



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

TRANSGENİK PATATESTE FARKLI PROMOTÖRLERİN AKTİVİTESİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

ILHOM RAHAMKULOV

Ağustos 2019



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

TRANSGENİK PATATESTE FARKLI PROMOTÖRLERİN AKTİVİTESİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

ILHOM RAHAMKULOV

Yüksek Lisans Tezi

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH

Ağustos 2019

Ilhom RAHAMKULOV tarafından Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH danışmanlığında hazırlanan “Transgenik Patateste Farklı Promotörlerin Aktivitesinin Karşılaştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Genetik Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan :Dr. Öğr. Üyesi Oya AKÇA, Harran Üniversitesi



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



Üye :Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

**ONAY:**

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

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

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR V.**

## TEZ BİLDİRİMİ

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

ILHOM RAHAMKULOV



## ÖZET

### TRANSGENİK PATATESTE FARKLI PROMOTÖRLERİN AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

RAHAMKULOV, Ilhom  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH

Ağustos 2019, 91 sayfa

Bu tez çalışmasında patatesten elde edilen yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörü ile *Arabidopsis thaliana* bitkisinden elde edilen ve stres koşullarında uyarılabilen *pRD29A* promotörünün Lady Olympia patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidinde gen ifade seviyelerine bakılmıştır. Çalışmada konstitütif -35S *CaMV* promotörü kontrol olarak kullanılmıştır. Seçilen promotörler *GUS-INT* genini kontrol edecek şekilde pCAMBIA-1301 plazmidine yerleştirilmiştir. Bitki transformasyonu *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin LBA4404 suşu aracılığıyla sağlanmıştır. Eksplant olarak yaprak ve boğum araları kullanılmıştır. Elde edilen transgenik hatlar histokimyasal GUS analizi, PCR, gen ifadesini belirlemek için qRT-PCR ve fluorogenik assay analizi kullanılarak doğrulanmıştır. Laboratuvar koşullarında transgenik bitkilerin taranması için higromisin fosfotransferaz (*hptII*), en uygun konsantrasyonda (5 mg/l) kullanılmıştır. Transformasyon etkinliği % 0,98 olarak hesaplanmıştır. *pRD29A* içeren transgenik patateslerde *GUS* gen ifadesinin kontrol koşullara göre farklı abiyotik stresler altında 10 kattan fazla arttığı gözlemlenmiştir. *pRCA* promotöründe kök/yumru kısımlarına göre yapraklarda *GUS* gen ifadesi 4 kat artmıştır. Bu promotörlerin aktivitelerine bakılarak, ileride farklı genler ile beraber kullanılmaları durumunda patateste transgenik teknolojinin risklerini minimuma indirmek ve olumsuz çevre koşullarına dayanıklı patates hatları geliştirmek mümkün olabilir.

*Anahtar Sözcükler:* Patates, dokuya özgü ve uyarılabilir promotörler, transformasyon, 35S, *pRCA* ve *RD29A*

## SUMMARY

### COMPARISON OF DIFFERENT PROMOTER ACTIVITIES IN TRANSGENIC POTATO

RAHAMKULOV, Ilhom

Niğder Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor : Ass. Prof. Dr. Allah BAKHSH

August 2019, 91 pages

In this thesis, the efficiency of green tissue specific (*pRCA*, isolated from potato) and stress inducible promoter (*pRD29A*, isolated from *Arabidopsis thaliana*) was compared in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants in comparison with constitutive promoter (*35S CaMV*). The promoter fragments were cloned upstream to a reporter gene (*GUS-INT*) in pCAMBIA-1301 binary vector. *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring recombinant binary vector was used to infect leaf discs and internodal explant of Lady Olympia cultivar. Transgenic lines were verified by GUS histochemical analysis, PCR, gene expression via RT-qPCR and fluorogenic GUS assay techniques. Hygromycin phosphotransferase (*hptII*) was used at optimal concentration (5 mg/l) for the screening of *in vitro* cultured putative transgenic plants. Overall transformation efficiency was calculated as 0,98%. As a result of the validation methods, *pRD29A* transgenic potatoes were observed to increase *GUS* gene expression more than 10 times in different abiotic conditions compared to controls. In *pRCA* promoter, *GUS* gene expression was increased 4-fold in leaves compared to root / tuber parts. The results of this study encourage the appropriate use of promoter to drive the expression of foreign gene(s) for the development of potato lines resistant/tolerant against biotic and abiotic stresses. Thus, minimizing the risks of transgenic technology can be possible in potatoes using different genes under suitable promoters in the future.

*Keywords:* Potato, tissue specific and inducible promoters, gene transformation, 35S, *pRCA* and *RD29A*

## ÖN SÖZ

Öncelikle yüksek lisans tezi ve diğer çalışmalarımın yürütülmesi boyunca laboratuvar malzemeleri ve ekipmanları ile çalışma imkânı veren, bilgisi ve tecrübesi ile yol gösteren, her türlü desteğini esirgemeyerek emek veren danışman hocam sayın Dr.Öğr. Üyesi Allah BAKHSH hocama sonsuz teşekkür ederim.

Aynı zamanda tez çalışmam esnasında her türlü bilgi ve yardımını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY hocama ve tez çalışmamda jüri görevi yapan sayın Dr. Öğr. Üyesi Oya AKÇA hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Buasimuhan ABUDUREYIMU, Safa SÜMER, Tahira HUSSEIN, Zehranur GÜLBAHAR, Abdurrahim NADİROV, Fatma SARIKAYA'ya ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olmasalar da maddi-manevi desteğini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük katkıları olan annem Gülsin JAYLAVOVA, kardeşlerim Jamila RAHAMKULOVA, Gülinar YOLDASHOVA, Nodira YOLDASHOVA ve İkram RAHAMKULOV'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına 2150520 numaralı proje ile finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Gen Transformasyon.....	5
2.2 Farklı Promotörler.....	6
2.2.1 Konstitütif promotörler.....	6
2.2.2 Dokuya özgü promotörler.....	7
2.2.3 Uyarılabilir promotörler.....	10
2.3 Raportör genler.....	12
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT.....	15
3.1 Materyal.....	15
3.1.1 Bitki materyali.....	15
3.1.2 Bakteri ve vektör materyal.....	15
3.1.3 Promotör ve gen kaynakları.....	15
3.2 Metot.....	19
3.2.1 Rekombinant plazmidlerinin oluşturulması ve klonlanması.....	19
3.2.1.1 Promotör sekansının belirlenmesi ve primer tasarımı.....	19
3.2.1.2 Restriksiyon enzimiyle kesim ve ligasyon.....	22

3.2.1.3 <i>Escherichia coli</i> bakterisiyle rekombinant plazmidlerin klonlaması .	23
3.2.1 <i>A.tumefaciens</i> aracılığıyla patates bitkisine farklı promotörlerin aktarılması	25
3.2.2.1 <i>A.tumefaciens</i> bakterisine rekombinant plazmidlerinin aktarılması ..	25
3.2.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA-4404 bakterisi ile koloni PCR.....	26
3.2.2.3 Transformasyon için Lady Olympia patates çeşidinin çoğaltılması ..	28
3.2.2.4 pCAMBIA - pRD29A, pCAMBIA - pRCA ve pCAMBIA - 1301 plazmidlerini <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla bitkiye aktarımı .....	30
3.2.3 Transgenik aday bitkileri doğrulama yöntemleri.....	34
3.2.3.1 Histokimyasal GUS analizi .....	34
3.2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	34
3.2.3.3 Transgenik aday bitkilerinin Gen ifadesini belirlemek için yetiştirme koşulları.....	35
3.2.3.3.1 Kuraklık ve yüksek sıcaklık uygulaması ( <i>pRD29A</i> ) .....	35
3.2.3.3.2 Konstitütif ve yeşil dokuya özgü promotörleri içeren aday transgenik patateslerin yetiştirme koşulları.....	37
3.2.3.4 GUS fluorogenik assay analizi.....	37
3.2.3.5 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR).....	39
3.2.4 İstatistiksel analizler .....	42
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA .....	43
4.1 Klonlama.....	43
4.1.1 <i>pRCA</i> ve <i>pRD29A</i> promotörleri PCR'ile çoğaltılması.....	43
4.1.2 pCAMIA-1301 plazmidi ile <i>pRCA</i> ve <i>pRD29A</i> promotörlerinin <i>KpnI</i> ve <i>NsoI</i> restriksiyon enzimleri kesilmesi ve ligasyonu .....	44
4.1.3 Ligasyon .....	45
4.1.3 Rekombinant plazmidlerini JM109 <i>E. coli</i> kompetent hücrelerine transformasyonu.....	46
4.2 Plazmidlerin LBA4404 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Elektro-Kompetent Hücrelerine Aktarılması.....	51

4.2.1 Orijinal pCAMBIA-1301 plazmidinin LBA4404 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> elektro-kompetent hücrelerine aktarılması.....	51
4.2.2 Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinin LBA4404 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> elektro-kompetent hücrelerine aktarılması.....	53
4.2.3 Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidinin LBA4404 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> elektro-kompetent hücrelerine aktarılması.....	53
4.3 Patates Bitkisinde <i>in vitro</i> Ortamda Higromisin Optimizasyonu .....	54
4.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Lady Olympia Patates Çeşidinin Promotörlerin Transformasyonu.....	57
4.5 Aday Transgenik bitkilerin Doğrulama Yöntemleri.....	61
4.5.1 Histokimyasal GUS analizi.....	61
4.5.2 PCR analizi .....	64
4.5.3 GUS protein aktivitesinin karşılaştırması.....	67
4.5.4 Gen ifade analizi (qRT-PCR) .....	72
BÖLÜM V SONUÇ.....	75
KAYNAKLAR .....	76
EKLER.....	83
ÖZ GEÇMİŞ .....	91

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı dokuya özgü promotörleri ve kaynakları .....	10
Çizelge 2.2. Farklı uyarılabilir promotörleri ve kaynakları .....	12
Çizelge 3.1. Kullanılan promotörlerinin primer sekansları .....	19
Çizelge 3.2. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> promotörünün PCR reaksiyonu.....	20
Çizelge 3.3. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> promotörünün PCR reaksiyonu .....	20
Çizelge 3.4. Restriksiyon Enzimlerinde kullanılan kimyasallar ve sıcaklıklar .....	22
Çizelge 3.5. pCAMBIA-1301 plazmidinin üzerindeki lacZ alfa ve GUS başlangıç arasındaki bölgelerine spesifik pCAM90 primer dizisi .....	23
Çizelge 3.6. Rekombinant plazmidlerin doğrulamasında RE karışım içeriği.....	25
Çizelge 3.7. <i>A. tumefaciens</i> koloni PCR içeriği.....	27
Çizelge 3.8. MS bitki besi ortamındaki besin maddeleri ve miktarı (Murashige ve Skoog, 1962).....	29
Çizelge 3.9. Ko-kültivasyon ortam içeriği.....	31
Çizelge 3.10. RSM ortam içeriği .....	31
Çizelge 3.11. Sürgün oluşturma ortam içeriği .....	33
Çizelge 3.12. Kök oluşum ortamının içeriği.....	33
Çizelge 3.13. Histokimyasal GUS solüsyon içeriği.....	34
Çizelge 3.14. Kuraklık stresi için %20 PEG hazırlanması .....	36
Çizelge 3.15. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> promotörünü içeren transgenik patateslerinin yetiştirme koşulları.....	36
Çizelge 3.16. Protein ekstraksiyon tamponu .....	39
Çizelge 3.17. DNaz uygulaması .....	40
Çizelge 3.18. qPCR’da kullanılan primer dizileri.....	41
Çizelge 3.19. qRT-PCR içeriği .....	41

Çizelge 3.20. qRT-PCR sıcaklık döngüsü .....	42
Çizelge 4.1. Patates bitkisinde higromisin optimizasyonu .....	56
Çizelge 4.2. Taransformasyonda yaprak ve boğum arası ekspalntalarının sonuçları.....	59
Çizelge 4.3. Aday transgenik bitkilerinden doğrulama yöntemleri ve sonuçları.....	66



## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Amerika kıtasındaki yabancı patates dağılımı (Hijmans ve Spooner, 2001). .... 2
- Şekil 1.2. DNA molekülü üzerindeki promotör, kodlanan bölge ve terminatör bölgeleri 4
- Şekil 2.1. Çınar ağacında *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin tümer oluşturması... 5
- Şekil 2.2. Arabidopsisde histokimyasal GUS analizi. Yeşil dokuya özgü *IbRbcS1* ve *CaMV35S* promotörünün karşılaştırılması (Noriaki vd., 2015) ..... 9
- Şekil 2.3. Transgenik pamuk bitkilerinin yapraklarında, *S. littoralis'* ya *S.Spodoptera exigua'*ya karşı direnç göstermiştir (B ve D) . *S. exigua* ve *S. littoralis* larva transgenik yapraktan beslendiğinde ölü bulundu, Transgenik olmayan (A ve C) pamuk yapraklarından beslendiğinde ise larvalar canlı olarak farkedildi (A ve C). (Bakhsh vd., 2016) ..... 11
- Şekil 2.4. X-Gluc ( 5-bromo - 4-kloro - 3-indolil -  $\beta$ -D-glukuronid ),  $\beta$  glukuronidaz substratı, glukuronik asit ve kloro-bromoindigo üretmek için ayrılır. Oksitlendiğinde, kloro-bromoindigo, çözünmeyen mavi çökeltici dikloro-dibromoindigo üretmek için dimerize olur (Karcher, 2002)..... 14
- Şekil 3.1 pCAMBIA-1301 vektörünün şematik görüntüsü ..... 18
- Şekil 3.2. Farklı promotörlerin pCAMBIA-1301 vektöründeki şematik görüntüleri. (A) Orijinal pCAMBIA1301 vektörü. (B, C) Orijinal pCAMBIA1301 plazmidinin üzerinden *35S CaMV* promotörünü restriksiyon enzimleri sayesinde çıkartarak sırasıyla *pRCA*, *pRD29A* promotörleri eklenmiştir ..... 21
- Şekil 3.3. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bakteri hattının seçici kanamisinli LB agar bakteri besin ortamında büyümesi. A) Farklı plazmidler aktarılan bakteriler yüzey yayma işleminin ardından 2 gün +28 °C'de beklettikten sonra kolonilerin oluşumu. B) Oluşan kolonilerden PCR yaparken, yeni kanamisinli LB agar ortamına replika edilen koloniler. .... 27
- Şekil 3.4. Doğrulanma sonucu pozitif çıkan bakterileri çizgileme (streaking). A) Steril tel halkası (wireloop) ile bakteri sıvısına dokundurarak kanamisinli LB agar

ortamına çizgileme. B) Bakterilerin optimum büyüme sıcaklığında çoğaldıktan sonraki hali. ....	28
Şekil 3.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA - 4404 bakterisinin çoğaltımı. A) Sıvı kanamisinli LB bakteri ortamında sırasıyla kontrolde boş, <i>pRD29A</i> , <i>pRCA</i> ve <i>35S CaMV</i> Capromotörlerini içeren farklı pCAMBIA-1301 plazmidleri ve bu plazmidleride içeren LBA-4404 <i>A. tumefaciens</i> hatları. B) Bir gece +28 °C'de 120 rpm'de inkübasyondan sonra çoğalan bitki transformasyona hazır bakteriler.....	28
Şekil 3.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarım aşamaları. A) Sıvı bakterili LB besin ortamda patates yaprak ve boğum aralarının kesilip bekletilmesi. B) Örneklerin ko-kültivasyon ortamına aktarımı. C) Sulsidle sterilizasyonu yapılan örneklerin kurutulması. D) RSM ortamında büyütülmesi.....	32
Şekil 3.7. MS-0 üzerine %20 PEG solüsyonu eklenmesi.....	36
Şekil 3.8. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> transgenik patatesler.....	37
Şekil 4.1. <i>pRCA</i> gradient PCR sonuçları .....	43
Şekil 4.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinden <i>pRD29A</i> promotörlerinin belirlenmesi.....	44
Şekil 4.3. <i>KpnI</i> ve <i>NsoI</i> restriksiyon enzim uygulaması.....	45
Şekil 4.4. pCAMBIA - pRCA ve pCAMBIA - pRD29A rekombinant plazmidlerinin ligasyon doğrulması .....	46
Şekil 4.5. pCAMBIA-pRCA rekombinant plazmidlerinden koloni PCR. Pozitif kontrol <i>pRCA</i> ligasyon solüsyonu.....	47
Şekil 4.6. pCAMBIA-pRD29A rekombinant plazmidlerinden koloni PCR. Pozitif kontrol <i>pRD29A</i> ligasyon solüsyonu.....	47
Şekil 4.7. pCAMBIA - pRCA ve pCAMBIA - pRD29A rekombinant plazmid promotörlerine spesifik primerlerle koloni PCR. Her iki PCR'da negatif kontrol H <sub>2</sub> O ve pozitif kontrol orjinal promotör kaynakları kullanıldı.....	48

Şekil 4.8. Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidini <i>EcoRI</i> ve <i>BglIII</i> restriksiyon enzimleriyle doğrulanması .....	49
Şekil 4.9. Rekombinant pCAMBIA-pRCA vektörünün CLC sekans programı ile şematik görüntüsü .....	49
Şekil 4.10. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidini <i>EcoRI</i> ve <i>BglIII</i> restriksiyon enzimleriyle doğrulanması .....	50
Şekil 4.11. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A vektörünün CLC sekans programı ile şematik görüntüsü .....	50
Şekil 4.12. Orijinal pCAMBIA-1301 plazmidinden LBA4404 agro koloni PCR.....	52
Şekil 4.13. Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinde LBA4404 agro koloni PCR	53
Şekil 4.14. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidinde LBA4404 agro koloni PCR .....	54
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonda higromisin uygulaması. Kontrol (a); 2,5 mg/L higromisin (b); 5mg/L higromisin (c); 7,5mg/L higromisn (d); 10 mg/L higromisn (e) .....	55
Şekil 4.16. Patates bitkisinde higromisin optimizasyonu .....	57
Şekil 4.17. Transformasyon sonrası histokimyasal GUS analizir. ....	58
Şekil 4.18. Boğum arasından kallus ve sürgünlerin oluşumu.....	58
Şekil 4.19. Yapraklardan kallus oluşumu .....	59
Şekil 4.20. Yaprak ve boğum arası eksplantlarından kallus oluşumu .....	60
Şekil 4.21. Yaprak ve boğum arası kalluslarından sürgün, kök oluşumu.....	60
Şekil 4.22. Histokimyasal GUS analizi. Transgenik olmayan bitki yaprakları (a); Strese duyarlı <i>pRD29A</i> promotörünü içeren transgenik bitki yaprakları (b) .....	62
Şekil 4.23. Histokimyasal GUS analizi. Transgenik olmayan yaprak (a); Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> promotörünü içeren transgenik bitki yaprakları (b); Konstitütif <i>35S CaMV</i> promotörünü içeren transgenik bitki yaprağı (c); Yeşil dokuya	

özgü <i>pRCA</i> promotörünü içeren transgenik bitki yumrusu (d); Konstitütif <i>35S CaMV</i> promotörünü içeren transgenik bitki yumrusu (e) .....	63
Şekil 4.24. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> PCR analizi. ....	64
Şekil 4.25. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> PCR analizi. ....	65
Şekil 4.26. Konstitütif <i>35S CaMV</i> PCR analizi. ....	66
Şekil 4.27. Farklı koşullardaki <i>pRD29A</i> transgenik patatesler. ....	67
Şekil 4.28. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> GUS fluorogenik assay analizi (1 saat). ....	68
Şekil 4.29. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> GUS fluorogenik assay analizi (3 saat). ....	68
Şekil 4.30. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> GUS fluorogenik assay analizi (24 saat). ....	69
Şekil 4.31. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> GUS fluorogenik assay analizi (1 saat).....	69
Şekil 4.32. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> GUS fluorogenik assay analizi (3 saat).....	70
Şekil 4.33. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> GUS fluorogenik assay analizi (24 saat).....	70
Şekil 4.34. GUS fluorogenik assay analizi sonuçlarından renk seçici (Color Picker) programıyla çıkan veriler. Harfler GUS protein aktivitesinin istatistiksel farkı belirtmektedir ( $p \leq 0.05$ ).....	71
Şekil 4.35. Strese duyarlı <i>pRD29A</i> transgenik patateslerin farklı koşullardaki gen ifadesi. Harfler GUS gen ifadesinin istatistiksel farkı belirtmektedir ( $p \leq 0.05$ ) .....	72
Şekil 4.36. Yeşil dokuya özgü <i>pRCA</i> ve konstitütif <i>35S CaMV</i> transgenik patateslerin yaprak ve kök/yumrularında GUS gen ifadesi. Harfler GUS gen ifadesinin istatistiksel farkı belirtmektedir ( $p \leq 0.05$ ).....	74

## SİMGE VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
dH <sub>2</sub> O	Distile su
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojenperoksit
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
$\mu$ M	Mikromolar
ng	Nanogram
rpm	Santrifuj işleminde dakikadaki devir sayısı

### Kısaltmalar

cDNA	Tamamlayıcı DNA
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Dinükleotidtrifosfat
EtBr	Etidyum Bromür
EtOH	Etanol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	Restriksiyon enzim
RNA	Ribonükleikasit
rRNA	Ribozomal RNA
TBE	Tris-Borik-EDTA
Y.S.	Yüksek sıcaklık
LB	Lysogeny broth
PEG	Polietilen glikol

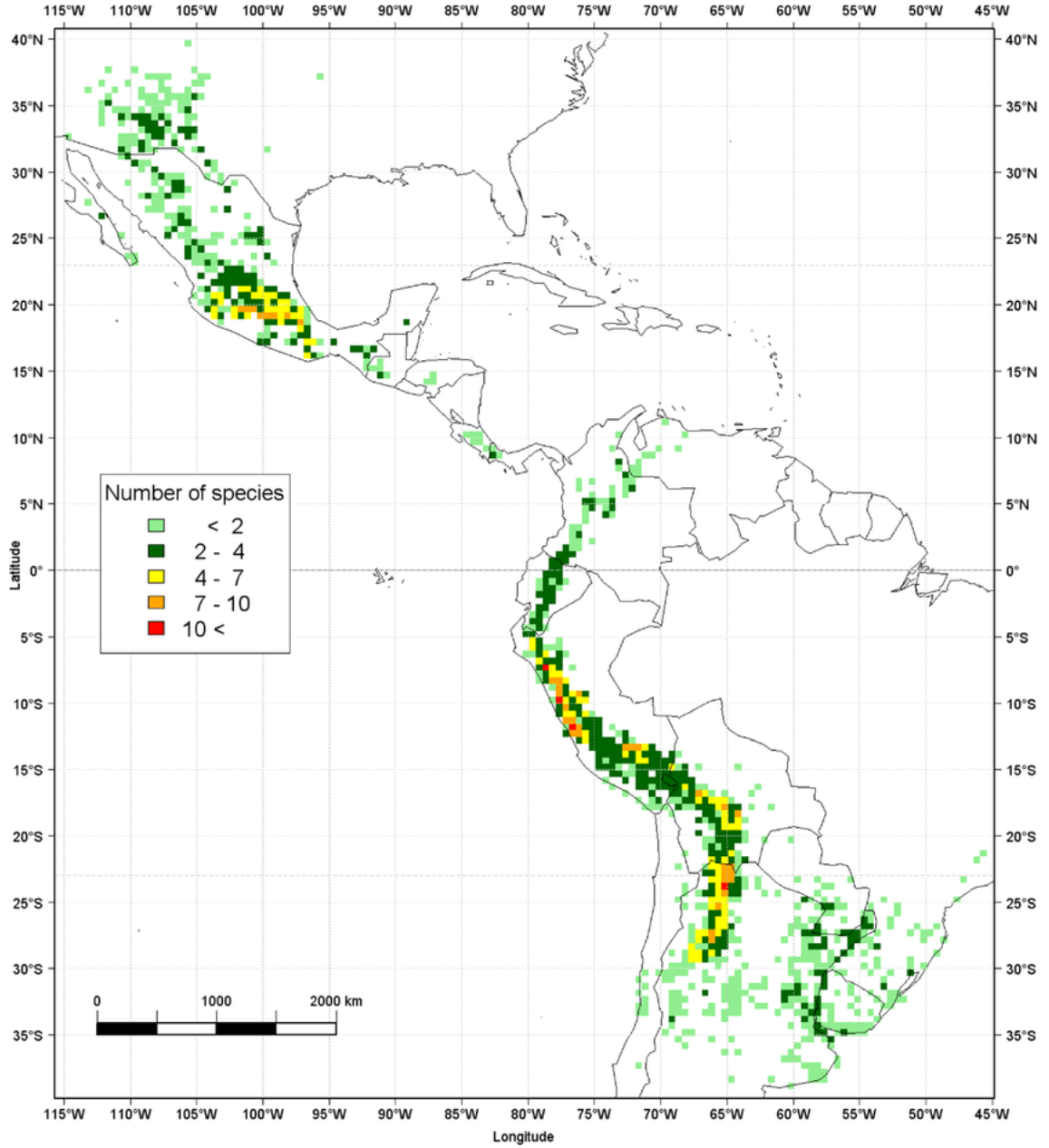
## BÖLÜM I

### GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum L.*) besin bileşiminin zenginliği ile dünyadaki nüfusun artması ve gıda kaynaklarının yetersiz kalması problemlerine çözüm olabilecek hem endüstri ham maddesi hem de direkt gıda olarak kullanılabilen dünyadaki en önemli kültür bitkilerinden biridir. Tahıl ürünleri başta olmak üzere sırasıyla çeltik (*Oryza sativa*), buğday (*Triticum aestivum*) ve arpa (*Hordeum vulgare*)'dan sonra patates yıllık üretimde dördüncü sıradadır (Alisdair vd., 2001).

Patates bitkisinin anavatanı Güney Amerika'da And Dağlarının yüksek bölgeleri olarak bilinmektedir. *Solanum* cinsinin sekiz türü insan gıda maddesi olarak tüketime uygundur ancak en çok üretilen ve yaygın olarak bilinen tür *Solanum tuberosum* türüdür (Rowe, 1993). Patates ilk kez İspanyollar tarafından XVI. yy'da Güney Amerika'dan Avrupa'ya getirilerek buradan dünyaya yayılmıştır. Daha sonra XIX yy'da lezzetiyle popüler olan patates, dünyanın diğer bölgelerinde de dikilmeye başlanmıştır (Baayen, 2006).

Dünyada 2017 yılında toplam 19 milyon 302 bin 642 hektar alanda, 388 milyon 190 bin 674 ton patates üretimi yapılmıştır. Bu patateslerin %50,4'ü Asya, %31,4'ü Avrupa, %11,4'ü Amerika, %6,4'ü Afrika ve %0,4'ü olan küçük bir oranı da Okyanusya kıtalarında üretilmiştir (FAOSTAT, 2017). Türkiye'de ise TÜİK (2017) verilerine göre 37 milyon 992 bin hektar alan tarımda kullanılmaktadır. Bu tarım alanlarının patates üretim payı 1 milyon 428 bin 835 dekadır. Patates dikimi yapılan bu alanlardan 4 milyon 800 bin ton hâsılat elde edilmiştir. Üretilen patates verimi ise 3359 kg/dekar olarak belirlenmiştir.



**Şekil 1.1.** Amerika kıtasındaki yabani patates dağılımı (Hijmans ve Spooner, 2001).

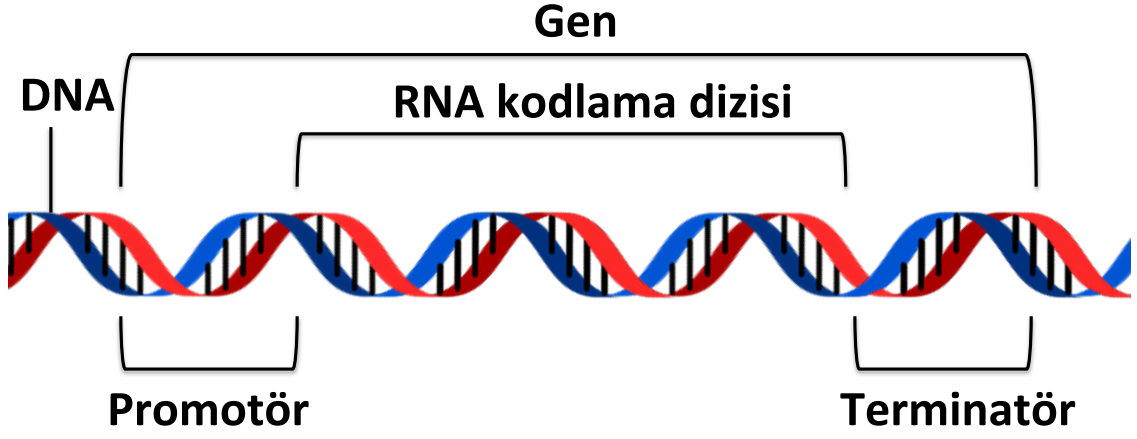
Transgenik teknolojinin önemli adımlarından biri olan DNA'nın çift sarmallı moleküler yapısının keşfi 1953 yılında Watson ve Crick tarafından belirlenmiştir. (Watson ve Crick, 1953). İkinci önemli adım ise rekombinant DNA çağının başlamasında büyük rol alan Smith ve Welcox tarafından 1970'lerde bir bakteri suşundan bir enzimin ayrıştırılmasını ve enzimin viral DNA'yı, özgül nükleotid dizilerinden kesmek için kullanılmasını tanımlar. Bu yapılar "restriksiyon enzimleri" olarak adlandırılmaktadır (Smith ve Welcox, 1970). Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle birlikte transgenik bitkiler ile çalışmalar hızla artmıştır. İlk transgenik bitkilerden biri olan antibiyotiğe dayanıklı transgenik tütün bitkisi, 1983 yılında modern biyoteknoloji

yöntemlerinden gen aktarım yöntemleri kullanılarak geliştirilmiştir (Fraley vd., 1983). Bunun ardından bitkilerin virüslere, bakterilere, herbisitlere ve böceklere karşı dayanıklılık vb., özelliklerin kazandırılması amacıyla transgenik bitkiler üretilmeye devam edilmiştir. 1994 yılında ise ticari satışına başlamış ilk transgenik bitki raf ömrü uzatılmış domates çeşidi Flavr Savr geliştirilmiş ve piyasaya sürülmüştür (Stone, 1994). Daha sonra bunu mısır, soya, kolza, pamuk ve patates gibi bitkilerin böceklere ve herbisitlere dayanıklı transgenik çeşitlerinin ticari ekimine başlanmıştır. 1996 yılında dünya çapında transgenik bitki üretimi 1,7 milyon hektar iken 2017 yılında bu rakam 189,8 milyon hektara ulaşmıştır. Önceleri gelişmiş ülkeler bu teknolojiyi kullanarak üretimi yıllar geçtikçe arttırmaktaydı. Ancak günümüzde gelişmekte olan ülkeler daha çok modern biyoteknoloji yöntemlerini kullanarak, gelişmiş ülkelerin üretimleri üzerinde transgenik bitki üretimi yapmaktadırlar (ISAAA, 2017).

