selma ONARICI (TÜBİTAK-MAM), Doç. Dr. Muhammad AASIM (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü), Dr. Güray AKDOĞAN (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D)’a; laboratuvar arkadaşlarım Deniz KÖM, Hussein A. AHMED, Dr. Surendra BARPETE, Saber D. KHABBAZİ, S. Fatih ÖZCAN, Murat AYCAN, Mustafa KAYAN, Burak ÖNAL’a; çalışmalarım da bana daima yardımcı olan Nevin ACAR’a, Öner ACAR’a ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Nilgün BAYRAKTAR (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D)’a;

bana fakültede bu çalışmayı yapma imkanı veren Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Dr. Mevlüt ŞAHİN’e, bölüm ve birim amirlerim Dr. Mikail ÇALIŞKAN ve Dr. Cuma KARAOĞLU’na;

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen çok değerli fedakar babam Bekir NİZAM, annem Hatice NİZAM ve ablalarım a; çalışmalarım süresince desteğini eksik etmeyen sevgili eşim Dr. Mustafa Alpaslan ANAYOL’a ve bu süreçte sabırlarından dolayı kızım Betül ve oğlum Yusuf’a;

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması “*CryIAc* Endotoksin Üretiminin Sınırlandırıldığı Böceklerle Dayanıklı Transgenik Pamuk Çeşitlerinin Geliştirilmesi” konulu TÜBİTAK projesi (Proje No: 111O254) tarafından desteklenmiştir.

Emine ANAYOL
Ankara, Aralık 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Pamuk Bitkisinin Genel Özellikleri.....	1
1.2 Pamuğun Ekonomik Önemi.....	3
1.3 Ülkemizde Pamuk Tarımının Sorunları.....	4
1.4 Dünyada ve Ülkemizde Pamuk Tarımı.....	7
1.5 Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Bitkilerin Üretimi ve Ekonomik Etkisi.....	9
1.6 Ülkemizde Pamuk Zararlıları.....	13
1.7 Böceklerle Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi.....	16
1.8 AoPR1 Promotörünün <i>Cry</i> Genlerinin Kontrol Edilmesinde Kullanımı.....	18
1.9 Pamukta Yabancı Otlar.....	19
1.10 Bar Geninin Transgenik Bitkilerin Seçiminde ve Herbisite Tolerans Geni Olarak Kullanılması.....	19
1.11 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Gen Aktarımı.....	20
1.12 Araştırmanın Amacı.....	23
2. KURAMSAL TEMELLER.....	24
2.1 Pamukta Doku Kültürü Çalışmaları.....	24
2.2 Pamukta Gen Aktarım Çalışmaları.....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
3.1 Çalışmada Kullanılan Pamuk Çeşitleri.....	47
3.2 Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve <i>In Vitro</i> Çimlendirilmesi.....	47

3.3 Gen Aktarımına Uygun Sürgün Rejenerasyonu.....	48
3.4 AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac Genlerinin Klonlanması.....	49
3.5 Gen Aktarımında Kullanılacak Olan <i>A. tumefaciens</i> Hatlarının Büyütülmesi ve Muhafazası.....	50
3.6 Elektroporasyonla <i>A. tumefaciens</i> Hatlarına Plazmid Aktarımı.....	50
3.7 Gen Aktarımında Kullanılacak Olan Bakteri Hatlarının Etkinliklerinin Tütünde Belirlenmesi.....	51
3.8 <i>A. tumefaciens</i> ile Pamuğa Gen Aktarımı.....	52
3.9 Histokimyasal GUS Analizi.....	53
3.10 Transgenik Adayı Bitkilerin PCR ile Teyit Edilmesi.....	53
3.11 Transgenik Bitkilerde Böcek Biyotest Analizleri.....	54
3.12 İstatistik Analizler.....	55
4. ARAŞTIRMA BUGULARI.....	56
4.1 AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac Gen Kasetlerinin pTF101.1 Vektörüne Klonlanması.....	56
4.2 pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac Vektörlerinin Elektroporasyon ile <i>A. tumefaciens</i> Hatlarına Aktarılması.....	67
4.3 Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve <i>In Vitro</i> Çimlendirilmesi.....	70
4.4 Pamukta Gen Aktarımına Uygun Sürgün Rejenerasyonunun Optimizasyonu.....	72
4.4.1 Farklı büyüme düzenleyicilerinin Coker 312 çeşidinde rejenerasyona etkisi.....	72
4.4.2 Farklı Büyüme düzenleyicileri ile MS ve sukroz oranlarının GSN-12 çeşidinde rejenerasyona etkisi.....	75
4.4.3 Farklı pamuk çeşitlerinin sürgün rejenerasyon kapasitesinin belirlenmesi.....	78
4.4.4 Sürgünlerin köklendirilmesi ve dış şartlara alıştırılması.....	79
4.5 Gen Aktarım Çalışmaları.....	80
4.5.1 Pamuğa gen aktarımında kullanılacak olan bakteri hatlarının etkinliğinin tütünde belirlenmesi.....	80
4.5.2 <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35S GUS-INT ve GV2260 AoPR1 GUS-INT hattı ile pamuğa gen aktarımının optimizasyonu.....	84
4.5.3 Seleksiyonda kullanılacak olan fosfinotrisin (PPT) miktarının belirlenmesi.....	88

4.5.4 AoPR1-Cry1Ac ve CaMV35S-Cry1Ac genlerini taşıyan <i>A. tumefacines</i> hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımı.....	89
4.5.5 Transgenik adayı pamuk bitkilerinin PCR ile teyit edilmesi.....	93
4.6 Transgenik Bitkilerde Böcek Biyotest Analizleri.....	109
4.6.1 T ₀ bitkilerinde <i>Spodoptera exiqua</i> ile yapılan biyotest çalışmaları.....	109
4.6.2 T ₁ bitkilerinde <i>Spodoptera littoralis</i> ile yapılan biyotest çalışmaları.....	114
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	117
5.1 AoPR1-Cry1Ac Gen Kasetlerinin Oluşturulması ve <i>A. tumefaciens</i> 'e Aktarılması.....	117
5.2 Pamukta Gen Aktarımına Uygun Sürgün Rejenerasyonunun Optimizasyonu.....	118
5.3 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac ve pTF101.1 35S-Cry1Ac Vektörlerini Taşıyan <i>A. tumefacines</i> Hatlarıyla Farklı Pamuk Çeşitlerine Gen Aktarımı.....	119
5.4 Elde Edilen Transgenik Bitkilerde Böcek Biyotest Analizleri.....	121
5.5 Sonuç.....	122
KAYNAKLAR.....	123
ÖZGEÇMİŞ.....	138

SİMGELER DİZİNİ

AgNO ₃	Gümüş nitrat
bp, bç	Baz çifti
⁰ C	Santigrat
g	gram
GA ₃	Giberellik asit
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HgCl ₂	Civa klorür
kDa	kilo dalton
KNO ₃	Potasyum nitrat
mg	miligram
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
ml	mililitre
mM	milimolar
µM	mikromolar
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrate
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
(Na ₂ S ₂ O)	Sodyum thiosülfat
NaOH	Sodyum hidroksit
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
MgCl ₂	Mağnezyum klorür

Kısaltmalar

BAP, BA	6-benzilaminopurin
Bt	Bacillus thuringiensis

CaMV	Kanıbahar Mozaik Virüsü
2,4 D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	dakika
dNTP	Deoksiribonükleotittrifosfat
GD	Genetiği değiştirilmiş
GUS	β -glukuronidaz
IAA	Indole-3-asetik asit
IBA	Indole-3-butrik asit
KIN	kinetin
LB	LuriaBroth
MSO	Hormonsuz Murashige ve Skoogbasal besin ortamı
NAA	α -Naftelenasetik asit
Nos	Nopalinsentaz
NB	Nutrient Broth
NPT-II	Neomisin fosfotransferaz II
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PPT	fosfinotrisin
SDS	Sodiumdodecylsulfate
STS	Gümüş thiosulfat
sn	saniye
TDZ	Thidiazuron
T-DNA	Aktarılan DNA
U	ünite
X-GLUC	5-Broma 4-Chloro-3-Indolyl glucoronide içeren solüsyon
ZT	Zeatin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Cry toksinlerinin etki mekanizması.....	17
Şekil 1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'ten bitki hücrelerine gen (T-DNA) aktarımı.....	21
Şekil 4.1	pJIT 61 aracı plazmidi ve enzim kesim noktaları.....	56
Şekil 4.2	pJIT 61 plazmidi üzerinde yer alan ve biri CaMV35S diğeri AoPR1 promotörü içeren iki farklı kasetinin şematik gösterimi.....	57
Şekil 4.3	AoPR1-pJIT 61 plazmidinin <i>Bam</i> HI ve <i>Eco</i> RI enzimleriyle kesiminden sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	58
Şekil 4.4	pRD400 plazmidinin ve 35S-pJIT 61 plazmidinin <i>Bam</i> HI ve <i>Eco</i> RI enzim kesimi.....	58
Şekil 4.5	<i>Bam</i> HI ve <i>Eco</i> RI kesim ürünlerinin agaroz jelden izole edildikten sonraki agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	59
Şekil 4.6	CaMV35S-Cry1Ac-pJIT 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidlerinin 35S, AoPR1 ve <i>cry</i> IAc primerleriyle kontrolü.....	60
Şekil 4.7	CaMV35S-Cry1Ac-pJIT 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidlerinin şematik gösterimi.....	61
Şekil 4.8	pTF101.1 Binary vektörü ve restriksiyon kesim bölgeleri.....	62
Şekil 4.9	pTF101.1 plazmidi ile 35S-Cry1Ac-pJit 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJit 61 kasetlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve jelden izole edilmesi.....	63
Şekil 4.10	AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidinin aktarılması sonucunda büyüye 23 <i>E. coli</i> JMA109 kolonisinde <i>cry</i> IAc primerleri ile yapılan PCR analizi.....	64
Şekil 4.11	35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidinin aktarılması sonucunda büyüyen 4 <i>E. coli</i> JMA109 kolonisinde <i>cry</i> IAc primerleri ile yapılan PCR analizi.....	65
Şekil 4.12	Pozitif <i>E. coli</i> JMA109 kolonilerine aktarılan AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 ve 35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidleri farklı primerler kullanılarak teyit edilmesi.....	66
Şekil 4.13	a. CaMV35S promotörünü içeren birinci klonlama kaseti, b. AoPR1 promotorunu içeren ikinci klonlama kaseti.....	67

Şekil 4.14	pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı <i>A. tumefaciens</i> hatlarından <i>cryIAc</i> geninin amplifikasyonu.....	68
Şekil 4.15	pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı <i>A. tumefaciens</i> hatlarından bar geninin amplifikasyonu.....	69
Şekil 4.16	pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı <i>A. tumefaciens</i> hatlarından AoPR1 promotörünün amplifikasyonu.....	69
Şekil 4.17	Tohumların yüzey sterilizasyonu.....	70
Şekil 4.18	Pamuk tohumlarının hidrojen peroksit ile sterilizasyonundan sonra sukroz içermeyen ve %0.4 phytigel ile katılaştırılmış MSO besin ortamında çimlendirilmesi.....	71
Şekil 4.19	<i>In vitro</i> 'da çimlenen fidelerden alınan eksplantlar.....	73
Şekil 4.20	GSN-12 çeşidinin kotiledon boğumlarından 8 hafta sonra sürgün rejenerasyonu.....	75
Şekil 4.21	a. Tam MS ve 30 g/l sukroz ve b. ½ MS ve 15 g/l sukroz içeren besin ortamında fenolik bileşik oluşumu.....	76
Şekil 4.22	a. sürgünlerin köklendirilmesi b. köklerin saf suda yıkanması, c. köklenen sürgünlerin dış şartlara alıştırılması d. büyüyen bitkilerin saksılara alınması ve tohum bağlaması.....	80
Şekil 4.23	Kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi.....	81
Şekil 4.24	Kanamisin içeren ortamda transgenik aday tütün bitkilerinin köklendirilmesi.....	81
Şekil 4.25	İklim odasında gelişen transgenik tütün bitkisi.....	82
Şekil 4.26	Farklı <i>A. tumefaciens</i> hatlarıyla tütün yaprak disklerinin inokülasyonu sonucunda elde edilen kanamisine dayanıklı sürgünlerde GUS geninin ekspresyonu.....	83
Şekil 4.27	Kanamisine dayanıklı tütün bitkilerinde <i>npt-II</i> geninin varlığının tespiti.....	83
Şekil 4.28	GV2260 35S GUS INT ile inoküle edilen GSN-12 çeşidinde 100 mg/l Kanamisin ve 0.1 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren seleksiyon ortamında kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi.....	85

Şekil 4.29	GV2260 p35S GUS-INT hattı ile inokülasyon yapılan eksplantlardan elde edilen sürgünlerde histo-kimyasal GUS analizi.....	86
Şekil 4.30	Farklı PPT dozlarının pamukta sürgün gelişimine etkisi.....	88
Şekil 4.31	<i>A. tumefaciens</i> ile farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımında kullanılan prosedür.....	90
Şekil 4.32	<i>Cry</i> ve <i>Bar</i> genlerini aktarıldığı aday transgenik bitkilerin dış şartlara alıştırılması ve sera şartlarında yetiştirilmesi.....	91
Şekil 4.33	Büyütme kabini ve sera şartlarında yetiştirilerek tohum elde edilen transgenik bitkiler.....	93
Şekil 4.34	AoPR1 promotor ve <i>cryI</i> Ac geni taşıyan, pRD400 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde AoPR1 promotor varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	94
Şekil 4.35	<i>nptII</i> ve <i>cryI</i> Ac/ <i>cry2</i> Ac geni taşıyan pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ve AoPR1 promotor ve <i>cryI</i> Ac geni taşıyan pRD400 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	95
Şekil 4.36	35S promotor ve <i>CryI</i> Ac/ <i>Cry2</i> Ac geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	95
Şekil 4.37	35S promotor ve <i>CryI</i> Ac/ <i>Cry2</i> Ac geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	96
Şekil 4.38	35S promotor ve <i>CryI</i> Ac/ <i>Cry2</i> Ac geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	96
Şekil 4.39	35S promotor ve <i>CryI</i> Ac/ <i>Cry2</i> Ac geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	97

Şekil 4.40	AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren pamuk bitkilerinde AoPR1 promotor varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	97
Şekil 4.41	AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>bar</i> gen varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	98
Şekil 4.42	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	98
Şekil 4.43	35S promotor ve <i>CryIAc/Cry2Ac</i> geni taşıyan, pk2Ac plazmidini içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan pRD400 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>cry</i> geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>cryIAc</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	99
Şekil 4.44	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde <i>cryIAc</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	99
Şekil 4.45	AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde <i>cryIAc</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	100
Şekil 4.46	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde <i>cryIAc</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	100
Şekil 4.47	35S promotor ve <i>CryIAc/Cry2Ac</i> geni taşıyan pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı, AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan pRD400 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ve AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>cry</i> geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>cryIAc</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	101

Şekil 4.48	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ve AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	102
Şekil 4.49	AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ve 35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	103
Şekil 4.50	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ve AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	104
Şekil 4.51	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	105
Şekil 4.52	35S promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>bar</i> geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	106
Şekil 4.53	AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, pRD400 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>cry</i> geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>cryIAc</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	106
Şekil 4.54	AoPR1 promotor ve <i>cryIAc</i> geni taşıyan, pRD400 plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>nptII</i> geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	107
Şekil 4.55	35S promotor ve <i>CryIAc/Cry2Ac</i> geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>nptII</i> geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	108

Şekil 4.56	35S promotor ve <i>CryIAc/Cry2Ac</i> geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>nptII</i> geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	108
Şekil 4.57	35S promotor ve GUS geni taşıyan <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ve AoPR1 promotor ve GUS geni taşıyan <i>A. tumefaciens</i> GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen <i>nptII</i> geni içeren pamuk bitkilerinde <i>nptII</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	109
Şekil 4.58	Transgenik olmayan kontrol bitkilerinin yaprakları ile yapılan biyotest denemelerinde <i>Spodoptera exiqua</i> larvalarının gelişme durumları ve zararı derecesi.....	110
Şekil 4.59	AoPR1- <i>cryIAc</i> ve 35S- <i>cryIAc</i> genlerinin aktarıldığı farklı transgenik T0 pamuk bitkilerine ait yapraklarda biyotest çalışmaları sonucunda zehirlenerek ölmüş olan <i>Spodoptera exiqua</i> larvaları.....	111
Şekil 4.60	a. T0 bitkilerinden elde edilen tohumların PPT içeren besin ortamında çimlendirilmesi, b. dış şartlara alıştırılması, c. kontrol, d. transgenik bitkilerde <i>S. littoralis</i> larvaları ile yapılan biyotest sonuçları.....	115

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Önemli pamuk üretici ülkelerin, 2013/14 yılı ekim alanı, üretim, verim ve tüketimi.....	8
Çizelge 1.2	Türkiye pamuk ekim alanı, kütlü pamuk üretim miktarı ve verimi.....	8
Çizelge 1.3	2013 yılında GD bitkilerin üretildiği ülkeler ve ekim alanları.....	10
Çizelge 1.4	Dünyada 2013 yılında transgenik bitkilerin geleneksel bitkilere oranı.....	11
Çizelge 1.5	Böceklere dayanıklı GD pamuk üretimin tarımsal ve ekonomik etkisi.....	13
Çizelge 1.6	Ülkemizde zarar yapan pamuk böcekleri ve zarar yaptığı bitki kısımları.....	14
Çizelge 4.1	Farklı pamuk çeşitlerine ait tohumların şeker içermeyen MSO ortamında çimlenme oranları.....	71
Çizelge 4.2	Farklı vitamin ve katılaştırıcıların GSN-12 tohumlarının çimlenme oranına etkisi.....	72
Çizelge 4.3	Farklı oranlarda büyüme düzenleyicisi içeren MSO ortamında kültüre alınan Coker 312 çeşidinin kotiledon boğumu ve hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	74
Çizelge 4.4	Farklı oranlarda büyüme düzenleyici ve sukroz içeren ½ ve tam MSO ortamında kültüre alınan GSN-12 çeşidinin kotiledon boğumu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	77
Çizelge 4.5	Farklı büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarının GSN-12 çeşidinin değişik eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi...	78
Çizelge 4.6	Farklı pamuk çeşitlerinin kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	79
Çizelge 4.7	Farklı A. tumefaciens hatlarıyla inoküle edilen tütün yaprak disklerinden kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi ve GUS sonuçları.....	82
Çizelge 4.8	Coker 312 ve GSN12 çeşitlerinin farklı eksplantlarına farklı GV2260 p35S GUS-INT ve GV2260 AoPR1 GUS-INT hatları ile gen aktarımı.....	87

Çizelge 4.9	Farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımında kullanılan <i>A. tumefaciens</i> hatları ve içerdikleri plazmidler.....	90
Çizelge 4.10	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 pTF101.1 35S Cry1Ac ve GV2260 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine yapılan gen aktarım sonuçları.....	92
Çizelge 4.11	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 pRD400 AoPR1 Cry1Ac ve LBA4404 pk2Ac 35S Cry1Ac /Cry2Ac hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine yapılan gen aktarım sonuçları.....	92
Çizelge 4.12	Aday transgenik bitkilerin teyit edilmesinde kullanılan gen bölgeleri ve kullanılan primerler.....	94
Çizelge 4.13	AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac genlerini taşıyan farklı plazmidler kullanılarak elde edilen değişik pamuk çeşitlerine ait bireysel T0 transgenik bitkilerinin yapraklarıyla beslenen <i>S. exigua</i> larvalarının 168 saate kadar farklı zaman aralıklarında ölüm oranları.....	113
Çizelge 4.14	AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac genlerini taşıyan farklı plazmidler kullanılarak elde edilen değişik pamuk çeşitlerine ait bireysel T1 transgenik bitkilerinin yapraklarıyla beslenen <i>S. littoralis</i> larvalarının 168 saate kadar farklı zaman aralıklarında ölüm oranları.....	116

1. GİRİŞ

1.1 Pamuk Bitkisinin Genel Özellikleri

Pamuk anavatanı Hindistan olan bir kültür bitkisi olup; *Magnoliopsida* (iki çenekliler) sınıfı, *Malvales* takımı, *Malvaceae* (ebegümeçigiller) familyası, *Gossypium* cinsi ve *Gossypium hirsutum* (2n= 52), *G. barbedense* (2n= 52), *G. herbaceum* (2n= 26) ve *G. arboreum* (2n= 26) olmak üzere 4 türden oluşur (Kolsarıcı 2009). *G. herbaceum* ve *G. arboreum* Eski Dünya pamukları olarak bilinmektedir. Bunların kozaları kapalı, verimleri düşük, lifleri kısa ve kalındır. Daha çok yatak ve yorgan yapımında kullanılırken, kaba iplik ve dokumalarda daha az kullanılmaktadır. Asya kökenli bu pamukların yerini Amerika kökenli *G. hirsutum* ve *G. barbadense* türleri almıştır. Bunlardan *G. hirsutum* diğer bir ifadeyle “upland” pamukları, tekstilde çok ince iplik ve dokumalar dışında normal kaliteler için uygundur. Verimleri yüksek, vejetasyonları orta-uzun, çırçır randımanları %38-39 ve daha yukarı değerleri verebilmektedirler. Dünya’da yetiştirilen pamukların %80’inden fazlasını oluştururlar. Dolayısıyla ülkemiz pamuklarının %99.5’i *G.hirsutum* türü pamuklardır. Yeni Dünya “Amerika” orijinli ikinci önemli tür, *G. barbadense*’dir. En uzun (35-40 mm), ince ve dayanıklı liflere sahiptir. Liflerinden pahalı, ince iplik ve kaliteli poplin kumaşlar üretilir. Dünya pamuk kuşağında Ekvator’a yakın paraleller içindeki sıcak ve yazları uzun geçen iklimlerde yetişmektedirler. Verim ve çırçır lif randımanları, *G. hirsutum* türü pamuklardan daha düşüktür (Gürel vd. 2000). Pamuk çalı şeklinde yetişen çok yıllık bir bitki olmasına rağmen, kışı soğuk ve donlu geçen ülkelerde tek yıllık yetiştirilmeye başlanmıştır. Böylece ekim alanları kışları serin ve yazları sıcak geçen ülkelere kaymıştır (Tümer 2010). Pamuk genellikle kendine döllen (autogam) bir bitki olduğu gibi, %5-7 arasında yabancı döllenme (allogam) de olabilmektedir. Pamuk bitkisinin kuvvetli bir kazık kök ve buna bağlı yan kökleri olup; gövdesi dik ve sağlam bir yapıya sahiptir (Kolsarıcı 2009). Pamuk bitkisinin sapı boğum ve boğum aralarından oluşur ve bu boğumlardaki yaprak altı tomurcuklardan yan dallar çıkar. Sap uzunluğu ise türe, çeşide, yetiştirme tekniğine ve çevre koşullarına göre değişir. Yaprakların rengi, şekli, büyüklüğü ve tüylülüğü yine tür ve çeşitlere göre değişiklik gösterir. Yapraklar genellikle 3-5 parçalı olup, derin veya yüzlek yırtmaçlıdır. Renkleri açık-koyu yeşil

veya antosiyanin pigmentlerinden dolayı kırmızı renkli olabilir. *G. barbedense* ve *G. herbaceum* türüne ait pamuk yaprakları seyrek tüylü veya tüysüzken, *G. hirsutum* türünde genellikle tüylüdür. Bir pamuk bitkisinin çiçeği; dışta üç adet brakte, braktelerin içinde 5 adet asıl çanak yaprak (kaliks-sepal), içte 5 adet taç yaprak (korollo-petal), 1 adet dişi organ (pistil) ve erkek organlardan (stamenler) oluşur. Döllenmeden sonra yumurtalık gelişerek kozayı (meyve) oluşturur. Kozalar olgunlaştığında, çenetlerin birleşme yerlerinden çatlar ve lülelerden oluşan beyaz kütlü dışarı çıkar. Çenet açılımına göre kozalar; açık (*G. hirsutum* ve *G. barbedense*), yarı açık ve kapalı (*G. herbaceum*) olmak üzere 3 tiptir. Çiçeğin döllenmesinden sonra, yumurtalık gelişerek tohumu oluşturur. Her gözde 5-10 tohum bulunur. Tohum kabuğunun üzerinde bulunan epidermis hücrelerinin dışa doğru uzamasıyla, beyaz veya krem renkli, kalınlaşmış uzun lifler (lint) ve tohum kabuğuna sıkıca sarılan, genellikle beyaz veya renkli kısa lifler (hav veya linter) oluşur. Bazı çeşitlerin tohumlarında hav yoktur. Tohum ve lifin ikisine birden kütlü pamuk adı verilmektedir (İşler 2013). Pamuk lifinin kalitesini etkileyen en önemli faktörler kullanılan tohum, iklim şartları ve uygulanan tarımsal işlemlerdir. Pamuğun lif uzunluğu arttıkça, içindeki bitkisel artıkların oranı azaldıkça ve rengi beyaz, görünümü parlak oldukça iplik ve kumaşın kalitesi de artmaktadır (Alkaya 2010). Pamuk lifinin doğal oluşu, ısıtılıp kaynatmaya karşı diğer liflere göre sağlamlığı, teri absorbe etmesi, statik elektriği daha az iletmesi, hava geçirgenliği ve hijyenik özelliğinden dolayı diğer bitkisel ve sentetik elyaflara tercih edilmesi pamuğu çok değerli kılmaktadır (Anonim, 2014a). Pamuk derin sürülmüş, süzek, nemli, alüvyon ve tınlı topraklarda iyi yetişir. Ekim zamanı bölgelere göre farklılık gösterir ve genellikle toprak sıcaklığı 13-15°C olduğunda, ilkbahar son don tehlikesinin geçtiği zamanda yapılması uygundur. Hasat, bölgelere göre değişip Ağustos-Kasım aylarında yapılır. Hasattan sonra kütlüler çırçır fabrikalarına gönderilerek lif ve çığitlerin birbirlerinden ayrılması için çırçırılama işlemi gerçekleştirilir (Kolsarıcı 2009). Pamuğun hasadında ülkemizde genelde el ile toplama yöntemi kullanılmakta olup, son yıllarda makine ile hasat yaygınlaşmaya başlamıştır (Güngör vd. 2009).

1.2 Pamuğun Ekonomik Önemi

Pamuk tüm dünyada tarım, sanayi ve ticaret bakımından çok önemli bir yere sahip olup, 50'den fazla sanayi kolunda ham madde olarak kullanılmaktadır. 70 farklı ülkede tarımı yapılan pamuktan 180 milyon insan da geçimini sağlamaktadır (Akçar1986). Pamuk, gerek lifi gerekse çiğidinden elde edilen yağı ve diğer yan ürünleriyle ekonomik değeri çok yüksek olan bir bitkidir. Lifi ile tekstil sanayinin, linteri ile selüloz sanayinin, çekirdeğinden elde edilen yağı ile bitkisel sanayinin, kapçık ve küspesi ile yem sanayinin hammaddesini oluşturur (Anonim 2014b). Ayrıca kısa pamuk lifleri yatak, yastık ve yorganların doldurulmasında kullanılmaktadır. Yine dokuma sanayinde iplik ve sicim yapımında, sentetik ipek üretiminde, halı ipliklerinde, aydınlatma lambaları ve mumların fitillerinde, plastik ürünlerde, dumansız barut imalinde değerlendirilmektedir (Kolsarıcı 2009). Buna ek olarak günümüzde üretilen bazı roketlerde kullanılan nitroselüloz maddesinin içerisinde linter kullanılabilir (Anonymous 2002). Pamuğun çiğit adı verilen tohumlarında %17-21 oranında ham yağ, bitkisel yağ sanayisinde sıvı ve katı yağ olarak kullanılmaktadır. İkinci derece pres yağları ise tıbbi alanda, kozmetik sanayinde, sabun ve mum yapımında kullanılmaktadır. Yağı alındıktan sonra hayvan yemi olarak kullanılan pamuğun; geri kalan küspesi ise %3.5 ham yağ, %43 ham protein, %20 karbonhidrat, % 7 ham kül, % 5 ham selüloz, %8.5 su içermektedir (Kolsarıcı 2009). Hayvan yeminin dışında pamuk küspesi farklı bileşiklerle birlikte gübre olarak da kullanılmaktadır. Bu sayede toprağın yapısını güçlendirdiği ve su ihtiyacını azalttığı rapor edilmiştir (Anonymous 2002). Pamuk tohumunda bulunan proteinler özellikle biyo-bozunur plastik üretimi için kimyasal yöntemlerle oluşturulan filmlerin yapımında kullanılabilir. Bu kapsamda Marquie vd. (1995) tarafından yapılan bir araştırmada, ezilmiş pamuk tohumlarından biyo-bozunur plastik üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada gossipol, formaldehit ve glutaraldehit kimyasallarının film mukavemetini artırdığı ve pamuk tohumunun, biyo-bozunur plastik üretiminde kullanılan nişasta vb. diğer hammaddelere göre daha uygun bir hammadde olduğunu göstermişlerdir. Yine Grevelec vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada da, pamuk tohumunda bulunan proteinler gliserol maddesi ile işleme tabi tutulmuş ve biyo-bozunur plastik türevleri üretilmiştir. 2001-2005 yılları arasında Hollanda, Fransa, Brezilya ve Arjantin'den çeşitli üniversiteler ve araştırma kurumları

tarafından yürütülen ve Avrupa Birliği 5. Çerçeve Programı tarafından desteklenen bir projede Latin Amerika'da tarımsal amaçlı kullanılan sentetik polimerlere alternatif olarak pamuk tohumundan biyo-bozunur malzeme üretimi gerçekleştirilmiştir. Riaz vd. (2009) tarafından yapılan bir araştırmada, pamuk tohumu küspesi ile endüstriyel atık suların ağır metal giderimi konusu ile bu çalışma ilk defa uluslararası literatüre geçmiş bulunmaktadır (Alkaya 2010). Ülkemizde, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde yapılan bir çalışmada ise anaerobik biyolojik bozundurma yöntemiyle pamuk tohumu küspesi ve kabuğundan biyogaz üretimi gerçekleştirilmiştir (İşçi ve Demirer 2007). Dünyada daha çok organik bazlı atık suların, biyolojik arıtma çamurlarının ve hayvansal atıkların arıtılmasında kullanılan bu yöntem önemli bir yakıt olan metan gazı üretimine olanak sağlamıştır (Alkaya 2010). Pamuğun çekirdeğinden elde edilen yağ, petrole alternatif olarak giderek artan miktarda biyodizel üretiminde de hammadde olarak kullanılmaktadır. Pamuk bitkisi, yaygın ve zorunlu kullanım alanıyla insanlık açısından yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler açısından büyük ekonomik öneme sahip bir üründür. Bu sebeplerin yanında nüfus artışı ve yaşam standardının yükselmesi, pamuk bitkisine olan talebi de artırmaktadır (Eralp 2012).

1.3 Ülkemizde Pamuk Tarımının Sorunları

Türkiye oldukça güçlü bir pamuk üretimi yapılanmasına karşın, bu güçlü yapıyı olumsuz yönde etkileyebilen birçok sorunla karşı karşıyadır. Bu sorunların başlıcaları şunlardır:

1. Türkiye'de pamuk üretimi ihtiyacın oldukça altında gerçekte ve dolayısıyla tüketimi karşılayamamaktadır. 2006/07 döneminde üretim ile tüketim farkı (-) 740.000 ton iken, 2009/10 döneminde tüketimin ciddi miktarda düşmesine rağmen aradaki fark (-)840.000 tona yükselmiştir. Bu durum pamuk ithalatında dünyada ikinci sıraya kadar yükselmemize neden olmuş ve her yıl (yıllara göre değişmekle birlikte) 1 milyar dolar civarında dövizin ülke içinden çıkmasına neden olmaktadır. Lif pamuk, pamuk ipliği ve pamuklu dokuma ithalatı birlikte değerlendirildiğinde bu tutar son yıllarda 2 milyar

doların üstünde gerçekleşmektedir. Bu durum pamuk ithalatında dünyada ikinci sıraya kadar yükselmemize neden olmuştur (Anonim 2013).

2. Ülkemiz pamuk üretiminde dünya ortalamasının üzerinde olmasına rağmen, girdi fiyatlarının artışı üretimi azaltmakta ve sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir. Girdi fiyatları, küçük işletme yapısının getirdiği sorunlar, işçilik giderleri, tarıma yönelik mal ve hizmetlere uygulanan vergi oranları üretici için önemli maliyet unsurlarıdır.

3. Son yıllarda pamuk üretimine elverişli alanlarda başka ürünlerin tercih edilmesi üretimdeki düşüşün en önemli nedenleri arasındadır. Buna ek olarak, pamuk prim hak edişlerinde, çiftçilerden istenen evrakların tamamlanmasındaki güçlükler ve son dönem haricinde prim miktarlarının ekimden önce açıklanmaması gibi sorunlar üreticileri olumsuz etkilemektedir.

4. Pamuk dünyada en fazla müdahalelere maruz kalan piyasalardan biridir. Müdahaleler hem pamuk arzına hem de pamuk talebine yapılmaktadır. Özellikle ABD ve Çin'in belirgin ve etkileyici bir stratejik davranışları vardır. Dolayısıyla pamukta dış ticaret ve kur politikalarından kaynaklanan sorunlar ciddi şekilde Türkiye'yi etkilemektedir. ABD ve AB ülkelerinin uyguladığı ihracat politikaları ve Türkiye'de pamuğun herhangi bir dış ticaret aracı ile korunmaması yerli üretimi tehdit etmektedir.

5. Pamuk üretiminin azalışı ve istikrarsızlığının en önemli nedeni Türkiye'de üretici örgütlerinin zayıflamasıdır. TARIŞ, ÇUKOBİRLİK ve ANTBİRLİK gibi pamukta uzmanlaşmış kooperatif birliklerinin etkinlikleri, finansman imkanlarında yaşanan sorunlardan dolayı giderek azalmaktadır.

6. Pamukta standardizasyon ve kalite kontrolü halen bir sorun olmaya devam etmektedir. Türk pamuk standardizasyonundaki yetersizlikler, pamuk ile ilgili sektörlerin, lif pamukların tasnifi konusundaki gereksinimlerine çok az ölçülerde cevap verebilmesine neden olmaktadır.

7. Üretimi daha kolay olan mısır, ayçiçeği ve kuru üzüm gibi ürünlerin fiyatlarının nispeten yüksek olması ve bu ürünler için verilen destekler pamuk üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle pamuk ekilen alanlar yerini bu ürünlere bırakmış ve sonuçta pamuk üretiminde iç talebi karşılayacak miktarda artış sağlanamamıştır.

8. Pamuk dışındaki maddeler, tarladan toplama, çırçırılama ve ambalajı nedeniyle pamuk elyafının içine karışması sonucu ipliğin bünyesine girerek pamukta sorun olan kirliliğe sebep olur. Bu sorunun devam etmesi pamuklarımızın iç ve dış piyasa değerini düşürmekte ve ithal pamukların tercih edilmesine neden olmaktadır.
9. Ülkemizde pamuk alanlarında ortalama 70 dekar kadar küçük, çok parçalı arazi yapısı, pamuk üretiminin ekonomik işletme yapısına dönüşümünü ve makineli hasadın yaygınlaşmasını engellemektedir. Yüksek verim ve kaliteye rağmen küçük ölçek yapısı maliyet dezavantajına neden olmaktadır.
10. Pamuğun tarla aşamasında tarım ürünü, işlenmesi açısından sanayi ürünü olarak değerlendirilmesi ve pazarlama yönü gibi çok boyutlu yapısı, pamukla ilgili bütüncül politika üretiminde sorunlara yol açmaktadır.
11. Yasaklayıcı düzenlemelere rağmen, bölgeler arasında kütlü pamuk naklinin devam etmesi kalite sorununu ortaya çıkarmakla birlikte Türk pamuğunun imajını zedelemektedir (Anonim 2012).
12. Pamuk üretim ve işleme tekniği konusundaki eğitim yetersizliği ve pamuk ile ilgili kesimler arasındaki iletişim ve işbirliği yetersizliği pamuk tarımının bir diğer sorunudur.
13. Ülkemizde genellikle üst üste pamuk tarımının (monokültür) yapılması toprakların fiziksel ve kimyasal yapısını bozar ve verimin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca hastalık, zararlı ve yabancı otların artmasına neden olmaktadır.
14. Pamuk tarımında bilinçsizce aşırı kullanılan pestisitler, gübreler, bitki gelişim düzenleyicileri çevre kirliliğine ve ekolojik dengenin bozulmasına yol açmaktadır.
15. Bazı pamuk üretim bölgelerinde kuraklığın görülmesi ve su kaynaklarının yetersizliği, aynı zamanda tekniğe uygun yapılmayan zamansız ve fazla sulama da pamuk tarımında bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.
16. Pamuk tarımı sırasında diğer bir sorun fide kök çürüklüğü, solgunluk ve köşeli yaprak lekeli hastalığıdır.
17. Pamuk tarlalarında görülen pıtrak, horozibiği, yapışkan otu, darıcan, hardal, tilki kuyruğu, köpek dişi ayrığı gibi dar ve geniş yapraklı yabancı otlar da mücadele edilmesi gereken çok önemli bir sorundur.

18. Pamuk tarımında en önemli sorunlardan bir diğeri de zararlılardır. Pamuk yaprak biti, beyaz sinek, yeşil kurt, pamuk yaprak kurdu, çizgili yaprak kurdu, pembe kurt, kesici kurt, yaprak piresi, tütün tripsi, çiçek tripsi, kırmızı örümcekler ve bitki tahta kuruları önemli pamuk zararlılarıdır (Anonim 2011).

1.4 Dünyada ve Ülkemizde Pamuk Tarımı

Pamuğun dünyada ekim alanı 2013/14 Uluslararası Pamuk Danışma Kurulu (ICAC) verilerine göre 32,9 milyon hektar olup, hektar başına lif verimi ise 735 kg ve toplam lif üretimi ise 23,1 milyon tondur. Dünya’da en fazla pamuk üretiminde Çin, Hindistan ve Amerika ilk üç içerisinde olmaya devam ederken, en fazla pamuk tüketen ülkeler ise Çin, Hindistan ve Pakistan’dır (Çizelge 1.1, Anonymous 2014).

Türkiye ise 2013/2014 verilerine göre 500 bin hektarlık ekim alanı ile dünyada sekizinci sırada yer almaktadır. Aynı yıl toplam lif üretimi 457 bin ton olan ülkemiz, verim bakımından 1.229 kg/ha ile Brezilya ve Çin'den sonra dünyada üçüncü sıraya yerleşmektedir. Tüketim miktarı ise 1.365 bin ton ile Çin, Hindistan ve Pakistan'dan sonra gelmektedir (Çizelge 1.1, Anonymous 2014).Yıllar itibarıyla Türkiye’de pamuk ekim alanlarında azalmalar yaşansa da, artan birim alan verimi nedeniyle toplam üretimde önemli bir değişiklik olmamıştır. Öte yandan, hızla gelişen tekstil sanayisi için üretilen pamuk miktarı yetersiz kalmakta ve 2013 yılı için 876.534 ton pamuk lifi ithal edilerek, karşılığında 1,6 milyar dolar döviz ödenmiştir (Çizelge 1.2, Anonim 2014c). Üstelik ithal edilen pamuk lifinin çok önemli bir kısmı da ABD gibi transgenik pamuk üreten ülkelere yapılmaktadır. Pamuk üretiminde Türkiye’deki verimin dünya ortalamasının üzerinde olmasına rağmen, girdi fiyatlarının artışı ve yüksek maliyet üretimin sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir. Girdi fiyatları, küçük işletme yapısının getirdiği sorunlar, işçilik giderleri, ilaç ve gübre fiyatlarındaki artış, tarıma yönelik mal ve hizmetlere uygulanan vergi oranları pamuk tarımımızdaki önemli sorunların başında gelmektedir. Diğer taraftan tamamen böceklere dayanıklı transgenik pamuk üretimine geçen ülkelerde ilaç maliyetleri ve işçilikten önemli tasarruflar sağlanırken verimde de artışlar olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ülkemizin de bu teknoloji kullanması durumunda pamuk tarımında önemli gelişmeler yaşanabilecektir.

Çizelge 1.1 Önemli pamuk üretici ülkelerin, 2013/14 yılı ekim alanı, üretim, verim ve tüketimi (<https://www.icac.org/> 2014a)

Ülkeler	Ekim Alanı (bin ha)	Lif Üretimi (bin ton)	Verim (kg/ha)	Tüketim (bin ton)
Hindistan	11.878	5.570	511	4.162
Çin	4.600	6.090	1.330	8.378
ABD	3.149	2.820	869	740
Pakistan	2.914	1.950	708	2.546
Özbekistan	1.246	869	697	345
Brezilya	1.063	1.470	1.437	906
Türkmenistan	550	282	565	144
Türkiye	500	457	1.229	1.365
Dünya	32.996	23.190	735	24.206

Çizelge 1.2 Türkiye pamuk ekim alanı, kütlü pamuk üretim miktarı ve verimi (<http://www.tuik.gov.tr/> 2014c)

Yıllar	Ekim Alanı (ha)	Üretim (ton)		Verim (kg/ha)		Pamuk lifi ithalatı	
		Kütlü	Lif	Lif	Kütlü	Miktar (ton)	Değer (bin USD)
2006	590.700	2.550.000	976.540	4.320	1666	761.014	974.339
2007	530.253	2.275.000	867.716	4.290	1640	956.000	1.282.779
2008	495.000	1.820.000	673.400	3.680	1360	619.000	1.005.813
2009	420.000	1.725.000	638.250	4.110	1520	760.171	1.008.295
2010	480.650	2.150.000	816.705	4.480	1700	895.089	1.726.419
2011	542.000	2.580.000	954.600	4.760	1760	611.924	1.864.387
2012	488.503	2.320.000	858.400	4.750	1760	618.292	1.279.521
2013	450.890	2.250.000	877.500	4.990	1950	876.534	1.689.005

1.5 Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Bitkilerin Üretimi ve Ekonomik Etkisi

Genetiği değiştirilmiş (GD) bitkilerin 1996 yılında başlayan üretim serüveni 17 yıllık bir süre sonunda 2013 yılında 175 milyon hektar gibi çok büyük bir ekim alanına ulaşmıştır (Çizelge 1.3, James 2014). Üretilen bu bitkilerin hemen hemen tamamı böceklerle ve ot öldürücülere dayanıklı çeşitlerden oluşmaktadır. Bu bitkilerin üretildiği alanlarda verim artışları sağlandığı gibi, kimyasal ilaçların kullanımı ve işçilikten de önemli ölçüde tasarruf edilmiştir. Bu önemli avantajlar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki üreticilerde her yıl daha fazla GD çeşit üretme arzusunu uyandırmıştır. GD bitkiler gelişmiş ülkelerde daha fazla üretilirken gelişmekte olan ülkelerde de yaygın olarak üretim alanı bulabilmiştir.

Günümüzde GD bitkiler 27 ülkede üretilirken 54 farklı ülkede de yem ve gıda olarak kullanılmaktadır (Çizelge 1.3). Üretilen bu GD bitkilerin yaklaşık yarıya yakını da ABD’de üretilmektedir. ABD’yi Brezilya, Arjantin, Hindistan, Kanada ve Çin takip etmektedir. GD bitkiler gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki küçük ve büyük çiftçiler tarafından hızla benimsenmiş olup; kayda değer ekonomik, çevresel, sağlık ve sosyal kazanımlar elde etmişlerdir. Bu kazanımlar sonucunda GD bitkiler üreten çiftçilerin sayısı 2013 yılında 18 milyonu aşmıştır. Ayrıca, birçok ülkede GD soya, pamuk, mısır ve kolza çeşitlerinin üretim oranları %90’ların üzerine çıkmıştır.

2013 yılında transgenik bitkilerin toplam üretimdeki paylarına bakıldığında, dünya genelinde üretilen toplam 107 milyon hektarlık alanda yapılan soya üretiminin %79’u 34 milyon hektarlık alanda yapılan pamuk üretiminin %70’ü transgenik bitkilerden oluşmaktadır. İlave olarak, oranları düşük de olsa 177 milyon hektarlık dünya mısır üretiminin %32’si ve 34 milyon hektarlık toplam kolza üretiminin ise %24’ü transgenik bitkilerden oluşmaktadır (Çizelge 1.4). Özellikle de en fazla pamuk üreten 4 ülke olan Hindistan, Çin, ABD ve Pakistan’da pamuk üretiminde tamamen böceklerle dayanıklı transgenik çeşitleri kullanılır hale gelmiştir. Öte yandan, pamuk üretimde önemli bir yere (7. sırada) sahip olan ülkemiz, yasal durumlardan dolayı transgenik pamuk üretimine geçememiştir. Ancak, dünyadaki gelişmeler göz önüne alındığında, bu yasalarda yeniden düzenlemelere gidilmesinin kaçınılmaz olacağı düşünölmektedir.

Çizelge 1.3 2013 yılında GD bitkilerin üretildiği ülkeler ve ekim alanları (James 2014, <https://www.ers.usda.gov/> 2014b)

Ülke	Ekim Alanı (Milyon Hektar)	GD Bitkiler ve Toplam Üretim Oranları
ABD	70.1	Soya, Mısır, Pamuk; Ş. Pancarı, Kolza, Papaya, Yonca
Brezilya	40.3	Soya, Pamuk, Mısır
Arjantin	24.4	Soya, Mısır, Pamuk
Hindistan	11.0	Pamuk
Kanada	10.8	Kolza, Mısır, Soya, Şeker Pancarı
Çin	4.2	Pamuk, Domates, Kavak, Petunya, Papaya, Biber
Paraguay	3.6	Soya, mısır, pamuk
Güney Afrika	2.9	Mısır, Soya, Pamuk
Pakistan	2.8	Pamuk
Uruguay	1.5	Soya, Mısır
Bolivya	1.0	Soya
Filipinler	0.8	Mısır
Avustralya	0.6	Pamuk, Kolza
Burkina Faso	0.5	Pamuk
Myanmar	0.3	Pamuk
Sudan	0.1	Pamuk
Meksika	0.1	Pamuk, Soya
İspanya	0.1	Mısır
Şili	<0.1	Mısır, Soya, Kolza
Kolombiya	<0.1	Pamuk, mısır
Honduras	<0.1	Mısır
Portekiz	<0.1	Mısır
Küba	<0.1	Mısır
Çek Çum.	<0.1	Mısır
Kosta Rica	<0.1	Pamuk, Soya
Romanya	<0.1	Mısır
Slovakya	<0.1	Mısır
TOPLAM	175.2	

Çizelge 1.4 Dünyada 2013 yılında transgenik bitkilerin geleneksel bitkilere oranı (James 2014)

Bitkiler	Toplam Ekim Alanı (Milyon Hektar)	GDB Ekim Alanı (Milyon Hektar)	GD Bitkilerin Toplam Üretime Oranı (%)
Soya	107	84.5	79
Mısır	177	56.6	32
Pamuk	34	23.8	70
Kolza	34	8.2	24

Son yıllarda küresel ısınmanın da etkisiyle böcek yoğunluğunda ve böceklerin bölgeler arasındaki hareketliliğinde önemli artışlar gözlenmektedir. Bundan dolayı zararlı böcekler günümüzde bitkisel üretimi tehdit eden en büyük etmen haline gelmiştir. Zararlı böceklerle mücadele yapılmadığında bazı bitkilerde oldukça yüksek sayılabilecek kayıplar oluşabilmektedir. Zararlı böceklerle yapılan mücadeleye rağmen dünya genelinde böceklerden kaynaklanan ürün kayıplarının yaklaşık %15–20 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, böcekler birçok hastalığın yayılmasında ve gelişmesinde de önemli rol oynamaktadır.

Zararlı böceklerle mücadelede kültürel ve biyolojik savaş yöntemleri kullanılsa da, en etkili ve yaygın olanı kimyasal ilaç (insektisit) kullanımınıdır. Verimli kültür çeşitleri çoğunlukla zararlı böceklere karşı dayanıksız olduklarından dolayı, uzun yıllardan beri insektisitler bitkiler üzerine püskürtülerek böcek mücadelesi yapılmaktadır. Günümüzde böcek öldürücü olarak binlerce kimyasal birçok ülkede ruhsatlandırılmıştır. Özellikle böcek salgınlarının yoğun olduğu yıllarda pamuk üretiminde kimyasal ilaçlama sayısı 3'e çıkabilmekte ve mücadeleye rağmen önemli verim kayıpları yaşanabilmektedir. Ayrıca bitki kök, gövde ve meyvesi içerisinde gelişme gösteren böcek larvalarına karşı kimyasal mücadeleler çoğu zaman etkisiz kalabilmektedir. Öte yandan, tarım ilaçları içerisinde insektisitler çevre, insan ve hayvan sağlığını en fazla tehdit eden grup olarak değerlendirilmektedir. İnsektisitler insanlar tarafından ilaçlama sırasında ve ürünlerde kalıntı şeklinde alındığında geri dönüşümü olmayan biyolojik ve genetik hasarlara

neden olabilmektedir. Çok sayıda çiftçi ilaçlı mücadele sırasında hayatını kaybetmektedir. Yapılan yoğun kimyasal mücadele yöntemleri büyük ekonomik kayıplar ile başta toprak ve su olmak üzere önemli bir çevre kirliliğine neden olduğu gibi doğal ekolojik dengeye de büyük zararlar verebilmektedir. Kimyasalların kullanılmasıyla ekolojik denge ve bitkisel üretim için gerekli olan faydalı böcekler de zarar görmekteyiz. Ayrıca, insektisitlerin yaygın kullanımı sonucunda hedef böcekler kullanılan kimyasala karşı zamanla direnç kazanabilmekte ve direnç sonraki döllere de aktarılmaktadır (Çakır ve Yamanel 2005). Dolayısıyla dirençli böceklere karşı daha etkili kimyasalların kullanımına gidilmektedir.

