

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***GNA* VE *CRYIAC* GENLERİNİN BÖCEKLERE DAYANIKLILIK İÇİN
PAMUK BİTKİSİNE AKTARILMASI**

Saber DELPASAND KHABBAZI

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Saber DELPASAND KHABBAZI tarafından hazırlanan “*GNA* ve *cryIAc* genlerinin böceklerle dayanıklılık için pamuk bitkisine aktarılması” adlı tez çalışması 08/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Dilek BAŞALMA



Jüri Üyeleri:

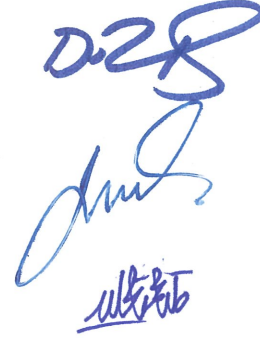
Başkan: Prof. Dr. Dilek BAŞALMA
Ankara Üniversitesi / Tarla Bitkileri A.B.D

Üye : Prof. Dr. Serkan URANBEY
Ankara Üniversitesi / Tarla Bitkileri A.B.D

Üye : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi / Tarla Bitkileri A.B.D

Üye : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
Çukurova Üniversitesi / Tarla Bitkileri A.B.D

Üye : Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi / Tarımsal Genetik Mühendisliği A.B.D.



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

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

08/08/2017



Saber DELPASAND KHABBAZI

ÖZET

Doktora Tezi

GNA VE *CRYIAC* GENLERİNİN BÖCEKLERE DAYANIKLILIK İÇİN PAMUK BİTKİSİNE AKTARILMASI

Saber DELPASAND KHABBAZI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Dilek BAŞALMA

Pamuk (*Gossypium hirsutum* L) ekim alanı ve üretimi bakımından Türkiye ekonomisinde önemli yer almaktadır. Pamuk bitkisindeki zararlılardan kaynaklanan verim kaybı % 29' a ulaşmaktadır. Zararlı böceklerle mücadelede sentetik insektisitler kullanılmaktadır; ancak bu strateji çevreye zarar verip insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkiler bırakmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *GNA*, *CryIAC* ve *CP4-EPSPS* genlerini farklı kaynaklardan izole edip pCAMBIA1301 vektöründe klonladıktan sonra *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla pamuk bitkisine aktarılmasıdır. *CP4-EPSPS* markör genini taşıyan aday transgenik bitkiler PMG içeren seleksiyon ortamlarında rejenere olup toprağa aktarılmıştır. Aktarılmış genlerin varlığı ve ifadelerini incelemek için PCR, RT-PCR, ELISA ve böcek denemeleri yapılmıştır. Transgenik T₀ bitkilerinin tohumları seleksiyon ortamlarında çimlendirilip bitkiler üzerinde PCR denemesi yapılarak genlerin T₁ nesline geçtikleri teyit edilmiştir. Transgenik bitkilerden beslenen *Aphis gossypii* Glover nimfalarının üremeleri % 46 - 66 azalmış; ayrıca *Spodoptera littoralis* larvalarında ise % 10 - 100 ölüm gözlenmiştir.

Ağustos 2017, 128 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoinformatik çalışmaları, Gen izolasyonu, Gen klonlaması, Gen aktarımı, Transgenik pamuk bitkisi, Moleküler denemeler

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

TRANSFORMATION OF COTTON WITH *GNA* AND *CRYIAC* GENES FOR INSECT-RESISTANCE

Saber DELPASAND KHABBAZI

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

Supervisor: Prof. Dr. Dilek BAŞALMA

Cotton (*Gossypium hirsutum* L) production and farming has very important place in the economy of Turkey. The damage caused by insect pests in cotton plant has approached approximately 29 %. Synthetic insecticides are used to kill pests; however, this strategy harms environment and also has a negative effect on human health. This study aimed to clone *GNA*, *CryIAC* and *CP4-EPSPS* genes isolated from different sources into pCAMBIA1301 vector and transfer cotton mature embryos using *Agrobacterium tumefaciens*. Carrying the *CP4-EPSPS* marker gene, putative transgenic plants were regenerated in PMG containing selection media and transferred to the soil. PCR, RT-PCR, ELISA and leaf biotoxicity assays were conducted to confirm the presence and expression of the transgenes. The seeds of transgenic T₀ plants were germinated on selection medium and PCR evaluations were performed on the plants to confirm the transitions of the transgenes to T₁ generation. The fertility of *Aphis gossypii* Glover nymphs fed on transgenic plants decreased by 46 - 66 %; additionally, 10 to 100 % mortality was observed in *Spodoptera littoralis* larvae released on transgenics.

August 2017, 128 pages

Key Words: Bioinformatics studies, Gene isolation, Gene cloning, Gene transformation, Transgenic cotton plants, Molecular assays

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişme katkıda bulunan danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri ABD), Prof. Dr. Dilek BAŞALMA'ya (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri ABD), çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve yönlendiren tez izleme komitesi üyeleri Yrd. Doç. Dr. Allah BAKHSH (Niğde Ömerhalis Demir Üniversitesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği ABD) ve Prof. Dr. Serkan URANBEY' e (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri ABD), bilimsel çalışmaların yanında her aşamada bir hoca bir arkadaş olarak destek olan Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri ABD), tez jüri üyesi Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a, (Çukurova Üniversitesi, Tarla Bitkileri ABD) tez çalışmam boyunca kimyasal materyalin sağlanmasında desteklerini esirgemeyen Dr. Güray AKDOĞAN' a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri ABD), laboratuvar çalışmalarında verdiği desteklerden dolayı Dr. Deniz KÖM'e, manevi desteklerinden dolayı Dr. Farzad NOFOUZI ve Dr. Cennet YAMAN'a, TÜBİTAK-BİDEB' e sağladığı 2215 burs programından dolayı, teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgi ve fedakârlıkla, maddi ve manevi tüm destekleri ile yanımda olan, babam, annem ve ablama en derin duygularla teşekkürlerimi sunar, bu tezin kazandığı tüm değerleri saygılarımla babam ve rahmetli anneme ithaf ederim.

Saber Delpasand Khabbazi

Ankara, Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZENİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Böceklerle Dayanıklı Bitkiler	3
2.2 Bt Ürünlerinin Ekonomik Etkileri	5
2.3 Pamuk Zararlı Böceklerinin Ana Grupları.....	6
2.4 Transgenik Bitkilerin Dünyada Üretim Durumu	7
2.5 Zararlı Böceklerle Karşı Dayanıklı Bitkilerin Üretiminde Kullanılmış Genler	12
2.5.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> δ -endotoksinler (Bt).....	12
2.5.2 Lektinler, kaynak ve etkileri.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1 Materyal.....	28
3.1.1 Bitki materyali	28
3.1.2 Genler ve kaynakları	29
3.1.3 Bakteriler.....	29
3.2 Yöntem	30
3.2.1 <i>GNA</i> geninin izolasyonu ve pCAMBIA 1301 vektöründe altklonlaması	30
3.2.2 pGTGN plazmitinin hazırlanması	41
3.2.3 <i>CryIAc</i> gen kasetinin hazırlanmış pGTGN ekspresyon vektöründe altklonlanması	43
3.3 İfade Plazmitlerin <i>A. tumefaciens</i> Hücrelerine Aktarımı.....	48
3.3.1 Elektro kompetan <i>A. tumefaciens</i> hazırlanması	48

3.3.2 Elektroporasyon.....	48
3.3.3 Elektroporasyon doğrulanması.....	49
3.4 Bitki Gen Aktarımı ve Doku Kültüründe Kullanılan Besi Ortamları.....	49
3.4.1 Bakteri besi ortamları.....	49
3.4.2 Bitki besi ortamları.....	49
3.5 Plazmid Çalışma İncelemesi.....	50
3.5.1 Tütün tohum sterilizasyonu.....	50
3.5.2 Tütün seleksiyonunda uygun PMG dozunun belirlenmesi.....	51
3.5.3 Bakteri hazırlanması.....	51
3.5.4 Gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu.....	51
3.6 Pamuk Gen Aktarımı.....	52
3.6.1 Pamuk tohum sterilizasyonu.....	52
3.6.2 Seleksiyon için uygun PMG doz belirlenmesi.....	53
3.6.3 Bakteri hazırlanması.....	54
3.6.4 Gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu.....	54
3.7 Aday Transgenik Bitkileri Dış Koşullara Alıştırmak.....	55
3.8 Aday Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri.....	56
3.8.1 Aktarılmış gen dizilerin izlenmesi.....	56
3.8.2 ELISA (Enzim Bağlı İmmüno Sorbent Deneyi).....	59
3.8.3 RT-PCR.....	60
3.9 Böcek Denemesi.....	64
3.9.1 <i>Spodoptera littoralis</i>	64
3.9.2 <i>Aphis gossypii</i> Glover.....	65
3.10T1 Nesli Bitkilerin Analizi.....	66
4. BULGULAR.....	68
4.1 Plazmitler ve Hazırlanmaları.....	68
4.1.1 GNA izolasyonu, klonlama, doğrulama ve biyoinformatik çalışmaları.....	68
4.1.2 pGN plazmitinin hazırlanması.....	75
4.1.3 pGTGN plazmitinin hazırlanması.....	77
4.1.4 pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmitlerinin hazırlanması.....	78
4.2 İfade Plazmitlerin <i>A. tumefaciens</i> Hücrelerine Aktarımı ve Doğrulanması.....	80
4.3 Tütün Gen Aktarımı.....	81

4.3.1 Tütün seleksiyonunda uygun PMG dozunun belirlenmesi.....	81
4.3.2 Gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu	82
4.4 Pamuk Gen Aktarımı	83
4.4.1 Seleksiyon için uygun PMG doz belirlenmesi	83
4.4.2 Bitki rejenerasyonu ve dış koşullara alıştırmaları.....	86
4.5 Aday Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri.....	87
4.5.1 Genomik DNA izolasyonu, PCR ve jel görüntüleme.....	87
4.5.2 ELISA	89
4.5.3 RNA izolasyonu, cDNA sentezleme ve RT-PCR.....	92
4.6 Böcek Denemesi.....	93
4.6.1 <i>Spodoptera littoralis</i>	93
4.6.2 <i>Aphis gossypii</i> Glover	95
4.7 T ₁ Nesli Bitkilerin Analizi.....	96
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	98
5.1 Genler ve Böcekler Üzerindeki Ölümcül Etkileri	98
5.2 <i>trGNA</i> Geninin Karakterizasyonu.....	100
5.3 Agglutinin Lektin Genlerinin Böcekler Üzerindeki Etkileri.....	100
5.4 Bt Genleri ve Etkileri.....	103
5.5 Gen Aktarımı ve Frekansı	104
5.6 Rejenerasyon Ortamlarında Seleksiyon	106
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ.....	125

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece santigrat
ddH ₂ O	Çift Damıtılmış Su
dk	Dakika
G	Yerçekim ivmesi
g	Gram
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
L	Litre
LiCl	Lityum Klorür
M	Molar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	mikromolar
mg	Miligram
mgL ⁻¹	Miligram litrede
ml	Mililitre
mM	milimolar
mol	Madde miktarı (mol)
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
rpm	Dakikada Devir
s	Saniye
U	Birim
UV	Ultraviyole

Kısaltmalar

BAP	6- benzilaminopurin
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry	Kristal

çb	Çift Baz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTPs	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmüno Sorbent Deneyi
<i>EPSPS</i>	5-Enolpiruvil Şikimat-3-Fosfat Geni
<i>GNA</i>	<i>Galanthus nivalis</i> Agglutinin Lektin Geni
MS0	Hormonsuz Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
NAA	α -Naftalenasetik Asit
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojenin Gücü
PMG	Fosfino Metil Glisin
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris Asetikasit EDTA
T-DNA	Aktarılan DNA

ŞEKİLLER DİZENİ

Şekil 2.1 Bazı pamuk zararlılar:	7
Şekil 2.2 2016 yılında transgenik bitkilerin yetiştirildiği ülkeler	8
Şekil 2.3 2016 yılında transgenik bitkilerin yetiştirildiği ülkeler	8
Şekil 2.4 Transgenik bitkilerin dünyada ekim alanı (1996.2016).....	10
Şekil 3.1 Doğadan toplanmış kardelen bitkisi (<i>Galanthus nivalis</i>)	29
Şekil 3.2 Total RNA izolasyonunda TRIzol [®] reaktifi kullanılmıştır. Karışıma kloroform ilave edildikten sonra karışım üç faza ayrılmıştır	32
Şekil 3.3 pGEM [®] .T Easy plazmit haritası	34
Şekil 3.4 pCAMBIA1301 ifade vektör haritası	38
Şekil 3.5 pJIT 61 vektör haritası.....	44
Şekil 3.6 Bakteri ile muamele edilmiş tütün yaprakları ko.kültivasyon ortamına alınmıştır.....	52
Şekil 3.7 Sterilizasyon için pamuk tohumları 30 dakika % 30' luk hidrojen peroksit & Tween.20' de çalkalanmıştır.....	53
Şekil 3.8 Pamuk gen aktarımında:	55
Şekil 3.9 <i>Spodoptera littoralis</i> larvası	65
Şekil 3.10 <i>Aphis gossypii</i> Glover pamuk yaprağı üzerinde partenogenez ile çoğalmaktadır	66
Şekil 4.1 Bitkiye gen aktarım çalışmasında biyoinformatik incelemeler sonucu tasarlanmış pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmit vektörler (Kaynak: Orjinal).....	68
Şekil 4.2 İzole edilmiş total RNA agaroz jeline yüklenip kalite ve yoğunluğu incelenmiştir	69
Şekil 4.3 İzole edilmiş RNA' nın kalite ve yoğunluğunu belirlemek için NanoDrop 1000 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.....	69
Şekil 4.4 cDNA' yı kullanarak PCR' da çoğaltılmış <i>GNA</i> geni	70
Şekil 4.5 pGEMT. <i>GNA</i> aktarımından sonra X.Gal.IPTG.ampisilin içeren plakta gelişen mavi.beyaz JM109 kolonileri.....	70
Şekil 4.6 Seçilmiş beyaz kolonilerin PCR sonuçlarına göre dört tanesinin pozitif olduğu belirlenmiştir.....	71
Şekil 4.7 kesme reaksiyonu ürünü agaroz jelinde elektroforez yapıp <i>GNA</i> geninin vektörde klonlanması doğrulanmıştır	71
Şekil 4.8 İzole edilmiş <i>GNA</i> nükleotid dizisi ve 333 çb' lık ORF bölgesi	73
Şekil 4.9 İzole edilmiş <i>GNA</i> protein dizisi, sinyal peptid dizisi (altı çizilmiş) ve muhafaza edilmiş mannoz bağlanma bölgeleri (kırmızıya boyanmış).....	73
Şekil 4.10 İzole edilmiş <i>GNA</i> nükleotid dizisi ile önceden bulunan dizilerin alt sıralanması.....	74
Şekil 4.11 İzole edilmiş <i>GNA</i> geni ile önceden bulunan dizilerin filogramı.....	75

Şekil 4.12	pCAMBIA 1301 (3) ve pGEMT.GNA (4, 5) vektörleri kesme reaksiyonlarında XhoI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde elektroforez yapıp istenen parçalar jelden izole edilmiştir	76
Şekil 4.13	pGN plazmiti Sall enzimi ile kesilip GNA geninin inserte olmuş yönü incelenmiştir; (2) yanlış yönde inserte olmuş GNA, (3 ve 5) doğru yönde inserte edilmiş GNA, (4) kesim sonrası hiçbir GNA vektörden ayrılmadı, (7) negatif kontrol	77
Şekil 4.14	Plakta gelişen pGTGN içeren DH5α suşları (Kaynak: Orjinal).....	77
Şekil 4.15	pGTGN plazmiti BglII ve NcoI enzimleri ile kesilip ~ 1.4 kb' lik CP4.EPSPS geni agaroz jel elektroforezinde izlenip klonlama doğrulanmıştır	78
Şekil 4.16	pGTGN plazmiti SmaI enzimi ile lineer edilip jelden ekstrekte edilmiştir (2) pJIT61 plazmiti KpnI ve EcoRV enzimleri ile kesilip 35S.CryIac.CAMV (3) ve AoPR1.CryIac.CAMV (4) kasetleri jelden ekstrekte edilmiştir	79
Şekil 4.17	Jelden ekstrekte edilmiş lineer pGTGN CIAP defosforile edilip saflaştırılmıştır (2) 35S.CryIac.CAMV (3) ve AoPR1.CryIac.CAMV (4) kasetleri, pGTGN ile ligasyondan önce jelden izole edilip saflaştırılmıştır.....	79
Şekil 4.18	CryIac genini içermeyen pGTGN vektörü Sall enzimi ile kesilmiştir (1). Farklı kolonilerden ekstrekte edilmiş pGTGNAoC1AC plazmiti Sall enzimi ile kesilip (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14) CryIac kasetinin klonlanması doğrulanmıştır (3, 4, 5, 6, 7, 12, 13); Farklı kolonilerden ekstrekte edilmiş pGTGN35C1AC plazmiti Sall enzimi ile kesilip CryIac kasetinin klonlanması doğrulanmıştır (10, 11)	79
Şekil 4.19	Elektroporasyon aracılığıyla pGTGNAoC1AC ve pGTGN35sC1AC plazmitleri <i>A. tumefaciens</i> (EHA105) bakterisine aktarılmıştır	80
Şekil 4.20	<i>A. tumefaciens</i> koloni PCR sonuçlarına göre: pGTGN35C1AC plazmitinde GNA (2), CP4.EPSPS (4), CryIac (8) genleri ve 35s.CryIac.camv tam kaseti (6) doğrulanmıştır; pGTGNAoC1AC plazmitinde ise de GNA (3), CP4.EPSPS (5), CryIac (9) genleri ve AoPR1.CryIac.camv tam kasetinin (7) varlığı doğrulanmıştır	81
Şekil 4.21	Tütün eksplantları üzerinde uygulanmış farklı PMG dozları; 1 ^a , 1.5 ^b , 2.5 ^c , 3.5 ^d , 5 ^e , 6.5 ^f , 8 ^g ve 10 ^h mg/L	82
Şekil 4.22	A. 5 mg/L PMG içeren rejenerasyon ortamlarında oluşmuş kaluslar üzerinde sürgünler gelişmeye başlamıştır. B. Eksplantlar alt kültür yapıp PMG dozu düşürülmüştür. C. Tütün bitkileri MS ₀ ortamına alınıp köklendirilmiştir	83
Şekil 4.23	Seleksiyon için uygun PMG dozunu belirlemek amacıyla farklı PMG dozlarında rejenerasyon ortamları hazırlanıp (A: 0 ^a , 1 ^b , 3 ^c , 5 ^d , 7 ^e , 9 ^f , 12 ^g , 15 ^h , 17 ⁱ mg/L; B: 17 ^a , 25 ^b , 34 ^c , 42 ^d , 51 ^e , 68 ^f , 85 ^g , 102 ^h , 119 ⁱ ve 136 ^j mg/L) eksplantlar üzerindeki etkileri incelenmiştir	84

Şekil 4.24	Rejenerasyon.seleksiyon ortamında gelişen fideleri (A) dış koşullarına alıştırmakta ilk aşamada torfa aktarıp (B) rutubet kaybını önlemek için magenta ağızları kapatılmıştır (C). Yeni yapraklar geliştikten sonra kapaklar uzattırılıp (D) bitkiler saksılara aktarılmıştır (E). Son aşamada bitkiler seraya alınmıştır (F).....	87
Şekil 4.25	Aday transgenik bitkilerin DNA' ları izole edilip nanodrop ile incelenmiştir	87
Şekil 4.26	PCR ile taranmış aday transgenik pamuk bitkileri (T ₀ nesli):.....	88
Şekil 4.27	ELISA plakasında hazırlanmış örneklerin OD değerleri ELISA READER cihazında okutulmuştur	89
Şekil 4.28	OD'ye göre çizilmiş <i>CryIAc</i> proteinin kalibrasyon grafiği	90
Şekil 4.29	ELISA denemesinde elde edilmiş <i>CryIAc</i> protein birikim miktarı (µg/g) ..	92
Şekil 4.30	Normalize edilmiş RT.PCR sonuçlarının incelenmesi.....	93
Şekil 4.31	T ₀ transgenik pamuk bitkilerinde <i>Spodoptera littoralis</i> böcek denemesi (a: 39, b: kontrol bitki, c: 6 ve d: 8 kodlu bitkiler) (Kaynak: Orjinal)	94
Şekil 4.32	T ₀ transgenik pamuk bitkilerinde <i>Aphis gossypii</i> Glover böcek denemesi (a: 6, b: kontrol bitki)	95
Şekil 4.33	T ₁ tohumları 17.5 mg/L PMG' lı ortamda çimlendirilmiştir. A: J, B: 39, C: 6, D: 8 bitkileri	96
Şekil 4.34	T ₁ bitkilerinde aktarılmış AoPR1. <i>CryIAc</i> .CaMV.polyA ve 35s. <i>CryIAc</i> .CaMV.polyA kasetleri PCR ile doğrulanmıştır; 1, 2 ve 3: 39 kodlu bitki; 4, 5 ve 6: J kodlu bitki; 7 ve 14 1 kb DNA ladder; 8, 9 ve 10: 6 kodlu bitki; 11, 12 ve 13: 8 kodlu bitki	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera böceklerine karşı zehirli etkisi olan bazı <i>Cry</i> genleri (Bakhsh vd. 2015).....	4
Çizelge 2.2	Transgenik Bitkilerin Dünyada Ekim Alanı (1996.2016) (James 2016)....	10
Çizelge 2.3	2015 ve 2016 yıllarında 26 ülkede transgenik bitkilerin üretim miktarları (milyon hektar) (James 2016).....	11
Çizelge 2.4	Ticari transgenik pamuk çeşit ve özellikleri.....	14
Çizelge 2.5	Ticari transgenik pamuk çeşit ve özellikleri (Bakhsh vd. 2015).....	15
Çizelge 2.6	Böceklere dayanıklı transgenik bitki üretim çalışmalarının bazıları; aktarılmış gen ve bitkiler (Bakhsh vd. 2015)	25
Çizelge 2.7	Böceklere dayanıklı transgenik bitkilerde aktarılmış lektin genleri ve etkileri (Bakhsh vd. 2015)	26
Çizelge 2.8	Böceklere dayanıklı transgenik bitkilerde aktarılmış lektin genleri ve etkileri (Bakhsh vd. 2015)	27
Çizelge 3.1	Kardelen bitkisinden <i>GNA</i> izolasyonu amacıyla tasarlanmış primer çiftleri	30
Çizelge 3.2	DNA kontaminasyonunu gidermek için total RNA, DNaseI enzimi ile muamele edilmiştir	32
Çizelge 3.3	cDNA sentezi için reaksiyon bileşen ve miktarları	33
Çizelge 3.4	<i>GNA</i> izolasyonu için optimize edilmiş PCR programı.....	33
Çizelge 3.5	<i>GNA</i> ve pGEM [®] .T Easy ligasyonu için optimize edilmiş bileşenler ve miktarları	35
Çizelge 3.6	pGEMT. <i>GNA</i> plazmitini XhoI ile kesmek için kurulmuş reaksiyon bileşenler ve miktarları	37
Çizelge 3.7	pCAMBIA 1301 ve pGEMT. <i>GNA</i> vektörlerinin kesimleri için kullanılmış bileşenler ve miktarları	39
Çizelge 3.8	<i>GNA</i> geni ve lineer pCAMBIA 1301 ligasonunda optimize edilmiş bileşenler ve miktarları	39
Çizelge 3.9	pGN plazmitinin Sall enzimi ile kesilmesinde gereken bileşenler ve miktarları	41
Çizelge 3.10	pGN plazmitinin kesme reaksiyonundaki gereken bileşenler ve miktarları	41
Çizelge 3.11	pCAMBIA. <i>CP4.EPSPS</i> plazmitinin kesme reaksiyonundaki gereken bileşenler ve miktarları	42
Çizelge 3.12	pGN plazmiti ve <i>CP4.EPSPS</i> geninin ligasyon reaksiyonundaki bileşenler ve miktarları	42
Çizelge 3.13	AoPR1. <i>CryIac.CAMV</i> kasetini pJIT61' den kesiminde gereken bileşenler ve miktarları	44
Çizelge 3.14	pGTGN kesme reaksiyonunda gereken bileşenler ve miktarları.....	45

Çizelge 3.15 AoPR1. <i>CryIAc</i> .CAMV ve pGTGN ligasyonu için gereken bileşenler ve miktarları	45
Çizelge 3.16 35s. <i>CryIAc</i> .CAMV kasetini pJIT61' den kesiminde gereken bileşenler ve miktarları	46
Çizelge 3.17 pGTGN kesme reaksiyonunda gereken bileşenler ve miktarları.....	46
Çizelge 3.18 35s. <i>CryIAc</i> .CAMV ve pGTGN ligasyonu için gereken bileşenler ve miktarları	47
Çizelge 3.19 Transgenik bitkilerin taramasında kullanılmış primerler, bağlanma sıcaklıkları ve ürün uzunlukları	58
Çizelge 3.20 PCR ile transgenik bitki taramasında hazırlanmış karışım içerikleri	58
Çizelge 3.21 Aktarılmış genlerin doğrulamasında uygulanmış PCR programı	59
Çizelge 3.22 İzole edilmiş total RNA' nın DNaseI reaksiyonundaki bileşenler ve miktarları	62
Çizelge 3.23 cDNA sentezi için reaksiyon bileşen ve miktarları	63
Çizelge 3.24 RT.PCR reaksiyonundaki bileşenler ve miktarları.....	63
Çizelge 3.25 RT.PCR' da uygulanmış reaksiyon programı	64
Çizelge 3.26 RT.PCR' da kullanılmış primer dizileri	64
Çizelge 3.27 T ₁ pamuk taranmasında kurulmuş PCR bileşikleri ve miktarları.....	67
Çizelge 3.28 Aktarılmış <i>CryIAc</i> kasetinin doğrulamasında uygulanmış PCR programı	67
Çizelge 3.29 <i>CryIAc</i> kasetlerinin tam çoğaltılmasında kullanılmış primer setleri	67
Çizelge 4.1 BLAST sonucuna göre izole edilmiş <i>GNA</i> geni ile önceden rapor edilmiş diziler arasındaki benzerlik bulunmaktadır	72
Çizelge 4.2 Farklı PMG konsantrasyonlarının tütün rejenerasyonunda etkisi	82
Çizelge 4.3 Farklı PMG konsantrasyonlarının embriyo rejenerasyonunda etkisi	85
Çizelge 4.4 PCR sonuçları pozitif olan transgenik pamuk bitkileri	89
Çizelge 4.5 ELISA READER cihazında okutulmuş <i>CryIAc</i> OD değerleri	90
Çizelge 4.6 ELISA denemesinde elde edilmiş <i>CryIAc</i> protein birikim miktarı (µg/g).....	91
Çizelge 4.7 İzole edilmiş total RNA' ların konsantrasyonları.....	92
Çizelge 4.8 Normalize edilmiş RT.PCR sonuçları	93
Çizelge 4.9 T ₀ transgenik pamuk yaprakları üzerinde beslenmiş <i>S. littoralis</i> larvalarının ölüm yüzdesi	94
Çizelge 4.10 T ₀ transgenik pamuk bitkilerinin <i>Aphis gossypii</i> Glover böcek denemesindeki ölüm yüzdesi.....	95
Çizelge 4.11 T1 bitkilerinin seleksiyon ortamlarında çimlenme sayısı ve PCR sonuçları	97

1. GİRİŞ

Tetraploid pamuk bitkisinin (*Gossypium hirsutum* L.) 70 ülkede tarımı yapılmakta olup, her yıl 500 milyar dolar katkı ile 180 milyon insanın geçimini sağlamaktadır (John 1997, Rahman vd. 2012).

Tarımsal ürünlere zarar veren yaklaşık 67.000 zararlı türü vardır; bunların yaklaşık 9,000 türü böcek ve örümcek türleridir (Ross ve Lembi, 1985). Böcek zararlıları bitkilerin dokularını (yaprak, sap, kök ve meyve) çiğneyerek veya özularını emerek ürün kayıplarına sebep olmaktadır. Böcek zararlıları virüs, bakteri ve mantarları bitkilere bulaştırıp dolaylı olarak bitkilere zarar verebilmektedirler (Rahman vd. 2012).

Gatehouse vd. (1992) böcek zararlıları ve hastalıkların tarımsal ürünlerde yaklaşık % 37 verim kaybına neden olduğunu, bu oranın % 13' ünün böcek zararından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Oerke (2006) yaptığı araştırma sonuçlarına göre pamuk bitkisindeki hasarın % 29' a ulaştığını kaydetmiştir. Zararlı böcekler ile mücadelede sentetik insektisitler kullanılmaktadır; ancak bu strateji çevreye zarar verip insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkiler bırakmaktadır (Curry 2002; Bakhsh vd. 2009). Bir araştırma sonucuna göre, dünya genelinde işçilerin % 1 - 3' ü (25 – 77 milyon kişi) pestisit kullanımından zarar görmekte olup, yaklaşık yılda bir milyon kişi zehirlenmeden dolayı hastanelere müracaat etmektedir (EJF 2007). Dolayısıyla, pestisitlerin zararlı etkilerini azaltmak amacıyla genetiği değiştirilerek böceklere dayanıklı hale getirilen bitkiler, gen aktarım yöntemleri ile üretilmiştir.

1996 yılında ticari üretimi başlayan genetiği değiştirilmiş bitkilerin ekim alanı gittikçe artmaktadır. 1996 yılında 1.7 milyon hektar olan ekim alanı 2016 yılında 185.1 milyon hektara yükselmiştir.

Biyoteknoloji ürünlerinin dünya piyasasındaki değeri 2015 yılına göre % 3 artış ile 2016 yılında 15.8 milyar dolara yükselmiştir. Bu değer 2016 yılındaki 73.5 milyar

dolarlık bitki koruma piyasasının % 22' sini ve 45 milyar dolarlık dünya ticari tohum piyasasının ise % 35' ini temsil etmektedir (James 2016).

Böceklere dayanıklı transgenik pamuk üretimi insektisit kullanımı ve ilaçlama maliyetinde azalma, verim ve elde edilen kârda artış, çiftçi sağlığında iyileşme, çevrenin korunması ve faydalı böcekler üzerine olumsuz etki bırakmamakla avantaj sağlamıştır. Ancak bu yaklaşımda bazı olumsuz yönler de tanımlanmaktadır. Zararlı böcekler ile beslenen predatör ve parazitler olumsuz yönde etkilenebilmesi, tüm böcek türleri ile etkili mücadelenin mümkün olmaması, toleransı sağlayan genler yakın akraba olan yabani türlere geçebilmesi, toleranslı transgenik bitkilerin üretimiyle böceklerin zamanla üretilen toksine karşı dayanıklılık sergileyebilmeleri böceklere dayanıklı transgenik bitki üretiminin dezavantajları olarak bilinmektedir (Karthikeyan vd. 2012).

Bu tezin amacı ise, *GNA*, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS* genlerinin farklı kaynaklardan izole edilmesi, pCAMBIA1301 ifade vektörünün T-DNA bölgesinde klonlanması ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla pamuk bitkisine aktarılması olmuştur. Üretilen genetiği değiştirilmiş pamuk bitkilerinin lepidoptera ve hemiptera takımlarına ait olan *Spodoptera littoralis* ve *Aphis gossypii* Glover böceklerine karşı dayanıklılık kazanımları hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Böceklerle Dayanıklı Bitkiler

Biyoteknoloji alanındaki son gelişmeler, çeşitli kaynaklarda bulunan genlerin bitkilere aktarılması ve yeni böcek zararlılarına dayanıklı tarımsal ürünlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır (Dhaliwal vd. 1998). Böcek zararlıları ve hastalıklar tarımsal ürünlerde yaklaşık verimin % 37' sinin kaybına sebep olarak ciddi bir tehdit sayılmaktadır; bu oranın % 13' u böcek zararlılarından kaynaklanmıştır (Gatehouse vd. 1992). Böceklerle dayanıklı bitkilerin üretiminde en çok *Bacillus thuringiensis* bakterisinden izole edilmiş genler kullanılmıştır. Bt genlerinin çoğu Lepidoptera böceklerine karşı direnç sağlamakla birlikte bazen Coleoptera (McPherson vd. 1988) veya Diptera (Yamamoto and McLaughlin, 1981) grup böceklerine de karşı ölümcül etki göstermiştir (çizelge 2.1). Bt genlerinin faydalı böcekler, hayvanlar veya insanlar üzerine zehirli etkisi kanıtlanmamıştır (Klausner, 1984).

Bitkilerde daha iyi ifade olması amacıyla Bt genlerinde yapılmış modifikasyonlar böceklerle dayanıklı bitki üretiminde önemli adımlardan sayılmaktadır (Perlak vd. 1991). Kodonları optimize edilmiş genler Lepidoptera ve Coleoptera' ya karşı dayanıklılık sağlamak amacıyla ilk olarak sırasıyla pamuk ve patatese aktarılmıştır (Perlak vd. 1991).

Bacillus thuringiensis' ten izole edilmiş Bt genlerine ilaveten birçok bakteri, bitki ve farklı kaynaklardan izole edilmiş genler zararlı böceklerle karşı dayanıklı bitki üretiminde kullanılmıştır (Kereša vd. 2008). Proteinaz inhibitör (*PI*) genleri böceklerin sindirim enzimlerinin faaliyetlerinde engelleyici etki bırakmaktadır. İlk çalışmada, börülce bitkisinden izole edilmiş tripsin inhibitör geni (*CpTI*) tütün bitkisine aktarılmıştır (Hilder vd. 1987). Diğer çalışmalarda patates inhibitör II geni çeltik ve pamuk bitkilerine aktarılmıştır (Duan vd. 1996; Majeed, 2005).

Çizelge 2.1 Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera böceklerine karşı zehirli etkisi olan bazı *Cry* genleri (Bakhsh vd. 2015)

Cry geni	Hedeflenmiş böcekler	Böcek sınıfı
<i>CryIA(a)</i>	<i>Bombyx mori</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i>	Lepidoptera
<i>CryIA(b)</i>	<i>Manduca sexta</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Lahana solucani</i> , sivrisinek	Lepidoptera ve Diptera
<i>CryIA(c)</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Helicoverpa zea</i>	Lepidoptera
<i>CryIA(e)</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera
<i>CryIB</i>	<i>Lahana solucani</i>	Lepidoptera
<i>CryIC</i>	Sivrisinek, <i>Spodoptera littoralis</i>	Lepidoptera ve Diptera
<i>CryIC(b)</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera
<i>CryID</i>	<i>Manduca sexta</i> , <i>Spodoptera exigua</i>	Lepidoptera
<i>CryIE</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	Lepidoptera
<i>CryIF</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Lepidoptera
<i>CryIG</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Lepidoptera
<i>CryIIA</i>	<i>Lymantria dispar dispar</i> , sivrisinek, <i>Helicoverpa armigera</i>	Lepidoptera
<i>CryIIB</i>	<i>Manduca sexta</i> , <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Lymantria dispar dispar</i>	Lepidoptera
<i>CryIIC</i>	<i>Manduca sexta</i> , <i>Lymantria dispar dispar</i>	Lepidoptera
<i>CryIIIA</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera
<i>CryIIIA(a)</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera
<i>CryIIIB</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Coleoptera
<i>CryIIIC</i>	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Coleoptera
<i>CryIVA</i>	Sivrisinek (Aedes ve Culex)	Diptera
<i>CryIVB</i>	Sivrisinek (Aedes)	Diptera
<i>CryIVC</i>	Sivrisinek (Culex)	Diptera
<i>CryIVD</i>	Sivrisinek (Aedes ve Culex)	Diptera
<i>CryV</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Lepidoptera ve Coleoptera

Bitki lektinleri başarılı bir şekilde böcek zararlılara karşı tarımsal ürünlerin korunmasında kullanılmıştır (Goldstein ve Hayes 1978). Çeşitli lektinlerin Coleoptera, Lepidoptera (Czapla ve Lang 1990) ve Diptera (Eisemann vd. 1994) zararlılarına olan zehirli etkileri kanıtlanmıştır. Bitki lektinleri bitki özsuynunu emen Homoptera zararlıların kontrol edilmesinde kullanılmıştır. Lektinler orta bağırsak hücrelerinde endositozu ve bulunan başka zehirli metabolitleri uyararak besi maddelerin emilimini engelleyip orta bağırsak hücrelerinde parçalanmaya da sebep olabilirler (Czapla ve Lang 1990).

Zehirli proteinler, lektinler ve inhibitörler gibi yaygın stratejiler ile direnç kazandırmak yanında bitki aracılıkla RNAi teknolojisi zararlılarla mücadelede yeni ufuk açmıştır (Price ve Gatehouse 2008). İlk olarak *Caenorhabditis elegans*' ta tanımlanmış RNAi (Fire vd. 1998), çeşitli organizmalarda etkili gen susturma yöntemi olarak kullanılmıştır (Hannon 2002). Farklı Hymenoptera (Lynch ve Desplan 2006), Coleoptera (Tomoyasu vd. 2008), Diptera (Dzitoyeva vd. 2001) ve Lepidoptera (Terenius vd. 2011) böceklerinde genlerin susturulması, dsRNA' yı oral yolla besletmek ile gerçekleşmiştir. Ancak, Mao vd. (2011), Zhu vd. (2012), ve Mao ve Zeng (2014)'in çalışma sonuçları daha ümit verici sayılmaktadır; Bitki aracılığıyla RNAi teknolojisini kullanarak cytochrome P450 (*CYP6AE14*), ecdysone reseptör (*EcR*) ve hunchback (*hb*) genleri sırasıyla *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua* ve *Myzus persicae* böceklerinde susturulmuştur.