Genetik mühendisliğinin çeşitli tekniklerle bir canlının gen diziliminin değiştirilmesi ya da ona kendi doğasında bulunmayan bambaşka bir karakter kazandırılması yoluyla elde edilen kalıtsal değişikliğe uğrattığı yeni organizmalar günümüzde, G.D.O. (genetiği değiştirilmiş organizmalar) kısaltılmış adıyla ifade edilmektedir. Ayrıca bu ürünlere, genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar (GMO), gen aktarımlı organizmalar, biyomühendislik organizmalar, transgenik ürünler de denilmektedir. Kullanılan teknolojiye ise rekombinant DNA teknolojisi ya da genetik modifikasyon denmektedir. Bu işlem sırasında aktarılan gene ise transgen denir (Meseri, 2008).

Bitkiler açısından baktığımızda, kendi doğası haricindeki herhangi bir organizmadan gen aktararak, belirli özellik kazandırılmış bitkilere transgenik bitkiler ya da genetiği değiştirilmiş bitkiler denilmektedir.

Promotörler, biyolojide genlerin transkripsiyonunu başlatan DNA parçasıdır. Promotörler, ilgili genin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın kısımlarda ve genle aynı DNA iplikliği üzerinde bulunurlar. Promotörler, transkripsiyonu başlattıkları gen dizisinden önce karşıt tamamlayıcı DNA dizisinin 3' ucuna doğru olan kısımda bulunurlar. Gen transformasyon çalışmalarında kullanılan promotörler; bitki, virüs veya bakteri kökenlidirler. Promotörler; konstitütif promotörler, dokuya özgü promotörler, uyarılabilir promotörler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** DNA molekülü üzerindeki promotör, kodlanan bölge ve terminatör bölgeleri

Promotörler, gen transkripsiyonunun başlatılmasında ve düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Özellikle yeşil doku promotörü, genetiği değiştirilmiş mahsullerin gelişiminde büyük öneme sahiptir (Xue vd., 2018).

## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Transformasyonu

Transgenik bitki teknolojisinde son zamanların en çok kullanılan yöntemi *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi aracılığıyla yapılmaktadır. Bu bakteri ilk olarak Smith ve Townsend, (1907), tarafından tanımlanmıştır. Yapısı çubuk şeklinde ve gram negatif bir bakteridir. İki çenekli bitkilerin 140 türünden fazlasında tümör oluşumuna veya taç uru hastalığına neden olan bir ajandır. Tümör oluşumu sırasında, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi T-DNA bölgesi bitki genomuna transfer olmaktadır ve ardından bitki genomuna bağlanan T-DNA, bitki hücrelerinde hormonların sentezindeki dengesini bozmakta ve bu hücrelerde kontrolsüz büyüme başlamasına neden olmaktadır (Escobar ve Dandekar, 2003) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Çınar ağacında *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin tümör oluşturması.

Wenzler vd. (1989), transgenik patates bitkisini elde etmek amacıyla hızlı ve verimli bir transformasyon yönteminin geliştirilmesi üzerinde çalışmışlardır. Araştırmaları

sırasında Agency, Antigo, Desiree, Russet Burbank çeşitleri ve FL1607 patates hattından yararlanılmışlardır. Eksplant olarak yaprak, gövde ve yumru diski kullanılmış, 3 farklı eksplantın içerisinde en etkili olanının yaprak sürgün rejenerasyonu olduğunu vurgulamışlardır. Rejenerasyon ortamında ise, 2.24 mg/l BAP, 10 mg/l GA<sub>3</sub>, 0.2 mg/l NAA, ve 60 g/l sakkaroz içeren MS bitki besin ortamı olarak saptamışlardır. Transformasyonda LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* hattı, CaMV 35S promotörü ile NptII ve GUS markör genlerini taşıyan pBI121 plazmidi kullanılmıştır. NptII geni kanamisinine dayanıklı olduğundan sürgün seçiminde 37.5mg/l, 50mg/l, 75mg/l ve 100 mg/l kanamisin içeren rejenerasyon ortamı hazırlamışlardır. Transgenik sürgünlerin optimum antibiyotik içeren ortamı 62.5 mg/l kanamisin olarak belirlemişlerdir. Kullanılan hatların içerisinde en yüksek transgenik bitki elde edilen hat FL1607 olmuştur. Yapılan çalışmanın sonunda bitki genotipinin ve transgenik bitki seçiminde kullanılan antibiyotiklerin transgenik bitki elde edilmesinde önemli faktörler olduğunu belirtmişlerdir.

## **2.2 Farklı Promotörler**

### **2.2.1 Konstitütif promotörler**

Bu promotörler hemen hemen bitkinin tüm dokularında ifade edilirler ve tamamen değilse de çevresel ve gelişimsel faktörlerden bağımsızdırlar. Örnek olarak; karnabahar mosaik virüsü (CaMV) 35S promotörü, *Agrobacterium*'un nopalin sentaz (nos) promotörü, ubiquitin geni promotörleri, çeltik aktin geni promotörü verilebilir. Günümüzde transgenik bitki teknolojisinde en çok kullanılan promotörlerden biri CaMV 35S promotörüdür.

CaMV'den türetilen 35S promotörü, 1990'larda transgenik bitkilerin %80'inden fazlasında kullanılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda CaMV 35S promotörünün, istenmeyen bitki genlerinin veya endojen virüslerin kazara aktivasyonuna neden olabileceğini, yatay gen transferini teşvik edebileceğini belirlemişler (Hull vd., 2000).

CaMV 35S promotörünün konstitütif bir promotör olduğu varsayılmasına rağmen, bazı raporlarda bitkinin tüm hücre tiplerinde ifade edilmediği belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada pamukta raportör yeşil florasın proteini (GFP) genine konstitütif CaMV 35S

promotörü eklenerek pamuk bitkisinin tüm gelişim evreleri gözlemlenmiştir. Pamukta embriyogenezin ilk erken aşamasında GFP geninin ifadesi tespit edilmemiştir. Pamukta çimlenme gelişimi sırasında devamlı gözlenen GFP gen ifadesi ilk 13 gün hipokotil ve kotiledonların birleşmesinde küçük bir bölgede gözlemlenmiştir. Çimlenmeden sonra bitkinin tüm organlarında GFP proteini aktif olarak belirlenmiştir (Sunilkumar vd., 2002).

Son zamanlarda, transgenik bitkilerde gen ifadesi için CaMV 35S promotörünün kullanılmasıyla ilgili bazı endişeler ortaya atılmıştır. En önemli sebeplerden biri de CaMV 35S promotör ile P6 proteininin sekans kodlarının arasında birbirleri ile benzer örtüşme gözlemlenmesidir. P6 proteininin yan etkileri tam olarak belli değil fakat yine de çok işlevli bir protein olduğundan dolayı, gelecekte transgenik bitkilerde öngörülemeyen sonuçlara yol açabileceği konusunda bazı endişeler bulunmaktadır (Podevin ve Jardin, 2012). 1985 yılında modern biyoteknolojide CaMV 35S promotörü tanımlanmıştır. Her şeye rağmen, keşif edildiğinden günümüze kadar, bitki bilimlerinin tamamında ve bitki biyoteknolojisinde en çok tercih edilen promotörlerden biri olmuştur (Somssich, 2019).

CaMV 35S promotörünü içeren transgenik bitkilerde bu zamana kadar geri dönüşü olmayan bir biyogüvenlik olayı gerçekleşmemiştir. Ancak yine de direkt virüs kaynaklı oluşu bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bundan dolayı bitki kaynaklı promotörlerin transgenik teknolojide bilinmeyen riskleri minimuma indirme gibi bir avantajı olabilir. Özellikle yeşil dokuya özgü patates kökenli *pRCA* promotörünün kullanımı patates için uygun olabilir. Çünkü patates yumrularından yararlanılması, transgen ifadesinin sadece yeşil dokularda aktif olması söz konusudur.

### **2.2.2 Dokuya özgü promotörler**

Dokuya özgü promotörler, bir genin transformasyonunda kullanıldıklarında spesifik dokularda veya belirli gelişim evrelerinde ifade göstermektedirler. Bitkilerde dokuya özgü promotörler vasküler sistemlerde, fotosentetik dokularda, yumrularda, köklerde ve diğer bitki organlarında ifade edilmektedir.

Promotörler, gen transkripsiyonunu düzenleyen spesifik sekanslar içeren kodlama bölgesinin üst akışındaki DNA bölgeleridir. Bununla birlikte, transgenik bitkilerdeki yabancı proteinlerin sürekli olarak ekspresyonu olumsuz etkilere sahip olabileceğinden, uygun bir promotör kullanımı transgen ekspresyonu için önemlidir. Ancak transgenlerin üretimi ekonomik nedenlerden ötürü, biyo-sanayi, biyo-ürünlerin yerelleştirilmesi, çeşitlilik ve istikrar, fraksiyonasyon potansiyeli, verim, pazar ve tüketici kabulü ile doğrudan ilişkilidir. Düzenleyici kurumlar ve devlet kurumları, yeni biyolojik ürünlerin çevresel ve sağlık etkileri ile ilgilenmektedir. Maksimum ekstraksiyon verimi elde etmek ve biyo-güvenlik risklerini en aza indirmek amacıyla; moleküllerin endüstriye yönelik son kullanım için tasarlanan belirli dokuları hedeflemek, yeni gelişimsel ve dokuya özgü promotörler karakterize edilmesi ve seçilmesinde gereklilik oluşturmaktadır (Penniket, 2013).

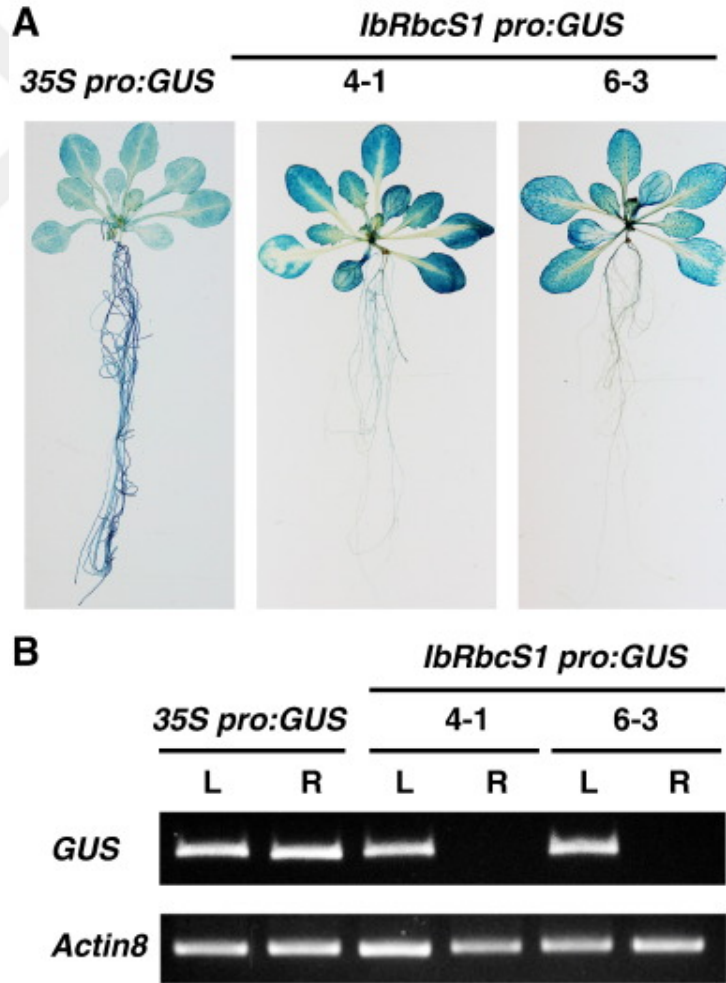
Qu vd. (2011), patates bitkisinde (*Solanum tuberosum*) yeşil dokuya özgü promotörler ile çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (rubisco) aktivasyonunun (RCA) kodlayan promotörü izole etmişlerdir. Raportör gen olarak ise GUS genini kullanmışlardır. Transgenik tütün bitkilerinde analiz edilen StRCAP'nin yapraklardaki etkinliği, CaMV35S promotörününkinden 0,4 kat daha az ifade edilmiştir. Ardından StRCAP'ın bitki genetik mühendisliğinde uygulanma potansiyelini vurgulamışlardır.

Xue vd. (2018), çeltik bitkisinde (*Oryza rufipogon* Griff.) RNA-seq verilerine ve RT-PCR ekspresyon analizine dayanarak, yeşil dokularda eksprese edilen OrGSE geni tanımlanmıştır. Çalışmada ayrıca OrGSE geninin (OrGSEp) promotörü izole edilerek CAAT-Box ve TATA-Box gibi cis-etkili elementleri ve sirkadiyen, G-BOX ve GT1 CONSENSUS gibi bölgeleri belirlemiştir. OrGSEp kontrolü altında GUS genini ifade eden transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde GUS aktivitesine bakılmıştır. Bu promotörün sadece yeşil dokuya özgü olmadığını, aynı zamanda ışıkta da indüklenebilir olduğunu belirtmişlerdir.

Manikandan vd. (2016), *Bacillus thuringiensis* (Bt) böcek öldürücü *cry* genlerini, böcek türlerine dirençli transgenik çeltik bitkilerinin geliştirilmesinde kullanmışlardır. Bu çalışmada, çeltik *rbcS* promotörünün kontrolü altında *cry2Aa* ve *cry2Ac* genini içeren yeni bir *cry2AX1* genin aktivitesine bakılmıştır. Transgenik çeltik bitkilerinde *cry2AX1*

proteininin ifadesi taze yaprak dokusunda 5.95 ila 122,40 ng/g arasında değişmiştir. Transgenik eltik bitkileri üzerinde *Cnaphalocrocis medinalis* karşı yapılan böcek biyolojik deneyinde, % 80'nin üzerinde larva ölümü kaydedilmiştir.

Noriaki vd. (2015), dokuya özgü promotörlerden biri olan tatlı patatese ait *IbRbcS1*, yeşil dokuya özgü promotörü, izole etmişlerdir. Raportör gen olarak GUS genini seçmişlerdir. Dolaylı gen transformasyon tekniklerinden *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla Arabidopsis bitkisine transformasyon gerçekleştirmişlerdir. Yeşil dokuya özgü promotör ve *CaMV35S* promotörü aktarılan Arabidopsis bitkisinde histokimyasal GUS analizi sonucu GUS geninin ekspresyon gösterdiğini belirlemişleridir. Çalışma sonucunda yeşil dokuya özgü promotörün yapraklarda ekspresyon olurken *CaMV35S* promotörünün tüm dokularda ekspresyon olduğunu bildirmişlerdir (şekil 2.2).



**şekil 2.2.** Arabidopsiste histokimyasal GUS analizi. Yeşil dokuya özgü *IbRbcS1* ve *CaMV35S* promotörünün karşılaştırılması (Noriaki vd., 2015).

**Çizelge 2.1.** Farklı dokuya özgü promotörler ve kaynakları

Promotörk aynağı	Promotör	Özelliği	Transformasyon tek.	Aktarılan bitki	Referans
Tatlı patates	RbcS gen (IbRbcS1) promotör	Yeşil dokuya özgü	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Arabidopsis	Noriaki vd., 2015.
<i>Eucalyptus grandis</i>	EgTIP2	Köke özgü	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tütün	Rodrigues vd., 2013
Sorghum	alpha-kaf	Tohuma özgü	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Sorghum ve Tatlı mısır	Ahmad vd., 2012
<i>Solanum lycopersicum</i>	SIFRK4 promotörü	Polene özgü	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Arabidopsis	Schwartz vd., 2013

### 2.2.3 Uyarılabilir promotörler

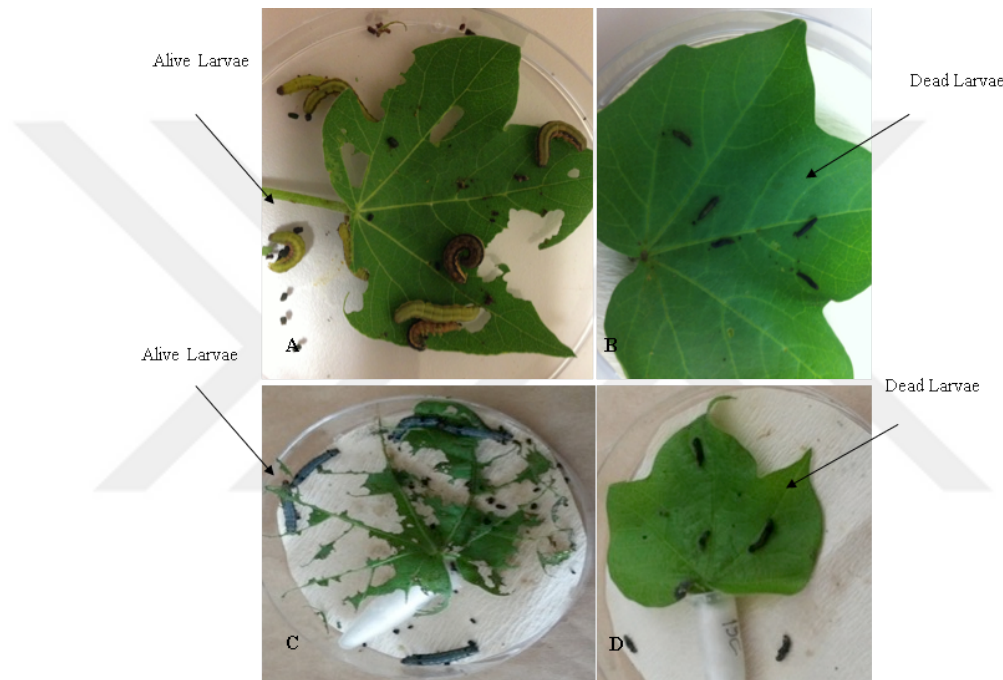
Uyarılabilir promotörler, genin gerekli olduğu zaman eksprese edilmesini sağlar. Bu promotörler, sadece bitki herhangi bir biyotik veya abiyotik strese maruz kaldığında eksprese edilen başka önemli promotör tipleridir; alkol, steroid gibi kimyasal maddeler veya fiziksel faktörler; ışık veya sıcaklık gibi farklı koşullarda aktivitesini göstermektedir (Zhu vd., 2010).

Desiree patates çeşidine *Arabidopsis thaliana* kaynaklı, *pRD29A* promotörünün kontrolü altındaki DREB1A genini transfer etmişlerdir. Transgenik Desiree patates çeşidi ve kontrol olarak kullanılan transgenik olmayan Desiree patates çeşidinin *in vitro* ortamda donmaya karşı gösterdikleri yanıtlarda önemli ölçüde değişiklikler belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonunda transgenik patateslerde donmanın ilk aşamalarından itibaren DREB1A geninin yüksek seviyelerde ifade olduğunu gözlemlemişlerdir (Behnam vd., 2007). *pRD29A* promotörü kontrolü altında raportör gen olarak da lusiferaz (LUC) genini kullanarak *cpl1* ve *cpl3* genleriyle *Arabidopsis thaliana*'da soğuk, absisik asit (ABA) ve NaCl streslerini uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, NaCl uygulamasında diğer stres koşullarına göre daha fazla gen ifadesinin olduğu gözlemlenmiştir (Koiwa vd., 2002).

Özcan vd., 1993, yara duyarlı promotör *AoPRI*'i, *Asparagus officinalis* (kuşkonmaz) bitkisinden tütün bitkilerine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarmışlar ve

GUS raportör geni ile doğrulama yapmışlardır. Daha sonra bu *AoPR1* promotörünün yaraya duyarlı özelliklerinden yararlanarak, böceklere dirençli transgenik bitkilerin üretimi sağlanmıştır.

Bakhsh vd., 2016, pamuk bitkisinde *cryIAc* geni ile *Asparagus officinalis* (kuşkonmaz) bitkisinden izole edilen *AoPR1* promotörünü *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transformasyon yaparak böceklere dirençli transgenik pamuk geliştirmişlerdir. (Şekil 2.3), (Bakhsh vd., 2016).



**Şekil 2.3.** Transgenik pamuk bitkilerinin yapraklarında, *S. littoralis*' ya *S. Spodoptera exigua*'ya karşı direnç göstermiştir (B ve D) . *S. exigua* ve *S. littoralis* larva transgenik yapraktan beslendiğinde ölü bulundu, Transgenik olmayan (A ve C) pamuk yapraklarından beslendiğinde ise larvalar canlı olarak farkedildi (A ve C). (Bakhsh vd., 2016)

Kazuko ve Kazuo, (1992), *Arabidopsis thaliana*'da desikasyon, soğuk ve yüksek tuz koşulları ile indüklenen bir cDNA klonuna, *RD29* genine karşılık gelen genlerin ekspresyonunu karakterize etmişlerdir. Ekzojen absisik asitin (ABA), *RD29* mRNA'sını 3 saat içerisinde indüklendiğini belirlemişleridir. Çalışmada *RD29* geninin karşılığı olan, *RD29A* ve *RD29B* genlerinin, *Arabidopsis* genomunun 8 kb'lik bir bölümünde ard arda bulunduğunu ve bunların hidrofilik proteinleri kodladığını belirlemişlerdir. Desikasyon sırasında, *RD29A* geninin mRNA'sı iki aşamalı kinetikle indüklenirken,

*RD29B* geninin desikasyonun başlamasından sadece 3 saat sonra indüklendiği belirlenmiştir. Her iki genin, ABA uygulamasından yaklaşık 3 saat sonra ifade edildiğini bildirmişlerdir. *RD29A*'nın en az iki *cis*-etkili elementi bulunduğunu ve bunlardan birinin desikasyon diğerinin ise desikasyona bağlı ozmotik potansiyel değişiklikleriyle ABA-ilişkili olduğunu vurgulamışlardır.

Safaezadeh ve Boller, 2019, *Arabidopsis thaliana*'da metil jasmonat (MeJA) ve sodyum klorür (NaCl) dâhil olmak üzere, biyotik ve abiyotik stresler altında *AtPEPR* ve *AtPROPEP* genlerinin ekspresyon modellerini incelemişlerdir. Deneylerin sonucunda *AtPROPEP* gen ailesi içinde sınıflandırma yapmışlardır (Çizelge 2.2)..

**Çizelge 2.2.** Farklı uyarılabilir promotörleri ve kaynakları

Promotörka ynağı	Promotör	Özelliği	Transformasyon tek.	Aktarılan bitki	Referans
<i>Asparagus officinalis</i> (kuşkonmaz)	cry1Acgeni AoPR1 promotör	Böceklere dayanıklı	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pamuk	<b>Bakhsh vd., 2016</b>
<i>Asparagus officinalis</i> (k uşkonmaz)	<i>PR</i> geni ( <i>AoPRf</i> )pro	Yara ve patojen saldırısında	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tütün	<b>Warner vd, 1993</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>atExt1</i>	Biyotik ve abiyotik stres, Patojen saldırısında	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Arabidops is thaliana</i>	<b>Roberts vd., 2013</b>
<i>Coffea arabica</i>	CaPrx	Nematotlara duyarlı	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tütün	<b>Severino vd., 2012</b>

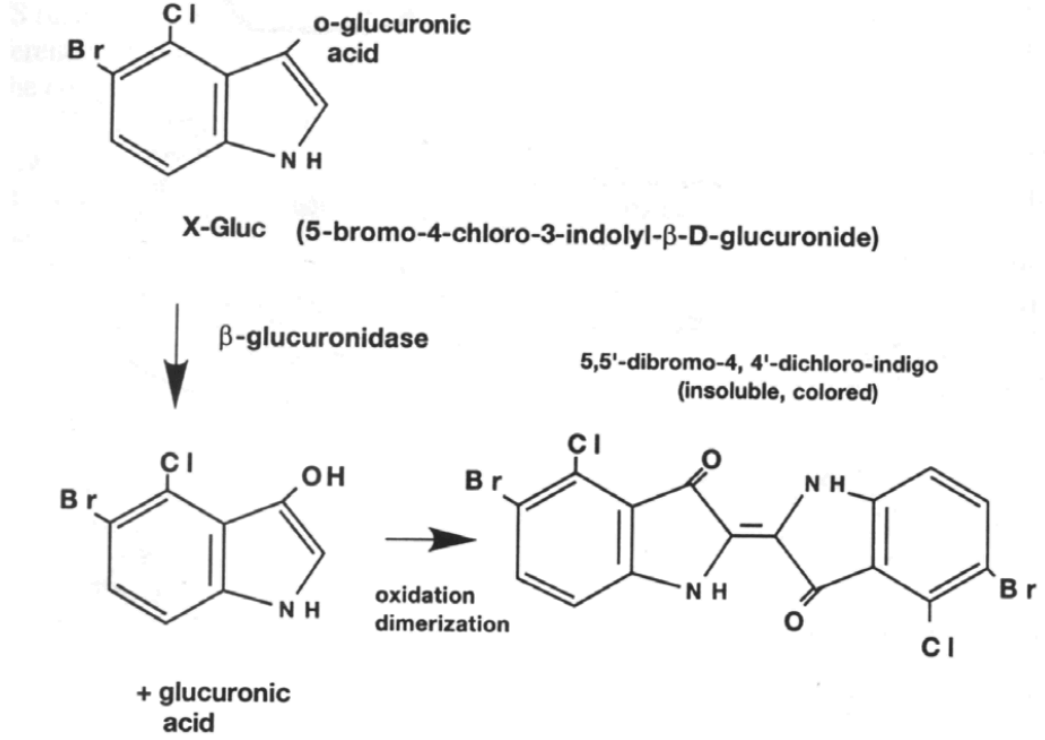
### 2.3 Raportör Genler

Raportör genler, ilgilendiğimiz bir genin transkripsiyonel aktivitesi sırasında üretilen enzimlerinin kolaylıkla analiz edilmelerini sağlamaktadır. Başka bir deyişle raportör genler, belirleyici görevleri bilinmeyen gen ürünlerinin ya da kolaylıkla tanımlanamayan bir genin ifade edilmesine olanak sağlamaktadır. (Karcher, 2002).

Raportör genler arasında en yaygın kullanılanı *E.coli*'ye ait olan GUS ( $\beta$ -glukuronidaz) genidir. Bu gen  $\beta$ -glukuronidaz enzimini kodlamaktadır. GUS geni son yıllarda füzyon sistemi sayesinde bitki biyoteknolojisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çok kullanılmasının diğer sebepleri arasında; bitkilerde endojen aktivite göstermemesi ve

gen ifadesi sonrası protein aktivitesini spektrofotometrik, histokimyasal, florimetrik ve fluorogenik olarak kolaylıkla saptanabilmesi yer almaktadır (Gören Sağlam, 2017). Jefferson vd. (1987b), tarafından rapor edilmesinden bu yana GUS ( $\beta$ -glukuronidaz) geni füzyon sistemi ile bitkilerde ve tarımsal moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Jefferson, 1987a, 1989, Gallagher, 1992, Cote ve Rutledge, 2003).

GUS geninin yanı sıra yaygın kullanılan raportör genlerden biri olan yeşil floresans proteini (GFP, Green Flourescent Protein) de bitkilerde gen anlatımının gözlemlenmesinde genetik markör olarak kullanılmaktadır. Denizanası *Aequorea victoria*'dan izole edilmiş bir protein olan GFP 395 nm dalga boyu ile en üst absorbe etme oranına sahiptir. GFP geninin diğer raportör genlerden farkı ise transferinin gerçekleşip gerçekleşmediği canlı doku veya hücrelerde yeşil renk vermesiyle anlaşılabilmekte ve kullanılan eksplantlar canlılıklarını koruyabilmektedirler (Gören Sağlam., 2017). GFP etkisiyle çeşitli biyoluminesan ışık veren türlere yayılır. *Aequorea victoria*'dan izole edilen GFP, kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ile aktive edilmiş fotoprotein ile ekorinden enerjinin transferini takiben *in vivo* ortamda floresan renk oluşturmaktadır (Ward ve Cormier, 1978, Inouye ve Tsuji, 1994). Bu enerji mekanizmasının radyasyonsuz olduğu düşünülmektedir. Bu protein denizanası şemsiyesinin tabanında bulunan fotositler içinden doğrudan etkileşim ile ilerlemektedir. Saflaştırılmış GFP, *in vivo* olarak eksprese edilen proteine benzer spektral özelliklere sahiptir ve floresans uyarma ve emisyon spektrumları vermektedir (Chalfie ve Tu, 1994).



**Şekil 2.4.** X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronid),  $\beta$  glukuronidaz substratı, glukuronik asit ve kloro-bromoindigo üretmek için ayrılır. Oksitlendiğinde, kloro-bromoindigo, çözünmeyen mavi çökteltici dikloro-dibromoindigo üretmek için dimerize olur (Karcher, 2002).

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bitki materyali

Çalışmada bitki materyali olarak Lady Olympia patates çeşidi kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan patates çeşidi fakültemizin doku kültürü laboratuvarında daha önceden sterilizasyonu yapılarak *in vitro* ortamına alınmıştır. Yapılan çalışmada bitki eksplantlarının devamlılığının sağlanması için, Murashige ve Skoog (MS-0) besin ortamı kullanılmıştır ve steril ortamda bitki eksplantları alt kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Transformasyon boyunca bitkilerin yaprak ve boğum araları eksplant olarak kullanılmıştır (Sümer vd., 2019).

##### 3.1.2 Bakteri ve vektör materyali

Klonlama için bakteri materyali olarak JM109 *E.coli* bakterisi kullanılmıştır. Vektör olarak pCAMBIA-1301 plazmidi hem klonlama da hem de *Agrobacterium tumefaciens* transformasyonunda kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bitkiye gen transferinde ise LBA4404 *A.tumefaciens* hattından yararlanılmıştır. Kullanılan bakterilerin tamamı Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümü laboratuvarımızın -80°C dolabında muhafaza edilen stoklardan temin edilmiştir.