İlk olarak 1902 yılında Japonya'da keşfedilen *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bakterisinin sporülasyon esnasında belirli böcekler üzerine öldürücü etki yapan proteinler ürettikleri belirlenmiştir. Bu proteinler ileriki yıllarda *B. thuringiensis* bakterisine ürettirilerek *Lepidoptera*, *Coleoptera* ve *Diptera* takımındaki böceklere karşı insektisit olarak kullanılmıştır. Halen kullanılmakta olan biyo-insektisitlerin %90'ını oluşturan *Bt* formülasyonları, toplam insektisit pazarının da %5'ini oluşturmaktadır. Modern bitki biyoteknolojisinin kullanımı sonucunda *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bakterisinden kopyalanarak verimli kültür çeşitlerine aktarılan tek bir gen (*cry*) sayesinde zararlı böceklere karşı dayanıklı genetiği değiştirilmiş (GD) bitkiler üretilebilmiştir. Böceklere dayanıklı GD pamuğun ABD, Hindistan, Çin, Pakistan, Brezilya, Arjantin ve Güney Afrika Cumhuriyeti gibi ülkelerde yaygın olarak üretimi sonucunda dolaylı olarak verimde %30'lara varan verim artışı sağlanırken insektisit kullanımında da çok önemli düşüşler gözlenmiştir (Çizelge 1.5, Qaim 2009, Sadashivappa ve Qaim 2009). Özellikle de son yıllarda dünyanın önemli pamuk üreticisi ülkelerinden olan Hindistan'da 11 milyon hektarlık alanda böceklere dayanıklı GD pamuk üretilmeye başlanmıştır. GD pamuk üremiyle Hindistan pamuk ihraç eder hale gelmiştir. Çiftçiler dayanıklı çeşitler sayesinde insektisit ve ilaçlama için harcadıkları yakıt maliyetini en az düzeye indirmişlerdir. GD bitkilerin kullanımı verim artışıyla birlikte ürün kalitesini de artırmıştır. Kütlüde oluşan, kaliteyi doğrudan etkileyen böcek zararları ve buna bağlı olarak gerçekleşen mikotoksin üretimi engellenebilmiştir. Ayrıca, insektisit kullanılmaması sonucunda çiftçilerin sağlığında da önemli iyi yönde gelişmeler sağlanmıştır. Son yıllarda hem herbisitlere ve hem de böceklere dayanıklılık özelliğini

taşıyan GD pamuk çeşitlerinin üretiminde çok önemli artışlar gözlenmektedir. Bu bitkilerin kullanılmasıyla daha az maliyetle birim alandan daha fazla ürün elde edilerek daha yüksek kazanç sağlanabileceği ifade edilmektedir.

Çizelge 1.5 Böceklere dayanlı GD pamuk üretiminin tarımsal ve ekonomik etkisi (Qaim 2009, Sadashivappa ve Qaim 2009)

	Hindistan	Çin	G. Afrika	Arjantin	Meksika	ABD	Ort.
İnsektisit kullanımında azalma (%)	41	65	33	47	77	36	49.8
Ürün artışı (%)	37	24	22	33	9	10	22.5
Kar artışı (US\$/ha)	135	470	91	23	295	58	178.7

1.6 Ülkemizde Pamuk Zararlıları

Ülkemizde pamuk tarımının yapıldığı alanlarda farklı takımlara ait birçok böcek türü büyük ölçüde zarar meydana getirmektedir (Çizelge 1.6). Ege Bölgesi'nde yetişen pamuk alanlarında *Lepidoptera* takımı içerisinde zararlı olan beş familyadan 14 türü Bozkurt (1973) tarafından tespit edilmiştir. Göven (1995) ise GAP Bölgesindeki pamukların ana zararlısı olarak *Heliothis armigera*'yı göstermiş ve zararlının pamukta biri koza oluşturma diğeri olgunlaşma döneminde olmak üzere iki döl verdiğini belirtmiştir. *Lepidoptera* takımı pamuk bitkisinde zarar meydana getiren en geniş takım olmakla birlikte zararları bölgelere ve yıllara göre değişiklik göstermektedir (Göven ve Gümüş 1998). Yapılan çalışmalar sonucu yeşilkurt (*Heliothis armigera* Hbn.)'un Akdeniz Bölgesi pamuk alanlarında ana zararlı olduğu, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde ise zaman zaman mücadeleyi gerektirecek yoğunluğa ulaştığı belirlenmiştir (Mart vd. 2000). Ünlü (2001) 1998-2000 yılları arasında ülkemiz pamuklarının %20'sinin yetiştirildiği Şanlıurfa'da pamukta zarar yapan *Lepidoptera* takımına ait sekiz türü tespit etmiştir. Ünlü ve Kornoşor (2002) Harran Ovası'nda Yeşilkurt, Dikenlikurt ve Pembekurt'un ekonomik olarak zararlı türler olduğunu

belirlerken, Yabaş (1979) Çukurova’da; Stam ve El-Mosa (1990) Harran Ovası’na sınır olan Suriye’de Yeşilkurt’un pamuk alanlarında her yıl zararlı olmadığını belirtmişlerdir. Ünlü ve Kornoşor (2003) yapmış oldukları diğer bir çalışmada Şanlıurfa ili ve çevresindeki pamuk alanlarında *Spodoptera littoralis* Boisid zararının önemli seviyede olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 1.6 Ülkemizde zarar yapan pamuk böcekleri ve zarar yaptığı bitki kısımları

Takımı	Türkçe ismi	Latince ismi	Zararı
Hemiptera	Pamuk yaprak biti	<i>Aphis gossypii</i>	Yaprak, gövde ve dallarda, Fumajin
	Tütün beyaz sineği	<i>Bemisia tabaci</i>	Yapraklarda, Fumajin
	Pamuk yaprak pireleri	<i>Empoasca decipiens, Asymmerasca decedens</i>	Yapraklarda
	Bitki tahta kuruları	<i>Creontiades pallidus, Exolygus gemellatus, E. pratensis</i>	Tüm bitki aksamında
Thysanoptera	Tütün tripsi	<i>Thrips tabaci</i>	Yapraklarda
	Çiçek tripsleri	<i>Frankliniella intonsa, F. occidentalis</i>	Çiçek ve kozalarda
Acarina	Kırmızı örümcekler	<i>Tetranychus cinnabarinus, T. urticae</i>	Tüm bitki aksamında
Lepidoptera	Yeşil kurt	<i>Helicoverpa armigera</i>	Tarak ve kozalarda
	Pembe kurt	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Çiçek ve kozalarda
	Dikenli kurt	<i>Earias insulana</i>	Tarak ve kozalarda
	Kesici kurtlar (Bozkurtlar)	<i>Agrotis segetum, A. ipsilon</i>	Pamuk fidesini keserek
	Pamuk Çizgili Yaprak kurdu	<i>Spodoptera exigua</i>	Yapraklarda
	Pamuk Yaprak kurdu	<i>Spodoptera littoralis</i>	Yapraklarda

Pamuk ekim alanlarında zarar meydana getiren diğer bir böcek takımı ise *Hemiptera*’dır. Bu takıma ait en önemli pamuk zararlılarını ise *Bemisia tabaci* Genn., *Aphis gossypii* Glov., *Empoasca decipiens* Paolive *Asymmerasca decedens* Paoli gibitürler oluşturmaktadır. *B. tabaci* 1974 yılından bu yana özellikle Çukurova

bölgesindeki pamuk alanlarında sorun oluşturmaktadır (İşler ve Özgür 1992). Mart vd. (1997) ise *A. gossypii*'nin 1984 yılından itibaren özellikle Akdeniz bölgesinde hızlı bir yayılış gösterdiğini ve buna bağlı olarak da yaygın bir ilaçlı mücadele gerektirdiğini belirtmişlerdir. Efil ve Güçlü (2004) Diyarbakır, Şanlıurfa ve Mardin illeri pamuk alanlarında yapmış oldukları çalışmada 12 *Cicadellidae* (Yaprak piresi) türünün bulunduğunu belirlemiştir. Mart ve Sunulu (2011) ise Doğu Akdeniz bölgesinde bulunan Kahramanmaraş ili pamuk ekim alanlarında yaprak pirelerinin önemli bir zararlı haline geldiğini bildirmişlerdir.

Thysanoptera takımına ait olan *Thrips tabaci* L. (Tütün tripsi), *Frankliniella intonsa* Trybom ve *F. occidentalis* Perg. (Çiçek tripsleri), pamuk ekiliş alanlarında zarar yapan sokucu-emici ağız yapısına sahip diğer türlerdir. Efil vd. (2010) Mardin ilinde gerçekleştirdikleri çalışmada pamuk ekiliş alanlarında özellikle erken dönemde *T. tabaci* popülasyonunun yüksek olduğunu belirlemiştir. Çukurova bölgesinde ise Çiçek tripsleri (*F. intonsa* ve *F. occidentalis*) pamuk tarlalarında geç dönemde özellikle Ağustos ayı ortalarında en yüksek popülasyonuna ulaşmakta ve büyük zararlara neden olmaktadır (Atakan ve Özgür 2001).

Hemiptera takımına ait türlerden afitler, yaprak pireleri ve tütün beyaz sineği, *Thysanoptera* takımından tütün tripsi ve çiçek tripsleri, *Acarina* takımından kırmızı örümcekler, pamuk yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerde (Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu) yayılış göstermekte ve zararları buldukları bölgelere ve iklim şartlarına göre değişiklik göstermektedir. *Lepidopter* zararlılardan pamuk çizgili yaprakkurdu (*S. exigua*), yurdumuzdaki pamuk alanlarında fide dönemi dahil pamuğun tüm fenolojik dönemlerinde zarar meydana getirmekte iken yaprakkurdu (*S. littoralis*) ise, pamuk vegetasyonunun son zamanlarında zararlı olup, özellikle yapraklarla beslenmektedir. Dikenlikurt (*E. insulana*), ülkemizin Suriye sınırı boyunca (Akçakale, Ceylanpınar, Kızıltepe ve Nusaybin) yetiştirilen pamuklarda zarar yapmaktadır. Yeşil kurt (*H. armigera*) ülkemizde pamuk yetiştiriciliği yapılan tüm alanlarda bulunmakta ve bitkinin özellikle generatif organlarında zarar vermektedir. Pembe kurt (*P. gossypiella*) ise ülkemizdeki tüm pamuk alanlarında zarar meydana getirmektedir. Pembekurt pamuk bitkisinin özellikle koza ve içerisinde oluşan çiğitlerle beslenerek zarar verir. Pamuk

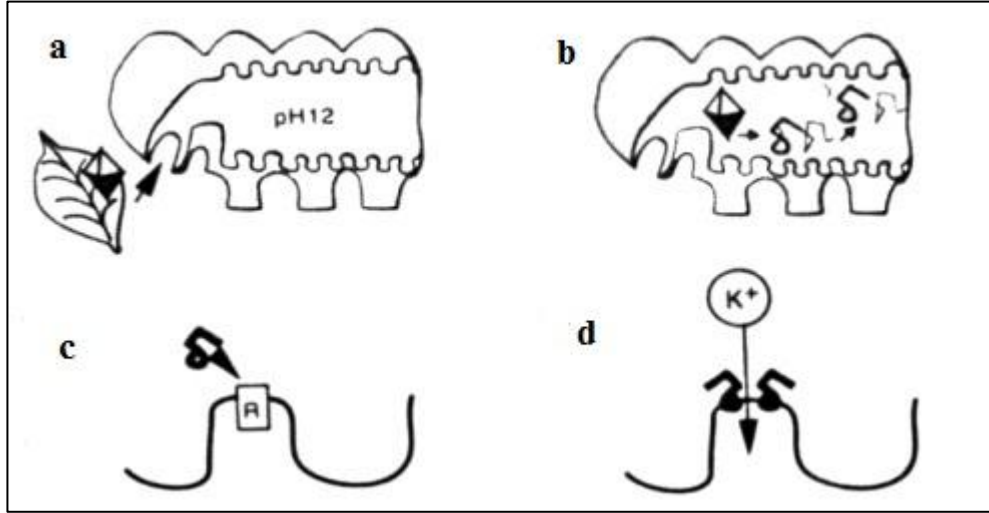
yetiştiriciliği yapılan Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde üreticiler zararlılara karşı böcek yoğunluğuna göre 1-3 kez ilaçlama yapmaktadır. Çok fazla sayıda zararlısı bulunan ve mücadelesinin de nispeten zor olan pamuk tarımında, dünyada olduğu gibi ülkemizde de transgenik çeşitlerin kullanılmasına yönelik adımların atılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

1.7 Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi

Zararlı böceklere dayanıklı GD bitkiler üretmek için farklı insektisidal proteinleri kodlayan çok sayıda gen bitkilere aktarılmıştır. Bunlara örnek olarak *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bakterisine ait *cry*, proteinaz inhibitör, lektin, alfa-amilaz inhibitör, kitinaz, kolesterol oksidaz ve avidin genleri örnek olarak verilebilir (Öktem 2004a). Ancak, bu genleri taşıyan GD bitkiler içerisinde yalnızca *cry* genlerini taşıyan çeşitler ticarileşerek, yaygın olarak üretime girebilmiştir. Bunun nedeni de *cry* proteinlerinin zararlı böcekler üzerinde son derece toksik olması, çevre ve hedef dışı böcekler ile organizmalara etkisinin olmaması veya çok sınırlı kalmasıdır.

Bacillus thuringiensis toprakta yaşayan gram-pozitif bir bakteri olup, sporulasyon sırasında kristalize (*cry*) yapıda delta-endotoksin olarak adlandırılan proteinleri üretmektedirler. Üretilen bu proteinler (*cry*-I, *cry*-II, *cry*-III, *cry*-IV, *cry*V ve *cyt* gibi) farklı *Bt* suşlarına göre değişiklik gösterebilmektedir. *Cry*-I toksinleri *Lepidoptera* takımındaki böcekleri öldürürken, *cry*-III toksinleri *Coleoptera* ve *cry*-IV toksinleri ise *Diptera* takımındaki böcekler üzerinde ölümcül etki yapmaktadır. Öte yandan, *cry*-II toksinleri ise hem *Lepidoptera* hem de *Diptera* üzerinde etkin olurken *cry*-V hem *Lepidoptera* hem de *Coleoptera* üzerinde etkin olduğu belirtilmektedir (Öktem 2004a, Sharma vd. 2004). Kristalin delta-endotoksinleri (*cry*) inaktif protoksinler olarak sentezlenirken, aktif forma dönüştüklerinde hedef böcekler üzerine yüksek oranda toksisite gösterirler. *Cry* proteinleri böcek sindirim sistemine ulaştığında bazik ortam sayesinde proteazlar tarafından kesilerek aktif toksin haline dönüşürler. Aktif hale dönüşen proteinler belirli böceklerin orta bağırsağında bulunan epitel hücrelerinin reseptör bölgelerine bağlanarak delikler oluşmasına neden olurlar (Şekil 1.1). Delik oluşumunu takiben hücre lizisi ve barsak bütünlüğünün bozulması sonucu böcek

beslenme yetersizliği ya da septicemia nedeniyle ölmektedir (Aronson ve Shai 2001, Öktem 2004a). *Cry* endotoksin proteinleri 3 farklı alt üiteden oluşmaktadır. İlk alt üite delik oluşumundan, ikinci ve üçüncü alt üitelerin ise spesifik böcek reseptörünün tanınması ve bağlanmadan sorumlu olduğu bildirilmektedir. (Li vd. 1991, Cannon 1996, de Maagd vd. 1996).



Şekil 1.1 *Cry* toksinlerinin etki mekanizması (Öktem vd. 2004'den alınmıştır)

a. *Cry* geni taşıyan transgenik bitkinin böcek tarafından alınması b. Protein yapısındaki toksinin böcek orta bağırsağında proteinazlar tarafından aktif forma döndürülmesi c. Aktif toksinin epitel hücreler üzerinde bulunan ilgili reseptörlere bağlanması d. Hücre zarlarında delik oluşumu ve hücrelerin ölümü

Günümüzde 50 alt grupta 400'den fazla *cry* geni karakterize edilerek sınıflandırılmış ve veri tabanına ilave edilmiştir. Bu genlerin bir kısmı da bitkilere aktarılarak zararlı böcekler üzerine etkileri araştırılmıştır. Başarılı olan çok sayıda *cry* geni ise pamuk başta olmak üzere kültür çeşidine aktarılarak ticarileştirilmiştir. Tek hücreli canlılara ait genler yapısal olarak çok hücreli canlılara ait genlerden farklılık gösterdikleri için doğrudan bitkilere aktarıldıklarında işlev yapamamaktadırlar. Bu genlerin bitkilerde aktif olabilmeleri için promotör ve terminatör bölgelerinin bitkilerde aktif olanlarla değiştirilmesi gerekmektedir. İlave olarak kodon optimizasyonu da gerekmektedir. Ancak, son yıllarda yapılan laboratuvar ve arazi çalışmalarında bazı böceklerin *cry* genlerine karşı dayanıklılık kazanabilecekleri yönünde bulgular elde edilmiştir (Tabashnik 1994, Tang vd. 2001, Ma vd. 2005, Huang vd. 2007, Anilkumar vd. 2008). Bunun en büyük nedeninin ise aktarılan genlerin CaMV 35S gibi çok kuvvetli ve

konstitütif promotörler tarafından kontrol edilmesi ve üretilen yüksek seviyedeki toksik proteinlerin de böceklerde dayanıklılık mekanizmasını geliştirebileceği şeklinde ifade edilmektedir. Bu çalışmada ayrıca *cry* genlerinin kontrol edilmesinde yaralanmayla aktif olan (AoPR1) ve sadece ısırma bölgelerinde yüksek seviyede protein üretimine neden olan AoPR1 promotörünün kullanılması hedeflenmiştir. AoPR1 promotörünün kullanılmasıyla böceklerin direnç kazanmasının engellenmesi hedeflenirken, aynı zamanda bu toksik proteinlerin üretimlerinin sadece ısırılan bölgeyle sınırlı kalması planlanmaktadır.

1.8 AoPR1 Promotörünün *Cry* Genlerinin Kontrol Edilmesinde Kullanımı

Asparagus officinalis fidelerinin mekanik olarak yaralanmasıyla elde edilen mezofil hücrelerine ait mRNA'lardan çok sayıda cDNA elde edilmiştir. Bunlar içerisinde yaralanmayla yüksek oranda aktivite gösteren bir cDNA belirlenerek buna karşılık gelen bir promotör (AoPR1) izole edilmiştir. Yapılan araştırmalarda bu genin patojen ilişkili (PR) genlerle önemli oranda benzerlik gösterdiği, ancak yaralanma bölgesinde onlardan (PAL ve CHS gibi) çok daha yüksek oranlarda ve uzun süreli bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. AoPR1 promotörünün GUS geninin önüne klonlanarak tütün ve patates gibi bitkilere aktarılması sonucunda yaralanma bölgesinde 3. saatten, 4 ve 5. güne kadar yüksek oranlarda aktivite gösterdiği GUS enzimiyle belirlenmiştir (Özcan 1993, Warner vd. 1993, Mur vd. 2004). Ayrıca, AoPR1 tarafından kontrol edilen GUS aktivitesinin yaralanmış bölgede sınırlı kaldığı belirlenirken, bu bölgedeki aktivitenin kontrol olarak kullanılan CaMV 35S promotöründen de çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. İlave olarak, AoPR1-GUS ve 35S-GUS geni içeren çok sayıda bireysel transgenik tütün ve patates bitkileri elde edilerek bu bitkilerin farklı organlarındaki gen ekspresyonu belirlenmiştir (Firek vd. 1993, Özcan 1993, Özcan vd. 1993, Uranbey 2005). AoPR1-GUS geni yaralanan bitki kısımlarında 35S-GUS geninden çok daha yüksek oranlarda aktivite gösterirken, yaralanmadığı sürece yaprak, gövde, kök, tohum ve yumrulara ya hiç ya da son derece düşük oranlarda aktivite göstermiştir. AoPR1 promotörü *cryIAc* geninin önüne klonlanıp tütün bitkisine aktarıldığında da *cryIAc* geninin genelde bitkide sessiz kaldığı, ancak böcekler tarafından yaralanıp, çiğnendiğinde toksik *cryIAc* proteinin yüksek oranlarda üretilerek üzerinde çalışılan

böceklerin hızlı bir şekilde %100 oranında ölümüne neden olmuştur (Gulbitti-Onarici vd. 2009). AoPR1 promotörü tarafından kontrol edilen *cryIAc* geninin pamuk bitkisine aktarılması sonucunda da aynı sonucun alınacağı beklenmektedir. Bu sistemin en önemli avantajı zehirli *cry* proteinlerinin sadece ısırılan bölgelerde üretilmesi yaprak, kök, gövde, tohum, lif, meyve ve polen gibi organlarda üretilmemesi olacaktır. Bu durum ise bu bitkilerin hem tüketiciler tarafından kabul edilmesini kolaylaştıracak, hem de çevre ile hedef dışı organizmalar üzerine olası negatif etkilerini en aza indirecektir.

1.9 Pamukta Yabancı Otlar

Yabancı otlar ışık, su ve besin maddelerini tüketerek kültür bitkilerine zarar verirler. Ayrıca; yabancı otların hastalık ve zararlılara konukçuluk etmeleri, hasadı zorlaştırmaları ve kaliteyi bozmaları gibi istenmeyen özellikleri de vardır (Emiroğlu ve Gürel 1997, Öziş 1997). Pamuk ekim alanlarında hem tek yıllık hem de çok yıllık yabancı otlar sorun oluşturmaktadır (Tursun vd. 2004). Pamuğun yabancı otlarla rekabeti bitki çıkışından itibaren ilk 4-8 haftalık periyotta olmaktadır (Özer ve ark. 2001). Pamukta verim kaybı yabancı otlardan dolayı dünyada ortalama %5,8 iken (Cramer 1967), bazı yerlerde bu oran ekolojiye, yapılan kültürel işlemlere ve yabancı otun türüne göre %21-61'e kadar ulaşabilmektedir (Anonim 1995). Pamuk alanlarında sorun olan başlıca yabancı otlar, kırmızı köklü horoz kuyruğu, deve dikenini, sirken, bambul otu, tarla sarmaşığı, köpek dişi ayrığı, topalak, şeytan elması, çatal otu, darıcan, kargı, semizotu, soda otu, yapışkan otu, köpek üzümü, kanyaş, demir dikenini, domuz pıtrağıdır (Demirkan 1999). Pamukta yabancı ot problemi, ülke ekonomisi ve üretici açısından verim ve kaliteyi etkileyecek sorunların başında gelmektedir. Özellikle pıtrak (*Xanthium* spp.) ve yapışkan otu (*Setaria* spp.) gibi yabancı otlar hem pamuğun liflerine karışıp lif kalitesini düşürerek, hem de hasatı güçleştirerek zararlı olmaktadır (Uygur vd. 1984). Yine pamuk alanlarında yabancı otlarla yapılan mücadelede milyarlarca lira ekonomik ve büyük iş gücü kayıplarına neden olmaktadır (Kaya ve Nemli 2001).

1.10 Bar Geninin Transgenik Bitkilerin Seçiminde ve Herbisite Tolerans Geni Olarak Kullanılması

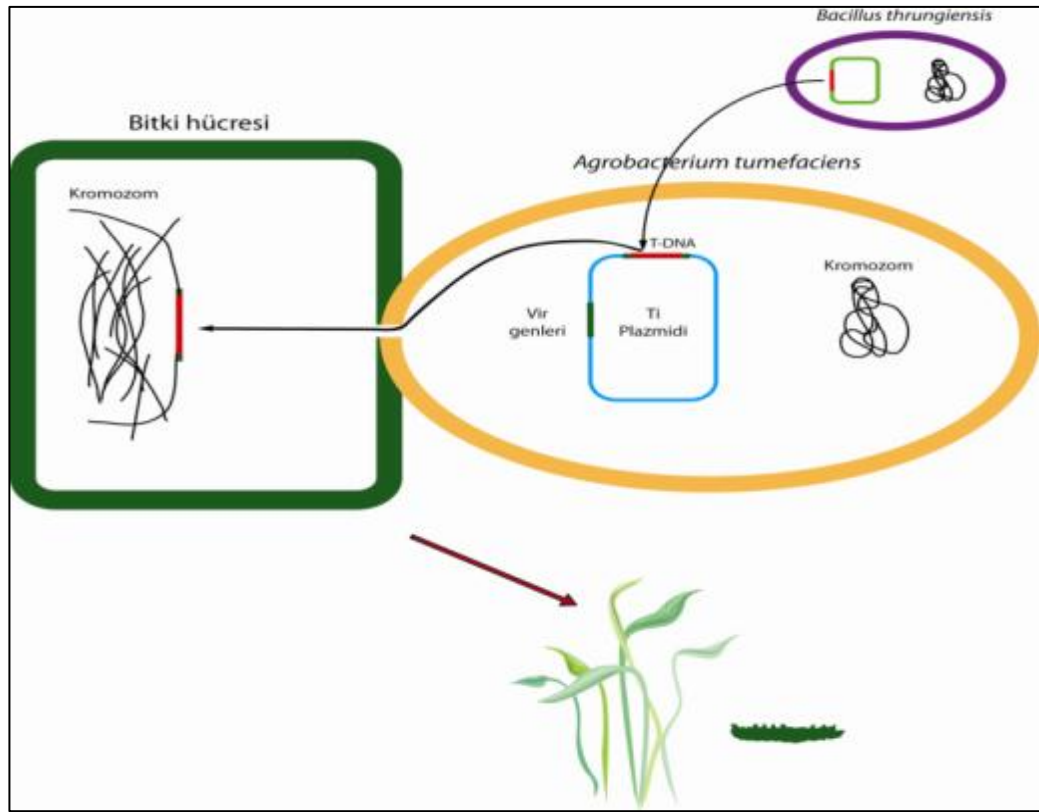
Son yıllarda birden fazla tarımsal özelliğin (böceklerle ve herbisitlere dayanıklılık gibi) kazandırıldığı bitkilerin üretiminde önemli artışlar yaşanmaktadır. Bu çalışmada seçici işaret geni olarak antibiyotiklere direnç genleri (*nptII* ve *hptII* gibi) yerine herbisitlere toleransı sağlayan *Streptomyces hygroscopicus* orijinli *bar* geni kullanılmaktadır. Bu sayede hem gen aktarımı yapılan sürgün ve bitkiler etkili bir şekilde seçilebilmekte, hem de elde edilen bitkiler *bar* geninin üretmiş olduğu PAT enzimi sayesinde glifosinat amonyum herbisidine karşı toleranslı olmakta (Öktem, 2004b) ve etkin bir yabancı ot kontrolü de yapılabilmektedir. Ayrıca, antibiyotik direnç genlerinden kaynaklanan endişeler de ortadan kalkmaktadır. Yapılan araştırmalarda da *bar* geninin ve üretmiş olduğu PAT (phosphinotricin-N-asetiltransferaz) enziminin hedef dışı canlılarda allerjik veya toksik etkisine rastlanmamıştır.

1.11 *Agrobacterium tumefaciens* ile Gen Aktarımı

Günümüzde *A. tumefaciens* tercih edilen ve en yaygın gen aktarım aracı olma özelliğini korumaktadır. Tercih edilmesinin en büyük nedeni ise sadece istenilen genleri aktarması ve fazladan istenmeyen plazmid DNA parçalarının geçişinin son derece düşük olmasıdır. Ayrıca bu bakteri ile gen aktarımının kolay olması ve fazla altyapı gerektirmemesi de diğer olumlu yönleridir. *A. tumefaciens* ile gen aktarımının en büyük dezavantajı ise konukçu seçiciliğidir. Tütün, patates ve domates gibi *Solanacea* familyasındaki bitkilere bakteri ile gen aktarımı son derece kolay iken; pamuk, tahıllar, baklagiller ve meyve ağaçlarına gen aktarım frekansı son derece düşüktür. Bundan dolayı bu bitki çeşitleri için yoğun bir laboratuvar çalışması yapılması gerekmektedir.

A. tumefaciens gram-negatif bir bakteri olup, *Rhizobiacea* familyasındandır. Bu bakteri toprakta yaşamakta ve bitkiyi genellikle kök boğazında oluşan yaralardan enfekte etmektedir. Enfeksiyon sonucunda bitkinin kök boğazı hücrelerinde görülen düzensiz bölünme tümör (ur) oluşmasına neden olmaktadır. Bu hastalık tarımsal açıdan oldukça önemli olup, çoğu iki çenekli bitkiyi etkileyerek her yıl büyük ekonomik kayıplara yol

açmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda hastalık nedeninin bakteriden bitki hücrelerine geçen bir DNA parçası olduğu anlaşılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi kromozom DNA'sından başka, Ti plazmidini (tumour-inducing/tümör oluşturucu) olarak bilinen çok küçük yuvarlak bir DNA molekölü daha içermektedir (Watson vd. 1975), (şekil 1.2). İçte, bakteriden bitki hücrelerine geçen faktör, Ti plazmidinin üzerinde bulunan ve T-DNA (Transferred-DNA) olarak adlandırılan küçük bir DNA parçasıdır (Chilton vd. 1980). T-DNA bitkinin kromozomlarına entegre olduktan sonra, taşıdığı genlerin çalışmaya başlamasıyla bitki hücrelerinde yeni enzimler üretilir ve böylelikle hücrenin hormon dengesi bozulur (Bevan ve Chilton 1982, Bevan vd. 1983). Bunun sonucunda hormon dengesi bozulan bu hücrelerin çok hızlı bir şekilde ve düzensiz olarak bölünmesiyle bitkide tümör meydana gelir.



şekil 1.2 *Agrobacterium tumefaciens*'ten bitki hücrelerine gen (T-DNA) aktarımı (Özcan ve Sancak 2005'ten değiştirilerek, Özcan 2009)

T-DNA bölgesinde yapılan araştırmalar, T-DNA'nın bitki hücrelerine entegre olabilmesi için iki önemli bölgeyi taşıması gerektiğini ortaya koymuştur (Wang vd. 1984).

Bunlardan ilki T-DNA'yı sağdan sınırlandıran "sağ sınır" ikincisi ise soldan sınırlandıran "sol sınır" bölgesidir. Daha sonra yapılan araştırmalar, bu iki sınır arasına yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolayca bitki hücresine aktarılabilirdiğini göstermiştir (Leemans vd. 1982),(şekil 1.2). Üstelik tümör meydana getiren genlerin, T-DNA bölgesinden kesici enzimler ile kesilerek çıkarılmasının bitki hücresine olan gen transferini hiçbir şekilde etkilemediği çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Schell ve Van Montagu 1983).

A. tumefaciens transgenik bitkilerin üretiminde kullanılan en yaygın araç olma özelliğini halen korumaktadır. Bu bakteri aracılığıyla her çeşit bitki hücresine gen aktarmak mümkün iken, gen aktarılan hücre oranı son derece düşüktür. Bu nedenle, çok sayıda gen aktarımı yapılmayan hücre içerisinden gen aktarımı yapılan hücrelerin belirlenerek seçilmesi gerekmektedir. Gen aktarımının başarısını en fazla etkileyen faktör ise gen aktarımı yapılan hücrelerin rejenerasyon kabiliyetidir. Rejenerasyon kabiliyeti (totipotensi) olmayan hücrelere yapılan gen aktarımı hiçbir anlam ifade etmemekte ve mutlaka gen aktarımının yapıldığı hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir. Ancak, bitki dokularındaki hücrelerin son derece az bir bölümü hem gen aktarımı hem de rejenerasyon yeteneğine sahiptirler. Bundan dolayı, tarımsal öneme sahip olan genleri bitkilere aktarabilmek için, bitki doku ve hücrelerinden etkili rejenerasyon yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Özcan ve Özgen 1996, Özcan vd. 2004).

1980'li yıllarda *Agrobacterium*'un tümör oluşturma mekanizması anlaşıldıktan sonra bitki genetik mühendisliğinde çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir. İlk olarak, işaret genleri *Agrobacterium*'un T-DNA bölgesine klonlanarak bitki hücrelerine aktarılmıştır. Daha sonra böceklere dayanıklılık genleri başta olmak üzere tarımsal öneme sahip çok sayıda gen farklı organizmalardan klonlanarak *Agrobacterium* aracılığıyla bitki hücrelerine başarılı bir şekilde bitkilere aktarılmıştır (şekil 1.2). Başlangıçta, tek çenekli bitkilere *Agrobacterium* ile gen aktarımı mümkün olmazken, son yıllarda geliştirilen süper-virüent ikili vektörler aracılığıyla bu bitkilere de gen aktarımı kolaylıkla yapılabilmektedir. Günümüzde, *Agrobacterium* aracılığıyla hemen hemen tüm kültür türlerine gen aktarımı mümkün hale gelmiştir (Özcan vd. 2004).

Farklı pamuk çeşitlerine düşük frekansta da olsa *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımının yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle hipokotil, epikotil, sürgün ucu ve kotiledon nodları farklı büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında farklı bakteri ırklarına inokülasyon ve kokültivasyona tabi tutulmuş ve transgenik bitkiler elde edilmiştir (Gould ve Magallanes-Cedeno 1998, Leelavathi vd. 2004, Guo vd. 2007, Tohidfar vd. 2008, Li vd. 2009). Ayrıca; *cryIAc*, *cryIAc + cry2Ab* veya *cryIAc + cryIF*, *cryIAb*, *cryIAc + cryIAb* gibi farklı *Bacillus thuringiensis* genleri de pamuk çeşitlerine aktararak *Lepidoptera* böceklerine karşı tam dayanıklılık sağlanmış ve bu çeşitler geniş alanlarda üretilmeye başlanmıştır (Barwale vd. 2004, Dong vd. 2005, James 2010).

1.12 Araştırmanın Amacı

Diğer birçok bitki türüyle karşılaştırıldığında pamuk bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu oldukça zordur. Ülkemizde yaygın olarak üretilen pamuk çeşitlerinde de başarılı rejenerasyon yöntemlerinin geliştirildiği yayınlara rastlanamamıştır. Bu çalışmada ilk olarak farklı çeşitlerin farklı eksplantları, farklı besin ortamlarında kültüre alınarak gen aktarımına uygun adventif sürgün rejenerasyon yöntemleri amaçlanmıştır. Adventif sürgün rejenerasyonunda olduğu gibi, pamuk bitkisine gen aktarım frekansı da son derece düşüktür. Farklı pamuk çeşitlerine düşük frekansta da olsa *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımının yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, ülkemizde üretilen pamuk çeşitlerinde *A. tumefaciens* ile gen aktarımının başarılı olduğu çalışmalara rastlanamamıştır. Bu çalışma ile sürgün rejenerasyonundan sonra farklı pamuk çeşitlerine *A. tumefaciens* ile *Lepidoptera* takımındaki böceklere dayanıklılığı sağlayan *cryIAc* ve glufosinat amonyum herbisitine toleransı sağlayan *bar* genlerinin aktarılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Pamukta Doku Kültürü Çalışmaları

Davidonis ve Hamilton (1983), ilk kez somatik embriyogenesis Coker 310 çeşidinde, iki yaşındaki kallustan bitki rejenerasyonu tanımlamışlardır. Fakat bu prosedür uzun kültür dönemini içermekle birlikte, diğer çeşitlerde başarılı olmamış ve tekrarlanamamıştır.

Rangan vd. (1984), Shoemaker vd. (1986) ve Gawel vd. (1986), pamukta somatik embriyo ve rejenerasyonun başarılı bir şekilde başlattıklarını rapor etmişlerdir. Araştırmalarında yavaş büyüyen gri, opak kalluslar embriyogenik iken; soluk sarı, açıktan koyu yeşile kadar hızlı büyüyen kalluslar embriyogenik olmamıştır.

Trolinder ve Goodin (1987), süspansiyon kültürlerden bitki rejenerasyonunu tanımlamışlardır. Coker 312 dahil 8 çeşitte hipokotil eksplantından embriyogenik kallus oluşturma kabiliyeti incelemiş ve yüksek embriyogenik kalluslar gözlemlemişlerdir. Bu işlem kısa zamanda çok sayıda somatik embriyonun üretildiği kolay bir sistem olarak tanımlanmıştır.

Finer (1988) çalışmasında, Coker 310 pamuk çeşidinde yüksek düzeyde embriyogenik süspansiyon kültürler elde ettiğini rapor etmiştir. Kallus kültürleri, kotiledon dokulardan aseptik çimlendirilmiş fidelerden başlatılmıştır. Süspansiyon kültürleri oluşturmak için, kallus dokuları 0,5 mg/l pikloram veya 0,1 mg/l 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4 D) içeren bir sıvı ortama yerleştirilmiştir. Embriyogenik süspansiyonun çoğalması için, 5 mg/l 2,4-D kullanılmıştır. Embriyogenik doku, embriyo gelişimi oksin içermeyen 15 mM glutamin içeren sıvı ortama aktarılmıştır. Sonuçta çok sayıda embriyonun üretildiği erken embriyo gelişimi gözlenmiş ve rejener bitkilerin tohumdan üretilmiş bitkilerden daha küçük olduğu görülmüştür.

Li vd. (1989), 15 adet pamuk çeşidine ait hipokotil ve kotiledon eksplantlarında kalluslardan embriyo oluşumu en fazla 1 mg/l kinetin içeren MS besin ortamında olmuştur. Beyaz ve yeşil kalluslardan embriyo elde edilemezken, gri ve yeşilimsi gri kalluslardan 50-60 günde embriyo elde etmişlerdir. Sonuçta bu embriyoidlerin 7-10 gün içinde çimlendiklerini gözlemlemişlerdir.

Wu ve She (1990), *Gossypium*'un 40 farklı kültür ve yabancı türü ile uzak akraba melezlerinde sürgün uçları, yan sürgünleri kullanarak *in vitro* sürgün rejenerasyonunu incelemişler; 0,1 mg/l ZT, 0,02 mg/l BAP, 1,9 g/l KNO₃ ve %3 sukroz ile takviye edilmiş MS besin ortamında bitki rejenerasyon oranını %87,5 olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca sürgün rejenerasyonunda genotipin de önemli olduğu vurgulanmıştır.

Gould vd. (1991), bazı *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. çeşitlerinde en iyi rejenerasyonun 3-5 günlük fidelerin sürgün uçlarının 0,1 mg/l kinetin içeren Murashige and Skoog (MS) besin ortamında bir hafta bekletilmesinden sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamında 1-2 hafta bekletilmesi ve son olarak % 0,3 aktif karbon içeren MS ortamına aktarılmasıyla 2-3 hafta boyunca kök oluşumuna bırakılmasıyla mümkün olduğunu gözlemlemişlerdir.

Firoozabady ve De Boer (1993), farklı pamuk çeşitlerinde olgun ve olgunlaşmamış tohumlar çimlendirilmiş ve 7-10 günlük fidelerden kotiledon, hipokotil parçaları, 21 günlük fidelerden ise yaprak parçaları 100 mg/l myo-inositol, 0,4 mg/l HCl, 0,1 mg/l NAA, 5 mg/l 2İP ve 30 g/l glukoz içeren MS ortamına alınan çeşitlerin çoğunda yüksek oranda kallus oluşmuş, daha sonra bu kalluslar embriyogenik kallus gelişimi için 5 mg/l NAA, 1 mg/l 2İP, 5 mg/l NAA ve 0,1 mg/l 2İP ortamına aktarılmış ve bu kalluslar globular, kalp şeklinde proembriyoid yapılar oluşturmuştur.

Zhang vd. (1994), 7 upland pamuk çeşidinde ilk alt kültürden sonra embriyogenik kallus elde etmişlerdir. Araştırmacılar bazı embriyoların 20 gün sonra çimlendiğini, bazı embriyoların ise 70 gün içinde bile çimlenemediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, IAA

ve kinetin ilavesi ile bitki sayısının azaldığını, fakat bu hormonlarla birlikte aktif karbon kullanıldığında ise bitki sayısının arttığı kanısına varmışlardır. Yine bitki rejenerasyonunun çeşitlere göre değiştiğini, sıvı kültürde yetiştirilen bitkilerin kök gelişiminin iyi olduğu ve toprağa aktarılan bitkilerin yaşama oranının %100'e çıktığı bildirilmiştir.

Nandeswar (1995), *G. hirsutum*'un 6 çeşidinde rejenerasyon yeteneğinin çeşitlere göre ve eksplant yaşına göre farklılık gösterdiğini saptamışlardır. En yüksek rejenerasyon oranının Coker 417-68 çeşidinin 14 günlük sürgün uçlarına 2 mg/l IAA ve 1 mg/l kinetin uygulandığında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Agrawal vd. (1997), *G. hirsutum*'un Angali-LRK 516 çeşidinde 5, 20 ve 35 günlük fidelerin apikal meristem ve kotiledon boğumları ile yaptıkları çalışmada en fazla sürgün sayısının (4.7 adet sürgün/eksplant) 35 günlük fidelerden alınan eksplantların 2.5 mg/l BAP ve 2.5 mg/l kinetin ilave edilmiş besin ortamına alınması ve sürgün uzamasının büyüme düzenleyici içermeyen MS sıvı besin ortamında, köklenmenin ise 0.05-0.1 mg/l NAA içeren ½ MS besin ortamında iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Carvalho vd. (1997), eksplant tipi, karbon kaynağı ve katılaştırıcı maddenin sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemek için; eksplant tipi olarak apikal gözler ve yan gözler, karbon kaynağı olan şeker olarak sukroz ve glikoz, katılaştırıcı olarak agar ve gelrite kullanmışlar ve sürgün ile kök gelişiminde en iyi sonucu apikal gözler, glikoz ve gelritin kullanıldığı denemeden elde etmişlerdir.

Gupta vd. (1997), Hindistan pamuk çeşitlerinde farklı eksplantların sürgün çoğalımı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada çimlendirilmiş bitki filizlerinden kotiledon içermeyen, tek ve iki kotiledonlu hipokotil olmak üzere üç farklı eksplantı farklı konsantrasyonlarda BA, kinetin, ve 2İP ile 0.5 mg/l pyridoksin-HCl, 10 mg/l thiamine-HCl, 0.5 mg/l nicotinic asit, 2 mg/l glycine, 100 mg/l myo-inositol ve 30 g/l glukoz içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Daha sonra sürgünler köklenmesi için NAA içeren ortama aktarılmış ve sonuçta tek kotiledonlu sürgün uçlarının en uygun

eksplant, 22.2 µM BA içeren besin ortamının sürgün oluşumunda en iyi besin ortamı, 2.7 µM NAA'nın köklenme için en uygun büyüme düzenleyici olduğu belirlenmiştir. Çoklu sürgün oluşumunda BA'nın etkili olduğunu, ancak primer ve sekonder sürgün oluşumunun genotiplere bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Nasir vd. (1997), pamukta 19 çeşidin sürgün ucu eksplantını çalışmışlar ve en yüksek sürgün gelişiminin 0.46 mM kinetin ve köklenmenin ise 2.68 mM NAA içeren MS ortamında olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra gelişip köklenen sürgün uçlarını toprağa aktarmışlardır. Bu metodoloji ile pamuğun meristem ucu kültürü için basit ve tekrarlanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Kumar vd. (1998), Coker 310 çeşidinde somatik embriyogenesis yoluyla seleksiyon yapmışlar ve üçüncü generasyonda elde ettikleri saf hatta Coker 310 FR adını vermişlerdir. Bu hat rejenerasyon yeteneği zayıf olan Hindistan' da yetişen MCU 5, MCU 7, Khandwa 2, Bikaneri Nerma, F 846 adlı çeşitlerle melezlenmiş ve *G. barbadense* L. x *G. hirsutum* L. Coker 310 FR dışındaki F1'ler somatik embriyogenesis yoluyla rejenere olmuştur.

Morre vd. (1998), pamukta 2-20 gün 3 mg/l BA uygulanmış ve kontrol embriyonik ekseninde sürgün gelişimini incelemişler; hormon uygulanmış ortamda eksplant başına 3.4 adet sürgün elde edilirken, bu konsantrasyonun üzeri ve altındaki ortamlarda ise sürgün sayısının düştüğünü tespit etmişlerdir. Sonuçlar BA'nın birden fazla sürgün oluşumunda embriyonik apikal meristem eksenlerini yeniden programlamada doğrudan sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Zapata vd. (1999a) çalışmalarında, *G. hirsutum* L. Tamcot Sphinx, elit hat Mar-Cubqhrpis ve Coker 312 çeşitlerinde 3-4 günlük fidelerinin 2-3 mm'lik sürgün uçlarını 0.1 mg/l ve 1 mg/l NAA ve BA içeren 18 farklı ve tam ve ½ MS besin ortamlarına koymuşlardır. Deneme sonunda en yüksek rejenerasyonun büyüme düzenleyici içermeyen tam MS besin ortamında ve 2-3 hafta sonra köklenmenin başladığını bildirmişlerdir. Sürgün uçlarının %58'inin sürgün oluşturduğunu, 6 hafta içinde

köklendiklerini ve rejenere olan bütün bitkilerin fenotipik olarak normal ve tohum oluşturdıklarını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, sürgün ucu eksplantı kullanılarak rejenerasyonun hızlı, basit ve genetik varyasyon riskinin düşük olmasından dolayı transformasyon çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2000), Coker 201 ve CRI 12 çeşidinde yaprak ve hipokotil eksplantlarını kullanarak somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu için etkili ve hızlı bir protokol geliştirmişlerdir. Embriyogenik kallus ve somatik embriyolar eksplantlardan direk elde edilmiştir. Direk somatik embriyogenesis elde etmek için 0.1 mg/l zeatin ve 2 mg/l aktif karbon içeren MS ortamı kullanmışlardır. 20 gün içinde yüksek frekansta somatik embriyogenesis elde edilmiş ve 60-80 günde bitkiler rejenere olmuştur. Bu yöntemin pamukta doku kültürü ve genetik mühendisliği uygulamalarında kolaylık sağlayacağını tanımlanmıştır.

Zhang vd. (2001)'nin yaptıkları çalışmada, elit Çin pamuk çeşidi olan Simian-3'de hipokotil, kotiledon ve kök eksplantları kullanılarak kallustan, yüksek oranda somatik embriyo ve rejenere bitkiler elde etmişlerdir. En iyi embriyogenik kallus oluşumu 1.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 0.5 mg/l zeatin içeren besin ortamında olurken, somatik embriyoların farklılaşması ve çimlenmesi için en iyi ortamın 0,1 mg/l zeatin ile 2 g/l aktif kömür ilave edilmiş MSB (MS tuzları ve B5 vitaminleri) olmuştur. En yüksek embriyogenik kallus oluşumu hipokotil eksplantlarından elde edilmiş, somatik embriyo oluşumuna en fazla tepkiyi ise kök eksplantı vermiş ve bunu hipokotil izlemiştir. Araştırmacılar bu protokolle bitkilerin hipokotil, kotiledon ve kök eksplantlardan 3-4 ay içinde somatik embriyogenesis ile rejenere edilebildiğini gözlemlemişlerdir.

Tripathy ve Ready (2002a), 10 farklı Hindistan pamuk çeşidinin kallus kültürlerinden bitki rejenerasyonu incelemişlerdir. Kallus indüksiyonu için epikotil, hipokotil, kotiledon, yaprak, kök gibi eksplantlar kullanmış ve en uygun eksplantın yaprak olduğunu belirtmişlerdir. Kullandıkları farklı bazal ortamlar ve farklı büyümeyi düzenleyiciler arasında 2 mg/l BA ve 2 mg/l IAA içeren MS ortamının rejenerasyona en iyi cevap verdiğini rapor etmişlerdir.

Tripathy ve Ready (2002b), pamukta yüksek verime sahip 10 adet Hint kültür çeşidinde farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları kullanarak çoklu sürgün oluşumuna etkisini incelemişler ve eksplant başına elde edilen sürgün sayısının artmasında gümüş nitratın (AgNO_3) çok önemli rol oynadığını, her bir eksplantta 9.6-20.5 sürgün sayısı elde edildiğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra sürgün sayısındaki artışta genotipin de önemli rol oynadığını vurgulamışlardır. Ayrıca bu çalışmanın kendi türünde ilk olduğunu ve transgenik pamuk üretiminde ticari olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Banerjee vd. (2003), pamukta 6 adet kültür çeşidinde embriyo ekseni kullanılarak *in vitro* bitki rejenerasyonunu tanımlamışlardır. $0.4 \mu\text{M}$ BA ve $0.1 \mu\text{M}$ NAA ile desteklenmiş MS tuzları ve Gamborg (B5) vitaminlerinin olduğu ortamda birden fazla sürgün sayısının uyarıldığını rapor etmişlerdir. Daha sonra uzayan sürgünler $0.5 \mu\text{M}$ NAA içeren yarım MS ortamında köklenmeye alınmış ve köklenen sürgünlerin toprağa alındıktan sonra %92 oranında hayatta kaldığı belirtilmiştir.

