



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

HERBİSİTE DİRENÇ GENİ CP4-EPSPS'NİN *Agrobacterium tumefaciens*
ARACILIĞIYLA PATATESE AKTARILMASI

SAFA SÜMER

Ocak 2018

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

HERBİSİTE DİRENÇ GENİ CP4-EPSPS'NİN *Agrobacterium tumefaciens*
ARACILIĞIYLA PATATESE AKTARILMASI

SAFA SÜMER

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH

Ocak 2018

Safa SÜMER tarafından Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH danışmanlığında hazırlanan “Herbisite direnç geni CP4-EPSPS’nin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla patatese aktarılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Nigde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü - Tarımsal Genetik Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR, Ankara Üniversitesi

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

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL, Nigde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

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

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

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR V.

TEZ BİLDİRİMİ

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



Safa SÜMER

ÖZET

HERBİSİTE DİRENÇ GENİ CP4-EPSPS'NİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA PATATESE AKTARILMASI

SÜMER, Safa

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman

:Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH

Ocak 2018, 59 sayfa

Yabancı otlar diğer bitkilerde olduğu gibi patates bitkisinde de önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışmada herbisite dayanıklılık karakterinin *Agrobacterium* aracılığıyla iki farklı patatese gen aktarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, genetik aktarımı için “Lady Olympia” ve “Desiree” patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerinin yaprak ve boğumarası doku parçaları eksplant olarak kullanılmıştır. Gen aktarımı yapmak için pCAMHE-EPSPS plazmidini içeren *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin LBA440 izolatları kullanılmıştır. Gen aktarım amacıyla kullanılan pCAMHE-EPSPS plazmidinde 35S promotörü kontrolü altında CP4-EPSPS geni bulunmaktadır. Çalışmada, T-DNA bölgesinde bulunan gusA geninin varlığı aday transgenik bitkilerin erken dönemde tespit edilmesini kolaylaştırmıştır. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerinde transformasyon etkinliği sırasıyla % 0,7 ve % 0,3 olarak hesaplanmıştır. Yapılan analizler sonucunda CP4-EPSPS geninin transgenik patates hatlarında işlevsel olarak yer aldığı tespit edilmiştir. Yapılan glifosat herbisit uygulaması sonucunda da CP4-EPSPS geninin patatese karşı etkinliğini ortaya koymuştur. Geliştirilmiş transgenik patates hatları ıslah programında gen kaynağı olarak kullanılabilirler.

Anahtar Sözcükler: Yabancı otlar, Patates transformasyonu, Glifosat dirençlilik

SUMMARY

Agrobacterium tumefaciens MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION of POTATO with CP4-EPSPS HERBICIDAL GENE

SÜMER, Safa

Nigde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor :Assistant Professor Dr. Allah BAKHSH

January 2018, 59 pages

Weeds incur significant losses to crop plants including potato. The present research work was conducted to introduce herbicide resistance trait in two potato cultivars Lady Olympia and Desiree via *Agrobacterium* mediated genetic transformation. For this purpose, *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring pCAMHE-EPSPS binary vector was used to infect leaf and internodal explants of both cultivars. The plasmid contained CP4-EPSPS gene under the control of 35S promoter. The presence of *gusA* gene within T-DNA region facilitated earlier screening of primary transformants. Overall transformation efficiency was calculated as 0,7 and 0,3% in “Lady Olympia” and “Desiree”. The primary transformants were used for gene integration and expression using standard molecular techniques. The efficacy of transgenic plants against roundup ready was evaluated by glyphosate application assays using recommended dose. The transgenic plants showed enhanced tolerance against glyphosate applications. The developed transgenic lines can be used as a germplasm in potato breeding programme.

Keywords: Weeds losses, Potato transformation, Glyphosate resistance

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca, desteğini benden esirgemeyen, her türlü destekte bulunan, laboratuvar ekipmanlarından faydalanmamı sağlayıp çalışma imkanı sağlayan, tez çalışmamı yönlendiren her daim yanımda olan danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH'a içtenlikle saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme sırasındaki değerli katkılarından dolayı sayın Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL hocama teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmasında yardımcı bulunan Doç. Dr. Halil TOKTAY hocama teşekkür ederim.

Özellikle laboratuvar ve sera çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Tolga Dinç'e, İlhom Rahamkulov'a, Abdul Naser Amiri'e, Begimay Taalaybek Kızı'na ve Tahira Hussein'e teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yardımları bulunan Nurefşan Cırık'a, Esra Duru'ya ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sonsuz katkıları ve fedakârlıkları olup, bugüne gelmemde de büyük payları olan, bana inanıp güvenen, arkamda olan babam Mustafa Sümer'e ve annem Melda Sümer'e, kardeşlerim Hasan Basri Sümer'e, Aliye Sümer'e ve ikizim Peyami Sümer'e en içten duygularıyla sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca, bu tez çalışmasında TÜBİTAK 115O022 numaralı projeden faydalanılmıştır. Bu projeden faydalanıp bana çalışma imkanı sağlayan sayın değerli hocalarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEZ BİLDİRİMİ.....	iv
ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Bitkilere Gen Aktarımı	8
2.2 Herbisistlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi	11
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT.....	16
3.1 Materyal	16
3.1.1 Bitki materyali	16
3.1.2 Bakteri materyali	16
3.2 Metot.....	16
3.2.1 Besin ortamı ve doku kültürü koşulları	16
3.2.2 <i>Agrobacterium</i> kültürlerinin hazırlanması.....	17
3.2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığı ile patates bitkisine gen aktarımı.....	19
3.2.4 Regenere olan bitkilerin köklendirilmesi.....	21
3.2.5 Histokimyasal GUS analizi.....	22
3.2.6 Köklenen bitkilerin toprağa aktarılması ve toprakta adaptasyonları	22
3.2.7 Aday transgenik patates bitkilerinin moleküler analizleri	22
3.2.7.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	23
3.2.7.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT –PCR).....	25
3.2.7.3 Yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi.....	27
3.2.8 Glifosat uygulaması	27
BÖLÜM IV BULGULAR	28
4.1 <i>Agrobacterium</i> Hücrelerinin Koloni PCR ile Taranması	28

4.2 Patates Hatlarının Agrobacterium Yöntemi ile Genetik Transformasyonu.....	28
4.3 Aday Transgeniklerin Moleküler Analizleri.....	32
4.3.1 Gen aktarımın doğrulanması (PCR analizi).....	33
4.3.2 Histokimyasal GUS analizi.....	34
4.3.3 Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR)	36
4.3.4 Yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi (LFD analizi).....	37
4.3.5 Glifosat uygulaması.....	39
4.3.6 Transgenik T1 patates hatlarının moleküler analizleri	41
BÖLÜM V TARTIŞMA.....	42
BÖLÜM VI SONUÇ	46
KAYNAKLAR	47
EKLER.....	56
ÖZ GEÇMİŞ	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS ortamında bulunması gereken besin maddeleri ve miktarları (Murashige ve Skoog 1962)	17
Çizelge 3.2. GUS seleksiyonunun hazırlanması için kullanılan kimyasallar ve miktarları	22
Çizelge 3.3. PCR ve qRT-PCR çalışmalarında patates bitkisinin Desiree ve Lady Olympia hatlarına ait aday transgenik bitkilerin teyit edilmesi için CP4-EPSPS, GUS ve ChvA geninin primer baz dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyutu	24
Çizelge 3.4. Tek zincirli cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği	26
Çizelge 3.5. qRTt-PCR karışım içeriği	26
Çizelge 3.6. qRTt-PCR sıcaklık döngüsü	26
Çizelge 4.1. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin kullanılan yaprak eksplantlarının kallus ve sürgün verileri	30
Çizelge 4.2. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin kullanılan boğumarası eksplantlarının kallus ve sürgün verileri	30
Çizelge 4.3. PCR analizine göre transformasyon etkinliği	30
Çizelge 4.4. Aday transgenik bitkilere ait PCR, GUS ve LFD analiz sonuçları	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Çeşitli bitki türlerinde (a,b) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> tarafından oluşturulan tümörler.....	8
Şekil 2.2.	<i>Agrobacterium</i> 'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımında olması gereken bölgeler (Özcan vd.).....	10
Şekil 2.3.	EPSPS çalışma mekanizması	11
Şekil 3.1.	pCAMHE-EPSPS vektörünün T-DNA bölgesinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 3.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA4404 ırkından CP4-EPSPS genini içeren bakterilerin LB ortamında çoğaltılması. LB besin ortamındaki çizilmiş bakteri (a), steril edilmiş pipet ucuyla bakteriden koloni alınması (b), LB içine konulan koloni bakteriye rifampisin ve kanamisin antibiyotiklerinin ilave edilmesi ve bir gece için çoğaltılmaya hazırlanmış bakteri (c), bir gece sonra çoğaltılarak hazır olan bakteri (d)	18
Şekil 3.3.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> yöntemi ile CP4-EPSPS geni gen aktarımının görünümü. LBA4404 ırkının pCAMHE-EPSPS plazmidinden CP4-EPSPS geninin aktarılması (a), steril ortamda bitki eksplantların elde edilmesi (b), bitki eksplantlarının LB ortama aktarılması (c), 45 dk bekletildikten sonra eksplantların 3 gün boyunca ko-kültivasyon ortamına alınması (d)	21
Şekil 4.1.	<i>Agrobacterium</i> hücrelerinin koloni PCR ile taranması. 1: negatif kontrol, 2: pozitif kontrol, 3-9: test edilen klonlar, kuyu 10: marker (1 kb plus DNA ladder, Fermentas).....	28
Şekil 4.2.	Lady Olympia ve Desiree çeşitlerinde yaprak ve boğumarası eksplantları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda Glifosat N-(fosfonometil) glisin ile optimize edilmesi	29
Şekil 4.3.	Patates çeşitlerinde bazı genetik transformasyon aşamaları. Her iki ekplantın <i>Agrobacterium</i> ile inokulasyonu (a), seçici jenerasyon ortamında her iki ekplanttan kallus oluşumları (b) (c) (d) (e), aday transgenik sürgün oluşturan kallus (f)	31
Şekil 4.4.	Desiree ve Lady Olympia patates çeşitlerinin genetik transformasyon aşamalarının devamı. Sürgün oluşturan eksplantları seleksiyon ortamına	

	aktarılması (a), sürgünlerin büyümesi (b), sera ortamında dikilmeye hazır köklenmiş bitki (c), sera ortamına dikilen bitki (d)	32
Şekil 4.5.	Lady olimpia ve Desiree aday transgeniklerde GUS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markörü, Fermentas	33
Şekil 4.6.	Lady Olympia ve Desiree aday transgeniklerde CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markör, Fermentas	33
Şekil 4.7.	Lady Olympia ve Desiree transgenikler bitkilerde ChvA geni için PCR sonuçları. (M):1 kb plus DNA markörü, (NK): Negatif kontrol, (P): Pozitif kontrol, <i>Agrobacterium</i> LBA4404 kolonisi, (L): Lady Olympia, (D): Desiree bitkisi.....	34
Şekil 4.8.	Yaprak ve boğumlarından oluşan kesilmiş eksplantların histokimyasal GUS analizi	35
Şekil 4.9.	qRT-PCR analizi ile CP4-EPSPS geninin transgenik bitkilerde kontrol bitkilere oranla kat değişimleri	36
Şekil 4.10.	CP4-EPSPS geni bulunduran transgenik bitkilerde yapılan yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi	37
Şekil 4.11.	Seraya aktarılan bitkilerin herbisit uygulamasından önceki görünümü.....	39
Şekil 4.12.	Seraya ortamında büyüyen bitkilerde glifosat uygulaması, herbisit hazırlanıp bitkiye uygulanması (a), glifosat uygulamasından 5 gün sonra bitkideki tipik belirtiler (b).....	40
Şekil 4.13.	Desiree çeşidinde glifosat uygulamasıyla serada bitkilerden görünüm	40
Şekil 4.14.	Lady Olympia çeşidinde glifosat uygulamasıyla bitkilerden görünüm (a) kontrol bitkisi, (b) uygulamadan sonra LO-515 bitkisinin transgenik durumu, (c) LO-503 bitkisinin belirtisi	41
Şekil 4.15.	Lady Olympia ve Desiree transgenik yumrulardan yapılan CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markör, Fermentas.....	41

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

Kg	Kilogram
Mm	Milimetre
g	Gram
mL	Mililitre
Min/dk	Dakika
m	Metre
°C	Santigrat derece
mg	Miligram
g (rpm)	Yerçekimi (Dakika Başına Dönüş Sayısı)
μl	Mikrolitre
ng	Nanogram
V	Voltaj

Kısaltmalar

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR
LB	Lysogeny Broth
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Vir	Virülens
Ti	Tumour-İnducing (Tümör Oluşturan)
EPSPS	5-Enolpiruvilşikimat-3-Fosfat sentez
hptII	Fosfotransferaz Geni
GUS	β-glukuronidaz
MS	Murashige ve Skoog
NptII	Neomysinfosfotransferaz Geni

BÖLÜM I

GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum L.*) anavatanı Güney Amerika olan tek yıllık bir kültür bitkisidir. Dünyanın yaklaşık hemen her yerinde yetiştirilen patates ülkemiz tarım ve ekonomi açısından da önemli yere sahiptir. Yumrularında; nişasta halinde karbonhidrat, protein, vitaminler ve demir (Fe) gibi önemli besin maddelerini içeren patates, bu yönüyle insanlar tarafından doğrudan yemeklik olarak tüketildiği gibi, yüksek oranda nişasta içeren cips, konserve, alkol, nişasta, pudra, çocuk maması vb. yapımında hammadde olarak ve bir kısmı da havyan yemi olarak kullanılmaktadır. Patates nişastasından salam ve sosis yapımı olarak kullanılması da oldukça yaygındır (Arıoğlu, 2002).

Patatesin besin değerlerinin yüksek olması, fazla verim sağlanması, her çeşit iklimde kolaylıkla yetiştiriciliğinin yapılmasından dolayı bugün ülkemizin hemen her yerinde patates tarımı yapılsa da özellikle Orta Anadolu Bölgesinde yetiştiricilik bakımından önemli bir durumdadır. Ülkemizde patates tarımının yoğun yapıldığı iller Niğde ve Nevşehir olup bunları sırayla Afyon, Kayseri, Bolu, Adana takip etmektedir. Ülkemizde patates üretiminin yaklaşık %75 i bu illerde yapılmaktadır (Anonim, 2017).

Dünyada yaklaşık olarak 40 milyon ha alanda patates tarımı yapılmaktadır. En çok patates yetiştiriciliği yapan ülkeler Çin, Hindistan, Rusya, Ukrayna ve ABD'dir. Çin dünyada tek başına patates üretiminin yüzde 25'ini gerçekleştirmektedir (FAOSTAT, 2016). TÜİK'in 2016 verilerine göre ülkemizde 1 447 056 da alanda, 4 750 000 ton üretim yapılarak, 3.09 ton/da ortalama yumru üretimi meydana gelmiştir. Patates üretimi bakımından ülkemiz dünyada olup 19.sırada yer almaktadır. 2017 yılında 4 800 000 ton üretimi yapılan patates 2016 yılında 4 750 000 ton yapılan üretim ile göre bir önceki yıla göre %1.1 oranında artış göstermiştir. Niğde ilimizde 2016 yılında 237 851 da alanda 892 8297 ton üretilen patatesin Niğde için ortalama verimi 3.751 kg tespit edilerek Türkiye'deki patates üretiminin %19 unu gerçekleştirmiştir. Niğde'nin bir yıl öncesine göre dikim alanlarında yüzde 4,57; üretimde yüzde 32,24 artış olmuştur (Bilgili ve Kadioğlu, 2003; TÜİK, 2016).

Patates tarımında yüksek verimler elde edebilmek için hastalık, zararlı ve yabancı otlarla mücadele büyük önem taşımaktadır .

Ülkemizde geniş alanlarda tarımı yapılan patates bitkisinde birçok hastalık kalite ve verim kaybına neden olmaktadır. En çok görülen fungal hastalıklar; patates mildiyösu (geç yanıklık) (*Phytophthora infestance*), patates siğil (siyah kabuk) (*Synchytrium endobioticum*) hastalığı; bakteriyel hastalıklar; bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearum*), yumuşak çürüklük (*Erwinia carotovora subsp. atroseptica*); viral hatalıklar ise yaprak kıvrıklık virüsü (PLRV), patates Y virüsü (PVY), patates X virüsü (PVX) ve patates A virüsü (PVA) hastalıklarıdır (Bostan ve Demirci, 2010; Brunt ve Loebenstein, 2001). Wang vd. (2011) patatesta virüslerin bulunması halinde üretimde verim kaybının %80' e ulaşabileceğini tespit etmişlerdir. Böylece patates üretiminden verimli sonuçlar almak için tohumluk materyalin virüslerden uzak ari olması gerekmektedir (Çalışkan vd., 2011).

Patates bitkisinin yetiştirildiği alanlarda ise en fazla patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*), patates yaprakbiti (*Macrosiphum euphorbiae*), patates güvesi (*Phthorimaea operculella*), trips (*Thrips tabaci*) , kırmızı örümcek (*Tetranychus urticae*), pis kokulu yeşil böcek (*Nezara viridula*) gibi zararlılar bitkide olumsuz yönde etki göstererek ürün kaybına yol açarlar (Kayapınar ve Kornoşor, 1990).

Yabancı otlar, tarım alanlarında yarardan daha çok zarar veren, yetişmesi istenmeyen, ekili alanlarda ürün kaybına neden olan bitkiler olarak tanımlanır. Kültür bitkileri ile su, ışık, CO₂, mineral maddeler bakımından rekabete girip zarara yol açarlar. Bunun yanında çeşitli hastalık etmenleri ile böceklere konukçuluk ederler (Günca, 2002).

Kültür bitkilerinin yabancı otların etki ettiği rekabetten etkilenmesi ekimden yaklaşık 1-1.5 ay içerisinde olmaktadır. Bu nedenle, rekabetin verdiği zararı en aza indirmek ve yabancı otlarla mücadeleyi etkin kılmak için erken müdahale şarttır (Banaras, 1993).

Yabancı otlarla mücadele yapılmayan patates tarlalarında ürün kaybı %43 oranında tespit edilmiştir (Banaras,1993). Yabancı otlar patates bitkisinde özellikle hasadı zorlaştırıp yumru büyüklüğü ile ve ağırlığının azalmasına neden olarak, birim alandan alınan verim miktarını önemli ölçüde azaltır (Zengin ve Günca, 1993).

Niğde merkezinde yapılan bir çalışmaya göre patates bitkisinde bulunan yabancı otlar genellikle melez horozibiği (*Amaranthus hybridus* L.), sirken (*Chenopodium album* L.), kırmızı köklü tilkikuyruğu (*Amaranthus retroflexus* L.), siyah itüzümü (*Solanum nigrum* L.), kuş çobandeğneği (*Polygonum aviculare* L.) tarla sarmaşığı (*C. arvensis* L.), dağ minesini (*Myosotis arvensis* L.)'dir (Üstüner ve Güncan, 2003).