##### 3.1.3 Promotörler ve gen kaynakları

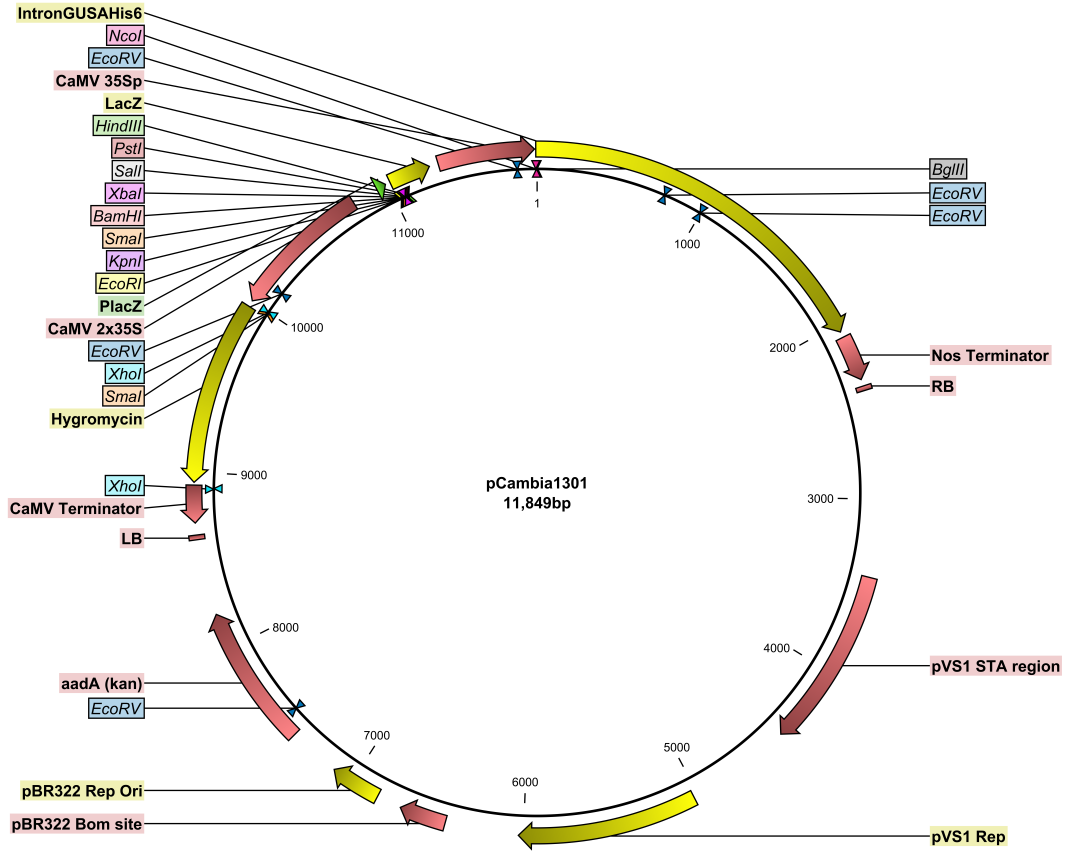
Patates bitkisinden yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörü izole edilmiştir. Strese duyarlı *pRD29A* promotörünün izolasyonu ise *Arabidopsis thaliana* 'dan yapılmıştır. Kullanılan pCAMBIA-1301 vektörünün içerdiği konstitütif *35S CaMV* promotörü *pRCA* promotörü için normal karşılaştırma olarak kullanılmıştır. Promotörlerin tamamı özgün pCAMBIA-1301 vektörünün dizisinde yer alan GUS genine yönlendirilecek şekilde dizayn edilmiştir.

Yeşil dokuya özgü patates *pRCA* promotörünün 731 baz çifti (bç) uzunluğundaki sekansı (Gen bankası numarası: HQ259068.1):

AAATCTAACCTCATATTAAGTGATTGCCACATATATTTTGTTTTTACTCAAT  
CTAGTCATTCATCCAAGCAAGAAAAATAAAAATAAATAAAAAGTATCGAAAA  
CCCTCTAAATTTGGCGTAAATTATTAGTTTCATCTATGAAGTATTGACAGTC  
TTAACAATACCTCTCTACTTGACTAACTAACTTAGATACACCCCTGATCTG  
CCACATGACATAGCAAGTGGTCTCAAACCTTGTAGGAGCATGAAACTTTTA  
ATAAAAAGACGAGAGGAGTGTTGAAAATACCTCTAACTTGACAAGAATTT  
AAGGGTGTATTTCACTCATGTTGCAAGGTCCGGGGTATATTAAGTTCAGTTA  
GTCAAATAAAGTGGTATTTTTAAGACTGTCAATAATTCGAAGATGTAACAT  
AATTCACACCTAATTTAAATGTGTTATCAATATTTCTCTCAATTTTTATTCT  
TAAAAAAAAGAATTTAAAAGCCCATGCCCAAATTACAAGTCGCCTTCATAT  
CTCCCCCTTAGATAACCAATCTTCAATTTGTGGCCATTGAGTAAAGGTAAGC  
CAAATCCACATAATTTTGTTACACTTATTTCCCATACACTCCTTACAACAAAC  
TACTACTATAAAGCCTATCTCTTCCCATACTTATTTTTTCATCAACAAATTTT  
GAAATTTCTAAGGCAAATCAAGAAAGCTTTTTTCATCAATTTTAGTCATCAA  
GA

Strese duyarlı *Arabidopsis thaliana* *pRD29A* promotörünün 824 bç uzunluğundaki sekansı (Gen bankası numarası: AY973635.1):

CGACTCAAACAAACTTACGAAATTTAGGTAGAACTTATATACATTATATGT  
GTAATTTTTTGTAACAAAATGTTTTTATTATTATTATAGAATTTTACTGGTTA  
AATTA AAAATGAATAGAAAAGGTGAATTAAGAGGAGAGAGGAGGTAAACA  
TTTTCTTCTATTTTTTCATATTTTCAGGATAAATTATTGTAGAAGTTTAAAAG  
ATTTCCATTTGACTAGTGTAATGAGGAATATTCTCTAGTAAGATCATTATT  
TCATCTACTTCTTTTATCTTCTACCAGTAGAGGAATAACAATATTTAGCTCC  
TTTGTAATAACAATTAATTTTCGTTCTTGACATCATTCAATTTTAATTTTAC  
GTATAAAATAAAAGATCATACTATTAGAACGATTAAGGAGAAATACAATT  
CGAATGAGAAGGATGTGCCGTTTGTATAATAAACAGCCACACGACGTAAA  
CGTAAAATGACCACATGATGGGCCAATAGACATGGACCGACTACTAATAAT  
AGTAAGTTACATTTTAGGATGGAATAAATATCATAACGACATCAGTTTGAA  
AGAAAAGGGAAAAAAAGAAAAAATAAATAAAAGATATACTACCGACATGA  
GTTCCAAAAGCAAAAAAAGATCAAGCCGACACAGACACGCGTAGAGA  
GCAAAATGACTTTGACGTCACACCACGAAAACAGACGCTTCATACGTGTCC  
CTTTATCTCTCTCAGTCTCTCTATAAACTTAGTGAGACCCTCCTCTGTTTTAC  
TCACAAATATGCAAACCTAGAAAACAATCATCAGGAATAAAGGGTTTGATT



Şekil 3.1. pCAMBIA-1301 vektörünün şematik görüntüsü

## 3.2 Metod

### 3.2.1 Rekombinant plazmidlerinin oluşturulması ve klonlanması

#### 3.2.1.1 Promotör sekansının belirlenmesi ve primer tasarımı

Promotörlerin sekansları National Center for Biotechnology Information (NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) web sitesinden yararlanılarak belirlenmiştir. Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörüne ait GenBank Numarası: HQ259068.1 kullanılarak *RCA* geni ile birlikte sekansına ulaşılmıştır. Bu sekans bilgisinden yararlanılarak *RCA* geninin promotör bölgesine spesifik primer tasarımı yapılmıştır. *Arabidopsis thaliana*'dan izole edilen strese duyarlı *pRD29A* promotörünün GenBank Numarası: AY973635.1 yardımı ile promotör bölgesine spesifik primerler dizayn edilmiştir. Her iki promotöre ait primerlerin tasarımı sırasında pCAMBIA1301 plazmidine ait *35S CaMV* promotörünün başlangıç bölgesi olan lac-Z ve bitiş bölgesine denk gelen GUS genlerinin başlangıç bölgesi için restriksiyon enzimleri seçilmiştir. Enzimler seçilirken *pRCA* ve *pRD29A* promotörlerine zarar vermeyen özellikte olmalarına dikkat edilmiştir. Bu enzimler *KpnI* ve *NcoI* restriksiyon enzimleridir. Primerler bu enzimlere özgü kesim bölgeleriyle beraber tasarlanmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Kullanılan promotörlerinin primer sekansları

No	Promotör	Kaynak bitkisi	Primer	Primer sekansı (5'-3')	Boyutu
1	<i>pRCA</i>	Patates	GTS-F GTS-R	GCAGGTACCAAATCTAACCTCATATTA GCACCATGGTCTTGATGACTAAAATTG	731 bç
2	<i>RD29A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SIP-F SIP-R	GCAGGTACCCGACTCAAACAAACTTA GCACCATGGAATCAAACCCTTTATTCC	824 bç

Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünün PCR'da kullanılan kimyasal bileşikler çizelge 3.2'de verilmiştir. Başlangıçta primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklığını belirlemek için derece derece değişen (gradient) PCR yapılmış ve optimum sıcaklık +50°C olarak belirlenmiştir.

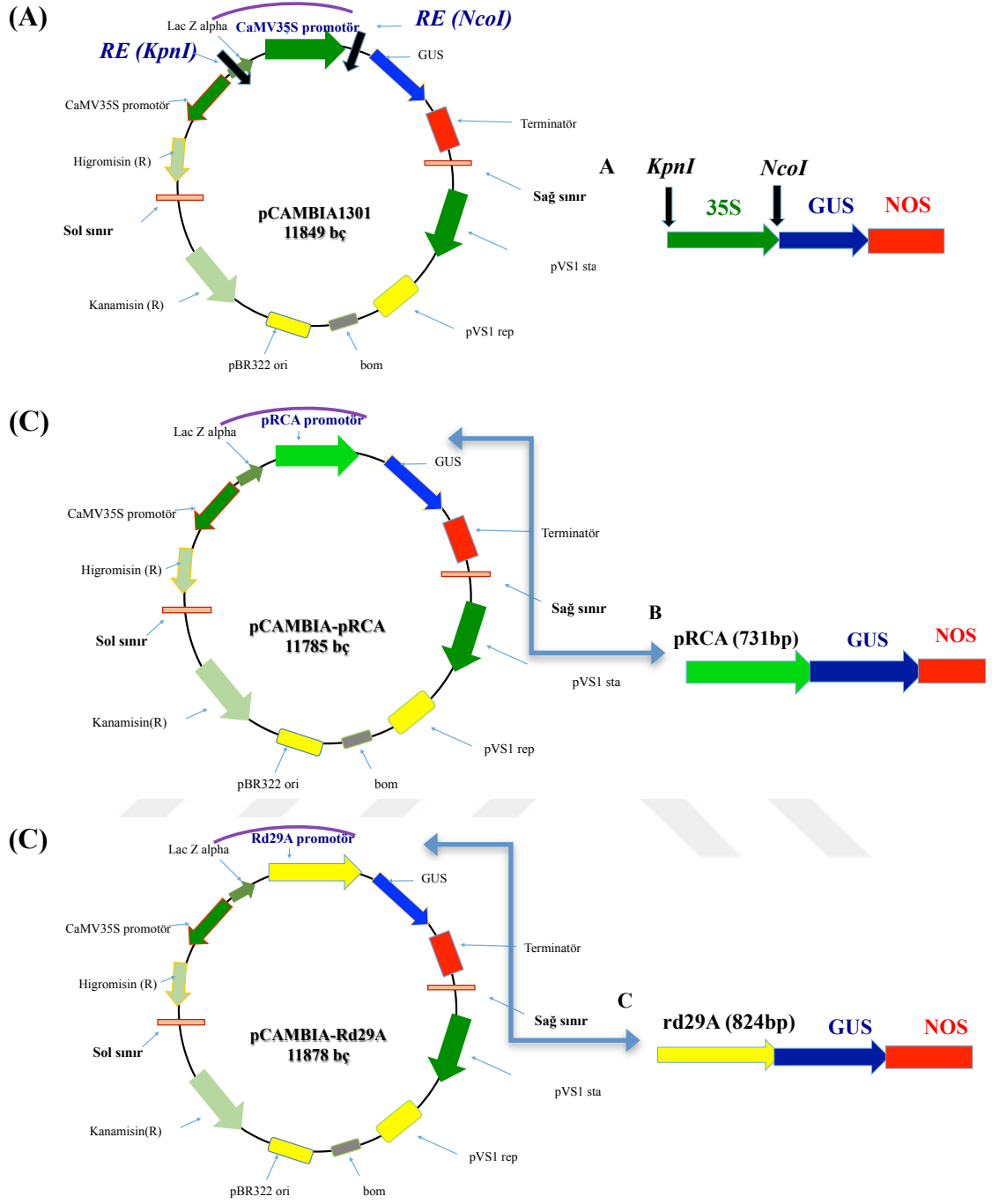
**Çizelge 3.2.** Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünün PCR reaksiyonu

1	İleri primer (F) GTS-F	0,5 µl
2	Geri primer (R) GTS-R	0,5 µl
3	<i>Pfu</i> Buffer (Promega)	2 µl
4	MgSO <sub>4</sub>	2 µl
5	10 mM dNTP Mix	0.4 µl
6	<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0.2 µl
7	H <sub>2</sub> O	13.4
8	Patates DNA (20ng)	2 µl

Strese duyarlı *pRD29A* promotörüne ait tasarladığımız spesifik primerlerin bağlanma sıcaklığını belirlemek için *Arabidopsis* bitkisinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra derece derece değişen (gradient) PCR yapılarak primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları +55 °C olarak belirlenmiştir. PCR’da kullanılan kimyasal bileşiklerin miktarları aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Strese duyarlı *pRD29A* promotörünün PCR reaksiyonu

1	İleri primer (F) SIP-F	0.5 µl
2	Geri primer (R) SIP-R	0.5 µl
3	Green MM 2X (Thermo Scientific)	10 µl
4	H <sub>2</sub> O	7 µl
5	DNA (20 ng)	2 µl
6	Toplam	20 µl



**Şekil 3.2.** Farklı promotörlerin pCambia-1301 vektöründeki şematik görüntüleri. (A) Orijinal pCambia1301 vektörü. (B, C) Orijinal pCambia1301 plazmidinin üzerinden 35S *CaMV* promotörünü restriksiyon enzimleri sayesinde çıkartarak sırasıyla *pRCA*, *pRD29A* promotörleri eklenmiştir.

### 3.2.1.2 Restriksiyon enzimleri ile kesim ve ligasyon

PCR ürünleri hazırlanan %1'lik agaroz jel elektroforezinde 100 V'ta, 120 Amp'de 40 dakika boyunca koşturulduktan sonra, UV ışık altında görüntülenmiştir. Daha sonra pozitif görüntü verdiği belirlenen promotör bantlar kesilerek 1,5 ml'lik eppendorf tüplere koyulmuştur. Jel ekstraksiyonu GeneJet Gel Ex. Kit (Thermo, ABD)'i kullanılarak yapılmıştır.

Jel ekstraksiyonu sonrası *pRCA* ve *pRD29A* promotörleri *KpnI* ve *NcoI* yapışkan uçlu restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Aynı enzimler kullanılarak pCAMBIA-1301 vektöründe kesimi yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda kullandığımız enzimlerin ve solüsyonların miktarları verilmiştir (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4.** Restriksiyon enzimleriyle yapılan kesimde kullanılan kimyasallar ve sıcaklıklar

1	Promotör (20ng), plazmid (30 ng)	15 µl
2	FD Buffer (Thermo)	2 µl
3	<i>KpnI</i> (Thermo)	0,2 µl
4	<i>NcoI</i> (Thermo)	0,2 µl
5	H <sub>2</sub> O	2,6 µl
6	Toplam	20 µl

1	37 <sup>0</sup> C	45 dk
2	65 <sup>0</sup> C	5-10 dk
3	4 <sup>0</sup> C	∞

pCAMBIA1301 plazmidinde bulunan ve restriksiyon enzimleriyle kestiğimiz 35S *CaMV* promotörüne ait bölgeye *pRCA* ve *pRD29A* promotörleri ligaz enzimi yardımıyla yapıştırılmıştır. Böylece yeni rekombinant plazmid oluşturulmuştur. Bu aşamada ligasyon için 0,2 ml'lik küçük PCR tüplerine kesilmiş pCAMBIA-1301 plazmidinden 4 µl, pRCA promotöründen 4 µl, 10X ligaz tamponundan (Buffer) 1 µl, T4 ligaz (ligase) (Thermoscientific Lot:00347678) enziminden de 1 µl koyularak toplam hacim 10 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR cihazında +22°C'de 4 saat, +15°C'de 3 saat bekletilmiştir. Enzimlerin inaktif hale gelmeleri için +65°C'de 10 dakika ve son olarak +4°C bekletildi. Daha sonra pCAM90 primerleri kullanılarak ligasyonun PCR yöntemiyle doğrulaması yapıldı (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** pCAMBIA1301 plazmidinin üzerindeki lacZ alfa ve GUS başlangıç arasındaki bölgelerine spesifik pCAM90 primer dizisi

Primer ismi	Primer sekansı (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı
pCAM90-F	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG	50°C
pCAM90-R	AGAGAAAAGGGTCCTAACCAAGAA	

### 3.2.1.3 *Escherichia coli* bakterisiyle rekombinant plazmidlerin klonlaması

Ligasyon sonucu oluşan rekombinant plazmidler -80°C'de muhafaza edilen JM109 *E.coli* bakterilerine ısı şoku uygulanarak aktarılmıştır. Daha önce oluşturduğumuz rekombinant plazmidler olan yeşil dokuya özgü *pRCA* ve strese duyarlı *pRD29A* promotörleri pCAMBIA-1301 vektörünün üzerinde yer alan ve GUS geninin kontrolünü sağlayan *35S CaMV* promotörünün yerini almışlardır (Şekil 3.2). Klonlama protokolü aşağıda verilmiştir.

*E.coli* hücrelerinde plazmid klonlamasında, JM109 *E.coli* bakteri hücreleri içerisine rekombinant plazmidlerin aktarılabilmesi için öncelikle bakteriler -80°C'deki derin dondurucudan çıkarıldı ve buz üzerinde 10 dakika bekletilerek erimeleri sağlandı. Buz üzerindeki 1.5 ml'lik eppendorf tüpü içerisinde 50 µl *E.coli* bakterileri ve 5 µl ligasyonu gerçekleştiren rekombinant plazmidlerimizden ilave edildi. Daha sonra *E.coli* bakterisinin hücre duvarına ilave edilen plazmidlerin yapışmasını sağlamak için 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Hücre duvarına yapışan plazmidlerin *E.coli* hücre porlarının açılması ve bu porlardan içeriye aktarılabilmesi için ise su banyosunun derecesi +42°C sıcaklığa ulaştıktan sonra 1 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar hücrelerin porlarının eski haline gelmesi için buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Hücrelerin çoğaltımı için hücre karışımı üzerine 450 µl sıvı steril SOC bakteri besi ortamı ilave edildi. Hücreler +37°C'de 10 dakika bekletildikten sonra +37°C'de 900 rpm'de 1 saat inkübe edildi. Çoğaltımı gerçekleştiren hücre çözeltisi plastik petri kaplarında bulunan ve 50 µg/ml Kanamisin içeren agarlı katı LB bakteri besi ortamının üzerine eklendi. Ardından yayma (spreading) işlemi yapıldı ve bu işleme sıvı yüzey kuruyana kadar devam edildi. Yüzey yayma işlemi kuruduktan sonra petri kapları +37°C'de gece boyunca inkübe

edildi. Kanamisin içeren seçici bakteri besi ortamında büyüyen bakteri kolonilerinden pCAM90 primerleri kullanılarak koloni PCR yöntemiyle pozitif kolonilerin seçimi yapıldı.

### Koloni PCR

Kullandığımız pCAMBIA-1301 plazmidinin üzerinde nptII geni içerdiği için bakteri seçiminde antibiyotik olarak kanamisinli LB agar bakteri besi ortamı hazırlanmıştır. Sadece istediğimiz plazmidi içeren kanamisine dirençli *E.coli* bakterilerin çoğaltmasını sağlayan seçici bakteri besin ortamında 1 gece +37 °C’de oluşan koloniler seçildi. Seçilen kolonilere pipet ucunu dokundurarak yeni kanamisinli LB agar içeren bakteri besin ortamına replika edilerek +37 °C’ de inkübe edildi ve aynı kolonilerden PCR yapıldı. Koloni PCR sonucunu %1 agaroz jel elektroporasyonda aldıktan sonra pozitif çıkan kolonilerinden seçerek 50 ml eppendorf tüplere 10 ml sıvı LB bakteri besin ortamı ve 10 µl kanamisin eklenerek +37 °C’de 120 rpm’de bir gece bekletildi. Ertesi gün, sıvı şeffaf LB homojen bir şekilde şeffaflığını yitirerek bakteri çoğaltımı gerçekleşmiştir.

### Plazmid izolasyonu

Koloni PCR sonucu pozitif seçilen rekombinant plazmid adaylarını daha da kesinleştirmek için plazmid izolasyonu Thermo Scientific firmasının GeneJETPI plazmid miniprep kiti (#K0502, #K0503) protokollerini takip ederek yapılmıştır.

Plazmidlerin LacZ ve GUS başlangıç bölgelerinde kesecek şekilde *KpnII* ve *BglIII* restriksiyon enzimleri seçildi. Kullanılan enzimleri -80°C’de muhafaza edilen stoklardan alınarak buz üzerinde deney hazırlandı. Deney içeriği aşağıdaki çizelge 3.6’da verilmiştir. Restriksiyon kesim enzimlerin rekombinant plazmidleri kesmesi için hazırlanan karışım +37°C’de 1 saat inkübe edildi. Ardından enzimleri inaktif etmek için +65 °C’de 10 dakika bekletildi. Sonuçları %1 agaroz, 0.5X TBE tamponu kullanarak hazırlanan jeli elektroforezi yardımıyla 45 dakika 100 W, 120 A’de yürüttükten sonra UV görüntüleme cihazı ile sonuçlar alınmıştır.

**Çizelge 3.6.** Rekombinant plazmidlerin doğrulamasında RE karışım içeriği

N:	Reaksiyon içeriği	Miktarı
1	Plasmid	7 µl
2	10X-FD Buffer	1 µl
3	<i>KpnI</i>	0,2 µl
4	<i>BglII</i>	0,2 µl
5	H <sub>2</sub> O	1,6 µl

### 3.2.2 *A.tumefaciens* aracılığıyla patates bitkisine farklı promotörlerin aktarılması

#### 3.2.2.1 *A. tumefaciens* bakterisine rekombinant plazmidlerinin aktarılması

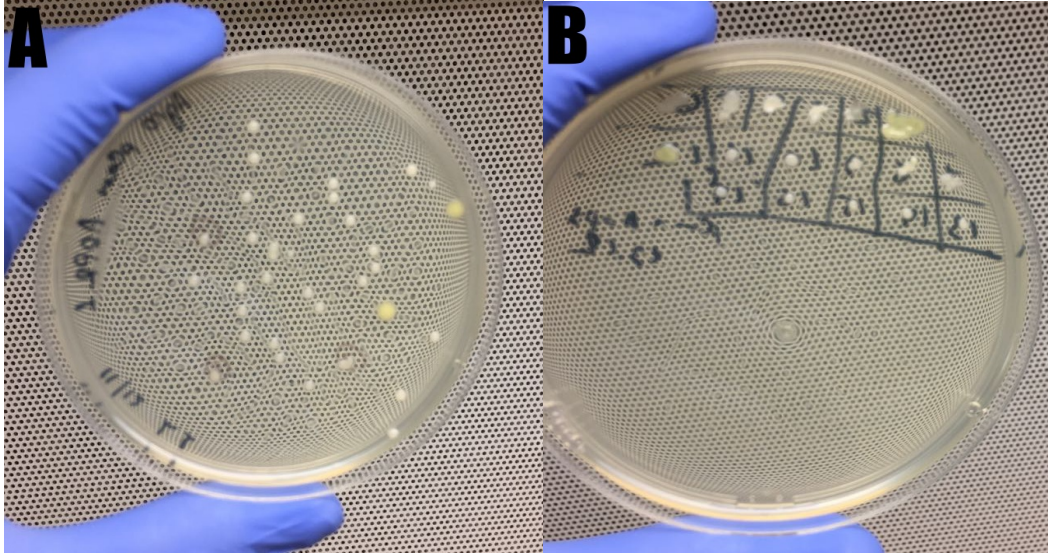
Elde edilen rekombinant pCAMBIA-pRCA ve pCAMBIA-pRD29A plazmidlerinin konsantrasyonları hem nanodrop cihazında hem de jel elektroforez yöntemleri ile belirlendi. Artından LBA4404 *A. tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerine BIO RAD (Gene PulserXcell™) elektroporasyon yöntemiyle plazmidlerin transformasyonu aşağıda gösterildiği aşamalarla gerçekleşmiştir.

*A. tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle plazmid aktarımı yapıldı. -80°C’de muhafaza edilen *A. tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerini 10 dakika buz üzerinde erimesi için bekletildi. 50 µl *Agrobacterium tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerinin üzerine rekombinant plazmidlerinden (500 ng/µl) ilave edilerek ve 30 dakika buz üzerinde hücrelerin duvarlarına bağlanması için maruz bırakıldı. Kullanılacak elektroporasyon kuvvetlerini -20°C dereceye 20 dakika koyuldu ve artından elektroporasyon kuvvetlerine karışımı gerçekleştiren elektro-kompetent hücrelerinin suşu aktarıldı. BioRad (Gene PulserXcell™) elektroporasyon cihazına kuvvetlerini yerleştirerek 2,4k V, 25 kapasitans, 200 ohm direnç kuşullarında çalıştırıldı. Bu aşamada hücrelerin gözenekleri genişleyerek plazmidler içeri girebilir. Elektroporasyon transformasyonu gerçekleştiren hücreleri kuvetten yeni tüplere aktararak üzerine 450 µl LB sıvı bakteri besi ortamı eklendi. Elektro-kompetent hücreleri antibiyotiksiz besin ortamında 28°C’de 15 dakika bekletilerek artından 1200 rpm’de aynı derecede 2 saat 45 dakika çoğalması için inkübe edildi. Çoğalması gerçekleşen

hücrelerin renkleri şeffaftan bulanık şeklini aldıktan sonra 50 µg/ml Kanamisin içeren agarlı katı LB bakteri besi ortamının üzerine eklenerek yayma (spreading) işlemi kuruyana kadar devam edildi. Yüzey yayma işlemi kuruduktan sonra petri kapları +28°C’de gece boyu inkübe edildi. Kanamisin içeren seçici bakteri besi ortamında büyüyen bakteri kolonilerinden pCAM90 ve özgün promotör primerleriyle koloni PCR yöntemiyle pozitif kolonilerin seçimi yapıldı.

### **3.2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 bakterisi ile koloni PCR**

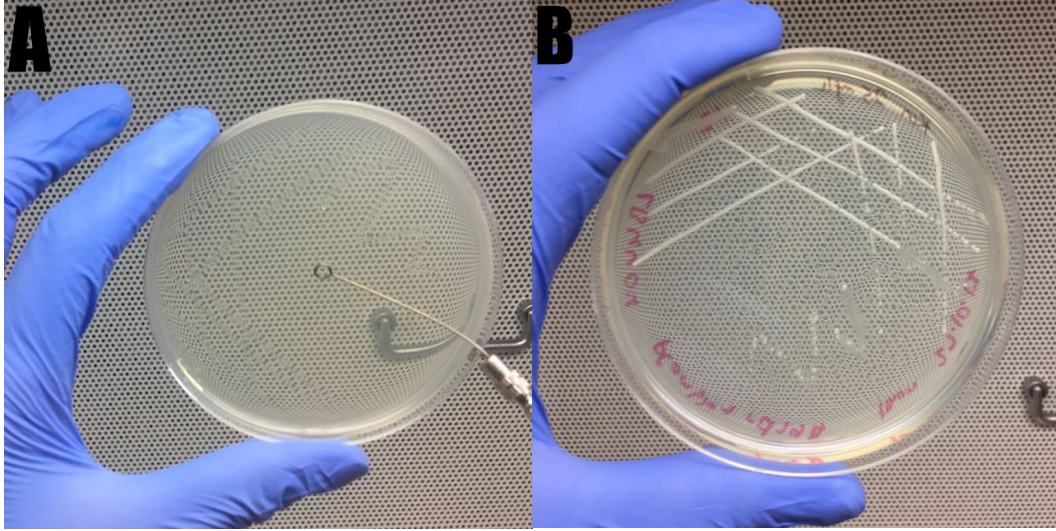
Kanamisinli LB agar bakteri besi ortamı üzerinde büyümesi gerçekleştirilen kolonilerden pipet ucuyla dokundurarak yeni kanamisinli LB agar içeren bakteri besin ortamına şekil 3.3’de gösterildiği gibi replika edilerek +28°C’de inkübe edildi ve aynı kolonilerden PCR reaksiyonu ile karıştırıldı. Aşağıda şekil 4.7’de koloni PCR reaksiyon içerikleri belirlenmiştir. Koloni PCR sonucunu %1 agaroz jel elektroporasyondan aldıktan sonra pozitif çıkan kolonilerinden seçerek 50 ml eppendorf tüplere 10 ml sıvı LB bakteri besin ortamı ve 10 µl kanamisin eklenerek +28 °C’de 100 rpm’de bir gece büyümesi sağlandı. (Şekil 3.5.) Ardından çoğalttığımız rekombinant plazmidleri uzun süreli muhafaza etmek için (VWR no:479-1263 2 ml rundboden tüpüne) 900 µl ve %50 gliserol’dan 900 µl koyarak karıştırdıktan sonra -80 °C’e stokladık. Transformasyon için kullanılacak bakterileri ise kısa süreli muhafaza şekil 3.4’de belirtildiği gibi edilmiştir. Pozitif çıkan bakterileri çizgileme (streaking) steril tel halkası (wireloop) ile bakteri sıvısına dokundurarak kanamisinli LB agar ortamına çizgileme yapılarak +28 °C 2 gün büyümesi sağlandıktan sonra 4°C’de muhafaza edildi.



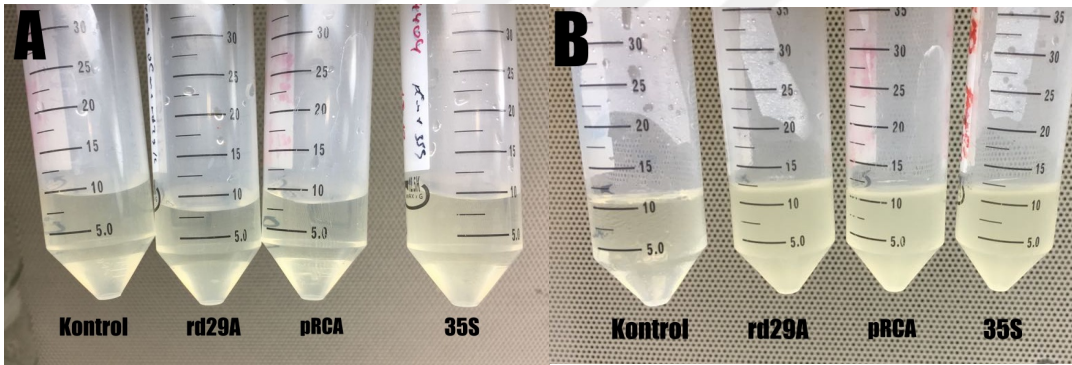
**Şekil 3.3.** *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bakteri hattının seçici kanamisinli LB agar bakteri besin ortamında büyümesi. A) Farklı plazmidler aktarılan bakteriler yüzey yayma işleminin ardından 2 gün +28 °C’de belettikten sonra kolonilerin oluşumu. B) Oluşan kolonilerden PCR yaparken, yeni kanamisinli LB agar ortamına replika edilen koloniler.