Ikram-ul-Haq ve Zafar (2004)'ın çalışmalarında Coker-312 çeşidinde kallus kültüründen en yüksek embriyo oluşumu KNO_3 içeren, fakat ortamdan NH_4NO_3 elemine edildiğinde elde etmişlerdir.

Ouma vd. (2004), pamukta direk sürgün rejenerasyonunu optimize etmek için Deltapine 50 (DP50) ve Stoneville 474 (STV474) çeşitlerini kullanmışlardır. *In vitro*'da kültüre alınmış 14 günlük filizlerin hipokotil eksplantlarında TDZ, NAA ve AgNO_3 denemişler; en iyi sonucu DP50 çeşidinde 0.175 mg/l TDZ, 0.01 mg/l NAA ve 5.1 mg/l AgNO_3 uygulaması verirken, STV474 çeşidinde ise 0.08 mg/l TDZ, 0.01 mg/l NAA ve 10.2 mg/l AgNO_3 miktarları sürgün oluşturmuştur.

Rauf vd. (2004), upland pamukta çoklu sürgün eldesine yönelik yaptıkları çalışmada eksplant olarak kotiledon nodlarını kullanmışlardır. MS besin ortamına ilave olarak 0.1 , 0.25 , 0.50 ve 0.1 mg/l kinetin dozlarını denemişler ve en yüksek sürgün sayısının (3.43 adet sürgün/eksplant) 0.25 mg/l kinetin kullanıldığında tespit etmişlerdir. En

yüksek kök gelişimi (% 93.3) ve kök uzunluğunun (5.85 cm) ise MS ortamında 0.5 mg/l NAA ve 0.1 mg/l kinetin kullanıldığında oluştuğunu belirtmişlerdir.

Ikram-ul-Haq (2005), Coker 312 çeşidinde somatik embriyogenesis oluşumunu incelemiş 2.0 mg/l NAA, 0.1 mg/l zeatin ve 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamının kallus oluşumu için en uygun ortam olduğu kabul edilmiştir. Kalluslar 6 haftalık olduğunda 0.1 mg/l 2, 4-D, 0.5 mg/l kinetin ortamına aktarılmıştır. NH_4NO_3 kallus farklılaşması için önemli iken fakat 2 hafta sonunda embriyolar için öldürücü olmuştur. Bununla birlikte, KNO_3 somatik embriyo indüksiyonu için daha az etkilidir, ancak embriyo olgunlaşması için en uygundur. Bu yöntemle % 56.51 kotiledon embriyoları 5 hafta içinde geliştirilmiştir. 0.05 mg/l GA_3 içeren MS ortamında köklendirme için kültüre alınmıştır. Bu metod ile Coker 312 somatik embriyogenesis yoluyla 4-5 ay içerisinde rejenere olmuştur.

Jin vd. (2006), YZ-1, Coker 312 ve Coker 201 çeşitlerinde hipokotil eksplantları kallus teşvik ortamında inoküle edilmiştir. Z-1 çeşidine ait eksplantların % 81.9'u 8-10 hafta içinde embriyogenik kallus oluşturmuştur. Kallusların 1-3 yıl alt kültür süresince, Coker 312 ve Coker 201 çeşitlerinde total embriyo sayısında kesin bir düşüş ve embriyo çimlenme yüzdesinde azalma olmuştur. YZ-1 kalluslarında ise tam tersine uzun zaman alt kültürden sonra yüksek frekanslı bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir.

Wang vd. (2006), iki dirençli genotip olan *G. hirsutum* L. cv. CCRI521 ile Zhongzhi 86-6 pamuk çeşitlerinde somatik embriyogenez ve bitki rejenerasyonu için bir protokol geliştirmiş olup, 0.01-0.1 mg/l arasında farklı konsantrasyonlarda kinetin ve 2,4D içeren MS besin ortamında yüksek oranda kallus ve embriyogenik dokular elde etmişlerdir. Somatik embriyolar 0.5 g/l glutamine ve 0.5 g/l asparagine ilave edilmiş $\frac{1}{2}$ makro element MSB süspansiyon besin ortamında başarılı bir şekilde inkübe edilmiştir. MSB'nin makro element konsantrasyonundaki azalma karamayı aza indirgemiş ve bu da süspansiyon hücreleri için faydalı olmuştur. Somatik embriyoların bitkilere dönüşümü 0.5 g/l glutamine, 0.5 g/l asparagin, %3 sukroz ilave edilmiş ve 6.0 mg/l agar

ile katılaştırılmış ortamda sağlanmıştır. Bu protokol ile bitki rejenerasyon oranı CCRI521 çeşidinde % 19.6 iken, Zhongzhi 86-6'da % 18.5 olmuştur.

Abdellatef ve Khalafalla (2007), yedi günlük pamuk fidelerinden kotiledon ve apikal meristemden yoksun kotiledon nodları kullanmışlardır. Sürgün gelişimi için eksplantlar kinetin, BA tek başına veya NAA ile birlikte B₅ ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Kinetinin sürgün çoğalımında BA'dan daha etkili olduğu görülmüştür. En iyi sonuç 2 mg/L Kin kullanıldığında alınmıştır. BA ve Kin, NAA ile birlikte kullanıldığında çoklu sürgün oluşumuna negatif etki yaptığı görülmüştür. Çoklu sürgünlerin uzaması hormonsuz yarı katılaştırılmış B₅ bazal ortamında sağlanmıştır. Sürgünler % 2 sukroz, % 0.8 agar ve 0.1 mg/l NAA içeren yarı katılaştırılmış B₅ bazal ortamında köklendirilmiştir. Köklenen sürgünlerin % 95'i sera şartlarında hayatta kalmıştır.

Divya vd. (2008), pamuğun 8-10 günlük fidelerinin hipokotil eksplantlarını kullanarak çoklu sürgün elde etmişlerdir. MS basal ortamına ilave olarak 2 mg/l TDZ ve 0.05 mg/lNAA edilen besin ortamı; eksplant başına 10.6 sürgün sayısı ve % 76 rejenerasyon oranı ile en etkili rejenerasyon ortamı olmuştur. Yine sitokinlerden BAP ve kinetin kombinasyonlarının da rejenerasyona iyi yanıt verdiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda etilen inhibitörü olan gümüş nitrat (AgNO₃) ve aktif karbonun da etkili olduğunu göstermişlerdir. Sürgünleri 1 mg/l IBA ve aktif karbon içeren ½ MS ortamında köklendirmişlerdir.

Khalafalla ve Abdellatef (2008), Sudan elit pamuk çeşitlerinde *in vitro* bitki rejenerasyonu için geliştirdikleri bir protokole göre 7, 21 ve 35 günlük fidelerden kotiledon ve apikal meristemleri çıkarılmış eksplant olarak iki dormant yan tomurcuk kullanılmışlardır. Eksplant başına maksimum sürgün sayısı (2.8 sürgün/eksplant) 35 günlük fidelerden 0.1 mg/l BA ve 2.5 mg/l kinetin içeren Gamborg (B₅) bazal ortamı kullanılarak elde edilmiştir. Sürgünlerin uzaması büyüme düzenleyici içermeyen ½ B₅ ortamında, sürgünlerin köklenmesi ise büyüme düzenleyici kullanmadan veya farklı konsantrasyonlarda 0.1-1.0 mg/l NAA içeren yine yarı katılaştırılmış ½ B₅ ortamında

sağlanmıştır. Bu işlem hızlı, güvenilir ve yüksek frekanslı olduğu için gen transferi tekniklerini uygulamada kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Özyiğit (2008)'in çalışmalarındaki amaç, pamukta eksplantların toplam fenol miktarını tespit etmek; eksplant yaş ile toplam fenollerin doku kültürü ve gen transfer sistemleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Nazilli 84S çeşidinin 7, 14, 21 ve 28 günlük çimlenme dönemlerinde total fenol miktarı belirlenmiştir. Eksplant olarak kök, hipokotil, kotiledon ve yapraklar kullanılmıştır. Eksplantlar 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamı üzerinde ve 25°C'de floresan ışığı (7.500 lux) altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık 3 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Farklı rejenerasyon oranları eksplant yaş ve toplam fenol miktarlarına göre elde edilmiştir. Rejenere filizler, 1 mg/l IBA ile takviye edilmiş odunsu bitki ortamında (WPM) köklendirilmiştir

Özyiğit ve Gözükırmızı (2008), Nazilli 84S ve Çukurova 1518 çeşitlerinin yedi günlük filizlerinden bir parça hipokotil içeren kotiledon boğumları farklı kombinasyonlarda kinetin ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre almışlar ve 5 hafta içinde sürgün ve kök oluşumu gözlemişlerdir. En iyi rejenerasyon Nazilli 84S çeşidinin kotiledon boğumlarında 0.1 mg/l KIN ve 1 g/l PVP içeren MS kültür ortamında %80 iken, Çukurova 1518 çeşidinde MS 0.1mg/l KIN, 2 mg/l NAA ve 1 g/l PVP içeren MS ortamında %75 olmuştur. Buna göre iki genotip arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca rejenere olmuş genç bitkiler fenotipik olarak normal olup, tohum oluşturmuşlardır.

Han vd. (2009)'nin çalışmalarında, 5 dirençli pamuk çeşidinde somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonuna olanak sağlayan bir protokol geliştirmeyi amaçlamışlardır. En iyi kallus oluşumunun 0.1 mg/l IBA, 0.1 mg/l KIN ve 0.1 mg/l 2,4-D destekli MSB (MS + B5 vitaminleri) ortamında, embriyogenik kallusların ise 0.3 mg/l IBA ve 0.05 mg/l kinetin içeren MSB ortamında başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Somatik embriyoların sürgüne dönüşümü $\frac{1}{2}$ NH₄NO₃ (825 mg/l), 2 kat KNO₃ (3800 mg/l), glutamine (2.0 g/l) ve asparagin (0.5 g/l) ilave edilmiş MSB ortamında sağlanmıştır. Bu

protokol kallus çıkışından itibaren sera dönemine kadar 4-5 ay gibi çok kısa bir zamanda tamamlanmıştır.

Özyiğit (2009)'in araştırmasında, Nazilli 84S çeşidinde kotiledon, birinci ve ikinci yaprak boğumlarını hipokotilleriyle birlikte 0.1 mg/l kinetin ilave edilmiş MS besin ortamında *in vitro* şartlarda büyümeye tabi tutmuştur. Deneme sonunda her üç eksplant arasında önemli farklar gözlenmiş; kotiledon boğumda maksimum sürgün gelişimi %74.2 iken, birinci ve ikinci yaprak boğumu alınmış parçalarda sürgün gelişimi sırasıyla %60.7 ve % 41.6 olmuştur. Bütün sürgünler 1 mg/l IBA içeren Woody Plant Medium (WPM) ortamında köklendirilmiş 15-30 gün sonra toprağa adapte olma yeteneğine sahip olmuştur.

Özyiğit ve Gözükırmızı (2009), pamukta Nazilli 84S ve Çukurova 1518 çeşitlerinin yedi günlük filizlerinden sürgün ucu eksplantını kültüre almışlardır. En yüksek rejenerasyonun Nazilli 84S (%98) çeşidinde 0.1 mg/l KI ve 1 g/l polyvinyl pyrolidone (PVP) içeren MS besin ortamında, Çukurova 1518 (%94) çeşidinde ise 0.1 mg/l KIN, 2 mg/l NAA ve 1 g/l PVP içeren MS ortamından elde etmişlerdir.

Farahani vd. (2010), Bakhtegan, Zeta-2 ve Bakhtegan X Zeta-2 çeşitlerinde 7-10 günlük filizlerin sürgün ucu eksplantlarına zeatin, kinetin, BAP ve IAA uygulamışlar ve bu protokole göre direk sürgün rejenerasyonunu optimize etmişlerdir. Hibrit çeşitte apikal meristemler 0.1 mg/l zeatin ve 2 g/l aktif kömür ilave edilmiş MS ortamında eksplant başına 7.66 sürgün sayısı elde edilmiştir. En yüksek sürgün uzunluğu Zeta-2 çeşidinde 2.75 cm iken, en yüksek boğum (4.5 adet) ve yaprak sayısı (3.5 adet) ise Zeta-2 ve Bakhtegan çeşidinde elde edilmiştir. Her üç genotipin tekrarlanan alt kültürlerinde sekonder sürgünler farklılaşmış organogenik kültürleri oluşturmuştur.

Aslam vd. (2010), 5 ticari pamuk (CIM-443, CIM-446, CIM-473, NIAB-Karishma ve FH-900) çeşidinde meristem kültürü yoluyla mikroenjeksiyon teknolojisi aracılığı ile transgenik bitki üretimi için protokol geliştirmişlerdir. B5 vitamini içeren MS ortamında büyüyen tohumlar çimlendikten sonra 5-7 günlük fideden apikal meristemler elde

edilmiştir. Apikal mersitemler için 2 mg/l BA tek başına kullanıldığında sürgün için en uygun ortam iken, 2 mg/l KIN ve 1.5 mg/l IAA köklenme ortamı olarak kullanılmıştır. CIM-443 çeşidinde maksimum rejenrasyon sağlanırken, FH-900 rejenerasyona en az cevap veren çeşit olmuştur. Fakat rejenere bitkilerin çoğu köklenmemiş ve bu nedenle fidelere aşılama yapılmıştır.

Laud vd. (2010), *G. arboreum* PA 255 çeşidinde 12 günlük fidelerin sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarını 30 mg/l glucose, 10 mg/l thiamine, 100 mg/l inositol ve BAP, kinetin ve NAA'ın beş farklı konsantrasyonunu içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. En yüksek rejenerasyon oranını 2.5 mg/l BAP ve 1 mg/l kinetin kullanarak elde etmişler, sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sırasıyla %89.4 ve %82.3 olarak bulmuşlardır.

Bazargani vd. (2011)'nin denemelerinde, Sahel ve Varamin adlı iki ticari pamuk çeşidinde sürgün ucu eksplantını kullanarak çoklu sürgün oluşumunu incelemek için; 3-4 günlük filizlerden sürgün uçlarını izole etmişlerdir. Eksplantlar farklı oranlarda kinetin ve BAP ile NAA ve BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 1.5 ay sonunda her iki çeşit de 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l BAP ile muamele edilmiş eksplantlardan 3-4'er sürgün elde edilmiştir. Sürgünler 0.1 mg/l IBA içeren ½MS besin ortamında ise köklendirilmiştir.

Prasad vd. (2011), Narishima çeşidinde eksplant olarak embriyoları kullanarak etkili ve hızlı bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Embriyoların üst kısmından itibaren dikey olarak yarık oluşturulmuş ve 2 mg/l BAP ilave edilmiş MS ortamına alınmıştır. Sürgünler iki haftada bir alt kültüre alınmış ve 1 mg/l IBA içeren MS ortamına transfer edilerek köklendirilmiştir. Bu çalışma ile araştırmacılar başarılı bir sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Mushke vd. (2012), 15 adet Hindistan pamuk çeşidinde 7-12 günlük fidelerin kotiledon boğum eksplantlarını kullanarak doku kültürüne en iyi cevap veren üç çeşidi (RAH9750, TCH1569 ve MCU11) seçmişlerdir. Bu çeşitlerde en iyi sürgün çıkışı ve

çoklu sürgün oluşumu MCU11 çeşidinde olmuştur. En hızlı ve çoklu sürgün oluşumu 4 hafta sonra, 1.5 mg/l BA ve 0.1 mg/l NAA'nın birlikte kullanıldığı MS ortamında sağlanmıştır. Her eksplantın 6-8 sürgün verdiği gözlenmiştir. Fakat genotipe bağlı olarak köklenmenin yetersiz olduğu görülmüş, bu nedenle köklenmeyen micro sürgünler için *in vitro* aşılama yapılarak %90'ı kurtarılmıştır.

Sangannavar vd. (2012a), *G. arboreum* DLSa-17 ve *G. barbadense* SB(YF)-425 çeşitlerinde apikal dominansinin önlenmesiyle kotiledon yan tomurcuklarının çıkışı ve rejenerasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. *In vitro*'da 6-8 günlük filizlerin sürgün uçları kesilmiş ve BAP ve TDZ ile BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu çalışmada büyüme düzenleyicilerin etkisi, temel besin ortamından farklı olmamıştır.

Sangannavar vd. (2012b), Coker 312 çeşidinde somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunu araştırmak için hipokotil ve kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. En erken kallus oluşumu hipokotillerde %99 oranında 0.1 mg/l 2, 4-D ve 0.5 mg/l kinetin kullanıldığında 10 gün içinde olmuştur. 55-60 gün sonra kallusların embriyo ürettiği rapor edilmiştir. 0.01 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l kinetin destekli MS ortamı kullanıldığında ise kallus kümeleri üzerinde en yüksek oranda somatik embriyogenesis gözlemlenmiştir. Embriyoların olgunlaşmasından sonra büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında sürgün ve köklerin bitkiye dönüşümü beklenmiştir. Daha sonra bitkiler (1:1) oranında toprak ve torf karışımına alınmıştır.

Ezhilarasi ve Nallathambi (2013), pamukta sürgün ucu eksplantını kullanarak hızlı bir *in vitro* bitki rejenerasyonu geliştirmişlerdir. Coker 310, Coker 312, MCU5 ve SVPR2 genotiplerine ait 7 günlük fidelerden sürgün ucu izole edilmiş ve sürgün uzaması için farklı büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün ucu rejenerasyonu bitki genotipi ve büyüme düzenleyicilerine göre değiştiği gözlemlenmiştir. En yüksek ortalama değer 0.05 mg/l TDZ, 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında %98.67 iken; bunu 0.01 mg/l TDZ, 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında %95.83 değeri takip etmiştir. Sürgün uzaması yönünden genotipler karşılaştırıldığında

ise SVPR2 çeşidi en yüksek ortalama değeri verirken (%83.93), MCU5 çeşidi %81.07 olmuştur. Sürgünler 0.1 mg/l GA₃ ve 1.0 mg/l NAA ilave edilmiş MS ortamında yüksek oranda (%92.33) köklenmiştir. Köklenen bitkiler steril toprak ihtiva eden saksılara transfer edilmiştir. Bitkilerin üzerine polietilen torba geçirilmiş ve adaptasyon için iklim odalarına alınmıştır.

Pathi ve Tuteja (2013), Narashima adlı elit Hindistan pamuk çeşidinde kalite karakteristiklerine, biyotik ve abiyotik stres toleransındaki ilerlemelere yardımcı olacak sürgün rejenerasyonuna ait bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada 2 günlük çimlenmiş tohumların embriyo ucu çıkarılarak farklı büyüme düzenleyici içeren ortamlara koyulmuş; 2 mg/l BAP ve 2 mg/l kinetin içeren MS ortamında maksimum sürgün aldıklarını kanıtlamışlardır. Çalışma sonunda daha önceki raporlarda rastlanmamış şekilde maksimum sürgün sayısının 16 olduğunu tespit etmişlerdir. Sürgünlerin uzaması için 1.0 mg/l GA₃ içeren ortamın en uygun olduğunu belirtmişlerdir. Sürgünlerin köklenmesi ise 1 mg/l IBA içeren ortamda %90 düzeyinde başarılmıştır.

2.2 Pamukta Gen Aktarım Çalışmaları

Gould ve Magallanes-Cedeno (1998), pamuk bitkisinin 7 günlük fidelerinin sürgün uçları kullanarak bitkilerin hızlı bir rejenerasyonu ve transformasyonu sağlanmışlardır. İzole edilen sürgünler *A. tumefaciens*'in süper virulent hattı ile inokule edilerek antibiyotik seleksiyona tabi tutulmuştur. Pamuk çeşitlerinde izolasyon ve inokülasyona bağlı olarak köklü sürgünler 6-10 hafta içinde elde edilmiştir.

Zapata (1999b), Texas CUBQHRPIS pamuk çeşidinde sürgün ucu eksplantını kullanarak *A. tumefaciens* yoluyla transgenik pamuk elde etmişlerdir. Eksplantlar pBI121 plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 bakteri hattı ile inokulasyondan sonra primer bitkilerin rejenerasyonu kanamisin (100 mg/l) içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Transgenik adayları serada geliştikten sonra, T-DNA bölgesinde markör gen olan neomisin fosfotransferaz II (*nptII*) nin ekspresyonu için yaprakların üzerinde %2'lik kanamisin kullanarak seçilmiştir. Yaşayan bu bitkilerde DNA blot ile

analizi yapılmıştır. T₀ bitkilerinden ardışık iki generasyonda β -glucuronidase (GUS) geninin entegrasyonu kanıtlanmıştır. Transgenik bitkilerde T-DNA'nın birden fazla kopyasının olduğu ortaya çıkmıştır.

Majeed vd. (2000), CIM-443 pamuk çeşidinde *Agrobacterium* ve partikül bombardıman metodlarının kullanılmasıyla virüse direnç geni aktarılmıştır. *Bacillus thuringiensis* bakterisinden böceklere direnç geni olan *cryIAb* elde edilmiştir. Olgun embriyolar *A. tumefaciens* ile inoküle edildikten sonra kokültivasyona ortamına yerleştirilmiş ve 100 mg/l kanamisin içeren MS ortamına aktarılmıştır. Bitkilerin %9.6'sı bu seçici ortamda gelişmiştir. Moleküler ve immünolojik (Western ve ELISA) analizlerinde *cryIAb* geninin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca bioassey denemelerinde *Lepidoptera* takımı *Helicoverpa armigera*'ya karşı bitkilerin korunduğu bildirilmiştir. Bu denemede böceklerin ikinci dönem larvaları kullanılmış ve 7 gün içinde öldükleri rapor edilmiştir. Bt ekspresyonu olan bu bitkilerde bu oran %44-89 iken, kontrol bitkilerde %11 olmuştur.

Sunilkumar ve Rathore (2001), pamukta Green Fluorescent Protein (GFP) ekspresyonunun sağlandığı ilk çalışma olarak söylenebileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada kotiledon veya hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Kotiledon disklerinin *Agrobacterium* ile enfeksiyonu en erken 48 saat, 4 günde maksimum düzeye ulaşmıştır. Pamukta acetosyringone ile transformasyon frekansı artırılmıştır. Ayrıca kokültivasyon sıcaklığı olarak 21°C ile 25°C karşılaştırıldığında 21°C'de transformasyon etkinliğinin arttığı ortaya çıkmıştır. LBA4404 bakteri hattının EHA105'den daha iyi olduğu kanıtlanmıştır. Transgen (GFP) ifade eden ve büyük olan kallusların hayatta kalma oranı daha yüksek bulunmuştur. Embriyolar filtre kağıt üzerinde besin ortamında çimlendirildikten ve iyi bir kök ve yaprak oluşumu tamamlandıktan sonra oluşan bitkicikler toprağa transfer edilmiştir. Moleküler analizleri yapmadan önce kaçak bitkileri elemine etmek için 50 mg/l kanamisin içeren ortamda seçim yapılması önerilmiştir. PCR analizi ile bitkilerde *nptII* genine ait zincirin varlığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, 22 bitkinin hepsi 722 bp fragmentinin varlığını göstermiştir. Southern Blot analizinde elde edilen sonuçlar, T-DNA'nın pamuk genomunun içine entegre olduğunu ispatlamaktadır.

Banerjee vd. (2002), NHH-44 ve DCH-32 adlı iki Hindistan pamuk çeşidinde *Agrobacterium* aracılığıyla veya partikül bombardımanı ile zigotik embriyo ucunda GUS geninin geçici ekspresyonu incelemişlerdir. *A. tumefaciens* GV2260 p35S GUS-INT hattı kullanılmıştır. NHH-44 çeşidinde maksimum ekspresyon oranı %14.28 olarak bulunmuştur. Bu metot transforme edilmiş kallus hatlarında güçlü bir GUS aktivitesi ile sonuçlanmıştır. *nptII* geninin integresyonu Southern analizleri ile doğrulanmıştır. Partikül bombardımanında p35S GUS INT ve pIBGUS plazmidleri ayrı ayrı uygulanarak gen ekspresyonu başarılmıştır. Bombardıman altın mikrotarıyıcılar (1.1 µm) kullanarak NHH-44 çeşidinde %29.16 GUS ekspresyonu ile maksimum değeri bulunmuştur.

Satyavathi vd. (2002), üç adet Hindistan pamuk çeşidinde *A. tumefaciens* LBA4404 bakteri hattı kullanılarak transformasyon yapmışlardır. Bu bakteri hattı raportör gen GUS-INT ve seçici markör olarak *nptII* taşıyan pBAL2 ikili vektörünü taşımaktadır. Organogenesis ile sürgünlerin etkili bir rejenerasyonu için 0.1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS+B5 ortamının en uygun ortam olduğu belirtilmiştir. Sürgün sayılarının artması ve uzaması GA₃ içeren ortamda 3-4 hafta içinde sağlanmıştır. Uzayan sürgünler IBA ve 75 mg/l kanamisin içeren ortamda köklendirilmiştir. Transgenik bitkiler 12-16 hafta içinde elde edilmiştir. GUS ve *nptII* genlerinin varlığı histokimyasal GUS analizi ve PCR ile doğrulanmıştır. T-DNA'nın transgenik bitkilerin içerisine entegrasyonu Southern Blot analizi ile de belirlenmiştir. Saksılarda toplam 70-75 transgenik bitki yetiştirilmiştir. Bu bitkilerin döl analizi, kalıtıma ait Mendel kuralını göstermiştir.

Chaudhary vd. (2003)'nin çalışmalarında, Coker 310FR pamuk çeşidinin genetik transformasyon için pGSFR binary vektör ve NOS-*nptII* ve 35S GUS-INT geni içeren *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 bakteri hattını kullanmışlardır. 7 günlük sürgünlerden hipokotil ve kotiledon eksplantları yarım MS ortamında *Agrobacterium* ile enfekte edilmiş, eksplantlar 48 saat 22°C' de ko-kültivasyon ortamında bekletilmiştir. 50 mg/l kanamisin içeren rejenerasyon protokolüne göre eksplantların %78'i kallus oluşturmuştur. Rastgele seçilen kalluslar β-glucuronidase (GUS) analizine tabi tutulmuş ve pozitif sonuç elde edilmiştir. 30 gün sonra kalluslar yine 50 mg/l kanamisin içeren diğer bir ortama alındığında 30-40 gün sonra kallusların %45'i beyaz ve sarımsı granül

embriyogenik kalluslara dönüşmüştür. Embriyogenik kalluslar da 25 mg/l kanamisin ve 1.9 mg/l KNO₃ içeren ortama alındığında %39 oranında somatik embriyo oluşmuştur. Yapılan GUS analizinde somatik embriyoların %75'inin üniform maviye boyandığı tespit edilmiştir. Bu embriyolar yavaş bir fiziksel kurumaya tabi tutulmayı takiben taze ortama transfer edilerek kotiledon uçlarından tek ya da çoklu sürgünler rejenere olmuştur. Rejenere bitkiler Southern Blot analizi ile test edilmiştir. Normal ve abnormal görünüşlü somatik embriyolardan transgenik pamukların yüksek frekanslı üretimi sağlanmıştır.

Leelevathi (2004), transgenik bitkiler elde etmek için *CryIIa5* genini taşıyan *Agrobacterium* ile kokültive edilmiş embriyogenik kalluslar dehidrasyon stresi ve antibiyotik seleksiyon altında 3-6 hafta boyunca kültüre almıştır. Globular embriyo kümelerinin ortalama %75' i seçici ortamlarda görülmüş ve embriyo olgunlaşma ortamında bu embriyolar kotiledon embriyolarının gelişmesiyle çoğaltım ortamında kültüre alınmıştır. Bu işlem sonucunda petri başına 12 bitki elde edilmiştir. Bu bitkilerin %83'ünün Southern Blot analizi ile transgenik bitki olduğu doğrulanmıştır.

Jiang (2004), transgenik pamuk bitkilerini *Agrobacterium* aracılığı ile sürgün apikal eksplantı kullanarak elde etmiştir. GUS geni ihtiva eden LBA4404 bakteri hattında transformasyon oranı %0.67 iken *bar* geni içeren EHA105 bakteri hattında %1.01 olmuştur. Aday transgenik bitkiler yaprak GUS analizi, kanamisin ya da herbisit yaprak testi, PCR ve Southern Blot analizi ile doğrulanmıştır.

Wu vd. (2005), pamukta embriyogenik kallusun kullanılmasıyla yüksek frekansta *Agrobacterium* yoluyla transformasyon için basit bir protokol geliştirmişlerdir. İki Çin pamuk çeşidinin sadece bir ya da iki somatik embriyogenik kallus hattından embriyogenik kallus oluşmuştur. Bu çeşitler düşük embriyogenik potansiyele sahip olup, ilk kez sentetik *Bacillus thuringiensis* aktif *cryIAc* ve *API-B* kimerik genini taşıyan pBin438 binary vektörünü içeren LBA4404 *A. tumefaciens* suşu ile inoküle edilmiştir. Embriyonik kalluslar 48 saat ko-kültivasyona tabi tutulmuş ve 100 mg/l kanamisin taşıyan ortamda 7-8 hafta seleksiyona tabi tutulmuştur. Otuz gün sonra

somatik embriyo olarak farklılaşması ve çoğalması için kanamisin dirençli kalluslar alt kültüre alınmıştır. Kotiledon embriyoları 100 ml erlenmayere çimlenme ve rejenerasyon için transfer edilmiştir. Aday transformantlar PCR ve Southern Blot analizi ile kontrol edilmiştir. 45 adet rejenere bitki toprağa aktarılmış *cryIAc* ve *API-B* kimerik genin aktif olduğu kanıtlanmıştır. Bioassay denemesiyle insektisitlere dirençliliğe bakılmıştır. Transgenik bitkiler pamuk kurdu (*Heliothis armigera*) larvalarına karşı dirençli çıkmışlar, larvalardaki ölüm oranı %95.8-%100 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada *Agrobacterium* yoluyla pamukta hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanılarak 6 ay içinde transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Tohidfar vd. (2005), gen aktarımında chitinase (*chi*) ve *nptII* genlerini bulduran pBI121 rekombinant binary vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* LBA4404, EHA101 ve C58 bakteri hatları ve eksplant olarak ta 7-10 günlük fidelerin hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlar kokültivasyon işleminden sonra 50 mg/l kanamisin ve 200 ml/l cefotaxime içeren MS ortamına aktarılmıştır. Rejenere olan bitkilerde *nptII* geninin ifadesi gözlenmiştir. T1 bitkilerde *chi* ve *nptII* genlerinin varlığı PCR ile tespit edilmiştir. Ayrıca aday transgenik bitkilerde *chi* geninin genoma integresyonu Southern Blot analizi ile doğrulanmıştır. T1 ve To bitkilerinin yapraklarında Western immunoblot analizi ile anti-chitinase-I polyclonal anti-serum kullanılarak transgenik pamuk bitkilerinde yaklaşık 31 kDa MW (molecular weight) büyüklüğünde immunoreaktif bandının varlığı ortaya çıkarılmıştır. Transgenik yaprak dokularında Chitinase spesifik aktivitesi transgenik olmayanlara göre kat kat daha fazla bulunmuştur. Transgenik hatların ham yaprak ekstraktelerinde *Verticillium dahliae*'ye karşı engelleyici etki görülmüştür.

Guo vd. (2007), *Bacillus thuringiensis cryIC*, *cry2A* ve *cry9C* genleri ile *bar* geni dört adet upland pamuk çeşidine (Ekangmian 10, Emian 22, Coker 201 ve YZ1) *Agrobacterium* ile transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Seçilebilir bir marker olarak *bar* geni ile birlikte dayanıklı kallusların %84.8'i PCR ile pozitif olarak bulunmuş ve toplam 50 transgenik bitki rejenere olmuştur. Sonuçlar Southern Blot analizi ile teyit edilmiştir. Transgenik bitkilerin %80'inin herbisite ve böceklere dirençli olduğu bioassay denemeleri ile gösterilmiştir.

Keshamma vd. (2008), bu çalışma ile pamukta *A. tumefaciens* yoluyla gen aktarımı ile transgenik pamuk bitkileri elde edilmiştir. GUS ve *nptII* geni içeren ve pKIWI105 binary vektörü taşıyan *Agrobacterium* LBA4404 suşu transformasyon için kullanılmıştır. Çimlenmiş fidelerin farklılaşmış embriyolarının apikal meristemleri *Agrobacterium* ile infekte edilmiştir. Kokültivasyondan 5 gün sonra T₀ generasyonunda transformasyonun ilk kanıtı fidelerin GUS histokimyasal analizi ve takibinde polen ve lintlerin analizi olmuştur. T1 transformantları PCR analizi ile tanımlanmıştır ve Southern ile doğrulanmıştır. Gelecek nesillere devamı için tek kopya içeren 3 bitki (T1) seçilmiştir. T₁, T₂ ve T₃ generasyonunun moleküler karakterizasyon ve GUS ekspresyon analizleri pamukta transgenik bitkilerin üretimi için bu metodun uygulanabilirliği göstermiştir.

Tohidfar vd. (2008), böceklere dirençli transgenik pamuk üretimi için, hipokotil eksplantları ile CaMV 35S promotörünün kontrolü altında *cryIAb* genini içeren rekombinant pBI121 ikili vektörünü taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşu kullanmışlardır. Neomycin phosphotransferase (*nptII*) geni seçici marker olarak kullanılmıştır. Transforme edilmiş kalluslar MS ortamında 50 mg/l kanamisin ve 200 mg/l cefotaxime ile seçilmiştir. Aday transgenik kalluslardan rejenere bitkiler elde edilmiş ve PCR ile Southern Blot analizleri ile bitki genomuna *cryIAb* ve *nptII* transgenlerinin integrasyonunu teyit etmek için kullanılmıştır. Transgenik bitkilerin yapraklarından ekstrakte edilen proteinlerin Western immunoblot analizlerinde anti-*cryIAb* polyclonal anti-serum kullanarak transgenik pamuk hatlarında yaklaşık 67 kDa moleküler büyüklüğüne sahip immunoreaktif bir bandın varlığı gösterilmiştir. *CryIAc* geni içeren homozigot T2 bitkileri, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında *Heliothis armigera* larvalarına karşıyüksek düzeyde direnç göstermiştir.

Wu vd. (2008a), CaMV 35S promoter kontrolü altında sentetik akrep Hector böcek toksin geni (*AaHIT*), *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuğa aktarılmıştır. Southern Blot analizi ile tahmini her genoma 1-3 arasında transgenin integrasyonu gösterilmiştir. PCR ve Southern Blot analizi ile tek kopya T-DNA taşıyan 7 adet homozigot transgenik hat seçilmiştir. Western blot analizi ile total çözünebilir proteinin %0.02-0.43'ü *AaHIT* sentezlemiştir. Homozigot olan bu transgenik hatlar pamuk kurdu (*Heliothis armigera*)

larvalarını %44-98 oranında öldürmüştür. *AaHIT* geninin pamuk kurdunun etkin kontrolünde Bt toksini ve proteinaz inhibitörü genler için alternatif olarak kullanılabilceği ifade edilmiştir.

Wu vd. (2008b)'nin çalışmalarında, *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk embriyogenik kallusların transformasyonunu, uygun embriyogenik kallusların seçilmesi ve etkili bir ko-kültivasyon, seleksiyon ve bitki rejenerasyonu ile gerçekleştirmişlerdir. 48 saat ko-kültivasyondan sonra sarı, gevşek ve ince taneli embriyogenik kalluslarda GUS pozitif kallusların sayısı gri, kahverengi ve iri tanelilerden daha fazla olmuştur. Bu geçici transformasyonun etkinliği 19°C'de 48 saat boyunca 50 mg/l acetosyringone'un ortama ilavesi ile artırılmıştır. Kanamisine dirençli klonlarının GUS pozitif oranı %81.97 olarak bulunmuştur. Normal bitkilerin çoğu hızlı rejenerasyon olmuştur ve rejenerasyon bitkilerin %72.60'ı GUS pozitif sonuç vermiştir. Yapılan PCR analizi sonucunda GUS pozitif bitkilerin %100'ü neomycin *nptII* ve GUS geni bakımından pozitif sonuç vermiştir. Kanamisine dirençli farklı kallus hatlarından rejenerasyon olan bitkilerin Southern Blot analizinde düşük kopya sayısı ile hedef genin pamuk genomuna entegre olduğunu gösterilmiştir.

Nandeshwar vd. (2009), *Agrobacterium* aracılığıyla *G. arboreum*'un sürgün uçlarının meristematik hücrelerine gen aktarımı sonucunda çoklu sürgün oluşumu sağlanmışlardır. Bu çalışmada; *G. arboreum* RG8 çeşidinin *in vitro* çimlendirilmiş 7 günlük sürgün eksplantları *cryIAC* geni ihtiva eden vektörü taşıyan *A. tumefaciens* ile bir gece inoküle edildikten sonra 30 mg/l acetosyringone, 100 mg/l myoinositol, 10 mg/l thiamine, ve 30 g/l glikoz içeren MS ortamında üç gün karanlıkta kültüre alınmıştır. Ko-kültivasyonu takiben eksplantlar 20 mg/l kanamisin içeren aynı ortamda 10-12 gün, sonrasında 50 mg/l kanamisin içeren ortamda bekletilmiştir. Eksplantlar daha sonra 0.1 mg/l kinetin, 100 mg/l myo-inositol, 10 mg/l thiamin ve 30 g/l glukoz veya 2 mg/l BA, 1 mg/l kinetin, 100 mg/l myo-inositol, 10 mg/l thiamin ve 30 g/l glikoz içeren ortama aktarılmıştır. Altı hafta sonra 0.05-0.1 mg/l NAA ve 15 g/l glikoz ile desteklenmiş sıvı MS köklenme ortamına transfer edilmiştir. Köklenen bitkiler toprağa alındıktan sonra PCR ile *cryIAC* geni tespit edilmiştir.

Daud vd. (2009), bu çalışmada çeşit olarak Coker 312 ve pCB4binary plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* LBA4404 bakteri hattı kullanmışlardır. pCB4 plazmidini CaMV 35S constitutive promotör tarafından kontrol edilen herbisite direnç geni *bar* içermektedir. Denemede yumurtalık enfeksiyonu aracılığıyla polen tüp yolu metodu ve sürgün ucu kültürü kullanılarak gen aktarımı yapılmıştır. PCR ve Southern Blot analizleri hedef genlerin genoma entegrasyonunu doğrulamıştır. Deneme sonucunda sürgün ucu kültür metodu yumurtalık enfeksiyon aracılığıyla polen tüp yolu metoduna göre daha yüksek sonuç vermekle birlikte, toprakta gelişen bitki sayısı hemen hemen aynı olmuştur.

Bakhsh (2010), *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 kullanılmıştır. Sürgün ucu meristemleri ko-kültivasyon ortamına alındıktan sonra sürgün oluşturma ve köklendirme ortamlarına alınmıştır. Daha sonra toprağa alınan aday transgenik bitkilerde GUS, PCR, ELISA ve Southern Blot analizleri ile transgenik bitkiler doğrulanmıştır. Sonuçlar *cryIAc* geninin bitkilerin genomuna entegre olduğunu göstermiştir. Ayrıca bitki yaprakları *Heliothis larvae* larvalarına yedirildiğinde larvaların %60-90 ölümüne neden olmuştur.

Khan vd. (2010), üstün bir lif kalitesine sahipve çeşitli hibrit pamuklarda dişi ebeveyn olarak kullanılan *G. hirsutum* Narasimha (NM) çeşidinde somatik embriyogenesi yüksek frekansta ve tekrarlanabilir bir sistem olarak tanımlamışlardır. Eksplant olarak hipokotil ve kotiledon yapraklarının her ikisinden de kinetin ve 2-4 D içeren MS ortamında embriyonik kallus elde edilmiştir. Somatik embriyolar B₅ vitamini içeren MS ortamında çimlendirilmiş, zeatin ilavesinin normal gelişim için yararlı olduğu bulunmuştur. Embriyogenik kallus eksplant olarak kullanıldığında *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyon için geliştirilen protokol başarılı olmuştur. GFP marker geninin ifadesi ve kararlı integrasyonu moleküler analizler ile teyit edilmiştir. Bu sonuçlar, elit çeşit Narasimha ve ticari çeşit olarak kullanılan Coker genomu içine yabancı gen veya genlerin aktarımının kısa bir sürede mümkün olduğunu göstermiştir.

Afollabi-Balagun vd. (2011), pamukta sürgün ucundan rejenerasyonu optimize edilerek *Allium sativum*'un insektisidal lektin genini pamuğa aktarabilmiştir. Denemede 3 farklı çeşit (Samcot 9, Samcot 11 ve Samcot 13) ve farklı yaşlarda sürgün ucu eksplanti kullanılmıştır. Bitki rejenerasyonunun 16. haftada %85 oranında genotipten bağımsız olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek köklenme %47 Samcot 9 çeşidinde, en düşük köklenme ise Samcot 13 çeşidinde olmuştur. GUS geni içeren LBA4404 bakteri hattı kullanarak transformasyon oranı %1.3 olmuştur. Ortamda acetosyringone kullanıldığında GUS pozitif oranı %67 değerine ulaşmıştır. *Agrobacterium* konsantrasyonu ve ko-kültivasyon zamanı geçici GUS ekspresyonu üzerine etkisi önemli olmuştur. En yüksek GUS pozitif sayısı OD600'de 0.6 ve ko-kültivasyon süresinin 3 gün olduğu zaman elde edilmiştir. Aday transgenik bitkiler yaprakta GUS deneyi, kanamisin yaprak testi ve aday genç yaprakların moleküler analizleri ile teyit edilmiştir.

Khan vd. (2011), MNH-93 adlı yerel pamuk çeşidine gen aktarımı için, *cryIAb* ve *iptII* genlerini taşıyan rekombinant ikili vektör pKMAB'ı içeren *A. tumefaciens* C58C1 bakteri hattını tungsten partikülleri ile bombardıman etmiştir. Transformasyon etkinliği %0.26 olarak bulunmuştur. Primer transformantlar, PCR, Southern Blot ve Western dot blot yoluyla transgen entegrasyonu ve ifadesi için analiz edilmiştir. Gen kopya sayısı Southern Blot analizi ile tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde üretilen *Bt* proteininin total protein içerisindeki oranı %0.00 -1.35 arasında değiştiği belirlenmiştir. To'dan elde edilen pozitif tohumlar saha performansını değerlendirmek için sera ve tarla koşullarında kullanılmıştır. Yaprak biotoksite deneyleri genin etkinliğini belirlemek için yapılmıştır. Sonuçlar, T1 bireylerinde lepidopteralara karşı kayda değer direnç seviyesi (%40-60) sahip olduğunu göstermiştir.

Mogali vd. (2011), Sahana ve BC-68-2 çeşitlerinde *A. tumefaciens* pBINIa5 vektörünü taşıyaneden EHA105 suşu aracılığı ile transgenik bitkiler elde etmek için bir protokol geliştirmişlerdir. Eksplant olarak 5-7 günlük fidelerin sürgün ucu tek bir kotiledonu koparılarak kullanılmıştır. Sürgün uçlarından mikroskop altında apikal bölgeleri izole edilerek agarla katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Transgenik bitkilerde *cryIIA5* geninin mevcudiyeti PCR analizi ile doğrulanmıştır. Gen ifade çalışması

bioassay denemesi ile desteklenmiştir. Denemede transgenik bitkiler transgenik olmayan bitkilerle karşılaştırıldığında 72 saat sonra ikinci dönem *Helicoverpa armigera* larvalarına karşı kayda değer şekilde direnç göstermiştir. Larvalarda ölüm oranı pozitif kontrolde %75 iken, transgenik bitkilerde %76 olmuştur.

Dhaka vd. (2013), *Agrobacterium* yoluyla diploid pamukta sürgün ucu meristemini kullanarak çoklu sürgün rejenerasyonu ve transformasyonu takiben gen transfer protokolünü geliştirmişlerdir. Sürgün ucu eksplanti kullanılarak pamuk bitkisinde tuza toleransı sağlamak için *Glyoxalase II* geni transfer edilmiştir. *GlyII* geni güçlü bir promotor olan 35S CaMV nün kontrolü altında pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanmıştır. Bu konstrakta higromisine direnç için *hptII*, reporter gen olarak da GUS geni bulunmaktadır. Transformasyon için higromisin konsantrasyonu optimize edilmiştir. 10 mg/l higromisin içeren MS ortamında seleksiyondan sonra dokular histokimyasal GUS analizi ile test edilmiştir. Meristemlerinden rejenere olan sürgünler 4-6 hafta boyunca kültüre alınmış ve köklendirilmiş bitkiler sera şartlarına alıştırmıştır. Gly II genini içeren aday transformantlar PCR analizi ile teyit edilmiştir.

Kiani vd. (2013), pamukta T3 generasyonuna kadar kloroplast hedefli *cryIAc-RB* geninin ekspresyonunu sağlamışlardır. Laboratuvar ve tarla biyotest denemeleri *Heliothis armigera*, *Pictinophora scutigera* ve *Spodoptera frugiperda* böcek türlerine karşı umut veren sonuçlar vermiştir. Kloroplasttaki rekombinant *cryIAc-RB* proteininin yerleşimi konfokal lazer tarama mikroskopisiyle kanıtlanırken, transgenik pamuk hatlarının yapraklarından izole edilmiş kloroplastça zenginleştirilmiş protein örneklerinin ELISA testi ile yüksek oranda hibrit *Bt*-toksin seviyesini doğrulamıştır.

Liu vd. (2013), Sumian 16 elit pamuk çeşidini *cryIAc*, *Galanthus nivalisagglutinin* (GNA) ve seçici marker *nptII* geni içeren p7RPSBK-mGNA-*nptII* plazmidi ile transforme etmişlerdir. Polen tüpü yolu metoduyla 2 adet fertil transgenik Bt+GNA bitkileri elde edilmiştir. Bt ve GNA genlerinin ekspresyonu moleküler biyoloji teknikleri ve Biyotest denemeleri ile doğrulanmıştır. Böcek denemeleri, böcek larvalarına karşı yüksek toksik etki ve afit popülasyonlarının gelişimini yavaşlattığını

göstermiştir. PCR analizi ile her iki bitkide de aktarılan genlerin mendel kuralına göre ilk döllere geçtiği belirlenmiştir.

Bajwa vd. (2014), pamuk lif kalitesinin iyileştirilmesi için *Calotropis procera* bitkisinden izole edilen CpEXPA3 geni *A. tumefaciens* LBA4404 hattı aracılığıyla lokal pamuk çeşidi NIAB-846'ya aktarılmıştır. CpEXPA3 geninin transgenik bitkilerdeki varlığı Southern Blot, real-time PCR ve selüloz analizleriyle belirlenmiştir. Üç yıl yapılan tarla çalışmaları sonucunda kontrol bitkilere göre transgenik bitkilerde lif sağlamlığının önemli oranda arttığı gözlenmiştir.

Hussain vd. (2014), *cryIAc* ve *cry2a* genlerinin aktarıldığı yerel CIM-482 çeşidinden elde edilen Bt-14 ve Bt-17 dölleri *Helicoverpa armigera* böcek türüne karşı tarla şartlarında test etmişlerdir. PCR, ELISA ve western dot blot gibi bazı standart tekniklerle transforme edilmiş Bt geninin varlığı ve ekspresyon düzeyi ve döllere geçişi teyit edilmiştir. Bt genlerinin ifadesi hedef böceklere karşı etkin koruma sağlamış ve *Helicoverpa armigera* larvalarda %70-100 oranında ölüm gözlenmiştir. Transgenik hatların agronomik özellikleri transgenik olmayan CIM-482 çeşidiyle karşılaştırılmış olup, morfolojik, agronomik ve lif verimlerine yönelik istatistiksel analizleri yapılmıştır. Özellikle Bt-17 hattının umutvar bir hat olduğu ve ileriki böceklere dayanıklılık ıslahında kullanılabileceği belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Pamuk Çeşitleri

Çalışmada ülkemizin Güney ve Ege bölgelerimizde yaygın olarak üretilen Özbek-100, Ayhan-107, GSN-12, SG-125, BA-119 ve Stoneville 468 çeşitleri ile Furkan-1 çeşit adayı kullanılmıştır. İlave olarak pamukta sürgün rejenerasyonu ve gen aktarımı son derece zor olduğundan, nispeten daha iyi sonuçlar veren Coker 312 çeşidi de optimizasyon denemelerinde kullanılmıştır. Çeşitlere ait tohumlar üretici enstitü ve firmalardan temin edilmiştir. Tohumlar temin edilirken özellikle sağlıklı ve yeni tohumların temin edilmesine özen gösterilmiştir.

3.2 Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve *in vitro* Çimlendirilmesi

Pamuk sürgün rejenerasyonu ve gen aktarımında olgun embriyolar ve *in vitro* çimlenen tohumdan elde edilen farklı eksplantlar kullanıldığından öncelikle tohumlar yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. İlk olarak pamuk tohumları üzerinde bulunan havlar sülfürik asit (H_2SO_4) ile muamele edilerek uzaklaştırılmış ve farklı pamuk çeşitlerinde tohum sterilizasyonu için aşağıdaki yöntemler uygulanmıştır.