Yabancı ot mücadelesinde başlıca kullanılan yöntemler kültürel, fiziksel, biyolojik ve kimyasal mücadelelerdir. Kimyasal mücadele yöntemi olarak kullanılan herbisitler diğer mücadele yöntemlerine göre daha kolay uygulanıp, mücadelesi zor olan yabancı otlara daha kolay etki gösterirler (Serim ve Özdemir, 2012; Zoschke, 1994).

Patates bitkisinde yabancı ot mücadelesi için genellikle dikim öncesi ve çıkış sonrası herbisitler tavsiye edilmektedir (Arnold vd., 1997). Çünkü patates rekabet gücü yüksek bir bitki olup, hızlı gelişip hızlı büyüyen ve dikildikten yaklaşık 6 hafta sonra çıkış yapan yabancı otları baskı altına alan bir kültür bitkisidir (Thakral vd., 1989).

Patates tarlasında ekim yapıldıktan 15 gün içerisinde ekili alanın yabancı otlarla bulunması ve 45-49 gün sonra ot mücadelesi yapılmaması durumunda üründe verim artışının olmadığı tespit edilmiştir (Sönmez, 1976). Genellikle yabancı otlar patates bitkisinde büyüme ve gelişme zamanında zarar oluşturmaktadır (Bhan vd., 1970). Scholz (1996), ekili alanda bulunan 100 kg yeşil aksamli yabancı otun üretimde 400 kg ürün kaybına neden olduğu belirlemiştir. Neururer (1968), ise orta derecede yabancı otun bulunduğu bir patates tarlasında %10 oranında bir zararlanma olduğu tespit etmiştir.

Patates bitkisinde yaygın olarak yetişen melez horozibiği, domuz pıtrağı, yabani hardal gibi yabancı otların mücadelesinde kullanılan rimsulfuron ve metribuzin gibi çıkış öncesi ile sonrası kullanılan herbisitlerin mücadelede % 100 etki gösterdiği tespit edilmiştir (Robinson vd., 1996). Patateste sorun olan geniş ve dar yapraklı yabancı otlara karşı metribuzin, pentimethalin, metolachlor gibi çıkış öncesi uygulanan herbisitlerin mücadelede etkili olduğu bildirilmiştir (Zollinger vd., 2006). Ghosh (1998), patateste en yüksek yumru veriminin 4207.2-4261.6 kg/da ile metribuzin ve metolachlor herbisitlerin kullanıldığı parsellerden elde edildiğini rapor etmiştir. Phogat vd. (1991) ise parsellerde aynı çeşit herbisitlerle aynı uygulamayı denemiş ve verimde 302 kg/da artış elde

etmişken; Arnold vd. (1997) ise parsellerinde % 69-81 oranında verim kaybı olduğunu tespit etmişlerdir.

Herbisitlerin etki mekanizmaları zarara neden olan yabancı otların gösterdiği tepkiye ve ekolojik faktörlere göre değişebilmektedir (Medd vd., 2001). Yabancı otlara karşı ilk kimyasal mücadele 1947 yılında MCPA ve 2,4 D- acid dimethylamin herbisitlerinin kullanılmaya başlanması ile başlamıştır (Hopkins, 1989). 1970'li yıllardan itibaren herbisitlerin oldukça fazla kullanımı sonucunda üretim maliyetlerinde dengesiz artışlar, bilinçsiz ve yanlış kullanımı ile çevre kirliliği ve dayanıklılık problemleri gibi sorunlar ortaya çıkmıştır (Cotterman ve Saari, 1992; Doğan vd., 2004; Kudsk ve Streibig, 2003; Reed vd., 1989).

Herbisitlere karşı dayanıklılık problemleri herbisitlerin kontrolsüz bir şekilde ve sürekli olarak uygulanması sonucunda meydana gelmektedir. 1970'li yıllarda dayanıklılık problemleri ilk olarak Washington'da triazine herbisit grubuna karşı dayanıklı *Senecio vulgaris* L. biyotipi olarak bulunan yabancı otun gelişmesiyle ortaya çıkmıştır. Herbisit dayanıklılığı yabancı ot mücadelesinde aynı etki mekanizmasına sahip herbisitlerin devamlı olarak kullanılması sonucu ortaya çıkmaktadır. Herbisitlere karşı dayanıklılıktan ilk olarak Harper, 1956 yılında bahsetmiş ve yabancı otların zamanla herbisitlere karşı dayanıklılık oluşturacağını belirtmiştir (Avcı, 2009).

Günümüzde dünyada 116 geniş yapraklı 85 tek çenekli olmak üzere toplamda 201 adet yabancı ot bitkisinde dayanıklılık çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar ABD, Fransa, Kanada, Avustralya, İspanya, İngiltere gibi ülkelerde yürütülmüştür (Anonim, 2017). Ülkemizde herbisitlere dayanıklılık konusunda ilk çalışma buğday tarlasında yabani yulaf (*Avena sterilis* L.) yabancı otu ile başlamıştır (Uludağ vd., 1997).

Herbisitlere karşı dayanıklılık genel olarak sera saksı denemeleri ve genetik mühendisliği moleküler çalışmalar yoluyla tespit edilebilmektedir (Anonim, 2017).

Genetik mühendisliği ve bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerin herbisitlere dayanıklılık kazandırmak konusunda 3 farklı strateji izlenim göstermektedir. Bunlar, herbisit etkili olduğu enzimi bitkinin fazla üretmesi, herbisit etkili olduğu enzimin yerine aynı görevi yapacak olan başka bir enzimin bitki bünyesine sentezi ve bitki gerekli

olan kendi metabolizma faaliyetlerini arttırıp bünyesi içinde bulunan herbisiti detoksifikasyon yapması sonucunda gerçekleştirmesidir. Bu stratejiler sonucunda herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Moss vd., 2003).

Genellikle bitkilerde gen transfer çalışmaları 1982-1983 yıllarında başlamış ve böylece genlerin etki ve mekanizmaları incelenmiştir (Arı, 2001).

İlk transgenik bitki tütün olup bitkiye antibiyotiğe dirençlilik geni aktarılmıştır (Fraley vd., 1983). 1986 yılında Fransa ve ABD’de tütün bitkisine herbisite dirençlilik geni aktarılmış ve böylece transgenik bitkiler ile ilgili ilk transgenik tarla denemeleri yapılmıştır (James, 2015).

1996 yılında 1.7 milyon hektara ekilen transgenik bitkiler, 2016 yılında 26 farklı ülkede 18 milyon çiftçi tarafından 185.1 milyon hektar alana ekilmiştir. Böylece biyoteknolojik ürünler modern tarım tarihinin en hızlı kabul edilen teknolojisi olarak kabul edilmektedir (ISAAA, 2016).

Bugün dünyada en fazla transgenik bitki ekimi ülke 72.9 milyon hektar ile ABD’dir. Ve sırasıyla Brezilya, Arjantin, Hindistan, Kanada, Çin, Paraguay, Pakistan, Güney Afrika gibi ülkeler takip etmektedir. Kültür bitkileri içerisinde tarım alanı bakımından transgenik olarak en fazla tarımı yapılan bitki 91.3 milyon ha ekimi ile soya bitkisidir. Bu bitkiyi sırasıyla mısır (60.6 milyon ha), pamuk (22.3 milyon ha) ve kanola (8.6 milyon ha) takip etmektedir. 2016 yılında ise toplam 161,9 milyon hektar alanda herbisite dayanıklı bitkilerin tarımı yapılmıştır (ISAAA, 2016).

Bitkilerde günümüzde gen transformasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* olup daha kolay ve ekonomik olması bu yöntemde başarısı şansını arttırmıştır (Özcan ve Özgen, 1996).

Herbisite dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde en sık kullanılan yöntem *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarılan, bitkide ki EPSPS enziminin üretiminden sorumlu gen ile olmaktadır ve böylece total bir herbisit olan glifosat herbisitinin bitkide ki EPSPS enzimini etkileyerek bitkideki gerekli aminoasit sentezini engellemesi önlenir (Padgett vd., 1995).

Dünyada herbisitlere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesi çalışmaları daha önce bazı bitkilerde denenmiş olup patates bitkisinde bu çalışma ilk defa yapılmıştır. Gen aktarımı vasıtasıyla geliştirilen ve böceklerle, Y virüsüne ve glifosata dayanıklı olan New Leaf Plus Russet Burbank patates çeşidi, Monsanto (RBMT22-186) tarafından piyasaya sürülmüş ve daha sonra da piyasadan çekilmiştir (ISAAA, 2017). Bu tez çalışmasının amacı ise tarımsal girdileri azaltmak ve daha iyi yabancı ot mücadelesi yapmak amacıyla genetik transformasyon çalışması kullanılarak CP4-EPSPS genine sahip, glifosat tipi herbisitlere dayanıklı patates hatalarının geliştirilmesidir.

Bugüne kadar herbisitlere dayanıklı bitkilerin geliştirilip elde edilmesinde en çok kullanılan yöntem, *Agrobacterium tumefaciens*'ten aktarılan EPSPS enziminin üretiminden sorumlu, total seçici olmayan bir herbisit olan glifosat herbisitinin bitkide EPSPS enzimini etkileyerek ve böylece bitkinin amino asit sentezin engellemesine engel olan bir gen aktarmakla mümkün olmaktadır. Çünkü *Agrobacterium tumefaciens*'ten izole edilmiş olan CP4-EPSPS geninin glifosat tipi herbisitelere direçli olduğu tespit edilmiştir (Padgett vd., 1995).

1983 yılında Monsanto ve Washington'da ki bilim adamları *Agrobacterium tumefaciens*'ten izole ettikleri CP4-EPSPS geninin glifosat tipi herbisitlere dayanıklılığını tespit etmişlerdir. Monsanto tarafından Roundup Ready adı olarak tescil edilmiş olan soya fasulyesi bitkisine CP4-EPSPS geni aktararak glifosata dayanıklılığı belirlenmiş ve yaygınlaşmıştır. 1986 yılına kadar CP4-EPSPS bitkilerde uygulanmış ve başarı ile sonuçlanıp kabul edilen teknoloji haline gelmiştir. 2005 yılında ilk defa herbisite dayanıklı şekerpancarı ABD, Kanada ve Filipinler gibi ülkelerde onaylanmış olup çeltik ve buğday bitkilerinin halen herbisitlere dayanıklılığı gelişmekte olup fakat henüz kullanıma girmemiştir (Baum vd., 2007; Watrud vd., 2004).

Baird vd. (1971) yılında yeni herbisit olarak tanıtılmış ve 1974 yılında Amerika'da piyasaya sürülmüştür (Baird vd., 1971). Glifosat seçici olmayan, total, geniş spektrumlu, yabancı ot mücadelesi ve bitki kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir herbisittir (Alberdi vd., 1996). Yabancı ot mücadelesi için yapılan işlemler gerekli maliyetlerin azaltılması, toprak neminin korunması gibi avantajlar sağlamaktadır. Böylece, glifosat herbisiti uygulanması daha kolay, ekonomik güvenli olması nedeniyle, dünya çapında

tarım için mükemmel ot kontrolü sağlamaya devam etmektedir (Brookes ve Barfoot, 2008; Duke ve Powles, 2008).

Dünyada çok yaygın olarak kullanılan Roundup Ready herbisitinin aktif maddesi olan glifosat bitkilerde EPSPS (5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentez) enzim sentezini inhibe etmektedir. Fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerinin üretiminden sorumlu olan EPSPS biyokimyasal zorunlu olan bir enzim olup; bunun durdurulması bitkide protein sentezinin engellenip, büyüme ve gelişmenin yavaşlayıp ölümüne neden olmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* CP4 ırkından izole edilmiş olan EPSPS geni CP4-EPSPS olarak isimlendirilmiştir. Şikimat-3-fosfat ve fosfoenolpiruvat (PEP) arasındaki reaksiyonu katalize eden EPSPS enzimi glifosatın bitkideki tek hedef enzimidir (Duke ve Powles, 2008).

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 *Agrobacterium tumefaciens* ile Bitkilere Gen Aktarımı

Dünyada bitkilerde gen aktarım çalışmaları 1982-1983 yıllarında başlamış olup ve bu yıllarda bitkilerde aktarılan genlerin başarı ile sonuçlanması böylece genlerin etki ve mekanizmaları, fonksiyonları incelenmiş olup modern tarımda temel biyolojik araştırmalarda yerini almıştır (Arı, 2001). Günümüzde bitkilere gen aktarım çalışmalarında en çok kullanılan yöntem olan *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi daha kolay, ekonomik ve başarı şansının yüksek olması nedeniyle diğer doğrudan gen aktarım yöntemlerine göre daha avantajlıdır. Daha önce tütün, domates, kolza gibi birçok kültür bitkisinde başarıyla gen transferinin yapıldığı *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi *Rhizobiaceae* familyasının bir türü olup; gram negatif (-) bir bakteridir. Bu bakteri bitkilerin kökboğazlarından enfekte olup buralarda tümör oluşumuna neden olmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996; Zambryski, 1992).



Şekil 2.1. Çeşitli bitki türlerinde (a,b) *Agrobacterium tumefaciens* tarafından oluşturulan tümörler

(www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/agrobacterium) (a)
www.flickr.com/photos/photostream (b) 25.07.2017).

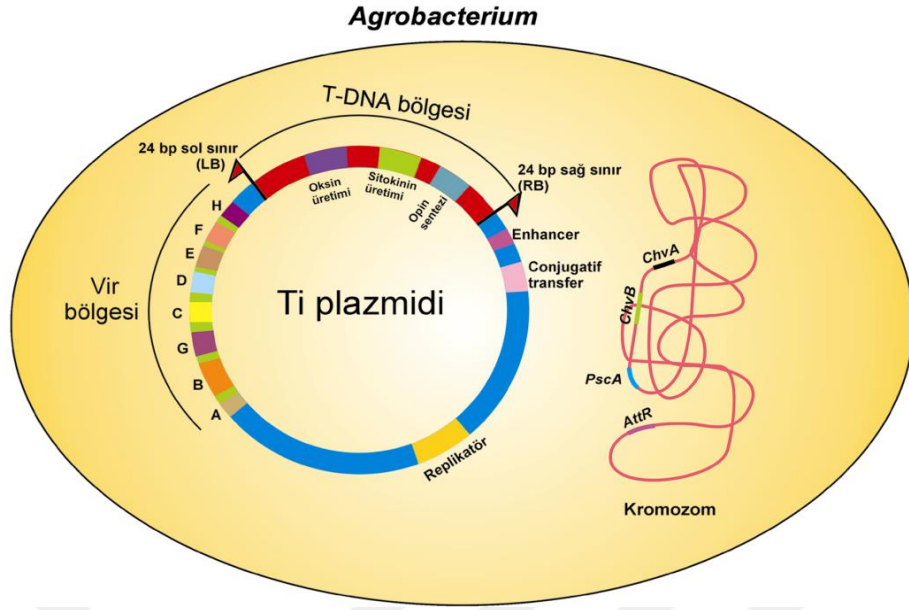
Gen aktarım çalışmaları ile böylece bitkilerde strese, tuza, kuraklığa dayanıklılık; böceklerle ve herbisitlere dayanıklılık gibi bitki gelişiminin değişik aşamalarda kontrolü

gerçekleşmiştir (Glick ve Pasternak, 1998). Tümör oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerin hücrelerine *Agrobacterium*'dan geçmekte olan ve bitki DNA'sıyla etkileşerek birleşen bazı genlerin sebep olduğu belirlenmiştir. *A.tumefaciens*' in kromozomal DNA'sı yanında Ti (tumour-inducing) plazmidi olarak adlandırılan bir plazmit de bulunmaktadır. Ti plazmid, bakterinin bitkiyle etkileşim haline geldiği ettiği sırada T-DNA (transfer-DNA) bölgesi olarak adlandırılan bir DNA parçasının da bakteriden bitki hücresine geçtiği ve böylece bitki kromozomlarıyla birleşti tespit edilmiştir (Chilton vd., 1980; Chilton vd., 1977; Watson vd., 1975). T-DNA bölgesinde oksin ve sitokinin opin genleri bulunmaktadır. *Agrobacterium*, bitki hücresini enfekte edip bu genlerinde etkileşim sağlayarak harekete geçmesiyle bitki hücresinde kontrolsüz bit tümör oluşmaktadır (Özcan vd., 2004).

Agrobacterium tumefaciens bakterisinin bitki hücrelerine gen transferi yapılabilmesi için üç temel bölge bulunmaktadır. Bunlar;

- T-DNA bölgesi,
- virülens (vir) bölge,
- kromozomda bulunan genler

Ti-plazmid üzerinde bulunan T-DNA bölgesinde belirli baz dizinleri bulunup, sağ (RB/right border) ve soldan (LB/left border) 24 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Aktarım çalışmalarında sağ sınırın mutlaka bulunması gerekir ve Ti-plazmid den bitki hücrelerine aktarılan DNA bölgesi sağ ve sol sınırlarda bulunur. T-DNA bölgesinde opin sentezini kodlayan genlerin yanı sıra 2 tane oksin, 1 tane de sitokinin sentezini sağlayan genler bulunmaktadır (Özcan vd., 2004).



Şekil 2.2. *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımında olması gereken bölgeler (Özcan vd.,)

Virülens genlerin olduğu virülant (vir) bölgesinde ise 8 adet gen bölgesi (VirA, B, C, D, E, G, F, H) bulunmaktadır. Bu genler yaralanan bitki hücrelerinden gelen fenolik bileşikleri algılar ve üretmiş oldukları enzim sayesinde T-DNA bölgesini sınırlardan kesmektedir. Böylece, *Agrobacterium*'un bitki hücresine geçişinde ve bitkideki kromozomal genleriyle etkileşim sağlayarak birleşmesinde etkili olmaktadır (Özcan vd., 2004; Zambryski, 1992).

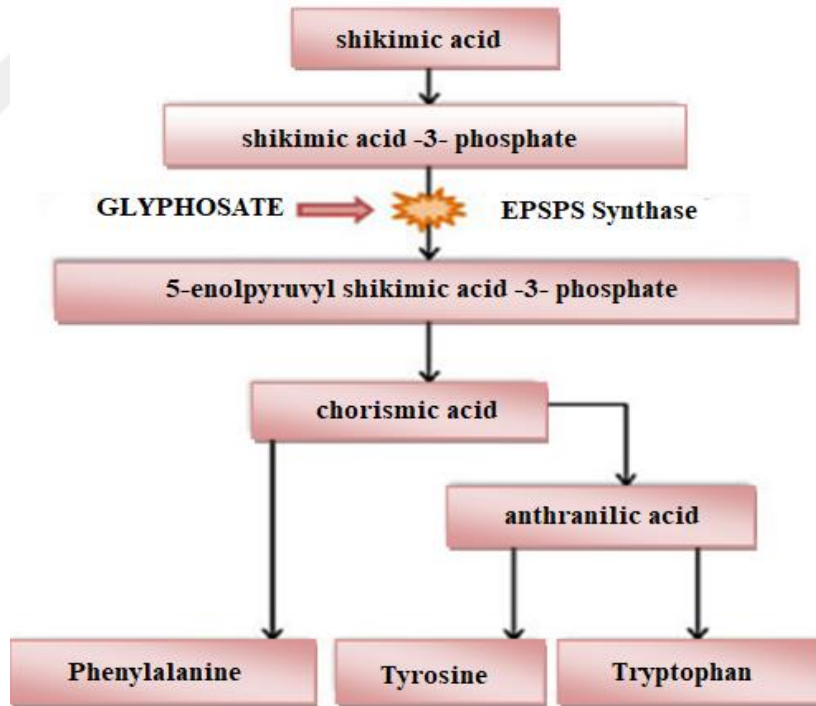
Kromozomların bulunduğu bölge ise *Agrobacterium* bakterisinin kromozomunda bulunan *chvA*, *chvB*, *pscA* ve *attR* genlerinin bulunduğu bölgedir. Bakteri hücresinin bitki hücrelerine bağlanmasını, bakterinin yaralanan bitki dokularında çoğalmasını ve Ti plazmidi üzerinde bulunan *vir* genlerinin düzenlenmesinde bu genler rol oynamaktadır (Douglas vd., 1985; Kado ve Hooykaas, 1991).