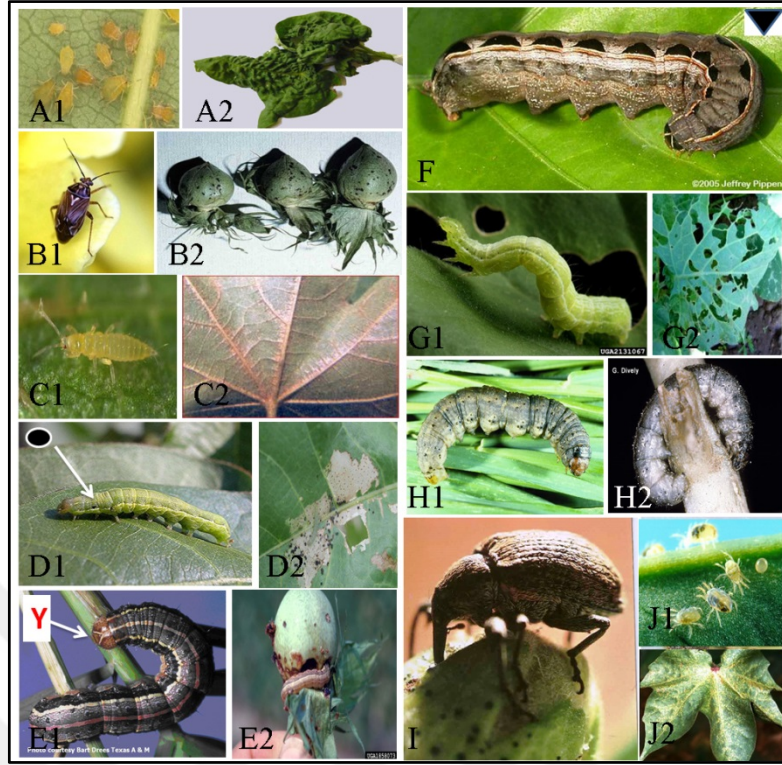
2.2 Bt Ürünlerinin Ekonomik Etkileri

Sentetik insektisit üretiminde yaklaşık 8.11 milyar amerikan doları harcanmaktadır; üretilen insektisit % 30' u sebze ve meyveler, % 23 ve % 15 ise sırasıyla pamuk ve çeltik tarımında kullanılmaktadır (Krattiger 1997). Dünya pirincinin yaklaşık % 92' si Asya' da üretilmektedir; verilere göre insektisit için yaklaşık olarak bir milyar dolar harcanmaktadır. Pamuk ziraatında yaklaşık 1.9 milyar dolarlık insektisit kullanılmaktadır. Bt transgenik bitkilerin etkinliğine bakıldığında etkili ve ideal alternatif olmaktadır (Bakhsh vd. 2009; 2015). Böceklere dayanıklı pamuk üretimi dünya genelinde insektisit kullanımında % 49.8 azalma sağlamıştır; Meksika, Çin,

Arjantin, Hindistan, Güney Afrika' da insektisit tüketiminde sırasıyla yüzde 77, 65, 47, 41 ve 33 azalma olmuştur (Qaim 2009). İnsektisit kullanımındaki azalma ürün veriminde de artışa sebep olmuştur. Ortalama, dünya genelinde Bt transgenik bitki üretimi ile verimde % 22.5 artış gözlenmiştir. Transgenik pamuk üretimi, 1996 ile 2012 yılları arasında Çin' de 15 milyar dolarlık kâr sağlamıştır. Hindistan' da Bt pamuk ziraatından elde edilen gelir 2002 ile 2008 yılları arasında 5.1 milyar dolar ve 2008 yılında 1.8 milyar dolar (Brookes ve Barfoot 2010) , Pakistan' da ise 1.7 milyar dolar olmuştur (Kouser ve Qaim 2012; Bakhsh 2015).

2.3 Pamuk Zararlı Böceklerinin Ana Grupları

Pamuk belirsiz büyüme özelliklerinden dolayı böcekler için iyi bir yiyecek ve barınma bitkisidir. Pamuktaki zararlı böcekler, sokucu emici böcekler, tırtıllar ve çiçek tomurcuğu veya kozalardan beslenen böcekler olmak üzere üç gruba ayrılır. Yaprak biti, ligus böceği, trips, iki noktalı kırmızı örümcek bitki özsuğunu emebilmek için bitki dokusunu delerek veya törpüleyerek zarar vermektedir. Pamuk kurtları, kabak oyucu tırtılı ve boz kurtlar yaprak ve fideyi çiğneyerek veya keserek bitkiye zarar vermekteler. Pamuk hortumlu böceği çiçek tomurcuğu ve kozalardan beslenerek bitkiye zarar verirler. Bazı zararlılar ve oluşturdıkları hasar şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Bazı pamuk zararlıları:

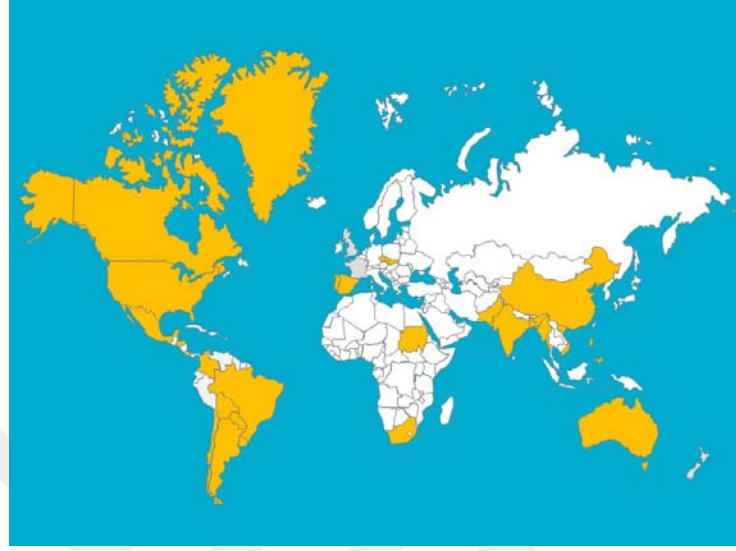
Pamuk yaprak biti (aphids) ve hasarı (A1, A2), ligus böceği (tarnished plant bug) ve hasarı (B1, B2), Trips ve hasarı (C1, C2), Pamuk çizgili yaprak kurdu (beet armyworms) ve hasarı (D1, D2), Güz tırtılı (fall armyworm) ve hasarı (E1, E2), pamuk yaprak kurdu, yellowstriped armyworm (F), kabak oyucu tırtılı (cabbage looper) ve hasarı (G1, G2), boz kurt (cutworm) ve hasarı (H1, H2), pamuk hortumlu böceği, Boll Weevil (I), İki Noktalı Kırmızı Örümcek (Two spotted spider mite) ve hasarı (J1, J2) (Kaynak: Anonim)

2.4 Transgenik Bitkilerin Dünyada Üretim Durumu

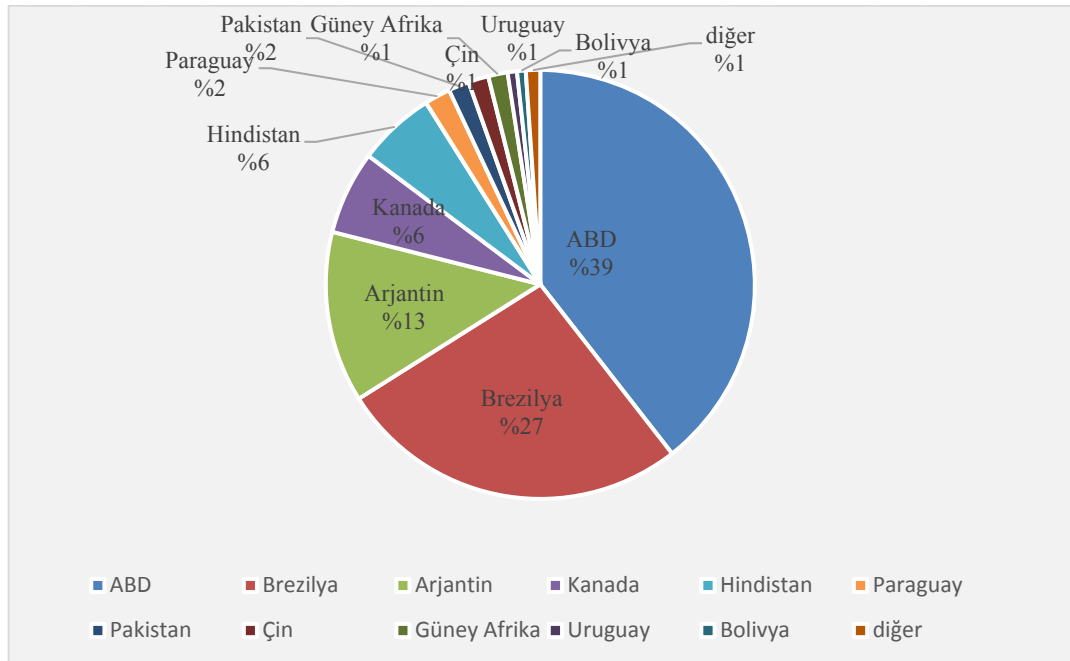
Son beş yılda transgenik bitkiler gelişmekte olan ülkelere göre daha fazla üretilmiştir. 2016 yılında gelişmekte olan 19 ülkede 99.6 milyon hektardır (dünya transgenik ekim alanının % 54' u) ancak 7 gelişmiş ülkede 85.5 milyon hektar (dünya transgenik ekim alanının % 46' sı) transgenik bitki üretilmiştir (James 2016).

2016 yılında transgenik bitki üreten toplam 26 ülkeden, 18' i biyotek mega-ülke olarak tanımlanmıştır (şekil 2.2 ve çizelge 2.2). ABD 72.9 milyon hektar (toplam transgenik üretiminin % 39' u) transgenik bitki üretimiyle 2016 yılında dünyanın en büyük üreticisidir. Brezilya 49.1 milyon hektar (% 27) üreterek dünyada ikinci sırasında yer

almaktadır (şekil 2.3). 2015-2016 yılında biyotek ürün üretiminde Brezilya en yüksek artışa sahiptir (% 4.9) (James 2016).



Şekil 2.2 2016 yılında transgenik bitkilerin yetiştirildiği ülkeler



Şekil 2.3 2016 yılında transgenik bitkilerin yetiştirildiği ülkeler

2016 yılında soya, mısır, pamuk ve kanola en fazla üretilen transgenik ürünlerdir. %1'lik üretim artışına rağmen transgenik soya, % 50' lik üretim miktarını korumuş ve 91.4 milyon hektarlık ekim alanı ile en fazla üretilen biyotek bitki haline gelmiştir. Bu miktar dünya soya üretiminin % 78' ini kapsamaktadır.

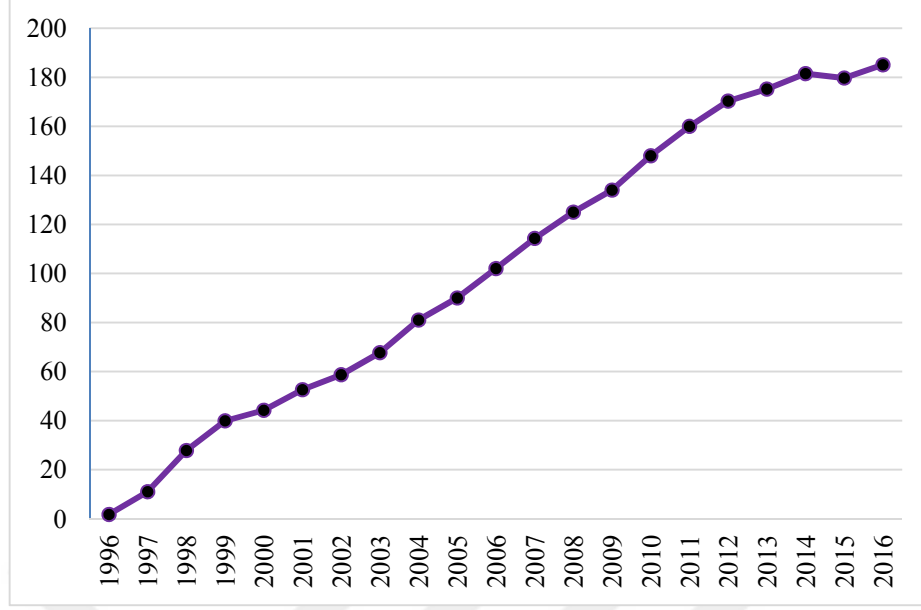
En fazla üretim gelişmesi 2015–2016 yıllarında transgenik mısır üretiminde gözlenmiştir (% 13). Transgenik mısır dünyada 60.6 milyon hektarda yetiştirilmektedir. Bu miktar 2016 yılında toplam mısır üretim alanının % 64' unu oluşturmaktadır.

Transgenik pamuğun ekim alanı 2016 yılında 2015' e göre % 7 azalmakla 22.3 milyon hektara düşmüştür. Bu üretimdeki azalma transgenik olmayan pamuk bitkilerinde de görünmüştür ve nedeni dünya pamuk piyasasındaki fiyatların azalmasına atfedilmiştir.

Transgenik kanola üretimindeki % 1' lik artış ile ekim alanı 2015 yılında 8.5 milyon hektardan 2016' da 8.6 milyon hektara yükselmiştir. Bu artışın nedeni ise ABD, Kanada ve Avustralya' daki sofralık yağlara olan marjinal talebin yükselmesine atfedilmiştir.

İlk olarak 2016 yılında ticarileştirilmiş düşük-lignin yonca yüzde 15 – 20 verimin artışını sağlamaktadır; ABD' de yaklaşık 1.2 milyon hektar herbisite toleranslı ve 21,000 hektar düşük lignin içeren yonca yetiştirilmiştir; Kanada' da ise düşük-lignin yonca yaklaşık 1,000 milyon hektarda yetiştirilmiştir (James 2016).

1996 yılında ticari üretimi başlayan genetiği değiştirilmiş bitkilerin ekim alanı gittikçe artmaktadır (şekil 2.4). 1996 yılında 1.7 milyon hektar olan ekim alanı 2016 yılında 185.1 milyon hektara yükselmiştir (çizelge 2.3). ISAAA' nın verilerine göre 2016 yılında bu bitkiler ticari olarak toplam 26 ülkede yetiştirilmektedir (çizelge 2.4). Dünya ülkeleri arasında ABD 72.9 milyon hektar ile en fazla transgenik bitki üretip Brezilya ve Arjantin ise sırasıyla 49.1 ve 23.8 milyon hektarla ikinci ve üçüncü sırada yer almaktalar (James 2016).



Şekil 2.4 Transgenik bitkilerin dünyada ekim alanı (1996-2016)

Çizelge 2.2 Transgenik Bitkilerin Dünyada Ekim Alanı (1996-2016) (James 2016)

Yıl	Hektar (Milyon)
1996	1.7
1997	11.0
1998	27.8
1999	39.9
2000	44.2
2001	52.6
2002	58.7
2003	67.7
2004	81.0
2005	90.0
2006	102.0
2007	114.3
2008	125.0
2009	134.0
2010	148.0
2011	160.0
2012	170.3
2013	175.2
2014	181.5
2015	179.7
2016	185.1
Toplam	2.149.7

Çizelge 2-3 2015 ve 2016 yıllarında 26 ülkede transgenik bitkilerin üretim miktarları
(milyon hektar) (James 2016)

Sıra	Country	2015	2016
1	ABD*	70.9	72.9
2	Brezilya*	44.2	49.1
3	Arjantin*	24.5	23.8
4	Kanada*	11.0	11.6
5	Hindistan*	11.6	10.8
6	Paraguay*	3.6	3.6
7	Pakistan*	2.9	2.9
8	Çin*	3.7	2.8
9	Güney Afrika*	2.3	2.7
10	Uruguay*	1.4	1.3
11	Bolivya*	1.1	1.2
12	Avustralya*	0.7	0.9
13	Filipin*	0.7	0.8
14	Myanmar*	0.3	0.3
15	İspanya*	0.1	0.1
16	Sudan*	0.1	0.1
17	Meksika*	0.1	0.1
18	Kolombiya*	0.1	0.1
19	Vietnam	<0.1	<0.1
20	Honduras	<0.1	<0.1
21	Şili	<0.1	<0.1
22	Portekiz	<0.1	<0.1
23	Bangladeş	<0.1	<0.1
24	Kosta Rika	<0.1	<0.1
25	Slovakya	<0.1	<0.1
26	Çek Cumhuriyeti	<0.1	<0.1
Toplam		181.5	179.7

*50,000 hektardan fazla biyotek ürünleri üreten mega-ülkeler

Bacillus thuringiensis (Bt) zehir proteinini üreten transgenik bitkiler bazı önemli zararlıları kontrol ederek, insektisit kullanımını azaltarak fayda sağlamaktadır (Shelton vd. 2002, Carrie`re vd. 2003). Bt ürünlerinin ticarileştirilmesinden önce, böceklerin bu zehir proteinine dayanıklılık kazanacağı birçok bilim adamı tarafından söylenmiştir. Böceklerin insektisitlere yaygın olarak kazandıkları dayanıklılık, laboratuvar denemelerindeki Bt' ye karşı kazanılmış dayanıklılık, tarlada Bt ilacının *Plutella xylostella*' ya karşı kullanımı ardından kazanmış olduğu dayanıklılık bu iddiayı desteklemiştir (Georghiou ve Lagunes-Tejeda 1991, Tabashnik 1994, Shelton vd. 2002, Ferre' ve Van Rie 2002). Böceklerin dayanıklılık kazanmalarını engellemek amacıyla sığınma stratejisi (refuge strategy) yaygın olarak kabul edilmiştir (Tabashnik vd. 2003). Bu stratejiye göre hassas böceklerin korunması amacıyla Bt bitkilerinin yanına Bt olmayan bitkiler ekilmiştir.

Dünya Bt pamuk ve mısır üretim miktarı 2011 yılına kadar 66 milyon hektara ulaşmıştır. Bt bitkilerinin üretim artışıyla, direnç kazanan böcek türlerinin de sayısı artmaktadır; 2011 yılına kadar bu böceklerin cins sayısı beşe artmıştır (Tabashnik vd. 2013).

2.5 Zararlı Böceklere Karşı Dayanıklı Bitkilerin Üretiminde Kullanılmış Genler

Bakteri kaynaklı genler *Cry*, *cyt*, *vip*; böcek kaynaklı genler *AaHIT* (*Androctonus australis* hector insect toxin), *CYP6AE14* (P450 mono-oksijenaz), Kitinaz, Proteaz inhibitörleri ve lektinler (*GNA*, *ACA* ve *ASAL*), Proteinaz inhibitörleri, Alfa-amilaz inhibitörleri, proteazlar gibi bitki kaynaklı genler zararlı böceklere karşı dayanıklılık kazandırmak amacıyla bitkilere aktarılmıştır. (Nanasaheb ve Bryony 2012).

2.5.1 *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksinler (Bt)

Gram pozitif *Bacillus thuringiensis* bakterisi 1902 yılında, Ishwata tarafından Japonya'da keşfedilmiştir. Bu bakteri sporülasyon esnasında böcek öldürücü etkisi olan

kristalize yapılar oluşturmaktadır. Bu delta-endotoksin yapılar pro-toksinlerden oluşmaktadırlar. Bt son 40 yılda biyoinsektisit olarak kullanılmıştır (Schnepf vd. 1998).

Doğal Bt genlerinde yüksek A/T oranından dolayı bu genlerin bitkilere aktarımından sonra ifade seviyeleri düşük görülmüştür (1-5 ng/mg). Bu miktarın yükselmesi için bu gen modifiye edilip veya tamamen sentetik olarak üretilmiştir. Farklı promotörler kullanarak bu genin ifade seviyesi 100 - 200 ng/mg seviyesine yükseltilmiştir (Palma vd. 2014).

2.5.1.1 Cry proteinlerinin yapısal bölgeleri

Cry proteinleri üç yapısal bölgeden oluşmuştur; birinci bölge 7 alfa sarmal (α -helix) ile proteinin hücre zarına girişiminden sorumludur. İkinci bölge ise “Grek anahtarı” yapısında 3 adet anti paralel beta katmanından (β -sheets) oluşmuştur. Üçüncü bölge ise Jöleli rol yapısında iki adet anti paralel beta katmanından oluşmuştur. Bu iki bölge reseptörlerin tanımlanma ve bağlanmasından sorumludur (De Maagd vd. 2001).

2.5.1.2 Cry proteinlerin etki mekanizması

Bt δ -endotoksinler protoksin halinde farklı büyüklükte olan proteinlerden oluşmaktalar. Kristal proteinler veya protoksinler yüksek pH’ ta böcek orta bağırsağında çözündüğü zaman parçalanır ve 65-70 kDa’ luk aktif toksinlere dönüşürler. Aktif toksinler bağırsağın epitel hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanıp hücre zarında delikler oluşturarak bu hücrelerin patlamasına neden olurlar (Palma vd. 2014).

2.5.1.3 Piyasada bulunan ticari transgenik pamuklar

Ticari amaçla üretilmiş zararlı böceklere dayanıklı pamuk bitkisinde altı gen *CryIAc*, *CryIAb*, *Cry2Ab2*, *Cry2Ae*, *CryIF*, *vip3A(a)* kullanılmıştır. Bu genler tek veya birlikte bitkiye aktarılmıştır. Bt genlerinin birleştirilmesindeki esas amaç, dayanıklılık ve

etkinliğini artırmaktır. Ticari olarak, herbisitlere toleranslı pamuk üretiminde ise *CP4-EPSPS*, *ZM-2MEPSPS*, *Bar* ve *bxn* genleri kullanılmıştır (çizelge 2.4 ve 2.5).

Çizelge 2.4 Ticari transgenik pamuk çeşit ve özellikleri

Ticari ad	Üreten firma	Ticari Özellikler	Aktarılmış gen	Böcek /herbisit türleri
VIPCOT™ Cotton	Syngenta	Böceğe direnç	<i>vip3A(a)</i>	Lepidoptera
WideStrike™ Cotton	Dow AgroSciences LLC	Böceğe direnç	<i>CryIF</i> <i>CryIAc</i>	Lepidoptera
WideStrike™ Ready™ Cotton	Roundup Monsanto ve Dow AgroSciences LLC	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i> <i>CryIF</i> <i>CryIAc</i>	Gilifosat, Lepidoptera
BXN™ Plus Cotton	Bollgard™ Monsanto	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>bxn</i> <i>CryIAc</i>	Oxynil herbisitlerinin ot öldürücü özelliklerini kaldırmak, Lepidoptera
VIPCOT™ Roundup Ready™ Flex™ Cotton	Syngenta ve Monsanto	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i> <i>vip3A(a)</i> <i>CryIAb</i>	Gilifosat, Lepidoptera
Bollgard® III	Monsanto	Böceğe direnç	<i>vip3A(a)</i> <i>CryIAc</i> <i>Cry2Ab2</i>	Lepidoptera

Çizelge 2.5 Ticari transgenik pamuk çeşit ve özellikleri (Bakhsh vd. 2015)

Ticari ad	Üreten firma	Ticari Özellikler	Aktarılmış gen	Böcek /herbisit türleri
JK 1	JK Agri Genetics Ltd (Hindistan)	Böceğe direnç	<i>Cry1Ac</i>	Lepidoptera
Glytol™ x Twinlink™	Bayer CropScience	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>2mepsps</i> <i>Cry1Ab</i> <i>Cry2Ae</i>	Glifosat, lepidoptera
Fibermax™ Liberty Link™ Bollgard II™	Bayer CropScience	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>bar</i> <i>Cry1Ac</i> <i>Cry2Ab2</i>	Glifosinat, Lepidoptera
Bollgard™ Cotton	Monsanto	Böceğe direnç	<i>Cry1Ac</i>	Lepidoptera
Roundup Ready™ Bollgard II™ Cotton	Monsanto	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i> <i>Cry2Ab2</i> <i>Cry1Ac</i>	Glifosat, Lepidoptera
Bollgard™ Cotton, Ingard™	Monsanto	Böceğe direnç	<i>Cry1Ac</i>	Lepidoptera
Bollgard® III x Roundup Ready™ Flex™	Monsanto	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i> <i>vip3A(a)</i> <i>Cry1Ac</i> <i>Cry2Ab2</i>	Glifosat, Lepidoptera
Roundup Ready™ Bollgard™ Cotton	Monsanto	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i> <i>Cry1Ac</i>	Glifosat, Lepidoptera
TwinLink™ Cotton	Bayer CropScience	Herbisite tolerans & Böceğe direnç	<i>Cry1Ab</i> <i>Cry2Ae</i> <i>bar</i>	Glifosinat, Lepidoptera

2.5.2 Lektinler, kaynak ve etkileri

Sekonder metabolitlerin bir gurubu olan lektinler bitkiden beslenen böceklere karşı dayanıklılık sağlar. Lektinler böceklerin bağırsak hücrelerinde parçalanmaya, mikrovililerin şişmesi veya epitel hücrelerin uzaması ile bağırsak lümeninin kapamasına, amino asit ve demir metabolizmasının engellenmesiyle böceklere zarar verip onların bitkiden beslenmelerine engel olurlar (Chougule ve Bonning 2012).

Bitkisel lektinlerin birçoğu böcek-karşıtı potansiyeline sahipler. Lektinlerin çoğu böceklerin gelişme ve çoğalmalarını olumsuz yönde etkileyip bazıları ise güçlü böcek öldürücü özelliğine sahipler. Bazı araştırma sonuçlarına göre lektinler beslenme ve ovipozisyon faaliyetler üzerine caydırıcı etki bırakırlar. Genelde yutulmuş lektinler böcek bağırsağının bazı bölgelerine bağlanırlar. Ayrıca, *GNA* lektin gibi bazıları bağırsak epitelinden hemolimf ve diğer dokulara geçerler (Michiels vd. 2010).

Lektinler en az bir katalitik olmayan bölgeye sahip olan protein molekülleridir, bunlar ters olarak özel karbonhidratlara bağlanırlar; bu karbonhidratlar basit monosakkaritler veya daha karmaşık gelikanlar olabilirler (Peumans ve Van Damme 1995). Klasik bitki lektinleri genelde yoğun olarak tohum, kabuk ve soğanlarda bulunurlar. Bu proteinlerin tam işlevi henüz aydınlatılamamış olsa da, yüksek konsantrasyon ve kaynak dokuları, onların depolama proteinleri olduklarını önermektedir. Ayrıca, bitkilerden beslenen böcekler ve patojenlere karşı savunma molekülleri olarak görev yapmaktadırlar (Michiels vd. 2010).

Son yirmi yılda, bitkilerde devamlı olarak üretilen birçok lektin molekülleri tanımlanmıştır. Bu lektinler çeşitli yapı ve şeker özelliklerine sahipler. Bunların yanında son yıllarda, indüklenen ifadeye sahip lektinler bulunmuşlardır. Tüm bu lektinler 12 familyada sınıflandırılmıştır (Van Damme vd. 2008). Lektinlerin ifadeleri tuz stres koşullarında (Zhang vd. 2000), patojen bulaşmasında (Qin vd. 2003), jasmonik asit muamelesinde (Lannoo vd. 2007) ve böceklerin bitkiden beslenmesinde (Subramanyam vd. 2008; Vandenborre vd. 2004 a, b) uyarılmaktadır. Depolanan klasik lektinlerin aksine indüklenen lektinler çoğu zaman bitki hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında

yerleşmektedir. Bu lektinlerin ifade seviyeleri devamlı ifade olunan lektinlere göre daha düşüktür (Michiels vd. 2010).

Bitkisel lektinler böceklerin üreme ve büyümeleri üzerine ağır etki bırakmaktadırlar. Araştırmalara göre *GNA* lektin en çok böcek-karşıtı potansiyele sahiptir (Rahbe vd. 1995). Ayrıca mannoza bağlanmayan lektinlerin de insektisit faaliyetlerine sahip oldukları belirlenmiştir (Michiels vd. 2010).

GNA lektin mannoza özel olarak bağlanan bir lektindir. İlk Hemiptera böceklerine karşı etkiye sahip olan bitkisel lektin olarak ve kolay saflaştırmasına göre birçok çalışmada incelenmiştir (Shi vd. 1994; Hilder vd. 1995). Bu lektin özel olarak yüksek-mannozlu glikanların terminal mannoz kalıntılarına bağlanır (Michiels vd. 2010).

GNA'nın hemipteran ve lepidopteran zararlıları üzerine negatif etkisi belgelenmiştir, ancak etki derecesi lektin yoğunluğu ve böcek türüne göre değişmektedir (Wang vd. 2005; Setamou vd. 2002).

Galaktoza özel bağlanan *Amaranthus caudatus* lektini (*ACA*) bezelye yaprak biti üzerine (*A. pisum*) yüksek zehirli etki bırakmaktadır (Rahbe vd. 1995). Wu vd. (2006) transgenik pamuk üzerinde beslenen pamuk bitinin (*Aphis gossypii* Glover) popülasyonunun büyümesinde *ACA*'nın engelleyici etkisi olduğunu açıklamıştır.

Mannoz/glukoza özel bağlanan baklacık (jackbean) lektini (*ConA*), *A. pisum* böceği üzerine yüksek zehirli etki bırakmaktadır (Rahbe vd. 1995). Bu lektinin ölümcül ve negatif etkileri Lepidoptera ve Hemiptera türleri üzerinde de belirlenmiştir (Fitches vd. 2001; Gatehouse vd. 1999; Sauvion vd. 1996).

Saha vd. (2006 a, b) araştırma sonuçlarına göre çeltik bitkisinde ifade olan sarımsak yaprak lektini (*ASAL*) olumsuz şekilde *N. virescens* ve *N. lugens* böceklerinin üreme ve canlılığını etkilemiştir. Sonuçlara göre *GNA* lektin *S. furcifera*'ya karşı daha etkili iken

ASAL lektin *N. virescens* ve *N. lugens*' e karşı daha etkili görünmüştür. *ACA* lektininin en fazla zehirli etkisi *L. erysimi*' ye karşı belirlenmiştir (Michiels vd. 2010).

GNA, *NPA* ve *ASAL* lektinleri özel mannozlara bağlanarak etki bırakmaktadır. Yapay diyet denemeleri sonuçlarına göre *GNA* nimfaların büyüme ve gelişmelerinde en fazla toksik etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. *GNA* lektin 1500 ug/ml yoğunluğunda nimfaların % 42' sinin ölümüne neden olmuştur. *NPA* (*Narcissus pseudonarcissus* agglutinin) ve *ASA* (*Allium sativum* agglutinin) 10-1500 mg/ml yoğunluğunda diyetlerde önemli derecede ölüme sebep olmuştur (Sauvion vd. 1996).

Bitkisel lektinler heterojen protein olduklarından dolayı farklı biyokimyasal özelliklere sahip olup özel karbonhidratlara bağlanırlar. Kardelen bitkisinden elde edilen agglutinin lektin (*GNA*) 50 kDa' luk bir tetramerik protein yapısına sahip olmaktadır (Vandamme vd. 1987). Bu protein dört homojen alt birimden oluşmuştur. Bu lektin alfa-D-mannoz gurubuna bağlanmakta benzersiz özelliğe sahiptir (Shibuya vd. 1988). Kristalografik çalışmalarının sonuçlarına göre 12 bağlanma noktasına sahip olan bu protein diğer lektinlerden farklı olmaktadır (Hester vd. 1995).

Bt proteinlerinin etkili olmadıkları sokucu-emici böceklerde, *GNA* lektin Homoptera böceklerine karşı dayanıklılık verip gen aktarım çalışmalarında kullanılmıştır (Shelton vd. 2002). Homopterlerin yanında Lepidoptera (Fitches ve Gatehouse 1998; Se'tamou vd. 2002 a, 2003), ve Cloeoptera (Nutt vd. 1999) gibi böcekler üzerine de *GNA* lektinin etkisi belirlenmiştir.

Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan lektinler karbonhidratlara bağlanma özelliklerine sahip olan proteinlerdir (Glynn vd. 1990; Kilpatrick vd. 2002; Van damme vd. 2008). Bu proteinler katalitik olmayan bölgelerinden ters olarak özel monosakaridlere ya da karmaşık glikanlara bağlanıp ve biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirirler (Peumans ve Vandamme 1995). Lektinler bitki büyüme düzenlenmesi (Howard vd. 1972), gelişmesi (Brill vd. 2001), tohum depolanması (Huang vd. 2006), zararlılar ve patojenlere karşı savunmasında rol almaktadır (Rodrigues Macedo vd. 2003; Luo vd. 2007). Lektinlerin farklı bağlanma

özellikleri ve memelilere karşı zehirli etkileri belirlenmiştir. Lektinler fasulye, buğday, patates, muz, kardelen, soğan, pırasa ve sarımsak gibi bitkilerde bulunmaktalar. Mannoz karbonhidratına bağlanan *Galanthus nivalis* agglutinin (*GNA*), Hemiptera böceklerine karşı zehirli etkiye sahiptir. Bu gurubun lektinleri (soğan, sarımsak ve pırasa) memelilerde oral zehirlenme yapmazlar; bu lektinlerin ham ya da işlenmiş hâli bulunduğu yiyeceklerde zararlı değildir (Peumans vd. 1996). *GNA* lektin sadece terminal α -1-3-bağlantılı mannozlara bağlanır. Bu α -1-3-bağlantılı mannoz kalıntıları memelilerin ince bağırsaklarının zarlarında bulunmamaktadır. Fare üzerine yapılmış çalışmalara göre *GNA* lektinin zehirli etkisi tespit edilmemiştir (Pusztai vd. 1995; Vandenborre et al. 2011). Lektinlerin böcek bağırsağının epitelyumuna bağlanması zehirlenmenin önkoşuludur. Lektinler böceğin bağırsak zarında bulunan glikoproteinlere bağlanarak böceğin fizyolojik işlevlerinde engel oluşturur.

GNA lektin, bezelye yaprak bitlerinin zara sabitlenmiş aminopeptidaz-N (APN) enzimlerine bağlanır (Cristofolletti vd. 2006); APN mannoz ile glikozile olduktan sonra *GNA*'nin özel bağlantısından dolayı (mannoz bağlantısı) kalıcı olarak kalmaktadır (Rahbe vd. 1993). *N.lugens* ve *S.littoralis* böceklerinde *GNA*, ferritin albitirimine bağlanıp ve demir metabolizmasını engeller (Du vd. 2000; Sadeghi vd. 2008); ayrıca *GNA* bilinmeyen mekanizmalar ile bağırsak epitelyumundan geçiş yapıp zarar vermesi gözlenmiştir (Fitches vd. 2001). Bunların yanında yutulmuş *GNA* lektin, *N.lugens* böceklerinin yağ yapıları (fat body), ovariyolar ve hemolenflerinde gözlenmiştir (Powell vd. 1998).

Tarla bitkilerinde yapılmış gen aktarımı çalışmalarında, çizelge 2.6, 2.7 ve 2.8' te belirtildiği gibi, böcek zararlılarına dayanıklılık kazandırmak amacıyla Bt ve lektin genleri kullanılmıştır. Yapılmış çalışmaların sonucunda aktarılmış genlerden dolayı lepidoptera, homoptera, coleoptera ve hemiptera zararlı böceklerine karşı direnç sağlanmıştır.

Perlak vd. (1990), pamuk bitkisine aktarılmış *CryAc* ve *CryIAb* genlerinin etkilerini incelemişlerdir. Bu genler CaMV 35S kontrolü altında ifade edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla pamuğun hipokotil eksplantlarına gen aktarılmıştır. Aday

transgenik bitkiler rejenerasyon ortamlarındaki kanamisin huzurunda gelişmeye devam etmişler. Transgenik bitkilerin *Helicoverpa zea* ve *Spodoptera exigua* zararlı böceklerine karşı dayanıklılıkları bildirilmiştir.

McCabe ve Martinell (1993), tarafından yapılmış çalışmada Cry2Ab ve *gusA* genleri CaMV35S promotörü kontrolü altında pamuk bitkisine aktarılmıştır. Hazırlanmış gen kasetleri partikül bombardımanı aracılığıyla embriyo eksplantlarına aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, transgenik pamukların *Heliothis virescens*, *H. zea*, ve *Spodoptera frugiperda* böceklerine karşı dirençleri saptanmıştır.

Thomas vd. (1995), *Manduca sexta*'nin proteaz inhibitör genini, CaMV35S ve Ppc-1 promotörleri kontrolü altında pamuk bitkisine aktarmışlar. Hazırlanmış plazmid *A. tumefaciens* aracılığıyla kotiledon eksplantlarına aktarılmıştır. Aday transgenik bitkilerin seleksiyonu için kanamisin antibiyotiği rejenerasyon ortamlarına ilave edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre transgenik pamuk bitkilerinin *Bemisia tabaci* böceğine karşı direnci belirtilmiştir.

Majeed vd. (2000) çalışmasında, CaMV35S-Cry1Ab gen kaseti pamuk bitkisine aktarılmıştır. Hazırlanmış plazmid *A. tumefaciens* yöntemiyle pamuğun olgun embriyolarına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamlarında seleksiyon yapılması için kanamisin ilave edilmiştir. Elde edilmiş sonuçlara göre, transgenik pamuk bitkilerinde Cry proteini 100-120 ng/mg konsantrasyonunda üretilmiştir. *Helicoverpa amigera* larvalarının transgenik bitkilerin üzerinde beslenmesinden dolayı böceklerde % 44 – 89 ölüm gözlenmiştir.