**Çizelge 3.7.** *A. tumefaciens* koloni PCR içeriği

N:	Reaksiyon içeriği	Miktarı
1	İleri primer (F)	0.5 µl
2	Geri primer (R)	0.5 µl
3	Green MM 2X (Thermo)	10 µl
4	H <sub>2</sub> O	9 µl
5	Toplam	20 µl



**Şekil 3.4.** Doğrulanma sonucu pozitif çıkan bakterileri çizgileme (streaking). A) Steril tel halkası (wireloop) ile bakteri sıvısına dokundurarak kanamisinli LB agar ortamına çizgileme. B) Bakterilerin optimum büyüme sıcaklığında çoğaldıktan sonraki hali.



**Şekil 3.5.** *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bakterisinin çoğaltımı. A) Sıvı kanamisinli LB bakteri ortamında sırasıyla kontrolde boş, *pRD29A*, *pRCA* ve *35S* *CaMV* Capromotörlerini içeren farklı pCambia1301 plazmidleri ve bu plazmidleride içeren LBA-4404 *A. tumefaciens* hatları. B) Bir gece +28 °C’de 120 rpm’de inkübasyondan sonra çoğalan bitki transformasyona hazır bakteriler.

### 3.2.2.3 Transformasyon için Lady Olympia patates çeşidinin çoğaltılması

Transformasyon sürecinde bitki eksplantlarının devamlılığının sağlanması için Lady Olympia patates çeşidi (Çizelge 3.8) MS-0 bitki besin ortamında kültüre alındı. MS-0 bitki besi hazırlanmasında %3 sakkaroz ve %0,44 MS mineral ve vitaminlerini distile su ile karıştırarak 5.7-5.8 pH’a ayarladıktan sonra %0.8’lik agar katarak kullanılacak kaplar ve enstrümanlar (makas, bisturi, pens) ile beraber +121°C 20 dk otoklavda steril edildi. Kültüre alınan bitkiler beyaz floresanışık altında  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 16 saat ışık ve  $16 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de ise 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulanarak büyümesi sağlandı.

Transformasyondan 1 ay önce bitkileri doku kültür ortamında büyüterek bitki transformasyon deneyimiz bitene kadar alt kültüre alma işi devam etmiştir. Doku kültürü çalışmalarının hepsi steril kabin içinde yürütülmüştür.

**Çizelge 3.8.** MS bitki besi ortamındaki besin maddeleri ve miktarı (Murashige ve Skoog, 1962)

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

### 3.2.2.4 pCAMBIA-pRD29A, pCAMBIA-pRCA ve pCAMBIA-1301 plazmidilerini *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla bitkiye aktarımı

Transformasyon çalışmasını başlatmadan önce MS-0 besi üzerinde Lady Olympia patates çeşidinin Higromisin optimizasyonu yapılmıştır. Higromisin pCAMBIA-1301 vektöründe markör gen olarak içermektedir. Bundan dolayı dört farklı konsantrasyonlarda (0 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 10mg/L) üçer tekerrür şeklinde yaprak ve boğum arasını eksplant olarak kullanarak optimizasyon deneyi yapılmıştır. Higromisin konsantrasyonu 2,5 mg/L olan ortamda 3 hafta gözlemedikten sonra yaklaşık yarısı ölürken 5 mg/L ortamda ise ölüm oranı %100 olarak gözlemlenmiştir. Deney sonrası transformasyonda kullanacağımız RSM ortamının konsantrasyonunu 5 mg/L olarak optimize edilmiştir. Lady Olympia patates çeşitlerini *in vitro* kültürde 5-6 hafta büyüttükten sonra eksplant olarak yaprak ve boğum arası kullanılmıştır.

Transformasyon aşamaları aşağıdaki gibi yapılmıştır:

Farklı pCAMBIA-pRD29A, pCAMBIA-pRCA ve pCAMBIA-1301 plazmidilerini içeren üç tane *A. tumefaciens* LBA-4404 hattına her bir hatta 50 mg/l kanamisin içeren 10 ml Luria Broth bakteri sıvı besin ortamı içerisinde +28°C’de ve 220 rpm’de bir gece inkübe edilmiştir. Luria Broth bakteri besin ortamını inokülasyon için, ko-kültivasyon için ise MS-0 bitki besin ortamına Acetosyringone 1ml/L (100mM) ilave ederek hazırlanmıştır (Şekil 3.9). Patates seleksiyonu için seçici rejenerasyon (RSM) ortamında MS-0 üzerine farklı kallus oluşumu için farklı hormonlar ve bitki seçimi içinde antibiyotik (1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 1mg/l Trans-Zeatin, 0,1 mg/l Askorbik asit, 0,1 mg/l GA3, 500 mg/l Sulsid 5mg/l higromisin) ilave ederek hazırlanmıştır (Çizelge 3.10). Steril kabin içinde Lady Olympia patates çeşitlerinin uygun büyüklükteki yaprak ve boğum arası eksplantları kesilerek üzerine 2 ml pCAMBIA-pRCA, pCAMBIA-pRD29A ve pCAMBIA-1301 vektörlerini içeren *A. tumefaciens* LBA-4404 hattına ait sıvı bakteri şusu eklenerek 45 dakika inokülasyon edilmiştir. İnoküle edilen eksplantlar (yaprak ve boğum arası) daha sonra ko-kültivasyon ortamına aktarılarak 3 gün boyunca büyütme kabininde ko-kültivasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyonu tamamlanan eksplantlarda bakteri büyümesi gösterdikten sonra, başta histokimyasal GUS analiz uygulayarak bakterilere aktardığımız plazmidlerinin çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. Ardından inoküle olan eksplantları steril kabin içerisinde steril saf su üzerine

Sulcid antibiyotiğini kullanarak bakterilerden uzaklaştırma işlemi yapılarak steril kağıt üzerinde kurutulmuştur. Yapraklar çabuk kuruduğu için başta yaprakları ardından boğum arasını RSM seleksiyon ortamına aktararak bitki büyüme kabine yerleştirilmiştir. RSM ortamında transformasyon işlemi gerçekleşen dokuları 6-7 hafta sonra eksplantların üzerinde hem higromisine dayanıklı kallus sayımı hem de higromisine dayanıklı sürgün sayımı yapılmıştır. Gelişen transgenik aday sürgünleri daha sonra 5 mg/l higromisin ve içeren MS-0 besin ortamında köklendirilmiştir.

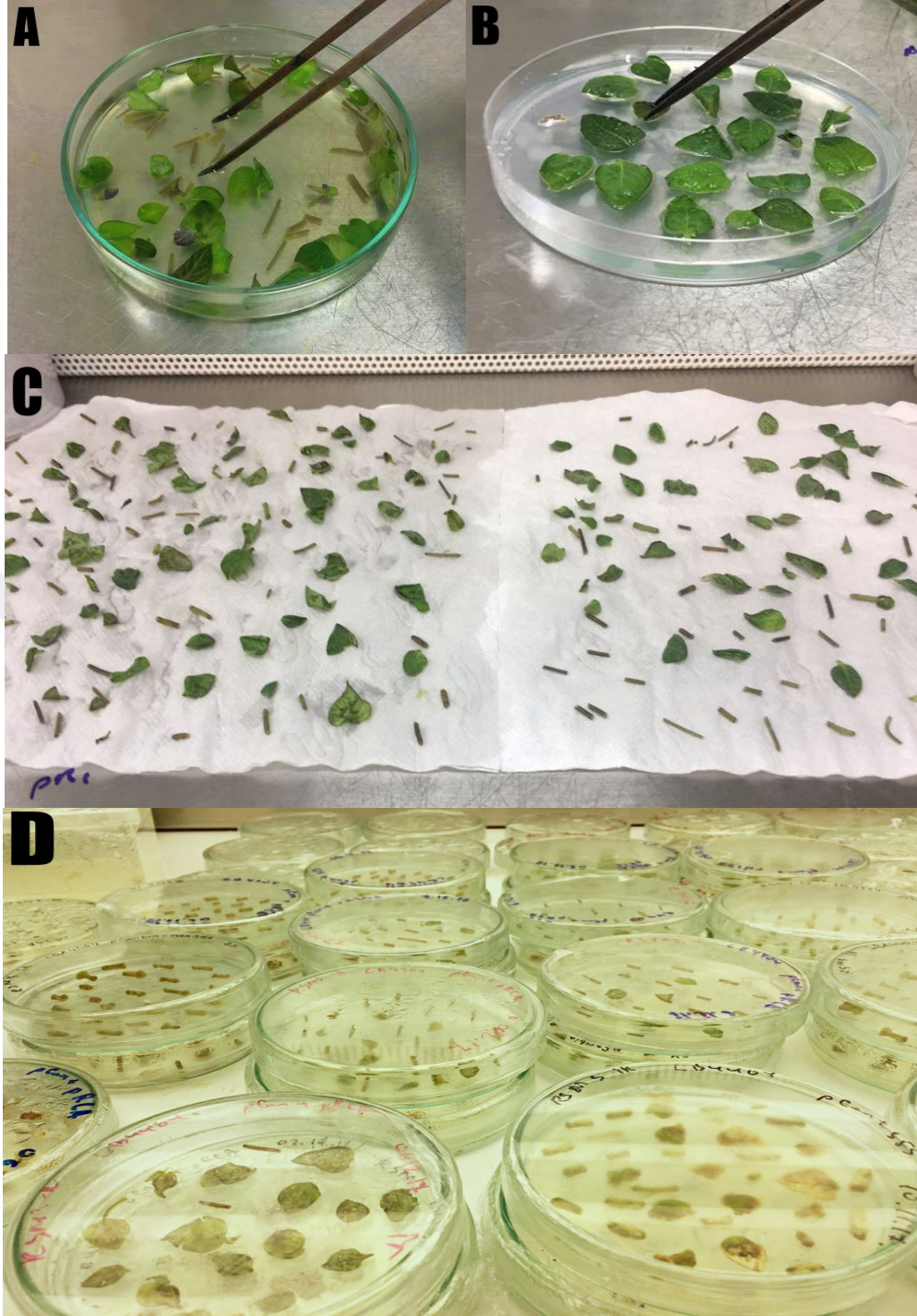
**Çizelge 3.9.** Ko-kültivasyon ortam içeriği

<b>Karışım içeriği</b>	<b>Miktarı</b>
MS Tuz ile vitaminler	4.4g/L
Şeker (Sucrose)	30g/L
Agar	8g/L
Asetosyringone	50mg/L

} 5,7 pH

**Çizelge 3.10.** RSM ortam içeriği

<b>Rejenerasyon Seçim Ortamı (RSM)</b>	
MS Tuz ile vitaminler	4.4g/L
Şeker (Sucrose)	30g/L
Agar	8g/L
BAP (6-benzyl amino purine)	2mg/L
NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid)	0.2mg/L
Kinetin	1mg/L
Trans zeatin	2mg/L
Askorbik Acid	100mg/L
Higromisin	5mg/L
Sulcid acid	500mg/L



**Şekil 3.6.** *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım aşamaları. A) Sıvı bakterili LB besin ortamda patates yaprak ve boğum aralarının kesilip bekletilmesi. B) Örneklerin ko-kültivasyon ortamına aktarımı. C) Sulfidle sterilizasyonu yapılan örneklerin kurutulması. D) RSM ortamında büyütülmesi.

Rejenerasyon seçim ortamında eksplantların büyümesinden altı hafta sonra, oluşturulan kallusları sürgün başlatıcı ortamına transfer edildi. Bu ortamda kullandığımız antibiyotiğin yani Sulsid asitin miktarı azaltılmıştır. Çünkü bakteri transferinin ardından 5-6 hafta geçtikten sonra bitki gelişmesine olumsuz etki edebilir. Higromisin’de aynı şekilde 5mg/L den 2mg/L’e azaltılmıştır. Sürgünlerin daha iyi büyümesi için ise GA3 (Gibberellik asit) hormonunu ilave ettik.

**Çizelge 3.11. Sürgün oluşturma ortam içeriği**

<b>Sürgün oluşturma ortam</b>	
MS Tuz ile vitaminler	4.4g/L
Şeker (Sucrose)	30g/L
Agar	8g/L
BAP (6-benzyl amino purine)	2mg/L
NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid)	0.2mg/L
GA3 (Gibberellik asit)	0.1mg/L
Higromisin	2mg/L
Sulcid acit	300mg/L

Kalluslar sürgün oluşturma ortamında 3-5 hafta sonra sürgün oluşturmaya başladıktan sonra sürgünlerden tam bitki oluşturmak için kök oluşum ortamına aktarıldı. Bu ortam normal MS-0 bitki besin ortamı fakat aday transgenik bitkiler higromisine dayanıklı olduğu için 1mg/L ilave edildi (Çizelge 3.12).

**Çizelge 3.12. Kök oluşum ortamının içeriği**

<b>Kök oluşum ortamı</b>	
MS Tuzvitaminlerle (Salt with vitamins)	4.4g/L
Şeker (Sucrose)	30g/L
Agar	8g/L
Higromisin	1mg/L

### 3.2.3 Transgenik aday bitkilerinden doğrulama yöntemleri

#### 3.2.3.1 Histokimyasal GUS analizi

Transgenik aday bitkiler köklenerek 4-5 boğum halinde büyüdüktan sonra yaprak ve boğum aralarından ilk histokimyasal GUS analizini yaparak pozitif bitkiler seçilmiştir. Histokimyasal GUS analizi solüsyonu çizelge 3.13’da verilmiştir. Steril kabin içerisinde 1,5 ml ependorf tüplere 500 µl GUS solüsyonu katarak üzerine yaprak, gövde ve köklerden eksplant eklenmiştir. Hazırlanan deneyi ışıktan korumak için alüminyum folyo ile tüpleri kaplayarak +37°C’de inkübe edilmiştir. GUS geni yaklaşık 1 saat sonra ifadesini göstermeye başlamıştır. Gece boyu beklettikten sonra solüsyonu dökerek eksplantların üzerine %70 alkol eklenerek bilgisyara bağlı (Leica M165C) mikroskop altında görüntü alınmıştır.

**Çizelge 3.13.** Histokimyasal GUS solüsyon içeriği

Stok	10 mL	25 mL	50 mL
X-Gluc içinde DMF, 5 mg/mL	1 mL	2,5 mL	5 mL
NaPO <sub>4</sub> Tamponu 1,200 mM	950 µL	2,38 mL	4,75 mL
NaPO <sub>4</sub> Tamponu 2,200 mM	4,05 mL	10,13 mL	20,25 mL
Triton X-100	10 µL	25 µL	50 µL
dH <sub>2</sub> O	4 mL	10 mL	20 mL

#### 3.2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Histokimyasal GUS analizi sonucu pozitif çıkan bitkileri 2-3 hafta *in vitro* ortamda büyüdüktan sonra istediğimiz farklı promotörlerin transformasyonu gerçekleştiğini PCR yöntemiyle doğrulamak için DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonunda aşağıda protokolde gösterildiği gibi CTAB yönteminden yararlanmıştır (Doyle ve Doyle, 1987).

CTAB yönteminde kullanılan tamponlar ve kullanımı: %2(w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide) proteinlerin nükleik asitlerden ayrılmasında ve nükleaz inhibisyonunda rol oynamaktadır. Bitki DNA izolasyonunda çok tercih edilen bir

deterjandır. 1,4 M NaCl ise nükleik asitlerin çökmesini sağlamaktadır. Nükleazlardan koruma yapan ve proteinleri denature etmesinde ise % 0.2 (v/v) β-merkaptoetanol büyük rolü vardır. Aynı zamanda, 20 mM EDTA DNaz enzimini inaktif etmektedir. Solüsyonun pH'sını sabitlemek için 100 mM Tris-HCl (pH 8) kullanılmaktadır.

Başta toplanan genç yapraklar sıvı azot ile parçalanmıştır. Homojen hale gelen dokulardan 100 mg CTAB tamponundan 500 µl eklenerek karıştırılmıştır. Ardından karışımı 65°C'de 60 dakika 800 rpm'de inkübe edilmiştir. Homojen hale gelen karışıma CTAB tamponu ile aynı oranda kloroform eklenerek karıştırılmıştır. Örnekleri 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. İki fazdan oluşan karışımın üst sıvı (supernatant) fazı yeni 1,5 ml tüplere aktarılmıştır. -20°C muhafaza edilen soğuk İzopropanol'dan 500 µl üzerine ekleyerek tekrar karıştırarak 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Pellet oluşuktan sonra üst sıvı kısmı atılarak pelet üzerine %75'lik etanol eklenerek tekrar karıştırılarak, 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Pelletlere dikkat ederek üst faz atılmıştır. Tüplerin ağzı açık bir şekilde kurutma makinesinde 15 dakika kurutulmuştur. Pellet DNA'lar kuruduktan sonra 60 µl TE tamponunda çözülmüştür.

Spesifik promotör (*pCAM90*, *pRCA*, *pRD29A*) ve GUS geninin primerleri ile PCR yapılmıştır. PCR aşamasından sonra %1 agaroz Jel elektroforez ile sonuçlar 120 W 30 dakika koşturulduktan sonra UV görüntüleme cihazı ile sonuçlar alınmıştır.

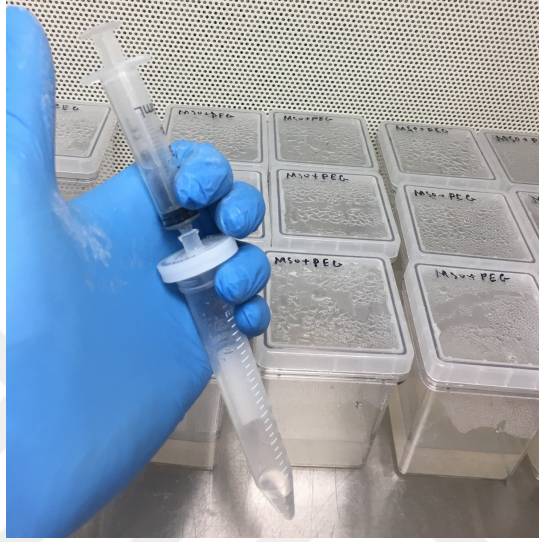
### **3.2.3.3 Transgenik aday bitkilerinin gen ifadesini belirlemek için yetiştirme koşulları**

#### **3.2.3.3.1 Kuraklık ve yüksek sıcaklık uygulaması (*pRD29A*)**

Strese duyarlı *pRD29A* promotörü transformasyonu gerçekleştirilen Lady Olympia patates çeşitinde kuraklık stresi uygulamak için Duchefa Biochemie firmasının Polyethylene Glycol (PEG) 6000 (ürün no:P0805.5000) kullanıldı. Kuraklık stresinde magenta (GA-7 autoclavable) kaplarında 50 ml MS0 bitki besin ortamı üzerine %20 PEG'den steril filtrelerden geçirip, 25 ml ekleyerek 1 gün besin ortamın absorbe etmesi için beklettik (Şekil 3.7). PEG hazırlanması aşağıda Çizelge 3.14'da verilmiştir. Normal MS-0 ve MS0/PEG besin ortamları *pRD29A* promotörünü içeren transgenik bitkileri kök ve sürgün oluşumu için 2 boğum şeklinde alt kültüre alınmıştır.

**Çizelge 3.14.** Kuraklık stresi için %20 PEG hazırlanması

Karışım içeriği	Miktarı
PEG H(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> OH=6000	20 gr
Distril H <sub>2</sub> O	80ml



**Şekil 3.7.** MS-0 üzerine %20 PEG solüsyonu eklenmesi

**Çizelge 3.15.** Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren transgenik patateslerinin yetiştirme koşulları

N:	Deney ismi	Besin ortamı	Büyüme koşulu	Stres
1	Kontrol	MS0	25 °C'de 10 gün	25 °C'de 2 gün
2	Kuraklık	MS0+PEG	25 °C'de 10 gün	25 °C'de 2 gün
3	Kuraklık+Y.sıcaklık	MS0+PEG	25 °C'de 10 gün	35 °C'de 2 gün
4	Yüksek sıcaklık	MS0	25 °C'de 10 gün	35 °C'de 2 gün

Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren Lady Olympia transgenik aday patates hatlarını çizelge 3.15'de belirtildiği gibi dört farklı bitki büyüme koşullarında üç tekerrür şeklinde yapıldı. Her magenta (GA-7) kutusunda 4 bitki yerleştirdik. Bitki büyüme kabinin sıcaklığını gece-gündüz +35°C'ye ayarlayarak seçilen bitkiler iki gün bu kabinde yetiştirildi.

### 3.2.3.3.2 Konstitütif ve yeşil dokuya özgü promotörleri içeren aday transgenik patateslerin yetiştirme koşulları

Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü ve konstitütif *35S CaMV* promomotörünü içeren aday transgenik patatesleri *in vitro* ortamından *in vivo* ortamına aktardık. MS-0 ortamda köklerinde ışık alarak sonuçlarda hata olabilir diye yaklaşık %65 torf ve %35 perlit karışımı ortamda 2,5 ay bitki büyütme kabinin içinde büyüttükten sonra örnekler sıvı azot içinde hem yaprak hem de kök yumrularından örnek alınmıştır. Konstatif *35S CaMV* promotörünü içeren patates hatları ile *pRCA* promomörünü içeren hatlarının hem kök hem de yapraklarını bir birine karşılaştırarak *pRCA* promotöründe GUS genin aktivitesi belirlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Yeşil dokuya özgü *pRCA* transgenik patatesler

### 3.2.3.4 GUS fluorogenik assay analizi

GUS geninde genellikle spektrofotometrik substratlar mevcut olmasına rağmen, çözelti içindeki GUS aktivitesi florometrik substrat 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glukuronid (MUG) ile ölçülür. Florometrik spektrofotometriyle göre büyük ölçüde artan hassasiyeti ve geniş dinamik aralığı nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntem, son derece

güvenilir ve kullanımı kolaydır. Kullanılan substrat 4-triflorometil belliferil- $\beta$ -D-glukuronik asit (4-TFMUG), GUS protein aktivitesinin sürekli izlenmesini sağlar, bundan dolayı MUG'den farklı olarak, deneyin pH'ında hidroliz üzerine floresan olur. Bunu önlemek için ise, MUG'nin GUS ile hidrolizinden sonra, reaksiyonu bazik çözelti ile bitirmelidir. Bu durum hem enzim reaksiyonunu durdurmasını sağlar hem de floresansa da neden olur (Paul, 2018).

Fluorometrik analizi için kullanılan makine fakültemiz laboratuvarlarında mevcut olmadığı için fluorogenetik assay analizini kullandık. Strese duyarlı *pRD29A* transgenik patatesleri farklı stresli ve kontrol yetiştirme koşullarında yetiştirken örnek alınarak protein izolasyonu yapıldı. Yeşil dokuya özgü *pRCA* transgenik ve konstitütif *35S CaMV* transgenik patateslerinden hem yaprak hem de kök/yumrularından örnek alarak protein izolasyonu yapıldı. Proteini yapılan transgenik patateslerden GUS fluorogenetik assay analizi yapılmıştır.

#### GUS fluorogenetik assay analizi

Transgenik bitkilerden tamamından yetiştirme koşullarına göre sıvı azot içine yaprak veya kök-yumru şeklinde örnek toplandı. Eksplantları sıvı azot içinde homojen hale getirilerek üzerine 100  $\mu$ l Ekstraksiyon Tamponunu katarak karışımı sağlandı (Çizelge3.16). Santrifüjde 14,000 rpm, +4 ° C'de 7,5 dk şeklinde yapıldı. Üst sıvı fazını yeni tüplere aktararak - 80° C derecede muhafaza ettik.

Assay tamponu: Ekstraksiyon tamponunda 1mM MUG şeklinde eklenerek ve assay tamponu hazırlandı (50 ml Ekstraksiyon Tamponunda 17,6 mg 4-Metilumbelliferil- $\beta$ -D-glukuronid (MUG) eklendi).

Elde edilen proteinlerden 50  $\mu$ l alarak 0,5 ml assay tamponunu üzerine eklendi ve +37°C'de inkübe edildi (Her transgenik bitkiden 3 tekerrür şeklinde örnek hazırlandı). Bir saat, üç saat, ve bir gece şeklinde +37 °C de inkübe edilen örneklerin üzerine üzerine 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stop tamponunu ekleyerek reaksiyonu durdurduk (dH<sub>2</sub>O içinde 21.2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözülerek 1 litreye tamamlandı). Durdurulan reaksiyonu UV ışıklar altında sonuçları inceleyerek görüntü alındı.

**Çizelge 3.16.** Protein ekstraksiyon tamponu

<b>N:</b>	<b>Tampon içeriği</b>
1	50mM Fosfat Tamponu, pH 7,0
2	10mM dithiothreitol (DTT)
3	1mM Na <sub>2</sub> EDTA
4	% 0,1 Sodyum Lauryl Sarcosine
5	% 0,1 Triton X100

Alınan görüntülerin 1,5 ml ependorf tüplerde GUS protein solüsyonunu içeren kısmına odaklayarak renk seçici (Color Picker) programında göre kırmızı, yeşil, mavi (RGB) renk pigmentlerine göre veriler sayı şeklinde aktarılmıştır.

#### **3.2.3.4 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR)**

Farklı stres ve kontrol koşullarda yetiştirilen *pRD29A* transgenik patateslerden sıvı azotla örnek alınmıştır. Yeşil dokuya özgü *pRCA* ve konstitütif *35S CaMV* transgenik patateslerde hem yaprak hem de kök/yumrulardan sıvı azotla örnek toplanmıştır. Trizol RNA izolasyonu protokolü sayesinde toplanan örneklerden RNA izolasyonu aşağıda sunulduğu gibi yapılmıştır. Toplam RNA izolasyonu için TRIzolReagent kullanılmıştır (Life teknoloji, katalog no:15596-018).

#### Trizol RNA izolasyonu

Transgenik patateslerden farklı yetiştirme koşulları ve farklı dokularına göre toplanan örnekleri havan içinde sıvı azotla homojen hale getirdik. Homojen hale gelen dokulardan 0,1g alarak üzerine 1 ml trizol tamponunu ekleyerek karışmasını sağladık. Artından oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve 15,000 rpm +4 °C'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Yeni tüplere üst sıvı kısmı (süpernetant) alınmıştır. Üzerine 300 µl kloroform ekleyerek ters düz şekilde karışımı yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekleterek 15 dakika 15,00 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Yeni tüplere üst sıvı kısmı (süpernetant) alınmıştır. -20 °C derecede muhafaza edilen izopropil alkolden 500 µl süpernetant üzerine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 dk bekleterek 10 dakika 15,00 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı kısmı (süpernetant) dökülmüş ve pellet kısmına

%75 etanolden 1 ml eklenmiştir (Pellet kısmını yıkamak için). 15,000 rpm 4 °C derecede 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı kısmı (süpernetant) dökülmüş ve vakumda 10 dakika pelletleri kurutmak için bekletilmiştir. Tamamen kuruması sağlanan pelletleri 60 µl DEPC suda çözülmesi sağlandı. Toplam RNA'a izolasyonundan sonra DNA'ları uzaklaştırma işlemi yapılmıştır. DNA uzaklaştırma işlem içeriği çizelge 3.17'de verilmiştir.

**Çizelge 3.17. DNaz uygulaması**

<b>Reaksiyon içeriği</b>	<b>Miktar</b>
RNA	1 µg
10× Reaction Buffer (MgCl <sub>2</sub> içeren)	1 µl
DNaz I, RNaz free	1 µl (1U)
dH <sub>2</sub> O	10 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımını +37 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra, 50mM EDTA'dan 1 µl ekleyerek 10 dakika +65 °C'de bekletildi. Bu aşamada RNA kenetleme maddesi, katyonlarla ısıtma sırasında hidrolize olur.

Kalan saf RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır. Ters transkripsiyonda toplam RNA'ları (200 ng/ul) 0,2 µg konsantrasyona sabitleyerek oligo (dT)<sub>18</sub> (Thermoscientific Lot:00330692), primerlerinden 1 µl ekleyerek toplam hacimi nukleazsız su ile 11 µl'ye tamamladık. Karıştırarak +65 °C'de 5 dakika beklettik. Artından 5X reaksiyon tamponundan (Thermo scientific Lot:00230154) 4 µl, RiboLockRNaz inhibitöründen (Thermo scientific Lot:00331041) 1 µl, 10 mM dNTP mix'de 2 µl ve son olarak ters transkripsiyon enzimini (RevertAid Reverse Transcriptase Thermo scientific REF: EP00441) ekleyerek reaksiyonu +37 °C'de bir saat beklettik. Tamamlanan cDNA'da Enzimleri inaktif etmek için +70 °C'de 5 dakika bekleterek qPCR için hazır cDNA'ları -20 °C'de muhafaza ettik.

**Çizelge 3.18.** qPCR’da kullanılan primer dizileri

No	Primer	Primer sekansı (5’-3’)	Boyutu
1	gusF-RT1 gusR-RT1	TACCGACGAAAACGGCAAGA CAGACGCGTGGTTACAGTCT	158 bp
2	gusF-RT2 gusR-RT2	CACACCGATACCATCAGCGA GCTAACGTATCCACGCCGTA	179 bp
3	ef1a-F ef1a-R	ATTGGAAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	101 bp
4	18S rRNA-F 18S rRNA-R	GGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGAG CGGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT	101 bp

Seçilen transgenik bitkileri yetiştirme koşullarına göre RNA izolasyonundan sonra hazırlanan cDNA’ları 1:10 şeklinde seyrelterek qRT-PCR için kullandık. Gerçek zamanlı kantitatif PCR’da (qRT-PCR) kullandığımız master mix (*BIO-RAD*, iTaq™ Universal SYBR GreenSupermix Con:64079848, katalog no:172-5121). Çizelge 3.14’de qRT-PCR içeriği verilmiştir.