1. *Yöntem:* Çeşme suyunda yaklaşık 2 saat bekletilen tohumlar steril kabinde %70'lik etanolde 3 dakika çalkalandıktan sonra steril saf suyla 5 dakika yıkanmıştır. Daha sonra tohumlar %20'lik ticari çamaşır suyu ile 20 dakika muamele edilip 5'er dakika süreyle steril saf suda 3 kez durulanmıştır.

2. *Yöntem:* Tohumlar %10'luk civa klorür ($HgCl_2$) çözeltisinde 10 dakika çalkalandıktan sonra 5'er dakika süreyle 3 kez steril saf suyla yıkandıktan sonra %90'lık etanolde 1 dakika bekletilmiştir.

3. *Yöntem:* %0.1 $HgCl_2$ ve %0.1 Sodium dodecyl sulfat (SDS) solüsyonunda 10 dakika çalkalanan tohumlar 5'er dakika süreyle 3 kez steril saf suyla yıkanmıştır.

4. *Yöntem:* Tohumlar %2 hidrojen peroksit (H₂O₂) ve steril saf su içinde 10 dakika muameleden sonra 5 dakika steril saf suda yıkanmıştır. Daha sonra steril saf su, %0.1 Sodium dodecyl sulfat (SDS) ve %0.1 HgCl₂ karışımından oluşan çözeltide 10 dakika çalkalandıktan sonra, steril saf suda 2'şer kere 5'er dakika süresiyle yıkanmıştır.

5. *Yöntem:* Çeşme suyunda 1-2 saat beklemiş tohumlar steril kabinde %35'lik çamaşır suyu (pH 8) ile 30 dakika çalkalandıktan sonra steril saf suda 5'er dakika süreyle 4 defa yıkandı.

6. *Yöntem:* Tohumlar %20 hidrojen peroksit (Stok %35 H₂O₂) ve Tween 20-25 dakika muameleden sonra 5'er dakika süreyle 4 defa steril saf su ile yıkandı.

Steril edilmiş tohumlar %3, %2, %1 sukroz içeren ve sukroz içermeyen, pH 5.6-5.8 olan ve %0.8 agar ile katılaştırılan MSO besi ortamında 24°C de 16 saat ışık fotoperiyodunda magenta kaplarında çimlendirilmiştir. Tohum durumuna göre her magenta kabında 5-12 arasında tohum çimlenmeye alınmıştır. Gerektiğinde tohum çimlenme ortamına bakteriyel bulaşıklığı önlemek için 500 mg/l Amoklavin® (Amoksisilin + Klavulanik Asit) tablet ilave edilmiştir.

3.3 Gen Aktarımına Uygun Sürgün Rejenerasyonu

A.tumeficiens ile bitki hücrelerine gen aktarabilmek için öncelikle bitki eksplantları üzerinde bulunan hücrelerden yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Daha önce farklı pamuk çeşitlerine yapılan gen aktarım çalışmalarında eksplant olarak en fazla hipokotil, epikotil, sürgün ucu ve kotiledon nodları kullanılmıştır. Bu çalışmada önceki çalışmalar dikkate alınarak sürgün rejenerasyon ve gen aktarım çalışmalarında, yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş çimlenen pamuk tohumlarından gelişen sürgünlere ait hipokotil, epikotil, sürgün ucu ve kotiledon boğumları ile yaprak eksplantlar kültüre alınmıştır. Denemelerde temel ortamı olarak MS mineral tuzları ile vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962), %3 sukroz ve %0.8 agar kullanılmıştır. Ayrıca 500 mg/l Amoklavin, 5 mM Asparagine, etilen

sentezini durdurmak için Gümüş Nitrat (AgNO_2) ve Sodyum Thiosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}$) içeren 20 mM Gümüş Thiosulfat (STS) ve fenolik bileşik oluşumu engellemek için 10 mg/l askorbik asit ve 10 mg/l sitrik asit birlikte kullanılmıştır. MSO besin ortamlarına kullanılan eksplant tipine ve önceki araştırmalarda elde edilen sonuçlara göre farklı oranlarda ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyicileri (BAP, KIN, TDZ, picloram, dicamba, NAA, IBA), şekerler, vitaminler ve katılaştırıcılar ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C 'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta ve 24°C sıcaklıkta tutulmuştur. Elde edilen sürgünler kesilerek 2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında köklendirilerek, öncelikle içerisinde toprak bulunan kültür kaplarına aktarılarak kapakları kapatılmış ve zaman zaman kapakları açılarak hava sirkülasyonu sağlanmıştır. 4-5 hafta sonra da bitkiler büyük saksılara aktarılarak bitki büyütme odası veya serada çiçeklenerek tohum elde edilmiştir.

3.4 AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac Genlerinin Klonlanması

Bu çalışmadan önceki çalışmalarda AoPR1-cry1Ac-NosT ve 35S-cry1Ac-NosT gen kasetleri seçici işaret geni olarak *npt-II* geni bulunan *A. transformasyon* vektörlerine klonlanmıştır. Ancak, bu çalışmada seçici işaret geni olarak glifosinat amonyum herbisitine karşı toleranslı *bar* geni kullanılacağından dolayı AoPR1-cry1Ac-Nos ve 35S-cry1Ac-NosT gen kasetleri *bar* geni içeren pTF101.1 plazmidine klonlanmıştır. pTF101.1 plazmidleri T-DNA bölgesinde *bar* geni ile birlikte çoklu klonlama bölgesini içermektedirler. AoPR1-cry1Ac-NosT ve 35S-cry1Ac-NosT ekspresyon kasetleri sırasıyla pAoPR1Ac ve pRD1Ac vektörlerinden *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV* ve *HindIII* gibi enzimler ile kesilerek, pTF101.1 vektörlerinin T-DNA bölgesinde bulunan çoklu klonlama bölgesine klonlanmıştır. DNA parçalarının birbirine bağlanmasında T4 DNA ligaz enzimi kullanılmıştır. Her kesim, ligasyon ve PCR çalışması için ayrı reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Daha sonra vektörler *E. coli* içerisinde çoğaltılarak, elektroporasyon yöntemiyle önceden hazırlanmış kompetant

Agrobacterium tumefaciens hatlarına aktarılmıştır. Klonlama sonucunda elde edilen tüm sonuçlar ayrıntılı olarak bulgular kısmında verilmiştir.

3.5 Gen Aktarımında Kullanılacak olan *A. tumefaciens* Hatlarının Büyütülmesi ve Muhafazası

Derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen *A. tumefaciens* LBA4404, GV2260, C58C1 ve EHA105 bakteri hatlarından bistürü ucu ile örnekler alınarak öncelikle içerdiği plazmitte bulunan genlerin sağladığı dirence göre 50 mg/l rifamisin, 50 mg/l kanamisin, 100 mg/l spectinomycin ve 300 mg/l streptomycin seçici antibiyotikleri içeren sıvı NB (Nutrient Broth) besin ortamında bir gece süresince 28°C'lik sıcaklıkta büyütülmüştür. Daha sonra gelişen bu bakteri kültürlerinden steril lup ile alınan örnekler seçici antibiyotikleri içeren katı NA (Nutrient Agar) ortamına yayılarak tek koloniler oluşturulmuştur. Oluşan tek kolonilerden örnekler alınarak yukarıdaki işlem iki defa daha tekrarlanarak bakteri hatları saflaştırılmıştır. Klonlama sonucunda elde edilen gen kasetlerini taşıyan gen aktarım vektörleri elektroporasyon yöntemiyle saflaştırılan bakteri hatlarına aktararak pamuğa gen aktarımında kullanılmıştır.

3.6 Elektroporasyonla *A. tumefaciens* Hatlarına Plazmid Aktarımı

Elektroporasyondan önce “competent” *A. tumefaciens* hatları elde edilmiştir. Competent bakteri eldesi için öncelikle bakteri hatlarına göre uygun antibiyotikleri (50 mg/l rifamisin) içeren katı LB agar besin ortamına yayılarak 28°C kültürde koloniler elde edilmiştir. Daha sonra tek koloni alınarak uygun antibiyotikleri içeren 10 ml sıvı LB besin ortamı içeren 50 ml'lik falkon tüpte 28°C'de bir gece büyümeye alınmıştır. Bu kültürden 5 ml alınarak, 50 ml LB besin ortamı içeren 300 ml'lik erlene aktararak, uygun sıcaklıkta OD₆₀₀= 0.4 (~2-3 saat) olana kadar büyütülmüştür. Hücreler 50 ml'lik Falcon tüplere aktararak buz üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra 4°C 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökeltilen bakteri hücreleri 10 ml 0.1 M CaCl₂ içerisinde tekrar çözülerek buz üzerinde 30 dakika bekletildikten sonra tekrar santrifüj edilerek 2 ml soğuk 0.1M CaCl₂ ve %15 gliserol içerisinde tekrar çözülmüştür. Son olarak bakteri

hücreleri 50 µl'lik parçalar halinde 1.5 ml eppendorf tüplerine konarak kullanılmak üzere -80°C muhafazaya alınmıştır. Elektroporasyon işlemi Eppendorf cihazı ile 25 µF, 2.2 kV ve 200 ohms'da yürütülmüş olup, 2 µl (100 ng) plazmid DNA ile 100 µl competent *A. tumefaciens* hücreleri ayrı ayrı karıştırılarak buz üzerine yerleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminden sonra 1 ml SOC (2% triptofan, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ve 20 mM glikoz) ortamı ilave edilerek 28°C de 200 rpm'de 2-3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler seçici antibiyotikleri içeren katı LB besin ortamına yayılarak 28°C'de 24-48 saat inkübe edilmek suretiyle tek koloniler elde edilmiştir. Büyüyen *Agrobacterium* kolonilerinin aktarılan plazmidleri taşıyıp taşımadıkları PCR ile teyit edilmiştir. Gen aktarım plazmidlerini taşıdığı teyit edilen *A. tumefaciens* hatları tekrar büyütülerek gen aktarımında kullanılacak ve uzun süreli muhafaza için gliserol stokları yapılarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7 Gen Aktarımında Kullanılacak Olan Bakteri Hatlarının Etkinliklerinin Tütünde Belirlenmesi

A. tumefaciens ile tütün bitkisine gen aktarım frekansı çok yüksek olduğundan dolayı, gen aktarım çalışmalarında model bitki olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı gen aktarım frekansı son derece düşük olan pamuk bitkisine gen aktarımında kullanılacak olan LBA4404, GV2260, C58C1 ve EHA105 bakteri hatlarının etkinlikleri öncelikle tütünde test edilmiştir. Tütüne gen aktarımında *in vitro* kültürde 4-5 hafta büyütülen steril Samsun tütün çeşidine ait fidelerinden alınan 0.5 cm çapındaki yaprak eksplantları kullanılmıştır. *A. tumefaciens* bakteri hatları 50 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin içeren 10 ml NB besin ortamında bir gece boyunca büyütülmüştür. Tütün rejenerasyon ortamı olarak 1 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA ve 30 g/l şeker içeren MS besin maddesi kullanılmıştır. İnokülasyon için sıvı, ko-kültivasyon ve seleksiyon için de katı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Seleksiyon ortamına ise 50 veya 100 mg/l kanamisin ve 500 mg/l Amoklavın ilave edilmiştir. Amoklavın seleksiyon ortamında *A. tumefaciens*'in gelişimini engellerken, kanamisin ise gen aktarımı yapılan bitki hücrelerinin seçimi için kullanılmıştır. *In vitro*'da gelişen tütün yapraklarından kesilen 0.5 cm çapındaki yaprak eksplantları bu inokülasyon ortamlarında 30 dakika süreyle

inoküle edilmiştir. İnoküle edilen eksplantlar daha sonra katı ko-kültivasyon ortamına aktarılarak 2 gün boyunca kültür odasında ko-kültivasyona tabi tutulmuştur. İki gün sonra eksplantlar ko-kültivasyon ortamından alınarak seleksiyon ortamına aktarılmış ve kültür odasında tutulmuştur. İnokülasyondan 4 hafta sonra da kanamisine dayanıklı sürgün sayımı yapılmıştır. Gelişen sürgünlerin transgenik oldukları histokimyasal GUS analizi ile teyit edilmiştir.

3.8 A. *tumefaciens* ile Pamuğa Gen Aktarımı

Önceki ve bu çalışmalardan elde edilen rejenerasyon sonuçları dikkate alınarak gen aktarım çalışmalarında, yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş çimlenen pamuk tohumlarından gelişen sürgünlere ait hipokotil, epikotil, sürgün ucu ve kotiledon boğumları *A. tumefaciens* ile pamuğa gen aktarımında kullanılmıştır. Öncelikle *A. tumefaciens* bakteri hatları içerdiği binari vektöre göre farklı antibiyotikleri içeren 10 ml NB besin ortamında bir gece boyunca büyütülmüştür. Rejenerasyon ortamı olarak doku kültürü çalışmalarında en yüksek sonuçları veren besin ortamları kullanılmıştır. İnokülasyon için sıvı, ko-kültivasyon ve seleksiyon için de katı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Seleksiyon ortamına binari vektöre göre 100 mg/l kanamisin veya 2 mg/l fosfinotrisin ve *Agrobacterium* gelişimini engellemek için de 500 mg/l Amoklavın veya augmentin ilave edilmiştir. *In vitro*'da çimlenen pamuk tohumlarından gelişen fidelerden elde edilen farklı eksplantlar öncelikle inokülasyon ortamlarında 30 dakika ile 2 saat arasında tutulmuştur. İnoküle edilen eksplantlar daha sonra katı ko-kültivasyon ortamına aktarılarak 2-3 gün boyunca kültür odasında ko-kültivasyona tabi tutulmuştur. 2-3 gün sonra eksplantlar ko-kültivasyon ortamından alınarak seleksiyon ortamına aktarılmış ve kültür odasında tutulmuştur. İnokülasyondan 6-8 hafta sonra da kanamisine veya fosfinotrisine dayanıklı sürgün sayımı yapılmıştır. Gelişen sürgünler kesilerek köklendirme ortamında köklendirildikten sonra saksılara aktarılarak dış şartlara alıştırmıştır. Bu bitkilerin transgenik oldukları histokimyasal GUS veya PCR analizleriyle teyit edilmiştir.

3.9 Histokimyasal GUS Analizi

Histokimyasal GUS analizi için gen aktarılmış bitki dokuları 37 °C'de 4-12 saat süre ile 100 mM Sodyum fosfat (pH 7,0), 10 mM EDTA, %0,1 Triton X-100 ve 1 mM 5-Broma 4-Chloro-3-Indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda inkübe edildikten sonra, % 70'lik etanolde bekletilmiştir. Dokular içerisindeki mavi renge göre GUS aktivitesi belirlenmiştir (Jafferson 1987).

3.10 Transgenik Adayı Bitkilerin PCR ile Teyit Edilmesi

Transgenik aday bitkilerin teyit edilmesinde *bar*, *cryIAC* ve *nptII* genleri ile AoPR1 promotör bölgesine yönelik dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır. PCR analizi Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit (F-130)'e göre doğrudan bitkilere ait yaprak örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonlar, Biometra T-personal thermocycler PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR programı da yine kit klavuzuna göre yapılmış olup, yalnızca primerlerin bağlanma sıcaklığı değiştirilmiştir. PCR, kit protokolünün tarif ettiği şekilde direk yaprak dokusu veya yaprak özütü reaksiyona ilave edilerek kurulmuştur. Reaksiyonlar 2x Phire Plant PCR Bufferdan (1x) 10 µl, her primerden (10 µM) 1 µl, 0.4 µl Phire Hot Start II DNA polimeraz kullanılarak toplam 20 µl hacime tamamlanarak, aşağıdaki döngüde olduğu gibi yürütülmüştür.

<u>Döngü Basamağı</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Zaman</u>	<u>Döngü sayısı</u>
Başlangıç denatürasyonu	98 °C	5 dk	} 40
Denatürasyon	98°C	5 sn	
Primerlerin bağlanması	58 °C	5 sn	
Uzama	72°C	20 sn	
Final uzama	72°C	1 dk	

PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünler %1.5'lük agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Bunun için 1.5 g agaroz 100 ml 1XTAE (50X TAE Tamponu: 242 g Trizma-base, 57.1 ml Glacial asetik asit, 100 ml EDTA pH=8) tamponunda mikrodalga

fırında çözdürülmüştür. Sıcaklığı 50-60°C'ye düştüğü zaman DNA'nın UV'de görüntülenebilmesi için etidyum bromit eklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 Volta 1 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.11 Transgenik Bitkilerde Böcek Biyotest Analizleri

Denemelerde kullanılan çizgili yaprak kurdu (*Spodoptera exigua*) larvaları, Şanlıurfa ilinde pamuk ve mısır yetiştiriciliği yapılan alanlardan toplanıp, laboratuvar şartlarında kültüre alınırken, *Spodoptera littoralis* larvaları ise Çankırı Karatekin Üniversitesi stok kültürlerinden temin edilmiştir. Yumurtadan çıkan larvalar, ince bir fırça yardımı ile toplanarak alt kısmında kurutma kâğıdı bulunan 10x10x6 cm boyutlarındaki küvetler içerisine aktarılmış ve *Spodoptera* cinsine ait hazırlanan böcek besini veya pamuk yapraklarıyla beslenmişlerdir. Bu şekilde her bir küvette 10 gün beslenen yaklaşık 200 civarında larva bakteriyel enfeksiyon riskine karşı 30'arlık gruplara ayrılarak 20x15x7 boyutlarındaki temiz küvetlere aktarılmıştır. Pre-pupa dönemine gelen larvalar tabanında talaş bulunan 25x40x8 boyutlarındaki küvetlere alınarak burada pupa olmaları sağlanmıştır. Pupadan çıkan kelebekler her 2 günde bir %15'lik bal solüsyonu ile beslenmiştir. Küvetlerin kenar ve köşelerine zik-zak şeklinde katlanan beyaz kağıt yaprakları dizilerek dişilerin yumurta bırakması sağlanmıştır. Böceklerin yetiştirilmesindeki tüm aşamalar, 25±2 °C sıcaklık, %60±5 orantılı nem ve 16/8 (aydınlık/karanlık) saat ışıklandırma süresinin sağlandığı inkübatörde yürütülmüştür.

Çalışmada *cryIAc* geni aktarılmış bitkilerin taze yaprakları kopartılarak tabanında kurutma kâğıdı bulunan 90 mm çapında petri kutularına yerleştirilmiştir. Yaprığın canlılığını koruması için ise sap kısmı saf su ile ıslatılmış pamuk ile sarılmıştır. Yaprığın üzerine ise 10 adet *S. exigua* 3. dönem larva salınarak beslenmeleri sağlanmış ve meydana gelen ölümler 24 saat ara ile kayıt altına alınmıştır. Böcek tarafından tamamen tüketilen, deforme olan veya solan yapraklar yenileriyle değiştirilmiştir. Kontrolde ise transgenik olmayan pamuk yaprağı kullanılmıştır. Denemeler 25±2 °C sıcaklıkta ve 16/8 (aydınlık/karanlık) şartlarda yürütülmüştür. Denemeler 3 tekerrürlü olarak kurulmuş her bir tekerrürde larva durumuna göre 5-10 adet larva kullanılmıştır.

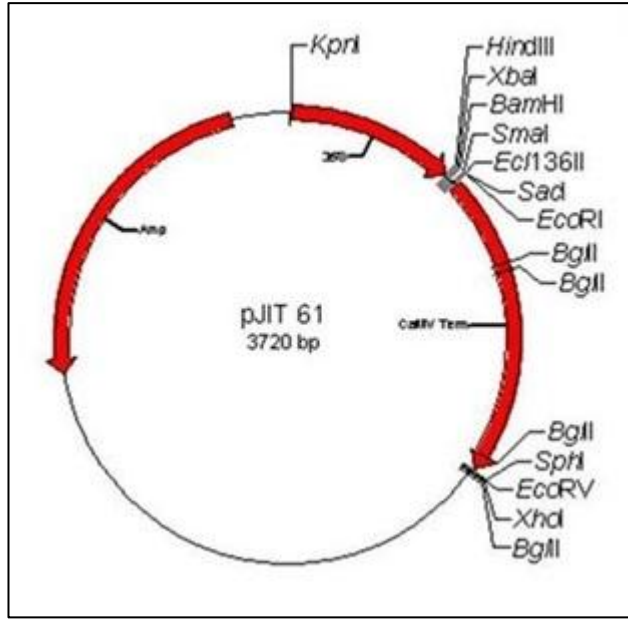
3.12 İstatistik Analizler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her muamele içerisinde 5-10 adet eksplant veya böcek larvasının bulunduğu, en az 3 tekerrürden oluşmuştur. Denemelerde elde edilen veriler, ilk olarak % ölüm değerlerine çevrilmiş daha sonra arcsin transformasyonuna tabi tutulmuştur (Zar 1996). Transformasyonu takiben, değerler ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA, $P < 0,05$) yapılarak ortalamalar ve standart hatalar hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel analizler MINITAB Release 14 paket programı yardımıyla yürütülmüştür (McKenzie ve Goldman 2005).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

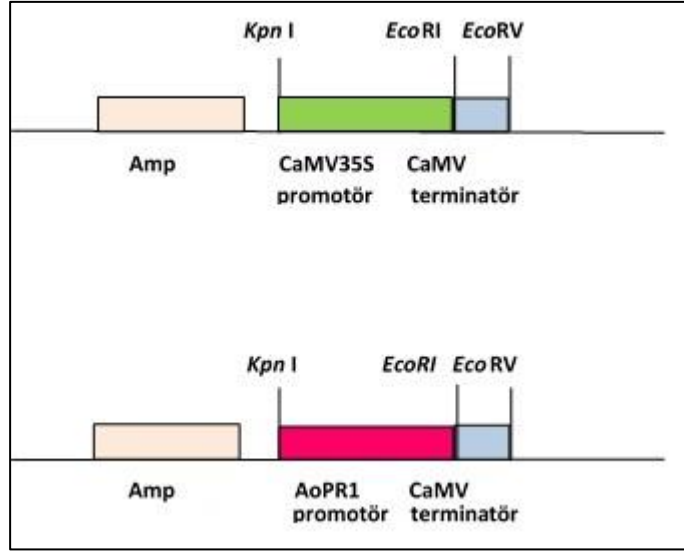
4.1 AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac Gen Kasetlerinin pTF101.1 Vektörüne Klonlanması

Farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımında farklı gen kasetinin kullanılması amaçlanmıştır. Bunlardan birincisi pamuk bitkisinde sürekli gen ifadesini sağlayacak olan CaMV35S promotörünü, *cry1Ac* genini ve markör olarak herbisit dirençliliği sağlayan bar genini içerecektir. İkincisi ise, *Asparagus officinalis*'den izole edilen ve yaralanmayla uyarılan AoPR1 promotörünü, *cry1Ac* genini ve bar genini içerecektir. Klonlama kasetlerinin oluşturulması için ilk aşamada aracı plazmid olarak pJIT 61 plazmid vektörü kullanılmıştır. pJIT 61 vektörünün haritası şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 pJIT 61 aracı plazmidi ve enzim kesim noktaları

pJIT 61 plazmidinde bulunan CaMV35S promotörü *Kpn* I ve *Bam* HI enzimleriyle kesilerek yerine aynı enzim kesim noktalarını içeren AoPR1 promotörü eklenmiştir. Bu şekilde biri CaMV35S promotörünü içeren, diğeri AoPR1 promotörünü içeren iki klonlama kaseti elde edilmiştir. Bu kasetlerin şematik gösterimi şekil 4.2'de verilmiştir.



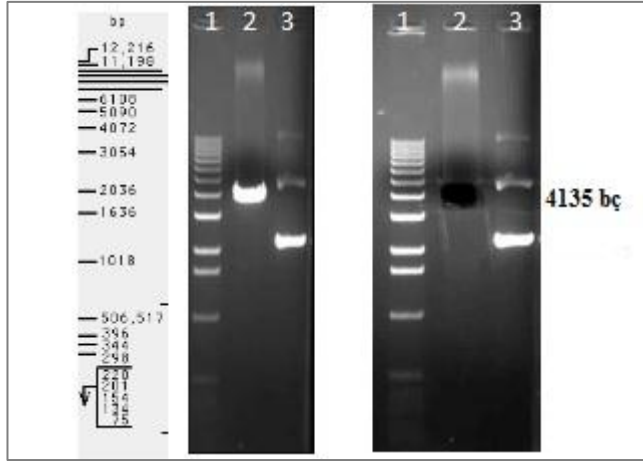
Şekil 4.2 pJIT 61 plazmidi üzerinde yer alan ve biri CaMV35S diğeri AoPR1 promotörü içeren iki farklı kasetin şematik gösterimi

Çalışmada iki farklı promotör içeren bu pJIT 61 vektörlerine *cryIAc* geni eklenmiştir. Bu amaçla her iki kaset *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle kesilmiştir. Aynı şekilde *cryIAc* genini taşıyan pRD400 plazmidi *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle kesilerek *cryIAc* kodlama bölgesi çıkarılmıştır. Kesim reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Kesim Reaksiyonu:

DNA	1 µg
H ₂ O	24 µl
10x Tampon	5 µl
<i>Bam</i> HI (10 U/µl)	0.5 µl
<i>Eco</i> RI (10 U/µl)	0.5 µl
<hr/> Toplam	<hr/> 50 µl

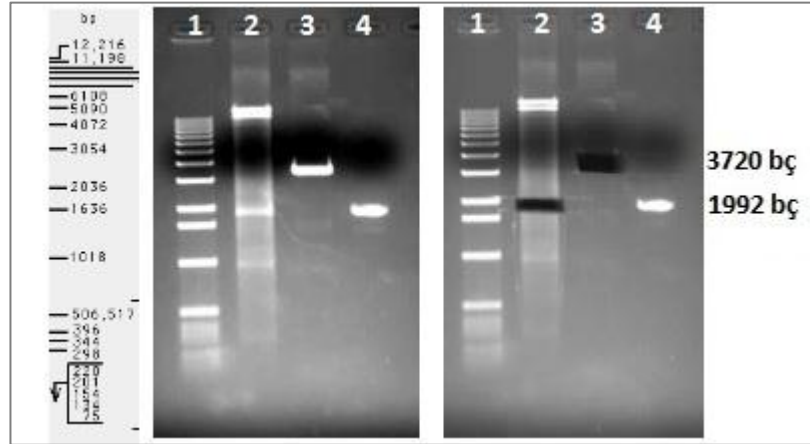
AoPR1-pJIT 61 plazmidinin kesim reaksiyonundan sonra yüklendiği agaroz jel elektroforezi görüntüsü şekil 4.3’de verilmiştir. Kesim sonucunda beklenen bant büyüklüğü 4135 bp’dir.



Şekil 4.3 AoPR1-pJIT 61 plazmidinin *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle kesiminden sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü

1. 1 kb markör DNA (Invitrogen)
2. AoPR1-pJIT 61 *Bam*HI/*Eco*RI kesimi
3. Kesilmemiş AoPR1-Cry1Ac

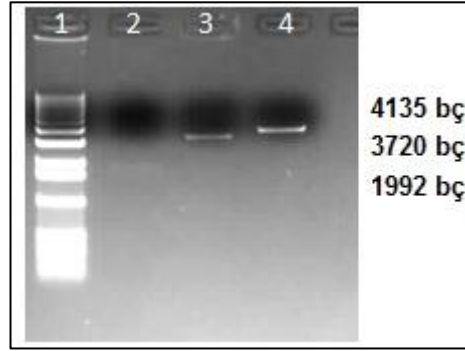
pRD400 plazmidinin ve CaMV35S-pJIT 61 plazmidinin *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle kesiminden sonra elde edilen fragmentlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.4'te verilmiştir. CaMV35S-pJIT 61 plazmidini için beklenen bant büyüklüğü 3720 bç, *cry*IAc geni için beklenen bant büyüklüğü 1992 bç'dir.



Şekil 4.4 pRD400 plazmidinin ve 35S-pJIT 61 plazmidinin *Bam*HI ve *Eco*RI enzim kesimi

1. 1 kb markör
2. AoPR1-Cry1Ac pRD400 *Bam*HI/*Eco*RI kesimi
3. CaMV35S-pJIT 61 *Bam*HI/*Eco*RI kesimi
4. CaMV35S-pJIT 61 kesilmemiş

Agaroz jelde ayrıştırılan *Bam*HI ve *Eco*RI kesim ürünleri QIAGEN jel izolasyon kiti kullanılarak agaroz jelden izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında elde edilen bantlar tekrar agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir (Şekil 4.5). *Cry*I*Ac* bandı agaroz jelde çok silik görünmesine rağmen ligasyon reaksiyonu başarıyla gerçekleşmiştir.



Şekil 4.5 *Bam*HI ve *Eco*RI kesim ürünlerinin agaroz jelden izole edildikten sonraki agaroz jel elektroforezi görüntüsü

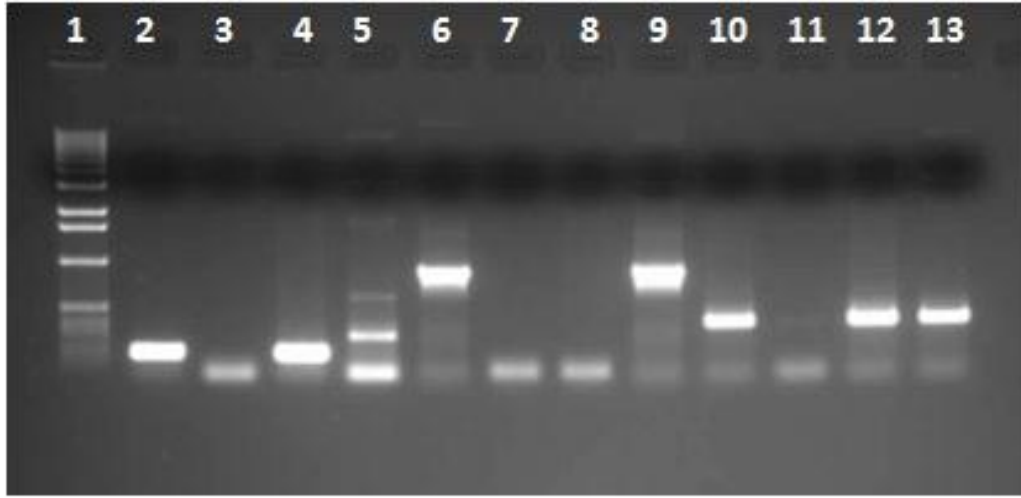
1. 1 kb markör
2. AoPR1-*Cry*I*Ac* pRD400 *Bam*HI/*Eco*RI kesimi sonucunda elde edilen 1992 bç büyüklüğündeki bant
3. CaMV35S pJIT 61 *Bam*HI/*Eco*RI kesimi sonucunda elde edilen 3729 bç büyüklüğündeki bant
4. AoPR1 pJIT 61 *Bam*HI/*Eco*RI kesimi sonucunda elde edilen 4135 bç büyüklüğündeki bant

CaMV35S-pJIT 61, AoPR1-pJIT 61 ve *cry*I*Ac* *Bam*HI/*Eco*RI kesim ürünlerinin ligasyonu için aşağıdaki reaksiyonlar karışımları hazırlanmış ve reaksiyonlar 16°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

35S pJIT 61 plazmidi	10 µl	AoPR1 pJIT 61 plazmidi	10 µl
<i>Cry</i> I <i>Ac</i> geni	5 µl	<i>Cry</i> I <i>Ac</i> geni	5 µl
5xT4 DNA ligaz tamponu	4 µl	5xT4 DNA ligaz tamponu	4 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl	T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam	20 µl	Toplam	20 µl

Ligasyon işleminin gerçekleşmiş olduğu varsayılarak, oluşturulan yeni kasetleri, transformasyonla *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyondan sonra *E. coli* DH5α kompetan hücreleri kontrol amacıyla 100, 200 ve 250 µl hacimlerde

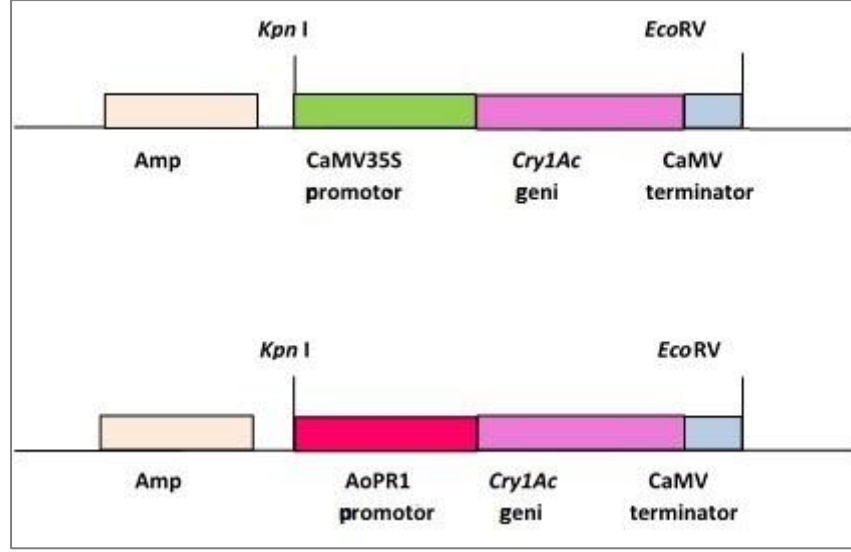
100 µg/ml ampisilin içeren LB agar plaklarına ekilerek 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir. CaMV35S-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidini taşıyan 14 koloni, AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidini taşıyan 17 koloni elde edilmiştir. Üreyen bu kolonilerden birer tanesi seçilerek PCR analizleri yapılmıştır. Tüm reaksiyonlar beklenildiği gibi çıkmıştır. PCR reaksiyonları sonucunda beklenen bant büyüklükleri CaMV35S promotörü için 195 bp, AoPR1 promotörü için 900 bp ve *cry1Ac* için 412 bp’dir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 CaMV35S-Cry1Ac-pJIT 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidlerinin 35S, AoPR1 ve *cry1Ac* primerleriyle kontrolü

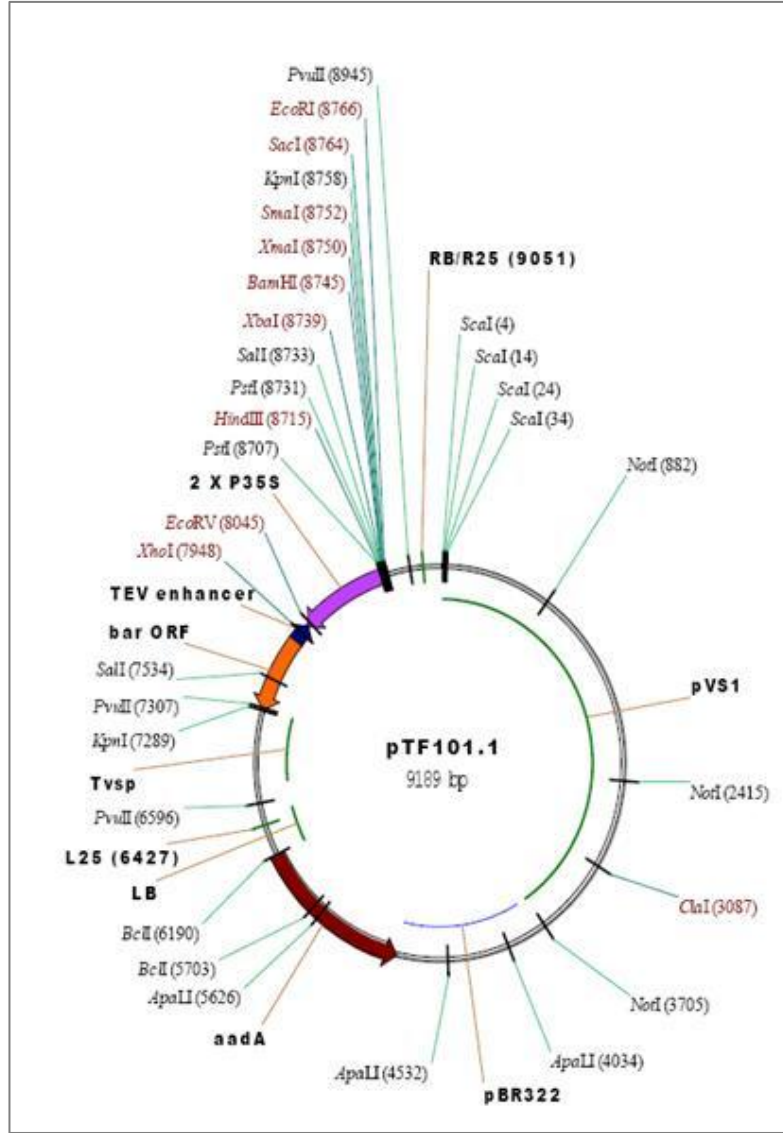
1. 1 kb markör
2. +K, 35S-pJIT 61 plazmid, 35S primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)
3. -K, 35S primeri kullanıldı (pozitif bant görülmedi)
4. 35S-Cry1Ac-pJIT 61 plazmid, 35S primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)
5. AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmid, 35S primeri kullanıldı (pozitif bant görülmedi)
6. +K, AoPR1-pJIT 61 plazmid, AoPR1 primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)
7. - K, AoPR1 primeri kullanıldı (pozitif bant görülmedi)
8. 35S-Cry1Ac-pJIT 61 plazmid, AoPR1 primeri kullanıldı (pozitif bant görülmedi)
9. AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmid, AoPR1 primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)
10. + K, AoPR1-Cry1Ac pRD400 plazmid, *cry1Ac* primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)
11. - K, *cry1Ac* primeri kullanıldı (pozitif bant görülmedi)
12. 35S-Cry1Ac-pJIT 61 plazmid, *cry1Ac* primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)
13. AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmid, *cry1Ac* primeri kullanıldı (pozitif bant görüldü)

Bu aşamada oluşturulan iki gen kasetinin şematik gösterimi şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7 CaMV35S-Cry1Ac-pJIT 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidlerinin şematik gösterimi

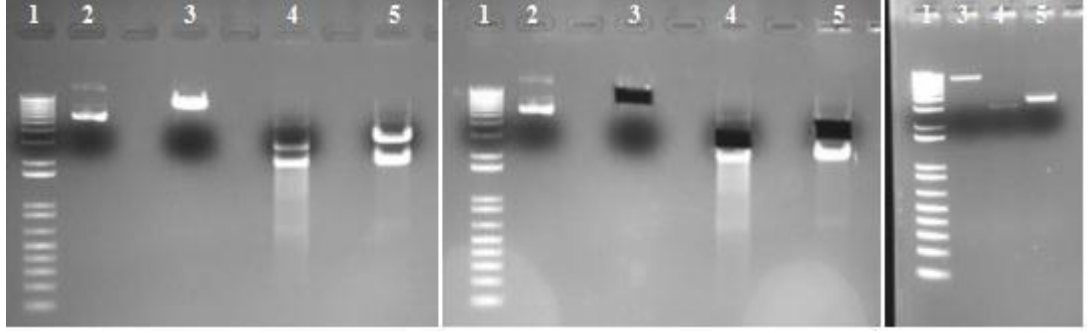
Hazırlanan gen kasetlerinin *Agrobacterium* aracığı ile pamuk çeşitlerine aktarılabilmesi için pTF101.1binary plazmidi kullanılmıştır. pTF101.1 plazmidinin haritası şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8 pTF101.1 Binary vektörü ve restriksiyon kesim bölgeleri

pTF101.1 plazmidinin T-DNA bölgesine 35S-Cry1Ac ve AoPR1-Cry1Ac ekspresyon kasetlerininin klonlanabilmesi için;

- pTF101.1 plazmidi öncelikle *SmaI* enzimi ile kesilmiştir.
- Daha sonra alkalin fosfataz ile defosforile edilerek plazmidin kendi üzerine katlanması engellenmiştir.
- Son olarak kesilen plazmid agaroz jele yüklenip jelden izolasyon kiti ile tekrar izole edilerek saflaştırılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 pTF101.1 plazmidini ile 35S-Cry1Ac-pJIT 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 kasetlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve jelden izole edilmesi

1. 1 kb ladder
2. uncut pTF101.1
3. pTF101.1 SmaI
4. 35S-Cry1Ac-pJIT 61 KpnI-EcoRV
5. AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 KpnI-EcoRV

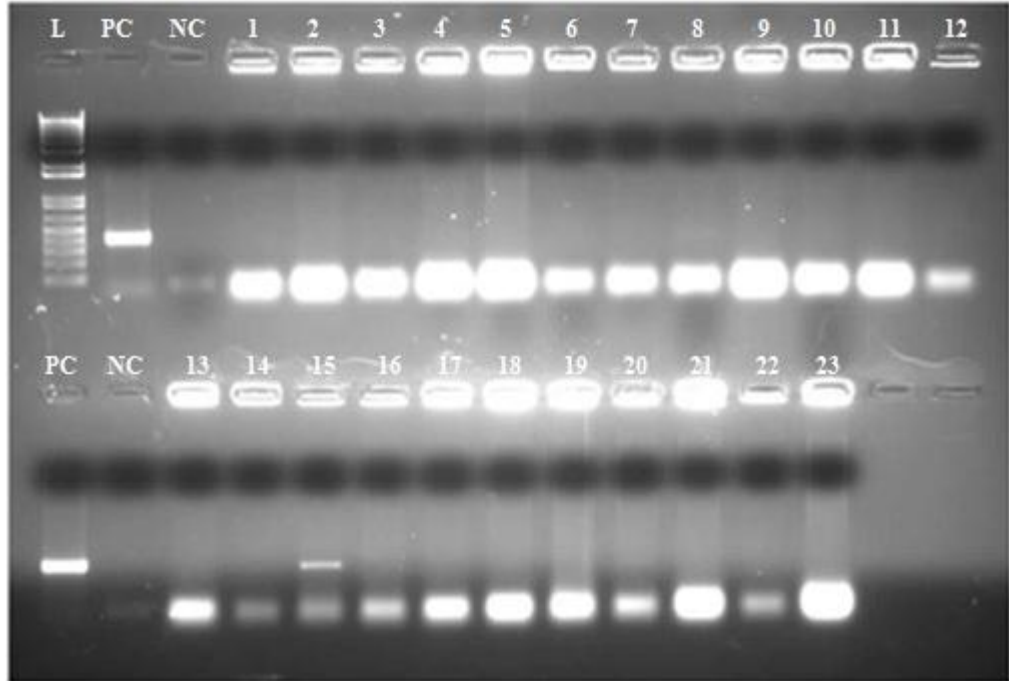
Daha önce hazırlanan ve şekil 4.7’de gösterilen 35S-Cry1Ac ve AoPR1-Cry1Ac ekspresyon kasetlerinin pJIT 61 plazmidinden izole etmek için aşağıdaki prosedür uygulanmıştır:

- a. İlk olarak 35S-Cry1Ac-pJIT 61 ve AoPR1-Cry1Ac-pJIT 61 plazmidleri *KpnI* ve *EcoRV* enzimleriyle kesilmiştir.
- b. Daha sonra kesilen uçları küt hale getirmek için “end filling” yapılmıştır.
- c. Son olarak agaroz jele yüklenen kasetler jelden izolasyon kiti ile tekrar izole edilmiştir.

Elde edilen bantlar T4 DNA ligaz enzimi ile birbirine bağlanarak, transformasyon için gerekli olan binary vektör oluşturulmuştur. Küt uçlu DNA fragmentlerinin birbirine bağlanması zor olduğundan ligasyon reaksiyonu 14°C’de ve 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. CaMV35S-Cry1Ac, AoPR1-Cry1Ac kasetlerinin ve pTF101.1 plazmidinin ligasyonu için aşağıdaki reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

pTF101.1 plazmidi	10 µl	pTF101.1 plazmidi	10 µl
CaMV35S-Cry1Ac kaseti	5 µl	AoPR1-Cry1Ac kaseti	5 µl
5xT4 DNA ligaz tamponu	4 µl	5xT4 DNA ligaz tamponu	4 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl	T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam	20 µl	Toplam	20 µl

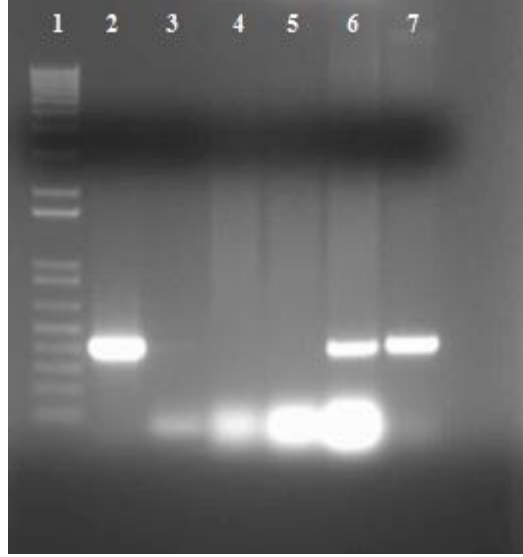
İnkübasyonun ardından ligasyon karışımı *E. coli* JM109 kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyondan sonra *E. coli* JM109 hücreleri kontrol amacıyla 100, 200 ve 250 µl hacimlerde spectinomycin (100 mg/l) ve streptomycin (300 mg/l) antibiyotikleri içeren LB agar plaklarına ekilerek ve 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Bu inkübasyondan sonra AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 plazmid aktarımında 23 *E. coli* JMA109 kolonisi üremiştir. *cry1Ac* primerleri ile yapılan PCR analizinde de bu kolonilerden sadece bir tanesinin (15. Koloni) AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidini taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidinin aktarılması sonucunda büyüyen 23 *E. coli* JMA109 kolonisinde *cry1Ac* primerleri ile yapılan PCR analizi.

L: 1kb ladder, PC: +Kontrol AoPR1-Cry1Ac-pJit 61, NC: -Kontrol, 1-23. koloniler

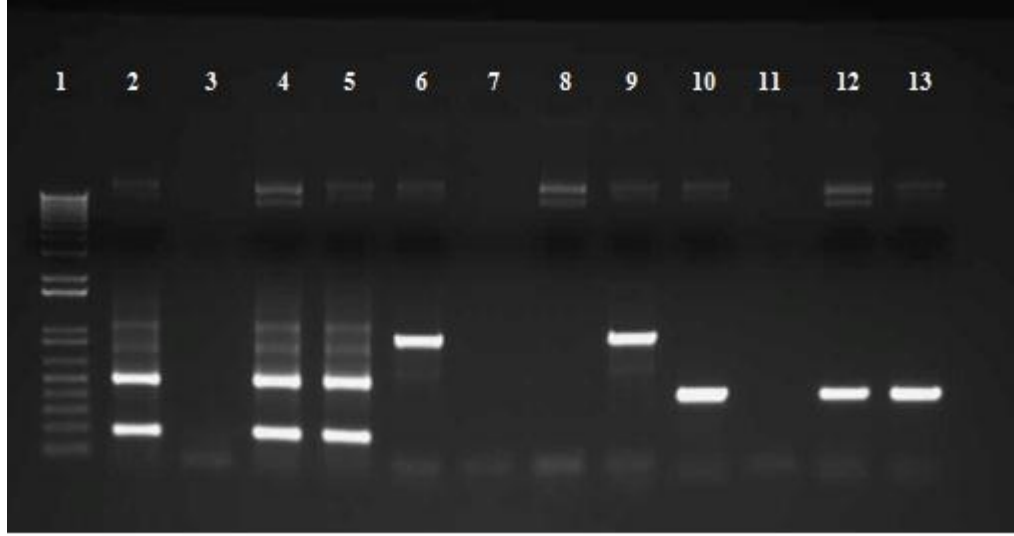
35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmid aktarımında ise 4 *E. coli* JMA109 kolonisi üremiştir. *CryIAc* primerleri ile yapılan PCR analizinde de bu kolonilerden 2 tanesinin 35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidini taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidinin aktarılması sonucunda büyüyen 4 *E. coli* JMA109 kolonisinde *cryIAc* primerleri ile yapılan PCR analizi

1. 1 kb ladder
2. 1. +K 35SCry1Ac, 35S primeri
3. - Kontrol
4. 1. koloni (jm109), 35S primeri
5. 2. koloni (jm109), 35S primeri
6. 3. koloni (jm109), 35S primeri
7. 4. koloni (jm109), 35S primeri

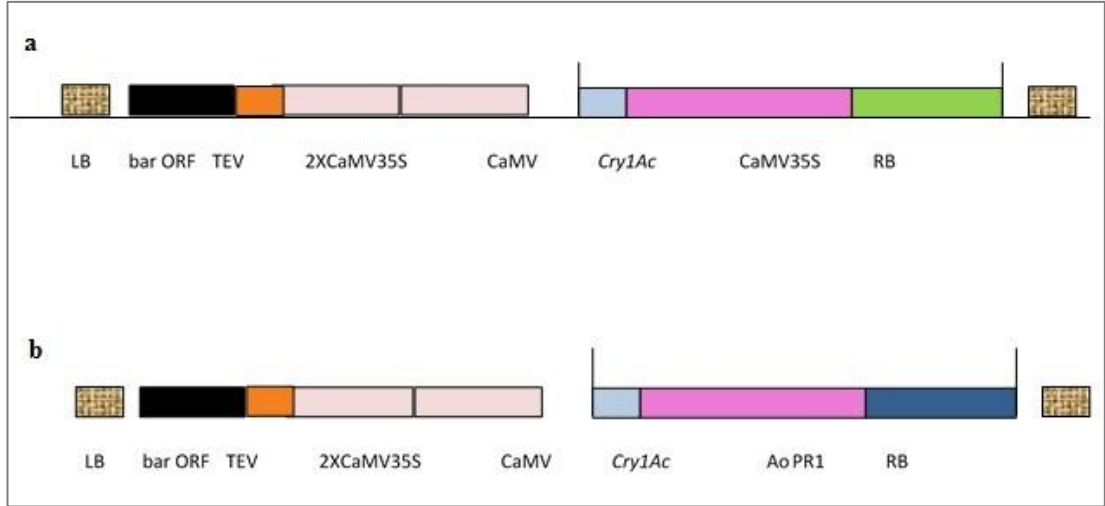
Pozitif *E. coli* JMA109 kolonilerine aktarılan AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 ve 35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidleri farklı primerler kullanılarak teyit edilmiştir. Bu teyit işlemine ait jel görüntüleri şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12 Pozitif *E. coli* JMA109 kolonilerine aktarılan AoPR1-Cry1Ac-pTF101.1 ve 35S-Cry1Ac-pTF101.1 plazmidleri farklı primerler kullanılarak teyit edilmesi

- 1-1Kb ladder
- 2-(+) Kontrol 35S pJit 61, 35S primeri
- 3-(-) 35S Kontrol 35S primeri
- 4-35S cry1ac ptf101.1 jm109
- 5-AoPR1 cry1Ac ptf101.1 jm109
- 6-(+) Kontrol AoPR1 pJit 61, AoPR1 primeri
- 7-(-) Kontrol AoPR1 primeri
- 8-35S cry1ac ptf101.1 jm109, AoPR1 primeri
- 9-Aopr1 cry1Ac ptf101.1 jm109, AoPR1 primeri
- 10-(+) Kontrol 35S cry1Ac pjit 61, Cry1Ac primeri
- 11-(-) Kontrol, Cry1Ac primeri
- 12-35S cry1ac ptf101.1 jm109, Cry1Ac primeri
- 13-Aopr1 cry1ac ptf101.1 jm109, Cry1Ac primeri

Bu klonlama sonucunda 35S-Cry1Ac ve AoPR1-Cry1Ac ekspresyon kasetleri pTF101.1 binari gen aktarım vektörünün T-DNA bölgesine klonlanarak 35S-Cry1Ac-pTF101.1 ve AoPR1-Cry1Ac- pTF101.1 vektörleri elde edilmiştir (Şekil 4.13). Bu plazmidler daha sonra elektroporasyonla *A. tumefaciens* hatlarına aktarılmıştır.