Böylece, modern teknolojinin gelişmesiyle birlikte T-DNA bölgesinde tümör oluşumuna neden olan sınırlar içindeki genler kesici enzimler yardımıyla kesilip çıkarılarak bunların yerine herhangi bir canlıdan (bitki, hayvan, mikroorganizma gibi) alınıp izole edilmiştir. Tarım açısından önemli olan bu genler herhangi bir hücreye aktarıldığında *in vitro* şartlarda gelişen hücre ve dokular bu *A. tumefaciens* bakterisiyle etkileşim olmaktadır. Böylece, bir veya birden fazla genler bitki hücrelerine aktarılarak istenilen özellikte transgenik bitkiler elde edilmektedir (Özcan vd., 2004).

2.2 Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

Herbisite dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde en sık kullanılan yöntem *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarılan, bitkide ki EPSPS enziminin üretiminden sorumlu gen ile olmaktadır ve böylece total bir herbisit olan glifosat herbisitinin bitkide ki EPSPS enzimini etkileyerek bitkideki gerekli aminoasit sentezini engellemesi önlenir (Padgett vd., 1995).

Bugüne kadar herbisitlere dayanıklı bitkilerin geliştirilip elde edilmesinde en çok kullanılan yöntem, *Agrobacterium tumefaciens*'ten aktarılan EPSPS enziminin üretiminden sorumlu, total seçici olmayan bir herbisit olan glifosat herbisitinin bitkide EPSPS enzimini etkileyerek ve böylece bitkinin amino asit sentezin engellemesine engel olan bir gen aktarmakla mümkün olmaktadır. Çünkü *Agrobacterium tumefaciens* 'ten izole edilmiş olan EPSPS geninin glifosat tipi herbisitlere dirençli olduğu tespit edilmiştir (Padgett vd., 1995).



Şekil 2.3. EPSPS çalışma mekanizması

Herbisite dayanıklı bitkilerden en önemlileri soya fasulyesi, mısır, pamuk ve kanola olup yabancı ot mücadelesi uygulamalarında tamamen bir deamlılık niteliğindedir. Ticari olarak ilk önce Monsanto GTS 40-3-2 adı verilen ilk herbisite toleranslı CP4-EPSPS

genine sahip soya fasulyesi bitkisini geliştirmiş ve bu dünya çapında benimsenmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* CP4 ırkından izole edilmiş olan EPSPS geni CP4-EPSPS olarak isimlendirilmiştir. Herbisit toleranslı (HT) soya fasulyesi, ilk olarak ticari olarak 1996 yılında yetiştirilmiştir; bunu 1997'de GM HT mısır ve pamuk, 1999'da kanola ve 2007'de şeker pancarı izlemiştir. Dünyada çok yaygın olarak kullanılan Raundup Ready herbisitinin aktif maddesi olan glifosat bitkilerde EPSPS (5-enolpiruvilşikimat-3-fosfatsentez) enzim sentezini inhibe etmektedir. Fenilalanin, tirosin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerinin üretiminden sorumlu olan EPSPS biyokimyasal zorunlu olan bir enzim olup; bunun durdurulması bitkide protein sentezinin engellenip, büyüme ve gelişmenin yavaşlayıp ölümüne neden olmaktadır (Duke ve Powles, 2008).

Haughn vd. (1988), *Arabidopsis*'in chlorsulfuron dirençli mutantından klonlanan ve asetolaktat sentezini kodlayan bir gen Ti plazmid aracılığıyla transformasyon yöntemi ile tütün bitkisine aktarılmış ve bitkideki sülfonilüre herbisitlerine karşı dayanıklılığı tespit edilmiştir. Çalışmada pGV3850 plazmidi ve *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi ile transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar klonlanan genin diğerk bitki türlerinde agronomik olarak yararlı seviyede herbisite dirençlilik kazandırabileceğı tespit edilmiştir.

Lyon vd. (1989), Bitkilere 2,4-D detoksifikasyonunu mümkün kılan bakteri orijinli monooksijenaz enzimi sentezlettirilerek bu herbisite dayanıklı tütün ve pamuk bitkileri geliştirilmiştir.

Smeda vd. (1993), Triazine dayanıklı yabancı otlardan ve sianobakterilerden izole edilen psbA genini tütüne aktararak atrazin herbisitine dayanıklı bitkiler elde etmişlerdir.

Rajasekaran vd. (1996), Asetohidroksiasit sintaz (AHAS) sentezinden sorumlu olan yerli A19 genini pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkilerine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Coker ve Acala pamuk çeşitlerinin eksplantları, A19 geni ile mutasyona uğratılmıştır. Araştırmada imidazolinon ve sülfonilüre herbisitleri sera koşullarında bitkilere uygulanıp Coker eřidinde birçok olumlu sonuç elde edilirken, Acala eřitlerinde ise onda bir verimlilik gözlemlenmiştir.

Mannerl f vd. (1997),  kerpancarı bitkisine *Agrobacterium sp.*'den izole edilen CP4-EPSPS geni ile aynı zamanda bakterilerden izole edilen glifosat oksidaz redüktaz geni (GOX) aktarılmış ve glifosfata karşı yüksek dayanıklılık gösteren  kerpancarı bitkileri geliştirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla yapılan transformasyon çalışmasında glifosat herbisiti olarak Roundup Ready kullanılmış olup bitkide herbisite karşı toleranslık gözlemlenmiştir.

Öktem vd. (1997), Fosfonitrisin asetil transferaz'ın (PAT) sentezinden sorumlu olan bar geni tütün bitkilerine aktarılmıştır. Transformasyon  alı masında, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 su ları ve pDHB321.1 vektörü kullanılmıştır. Gen transformasyon çalışması sonrasında, 4 mg/l derişimde glifosinat amonyum herbisiti denenmiş ve bitkide dayanıklılığı tespit edilmiştir.

Tingay vd. (1997), Arpa bitkisinde *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi ile yaptıkları transformasyon çalışmasında bar geni uygun vektör sayesinde Golden Promise arpa çeşidine aktarılmıştır. Araştırmada herbisite dirençlilik kontrol edlip % 4.2 başarı elde edilmiştir. Bu çalışmanın önemi ise arpa bitkisinde ilk kez *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile genetik transformasyon çalışması yapılmış olmasıdır.

Daniell vd. (1998), Tütün bitkisinde yaptıkları bir çalışmada, petunya bitkisinden izole ettikleri enzim proteini olan EPSPS in mekanizmasından sorumlu geni tütün bitkisinin kloroplastlarına aktararak genin yabancı çeşitlere kaçma riskini ortadan kaldırılmıştır.

En riquez-Obreg n vd. (1998), Fosfinotrisin (PPT) asetiltransferazı kodlayan ve amonyum glifosinata direnç kazandıran bar geninin *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile  ekerkamı ı bitkilerine aktararak amonyum glifosinata dirençli  ekerkamı ı bitkileri geliştirmiştir. Amonyum glifosinata direnç seviyeleri ticari bir herbisit olan BASTA'nın transgenik bitkilere uygulanmasıyla test edilmiştir. Sonuç itibariyle, çalışmada % 10-35 oranında başarıya ulaşılmıştır.

Falco vd. (2000), Brezilya  eker kamı ı (*Saccharum officinarum* L.) bitkisinde yaptıkları çalışmada fosfinotrisin asetiltransferazı kodlayan bar genini pAHC20 plazmidi vektörü ve Copersucar Technology Center' da geliştirilen bir aparat kullanılarak parçacık bombardımanı ile bitkiye transfer edilmiştir. Aktarılan bitkiler genetsin içeren kültür

ortamından seçilmiş ve bitkilerin yaprakları üzerine kanamisin uygulanmıştır. Amonyum glifosfatın ticari bir formülasyonu bitkilere uygulanıp herbisite dirençliliği gözlemlenmiştir. Dirençli bitkilerden PCR analizleri yapıp fosfinotrisin asetiltransferaz ifadesi belirlenmiştir.

Uludağ vd. (1997), Herbisitlere dayanıklılık konusunda buğday bitkisinde yaptıkları bir çalışmada buğdayda problem olan *Avena sterilis* yabancı otunun ACCase inhibitörlerinden clodinafop-propargyl ve fenoxaprop-p-ethyl herbisitlerinin dozlarına karşı dayanıklılığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın önemi ise, ülkemizde herbisitlere dayanıklılık konusunda yapılmış olan ilk araştırmadır.

Hu vd. (2003), *Agrobacterium* suşusundan izole edilen CP4-EPSPS geni *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi buğday bitkisinde aktarılmıştır. Glifosfata dayanıklı transgenik bitkilerin elde edilmesi için yapılan araştırmada bitkiler moleküler çalışmalar ile değerlendirilmiş ve çalışmadan %46 olumlu sonuç alınmıştır. Bu sonuçlar ELİSA testi ile doğrulanmış ve ayrıca Roundup Ready® herbisiti kullanılarak transgenik bitkilerde dirençlilik tespit edilmiştir.

Zhao vd. (2006), *Agrobacterium* metodu ile yapılan transformasyon çalışmasında Aroa-M1 glifosata dirençli geni pamukta Zhongmian 35 çeşidine aktarılmıştır. Moleküler analizler vasıtasıyla aktarılan genin, doğrudan glifosat içeren ortamdan seçilen transgenik pamuk bitkilerinde bulunduğu teyit edilmiştir.

Tan vd. (2006), *Ororobactrum anthropi*' den izole ettikleri GOX geninin bitkilerde glifosfatı detoksifiye etmek için kullanılmıştır. Yine *Streptomyces hygroscopicus* ve *S. viridochromogenes*' ten izole edilen bar ve pat genlerini fosfinotrisin fosfonitrisin N-asetiltransferazı kodlamak için, bitkilere aktarılmış ve böylece glifosinatın detoksifiye edildiğini tespit edilmiştir.

Yi vd. (2007), Herbisite dirençli tatlı patates bitkisi geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada bar genini *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile bitkiye transfer etmişlerdir. Bu amaçla gen aktarım vektörü olarak seleksiyon marker olarak nptII seleksiyon marker genini barındıran pCAMHE-EPSPS vektörü kullanılmıştır. Raportör gen olarak β -glukuronidaz geni (*gusA*) ve seçim için fosfinotrisin (PPT) kullanılmıştır. Transgenik

bitkilerden histokimyasal GUS ve PCR analizleri yapılarak transgenik bitkilerin genomik DNA'sında bar geninin varlığı tespit edilmiştir. Transgenik patateslere Herbisit olarak aminyum glifosanat etken maddesi içeren ticari BASTA herbisiti uygulanarak bitkilerin dayanıklılığı doğrulanmıştır. Transgenik olmayan bitkilerde ise uygulamadan 1-2 hafta sonra yapraklarda sararmalar ve büyümede yavaşlama gözlemlenmiştir.

Kishchenko vd. (2011)'nin, Şekerpancarı (*Beta vulgaris* L.) bitkisinde imidazolinon herbisitlerine karşı dayanıklı bitki geliştirmek için yaptıkları çalışmada, *Arabidopsis thaliana*'dan izole edilen ALS geni *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile şekerpancarına aktarılmış ve plazmid olarak pCB004 vektörü kullanılmıştır. Transgenik şekerpancarındaki ALS geninin ifade düzeyindeki artış RT-PCR analizleri ile doğrulanmış ve genetik dönüşüm oranları %5-8 olarak belirlenmiştir. Sera koşullarında transgenik şekerpancarı bitkilerine imidazolinon tipi (Pursuit BASF) herbisiti uygulanarak transgenik bitkilerdeki dayanıklılık teyit edilmiştir.

Ren vd. (2015), Glifosfata dayanıklı mısır bitkisini geliştirmek için bakteri kökenli EPSPS enzimini kodlayan AM79 aroA genini modifiye ederek bitkide ifade olabilecek mAM79 isimli yeni bir sentetik gen oluşturulmuştur. mAM79 sentetik genini pM3301UbiSpAM79 isimli bitki ifade vektörüne klonlamıştır. mAM79 geni *Agrobacterium* aracılığıyla olgunlaşmamış mısır embriyolarına aktarılmıştır. Seçici besin ortamında toplamda 74 bitki elde edilmiş ve transgenik bitkilerde yapılan PCR analizleri sonucunda tamamının mAM79 genini barındırdığı belirlenmiştir. Glifosat uygulaması sonucunda transgenik olmayan tüm mısır bitkileri ölürken, transgenik mısır hatları AM85 ve AM72 glifosatın yaygın kullanım dozunun 4 katına dayanıklılık gösterebilmiştir.

Zhang vd. (2017), EPSPS sentezini kodlayan yeni G2-aroA genini *Agrobacterium* bakterisi (LBA4404 ırkı) aracılığıyla pamuk K132 çeşidine aktarmışlardır. Yapılan PCR ve Southern emdirim yöntemleriyle G2-aroA geninin transgenik bitkilerin kromozomlarına entegre olduğu ayrıca, Western emdirim analizleri sonucunda bu genin protein seviyesinde anlatım yaptığı ispatlanmıştır. Glifosat uygulaması sonrasında transgenik pamuk bitkilerinin glifosata yüksek seviyede direnç gösterdiği belirlenmiştir. Hatta 45 mmol L-1 konsantrasyonun glifosat uygulamasında dahi transgeniklerin yavaştan olsa büyüebildiği gözlemlenmiştir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

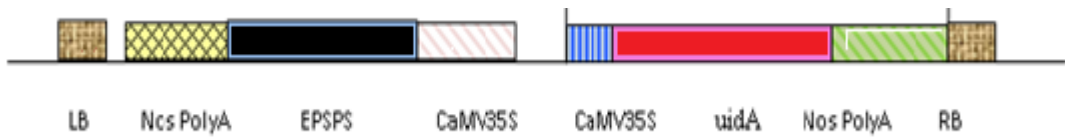
3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Transformasyon çalışmasında bitki materyali olarak Lady Olympia ve Desiree adlı iki patates çeşidi kullanılmıştır. Her iki çeşit de yumru bakımından büyük olup patates ekilen bölgelerde üstün kalite ve verime sahiptirler. Çalışmada yaprak ve boğum araları eksplant olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Bakteri materyali

Bu çalışmada gen aktarım vektörü olarak, CP4 enopiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geninin mutant versiyonunu içeren pCAMHE-EPSPS bitki ifade vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu vektör daha önce TÜBİTAK tarafından desteklenen “Herbisite Toleranslı Patates Hatlarının Geliştirilmesi ” isimli çalışma kapsamında geliştirilmiştir. pCAMHE-EPSPS bitki ifade vektörü GUS-INT genini de içermektedir. pCAMHE-EPSPS bitki ifade vektöründeki T-DNA bölgesi 35S promotör ve nos terminatör tarafından yönetilmektedir. Gen aktarımı için *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404 suju kullanılmıştır.



Şekil 3.1. pCAMHE-EPSPS vektörünün T-DNA bölgesinin şematik gösterimi

3.2 Metot

3.2.1 Besin ortamı ve doku kültürü koşulları

Doku kültürü şartlarında yapılan çalışmada büyüme ortamı olarak % 3 sakkaroz ve ve % 0,8 agar içeren MS besin ortamı (MS0) kullanılmıştır (Çizelge 3.1.) (Murashige ve Skoog 1962). Besin ortamları distile su ile hazırlanmış ve değişen duruma göre besin ortamlarına

farklı konsantrasyonlar da bitki büyüme düzenleyicileri (2 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 2 mg/l Trans zeatin ve 0,1 mg/l GA3+ 1.5 mM PMG) ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra otoklavda tutularak steril edilmiştir. Tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Kullanılacak olan kaplar, metal araç-gereç ve ekipmanların hepsi otoklavda steril edilmiştir.