**Çizelge 3.19.** qRT-PCR içeriği

qRT-PCR içeriği	Miktar (µl)
Master Mix (2X)	5,0
F Primer (5 µM)	0,4
R Primer (5 µM)	0,4
ddH <sub>2</sub> O	1,7
cDNA (1:10)	2,5
Toplam	10

**Çizelge 3.20.** qRT-PCR sıcaklık döngüsü

Basamak	İşlevi	Sıcaklık (°C)	Süre (sa:dk:sn)	Döngü
1	Taq Polimeraz aktifleştirme	95	0:15:00	-
2	DNA denatürasyonu	95	0:00:10	40
3	Primer bağlama	55-60	0:00:15	
5	Yeni DNA zincir sentezi	72	0:05:00	
7	Erime eğrisi analizi	70°C'den 99°C'ye, 1,0°C aralıkla	00:00:05	-

Strese duyarlı *pRD29A* transgenik bitkileri için housekeeping *ef1a* geninin ifadesine bakılmıştır. Yeşil dokuya özgü *pRCA* ve konstitütif *35S CaMV* transgenik patateslerde hem *ef1a* hem de 18S rRNA housekeeping genlerinin ifadesine bakılmıştır. Gen ifade analizi için Rotor-Gene Q (QIAGEN) cihazı ve cihazın yazılımı kullanılmıştır. Gen ifadesinin oransal değişimi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemine göre hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

### 3.2.4 İstatistiksel analizler

GUS protein aktivitesi ve gen ifade analiz sonuçlarını Statistix (Analytical Software, USA) programının 8.1 yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) uygulayarak, ardından çoklu karşılaştırma (post-hoc) olarak da LSD (en önemsiz fark) yöntemi kullanılarak % 5 seviyesinde analiz edilmiştir.

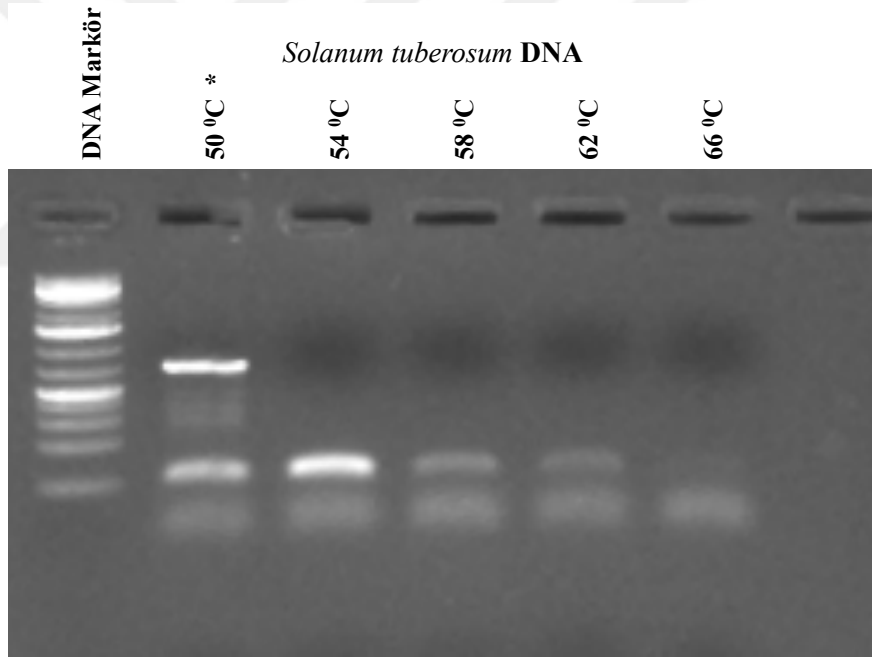
## BÖLÜM IV

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1. Klonlama

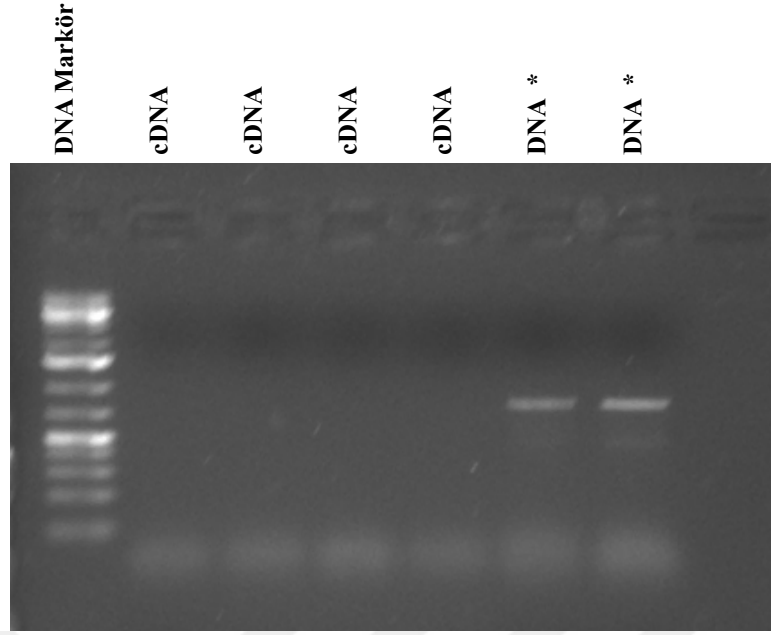
##### 4.1.1 *pRCA* ve *pRD29A* promotörleri PCR'ile çoğaltılması

Yeşil dokuya özgü promotörü *pRCA* Lady Olympia patates çeşidinin toplam DNA'sından *pRCA* promotörüne (GTS) spesifik primer ile başta 50-66 °C aralığında gradient PCR yapılarak optimum annealing sıcaklığı +50 °C derece olarak belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *pRCA* gradient PCR sonuçları

Strese duyarlı *pRD29A* promotöründe ise *Arabidopsis thaliana* bitkisinin toplam cDNA ve DNA'sından *pRD29A* promotörüne spesifik (SIP) primeri ile PCR yapıldı (Şekil 4.2). Promotörler transkripsiyonun başlatan bölge olduğu için cDNA'da promotör bölgesi yoktur. PCR doğrulama *A. thaliana* toplam DNA'sında varken cDNA'sında ise bulunmadığı belirlendi.

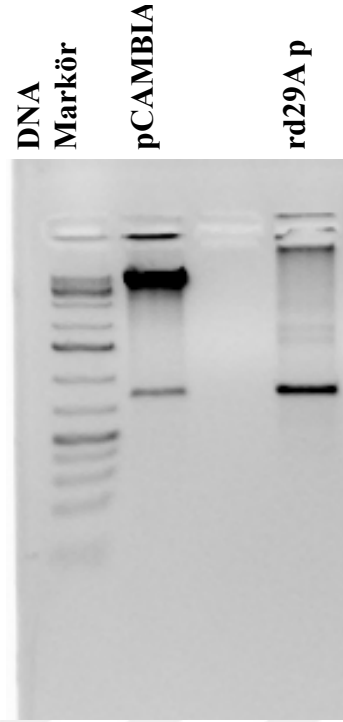


**Şekil 4.2.** *Arabidopsis thaliana* bitkisinden *pRD29A* promotörlerinin belirlenmesi

Elde edilen *pRCA* ve *pRD29A* promotörlerinin PCR sonuçları %1'lik agaroz jel elektroforezde 120 V'da 45 dakika koştuktan sonuçları analiz ederek şekil 4.1 ve şekil 4.2 yıldız ile işaretlenen bantları jelden saflaştırma yapılmıştır.

#### **4.1.2 pCAMIA1301 plazmidi ile *pRCA* ve *pRD29A* promotörlerinin *KpnI* ve *NsoI* restriksiyon enzimleri kesilmesi ve ligasyonu.**

Promotörleri elde etmek için kullandığımız primerlerini dizayn ederken 5' ucuna *KpnI* ve 3' ucuna ise *NsoI* restriksiyon enzimleri gelecek şekilde tasarlandı. Agaroz jelden saflaştırılan *pRCA* ve *pRD29A* promotörlerinin uçlarından ve pCAMBIA-1301 plazmidininin ise *35S CaMV* promotörünü kesecek şekilde *KpnI* ve *NsoI* restriksiyon enzimleriyle +37 °C 1 saat bekleterek kesimi yapılmıştır (Şekil4.3).

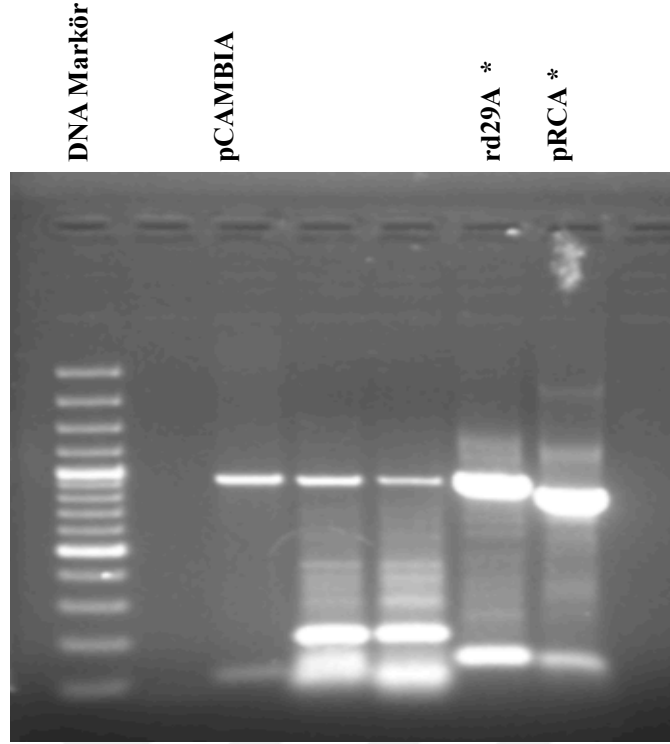


**Şekil 4.3.** *KpnI* ve *NsoI* restriksiyon enzim uygulaması

Normalde pCAMBIA-1301 plazmidinin toplam büyüklüğü 11,849 bç boyutunda. Restriksiyon enzim uygulaması ardından 11,045 bç ve 804 bç şeklinde iki bant oluştu. Bizim istediğimiz bant ise büyük kısmı olan 11,045 bç büyüklüğünde olan bant ve promotörlerde ise sadece uçlarından kesildiği için normal bir bant gözükmemektedir. Restriksiyon enzim uygulamasının sonuçları %1'lik agaroz jel elektroforezde 100 V'da 40 dakika koşturduktan sonra belirlenen bantları jelden saflaştırma yapıldı.

#### 4.1.3 Ligasyon

Rekombinant plazmid oluşturmak için restriksiyon enzimleri sayesinde hazırlanan *pRCA* ve *pRD29A* promotörleri ile pCAMBIA-1301 plazmidininin 11,045 bç büyüklüğündeki kısmını ligaz enzimiyle birleştirilmiştir. Sonuçları PCR yöntemini kullanarak pCAM90 primeri ile doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.4).

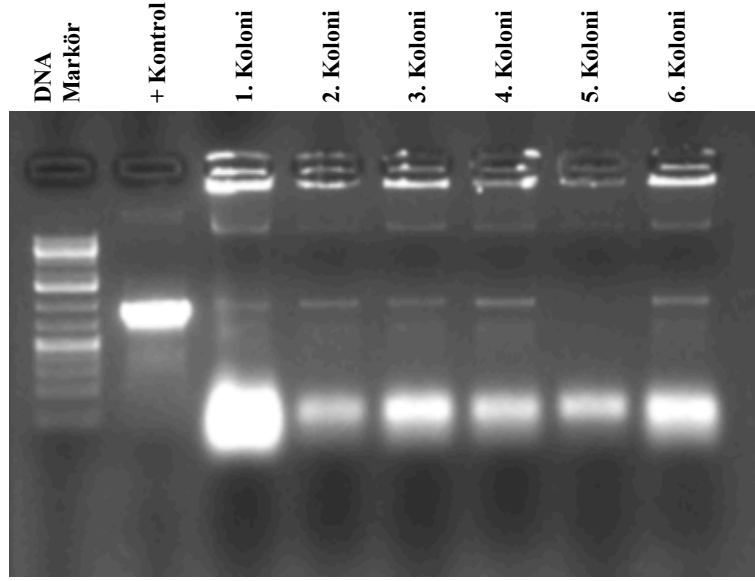


**Şekil 4.4.** pCAMBIA-pRCA ve pCAMBIA-pRD29A rekombinant plazmidlerinin ligasyon doğrulması

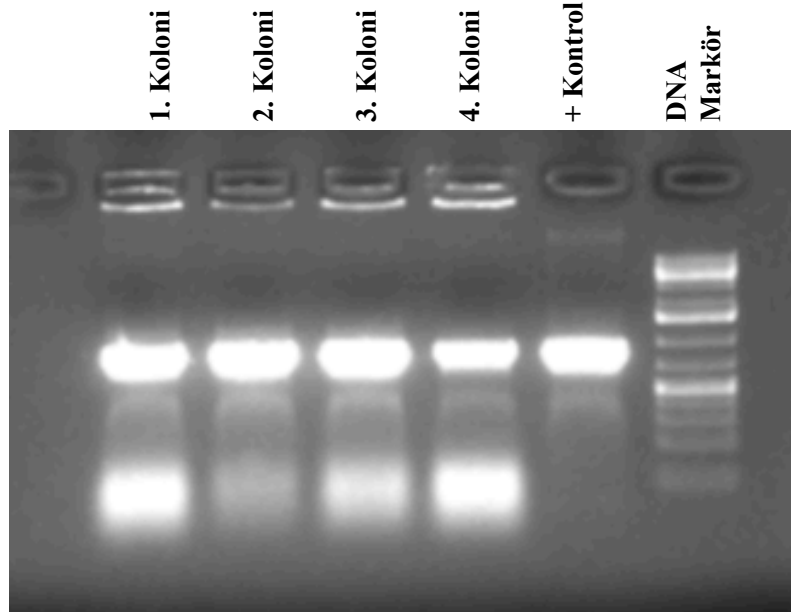
Ligasyon sonucunda pCAM90 primeri ile doğrulanma sonuçlarında görüldüğü gibi özgün pCAMBIA-1301 plazmidinde *35S CaMV* promotörü ve RE kesim bölgeleri ile 926 bç büyüklüğünde görülmektedir. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidinde ise 946bç büyüklüğünde bir bant gözükmemektedir. Son olarak rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinde ise 853 bç bant ile diğerlerinden biraz küçük olarak belli oluyor.

#### **4.1.4 Rekombinant plazmidlerini JM109 *E.coli* kompetent hücrelerine transformasyonu**

Ligasyon sonrası oluşan rekombinant pCAMBIA-pRD29A ve pCAMBIA-pRCA plazmidlerini JM109 *E.coli* kompetent hücrelerine ısı şoku ile transformasyon yaparak kanamisin içeren LB agar bakteri besi ortamında bir gece +37 °C 'de büyüttükten sonra oluşan kolonilerden pCAM90 primeri sayesinde koloni PCR yapıldı ve pozitif kontrol olarak transformasyonda kullanılan ligasyon sonucu oluşan rekombinant plazmidler kullanıldı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

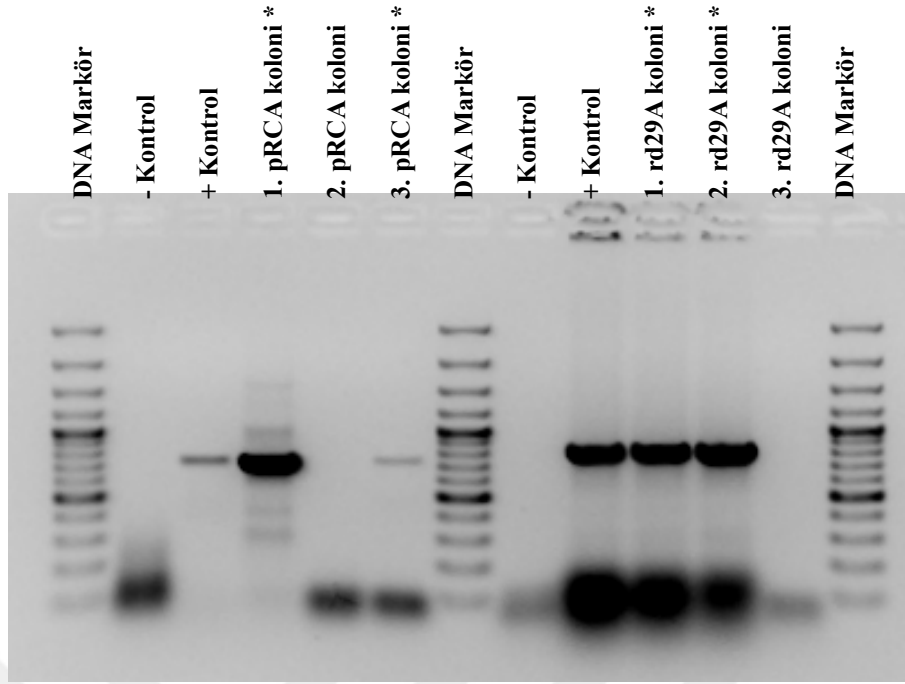


Şekil 4.5. pCAMBIA-pRCA rekombinant plazmidlerinden koloni PCR. Pozitif kontrol *pRCA* ligasyon solüsyonu.



Şekil 4.6. pCAMBIA-pRD29A rekombinant plazmidlerinden koloni PCR. Pozitif kontrol *pRD29A* ligasyon solüsyonu.

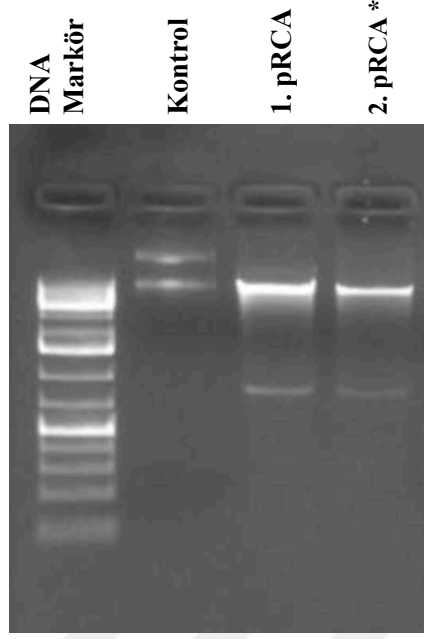
Birinci koloni PCR'larından çıkan pozitif kolonilerden ilk üç koloniye seçerek tekrar spesifik promotör primerleri ile koloni PCR yapıldı. Pozitif kontrol olarak orijinal promotör kaynakları kullanıldı.



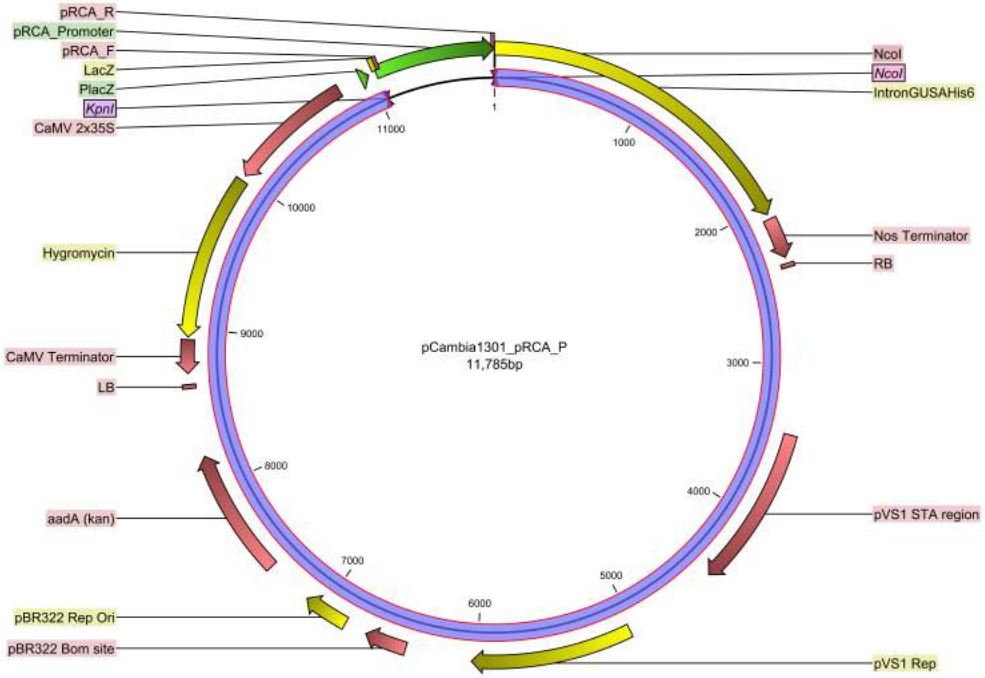
**Şekil 4.7.** pCAMBIA-pRCA ve pCAMBIA-pRD29A rekombinant plazmid promotörlerine spesifik primerlerle koloni PCR. Her iki PCR’da negatif kontrol H<sub>2</sub>O ve pozitif kontrol orjinal promotör kaynakları kullanıldı.

İlk koloni PCR’da pCAM90 primerini kullanmıştık. Bu primer pCAMBIA-1301 plazmidinde *KpnI* ve *NcoI* restriksiyon enzimlerinin kestiği bölgeye yakın ama zarar vermeyen LacZ ve GUS birinci ekzon kısmına göre tasarlanmıştı. İkinci koloni PCR’da kullandığımız ise yeşil dokuya spesifik *pRCA* (GTS) primerleri pozitif kontrolde patates DNA’sı ve strese duyarlı *pRD29A* promotörüne spesifik (SIP) primerleri pozitif kontrol olarak *Arabidopsis thaliana* DNA’sı kullanıldı. Yıldız ile işaretlenen birinci koloniler seçilerek kanamisinli LB sıvı bakteri besin ortamında +37 °C 220 rpm’de gece boyu çoğaltıldı.

Seçilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılarak restriksiyon enzimleri sayesinde doğrulaması gerçekleştirildi. *EcoRI* ve *BglIII* restriksiyon enzimleri klonlamada kullandığımız *KpnI* ve *NcoI* restriksiyon enzimlerine yakın bir bölgede olduğu için bu enzimleri seçerek kullandık (Şekil 4.8 ve Şekil 4.10).



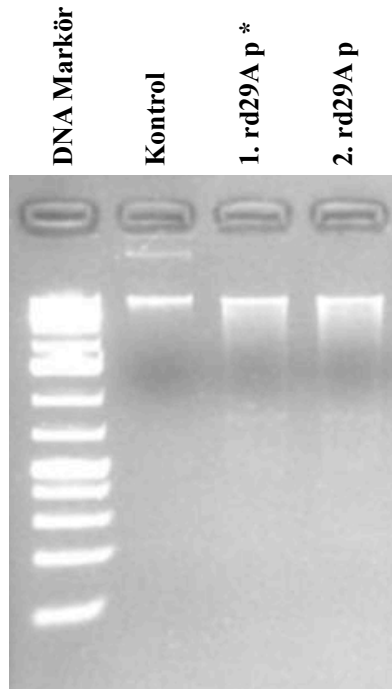
Şekil 4.8. Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidini *EcoRI* ve *BglII* restriksiyon enzimleriyle doğrulanması



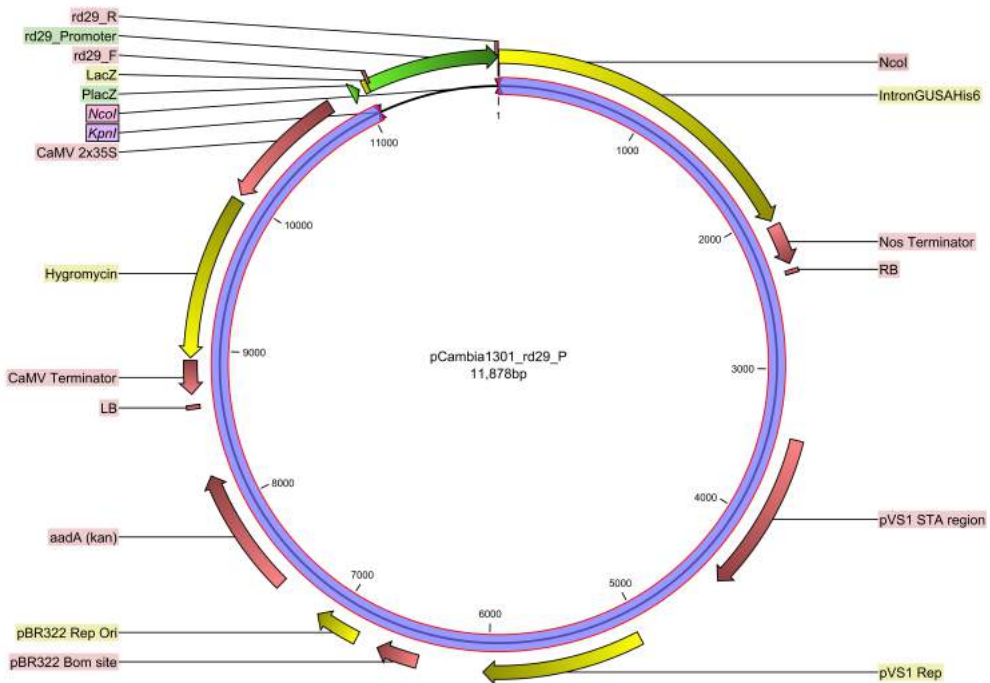
Şekil 4.9. Rekombinant pCAMBIA-pRCA vektörünün CLC sekans programı ile şematik görüntüsü

Rekombinant pCAMBIA-pRCA ve pCAMBIA-pRD29A plazmidleri *EcoRI* ve *BglII* restriksiyon enzimleri uygulandıktan sonra iki bant şeklinde bir görüntü almamız gerekiyordu, şekil 4.8. ve şekil 4.10. de görüldüğü gibi her iki plazmidlerde pozitif

olduğunu göstermektedir. Ardından yıldız ile işaretlenen kolonilerden deneylerimize devam ettik.



Şekil 4.10. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidini *EcoRI* ve *BglIII* restriksiyon enzimleriyle doğrulanması



Şekil 4.11. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A vektörünün CLC sekans programı ile şematik görüntüsü

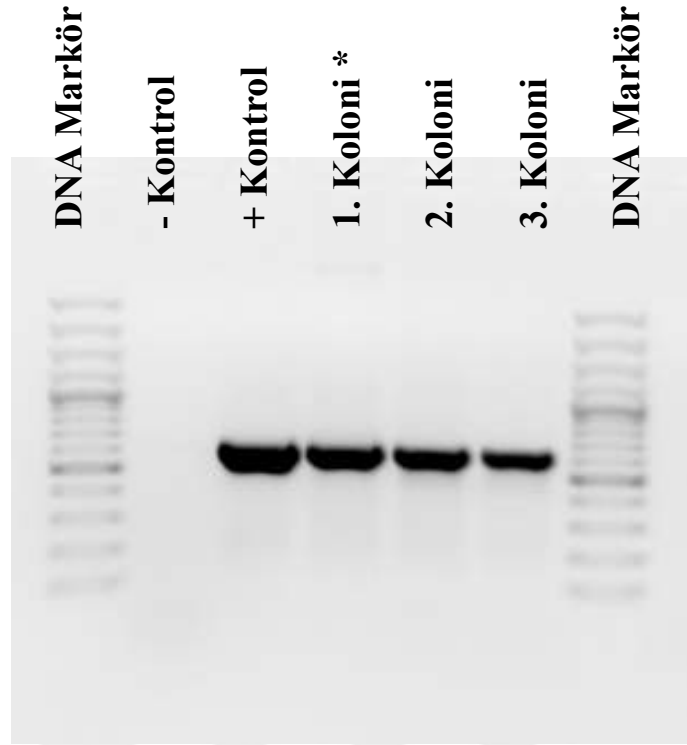
Uyguladığımız doğrulama yöntemlerinde pozitif çıktığı için bu veriler pozitif olduğuna dair yeterince delil taşıdığı için rekombinant plazmidlerinin doğrulama aşamasını yukarıdaki uyguladığımız doğrulama yöntemleriyle bitirdik.

## **4.2 Plazmidlerin LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* Elektro-Kompetent Hücrelerine Aktarılması**

Transformasyon için kullanılan plazmidlerin hepsi aynı BIO RAD (Gene PulserXcell™) elektroporasyon yöntemiyle LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerine aktarıldı.

### **4.2.1. Orijinal pCAMBIA-1301 plazmidinin LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerine aktarılması**

Özgün pCAMBIA-1301 plazmidi karşılaştırma olarak kullandığımız için LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* kompetent hücrelerine aktarıldı. Transformasyon elektroporasyon cihazı sayesinde gerçekleşti. Ardından kanamisin içeren LB agar bakteri besi ortamında bir gece +28°C derecede bir gece büyütüldükten sonra oluşan kolonilerden pCAM90 primeri sayesinde koloni PCR yapıldı (Şekil 4.12).

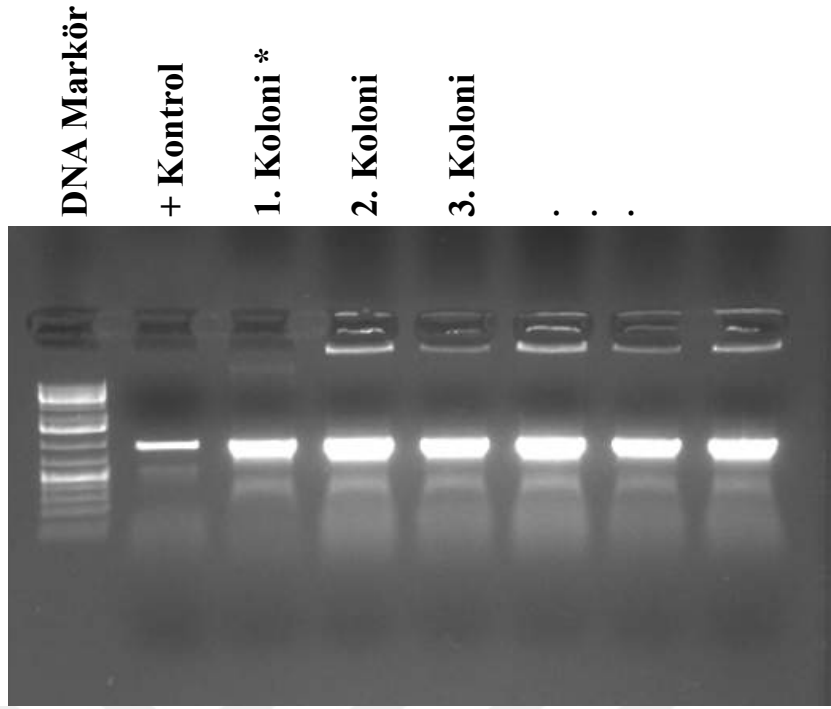


**Şekil 4.12.** Orijinal pCAMBIA-1301 plazmidinden LBA4404 agro koloni PCR

Konstitütif promotör içeren pCAMBIA-1301 plazmidini transformasyon sonrası koloni PCR doğrulaması pCAM90 primerinden yararlanıldı. Çıkan PCR sonuçlarını %1 agaroz jelde sonucunu aldık ve negatif kontrol olarak sadece H<sub>2</sub>O, pozitif kontrol olaraksa özgün pCAMBIA-1301 plazmidini kullandık. PCR sonucu 926 bç çıkan kolonilerin hepsi pozitif çıktı. Yıldız ile işaretlenen birinci koloniden deneyimizi devam ettik.