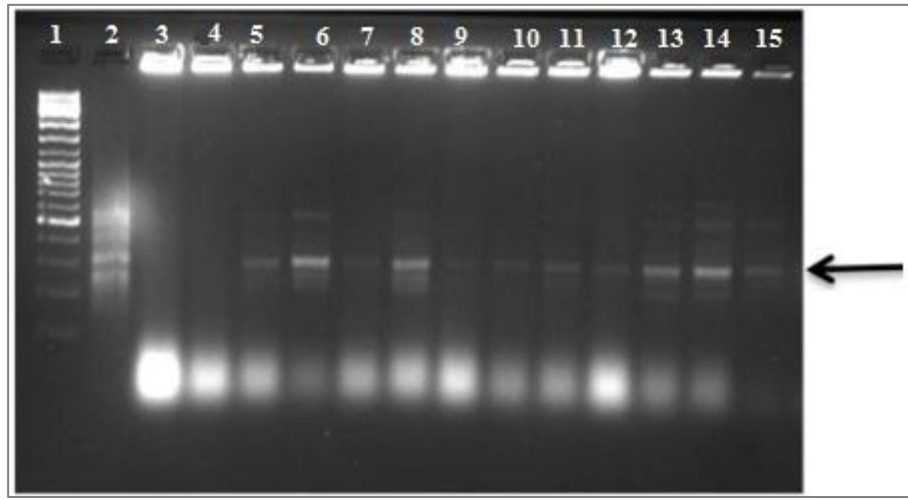


Şekil 4.13 a. CaMV35S promotörünü içeren birinci klonlama kaseti, b. AoPR1 promotörünü içeren ikinci klonlama kaseti

4.2 pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac vektörlerinin Elektroporasyon ile *A. tumefaciens* Hatlarına Aktarılması

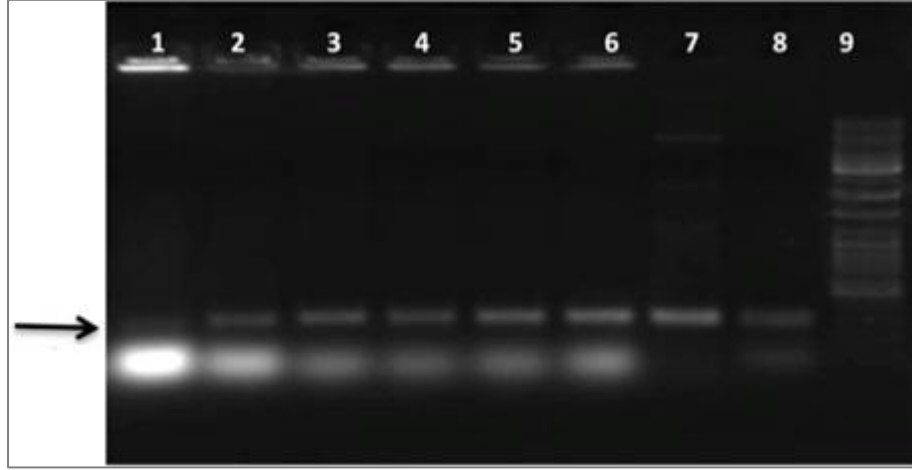
Elektroporasyon işlemi Eppendorf cihazı ile 25µF, 2.2kV ve 200 ohm'da yürütülmüştür. 2 µl (100 ng) pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidleri ile 100 µl competent *A. tumefaciens* LBA4404, GV2260 ve EHA101 hücreleri ayrı ayrı karıştırılarak buz üzerine yerleştirilmiştir. Elektroporasyon işleminden sonra 1 ml SOC ortamı ilave edilerek 28°C'de 200 rpm'de 2-3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler seçici antibiyotikleri içeren (100 mg/l spectinomycin ve 300 mg/l streptomycin) katı LB besin ortamına yayılarak 28°C'de 24-48'de inkübe edilmek suretiyle tek kolonilere elde edilmiştir. Büyüyen *Agrobacterium* kolonilerinin aktarılan pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerini taşıyıp taşımadıkları PCR ile teyit edilmiştir. PCR işleminde 20 µl PCR solüsyonu içerisine 0.5 µM spesifik primerler, dNTPs 100 µM, 1X PCR tamponu (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ ve 10 mM Tris-HCl) ve 1 Ünite Taq Polimeraz ilave edilmiştir. Daha sonra buz üzerinde tutulan PCR karışımına bir miktar bakteri kolonisi ilave edilmiştir. PCR işlemi 94°C'de 4 dakika, 94°C'de 45 saniye, 62°C'de 45 saniye (AoPR1 için 62°C, *cry1Ac* için 55°C ve *bar* geni için 60°C) ve 72°C'de 1 dakika ve 35 defa yürütülmüştür. Daha sonra PCR solüsyonu 1% agaroz jele yüklenerek UV ışığı altında gözlenmiştir.

Seçici antibiyotikler içeren besin ortamında gelişen kolonilerde *cryIAc* gen primerlerinin kullanılması sonucunda 412 bç büyüklüğünde bant gözlenmiştir (Şekil 4.14). Daha sonra bu pozitif koloniler üzerinde *bar* geni ve AoPR1 promotörüne yönelik PCR sonucunda da sırasıyla 310 ve 900 bç büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16). Bu sonuçlarla LBA4404, GV2260 ve EHA101 *A. tumefaciens* hatlarına pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı kesin olarak teyit edilmiştir. Plazmidleri taşıyan *A. tumefaciens* hatları tekrar büyütülerek -80 gliserol stokları yapılmıştır.



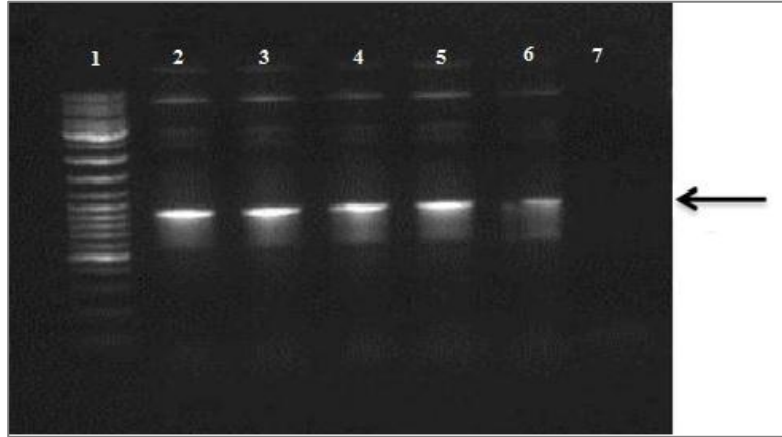
Şekil 4.14 pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı *A. tumefaciens* hatlarından *cryIAc* geninin amplifikasyonu.

1. DNA Ladder Mix (Fermentas)
2. Pozitif kontrol (plazmid DNA)
3. Negatif kontrol (Sadece PCR karışımı)
4. LBA4404 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
5. LBA4404 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
6. GV2260 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
7. GV2260 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
8. EHA101 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
9. EHA101 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
10. LBA4404 pTF101.1 35S-Cry1Ac
11. LBA4404 pTF101.1 35S-Cry1Ac
12. GV2260 pTF101.1 35S-Cry1Ac
13. GV2260 pTF101.1 35S-Cry1Ac
14. EHA101 pTF101.1 35S-Cry1Ac
15. EHA101 pTF101.1 35S-Cry1Ac



Şekil 4.15 pTF101.1-35S-Cry1Ac ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı *A. tumefaciens* hatlarından *bar* geninin amplifikasyonu

1. EHA101 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
2. GV2260 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
3. LBA4404 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
4. LBA4404 pTF101.1 35S-Cry1Ac
5. GV2260 pTF101.1 35S-Cry1Ac
6. EHA101 pTF101.1 35S-Cry1Ac
7. Pozitif kont (pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac)
8. Pozitif kontrol (pTF101.1 35S-Cry1Ac)
9. DNA Ladder Mix (Fermentas)



Şekil 4.16 pTF101.1-35S-Cry1Ac ve ve pTF101.1-AoPR1-Cry1Ac plazmidlerinin aktarıldığı *A. tumefaciens* hatlarından AoPR1 promotörünün amplifikasyonu

1. DNA Ladder Mix (Fermentas)
2. LBA4404 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
3. GV2260 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
4. EHA101 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac
5. Pozitif kontrol (plazmid DNA)
6. Pozitif kontrol (plazmid DNA)
7. Negatif control (Sadece PCR karışımı)

4.3 Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve *In Vitro* Çimlendirilmesi

Doku kültürü çalışmalarının ilk aşaması yüzey sterilizasyonu olup, farklı bitki türleri ve eksplantları için yöntem geliştirilmesi önemli olmaktadır. Yüzey sterilizasyonunda dokuya en az zarar veren ve bulaşıklığı engelleyen en düşük sterilant dozunun kullanılması son derece önemlidir. Pamuk tohumları üzerinde bulunan havlar sülfürik asit (H_2SO_4) ile muamele edilerek uzaklaştırılmış ve Materyal ve Yöntem bölümünde verildiği üzere yüzey sterilizasyonu için 6 farklı yöntem denenmiştir. Bu yöntemlerden %20 hidrojen peroksit ve Tween 20 içeren 6. yöntemde en yüksek çimlenme oranı elde edilmiş ve aynı zamanda tohumların bulaşıklık oranı en aza indirgenmiştir. Ayrıca diğer yöntemlere göre en sağlıklı fide gelişimi sağlandığı gerekçesi ve civa klorürün insan sağlığı açısından olumsuz etkilerine karşı tercih edilmiştir. Daha sonraki tüm denemelerde bu yöntem kullanılmıştır (Şekil 4.17). Yüzey sterilizasyona tabi tutulan tohumlar daha sonra farklı oranlara sukroz içeren MSO besin ortamına aktarılmıştır. Bir hafta süreyle çimlendirme sonucunda sukroz içermeyen MSO besin ortamında çimlenme oranı % 80.5 iken, %1, %2, %3 sukroz içeren ortamlarda çimlenme oranları sırasıyla % 72.7, % 69.4, % 60.6 olmuştur. Bu ortamlarda en yüksek çimlenme ve sağlıklı fide gelişimi sukroz içermeyen MSO besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.1)



Şekil 4.17 Tohumların yüzey sterilizasyonu

Çizelge 4.1 Farklı pamuk çeşitlerine ait tohumların şeker içermeyen MSO ortamında çimlenme oranları

Çeşit	Çimlenme oranı (%)
STN-468	38.3
BA-119	39.3
Coker 312	80.5
GSN-12	80.5
Özbek 100	58.3
Ayhan 107	52.7
Furkan-1	60.0
SG-125	66.6

Yukarıda verilen çimlendirme çalışmalarına ilave olarak, farklı katılaştırıcı oranlarının ve vitaminlerin de *in vitro* çimlendirme üzerine etkileri test edilmiştir. Bu çalışmada MS vitaminlerine ilave olarak Gamborg B₅ vitaminleri ile katılaştırıcı olarak agar ve phytigelin farklı konsantrasyonları denenmiştir. Bu denemede GSN-12 çeşidi kullanılmış ve en yüksek çimlenme oranı MS mineral ile vitaminlerinin kullanıldığı ve %0.4 phytigel ile katılaştırılan besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.2). Çimlendirme ortamında katılaştırıcı olarak phytigel kullanıldığında çimlenme oranında önemli artışlar gözlenmiştir. Bunun nedenin de phytigelin agara göre daha yumuşak olması ve tohumla temasının daha iyi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.18 Pamuk tohumlarının hidrojen peroksit ile sterilizasyonundan sonra sukroz içermeyen ve %0.4 phytigel ile katılaştırılmış MSO besin ortamında çimlendirilmesi

Çizelge 4.2 Farklı vitamin ve katılaştırıcıların GSN-12 tohumlarının çimlenme oranına etkisi

Besin Ortamı	Katılaştırıcı	Çimlenme oranı (%)
MS mineral tuz ve vitaminleri	%0.65 Agar	48.1
MS mineral tuz ve vitaminleri	%0.8 Agar	72.9
MS mineral tuz ve B ₅ vitaminleri	%0.65 Phytigel	73.5
MS mineral tuz ve B ₅ vitaminleri	%0.4 Phytigel	75.5
MS mineral tuz ve vitaminleri	%0.4 Phytigel	96.6

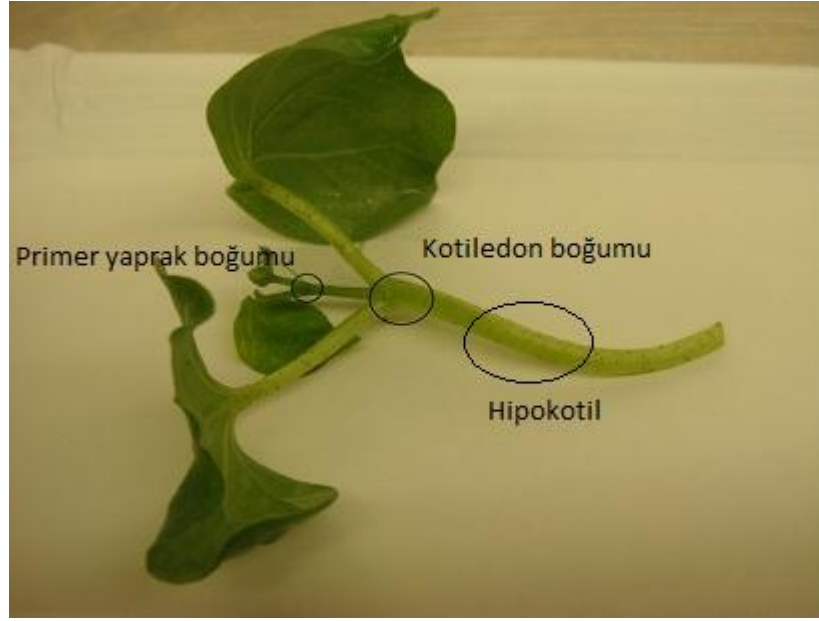
4.4 Pamukta Gen Aktarımına Uygun Sürgün Rejenerasyonunun Optimizasyonu

Diğer birçok bitki türüyle karşılaştırıldığında pamuk bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu son derece zordur. Bazı çeşitler düşük rejenerasyon kapasitesine sahip olsa da, bunlar üzerinde rejenerasyon protokolleri geliştirilmiş ve çeşitler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Ülkemizde yaygın olarak üretilen pamuk çeşitlerinde de başarılı rejenerasyon yöntemlerinin geliştirildiği yayınlara rastlanamamıştır. Bu çalışma kapsamında ilk olarak; denemede kullanılacak olan çeşitlerin farklı eksplantları, farklı besin ortamlarında kültüre alınarak gen aktarımına uygun adventif sürgün rejenerasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Sürgün rejenerasyonu için *in vitro*'da gelişen bitkiciklere ait farklı eksplantlar kullanılmıştır. Denemeler her petriye 5'er eksplant olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

4.4.1 Farklı büyüme düzenleyicilerinin Coker 312 çeşidinde rejenerasyona etkisi

İlk rejenerasyon denemesinde optimizasyonu için yalnızca Coker 312 çeşitleri kullanılmıştır. Coker 312 çeşidinin rejenerasyon ve transformasyon oranı diğer çeşitlere göre daha yüksek olduğundan dolayı optimizasyon çalışmalarında kontrol çeşit olarak tercih edilmiştir. Optimize edilen yöntemler daha sonra diğer çeşitlere uygulanmıştır. Öncelikle eksplant olarak kullanılan kotiledon boğumu ve hipokotil kısımları 6-7

günlük fidelerden (Şekil 4.19) izole edilerek steril kabin içerisinde aseptik ortamda farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre alınmış ve bu eksplantlar üzerinde 2 hafta sonra hipokotillerden kallus oluşumu ve 4 hafta sonrada kotiledon boğumundan sürgün oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 4.19 *In vitro*'da çimlenen fidelerden alınan eksplantlar

Sürgün rejenerasyonunun optimizasyonu için Coker 312 çeşide ait *in vitro* çimlenen fidelerden alınan kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları farklı büyüme düzenleyiciler içeren MSO besin ortamında kültüre alınmış ve kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hipokotil eksplantlarından sadece kallus oluşumu gözlenirken sürgün rejenerasyonu elde edilmemiştir (Çizelge 4.3). Diğer taraftan kotiledon boğumlarından besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicinin cinsine ve konsantrasyonuna göre farklı oranlarda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Coker 312 çeşidinde en yüksek sürgün rejenerasyonu tek başına 0.1 mg/l 2,4-D kullanıldığı MSO besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Bunu tek başına 0.125 ve 0.25 mg/l kinetinin kullanıldığı ortamlar takip etmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı oranlarda büyüme düzenleyicisi içeren MSO ortamında kültüre alınan Coker 312 çeşidinin kotiledon boğumu ve hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)					Kotiledon Boğum		Hipokotil
2,4-D	KIN	TDZ	NAA	BAP	Regenerasyon oranı (%)	Sürgün sayısı/ Eksplant	Kallus oluşumu (%)
0	-	-	-	-	100.0	1	100.0
0.1	-	-	-	-	100.0	3.83	100.0
0.25	-	-	-	-	66.6	1	100.0
0.5	-	-	-	-	50.0	1	16.6
0.75	-	-	-	-	66.6	1	0
1.0	-	-	-	-	66.6	1	0
0	0	-	-	-	100	1.77	61.07
0.125	0	-	-	-	100.0	1.11	88.87
0	0.125	-	-	-	100.0	2.33	55.53
0.125	0.125	-	-	-	88.9	1.36	66.63
0.250	0	-	-	-	100.0	1.11	91.67
0	0.250	-	-	-	100.0	2.22	23.00
0.250	0.250	-	-	-	100.0	1.30	100.0
0.125	0.250	-	-	-	100.0	1	100.0
0.250	0.125	-	-	-	40.0	1	100.0
-	-	0	0	-	100	1.25	62.5
-	-	0.125	0	-	100.0	1	75.0
-	-	0	0.125	-	87.5	1	87.5
-	-	0.125	0.125	-	0	0	33.3
-	-	0.250	0	-	0	0	100.0
-	-	0	0.250	-	50.0	1	87.5
-	-	0.250	0.250	-	50.0	1	0
-	-	0.250	0.125	-	50.0	1	0
-	-	0.125	0.250	-	87.5	1	0
-	0	-	-	0	100	1	100
-	0	-	-	0.125	100.0	1.86	100.0
-	0.125	-	-	0	100.0	2.11	0
-	0.125	-	-	0.125	100.0	1.77	61.07
-	0.25	-	-	0.25	100.0	1.44	85.0
-	0	-	-	0.25	100.0	1.40	100.0
-	0.25	-	-	0	100.0	1.11	100.0

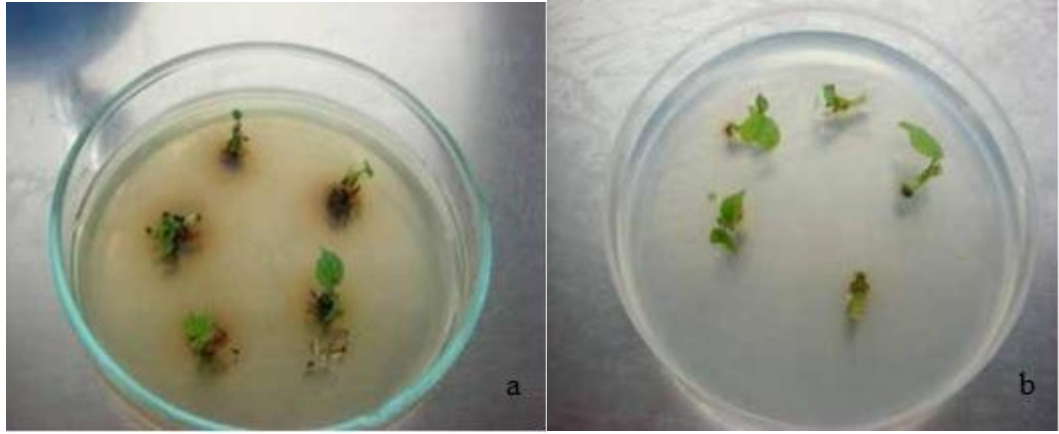
4.4.2 Farklı Büyüme düzenleyicileri ile MS ve sukroz oranlarının GSN-12 çeşidinde rejenerasyona etkisi

Yürütülen bu denemede GSN-12 çeşidinin kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri ile sukroz içeren tam ve ½ MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı belirlenmiştir (Şekil 4.20). Coker 312 çeşidinde olduğu gibi hipokotil eksplantlarından sadece kallus oluşumu gözlenmiş olup, sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Gen aktarımında kallus oluşumu tek başına bir değer taşımadığı için elde edilen kallus sonuçları verilmemiştir. Coker 312 çeşidi ile karşılaştırıldığında GSN-12 çeşidinde sürgün rejenerasyonu daha düşük bulunmuştur. Çok sayıda büyüme düzenleyici kombinasyonu ile farklı sukroz ve MS oranlarının kullanıldığı bu çalışmada en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.125 mg/l BAP ve 15 g/l sukroz içeren tam MS besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.20 GSN-12 çeşidinin kotiledon boğumlarından 8 hafta sonra sürgün rejenerasyonu

Pamukta *in vitro* çalışmalarda fenolik bileşiklerin fazla oluşması sonucunda sürgün rejenerasyonunun engellenmesi önemli problemlerden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Deneme sonuçlarına göre tam MS ve 30 g/l sukroz kullanılan besin ortamındaki eksplantlar fazla miktarda fenolik bileşik salgılamakta, ½MS ve 15 g/l sukroz içeren besin ortamındaki eksplantlarda fenolik bileşik salınımı çok az veya hiç olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 a. Tam MS ve 30 g/l sukroz ve b. ½MS ve 15 g/l sukroz içeren besin ortamında fenolik bileşik oluşumu

Pamuk çeşitlerinde en yüksek sürgün rejenerasyonunu veren eksplantı belirlemek için GSN-12 çeşidine ait kotildon boğum, primer yaprak boğumları, epikotil, kotiledon yaprak ve sekonder yaprak eksplantları önceki denemelerde en iyi sonuç veren büyüme düzenleyici kombinasyonlarını içeren MSO besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda kotiledon yaprak, sekonder yaprak ve epikotil eksplantlarında yüksek oranda kallus oluşumu gözlenirken, sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Bundan dolayı bu eksplantlardan elde edilen sonuçlar verilmemiştir. Kültüre alınan kotiledon boğum ve primer yaprak boğumu eksplantlarından ise en yüksek rejenerasyon değerleri yine kotiledon boğumlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 Farklı oranlarda büyüme düzenleyici ve sukroz içeren ½ ve tam MSO ortamında kültüre alınan GSN-12 çeşidinin kotiledon boğumu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

MS	Sukroz (g/l)	Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)							Rej. Oranı (%)	Sürgün sayısı/ Eksplant
		BAP	NAA	KIN	2,4-D	TDZ	Dic.	Pic.		
Tam	30	0	0	0	0	0	0	0	86.7	1
		0.1	0.1	-	-	-	-	-	100.0	1.13
		0.125	-	-	-	-	-	-	100.0	1
		-	-	0.125	-	-	-	-	80.0	1
		-	-	-	0.1	-	-	-	100.0	1
		-	-	0.25	0.125	-	-	-	86.7	1
		-	-	0.5	0.125	-	-	-	100.0	1
		-	-	-	-	0.125	-	-	53.3	1
		-	-	-	-	-	0.25	-	0	0
		-	-	0.5	-	-	0.5	-	73.3	1
		-	-	-	-	-	-	0.25	6.6	0.66
		-	-	0.5	-	-	-	0.5	0	0
Tam	15	0	0	0	0	0	0	0	100.0	1
		0.1	0.1	-	-	-	-	-	93.33	1
		0.125	-	-	-	-	-	-	100.0	1.53
		-	-	0.125	-	-	-	-	100.0	1.06
		-	-	-	0.1	-	-	-	100.0	1
		-	-	0.25	0.125	-	-	-	93.3	1
		-	-	0.5	0.125	-	-	-	100.0	1
		-	-	-	-	0.125	-	-	26.7	1
		-	-	-	-	-	0.25	-	0	0
		-	-	0.5	-	-	0.5	-	13.3	0.66
		-	-	-	-	-	-	0.25	6.7	0.33
		-	-	0.5	-	-	-	0.5	0	0
1/2	30	0	0	0	0	0	0	0	73.3	1
		0.1	0.1	-	-	-	-	-	100.0	1
		0.125	-	-	-	-	-	-	100.0	1
		-	-	0.125	-	-	-	-	93.3	1
		-	-	-	0.1	-	-	-	100.0	1.06
		-	-	0.25	0.125	-	-	-	86.7	1
		-	-	0.5	0.125	-	-	-	100.0	1
		-	-	-	-	0.125	-	-	66.7	1.43
		-	-	-	-	-	0.25	-	6.7	0.33
		-	-	0.5	-	-	0.5	-	13.3	0.33
		-	-	-	-	-	-	0.25	0	0
		-	-	0.5	-	-	-	0.5	0	0
1/2	15	0	0	0	0	0	0	0	100.0	1
		0.1	0.1	-	-	-	-	-	100.0	1
		0.125	-	-	-	-	-	-	100.0	1
		-	-	0.125	-	-	-	-	100.0	1
		-	-	-	0.1	-	-	-	100.0	1
		-	-	0.25	0.125	-	-	-	86.7	1
		-	-	0.5	0.125	-	-	-	100	1
		-	-	-	-	0.125	-	-	20.0	0.66
		-	-	-	-	-	0.25	-	6.7	0.33
		-	-	0.5	-	-	0.5	-	6.7	0.33
		-	-	-	-	-	-	0.25	6.7	0.33
		-	-	0.5	-	-	-	0.5	0	0

Dic: Dikamba, Pic: Pikloram, Rej: Rejenerasyon

Çizelge 4.5 Farklı büyüme düzenleyici kombinasyonlarının GSN-12 çeşidinin değişik eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Büyüme Düzenleyicileri	Konsantrasyon (mg/l)	Kotiledon boğum		Primer yaprak boğumu	
		Rejenerasyon oranı (%)	Sürgün sayısı/ Eksplant	Rejenerasyon oranı (%)	Sürgün sayısı/ Eksplant
Kontrol	0	86.7	1.53	100.0	1
BAP-NAA	0.1-0.1	80.0	1.75	93.3	1.06
KIN	0.125	86.7	1.58	66.7	1
2,4D	0.1	80.0	1.08	80.0	1
2,4 D-KIN	0.125-0.5	86.7	1.25	73.3	1
TDZ	0.125	73.3	2.00	60.0	1

4.4.3 Farklı pamuk çeşitlerinin sürgün rejenerasyon kapasitesinin belirlenmesi

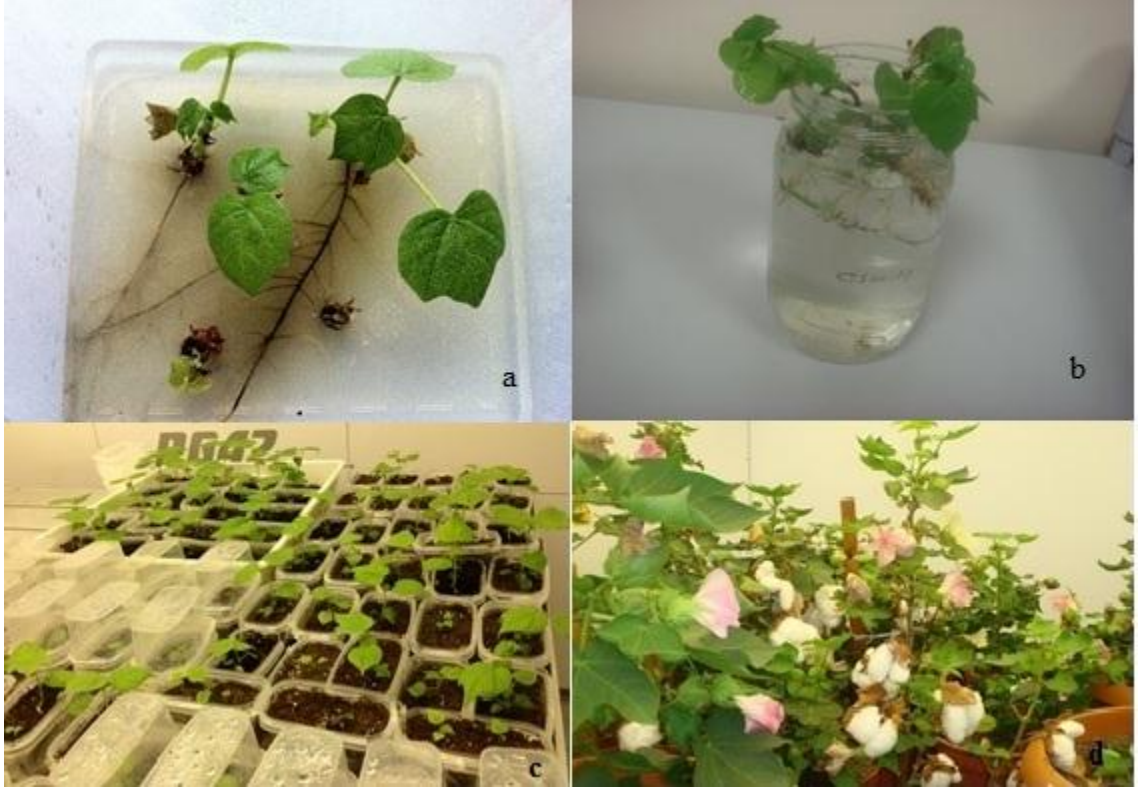
Coker 312 ve GSN-12 çeşidiyle yapılan denemeler sonucunda en yüksek rejenerasyon sağlayan eksplantın 6-7 günlük fidelerden alınan kotiledon boğum olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle Ayhan 107, BA 119, Özbek 100, STN-468 ve Furkan-1 çeşitlerine ait kotiledon boğum eksplantları önceki çalışmalarda en yüksek sonuç veren büyüme düzenleyici kombinasyonlarını içeren temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Yapılan bu çalışmada çeşitler ve büyüme düzenleyicileri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.6). Tüm çeşitlerde rejenerasyon oranı Coker 312 ve GSN-12 çeşitlerinden daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 4.6 Farklı pamuk çeşitlerinin kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Büyüme Düzenleyicileri		Kontrol	BAP-NAA	Kin	2,4-D	2,4 D-KIN	TDZ
Konsantrasyon(mg/l)		0-0	0.1-0.1	0.125	0.1	0.125-0.5	0.125
Ayhan 107	Rejenerasyon Oranı (%)	80.0	100.0	100.0	80.0	100.0	60.0
	Sürgün sayısı/ Eksplant	1.06	1.00	1.00	1.13	1.00	1.00
BA 119	Rejenerasyon Oranı (%)	100.0	100.0	100.0	86.7	86.7	40.0
	Sürgün sayısı/ Eksplant	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Özbek 100	Rejenerasyon Oranı (%)	46.7	100.0	100.0	100.0	100.0	26.7
	Sürgün sayısı/ Eksplant	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
STN-468	Rejenerasyon Oranı (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	6.7
	Sürgün sayısı/ Eksplant	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.33
Furkan-1	Rejenerasyon Oranı (%)	100.0	100.0	93.3	100.0	80.0	53.3
	Sürgün sayısı/ Eksplant	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.06
SG-125	Rejenerasyon Oranı (%)	80.0	100.0	100.0	86.7	80.0	40.0
	Sürgün sayısı/ Eksplant	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00

4.4.4 Sürgünlerin köklendirilmesi ve dış şartlara alıştırılması

Gelişen sürgünler kesilerek 2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında köklendirilerek, toprağa aktarılmadan önce kökleri saf suda bir müddet bekletilmiş, daha sonra içerisinde toprak bulunan kültür kaplarına aktararak kapakları kapatılmış ve zaman zaman kapakları açılarak hava sirkülasyonu sağlanmıştır. 4-5 hafta sonra da bitkiler büyük saksılara aktarılarak bitki büyütme odasında veya serada çiçeklenerek tohum bağlamışlardır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 a. sürgünlerin köklendirilmesi b. köklerin saf suda yıkanması c. Köklenen sürgünlerin dış şartlara alıştıırılması d. büyüyen bitkilerin saksılara alınması ve tohum bağlaması

4.5 Gen Aktarım Çalışmaları

4.5.1 Pamuğa gen aktarımında kullanılacak olan bakteri hatlarının etkinliğinin tütünde belirlenmesi

A. tumefaciens ile tütün bitkisine gen aktarım frekansı çok yüksek olduğundan dolayı, gen aktarım çalışmalarında model bitki olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı gen aktarım frekansı son derece düşük olan pamuk bitkisine gen aktarımında kullanılacak olan LBA4404, GV2260, C58C1, AgL1 ve EHA105 bakteri hatlarının etkinlikleri öncelikle tütünde test edilmiştir. Test için kullanılan bu bakteri hatlarının tamamı da kanamisin antibiyotiğine dayanıklılığı sağlayan seçici markör *nptII* genini taşıyan p35S GUS-INT plazmidini bulundurmaktadır. GUS geni gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların maviye boyanmasını sağlarken, içerdiği bitkisel intron geni sayesinde de *Agrobacterium* içerisindeki ekspresyonu ortadan kaldırılmıştır. Tütüne gen aktarımında

in vitro kültürde 4-5 hafta büyütülen steril Samsun tütün çeşidine ait fidelerinden alınan 0.5 cm çapındaki yaprak eksplantları kullanılmıştır. İnokülasyondan 4 hafta sonra tütün yaprak eksplantları üzerinde kanamisine dayanıklı transgenik adayı sürgünlerin sayımı yapılmıştır (Şekil 4.23). Kanamisine dayanıklı sürgünler kesilerek kanamisin içeren besin ortamında köklendirilmiş (Şekil 4.24) ve köklenen sürgünler saksılara aktarılarak iklim odasında büyütülmüştür (Şekil 4.25). AgL1 *A. tumefaciens* hattı dışındaki tüm bakteri hatlarının gen aktarım yeteneklerini muhafaza ettikleri gözlenmiştir (Çizelge 4.7). Ancak, bunlardan GV2260, LBA4404 ve EHA105 bakteri hatlarının etkinliklerin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen GUS pozitif sürgünlerle ilgili GUS ve PCR analiz sonuçları şekil 4.26-4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.23 Kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi



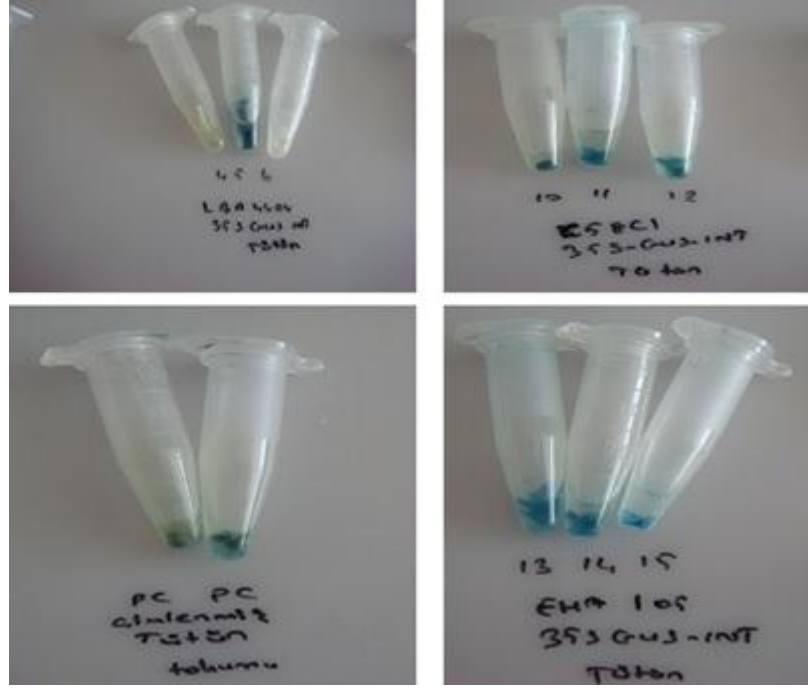
Şekil 4.24 Kanamisin içeren ortamda transgenik adayı tütün bitkilerinin köklendirilmesi



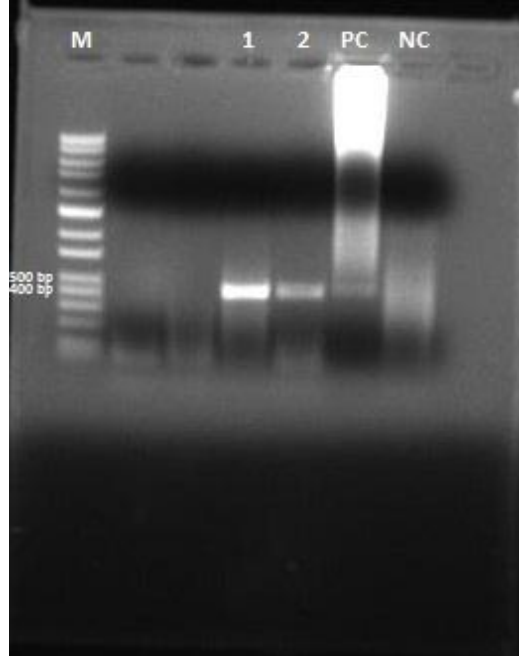
Şekil 4.25 İklim odasında gelişen transgenik tütün bitkisi

Çizelge 4.7 Farklı *A. tumefaciens* hatlarıyla inoküle edilen tütün yaprak disklerinden kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi ve GUS sonuçları

Bakteri Hattı	Binari plazmid	İnoküle edilen eksplant sayısı	Kanamisine dayanıklı sürgün veren eksplant oranı (%)	Kanamisine dayanıklı sürgün sayısı	GUS(+) sürgün oranı (%)
GV2260	p35GUS INT	18	100	150	44
GV2260	pAoPR1 GUS-INT	18	100	153	66.6
LBA4404	p35S-GUS INT	18	33.3	200	50.0
EHA 105	p35S-GUS INT	18	16.6	26	100
C58C1	p35S-GUS INT	18	11.1	4	100
AgL1	p35S-GUS INT	18	0	-	-



Şekil 4.26 Farklı *A. tumefaciens* hatlarıyla tütün yaprak disklerinin inokülasyonu sonucunda elde edilen kanamisine dayanıklı sürgünlerde GUS geninin ekspresyonu



Şekil 4.27 Kanamisine dayanıklı tütün bitkilerinde *nptII* geninin varlığının tespiti

M: 100 bp Markör, 1 ve 2 nolu kulvar: *nptII* geni taşıyan transgenik bitki, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol

4.5.2 A. tumefaciens GV2260 p35S GUS-INT ve GV2260 AoPR1 GUS-INT hattı ile pamuğa gen aktarımının optimizasyonu

Pamuğa gen aktarımının optimizasyonunda ön deneme olarak Coker 312 ve GSN-12 çeşitleri kullanılmıştır. Steril edilen tohumlar oda sıcaklığında bir miktar steril su içerisinde 1 gece bırakıldıktan sonra apikal meristem (sürgün ucu), embriyonik eksen, kotiledon boğum ve yarım kotiledon boğum eksplantları denemeye alınmıştır. Denemede 2 farklı yöntem uygulanmıştır. Eksplant şekline göre kağıt arası ve magentada besiyerinde olmak üzere 2 çeşit çimlendirme yapılmıştır. Kağıt arasında 33°C’de karanlık ortamda 2-3 gün çimlenmeye bırakılan fidelerden apikal meristem ve embriyonik eksen olmak üzere üzere 2 çeşit eksplant alınmıştır. Magentada çimlendirilmiş 6-7 günlük bitkilerden ise kotiledon boğum ve yarım kotiledon boğum eksplantları alınmıştır.

Birinci yöntemde her iki çimlendirme şeklinden alınan eksplantlar kullanılmıştır. Eksplantlar Nutrient Broth (NB) sıvı ortamında 1/25 oranında seyretelen *A. tumefaciens* GV2260 p35S GUS-INT ve GV2260 AoPR1 GUS-INT bakterileri hattı ile inoküle edildikten sonra 30 dakika yatay çalkalayıcıda hafifçe inokülasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra apikal meristem ve embriyonik eksen yaralanarak, kotiledon nod ve yarım kotiledon nod direk inokulasyon ortamına alınmıştır. Bu süre sonunda eksplantlardan fazla suyu ve bakteriyi uzaklaştırmak için eksplantlar steril kurutma kağıtına alındıktan sonra ko-kültivasyon ortamına alınmıştır. Ko-kültivasyon ortamında, tam ve yarım MS tuzları ve vitaminleri ile %3 sükroz kullanılmış, pH 5.6-5.8’e ayarlandıktan sonra ortama katılaştırıcı olarak %0.3 g/l phytigel ilave edilmiştir. Otoklav sonrası ise 100 mM acetosyringone stok solüsyonundan 1 ml/l, 10 mM’lık MES (Morpholinoethane sulfanic acid analytical grade) stok solüsyonundan 1 ml/l ve 0.1 mg/l kinetin eklenmiştir. Eksplantlar ko-kültivasyon ortamında bakterinin durumuna göre kontrol edildikten sonra yaklaşık 65 saat bekledikten sonra rejenerasyon ortamına alınmıştır.

Seleksiyon ortamı olan rejenerasyon ortamında ise 0.1 mg/l kinetin, 100 mg/l Kanamisin ve 500 mg/l Amoklavın içeren tam ve yarım MS tuzları ve vitaminleri ile %3 sukroz, katılaştırıcı olarak % 0.3 g/l phytigel kullanılmıştır. Rejenerasyon ortamına

almadan önce kök kısımları kahverengileşmiş ve uzamış eksplantlar ve fazla yapraklar kesilmiş, ayrıca eksplantların etrafında aşırı bakteri gelişimi olduğu durumlarda, eksplantlar Amoklavin içeren otoklavlanmış steril suda 5-6 dakika yıkandıktan sonra sadece gen aktarılmış sürgünlerin gelişimini sağlamak için de 50 mg/l kanamisin içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Sürgünlerin bu konsantrasyona dirençli olduğu düşünüldüğü için kanamisin miktarı 100 mg/l'ye çıkarılmıştır. Seleksiyon ortamında gelişen sürgünler 10 gün sonra 2.5-3 mg/l aktif karbon ilave edilmiş, 250 mg/l Amoklavin içeren aynı rejenerasyon ortamına transfer edilmiştir. 3-4 hafta sonra yapılan gözlemlerde seleksiyon ortamında bazı bitkilerin köklendiği ve sürgün sayılarının 1-3 arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.28). Daha sonra bu sürgünler yeterli büyüklüğe eriştiklerinde, yaklaşık 6-8 hafta sonra *in vitro* koşullarda 2 mg/l IBA veya 0.1 mg/l NAA içeren yarım MS ortamında denenerek köklendirmeye alınmıştır.