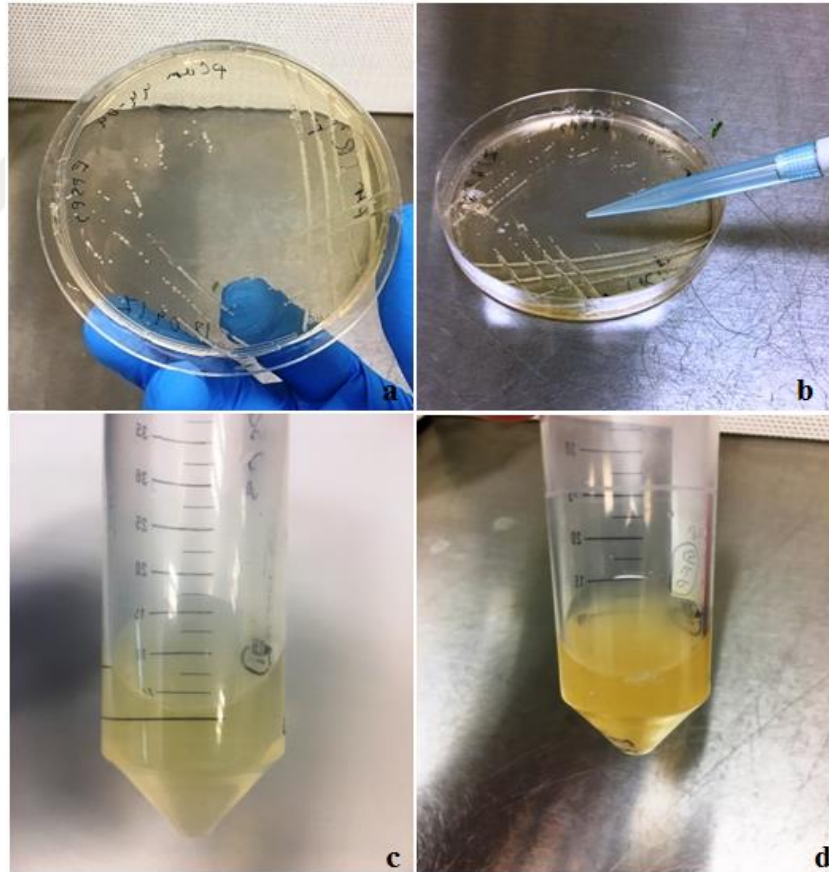
Çizelge 3.1. MS ortamında bulunması gereken besin maddeleri ve miktarları (Murashige ve Skoog 1962)

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

3.2.2 Agrobacterium kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan bakteri materyali olan -80°C'de bekletilen *A. tumefaciens* LBA4404 hatları gliserol stoklardan alınmış 10 ml'lik steril tüplerde, sıvı LB (Lysogeny broth) besin ortamı içine koyulup 28°C'de, 200 rpm'de çalkalanarak bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültürlerinden örnekler alınmış ve koloni elde etmek için petri kapları içerisine koyulup LB besin ortamına eklenmiştir. Ardından 28°C sıcaklıkta 24-48 saat süreyle saat inkübe edilmiştir. Besi ortamı üzerinde çok sayıda koloni

gözlemlenmiş ve bunların birkaç tanesi koloni PCR yöntemiyle taranmıştır. Rastgele seçilen kolonilerden küçük bir parça alınıp, CP4-EPSPS geninin iç bölgesini çoğaltmak için IF ileri ve IF geri primerlerini kullanarak koloni PCR yapılmıştır. Bu amaçla, kalıp DNA olarak bir miktar koloni, 0,5 μ M IF ileri primer, 0,5 μ M IF geri primer, 100 μ M dNTP, 1 $\times$ PCR tamponu (50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂ ve 10mM Tris-HCl) ve 1 U Taq DNA polimeraz içeren toplam 20 μ l hacimli karışım hazırlanmıştır. Karışım 94 °C’de 4 dk ön ısıtmaya maruz bırakıldıktan sonra, 35 döngü olacak şekilde 94 °C’de 40 sn, 55 °C’de 40 sn ve 72 °C’de 1 dk inkübe edilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünü %1 agaroz jelde koşturulmuş ve UV-ışığı altında görüntülenmiştir. Daha sonra pozitif olarak belirlenen koloniler seçilerek 50 μ g/ml Kanamisin ve 50 μ g/ml Rifampisin içeren sıvı LB besi ortamına inoküle edilmiş ve 28 °C’de, 200 rpm devirde shakerda çalkalanarak bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyütülen bu bakteriler gen aktarımında kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyonda kullanılan antibiyotikler -20°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. *Agrobacterium tumefaciens*’in LBA4404 ırkından CP4-EPSPS genini içeren bakterilerin LB ortamında çoğaltılması. LB besin ortamındaki çizilmiş bakteri (a), steril edilmiş pipet ucuyla bakteriden koloni alınması (b), LB içine konulan koloni bakteriyeye rifampisin ve kanamisin antibiyotiklerinin ilave edilmesi ve bir gece için çoğaltılmaya hazırlanmış bakteri (c), bir gece sonra çoğaltılarak hazır olan bakteri (d)

3.2.3 *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile patates bitkisine gen aktarımı

Patates transformasyon işlemi gerçekleştirilmeden önce, patates çeşitleri genetik transformasyon için Glifosat N-(fosfonometil) glisin ile konsantrasyonu optimize edilmiştir. Bitki çeşitlerinin yaprak ve boğumarası eksplantları, farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM ve 3,0 mM) glifosat içeren MS besi ortamında 2 hafta süreyle standart büyütme koşullarında kültüre alınmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Glifosat konsantrasyonu 1 mM üzerinde olan MS besi ortamında ekplantlarda kararma ve nekrosiz gözlenirken; glifosat konsantrasyonu 1,5 mM olan MS besi ortamında 2 hafta büyüme sonrasında ekplantlarda kısmi ölümlerin meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.). Daha sonra yapılan uygulamalar sonrası patates çeşitlerinin transformasyonu için en uygun glifosat konsantrasyonunun 1,5 mM olduğu bulunmuştur.

Agrobacterium tumefaciens aracılığı ile patatese gen aktarım aşağıdaki aşamalar şeklinde olmuştur.

1. pCAMHE-EPSPS plazmid vektörlerini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı, 50 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin içeren 10 ml LB sıvı besin ortamı içerisinde bir gece boyunca büyütülmüştür.
2. Büyütülen LB besi ortamı, ko-kültivasyon için katı MS bitki besin ortamı (% 3 sakkaroz ve % 0,8'lik agar ile katılaştırılan MS mineral tuz) ve patates seleksiyon için seçici rejenerasyon ortamı olan RSM2 ortamı [2 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 2 mg/l trans zeatin ve 0,1 mg/l GA3, 1.5 mM PMG, 500 mg/l sulcid] kullanılmıştır.
3. Bitkilerden uygun büyüklükteki yapraklar ve boğumarası steril kabin içerisinde kesilmiş ve üzerine 2 ml CP4-EPSPS genini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattına ait sıvı bakteri süspansiyon eklenerek 45 dk süreyle ara ara hafif çalkalanarak inokülasyon yapıp bekletilmiştir.
4. Bekletilip inoküle edilen eksplantlar daha sonra katı ko-kültivasyon ortamına aktararak 3 gün boyunca 25 °C ± 2 °C arasında sıcaklık, 16 saatlik ışık kapasiteli ve 8 saat karanlık bir fotoperiyot ve 47 µmol/m²/s ışık yoğunluğuna sahip olan büyütme kabininde ko-kültivasyon ortamında tutulmuştur.

5. Üç gün sonra eksplantların steril kabin içerisinde steril saf su ve 1000 mg/L sulcid antibiyotiği kullanılarak 15 dk yıkama işlemi yapılmış ve steril kağıt üzerinde kuruması sağlanmıştır. Bu yıkama işlemi ise ko-kültivasyonda tutulan ve eksplantlarda bulunan bakterilerin ortamdan uzaklaştırmak için yapılmıştır.
6. 15 boğumarası + 15 yaprak olacak şekilde eksplantlar RSM2 seleksiyon ortamına 3 tekerürlü olacak şekilde aktarılmıştır. Ve büyütme kabininde tutulmuştur.
7. Yaklaşık 3 ay sonra yapraklardan ve boğumalarından oluşan kallus ve sürgünlerin sayımı yapılmış ve rapor edilmiştir.
8. Gelişen transgenik aday sürgünleri daha sonra 2 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 2 mg/l trans zeatin ve 0,1 mg/l GA3 ve 1000 mg/l sulcid içeren MS besin ortamında magenta kutularına aktararak 25 °C $\pm$ 2 °C arasında sıcaklık, 16 saatlik ışık kapasiteli ve 8 saat karanlık bir fotoperiyot ve 47 μ mol/m²/s ışık yoğunluğuna sahip olan büyütme kabininde köklendirilmiştir.
9. Köklendirilmiş sürgünler (10-15 cm) dış ortama alıştırmak amacıyla 3:1 oranında torf ve perlit içeren saksılara şaşırtılarak sera ortama aktarılmıştır.
10. Sera ortamda geliştirilmiş bitkilerden yaprak örnekleri alınarak PCR analizi, protein testi gibi deneyler yapılarak trasgenik bitkiler tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile CP4-EPSPS geni gen aktarımının görünümü. LBA4404 ırkının pCAMHE-EPSPS plazmidinden CP4-EPSPS geninin aktarılması (a), steril ortamda bitki eksplantların elde edilmesi (b), bitki eksplantlarının LB ortama aktarılması (c), 45 dk bekletildikten sonra eksplantların 3 gün boyunca ko-kültüvasyon ortamına alınması (d)

3.2.4 Regenere olan bitkilerin köklendirilmesi

Yaprak ve boğumarası üzerinden gelişip büyüyen sürgünler farklı konsantrasyonlara sahip BAP (2 mg/l), NAA (0.2 mg/l), GA3 (0.1 mg/l), Trans-zeatin (2 mg/l) ve 1.5 mM içeren MS ortamlarında büyütülüp kök ve sürgün oluşumları gözlemlenmiştir.

3.2.5 Histokimyasal GUS analizi

Transformasyon çalışmasında pCAMHE-EPSPS plazmidinin T-DNA bölgesi GUS içermektedir. Aday transgenik bitkilerden yaprak diskleri alınıp GUS seleksiyonu kullanılarak analiz yapılmıştır. Ve böylece aday transgenik bitkilerin kontrol tespiti nispeten kolay olmaktadır. GUS analizi Jefferson (1987)' in tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Analiz için bitki dokuları X-GLUC (100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5 bromo-4 chloro 3 indolyl glucoronide) içeren solüsyonda yaprak diskleri solüsyon içine batırılıp daldırılarak tüplere yerleştirilip, 37°C'de 12 saat inkübe edilmiş ve meydana gelen mavi renk değişimi gözlemlenmiş olup çözeltinin ortamdan uzaklaştırılması için tüplere %70 lik ethanol eklenmiştir. Daha sonra mikroskopta gözlenen eksplantların görüntüsü alınmıştır.

Çizelge 3.2. GUS seleksiyonunun hazırlanması için kullanılan kimyasallar ve miktarları

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

3.2.6 Köklenen bitkilerin toprağa aktarılması ve toprakta adaptasyonları

Transformasyon sonucu köklenen bitkiler yaklaşık 10-15 cm boya geldiğinde köklerin zedelenmemesi için büyüme ortamlarından dikkatlice çıkarılmıştır. Çeşme suyu ile iyice yıkanıp temizlendikten sonra 1:1:1 oranında torf ve perlite hazırlanan karışıma aktarılmıştır. Toprağa aktarılan bitkiler zamanla sık sık kontrol edilmiş ve sera şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır.

3.2.7 Aday transgenik patates bitkilerinin moleküler analizleri

Rejenerasyon seleksiyon ortamında büyüyen aday transgenik bitkiler sulcid ve BAP, NAA, Trans-zeatin ve GA3 besin ortamlarında köklendirildikten sonra saksılara aktarılmıştır. Aday transgenik bitkilerin kontrol edilebilmesi için moleküler analizler yapılarak sonuçlar belirlenmiştir.

3.2.7.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

DNA izolasyonu

Aday transgenik bitkilerin belirlenmesi için genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Serada bulunan örnek bitkilerden genç yapraklar alınmış ve sıvı azot ile parçalanarak 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur. DNA izolasyonu için protokole göre hazırlanan tampon çözeltiden her örnek için tüplere 500 µl eklenmiştir. Örnekler 65 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra tüplerin her birine 500 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 15 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üst faz çekilip supernant kısım yeni hazırlanan 1.5 ml'lik tüplere aktarılmış ve üzerine 600 µl izopropnal eklenmiştir. Tekrar 15 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılarak tüplerdeki sıvı kısım dökülerek 600 µl %70'lik etanol eklenmiştir. 10 dk 14000 rpm'de santrifüj yapıp tüplerdeki etanol döküldükten sonra streil kabinde tüplerdeki pelet kısım kurutulmuştur. Kuruyan tüpelere 60 µl Tris-EDTA buffer ve 2 µl RNase eklenmiştir. 65°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 10 dk 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Üst kısım 1.5 ml' lik yeni tüplere aktararak DNA miktarları spektrofometre (BioSpec-SHIMADZU) yöntemi ile ölçülmüş ve örnekler -20°C'de saklanmıştır.

Primer Dizileri

Transgenik patetes bitkilerini belirlemek amacıyla PCR analizi yapılmıştır. CP4-EPSPS genlerinin çoğaltımında kendine özgü ve tez çalışmasında kullanılan primerler Çizelge 3.3. de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR ve qRT-PCR çalışmalarında patates bitkisinin Desiree ve Lady Olympia hatlarına ait aday transgenik bitkilerin teyit edilmesi için CP4-EPSPS, GUS ve ChvA geninin primer baz dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyutu

Primer adı	Primer dizisi	Bağlanma sıcaklığı	Ürün boyutu (bp)
IF İleri	5'- TCTCGCTAGCGGTGAAACTC -3'	55°C	430
IF Geri	5'- TTGAGCGGAAGCCATAGGT -3'		
GUS-F	5'- CCCTTACGCTGAAGAGATGC-3'	54°C	362
GUS-R	5'- GAGCGTCGCAGAACATTACA-3'		
ChvA-F	5'- CGAAACGCTGTTTCGGCCTGTGG-3'	65°C	890
ChvA-R	5'- GTTCAGCAGGCCGGCATCCTGG-3'		
EPSPS-F (qRT-PCR)	5'- CTTCCGCTCAGGTGAAGTCC-3'	55°C	120
EPSPS-R (qRT-PCR)	5'- GTTAGCACCGAAACCCTGGA-3'		

Patates bitkisinden izole edilen DNA örnekleri CP4-EPSPS genlerinin varlığı kanıtlanması için PCR analizleri ile test edilip belirlenmiştir. Kullanılacak olan primerler hazırlanmış ve reaksiyon karışımı için gen spesifik primerler kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı, 1X PCR Buffer (50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂ ve 10mM Tris-HCl)- (7.5 µl mix Mm Buffer µl), 0.5 µl ileri primer (50 pmol/ul), 0.5 µl geri primer (50 pmol/ul), 1 µl genomik DNA (50 ng/ul) ve 10.5 µl ddH₂O ile 1 U Taq DNA polimeraz kullanılarak 20 µl toplam hacimde olacak şekilde hazırlanmış ve 0.2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Tespit edilen PCR sonuçları, jel elektroforez yöntemi ile teyit edilmiştir. Bunun için %1 agaroz jel ve 0.5X TBE (Tris- borat EDTA) tamponu kullanılmıştır. Hazır edilen %1'lik agaroz (3 gr agaroz; 300 ml 0.5XTBE buffer) 0.5X TBE çözeltisi içerisinde konularak yaklaşık 3 dk mikrodalga fırınında eritilmiş ve ardından 50-60°C ye kadar soğutularak DNA'nın UV'de görüntülenebilmesi için 20 µl etüdyum bromit eklenmiştir. Sonrasında tankın her iki tarafıda bantlanmış ve ikili tarak kullanılıp tampon çözelti dökülmüştür. Yaklaşık 20 dk bekledikten sonra sertleşen jelden tarak ve bantlar çıkarılıp 8 µl örnekler eklenmiş ve 100 V/cm gerilimde 45 dk koşturulmuştur. Daha sonra koşturulan jel UV lambası üzerine konulup kontrol edilerek fotoğraflanmış ve sonuç belirlenmiştir.

3.2.7.2 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT –PCR)

RNA İzolasyonu

Yaprak disklerinden alınan örnekler -80 °C’de bekletilmiş ve sıvı azot ile parçalanıp 2 ml’lik tüplere konulmuştur. Her tüpteki örneğe 1000 µl trizol eklenmiş vorteks yapılıp karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Arkasından 10 dk 14000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üst kısım alınıp yeni hazırlanan 1.5 ml’lik tüplere aktarılmıştır. Tüpteki örnekler 400 µl kloroform eklenip karıştırıldıktan sonra 5-7 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. 15 dk 14000 rpm’de santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım alınarak tekrar yeni hazırlanan 1.5 ml’ lik tüplere aktarılmıştır. Yeni hazırlanan tüpteki örnekler 500 µl izopropanol eklenmiştir. 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dk 11000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Sonra tüplerdeki sıvı kısım dökülüp pelet kısmın kuruması için 10 dk streil kabinde bekletilmiştir. Örnekler kurutulduktan sonra tüplere 100 µl DEPC suyu eklenmiştir. İyice karışıldıktan sonra RNA miktarları spektrofometre (BioSpec-SHIMADZU) yöntemi ile ölçülmüş ve örnekler -20°C’de saklanmıştır.

cDNA Sentezi

RNA’dan cDNA sentezi, Fermentas cDNA synthesis kiti kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen RNA’nın çöktürülmesi için %75’lik alkol ile iki kez yıkanmış ve RNA örneklerinden DNA’nın uzaklaştırılması için DNaz I kullanılmıştır. Toplam miRNA’lardan cDNA sentezi için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Yapılmış olan çalışmada miRNA ve hedef genin ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla gerekli olan protokol uygulanmış olup miRNA’lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve ardından qRT –PCR analizi yapılmıştır. Toplam miRNA’lardan cDNA sentezi için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım için ilk olarak 1 µg toplam RNA (DNaz uygulanmış), 1 µl oligo dT primer (1000 µM) ve 12 µl’ye tamamlayacak hacimde DEPC suyu uygulanmıştır. Daha sonra bu karışım, 70 °C’de 5 dk inkübe edilmiş ve 1-2 dk buz üzerine alınarak soğutulmuştur. Soğutulan karışım üzerine 4µL 5× reaksiyon buffer, 1µl ribonukleaz inhibitör (20U/µl) ve 2µL dNTP karışımı (10mM) eklenmiştir. Ve arkasından 37 °C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Karışıma 1µl H minus M-MuLV ters transkriptaz (200U/µL) eklenmiş ve karışım 42 °C’de 60 dk inkubasyon yapılarak böylece cDNA sentez işlemi gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.4. Tek zincirli cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği

İçerik	Kullanılan miktar
RNA (85 ng/μl)	1 μl
Oligo dT Primer (0.5 ug/ml)	1 μl
5X Reaksiyon Buffer	4 μl
RiboLock RNases İnhibitörü(20U/ul)	1 μl
dNTPs (10mM)	2 μl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ul)	1 μl
Toplam hacim	20 μl

Reaksiyonun son aşamasında ise karışım 70°C’de 10 dk bekletilmiş ve cDNA örnekleri gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi için 1:10 seviyesinde seyreltilmiştir. Aday transgenik bitkilerde CP4-EPSPS geninin ifade düzeyini belirlemek gerçek-zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizi yapılmıştır. Aday transgenik bitkiler için qRT-PCR çalışması 2 teknik tekrarlamalı olarak yürütülmüş ve analizden sonra sadece tek bir PCR ürünü oluşup oluşmadığını kontrol etmek için erime eğrisi analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.5. qRTt-PCR karışım içeriği

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

Çizelge 3.6. qRTt-PCR sıcaklık döngüsü

İşlev	Sıcaklık(°C)	Süre
DNA denatürasyonu	95	15 dk
DNA denatürasyonu	95	10 sn
Primer bağlama	60	15 sn
Yeni DNA zincir sentezi	72	20 sn

Sıcaklık döngüsü 95°C’de 15 dk inkübasyon, ardından 40 döngü olacak şekilde, 95 °C’de 10 sn, 55 °C’de 15 sn, 72 °C’de 20 sn inkübasyon yapılmıştır. Erime Eğrisi analizi için PCR örnekleri 70 °C’den 99 °C’ye kadar 1 °C/dk olacak şekilde inkübe edilmiştir. Böylece PCR ürünlerinin erime sıcaklıkları tespit edilmiştir. qRT-PCR analizi çalışmaları Rotor-Gene Q cihazı (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. Cihazın kendi otomatik yazılımı

sayesinde her bir örneğin Ct değeri ile birlikte bunlara ait standart sapma ve standart hata değerleri belirlenmiştir. Her bir aday transgenik bitkideki CP4-EPSPS geninin kontrol bitkideki (transgenik olmayan) CP4-EPSPS genine göre oransal ifade düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplama yöntemine göre belirlenmiştir.

3.2.7.3 Yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi

Aday transgenik patates bitkilerinde CP4-EPSPS geninde protein seviyesi oranının belirlenmesi için yaprak disklerinden örnekler alınmış QuickStix™ Kit for Roundup Ready Plant Tissue (Envirologix AS010 LS) kiti kullanılarak protein analizi yapılmıştır. Protein analizi için alınan yaprak diskleri kitte bulunan tüpler içine konularak üzerine kitte tarif edildiği gibi 200 µl ekstraksiyon tamponu ilave edilmiştir. Protein testi için kitte tarif edilen uygulamalar yapılarak ölçümler belirlenmiştir.