Singh vd. (2004) çalışmasında, *CryIEC* geni CaMV35S promotörü kontrollüğünde pamuk bitkisine aktarılmıştır. İnokülasyon ardından hazırlanmış plazmid *A. tumefaciens* aracılığıyla hipokotil eksplantlarına aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, transgenik pamuklar *S. litura* larvalarına karşı dayanıklılıkları saptanmıştır. Yapraklar üzerine beslenen larvalarda %100 ölüm gözlenmiştir.

Leelavathi vd. (2004) tarafından yapılmış çalışmada, CaMV35S-*CryIIa5* gen kaseti *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk embriyonik kaluslarına aktarılmıştır. Rejenerasyon kanamisinli ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma *H. armigera* zararlı böceğiyle mücadele etmek amacıyla yapılmıştır. Southern blot analiz sonuçlarına göre bitkilerin % 83' ünün transgenik olduğu belirtilmiştir.

Wu vd. (2005) çalışmasında, *CryIAc* ve *API-B* genleri CaMV35S promotörü kontrolü altında pamuk bitkisine aktarmıştır. Embriyonik kalus dokularına gen aktarımı, *A. tumefaciens* aracılığıyla yapılmıştır. Transgenik aday bitkilerin rejenerasyonları kanamisin içeren ortamlarda sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, transgenik pamuk bitkileri üzerinde beslenen *H. armigera* larvalarında % 95.8 - 100 ölüm gözlenmiştir.

Wu vd. (2006), pamuk bitkisinde *Aphis gossypii* Glover böceğinin hasarını düşürmek amacıyla *ACA* lektin genini CaMV35S promotörü yanında klonlayıp, *A. tumefaciens* aracılığıyla hipokotil eksplantlarına aktarmışlar. Transgenik aday bitkiler kanamisinli ortamlarda geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, transgenik pamuk bitkileri üzerinde beslenen bitlerin üremesinde % 64.5 düşüş gözlenmiştir.

Guo vd. (2007) tarafından yapılmış çalışmada, *H. armigera* larvalarına karşı dayanıklılık kazandırması amacıyla, *CryIc*, *Cry2A* ve *Cry9c* genleri Ubi1 promotörü kontrolü altında pamuk bitkisine aktarılmıştır. Hipokotil eksplantlarına gen aktarımı *A. tumefaciens* aracılığıyla yapılmıştır. Transgenik bitkiler T-DNA üzerinde bulunan *BAR* geninden dolayı seleksiyon ortamlarında fosfinotrisin huzurunda gelişmişler. Elde edilen sonuçlara göre transgenik bitkilerin % 80' ninin böcek denemelerinin sonucu olumlu bildirilmiştir.

Katageri vd. (2007) çalışmasında, CaMV35S-*CryIAc* gen kaseti *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk sürgün apikal meristem hücrelerine aktarılmıştır. Doku kültüründeki aday transgenik bitkilerin seleksiyonu için ortama kanamisin ilave edilmiştir. Bu çalışmada transgenik pamuk bitkilerininin *H. armigera* larvalarına karşı önemli derecede dayanıklılık kazanmaları bildirilmiştir.

Rashid vd. (2008) pamuk bitkisinde, *H. armigera* zararlı böceğine karşı dayanıklılık kazandırmak amacıyla, *Cry1Ac* ve *Cry2A* genlerini CaMV35S promotörü yanında klonlayıp, olgun embriyo eksplantlarına aktarılmıştır. Gen akatarımı *A. tumefaciens* bakterisi ile yapılmıştır. Transgenik bitkilerin rejenerasyonu kanamisin içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, transgenik bitkiler üzerinde beslenen larvalarda % 75 - 100 ölüm gözlenmiştir.

Wu vd. (2008) çalışmasında, *H. armigera* böceğine karşı dayanıklılık kazandırılması amacıyla, CaMV35S-*AaHIT* gen kasetinin pamuk bitkisine aktarılması hedeflenmiştir. *A. tumefaciens* aracılığıyla gerçekleştirilmiş gen aktarımı ardında bitki rejenerasyonu kanamisinli ortamlarda yapılmıştır. Bu çalışmada, hipokotil eksplantlarına gen aktarılmıştır. Böcek denemeleri sonuçlarına göre, *H. armigera* larvaların % 44 – 98' inde ölüm gözlenmiştir.

Tohidfar vd. (2008) çalışmasında, CaMV35S-*Cry1Ab* gen kaseti *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk hipokotil eksplantlarına aktarılmıştır. Bitkilerde seleksiyon yapılması amacıyla rejenerasyon ortamlarına kanamisin ilave edilmiştir. Böcek denemeleri sonuçlarına göre *H. armigera* larvalarının % 80 – 100' ünde ölüm gözlenmiştir.

Kumar vd. (2009) tarafından yapılmış çalışmada, CaMV35s(r)PR-1a-*CryIEc* geni pamuk bitkisine aktarmıştır. Gen aktarımında *A. tumefaciens* bakterisi kullanılmıştır. Pamuk bitkisinin kotiledon ve hipokotil dokuları gen aktarımında kullanılmıştır. İnoküle edilmiş bitkilerin rejenerasyonu kanamisin içeren ortamlarda sağlanmıştır. Üretilmiş transgenik bitkiler üzerinde beslenmiş *Spodoptera litura* larvalarının % 100' ünde ölüm gözlenmiştir.

Dunse vd. (2010), pamuk bitkisinde *H. armigera* ve *H. punctigera* böceklerinin oluşturduğu zararı engellemek amacıyla, *NaPI* ve *StPin1A* genlerini CaMV35S promotörü kontrolü altında hipokotil eksplantlarına aktarmışlar. Gen akatarımı *A. tumefaciens* bakterisi ile yapılmıştır. Gen aktarımı ardından rejenerasyon kanamisin içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *NaPI* ve *StPin1A*

genlerinin transgenik bitkilerde birlikte bulunmaları, *H. armigera* ve *Helicoverpa punctigera* larvalarına karşı daha dayanıklı oldukları saptanmıştır.

Liu vd. (2013) tarafından yapılmış çalışmada, *GNA* ve *CryIAC* genleri pamuk bitkisine aktarılmıştır. *GNA* geni Mas-uas (mannopine synthase upstream activating sequence) promotörü ve *CryIAC* geni ise CLCu virüsünün replikasyon proteinin promotörü kontrolü altında ifade edilmiştir. Gen aktarımı polen tup yolağı yöntemi aracılığıyla yapılmıştır. Aday transgenik bitkilerin rejenerasyonu kanamisin içeren ortamlarda yapılmıştır. Böcek denemeleri sonuçlarına göre transgenik bitkiler *Aphis gossypii* Glover böceklerinin üremelerini önemli derecede engellemiştir; *H. armigera* larvaları üzerinde ise % 7 – 95 ölümcül etki bırakmıştır.

Li vd. (2014) çalışmasında, *Cry9C* genini *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk bitkisine aktarılmıştır. Gen aktarımında, *nptIII* geni kullanılmıştır. *Cry9C* genini içeren pamuk bitkileri *CryIAC* içeren hatlara göre *H. armigera*' ya karşı orta derecede toksik etki gösterdiği hâlde, *S. litura*' ya karşı şiddetli toksik olduğu bilinmektedir. Böcek zararlılarına karşı direnci arttırmak amacıyla, gen piramitleme stratejisi kullanılıp *Cry9C* ve *Cry2A* veya *CryIAC* genleri pamuk bitkisinde birleştirmiştir. Melezleme sonucunda elde edilmiş pamuk bitkilerinin *H. armigera* ve *S. litura*' ya karşı dayanıklılığı artırılmıştır.

Awan vd. (2015) çalışmasında, *CryIAC* ve *Cry2A* genleri ve *GTGene* (*CP4-EPSPS*) iki ayrı konstrakta pamuk bitkisine aktarılmıştır. Gen aktarımında pamuk bitkisinin olgun embriyoları kullanılmıştır. Gen aktarımı *A. tumefaciens* aracılığıyla yapılmıştır. Transgenik bitkilerinin yaprakları üzerinde beslenen *H. armigera* larvalarda % 100 ölmü gözlenmiştir. *CP4-EPSPS* geninin etkisini incelemek amacıyla, 3 aylık T0 bitkileri glifosate herbisiti ile sprey yapılmıştır. Herbisit uygulamasından üç gün sonra yabancı otlar herbisitten olumsuz etkilenirken, transgenik pamuk bitkileri tolerans göstermiştir.

Anayol vd. (2016), *CryIAC* toksik protein üretimini böceğin ısırıldığı bölgelere kısıtlamak amacıyla, *CryIAC* genini AoPR1 promotörü yanında klonlayıp, *A.*

tumefaciens aracılığıyla pamuk olgun embriyolarının apikal meristem hücrelerine aktarmışlar. Aday transgenik bitkilerin seleksiyonu fosfinotrisin içeren ortamlarda yapılmıştır. Elde edilmiş sonuçlara göre transgenik bitkiler üzerinde beslenen *S. exigua* larvalarında % 73 - 97 ölüm gözlemlenmiştir.

De Oliveira vd. (2016) tarafından yapılmış çalışmada, 35s-*CryIIa12* gen kaseti pamuk bitkisine aktarılmıştır. Gen aktarımında polen tüp yolu tekniği kullanılmıştır. Gen aktarımında nptII geni kullanılmıştır. T1 transgenik bitkiler, *Spodoptera frugiperda* larvalarında % 40 ölüme neden olmuştur; ayrıca kontrol bitkilere göre böceklerin gelişmesinde önemli derecede gecikme gözlenmiştir (30 kat). Transgenik bitkiler üzerinde beslenen *Anthonomus grandis* yetişkinlerinin ortaya çıkmasında % 60 azalma gözlenmiştir.

Chen vd. (2017) pamuk bitkisi üzerindeki çalışmasında, *CryIAC* ve *Vip3AcAa* genleri piramitleme yapıp *S. litura*, *S. exigua* ve *Agrotis ipsilon* böceklerine karşı dayanıklılık kazandırılmıştır. Bu bitkiler üzerinde beslenen böceklerin ölüm yüzdeleri kontrol ve *Bt-CryIAC* bitkiler üzerinde beslenenlere göre önemli derecede artmıştır. Elde edilmiş sonuçlarına göre, *Vip3AcAa* geni piramitleme stratejisinde önerilebilecek bir opsiyon olarak sunulmuştur.

Çizelge 2.6 Böceklere dayanıklı transgenik bitki üretim çalışmalarının bazıları; aktarılmış gen ve bitkiler (Bakhsh vd. 2015)

Bitki	Aktarılmış gen	Zararlı böcek	Çalışma
Pamuk	<i>CryIA(a)</i>	Lepidoptera	Perlak vd. 1990
	<i>CryIA (b)</i>	Homoptera	Majeed 2005
	<i>CryIA (c)</i>		Tohidfar vd. 2008
	<i>CryIIA</i>		Khan vd. 2011
	<i>CryIEC</i>		Bakhsh vd. 2012
	<i>Potato inhibitor</i>		Pushpa vd. 2013
	<i>GNA</i>		Anayaol vd. 2016
	<i>CryIAc</i>		Bakhsh vd. 2016
Patates/tatlı patates	<i>Cry3Aa</i>	Coleoptera	Peferoen vd. 1990
	<i>CryIA (c)</i>	Lepidoptera	Cheng vd. 1992
	<i>Cowpea trypsin inhibitor</i>		Adang vd. 1993
	<i>GNA</i>		Perlak vd. 1993
			Newell vd. 1995 Morán vd. 1998
Soya	<i>CryIA(b)</i>	Lepidoptera	Parrott vd. 1994
	<i>CryIA(c)</i>		Dufourmantel vd. 2005 Dang vd. 2007
Çeltik	<i>CryIA(b)</i>	Lepidoptera	Fujimoto vd. 1993
	<i>CryIA(c)</i>		Wunn vd. 1996
	<i>PinII</i>		Cheng vd. 1998
	<i>CryIC</i>		Bashir vd. 2005
	<i>sbk+sck</i>		Tang vd. 2006 Zhang vd. 2013
Mısır	<i>Cry3Bb1</i>	Lepidoptera	Kozziel vd. 1993
	<i>CryIAb</i>		Vaughn vd. 2005
	<i>CryIAb (MON810)</i>		Gassmann vd. 2011
	<i>CryI9c</i>		
Kanola	<i>CryIA (c)</i>	Lepidoptera	Tabashnik vd. 1993
			Stewart vd. 1996
			Ramachandran vd. 1998
			Halfhill vd. 2001
Nohut	<i>CryIA (c)</i>	Lepidoptera	Sanyal vd. 2005
	<i>Cry2Aa</i>		Indurker vd. 2007
	<i>CryIA (c) + CryIA (b)</i>		Acharjee vd. 2010 Mehrotra vd. 2011
Domates	<i>CryIA (c)</i>	Lepidoptera	Mandaokar vd. 2000
	<i>CryIA (b)</i>		Kumar vd. 2004 Koul vd. 2014
Yonca	<i>Cry3a</i>	Coleoptera	Tohidfar vd. 2013

Çizelge 2.7 Böceklere dayanıklı transgenik bitkilerde aktarılmış lektin genleri ve etkileri (Bakhsh vd. 2015)

Bitki	Gen	Böcek	Uygulanmış yöntem ve eksplant	Sonuç	Çalışma
Çeltik	<i>GNA</i>	<i>Nilaparvata lugens</i> ; BPH	Protoplast ve Olgunlaşmamış embriyo/ Elektroporasyon ve parçacık bombardımanı	BPH' in hayatta kalma ve doğurganlığında azalma	Rao vd. 1998
Çeltik	<i>GNA</i>	Sokucu emici böcekler, BPH	Olgun embriyo/ Parçacık bombardımanı	BPH ve Bakteri blight hastalığına karşı direnç	Tang vd. 1999
Çeltik	<i>GNA</i>	Sokucu emici böcekler, BPH ve GLH	Olgunlaşmamış embriyo/ Parçacık bombardımanı	BPH ve GLH böceklerine karşı direnç	Foissac vd. 2000
Çeltik	<i>GNA</i>	Sokucu emici böcekler, SBPH	Olgun embriyo/ parçacık bombardımanı	<i>GNA</i> geninin ifade seviyesi total proteinin % 0.3' ü	Wu vd. 2002
Çeltik	<i>GNA</i>	Sokucu emici böcekler, BPH ve GLH	Embriyogenik kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH ve GLH böceklerine karşı önemli direnç	Nagadhara vd. 2003
Çeltik	<i>GNA</i>	Sokucu emici böcekler, BPH, GLH ve WBPH	Embriyogenik kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH, GLH ve WBPH böceklerine karşı önemli direnç	Ramesh vd. 2004
Çeltik	<i>ASAL</i>	Sokucu emici böcekler, BPH ve GLH	Scutellar kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH ve GLH böceklerinin hayatta kalma ve doğurganlıklarında azalma	Saha vd. 2006
Çeltik	<i>ASAL</i>	Sokucu emici böcekler, BPH, GLH ve WBPH	Embriyogenik kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH, GLH ve WBPH böceklerine karşı direnç	Yarasi vd. 2008
Çeltik	<i>ASAL</i>	Sokucu emici böcekler, BPH ve GLH	kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH ve GLH böceklerinin hayatta kalma ve doğurganlıklarında önemli azalma	Sengupta vd. 2010
Çeltik	<i>DBI/G95A-mALS</i>	Sokucu emici böcekler, BPH	kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH' in hayatta kalma ve doğurganlığında azalma	Yoshimura vd. 2012
Çeltik	<i>ASAL</i>	BPH	Embriyogenik kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	BPH' e karşı önemli direnç	Chandrasekhar vd. 2014
Hint hardalı	<i>WGA-B</i>	Hardal Biti	Hipokotil/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hardal Bitinin hayatta kalma ve doğurganlığında azalma	Kanrar vd. 2002

Çizelge 2.8 Böceklere dayanıklı transgenik bitkilerde aktarılmış lektin genleri ve etkileri (Bakhsh vd. 2015)

Bitki	Gen	Böcek	Uygulanmış yöntem ve eksplant	Sonuç	Çalışma
Hint hardalı	<i>ASAL</i>	Hardal Biti	Hipokotil kaynaklı kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hardal Bitine karşı önemli direnç	Dutta vd. 2005
Hint hardalı	<i>ACA</i> , <i>ACA-ASAL</i>	Hardal Biti	Apikal meristem/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hardal Bitinin hayatta kalma ve doğurganlığında azalma	Hossain vd. 2006
Hint hardalı	<i>ASAL</i>	Hardal Biti	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hardal Bitine karşı direnç	Bala vd. 2013
Patates	<i>ConA</i>	Şeftali- Patates Biti	Yaprak parçaları/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Yaprak bitine karşı koruma	Gatehouse vd. 1999
Buğday	<i>GNA</i>	Tohum Biti	Kalus/ Parçacık bombardımanı	Bitlerin doğurganlıklarında azalma	Stoger vd. 1999
Mısır	<i>GNA</i>	Mısır Yaprak Biti	Olgunlaşmamış embriyo kaynaklı embriyonik kalus/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bitlerin doğurganlıklarında azalma	Wang vd. 2005
Nohut	<i>ASAL</i>	Nohut Biti	Tek embriyo & yarım embriyo/ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bitlerin hayatta kalma ve doğurganlıklarında azalma	Chakraborti vd. 2009
Pamuk	<i>ACA</i>	Pamuk Biti	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bite karşı direnç	Wu vd. 2006
Pamuk	<i>ASAL</i>	Jassid ve Beyazsinek	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Jassid ve Beyazsineke karşı dayanıklılık	Vajhala vd. 2013

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Pamuk bitkisine gen aktarımı çalışmasında çeşit seçiminde bitkisel özellikler, *in vitro*'da rejenerasyon kabiliyeti ve gen aktarımı frekansı gibi faktörler göz önüne alınmıştır. GSN-12 bir melez çeşidi olarak verim, makineli hasada uygunluk ve lif özellikleri bakımından geliştirilmiştir. Islah edilmiş GSN-12 çeşidi, yüksek verim potansiyeli sayesinde, kuraklık stresinden oluşabilecek verim kayıplarını tolere edebilmektedir (Bozbek, 2008). Ayrıca, yüksek gene aktarımı ve rejenerasyon kabiliyetinden dolayı (Anayol, 2016), GSN-12 pamuk çeşidi ve tohumları Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

Hazırlanan pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC kasetlerin çalışmalarını incelemek amacıyla pamuk öncesi tütün gen aktarımı planlanmıştır. Tütün bitkisinde gen aktarımı çalışması için Samsun Canik çeşidi kullanılmıştır. Bu çeşidin tohumları Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü tarafından sağlanmıştır.

GNA lektin gen izolasyonu için Ankara ilinde kış mevsiminde doğal yetişen kardelen (*Galanthus nivalis*) bitkisi toplanmıştır (Şekil 3.1). Gen izolasyonu için bitki yaprakları sıvı azotta dondurulup, -80°C 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Doğadan toplanmış kardelen bitkisi (*Galanthus nivalis*)
(Kaynak: Orjinal)

3.1.2 Genler ve kaynakları

GNA lektin geni *Galanthus nivalis* bitki yapraklarında izole edilmiştir. Pakistan CEMB araştırma merkezinde kodonları optimize edilmiş *CP4-EPSPS* geni, Yrd. Doç. Dr. Allah Bakhsh tarafından sağlanan plazmit üzerinden izole edilip ve ifade vektöründe altklon yapılmıştır. *CryIAc* geni promotör ve terminatörüyle birlikte (AoPR1-*CryIAc*-CAMV ve 35S-*CryIAc*-CAMV gen kasetleri) pJIT61-*CryIAc* vektöründen izole edilip ve ifade vektöründe altklon yapılmıştır. pJIT61-*CryIAc* vektörü TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinden (Doç. Dr. Selma Gülbitti-Onarıcı) temin edilmiştir.

3.1.3 Bakteriler

Klonlama aşamaları *E. coli* bakterisinin DH5 α ve JM109 suşları ve *A. tumefaciens* bakterisinin EHA105 suşunda yapılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *GNA* geninin izolasyonu ve pCAMBIA 1301 vektöründe altklonlaması

3.2.1.1 *GNA* dizi incelemesi ve biyoinformatik çalışmaları

Literatürdeki bulunan *GNA* dizileri araştırılıp ve farklı uzunlukta olan nükleotid dizileri toplanmıştır. Yapılmış çalışmalara göre *GNA* geninin 477 çift bazının ürettiği lektin böcek kontrolü için yeterli sayılmaktadır. NCBI data bankasında bulunan 477 çb *GNA* nükleotid dizileri toplanmış ve incelemeye alınmıştır (Erişim No: M55555.1, M55556.1, M55557.1, M55558.1, M55559.1, AF413083.1, AF413084.1, AF413085.1, AF413086.1 ve AF413087.1). Seçilmiş dizilerin birbiriyle uyuşmalarını incelemek için Clustalx 2.0 yazılımında sıralama (alignment) yapılmıştır. Gen dizisinin başlama/durma kodonlarını dikkate alarak spesifik primerler tasarlanmıştır. Nükleotid dizisi üzerine, Webcutter 2 yazılımından faydalanarak kesme enzim incelemeleri yapılmıştır. Primerlerin 5' uçlarına XhoI kesme enzim dizisi ilave edilmiştir. Enzimin kesme yerinde oturup ve çalışabilmesi amacıyla kesme yerlerinin 5' uçlarına üç nükleotid daha ilave edilmiştir (çizelge 3.1). Tasarlanmış primerlerin GC oranı, primer dimer oluşumu, Tm ve döngü oluşturma olasılıklarını incelemek için Primer3 ve Oligo7 yazılımları kullanılmıştır. Tasarlanmış spesifik primerlerin bitki genomunda diğer lokuslara bağlanabileceğini incelemek için NCBI-BLAST yazılımı kullanılmıştır. Primerler üretim için IDT Inc. şirketine sipariş edilmiştir.

Çizelge 31 Kardelen bitkisinden *GNA* izolasyonu amacıyla tasarlanmış primer çiftleri

Primer	Primer adı	Primer dizisi
1. çift	fgnaext	5' AACCTCGAGATGGCTAAGGCAAGTCTCC 3'
	rgnaext	5' ACCCTCGAGTCATTACTTTGCCGTCAC 3'
2. çift	fgnanoe	5' ATGGCTAAGGCAAGTCTCC 3'
	rgnanoe	5' TCATTACTTTGCCGTCACAA 3'

3.2.1.2 Bitki yapraklarından total RNA' nın izole edilmesi

Kardelen bitkisinden *GNA* geninin izole edilmesi için ilk aşamada total RNA' nın izolasyonu gerekmektedir. RNA izolasyonunda dikkate alınması gerekmekte olan prensiplerden biri RNase enziminin bulunmadığı koşullarda çalışmaktır. Kullanılmış tüm malzeme ve aletler çalışmadan önce otoklav edilmiş ve daha sonra % 0.1 DEPC' de gece boyunca çalkalanmıştır. Çalışılan bençin üzeri "RNase away reagent" solüsyonuyla sprey yapılmıştır.

Total RNA' nın izole edilmesine yönelik farklı yöntemler bulunmaktadır; TRIzol[®] reaktifini kullanarak total RNA izolasyonu kolay ve hızlı olduğundan dolayı, Kardelen bitkisi total RNA izolasyonunda kullanılmıştır. Eksi 80 derecede muhafaza edilmiş bitki yaprağı sıvı azotla havanda öğütülmüştür. 100 mg pudra haline gelmiş yaprak dokusundan ependörf tüpe aktarılıp üzerlerine 1 ml TRIzol[®] ilave ettikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bırakılmıştır (bu süreçte nükleoproteinlerin tam ayrılması gerçekleşmektedir). Üzerine 200 µl kloroform ilave edip 15 saniye kuvvetlice elde çalkalayıp, 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışım 15 dk 4 derecede santrifüj yapıp (12000 ×g) elde edilmiş üç fazlı karışımın renksiz sıvı üst fazı RNA izolasyonu için alınıp ve yeni bir ependörf tüpe aktarılmıştır (Şekil 3.2).

RNA moleküllerini izole etmek için 500 µl % 100 izopropanol sıvı faza ilave edilip 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj yapılmıştır (12000 ×g, 10dk, 4 °C). Süpernatant atılmış ve RNA peletini yıkamak için 1 ml % 75 etanol ilave edilmiştir; kısaca vorteks yapıldıktan sonra 5 dk santrifüj yapılmıştır (7500 ×g, 4 °C). Santrifüj sonrası etanol atılmış ve peletin kuruması amacıyla 5-10 dk havaya maruz bırakılmıştır. Elde edilmiş peletin üzerine 30 µl RNase-free su ilave edip su banyosunda 60 °C' de 15 dk inkübe edilmiştir. İzole edilmiş RNA' nın kalite ve yoğunluğunu belirlemek için NanoDrop 1000 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır . Ayrıca izole edilmiş total RNA agaroz jelinde elektroforez yapılmıştır.



Şekil 3.2 Total RNA izolasyonunda TRIzol[®] reaktifi kullanılmıştır. Karışıma kloroform ilave edildikten sonra karışım üç faza ayrılmıştır

3.2.1.3 cDNA sentezi ve *GNA* geninin izolasyonu

cDNA sentezlenmesinde “Thermo Scientific RevertAid RT #K1691” Kiti kullanılmıştır. DNA moleküllerinin tamamen giderilmesi için izole edilmiş total RNA, DNase I enzimi ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 DNA kontaminasyonunu gidermek için total RNA, DNaseI enzimi ile muamele edilmiştir

Bileşenler	Miktar
RNA	1 µg
10× reaksiyon tamponu	1 µl
DNaseI	1 µl (1 U)
Su	10 µl tamamlanmıştır

Reaksiyon kurulduktan sonra 30 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda 1 µl EDTA (50mM) ekleyip ve 10 dakika 65 derecede bekletilmiştir. Hazırlanmış total RNA ters transkripsiyon reaksiyonunda kullanılmıştır.

cDNA sentezleme reaksiyonlarında oligo (dT)18 primerleri kullanılıp birinci sarmal cDNA molekülleri sentezlenmiştir (Çizelge 3.3). Reaksiyon kurulduktan sonra 60 dakika 42 derecede inkübe edilmiştir. Reaksiyon 5 dakika 70 derecede bekletilmekle sonlandırılmıştır.

Çizelge 3.3 cDNA sentezi için reaksiyon bileşen ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Kalıp RNA	1 µg
Oligo (dT) ₁₈	1 µl
5× tampon	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT	1 µl
Toplam	20 µl

Üretilmiş cDNA molekülleri kalıp olarak *GNA* geninin üretimi için kurulmuş PCR denemesinde kullanılmıştır. PCR’ da 5’ uçlarında XhoI kesme yeri bulunan tasarlanmış spesifik primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Primerlerin bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradian PCR yapılmıştır. Primer bağlanma belirlendikten sonra, *GNA* çoğaltımı için PCR denemesi yapılmıştır. PCR çizelge 3.4’ de belirtildiği koşullarda kurulmuştur. PCR’ da Dream Taq DNA Polymerase enzimi kullanılmıştır (#EP0702 - Thermo Scientific). PCR ürünü % 1 agaroz jelinde elektroforez yapılmış ve beklenen bant doğrulandıktan sonra jelden ekstrakte edilmiştir.

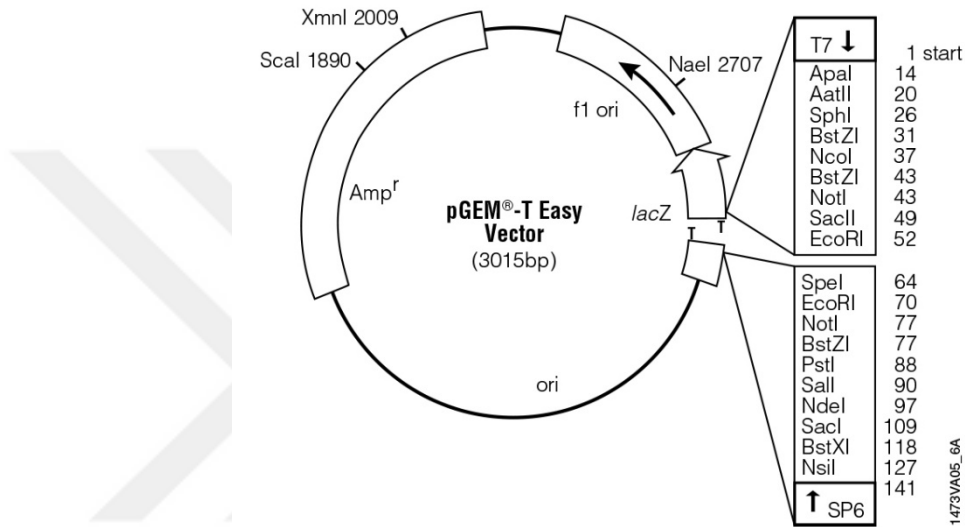
Ekstraksiyon ve saflaştırmak için GeneJET Gel Extraction Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 *GNA* izolasyonu için optimize edilmiş PCR programı

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	3 dk	1
denatürasyon	95	30 s	35
Primer bağlanması	58	30 s	
Uzama	72	60 s	
Nihai uzama		10 dk	

3.2.1.4 GNA klonlama ve doğrulanması

İzole edilmiş *GNA* geni pGEM[®]-T Easy (3.015 kb) lineer vektöründe (Şekil 3.3) klonlanmıştır. Klonlama yapılında pGEM[®]-T Easy vektör manüskripti (#A1360-Promega) takip edilmiştir.



Şekil 3.3 pGEM[®]-T Easy plazmit haritası (Kaynak: <https://worldwide.promega.com/>)

pGEM[®]-T Easy lineerleştirilmiş iki 3' uçlarında T bazı bulunan vektör olarak bulunmaktadır. Ligasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için insertin 5' uçlarında A bazının bulunması gerekmektedir. Ligasyonun sağlanması için *GNA* geninin amplifikasyonunda Dream Taq Polymerase enzimi (#EP0702-Thermo scientific) kullanılmıştır. Bu enzim amplifiye edilen fragmanların 5' uçlarına A bazı ekleme kabiliyetine sahip olmaktadır. Ligasyonun başarıyla yapılması için vektör ile insert Mol sayısı 1:3 oranında hesaplanıp kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Reaksiyon kurulduktan sonra bir saat 16 °C ardından 24 saat 4 °C' de bekletilmiştir.

Çizelge 3-5 *GNA* ve pGEM[®]-T Easy ligasyonu için optimize edilmiş bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Konsantrasyon
2× Rapid ligasyon tamponu	5µl
pGEM [®] -T Easy vektör	1µl (50ng)
PCR ürünü (<i>GNA</i>)	0.5µl (25ng)
T4 DNA ligaz	1µl
De-iyonize su	2.5µl

Ligasyon reaksiyonu ile elde edilmiş *GNA* genini içeren plazmit (pGEMT-*GNA*), JM109 kompetan *E. coli* hücrelerine “Heat-shock” yöntemiyle aktarılmıştır. Transformasyonda Promega manüskripti (#A1360) takip edilmiştir.

Ligasyon reaksiyonunun dört mikro litresi buz üzerinde tutulmuş 1.5 ml tüplere koyulmuştur. Kompetan bakterilerden 100 µl tüpe ilave edilmiştir. Hafifçe vurmakla plazmit-bakteri karıştırılmıştır. Karışım 20 dk buzda bekletildikten sonra, 55 saniye 42 derecede ardından 2 dk buzda bekletilmiştir. Transform edilmiş bakterilerin toparlanması için üzerlerine 900 µl SOC besi ortamı ilave edilip 1.5 saat 37 °C’ de çalkalanmıştır (~150 rpm). Bakteriler 5 dk 6000 rpm’ de santrifüj yapıp elde edilmiş peletler 500 ml taze hazırlanmış SOC ortamında çözülmüştür. Bakterinin 100 mikro litresi alınıp, X-Gal-IPTG-ampisilin içeren katı LB ortam üzerine dağıtılmıştır (ampisilin: 100 mg/L; X-Gal: 40 µl [% 2 stok]; IPTG: 7 µl [% 20 stok]). Bakteri plakları gece boyu 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Bakteri kolonileri geliştikten sonra plakalar +4 °C’ ye alınıp dört saat bekletilmiştir. Beyaz ve mavi Koloniler ortamda gelişmiştir. Beyaz kolonilerde bulunan *Lac Z* geni *GNA* yerleşmesinden dolayı deaktif hale gelmiş ve bu kolonilerin beyaz olmalarına sebep olmuştur. Mavi koloniler ise *GNA* geninin yerleşmediği için pGEM[®]-T Easy vektöründe bulunan *Lac Z* geni bakteride ifade edilmiştir; üretilen β-galaktozidaz enziminin faaliyetinden dolayı ortamda bulunan X-Gal çözümlü gelişen koloniler mavi olmuşlar. Beyaz kolonilerin kaç tanesi seçilip ve *GNA* geninin vektör üzerinde bulunduğunu doğrulamak amacıyla koloni PCR, kesme reaksiyonu ve gen sekanslama yapılmıştır.

Pozitif koloniler 100 mg/L ampisilin içeren LB sıvı ortamlarında inoküle edilmiştir. Bakteriler bir gece boyu 155 rpm' de çalkalanarak 37 derecede büyütülmüştür. pGEMT-*GNA* plazmiti mini-prep ekstraksiyon yöntemini kullanarak izole edilmiştir. Ekstraksiyonda için GeneJET™ Plazmid Miniprep (Thermo Scientific #K0503) kiti kullanılmıştır. Bakteriler 10 dk santrifüj yaparak (13000 ×g) çöktürülmüştür. Bakteri peleti 250 µl risüspanسیون tamponunda çözülmüştür. Elde edilmiş karışıma 250 µl liziz solüsyonu ilave edilip, viskoz ve biraz açık hale dönmesi için 4-6 kere ters düz ederek karıştırılmıştır. Viskoz solüsyona 350 µl nötralizasyon solüsyonu ilave edip, hemen 4-6 kere iyice ters düz yaparak karıştırılmıştır. Bakteriyel hücre kırıntıları (debris) oluştuktan sonra 5 dakika santrifüj (13000 ×g) yapılmıştır. Süpernatant nazikçe alınmış ve kit sütununa aktarılmıştır. 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra alt tüpe çökmüş sıvı atılmış ve tekrar sütun yerleştirilmiştir. yüzde 70 etanol içeren yıkama solüsyonundan 500 µl sütuna koyulmuş ve 1 dk santrifüj yapılmıştır. Tüpe geçmiş sıvı atılmış ve sütun tekrar yerleştikten sonra yıkama tekrar yapılmıştır. Sütunda kalmış etanolü tamamen gidermek için sütun tekrar santrifüj yapılmıştır. Sütun yeni 1.5 ml' lik tüpe aktarılmıştır. Sütunun merkezine 50 µl elüsyon tamponu koyulup 2 dk oda sıcaklığında tutulması ardından santrifüj yapılmıştır. Sütun atılıp ve arındırılmış plazmit - 20 °C' ye alınıp saklanmıştır.

GNA geninin plazmit üzerinde bulunduğunu doğrulamak için ekstrakte edilmiş plazmit XhoI enzimiyle kesilmiştir (Çizelge 3.6). Kesme reaksiyonu Thermo scientific şirketine ait XhoI (#FD0694 FastDigest) enzimiyle yapılmıştır.

Çizelge 3.6 pGEMT-*GNA* plazmitini XhoI ile kesmek için kurulmuş reaksiyon bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	14 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
Plazmit DNA	3 µl (400 ng)
XhoI	1 µl
Toplam	20 µl

Kesme reaksiyonu 15 dk 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 5 dk 80 °C’ de bekletilmiştir. Sonucun izlenmesi için % 0.8 agaroz jeline yüklenmiş ve elektroforez yapılmıştır. Jel hazırlanması ve elektroforez yapılması için 1× TAE tamponu kullanılmıştır. DNA’ yı jelde takip etmek için 1× loading tamponu örnekler ile ilave edilmiştir. Elektroforez sonrası etüdüyüm bromür ile boyanmış jel, görüntüleme cihazına alınıp *GNA* geninin pGEM[®]-T Easy vektöründe klonlanması incelenmiştir.

Nihai teyit için, pGEM[®]-T Easy vektöründe klonlanmış *GNA* geni nükleotid sekanslamasına gönderilmiştir. Sekanslama REFGEN Ltd. şirketinde yapılmıştır. *GNA* geninin izolasyonunu doğrulamak için elde edilmiş *GNA* nükleotid sonucu NCBI data bankasında BLAST edilmiştir. İzole edilmiş *GNA* geninin nükleotid ve amino asit dizisini incelemek için CLC Sequence Viewer 7.6.1 yazılımı kullanılmıştır. Nükleotid ve amino asit dizi benzerlik oranı, ORF uzunluğu, sinyal peptid dizisi ve konservatif bölgeler gibi özellikler biyoinformatik çalışmalarında dikkate alınmıştır. Dizi analizleri devamında nükleotid ve protein dizi alt-sıralaması (sequence alignment) yapılmıştır. Bulunan diziler arasında benzerlik miktarı filogramda araştırılmıştır.