Şekil 4.28 GV2260 35S GUS INT ile inoküle edilen GSN-12 çeşidinde 100 mg/l kanamisin ve 0.1 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren seleksiyon ortamında kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi

İkinci yöntemde, kağıt arasında çimlendirilmiş 2-3 günlük bitkilerin apikal meristem bölgelerinde 2 farklı şekilde uygulama yapılmıştır. Birinci uygulamada, eksplantlar ön-kültür ortamı olan hormonsuz %3 glukoz ve %0.25 phytajel içeren tam ve yarım MS ortamında 24°C’de ışıklı ortamda 2 gün bekletildikten sonra eksplant yaralanarak 30 dakika inokülasyona tabi tutulmuş ve 0.1 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren ko-kültivasyon ortamında yaklaşık 65 saat bekledikten sonra 100 mg/l Kanamisin ve 500 mg/l Augmentin içeren rejenerasyon ortamına alınmıştır. İkinci uygulamada, eksplantlar yaralanarak direk inokülasyon ortamında 30 dakika bekletildikten sonra aynı şekilde ko-kültivasyon ortamına ve daha sonra rejenerasyon ortamına alınmıştır. Eksplantları ko-kültivasyon optimizasyon ortamına alırken bazı denemelerde X-GLUC ile GUS analizi yapılmış ve bazı eksplantların kök, bazı eksplantların gövde, bazı eksplantların ise sürgüne yakın kısmında mavi renge boyanmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 GV2260 p35S GUS-INT hattı ile inokülasyon yapılan eksplantlardan elde edilen sürgünlerde histo-kimyasal GUS analizi

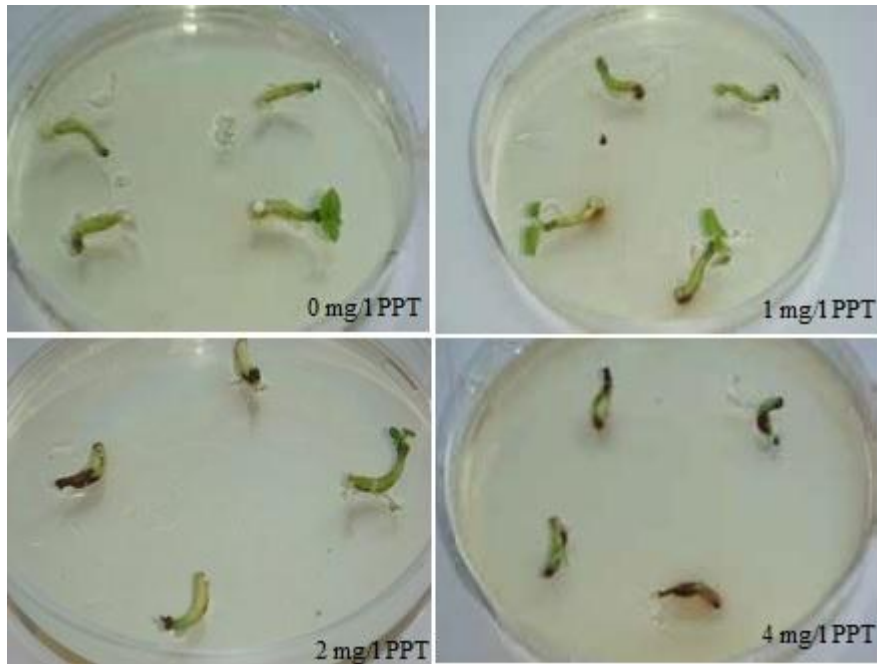
Pamuk bitkisine gen aktarımının optimizasyonu için farklı yöntemler, plazmidler, çeşitler ve eksplantlar kullanılmıştır. Kullanılan bu yöntemlerin özeti çizelge 4.8’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi 30 g/l sukroz içeren besin ortamında kültüre alınan apikal meristem eksplantlarının en yüksek sonucu verdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.8 Coker 312 ve GSN12 çeşitlerinin farklı eksplantlarına farklı GV2260 p35S GUS-INT ve GV2260 AoPR1 GUS-INT hatları ile gen aktarımı

	Çeşit/Ortam	Eksplant	Binari Plazmid	İnoküle edilen eksplant sayısı	Kanamisine dayanlı sürgün sayısı	Köklenen sürgün sayısı	GUS analizine alınan eksplant sayısı	GUS(+) sürgün sayısı
1. Deneme (1.Yöntem)	Coker 312 MS+ 30 g/l sukroz	Kotiledon boğum	p35SGUS-INT	12	10	1	2	0
		Yarım kotiledon boğum	p35SGUS-INT	14	10	-	2	0
	Coker 312 yarımMS+ 15 g/l sukroz	Kotiledon boğum	p35SGUS-INT	12	12	-	-	0
		Yarım kotiledon boğum	p35SGUS-INT	18	15	-	2	0
	GSN12 MS+ 30 g/l sukroz	Kotiledon boğum	p35SGUS-INT	10	10	-	3	0
		Yarım kotiledon boğum	p35SGUS-INT	14	9	-	3	0
	GSN-12 Yarım MS+ 15 g/l sukroz	Kotiledon boğum	p35SGUS-INT	10	10	-	-	-
		Yarım kotiledon boğum	p35SGUS-INT	14	8	-	-	-
2. Deneme (1.Yöntem)	GSN-12 MS+ 30 g/l sukroz	Apikal meristemi	pAoPR1GUS-INT	16	15	1	2	0
		Embriyonik Eksen	pAoPR1GUS-INT	14	14	2	3	0
	GSN12 Yarım MS+ 15 g/l sukroz	Apikal Meristemi	pAoPR1GUS-INT	18	16	2	2	0
		Embriyonik Eksen	pAoPR1GUS-INT T	18	17	-	1	0
3. Deneme (1.Yöntem)	GSN12 MS+ 30 g/l sukroz	Kotiledon boğum	p35SGUS-INT	32	27	-	2	2
		Yarım kotiledon boğum	p35SGUS-INT	45	27	-	2	2
	GSN12 Yarım MS+ 15 g/l sukroz	Kotiledon boğum	p35SGUS-INT	32	27	-	2	2
		Yarım kotiledon boğum	p35SGUS-INT	45	24	-	2	2
4. Deneme (2.Yöntem)	GSN12 MS+ 30 g/l sukroz	Apikal meristem (Önkültür)	p35SGUS-INT	40	28	6	8	0
	GSN12 MS+ 30 g/l sukroz	Apikal meristem (Direk)	p35SGUS-INT	50	38	10	22	9
5. Deneme (2.Yöntem)	GSN12 MS+ 30 g/l sukroz	apikal meristem (Direk)	p35SGUS-INT	60	58	-	12	10
	GSN12 MS+sukroz	Apikal meristem (Direk)	pAoPR1GUS-INT	13	12	1	9	4
6. Deneme (1.Yöntem)	GSN12 MS+sukroz	Apikal meristem (Direk)	pAoPR1GUS-INT	12	12	-	3	0
	GSN12 MS+sukroz	Apikal meristem	p35SGUS-INT	64	47	1	11	0

4.5.3 Seleksiyonda kullanılacak olan fosfotrisin (PPT) miktarının belirlenmesi

Gen aktarımına başlamadan önce, gen aktarılmış sürgünlerin seçiminde kullanılan seçici antibiyotik veya herbisitlerin kullanım dozlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan binari plazmidlerde *bar* geni bulunduğundan ve *bar* geni de aktarılan bitki hücrelerini PPT'ye dayanıklı hale getirdiğinden dolayı, seleksiyon ortamlarında kullanılacak olan PPT miktarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla pamuk sürgün apikal meristem eksplantları 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l ve 4 mg/l PPT içeren rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra yapılan kontrollerde PPT içermeyen kontrol grubunda rejenerasyon oranı %83.3 iken, 1 mg/l ve 2 mg/l PPT içeren ortamda sırasıyla %75 ve %25 olmuştur. 3 ve 4 mg/l PPT içeren ortamda ise rejenerasyon olmamıştır (Şekil 4.30). Elde edilen bu sonuçlara dayanarak gen aktarım çalışmalarında seleksiyon ortamlarında 2 mg/l PPT kullanılmıştır.



Şekil 4.30 Farklı PPT dozlarının pamukta sürgün gelişimine etkisi

4.5.4 AoPR1-Cry1Ac ve CaMV35S-Cry1Ac genlerini taşıyan *A. tumefaciens* hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımı

Farklı pamuk çeşitlerinde gen aktarımına uygun sürgün rejenerasyonu ve GUS geni içeren *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı optimize edildikten sonra, *bar* ve *cry1Ac* genlerinin farklı pamuk çeşitlerine aktarılması işlemine geçilmiştir. Bu amaç için farklı pamuk çeşitlerine ait farklı eksplantlar *bar* ve *cry1Ac* genlerini içeren değişik *A. tumefaciens* hatlarıyla inoküle edilmiştir. Kullanılan *A. tumefaciens* hatları ve içerdikleri plazmidlerin listesi çizelge 4.9'da verilmiştir.

Farklı çeşitlere ait tohumlardan *in vitro* çimlenen fidelerden elde edilen sürgün ucu meristem bölgeleri çizelge 4.9'da verilen *A. tumefaciens* hatlarıyla 45 dakika inoküle edildikten sonra 0.1 mg/l Kinetin, 0.1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS rejenerasyon ortamında 48 saat ko-kültivasyona alınmıştır. Ayrıca inokülasyon ve ko-kültivasyon ortamına 100 µM asetosrington ve 10 µM MES (Morpholinoethane sulfanic acid analytical grade) ilave edilmiştir. Besin ortamları %0.3 gelrite ile katlaştırılmıştır. Ko-kültivasyondan sonra eksplantlar 2 mg/l fosfotrisin (PPT) ve 500 mg/L Augmentin içeren ve yukarıda verilen seçici seleksiyon ve rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. 2 hafta sonra gelişen sürgünler 2 mg/l PPT, 500 mg/l Augmentin ve 1.5-2 g/l aktif karbon ilave edilen aynı seleksiyon ortamında alt kültüre alınmıştır. Yaklaşık 2 hafta sonra sürgünler 2 mg/l PPT, 500 mg/l Augmentin, 1.5-2 g/l aktif karbon, 0.1 mg/l Kinetin, 0.1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren 1/2 MS ortamına aktararak sürgünlerde kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.31). 4 hafta sonra köklenen bitkicikler kompost içeren kültür kapları veya saksılara aktararak iklim odasında dış şartlara alıştırmıştır. İklim odasında gelişen bitkiler yaklaşık 1 ay sonra daha büyük saksılara aktararak seraya alınmıştır. Serada bitkiler düzenli olarak sulanmış ve gübreleme işlemleri de yapılmıştır. Sera şartlarında yaklaşık 3-4 ay içerisinde bitkiler çiçeklenerek tohum oluşturmuştur (Şekil 4.32).

Çizelge 4.9 Farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımında kullanılan *A. tumefaciens* hatları ve içerdikleri plazmidler

<i>A. tumefaciens</i> hattı	Binari Plazmid	Bulunan Genler
GV2260	pTF101.1	35S-Cry1Ac/Bar
GV2260	pTF101.1	AoPR1-Cry1Ac/Bar
LBA4404	pRD400	AoPR1-Cry1Ac/nptII
LBA4404	pk2Ac	35S-Cry1Ac-Cry2Ac/nptII



Şekil 4.31 *A. tumefaciens* ile farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımında kullanılan prosedür



Şekil 4.32 *Cry* ve *bar* genlerinin aktarıldığı aday transgenik bitkilerin dış şartlara alıştırılması ve sera şartlarında yetiştirilmesi

Cry ve *bar/nptII* genlerini içeren değişik vektör ve *A. tumefaciens* hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine, farklı zaman dilimlerinde yapılan gen aktarım çalışmalarına ait sonuçlar çizelge 4.10-4.11'de verilmiştir. Çizelgelerden de gözlendiği gibi farklı çeşitlere ait sürgün ucu eksplantı, farklı genleri içeren *A. tumefaciens* hatlarıyla inoküle edilerek ko-kültivasyona tabi tutulmuştur. Bu gen aktarım çalışmaları sonucunda farklı çeşitlere ait transgenik aday pamuk bitkileri saksılara aktarılarak bitki büyütme odaları ve sera şartlarında büyütülerek PCR ile teyit edilmiştir. Seraya aktarılan bitkilere düzenli olarak sulama ve gübreleme yapılmıştır. Bu bitkilerden 2-3 ay içerisinde tohum elde edilmiştir (Şekil 4.33).

Çizelge 4.10 *A. tumefaciens* GV2260 pTF101.1 35S Cry1Ac ve GV2260 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine yapılan gen aktarım sonuçları

Çeşit	Bakteri/Plazmid	Gen	İnoküle edilen eksplant sayısı	Fosfinotri-sin'e dayanıklı sürgün sayısı	Köklenen sürgün sayısı	Saksılarda yaşayan bitki sayısı	PCR-AoPR1 (+) bitki sayısı	PCR-Bar (+) bitki sayısı	PCR-Cry (+) bitki sayısı
GSN 12	GV2260 pTF 101.1	35S-cry1Ac/Bar	60	30	15	14	-	3	1
		AoPR1-cry1Ac/Bar	60	33	30	28	3	2	2
STN 468	GV2260 pTF 101.1	35S-cry1Ac/Bar	30	12	12	12	-		1
		AoPR1-cry1Ac/Bar	30	19	9	0	0	0	0
Özbek 100	GV2260 pTF 101.1	35S-cry1Ac/Bar	30	9	6	5	-		1
		AoPR1-cry1Ac/Bar	30	6	2	2			0

Çizelge 4.11 *A. tumefaciens* LBA4404 pRD400 AoPR1 Cry1Ac ve LBA4404 pk2Ac35S Cry1Ac/Cry2Ac hatlarıyla farklı pamuk çeşitlerine yapılan gen aktarım sonuçları

Çeşit	Bakteri/Plazmid	Gen	İnoküle edilen eksplant sayısı	Kanamisin dayanıklı sürgün sayısı	Köklenen sürgün sayısı	Saksılarda adaptasyonu sağlanan bitki sayısı	PCR-nptII (+) bitki sayısı	PCR-AoPR1 (+) bitki sayısı	PCR-cry1Ac (+) bitki sayısı
GSN 12	LBA4404/pRD400	AoPR1-cry1Ac/nptII	141	96	36	23	1	1	2
	LBA4404/pk2Ac	35S-cry1Ac cry2Ac/nptII	123	67	15	10	2	-	1
STN 468	LBA4404/pRD400	AoPR1-cry1Ac/nptII	50	34	4	1	0	0	0
	LBA4404/pk2Ac	35S-cry1Ac cry2Ac/nptII	110	75	25	21	8	-	3
Özbek 100	LBA4404/pRD400	AoPR1-cry1Ac/nptII	94	54	3	2	0	0	0
	LBA4404/pk2Ac	35S-cry1Ac cry2Ac/nptII	98	67	8	7	0	-	0
Ayhan 107	LBA4404/pRD400	AoPR1-cry1Ac/nptII	100	23	1	1	0	0	0
	LBA4404/pk2Ac	35S-cry1Ac cry2Ac/nptII	102	34	7	7	1	-	1



Şekil 4.33 Büyütme kabini ve sera şartlarında yetiştirilerek tohum elde edilen transgenik bitkiler

4.5.5 Transgenik adayı pamuk bitkilerinin PCR ile teyit edilmesi

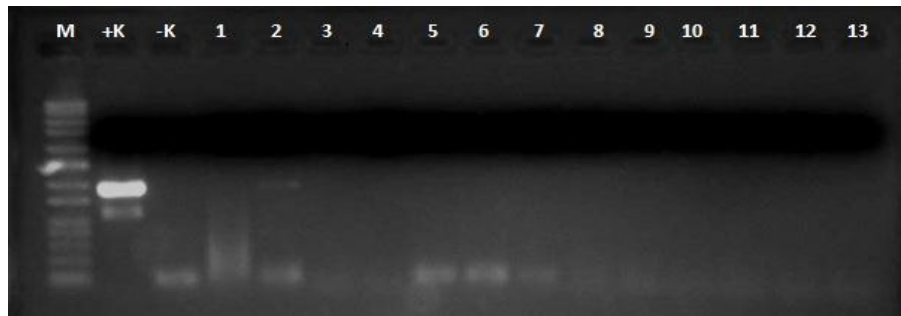
Gen aktarım çalışmalarıyla birçok transgenik adayı pamuk bitkisi elde edilerek sera şartlarında büyütülmüştür. Elde edilen bu transgenik adayı bitkilerin transgenik olup, olmadıkları PCR analizleriyle teyit edilmiştir. Transgenik adayı bitkilerin teyit edilmesinde *bar*, *cryIAc* ve *nptII* genleri ile AoPR1 promotor bölgesine yönelik dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır (Çizelge 4.12). PCR analizi Thermo Scientific Phine Plant Direct PCR Kit (F-130)'e göre doğrudan bitkilere ait yaprak örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonlar, Biometra T-personal thermocycler PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR programı da yine kit klavuzuna göre yapılmış olup, yalnızca primerlerin bağlanma sıcaklığı değiştirilmiştir.

Çizelge 4.12 Aday transgenik bitkilerin teyit edilmesinde kullanılan gen bölgeleri ve kullanılan primerler

Gen bölgesi	Primer baz dizini	Çoğaltılan gen bölgesi uzunluğu (bç)
nptII	F- TGG ATT GCA CGC AGG TTC TC R-CAA GAA GGC GAT AGA AGG CG	750
nptII	F-TTG CTC CTG CCG AGA AAG R-GAA GGC GAT AGA AGG CGA	459
bar	F- GCACCATCGTCAACCACTA R-ACAGCGACCACGCTCTTGAA	310
cryIAc	F-ATGGACAACCCAAACATC R-TCATGTCGTTGAATTGAATACG	412
AoPR1 promoter	F-CCG GTA CCC TCA GGA CTA GAC C R-GGC CAT GGT TAT GTA GCA CCG ATG	900

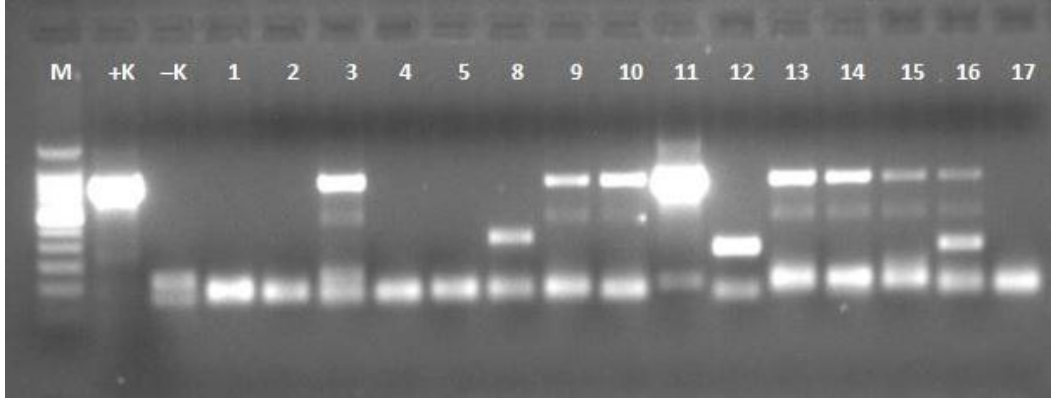
Seraya aktarılan farklı çeşitlere ait toplam 133 adet aday transgenik pamuk bitkisinin yapılan PCR analizleri sonucunda 48 adedinin aktarılan *bar*, *cryIAc* ve *nptII* genleri ile AoPR1 promoter bölgesini taşıdığı teyit edilmiştir.

Yapılan bu PCR sonuçlarıyla ilgili örnek jel görüntüleri şekil 4.34-4.57’de verilmiştir. Transgenik oldukları kesin olarak teyit edilen bitkiler muhafazaya alınarak, böcek biyotest analizleri yürütülmüştür. Transgenik olmayan bitkiler ise otoklavlandıktan sonra imha edilmiştir.



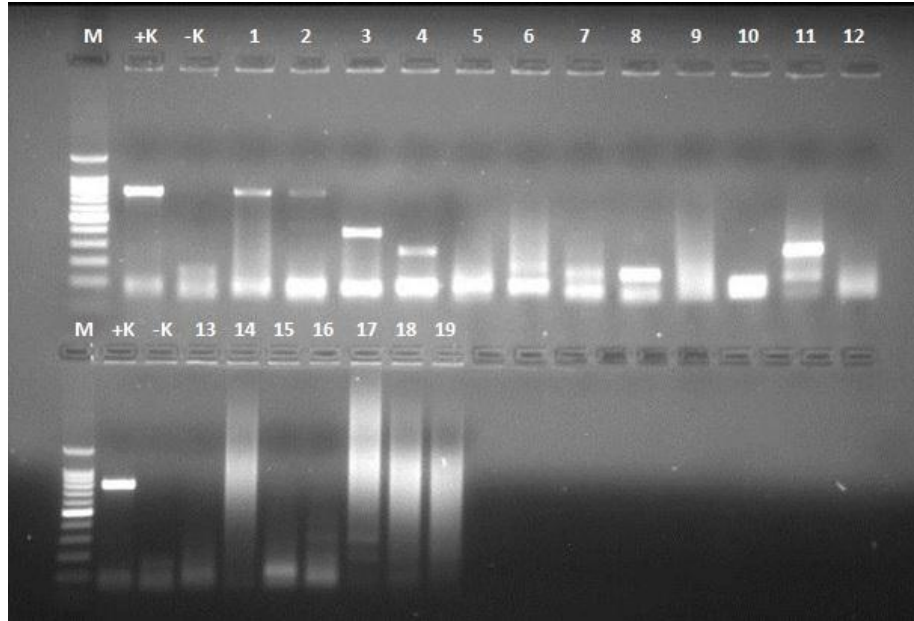
Şekil 4.34 AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, pRD400 plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisinine dayanıklı pamuk bitkilerinde AoPR1 promoter varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
1-13 kulvarlar: GSN 12 çeşidi
2 nolu kulvar: AoPR1 genini taşıyan transgenik bitki (2 nolu bitki)



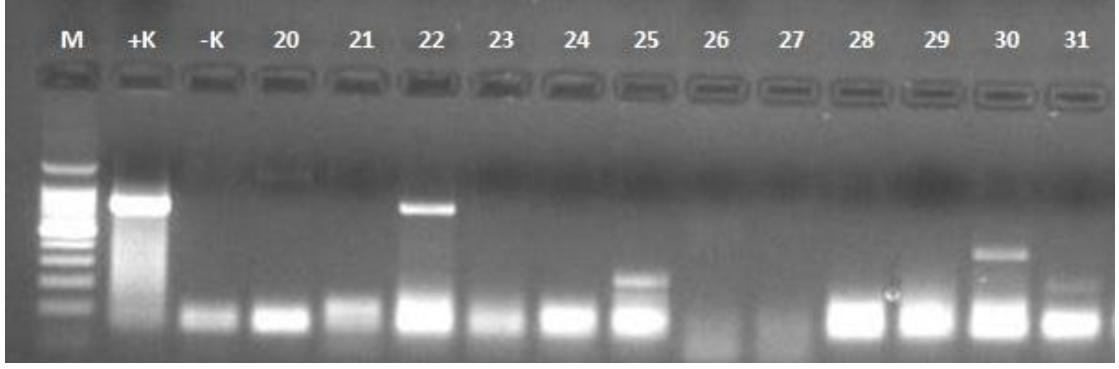
Şekil 4.35 *nptII* ve *cryIAc/cry2Ac* geni taşıyan pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ve AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan pRD400 plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
 1-5 kulvarlar: pRD400 AoPR1 *cryIAc* LBA4404 GSN-12 çeşidi,
 8-17 kulvarlar: pk2Ac 35S *cryIAc/cry2Ac* STN 468 çeşidi
 3, 9, 10, 11, 13, 14, 15 ve 16 nolu kulvarlar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitkiler



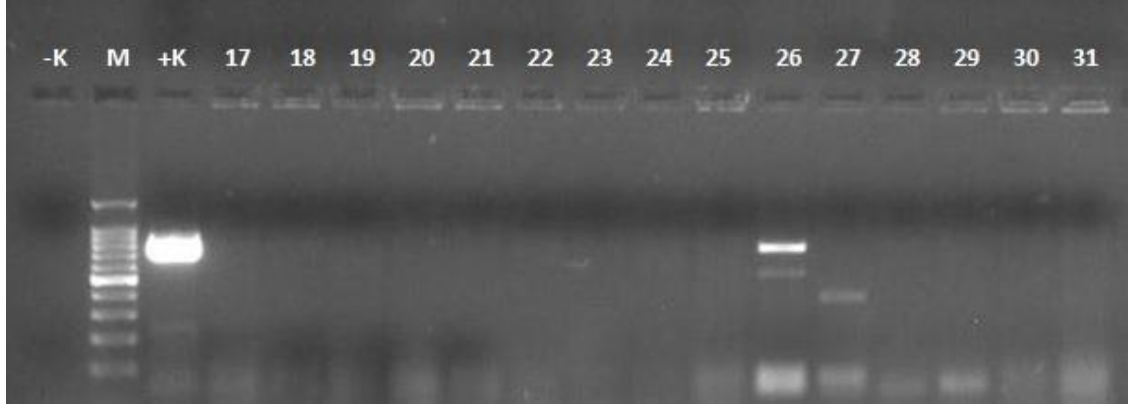
Şekil 4.36 35S promoter ve *CryIAc/Cry2Ac* geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
 1-19 kulvarlar: STN 468 çeşidi
 1 ve 2 nolu kulvarlar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitkiler



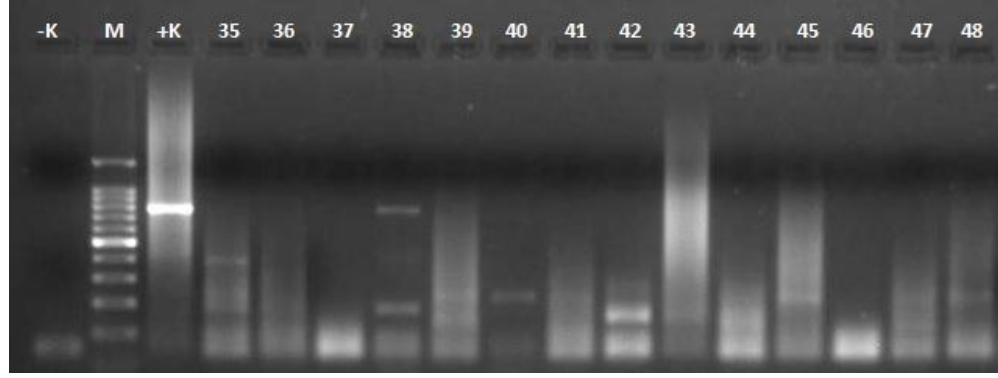
Şekil 4.37 35S promoter ve *CryIAc/Cry2Ac* geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
 20-21 kulvarlar: STN 468 çeşidi, 22-31 kulvarlar: GSN 12 çeşidi
 22 nolu kulvar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitki



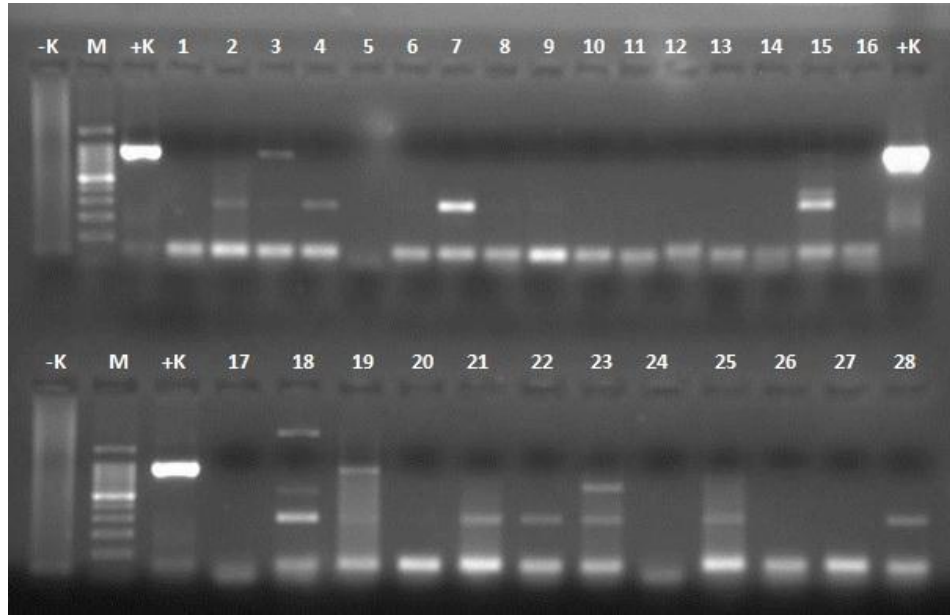
Şekil 4.38 35S promoter ve *CryIAc/Cry2Ac* geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör, +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
 17-21 kulvarlar: STN 468 çeşidi, 22-31 kulvarlar: GSN 12 çeşidi
 26 nolu kulvar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitki



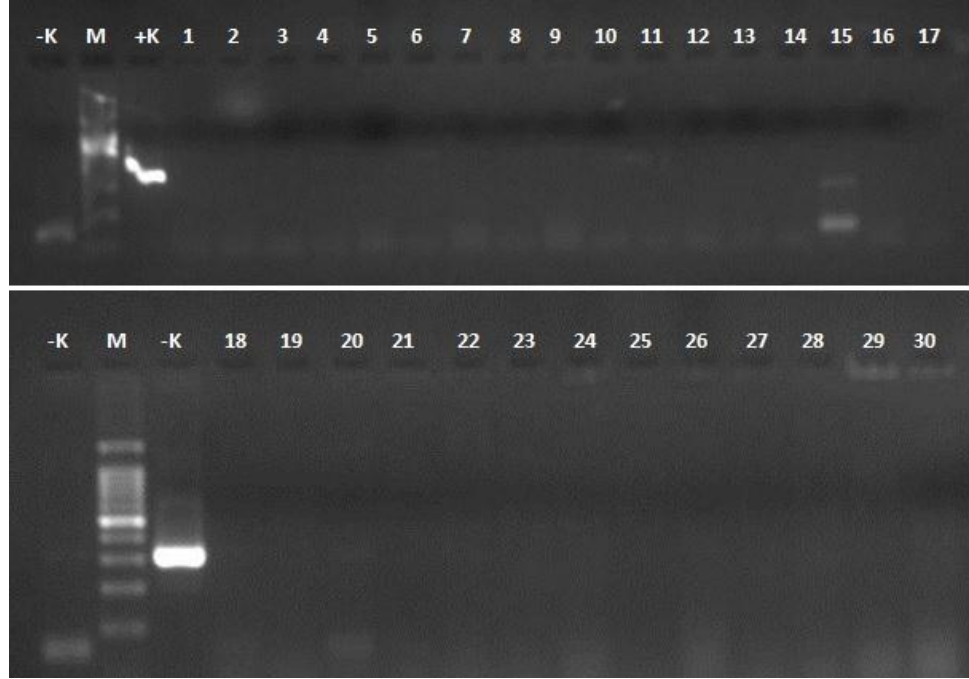
Şekil 4.39 35S promoter ve *CryIAc/Cry2Ac* geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
36-42 kulvarlar: Ayhan 107 çeşidi, 35,43-48 kulvarlar: Özbek 100 çeşidi
38 nolu kulvar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitki



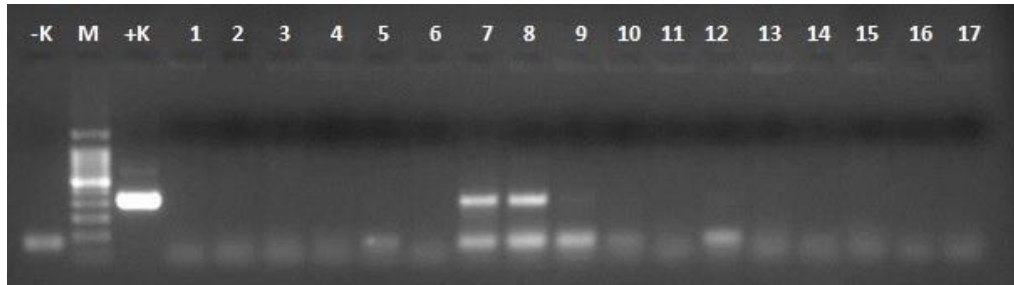
Şekil 4.40 AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren pamuk bitkilerinde AoPR1 promoter varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
1-28 kulvarlar: GSN 12 çeşidi
3 ve 19 nolu kulvar: AoPR1 genini taşıyan transgenik bitki



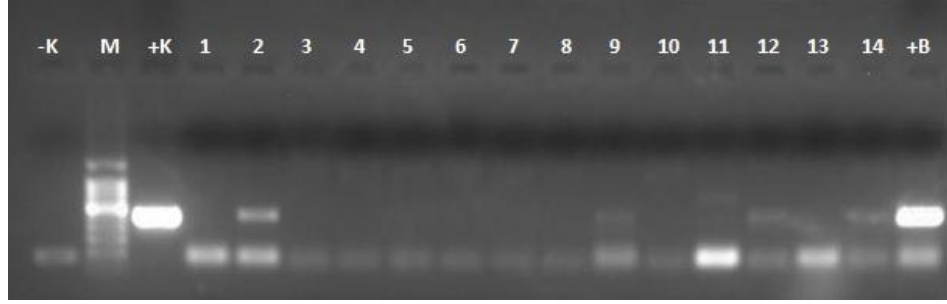
Şekil 4.41 AoPR1 promoter ve *cryI*Ac geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
 1-28 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 29-30 kulvarlar: Özbek 100 çeşidi
 15 nolu kulvar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitki



Şekil 4.42 35S promoter ve *cryI*Ac geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör,+K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA),-K: Negatif kontrol,
 1- 10 kulvarlar ve 12-15 kulvarlar: GSN 12 çeşidi; 11,16,17: STN 468 çeşidi.
 7, 8 ve 9 nolu kulvarlar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitki



Şekil 4.43 35S promoter ve *CryIAc/Cry2Ac* geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan pRD400 plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen *cry* geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde *cryIAc* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,

+B: cry pozitif bitki

pk2Ac LBA4404 35S *Cry1Ac/Cry2Ac* 1- 8. kulvarlar: STN 468 çeşidi, 9-11. kulvarlar: GSN 12 çeşidi,

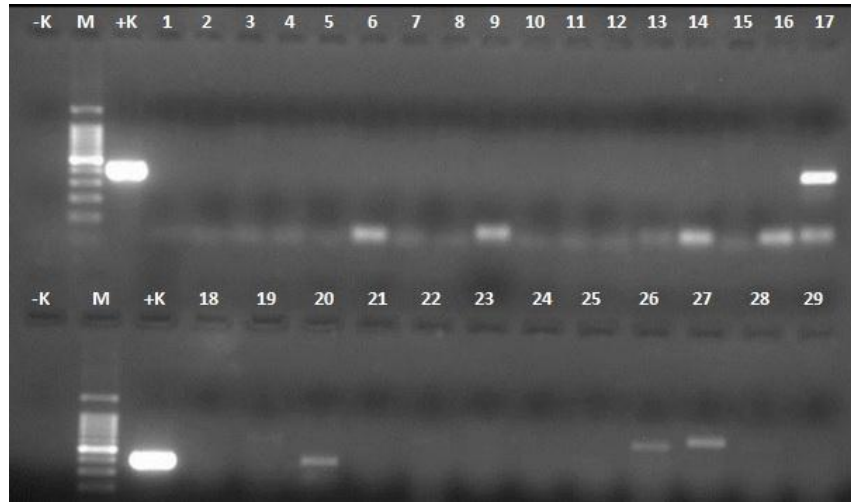
12 nolu kulvar: Ayhan 107 çeşidi, 13-14. kulvarlar: AoPR1 LBA4404 *cryIAc*, GSN 12 çeşidi

2. (2 nolu bitki) kulvar: pk2Ac LBA4404 35S *Cry1Ac/Cry2Ac* bakteri hatlarına ait *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitki

9. (22 nolu bitki) kulvar: pk2Ac LBA4404 35S *Cry1Ac/Cry2Ac* bakteri hatlarına ait *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitki

12. (38 nolu bitki) kulvar: pk2Ac LBA4404 35S *Cry1Ac /Cry2Ac* bakteri hatlarına ait *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitki

14. (3 nolu bitki) kulvar: pRD400 LBA4404 AoPR1 *Cry1Ac* bakteri hatlarına ait *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitki

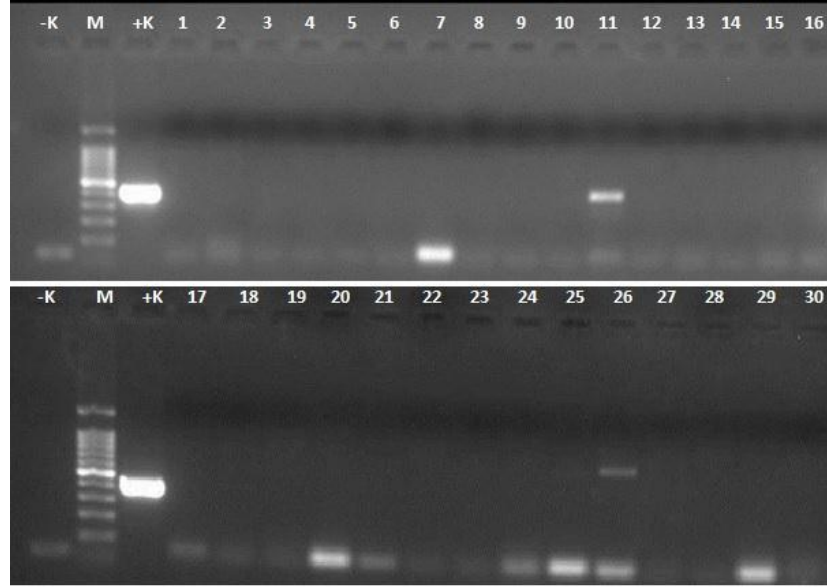


Şekil 4.44 35S promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, pk2Ac plazmidi içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde *cryIAc* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,

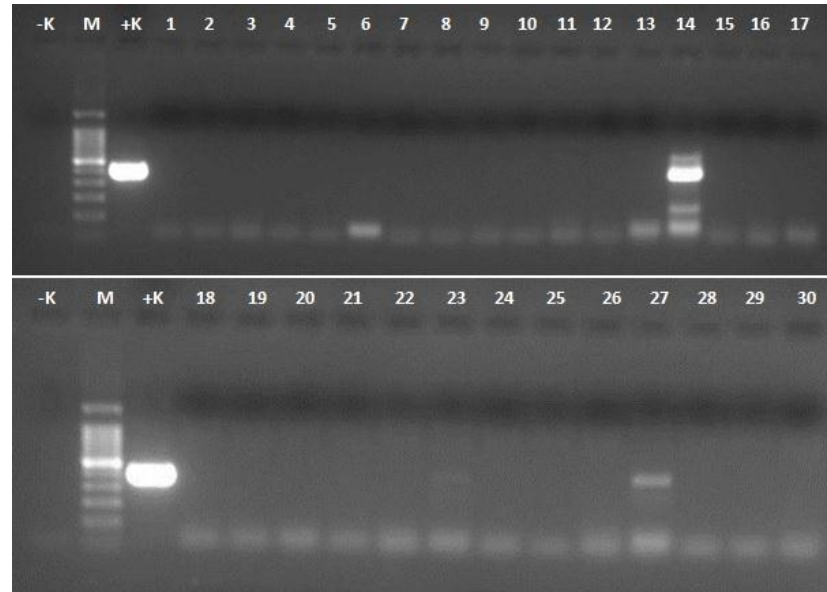
1- 21 kulvarlar STN 468 çeşidi, 22-29 kulvarlar: GSN 12 çeşidi

17 ve 20 nolu kulvarlar: *CryIAc* genini taşıyan transgenik bitkiler



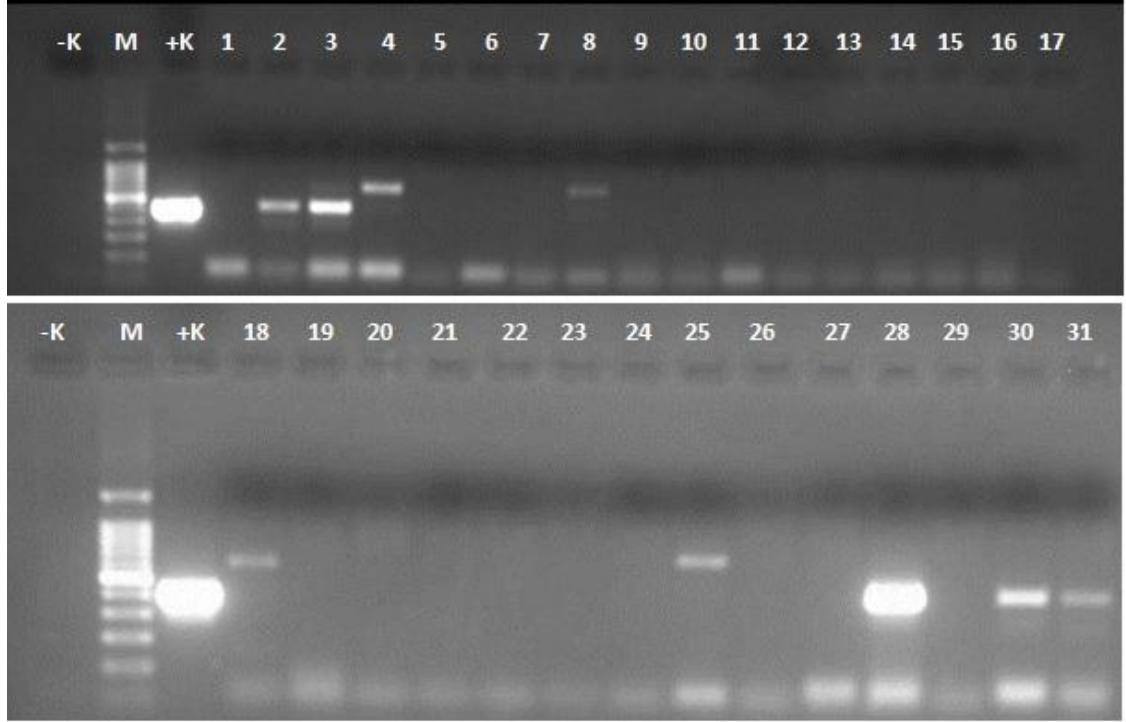
Şekil 4.45 AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde *cryIAc* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, 1-28 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 29-30 kulvarlar: Özbek 100
11 nolu kulvar: *CryIAc* genini taşıyan transgenik bitki



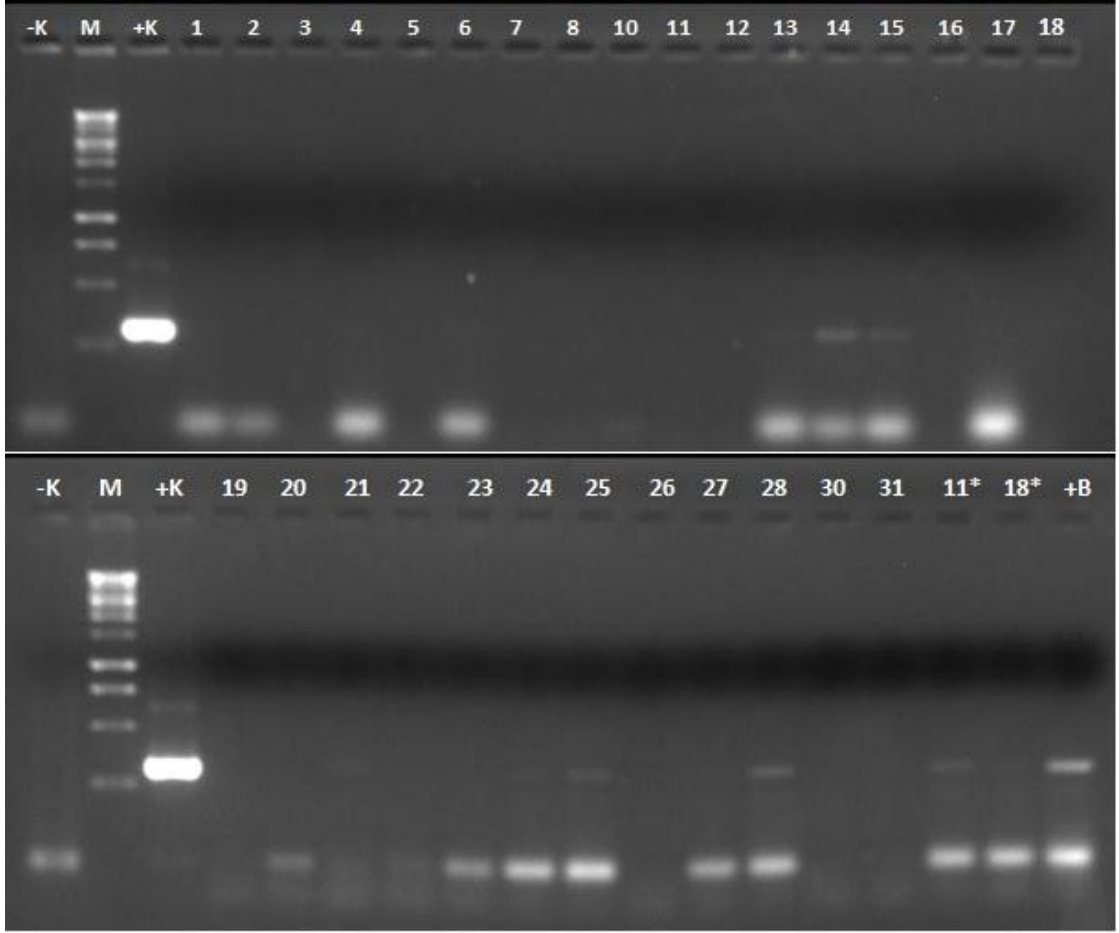
Şekil 4.46 35S promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde *cryIAc* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp),+K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, 1-10 kulvarlar ve 12-15 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 16-24 ,11. ve 30. kulvarlar: STN 468 çeşidi, 25-29 kulvarlar: Özbek 100 çeşidi
14, 23 ve 27 nolu kulvarlar: *CryIAc* genini taşıyan transgenik bitkiler



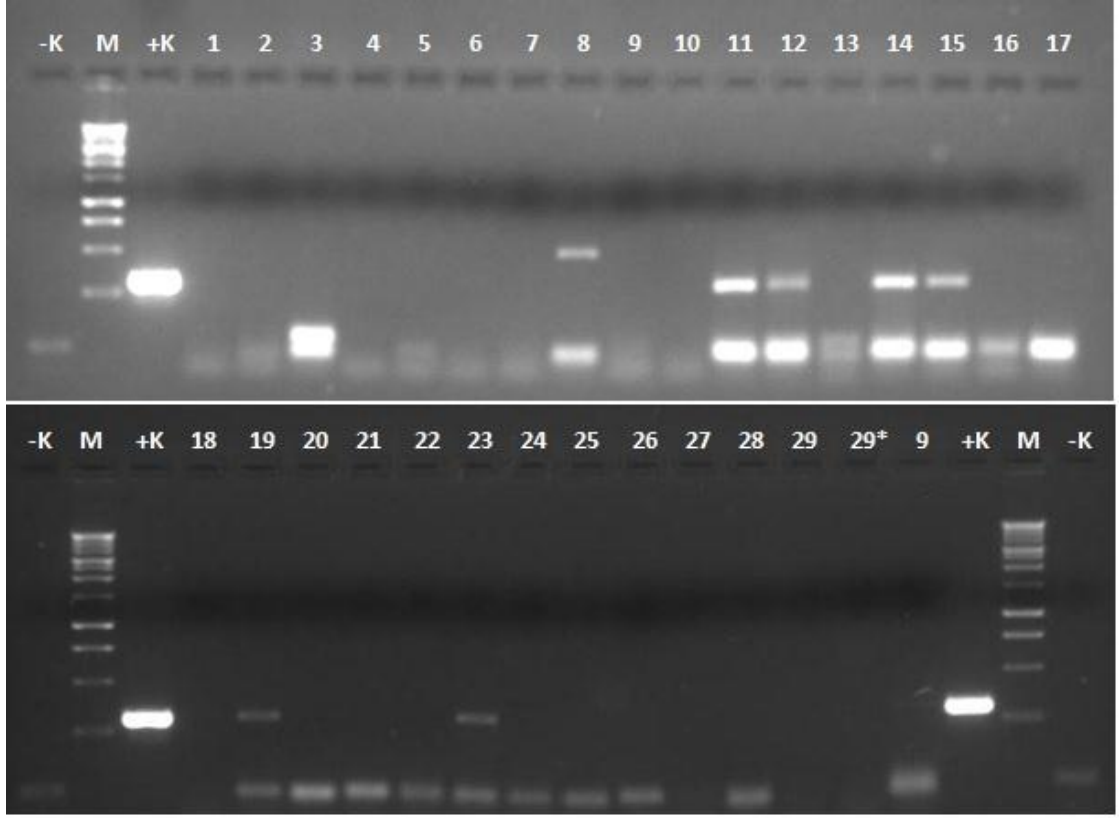
Şekil 4.47 35S promoter ve *CryIAC/Cry2Ac* geni taşıyan pK2Ac plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı, AoPR1 promoter ve *cryIAC* geni taşıyan pRD400 plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ve AoPR1 promoter ve *cryIAC* geni taşıyan PTF101.1 plazmidini içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *cry* geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde *cryIAC* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (100 bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, pRD400 LBA4404 AoPR1 *CryIAC*: 1-20 kulvarlar ve 22-24 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 21 nolu kulvar: STN 468, pK2Ac 35S *CryIAC/Cry2Ac* 25-27 kulvarlar: STN 468, 28-29 kulvarlar: STN 468 çeşidi, 30 nolu kulvar: Ayhan 107, PTF101.1 GV2260 AoPR1 *CryIAC* 31 nolu kulvar: GSN 12 çeşidi
2 ve 3. (2 ve 3 nolu bitki) kulvar, 28. (22 nolu bitki) kulvar, 30. (38 nolu bitki) kulvar ve 31. (18 nolu bitki) kulvar: *CryIAC* genini taşıyan transgenik bitkiler



Şekil 4.48 35S promoter ve cry1Ac geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ve AoPR1 promoter ve CryIAC geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (1 kb bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, +B: Pozitif Bitki
 1-10 ve 12-15 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 11. kulvar, 16-24, 31. kulvarlar: STN 468 çeşidi, 25-30 kulvarlar: Özbek 100çeşidi, PTF101.1 AoPR1 Cry1Ac 11 ve18 nolu kulvarlar: GSN 12 çeşidi
 PTF101.1 35S CryIAC 4,6,13,14,15,17,21,24,25,28 nolu kulvarlar ve PTF101.1 AoPR1 Cry1Ac 11*ve18*. kulvarlar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitkiler



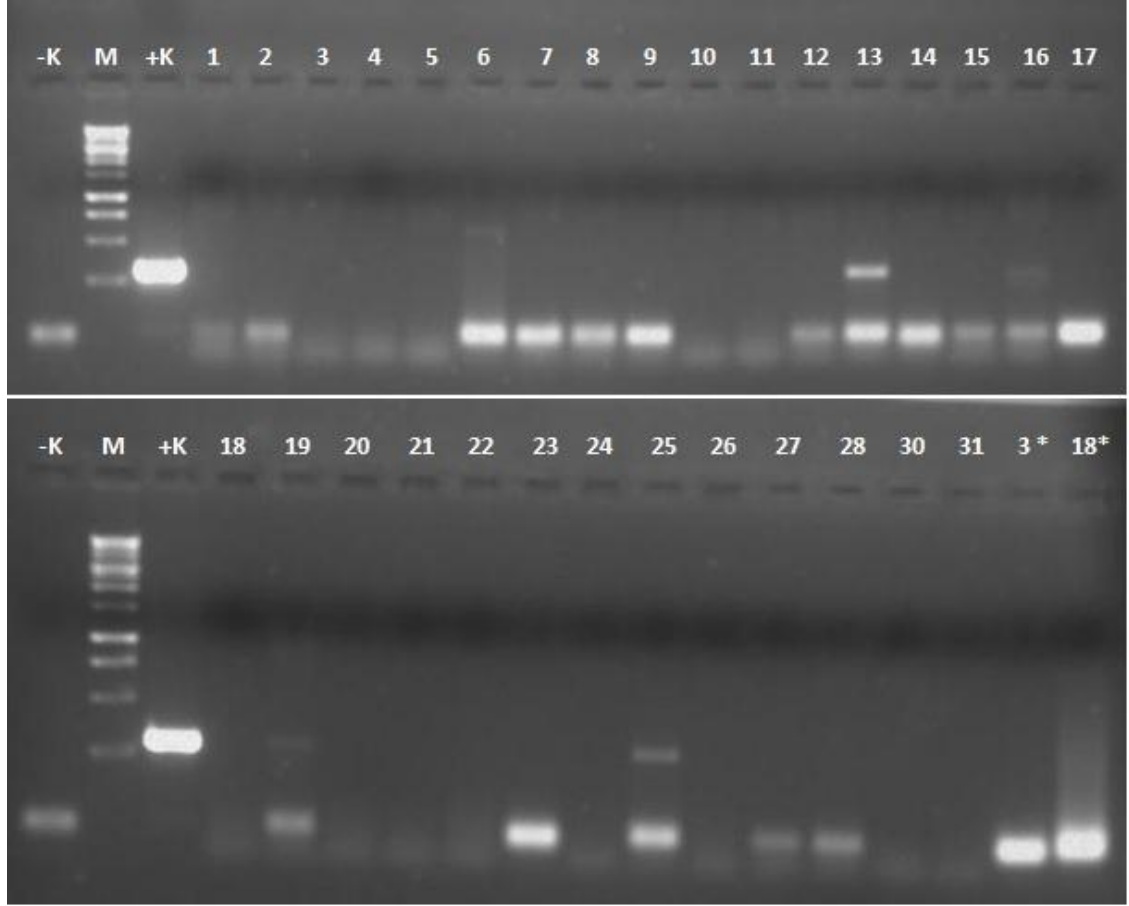
Şekil 4.49 AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidini içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ve 35S promoter ve *CryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidini içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (1 kb bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,