3.2.8 Glifosat uygulaması

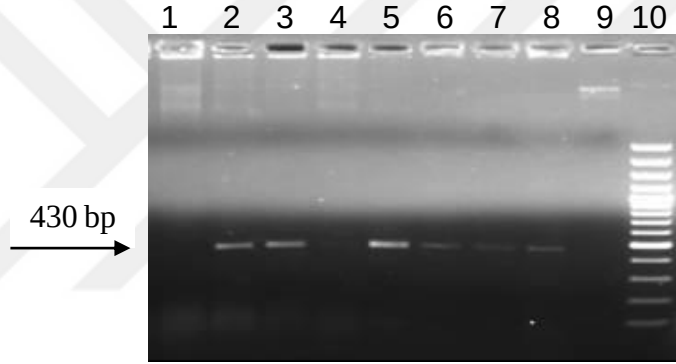
Serada büyütülen aday transgenik bitkilerden CP4-EPSPS geninin glifosata dayanıklılığını belirlemek için bitkileri her birine glifosat herbisiti uygulanmıştır. Glifosat uygulaması için glifosat etken maddesi içeren (441 g/l) ticari Roundup STAR (Monsanto) yabancı ot ilacı olan herbisit kullanılmıştır. Kullanılan herbisit konsantrasyonu firmanın etikette belirttiği gibi uygulanmıştır.

BÖLÜM IV

BULGULAR

4.1 *Agrobacterium* Hücrelerinin Koloni PCR ile Taranması

Çalışmada bakteri materyali olan -80°C’ de bekletilen *A. tumefaciens* LBA4404 hatları gliserol stoklardan alınmış ve çoğaltılarak LB besin ortamına eklenmiştir. Besin ortamında koloni oluşumu gözlemlenmiş ve oluşan kolonilerden koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR yöntemiyle taranan bakteri kültürlerinden sonuç olarak 6 adet pozitif koloni tespit edilmiştir. Jelde görüntülenen kolonilerden birkaç tanesi seçilip transformasyon işlemi için LB besin ortamında çoğaltılmıştır.

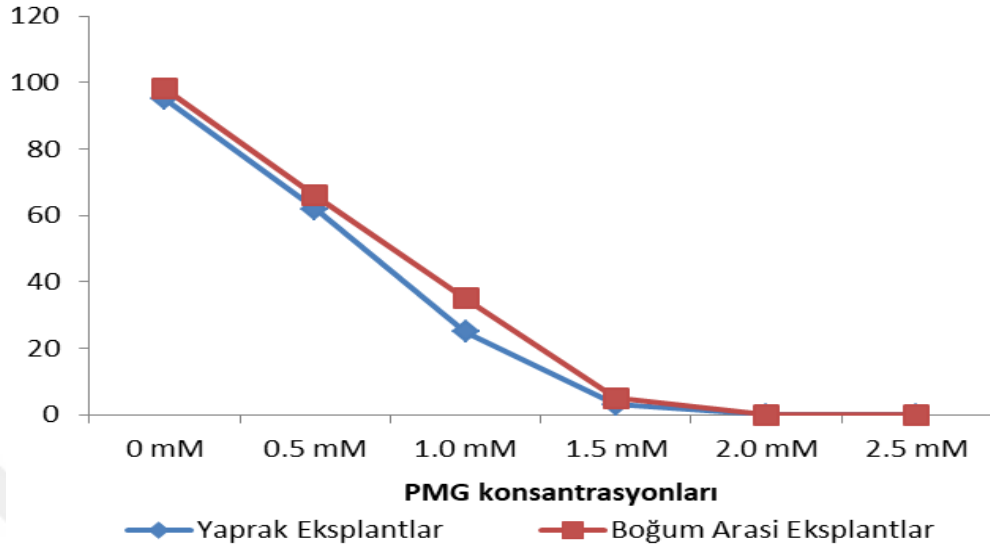


Şekil 4.1. *Agrobacterium* hücrelerinin koloni PCR ile taranması. 1: negatif kontrol, 2: pozitif kontrol, 3-9: test edilen klonlar, kuyu 10: marker (1 kb plus DNA ladder, Fermentas)

4.2 Patates Hatlarının *Agrobacterium* Yöntemi ile Genetik Transformasyonu

Patates çeşitleri genetik transformasyonu çalışması için optimum glifosat dozu belirlenmesi için Lady Olympia ve Desiree çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitlerin yaprak ve boğum arası eksplantları, farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM ve 3,0 mM) glifosat içeren MS besi ortamında 2 hafta süreyle standart büyüme koşullarında kültüre alınmıştır. Glifosat konsantrasyonu 1 mM üzerinde olan MS besi ortamında ekplantlarda kararma ve nekrosiz gözlenirken; glifosat konsantrasyonu 1,5 mM olan MS besi ortamında 2 hafta büyüme sonrasında ekplantlarda kısmi ölümlerin meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Daha sonra yapılan

uygulamalar sonrası patates çeşitlerinin transformasyonu için en uygun glifosat konsantrasyonunun 1,5 mM olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.2. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerinde yaprak ve boğumarası eksplantları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda Glifosat N-(fosfonometil) glisin ile optimize edilmesi

Transformasyon çalışmasında kullanılan Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinden yaprak diskleri ve bitki boğum araları alınarak transformasyon işlemi yapılmıştır. Transformasyon çalışmasının ardından bitkiler büyütme kabinlerinde bekletilmiş böylece aktarılan genin bitki hücrelerinin kromozomlara bağlanmasıyla kallus oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kallus oluşturan eksplantlardan 20-30 gün sonra sürgün oluşumu tespit edilip büyüyen transgenik adayı sürgünlerin sayımı yapılmıştır. Kallus oluşturmeyen bitki hücrelerinde ise 1 hafta sonra kararma gözlemlenmiş ve karamanın devamı gerekçesiyle kallus oluşturmadağı tespit edilmiştir. Kallus oluşturup sürgünlenen transgenik adayı bitkiler BAP (2 mg/l), NAA (0.2 mg/l), GA3 (0.1 mg/l), Trans-zeatin (2 mg/l) ve 1.5 mM içeren MS ortamlarında büyütölüp köklendirilmiştir. Köklenen sürgünler toprağa aktararak sera ortamında büyütölmüştür. Saksıya aktarılan transgenik adayı bitkiler sık sık takip edilerek sulama ihtiyacı karşılanarak iyi bir şekilde büyüdüğü gözlemlenmiştir. Çalışma sonunda aday transgenik bitkilerde kallus ve sürgün oluşumu ile ilgili veriler Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.’de toplanmıştır.

Çizelge 4.1. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin kullanılan yaprak eksplantlarının kallus ve sürgün verileri

RSM Ortamı	BAP 2 mg/l + NAA 0,2 mg/l+ Trans zeatin 2 mg/l + GA3 0,1 mg/l+ PMG 1.5 mM			Köklenme oranları
	Eksplant Sayısı	Kallus Oluşumu (%)	Ortalama Sürgün/Eksplant Sayısı	
Lady Olympia	400	75	2.00	% 100
Desiree	400	70	2.33	% 100

Çizelge 4.2. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin kullanılan boğumarası eksplantlarının kallus ve sürgün verileri

RSM Ortamı	BAP 2 mg/l + NAA 0,2 mg/l+ Trans zeatin 2 mg/l + GA3 0,1 mg/l+ PMG 1.5 mM			Köklenme oranları
	Eksplant Sayısı	Kallus Oluşumu (%)	Ortalama Sürgün/Eksplant Sayısı	
Lady Olympia	600	76	1.4	% 100
Desiree	600	75	1.5	% 100

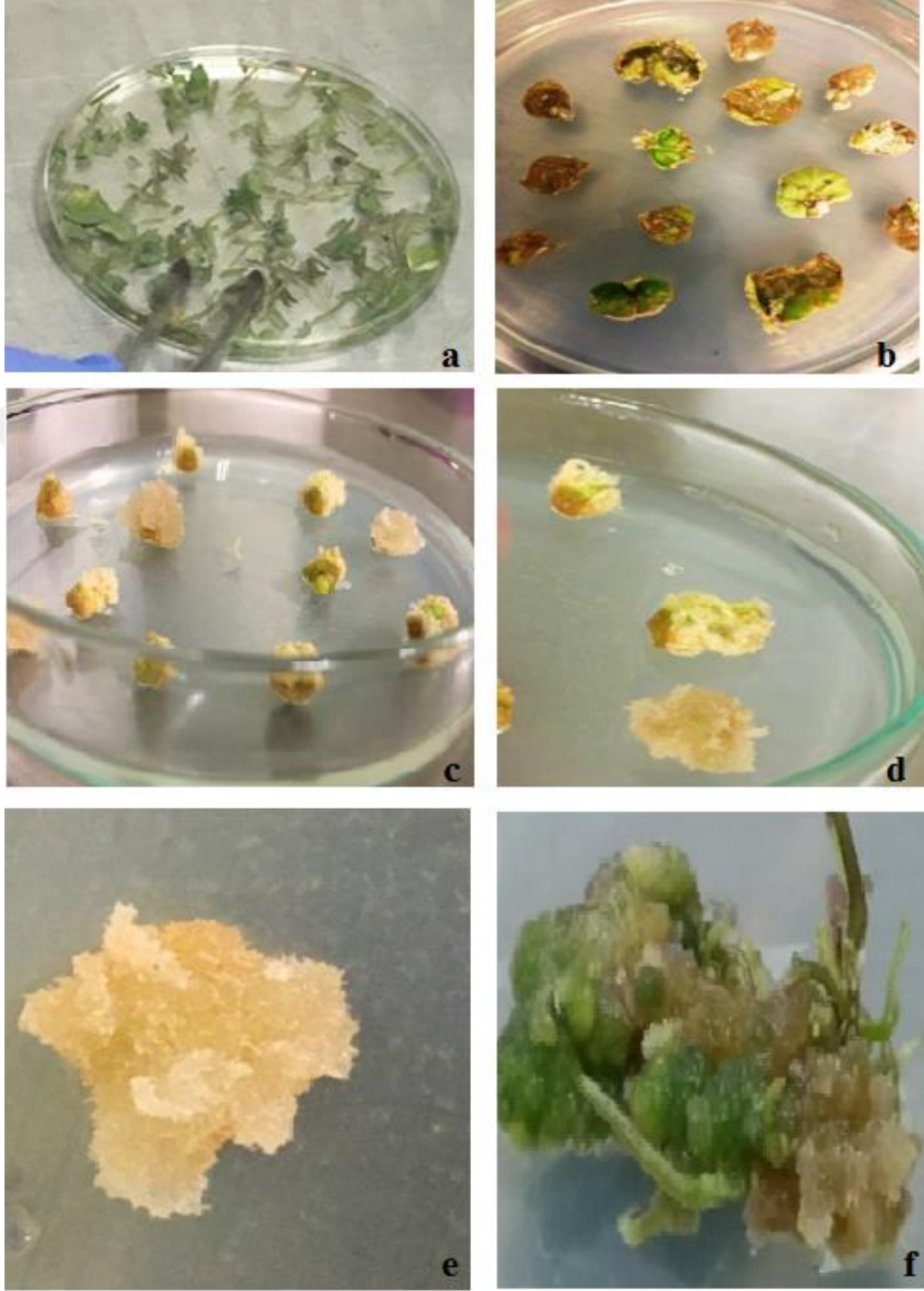
Çizelge 4.1. ve 4.2. de gösterdiği gibi her çeşide ait kesilen eksplant, kallus ve sürgün sayıları sayılmış ve 10-15 cm büyüyen sürgünler köklendirme ortamına aktarılmıştır. Ortamda iyi büyüyüp yeşil aksan oluşturan bitkilerden her birinden 25' er adet seçilerek serada toprağa aktarılıp büyüme ve gelişmeleri takip edilmiştir.

Çizelge 4.3. PCR analizine göre transformasyon etkinliği

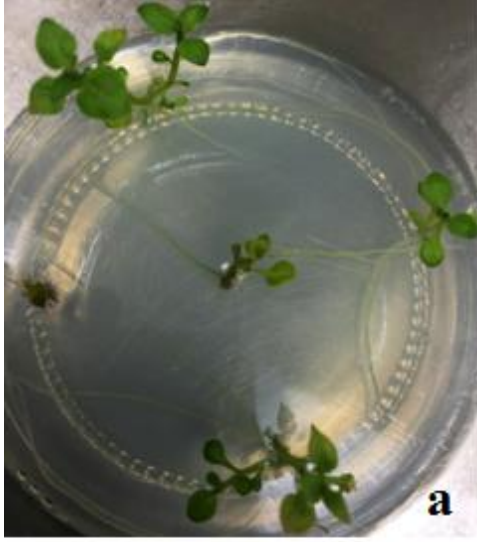
Bitki Çeşitleri	Toprağa aktarılan bitki sayısı	Elde edilen PCR pozitif transgenik bitki sayısı	PCR analizine göre transformasyon etkinliği %	Pozitif / eksplant transformasyon etkinliği %
Lady Olympia	25	7	28	0.7
Desiree	25	3	12	0.3

Yapılmış olan tez çalışmasında PCR analizine göre transformasyon verimliliği Lady olympia patates çeşidinde %28 iken; Desiree çeşidinde ise % 12 olarak belirlenmiştir.

Pozitif olarak belirlenen eksplanta göre ise tansformasyon etkinliği Lady Olympia patates çeşidinde % 0.7 iken; Desiree çeşidinde ise % 0.3 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Patates çeşitlerinde bazı genetik transformatasyon aşamaları. Her iki eksplantın *Agrobacterium* ile inokulasyonu (a), seçici jenerasyon ortamında her iki eksplanttan kallus oluşumları (b) (c) (d) (e), aday transgenik sürgün oluşturan kallus (f)



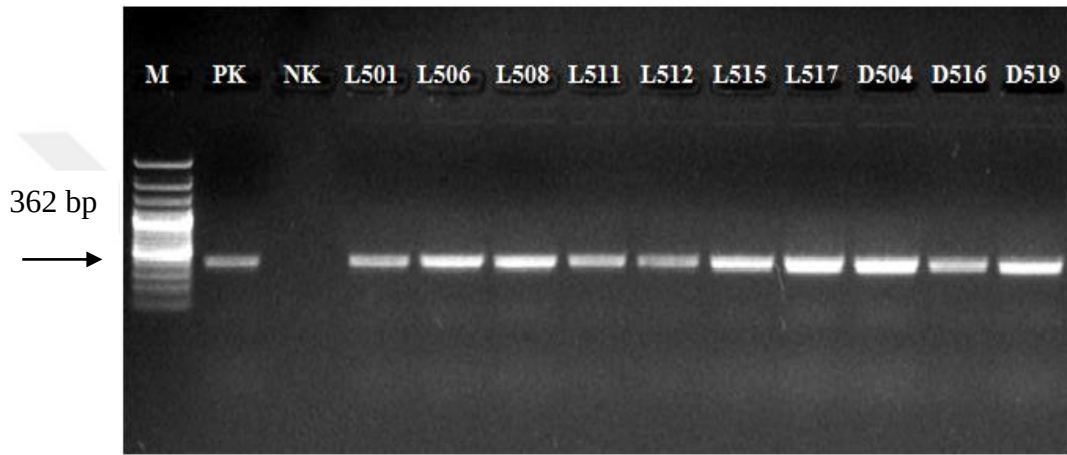
Şekil 4.4. Desiree ve Lady Olympia patates çeşitlerinin genetik transformasyon aşamalarının devamı. Sürgün oluşturan eksplantları seleksiyon ortamına aktarılması (a), sürgünlerin büyümesi (b), sera ortamında dikilmeye hazır köklenmiş bitki (c), sera ortamına dikilen bitki (d)

4.3 Aday Transgeniklerin Moleküler Analizleri

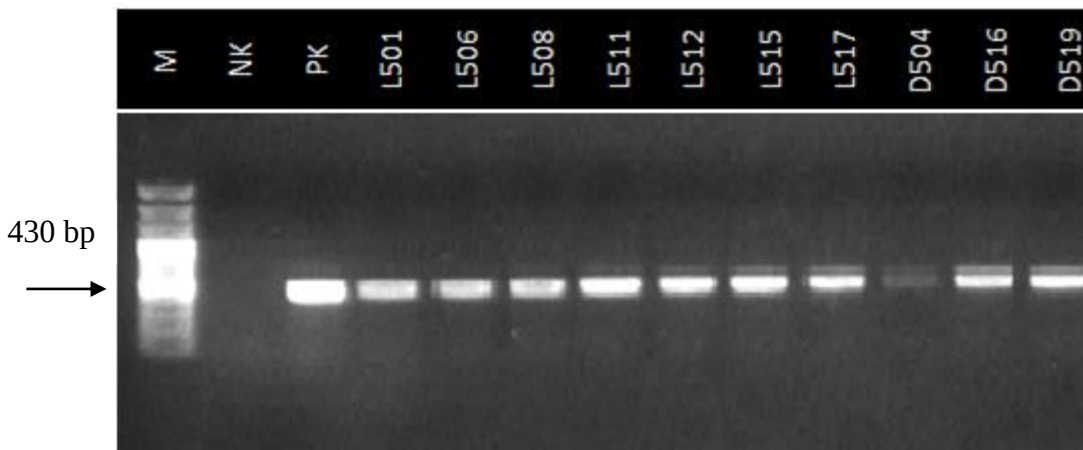
Serada yetiştirilen transgenik aday bitkilere aktarılan CP4-EPSPS geninin varlığını tespit etmek amacıyla çeşitli moleküler analizler yapılmıştır.

4.3.1 Gen aktarımının doğrulanması (PCR analizi)

Aday transgenik bitkilerden öngörülen protokol uygulanarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucunda DNA elde edilmiş ve ardından seyreltilerek PCR analizi için kullanılmıştır. Aday transgenik bitkilerde yapılan PCR analizi sonucunda CP4-EPSPS, GUS genlerinin bitkilerde varlığı tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde var olan genler çoğaltılmış ve PCR analizi sonucunda negatif kontrolde herhangi bir çoğalma olmadığı gözlemlenmiştir.