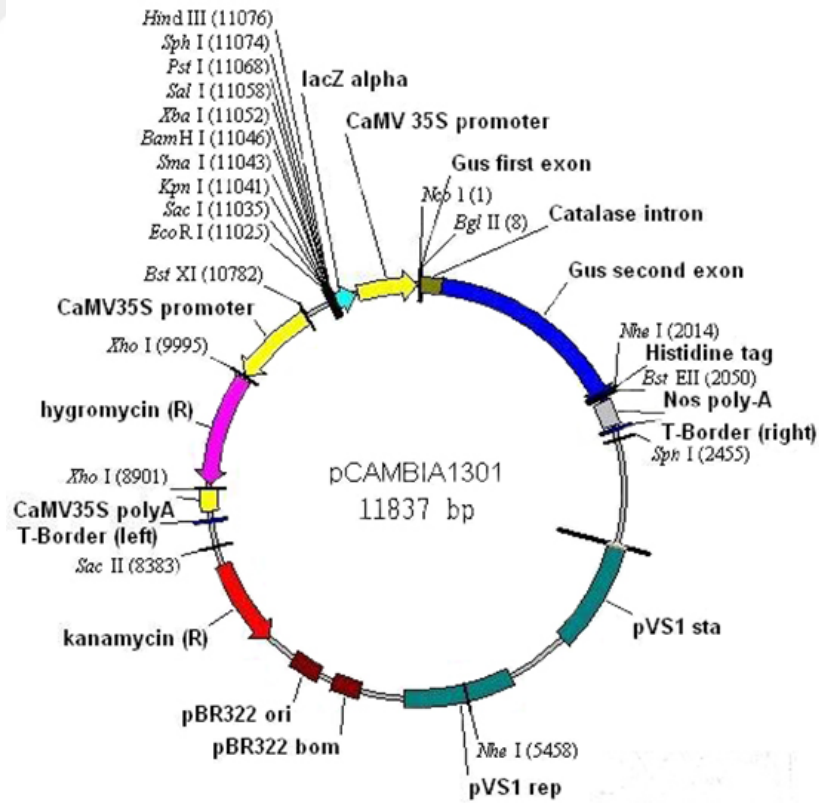
Elde edilmiş *GNA* nükleotid sonucu NCBI data bankasında BLAST edilip ve genin doğru izole edildiği saptanmıştır.

3.2.1.5 pGN plazmitinin hazırlanması

Gen aktarımında kullanmak için pCAMBIA 1301 ifade vektörü seçilmiştir. Bu seçimde uygun kesme yerlerinin bulunması, bulunan direnç genler, vektör uzunluğu (11837 çb) ve gen aktarımında iyi verimi dikkate alınmıştır (Şekil 3.4).

pGEM[®]-T Easy vektöründe klonlanmış *GNA* geni, pGEMT-*GNA*' den kesilip pCAMBIA 1301 ifade vektöründe alt-klonlanması için vektörlerin ikisi de XhoI enzimi ile kesilmiştir.

Tasarlanmış klonlama planına göre *GNA* geni pCAMBIA 1301 vektöründeki *Hph* (Hygromycin phosphotransferase) geninin yerine yerleştirilmiştir. Yaklaşık birer mikrogram pCAMBIA 1301 ve pGEMT-*GNA* vektörleri kesme reaksiyonlarında XhoI enzimi ile kesilmiştir (Çizelge 3.7).



Şekil 3.4 pCAMBIA1301 ifade vektör haritası (Kaynak: <http://www.cambia.org/>)

Çizelge 3.7 pCAMBIA 1301 ve pGEMT-*GNA* vektörlerinin kesimleri için kullanılmış bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	14 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
Plazmit DNA	3 µl (1 µg)
XhoI	1 µl
Toplam	20 µl

Kesilmiş vektörler % 0.8' lik agaroz jeline yüklenmiş elektroforez yapılmıştır. *Hph* geni ayrılmış pCAMBIA 1301 vektörü (10783çb) ve pGEMT-*GNA* vektöründen kesilmiş *GNA* geni (497 çb) jelden izole edilmiştir. İzolasyon için GeneJET Gel Extraction Kiti (# K0691-Thermo Scientific) kullanılmıştır.

İzole edilmiş *GNA* geni, lineer pCAMBIA 1301 vektöründe alt-klonlanması için ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon çizelge 3.8 belirtildiği gibi kurulmuştur.

Çizelge 3.8 *GNA* geni ve lineer pCAMBIA 1301 ligasonunda optimize edilmiş bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Lineer pCAMBIA 1301 (~10.783kb)	1 µl (100 ng)
<i>GNA</i> (~497 çb)	1 µl (14 ng)
10× T4 DNA ligaz tampon	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Su (nuclease-free)	15 µl
Toplam	20 µl

Ligasyon yapılmasında vektör ile insert mol sayısı 1:3 oranında hesaplanmıştır. Ligasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için reaksiyondaki toplam DNA miktarı 200 nanogramı geçmemiştir. Ligasyon reaksiyonu kurulduktan sonra bir saat 16 °C' de ardından 24 saat 4 °C' de bekletilmiştir.

Ligasyon reaksiyonu ile elde edilmiş *GNA* genini içeren pCAMBIA 1301 plazmiti (pGN), DH5 α kompetan *E. coli* hücrelerine “Heat-shock” yöntemiyle aktarılmıştır. Transformasyonda Promega manüskripti (#A1360) takip edilmiştir.

Ligasyon reaksiyonunun dört mikro litresi buz üzerinde tutulmuş 1.5 ml tüplere koyulmuştur. Kompetan bakterilerden 100 μ l tüpe ilave edilmiştir. Hafifçe vurmakla plazmit-bakteri karıştırılmıştır. Karışım 20 dk buzda bekletildikten sonra, 55 saniye 42 derecede ardından 2 dk buzda bekletilmiştir. Transform edilmiş bakterilerin toparlanması için üzerlerine 900 μ l SOC besi ortamı ilave edilip 1.5 saat 37 °C’ de çalkalanmıştır (~150 rpm). Bakteriler 5 dk 6000 rpm’ de santrifüj yapıp elde edilmiş peletler 500 ml taze hazırlanmış SOC ortamında çözülmüştür. Bakterinin 100 mikro litresi alınıp, 50 mg/L kanamisin içeren katı LB ortam üzerine dağıtılmıştır. Bakteri plakları gece boyu 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Bakteri kolonileri geliştikten sonra plakalar + 4 °C’ ye alınıp muhafaza edilmiştir.

GNA geninin pCAMBIA 1301’ de klonlanmasını doğrulamak için plakta gelişen kolonilerin beş tanesi seçilip spesifik *GNA* primerler ile koloni PCR yapılmıştır. Pozitif olan kolonilerin üç tanesi plazmit kesme reaksiyonu kurulması için LB sıvı ortamında çoğaltılmıştır. Plazmitler mini-prep yöntemini kullanarak bakterilerden izole edilip XhoI enzimiyle kesilmiştir. Kesme reaksiyon ürünü agaroz jelinde elektroforez yapılmıştır. UV ışını altında 497 çb’ lık bandın görünmesiyle *GNA*’ nın pCAMBIA 1301’ de klonlanması doğrulanmıştır.

GNA’ nın doğru yönde (5’ ucu promotöre ve 3’ ucu ise terminatöre yakın) klonlanmasını doğrulamak amacıyla pGN plazmiti SalI enzimi ile kesilmiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 pGN plazmitinin Sall enzimi ile kesilmesinde gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	15 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
Plazmit DNA	2 µl (300 ng)
Sall	1 µl
Toplam	20 µl

3.2.2 pGTGN plazmitinin hazırlanması

CP4-EPSPS (GTG; Glyphosate Tolerance Gene) genini pGN plazmitinde klonlamak için *CP4-EPSPS* genini içeren kaynak plazmit ve pGN plazmiti NcoI ve BglII enzimleriyle kesilmiştir (Çizelge 3.10 ve 3.11). Reaksiyon ürünleri % 0.8' lik agaroz jelinde elektroforez yapıp istenen parçalar (~ 11 kb lineer pGN vektörü ve ~ 1.4 kb *CP4-EPSPS*) jelden izole edilmiştir.

Çizelge 3.10 pGN plazmitinin kesme reaksiyonundaki gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	11µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
pGN	5 µl (1 µg)
NcoI	1 µl
BglII	1 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.11 pCAMBIA-CP4-EPSPS plazmitinin kesme reaksiyonundaki gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	9 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
pCAMBIA-CP4-EPSPS	7 µl (1 µg)
NcoI	1 µl
BglII	1 µl
Toplam	20 µl

NcoI ve BglII enzimleriyle kesilmiş pGN plazmiti ve CP4-EPSPS genin birbirine bağlanmaları için ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Jelden izole edilmiş bu parçaların ligasyonu 1:3 mol oranında yapılmıştır (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12 pGN plazmiti ve CP4-EPSPS geninin ligasyon reaksiyonundaki bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Lineer pGN vektörü (~ 11.3 kb)	1 µl (100 ng)
CP4-EPSPS (~ 1.4 kb)	1 µl (38 ng)
10× T4 DNA ligaz tamponu	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Su (nuclease-free)	15 µl
Toplam	20 µl

Ligasyon yapılması için vektör ile insert 1:3 mol oranında kullanılmıştır. Başarılı ligasyonun sağlanması için reaksiyondaki toplam DNA miktarı 200 ng' ı geçmemiştir. Reaksiyon kurulduktan sonra bir saat 16 °C' de ardından 24 saat 4 °C' de tutulmuştur.

pGTGN vektörü (pGN-CP4-EPSPS) ligasyon ardından *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Bakteriye plazmit aktarmasında ısı şoku yöntemi kullanılmıştır. Transform edilmiş bakterilerin 100 mikro litresi alınıp, 50 mg/L kanamisin içeren katı LB ortam üzerine dağıtılmıştır. Bakteri plakları gece boyu 37

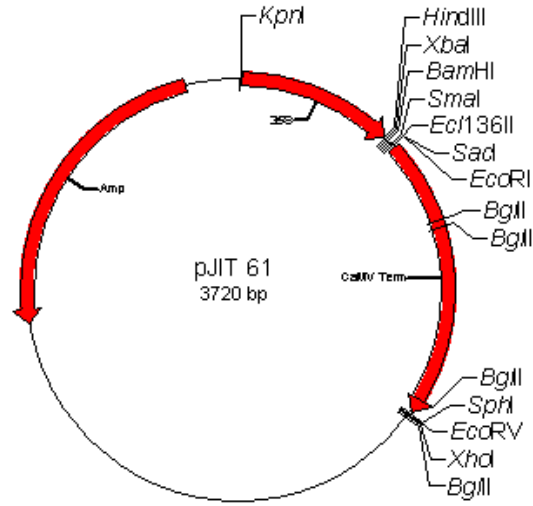
°C’de inkübe edilmiştir. Bakteri kolonileri geliştikten sonra plakalar +4 °C’ ye alınıp muhafaza edilmiştir.

CP4-EPSPS geninin pGTGN plazmitinde klonlanmasını doğrulamak amacıyla plakta gelişen kolonilerden kaç tanesi seçilip koloni PCR yapılmıştır. Pozitif koloniler LB sıvı ortamında (kanamisin 50 mg/L) çoğaltılıp mini prep yöntemiyle pGTGN izole edilmiştir. Ekstrekte edilmiş pGTGN plazmiti BglIII ve NcoI enzimleriyle kesilmiştir. Reaksiyon ürünü % 0.8’ lik agaroz jelinde elektroforez yapılmıştır. Jel görüntülemek jel dokümantasyon cihazında yapılıp ~ 1.4 kb parçanın görüntüsüyle *CP4-EPSPS* geninin vektörde alt klonlanması doğrulanmıştır.

3.2.3 *CryIac* gen kasetinin hazırlanmış pGTGN ekspresyon vektöründe altklonlanması

3.2.3.1 pGTGNAoC1AC plazmitinin hazırlanması

pJIT61-*CryIac* plazmit (Şekil 3.5) üzerinde bulunan AoPR1-*CryIac*-CAMV kaseti KpnI ve EcoRV enzimleri ile (Thermo Scientific FastDigest) kesilip (Çizelge 3.13) agaroz jelinde elektroforez yapılmıştır. AoPR1-*CryIac*-CAMV kaseti elektroforez ardından jelden izole edilip saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış kaset T4 DNA polimeraz enzimi ile “End Filling” yapılıp agaroz jelinde elektroforez yapıldıktan sonra saflaştırılmıştır.



Şekil 3.5 pJIT 61 vektör haritası (Kaynak: <http://www.pgreen.ac.uk/>)

Çizelge 3.13 AoPR1-*CryIAc*-CAMV kasetini pJIT61' den kesiminde gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	6 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
pJIT61 (AoPR1- <i>CryIAc</i> -CAMV)	10 µl (1 µg)
KpnI	1 µl
EcoRV	1 µl
Toplam	20 µl

AoPR1-*CryIAc*-CAMV kasetinin pGTGN plazmitinde alt-klonlanması için pGTGN MCS bölgesinde bulunan SmaI enzim yeri kullanılmıştır. pGTGN vektörü SmaI enzimi ile kesilip (Çizelge 3.14) ardından CIAP (Calf-intestinal alkaline phosphatase) ile defosforile edilmiştir. Defosforilasyon için Invitrogen şirketi (#18009-027) manueli takip edilmiştir ancak daha verimli defosforilasyon için 10 µl CIAP kesme reaksiyonuna ilave edilmiştir. Defosforilasyon reaksiyonu beş dakika 50 °C' de ardından 90 dk 37 °C' de inkübe ederek yapılmıştır. Lineer defosforile edilmiş pGTGN vektörü elektroforez sonrası jelden izole edilip saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.14 pGTGN kesme reaksiyonunda gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	7 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
pGTGN	10 µl (1 µg)
SmaI	1 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanmış AoPR1-*CryI*Ac-CAMV kaseti 1:3 vektör-insert mol oranıyla pGTGN vektörüne bağlanmıştır (Çizelge 3.15). Elde edilmiş 16.3 kb pGTGNAoC1AC plazmiti çoğaltılmak amacıyla DH5α bakteri hücrelerine aktarılmıştır.

Çizelge 3.15 AoPR1-*CryI*Ac-CAMV ve pGTGN ligasyonu için gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Linear pGTGN vektörü (~ 12.7 kb)	1 µl (100 ng)
AoPR1- <i>CryI</i> Ac-CAMV (~ 3.4 kb)	2.5 µl (81 ng)
10× T4 DNA ligaz tamponu	2 µl
% 50 PEG 4000 solusyonu	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Su (nuclease-free)	11.5 µl
Toplam	20 µl

3.2.3.2 pGTGN35C1AC plazmitinin hazırlanması

pJIT61 plazmiti üzerinde bulunan 35s-*CryI*Ac-CAMV kaseti KpnI ve EcoRV enzimleri ile (Thermo Scientific FastDigest) kesilip (Çizelge 3.16) agaroz jelinde elektroforez yapılmıştır. 35s-*CryI*Ac-CAMV kaseti elektroforez ardından jelden izole edilip saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış kaset T4 DNA polimeraz enzimi ile “End Filling” yapıp agaroz jelinde elektroforez yapıldıktan sonra saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.16 35s-*CryI*Ac-CAMV kasetini pJIT61' den kesiminde gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	6 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
pJIT61 (35s- <i>CryI</i> Ac-CAMVter)	10 µl (1 µg)
KpnI	1 µl
EcoRV	1 µl
Toplam	20 µl

35s-*CryI*Ac-CAMV kasetinin pGTGN plazmitinde alt-klonlanması için pGTGN MCS bölgesinde bulunan SmaI enzim yeri kullanılmıştır. pGTGN vektörü SmaI enzimi ile kesilip (Çizelge 3.17) ardından CIAP (Calf-intestinal alkaline phosphatase) ile defosforile edilmiştir. Defosforilasyon için Invitrogen şirketi (#18009-027) manueli takip edilmiştir ancak daha verimli defosforilasyon için 10 µl CIAP kesme reaksiyonuna ilave edilmiştir. Defosforilasyon reaksiyonu beş dakika 50 °C' de ardından 90 dk 37 °C' de inkübe ederek yapılmıştır. Lineer defosforile edilmiş pGTGN vektörü elektroforez sonrası jelden izole edilip saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.17 pGTGN kesme reaksiyonunda gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su (nuclease-free)	7 µl
10× FastDigest Green Buffer	2 µl
pGTGN	10 µl (1 µg)
SmaI	1 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanmış 35s-*CryI*Ac-CAMV kaseti 1:3 vektör-insert mol oranıyla pGTGN vektörüne bağlanmıştır (Çizelge 3.18). Elde edilmiş 16 kb pGTGN35C1AC plazmiti çoğaltılmak amacıyla DH5α bakteri hücrelerine aktarılmıştır.

Çizelge 3.18 35s-*CryIAc*-CAMV ve pGTGN ligasyonu için gereken bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Lineer pGTGN vektörü (~ 12.7 kb)	1 µl (100 ng)
AoPR1- <i>CryIAc</i> -CAMV (~ 2.9 kb)	2.5 µl (65 ng)
10× T4 DNA ligaz tamponu	2 µl
% 50 PEG 4000 solusyonu	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Su (nuclease-free)	11.5 µl
Toplam	20 µl

Hazırlanmış pGTGNAoCR1AC ve pGTGN35CR1AC plazmitler *E. coli* (DH5α) kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyonda ısı şoku yöntemi kullanılmıştır. Bakterilerin transformasyon sonrası toparlanmaları için 90 dakika 37 °C’ de çalkalanarak inkübe edilip üremiş bakterilerin 100 µl’ si 50mg/L kanamisin içeren katı LB ortamlarına dağıtılıp 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Kolonilerin geliştiğinden sonra plaklar + 4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

35s-*CryIAc*-CAMV ve AoPR1-*CryIAc*-CAMV kasetlerinin pGTGNAoCR1AC ve pGTGN35CR1AC plazmitlerinde klonlanmalarını doğrulamak amacıyla plazmit kesme reaksiyonu yapılmıştır. Üremiş tek kolonilerin on ikisi seçilmiş ve mini prep yöntemini kullanarak plazmitler izole edilmiştir. İzole edilmiş plazmitler Sall enzimini kullanarak kesilmiştir. *GNA*, AoPR1 promotörü ve pCAMBIA1301 vektörünün MCS bölgesinde Sall kesme yerinin bulunduğundan dolayı kesme reaksiyonu sonucunda pozitif örneklerde pGTGNAoC1AC plazmiti için üç bant ve pGTGN35C1AC plazmiti için de iki bandın elektroforez jelinde görünmesi beklenmiştir. Pozitif olan kolonilerin ikisi seçilip dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme için *GNA*, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS* genlerine özel tasarlanmış primerler kullanılmıştır. Dizileme sonuçlarına göre doğru genlerin klonlanması teyit edilmiştir.

3.3 İfade Plazmitlerin *A. tumefaciens* Hücrelerine Aktarımı

3.3.1 Elektro kompetan *A. tumefaciens* hazırlanması

Plaklarda gelişmiş EHA105 bakteri kolonilerden biri seçilip 10 ml sıvı LB ortamı içeren elli mililitrelik falkon tüpte inoküle edilmiştir. Bakteri kültürü 28 °C’ de 48 saat çalkalanmıştır (180 rpm). Bakterilerin 5 mililitresi alınıp 500 ml taze LB içeren bir litrelik şişelerde 28 °C’ de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bakterilerin OD₆₀₀ değerleri 0.5-1.0’ e ulaştığında steril 50 ml falkon tüplere aktarılıp buz üzerinde 30 dk tutulmuştur. Hücreler 10 dk 4 °C’ de 4000 rpm ile çöktürülmüştür. Üst faz atılıp pelet 50 ml soğuk steril suda çözülmüştür. Santrifüj aynı şartlarda tekrarlanıp üst faz atılmıştır. Pelet 25 ml soğuk steril suda çözülmüştür. Hücreler çöktürülüp 10 ml % 10’ luk steril gliserol içeren saf suda çözülmüştür. Son aşamada pelet 1-1.5 ml % 10’ luk steril gliserolda çözümlenip 1.5 ml’ lik tüplerde alikot yapılmıştır. Kompetan hücreler – 80 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.3.2 Elektroporasyon

Hazırlanmış pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmitleri elektroporasyon aracılığıyla *A. tumefaciens* EHA105 suşuna aktarılmıştır. Plazmitlerden 2 ng alınıp 40 µl kompetan hücrelere ilave edilip ve hafifçe pipetaj yapılmıştır. Karışım soğuk küvete aktarılmıştır. Elektroporasyon Eppendorf Eporator[®] cihazını kullanarak 2200 V’ da 5 mili saniyede yapılmıştır. Hücreler 1.5 ml tüplere alınıp üzerlerine 1 ml LB besi ortamı ilave edilip 28 °C’ de 90 dakika çalkalanarak çoğaltılmıştır. Bakterinin 200 µl’ si alınıp kanamisin (50 mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren LB plakların yüzeyine yayılmıştır. Plaklar gece boyu 28 °C’ de inkübe edilip koloniler geliştikten sonra +4 dereceye alınmıştır.

3.3.3 Elektroporasyon doğrulanması

pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmitleri *A. tumefaciens*' e aktarıldıktan sonra *GNA*, *CP4-EPSPS*, *35s-CryIAC-camv* ve *AoPR1-CryIAC-camv* kasetinin vektör üzerinde bulunmasının nihai doğrulanması amacıyla koloni PCR yapılmıştır. *GNA*, *CP4-EPSPS* ve *CryIAC* (partial amplification), *35s-CryIAC-camv* ve *AoPR1-CryIAC-camv* (full cassette amplification) spesifik primerleri koloni PCR' da kullanılmıştır. Plakta gelişen kolonilerinin kaç tanesi rastgele seçilip doğrudan PCR reaksiyonuna koyulmuştur. PCR ürünü elektroforez yapıp ve sonuç UV ışını altında incelenmiştir.

3.4 Bitki Gen Aktarımı ve Doku Kültüründe Kullanılan Besi Ortamları

Tüm besi ortamları otoklav yaparak steril edilmiştir (20 dk, 121 °C, 1.02 kg/cm²). büyüme düzenleyiciler, antibiyotik ve seleksiyon maddeleri ise 0.22 µm filtrelerle steril edilip otoklav sonrası besi ortamlarına ilave edilmiştir.

3.4.1 Bakteri besi ortamları

Bitki gen aktarımında kullanılmış *A. tumefaciens* pGTGNAoC1AC-EHA105 ve pGTGN35C1AC-EHA105 hatları sıvı "LB broth Low Salt" besi ortamında çoğaltılmıştır (Trypton 10 g, sodyum klorit 5 g, maya özütü 5 g).

3.4.2 Bitki besi ortamları

3.4.2.1 Bakteri-tütün kokültivasyon ortamı

Bir litre kokültivasyon ortamı (pH 5.6-5.8) hazırlanması için gereken bileşenler ve miktarları: MS (Murashige Skoog) 4.4 g; sakaroz 30 g; plant agar 7 g.

3.4.2.2 Tütün rejenerasyon-seleksiyon ortamı

Bir litre rejenerasyon-seleksiyon ortam (pH 5.6-5.8) hazırlanması için gereken bileşenler ve miktarları: MS 4.4 g, sakaroz 30 g, plant agar 7 g, BAP 1 mg/L, NAA 0.1 mg/L, Duocid 500 mg/L ve phosphonomethyl glycine (PMG) 5 mg/L.

3.4.2.3 Bakteri-pamuk kokültivasyon ortamı

Bir litre kokültivasyon ortam (pH 5.6-5.8) hazırlanması için gereken bileşenler ve miktarları: MS 4.4 g; sakaroz 30 g; Gelzan™ CM gelrit 2.8 g; kinetin 0.1 mg/L; acetosyringone 1.961 mg/L (100 µM); MES 0.195 mg/L (10 µM).

3.4.2.4 Pamuk rejenerasyon-seleksiyon ortamı

Bir litre rejenerasyon-seleksiyon ortam (pH 5.6-5.8) hazırlanması için gereken bileşenler ve miktarları: MS 4.4 g, sakaroz 30 g, Gelzan™ CM gelrit 2.8 g, BAP 0.1 mg/L, NAA 0.1 mg/L, kinetin 0.1 mg/L, Duocid 500 mg/L (ampisilin), PMG 3 mg/L ve aktif kömür 1.6 g/L.

3.5 Plazmid Çalışma İncelemesi

3.5.1 Tütün tohum sterilizasyonu

Sterilizasyon laminar flow kabininde yapılmıştır. Tohumlar 2 dakika % 70 etanolde bekletilip ardından 15 dakika % 10 sodyum hipokloritte çalkalanmıştır. Tohumlar 4 kere saf steril suyla durulanmıştır. Steril tütün bitki elde edilmesi amacıyla tohumlar MS₀ ortamlarında ekilmiştir.

3.5.2 Tütün seleksiyonunda uygun PMG dozunun belirlenmesi

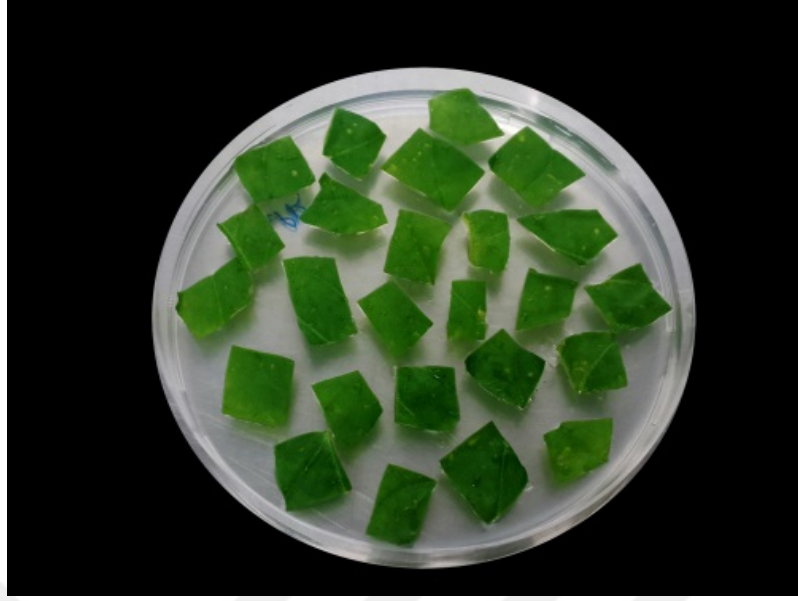
Steril MS ortamlarında gelişmiş tütün bitki yaprakları uygun seleksiyon PMG doz belirlenmesinde kullanılmıştır. Tütün rejenerasyon-seleksiyon ortamı hazırlanıp PMG 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5, 6.5, 8 ve 10 mg/L dozlarında ortama ilave edilmiştir. Yapraklar 1 cm² çaplarında kesilip yedişer tane ortam üzerine koyulmuştur. Eksplant içeren petri kapları iklim dolaplarına koyulup eksplantlar 24 derecede 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarında bekletilmiştir. Beş haftadan sonra seleksiyon için uygun PMG dozu seçilmiştir.

3.5.3 Bakteri hazırlanması

pGTGNAoC1AC-EHA105 ve pGTGN35C1AC-EHA105 hatları – 80 °C stoklarından alınıp kanamisin (50mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren 10 ml sıvı LB ortamlarında çoğaltılmıştır (28 °C, 185 rpm, ~20 saat).

3.5.4 Gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu

Tütün gen aktarımında bakteri OD₆₀₀ değerini 0.6' ya ayarlamak için spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Bakteri ortamının OD₆₀₀ değeri ölçülüp 0.6' ya düşürmek için sulandırılmıştır. Bu amaca ulaşmak için bakteri çöktürülüp besi ortamı taze LB ortamı ile değiştirilmiştir. Steril tütün yaprakları 1 cm² boyutunda kesilip hazırlanmış bakteri ortamına koyulmuştur. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Yaprak parçaları kurutma kâğıtları üzerinde kurutulup kokültivasyon ortamına alınmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Bakteri ile muamele edilmiş tütün yaprakları ko-kültivasyon ortamına alınmıştır

Eksplantlar 24-48 saat 24 derece ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Yapraklar seleksiyon-rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce 2 mg/ml Duocid (ampisilin)' de 5-10 dakika bekletilmiştir. Yaprak parçaları kurutma kâğıtları üzerinde kurutulup 5 mg/L PMG içeren rejenerasyon-seleksiyon ortamına alınmıştır. Sürgün gelişmesini hızlandırmak amacıyla daha düşük dozlarda PMG' lı ortamlara aktararak alt kültür yapılmıştır. Alt kültür ortalama 20 günde bir yapılmıştır. Yaklaşık beş ay sonra gelişmiş sürgünler kesilip MS₀ ortamında köklendirilmiştir.

3.6 Pamuk Gen Aktarımı

3.6.1 Pamuk tohum sterilizasyonu

Pamuk tohum sterilizasyonunda tohum tüylerini gidermek için yaklaşık 20 saniye sülfürik asitle muamele edilmiştir. Ardından bol çeşme suyu ile durulanmıştır. Tohumlar iki saat suda bekletildikten sonra laminar flow kabini içinde 30 dakika % 30' luk hidrojen peroksit artı kaç damla Tween-20' de çalkalanmıştır (Şekil 3.7). Steril edilmiş tohumlar üç kere yirmişer dakika saf steril suda çalkanarak durulanmıştır.



Şekil 3.7 Sterilizasyon için pamuk tohumları 30 dakika % 30' luk hidrojen peroksit & Tween-20' de çalkalanmıştır

3.6.2 Seleksiyon için uygun PMG doz belirlenmesi

Transgenik aday bitkiler arasında seleksiyon yapılması amacıyla PMG herbisiti kullanılmıştır. Uygun PMG dozunu belirlemek için olgun pamuk embriyolar üzerine farklı PMG dozları uygulanmıştır. Steril edilmiş pamuk tohumlarının çimlenmelerini hızlandırmak amacıyla tohumlar bir gece suda bekletilip ertesi gün nemli kurutma kâğıtlar arasında steril karanlık ortamda (24 °C) bir gün bekletilmiştir. Yaklaşık uzunlukları 1 cm olan embriyolar steril kabinde tohumlardan çıkartılıp rejenerasyon ortamına aktarılmıştır; bu ortamlara 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 17, 25, 34, 42, 51, 68, 85, 102, 119 ve 136 mg/L PMG ilave edilmiştir. Deneme iki tekerrürde yapılmıştır. Her petri kabında sekiz embriyo konulmuştur. Eksplantlar yaklaşık 20 gün 25 ± 1 derece sıcaklık 16/8 saat aydınlık/karanlıktaki iklim dolaplarında tutulmuşlar. Denemede farklı dozlar arasında, eksplantların rejenerasyonu sağlanmamış en az uygulanmış PMG dozu, en uygun doz olarak seleksiyon için seçilmiştir.

3.6.3 Bakteri hazırlanması

pGTGNAoC1AC-EHA105 ve pGTGN35C1AC-EHA105 hatları – 80 °C stoklarından alınıp kanamisin (50mg/L) ve rifampisin (25 mg/L) içeren 10 ml sıvı LB ortamlarında çoğaltılmıştır (28 °C, 185 rpm, ~20 saat). Bakteri çoğaltımında 50 mililitrelik falkon tüpleri kullanılmıştır.

3.6.4 Gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu

Pamuk gen aktarımında bakteri OD₆₀₀ değerini ölçmek için spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Bakteri ortamının OD₆₀₀ değerini 0.8' e ayarlamak için sulandırılmıştır. Bakteri çöktürülüp besi ortamı taze LB ortamı ile değiştirilmiştir. Pamuk embriyoları çimlendirilmiş steril tohumlardan izole edilip (Şekil 3.8.A) apikal sürgün meristem bölgesinde bisturi ile yaralandıktan sonra 50 mililitrelik falkon tüplerdeki bakteri ortamıyla bir saat 28 derecede çalkalanarak (110 rpm) muamele edilmiştir (Şekil 3.8.B). Embriyolar kurutma kâğıtları üzerinde kurutulup kokültivasyon ortamına alınmıştır.

Eksplantlar 24-48 saat 24 derecede karanlıkta inkübe edilmiştir (Şekil 3.8.C). Transgenik sürgünlerin gelişmesi için embriyolar rejenerasyon-seleksiyon ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3.8.D). Embriyolar rejenerasyon-seleksiyon ortamına aktarılmadan önce 2 mg/ml Duocid (ampisilin)' de 5-10 dakika bekletilmiştir. Rejenerasyon-seleksiyon ortamları iklim odalarına aktarılıp eksplantlar 24 derecede 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarında bekletilmiştir.



Şekil 3.8 Pamuk gen aktarımında:

(A) tohum çimlendirilmesi ve embriyo çıkarılması; (B) Embriyoların bakteri ile muamelesi; (C) Embriyoların kokültivasyon ortamına alınması; (D) Kokültivasyon sonrası embriyolar rejenerasyon seleksiyon ortamlarına aktarılmıştır

3.7 Aday Transgenik Bitkileri Dış Koşullara Alıştırmak

Rejenerasyon sonucu oluşan fidelerin dış koşullarına alıştırılması için fideler otoklav edilmiş torfta dikilmiştir. Fidelerin su kaybetmelerini önlemek amacıyla yerleştirildikleri magenta kaplarının ağzı kapatılıp iklim odasına alınmıştır (nispi nem: % 65; sıcaklık 24 derece; ışık/karanlık süresi: 16/8 saat). Fidelerin havalandırılmaları için kapaklar iki günde bir açılıp beşer dakika açık bırakılmıştır. Yaklaşık iki hafta sonunda kapaklar tamamen uzaklaştırılmıştır. Yeni yaprakların gelişmesinden sonra bitkiler toprak içeren saksılara aktarılıp iklim odasında yaklaşık bir ay bekletilmiştir. Bitkiler iyice büyüdükten sonra seraya aktarılmıştır.

3.8 Aday Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri

3.8.1 Aktarılmış gen dizilerin izlenmesi

3.8.1.1 Pamuk genomik DNA izolasyonu

PCR' da kullanılmış kalıp DNA molekülleri modifiye edilmiş Doyle & Doyle (1990) yöntemi ile izole edilmiştir. DNA izolasyonunda aşağıdaki aşamalar belirtildiği gibi takip edilmiştir:

1-İzolasyon tamponu (0.1M Tris-HCL pH:8, 0.05M EDTA pH:8, 0.5M NaCl, % 1.25 SDS) kullanımdan önce 55 °C' ye ısıtılmıştır. Isıtıldıktan sonra kullanılacak kadarı steril cam şişeye alınmış ve içerisine her 10 ml tampon için 60 µl ProteinazK (20mg/ml), 50 µl 2-merkaptoetanol ve % 2 PVP eklenip karıştırılmıştır.

2-Taze yaprak dokusu havanda sıvı azot ile ezilmiştir. Ezilen dokulardan 0.2 gram tartılarak steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, üzerine 800 µl izolasyon tamponu eklenip ve vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Tüp 15 dakika 55 °C' de akabinde 45 dakika boyunca 65 °C' de bekletilmiştir. Bekleme süresince her 15 dakikada bir tüpler karıştırılmıştır.

3-İnkübasyon süresi tamamlanınca tüplere 250 µl 5M KOAc eklenmiş, ters düz edilerek homojen hale getirilmiştir. Buz içerisinde 20 dakika bekletilmiştir.

4-Süre tamamlandığında tüpler 13000 rpm hızla, 4 °C' de, 15 dakika santrifüj edilmiştir.

5-Süpernatant yeni tüpe aktarılmış, üzerine 1:1 oranında kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiş, ters düz edilerek homojen hale getirilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında faz oluşumu beklenmiştir. Süre tamamlandığında tüpler 13000 rpm hızla, 4 °C' de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır.

6-Son yıkamadan elde edilen üst faz yeni tüpe aktarılmış, üzerine % 10' luk sodyum asetat (3M) ekleyip ve pipetaj yaparak karıştırılmıştır. Üzerine 1:1 oranında izopropanol eklenip ve tüpler ters düz edilerek DNA yığına görülünceye kadar karıştırılmış, gece boyu -20 °C' de bekletilmiştir.

7-Gece boyu bekleyen numuneler 13000 rpm hızla, 4 °C' de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı fazın tamamı uzaklaştırılmıştır.

8-Dipte biriken DNA pelletine 700 µl % 70 EtOH (oda sıcaklığı) eklenmiş, pellet kaldırılarak tüm yüzeye temas sağlanmıştır. Örnekler 10 dakika 13000 rpm' de oda sıcaklığında çöktürülmüştür. Yıkama aşaması 3 kere tekrarlanmıştır.

9-Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, tamamen kuruduktan sonra moleküler kalite su ile çözülmüştür. Örnekler tamamen çözüldükten sonra içlerine her 50 µl çözücü için 2 µl RNaze (10 mg/ml) eklenmiş, 37 °C' de 2 saat, 65 °C' de 20 dakika bekletilerek muhtemel RNA bulaşıklığı temizlenmiştir. Numunelerin nanodrop okumaları yapılmış ve PCR işlemlerinde kullanılmak üzere 100 ng/µl stokları hazırlanmıştır.