1-28 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 29 ve 29*nolu kulvar: Özbek 100,

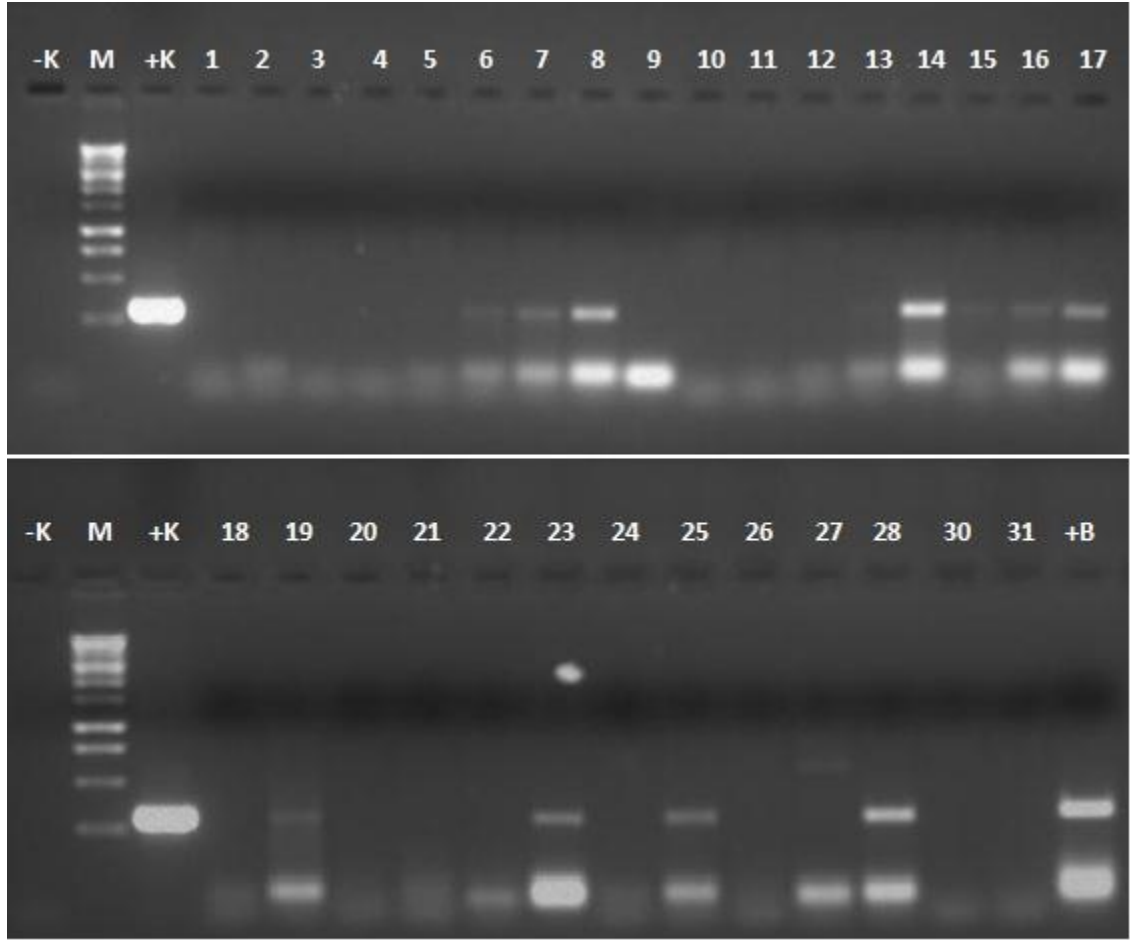
PTF101.1 35S *CryIAc* 9 nolu kulvar: GSN 12 çeşidi,

PTF101.1 AoPR1 *CryIAc* 11,12,14,15,19,23 nolu kulvarlar ve PTF101.1 35S *CryIAc* 9 nolu kulvar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitkiler



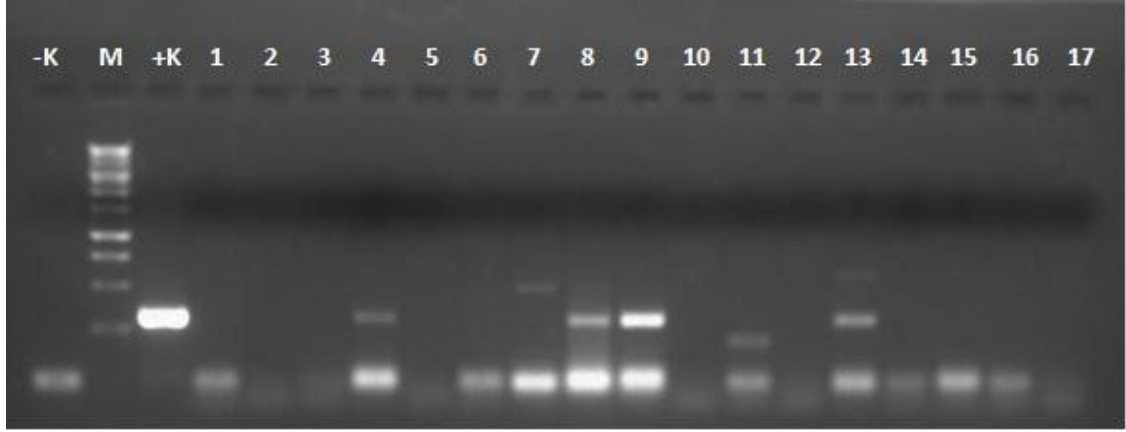
Şekil 4.50 35S promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ve AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (1 kb bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
 1-10 ve 12-15 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 11. kulvar, 16-24 kulvarlar ve 31. kulvar: STN 468 çeşidi,
 25-30 kulvarlar: Özbek 100 çeşidi, PTF101.1 AoPR1 Cry1Ac 3* ve 18* nolu kulvarlar: GSN 12 çeşidi
 PTF101.1 35S Cry1Ac 13,16,19, 25 nolu kulvarlar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitkiler



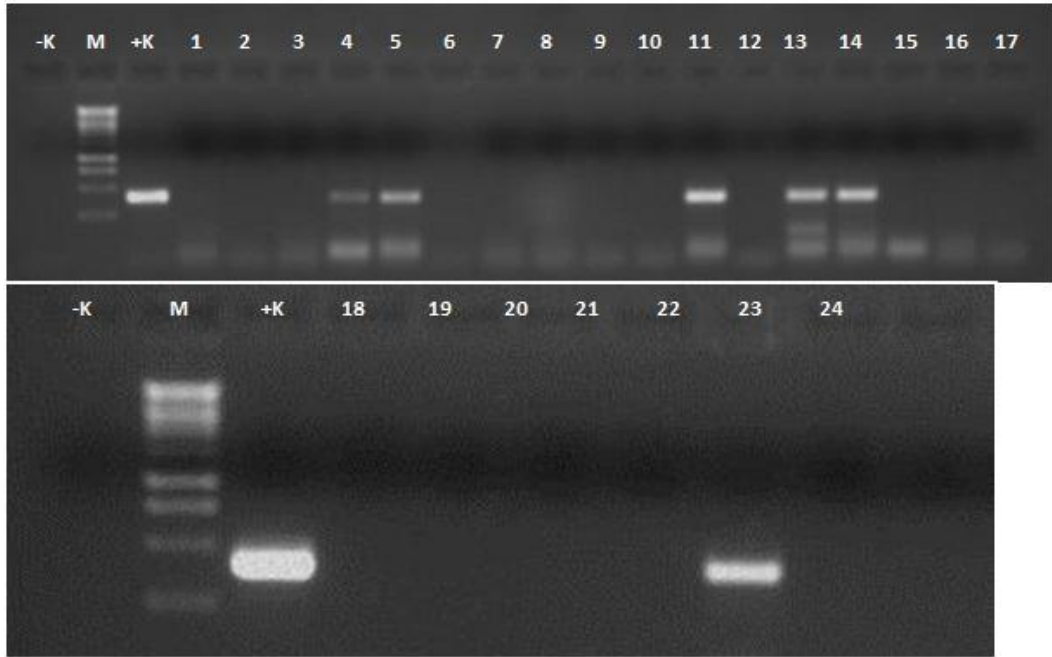
Şekil 4.51 35S promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidi içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (1 kb bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, B: Pozitif bitki,
 1-10 ve 12-15 kulvarlar: GSN 12 çeşidi; 11., 16-24, 31. kulvarlar: STN 468 çeşidi;
 25-30 kulvarlar: Özbek 100 çeşidi
 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 23, 25, 28 nolu kulvarlar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitkiler



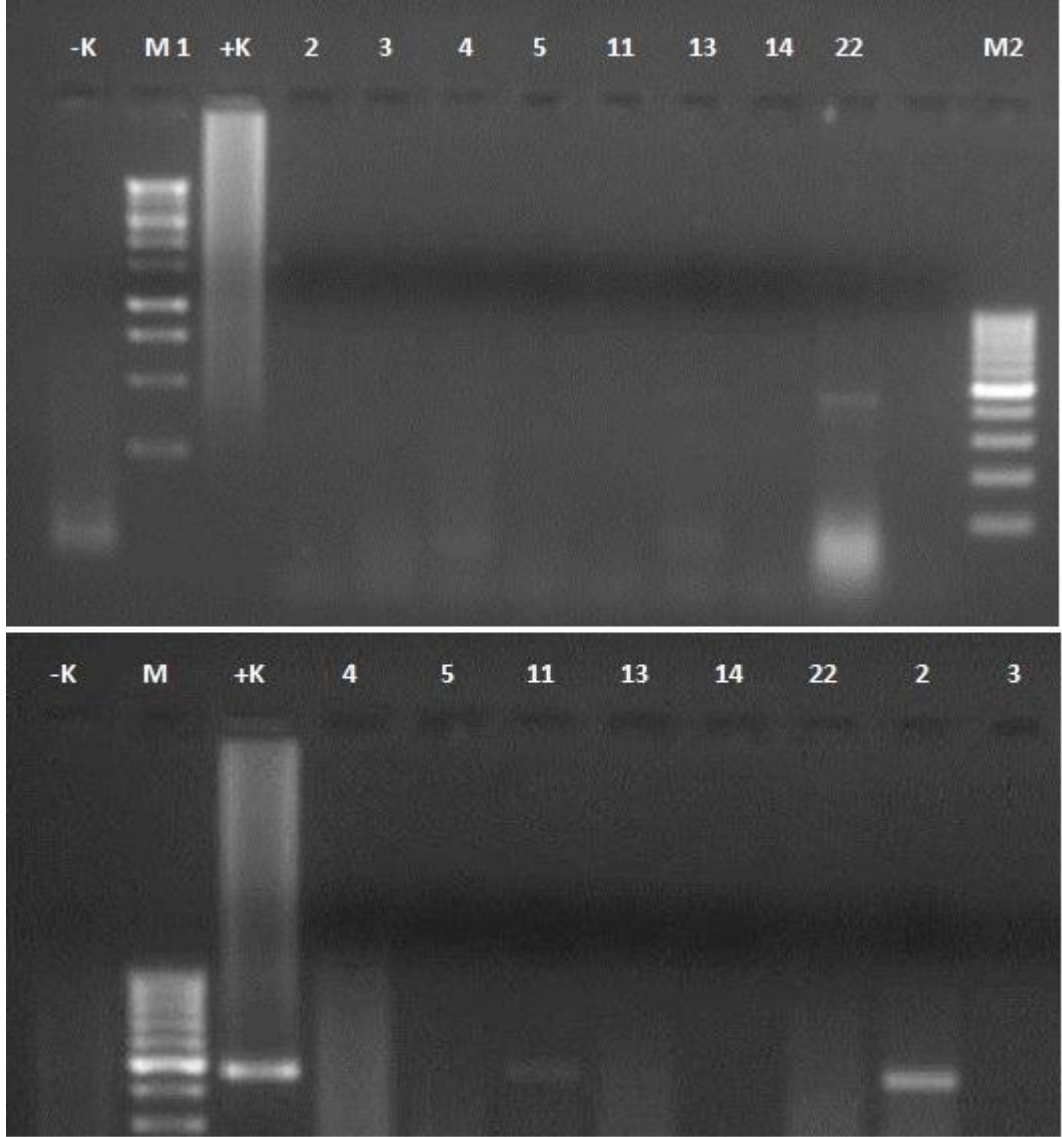
Şekil 4.52 35S promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, PTF101.1 plazmidini içeren *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *bar* geni içeren herbisite dayanıklı pamuk bitkilerinde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (1 kb bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
1-10 ve 12-15 kulvarlar: GSN 12 çeşidi; 11.,16-17 kulvarlar: STN 468 çeşidi
4, 8, 9, 13 nolu kulvarlar: *Bar* genini taşıyan transgenik bitkiler



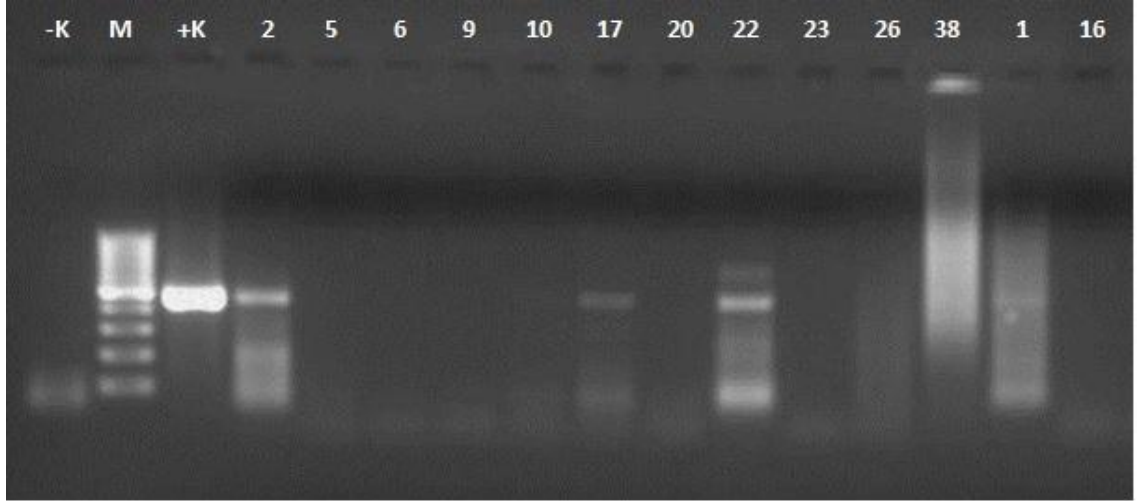
Şekil 4.53 AoPR1 promoter ve *cryIAc* geni taşıyan, pRD400 plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen *cryIAc* geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde *cryIAc* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: Markör (1 kb bp), +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol,
1-20 ve 22-24 kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 21 nolu kulvar: STN 468 çeşidi
pRD400 AoPR1 CryIAc 4, 5, 11, 13, 14, 22 nolu kulvarlar: *CryIAc* genini taşıyan transgenik bitkiler



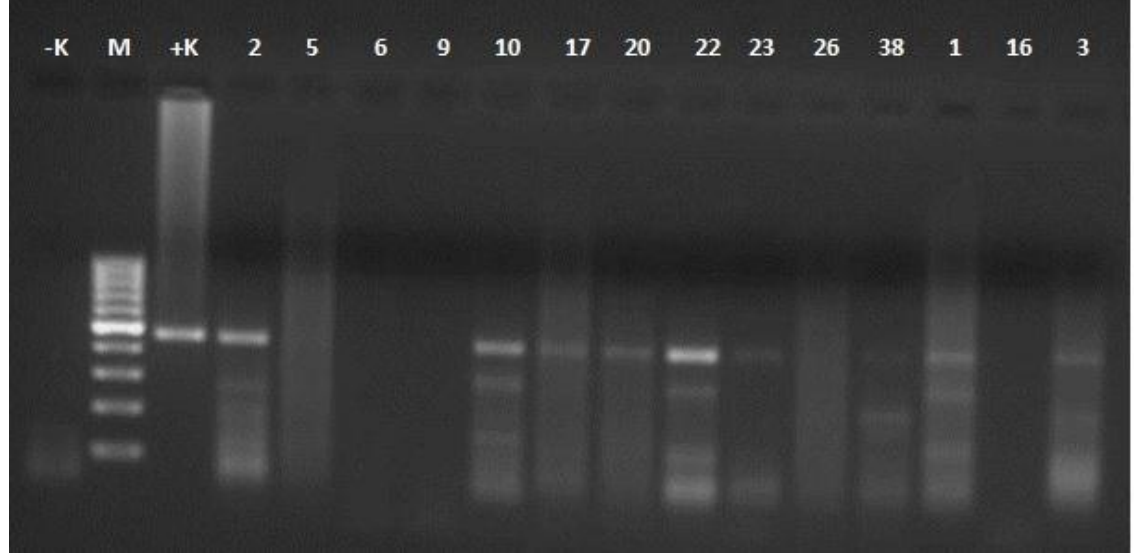
Şekil 4.54 AoPR1 promoter ve *cryIAC* geni taşıyan, pRD400 plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen *nptII* geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M1: 1 kb Markör, M2: 100 bp Markör, +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol;
2, 3, 4, 5, 11, 13, 14, 22 nolu kulvarlar: GSN 12 çeşidi
2, 11, 13, 22 nolu kulvarlar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitkiler



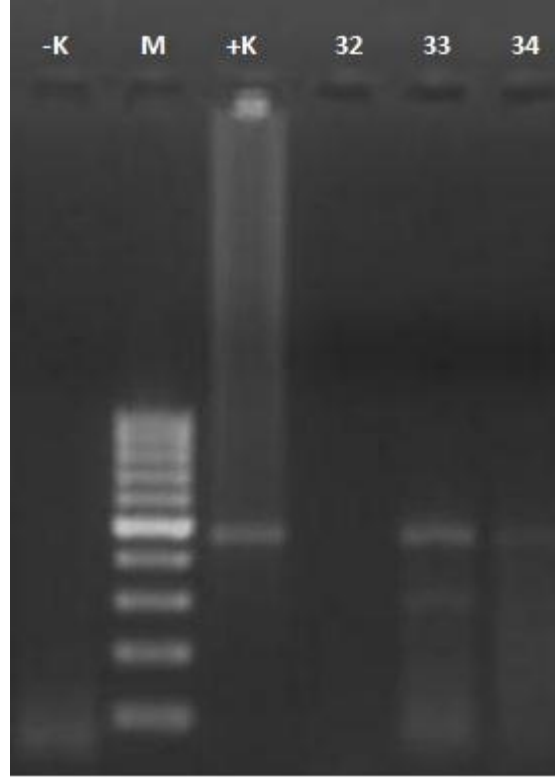
Şekil 4.55 35S promoter ve Cry1Ac/Cry2Ac geni taşıyan, pk2Ac plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen *nptII* geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: 100 bp Markör, +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, 1,2,5,6,9,10,17,20 nolu kulvarlar: STN 468 çeşidi, 22,23,26 nolu kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 38 nolu kulvar: Ayhan 107 çeşidi
1, 2, 10, 17, 22 nolu kulvarlar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitkiler



Şekil 4.56 35S promoter ve Cry1Ac/Cry2Ac geni taşıyan, pk2Ac plazmidini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı ile gen aktarımından elde edilen *nptII* geni içeren böceklere dayanıklı pamuk bitkilerinde *nptII* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: 100 bp Markör, +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, 1,2,5,6,9,10,17,20 nolu kulvarlar: STN 468 çeşidi, 22,23,26 nolu kulvarlar: GSN 12 çeşidi, 38 nolu kulvar: Ayhan 107 çeşidi
1, 2, 3, 10, 17, 20, 22, 23, 38 nolu kulvarlar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitkiler



Şekil 4.57 35S promoter ve GUS geni taşıyan *A. tumefaciens* GV2260 hattı ve AoPR1 promoter ve GUS geni taşıyan *A. tumefaciens* GV2260 hattı ile gen aktarımından elde edilen *nptII* geni içeren pamuk bitkilerinde *nptII* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi

M: 100 bp Markör, +K: Pozitif kontrol (Bakteri plazmid DNA), -K: Negatif kontrol, 32 nolu kulvar: GV2260 35S GUS INT, STN 468 çeşidi, 33 nolu kulvar: GV2260 AoPR1 GUS INT, Coker 312 çeşidi, 34 nolu kulvar: GV2260 35S GUS INT STN 468 çeşidi
33 ve 34 nolu kulvarlar: *nptII* genini taşıyan transgenik bitkiler

4.6 Transgenik Bitkilerde Böcek Biyotest Analizleri

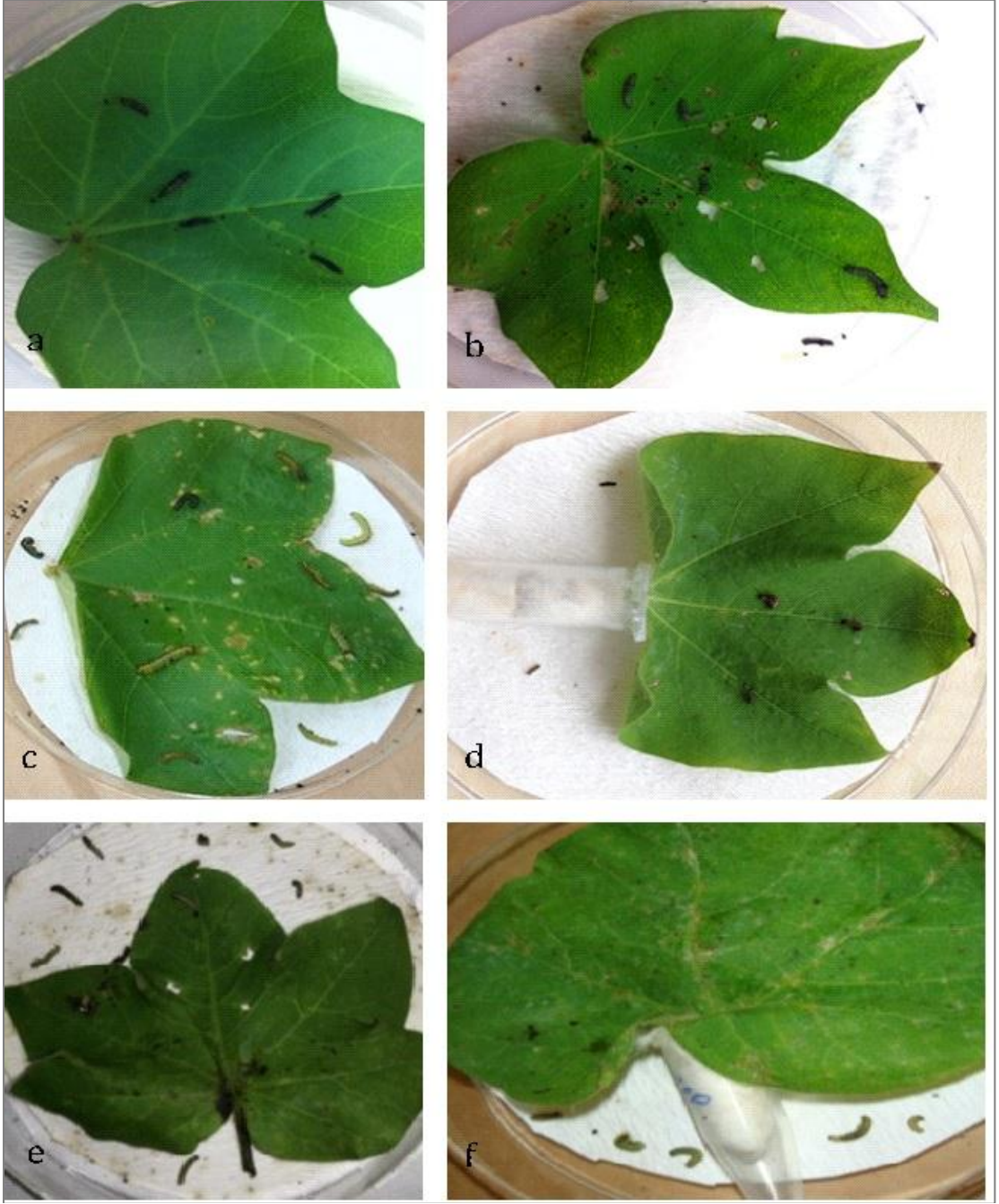
4.6.1 T₀ bitkilerinde *Spodoptera exigua* ile yapılan biyotest çalışmaları

Laboratuvar şartlarında çoğaltılan *Spodoptera exigua* larvaları transgenik oldukları teyit edilen ve sera şartlarında yetiştirilen T₀ pamuk bitkilerinden kopartılan taze yapraklar üzerine yerleştirilerek beslenmeleri sağlanmıştır. Transgenik olmayan kontrol bitkiler ile farklı plazmid konstraktları ve çeşitlerle yapılan böcek biyotest çalışmalardan elde edilen sonuçlara ait görseller şekil 4.58-4.59'da verilmiştir. Şekiller incelendiğinde transgenik olmayan kontrol bitki yapraklarıyla beslenen *S. exigua* böcek larvalarının ölmediği ve devamlı olarak beslenmeye devam ettikleri gözlenmiştir (Şekil 4.58). Öte

yandan, transgenik bitkilerin bazılarının yapraklarıyla beslenen larvaların bir hafta içerisinde öldüğü gözlenmiştir (Şekil 4.59).



Şekil 4.58 Transgenik olmayan kontrol bitkilerinin yaprakları ile yapılan biyotest denemelerinde *Spodoptera exiqua* larvalarının gelişme durumları ve zararı derecesi



Şekil 4.59 AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac genlerinin aktarıldığı farklı transgenik T₀ pamuk bitkilerine ait yapraklarda biyotest çalışmaları sonucunda zehirlenerek ölmüş olan *Spodoptera exiqua* larvaları

AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac genlerini taşıyan farklı plazmidler kullanılarak elde edilen değişik pamuk çeşitlerine ait 46 adet bireysel transgenik T₀ bitkilerin yapraklarıyla beslenen 3. dönem *S. exigua* larvalarının farklı zaman aralıklarında ölüm oranları Çizelge 4.13’da verilmiştir. Çizelge 4.13 incelendiğinde aktarılan gen ve çeşide göre değişmekle birlikte *Spodoptera exigua* larva ölümleri ilk 12 saatte başlamış ve 7 gün sonunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Birçok bitkide bu oran %90’ın üzerine çıkarak önemli bir başarı elde edilmiştir. Transgenik olmayan kontrol bitkide ise 7. günün sonunda larvaların tamamı canlı kalmıştır. Bu sonuçlar gerek AoPR1-cry1Ac ve gerekse 35S-cry1Ac genlerinin transgenik pamuk bitkilerinde yüksek oranlarda aktivite gösterdiklerini ve beslenen larvaların büyük oranda ölümlerini neden olduğunu göstermiştir. Birçok bitkide larva ölümlerinin düşük düzeyde kalmasının en önemli nedeni ise aktarılan genin kopya sayısı ve pozisyon etkisiyle açıklanmaktadır. Ayrıca, 7. günün sonunda transgenik bitkilerin önemli bir kısmındaki larva ölümlerinin %90’ın üzerine çıkmasının en önemli nedeninin ise *cry1Ac* proteininin toksik etkisinin *Spodoptera exigua* larvaları üzerine uzun zaman almasıdır.

Çizelge 4.13 AoPR1-cryIAc ve 35S-cryIAc genlerini taşıyan farklı plazmidler kullanılarak elde edilen değişik pamuk çeşitlerine ait bireysel T₀ transgenik bitkilerinin yapraklarıyla beslenen *S. exigua* larvalarının 168 saate kadar farklı zaman aralıklarında ölüm oranları

		% Ölüm ± Standart Hata									
Bakteri hattı	Plazmid	Çeşit	Bitki No	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat	144 saat	168 saat	
GV2260	pTF 101.1 35S-CryIAc	Kontrol	Kontrol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
		GSN-12	4	22.15±1.91	29.66±0.70	35.97±2.70	53.35±2.60	70.34±0.70	70.33±0.70	73.80±0.93	
		GSN-12	5	20.00±0.00	29.66±0.70	46.65±0.19	56.70±0.19	60.00±0.00	70.33±0.70	76.82±0.26	
		GSN-12	6	4.53±1.97	11.62±5.26	19.31±0.96	36.10±1.55	39.37±1.97	39.36±1.97	43.16±0.81	
		GSN-12	7	0.00±0.00	8.47±13.84	15.35±10.86	27.96±4.83	38.16±6.24	42.80±3.96	42.80±3.96	
		GSN-12	8	1.15±1.97	6.70±3.20	11.62±5.26	29.66±0.70	36.45±0.81	39.86±0.61	39.86±0.61	
		GSN-12	9	0.00±0.00	0.00±0.00	8.76±4.73	8.76±4.73	11.62±5.26	28.55±2.50	34.80±4.04	
		GSN-12	13	4.53±1.97	6.70±3.20	6.70±3.20	6.70±3.20	25.00±3.20	29.20±1.97	36.10±1.55	
		GSN-12	14	32.30±3.37	39.37±2.54	50.00±0.58	53.35±0.78	60.00±0.00	80.00±0.00	90.75±4.04	
		GSN-12	15	0.00±0.00	13.95±6.77	27.96±12.56	53.35±2.60	56.84±3.20	60.64±4.32	67.71±3.36	
		STN-468	16	13.95±6.77	35.97±2.70	46.65±0.78	60.65±2.54	67.22±1.52	75.00±3.20	78.98±4.04	
		STN-468	19	13.01±0.39	26.20±0.93	22.16±1.91	32.78±1.52	36.10±1.55	43.16±1.39	50.00±2.41	
		STN-468	23	23.18±0.26	23.18±0.26	26.20±0.93	43.30±0.19	60.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	
		STN 468	24	1.15±1.97	1.15±1.97	3.69±6.23	11.62±5.26	22.46±1.27	22.46±1.27	25.44±1.99	
		Özbek-100	25	0.00±0.00	0.00±0.00	6.70±3.20	13.02±0.39	16.36±0.39	20.00±0.00	26.20±0.93	
	Özbek-100	27	26.52±0.26	40.00±0.00	46.65±0.78	50.00±0.58	53.35±0.19	53.35±0.19	60.14±0.61		
	Özbek-100	28	1.15±1.97	2.37±4.04	3.69±6.23	19.42±8.56	19.42±8.56	39.36±1.97	39.37±1.97		
	pTF 101.1 AoPR1-CryIAc	GSN-12	3	4.53±1.97	22.16±1.91	40.00±0.00	43.30±0.19	70.34±0.70	70.34±0.70	97.63±4.04	
		GSN-12	11	18.92±10.61	18.92±10.61	53.35±0.78	53.35±0.78	67.08±0.93	67.08±0.93	73.80±0.93	
		GSN-12	12	26.20±0.93	26.20±0.93	26.20±0.93	75.00±11.58	77.84±9.92	77.84±9.92	86.05±6.77	
		GSN-12	14	5.12±8.56	22.16±1.91	27.96±4.83	60.00±0.00	60.00±0.00	86.05±6.77	97.63±4.04	
		GSN-12	15	39.37±2.54	53.35±0.78	86.05±6.77	86.05±6.77	94.88±8.56	94.88±8.56	94.88±8.56	
		GSN-12	18	27.96±4.83	53.35±0.78	67.08±0.93	86.05±6.77	90.75±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04	
		GSN-12	19	16.36±0.39	39.37±2.54	54.01±3.36	75.00±11.58	80.58±8.56	86.05±6.77	90.75±4.04	
		GSN-12	20	36.59±0.21	46.65±0.78	46.65±0.78	60.65±2.54	60.65±2.54	91.53±13.84	93.30±11.08	
		GSN-12	23	16.36±0.39	26.20±0.93	26.20±0.93	53.35±0.78	53.35±0.78	80.01±0.00	80.01±0.00	
	LBA4404	pk2Ac 35S-CryIAc	STN 468	1	46.65±0.78	73.80±0.93	73.80±0.94	73.80±0.94	80.01±0.00	80.01±0.00	90.75±4.04
			STN 468	2	29.67±0.70	29.66±0.70	50.00±0.58	60.00±0.00	60.00±0.00	83.26±7.50	83.26±7.50
STN 468			3	2.37±4.04	13.95±6.77	22.15±1.91	28.42±3.06	32.78±1.52	35.97±2.70	39.37±2.54	
STN 468			5	26.20±0.94	53.35±5.95	72.04±4.83	75.00±3.20	80.69±0.96	80.69±0.96	91.24±4.73	
STN 468			6	22.15±1.91	26.20±0.93	53.35±0.78	56.84±1.39	71.45±2.50	74.56±1.99	74.56±1.99	
STN 468			9	13.01±0.39	43.30±0.19	43.31±0.19	73.80±0.94	77.84±1.91	77.84±1.91	77.84±1.91	
STN 468			10	53.35±5.95	86.05±6.77	86.05±6.77	88.39±5.26	90.75±4.04	90.75±4.04	93.30±3.20	
STN 468			12	50.00±0.58	50.00±0.58	70.33±0.70	70.33±0.70	80.69±0.96	93.30±3.20	98.86±1.97	
STN 468			17	36.10±1.55	46.49±1.40	60.14±0.61	66.74±0.21	80.01±0.00	83.65±0.39	83.65±0.39	
STN 468			20	26.20±0.94	39.37±2.54	60.64±2.54	63.90±1.55	83.65±8.54	90.75±4.04	90.75±4.04	
GSN 12		22	36.45±0.81	60.65±2.54	70.33±0.70	77.85±1.91	88.38±5.26	88.38±5.26	88.38±5.26		
GSN 12		23	32.91±0.94	60.00±0.00	70.33±0.70	76.82±0.26	76.82±0.26	88.38±5.26	90.75±4.04		
GSN 12		26	29.67±0.70	50.00±0.00	60.14±0.61	80.69±0.96	98.86±1.97	98.86±1.97	98.86±1.97		
Ayhan 107		38	29.67±0.70	43.16±1.39	53.35±0.78	67.09±0.94	89.16±6.52	97.63±4.04	97.63±4.04		
pRD400 AoPR1-CryIAc	GSN-12	2	22.16±1.91	31.50±4.49	42.66±2.76	60.64±2.54	67.08±0.93	73.80±0.93	76.82±0.26		
	GSN-12	3	9.25±4.04	20.01±0.00	26.20±0.93	32.91±0.94	43.30±0.19	60.14±0.61	60.14±0.61		
	GSN-12	4	2.37±4.04	9.25±4.04	26.20±0.93	36.60±0.21	53.35±0.78	60.65±2.54	60.65±2.54		
	GSN-12	5	13.02±0.39	23.18±0.26	29.66±0.70	43.31±0.19	46.65±0.78	54.01±3.36	54.01±3.36		
	GSN-12	11	13.95±6.77	42.80±3.96	42.80±3.96	50.15±1.79	88.38±5.26	88.38±5.26	90.75±4.04		
	GSN-12	13	32.92±0.93	46.65±5.95	53.35±5.95	57.20±3.96	63.90±1.55	73.80±0.93	90.75±4.04		
	GSN-12	14	32.29±3.36	50.51±4.49	60.65±2.54	63.90±1.55	93.30±11.08	94.88±8.56	97.63±4.04		

4.6.2 T₁ bitkilerinde *Spodoptera littoralis* ile yapılan biyotest çalışmaları

Transgenik oldukları teyit edilen T₀ bitkilerinden alınan tohumlar ayrı ayrı 5 mg/L PPT ve 100 mg/L kanamisin içeren besin ortamlarında çimlendirildikten sonra, çimlenenler saksılara aktararak büyütme kabinlerinde dış şartlara alıştırılmıştır (Şekil 4.60). Daha sonra laboratuvar şartlarında çoğaltılan *Spodoptera littoralis* larvaları T₁ pamuk bitkilerinden kopartılan taze yapraklar üzerine yerleştirilerek beslenmeleri sağlanmıştır. Transgenik olmayan kontrol bitki ile AoPR1-Cry1Ac genini içeren bitkiyle yapılan böcek biyotest çalışmalardan elde edilen sonuçlara ait görseller Şekil 4.60'da verilmiştir. Şekil incelendiğinde transgenik olmayan kontrol bitki yapraklarıyla beslenen *S. littoralis* böcek larvalarının ölmediği ve devamlı olarak beslenmeye devam ettikleri gözlenmiştir. Öte yandan, transgenik bitkinin yapraklarıyla beslenen larvaların bir hafta içerisinde öldüğü belirlenmiştir (Şekil 4.60).

AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac genlerini taşıyan farklı plazmidler kullanılarak elde edilen değişik pamuk çeşitlerine ait 35 adet bireysel transgenik T₁ bitkilerin yapraklarıyla beslenen *S. littoralis* larvalarının farklı zaman aralıklarında ölüm oranları Çizelge 4.14'de verilmiştir. Çizelge 4.14 incelendiğinde aktarılan gen ve çeşide göre değişmekle birlikte *S. littoralis* larva ölümleri ilk 12 saatte başlamış ve 7 gün sonunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bitkilerin önemli bir kısmında ölüm oranı %90'ın üzerine çıkarak büyük bir başarı elde edilmiştir. Transgenik olmayan kontrol bitkide ise 7. günün sonunda larvaların tamamı canlı kalmıştır. Bu sonuçlar gerek AoPR1-Cry1Ac ve gerekse 35S-Cry1Ac genlerinin transgenik pamuk bitkilerinde yüksek oranlarda aktivite gösterdiklerini ve beslenen larvaların büyük oranda ölümlerini neden olduğunu göstermiştir. Özellikle AoPR1-Cry1Ac içeren bitkiler daha fazla larva ölümüne neden olmuştur. T₀ bitkileriyle karşılaştırıldığında T₁ bitkilerinin böcek larvalarına karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.60 a. T_0 bitkilerinden elde edilen tohumların PPT içeren besin ortamında çimlendirilmesi, b. dış şartlara alıştırılması, c. kontrol, d. Transgenik bitkilerde *S. littoralis* larvaları ile yapılan biyotest sonuçları

Çizelge 4.14 AoPR1-cry1Ac ve 35S-cry1Ac genlerini taşıyan farklı plazmidler kullanılarak elde edilen değişik pamuk çeşitlerine ait bireysel T₁ transgenik bitkilerinin yapraklarıyla beslenen *S. littoralis* larvalarının 168 saate kadar farklı zaman aralıklarında ölüm oranları

% Ölüm ± Standart hata										
Plazmid	Promotör	Çeşit	Bitki no	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat	144 saat	168 saat
pk2AC	35S-Cry1Ac	kontrol	kontrol	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
		STN-468	1	68.37±16.22	75.00±16.09	81.08±10.61	81.08±10.61	81.08±10.61	81.08±10.61	90.75±4.04
		STN-468	2	46.65±5.95	46.65±5.95	68.37±16.22	81.08±10.61	94.88±8.56	97.63±4.04	97.63±4.04
		STN-468	5	67.71±3.36	91.53±13.84	91.53±13.84	94.88±8.56	97.63±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04
		STN-468	10	80.58±8.56	80.58±8.56	86.05±6.77	90.75±4.04	97.63±4.04	100.00±0.00	100.00±0.00
		STN-468	17	26.20±0.93	26.20±0.93	26.20±0.93	39.37±2.54	46.65±0.78	53.35±0.78	80.01±0.00
		STN-468	20	46.65±28.99	53.35±28.99	53.35±28.99	53.35±28.99	80.58±8.56	80.58±8.56	80.58±8.56
		GSN-12	22	68.97±13.84	80.58±8.56	86.05±6.77	86.05±6.77	90.75±4.04	90.75±4.04	90.75±4.04
		GSN-12	23	68.37±16.22	68.37±16.22	86.99±20.54	86.99±20.54	86.99±20.54	86.99±20.54	100.00±0.00
		Ayhan 107	38	86.05±6.77	86.05±6.77	86.05±6.77	86.05±6.77	86.05±6.77	86.05±6.77	86.05±6.77
pRD400	AoPR1-Cry1Ac	GSN--12	3A	67.08±0.93	73.80±0.93	86.05±6.77	94.88±8.56	94.88±8.56	97.63±4.04	97.63±4.04
		GSN--12	3B	90.75±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04
		GSN--12	11A	68.97±13.84	75.00±11.58	75.00±11.58	75.00±11.58	75.00±11.58	86.05±6.77	86.05±6.77
		GSN--12	11 B	67.71±3.36	67.71±3.36	73.80±0.93	73.80±0.93	73.80±0.93	80.01±0.00	90.75±4.04
		GSN--12	11 C	54.72±20.54	61.98±17.65	68.97±13.84	75.00±11.58	97.63±4.04	97.63±4.04	100.00±0.00
		GSN--12	13 A	18.92±10.61	61.98±17.65	61.98±17.65	68.37±16.22	75.00±16.09	75.00±16.09	90.75±4.04
		GSN--12	13 B	26.20±0.93	46.65±5.95	53.35±5.95	53.35±5.95	86.05±6.77	97.63±4.04	100.00±0.00
		GSN--12	13 C	46.65±5.95	68.37±16.22	75.00±16.09	81.08±10.61	94.88±8.56	94.88±8.56	100.00±0.00
		GSN--12	13 D	54.72±20.54	61.98±17.65	61.98±17.65	61.98±17.65	91.53±13.84	94.88±8.56	94.88±8.56
		GSN--12	14 A	97.63±4.04	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
GSN--12	14 B	97.63±4.04	97.63±4.04	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00		
pTF 101.1	35S-Cry1Ac	GSN-12	14A	67.08±0.93	86.05±6.77	86.05±6.77	94.88±8.56	97.63±4.04	97.63±4.04	97.63±4.04
		STN-468	16	13.95±6.77	13.95±6.77	13.95±6.77	46.65±0.78	46.65±0.78	46.65±0.78	60.65±2.54
		Özbek100	27A	18.92±10.61	32.29±3.36	39.37±2.54	54.01±3.36	54.01±3.36	54.01±3.36	60.65±2.54
		Özbek100	27B	53.35±28.99	86.99±20.54	94.88±8.56	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
	AoPR1-Cry1Ac	Özbek100	27C	26.20±0.93	45.99±3.36	60.65±2.54	67.08±0.93	80.01±0.00	80.01±0.00	80.01±0.00
		GSN-12	15A	13.95±6.77	13.95±6.77	26.20±0.93	26.20±0.93	90.75±4.04	100.00±0.00	100.00±0.00
		GSN-12	15B	39.37±30.12	46.65±28.99	46.65±28.99	46.65±28.99	46.65±28.99	53.35±28.99	100.00±0.00
		GSN-12	15C	26.20±0.93	32.29±3.36	32.29±3.36	39.37±2.54	39.37±2.54	46.65±0.78	81.08±10.61
		GSN-12	18A	25.00±16.09	46.65±28.99	68.97±13.84	75.00±11.58	75.00±11.58	75.00±11.58	86.05±6.77
		GSN-12	18B	20.01±0.00	26.20±0.93	40.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00	60.00±0.00
		GSN-12	18C	5.12±8.56	32.29±3.36	32.29±3.36	80.58±8.56	94.88±8.56	94.88±8.56	100.00±0.00
		GSN-12	18D	39.37±7.61	68.97±13.84	80.58±8.56	80.58±8.56	80.58±8.56	80.58±8.56	80.58±8.56
		GSN-12	19A	5.12±8.56	46.65±28.99	46.65±28.99	46.65±28.99	68.97±13.84	68.97±13.84	68.97±13.84
		GSN-12	19B	39.37±2.54	39.37±2.54	68.37±16.22	75.00±11.58	80.58±8.56	86.05±6.77	100.00±0.00
GSN-12	19C	68.37±16.22	75.00±11.58	75.00±11.58	80.58±8.56	80.58±8.56	86.05±6.77	100.00±0.00		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Böceklere dayanıklı GD pamuk çeşitleri ABD, Hindistan, Çin ve Pakistan başta olmak üzere çok sayıda ülkede 23.8 milyon hektarlık büyük bir alanda üretilmektedir. Üretildiği bu ülkelerde de insektisit kullanımında azalmalar yaşanırken, önemli oranda verim ve karlılık artışları da yaşanmaktadır. Bundan dolayı GD pamuk üretiminde çok önemli artışlar yaşanarak, dünyada üretilen pamuk çeşitlerinin %70'i transgenik çeşitlerden oluşmaktadır. Ticari olarak üretilen bu GD pamuk çeşitlerinde böceklere dayanıklılık ise tamamen *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bakterisine ait *cry* genleri tarafından sağlanmakta ve bitkilere aktarılan bu *cry* genlerinin tamamı da yine kuvvetli ve konstütitif promotörler tarafından kontrol edilmektedir. Bundan dolayı zehirli *cry* proteinleri bitkinin tüm organlarında ve daima yüksek oranlarda üretilmektedir. Bu çalışmada yaralanmayla aktif olan AoPR1 promotörü tarafından kontrol edilen *cry* genlerinin ülkemizde yaygın olarak üretilen pamuk çeşitlerine aktarılması ve bu sayede toksik *cry* proteinlerinin sadece böceklerin ısırdığı noktalarda yüksek oranda üretilmesi hedeflenmiştir. Bundan dolayı bu çalışmada ilk olarak olarak AoPR1 promotörünün *cry1Ac* genini önüne klonlanarak binari transformasyon vektörlerine ve daha sonra da *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılması gerçekleştirilmiştir. Öte yandan, pamuk bitkisine gen aktarımını sınırlandıran en önemli faktörler ise *in vitro* rejenerasyon ve gen aktarım oranının son derece düşük olmasıdır (Wu ve She 1990, Gupta 1997, Benerjee 2002, Mushke vd. 2012). Bundan dolayı bu tez çalışmasında öncelikle üzerinde çalışılan çeşitlerde gen aktarımına uygun *in vitro* sürgün rejenerasyonu da optimize edilmiştir.

5.1 AoPR1-Cry1Ac Gen Kasetlerinin Oluşturulması ve *A. tumefaciens*'e Aktarılması

Doğru ve işlevsel gen kasetlerinin oluşturulması çalışmanın en önemli kısmını teşkil etmektedir. Bu aşamada yapılan hatalar önemli zaman kayıplarına neden olmaktadır. AoPR1 promotörünün *cry1Ac* genini önüne klonlanması için büyük oranda klonlama kitleri ve rutin klonlama teknikleri kullanılmıştır. Aynı şekilde kontrol için de CaMV 35S-Cry1Ac kaseti elde edilmiştir. Öncelikle AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac

ekspresyon kasetleri iki farklı klonlama adımıyla pJIT61 klonlama plazmidinde oluşturulmuştur. Bu ekspresyon kasetlerinde gen ifadesi ise CaMV 35S terminatör dizileriyle sonlandırılmıştır. Oluşturulan bu ekspresyon kasetleri restriksiyon enzimleriyle kesilerek jelden izole edildikten sonra *bar* genini de taşıyan pTF101.1 vektörünün T-DNA bölgesine yerleştirilmiştir. Klonlanan pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac ve pTF101.1 35S-Cry1Ac vektörleri daha sonra elektroporasyonla *A. tumefaciens* LBA 4404 ve GV2260 bakteri hatlarına aktararak PCR ile teyit edilmiş ve gen aktarım çalışmalarında kullanılmıştır.