#### **4.2.2. Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinin LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerine aktarılması**

Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü içeren rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinin LBA4404 agrobakterium elektro-kompetent hücrelerine transformasyonu yapıldı. Transformasyonda 50 µl LBA4404 agrobakterium elektro-kompetent hücreleri ve üzerine 2 µl pCAMBIA-pRCA plazmidi eklenerek elektroporasyon transformasyon gerçekleşti (Şekil 4.13).

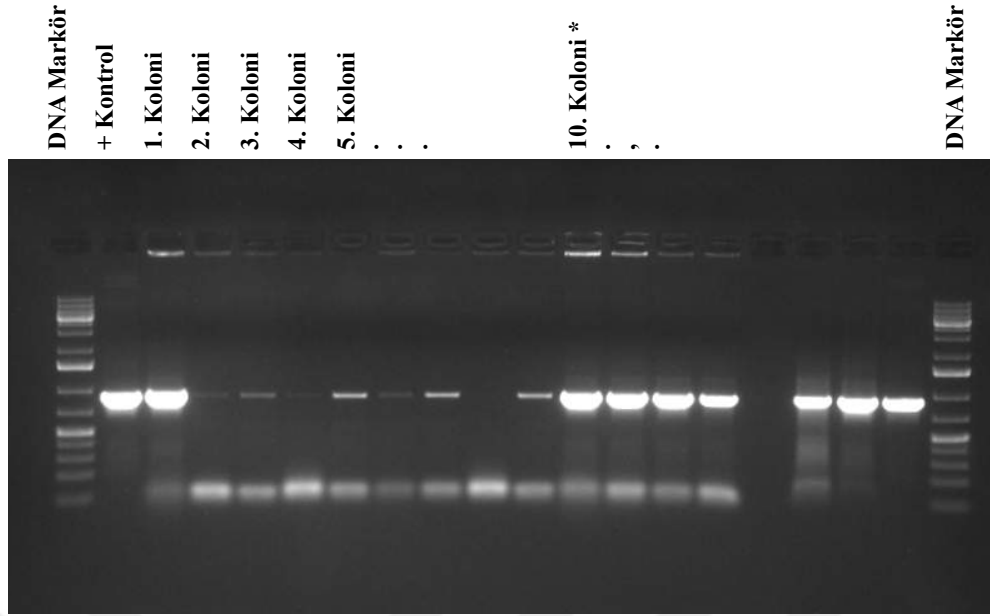


**Şekil 4.13.** Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinde LBA4404 agro koloni PCR

Rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidinin koloni PCR doğrulmasında da aynı şekilde pCAM90 primeri sayesinde yapıldı. %1 agaroz jelde 100 V'da 30 dakika koşdurduktan sonra seçilen kolonilerin hepsi 853 bp'de pozitif çıktı. Pozitif kontrol olarak rekombinant pCAMBIA-pRCA plazmidini kullandık. Sonraki deneyler için yıldız ile işaretlenen koloni numara bir kullandık.

#### **4.2.3. Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidinin LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* elektro-kompetent hücrelerine aktarılması**

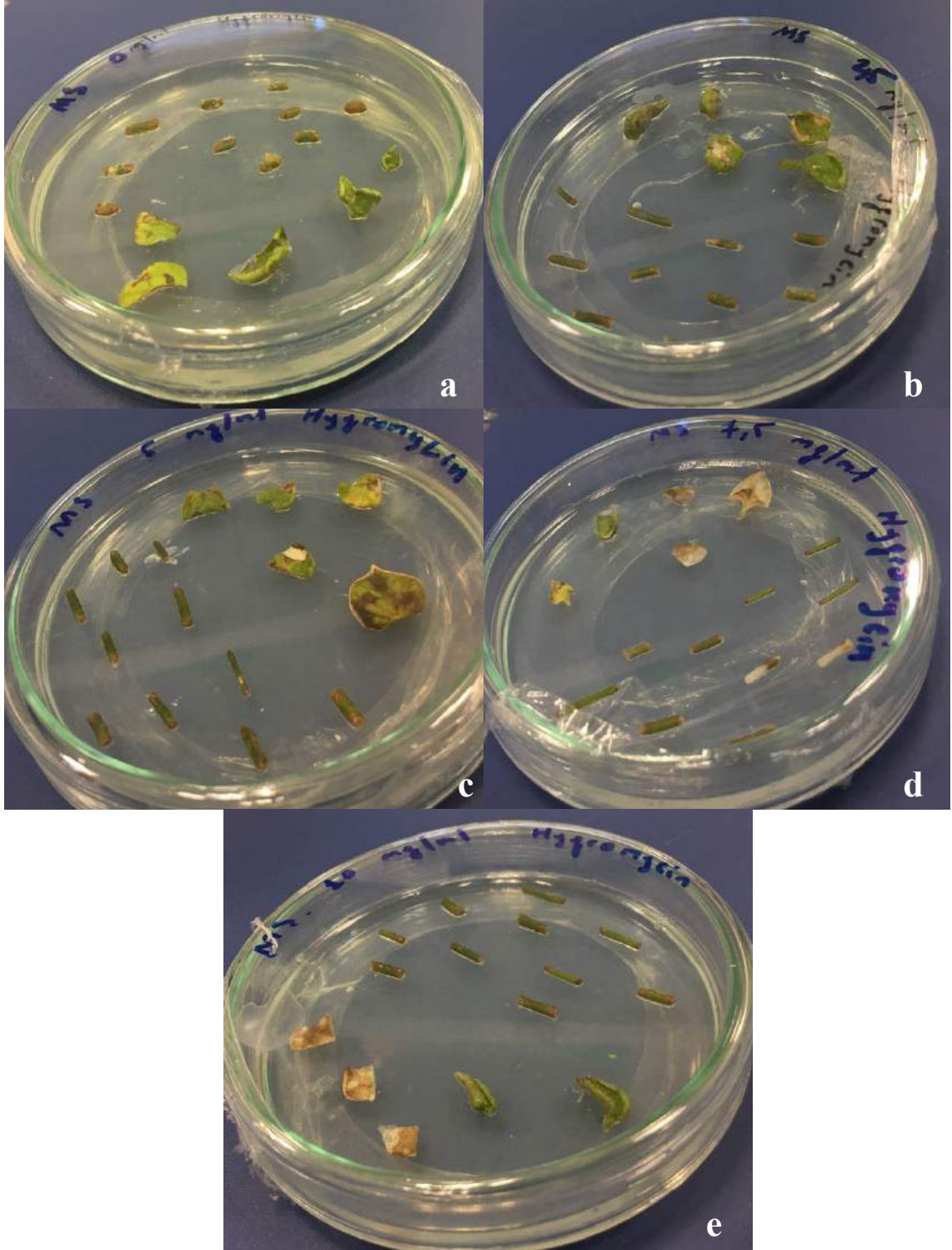
Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü aktardığımız rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidinde aynı şekilde LBA4404 *Agrobacterium* elektro-kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası hücreleri +28 °C'de LB agar kanamisinli bakteri besin ortamında bir gece büyütüldükten sonra oluşan kolonilerden pCAM90 primerleri ile koloni PCR doğrulması yapıldı (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Rekombinant pCAMBIA-pRD29A plazmidinde LBA4404 agro koloni PCR Koloni PCR sonucu %1 agaroz jelde 100 V'da 40 dakika koşturduktan sonraki görüntüsü Şekil 4.14'de görülmektedir. Pozitif kontrol olarak orijinal pCAMBIA-1301 plazmidi kullanıldı çünkü pCAM90 primerin bağlanan dizisi tezde kullanılan plazmidlerin hepsinde aktif olarak çalışabilmekteydi. Sonraki deneyler için yıldız ile işaretlenen 946 bç'de pozitif onuncu koloniden yararlanıldı.

### 4.3 Patates Bitkisinde *in vitro* Ortamda Higromisin Optimizasyonu

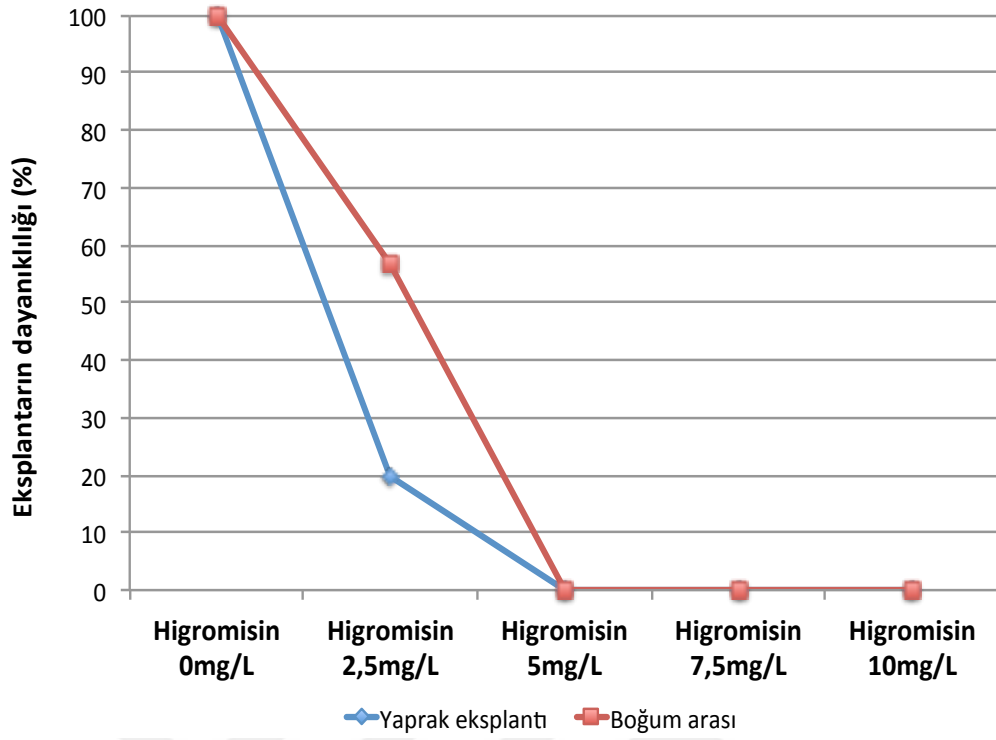
Kullandığımız pCAMBIA-1301 vektörünün bitki seçici markör geni olarak higromisin genini içeriyor. Bu yüzden transformasyon başlatmadan önce *in vitro* ortamda kullanılacak patates yaparak diski ve boğum araları eksplantlarından higromisin optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon 0-10 mg/L arası higromisin içeren beş farklı konsantrasyonda yapıldı. Her konsantrasyonda üç tekerrür 5 yaprak eksplantı, 10 boğum arası eksplantı petri kaplarda yetiştirildi.



**Şekil 4.15.** Farklı konsantrasyonda higromisin uygulaması. Kontrol (a); 2,5 mg/L higromisin (b); 5mg/L higromisin (c); 7,5mg/L higromisin (d); 10 mg/L higromisin (e).

**Çizelge 4.1.** Patates bitkisinde higromisin optimizasyonu

<b>Sıra No:</b>	<b>Antibiyotik</b>	<b>Konsantrasyon mg/L</b>	<b>Yaprak eksplantı (önce)</b>	<b>Boğum arası (önce)</b>	<b>Yaprak (sonra)</b>	<b>Boğum arası(sonra)</b>
1	Higromisin	0 mg/L	5	10	5	10
2	Higromisin	0 mg/L	5	10	5	10
3	Higromisin	0 mg/L	5	10	5	10
4	Higromisin	2,5 mg/L	5	10	1	7
5	Higromisin	2,5 mg/L	5	10	2	6
6	Higromisin	2,5 mg/L	5	10	0	4
<b>7</b>	<b>Higromisin</b>	<b>5 mg/L</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>8</b>	<b>Higromisin</b>	<b>5 mg/L</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>9</b>	<b>Higromisin</b>	<b>5 mg/L</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
10	Higromisin	7,5 mg/L	5	10	0	0
11	Higromisin	7,5 mg/L	5	10	0	0
12	Higromisin	7,5 mg/L	5	10	0	0
13	Higromisin	10 mg/L	5	10	0	0
14	Higromisin	10 mg/L	5	10	0	0
15	Higromisin	10 mg/L	5	10	0	0

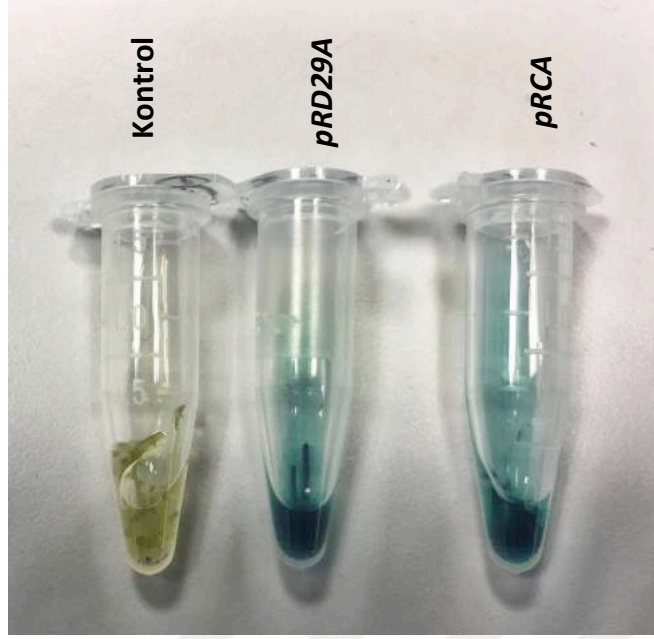


**Şekil 4.16.** Patates bitkisinde higromisin optimizasyonu

Higromisin optimizasyonunda Lady Opympia patates çeşidi kullanıldı. Sonuç olarak MS-0 besin ortamında 5 mg/L, 7,5mg/L, 10 mg/L higromisin konsantrasyonunda hiç bir yaprak ve boğum arası hayatta kalmamıştır. Bunlardan 5 mg/L higromisin RSM ortamı için optimum konsantrasyon olarak seçildi.

#### **4.4 *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Lady Olympia Patates Çeşidinin Promotörlerin Transformasyonu**

Başta promotörler ve GUS geninin çalışıp çalışmadığını analiz etmek için gen aktarımı sırasında ku-kültivasyon ortamında 2-3 gün beklettikten sonra RSM ortamına aktarmadan önce histokimyasal GUS analizi yapıldı (Şekil 4.17).



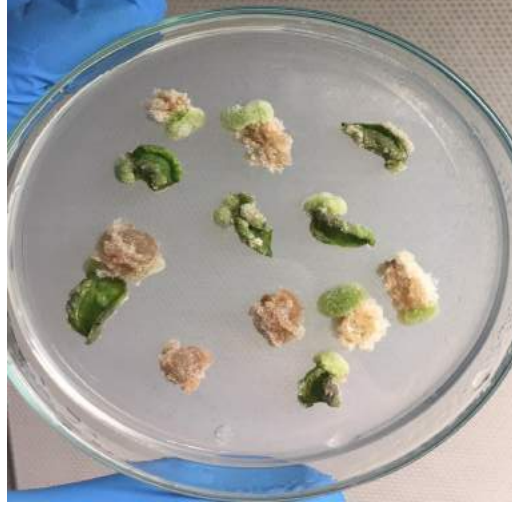
**Şekil 4.17.** Transformasyon sonrası histokimyasal GUS analizi

Histokimyasal GUS analizi sonucu pozitif çıktıktan sonra transformasyon deneylerine devam edildi.

Transformasyonu gerçekleştiren yaprak ve boğum araları RSM ortamında 3-4 hafta sonra yeni ortama alt kültüre alındı. Yeni RSM ortamında sulcid antibiyotik miktarını 500mg/L'den, 300mg/L'ye azalttık. Oluşan kalluslardan sürgün gelişmesi için sürgün oluşturma ortamına aktardık. Şekil 4.18'da sırasıyla gelişim aşamaları göstermektedir.



**Şekil 4.18.** Boğum arasından kallus ve sürgünlerin oluşumu

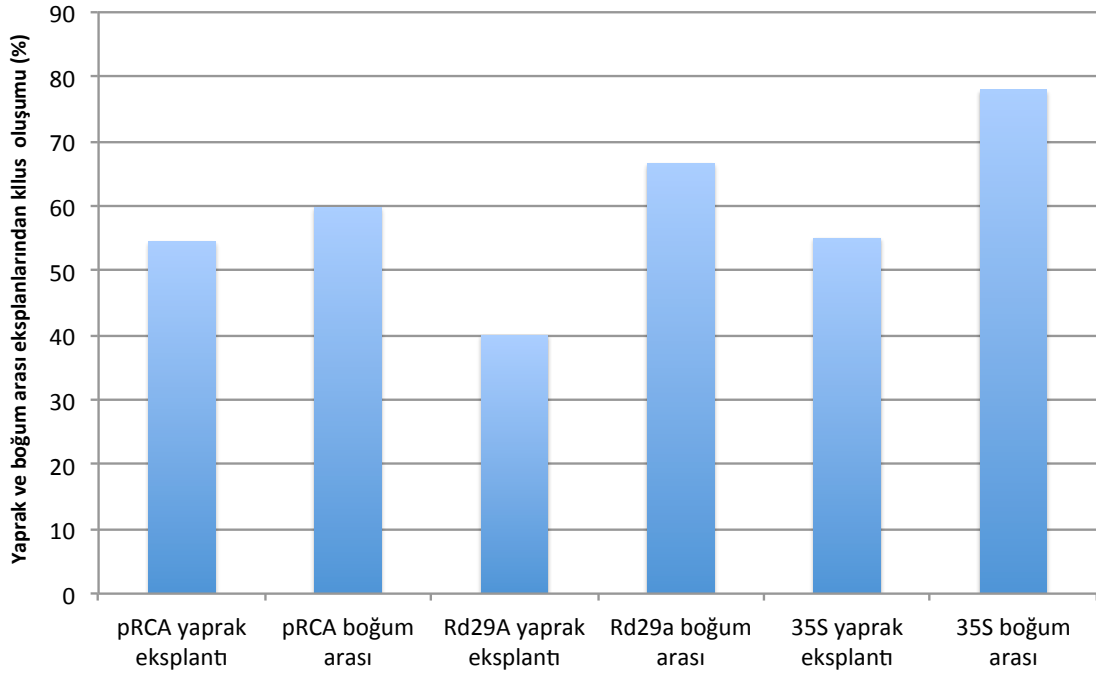


**Şekil 4.19.** Yapraklardan kallus oluşumu

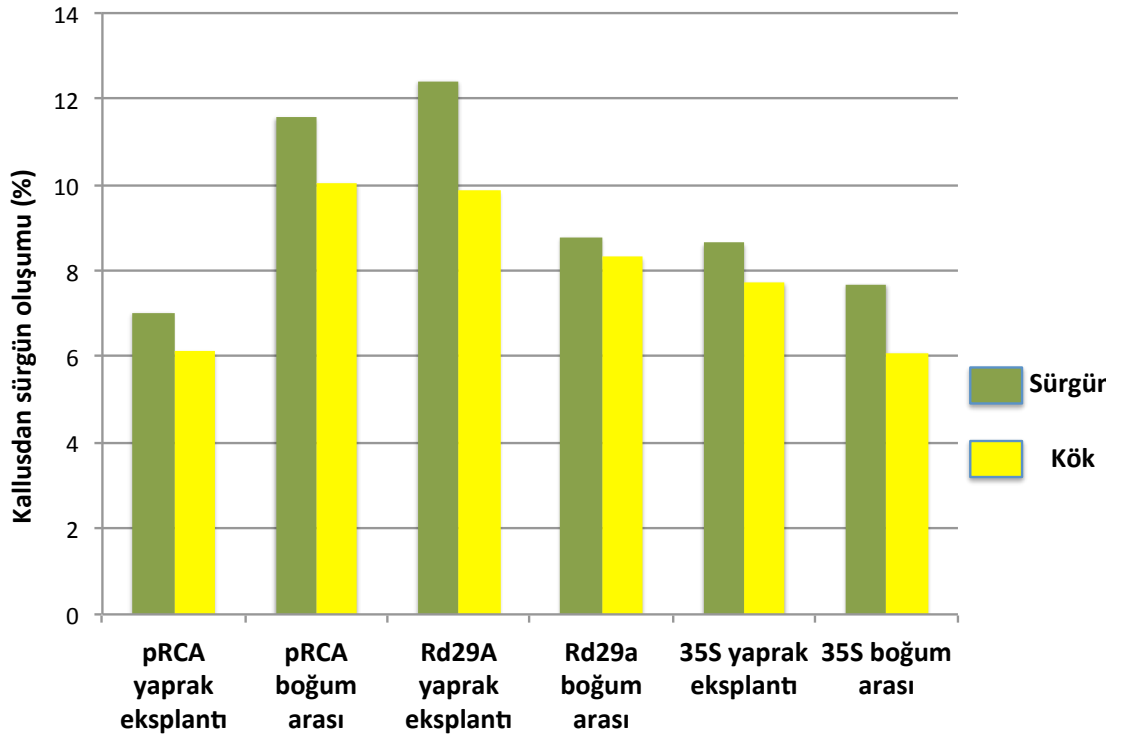
Oluşan sürgünleri köklendirme ortamına aktardık. Köklendirme ortamında gelişen aday transgenik bitkiler ilk transgenik doğrulama analizlerine hazır hale geldi. Çizelge 4.2’de kullanılan ekspalntlardan kallus, sürgün ve kök oluşumunun sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Taransformasyonda yaprak ve boğum arası ekspalntalarının sonuçları

Lady Olympia		Eksplant sayısı		Kallus oluşumu		Sürgün sayısı		Köklenme	
No:	Promotör	Yaprak	Boğum arası	Yaprak	Boğum arası	Yaprak	Boğum arası	Yaprak	Boğum arası
1	pRCA	600	650	327	389	23	45	20	39
2	rd29A	550	650	274	433	34	38	27	36
3	35S	400	400	220	312	19	24	17	19



Şekil 4.20. Yaprak ve boğum arası eksplantlarından kallus oluşumu



Şekil 4.21. Yaprak ve boğum arası kalluslarından sürgün, kök oluşumu.

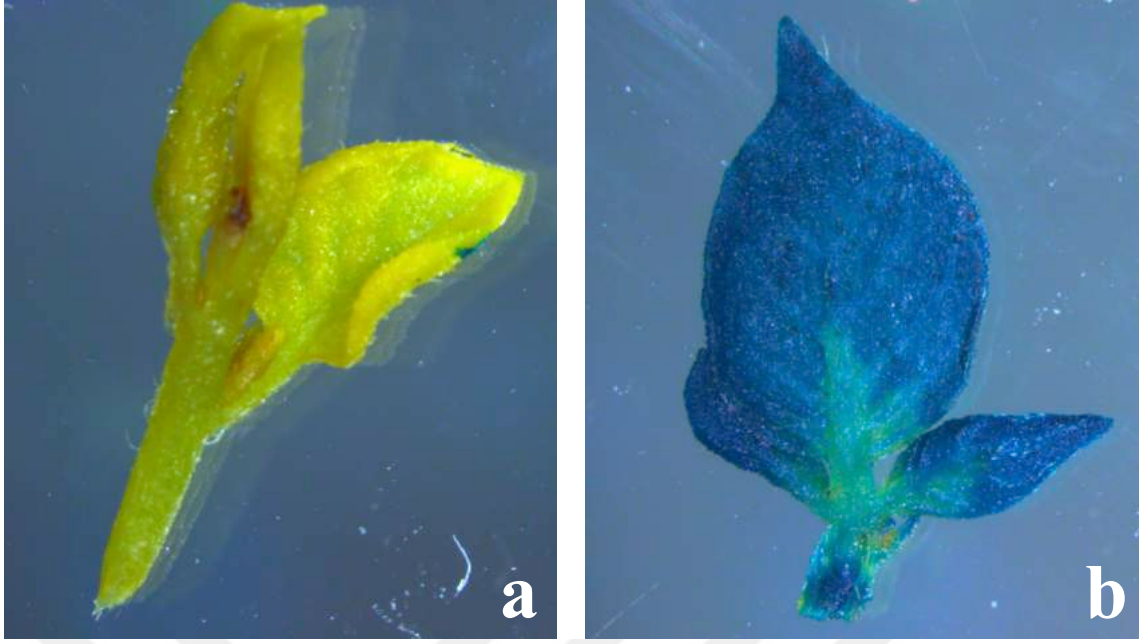
Şekil 4.20’de gösterildiği gibi toplam kullanılan yaprak ve boğum arası eksplantlarından kallus oluşumu görülmektedir. Yaprak ile boğum arası eksplantlarını

karşılaştığımızda boğum arasından kallus oluşum rejenerasyonu daha yüksek olduğu görüldü. Oluşan kalluslardan sürgün oluşumunda sadece *pRCA* promotörünü içeren yaprak kalluslarından boğum arası kalluslarına göre sürgün ve kök oluşumu düşük iken *pRD29A* ve *35S CaMV* yaprak kalluslarında sürgün ve kök oluşumu boğum arası kalluslarına göre daha yüksek oranda belirlendi (Şekil 4.21). Transformasyon sonucu kullanılan eksplantlardan elde edilen aday transgenik bitkiler: *pRCA* yaprak eksplantlarından %3,33, *pRCA* boğum arasından %6, *pRD29A* yaprak eksplantlarından %4,9, *pRD29A* boğum arasından %5,53, *35S CaMV* yaprak eksplantlarından %4,25 ve *35S CaMV* boğum arasından %4,75 oranlarda aday transgenik patatesler elde edildi.

#### **4.5 Aday Transgenik bitkilerin Doğrulama Yöntemleri**

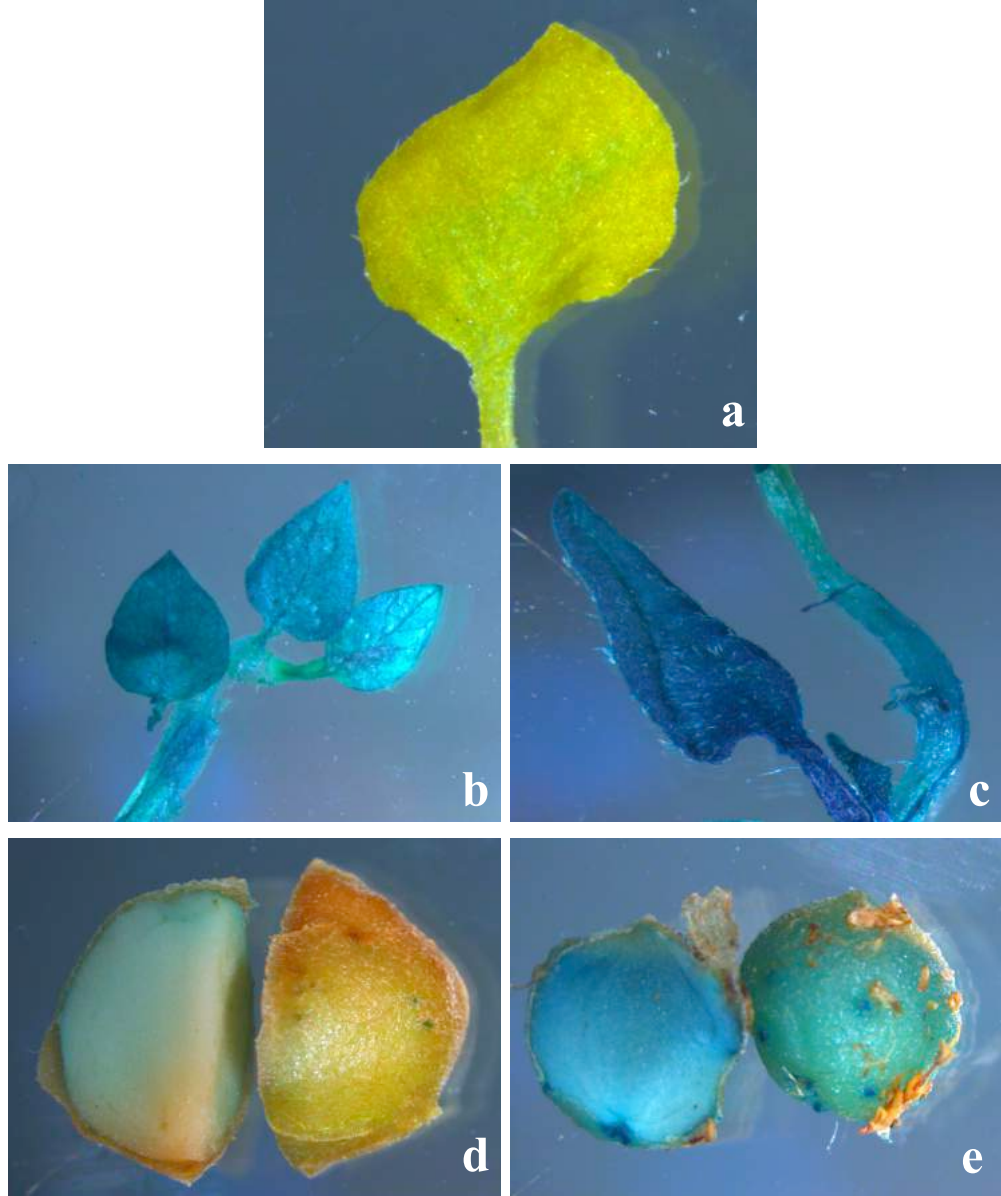
##### **4.5.1 Histokimyasal GUS analizi**

İlk doğrulama analizi olan histokimyasal GUS analizi ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Histokimyasal GUS analizleri Jefferson vd. (1987b), tarif edildiği gibi yapıldı. Stres uyarılabilir *pRD29A* promotörünü içeren transgenik patateslerde sadece yapraklarda kontrol edildi (Şekil 4.22). Yeşil dokuyaözümlü *pRCA* promotörünü içeren transgenik bitkilerde hem kök, yumru hemde yeşil dokularda analiz edildi. Konstitütif *35S CaMV* promotörü ise karşılaştırma olarak aynı şekilde analiz edildi (Şekil 4.23).



**Şekil 4.22.** Histokimyasal GUS analizi. Transgenik olmayan bitki yaprakları (a); Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren transgenik bitki yaprakları (b).