3.8.1.2 PCR

Seleksiyon ortamlarında dayanıp dış koşullarına adaptasyon sağlamış bitkilerde aktarılmış genleri doğrulamak amacıyla PCR denemeleri kurulmuştur. Farklı primer setleri kullanılarak aktarılmış *GNA*, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS* genleri doğrulanmıştır (Çizelge 3.19). Reaksiyon karışımları çizelge 3.20' de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.19 Transgenik bitkilerin taramasında kullanılmış primerler, bağlanma sıcaklıkları ve ürün uzunlukları

Gen	Primer dizisi	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Ürün uzunluğu (çb)
<i>GNA</i>	F-ATGGCTAAGGCAAGTCTCC R-TCATTACTTTGCCGTCACAA	59	477
<i>CryIAc</i>	F-GCTGCAACCATCAATAGCCG R-CTGTGGTGGGATTTCTGTTCA	61	750
<i>CP4-EPSPS</i>	F-TCTCGCTAGCGGTGAAACT R-TTGAGCGGAAGCCATAGGT	50	400

Çizelge 3.20 PCR ile transgenik bitki taramasında hazırlanmış karışım içerikleri

Bileşenler	Miktar
DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)	10 µl
İleri primer	1 µl (0.5 µM)
Ters primer	1 µl (0.5 µM)
Kalıp DNA	1 µl (100 ng)
Su	7 µl
Toplam	20 µl

Reaksiyon koşullarını optimize etmek amacıyla çeşitli PCR reaksiyonları kurulmuştur. Primer bağlanma sıcaklığını belirlemek için yapılmış gradient PCR reaksiyonlarında 47 ila 65 °C aralarındaki sıcaklıklar uygulanmıştır.

PCR' da kullanılmış kalıp DNA Doyle & Doyle (1990) yöntemi ile izole edilmiştir. Kalıp DNA' lar 100 ng/µl yoğunluğunda reaksiyonlarda kullanılmıştır. Primer setleri 0.5 pMol/µl yoğunluğunda reaksiyonlara konulmuştur. PCR' da Thermo Scientific mastır karışımları (DreamTaq Green PCR Master Mix #K1081) kullanılmıştır. Hazırlanmış reaksiyon karışımlarının PCR' ları çizelge 3.21' de belirtildiği koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 3.21 Aktarılmış genlerin doğrulamasında uygulanmış PCR programı

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	5 dk	1
denatürasyon	95	30 s	34
Primer bağlanması	59 (<i>GNA</i>) 61 (<i>CryIAc</i>) 50 (<i>CP4-EPSPS</i>)	30 s	
Primer uzaması	72	30 s	
Nihai üzama	72	7 dk	1

PCR' da uygulanmış bağlanma sıcaklığı gradient PCR ile belirlenmiştir. *GNA*, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS* genleri için en uygun bağlanma sıcaklığı sırasıyla 59, 61 ve 50 °C olarak belirlenmiştir.

3.8.1.3 Agaroz jel görüntülemesi

PCR aracılığıyla amplifiye edilmiş gen fragmanlarını görüntülemek için % 1.2' lik agaroz jeli hazırlanıp elektroforezde kullanılmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında 1× TAE tamponu kullanılmıştır. Gen parçalarını görüntülemek için hazırlanmış agaroz jel 5µg/ml etüdüyüm bromür ile boyanmıştır. Elektroforez öncesi DNA numunelerine Xylene Cyanol ve Bromophenol Blue indikatörleri ilave edilmiştir.

Agaroz jeli 1× TAE tamponu ile doldurulup elektroforez tankına yerleştirilmiştir. DNA numuneleri kuyucuklara konulduktan sonra elektrik akımını sağlayarak elektroforez yapılmıştır. Görüntüleme işlemi UV ışını altında görüntüleme cihazında yapılmıştır.

3.8.2 ELISA (Enzim Bağlı İmmüno Sorbent Deneyi)

PCR sonucu pozitif olan pamuk bitkilerin bazılarında (sonuçları her üç gen için pozitif olan bitkiler) aktarılmış *CryIAc* geninin protein ifadesini incelemek amacıyla ELISA testi yapılmıştır. Bu denemede Enviroligix kiti (#AP 051 NW V10) kullanılmıştır.

Seleksiyon ortamlarında rejenere olmuş ve PCR sonuçları pozitif bitkiler (J, P, 39, H, 6, 8, A) denemeye alınmıştır. AoPR1 kontrollü *CryIAc* gen ifadesini uyararak için genç ve yeşil yapraklar iğne ile yaralanmıştır. Yaralanmadan 0, 12 ve 24 saat sonra yaprak örnekleri alınıp hemen sıvı azota aktarılıp – 80 derecede muhafaza edilmiştir. Yaprak proteinleri 24 saat içerisinde ekstrakte edilmiştir. Protein izolasyonu için sıvı azotta ezilmiş yaprak dokudan 50 mg alınıp üzerine 400 µl PDB tamponu (Protein Dilution Buffer) ilave edilmiştir. Karışım vorteks yapıp 30 dakika buzda bekletilmiştir. 30 dakika +4 derecede son hızla santrifüj yapılmıştır. Üst fazın 20 µl' si alınıp üzerine 80 µl izolasyon tamponu ilave edilmiştir. ELISA plakasındaki mevcut kuyulara 50 µl 'Enzyme Conjugate' koyulup üzerine 50 µl izole edilmiş protein karışımı ilave edilmiştir. Plaka parafilm ile sarılıp çok nazik karıştırıldıktan sonra 90 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir. Kuyu içeriği atılıp üç kere yıkama tamponu (PBS) ile durulanmıştır. PBS damlaları tamamen uzaklaştırılıp 100 µl 'substrate' ilave edilmiştir. Kuyu içeriği iyice karıştırılmıştır. Plaka parafilm ile sarılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Karışıma 100 µl 'stop solution' ilave edip reaksiyon durdurulmuştur. İlk yarım saat içerisinde örneklerin OD değerleri ELISA READER cihazında (450 nm) okutulup sonuçlar incelenmiştir.

3.8.3 RT-PCR

3.8.3.1 RNA izolasyonu

Pamuk yapraklarının total RNA molekülleri Jaakola vd. (2001) yöntemi ile izole edilmiştir. pGTGNAoC1AC gen kasetlerini içeren pamuk yaprakları iğne ile yaralanmıştır. Yaralandıktan 6 saat sonra yapraklar toplanıp ve RNA izolasyonuna alınmıştır. pGTGN35C1AC gen kasetlerini içeren bitkilerin yaprakları ise yaralanmadan toplanmıştır.

İzolasyon öncesi RNA izolasyon tamponu (% 2 CTAB, % 2 PVP, 100 mM Tris HCl pH: 8.0, 25 mM EDTA, 2 M NaCl ve 0.5 g/L Spermidine) ve SSTE tamponu (1M NaCl, % 0.5 SDS, 10 mM Tris HCl pH: 8.0, 1 mM EDTA) hazırlanıp ve otoklav edilmiştir. İzolasyon iki günde yapılmıştır (Jaakola vd. 2001).

Birinci gün aşamaları:

1. İzolasyon tamponu 65 °C' de ısıtılıp içerisine % 2 β-mercapthoethanol ilave edilmiştir.
2. Numuneler sıvı azotla ezilip 0.1 gramı 1.5' luk steril tüpe alınmıştır. Üzerine 750 µl izolasyon tamponu ilave edilip iyice karıştırılmıştır. 10 dakika 65 derecede inkübe edilmiştir. Kaç dakikada bir vorteks yaparak karıştırılmıştır.
3. Tüpler + 4 derecede 10.000 G' de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Süpernatant yeni tüpe aktarılıp üzerine eşit miktarda chloroform:isoamylalcohol eklenmiştir. 5 dakika oda sıcaklığında 13000 rpm' de çöktürüp fazlar ayrılmıştır. Yıkama aşaması iki defa tekrarlanmıştır. İkinci defada 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
5. Süpernatant yeni tüpe aktarılıp üzerine ¼ oranında 10 M LiCl eklenmiştir. Nazıkçe ters düz ederek homojen hale getirip gece boyu +4 derecede bekletilmiştir.

İkinci gün aşamaları:

1. Tüpler 18000 G ve + 4 derecede 20 dakikada çöktürülmüştür.
2. Süpernatant atılıp ve tüpler yaklaşık bir dakika kurutma havlusu üzerine ters koyularak sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.
3. Pellet % 70' lik Etanol ile yıkatılmıştır.
4. RNA peletini 55 dereceye ısıtıp 100 µl SSTE tamponu ile çözülmüştür.
5. Peletin üzerine eşit hacimde phenol:chloroform:isomylalcohol (25:24:1) eklenip ters düz ederek karıştırılmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında 13000 rpm' de santrifüj yapıp fazlar ayrılmıştır.
6. Üst faz bir defa chloroform:isomylalcohol ile yıkatılmış akabinde 5 dakika oda sıcaklığında 13000 rpm' de çöktürerek fazlar ayrılmıştır.
7. Üst faz 2 katı hacminde – 20 dereceden alınmış saf alkol veya isopropanol ile karıştırılıp – 20 derecede iki saat bekletilmiştir.
8. Tüpler 18000 G' de + 4 derecede 20 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Elde edilmiş pelet % 70' lik etanol ile yıkatılmış ve 10 dakika kurumaya bırakılmıştır.

10. Kurumuş pelet 50 µl DEPC' li su ile çözülmüştür.
İzole edilmiş total RNA cDNA sentezleme reaksiyonunda kullanılmıştır.

3.8.3.2 cDNA sentezleme

ELISA denemesine göre sonuçları iyi olan “6, 8, 39 ve j” kodlu bitkilerde *GNA* ve *CryIAc* genlerinin ifadelerini incelemek amacıyla izole edilmiş total RNA' yı kullanarak cDNA molekülleri sentezlenmiştir. Ubiquitin geni referans gen amacıyla denemede incelenmiştir. cDNA sentezlenmesinde “Thermo Scientific RevertAid RT #K1691” Kiti kullanılmıştır. DNA moleküllerinin tamamen giderilmesi için izole edilmiş total RNA, DNaseI enzimi ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.22).

Çizelge 3.22 İzole edilmiş total RNA' nın DNaseI reaksiyonundaki bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
RNA	2 µg
10× reaksiyon tamponu	1 µl
DNaseI	1 µl (1 U)
Su	10 µl tamamlanmıştır

Reaksiyon kurulduktan sonra 30 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda 1 µl EDTA (50 mM) ekleyip ve 10 dakika 65 derecede bekletilmiştir. Hazırlanmış total RNA ters transkripsiyon reaksiyonunda kullanılmıştır. İzole edilmiş RNA moleküllerinin konsantrasyon ve kalitelerini incelemek için “NanoDrop 1000 Spectrophotometer” cihazı kullanılmıştır. cDNA sentezlemesinde her örnekten 2 µg alınmıştır.

cDNA sentezleme reaksiyonlarında oligo (dT)₁₈ primerleri kullanılıp birinci sarmal cDNA molekülleri sentezlenmiştir (Çizelge 3.23). Reaksiyon kurulduktan sonra 60 dakika 42 derecede inkübe edilmiştir. Reaksiyon 5 dakika 70 derecede bekletme ile sonlandırılmıştır. Elde edilmiş cDNA molekülleri RT-PCR' da kullanılmıştır.

Çizelge 3.23 cDNA sentezi için reaksiyon bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar
Kalıp RNA	2 µg
Oligo (dT) ₁₈	1 µl
5× tampon	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT	1 µl (200 U)
Toplam	20 µl

3.8.3.3 RT-PCR denemesi

Elde edilmiş *GNA* ve *CryIac* cDNA molekülleri RT-PCR’ da kullanılmıştır. RT-PCR incelemeleri “FastStart Essential DNA Green Master (#06402712001 Roche)” kiti ve “CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio Rad)” cihazını kullanarak yapılmıştır. RT-PCR incelemelerinde cDNA molekülleri 1:10 oranında sulandırılmıştır. Reaksiyonlar çizelge 3.24 ve 3.25 belirtildiği koşullarda hazırlanıp kurulmuştur. Gen ifadesi incelemesinde Ubiquitin geni referans gen olarak kullanılmıştır. RT-PCR yapılmasında tasarlanmış özel primerler kullanılmıştır. Primerlerin bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla gardiyan PCR denemeleri yapılmıştır. *GNA*, *CryIac* ve *Ubiquitin* genlerine ait primerlerin bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra her gen için ayrı RT-PCR denemesi kurulmuştur (Çizelge 3.26).

Çizelge 3.24 RT-PCR reaksiyonundaki bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
FastStart Essential DNA Green Master	6.5 µl
İleri primer	0.5 µl (0.5 µM)
Ters primer	0.5 µl (0.5 µM)
cDNA	1 µl (1:10 sulandırılmıştır)
Su	3.5 µl
Toplam	13 µl

Çizelge 3.25 RT-PCR’ da uygulanmış reaksiyon programı

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dk	1
denatürasyon	95	25 s	40
Primer bağlanması	55 (<i>GNA</i>) 59 (<i>CryIAc</i>)	25 s	
üzama	72	20 s	

Çizelge 3.26 RT-PCR’ da kullanılmış primer dizileri

Gen	Primer dizisi	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Ürün uzunluğu (çb)
<i>GNA</i>	F-GCATGCAGACTGATGGGAAC	55	164
	R-GTCCGGTGTGAGTTCCAGTA		
<i>CryIAc</i>	F-GGACAACAACCCAAACATCAA	59	173
	R-CGAGAACGAACCCAGCAC		
<i>Ubiquitin</i>	F-CAACGCTCCATCTTGTCCTT	57	74
	R-TGATCGTCTTTCCCGTAAGC		

3.9 Böcek Denemesi

3.9.1 *Spodoptera littoralis*

PCR, ELISA ve RT-PCR sonuçları pozitif olan bazı transgenik (39, j, 6, 8, P, H kodlu) bitkilerin hedeflenmiş böcekler üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla böcek denemesi yapılmıştır.

Aktarılmış *CryIAc* geninin faaliyetini incelemek amacıyla pamuk yaprak kurdunun (*Spodoptera littoralis*) ikinci dönemde olan larvaları seçilmiştir. *Spodoptera littoralis* (Şekil 3.9) böcekleri Doç. Dr. Umut Toprak’ tarafından (Ankara Üniversitesi, Ziraat

Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü) sağlanmıştır. Deneme iki tekerrürde yapılmıştır. Genç yeşil pamuk yaprakları cam petri kaplarında yerleştirip üzerlerine beşer tane larva bırakılmıştır. Yaprakların deneme sürecinde kurumaması için yaprak sapları yaş pamuk topağıyla sarılmıştır. Petri kaplarının kapakları kapatılıp oda sıcaklığı ve normal ışık şartlarında bırakılmıştır. Böceklerin ölüm yüzdelerini zamana göre hesaplamak amacıyla 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra ölmüş böceklerin sayısı alınmıştır.



Şekil 3.9 *Spodoptera littoralis* larvası (Kaynak: Orjinal)

3.9.2 *Aphis gossypii* Glover

Aktarılmış *GNA* geninin faaliyetini incelemek amacıyla ilk dönemlerinde olan pamuk yaprak biti (*Aphis gossypii* Glover) nimfaları denemede kullanılmıştır. Bu böcekler serada mevcut olan patates bitkileri üzerinden toplanmıştır. Seçilmiş transgenik bitkiler iki tekerrürde incelenmiştir. Pamuk genç yeşil yaprakları alınıp cam petri kaplarına konulmuştur. Yaprakların deneme sürecinde kurumamaları için yaprak sapları yaş pamuk topağıyla sarılmıştır. Her yaprak üzerine onar tane bit bırakılıp petri kapakları kapatılmıştır. Deneme 24 ± 2 derece, 16/8 saat ışık/karanlık ve % 65 nispi nem koşulunda yapılmıştır. Deneme sürecinde petri kaplarında havalandırma yapılmıştır. Böceklerin üreme yüzdesi denemenin 10. gününde alınıp ve kontrol bitkiler üzerine bırakılmış böceklerin üremesiyle karşılaştırılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 *Aphis gossypii* Glover pamuk yaprağı üzerinde partenogenez ile çoğalmaktadır (Kaynak: Orjinal)

3.10 T1 Nesli Bitkilerin Analizi

Transgenik tohumların seleksiyon ortamlarında çimlenmesi için uygun PMG dozunu belirlemek amacıyla normal (transgenik olmayan) pamuk tohumları farklı PMG (glifosat) içeren MS₀ ortamlarında ekilmiştir. Uygun doz belirlenmesinde 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 mg/L PMG dozları uygulanmıştır. Tohumlar iki hafta iklim dolaplarında tutulmuştur (sıcaklık 25 derece). Çimlenme oranları ve gelişme durumunu dikkate alarak uygun PMG dozu seçilmiştir.

39, J, 6 ve 8 kodlu bitkilerin tohumları (T₁) PMG (glifosat) 17.5 mg/L PMG içeren MS₀ ortamlarında çimlendirilmiştir. Her bitkinin tohumlarından on ikişer tane sterilizasyon yapıldıktan sonra ekilmiştir. Tohumlar iki hafta iklim dolaplarında tutulmuştur (sıcaklık 25 derece). Besi ortamında gelişmiş fidelerin yaprakları PCR denemesinde kullanılmıştır. PCR' da Phire Plant Direct PCR Kiti (#F130WH, Thermo fisher Scientific) kullanılmıştır. Kitte mevcut olan iğne ile PCR için gerekli olan yaprak örneği alınıp reaksiyona konulmuştur. Reaksiyon karışımı çizelge 3.27 belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Kitin manualını takip ederek PCR programı uygulanmıştır (Çizelge 3.28). Bitki taramasında T-DNA bölgesinin AoPR1-*CryIAc*-CaMV.polyA ve 35s-*CryIAc*-CaMV.polyA bölgeleri spesifik primer setleri (Çizelge 3.29) ile çoğaltılıp incelenmiştir.

Çizelge 3.27 T₁ pamuk taranmasında kurulmuş PCR bileşikleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
ddH ₂ O	7.1 µl
2× Phire Plant PCR Buffer	10 µl
İler Primer (F-AoPR1 / F-35s)	1 µl (0.5 µM)
Ters Primer (R-CaMVpolyA)	1 µl (0.5 µM)
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4 µl
Bitki dokusu	0.5 milimetre
Toplam	20 µl

Çizelge 3.28 Aktarılmış *CryIAc* kasetinin doğrulamasında uygulanmış PCR programı

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	98	5 dk	1
denatürasyon	98	5 s	40
Primer bağlanması	60	5 s	
Primer üzaması	72	60 s	
Nihai üzama	72	7 dk	1

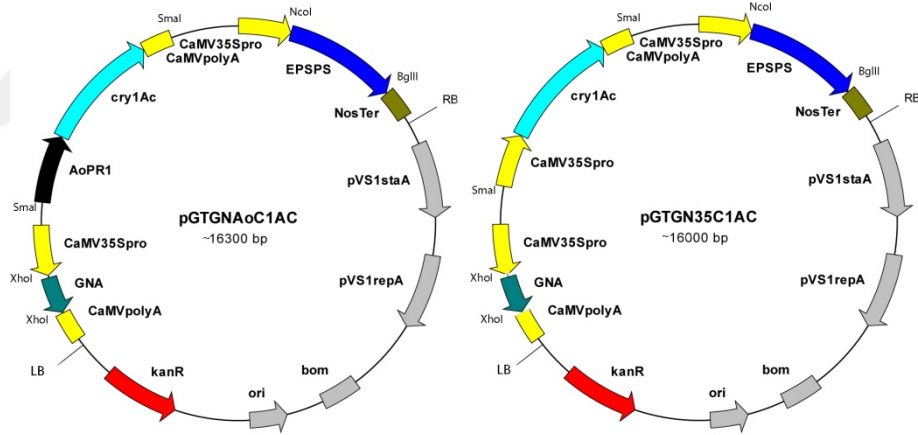
Çizelge 3.29 *CryIAc* kasetlerinin tam çoğaltılmasında kullanılmış primer setleri

Primer adı	Primer dizisi
F-AoPR1	5'ACCCGGGCTCAGGACTAGACCATC
F-35s	5'GCTCCTACAAATGCCATCA
R-CaMVpolyA	5'CCCGGGCGGTGTGAGGGAAC

4. BULGULAR

4.1 Plazmitler ve Hazırlanmaları

GNA, *CP4-EPSPS* ve *CryIAc* genlerinin pamuk bitkisine aktarılmasından önce ifade vektörlerinin tasarlanmasında biyoinformatik çalışmalar yapılmıştır. Genlerin dizileri, vektör üzerinde bulunan kesme enzim yerleri, promotör ve terminatörlere göre vektör tasarlanması yapılmıştır. Adı geçen faktörlere göre genler *GNA*, *CP4-EPSPS* ve *CryIAc* sırasıyla pCAMBIA 1301 plazmitinde klonlanmışlar. 35s-*GNA*-camv, 35s-*CP4-EPSPS*-nos ve AoPR1-*CryIAc*-camv gen kasetlerini içeren vektör pGTGNAoC1AC ve 35s-*GNA*-camv, 35s-*CP4-EPSPS*-nos ve 35s-*CryIAc*-camv gen kasetlerini içeren vektör ise pGTGN35C1AC adlandırılmıştır (Şekil 4.1).

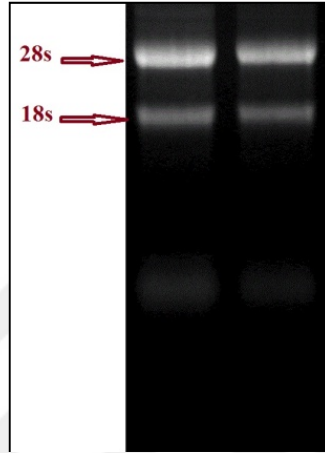


Şekil 4.1 Bitkiye gen aktarım çalışmasında biyoinformatik incelemeler sonucu tasarlanmış pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmit vektörleri (Kaynak: Orjinal)

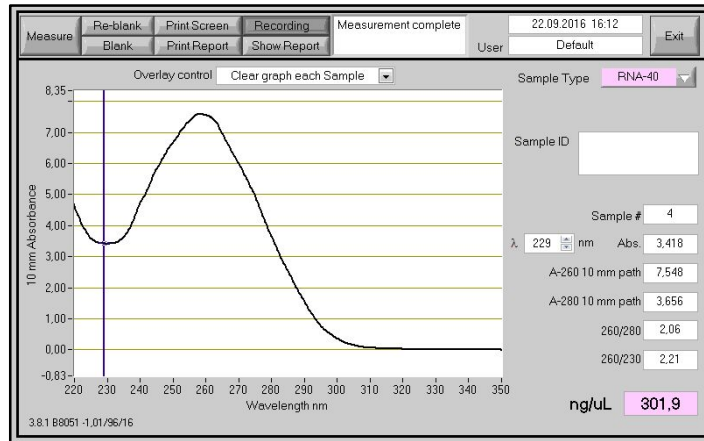
4.1.1 *GNA* izolasyonu, klonlama, doğrulama ve biyoinformatik çalışmaları

İzole edilmiş total RNA'nın kalite ve yoğunluğunu belirlemek için NanoDrop 1000 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Ayrıca izole edilmiş total RNA agaroz jelinde elektroforez yapılmıştır. Jel görüntüleme ve spektrofotometre sonuçlarına göre izole edilmiş RNA'nın kalite ve yoğunluğu doğrulanmıştır. Elektroforezde sonuçlarına göre

ayrılmış 28s ve 18s rRNA bantların görüntülemesiyle izole edilmiş RNA' nın kalitesi doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Yapılmış spektrofotometreye göre izole edilmiş RNA yoğunluğu yaklaşık 300 ng/μL belirlenmiştir. 260/280 ve 260/230 oranları ise sırasıyla 2.06 ve 2.21 olarak belirlenip RNA saflığı ve kalitesi doğrulanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2 İzole edilmiş total RNA agaroz jeline yüklenip kalite ve yoğunluğu incelenmiştir



Şekil 4.3 İzole edilmiş RNA' nın kalite ve yoğunluğunu belirlemek için NanoDrop 1000 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır

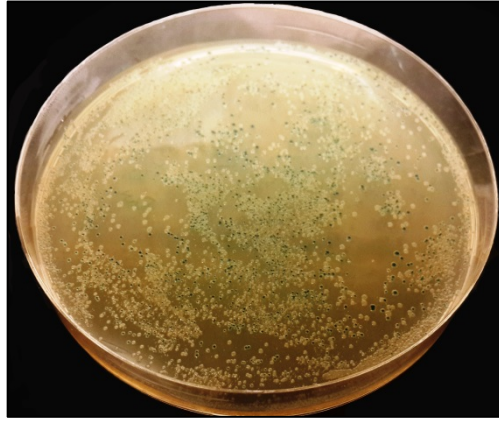
İzole edilmiş total RNA' yı kullanarak cDNA molekülleri üretilmiştir. cDNA kalıp olarak *GNA* sentezinde kullanılmıştır. *GNA* spesifik primerlerinin bağlanma sıcaklığı

gradient PCR sonucuna göre 58 derece belirlenmiştir. PCR aracılığıyla *GNA* dizisi sentez edilmiştir (Şekil 4.4).



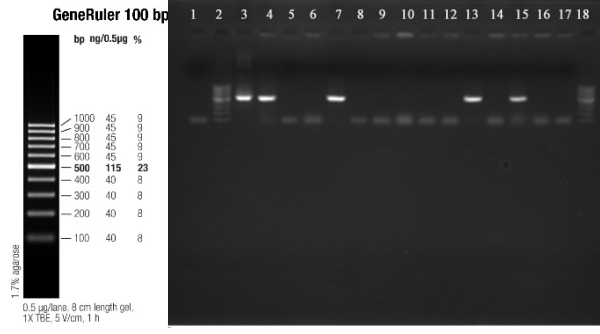
Şekil 4.4 cDNA' yı kullanarak PCR' da çoğaltılmış *GNA* geni

GNA geni agaroz jelden izole edilip pGEM[®]-T Easy vektöründe klonlanmıştır. pGEMT-*GNA* vektörü JM109 kompetan *E. coli* hücrelerine aktarılıp X-Gal-IPTG-ampisilin içeren katı LB ortam üzerine dağıtılmıştır. Transformasyon sonucunda mavi beyaz koloniler ortamda gelişmiştir (Şekil 4.5).



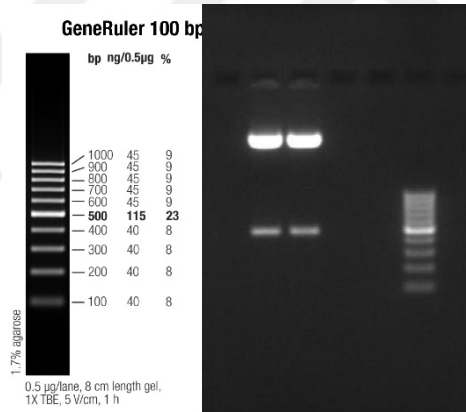
Şekil 4.5 pGEMT-*GNA* aktarımından sonra X-Gal-IPTG-ampisilin içeren plakta gelişen mavi-beyaz JM109 kolonileri (Kaynak: Orjinal)

İyi gelişmiş beyaz kolonilerin arasından bazıları seçilip koloni PCR yapılmıştır. Seçilen 15 koloniden beşinin pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Seçilmiş beyaz kolonilerin PCR sonuçlarına göre dört tanesinin pozitif olduğu belirlenmiştir

GNA genin pGEMT-*GNA* vektöründe klonlanmasını doğrulamak için *Xho*I enzimi ile kesim yapılmıştır. reaksiyon sonrası 488 çb' lık parçanın görünümüyle klonlama doğrulanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 kesme reaksiyonu ürünü agaroz jelinde elektroforez yapıлып *GNA* geninin vektörde klonlanması doğrulanmıştır

İzole edilmiş *GNA* geninin dizileme sonuçları üzerine biyoinformatik çalışmalar yapılmıştır. Elde edilmiş nükleotid BLAST sonuçlarına göre izole edilmiş *GNA* geni ile önceden rapor edilmiş *GNA* dizileri arasında % 89 - 97 dizi benzerliği bulunmuştur (Çizelge 4.1). *GNA* protein BLAST sonucuna göre *GNA* protein dizisi ve önceden bulunan diziler arasında % 84 - 96 protein dizi benzerliği belirlenmiştir. Biyoinformatik incelemelerinin sonucuna göre 477 çb' lık *GNA* geninin cDNA dizisi 333 çb' lık bir ORF (open reading frame) içermektedir (Şekil 4.8). Bu ORF 157 amino asit

kodlamaktadır (Şekil 4.9). Protein dizisinin 5' ucunda sinyal peptidin varlığı incelemelere göre doğrulanmıştır (Şekil 4.9). Bu sinyal peptid 23 amino asitten oluşup protein ifadesinde role sahiptir. Dizi analizleri devamında nükleotid dizi alt-sıralaması (sequence alignment) yapılmıştır (Şekil 4.10). Alt-sıralama sonuçları izole edilmiş *GNA* ve daha önce kayıt edilmiş diziler arasında önemli oranda benzerlik gösterip *GNA* izolasyonunu doğrulamıştır. Bulunan diziler aralarındaki benzerlik filogramda araştırılmıştır (Şekil 4.11); NCBI veri tabanında bulunan *GNA* dizileri Belçika (M55556.1, M55558.1, M55555.1, M55559.1, JQ898015.1 ve M55557.1) ve Çin' de (AF413086.1, AF413083.1, AF413087.1, AF413085.1 ve AF413084.1) yetişen *G. nivalis* bitkilerinden izole edilmiştir. İzole edilmiş dizilerin analizlerine göre en fazla akrabalık, Belçika' da yetişen bitkilerin lektin dizileri ile gözlenmiştir (Van Damme vd. 1991). Sonuçlara göre *trGNA*' nin en fazla dizi benzerliği Belçika' da yetişen ve NCBI veri tabanındaki M55556.1 erişim numaralı dizi ile olduğu belirlenmiştir (% 97).

Çizelge 4.1 BLAST sonucuna göre izole edilmiş *GNA* geni ile önceden rapor edilmiş diziler arasındaki benzerlik bulunmaktadır

Erişim numarası	Benzerlik %	Blast' da sorgulanan dizi örtüşmesi %	Erişim numarası	Benzerlik %	Blast' da sorgulanan dizi örtüşmesi %
M55556.1	97	100	M55558.1	90	98
AF413086.1	91	100	M55557.1	88	97
AF413083.1	90	100	M55559.1	91	78
AF413087.1	90	100	JQ898015.1	96	66
AF413085.1	90	100	M55555.1	89	80
AF413084.1	89	100			

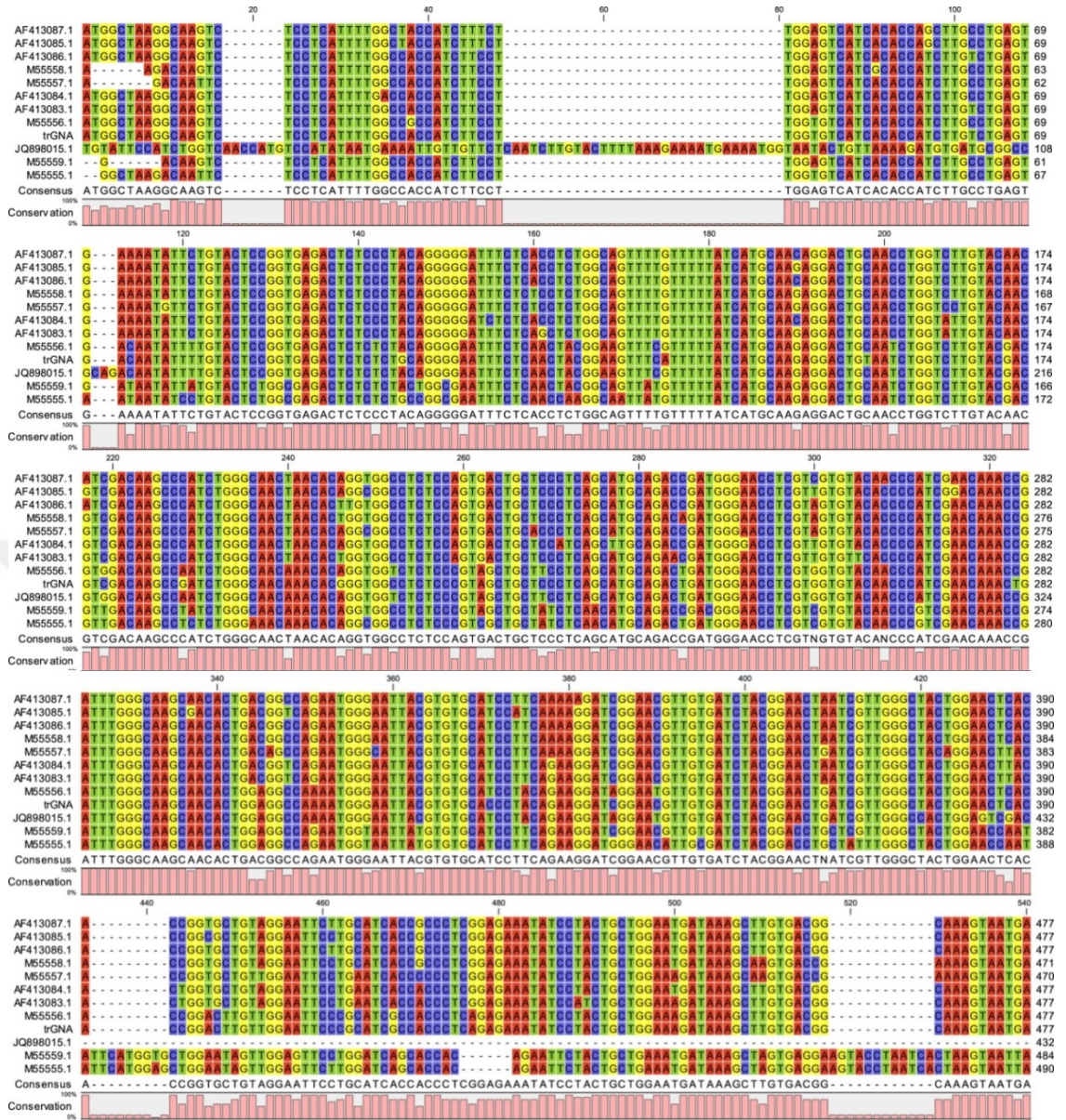
> *Galanthus nivalis* lektin (*trGNA*), 477 çb

ATGGCTAAGGCAAGTCTCCTCATTGTTGGCCACCATCTTCCTTGGTGTCATCACACCA
TCTTGTCTGAGTGACAATATTTGTACTCCGGTGAGACTCTCTCTGCAGGGGAATTT
CTCAACTACGGAAGTTTCATTTTTATC**ATG**CAAGAGGACTGTAATCTGGTCTTGTAC
GACGTCGACAAGCCGATCTGGGCAACAAACACGGGTGGCCTCTCCCGTAGCTGCTC
CCTCAGC**ATG**CAGACTGATGGGAACCTCGTGGTGTACAACCCATCGAACAAACTGA
TTTGGGCAAGCAACTGGAGGCCAAAATGGGAATTACGTGTGCACCCTACAGAA
GGATCGGAACGTTGTGATCTACGGAAGTATCGTTGGGCTACTGGAAGTACACCCG
GACTTGTGGAATCCCGCATCGCCACCCTCAGAGAAATATCCTACTGCTGGAAAG
ATAAAGCTTGTGACGGCAAAG**TAATGA**

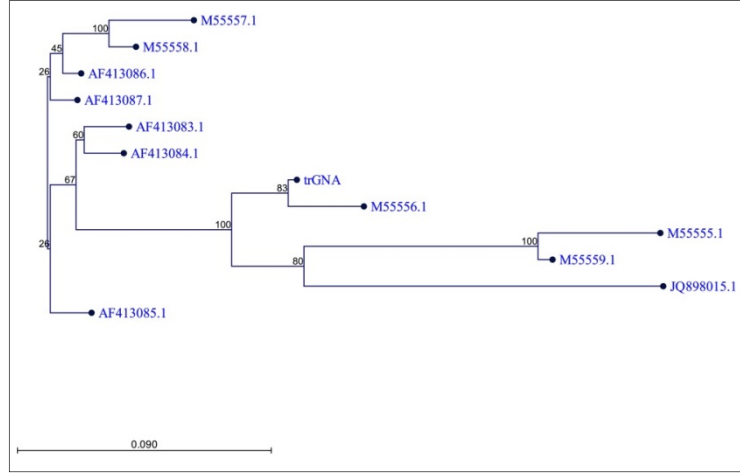
Şekil 4.8 İzole edilmiş *GNA* nükleotid dizisi ve 333 çb' lık ORF bölgesi (Kaynak: Orjinal)

MAKASLLILATIFLGVITPSCLSDNILYSGETLSAGEFLNYGSFIFIM**QEDCNLVLYD**VDKPIWAT
NTGGLSRSCSLSM**QTDGNLVVYN**PSNKLIWASNTGGQNGNYVCTL**QKDRNVVIY**GTDRWATG
THTGLVGIPASPPSEKYPTAGKIKLVTAK**

Şekil 4.9 İzole edilmiş *GNA* protein dizisi, sinyal peptid dizisi (altı çizilmiş) ve muhafaza edilmiş mannoz bağlanma bölgeleri (kırmızıya boyanmış) (Kaynak: Orjinal)



Şekil 4.10 İzole edilmiş *GNA* nükleotid dizisi ile önceden bulunan dizilerin alt sıralanması (Kaynak: Orjinal)

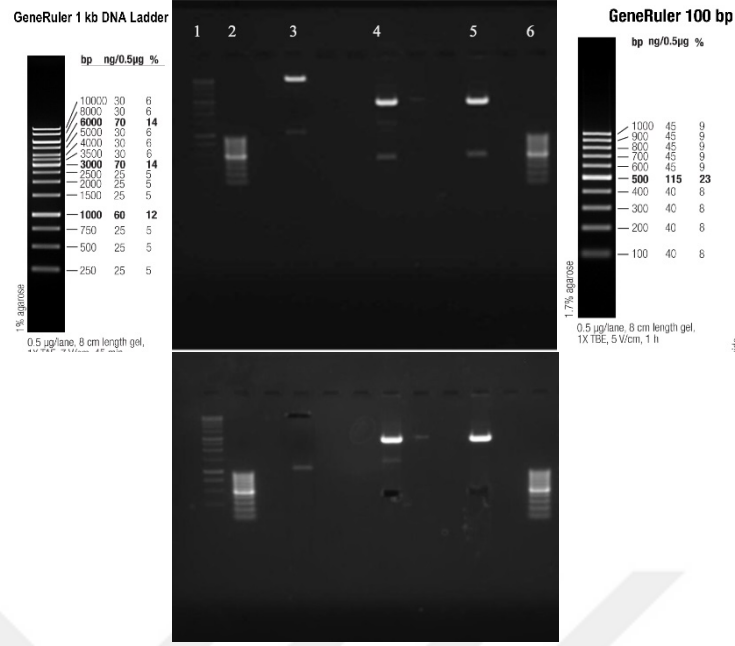


Şekil 4.11 İzole edilmiş *GNA* geni ile önceden bulunan dizilerin filogramı

4.1.2 pGN plazmitinin hazırlanması

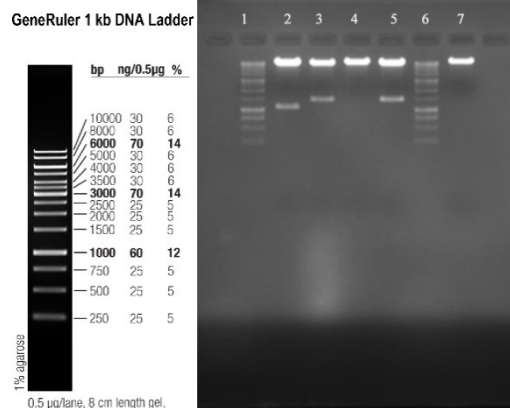
pGEM[®]-T Easy vektöründe klonlanmış *GNA* geni kesilip pCAMBIA 1301 ifade vektöründe alt-klonlanması için vektörlerin ikisi de XhoI enzimi ile kesilmiştir.