5.2 Pamukta Gen Aktarımına Uygun Sürgün Rejenerasyonunun Optimizasyonu

Pamuk *in vitro* kültüründe genel olarak *in vitro* çimlenen tohumdan gelişen fidelerden elde edilen kotiledon boğum, sürgün ucu, hipokotil ve yaprak gibi eksplantlar kullanılmaktadır. Pamuk tohumlarının *in vitro* çimlendirmeye almadan önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması gerekmektedir. Yüzey sterilizasyonunda dokuya en az zarar veren ve bulaşıklığı engelleyen en düşük sterilant dozunun kullanılması son derece önemli olmaktadır. Yapılan çalışmada *in vitro* tohum sterilizasyonu için 6 farklı yöntem denenmiştir. Denenen bu yöntemler içerisinde %20 hidrojen peroksit ve Tween 20 içeren solüsyonda çimlenme oranının en yüksek olduğu ve bulaşıklığın da çok düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir. Bundan dolayı yapılan tüm *in vitro* çalışmalarda bu yöntem kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımını sınırlandıran en önemli etmenin düşük *in vitro* sürgün rejenerasyonu olduğu belirtilmiştir. Özellikle yaprak ve hipokotil gibi eksplantlar kullanarak kallus yoluyla sürgün elde etmenin son derece sınırlı olduğu ve uzun zaman aldığı çok sayıda araştırmacı tarafından teyit edilmiştir. Bundan dolayı pamuk çeşitlerine gen aktarımında yaygın olarak kotiledon boğum ve sürgün ucu gibi eksplantlar kullanılmaktadır. Aynı şekilde çeşitler arasında da çok önemli farklılıklar gözlenmekte olup, Coker en yüksek *in vitro* rejenerasyon kabiliyetine sahip olan çeşit olarak bilinmektedir. Pamukta hipokotil, yaprak ve kotiledon gibi farklı eksplantlar, değişik büyüme düzenleyicileri ve kültür şartları denenerek somatik

embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır (Price ve Smith 1979, Finer ve Smith 1984, Firoozabady vd. 1987, Kumria vd. 2003, Sun vd. 2006, Khan vd. 2006, Ahmed vd. 2014). Bu çalışmalarda rejenerasyon oranı düşük kalırken, rejenerasyon süresi de uzun olmuştur. Somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu yanısıra, *in vitro* gelişen fidelerden izole edilen kotiledon boğum, tepe ve yan meristem eksplantları da organogenesis yoluyla sürgün rejenerasyonu için farklı büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınmış ve daha yüksek sürgün rejenerasyon oranları elde edilmiştir (Agrawal vd. 1997, Hemphill vd. 1998, Hazra vd. 2000, Özyigit 2009, Ahmed vd. 2014). Bu çalışmalar sonucunda pamuk gibi “recalcitrant” (rejenerasyonu çok zor olan) bitkilerde uzun kültür süresinde oluşan etilen gazının sürgün oluşumunu olumsuz etkilediği ve en uygun büyüme düzenleyicilerin ise BAP ve TDZ gibi sitokininler olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada çok sayıda denenen büyüme düzenleyici kombinasyonunda en yüksek sürgün rejenerasyonu BAP içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Çeşitler arasında önemli farklılıklar kaydedilirken, en yüksek rejenerasyon oranı Coker ve GSN-12 çeşitlerinin sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 2 mg/L IBA içeren ortamda köklendirilerek, toprak içeren saksılara aktarıldıktan sonra %100 oranında dış şartlara adapte edilmiştir. Gen aktarım çalışmalarında da ağırlıklı olarak sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantları kullanılmıştır.

5.3 pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac ve pTF101.1 35S-Cry1Ac Vektörlerini Taşıyan *A. tumefaciens* Hatlarıyla Farklı Pamuk Çeşitlerine Gen Aktarımı

Farklı pamuk çeşitlerine pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac ve pTF101.1 35S-Cry1Ac vektörlerini taşıyan *A. tumefaciens* hatlarıyla gen aktarımına geçmeden önce kullanılan pamuk çeşitlerine gen aktarımının optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon için de, T-DNA bölgesinde GUS ve seçici markör olarak kullanılan *nptII* geni taşıyan GV2260 35S GUS INT bakteri hattı kullanılmıştır. Kanamisin seleksiyonu ve GUS analiz sonuçlarına göre pamuk çeşitlerinde gen aktarımı için en uygun eksplantın sürgün ucu (apikal) meristem bölgelerinin olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda da sürgün ucu eksplantlarının farklı pamuk çeşitlerine *A. tumefaciens* ile gen aktarımında yaygın

olarak kullanıldığı gözlenmiştir (Gould ve Magallanes-Cedeno 1998, Zapata 1999b, Jiang 2004, Keshamma vd. 2008, Nandeshwar vd. 2009, Bakhsh 2010, Afollabi-Balagun vd. 2011, Mogali vd. 2011, Dhaka vd. 2013). Bundan dolayı bu çalışmada da farklı pamuk çeşitlerine gen aktarımında yoğun olarak *in vitro* çimlenen fidelerden elde edilen sürgün uçları kullanılmıştır.

Farklı pamuk çeşitlerine ait tohumların *in vitro* çimlenen fidelerinden elde edilen sürgün ucu meristem bölgeleri pTF101.1 AoPR1-Cry1Ac ve pTF101.1 35S-Cry1Ac vektörlerini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 ve GV2260 bakteri hatları ile inoküle ve ko-kültive edildikten sonra 2 mg/l fosfinotrisin (PPT) ve 500 mg/L Augmentin içeren seçici rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. GSN 12, STN 468, Özbek 100 ve Ayhan 107 çeşitlerinde *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitkiler elde edilmesine rağmen, gen aktarım frekansında çeşit ve bakteri hattı önemli rol oynadığı gözlenmiştir. Pamuğa gen aktarımının büyük oranda genotipe bağlı olduğu, Coker gibi bazı çeşitlere gen aktarımının nispeten daha kolay olduğu ve bakteri hattının da gen aktarım frekansında önemli rol oynadığı çok sayıda araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Banerjee vd. 2002, Satyavathi vd. 2002, Jiang 2004, Wu vd. 2005, Tohidfar vd. 2005, Guo vd. 2007, Afollabi-Balagun vd. 2011, Liu vd. 2013). Yürütülen bu çalışmada farklı *A. tumefaciens* hatlarıyla sürgün ucu eksplantlarının inokülasyonu sonucunda 133 adet bireysel transgenik aday pamuk bitkisi başarılı olarak seraya aktarılarak tohum oluşturma aşamasına getirilmiştir. Yapılan PCR analizleriyle de bu bitkilerden 48 adedinin aktarılan bar, *cryIAc* ve *nptII* genleri ile AoPR1 promoter bölgesine taşıdığı teyit edilmiştir. Özellikle sürgün ucu gibi meristem bölgelerini içeren eksplantlara gen aktarımı sonucunda yüksek oranda aktarılan genleri taşımayan, ancak seçici antibiyotik veya herbisit etkisinden kurtulan transgenik olmayan ve kaçak sürgün/bitki olarak ifade edilen çok sayıda bitki gelişebilmektedir (Sunilkumar ve Rathore 2001, Satyavathi vd. 2002, Leelavathin 2003, Guo vd. 2007, Afollabi-Balagun vd. 2011). Bu kaçak sürgünlerin gelişiminde özellikle yakın bölgede bulunan ve gen aktarımı sonucunda herbisite/antibiyotiğe dayanıklı olan dokuların etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, düşük oranda kullanılan seçici herbisit veya antibiyotiklerin de etkili olduğu bildirilmektedir.

5.4 Elde Edilen Transgenik Bitkilerde Böcek Biyotest Analizleri

Aktarılan *cryIAc* geninin PCR ile teyit edildiği T₀ pamuk, T₁ ve kontrol bitkilerden kopartılan taze yapraklar üzerine laboratuvar şartlarında çoğaltılan *Spodoptera exigua* ve *S. littoralis* larvaları yerleştirilerek beslenmeleri sağlanmıştır. Transgenik olmayan kontrol bitki yapraklarıyla beslenen *S. exigua* ve *S. littoralis* böcek larvalarının ölmediği, %100 oranında canlı kaldığı ve devamlı olarak beslenmeye devam ettikleri gözlenmiştir. Öte yandan, *cryIAc* genini taşıyan transgenik bitkilerin yapraklarıyla beslenen larvaların önemli kısmının bir hafta içerisinde toksisite sonucunda kararak öldükleri gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde böcek ölümlerinin 12 saat içerisinde başladığı ve 7 güne kadar devam ettiği gözlenmiştir. Biyotestlerin sonlandırıldığı 6-7 gün sonunda bireysel transgenik bitkilerden alınan yapraklardaki larva ölümlerinin %25-100 arasında değiştiği belirlenmiştir. *S. exigua* ile yapılan T₀ transgeniklerin biyotest sonuçlarında, AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac genlerini içeren çok sayıda bireysel bitkinin larvaların %90'dan fazlasının ölümüne neden olarak önemli bir dayanıklılık sergilemiştir. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde önceki çalışmalarda da olduğu gibi (Bakhsh 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. Böcek ölüm oranları *S. littoralis* ile yapılan T₁ transgeniklerin biyotest sonuçlarında ise çok daha yüksek olmuştur. Bunun nedeninin ise T₁ bitkilerinde homozigotluk oranının artması ve *S. littoralis*'in *cry* proteinlerine karşı daha hassas olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen böcek ölümlerinin önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlenmiştir. Beklendiği üzere yaralanmayla aktif olan AoPR1 promotörünün kontrolündeki *cryIAc* geni, 35S promotörü tarafından kontrol edilen *cryIAc* geninde böcek larva ölümlerinde daha etkili olmuştur. Böylelikle AoPR1-Cry1Ac genini kullanılmasıyla bitkinin yaralanmayan diğer doku ve organlarında toksik *cryIAc* protein üretimi engellenebilmiştir (Özcan 1993, Özcan vd. 1993, Firek vd. 1993, Uranbey 2005, Gulbitti-Onarici vd. 2009).

5.5 Sonuç

Yürütülen bu çalışmayla *in vitro* rejenerasyonun optimizasyonundan sonra, ülkemizde yaygın olarak üretilen pamuk çeşitlerine ilk defa gen aktarımı gerçekleştirilebilmiştir. Gen aktarımı sonucunda AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac genlerini taşıyan çok sayıda transgenik bitki elde edilerek, bunlar üzerinde 2 farklı türün böcekleriyle biyotest çalışmaları yürütülmüştür. Biyotestlerde, elde edilen bitkilerin önemli bir kısmının *Spodoptera exigua* ve *S. littoralis* larvalarına karşı %100 oranında dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bilindiği üzere 35S promotörü konstitütif (daima aktif) ve kuvvetli bir promotör olup, GD bitkilerde *cry* genlerinin kontrol edilmesinde kullanılan en yaygın olanıdır. Daima aktif olmasından dolayı da kontrolü altındaki *cry* genlerin toksik protein üretimleri bitkilerin tüm evrelerinde ve organlarında yüksek oranlarda bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen biyotest sonuçları, ilave olarak AoPR1 promotörünün böcek larva ölümleri üzerine en az 35S promotörü kadar veya daha fazla etkili olduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda da transgenik bitkilerde istenmeyen ve gereksiz *cry* toksik proteinlerin üretimi engellenebilmiştir.

Elde edilen AoPR1-Cry1Ac ve 35S-Cry1Ac genlerini taşıyan çok sayıdaki transgenik T₀ ve T₁ bitkileri ileriki çalışmalarla kendilenerek, sonraki generasyonlarda açılmayı önlemek için *cry1Ac* geni bakımından homozigot bitkiler elde edilecektir. Elde edilecek olan bu bitkilerde yine T-DNA kopya sayısının belirlenmesi, protein ekspresyon analizleri ve böcek biyotest analizlerine yönelik çalışmalar yürütülecektir. Özellikle, böcek biyotestlerinde etkili ve hızlı böcek ölümüne neden olan hatlar gerekli izinler alınarak arazi şartlarında denenecektir. Arazi şartlarında bu hatların özellikle hedef ve hedef olmayan böceklere karşı etkileri ve verim kriterlerine bakılacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdellatef, E. and Khalafalla, M.M. 2007. Adventitious Shoot and Plantlet Formation in Medium Staple Cotton Cultivar (*Gossypium hirsutum* L. cv Barac [67] B), Int. J. Agric. Biol., 9, 913-916.
- Afolabi-Balogun, N.B., Inuwa, H.M., Sani, I., Ishiyaku, M.F., Bakare-Odunola, M.T., Nok, A.J. and Van Emmenes, L. 2011. Expression of mannose-binding insecticidal lectin gene in transgenic cotton (*Gossypium*) plant, Cotton Genomics and Genetics, 2, 1-7.
- Agrawal, D.C., Banerjee, A.K., Kolala, R.R., Dhage, A.B., Kulkarni, A.V., Nalawade, S.M., Hazra, S. and Krishnamurthy, K.V. 1997. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Plant Cell Reports, 16, 647- 652.
- Ahmed, H.A., Hajyzadeh, M., Barpete, S. and Özcan, S. 2014. *In vitro* plant regeneration of Iraqi cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars through embryonic axis, Journal of Biotechnology Research Center, 8(2), 90-94 (Special edition).
- Akçar, H., 1986. Çukurova koşullarında, iki pamuk çeşidinde (*Gossypium* sp.) farklı ekim şekillerinin verim ve verim unsurlarına etkisi üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Alkaya, E. 2010. Lif pamuk üretimi yan ürünlerinin/artıklarının katma değerli ürünlere dönüştürülmesi: Mevcut uygulamalar ve teknolojik gelişmeler. Mersin Üniversitesi: 18-29 Ekim, 2.Ulusal Katı Atık Yönetimi Kongresi-UKAY 2010.
- Anonim. 1995. Türkiye İstatistik Yıllığı. Ankara: T.C. Başbakanlık DİE.
- Anonim, 2011. Pamuk entegre Mücadele Teknik Talimatı. Editör: Atlamaz, A. ve Gökçe, A.Y. Ankara. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı. http://www.tarim.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/009_pamuk.pdf. Erişim Tarihi: 20.04.2014.
- Anonim, 2014a. T.C. 2013 yılı pamuk raporu. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü. <http://koop.gtb.gov.tr/data/5342b718487c8ea5e4b4d9c3/2013%20Pamuk%20Rapor.pdf>. Erişim Tarihi: 25 Mart 2014.
- Anonim 2014b. Tarış. Pamuğun kullanım alanları. (http://www.taris.com.tr/pamukweb/t_pamuk_hak.asp). Son erişim tarihi: 07 Şubat 2014.
- Anonim, 2014c. Türk İstatistik Kurumu (TUIK) <http://www.tuik.gov.tr/> Erişim Tarihi: 25 Şubat 2014.

- Anonim, 2012.T.C. 2011 yılı pamuk raporu. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı
Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.
<http://koop.gtb.gov.tr/data/.../2011%20Yılı%20Pamuk%20Raporu.doc> Erişim
tarihi: 25.03.2014
- Anonim, 2013.T.C. 2012 yılı pamuk raporu. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı
Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.
<http://koop.gtb.gov.tr/data/53319a8c487c8eb1e43d728b/2012%20Y%C4%B1%C4%B1%20Pamuk%20Raporu.pdf>. Erişim Tarihi: 25 Mart 2014.
- Anilkumar, K.J., Rodrigo-Simón, A., Ferré, J., Pusztai-Carey, M., Sivasupramaniam, S.
and Moar, W.J. 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis*
Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). *Appl. Environ.*
Microbiol. 74, 462–469.
- Anonymous 2002. National Cottonseed Products Association. Cottonseed and its
products, 10th Edition. <http://landofcotton.com/fc/files/industry.pdf>. Erişim Tarihi:
07 Şubat 2014.
- Anonymous 2014a. International Cotton Advisory Committee (ICAC).
<https://www.icac.org/> Erişim Tarihi: 17 Şubat 2014.
- Anonymous, 2014b. <https://www.ers.usda.gov/Data/BiotechCrops>. Erişim Tarihi:
05.03.14
- Aronson, A.I. and Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxins Are So
Effective: Unique Features of Their Mode of Action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195,
1-8.
- Aslam, M., Ashfaq, M., Saeed, T., Sami Ul Allah and Zafar, Y. 2010. *In vitro*
morphogenic response of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) from apical meristem
culture, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 7(1), 07-11.
- Atakan, E. ve Özgür, A., 2001. Pamuk tarlasında *Frankliniella intonsa* (Trybom) ve
Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)'in populasyon
değişimi ile polifag predatör popülasyon gelişmesi ilişkisinin araştırılması, *Türkiye*
Entomoloji Dergisi, 25, 267-273.
- Bajwa, K.S., Shahida, A.A., Rao, A.Q., Dahab, A.A., Muzaffar, A., Habib Ur Rehmana,
Ahmad, M., Shaukat, M.S., Gul, A., Ahada, A. and Hussnain, T. 2014. Stable
genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using marker genes,
Advanced Crop Science, 4(1), 1-11.
- Bakhsh, A. 2010. Expression of two insecticidal genes in Cotton, National Centre of
Excellence in Molecular Biology University of the Punjab Lahore, Pakistan. Phd
thesis, 152 pp.

- Banerjee, A.K., Agrawal, D.C., Nalawade S.M. and Khrishnamurthy, K.V. 2002. Transient expression of β -glucuronidase in embriyo axes of cotton by *Agrobacterium* and particle bombardment methods, *Biologia Plantarum*, 45(3), 359-365.
- Banerjee, A.K., Agrawal, D.C., Nalawade, S.M., Hazra, S. and Krishnamurthy, K.V. 2003. Multiple Shoot Induction and Plant Regeneration from Embryo Axes of Six Cultivars of *Gossypium hirsutum*, *Biologia Plantarum*, 47(3), 433-436.
- Barwale, R.B., Gadwa, V.R., Zehr, U. and Zehr, B. 2004. Prospects for Bt cotton technology in India. *AgbioForum*, 7, 23-26.
- Bazargani, M.M., Tabatabaei, B.E.S. and Omid, M. 2011. Multiple shoot regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via shoot apex culture system, *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2005-2011.
- Bevan, M. and Chilton, M.-D. 1982. Multiple transcripts of T-DNA detected in nopaline crown gall tumors. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 539.
- Bevan, M., Barners, W. and Chilton, M-D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic. Acids Res.*, 11, 369-385.
- Bozkurt, E., 1973. Ege Bölgesinde pamuklarda zararı görülen Lepidoptera larvalarının taksonomik karakterleri, konukçuları ve yayılışları üzerinde araştırmalar (205). Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Matbaası, 115s.
- Cannon, R.J.C. 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: A molecular perspective. *Biol. Rev.* 71, 561-636.
- Carvalho, J.M.F.C., Gonzalez Benito, E., Perez, C. and Santos, J.W. 1997. Effect of explant type, carbon source and gelling agent on micropropagation of cotton cv. CNPA Precoce 2, *Revista de Oleaginosas e Fibras*, 1(1), 81-86.
- Chaudhary, B., Kumar, S., Prasad, K.V.S.K., Oinam, G.S., Burma, P.K. and Pental, D. 2003. Slow desiccation leads to high frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton *Gossypium hirsutum* L. cv. Coker310, *Plant Cell Reports*, 21, 955-960.
- Chilton, M.-D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P. and Quetier, F. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells, *Proc. natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 4060-4064.
- Cramer, H.H. 1967. *Plant Protection and World Crop Production* Leverkusen, 524 pp. Germany.
- Çakır, Ş. ve Yamanel Ş. 2005. Böceklerde insektisidlere direnç. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6, 21-29.

- Daud, M.K., Variath, M.T., ALI, S., Jamil, M., Khan, M.T., Shafi, M. and Shuijin, Z. 2009. 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.
- Davidonis, G.H. and Hamilton, R.H. 1983. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L, Plant Sci. Lett., 32, 89-93.
- De Maagd, R.A., Kwa, M.S., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J. and Bosch, D. 1996. Domain III substitution in Bacillus -endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera thuringiensis exigua* and altered membrane protein recognition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1537-1543.
- Demirkan, H. 1999. Pamuk Alanlarında Sorun Olan Yabancı Otlar ve Mücadelesi TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası İzmir Mart-Nisan 1999 Bülteni. 15-16.
- Dhaka, N., Chaudhary, P. and Sarin, N.B. 2013. *Agrobacterium* mediated transformation of *Gossypium hirsutum* using *Glyoxalase II* gene, Plant Mol Biol Biotechnol., 4(1), 1-5.
- Divya, K., Anuradha, S., Jami, S.K. and Kirti, P.B. 2008. Efficient regeneration from hypocotyl explants in three cotton cultivars, Biol. Plant., 52, 201-8.
- Dong, H.Z, Li, W.J, Tang, W and Zhang, D.M. 2005. Increased yield and revenue with a seedling transplanting system for hybrid seed production in Bt cotton. J. Agron. Crop Sci. 191, 116-124.
- Efil, L., ve Güçlü, Ş., 2004. Diyarbakır, Şanlıurfa ve Mardin illerinde pamuk alanlarında bulunan Cicadellidae (Homoptera) türleri, Samsun: Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri.
- Efil, L., Atakan, E. ve Karahan, H., 2010. Pamuk tarlasında erken dönemde *Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera:Thripidae)'ye karşı kullanılan pestisitlerin predatör böceklerin popülasyonlarına etkilerinin araştırılması, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(2), 1-8.
- Emiroğlu, Ş. H. ve Gürel, A. 1997. Pamuk Üreticileri İçin Teknik Bir Sohbet". BÜLTEN, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, İzmir.
- Eralp, Ö. 2012. Pamukta Son Durum. Tarım Türk Dergisi, 04/03/2012 <http://www.tarimturk.com.tr/yeni/index.php/makaleler/bitkiselm/item/71-pamukdurumu>. Erişim Tarihi: 07.02.2014
- Ezhılası, T. and Nallathambi, G. 2013. Plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): A rapid *in vitro* method, Journal of Cell and Tissue Research, 13(3), 3931-3936.

- Farahani, F., Yahyazadeh, F. and Sheidai, M. 2010. Optimization of *in vitro* direct regeneration of multiple shoots in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. Iranian varieties, *African Journal of Agricultural Research*, 5(11), 1304-1309.
- Finer, J.J. 1988. Plant regeneration from somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Cell Reports*, 7, 481-494.
- Finer, J.J. ve Smith, R.H., 1984. Initiation of callus and somatic embryos from explants of mature cotton (*Gossypium*), *Plant Cell Rep*, 3(1), 41-43.
- Firek, S., Özcan, S., Warner, S.A. and Draper, J. 1993. A wound-induced promoter driving *nptII* expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic shoots. *Plant Molecular Biology*, 22, 129-142.
- Firozabady, E., Deboer, DL. and Merlo, DJ., 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants, *Plant Mol Biol*, 10, 105-116.
- Firoozabady, E. and DeBoer, D.L. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 299, 166-173.
- Gawel, N.J., Rao, A.P. and Robacker, C.D. 1986. Somatic embryogenesis from leaf and petiole callus cultures of *Gossypium hirsutum* L., *Plant Cell Reports*, 5(6), 457-459.
- Gould, J., Banister, S., Hasegawa, O., Fahima, M. and Smith, R.H. 1991. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from shoot open tissues for transformation, *Plant Cell Reports*, 39, 12-16.
- Gould, J.H. and Magallanes-Cedeno, M. 1998. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16, 1-10.
- Göven, M. A., 1995. Güneydoğu Anadolu Bölgesi pamuk ekim alanlarındaki zararlılar ile ilgili sorunlar ve çözüm önerileri. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27-29 Nisan 1995, Şanlıurfa, 282-289.
- Göven, M.A. ve Gümüş, S.,1998.Diyarbakır (Bismil) ili pamuk alanlarında zararlı pamuk çizgili yaprak kurdu [*Spodoptera exigua* (Hüb.)] (Lep.:Noctuidae)'nun doğal düşmanları üzerinde bir gözlem, *Bitki Koruma Bülteni*, 38 (3-4), 117-120.
- Grevellec, J., Marquie, C., Ferry, L., Crespy, A. and Vialettes, V. 2001. "Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials", *Biomacromolecules*, 2, 1104-1109.
- Guo, X., Huang, C., Jin, S., Liang, S., Nie, Y. and Zhang, X. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cry1C*, *Cry2A* and *Cry9C* genes into *Gossypium hirsutum* and plant regeneration, *Biologia plantarum*, 51(2), 242-248.

- Gupta, S.K., Srivastava, A.K., Pradhyumna, K.S. and Rakesh, T. 1997. *In vitro* proliferation of shoots and regeneration of cotton, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 51, 149-152.
- Gülbitti-Onarıcı, S., Zaidi, M.Z., Taga, I., Özcan, S. and Altosaar, I. 2009. Expression of *CryIAc* in transgenic tobacco plant under the control of a wound-induced promoter (AoPR1) isolated from *Asparagus officinalis* to control *Heliothis virescens* and *Manduca sexta*, *Molecular Biotechnology*, 42, 341–349.
- Güngör, A., Palamutcu, S. ve İkiz, Y. 2009. Pamuklu tekstiller ve çevre: Bir bornozun yaşam döngü değerlendirmesi, *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3, 197–205.
- Gürel, A. Akdemir, H., Emiroğlu, Ş.H., Kadoğlu, H. ve Karadayı, H.B. 2000. Türkiye Lif Bitkileri: Pamuk Tarımı, Teknolojisine Genel Bakış ve Diğer Lif Bitkileri Ankara: Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi (2 cilt).
- Han, G.Y., Wang, X.F., Zhang, G.Y. and Ma, Z.Y. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*), *African Journal of Biotechnology*, 8(3), 432-437.
- Hazra, S., Kulkarni, AV., Nalawade, SM., Banerjee, AK., Agrawal, DC. And Krishtamurthy, KV. 2000. “Influence of explants, Genotypes and Culture Vessels on Sprouting and Proliferation of Pre-existing Meristems of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36, 505-510.
- Hemphill, J. K., Maier, C.G.A. and Chapman, K.D. 1998. Rapid *in vitro* plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum*L.), *Plant Cell Reports*, 17, 273-278.
- Huang, F.B., Leonard, R. and Andow, D.A. 2007. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. *J. Econ. Entomol.* 100, 164–171.
- Hussain, T., Bakhsh, A., Munir, B., Hassan, S., Rao, A.Q., Shahid, A.A., Rashid, B., and Husnain, T. 2014. Mendelian segregation pattern and expression studies of insecticidal gene (*cryIAc*) in insect resistant cotton progeny, *Emir. J. Food Agric.*, 26(8), 706-715.
- Ikram-Ul-Haq and Zafar, Y. 2004. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *African Journal of Biotechnology*, 3, 319-23.
- Ikram-Ul-Haq. 2005. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *African Journal of Biotechnology*, 4 (2), 206-209.
- İşci, A. ve Demirer, G.N. 2007. Biogas production potential from cotton wastes, *Renewable Energy*, 32, 750–757.

- İşler, N. ve Özgür, A.F. 1992. Farklı ekim zamanı ve ekim şeklinin pamukta Beyaz Sinek (*Bemisia tabaci* Gen.) populasyonuna, bitki gelişmesine ve pamuk verimine etkisi üzerinde araştırmalar, Türkiye Entomoloji Dergisi, 16(2), 87-98.
- İşler, N. 2013. Pamuk Tarımı. M.K.Ü. Ziraat Fak. Tarla Bit. Bölümü. www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=939. Erişim Tarihi: 05.02.2014
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387–405
- James, C. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops .www.gmo-compass.org. Erişim Tarihi: 26.02.14
- James, C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. www.gmo-compass.orgErişim Tarihi: 26.02.14
- Jiang, B. 2004. Optimization of *Agrobacterium* mediated cotton Transformation using shoot apices explants and quantitative trait loci analysis of yield and yield component traits in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), M. Ap. Stat., Louisiana State University, USA, Phd thesis, 106 pp.
- Jin, S.X., Zhang, X.L., Liang, S.G., Nie, Y.C., Guo, X.P. and Huang, C. 2006. Identification of a novel elite genotype for in vitro culture and genetic transformation of cotton. *Biologia Plantarum*, 50(4), 519-524.
- Kaya, İ. ve Nemli, Y. 2001. Aydın ili önemli pamuk ekiliş alanlarında sorun olan yabancı otların saptanması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 2002, 12(1):37-40.
- Keshamma, E., Rohini, S., Rao, K.S., Madhusudhan, B. and Udaya Kumar, M. 2008. Tissue culture-independent in plant transformation strategy: An *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *The Journal of Cotton Science*, 12, 264-272.
- Khalafalla, M.M. and Abdellatef, E. 2008. *In vitro* multiple shoot induction and plant regeneration in elite sudanese cotton *G. hirsutum* cultivar barac-B-67, *Journal innov. Dev. Strategy*, 2(3), 77-82.
- Khan, T., Singh, A. K. and Pant, R.C. 2006. Regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in different cultivars of cotton (*Gossypium* spp.), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 42, 498–501.
- Khan, N.U., Marwat K.B., Hassan, G., Farhatullah, S., Batool, K., Makhdoom, W., Ahmad H.U. and Khan. 2010. Genetic variation and heritability for cottonseed, fiber and oil traits in *G. hirsutum* L, *Pak. J. Bot.*, 42(1), 615-625.

- Khan, G.A., Bakhsh, A., Riazuddin, S. and Husnain, T. 2011. Introduction of *cryIAb* gene into cotton (*Gossypium hirsutum*) enhances resistance against Lepidopteran pest (*Helicoverpa armigera*), Spanish J. Agric. Res., 9, 296-300.
- Kiani, S., Mohamed, B.B., Shehzad, K., Jamal, A., Shahid, M.N., Shahid, A.A. and Husnain, T. 2013. Chloroplast-targeted expression of recombinant crystal-protein gene in cotton: An unconventional combat with resistant pests, Journal of Biotechnology, 166, 88– 96.
- Kolsarıcı, Ö. 2009. Lif ve kauçuk bitkileri. Tarla bitkileri kitabı .Hazırlayanlar: 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. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Kumar, S. and Pental, D. 1998. Regeneration of Indian cotton variety MCU-5 through somatic embryogenesis, Curr. Sci., 74, 538-540.
- Kumria, R., Sunnichan, V.G., Das, D.K., Gupta, S.K., Reddy, V.S., Bhatnagar, R.K. and Leekavathi, S., 2003. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*L.) through metabolic stress, Plant Cell Rep, 21, 635-639.
- Laud, D., Nandeshwar, S.B., Moghe, S. and Kulkarni, P. 2010. Effect of growth regulators and explant types on regeneration of diploid cotton *G. arboreum*, Asiatic Journal of Biotechnology Resources, 3, 214-219.
- Leelavathi, S., Sunnichan, V.G., Kumria, R., Vijaykanth, G.P., Bhatnagar, R.K. and Reddy, V.S. 2004. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants, Plant Cell Reports, 22, 465-470.
- Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M. and Schell, J. 1982. Broad host range cloning vectors derived from the W-plasmid *Sa*, Gene, 19, 361-364.
- Li, F., Wu, S.J., Chen, T.Z., Zhang, J., Wang, H.H., Guo, W.Z. and Zhang, T.Z. 2009. *Agrobacterium*- mediated co-transformation of multiple genes in upland cotton, Plant Cell Tiss. Organ Cult., 97,225-235.
- Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. 1991. Crystal structure of the insecticidal delta-toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Angstrom resolution, Nature, 353, 815-821.
- Li, R., Stelly, D.M. and Trolinder, N.L. 1989. Cytogenetic abnormalities in cotton (*Gossypium hirsutum* L) cell cultures, Genome, 32, 1128-1134.

- Liu, Z., Zhu, Z. and Zhang, T. 2013. Development of transgenic CryIAc(c)+GNA cotton plants via pollen tube pathway method confers resistance to *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii* glover. Transgenic cotton: Methods and Protocols. Editör: Zhang, B., New York: Springer.
- Ma, G., Robertsa, H., Sarjanb, M., Featherstonec, N., Lahnsteinc, J., Akhurstd, R. And Schmidta, O. 2005. Is the mature endotoxin *CryIAc* from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae?, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 729–739.
- Majeed, A., Husmain, T. and Riazuddin, S. 2000. Transformation of virus-resistant genotype of *Gossypium hirsutum* L. with pesticidal gene, *Plant Biotechnol.*, 17, 105-110.
- Marquie, C., Aymard C., Cuq, J. L. ve Guilbert, S. 1995. Biodegradable packaging made from cottonseed flour: formation and improvement by chemical treatments with gossypol, formaldehyde, and glutaraldehyde, *J. Agric. Food Chem.* 43, 2762–2767.
- Mart, C., Aslan, M.M., Eroğlu, N. ve Doğanlar, O., 2000. Pamuk alanlarında yeşilkurt, *Heliothis armigera* hbn. (Lepidoptera: Noctuidae)'un popülasyon takibinde eşeyssel çekici tuzakların kullanım imkanları üzerinde araştırmalar, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3 (2), 145-153.
- Mart, C., Güvelioğlu, M., Nasırcı, Z., Aktura, T. ve Gülyaşar, T., 1997. Doğu Akdeniz Bölgesi koşullarında *Aphis gossypii* Glov. (Homoptera: Aphididae)'nin bazı pamuk çeşitlerindeki popülasyon değişimi, *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 21,(1), 57-64.
- Mart, C. ve Sunulu, S., 2011. Kahramanmaraş pamuk ekim alanlarında Cicadellidae (Hemiptera) familyasına bağlı türler ve popülasyon değişimleri, *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 35 (4), 665-676.
- Mckenzie, J.D. and Goldman, 2005. The Student Guide to MINITAB Release 14 Manual Pearson Education, Boston, MA.
- Mogali, S.C., Khadi, B.M. and Katageri, I.S. 2011. 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.
- Morre, J.L., Permingeat, H.R., Maria, V.R., Cintia, M.H. and Ruben, H.V. 1998. Multiple shoots induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54, 131-136.
- Mur, L.A., Sturgess, F.J., Farrell, G.G. and Draper, J. 2004. The AoPR10 promoter and certain endogenous PR10 genes respond to oxidative signals in *Arabidopsis*, *Molecular Plant Pathology*, 5, 435–451.

- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Mushke, R., Sultana, T. and Pindi, P.K. 2012. High frequency regeneration and multiple shoot induction in indian cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar, *Research Journal of Agricultural Sciences*, 3(5), 1109-1112.
- Nandeshwar, S.B.1995. Regeneration of cotton through shoot tip and meristem culture, *Ad. Plant Sci.*, 1, 89-94.
- Nandeshwar, S.B., Moghe, S., Chakrabarty, P.K., Deshattiwar, M.K., Kranthi, K., Kumar, P.A., Mayee, C.D. and Khadi, B.M. 2009. Agrobacterium mediated transformation of *cryIAc* gene into shoot-tip meristem of diploid cotton *Gossypium arboreum* cv. RG8 and regeneration of transgenic plants, *Plant Mol Biol Rep.*, 27, 549-557.
- Nasir, A., Yusuf Zafar, S. and Malik, A. 1997. A simple procedure of *Gossypium* meristem tip culture, *Plant Cell tissue Organ Cult.*, 51, 201-207.
- Ouma, J.P., Young, M.M. and Reichert, N.A. 2004. Rooting of *in vitro* regenerated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is influenced by genotype, medium composition, explant type and age, *African Journal of Biotechnology*, 36,313-8.
- Öktem, HA. 2004a. Böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesi. *Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. Editörler: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Öktem, H.A. 2004b. Herbisitlere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesi. *Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. Editörler: Özcan, S., Gürel E., Babaoğlu, M. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation. *Doktora Tezi*. Leicester Üniversitesi Botanik Bölümü İngiltere.
- Özcan, S., Firek, S. and Draper, J. 1993. Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation, *Nature Biotechnology*, 11(2), 218–221.
- Özcan, S ve Özgen, M. 1996. *Bitki Genetik Mühendisliği*, *Kükem Dergisi*, 1, 69-95.
- Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E. ve Babaoğlu, M. 2004. *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı. *Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. Editörler: Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Özcan, S. ve Sancak, C. 2005. *Modern Biyoteknoloji Uygulamaları: Modern biyoteknolojinin bitkisel üretimde kullanımı*. Ankara: TKB TAGEM.

- Özcan, S. 2009. Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: Genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2(2), 01-34.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H. ve Tursun, N. 2001. Herboloji (Yabancı Ot Bilimi) (Genişletilmiş 3. Baskı). Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 20. Kitaplar Serisi No:10.
- Öziş, Z. 1997. Pamuk Hastalıkları, Zararlıları ve Yabancı Otlar. BÜLTEN, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, İzmir.
- Özyiğit, İ.İ. 2008. Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips, African Journal of Biotechnology Vol., 7 (8), 1145-1150.
- Özyiğit, İ.İ. and Gözükırmızı, N. 2008. High efficiency shoot and root formation from cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Pak. J. Bot., 40(4), 1665-1672.
- Özyiğit, İ.İ. 2009. *In vitro* shoot development from three different nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Not Bot Horti Agrobo, 37(1), 74-78.
- Özyiğit, İ.İ. and Gözükırmızı, N. 2009. Efficient Shoot and Root Formation from Cotton Shoot Apices. Russian Journal of Plant Physiology, Vol., 56, No. 4, 527-531.
- Pathi, K.M. and Tuteja, N. 2013. High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cvNarashima) by using embryo apex, Plant Signal Behav., 8, 22763-94.
- Prasad, M.G., Sudhakar, P. and Prasad, T.N.V.K.V. 2011. Optimization of medium conditions for efficient plant regeneration from embryo of cotton (var. narishima), Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering, 3(2), 20-22.
- Price, H.J. and Smith, R.H., 1979. Somatic embryogenesis in suspension cultures *Gossypium klotzschianum* Andress, Planta, 145(3), 305-307.
- Qaim, M. 2009. The Economics of Genetically Modified Crops. Annu. Rev. Resour. Econ., 1,665-9.
- Rangan, T.S., Zavala, T. and Ip, A. 1984. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Gossypium hirsutum* L, In Vitro, 20, 256.
- Rauf, S., Usman, M., Fatima, B., Manzoor, T.K. and Iqar, A.K. 2004. *In vitro* regeneration and multiple shoot induction in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Int. J. Agric. Biol., 4, 704-7.

- Riaz, M., Nadeem, R., Hanif, M. A., Ansari, T. M. and Rehman, K. 2009. Pb(II) biosorption from hazardous aqueous streams using *Gossypium hirsutum* (Cotton) waste biomass, *Journal of Hazardous Materials*, 161, 88–94.
- Sadashivappa, P. and Qaim, M. 2009. "Effects of Bt cotton in India during the first five years of adoption, Presented at Int. Assoc. Agric. Econ. Triennial Conf., Beijing, China
- Sangannavar, P.A., Hedge, P.M., Choudki, V.M., Savita, S.G., Vanti, G.L., Barkeer, S., Abdulnayeem., Vamadevaiah, H.M., Khadi, B.M. and Katageri, I.S. 2012a. *In vitro* and *in vivo* studies on induction of multiple Shoots and regeneration in cotton (*G. arboreum* L. and *G. barbadense* L.), *Journal of Cell and Tissue Research*, 12(1), 3069-3074.
- Sangannavar, P.A., Katageri, I.S., Vamadevaiah, H.M. and Khadi, B.M. 2012b. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Cotton cv. Coker-312 (*Gossypium hirsutum* L.), *Journal of Cell and Tissue Research*, 12(3), 3401-3408.
- Satyavathi, V.V., Prasad, V., Lakshmi, G.U. and Lakshmi, S. 2002. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Science*, 162, 215-223.
- Schell, J. and Van Montagu, M. 1983. The plasmids as natural and as practical gene vectors for plants, *Bio/Technology* 1, 75.
- Sharma, H.C., Sharma, K.K. and Crouch, J. 2004. Genetic transformation of crops for insect resistance : Potential and limitations, *Crit. Rev. In Plant Sciences*. 23(1), 47-72.
- Shoemaker, R.C., Couche, I.J. and Galbraith, D.W. 1986. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Cell Reports*, 3, 178-181.
- Stam, P.A. and El-Mosa, H. 1990. The role of predators and parasites in controlling populations of *Earias insulana*, *Heliothis armigera* and *Bemisia tabaci* on cotton in the Syrian Arab Republic, *Entomophaga*, 35(3), 315-327.
- Sun, Y.Q., Zhang, X.L., Huang, C., Guo, X.P. and Nie, Y.C., 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species, *Plant Cell Rep*, 25, 289-296.
- Sunilkumar, G. and Rathore, K.S. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration, *Mol Breed*, 8, 37-52.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*, *Annual Review of Entomology*, 39, 47–79.

- Tang, J.D., Collins, H.L., Metz, T.D., Earle, E.D., Zhao, J.Z. and Roush, R.T. 2001. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies, *Journal of Economic Entomology*, 94,240–247.
- Tohidfar, M., Ghareyazie, B. and Mohammadi, M. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton using a chitinase gene, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 83, 83-96.
- Tohidfar, M., Ghareyazie, B., Mosavi, M., Yazdani, S. and Golabchian, R. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic *cryIAb* gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*, *Iranian Journal of Biotechnology*, 6(3), 164-173.
- Tripathy, S. and Reddy, G.M. 2002a. *In vitro* callus induction and plantlet regeneration from Indian cotton cultivars, *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.*, 3, 137-142.
- Tripathy, S. and Reddy, G.M. 2002b. A study on the influence of genotype, medium and additives on the induction of multiple shoots in Indian cotton cultivars, *Asian Jr. of Microbiol Biotech. Env. Sc.* 4(4), 515-519.
- Trolinder, N.L. and Goodin, J.R. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Plant Cell Reports*, 6, 231-234.
- Tursun, N., Tursun, A. Ö. and Kaçan, K. 2004. Kahramanmaraş ili ve ilçelerinde pamuk ekim alanlarında sorun olan yabancı otların belirlenmesi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 7(1)-2004.
- Tümer, H. T. 2010. Çırcırlama yöntemlerinin Pamuk Kaşitesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Makinaları Ana Bilim Dalı.
- Ünlü, L., 2001. Şanlıurfa’da pamuk alanlarında zararlı olan *Lepidopter* türlerinin saptanması, populasyon değişimleri, doğal düşmanları ile dikenlikurt (*Earias insulana* Boisd.)’un biyolojisi ve bitki fenolojisi arasındaki ilişkilerin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 110s, Adana.
- Ünlü, L. ve Kornoşor, S. 2002. Harran ovasında pamukta zarar yapan lepidopterlerin populasyon değişimlerinin belirlenmesi. *Üniversite Dergisi*, 33(3), 253-257.
- Ünlü, L. ve Kornoşor, S., 2003. Şanlıurfa ilinde saptanan *Noctuidae* (*Lepidoptera*) familyası türleri ve morfolojik özellikleri, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7 (3-4), 19-28.
- Uranbey, S., Başalma, D., Sancak, C., Er, C. and Özcan, S. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation in potato using different explants and co-cultivation media and histochemical detection of pathogenesis-related promoters, *Biologia*, 60,685-690.

- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M. and Zambryski, P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome, *Cell* 38, 455-462.
- Wang, Y.X., Wang, X.F., Ma, Z.Y., Zhang, G.Y. and Han, G.Y. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from two recalcitrant genotypes of *Gossypium hirsutum* L, *Sci. Agric. Sin.*, 5(5), 323-329.
- Warner, S.A., Scott, R. and Draper, J. 1993. Isolation of an asparagus intracellular PR gene (AoPR1) wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterization in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 3,191–201.
- Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M.-D. and Nester, E. W. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*, *J. Bacteriol.*, 123, 255-264.
- Wu, J. Y. and She, J. M., 1990. Shoot apex and axillary bud culture of *Gossypium* spp. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 6(2), 22-26.
- Wu, J.H., Zhang, X.L., Nie, Y.C. and Luo, X.L. 2005. High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants, *Plant Breeding*, 124,142-6.
- Wu, J., Luo, X., Wang, Z., Tian, Y., Liang, A. and Sun, Y. 2008a. Transgenic cotton expressing synthesized scorpion insect toxin AaHIT gene confers enhanced resistance to cotton bollworm (*Heliothis armigera*) larvae, *Biotechnol Lett.*, 30(3), 547-54.
- Wu, S.J., Wang, H.H., Li, F.F., Chen, T.Z., Zhang, J., Jiang, Y.J., Ding, Y., Guo, W.Z. and Zhang, T.Z. 2008b. Enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of Upland cotton via efficient selection and timely subculture of somatic embryos, *Plant Mol Biol Rep*, 26, 174-185.
- Yabaş, M.N., 1979. Çukurova bölgesinde *Heliothis armigera* Hbn.'nın biyolojisi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. Adana Bölge Zırai Mücadele Araştırma Enstitüsü.
- Zapata, C., Srivatanakul, M., Park, S.H., Lee, B.M., Salas, M.G. and Smith, H. 1999a. Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 54, 185-191.
- Zapata, C., Park, S.H., El-Zik, K.M. and Smith, H. 1999b. Transformation of texas cotton cultivar by using *agrobacterium* and the shoot apex, *Theor. Appl. Genet.*, 98, 252-256.
- Zar, J. H., 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd Ed., Prentice Hall Inc. New Jersey, USA.

- Zhang, J.M., Sun, J.Z., Liu, J.L. and Zhang, X.L. 1994. Studies on plant regeneration from somatic cell and transferring technique of plantlets in upland cotton, *Acta Agron. Sin.*, 20(2), 210-216.
- Zhang, B.H., Liu, F., Yao, C.B. and Wang, B. 2000. Recent progress in cotton biotechnology and genetic engineering in china, *Curr. Sci.*, 79, 37-44.
- Zhang, B.H., Feng, R., Liu, F., Zhou, D.Y. and Wang, Q.L. 2001. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) explants, *Isr. J. Plant Sci.*, 49(3), 193-196.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine ANAYOL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 20.02.1976

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Lisesi, Ankara (1993)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (1997)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2003-2007)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Sakarya Hendek Tarım İlçe Müdürlüğü (2000-2001)

Sakarya Tarım İl Müdürlüğü Bitki Koruma Şubesi (2001-2002)

Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Biyogenetik Laboratuvarı (2002-2009)

Adıyaman Tarım İl Müdürlüğü Toprak Analiz Laboratuvarı (2009-2010)

Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji Araştırma Merkezi
(2011-devam)

Yayınlar (SCIE)

Joiya, A., **Anayol, E.**, Özcan, S. F. 2014. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana Tabacum* L. Emir. J. Food Agric. 26 (3): 259-264.

Uluslararası Kongre Sunumu

Anayol, E., Karakoç, Ö., Köm, D., 3, Joiya, A., Barpeta, S., Onarıcı, S., , Khabbazi S.D. Özcan, S.F., Oğuz, M.Ç., Aasım, M., Ünlü, L., Özcan, S. Yaralanmayla aktif olan AoPR1 promotörünün kontrolü altında *cryIAc* geninin aktarıldığı transgenik pamuk elde edilmesi ve gereksiz toksik cry protein üretiminin engellenmesi. International Mesopotamia Agriculture Congress. 22-25 September 2014. Diyarbakır, Turkey.

Özcan, S., **Anayol, E.**, Joiya, A., Özcan, S.F., Aasım, M., Gürbüz, B., Ünlü, L. Elimination of unnecessary protein production of transgenes in transgenic plants. 2014 World Forum on Biology. Joing Meeting of Society for In Vitro Biology and the Society for Cryobiology. May 31- June 4, 2014. Savannah, Georgia, USA.

Barpeta, B., Oğuz, M.Ç., Özcan, S.F., **Anayol, E.**, Özcan, Ö. 2014. Effects of Temperature and Dark Condition on Seed Germination of Five Native Cultivars of Turkish Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). 5th With International Partipication Seed Congress. 19-23 October 2014. Diyarbakır, Turkey.

Barbete, S., **Anayol, E.**, Ahmed, H.A., Özcan, S. F., Köm, D., Delpasand, S., Aasım, M., Khawar, K. M., Özcan, S. 2013. Optimization of in vitro culture condition for genetic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). International Plant breeding Congress (IPBC). 10-14 November, 2013. Antalya, Turkey.

Özcan, S., Joiya, A., **Anayol, E.**, Böke, H., Özcan, S. F., Onarıcı, S., Aasım, M., Khawar, K. M., Ünlü, L. 2012. An Apphroach to Limit The Cry Endotoxin Protein Production in Transgenic Cotton Using a Wound Induced Promoter. The First International Biology Congress in Kyrgyzstan. 24-27 September. Bishkek, Kyrgyzstan, S061.

Özcan, S., Joiya, A., **Anayol, E.**, Onarıcı, S., Aasım, M., Sancak, C., Khawar, K. M., Özcan, S. F., Ünlü, L. 2012. An approach to limit the cry endotoxin protein production to insect bite sites in cotton using a wound induced promoter. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal. 48 (Suppl 1): World Congress on *in vitro* Biology. 3-7 June. Bellevue, Washington, ABD.

Ulusal Kongre Sunum

Özcan, S., **Anayol, E.**, Ahmed, H.A., Joiya, A., Onarıcı, S., Aydın, G., Asım, M., Akdoğan, G., Khabbazi, S.D., Turgut, B., Özcan, S. F., Khawar, K. M., Ünlü, L. 2013. Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitki Üretiminde Yeni Bir Yaklaşım: Gereksiz Cry Protein Üretiminin Engellenmesi. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi. 10-13 Eylül. Konya.

Anayol, E., Şimşek, Ö., Özden, B., Avşaroğlu, M.D., Akçelik, M. 2006. *Lactococcus lactis subsp.lactis* EYL38 suşunda nisin üretiminin genetik analizi ve konjugal aktarımı. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi. 26-30 Haziran. Kuşadası, Aydın.