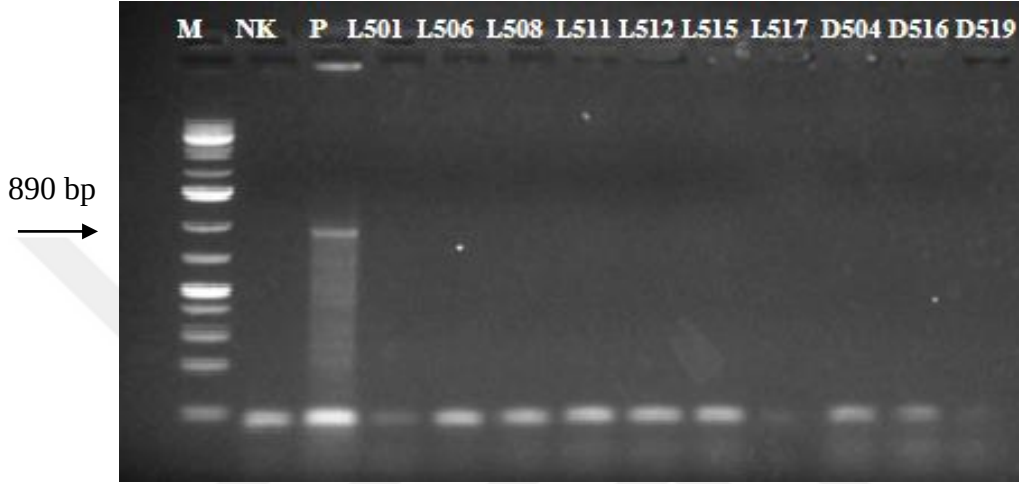


Şekil 4.5. Lady olimpia ve Desiree aday transgeniklerde GUS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markörü, Fermentas



Şekil 4.6. Lady Olympia ve Desiree aday transgeniklerde CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markör, Fermentas

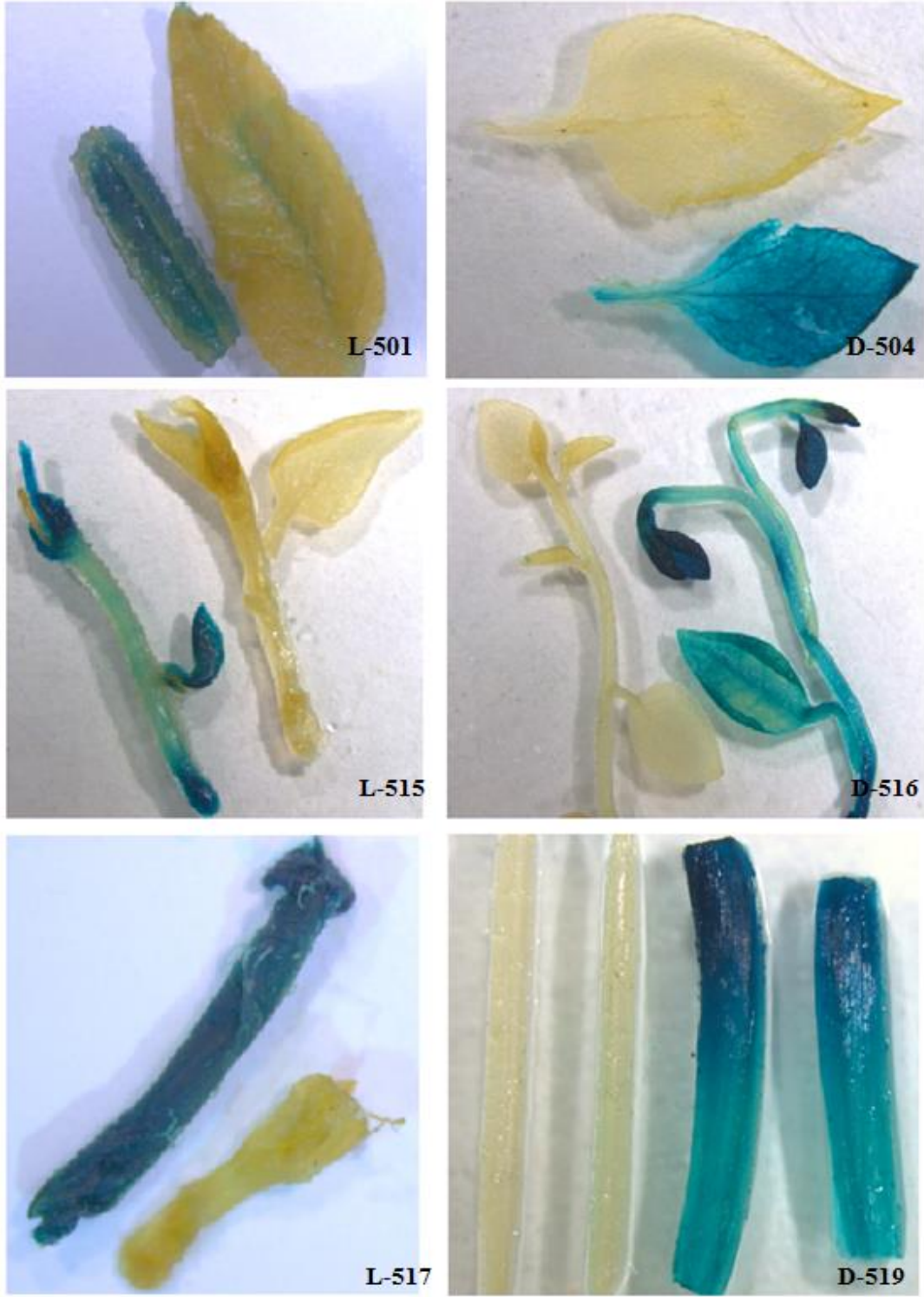
Agrobacterium'un konak bitkiyi enfekte edebilmesi ChvA genleri ile birlikte Vir genlerinin aktive edilmesine bağlıdır. ChvA, bakterinin konak hücreye tutunmasından sorumlu olan bir gendir (Nester 2015). Bu nedenle, transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu olup olmadığı ChvA ve Vir genlerine özgü primerler kullanılarak PCR analizi ile doğrulanmıştır. Şekil 4.6.'da belirlenen jel ile transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminesi görülmemiştir.



Şekil 4.7. Lady Olympia ve Desiree transgenikler bitkilerde ChvA geni için PCR sonuçları. (M):1 kb plus DNA markörü, (NK): Negatif kontrol, (P): Pozitif kontrol, *Agrobacterium* LBA4404 kolonisi, (L): Lady Olympia, (D): Desiree bitkisi

4.3.2 Histokimyasal GUS analizi

pCAMHE-EPSPS plazmidinin T-DNA bölgesinde GUS geninin bulunması nedeniyle, transgenik bitkilerin erken dönemde belirlenmesi daha kolay olmaktadır. Böylece, bu çalışmada transgeniklerin taranması için histokimyasal GUS analizi uygulanmıştır. Bu amaçla, yaprak diskleri ve sürgünleri X-Gluc çözeltisine konulmuş ve 37 °C’de gece boyu karanlık ortamda inkübe edilerek bekletilmiştir. Sonrasında, aday transgenik bitkilerde dirençli yaprak örneklerin mavi boyaması ile GUS ekspresiyon gözlenmiştir. Mavi renge boyanması ise aday transgenik bitkilerin hücre dokusunda dokusunda *GUS* gen ürünü β -glukuronidaz enziminin sentezlenerek 4-Brom-3-Klor-5-glukuronid substratı ile reaksiyona girmesi sonucunda mavi renkli protein çökeltisi oluşturmasından kaynaklanmaktadır. *GUS* geninin aktarıldığının göstergesi ise transgenik bitki dokularının mavi renge boyanmasıdır. (Basu vd., 2004). Ardından dokular berrak oluncaya kadar %70 etanol ile yıkanarak, çözeltideki boyama ortamı ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

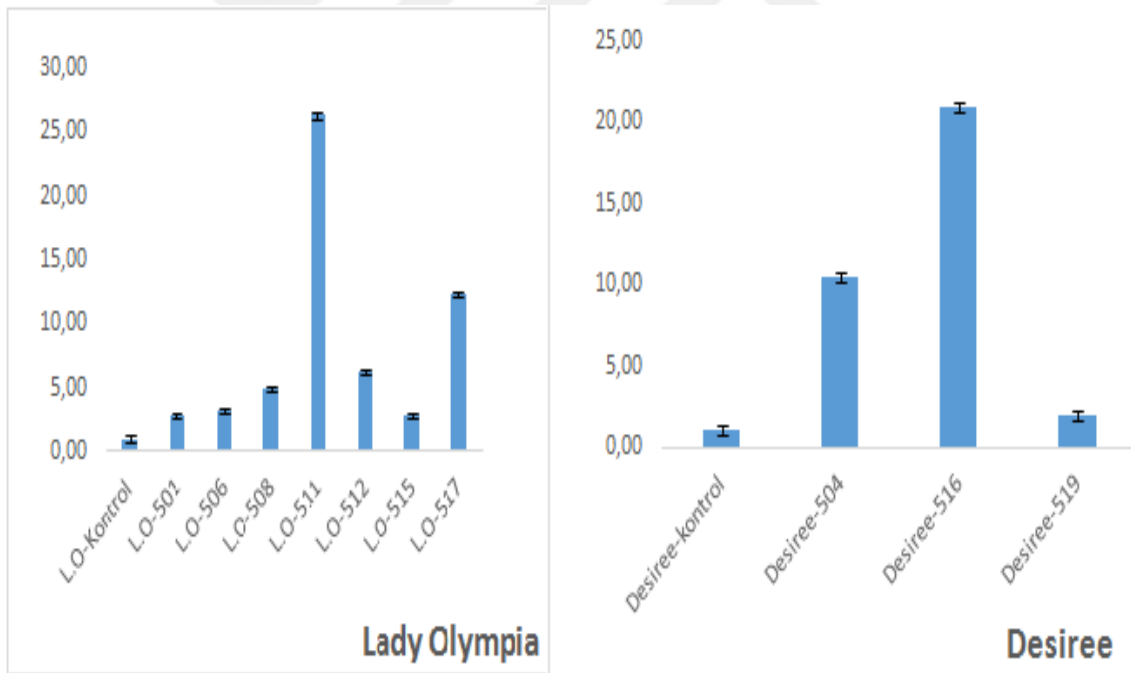


Şekil 4.8. Yaprak ve boğumalarından oluşan kesilmiş eksplantların histokimyasal GUS analizi

Mavi renkli olan bitki kesitleri aday transgenik bitkiyi ifade ederken; mavi renkli olmayanlar kesintiler ise transgenik adayı olmayan bitkileri göstermektedir.

4.3.3 Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR)

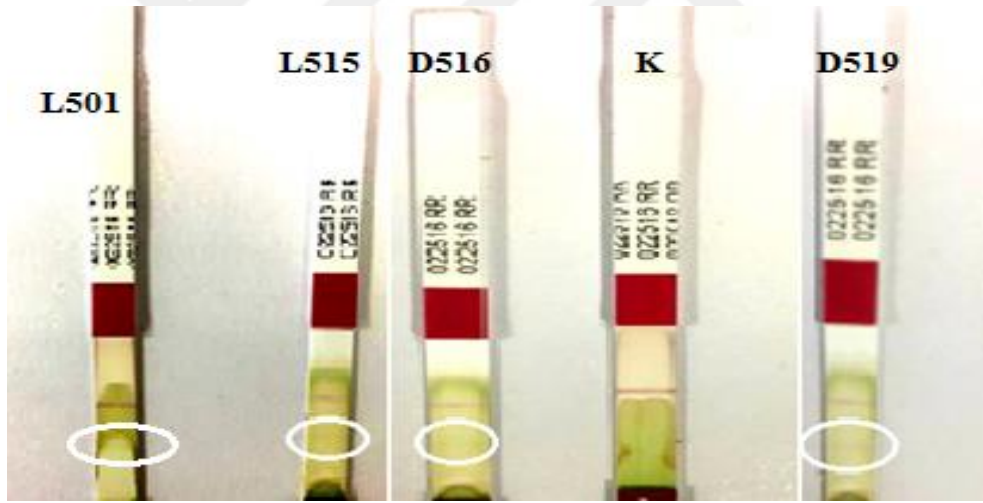
Daha önce yapılmış olan GUS ve PCR molekül analizlerine göre pozitif olarak belirlenen bitkilerden qRT-PCR analizi yapılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), genlerin hücrelerde ifade edilip edilmediğini belirlemek için günümüzde hassas ve standart bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır (Maqbool vd 2010; Rao vd 2011; Anayol vd., 2016). qRT-PCR analizi CP4-EPSPS geninin ifade düzeyini belirlemek için yapılmıştır. Desiree ve Lady Olympia patates çeşitlerinde oransal gen ifadesi Şekil 4.10. da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre CP4-EPSPS geninin transgenik patates hatlarında işlevsel var olduğu tespit edilmiştir. Ve sonuç olarak, transgenik bitkilerin kontrol ile karşılaştırıldığında CP4-EPSPS geninin ifadesinin Desiree çeşidinde transgenik bitkilerin kontrol ile karşılaştırıldığında D-504 ve D-516 hatlarında çarpıcı düzeyde yüksek bir artış görülürken D-519 hattında fazla artış görülmemiştir. Aynı şekilde LO-511 ve LO-517 transgenik hattı diğer transgenik hatlara göre fazla artış göstermiştir.



Şekil 4.9. qRT-PCR analizi ile CP4-EPSPS geninin transgenik bitkilerde kontrol bitkilere oranla kat değişimleri
Verilerin normalizasyonun için efl α geni kullanılmıştır. D: Desiree, LO: Lady Olympia.

4.3.4 Yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi (LFD analizi)

Aday transgenik patates bitkilerinde CP4-EPSPS geninde protein seviyesi oranının belirlenmesi için yaprak disklerinden örnekler alınmış QuickStix™ Kit for Roundup Ready Plant Tissue (Envirologix AS010 LS) kiti kullanılarak protein analizi yapılmıştır. Yatay akışlı ölçme çubuğu (LFD) analizi transgenik bitkilerin sera koşullarında çabuk ve hızlı tespiti için kullanılmaktadır. Bu analiz transgenik bitkilerin protein üretip üretmediğini tespit edebilmek için yapılmıştır. Protein analizi için alınan yaprak diskleri kitte bulunan tüpler içine konularak üzerine kitte tarif edildiği gibi 200 µl ekstraksiyon tamponu ilave edilmiştir. Protein testi için kitte tarif edilen uygulamalar yapılarak ölçümler belirlenmiştir. Yapılan analize göre transgenik bitkilerde pozitif test çizgisi görülürken transgenik olmayan negatif olan kontrol bitkilerde ise bu çizgi görülmemiştir. Bu durum, hedeflenen proteinin düşük seviyede sentezlenmesinden kaynaklanmış olabilir.



Şekil 4.10. CP4-EPSPS geni bulunduran transgenik bitkilerde yapılan yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi
(İşaretili kısımlar pozitif test çizgisini göstermektedir)

Çizelge 4.4. Aday transgenik bitkilere ait PCR, GUS ve LFD analiz sonuçları

Sıra No	Transgenik hattın adı	CP4-EPSPS geni	GUS analizi	LFD analizi
1	LO-501	+	+	+
2	LO-502	-	-	Yapılmadı
3	LO-503	-	-	-
4	LO-504	-	-	Yapılmadı
5	LO-505	-	-	-
6	LO-506	+	+	+
7	LO-507	-	-	-
8	LO-508	+	+	+
9	LO-509	-	-	-
10	LO-510	-	-	-
11	LO-511	+	+	+
12	LO-512	+	+	+
13	LO-513	-	-	Yapılmadı
14	LO-514	-	-	-
15	LO-515	+	+	+
16	LO-516	-	-	-
17	LO-517	+	+	+
18	LO-518	-	-	Yapılmadı
19	LO-519	-	-	-
20	LO-520	-	-	-
21	LO-521	-	-	-
22	LO-522	-	-	Yapılmadı
23	LO-523	-	-	-
24	LO-524	-	-	-
25	LO-525	-	-	-
26	D-501	-	-	-
27	D-502	-	-	Yapılmadı
28	D-503	-	-	-
29	D-504	+	+	+
30	D-505	-	-	-
31	D-506	-	-	-
32	D-507	-	-	-
33	D-508	-	-	Yapılmadı
34	D-509	-	-	-
35	D-510	-	-	-
36	D-511	-	-	-
37	D-512	-	-	Yapılmadı
38	D-513	-	-	-
39	D-514	-	-	-
40	D-515	-	-	-
41	D-516	+	+	+
42	D-517	-	-	-
43	D-518	-	-	-
44	D-519	+	+	+
45	D-520	-	-	-
46	D-521	-	-	Yapılmadı
47	D-522	-	-	-
48	D-523	-	-	-
49	D-524	-	-	Yapılmadı
50	D-525	-	-	-

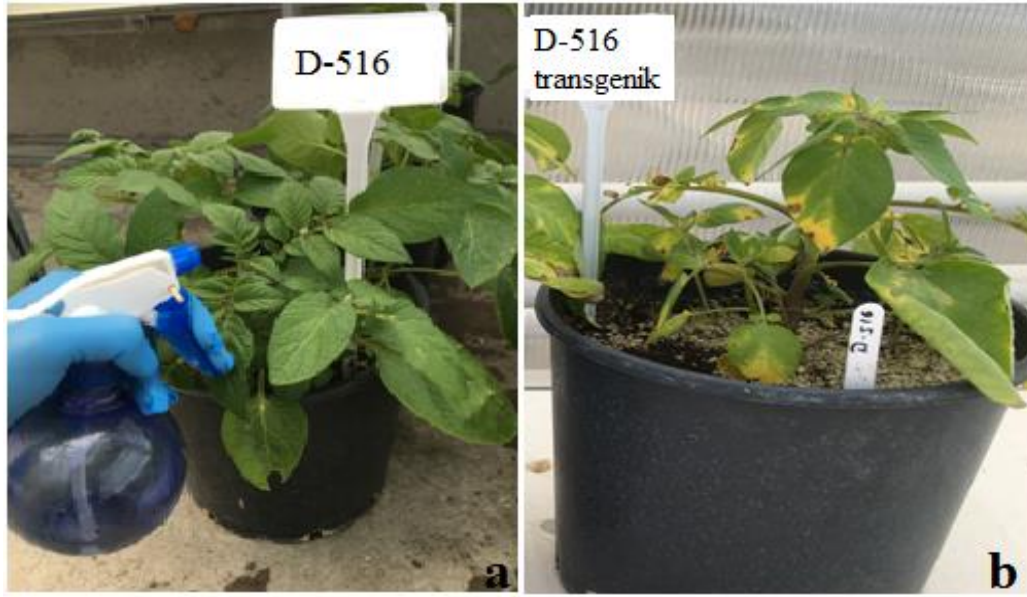
Analiz olarak *chvA* genine de bakılmıştır. Pozitif olarak belirlenen transgenik bitkilerin *Agrobacterium* tarafından kontamine olmadığı tespit edilmiştir.

4.3.5 Glifosat uygulaması

Serada büyütülen aday transgenik bitkilerden CP4-EPSPS geninin glifosata dayanıklılığını belirlemek için bitkileri her birine glifosat herbisiti uygulanmıştır. Glifosat uygulaması için glifosat etken maddesi içeren (441 g/l) ticari Roundup STAR (Monsanto) yabancı ot ilacı olan herbisit kullanılmıştır. Kullanılan herbisit konsantrasyonu firmanın etikette belirttiği gibi uygulanmıştır. Herbisit uygulandıktan 5 gün sonra sonra transgenik bitkilerde kloroz ve yaprak zayıflamaları görülmüş olsa bile glifosata karşı dayanıklı olduğu, negatif kontrol ile transgenik olmayan bitkilerin öldüğü görülmüş, transgenik bitkilerde ise yaprakların yeşil kaldığı gözlemlenmiştir.