Tasarlanmış klonlama planına göre *GNA* geni pCAMBIA 1301 vektöründeki *Hph* (Hygromycin phosphotransferase) geninin yerine yerleştirilmiştir. *Hph* geni kaldırılmış pCAMBIA 1301 vektörü (10783çb) ve pGEMT-*GNA* vektöründen kesilmiş *GNA* geni (497 çb) jelden izole edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 pCAMBIA 1301 (3) ve pGEMT-*GNA* (4, 5) vektörleri kesme reaksiyonlarında *Xho*I enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde elektroforez yapıp istenen parçalar jelden izole edilmiştir

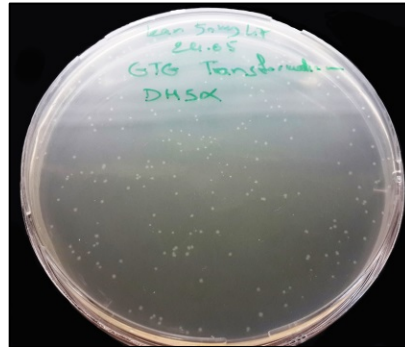
GNA içeren pCAMBIA 1301 plazmiti (pGN), DH5α kompetan *E. coli* hücrelerine aktarılmıştır. *GNA* geninin pCAMBIA 1301’ de klonlanmasını doğrulamak için plakta gelişen kolonilerin beş tanesi seçilip spesifik *GNA* primerler ile koloni PCR yapılmıştır. *GNA*’ nın klonlanmasında tek bir enzim kullanıldığından dolayı (*Xho*I) genin iki farklı yönde klonlanma olasılığı bulunuyordu. pGN plazmitinde klonlanmış *GNA*’ nın ifadesinin gerçekleşmesi için geninin plazmitte doğru yönde klonlanması gerekmektedir; bundan dolayı genin 5’ ucu promotöre ve 3’ ucu ise terminatöre yakın bağlandığını doğrulamak amacıyla pGN plazmiti uygun enzim ile (*Sal*I) kesilip parça sayı ve uzunluğuna göre gen bağlanma yönü doğrulanmıştır. Klonlanmış 497 çb’ lık *GNA* geninin 416. ve plazmitin MCS bölgesinin 11058. nükleotidinde *Sal*I kesme yeri bulunmaktadır. pGN *Sal*I enzimi ile kesilmesi sonucunda ~1500 çb’ lık parçanın ortaya çıkması, genin doğru yönde klonlanmasını (Şekil 4.13); ~1100 çb’ lık parçanın ortaya çıkması ise yanlış yönde klonlanmasını (Şekil 4.13) doğrulamıştır. Plakta gelişen 3 ve 5 kolonilerin plazmitleri izole edilmiştir.



Şekil 4. pGN plazmiti Sall enzimi ile kesilip *GNA* geninin inserte olmuş yönü incelenmiştir; (2) yanlış yönde inserte olmuş *GNA*, (3 ve 5) doğru yönde inserte edilmiş *GNA*, (4) kesim sonrası hiçbir *GNA* vektörden ayrıldı, (7) negatif kontrol

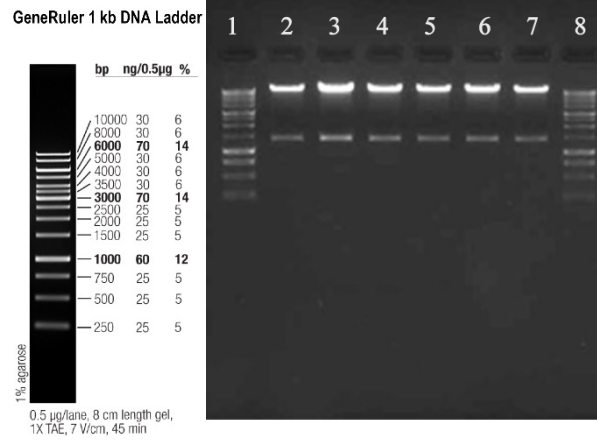
4.1.3 pGTGN plazmitinin hazırlanması

CP4-EPSPS geni pCAMBIA1301 vektöründen kesilip pGN vektöründe altklon yapılmıştır (pGTGN). Hazırlanmış pGTGN plazmiti *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine aktarılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.13 Plakta gelişen pGTGN içeren DH5α suşları (Kaynak: Orjinal)

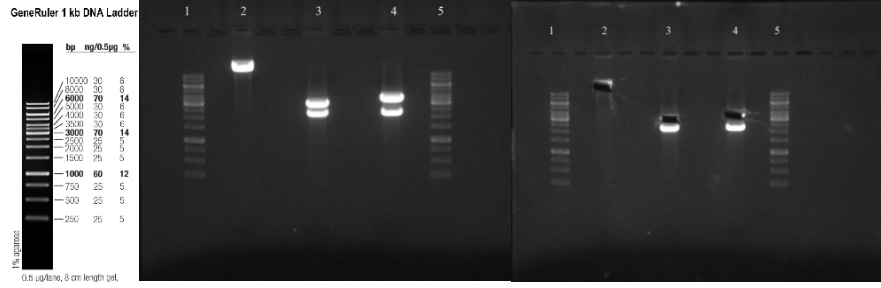
Kolonilerin kaç tanesi rastgele seçilip koloni PCR yapıp ve sonuçları pozitif olanların plazmitleri ekstekte edilmiştir. pGTGN plazmitleri BglII ve NcoI enzimleriyle kesilmiştir (Şekil 4.15). Kesme reaksiyonunda ~ 1.4 kb parçanın görüntüsüyle *CP4-EPSPS* geninin vektörde alt klonlanması doğrulanmıştır.



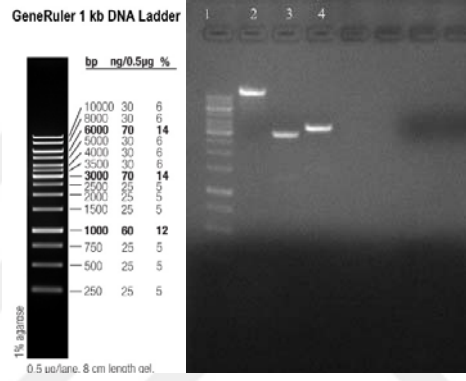
Şekil 4.14 pGTGN plazmi BglII ve NcoI enzimleri ile kesilip ~ 1.4 kb' lik *CP4-EPSPS* geni agaroz jel elektroforezinde izlenip klonlama doğrulanmıştır

4.1.4 pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmitlerinin hazırlanması

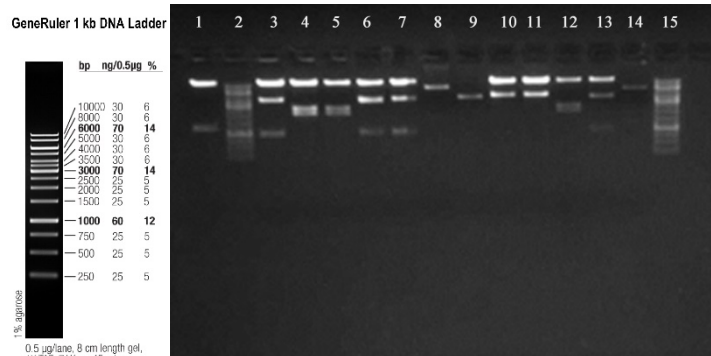
AoPR1-*CryIac*-CAMV ve 35s-*CryIac*-CAMV kasetleri pJIT61 plazmitlerinden izole edilip (Şekil 4.16) "End Filling" ve defosforilasyon yapıldıktan sonra saflaştırılmıştır (Şekil 4.17). Gen kasetleri pGTGN plazmitinde inserte edilmiştir. Hazırlanmış pGTGNAoCR1AC ve pGTGN35CR1AC plazmitler *E. coli* (DH5a) kompetan hücrelerine aktarılmıştır. Plaklarda gelişen kolonilerin on ikisi seçilip plazmitler ekstekte edilmiştir. Kasetlerin klonlandığını doğrulamak amacıyla pGTGNAoCR1AC ve pGTGN35CR1AC plazmitleri üzerine kesme reaksiyonu uygulanmıştır. *GNA*, AoPR1 promotörü ve pCAMBIA1301 vektörünün MCS bölgesinde Sall kesme yerinin bulunduğundan dolayı kesme reaksiyonu sonucunda pGTGNAoC1AC pozitif örneklerinde üç bant ve pGTGN35C1AC örneklerinde ise iki bant elektroforez jelinde görünüp klonlama doğrulanmıştır (Şekil 4.18). AoPR1-*CryIac*-CAMV kasetinin iki yönde klonlanabilmesinden dolayı kesme sonrası farklı uzunlukta parçalar oluşturmuştur (Şekil 4.18). Pozitif klonilerin ikisi dizilemeye gönderilip *GNA*, *CP4-EPSPS* ve *CryIac* genlerin pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC üzerinde klonlanmasını doğrulamıştır.



Şekil 4.15 pGTGN plazmiti *Sma*I enzimi ile linear edilip jelden ekstekte edilmiştir (2) pJIT61 plazmiti *Kpn*I ve *Eco*RV enzimleri ile kesilip 35S-*CryIAC*-CAMV (3) ve AoPR1-*CryIAC*-CAMV (4) kasetleri jelden ekstekte edilmiştir



Şekil 4.16 Jelden ekstekte edilmiş linear pGTGN CIAP defosforile edilip saflaştırılmıştır (2) 35S-*CryIAC*-CAMV (3) ve AoPR1-*CryIAC*-CAMV (4) kasetleri, pGTGN ile ligasyondan önce jelden izole edilip saflaştırılmıştır



Şekil 4.17 *CryIAC* genini içermeyen pGTGN vektörü *Sal*I enzimi ile kesilmiştir (1). Farklı kolonilerden ekstekte edilmiş pGTGNAoC1AC plazmiti *Sal*I enzimi ile kesilip (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14) *CryIAC* kasetinin klonlanması doğrulanmıştır (3, 4, 5, 6, 7, 12, 13); Farklı kolonilerden ekstekte edilmiş pGTGN35C1AC plazmiti *Sal*I enzimi ile kesilip *CryIAC* kasetinin klonlanması doğrulanmıştır (10, 11)

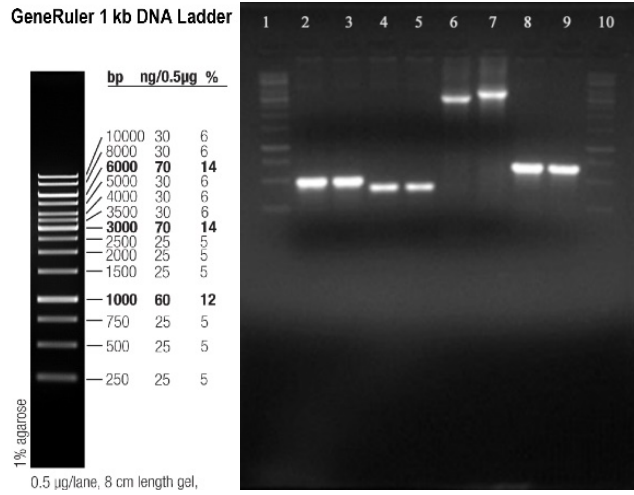
4.2 İfade Plazmitlerin *A. tumefaciens* Hücrelerine Aktarımı ve Doğrulanması

Hazırlanmış pGTGNAoC1AC ve pGTGN35C1AC plazmitleri *A. tumefaciens* EHA105 suşuna aktarılmıştır (Şekil 4.19). *A. tumefaciens* ye aktarılan gen ve plazmitlerin nihai doğrulanması amacıyla koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR' da kısmi ve tam çoğaltım gen ve kasetler üzerine uygulanmıştır (partial/full amplification).

Elde edilmiş sonuçlara dayalı GNA, CP4-EPSPS, Cry1Ac, 35s-Cry1Ac-camv ve AoPR1-Cry1Ac-camv gen kasetlerinin varlığı hazırlanmış *A. tumefaciens* hattında doğrulanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.18 Elektroporasyon aracılığıyla pGTGNAoC1AC ve pGTGN35sC1AC plazmitleri *A. tumefaciens* (EHA105) bakterisine aktarılmıştır (Kaynak: Orjinal)

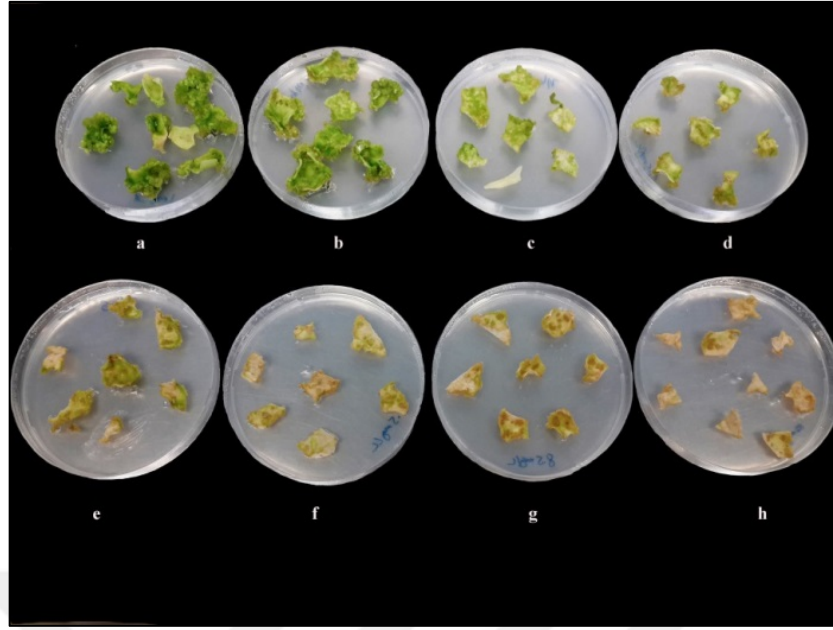


Şekil 4.19 *A. tumefaciens* koloni PCR sonuçlarına göre: pGTGN35C1AC plazmitinde *GNA* (2), *CP4-EPSPS* (4), *CryIAC* (8) genleri ve 35s-*CryIAC*-camv tam kaseti (6) doğrulanmıştır; pGTGNAoC1AC plazmitinde ise de *GNA* (3), *CP4-EPSPS* (5), *CryIAC* (9) genleri ve AoPR1-*CryIAC*-camv tam kasetinin (7) varlığı doğrulanmıştır

4.3 Tütün Gen Aktarımı

4.3.1 Tütün seleksiyonunda uygun PMG dozunun belirlenmesi

Tütün eksplantları beş hafta farklı dozlardaki PMG içeren ortamda (1, 1.5, 2.5, 3.5, 5, 6.5, 8 ve 10 mg/L) bekletildikten sonra, seleksiyonda en uygun PMG dozu tayin edilmiştir. Denemede 1, 1.5, 2.5 ve 3.5 mg/L PMG dozlarında sürgün rejenerasyonundan dolayı bu dozlar seleksiyonda kullanılmamıştır. Sonuçlara göre transgenik tütün aday bitkileri seleksiyonunda 5 mg/L PMG seçilmiştir (Şekil 4.21; Çizelge 4.2).



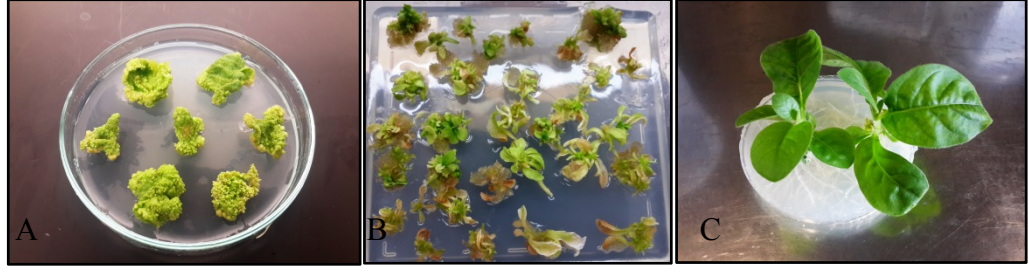
Şekil 4.20 Tütün eksplantları üzerinde uygulanmış farklı PMG dozları; 1^a, 1.5^b, 2.5^c, 3.5^d, 5^e, 6.5^f, 8^g ve 10^h mg/L (Kaynak: Orjinal)

Çizelge 4.2 Farklı PMG konsantrasyonlarının tütün rejenerasyonunda etkisi

PMG dozu (mg/L)	Eksplant sayısı	Rejenere olmuş eksplantların sayısı		Sürgün rejenerasyon durumu
		1.tekerrür	2.tekerrür	
1	7	7	7	Çok iyi
1.5	7	7	7	İyi
2.5	7	4	3	Zayıf
3.5	7	3	2	Çok zayıf
5	7	0	0	Rejenerasyon olmadı
6.5	7	0	0	Rejenerasyon olmadı
8	7	0	0	Rejenerasyon olmadı
10	7	0	0	Rejenerasyon olmadı

4.3.2 Gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu

Yaprak eksplantları rejenerasyon-seleksiyon ortamlarında kallus oluşturup sürgünler gelişmeye başlamıştır (Şekil 4.22.A). Sürgün gelişmesini hızlandırmak amacıyla daha düşük dozlarda PMG' lı ortamlara aktararak alt kültür yapılmıştır (Şekil 4.22.B). Yaklaşık bey ay sonra sürgünler kesilip MS₀ ortamına aktararak iki haftada köklenmiştir (Şekil 4.22.C).

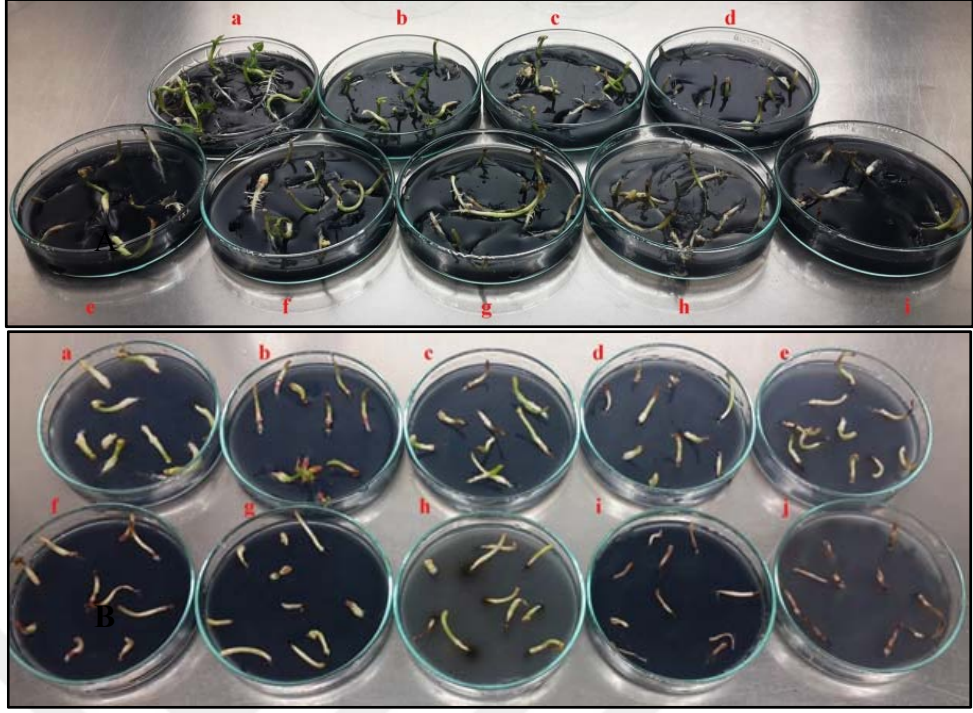


Şekil 4.21 A. 5 mg/L PMG içeren rejenerasyon ortamlarında oluşmuş kaluslar üzerinde sürgünler gelişmeye başlamıştır. B. Eksplantlar alt kültür yapıp PMG dozu düşürülmüştür. C. Tütün bitkileri MS₀ ortamına alınıp köklendirilmiştir (Kaynak: Orjinal)

4.4 Pamuk Gen Aktarımı

4.4.1 Seleksiyon için uygun PMG doz belirlenmesi

Seleksiyonda embriyolar üzerinde etkili PMG (phosphino methyl glycine; **PMG**) dozunu belirlemek amacıyla transgenik olmayan olgun pamuk embriyoları çıkartılıp farklı PMG dozları (0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 17, 25, 34, 42, 51, 68, 85, 102, 119 ve 136 mg/L) uygulanmıştır (Şekil 4.23). Deneme sonunda rejenere olmuş embriyo sayıları ve durumlarına göre seleksiyon için en uygun doz seçilmiştir. Uygulanmış farklı PMG konsantrasyon aralarında sadece 0, 1 ve 3 mg/L dozlarında gelişme görünmüştür. Diğer dozlarda ise PMG çok baskılayıcı etki bırakmıştır. 3 mg/L PMG’ de iki tekerrürde denemeye alınmış toplam 16 embriyodan 8’ inde rejenerasyon başlamıştır. Rejenerasyon başlangıç durumu çok zayıf görünmüştür. Bun eksplantların hiçbirinin rejenerasyonu başarılı olmayıp bitki gelişmemiştir. Rejenerasyon başlangıç yüzdesi 3 mg/L PMG konsantrasyonunda % 50 olmasına rağmen devamında gelişmiş bitki sayısı sıfır görünmüştür (Çizelge 4.2). Eksplantlar rejenerasyon-seleksiyonda kaçış oranını düşürmek ve gereksiz herbisit baskısı uygulamamak için 3 mg/L PMG kullanımına karar verilmiştir.



Şekil 4.22 Seleksiyon için uygun PMG dozunu belirlemek amacıyla farklı PMG dozlarında rejenerasyon ortamları hazırlanıp (A: 0^a, 1^b, 3^c, 5^d, 7^e, 9^f, 12^g, 15^h, 17ⁱ mg/L; B: 17^a, 25^b, 34^c, 42^d, 51^e, 68^f, 85^g, 102^h, 119ⁱ ve 136^j mg/L) eksplantlar üzerindeki etkileri incelenmiştir (Kaynak: Orjinal)

Çizelge 4.3 Farklı PMG konsantrasyonlarının embriyo rejenerasyonunda etkisi

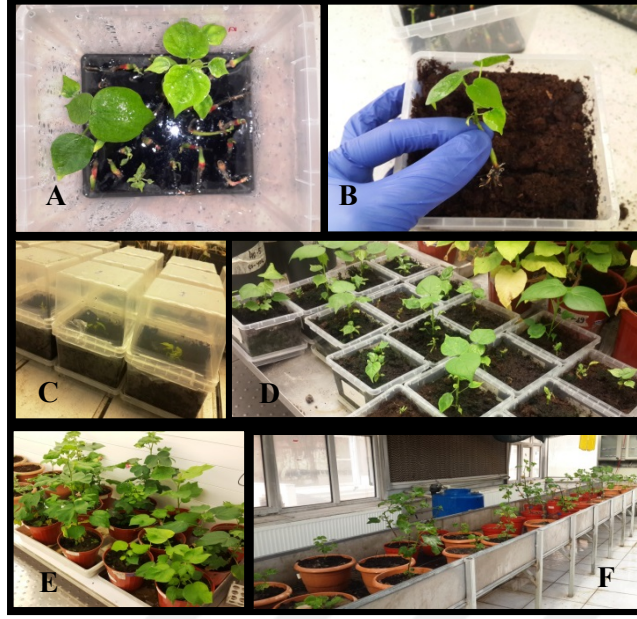
Çeşit	PMG miktarı	1. tekerrür			2. tekerrür			Ortalama rejenerasyon başlangıç yüzdesi	Ortalama başarılı rejenerasyon yüzdesi
		Sürgün rejenerasyon başlangıcı olan eksplant sayısı (toplam 8 eksplanttan)	Rejenerasyon başlangıcı	Gelişmiş bitkilerin sayısı	Sürgün rejenerasyon başlangıcı olan eksplant sayısı (toplam 8 eksplanttan)	Rejenerasyon başlangıcı	Gelişmiş bitkilerin sayısı		
a	0	8	Çok iyi	8	8	Çok iyi	8	% 100	% 100
b	1	8	İyi	6	8	Zayıf	4	% 100	% 60
c	3	2	Çok zayıf	0	6	Çok zayıf	0	% 50	0
d	5	0	-	0	0	-	0	0	0
e	7	0	-	0	0	-	0	0	0
f	9	0	-	0	0	-	0	0	0
g	12	0	-	0	0	-	0	0	0
h	15	0	-	0	0	-	0	0	0
i	17	0	-	0	0	-	0	0	0

4.4.2 Bitki rejenerasyonu ve dış koşullara alıştırmaları

Transgenik pamuk bitkilerin seleksiyonu için glifosat (phosphonomethyl glycine; PMG) herbisiti kullanılmıştır. Aktarılmış *CP4-EPSPS* geninden dolayı transgenik pamuk bitkileri rejenerasyon-seleksiyon ortamlarında PMG' ye rağmen gelişmelerine devam etmişler. Yaklaşık 50 – 60 günde rejenerasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.24.A). Embriyolarda kök apikal meristem bulunduğundan dolayı ve aktif kömürün sayesinde oluşan karanlık ortam köklenmeyi hızlandırmıştır.

Rejenerasyon sonucu oluşan fidelerin dış koşullarına alıştırmaları için fideler otoklav edilmiş torfta dikilmiştir (Şekil 4.24.B). Fidelerin su kaybetmeleri magenta kaplarının ağızları kapatılarak önlenmiştir (Şekil 4.24.C). Yaklaşık iki hafta sonunda kapaklar tamamen uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.24.D). Yeni yaprakların gelişmesinden sonra bitkiler toprak içeren saksılara aktarılıp iklim odasında yaklaşık bir ay bekletilmiştir (Şekil 4.24.E). Bitkiler iyice büyüdüktan sonra seraya aktarılmıştır (Şekil 4.24.F).

Gen aktarma denemesinde yaklaşık 4000 embriyo *A. tumefaciens* ile muamele edilmiştir. İnoküle edilmiş embriyoların 45 tanesi seleksiyon ortamlarında sürgün geliştirip rejenerasyonları sağlanmıştır. Seleksiyon ortamlarında rejenere olan sürgünlerin 31 tanesi dış koşullara adapte olmuştur. Seleksiyon ortamlarında gelişen sürgün sayılarına göre transgenik pamuk rejenerasyonu % 1.125.

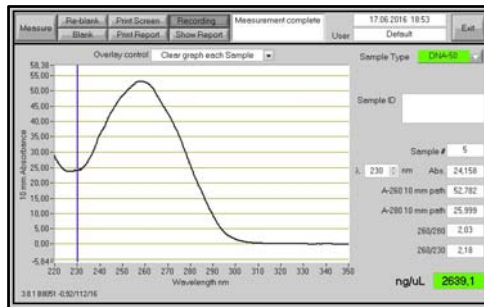


Şekil 4.23 Rejenerasyon-seleksiyon ortamında gelişen fideleri (A) dış koşullarına alıştırmakta ilk aşamada torfa aktarıp (B) rutubet kaybını önlemek için magenta ağızları kapatılmıştır (C). Yeni yapraklar geliştikten sonra kapaklar uzattırılıp (D) bitkiler saksılara aktarılmıştır (E). Son aşamada bitkiler seraya alınmıştır (F) (Kaynak: Orjinal)

4.5 Aday Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri

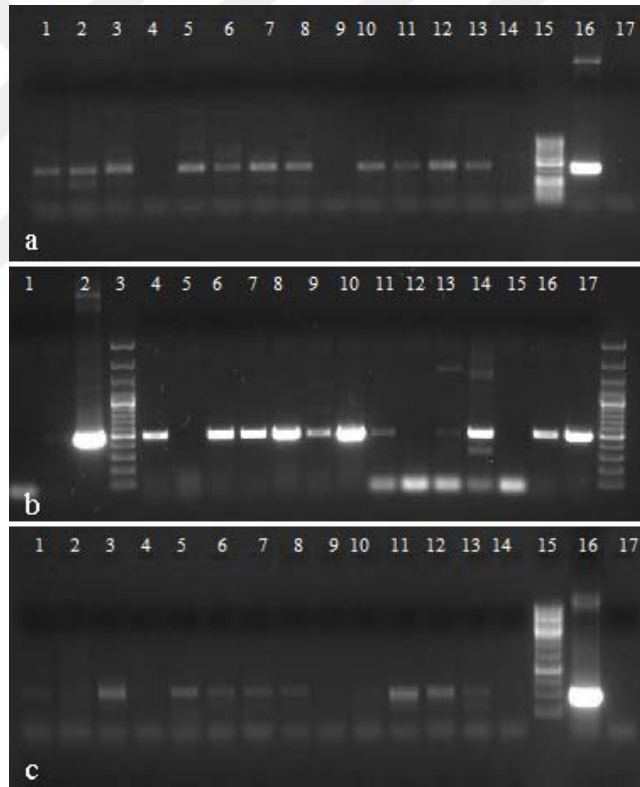
4.5.1 Genomik DNA izolasyonu, PCR ve jel görüntüleme

Aday transgenik bitkilerin PCR ile taranmasında bitkilerin genomik DNA' ları izole edilip nanodrop ile kalite ve konsantrasyonları ölçülüp PCR' da kullanılmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.24 Aday transgenik bitkilerin DNA' ları izole edilip nanodrop ile incelenmiştir

GNA, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS* genlerinin PCR bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için gradient PCR kurulup sırasıyla 59, 61 ve 50 °C en uygun bağlanma sıcaklığı seçilmiştir. Aday transgenik pamuk bitkilerinde *CP4-EPSPS* (Şekil 4.26.a), *GNA* (Şekil 4.26.b) ve *CryIAc* (Şekil 4.26.c) genleri spesifik primerleri ile taranmıştır. Pozitif kontrol için hazırlanmış pGTGNAoCR1AC plazmidi ve negatif kontrol için ise transgenik olmayan bitki kullanılmıştır. Dış koşullarına alıştırılmış 31 bitkiden 20 bitkinin PCR sonuçları pozitif olmuştur (Çizelge 4.3); dolayısıyla PCR analizlerine göre gen aktarım oranı % 0.5 belirlenmiştir (*A. tumefaciens* ile inoküle edilmiş toplam 4000 embriyonun 20 tanesinin PCR sonucu pozitif olarak belirlenmiştir). Ancak pozitif PCR sonuçlarını incelediğimizde bitkilerin sadece yarısı her üç geni taşımaktadır ve bu oran ise inoküle edilmiş embriyoların % 0.25' ini kapsamaktadır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.25 PCR ile taranmış aday transgenik pamuk bitkileri (T₀ nesli):

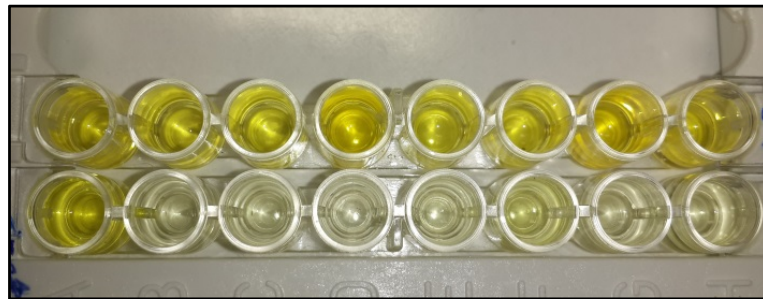
- a. 1-14 kuyularındaki örnekler: N, Y, J, C, H, 33, P, 39, B, 5, 6, 8, A, F; 16. Kuyu pozitif örnek ve 17. Kuyu negatif (marker: Thermo Scientific GeneRuler 50bp DNA Ladder)
- b. 4-17 kuyularındaki örnekler: 39, 35, P, H, N, 8, A, 7, 2, Y, 33, H, J, 6; 1. Kuyu pozitif kontrol ve 2. Kuyu negatif kontrol (marker: Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder)
- c. 1-14 kuyularındaki örnekler: N, F, 39, C, J, H, P, 8, 35, 1, 8, A, 6, 2; 16. Kuyu pozitif örnek ve 17. Kuyu negatif (marker: Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder)

Çizelge 4.4 PCR sonuçları pozitif olan transgenik pamuk bitkileri

Plazmit	Bitki Kodu	Aktarılmış Gen		
		<i>GNA</i>	<i>CryIAc</i>	<i>CP4-EPSPS</i>
pGTGNAoC1AC	1	+	-	+
	2	-	-	+
	3	+	+	+
	C	+	-	-
	E	+	-	+
	N	+	+	+
	Y	+	+	+
	J	+	+	+
	H	-	+	+
	33	-	+	+
	35	-	-	+
	P	+	+	+
	39	+	+	+
	pGTGN35C1AC	5	+	+
6		+	+	+
7		+	+	+
8		+	+	+
A		+	+	+
B		-	+	-
F		+	-	-

4.5.2 ELISA

PCR sonucu pozitif olan pamuk bitkilerin bazılarında (sonuçları her üç gen için pozitif olan bitkiler) *CryIAc* protein ifade seviyesi ve protein birikimini incelemek amacıyla ELISA testi yapılmıştır. Hazırlanmış ELISA plakasındaki (Şekil 4.27) örneklerin OD değerleri ELISA READER cihazında 430 nm' de okutulup sonuçlar incelenmiştir (Çizelge 4.4).

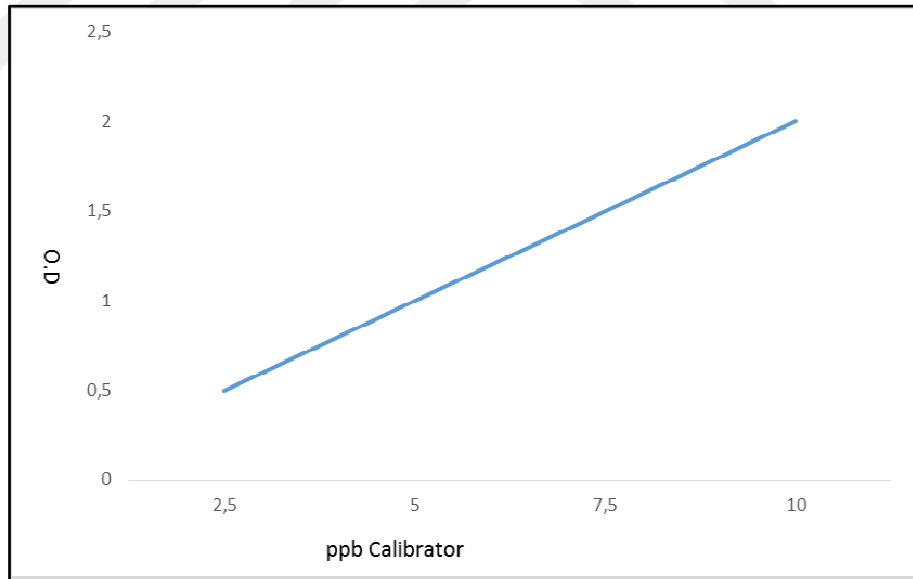


Şekil 4-26 ELISA plakasında hazırlanmış örneklerin OD değerleri ELISA READER cihazında okutulmuştur (Kaynak: Orjinal)

Çizelge 4.5 ELISA READER cihazında okutulmuş *CryIAc* OD değerleri

Bitki kodu	OD değerleri		
	0S	12S	24S
J	0.176	0.185	0.225
P	0.3	0.25	0.26
39	0.4	0.345	0.365
H	0.235	0.18	0.19
6	0.175	0.19	0.2
8	0.14	0.175	0.225
A	0.185	0.225	0.2

Elde edilmiş OD değerleri ve *CryIAc* protein kalibrasyon grafiğini (Şekil 4.28) kullanarak yaprak dokusundaki *CryIAc* protein birikimi ölçülmüştür. OD değerlerini “mikrogram protein /gram bitki yaprağı” verilerine çevirmek için aşağıda belirtildiği gibi muhasebe yapılmıştır.