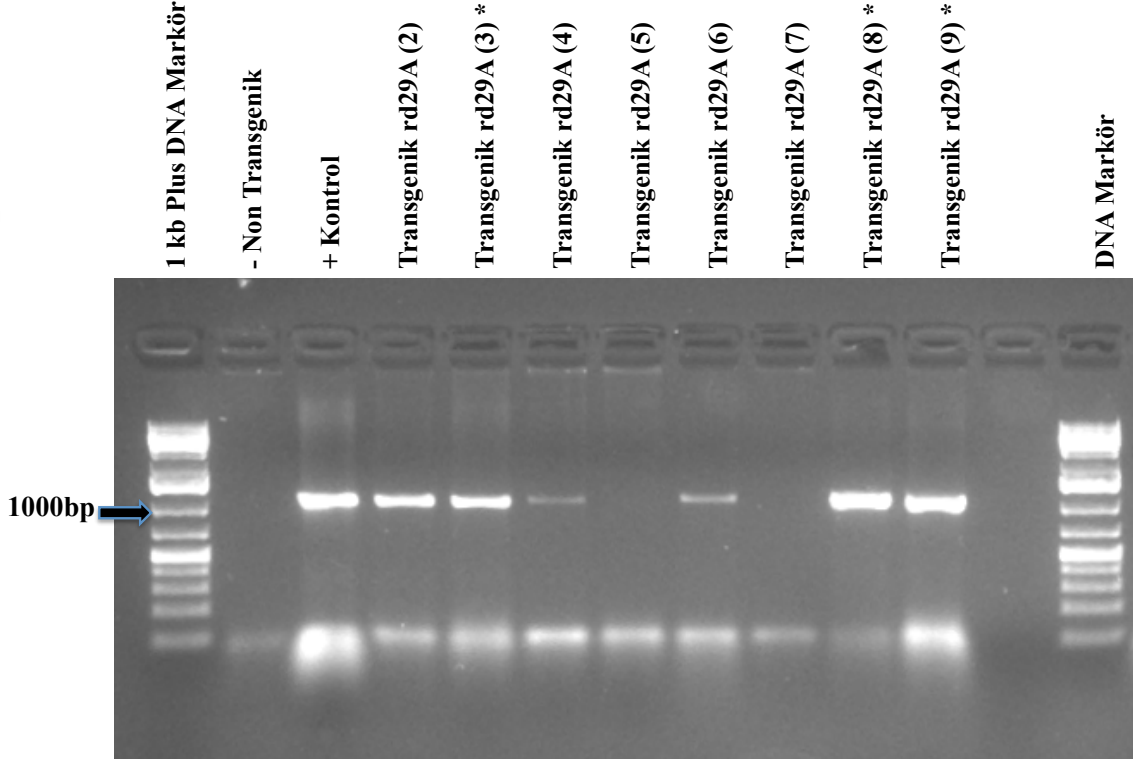
Başka bir araştırmada *Arabidopsis thaliana* *pRD29A* ve *pRD29B* promotörlerini karakterize etmek için GUS geni ile beraber çalışmışlar. Transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkisinde düşük sıcaklık, kuraklık ve tuz stresinde GUS geninin histokimyasal analizine bakılmış (Msanne vd., 2011).



**Şekil 4.23.** Histokimyasal GUS analizi. Transgenik olmayan yaprak (a); Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü içeren transgenik bitki yaprakları (b); Konstitütif *35S CaMV* promotörünü içeren transgenik bitki yaprağı (c); Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü içeren transgenik bitki yumrusu (d); Konstitütif *35S CaMV* promotörünü içeren transgenik bitki yumrusu (e).

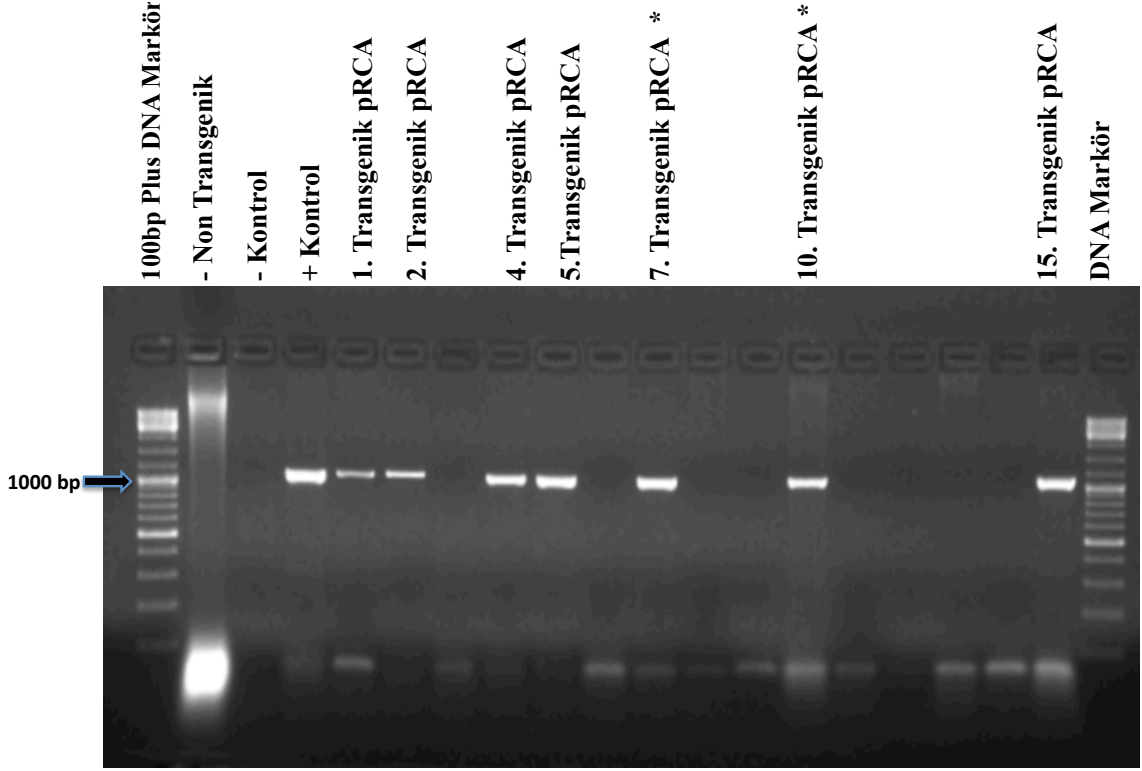
#### 4.5.2 PCR analizi

Aday transgenik bitkilerde gen entegrasyonu belirlemek için PCR yönteminden yararlanıldı. Transgenik bitkilerin tamamı GUS genini içerdiğinden, GUS genine spesifik primerler kullanarak doğrulama yöntemi yapıldı. Bu primer PCR ürünleri beklediğimiz 1085 bp boyutunda çıkmıştır.



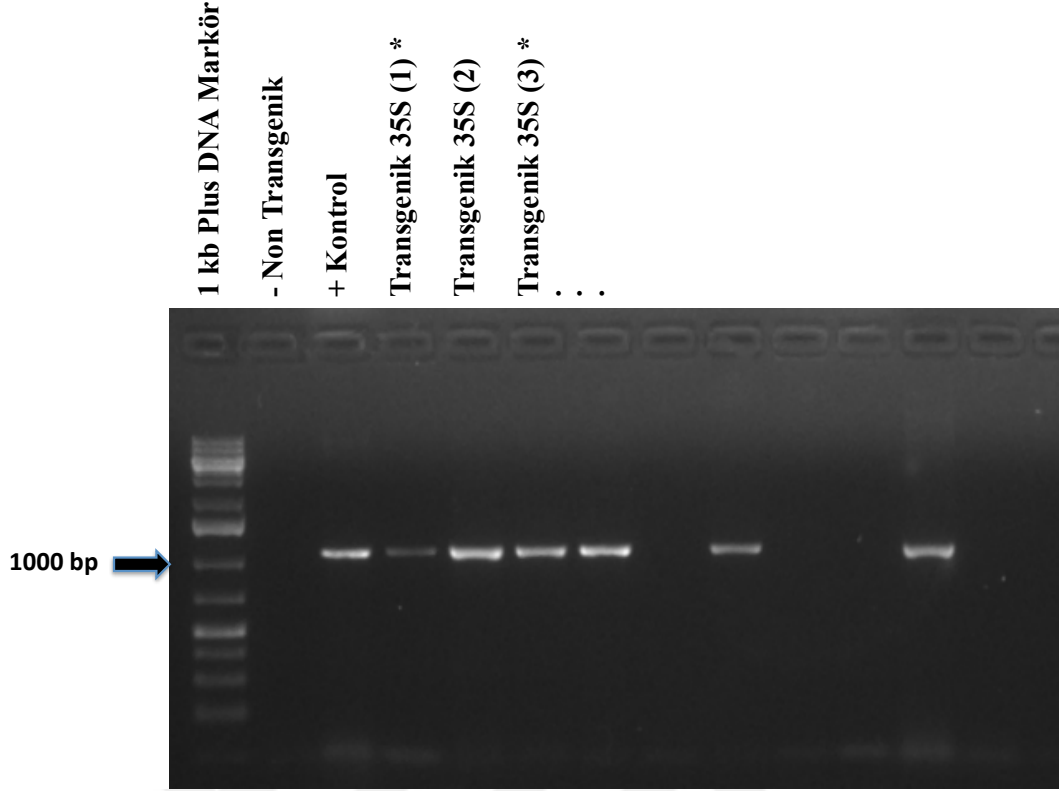
Şekil 4.24. Strese duyarlı *pRD29A* PCR analizi

Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren aday transgenik bitkilerin analizi Şekil 4.20. gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak transgenik olmayan bitki DNA'sını kullandık. Pozitif kontrol olarak ise pCAMBIA-pRD29A plazmidini kullandık. Yıldız ile işaretlenen *pRD29A(3)*, *pRD29A(8)* ve *pRD29A(9)* transgenik bitkilerle deneyimizi devam ettik.



Şekil 4.25. Yeşil dokuya özgü *pRCA* PCR analizi

Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü içeren transgenik bitkilerde negatif kontrol olarak transgenik olmayan bitki DNA'sı ve sadece H<sub>2</sub>O kullanıldı. Pozitif kontrolde pCAMBIA-pRCA plazmidinden yararlanıldı. Yıldız ile işaretli *pRCA(7)* ve *pRCA(10)* transgenik bitkilerle sonraki analizlerimizi devam ettik.



Şekil 4.26. Konstitütif 35S *CaMV* PRC analizi

Konstitütif 35S *CaMV* promotörünü içeren transgenik bitkilerin PCR analizi şekil 4.22’de verilmiştir. Bu jel görüntüsünde negatif kontrol transgenik olmayan Lady Olympia patates DNA’sı ve pozitif kontrolde ise pCAMBIA-1301 plazmidi kullanıldı. İşaretlenen 35S(1) ve 35S(3) transgenik bitkilerle deneyleri devam ettik.

Çizelge 4.3. Aday transgenik bitkilerinden doğrulama yöntemleri ve sonuçları

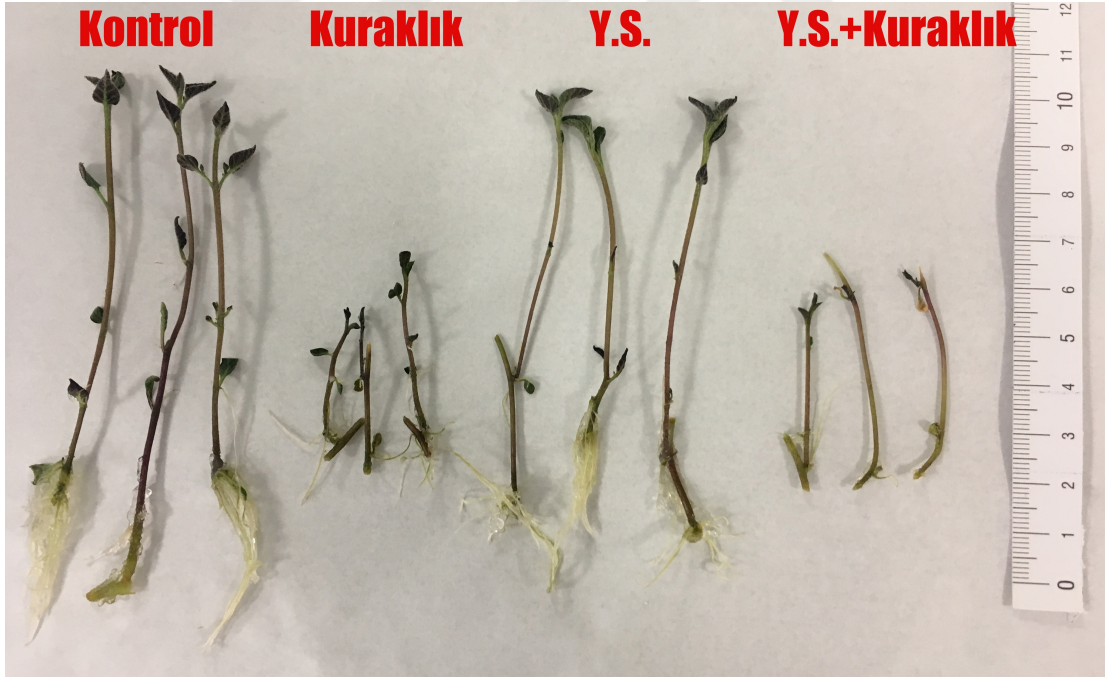
Tarnsgenik aday bitkiler	Histokimyasal GUS analizinde kullanılan bitki sayısı ve pozitif bitki sayısı		PCR’da kullanılan bitki sayısı ve pozitif bitki sayısı		GUS Fluorogenik analizinde kullanılan bitkiler		qRT-PCR’da kullanılan bitkiler	
LO-pRCA	59	14	19	14	2	2	2	2
LO-pRD29A	63	13	15	13	3	3	3	3
LO-35S <i>CaMV</i>	36	5	12	5	1	1	1	1

Yapılan doğrulama yöntemlerinde Histokimyasal GUS ve PCR analizlerine göre toplam transformasyon etkinliği Lady Olympia patates çeşidinde %0,98 olarak belirlendi.

#### 4.5.3 GUS protein aktivitesinin karşılaştırması

GUS fluorometrik assay analizi daha garantili sonuç veriyor olmasına rağmen, laboratuvarımızda bu cihaz bulunmadığından GUS fluorogenik assay yöntemini kullandık. GUS aktivitesinin fluorogenik analizleri daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (Jefferson vd., 1987b). Benzer bir diğer çalışmada patates bitkisinde Douglas-fr promotörün spatiotemporal aktivitesini kontrol etmek için  $\beta$ -glukuronidaz (GUS) geninin ifadesini florometrik GUS assay analizi ile kontrol etmiş (Yevtushenko ve Misra, 2018).

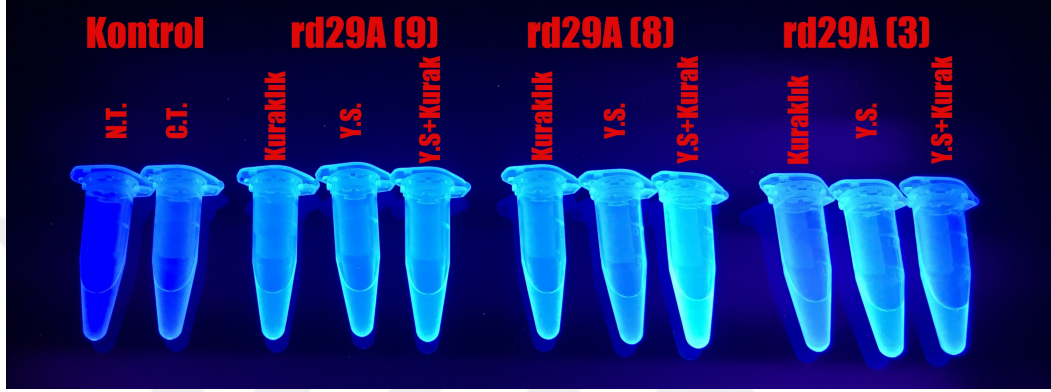
Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren transgenik patatesleri farklı abiyotik streslerde yetiştirdik. Bunlar kuraklık, yüksek sıcaklık ve her ikisini beraber kuraklık/yüksek sıcaklık kontrol olarak optimum bitki büyüme koşullarında *pRD29A* transgenik patatesler yetiştirildi (Şekil 4.27).



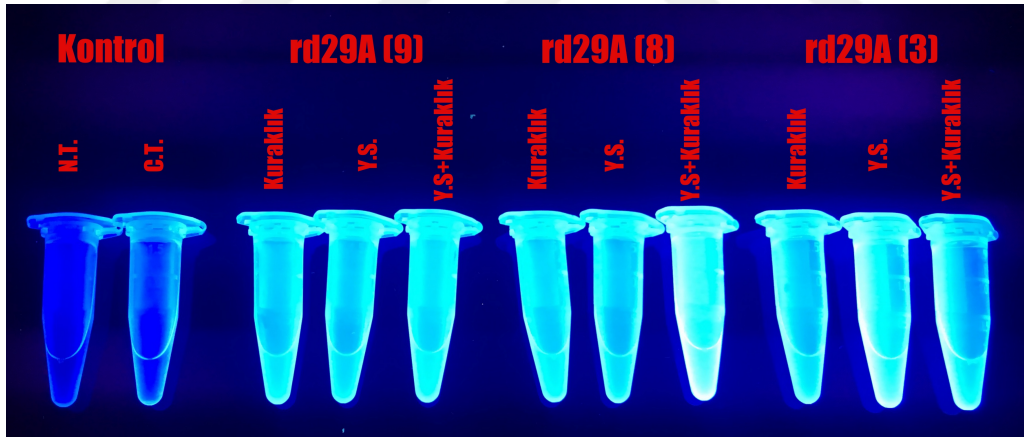
Şekil 4.27. Farklı koşullardaki *pRD29A* transgenik patatesler

*pRD29A* promotörünü içeren transgenik patateslerinin optimum bitki büyüme koşullarında bitkinin boyu yaklaşık 10 santimetre iken yüksek sıcaklık uyguladığımız koşullarda 8 santimetre olarak görüldü. Kuraklık ve yüksek sıcaklık/kuraklık koşullarında ortalama 4 santimetre uzunluğunda bitki büyümesi gerçekleşti.

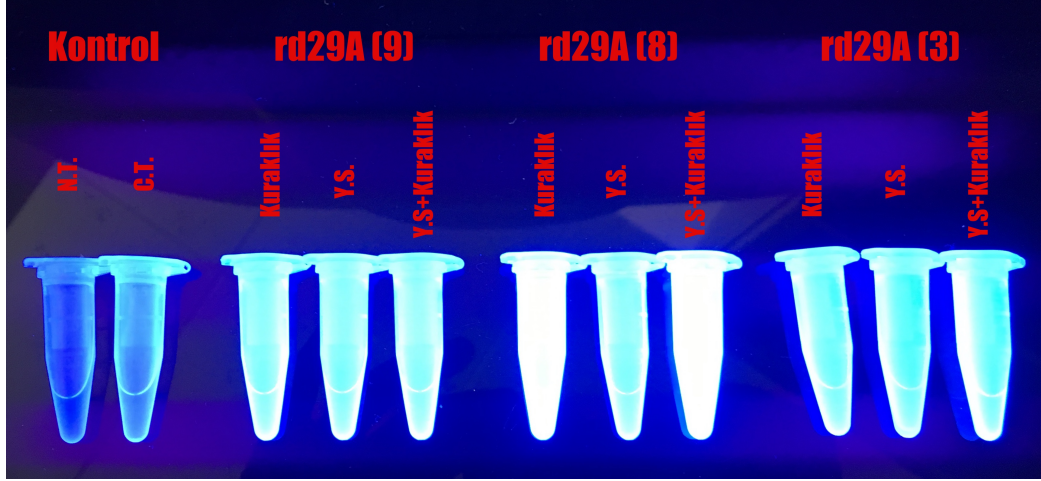
Farklı koşullarda yetiştirilen transgenik patateslerin proteininden GUS gen ifadesini kontrol etmek için GUS fluorogenik assay analizi yapıldı. Transgenik olmayan patatesten GUS protein aktivitesi tamamen yokken kontrol koşullardaki *pRD29A* transgenik patatesten çok az aktivitesini göstermiştir. Farklı stres koşullardaki GUS protein aktivitesi daha çok artmıştır (şekil 4.28, 4.28 ve 4.30).



şekil 4.28. Strese duyarlı *pRD29A* GUS fluorogenik assay analizi (1 saat)

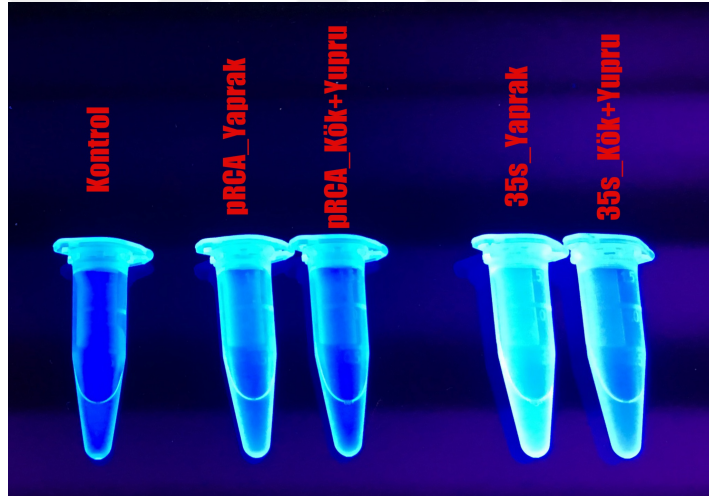


şekil 4.29. Strese duyarlı *pRD29A* GUS fluorogenik assay analizi (3 saat)

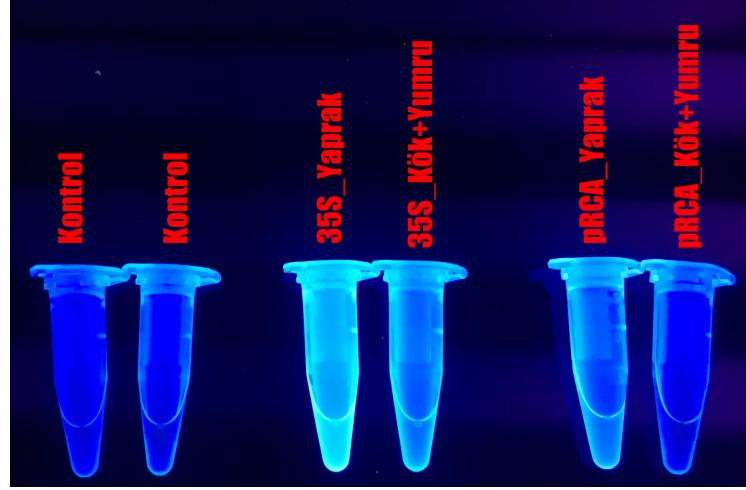


Şekil 4.30. Strese duyarlı *pRD29A* GUS fluorogenik assay analizi (24 saat)

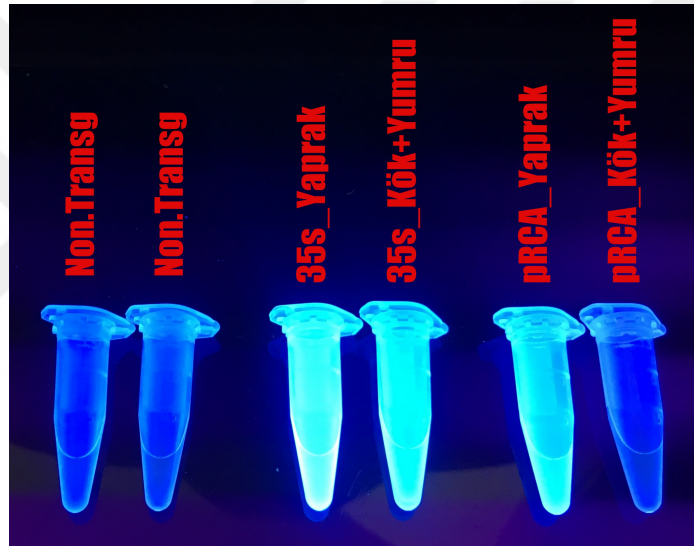
Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren transgenik patateslerinin GUS fluorogenik assay analizinde üç tekerrürlü bir saat, üç saat ve 1 gün şeklinde farklı zamanlarda +37°C derecede bekleterek UV altında görüntü aldık. (Şekil 4.28, 4.29 ve 4.30).



Şekil 4.31. Yeşil dokuya özgü *pRCA* GUS fluorogenik assay analizi (1 saat)



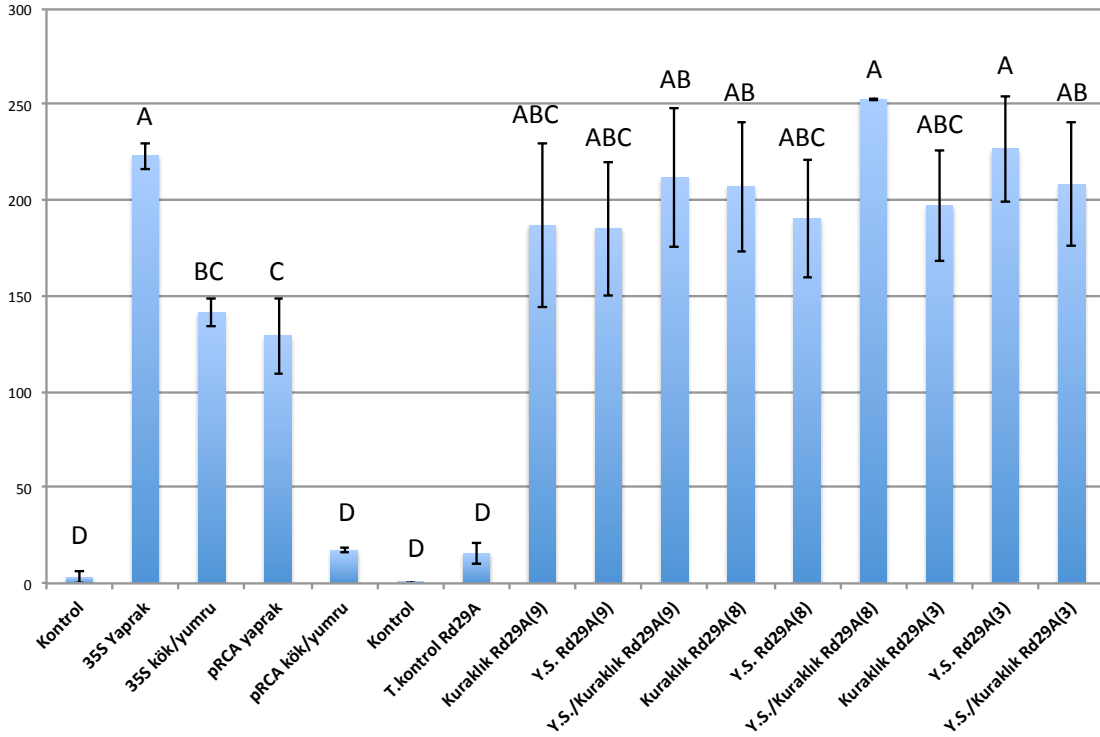
Şekil 4.32. Yeşil dokuya özgü *pRCA* GUS fluorogenik assay analizi (3 saat)



Şekil 4.33. Yeşil dokuya özgü *pRCA* GUS fluorogenik assay analizi (24 saat)

Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü içeren ve konstitütif *35S CaMV* promotörünü içeren transgenik patateslerini yetiştirme koşulları *in vivo* ortamda büyütülmüştür. Çünkü *pRCA* promotörleri ışıktan etkilenebilir diye bu ortamda yetiştirdik. Transgenik *pRCA* promotörünü içeren ve konstitütif *35S CaMV* promotörünü içeren patateslerinin GUS fluorogenik assay analizinde de aynı şekilde üç tekerrürlü bir saat, üç saat ve 1 gün şeklinde farklı zamanlarda +37 °C’de bekleterek UV altında görüntü aldık. Konstitütif *35S* promotörünüde GUS protein aktivitesi *pRCA* promotörün GUS aktivitesinden daha fazla artmıştır. Yapraklardaki aktivite yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörününde kök/yumrulardaki aktivitesine göre daha fazla artmıştır (Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33).

Farklı saatlerde incelenen strese duyarlı *pRD29A*, yeşil dokuya özgü *pRCA* ve konstitütif *35S CaMV* promotörlerinde GUS proteinleri yaptığımız çalışmaya göre bir saat ile üç saatte daha belirgin verileri alırken bir gün sonra artışı yavaşlanarak protein oranı sabitleşmiştir.



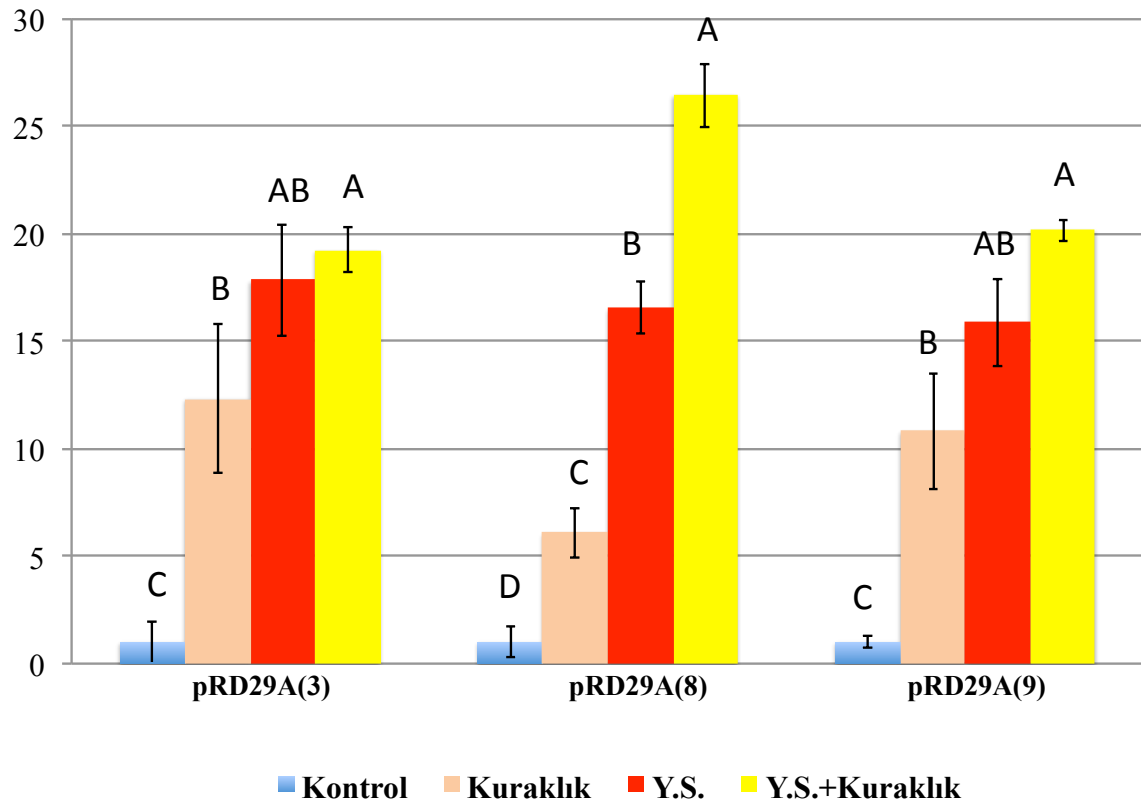
**Şekil 4.34.** GUS fluorogenik assay analizi sonuçlarından renk seçici (Color Picker) programıyla çıkan veriler. Harfler GUS protein aktivitesinin istatistiksel farkı belirtmektedir ( $p \leq 0.05$ ).