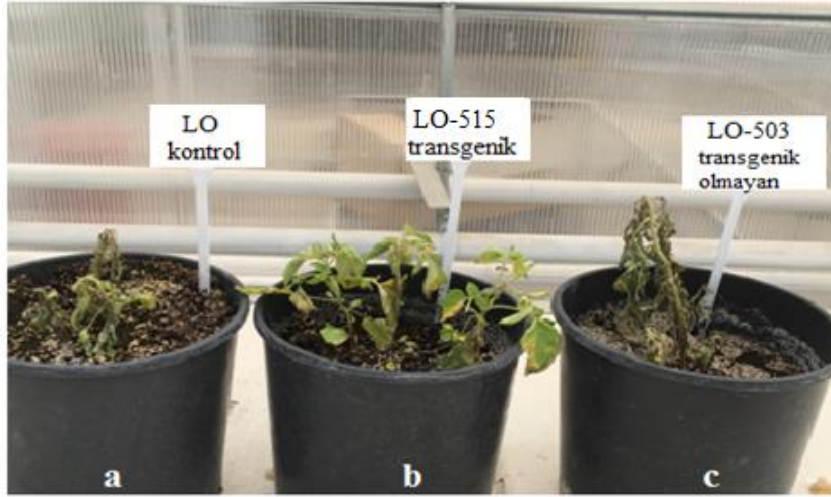
Şekil 4.11. Seraya aktarılan bitkilerin herbisit uygulamasından önceki görünümü



Şekil 4.12. Seraya ortamında büyüyüp gelişen bitkilerde glifosat uygulaması, herbisit hazırlanıp bitkiye uygulanması (a), glifosat uygulamasından 5 gün sonra bitkideki tipik belirtiler (b)



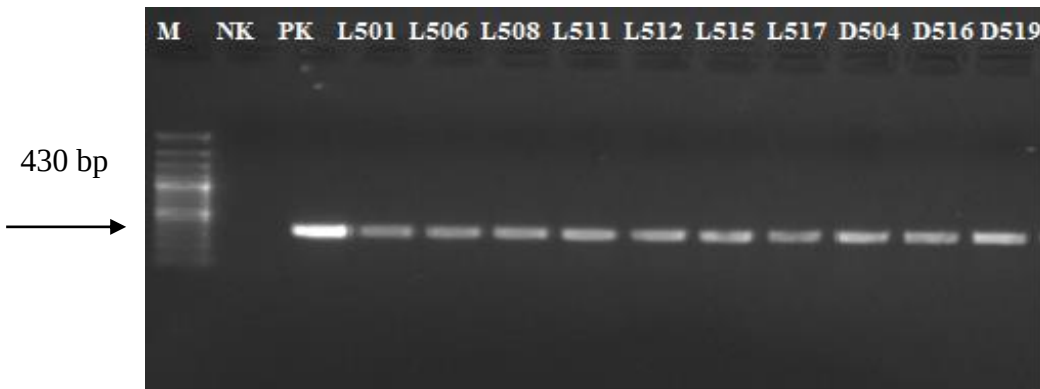
Şekil 4.13. Desiree çeşidinde glifosat uygulamasıyla serada bitkilerden görünüm (herbisit uygulaması ile 5 gün sonra kontrol ve transgenik bitkilerin tipik belirtileri)



Şekil 4.14. Lady Olympia çeşidinde glifosat uygulamasıyla bitkilerden görünüm (a) kontrol bitkisi, (b) uygulamadan sonra LO-515 bitkisinin transgenik durumu, (c) LO-503 bitkisinin belirtisi

4.3.6 Transgenik T1 patates hatlarının moleküler analizleri

Yapılan moleküler analizlerle olumlu sonuç edilen pozitif T0 patates çeşitleri serada iyi bir şekilde büyütülmüş ve çıkış gücü yüksek olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra transgenik T0 patates çeşitlerinde yumru hasadı yapılmıştır. PCR analizi için serada hasat edilen yumrulardan DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan yumrular daha sonra PCR analizi için tabi tutulmuştur. Hasat edilen yumrulardan CP4-EPSPS geninin genoma yerleşip yerleşmediği PCR analizi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Lady Olympia ve Desiree transgenik yumrulardan yapılan CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markör, Fermentas

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalar ile gen teknolojisindeki ilerlemelerle genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretim alanı, ticari olarak ilk yetiştirilmeye başlandığı 1996 yılından 2016 yılına kadar 110 kattan fazla artmış olduğu belirlenmiştir. Genellikle bitkilerde gen transfer çalışmaları 1982-1983 yıllarında başlamış ve böylece genlerin etki ve mekanizmaları incelenmiştir (Arı, 2001). Genetiği değiştirilmiş bitkilerin yetiştirildiği alan 185,1 milyon hektara ulaşmıştır (ISAAA, 2016). En çok transgenik üretimi yapılan bitkiler soya, pamuk, mısır ve kanola olup bu bitkilere çoğunlukla herbisitlere dirençlik, böceklerle dirençlilik ya da bu ikisine birden dirençlilik özelliği kazandırılmaktadır. Üretilen transgenik bitkiler içerisinde en yaygın karakter herbisite dirençlilik olup, 2016 yılında toplam transgenik bitki üretim alanının 161,9 milyon hektar'lık kısmında herbisite dirençli bitkiler (tek veya böcek direnci ile birlikte) yetiştirilmiştir. Hem glifosat hem de glufosinat etken maddelerine karşı tolerans gösteren herbisite dirençli bitkiler geliştirilmiş olsa da, glifosata dirençli bitkilerin kullanımı daha çok yaygınlaşmıştır (Bakhsh vd., 2015; Green, 2012). Yabancı otların seçici herbisitlere karşı dirençlerinin artması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde tarımsal işletme alanlarının genişlemesi, buna karşın tarım işçilerinin sayısının azalmasına bağlı olarak glifosata dirençli bitkilerin üretilmesi, yabancı ot mücadelesinin daha kolay, daha başarılı ve daha ucuza yapılabilmesini sağlamıştır.

Glifosata dirençli transgenik patates hakkında az sayıda bilimsel literatür bulunmaktadır. BAR/PAT geninin patates genomuna aktarıldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Figueira Filho vd., 1994; Padgett vd., 1995; Soto vd., 2007). Gen aktarımı vasıtasıyla geliştirilen ve böceklerle, Y virüsüne ve glifosata dayanıklı olan New Leaf Plus Russet Burbank potato çeşidi, Monsanto (RBMT22-186) tarafından piyasaya sürülmüş ve daha sonra da piyasadan çekilmiştir (ISAAA, 2017).

Bu tez çalışmasının amacı ise genetik transformasyon çalışması kullanılarak CP4-EPSPS genine sahip, glifosat tipi herbisitlere dayanıklı patates hatalarının geliştirilmesidir. Tez kapsamında yaprak ve boğum arası eksplantlar kullanılarak, Lady Olympia ve Desiree

patates çeşitlerine *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile gen aktarımı yapılmıştır. Böylece glifosat herbisitine dirençli yeni transgenik patates hatları geliştirilmiştir.

Patates çeşitlerine gen aktarım çalışmalarından önce, MS ortamında optimum glifosat konsantrasyonunun belirlenmesi için analizler yapılmıştır. Patates çeşitlerinin yaprak ve boğum arası eksplantları, farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM ve 3,0 mM) glifosat içeren MS besi ortamında 2 hafta süreyle standart büyüme koşullarında kültüre alınmıştır. Glifosat konsantrasyonu 1 mM üzerinde olan MS besi ortamında ekplantlarda kararma ve nekrosiz gözlenirken; glifosat konsantrasyonu 1,5 mM olan MS besi ortamında 2 hafta büyüme sonrasında ekplantlarda kısmi ölümlerin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Daha sonra yapılan uygulamalar sonrası patates çeşitlerinin transformasyonu için en uygun glifosat konsantrasyonunun 1,5 mM olduğu bulunmuştur. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerine pCAMHE-EPSPS (higromisin içermeyen) vektörünü barındıran *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarım çalışmaları başarılı sonuçlar vermiştir.

Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2. de belirtildiği gibi patates çeşitlerinden kesilen hem yaprak hem de boğumarası eksplantları, eksplant başına sürgün sayısı bakımından iyi sonuçlar ortaya koymuşlardır. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerinden toplam 25' er adet bitki seraya aktarılmış ve PCR sonuçlarına dayanarak transformasyon etkinliği Çizelge 4.3. de belirtilmiştir. Transformasyon etkinliği, rejenere seleksiyon ortamında hayatta kalan toplam bitki sayısı veya rejenere olan transformant bitkilerin GUS analiz sonuçlarına veya seraya aktarılan toplam bitkilerin içinden PCR pozitif olanların sayısına göre hesaplanabilmektedir. Önceki bilimsel raporlara dayanarak, farklı bitkilerdeki genetik transformasyon etkinliği farklı yöntemlerle hesaplanabilmektedir (Bakhsh vd., 2012; Wang vd., 2011).

Transformasyon etkinliğinin diğer kayıpları olarak serada transgenik bitkiler iyi büyürken herhangi bir olumsuz değişim gözlemlenmemiştir. Fakat, kanamisin kullanımının transgenik patates bitkilerinin rejenerasyonu için iyi bir seçim sistemi oluşturduğuna karar verilmiş olsa da Bakhsh vd. (2014), çalışmada gen kaçış olduğu fark edilmiştir. Yine benzer şekilde Fraley vd. (1983) yaptıkları bir çalışmada kanamisinden kaynaklanan bir gen kaçışı olduğunu tespit etmişlerdir. Zhang vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada ise eksplantların embriyojenik olmayan kallus, embriyojenik kallus ve somatik embriyoların

kanamisine karşı duyarlılıkları farklı olarak gözlemlemişlerdir. T-DNA'nın istikrarsızlığı, genetik alanında yapılan yeni düzenlemeler de kaçışların muhtemel nedenleri olabilir.

pCAMHE-EPSPS vektöründeki uidA geninin intron içermesi, aday transgenik bitkilerin erken dönemde belirlenmesi daha kolay olmaktadır. Böylece, bu çalışmada transgeniklerin taranması için histokimyasal GUS analizi uygulanmıştır. (Şekil 4.8.). İşlevsel olan uidA geni, GUS substratı olan X-Gluc ile muamele edildiğinde mavi renk oluşturmaktadır (Basu vd., 2004).

Agrobacterium'un konak bitkiyi enfekte edebilmesi ChvA genleri ile birlikte Vir genlerinin aktive edilmesine bağlıdır. ChvA, bakterinin konak hücreye tutunmasından sorumlu olan bir gendir Douglas vd. (1985). PCR analizine göre, kontaminasyon durumunda ChvA genine özgü primerler ile analiz sonucunda 860 bp uzunluğunda ampikon gözlenmesi gerekmektedir. (Nain vd., 2005). Bu nedenle, transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu olup olmadığı ChvA ve Vir genlerine özgü primerler kullanılarak PCR analizi ile doğrulanmıştır. (Şekil 4.7.). Sonuç olarak transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu göstren hiçbir sonuca ulaşılmamış ve böylece EPSPS geninin transgenik bitkilerin genomuna yerleştiği belirlenmiştir.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), genlerin hücrelerde ifade edilip edilmediğini belirlemek için günümüzde hassas ve standart bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır. (Maqbool vd., 2010; Rao vd., 2011). qRT-PCR analizi CP4-EPSPS geninin ifade düzeyini belirlemek için yapılmıştır. GUS ve PCR analizine göre pozitif olan bitkiler qRT-PCR analizine tabi tutulmuş ve sonuç olarak, transgenik bitkilerin kontrol ile karşılaştırıldığında CP4-EPSPS geninin ifadesinde çarpıcı düzeyde yüksek bir artış gözlemlenmiştir. CP4-EPSPS genindeki bu artış düzeyi çeşitli transgenik hatlarda farklılık göstermiştir (Şekil 4.9.). Bu sonuçlara göre CP4-EPSPS geninin transgenik patates hatlarında işlevsel var olduğu tespit edilmiştir. Ancak aktarılan gen çeşitli transgenik bitkilerde farklı olarak ifade edilebilir. Böylece bitkiye aktarılan genin bitki genomunda yerleştiği yere, aktarılan genin nükleotit dizisindeki herhangi bir değişikliğe, aktarılan genin kopya sayısına bağlı olarak gen ifade düzeyleri değişiklik gösterebilmektedir (Rao vd., 2011).

Aday transgenik patates bitkilerinde CP4-EPSPS geninde protein seviyesi oranının ve transgenik bitkilerin protein üretip üretmediğini tespit edebilmek için yatay akışlı ölçme çubuğu (LFD) analizi yapılmıştır. Bu analiz transgenik bitkilerin sera koşullarında çabuk ve hızlı tespiti için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu analizin saptama hassasiyeti, ELISA tabanlı analizler kadar etkili değildir (Posthuma-Trumpie vd., 2009). Yapılan analize göre transgenik bitkilerde pozitif test çizgisi görülürken transgenik olmayan negatif olan kontrol bitkilerde ise bu çizgi görülmemiştir. Bu durum, hedeflenen proteinin düşük seviyede sentezlenmesinden kaynaklanmış olabilir. (Şekil 4.10.)

Serada büyütülen aday transgenik bitkilerden CP4-EPSPS geninin glifosata dayanıklılığını belirlemek için bitkileri her birine glifosat herbisiti uygulanmıştır. Glifosat uygulaması için glifosat etken maddesi içeren (441 g/l) ticari Roundup STAR (Monsanto) yabancı ot ilacı olan herbisit kullanılmıştır. Kullanılan herbisit konsantrasyonu firmanın etikette belirttiği gibi uygulanmıştır. Herbisit uygulandıktan 5 gün sonra sonra transgenik bitkilerde kloroz ve yaprak zayıflamaları görülmüş olsa bile glifosata karşı dayanıklı olduğu, negatif kontrol ile transgenik olmayan bitkilerin öldüğü görülmüş, transgenik bitkilerde ise yaprakların yeşil kaldığı gözlemlenmiştir. (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.)

Yapılan moleküler analizlerle olumlu sonuç edilen pozitif T0 patates çeşitleri serada iyi bir şekilde büyütülmüş ve çıkış gücü yüksek olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra transgenik T0 patates çeşitlerinde yumru hasadı yapılmıştır. Hasat edilen yumrulardan CP4-EPSPS geninin genoma yerleşip yerleşmediği PCR analizi ile belirlenmiştir. PCR analizi için serada hasat edilen yumrulardan DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan yumrular daha sonra PCR analizi için tabi tutulmuştur.

BÖLÜM VI

SONUÇ

Dünyanın yaklaşık hemen her yerinde yetiştirilen patates ülkemiz tarım ve ekonomi açısından da önemli yere sahiptir. Patates tarımında yüksek verimler elde edebilmek için hastalık, zararlı ve yabancı otlarla mücadele büyük önem taşımaktadır. Bunlardan en önemlisi yabancı otlar patates bitkisinde büyük ölçüde zarar verip birim alandan alınan verimi azaltmaktadır. Bu nedenle yabancı ot mücadelesinde kimyasal bir yöntem olarak kullanılan herbisitler kolay uygulanıp, mücadelesi zor olan yabancı otlara daha kolay etki göstermektedir.

Bu tez çalışmasının amacı ise tarımsal girdileri azaltmak ve daha iyi yabancı ot mücadelesi yapılması için genetik transformasyon çalışması kullanılarak CP4-EPSPS genine sahip, glifosat tipi herbisitlere dayanıklı patates hatlarının geliştirilmesidir. Tez kapsamında yaprak ve boğum arası eksplantlar kullanılarak, Lady Olympia ve Desiree patates çeşitlerine *Agrobacterium tumefaciens* yöntemi ile gen aktarımı yapılmıştır. Böylece glifosat herbisitine dirençli yeni transgenik patates hatları geliştirilmiştir.

Gen aktarımının başarıyla yapılıp yapılmadığı GUS histokimyasal analizi, PCR deneyleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR ve akışlı ölçüm çubuğu analizi ile CP4-EPSPS geninin transgenik patates hatlarında işlevsel var olduğu tespit edilmiştir. Glifosat uygulaması da CP4-EPSPS geninin herbisit uygulamasına karşı etkinliğini ortaya koymuştur. Tez çalışmasında herbisitlere dayanıklı olarak geliştirilen transgenik patates çeşitleri tarımsal ıslah programlarında başka yeni çalışmalar olarak yürütülüp mükemmel bir gen kaynağı olarak kullanılabilirler. Herbisite dayanıklı kültür bitkilerinin tarımının yapılmasıyla, total herbisitler kullanılarak tek bir seferde, hızlı ve kolay bir biçimde yabancı ot mücadelesi yapılabilir. Böylece, tarımsal uygulamalarda daha az herbisit uygulaması yapılmakta ve traktör kullanımı azaltılarak yakıt tüketimi düşürülmektedir. Böylece bu teknoloji kullanılarak yabancı ot mücadelesi ile verim artırılarak kaliteli üretim sağlanabilmektedir. Sonuç itibarıyla verimin artması ve ekonomik gelirin artmasıyla tarım üreticilerine avantajlar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Alberdi, J. L., Sáenz, M. E., Di Marzio, W. D. and Tortorelli, M. C., "Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*", ***Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*** 57(2), 229-235, 1996.

Anonim, Europe Potato Database, 2017.

Arı, Ş., Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri: Bitki Biyoteknolojisi II, ***Selçuk Üniversitesi Basımevi***, Konya, 2001.

Arioğlu, H. H., Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı, ***Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi***, Adana, 2002.

Arnold, R. N., Murraray, M. W., Gregory, E. J. and Smeal, D., Weed Control in Field Potatoes Agricultural Experiment Station, ***Iowa State University Press***, USA, 1997.

Avcı, M. Ç., Çukurova bölgesi buğday ekim alanlarında sorun olan *Phalaris brachystchys* L. (kanlı çayır)'ın bazı buğday herbisitlerine karşı oluşturduğu dayanıklılık sorunlarının araştırılması, Yüksek lisans tezi, ***Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Adana, s. Pages, 2009.

Baird, D. D., Upchurch, R. P., Homesley, W. B. and Franz, J. E., "Introduction of a new broadspectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control", ***North Central Weed Control Conference*** 26, 64-68, 1971.

Bakhsh, A., Anayol, E. and Ozcan, S. F., "Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L", ***Emirates Journal of Food and Agriculture*** 26(3), 259-264, 2014.

Bakhsh, A., Baloch, F. S., Hatipoğlu, R. and H, Ö., Use of Genetic Engineering Benefits and Health Concerns, In: Handbook of Vegetable Preservation and Processing, ***CRC Press***, London, UK, 2015.

Bakhsh, A., Siddique, S. and Husnain, T., "A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (Cry1Ac) expression in cotton", *Euphytica* 183(1), 65-74, 2012.

Banaras, M., "Impact of weed competition on potato production", *Pakistan Journal of Agricultural Research* 14(1), 64-71, 1993.

Basu, C., Kausch, A. P. and Chandlee, J. M., "Use of β -glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320(1), 7-10, 2004.

Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T. and Pleau, M., "Control of coleopteran insect pests through RNA interference", *Nature Biotechnology* 25(11), 1322-1326, 2007.