Şekil 4.27 OD'ye göre çizilmiş *CryIAc* proteinin kalibrasyon grafiği (Kaynak: Anonim)

Yapılmış ELISA denemesinde 50 mg bitki dokusu sıvı azotta ezilip 400 µl izolasyon tamponunda *CryIac* proteini ekstrakte edilmiştir:

$$\text{Dilution factor} = \frac{\mu\text{l of extraction buffer}}{\text{mg of leaf tissue}}$$

$$\text{DF} = \frac{400\mu\text{l}}{50\text{mg}} = 8$$

Hazırlanmış protein solüsyonundan 20 µl alınıp ve 80 µl izolasyon tamponunda sulandırılmıştır:

$$\text{DSB} = \frac{100\mu\text{l}}{20\mu\text{l}} = 5$$

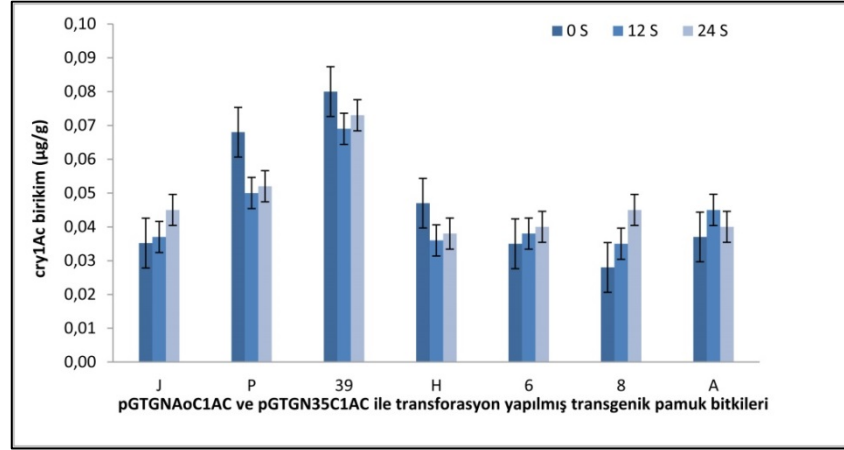
$$\text{DSB (dilution sample extracted)} = \frac{\text{total volume of diluted protein } (\mu\text{l})}{\mu\text{l of extraction buffer including tissue before dilution}}$$

$$\mu\text{g/g of tissue} = \frac{\text{PPB (part per bilion, ng)} \times \text{dilution factor} \times \text{DSB (dilution sample extracted)}}{1000}$$

Sonuçlara göre pGTGN35C1AC ve pGTGNAoC1AC ile muamele edilmiş bitkilerde yaralama sonrası üç farklı zamanda protein ifade oranı değişmektedir (Çizelge 4.5). Sonuçlara göre pGTGN35C1AC ile muamele edilmiş bitkilerde en fazla ifade 8 kodlu bitkide 24 saat ve A kodlu bitkide 12 saat yaralamadan sonra 0.045 µg/g kaydedilmiştir. pGTGNAoC1AC ile muamele edilmiş bitkilerde ise 39 kodlu bitkide hemen yaralama sonrası (0 saat) protein oranı en fazla kaydedilmiştir (0.080 µg/g) (Şekil 4.29).

Çizelge 4-6 ELISA denemesinde elde edilmiş *CryIac* protein birikim miktarı (µg/g)

		Yaralama sonrası örnek alma zamanı		
		0 saat	12 saat	24 saat
Bitki kodu	J	0.035	0.037	0.045
	P	0.068	0.050	0.052
	39	0.080	0.069	0.073
	H	0.047	0.036	0.038
	6	0.035	0.038	0.040
	8	0.028	0.035	0.045
	A	0.037	0.045	0.040



Şekil 4.228 ELISA denemesinde elde edilmiş *CryIAC* protein birikim miktarı (µg/g)

4.5.3 RNA izolasyonu, cDNA sentezleme ve RT-PCR

Pamuk yapraklarından total RNA izole edilmiştir. Bu moleküllerin konsantrasyon ve kalitelerinin incelemesinde “NanoDrop 1000 Spectrophotometer” cihazı kullanılmıştır (Çizelge 4.6). İzole edilmiş RNA, cDNA sentezinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.7 İzole edilmiş total RNA’ ların konsantrasyonları

Bitki kodu	RNA konsantrasyonu (ng/µl)
6	360.7
8	554.7
39	406.0
J	244.5

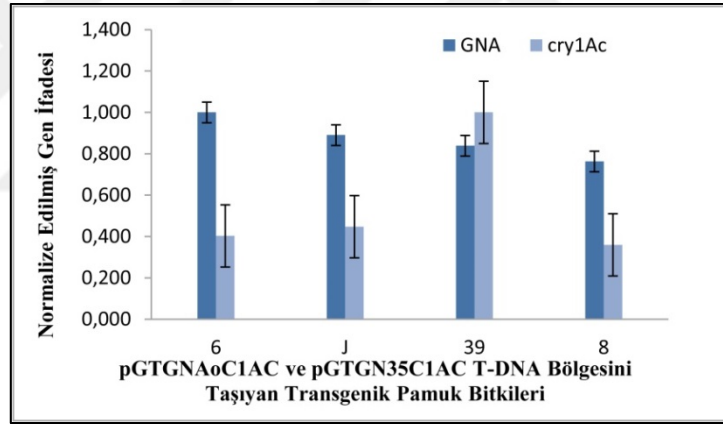
Primerlerin bağlanma sıcaklığını bulmak için gradian PCR kurulmuştur. Bu denemeni sonucuna göre uygun bağlanma sıcaklığı *GNA* ve *CryIAC* genleri için 55 ve 59 °C belirlenmiştir. Ubiquitin geni için ise en uygun sıcaklık 57 °C belirlenmiştir ancak *GNA* ve *CryIAC* genlerinin incelemesinde aynı reaksiyonda kullanılabilmek nedeniyle sırasıyla 55 ve 59 derece uygulanmıştır.

GNA ve *CryIAC* genlerinin RT-PCR ham verileri alınıp mRNA üretim miktarının incelenmesi amacıyla normalize edilmiştir (Çizelge 4.7). Elde edilmiş sonuçlara göre

GNA ifade düzeyi 6 kodlu pamuk bitkisinde J, 39 ve 8 kodlu bitkilerden sırasıyla 1.12, 1.19 ve 1.31 kat daha yüksektir. *CryIAc* ifadesi ise en fazla 39 kodlu bitkide belirlenmiştir. Bu miktar J, 6 ve 8 kodlu bitkilerin sırasıyla 2.24, 2.48 ve 2.78 katı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.30).

Çizelge 4.8 Normalize edilmiş RT-PCR sonuçları

		Normalize edilmiş mRNA miktarları	
		<i>GNA</i>	<i>CryIAc</i>
Bitki kodu	6	1.000	0.403
	J	0.890	0.447
	39	0.839	1.000
	8	0.763	0.359



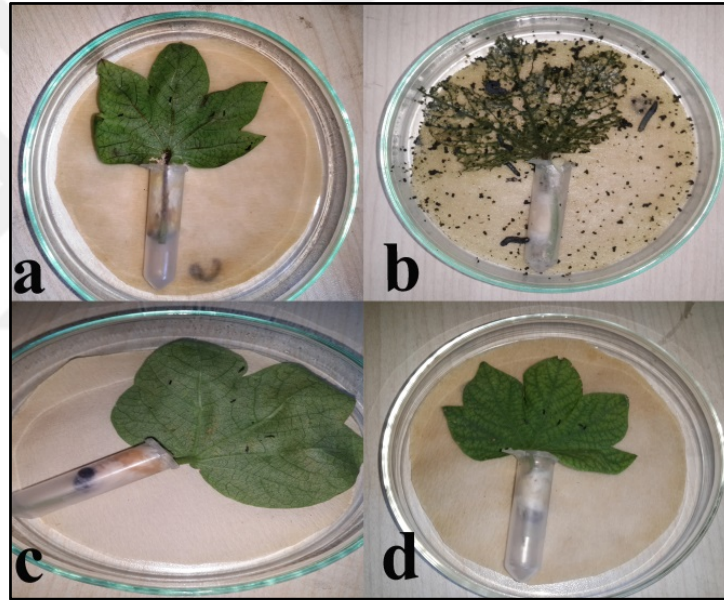
Şekil 4.29 Normalize edilmiş RT-PCR sonuçlarının incelenmesi

4.6 Böcek Denemesi

4.6.1 *Spodoptera littoralis*

Yapraklar üzerinde bırakılmış *Spodoptera littoralis* böcekleri *CryIAc* protein ifadesinden etkilenmiştir. Denemenin başlangıcından 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra ölmüş böceklerin yüzdesi hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Deneme sonuçlarına göre

144 saat sonra kontrol bitkiler üzerindeki böceklerin hepsi canlı iken 39, 6 ve 8 kodlu bitkilerde en iyi sonuç en yüksek ölüm yüzdesi elde edilmiştir (Şekil 4.31). pGTGNAoC1AC ile muamele edilmiş bitkiler arasında 39 kodlu bitkide % 100 ölüm gözlenmiştir; bu oran pGTGN35C1AC ile muamele edilmiş bitkilerde ise 6 kodlu bitkide % 100 ve 8 kodlu bitkide % 90 gözlemlenmiştir. 39, 6 ve 8 kodlu bitkilerde ilk 12 saatte sırasıyla yüzde 20, 20 ve 10 ölüm görünmüştür. Denemedeki diğer bitkilerin sonucuna göre ölüm yüzde oranı yüksek olmamıştır. J, H, P kodlu bitkilerde 144 saat sonra ölüm yüzdesi sırasıyla 10, 30 ve 20 gözlenmiştir. Elde edilmiş sonuçlara göre 39 ve 6 kodlu bitkilerde % 100 ölüme göre *CryIAc* gen ifadesi ve en etkili olduğu belirlenmiştir.



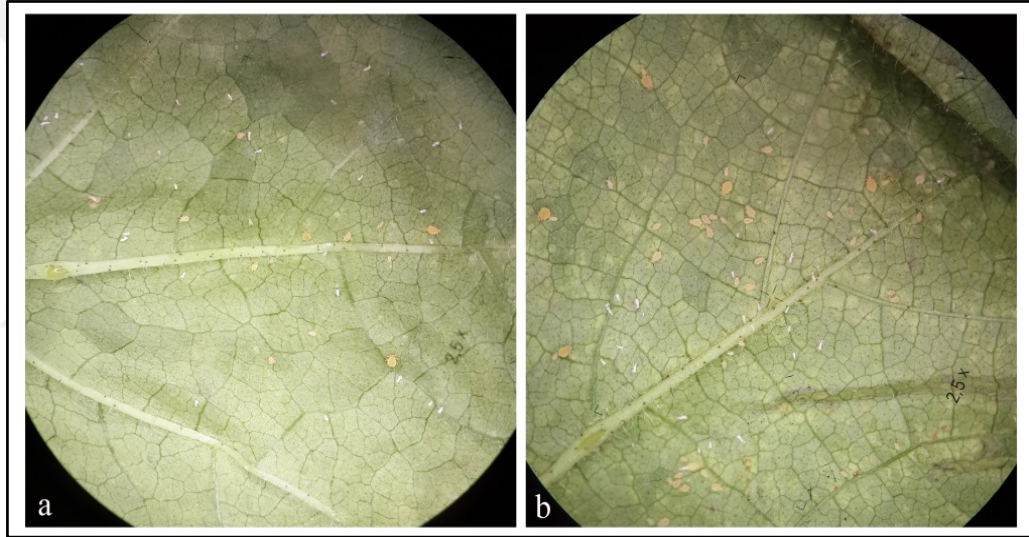
Şekil 4.30 T₀ transgenik pamuk bitkilerinde *Spodoptera littoralis* böcek denemesi (a: 39, b: kontrol bitki, c: 6 ve d: 8 kodlu bitkiler) (Kaynak: Orjinal)

Çizelge 4.9 T₀ transgenik pamuk yaprakları üzerinde beslenmiş *S. littoralis* larvalarının ölüm yüzdesi

Bitki kodu	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat	144 saat
Negatif kontrol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
39	20±14.14	20±14.14	30 ± 7.07	60 ± 28.28	80 ± 14.14	90 ± 7.07	100 ± 0.00
J	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	10 ± 7.07	10 ± 7.07	10 ± 7.07	10 ± 7.07
H	0.00 ± 0.00	10 ± 7.07	10 ± 7.07	20 ± 0.00	30 ± 7.07	30 ± 7.07	30 ± 7.07
6	20 ± 0.00	50 ± 7.07	90 ± 7.07	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
8	10 ± 7.07	10 ± 7.07	10 ± 7.07	50 ± 21.21	80 ± 14.14	90 ± 7.07	90 ± 7.07
P	0.00 ± 0.00	10 ± 7.07	20 ± 14.14	20 ± 14.14	20 ± 14.14	20 ± 14.14	20 ± 14.14

4.6.2 *Aphis gossypii* Glover

Pamuk yaprak bitleri deneme sürecinde üremeye devam etmiştir ancak *GNA* gen ifadesinden dolayı böcek üremesi olumsuz yönde etkilenmiştir. Böceklerde arasında ölüm gözlenmemiştir ancak 10 gün sürecinde üremede kontrol bitki ile kıyaslandığında % 46.62 - 66.29 düşüş gerçekleşmiştir (Şekil 4.32). pGTGNAoC1AC ile muamele edilmiş bitkiler arasında 39 ve J kodlu bitkilerde böcek üremesi yüzde 45.5 ve 32.5; pGTGN35C1AC ile muamele edilmiş bitkiler arasında ise 6 ve 8 kodlu bitkilerde yüzde 30 ve 47.5 üreme gözlenmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.31 T₀ transgenik pamuk bitkilerinde *Aphis gossypii* Glover böcek denemesi (a: 6, b: kontrol bitki) (Kaynak: Orjinal)

Çizelge 4.10 T₀ transgenik pamuk bitkilerinin *Aphis gossypii* Glover böcek denemesindeki ölüm yüzdesi

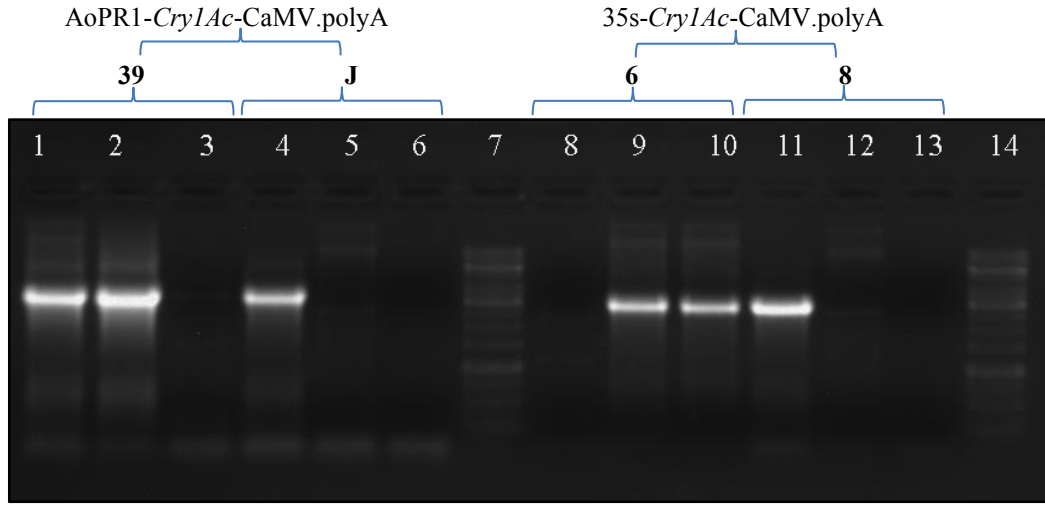
	Bitki kodu				
	Kontrol negatif bitki	39	J	6	8
Böcek üreme sayısı	89 ± 4.24	45.5 ± 2.47	32.5 ± 1.76	30 ± 1.41	47.5 ± 1.76
<i>GNA</i> geninin bit üremesinde önleyici etki yüzdesi	00.00	% 48.87	% 63.48	% 66.29	% 46.62

4.7 T₁ Nesli Bitkilerin Analizi

Seçilmiş dört transgenik pamuk tohumları (39, J, 6 ve 8) 17.5 mg/L PMG içeren MS₀ ortamlarında çimlendirilmiştir (Şekil 4.33). Bu bitkilerin tohumları on ikişer tane ekilmiş sırasıyla 5, 8, 11 ve 4 tohum çimlenmiştir. Çimlenmiş tohumlardan gelişmiş sağlam fideler (üçer tane) seçilip yaprakları PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. PCR sonuçlarına göre AoPR1-*CryI*Ac-CaMV.polyA ve 35s-*CryI*Ac-CaMV.polyA tam kasetlerinin bitkilerde varlığı teyit edilmiştir (Şekil 4.34; çizelge 4.10).



Şekil 4.32 T₁ tohumları 17.5 mg/L PMG' lı ortamda çimlendirilmiştir. A: J, B: 39, C: 6, D: 8 bitkileri (Kaynak: Orjinal)



Şekil 4.33 T₁ bitkilerinde aktarılmış AoPR1-*CryIAc*-CaMV.polyA ve 35s-*CryIAc*-CaMV.polyA kasetleri PCR ile doğrulanmıştır; 1, 2 ve 3: 39 kodlu bitki; 4, 5 ve 6: J kodlu bitki; 7 ve 14 1 kb DNA ladder; 8, 9 ve 10: 6 kodlu bitki; 11, 12 ve 13: 8 kodlu bitki

Çizelge 4.11 T1 bitkilerinin seleksiyon ortamlarında çimlenme sayısı ve PCR sonuçları

Bitki kodu	Toplam tohum sayısı	Seleksiyon ortamlarında çimlenmiş tohumların sayısı	Gelişmiş sağlam fide sayısı	PCR' ı yapılmış toplam bitki sayısı	PCR sonucu pozitif bitki sayısı
39	12	5	3	3	2
J	12	8	3	3	1
6	12	11	3	3	2
8	12	4	3	3	1

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye dünya pamuk üretiminde 577,000 ton ile 2015-2016 yıllarında, Hindistan, Çin, ABD, Pakistan, Brezilya ve Özbekistan' dan sonra yedinci en büyük pamuk üreticisi olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2017).

Lif bitkisi olan pamuk dünya tekstil sanayinde büyük öneme sahiptir. Bu bitkinin üretim verimliliği farklı zararlılar tarafından olumsuz olarak etkilenmektedir. Böcek zararlıları bitkinin dokularını çiğneyerek veya bitki özsuğunu emerek bitkiye zarar verip verimin düşümüne neden olmaktadır. Pamuk bitkisindeki bu hasar % 29' a ulaşmıştır (Oerke 2006). Sentetik insektisitlerin kullanımı çevreye zarar verip insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkiler bırakmaktadır (Curry 2002; Bakhsh vd. 2009). Dünya genelinde işçilerin % 1 - 3' ü pestisit kullanımından zarar görmektedirler(EJF 2007). Dolayısıyla, pestisitlerin zararlı etkilerini azaltmak amacıyla genetiği değiştirilmiş böceklere dayanıklı bitkiler, gen transformasyon yöntemleri ile üretilmektedir.

Bu tez çalışmasında, pamuk özsuğunu emen *A. gossypii* gibi ve yaprak dokularını çiğneyerek zarar veren *S. littoralis* gibi böceklere karşı direnç sağlanması amacıyla Bt ve lektin genleri pamuk GSN-12 çeşidine aktarılmıştır. Bu çalışmada, bir ilk olarak *GNA*, *CryIAC* ve *CP4-EPSPS* genleri birlikte tek vektör aracılığıyla pamuk bitkisine aktarılmıştır. Ayrıca gereksiz *Cry* proteinin üretimini engellemek amacıyla *CryIAC* geni yaralanmaya hassas olan AoPR1 promotörünün yanında klonlanmıştır.

5.1 Genler ve Böcekler Üzerindeki Ölümcül Etkileri

Yapılmış pamuk gen aktarım çalışmalarında çeşitli genler farklı promotörlerin kontrolü altında bitkilerde ifade edilmiştir. CaMV 35S bir konstitütif promotör olduğundan dolayı bitkinin tüm dokularında güçlü bir şekilde genlerin ifadelerini sağlar; Perlak vd. (1990), McCabe ve Martinell (1993), Thomas vd. (1995), Majeed vd. (2000), Singh vd. (2004), Leelavathi vd. (2004), Wu vd. (2005), Wu vd. (2006), Katageri vd. (2007), Rashid vd. (2008), Wu vd. (2008), Tohidfar vd. (2008), Dunse vd. (2010)

çalışmalarında CaMV 35S promotörünü kullanmışlar. Guo vd. (2007) çalışmalarında *Cry* genlerinin ifadesi için mısırın Ubi1 promotörü kullanılmıştır. Yapılmış tez çalışmasında *CryIAc* geninin ifadesi, AoPR1 promotörünü kullanarak sadece böceklerin ısırıkları bölgelere sınırlanmıştır. Böylece gereksiz *CryIAc* proteinin oluşumu kısıtlanmıştır. AoPR1 kontrolü altında *Cry* proteininin ifadesi biyogüvenlik açısından var olan endişeleri azaltarak transgenik bitkilerin üretiminde önemli adım olarak tanımlanmaktadır. Benzer şekilde Anayol vd. (2016) çalışmalarında, AoPR1 promotörü *CryIAc* ifadesinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır; ancak bizim çalışmamızda *GNA* geni de *CryIAc* geni ile birlikte bitkiye aktarılmıştır.

Liu vd. (2013) çalışmalarında *CryIAc* ve *GNA* genleri pamuk bitkisine aktarılmıştır; ancak bu iki gen farklı promotörler kontrolü altında ifade edilmiştir. *CryIAc* ifadesi için CLCu virüsünün replikasyon proteinin promotörü ve *GNA* için ise Mas-uas (mannopine synthase upstream activating sequence) promotörü kullanılmıştır.

Aktarılan *Cry* genleri ve promotör türüne göre ifade seviyeleri böcekler üzerine farklı ölümcül etkiler bırakmaktadır. CaMV35S-*CryIAb* pamuk yaprakları üzerinde beslenen *Helicoverpa armigera* larvalarında % 44 - 89 ölüm gözlenmiştir; bu oran, CaMV35S-*CryIIa5*, CaMV35S- *CryIAc* ve CaMV35S-*CryIAc/Cry2A* genleri ile transform edilmiş pamuk bitkileri üzerinde beslenen *H. armigera* larvalarında, sırasıyla % 83, % 95.8 - 100, % 75 - 100 bildirilmiştir (Leelavathi vd. 2004; Wu vd. 2005; Rashid vd. 2008). Singh vd. (2004) çalışmasında ise CaMV35S-*CryIEC* ile transform edilmiş pamuk bitkilerinde, *S. litura* larvalarının % 100' ü ölmüştür (Singh vd. 2004).

CaMV35S-*ACA* ile transform edilmiş pamuk bitkileri üzerinde beslenen *Aphis gossypii* Glover nimfalarının üremesinde % 64.5 düşüş gözlenmiştir (Wu vd. 2006).

Liu vd. (2013) çalışma sonuçlarına göre MasUas-*GNA* ile transform edilmiş pamuk yaprakları üzerine beslenen *Aphis gossypii* Glover böceklerinin üremelerini önemli derecede engellemiştir.

5.2 *trGNA* Geninin Karakterizasyonu

Bu çalışmada plazmid vektör hazırlanmasında *GNA*, *CryIAC* ve *CP4-EPSPS* genleri farklı kaynaklardan izole edilip ve ifade vektöründe alt-klon yapılmıştır. *GNA* lektin geni kış mevsiminde doğal olarak yetişen kardelen (*G. nivalis*) bitkisinden izole edilmiştir. İzole edilmiş gen dizisinin benzerlik oranını veri tabanlarında bulunan *GNA* diziler ile kıyaslamak amacıyla tüm *GNA* dizileri toplanıp izole edilmiş *trGNA* ile BLAST ve alt dizileme analizleri yapılmıştır. Elde edilmiş nükleotid BLAST sonuçlarına göre izole edilmiş *GNA* geni ile önceden rapor edilmiş *GNA* dizileri arasında % 89 - 97 dizi benzerliği bulunmuştur. *GNA* protein BLAST sonucuna göre *GNA* protein dizisi ve önceden bulunan diziler arasında % 84 - 96 protein dizi benzerliği belirlenmiştir. En fazla nükleotid benzerliği NCBI veri tabanında bulunan M55556.1 erişim nolu ve en az benzerlik ise de M55557.1 erişim nolu dizi ile belirlenmiştir. Protein dizisinin 5' ucunda sinyal peptidin varlığı incelemelere göre doğrulanmıştır. Bu sinyal peptid 23 amino asitten oluşup protein ifadesinde role sahiptir. *trGNA* sinyal peptid dizisi ve uzunluğu önceden bulunan *GNA* dizilerinin sinyal peptidleri ile aynı olması doğrulanmıştır (Van Damme vd. 1987).

Mannoz karbonhidratına özel bağlanan bir lektin olarak, *trGNA* amino asit dizisi üzerinde üç Q*D*N*V*Y motifin bulunması doğrulanmıştır. Bu motifin dizi ve işlevi ilk olarak Van Damme vd. (1987) tarafından sunulmuştur.

5.3 Agglutinin Lektin Genlerinin Böcekler Üzerindeki Etkileri

Daha önce yapılmış çalışmalarda böceklere karşı direnç kazandırma amacıyla farklı toksin genleri pamuk bitkisine aktarılmıştır. Farklı kaynaklardan izole edilmiş lektin genleri emici-sokucu böceklere karşı direnç kazandırmak amacıyla pamuk bitkisine aktarılmıştır. *GNA*, *ACA* ve *ASAL* genleri sırasıyla kardelen, soğan ve sarımsak bitkilerinden izole edilip kullanılmıştır (Liu vd. 2013; Wu vd. 2006; Vajhala vd. 2013). Pamuk bitkisine aktarılmış lektin genleri farklı promotörlerin yanında klonlanmıştır; Liu vd. (2013) *GNA* genini mannopin sintaz konstitütif promotörü yanında klonlamıştır.

Vajhala vd. (2013) *ASAL* genini CaMV 35S konstitütif promotörü kontrollüğünde ifadesini sağlamıştır. Diğer bir çalışmada *ACA* geni floeme özel promotör, CoYMV (Commelina Yellow Mottle Virus) yanında klonlanmış ifade edilmiştir (Wu vd. 2006). Yapılmış çalışmada *GNA* lektin geni CaMV 35S promotörü yanında klonlanmıştır. Bu tez çalışmasında promotörün seçilmesinde güçlü sürücü olmak kriteri dikkate alınmıştır.

GNA lektin geni yaprak bitleri üzerine ölümcül etki bırakmamasına rağmen böceklerin büyüme, gelişme ve üremesinde önemli engelleyici etki bırakmaktadır (Liu vd. 2013). Sarımsaktan izole edilen lektin geni, beyazsinek ve jasitlerin canlılık, gelişme ve üremeleri üzerine olumsuz etkide bulunduğu belirtilmiştir (Vajhala vd. 2013). Wu vd. (2006) *ACA* toksin proteinin pamuk yaprak bitlerinin popülasyonlarının gelişmesi üzerine % 25.3 - 64.5 engelleyici etkiye neden olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara göre *GNA* lektin geninin pamuk yaprak bitinin (*A. gossypii*) üremesi üzerine % 46.62 - 66.29 engelleyici etkisi olması belirlenmiştir. Elde edilmiş sonuçlara göre böceklerde ölüm gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, Liu vd. (2013) yayınladığı sonuçlarla benzer olmaktadır ancak onların raporlarında veriler getirilmemiştir.

Agglutinin lektin genleri çeltik, Hint hardalı, patates, nohut ve mısır bitkilerine aktarılıp etkileri farklı böcekler üzerinde incelenmiştir.

Nilaparvata lugens böceğine karşı direnç sağlamak amacıyla, *GNA* geni çeltik bitkisine aktarılmıştır. Bu gen RSs1 promotörü yanında klonlanmış floem dokularında ifadesi gerçekleştirilmiştir (Rao vd. 1998). Çalışma sonuçlarına göre çeltik bitkisi *N. lugens* böceğine karşı direnç kazanıp aynı zamanda bitki virüs zararlı hastalıkları oluşumunda da düşüş görülmüştür. Bir diğer çalışmada *N. Lugens* ve *Scirpophaga incertulas* zararlılarına karşı direnç kazandırmak amacıyla *GNA* geni *Cry2A* ve *CryIAc* genleri ile birlikte çeltik bitkisine aktarılmıştır. Bu genler ayrı ayrı ve üçü birlikte bitkiye aktarılmıştır. Genlerin üçünün birlikte bitkiye aktarılması emici-sokucu ve yaprağı çiğneyen böceklere karşı direnç kazandırması gözlenmiştir (Maqbool vd. 2001).

Tek çenekli bitkilerde gen aktarımında gen bombardıman yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem ile gen aktarım sonucunda çoklu transgenin genoma yerleştiğinden dolayı kosüpresiyon ve gen susması ortaya çıkmaktadır (Shou vd. 2004). Tek çenekli olmasına rağmen, çeltik gen aktarımında Nagadhara vd. (2003) çalışmasında *A. tumefaciens* kullanılmıştır. Bu yöntem ile gen aktarımında az gen kopyası genomda yerleşmektedir (Dai vd. 2001).

Nagadhara vd. (2004) *GNA* genini *A. tumefaciens* aracılığıyla çeltik bitkisine aktarmıştır. Transgenik çeltik bitkileri *Sogatella furcifera* böceklerine karşı yüksek direnç kazanmıştır.

Sarımsak bitkisinden izole edilmiş lektin geninin (*ASAL*) pirince aktarılması *N. lugens* ve *Nephotettix* spp. böceklerinin ölüm yüzdelerinin artışına neden olmuştur. Ölüm yüzdesi *GNA* ile kıyaslandığında yüzde on daha fazla olduğu belirlenmiştir (Saha vd., 2006; Yarasi vd., 2008; Chandrasekhar vd., 2014).

Bir diğer çalışmada, buğday tohum agglutinin (*WGA*) lektin geni Hint hardalına (*Brassica juncea*) aktarılmıştır. *A. tumefaciens* aracılığıyla aktarılmış *WGA* geni 35S CaMV promotörü kontrolü altında ifade edilmiştir. Transgenik bitkiler *Lipaphis erysimi* böceklerine karşı dayanıklı oldukları belirlenmiştir (Kanrar vd. 2002).

ASAL, *GNA* ve *ACA* (*Allium cepa* L. agglutinin) lektin genlerinin böceklere karşı etkilerini incelemek amacıyla bu üç gen ayrı kasetler şeklinde hardal bitkisine aktarılmıştır. Elde edilmiş sonuçlara göre *ACA* lektin geninin hardal bitlerine karşı daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir (Hossain vd. 2006).

Canavalia ensiformis bitkisinden izole edilmiş *ConA* Gatehouse vd. (1999) tarafından patates bitkisine aktarılmıştır. Bu gen 35S CaMV promotör kontrolü altında ifade edilmiştir. Böcek denemeleri sonuçlarına göre *Myzus persicae* böceklerinin üremesinde % 45 düşüş görülmüştür.

Transgenik buğday bitkilerinde ifade olmuş *GNA* lektin geni *Sitobion avenae* böcekleri üzerine ölümcül etkisi olmamasına rağmen böceklerin üremelerinde negatif etki bırakmıştır. *GNA* geni Ubiquitin ve RSs1 promotörlerinin yanında klonlanıp buğdaya aktarılmıştır. Toplam üretilmiş proteinin % 0.04' ünü agglutinin lektin oluşturmuştur (Stoger vd. 1999).

Bir diğer çalışmada *GNA* geni RSs1 promotörü yanında klonlanmış mısır bitkisine aktarılmıştır. Gen transformasyonunda *A. tumefaciens* yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlara göre toplam üretilmiş çözümlenebilir proteinin % 0.13 – 0.28' ni agglutinin lektin oluşturmuştur. Böcek denemesi sonuçlarına göre *Rhopalosiphum maidis* nimfa üretimi transgenik bitkilerde % 46.9 düşüş göstermiştir (Wang vd. 2005).

Nohut bitkisi, *Aphis craccivora* böceğine karşı dayanıklılık kazanması amacıyla rolC-*ASAL* ve 35S CaMV- *ASAL* genleri bitkiye aktarılmıştır. Transgenik bitkilerde *ASAL* agglutinin proteinin üretimi toplam çözümlenebilir proteinlerin % 0.08 - 0.38' ni oluşturmuştur. Böcek denemesi sonuçlarına göre, transgenik bitkiler % 11 - 26 ve % 22 - 42 sırasıyla böceklerin canlılığını ve üremelerini olumsuz etkilemiştir (Chakraborti vd. 2009).

5.4 Bt Genleri ve Etkileri

Bitki dokularını çiğneyerek hasara neden olan böceklerle mücadelede *Cry* genleri bitkilere aktarılmıştır. *CryAc*, *CryIAb*, *CryIAb*, *CryIIa5*, *CryIC*, *Cry2A*, *Cry9C*, *CryIAc* ve *CryIEc* genleri lepidoptera böceklerine karşı direnç kazandırmak amacıyla pamuk bitkisine aktarılmıştır (Perlak vd. 1990, McCabe ve Martinell, 1993, Majeed vd. 2000, Singh vd. 2004, Leelavathi vd. 2004, Wu vd. 2005, Guo vd. 2007, Katageri vd. 2007, Rashid vd. 2008, Tohidfar vd. 2008, Kumar vd. 2009, Khan vd. 2011, Bakhsh vd. 2012, Bakhsh vd. 2016, Anayol vd. 2016). Aktarılmış genler *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* ve *Heliothis armigera* böcek zararlılarının gelişmesini engelleyerek yüksek yüzdelerde ölüme neden olmuştur.

Yapılmış çalışmamızda, *CryIAc* geninin toksik etkisini incelemek için *Spodoptera littoralis* böceklerinin iki ve üçüncü dönemlerindeki larvaları böcek denemesinde kullanılmıştır. Böcek ölüm yüzdesi % 10 - 100 arasında gözlenmiştir. *CryIAc* geni ciddi bir şekilde böceklerin gelişmesini yavaşlatıp ve bazı bitkilerde onların ölümlerine neden olmuştur.

5.5 Gen Aktarımı ve Ferekansı

Pamuk gen aktarım çalışmalarında bitkinin çift çenekli olduğundan dolayı *A. tumefaciens* yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen (Perlak vd. 1990, Singh vd. 2004, Wu vd. 2005, Katageri vd. 2007, Kumar vd. 2009, Anayol vd. 2016) gen bombardımanı yöntemi de gen aktarımında kullanılmıştır (Majeed vd. 2000; Khan vd. 2011; McCabe ve Martinell, 1993). Gen aktarım çalışmalarında farklı eksplantlar kullanılmıştır; Hipokotil (GUO vd. 2007), embriyo (Rashid vd. 2008), sürgün ucu meristem (Nandeshwar vd. 2009), kotiledon (Rawat vd. 2011), polen (Liu vd. 2013). Bitki rejenerasyonu direkt ve indirekt olarak gerçekleştirilmiştir.

Pamuk bitkisinin *in vitro* koşullarındaki rejenerasyonu laboratuvarımızda optimize edilmiştir (Anayol vd. 2016). Olgun embriyolar gen aktarım denemesinde kullanılmıştır. Bitki rejenerasyonu direkt rejenerasyon yolu ile yapılmıştır. Gen aktarımında *A. tumefaciens* aracılığıyla transformasyon yapılmıştır.

A. tumefaciens farklı hatları gen aktarım çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu hatların gen aktarım kabiliyetleri farklı olmaktadır. Bakhsh vd. (2014) çalışma sonuçlarına göre en iyi gen aktarım kabiliyeti sırasıyla LBA4404, EHA105, GV2260, C58C1 ve AGL1 bakteri hatlarında belirlenmiştir.

Yapılmış tez çalışmasında LBA4404 hattı laboratuvarımızda mevcut olmadığından dolayı EH105 hattı kullanılmıştır. Bakteri ile muamele edilmiş yaklaşık 4000 olgun embriyodan sadece 45 tanesi PMG seleksiyon ortamında rejenere olmuştur (% 1.125); ancak dış koşullarına adapte edilmiş 31 bitkinin *GNA*, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS*

sonuçlarına göre gen aktarım yüzdesi 0.5 belirlenmiştir. Anayol vd. çalışma sonuçlarına göre pamuk bitki çeşitleri arasında gen transformasyon oranı değişmektedir; Ozbek-100 ve STN- 486 çeşitlerinde gen aktarımı frekansı çok düşük ancak GSN-12 ve Ayhan-107 çeşitlerinde sırasıyla % 0.9 ve % 0.7 belirlenmiştir.