Bhan, V. M., Singh, M. and A, M. R., "Weed control in field crops at Panthagar", *India Research Report* 116, 690-701, 1970.

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

Bostan, H. ve Demirci, E., "Patates X ve Y virüslerinin bazı patates çeşitlerinde neden olduğu belirtiler", *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 32(1), 1-4, 2010.

Brookes, G. and Barfoot, P., "Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects, 1996-2006", *AgBioForum* 11(1), 21-38, 2008.

Brunt, A. A. and Loebenstein, G., "The main viruses infecting potato crops", *Virus and Virus-Like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes* 1, 65-67, 2001.

Chilton, M.-D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P. and Quetier, F., "T-DNA from Agrobacterium Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(7), 4060-4064, 1980.

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

Cotterman, J. C. and Saari, L. L., "Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR484", **Pesticide Biochemistry and Physiology** 43(3), 182-192, 1992.

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

Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. and Lee, S.-B., "Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome", **Nature Biotechnology** 16(4), 345-348, 1998.

Doğan, M. N., Boz, Ö. ve Albay, F., Tarım Alanlarında Sorun Olan Yabancı Otların Kimyasal Mücadelesinde Azaltılmış Herbisit Dozlarının Etkinliğinin Araştırılması, **TÜBİTAK**, Ankara, 2004.

Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A. and Nester, E. W., "Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region", **Journal of Bacteriology** 161(3), 850-860, 1985.

Duke, S. O. and Powles, S. B., "Glyphosate: a once in a century herbicide", **Pest Management Science** 64(4), 319-325, 2008.

Enríquez-Obregón, G. A., Vázquez-Padrón, R. I., Prieto-Samsonov, D. L., Gustavo, A. and Selman-Housein, G., "Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium* mediated transformation", **Planta** 206(1), 20-27, 1998.

Falco, M. C., Neto, A. T. and Ulian, E. C., "Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane", **Plant Cell Reports** 19(12), 1188-1194, 2000.

FAOSTAT, Area harvested and production quantity of potatoes, 2016.

Figueira Filho, E. S., Figueiredo, L. F. and Monte-Nesich, D. C., "Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance", ***Plant Cell Reports*** 13(12), 666-670, 1994.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L. and Fry, J. S., "Expression of bacterial genes in plant cells", ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 80(15), 4803-4807, 1983.

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

Glick, B. R. and Pasternak, J. J., Principles and applications of recombinant DNA, ***ASM Press***, Washington, USA, 1998.

Green, J. M., "The benefits of herbicide-resistant crops", ***Pest Management Science*** 68(10), 1323-1331, 2012.

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

Haughn, G. W., Smith, J., Mazur, B. and Somerville, C., "Transformation with a mutant *Arabidopsis acetolactate* synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides", ***Molecular and General Genetics MGG*** 211(2), 266-271, 1988.

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

Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M. and Lu, F., "Agrobacterium mediated large scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection", ***Plant Cell Reports*** 21(10), 1010-1019, 2003.

ISAAA, Global Status of Commercialized Biotech/GM, Crops: 19, 2016.

ISAAA, GMO approval data base, 2017.

James, C., Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014, **International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)**, USA, 2015.

Kado, C. I. and Hooykaas, P. J. J., "Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis", **Critical Reviews in Plant Sciences** 10(1), 1-32, 1991.

Kayapınar, A. ve Kornoşor, S., "Çukurova bölgesinde mısır tarımıyla birlikte gelişen entomolojik sorunlar ve çözüm yolları", **I. Tarım Kongresi**, Adana, s. 595, 9-13 Ocak, 1990.

Kishchenko, E. M., Komarnitskii, I. K. and Kuchuk, N. V., "Transgenic sugar beet tolerant to imidazolinone obtained by Agrobacterium-mediated transformation", **Cytology and Genetics** 45(3), 148-152, 2011.

Kudsk, P. and Streibig, J. C., "Herbicides a two edged sword", **Weed Research** 43(2), 90-102, 2003.

Lyon, B. R., Llewellyn, D. J., Huppatz, J. L., Dennis, E. S. and Peacock, W. J., "Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", **Plant Molecular Biology** 13(5), 533-540, 1989.

Mannerlöf, M., Tuvešson, S., Steen, P. and Tenning, P., "Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate", **Euphytica** 94(1), 83-91, 1997.

Maqbool, A., Abbas, W., Rao, A. Q., Irfan, M., Zahur, M., Bakhsh, A., Riazuddin, S. and Husnain, T., "*Gossypium arboreum* GHSP26 enhances drought tolerance in *Gossypium hirsutum*", **Biotechnology Progress** 26(1), 21-25, 2010.

Medd, R. W., Van De Ven, R. J., Pickering, D. I. and Nordblom, T., "Determination of environment-specific dose-response relationships for clodinafop-propargyl on *Avena* spp.", **Weed Research** 41(4), 351-368, 2001.

Moss, S. R., Cocker, K. M., Brown, A. C., Hall, L. and Field, L. M., "Characterisation of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass)", **Pest Management Science** 59(2), 190-201, 2003.

Nain, V., Jaiswal, R., Dalal, M., Ramesh, B. and Kumar, P. A., "Polymerase chain reaction analysis of transgenic plants contaminated by *Agrobacterium*", **Plant Molecular Biology Reporter** 23(1), 59-65, 2005.

Neururer, H., "A die konkurrenz zwischen kulturpflanzen und unkareuter als wichtiger und beeinflussbarer faktor in der fortschrittlichen agricultur Z", **Pflanzenkrankheiten Sondern** 4, 31-36, 1968.

Öktem, H. A., Soyer, Y., Setenci, F. and Yucel, M., "Development of herbicide resistant transgenic tobacco plants", **Anadolu Kard Dergisi** 7, 80-88, 1997.

Özcan, S. ve Özgen, M., "Bitki genetik mühendisliği", **Kökem Dergisi** 1(1), 69-95, 1996.

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

Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., LaVallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F. and Eichholtz, D. A., "Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line", **Crop Science** 35(5), 1451-1461, 1995.

Phogat, B. S., Bhan, V. M., Singh, J. and Dhawan, R. S., Effects of different herbicides on weeds and tuber yield in potato, **Indian Soc Agronomy Indian Agr Res Inst Div Agronomy**, New Delhi, India, 1991.

Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J. and Van Amerongen, A., "Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey", **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 393(2), 569-582, 2009.

Rajasekaran, K., Grula, J. W., Hudspeth, R. L., Pofelis, S. and Anderson, D. M., "Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase", **Molecular Breeding** 2(4), 307-319, 1996.

Rao, A. Q., Bakhsh, A., Nasir, I. A., Riazuddin, S. and Husnain, T., "Phytochrome B mRNA expression enhances biomass yield and physiology of cotton plants", **African Journal of Biotechnology** 10(10), 1818-1826, 2011.

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

Ren, Z. J., Cao, G. Y., Zhang, Y. W., Yan, L. and Liu, Y. J., "Overexpression of a modified AM79 aroA gene in transgenic maize confers high tolerance to glyphosate", **Journal of Integrative Agriculture** 14(3), 414-422, 2015.

Robinson, D. K., Monks, D. W. and Monaco, T. J., "Potato (*Solanum tuberosum*) tolerance and susceptibility of eight weeds to rimsulfuron with and without metribuzin", **Weed Technology** 10(1), 29-34, 1996.

Scholz, B., "Mechanische kartoffel und anwendung von herbizide, kurz und bündig", **BASF Limburger** 12, 219-226, 1996.

Serim, A. T. ve Özdemir, Y. G., "Herbisit uygulamalarında kullanılan pülverizatör memelerinin damla büyüklük dağılımlarının belirlenmesi", **Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi** 5(2), 172-175, 2012.

Smeda, R. J., Hasegawa, P. M., Goldsbrough, P. B., Singh, N. K. and Weller, S. C., "A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity", **Plant Physiology** 103(3), 911-917, 1993.

Soto, N., Enríquez, G. A., Ferreira, A., Corrada, M., Fuentes, A., Tiel, K. and Pujol, M., "Efficient transformation of potato stems segments from cultivar Désirée using phosphinothricin as selection marker", *Biotechnología Aplicada* 24(02), 139-144, 2007.

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

Tan, S., Evans, R. and Singh, B., "Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops", *Amino Acids* 30(2), 195-204, 2006.

Thakral, K. K., Pandita, M. L., Khurana, S. C. and Kalloo, G., "Effect of time of weed removal on growth and yield of potato", *Weed research* 29(1), 33-38, 1989.

Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S. and Brettell, R., "Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation", *The Plant Journal* 11(6), 1369-1376, 1997.

TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, 2016.

Uludağ, A., Nemli, Y. ve Rubin, B., "Yabani yulafta (*Avena sterilis* L.) Cladinofof'a dayanıklılık üzerine çalışmalar", *Türkiye II. Herboloji Kongresi*, Ayvalık, İzmir, s. 401-409, 1-4 Eylül, 1997.

Üstüner, T. ve Güncan, A., "Mekanik, kimyasal ve entegre yabancı ot mücadelesi yöntemlerinin patates verimi ve yumru çapı üzerine etkisi", *Türkiye Herboloji Dergisi* 6(2), 9-20, 2003.

Wang, B., Ma, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Wu, Y., Wang, Q. and Li, M., "Potato viruses in China", *Crop Protection* 30(9), 1117-1123, 2011.

Watrud, L. S., Lee, E. H., Fairbrother, A., Burdick, C., Reichman, J. R., Bollman, M. and Water, P. K., "Evidence for landscape-level, pollenmediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4-EPSPS as a marker", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101(40), 14533-14538, 2004.

Watson, B., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. D. and Nester, E. W., "Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*", **Journal of Bacteriology** 123(1), 255-264, 1975.

Yi, G., Shin, Y. M., Choe, G., Shin, B., Kim, Y. S. and Kim, K. M., "Production of herbicide-resistant sweet potato plants transformed with the bar gene", **Biotechnology Letters** 29(4), 669-675, 2007.

Zambryski, P. C., "Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story", **Annual Review of Plant Biology** 43(1), 465-490, 1992.

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

Zhang, X. B., Tang, Q. L., Wang, X. J. and Wang, Z. X., "Development of glyphosate-tolerant transgenic cotton plants harboring the G2-aroA gene", **Journal of Integrative Agriculture** 16(3), 551-558, 2017.

Zhao, F. Y., Li, Y. F. and Xu, P., "Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Zhongmian 35) using glyphosate as a selectable marker", **Biotechnology Letters** 28(15), 1199-1207, 2006.

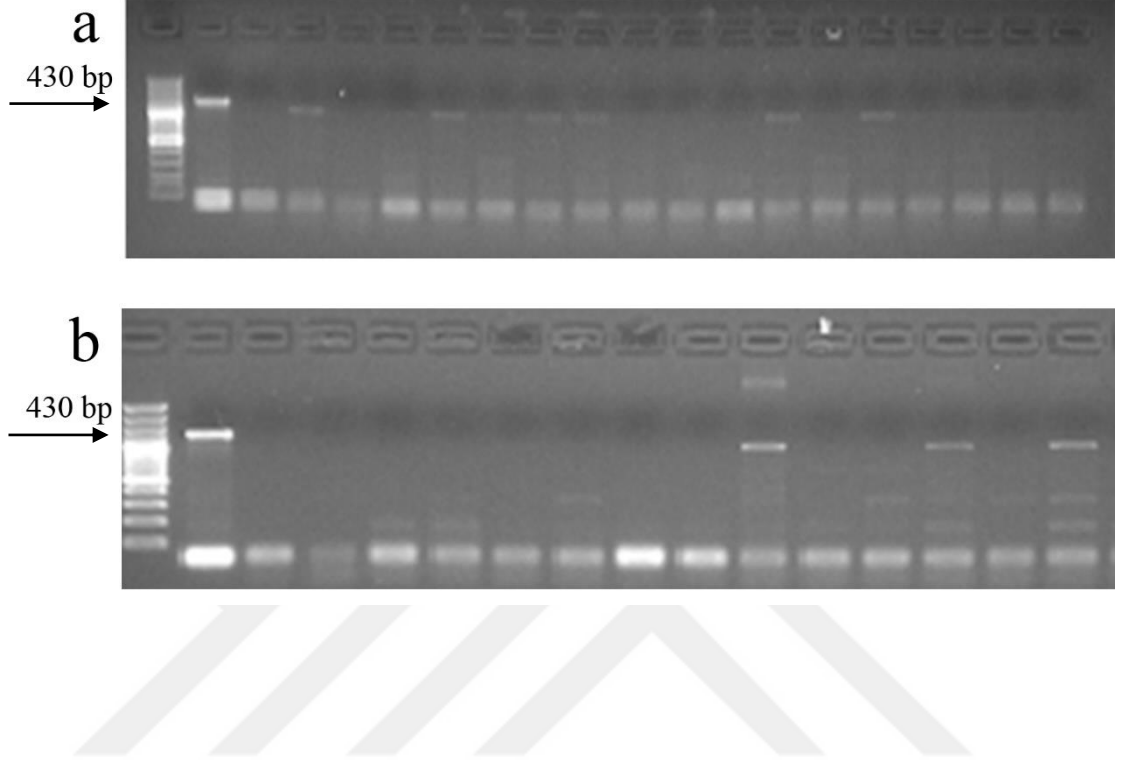
Zollinger, R. K., Christoffers, M., Endres, G., Gramig, G., Howatt, K., Jenks, B., Lym, R., Stachler, J., Thostenson, A. and Valenti, H. H., North Dakota Weed Control Guide, **North Dakota State University Extension Service Publication**, USA, 2006.

Zoschke, A., "Toward reduced herbicide rates and adapted weed management", **Weed Technology** 8(2), 376-386, 1994.

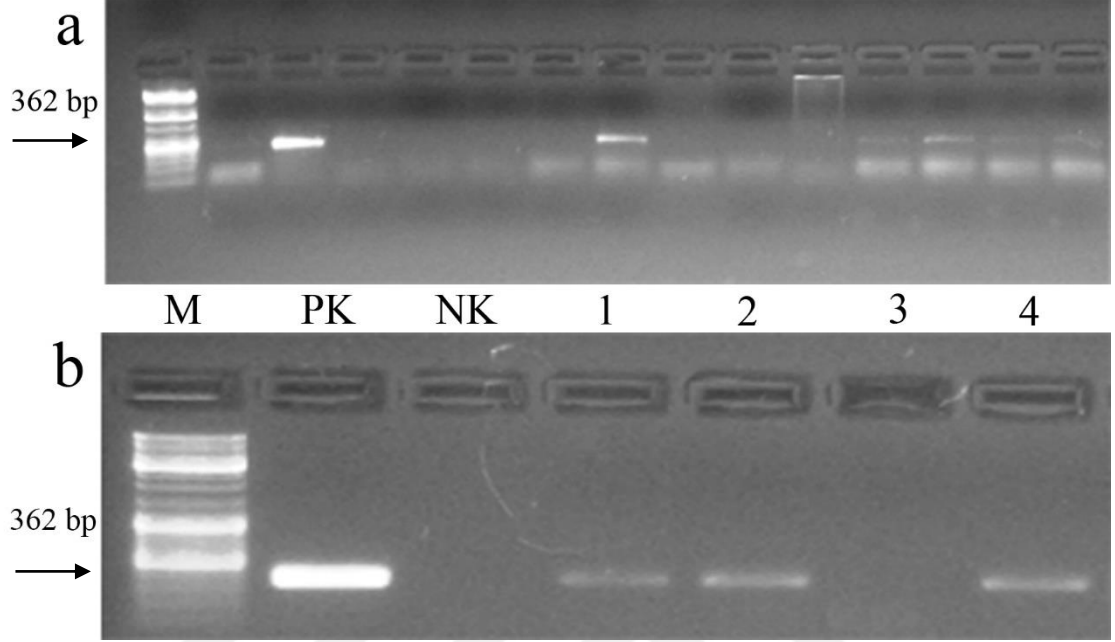
Ek-A Aday transgenik hatların DNA delesyon konsantrasyonları ve PCR sonuçları

Sıra No	Hattın adı	DNA delesyon konsantrasyon (µl/ng)	PCR sonucu
1	LO-501	100	+
2	LO-502	Yapılmadı	-
3	LO-503	300	-
4	LO-504	Yapılmadı	-
5	LO-505	300	-
6	LO-506	200	+
7	LO-507	200	-
8	LO-508	20	+
9	LO-509	100	-
10	LO-510	30	-
11	LO-511	600	+
12	LO-512	1000	+
13	LO-513	600	-
14	LO-514	1200	-
15	LO-515	200	+
16	LO-516	75	-
17	LO-517	80	+
18	LO-518	15	-
19	LO-519	Yapılmadı	-
20	LO-520	800	-
21	LO-521	Yapılmadı	-
22	LO-522	10	-
23	LO-523	50	-
24	LO-524	300	-
25	LO-525	30	-
26	D-501	10	-
27	D-502	10	-
28	D-503	200	-
29	D-504	400	+
30	D-505	800	-
31	D-506	800	-
32	D-507	800	-
33	D-508	1000	-
34	D-509	1000	-
35	D-510	600	-
36	D-511	300	-
37	D-512	10	-
38	D-513	500	-
39	D-514	10	-
40	D-515	30	-
41	D-516	1000	+
42	D-517	10	-
43	D-518	1000	-
44	D-519	800	+
45	D-520	800	-
46	D-521	10	-
47	D-522	20	-
48	D-523	500	-
49	D-524	10	-
50	D-525	800	-

Ek-B Lady Olympia aday transgeniklerde CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb plus DNA marker, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol, kuyu 1: L501, kuyu 4: L508, kuyu 5: L508, kuyu 6: L511, kuyu 7: L512, kuyu 11: L515, kuyu 13: L517 (a), Desiree aday transgeniklerde CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb plus DNA marker, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol, kuyu 8: D504, kuyu 11: D516, kuyu 13: D516 (b)



Ek-C Lady Olympia aday transgeniklerde GUS PCR analizi (M):1 kb plus DNA marker, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol, kuyu 5: L501, kuyu 9: L506, kuyu 10: L508 kuyu 11: L511, kuyu 12: L512 (a), Desiree aday transgeniklerde GUS PCR analizi (M):1 kb plus DNA marker, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol, kuyu 1: D504, kuyu 2: D516, kuyu 4: D519 (b)



ÖZ GEÇMİŞ

Safa SÜMER 29.10.1993 tarihinde Adana'nın Ceyhan ilçesinde ikiz çocuk olarak dünyaya geldi. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Ceyhan'da tamamladı. Lisenin ardından 2011 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nü kazandı. 2014 ve 2015 yılları arasında staj programını Sygenta Tarım ve Ticaret A.Ş.-Adana Bölge Müdürlüğü'nde yaptı ve aynı yıl içerisinde Erasmus Öğrenci Değişim Programından faydalanıp 6 ay Rusya Perm State Agricultural Academy'de eğitim gördü. 2015 yılında okulunu bitirip ardından aynı sene içerisinde Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2017 yılı içerisinde Antalya'nın Serik ilçesinde Agroser Tarım ve Ticaret A.Ş.'nde "Topraksız Tarımda Domates Bitkisinin Üretimi ve Ekonomik Verimlilik" üzerine üretim mühendisi olarak çalışmıştır.