Anayol vd. (2016) *CryIAc* genini AoPR1 promotörü kontrolü altında pamuk bitkisine aktarmıştır. Çalışma sonuçlarına göre *CryIAc* geninin toksik etkisinden dolayı, GSN-12 transgenik bitkiler üzerinde beslenen *S. exigua* larvalarda % 73 - 97 ölüm gözlemlenmiştir. Yapılmış çalışmamızda, *CryIAc* geninin yanında *GNA* lektin geni de aynı T-DNA üzerinde olarak bitkiye aktarılmıştır; dolayısıyla *S. littoralis* larvasına karşı dayanıklı olmakla birlikte pamuk yaprak bitine karşı da dayanıklılığı kanıtlanmıştır. Böcek denemeleri sonuçlarına göre *S. littoralis* iki ve üçüncü larvalarına karşı % 10 - 100 ölümcül etki bırakmıştır. *A. gossypii* nimfaları üzerinde ise ölümcül etki görünmemiştir ancak bitlerin üremesi *GNA* lektin toksik etkisinden dolayı % 46 - 66 azalmıştır. *GNA* lektin geninin ölümcül etkisi olmadığı ve sadece üremeyi olumsuz etkilediği, daha önce yapılmış çalışma sonuçlarını onaylamaktadır (Stoger vd. 1999; Miao vd. 2011; Yoshimura vd. 2012; Wang vd. 2005; Liu vd. 2013).

Liu vd. (2013) çalışmasında *GNA* ve *CryIAc* genleri pamuk bitkisine aktarmıştır ancak bu genler farklı promotör yanında klonlanmıştır. *CryIAc* geni CLCu virüsünün replikasyon protein promotörü ve *GNA* geni ise Mas-uas (mannopine synthase upstream activating sequence) promotörü yanında klonlanmıştır. İn vitro seleksiyonunda kanamisin antibiyotiği kullanarak transgenik aday bitkiler seçilmiştir. Bizim çalışmamızda ise *CryIAc* geni AoPR1 promotörü ve *GNA* geni ise 35S CaMV promotörü yanında klonlanmıştır. AoPR1 promotörü sadece böcek ısırıldığı bölgelerde *CryIAc* geninin ifadesini sağlamaktadır (Özcan vd. 1993). Bu promotör kullanımı *CryIAc* proteinin gereksiz üretimini engelleyerek biyo-güvenlik açısından büyük bir önem taşımaktadır. Liu vd. (2013) çalışmasında Mas-uas promotörü kontrolü altında ifade edilmiş *GNA* lektin, *A. gossypii* böceklerinde üreme yüzdesini düşürmüştür ancak verileri yayınlanmamıştır. Bu sonuç bizim çalışmamızdaki sonuçla aynı olmaktadır; 35S CaMV promotörü kontrolü altında ifade edilmiş *GNA* geni pamuk yaprak bitlerinde üreme yüzdesini % 46 - 66 düşürmüştür.

5.6 Rejenerasyon Ortamlarında Seleksiyon

İn vitro koşullarında rejenerasyonları gerçekleştiren bitkilerin gen aktarım sonrası seleksiyonlarında farklı antibiyotik veya herbisitler kullanılmaktadır.

Pamuk gen aktarım çalışmalarında, *in vitro* rejenerasyon ortamlarda kanamisin, higromisin ve glufosinat kullanılmıştır. Transgenik fidelerde kanamisin, higromisin ve glufosinata direnç kazandırmak için sırasıyla *nptII* (Liu vd. 2013), *hptII* (Kumar vd. 2009) ve *bar* (Wu vd. 2006) genleri bitkilere aktarılmıştır. Yapılmış tez çalışmasında, bitkilerin seleksiyonunda fosfinometil glisin (PMG) kullanılmıştır. PMG' ye direnç sağlamak amacıyla bitkilere *CP4-EPSPS* geni aktarılmıştır.

Sonuç olarak:

1. *GNA* lektin geni kardelen bitkisinden başarıyla izole edilmiştir
2. Biyoinformatik incelemeleri, izole edilmiş *GNA* geninin veri tabanlarındaki dizilerle önemli derecede benzerliğini doğrulanmıştır
3. *GNA*, *CryIAc* ve *CP4-EPSPS* genleri pCAMBIA1301 vektörünün T-DNA bölgesinde başarıyla klonlanmıştır
4. Hazırlanmış T-DNA, *A. tumefaciens* aracılığıyla pamuk olgun embriyosunun apikal meristem hücrelerine aktarılıp genlerin bitkide bulunması ve çalıştığı doğrulanmıştır
5. Bitki rejenerasyonunda kullanılmış aktif kömür, fenolik bileşiklerin salgılanmasını engellemiş öte yandan karanlık ortam oluşturduğu için bitkilerin köklenmesine de ciddi destek sağlamıştır

6. Seleksiyon ortamlarında transgenik aday bitkilerin rejenerasyon oranları % 1.125 olmuştur
7. PCR sonuçlarına göre gen aktarım frekansı % 0.5 olarak belirlenmiştir
8. RT-PCR sonuçlarına göre transgenik bitkiler arasında *GNA* ve *CryIAc* genlerinin ifade seviyelerinin farklı oldukları belirlenmiştir
9. ELISA ve RT-PCR sonuçlarını incelediğimizde her iki denemede de sırasıyla 39, J, 6 ve 8 kodlu bitkilerde en çok *CryIAc* transkripsiyon ve protein birikimi gözlenmiştir
10. *CryIAc* proteinin üretimi transgenik bitkilerde ELISA yöntemi ile doğrulanmıştır
11. Transgenik bitkiler *A. gossypii* Glover böceklerinin üremesini % 46.62 - 66.29 engellediği tespit edilmiştir
12. Transgenik bitkiler üzerinde beslenen *S. littoralis* böceklerinde % 10 - 100 ölüm gözlenmiştir
13. T₀ bitki tohumlarının PMG içeren MS ortamında çimlenmesi ve PCR sonuçlarının pozitif olmasıyla genlerin genoma bağlandığı teyit edilmiştir

Bu çalışmanın devamında:

1. Southern blot denemesinin yapılması ve genlerin kopi sayılarının belirlenmesi,
2. *GNA* lektin ve *CryIAc* proteinleri için western blot analizinin yapılması ve protein incelemelerinin gerçekleştirilmesi,

3. *CP4-EPSPS* geninin transkriptom incelemesi için RT-PCR denemesinin yapılması,
4. T₂ nesli bitkiler yetiştirilip glifosat herbisitine karşı toleranslarının incelenmesi,
5. Bitkiler tarlada ekilip doğal koşullarda böceklere karşı dayanıklılıklarının incelenmesi,
6. Transgenik pamuk yaprakları üzerinde beslenen *S. littoralis* larvalarının yaprak tüketim miktarının belirlenmesi,
7. Transgenik pamuk yaprakları üzerinde beslenen *S. littoralis* larvalarının büyüme oranlarının incelenmesi,
8. Transgenik pamuk yaprakları üzerinde beslenen *S. littoralis* böceklerinin bıraktıkları yumurtaların açma oranlarının incelenmesi,
9. Transgenik pamuk yaprakları üzerinde beslenen *S. littoralis* böceklerinin üreme oranının incelenmesi,

Yeni çalışma konuları olarak önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Anayol, E., Bakhsh, A., Karakoç, Ö.C., Onarıcı, S., Köm, D., Aasim, M., Özcan, S.F., Barpete, S., Khabbazi, S.D., Önel, B., Sancak, C., Khawar, K.M., Ünlü, L., Özcan S. 2016. Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton Plant Biotechnology Reports, 10; 83-94.
- Anonymous. 2013. Web Sitesi: <http://www.usda.gov/> Erişim Tarihi: 10.06.2017
- Awan, M.F., Abbas, M.A., Muzaffar, A., Ali, A., Tabassum, B., Rao, A.Q., Ahmad Nasir, I., and Husnain, T. 2015. Transformation of Insect and Herbicide Resistance Genes in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Agricultural Science and Technology, 17: 275-285.
- Bakhsh, A., Anayol, E., Khabbazi, S.D., Karakoç, Ö.C., Sancak, C. and Özcan, S. 2016. Development of insect-resistant cotton lines with targeted expression of insecticidal gene. Archives of Biological Sciences, 68 (4); 773-80.
- Bakhsh, A., Rao, A.Q., Shahid, A.A., Husnain, T. and Riazuddin, S. 2009. Insect resistance and risk assessment studies in advance lines of Bt cotton harboring *CryIAc* and *Cry2A* genes. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 6; 1-11.
- Bakhsh, A., Siddiq, S. and Husnain, T. 2012. A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (*CryIAc*) expression in cotton. Euphytica, 183; 65-74.
- Bakhsh, A., Anayol, E. and Ozcan SF. 2014. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. Emirates Journal of Food and Agriculture, 26 (3); 259-264.
- Bakhsh, A., Khabbazi, S.D., Baloch, F.S., Demirel, U., Çalışkan, M.E., Hatipoğlu, R., Özcan, S. and Özkan, H. 2015. Insect resistant transgenic crops: retrospect and challenges. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39; 531–548.

- Bala, A., Roy, A., Das, A., Chakraborti, D. and Das, S. 2013. Development of selectable marker free, insect resistant, transgenic mustard (*Brassica juncea*) plants using Cre/lox mediated recombination. BMC Biotechnology, 13; 88.
- Bozbek, T. 2008. Web Site: <http://www.hurriyet.com.tr/pamukta-10-yillik-calismanin-urunu-gsn-12-9876237> Erişim Tarihi: 26.07.2017.
- Brill, L.M., Evans, C.J. and Hirsch, A.M. 2001. Expression of *MsLECI* and *MsLEC2*-antisense genes in alfalfa plant lines causes severe embryogenic, developmental and reproductive abnormalities. The Plant Journal, 25; 453–461.
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Sisterson, M., Antilla, L., Whitlow, M., Dennehy, T. J. and Tabashnik, B. E. 2003. Longterm regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100; 1519 - 1523.
- Chakraborti, D., Sarkar, A., Mondal, H.A. and Das S. 2009. Tissue specific expression of potent insecticidal, *Allium sativum* leaf agglutinin (*ASAL*) in important pulse crop, chickpea (*Cicer arietinum* L.) to resist the phloem feeding *Aphis craccivora*. Transgenic Research, 18; 529-544.
- Chandrasekhar, K., Vijayalakshmi, M., Vani, K., Kaul, T. and Reddy, M.K. 2014. Phloem-specific expression of the lectin gene from *Allium sativum* confers resistance to the sap-sucker *Nilaparvata lugens*. Biotechnol Letters, 36; 1059-1067.
- Chougule, N.P. and Bonning, B.C. 2012. Toxins for Transgenic Resistance to Hemipteran Pests. Toxins. 4, 405-429.
- Cristofolletti, P.T., de Sousa, F.A., Rahbe, Y. and Terra, W.R. 2006. Characterization of a membrane-bound aminopeptidase purified from *Acyrtosiphon pisum* midgut cells. A major binding site for toxic mannose lectins. FEBS Journal, 273; 5574–5588.

- Curry, D. 2002. Farming and food: a sustainable future. Report of the Policy Commission on the Future of Farming and Food. Cabinet Office, 151, London.
- Czapla, T.H. and Lang, B.A. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 83; 2480-2485.
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy, R.N. and Fauquet, C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* 7; 25–33.
- De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trend in genetics*, 17 (4); 193-199.
- De Oliveira, R.S., Oliveira-Neto, O.B., Moura, H.F.N., de Macedo, L.L.P., Arraes, F.B.M., Lucena, W.A., Lourenço-Tessutti, I.T., de Deus Barbosa, A.A., da Silva, M.C.M. and Grossi-de-Sa, M.F. 2016. Transgenic Cotton Plants Expressing *CryIIa12* Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). *Frontiers in Plant Science*, 7; 165.
- Dhaliwal, H.S., Kawai, M. and Uchimiya, H. 1998. Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology*, 15; 1-10.
- Du, J.P., Foissac, X., Carss, A., Gatehouse, A.M.R. and Gatehouse, J.A. 2000. Ferritin acts as the most abundant binding protein for snowdrop lectin in the midgut of rice brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30; 297–305.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-El-Saad, M., Xu, D. and Wu, R. 1996. Transgenic rice plants harbouring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology*, 14; 494-498.

- Dutta, I., Majumder, P., Saha, P., Ray, K. and Das, S. 2005. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (*ASAL*) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). *Plant Science*, 169; 996–1007.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N. and Manev, H. 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Molecular Psychiatry*, 6; 665–670.
- Eisemann, C.H., Donaldson, R.A., Pearson, R.D., Cadagon, L.C., Vuocolo, T. and Tellam, R.L. 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: Mechanism of action. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72; 1-11.
- EJF. 2007. *The Deadly Chemicals in Cotton*, Environmental Justice Foundation in collaboration with Pesticide Action Network, 37, UK.
- Ferré, J., Escriche, B., Bel, Y. and Van, R.J. 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal Crystal proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 132; 1–7.
- Fitches, E., Woodhouse, S.D., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. 2001. *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, *GNA*) and jackbean (*Canavalia ensiformis*, Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae, mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology*, 47; 777–787.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391; 806–811.
- Foissac, X., Loc, N.T., Christou, P., Gatehouse, A.M.R. and Gatehouse, J.A. 2000. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; *GNA*). *Journal of Insect Physiology*, 46; 573–583.

- Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. and Boulter, D. 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of the crops for insect resistance, In: Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Menken, S.B.J., Visser, J.H. and Harrewijn, P. (eds), Springer, 221-234, Dordrecht.
- Gatehouse, A.M.R., Davison, G.M., Stewart, J.N., Gatehouse, L.N., Kumar, A., Geoghegan, I.E., Birch, A.N.E. and Gatehouse, J.A. 1999. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. *Molecular Breeding*, 5; 153–165.
- Georghiou, G. P., and Lagunes-Tejeda A. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. FAO, United Nations, Rome.
- Goldstein, I.J. and Hayes, C.E. 1978. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 35; 127-340.
- Guo, X., Huang, C., Jin, S., Liang, S., Nie, Y. and Zhang, X. 2007. *Agrobacterium* mediated transformation of *Cry1C*, *Cry2A* and *Cry9C* genes into *Gossypium hirsutum* L. and plant regeneration. *Biology Plant*, 51; 242–248.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418; 244–251.
- Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I. J. and Wright, C. S. 1995. Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2; 472-479.
- Hilder, V. A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. and Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330; 160-163.
- Hilder, V.A., Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., Gatehouse, L.N., Shi, Y., Hamilton, W.D.O., Merryweather, A., Newell, C., Timans, J.C., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. and Boulter, D. 1995. Expression of snowdrop

- lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research*, 4;18–25.
- Hossain, S., Venkateswari, J., Kirti, P.B. and Chopra, V.L. 2002. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). *Plant Cell Reports*, 20; 976–981.
- Hossain, M.A., Maiti, M.K., Basu, A., Sen, S., Ghosh, A.K. and Sen, S.K. 2006. Transgenic Expressin of Onion Leaf Lectin Gene in Indian Mustard Offers Protection against Aphid Colonization. *Crop Science*, 46; 2022-2032.
- Howard, I.K., Horton, C.B. and Sage, H.J. 1972. Studies on appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of a plant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 149; 323–326.
- Huang, G.L., Huang, H.L., Zhang, H.C. and Wang, P.G. 2006. Structure-function relations of carbohydrates by neoglycolipid arrays. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133 (3); 211–216.
- Ishwata, S. 1901. On a kind of severe flasherie (sotto disease). *Danihan Sanbshi Kaiho*, 9; 1–5.
- James, C. 2016. Global status of commercialized biotech/GM crops: ISAAA Brief No. 52, ISAAA, Ithaca, New York.
- John, M.E. 1997. Cotton crop improvement through genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17; 185–208.
- Karthikeyan, A., Valarmathi, R., Nandini, S. and Nandhakumar, M.R. 2012. Genetically Modified Crops: Insect Resistance. *Biotechnology*, 11; 119-126.
- Katageri, I.S., Vamadevaiah, H.M., Udikeri, S.S., Khadi, B.M. and Polumetla, A.K. 2007. Genetic transformation of an elite Indian genotype of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for insect resistance. *Current Science*, 93; 12–25.
- Kereša, S., Grdiša, M., Barić1, M., Barčić, J. and Marchetti, S. 2008. Transgenic Plants Expressing Insect Resistance Genes. *Sjemenarstvo*, 25; 139-153.

- Khan, G.A., Bakhsh, A., Riazuddin, S. and Husnain, T. 2011. Introduction of *CryIAb* gene into cotton (*Gossypium hirsutum*) enhances resistance against Lepidopteran pest (*Helicoverpa armigera*). Spanish Journal of Agricultural Research, 9; 296–300.
- Kilpatrick, D.C. 2002. Mannan-binding lectin: Clinical significance and applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1572; 401–413.
- Kouser, S. and Qaim, M. 2012. Valuing financial, health and environmental benefits of Bt cotton in Pakistan. The International Association of Agricultural Economists (IAAE) Triennial Conference, Foz do Iguaçu, Brazil.
- Krattiger, A.F. 1997. Insect Resistance in Crops: A Case Study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries. ISAAA Briefs No. 2. 42, New York.
- Kumar, M., Shukla, A.K., Singh, H. and Tuli, R. 2009. Development of insect resistant transgenic cotton lines expressing *CryIEC* gene from an insect bite and wound inducible promoter. Journal of Biotechnology, 140; 143–148.
- Lannoo, N., and Van Damme, E.J.M. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. Frontiers in Plant Science, 5; 397.
- Leelavathi, S., Sunnichan, V.G., Kumria, R., Vijaykanth, G.P., Bhatnagar, R.K., Reddy, V.S. 2004. A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. Plant Cell Reports, 22; 465–470.
- Liu, Z., Zhu, Z. and Zhang, T. 2013. Development of transgenic *CryIA(c)*+*GNA* cotton plants via pollen tube pathway method confers resistance to *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii* Glover. In: Transgenic Cotton: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Zhang, B. (eds), Springer Science+Business Media, 199-210, New York.
- Luo, Y., Xu, X., Liu, J., Li, J., Sun, Y., Liu, Z., Liu, J., van Damme, E., Balzarini, J. and Bao, J. 2007. A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium*

- divaricatum (L.) Decne (family Araceae) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 40; 358–367.
- Lynch, J.A. and Desplan, C. 2006. A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols*, 1; 486–494.
- Majeed, A., Husnain, T. and Riazuddin, S. 2000. Transformation of virusresistant genotype of *Gossypium hirsutum* L. with pesticidal gene. *Plant Biotechnology*, 17; 105–110.
- Majeed, A. 2005. Expression of proteinase inhibitor gene in cotton. PhD Thesis, The University of Punjab, Lahore, Pakistan.
- Mao, Y.B., Tao, X.Y., Xue, X.Y., Wang, L.J. and Chen, X.Y. 2011. Cotton plants expressing *CYP6AE14* double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 20; 665–673.
- Mao, J. and Zeng, F. 2014. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgenic Research*, 23; 389–396.
- Maqbool, S.B., Riazuddin, S., Loc, T.N., Gatehouse, J.A. and Chritou, P. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different insect pests. *Molecular Breeding*, 7; 85-93.
- McCabe, D.E. and Martinell, B.J. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Nature Biotechnology*, 11; 596–598.
- McPherson, S. A., Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Marrone, P. G., Lavrik, P. B. and Fischhoff, D. A. 1988. Characterization of the Coleopteran specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. Tenebrionis. *Nature Biotechnology*, 6; 61-66.
- Miao, J., Wu, Y., Xu, W., Hu, L., Yu, Z. and Xu, Q. 2011. The Impact of Transgenic Wheat Expressing *GNA* (Snowdrop Lectin) on the Aphids *Sitobion avenae*, *Schizaphis graminum*, and *Rhopalosiphum padi*, *Environmental Entomology*, 40; 743-748.

- Michiels, K., Van Damme, E.J.M. and Smagghe, G. 2010. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Archives of insect biochemistry and physiology*, 73(4); 193–212.
- Nagadhara, D., Ramesh, S., Pasalu, I.C., Rao, Y.K., Krishnaiah, N.V., Sarma, N.P., Bown, D.P., Gatehouse, J.A., Reddy, V.D. and Rao, K.V. 2003. Transgenic indica rice resistant to sap-sucking insects. *Plant Biotechnology Journal*, 1; 231-240.
- Nagadhara, D., Ramesh, S., Pasalu, I.C., Rao, Y.K., Sarma, N.P., Reddy, V.D. and Rao, K.V. 2004. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theoretical and Applied Genetics*, 109; 1399–1405.
- Nanasaheb, P. C. and Bryony, C. B. 2012. Toxins for Transgenic Resistance to Hemipteran Pests. *Toxins*, 4; 405-429.
- Nandeshwar, S.B., Moghe, S., Chakrabarty, P.K., Deshattiwar, M.K., Kranthi, K., Kumar, P.A., Mayee, C.D. and Khadi, B.M. 2009. *Agrobacterium* mediated transformation of *CryIAc* gene into shoot-tip meristem of diploid cotton *Gossypium arboreum* cv. RG8 and regeneration of transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27; 549–557.
- Nutt, K.A., Allsopp, P.G., McGhie, T.K., Shepherd, K.M., Joyce, P.A., Taylor, G.O., McQualter, R.B. and Smith, G.R., 1999. Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs. In: *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists*, 21; 171–176.
- Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144; 31–43.
- Ozcan, S., Firek, S. and Draper, J. 1993. Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *BioTechnology*, 11; 218–221.

- Palma, L., Munoz, D., Berry, C., Murillo, J. and Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6; 3296–3325.
- Pental, D. and Burma, P.K. 2011. Detrimental effect of expression of Bt endotoxin *CryIAc* on *in vitro* regeneration, *in vivo* growth and development of tobacco and cotton transgenics. *Journal of Biosciences*, 36; 363–376.
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. and Fischhoff, D.A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Biotechnology*, 8; 939–943.
- Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. and Fischhoff, D.A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88; 3324–3328.
- Peumans, W.J. and Van damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109; 347–352.
- Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. 1996. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7; 132–138.
- Powell, K.S., Spence, J., Bharathi, M., Gatehouse, J.A., and Gatehouse, A.M.R. 1998. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Journal of Insect Physiology*, 44; 529–539.
- Pusztai, A., Ewen, S.W.B., Grant, G., Peumans, W.J., Damme, E.J.M.V., Coates, M.E. and Bardocz, S. 1995. Lectins and also bacteria modify the glycosylation of gut surface receptors in the rat. *Glycoconjugate*, 12; 22–35.
- Price, R.G.D. and Gatehouse, J.A. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26; 393–400.

- Qaim, M. 2009. The economics of genetically modified crops. *Annual Review of Resource Economics*, 1; 665–693
- Qin, Q.M., Zhang, Q., Zhao, W.S., Wang, Y.Y. and Peng, Y.L. 2003. Identification of a lectin gene induced in rice in response to *Magnaporthe grisea* infection. *Acta Botanica Austro Sinica*, 45; 76–81.
- Rahbe, Y. and Febvay, G. 1993. Protein toxicity to aphids an *in vitro* test on *Acythosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 67; 149–160.
- Rahman, M., Shaheen, T., Tabbasam, N., Iqbal, M.A., Ashraf, M., Zafar, Y. and Paterson, A.H. 2012. Cotton genetic resources. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32; 419–432.
- Ramesh, S., Nagadhara, D., Reddy, V.D. and Rao, K.V. 2004. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166; 1077–1085.
- Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S., Spence, J., Gatehouse, A.M.R and Gatehouse JA. 1998. Expression of snowdrop lectin (*GNA*) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal*, 15; 469–477.
- Rashid, B., Saleem, Z., Husnain, T. and Riazuddin, S. 2008. Transformation and inheritance of Bt genes in *Gossypium hirsutum* L. *Journal of Plant Biology*, 51; 248–254.
- Rawat, P., Singh, A.K., Ray, K., Chaudhary, B., Kumar, S., Gautam, T., Kanoria, S., Kaur, G., Kumar, P., Rodrigues, Macedo, M.L., Damico, D.C., Machado, Freire, M.G., Toyama, M.H., Marangoni, S. and Novello, J.C. 2003. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella*

- (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51; 2980–2986.
- Ross, M.A. and Lembi, C.A. 1985. *Applied weed science*. Burgess Publishing Co., 340, Minneapolis.
- Schnepf, E.C.N., Van, R.J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal Crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62; 775–806.
- Sengupta, S., Chakraborti, D., Mondal, H.A. and Das, S. 2010. Selectable antibiotic resistance marker gene-free transgenic rice harbouring the garlic leaf lectin gene exhibits resistance to sap-sucking planthoppers. *Plant Cell Reports*, 29; 261–271.
- Sadeghi, A., Smagghe, G., Proost, P. and Van Damme, E.J.M. 2008. Ferritin acts as a target site for the snowdrop lectin (*GNA*) in the midgut of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Science*, 15; 513–519.
- Saha, P., Majumder, P., Dutta, I., Ray, T., Roy, S.C. and Das, S. 2006. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta*, 223; 1329–1343.
- Sauvion, N., Rahbe, Y., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Gatehouse, J.A. and Gatehouse, A.M.R. 1996. Effects of *GNA* and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79; 285–293.
- Se'tamou, M., Bernal, J.S., Legaspi, J.C., Mirkov, T.E. and Legaspi, B.C. 2002. Evaluation of lectinexpressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera:Pyralidae): effects on life history parameters. *Journal of Economic Entomology*, 95;469–477.
- Se'tamou, M., Bernal, J.S., Mirkov, T.E. and Legaspi, J.C. 2003. Effects of snowdrop lectin on Mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae) life history parameters. *Journal of Economic Entomology*, 96; 950–956.

- Shelton, A.M., Zhao, J.-Z. and Roush, R.T., 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, 47; 845–881.
- Shi, Y., Wang, M.B., Powell, K.S., Van Damme, E.J.M., Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Boulter, D. and Gatehouse, J.A. 1994. Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem-specific expression of Xglucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 45;623–631.
- Shibuya, N., Goldstein, I. J., Van Damme, E.J.M. and Peumans, W. J.,1988. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb, *The Journal of Biological Chemistry*, 263; 7282734.
- Shou, H., Frame, B.R. and Whitham, S.A.W.K. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*, 13; 201–208.
- Singh, P.K., Kumar, M., Chaturvedi, C.P., Yadav, D. and Tuli, R. 2004. Development of a hybrid delta-endotoxin and its expression in tobacco and cotton for control of a polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Transgenic Research*, 13; 397–410.
- Stoger, E., Williams, S., Christou, P., Down, R.E. and Gatehouse, J.A. 1999. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; *GNA*) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Molecular Breeding*, 5; 65–73.
- Subramanyam, S., Smith, D. F., Clemens, J. C., Webb, M. A., Sardesai, N., and Williams, C. E. 2008. Functional characterization of HFR1, a high-mannose N-glycan-specific wheat lectin induced by Hessian fly larvae. *Plant Physiology*, 147; 1412–1426.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39; 47–79.

- Tabashnik, B.E., Brévault, T. and Carrière, Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31; 510-521.
- Tang, K., Tinjuangjun, P., Xu, Y., Sun, X., Gatehouse, J.A., Ronald, P.C., Qi, H., Lu, X., Christou, P. and Kohli, A. 1999. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 208; 552-563.
- Terenius, O. et al. 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57; 231–245.
- Tohidfar, M., Mohammadi, M. and Ghareyazie, B. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83; 83–96.
- Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D. and Bucher, G. 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9(1); R10.
- Vajhala, S.K.C., Sadumpati1, V.K., Nunna, H.R., Sateesh Puligundla, S.K., Vudem, D.R. and Khareedu. V.R. 2013. Development of Transgenic Cotton Lines Expressing *Allium sativum* Agglutinin (*ASAL*) for Enhanced Resistance against Major Sap-Sucking Pests. *Plos One*, 8; 1-9.
- Van Damme, E.J.M., Allen, A.K. and Peumans, W.J. 1987. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs, *FEBS Letters*, 215; 1402144.
- Van Damme, E.J.M., Kaku, H., Perini, F., Goldstein, I.J., Peeters, B., Yagi, F., Decock, B. and Peumans, W.J. 1991. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin. *European Journal of Biochemistry*, 202(1); 23-30.
- Van Damme, E.J.M., Lannoo, N. and Peumans, W.J. 2008. Plant lectins. *Advances in Botanical Research*. 48; 107–209.

- Vandenborre, G., Smagghe, G. and Van Damme, E.J. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72; 1538–1550.
- Vandenbussche, F., Desmyter, S., Ciani, M., Proost, P., Peumans, W. J., and Van Damme, E. J. M. 2004a. Analysis of the in planta antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating proteins. *European Journal of Biochemistry*, 271; 1508–1515.
- Vandenbussche, F., Peumans, W.J., Desmyter, S., Proost, P., Ciani, M., and Van Damme, E.J.M. 2004b. The type-1 and type-2 ribosome-inactivating proteins from *Iris* confer transgenic tobacco plants local but not systemic protection against viruses. *Planta*, 220; 211–221.
- Wang, Z., Zhang, K., Sun, X., Tang, K. and Zhang, J. 2005. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *gna* into maize plants. *Journal of Biosciences*, 30; 627–638.
- Wu, A., Sun, X., Pang, Y. and Tang, K. 2002. Homozygous transgenic rice lines expressing *GNA* with enhanced resistance to the rice sap-sucking pest *Laodelphax striatellus*. *Plant Breeding*, 121; 93-95.
- Wu, J., Zhang, X., Nie, Y. and Luo, X. 2005. High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* L. embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants. *Plant Breeding*, 124; 142–146.
- Wu, J., Luo, X., Guo, H., Xiao, J. and Tian, Y. 2006. Transgenic cotton, expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids. *Plant Breeding*, 125; 390–394.
- Yamamoto, T. and McLaughlin, R.E. 1981. Isolation of a protein from the parasporal Crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 103; 414-421.

- Yarasi, B., Sadumpati, V., Immani, C.P., Vudem, D.R. and Khareedu, V.R. 2008. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf agglutinin (*ASAL*) exhibits high-level resistance against major sap-sucking pests. *BMC Plant Biology*, 8; 102.
- Yoshimura, S., Komatsu, M., Kaku, K., Hori, M., Ogawa, T., Muramoto, K., Kazama, T., Ito, Y. and Toriyama, K. 2012. Production of transgenic rice plants expressing *Dioscorea batatas* tuber lectin 1 to confer resistance against brown planthopper. *Plant Biotechnology*, 29; 501–504.
- Zhang, W., Peumans, W. J., Barre, A., Astoul, C. H., Rovira, P., Rougé, P., et al. 2000. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta*, 210, 970–978.
- Zhu, J.Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J.Q., Qi, H.S., Wei, Z.J., Yao, Q., Zhang, W.Q. and Li, S. 2012. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene *EcR*. *PLoS ONE*, 7; e38572.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Saber DELPASAND KHABBAZI

Doğum Yeri : Tabriz, IRAN

Doğum Tarihi : 29.03.1985

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ferdowsi-Tabriz, IRAN (2002)

Lisans : University of Tabriz, Faculty of Agriculture, Department of Agronomy and Plant Breeding (2006)

Yüksek Lisans: University of Tabriz, Faculty of Agriculture, Agricultural Biotechnology Program (Ekim 2007- Şubat 2009)

Yayınlar (SCI, SCI/expanded)

Saber Delpasand Khabbazi, Surendra Barpete, Cengiz Sancak, Sebahattin Özcan: *Preconditioning effect of BAP on in vitro multiplication of mature embryo of Lentil (Lens culinaris Medik.)*. Fresenius Environmental Bulletin. 01/2017; 26(1a): 919-925

Saber Delpasand Khabbazi, Allah Bakhsh, Cengiz Sancak, Sebahattin Özcan: *Molecular Characterization of Snowdrop Lectin (GNA) and its Comparison with Reported Lectin Sequences of Amaryllidaceae*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 09/2016; 52(3). doi: 10.17221/58/2016-CJGPB

Allah Bakhsh, Emine Anayol, **Saber Delpasand Khabbazi**, Ömer Karakoç, Cengiz Sancak, Sebahattin Özcan: *Development of insect-resistant cotton lines with*

targeted expression of insecticidal gene. Archives of Biological Sciences 08/2016; 68(4). DOI:10.2298/ABS151012063B

Emine Anayol, Allah Bakhsh, Ömer Cem Karakoç, Selma Onarıcı, Deniz Köm, Muhammad Aasim, Sancar Fatih Özcan, Surendra Barpete, **Saber Delpasand Khabbazi**, Burak Önoel, Cengiz Sancak, Khalid M. Khawar, Levent Ünlü, Sebahattin Özcan: *Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton*. Plant Biotechnology Reports 03/2016; 10(2). doi:10.1007/s11816-016-0388-5

Allah Bakhsh, **Saber Delpasand Khabbazi**, Faheem Shahzad Baloch, Ufuk Demirel, Mehmet Emin Çaliskan, Rüştü Hatipoğlu, Sebahattin Özcan, Hakan Özkan: *Insect-resistant transgenic crops: Retrospect and challenges*. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 07/2015; 39(4). doi:10.3906/tar-1408-69

Hakemli Dergiler (diğer indekslere giren)

Afsaneh Delpasand Khabbazi, Nemat Sokhandan Bashir, **Saber Delpasand Khabbazi**, Hakime Ighani: *Extraction and molecular detection of viral dsRNA from different infected plants*. Journal of Scientific Agriculture 06/2017, 1: 197-203. DOI: 10.25081/jsa.2017.v1.54

Afsaneh Delpasand Khabbazi, Nemat Sokhandan Bashir, Ebrahim Zahedi Asl, **Saber Delpasand Khabbazi**: *Molecular detection of Grapevine fanleaf Virus by the isolation of ssRNA and dsRNA from Xiphinema index*. Journal of Scientific Agriculture 05/2017, 1: 100-105. DOI: 10.25081/jsa.2017.v1i0.35

Saber Delpasand Khabbazi: *Silencing the Key Genes Involved in Oleic Acid Biosynthetic Pathway of Oil Crops and Clean-Up of Contaminant*. Journal of Biosafety 01/2011. 3(4)

Ulusal Kongre Sunum

Sebahattin Özcan, Emine Anayol, Hussein A. Ahmed, Allahbakhsh Joiya, Selma Onarıcı, Gülsüm Aydın, Muhammad Aasım, Güray Akdoğan, **Saber Delpasand Khabbazi**, Burak Turgut, S. Fatih Özcan, Khalid M. Khawar, Levent Ünlü: *Böceklerle Dayanıklı Transgenik Bitki Üretiminde Yeni Bir Yaklaşım: Gereksiz Cry*

Protein Üretimini Engellenmesi. 10th Field Crops Congress, Konya, Turkey; 09/2013

Saber Delpasand Khabbazi, Surendra Barpete, Sebahattin Özcan. *The Effect of Preconditioning on In Vitro Shoot Regeneration in Lentil (Lens culinaris Medik.)*. 11th Field Crops Congress, Canakkale, Turkey; 09/2015

Afsaneh Delpasand Khabbazi, Nemat Sokhandan Bashir, **Saber Delpasand Khabbazi**. *Virus silencing Repressors Identification, a Step towards Increasing the Crop Production*). 11th Field Crops Congress, Canakkale, Turkey; 09/2015

Surendra Barpete, Emine Anayol, Hussein A. Ahmed, S. Fatih Özcan, Deniz Köm, **Saber Delpasand Khabbazi**, Muhammad Aasim, Khalid Mahmood Khawar, Sebahattin Özcan: *Optimization of In-Vitro Culture Condition for Genetic Transformation of Cotton (Gossypium hirsutum L)*. International Plant Breeding Congress, Antalya, Turkey; 11/2013

Saber Delpasand Khabbazi, Afsaneh Delpasand Khabbazi, Alireza Babazadeh Behdostani: *Oil Crops Genetic Engineering an Step Towards Biodiesel Production*. 3rd Biosafety and Genetic Engineering Congress, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran; 06/2011

Alireza Babazadeh Behdostani, **Saber Delpasand Khabbazi**, Afsaneh Delpasand Khabbazi: *Three-Dimensional Nano-Carriers Safe Tools for Gene Transferring*. 3rd Biosafety and Genetic Engineering Congress, in Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran; 06/2011

Saber Delpasand Khabbazi, Afsaneh Delpasand Khabbazi, Alireza Babazadeh Behdostani: *Increasing Vitamin Synthesis of Plants through Genetic Manipulation*. 3rd Biosafety and Genetic Engineering Congress, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran; 06/2011

Saber Delpasand Khabbazi, Bahram Baghban Kohnehrouz, Ashraf Gholizadeh, Afsaneh Delpasand Khabbazi: *Crops Fortification for Folic Acid By Over-Expressing the Key Genes Involved in Biosynthetic Pathway*. Regional Biotechnology Congress, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran; 09/2010

Uluslararası Kongre Sunum

Emine Anayol, Ömer Karakoç, Deniz Köm, Allahbakhsh Joiya, Surendra Barpete, Selma Onarıcı, **Saber Delpasand Khabbazi**, Sancar Fatih Özcan, Muhammet Çağrı Oğuz, Muhammad Aasim, Levent Ünlü, Sebahattin Özcan: *Yaralanmaya Aktif Olan AoPR1 Promotörünün Kontrolü Altında CryIAc Geninin Aktarıldığı Transgenik Pamuk Elde Edilmesi ve Gereksiz Toksik Cry Protein Üretiminin Engellenmesi*. international mesopotamia agriculture congress, Diyarbakır, Turkey; 09/2014

Saber Delpasand Khabbazi, Bahram Baghban Kohnerouz, Ashraf Gholizadeh: *Preparing RNAi construct for fad2 gene fragment of Brassica napus as a step towards gene silencing*. International Plant Breeding Congress, Antalya, Turkey; 11/2013