GUS fluorogenik assay analizi sonuçlarından bir saat ve üç saat  $+37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe ettiğimiz örneklerin UV altında aldığımız verilerinden parlaklığına göre renk seçici (Color Picker) programıyla verileri sayıya aktardık. Çıkan sonuçları gruplara ayırarak istatistiksel karşılaştırma yaptık. Transgenik olmayan kontroller, *pRCA* kök/yumru ve *pRD29A* optimum koşullarda yetişen transgenik patatesler D grubunda en düşük GUS protein aktivitesi göstermiştir. C grubunda sadece yeşil dokuya özgü *pRCA* yaprak GUS protein aktivitesi yer almaktadır, BC grubunda da *35S CaMV* kök/yumru GUS protein aktivitesini içermektedir. Dört tane farklı örnekleri içeren ABC grubunda kuraklık *pRD29A*(9), yüksek sıcaklık *pRD29A*(9), yüksek sıcaklık *pRD29A*(8) ve kuraklık *pRD29A*(3) transgenik patatesleri yer almaktadır. AB grubunda yüksek sıcaklık/kuraklık *pRD29A*(9), kuraklık *pRD29A*(8) ve yüksek sıcaklık/kuraklık

*pRD29A(3)* transgenik patateslerinin GUS protein aktivesini göstermektedir. En fazla GUS protein aktivesini gösteren A grubunda *35S CaMV* yaprak, yüksek sıcaklık/kuraklık *pRD29A(8)* ve yüksek sıcaklık *pRD29A(3)* transgenik patateslerini içermektedir.

#### 4.5.4 Gen ifade analizi (qRT-PCR)

Strese duyarlı *pRD29A* promotörünü içeren transgenik patatesleri farklı koşullarda kültüre alınmıştır. Bunlar ters çevre koşullarında kuraklık, yüksek sıcaklık ve kuraklık/yüksek sıcaklık şeklinde idi. Kontrol olarak ise optimum bitki büyütme koşullarında yetiştirdik. Farklı koşullarda yetişen *pRD29A* transgenik patateslerden toplam RNA izolasyonu yapıldı. Artından DNA uzaklaştırarak toplam mRNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR'da (qRT-PCR) sentezi yapılan cDNA'ları 1:10 kat seyrelterek kullanılmıştır (Şekil 4.35).

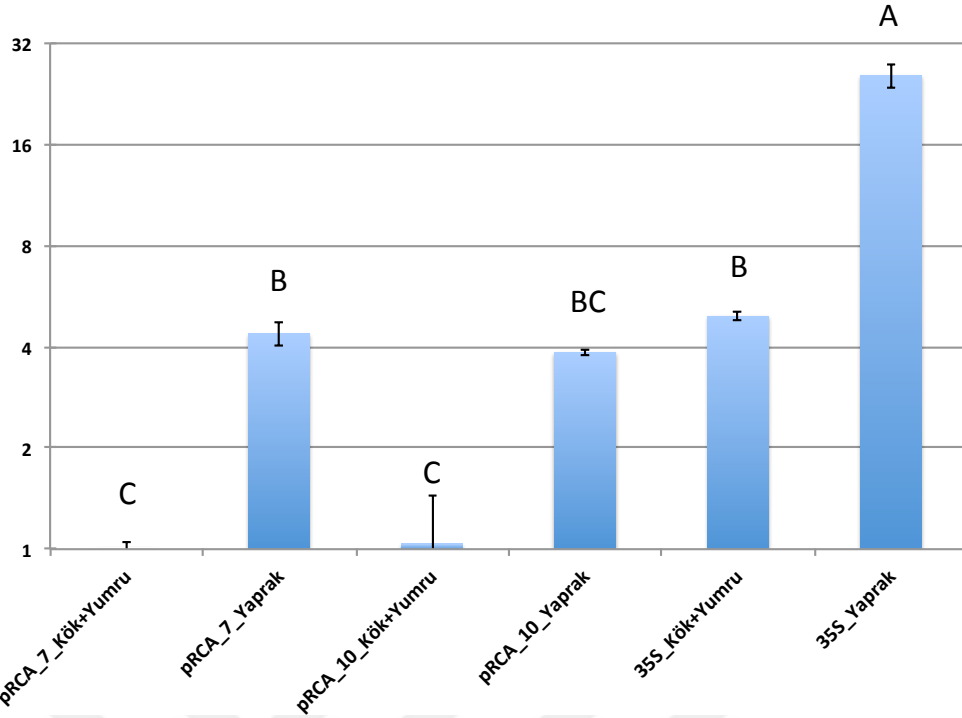


Şekil 4.35. Strese duyarlı *pRD29A* transgenik patateslerin farklı koşullardaki gen ifadesi. Harfler GUS gen ifadesinin istatistiksel farkı belirtmektedir ( $p \leq 0.05$ ).

Yapılan çalışma sonucu strese duyarlı *pRD29A* transgenik patateslerde kuraklıkta yaklaşık 10 kat artarken yüksek sıcaklıkta ise 15 kattan üzerinde GUS geninin ifadesinde artış göstermiştir. Bu durum her iki stres beraberinde (kuraklık-yüksek sıcaklık) daha artış göstermiştir. Çıkan gen ifade sonuçlarından her transgenik bitkiyi ayrı istatistiksel analizle gruplandırma yapıldı *pRD29A(3)* ile *pRD29A(9)* transgenik patateslerin verileri optimum koşullarda yetişen transgen GUS ifadesi C grubunda, kuraklık stresinde B grubunda, yüksek sıcaklıkta AB grubunda yer almaktadır. En fazla GUS gen ifadesini gösteren A grubunda yüksek sıcaklık/kuraklık stres koşullarındaki yer almaktadır. *pRD29A(8)* transgenik patatesinde D grubunda kontrol optimum koşullar, C'de kuraklık, B grubunda yüksek sıcaklık ve son olarak A grubunda yüksek sıcaklık/kuraklık stres koşullarında GUS gen ifadesini göstermektedir. Başka bir çalışmada *pRD29A* promotörünü farklı stres koşullarda aktivitesine karşılaştırdığı zaman NaCl uygulamasında diğer kuraklık ve absisik asit (ABA) stresler uygulamalarına göre lusiferaz (LUC) geninin ifadesi yaklaşık 7 kat artış gösterdiğini belirlemektedir (Koiwa vd., 2002).

Daha önceki çalışmalarda Desiree patates çeşidinde düşük sıcaklıkta *Arabidopsis thaliana* kaynaklı, *pRD29A* promotörünü kontrolü altında *DREB1A* geninin ifadesine bakılmış. Kullandığımız *pRD29A* promotörü düşük sıcaklıkta kontrol edilmiş (Behnam vd., 2007). Bir başka çalışmada aynı *pRD29A* promotörü kontrolü altında *AtPDC1* genini patatese aktararak yine düşük sıcaklıkta gen ifadesine bakılmış (Pinhero vd., 2011).

Yeşil dokuya özgü *pRCA* ve konstitütif *35S CaMV* promotörlerini içeren transgenik patateslerinden yumru/kök hemde yapraklardan örnek alarak toplam RNA izolasyonu yapıldı ve DNA uzaklaştırılmıştır. Toplam mRNA'lerden cDNA sentezi yapılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR'da (qRT-PCR) sentezi yapılan cDNA'ları 1:10 kat seyrelterek kullanılmıştır (Şekil 4.36). Transgenik bitkiler *in vivo* koşulda yetiştirilmesi sağlanmıştır.



**Şekil 4.36.** Yeşil dokuya özgü *pRCA* ve konstitütif *35S CaMV* transjenik patateslerin yaprak ve kök/yumrularında GUS gen ifadesi. Harfler GUS gen ifadesinin istatistiksel farkı belirtmektedir ( $p \leq 0.05$ ).

Elde edilen gerçek zamanlı kantitatif PCR verilerine göre yeşil dokuya özgü *pRCA* transjenik patatesler yapraklardaki GUS geninin ifadesi kök/yumrulara göre yaklaşık 4-5 kat daha fazla artığı gözlemlenmiştir. Konstitütif *35S CaMV* promotörü ile *pRCA* promotörünü karşılaştırılmasında *35S CaMV* transjenik patatesler 5 kat daha fazla GUS geninin ifadesini göstermiştir. İstatistiksel gruptandırmaya göre GUS gen ifadesi en düşük C grubunda *pRCA* (7 ve 10) kök/ yumru görülmüştür. BC grubunda *pRCA*(10) yapraktaki GUS gen ifadesini içermektedir. B grubunda *pRCA*(7) ve *35S CaMV* kök/yumru GUS geninin ifadesini belirtmektedir. Son olarak en fazla GUS gen ifadesini gösteren A grubunda *35S CaMV* yapraklardan alınan örnekleri içermektedir.

Daha önceki çalışmada patates yeşil dokuta spesifik *pRCA* promotörü ve *35S CaMV* promotörünün GUS geninin ifadesini tütün bitkisinde karşılaştırma yapılmış. Bu karşılaştırmada *35S CaMV* promotörü yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörüne göre 0,4 kat daha fazla GUS geninin ifadesi gözlemlenmiştir (Qu vd., 2011).

## BÖLÜM V

### SONUÇ

Günümüzde dünyada birçok ülkede belirli transgenik bitkilerin üretirken bunun aksine üretimi tamamen yasak ülkeler daha fazladır. Hızla artan nüfus ve küresel ısınma etkisi ile gelecekte transgenik bitkilere ihtiyaç duyulabilir.

Transgenik bitkiler üretilmeye başladığından beri avantaj ve dezavantajları günümüzde hala tartışılmaya devam etmektedir. Dezavantajlarından en dikkat çeken ise tükettiğimiz transgenik ürünlerin ne tür yan etkisi olacağıın tam belli olmamasıdır. Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörünü ile bu riski minimuma indirilebilir. Özellikle patatesten bitkinin yumrusunu tükettiğimiz için aktardığımız gen *pRCA* promotörü sayesinde bitkinin yeşil dokularında ekspresyonunu göstermektedir. Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörü konstatif *35S CaMV* promotörüne göre 5 kat daha az gen ifadesi belirlendi. Yaprak'ta ise kök-yumrulara göre 4-5 kat daha fazla gen ifadesi gözlemlenmiştir.

Strese duyarlı *pRD29A* promotöründe optimim bitki yetiştirme koşullarına göre kuraklıkta 10 kat daha fazla iken bu durum yüksek sıcaklıkta 15 kat ve kuraklık ve yüksek sıcaklıkta yaklaşık 20 kat gen ifadesi artmıştır.

Kullandığımız bu promotörler diğer çalışmalara bakılırsa sadece patates bitkisinde değil birçok bitkide aktivitesini göstermiş ve farklı bitkilerde kullanılabilir. Gelecekteki transgenik patates çalışmasına veya ıslah programlarında bu promotörleri kullanarak farklı genleri patates bitkisine transformasyon yapılabilir. Yeşil dokuya özgü *pRCA* promotörü hem böceklerle hem herbisitlere dayanıklı genlerle beraber transgenik patates çeşidi geliştirilebilir. Böylece gıda olarak tükettiğimiz patates yumrusunda transgen ifadesi minimuma inmiş olur. Strese duyarlı *pRD29A* promotöründe ters çevre koşullarına dayanıklı genlerle beraber patates bitkisine aktararak abiyotik streslere karşı dayanıklı transgenik patates geliştirilebilir.

## KAYNAKLAR

Ahmad, N., Sant, R., Bokan, M., Steadman, K. J. and Godwin, I. D., “Expression Pattern of the Alpha-Kafirin Promoter Coupled with a Signal Peptide from Sorghum bicolor L. Moench. Hindawi Publishing Corporation”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.

Alisdair, R., Fernie, R. and Willmitzer, L., “Update on tuber formation, dormancy, and sprouting molecular and biochemical triggers of potato tuber development”, *Plant Physiol*, 127:1459-1465, 2001.

Baayen, R. P., Cochius, G., Hendriks, H., Meffert, J. P., Bakker, J., Bekker, M., Boogert, P. H. J. F., Stachewicz, H. and van Leeuwen, G. C. M., “History of potato wart disease in Europe—a proposal for harmonisation in defining pathotypes”, *European Journal of Plant Pathology*, 116, 21–31, 2006.

Bakhsh, A., Anayol, E., Khabbazi, S. D., Karakoç, Ö. C., Sancak, C. and Özcan, S., “Development of insect-resistant cotton lines with targeted expression of insecticidal gene”, *Archives of Biological Sciences*, 68, (4), 773-780 2016.

Behnam B., Kikuchi A., Celebi-Toprak F., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K. and Watanabe K.N., “Arabidopsis rd29A::DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato”, *Plant Cell Rep* 26:1275–1282, 2007.

Chalfie, M. and Tu, Y.T., “Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression”, *Science*, 263, 802 805, 1994.

Cote, C. and Rutledge, R.G., “An improved MUG fluorescent assay for the determination of GUS activity within transgenic tissue of woody plants”, *Plant Cell Reports*, 21: 619-624, 2003.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L., “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue”, *Phytochemistry Bulletin*, 19:11-15, 1987.

Escobar, M. A. and Dandekar, A. M., “Agrobacterium tumefaciens as an agent of disease”, *TRENDS in Plant Science* 10, 3-15, 2003.

FAOSTAT, “<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>”, 01 Ağustos 2019.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L. and Woo, S. C., “Expression of bacterial genes in plant cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803–4807, 1983.

Gallagher, S. R., “GUS Protocols: Using The GUS Gene As A Reporter Of Gene Expression”, *Academic Press*, San Diego, 215, 1992.

Gören Sağlam, N., “*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. yapraklarında GUS ve GFP raportör genleri kullanılarak senesens ile ilişkili genlerin analizi”, *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(2): 175-183, 2017.

Hijmans, R. J. and Spooner, D. M., “Geographic distribution of wild potato species”, *American Journal of Botany*, 88(11): 2101–2112, 2001.

Hull, R., Covey, S. N. and Dale, P., “Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate”, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12: 1–5. 2000.

Inouye, S. and Tsuji, F.I., “Aequorea green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein”, *FEBS Lett.* 341, 277-280, 1994.

ISAAA., “<http://www.isaaa.org/>”, 13 Ağustos 2019.

Jefferson, R. A., “Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system”, *Plant Molecular Biology Reports*, 5: 387-405. 20, 1987a.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W., “GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants”, *EMBO Journal*, 6: 3901-3907, 1987b.

Jefferson, R.A., 1989. “The GUS reporter gene system”, *Nature*, 342: 837-838. 21, 1989.

Karcher, S. J., “Blue plants: Transgenic plants with the GUS reporter gene”, *Association for Biology Laboratory Education*, 30, 2002.

Kazuko, Y. S. and Kazuo, S., “Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) ”, *Mol. Gen. Genet.* 236:331-340, 1993.

Koiwa, H., Barb, A. W., Xiong, L., Li, F., McCully, M. G., Lee, B. H., Sokolchik, I., Zhu, J., Gong, Z., Reddy, M., Sharkhuu, A., Manabe, Y., Yokoi, S., Zhu J. K., Bressan, R. A. and Hasegawa, P.M., “C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signaling, growth, and development”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 6; 99(16): 10893–10898, 2002.

Liu, X., Yang, W., Li, Y., Li, S., Zhou, X., Zhao, Q., Fan, Y., Lin, M. and Chen, R., “The intergenic region of the maize defensin-like protein genes Def1 and Def2 functions as an embryo-specific asymmetric bidirectional promoter”, *Journal of Experimental Botany*, Vol.67, No.14, pp.4403–4413, 2016.

Manikandan, R., Balakrishnan, N., Sudhakar, D. and Udayasuriyan, V., “Development of leaf folder resistant transgenic rice expressing cry2AX1 gene driven by green tissue-specific rbcS promoter”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:37, 2016.

Meseri, R., “Beslenme ve Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar”, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 7(5), 455-460, 2008.

Msanne, J., Lin, J., Stone, J.M. and Awada, T., “Characterization of abiotic stress-responsive Arabidopsis thaliana RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes”, *Planta*, 234:97–107, 2011.

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

Nguyen, K. H., Mostofa, M. G., Watanabe, Y., Tran, C. D., Rahman, M. M. and Tran, L. P., “Overexpression of GmNAC085 enhances drought tolerance in Arabidopsis by regulating glutathione biosynthesis, redox balance and glutathione-dependent detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal”, *Environmental and Experimental Botany*, 161, 242-254, 2019.

Noriaki, T., Masahiro, T. and Shigeru, S., “The sweet potato RbcS gene (IbRbcS1) promoter confers high-level and green tissue-specific expression of the GUS reporter gene in transgenic Arabidopsis”, *Gene*, 567, 244–250, 2015.

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

Özcan, S., Firek, S. and Draper, J., “Selectable Marker Genes Engineered for Specific Expression in Target Cells for Plant Transformation”, *Nature Biotechnology*, 11, 218 – 221, 1993.

Paul J., “Gus Gene Assay in Transformed Tissues”, *Gold Biotechnology*, 2018.

Penniket, C. R., “Tissue-specific gene expression and promoter characterization in triticale”, *B. Sc. Biochemistry, University of Lethbridge*, Alberta, Canada 2013.

Pinhero, R., Pazhekattu, R., Marangoni, A.G., Liu, Q. and Yada, R.Y., “Alleviation of low temperature sweetening in potato by expressing Arabidopsis pyruvate decarboxylase gene and stress-inducible rd29A: A preliminary study”, *Physiol Mol Biol Plants* 17(2):105–114, 2011.

Podevin, N. and Jardin, P., “Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants”, *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 3:4, 296-300, 2012.

Qu, D., Song, Y., Li, W. M., Pei, X. W., Wang, Z. X., Jia, S. R. and Zhang Y. Q., “Isolation and characterization of the organ-specific and light-inducible promoter of the gene encoding rubisco activase in potato (*Solanum tuberosum*)”, *Genet. Mol. Res.* 10 (2): 621-631, 2011.

Rakocevic, M., Muller M., Matsunaga, F.T., Neumaier, N., Farias J. R. B., Nepomuceno A. L. and Fuganti-Pagliarini R., “Daily heliotropic movements assist gas exchange and productive responses in DREB1A soybean plants under drought stress in the greenhouse”, *The Plant Journal*, 96, 801–814, 2018.

Roberts, K., Merkouropoulos, G. and Shirsat, A. H., “Identification of promoter regions in the Arabidopsis thaliana atExt1 extensin gene controlling late responses to wounding and pathogen attack”, *Biologia Plantarum*, 57 (2): 341-350, 2013.

Rodrigues, M. I., Bravo, J. P., Sasaki, F. T., Severino, F. E. and Maia, I. G., “The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of Eucalyptus grandis: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene”, *Plant Science*, 213, 106–113, 2013.

Rowe, C. R., “Potato Health Management. Department of Plant Pathology”, *Ohio State University*, USA, 1993.

Sümer, S., Rahamkulov, İ., Demirel, U., Çalışkan, M. E. ve Bakhsh, A., “Herbisite Dayanıklılık Geni (CP4-EPSP Sentez) İçeren Transgenik Patates Hatlarının

Geliştirilmesi”, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 56 (1):35-43, 2019.

Safaeizadeh, M. and Boller, T., “Differential and tissue-specific activation pattern of the AtPROPEP and AtPEPR genes in response to biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Signaling & Behavior*, Vol. 14, No. 5, 2019.

Schwartz, D. R., Weintraub, L., Vidavski, R., Zemach, H., Murakhovsky, L., Swartzberg, D. and Granot D., “The SIFRK4 promoter is active only during latestages of pollen and anther development”, *Plant Science*, 199–200, 61–70, 2013.

Severino, F. E., Brandalise, M., Costa, C. S., Wilcken, S. R., Maluf, M. P. ve Gonçalves, W., “Maia I.G. CaPrx, a Coffearabica gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection”, *Plant Science*, 191-192, 35-42, 2012.

Smith, E. F. and Townsend, C. O., “A plant-tumor of bacterial origin”, *Science*, 26;25(643):671-3, 1907.

Smith, O. H. and Welcox, K.W., “A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties”, *Journal of Molecular Biology*, 51, 2, 379–391. 1970.

Somssich, M., “A Short History of the CaMV 35S Promoter”, *PeerJ Preprints*, 2019.

Song, Y., Xuan, A., Bu, C., Ci, D., Tian, M. and Zhang D., “Osmotic stress-responsive promoter upstream transcripts (PROMPTs) act as carriers of MYB transcription factors to induce the expression of target genes in *Populus simonii*”, *Plant Biotechnology J.* 17, pp. 164–177, 2019.

Stone, B., “The Flavr Savr Arrives”, *Food and Drug Administration*, (202) 205-4144, 1994.

Sunilkumar, G., Mohr, L., Lopata-Finch, E., Emani, C. and Rathore, K. S., “Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP”, *Plant Mol. Biol.* 50(3):463-74, 2002.

TÜİK, 2017, [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001), 01. Mayıs 2018

Ward, W. W. and Cormier M.J., “Energy transfer via protein-protein interaction in Renilla bioluminescence”, *Photobiochem. Photobiol.* 27, 389-396, 1978.

Warner, S. A., Scott, R. and Draper, J., “Isolation of an asparagus intracellular PR gene (AoPRf) wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterization in transgenic tobacco”, *The Plant Journal*, 3(2), 191-201, 1993.

Watson, J. D. and Crick, F. H. C., “A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid”, *Nature*, 171 (4356): 737–738, 1953.

Wenzler, H., Mignery G., May G., and Park W., “A Rapid and Efficient Transformation Method for the Production of Large Numbers of Transgenic Potato Plants”, *Plant Science*, 63: 79-85, 1989.

Xue, M., Long, Y., Zhao, Z., Huang, G., Huang, K., Zhang, T., Jiang, Y., Yuan, Q. and Pei X., “Isolation and Characterization of a Green-Tissue Promoter from Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.)”, *Int. J. Mol. Sci.* 19,2009; doi:10.3390/ijms19072009, 2018.

Yevtushenko, D. P. and Misra S., “Spatiotemporal activities of Douglas fir BiP Pro1 promoter in transgenic potato”, *Planta*, 248:1569–1579, 2018.

Zhu, L. P., Yu, Z., Zou, C. X., Li, Q.L. and Chuan Y., “Plant stress-inducible promoters and their function”, *Yi Chuan = Hereditas*, 32(3): 229-234, 2010.

## EKLER

### Ek-1.Nanodrop cihazında aday transgenik patateslerdetoplam DNA konsantrasyonu

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/05/04

Analyte:dsDNA

Page:1/4

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	pRCA 1	18/05/04 11:36:34			373.63	2.27	1.13	7.413	3.235	6.539	-0.060	0.193	1.000
2	pRCA 2	18/05/04 11:37:37			86.72	2.18	0.44	2.323	1.385	4.547	0.588	0.193	1.000
3	pRCA 3	18/05/04 11:38:21			169.14	2.26	0.63	3.371	1.485	5.360	-0.012	0.193	1.000
4	pRCA 4	18/05/04 11:39:09			121.11	2.12	0.33	2.555	1.276	7.368	0.133	0.193	1.000
5	pRCA 5	18/05/04 11:40:12			72.11	2.34	0.58	1.369	0.544	2.397	-0.073	0.193	1.000
6	pRCA 6	18/05/04 11:41:43			134.13	2.31	0.46	2.540	1.017	5.670	-0.143	0.193	1.000
7	pRCA 7	18/05/04 11:42:33			230.35	2.24	1.21	4.572	2.026	3.760	-0.035	0.193	1.000
8	pRCA 8	18/05/04 11:43:26			160.18	2.25	0.98	3.078	1.298	3.140	-0.126	0.193	1.000
9	pRCA 9	18/05/04 11:44:14			128.39	2.28	0.58	2.494	1.051	4.382	-0.073	0.193	1.000
10	pRCA 10	18/05/04 11:44:56			25.40	2.91	0.12	0.326	-0.007	3.898	-0.182	0.193	1.000

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/05/04

Analyte:dsDNA

Page:2/4

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
11	pRCA 11	18/05/04 11:45:55			490.87	2.27	1.47	9.666	4.176	6.536	-0.151	0.193	1.000
12	pRCA 12	18/05/04 11:46:56			114.79	2.28	0.70	2.114	0.824	3.076	-0.182	0.193	1.000
13	pRCA 13	18/05/04 11:47:58			31.96	2.56	0.22	0.466	0.076	2.687	-0.173	0.193	1.000
14	pRCA 14	18/05/04 11:48:57			76.07	2.25	0.45	1.319	0.472	3.148	-0.203	0.193	1.000
15	pRCA 15	18/05/04 11:49:54			288.98	2.13	0.67	5.770	2.698	8.656	-0.010	0.193	1.000
16	pRCA 16	18/05/04 11:50:49			353.31	2.24	0.86	7.085	3.173	8.278	0.019	0.193	1.000
17	rd 1	18/05/04 11:52:14			1371.55	2.24	1.86	27.495	12.304	14.791	0.064	0.193	1.000
18	rd 2	18/05/04 11:53:20			4048.08	1.27	1.18	82.902	65.528	70.596	1.940	0.193	1.000
19	rd 3	18/05/04 11:53:56			425.32	2.25	1.22	8.345	3.621	6.823	-0.162	0.193	1.000
20	rd 4	18/05/04 11:54:46			112.48	2.12	0.45	2.395	1.207	5.145	0.145	0.193	1.000

## Ek-2.Nanodrop cihazında aday transgenik patateslerdetoplam DNA konsantrasyonu

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.  
Analyte:dsDNA

Date:2018/05/04  
Page:3/4

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
21	rd 5	18/05/04 11:55:40			452.81	2.13	1.34	8.947	4.136	6.651	-0.109	0.193	1.000
22	rd 6	18/05/04 11:56:37			266.22	2.25	0.71	5.144	2.189	7.341	-0.180	0.193	1.000
23	rd 7	18/05/04 11:57:24			1098.04	2.22	1.37	22.939	10.881	17.053	0.978	0.193	1.000
24	rd 8	18/05/04 11:58:12			361.07	2.16	0.90	7.411	3.534	8.195	0.190	0.193	1.000
25	rd 9	18/05/04 11:58:57			899.28	2.23	1.32	17.977	8.039	13.653	-0.009	0.193	1.000
26	rd 10	18/05/04 12:00:53			180.94	2.24	1.03	3.450	1.447	3.347	-0.169	0.193	1.000
27	AoPR 1	18/05/04 12:02:01			9.85	0.41	0.23	3.373	3.651	4.030	3.176	0.193	1.000
28	AoPR 2	18/05/04 12:02:28			54.11	2.49	0.12	0.907	0.260	8.694	-0.176	0.193	1.000
29	35S	18/05/04 12:03:41			336.28	2.00	0.93	8.803	5.434	9.330	2.078	0.193	1.000
30	KON 1	18/05/04 12:04:18			391.13	2.22	1.07	7.757	3.463	7.266	-0.065	0.193	1.000

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.  
Analyte:dsDNA

Date:2018/05/04  
Page:4/4

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
31	KON 2	18/05/04 12:05:20			1025.14	2.19	1.26	20.967	9.816	16.715	0.464	0.193	1.000
32	TE	18/05/04 12:06:04			5.89	1.68	0.42	0.001	-0.047	0.162	-0.116	0.193	1.000

### Ek-3.Nanodrop cihazında aday transgenik patateslerdetoplam RNA konsantrasyonu

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/07/12

Analyte:RNA

Page:1/6

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	pRCA 8/1	18/07/12 09:48:08			431.11	1.67	0.13	11.675	7.337	82.902	0.897	0.193	1.000
2	KK rd29A 9/1	18/07/12 09:51:24			2029.88	1.58	0.63	53.076	34.498	82.870	2.329	0.193	1.000
3	Kontrol 1	18/07/12 09:52:58			316.36	1.65	0.11	8.296	5.181	73.858	0.387	0.193	1.000
4	35 S 2	18/07/12 09:54:28			1403.48	1.61	0.43	36.036	22.805	82.902	0.949	0.193	1.000
5	35 S 1 kök	18/07/12 09:57:30			227.61	1.63	0.11	5.942	3.746	54.334	0.252	0.193	1.000
6	PRC 10 2	18/07/12 09:58:41			410.09	1.62	0.15	10.336	6.416	69.774	0.084	0.193	1.000
7	35 S kök	18/07/12 09:59:43			78.07	1.58	0.45	1.750	1.034	4.114	-0.202	0.193	1.000
8	PRCA 9 1	18/07/12 10:00:46			142.61	1.87	0.12	3.646	1.983	30.221	0.081	0.193	1.000
9	Kontrol kök	18/07/12 10:02:58			417.96	1.74	0.13	12.479	8.030	82.902	2.030	0.193	1.000
10	YS rd 9/2	18/07/12 10:04:45			190.29	1.84	0.07	5.300	3.132	66.607	0.543	0.193	1.000

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/07/12

Analyte:RNA

Page:2/6

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
11	35 S 1/1	18/07/12 10:05:38			51.15	1.73	0.09	1.277	0.738	14.309	-0.002	0.193	1.000
12	Sera kontrol rd 3	18/07/12 10:06:50			368.72	2.00	0.11	9.832	5.215	82.902	0.614	0.193	1.000
13	35 S 2	18/07/12 10:07:35			186.37	2.07	0.17	5.047	2.638	27.391	0.388	0.193	1.000
14	YS+K rd 8/1	18/07/12 10:10:35			575.86	1.58	0.17	14.453	9.149	82.902	0.057	0.193	1.000
15	KK rd 3/1	18/07/12 10:12:20			382.43	1.59	0.13	9.641	6.101	71.909	0.080	0.193	1.000
16	Kontrol rd 3/1	18/07/12 10:13:41			95.65	1.84	0.04	2.614	1.520	64.649	0.222	0.193	1.000
17	Doku Kültürü 35 S 1	18/07/12 10:14:50			96.73	1.90	0.11	2.362	1.217	21.782	-0.056	0.193	1.000
18	YS+K rd 8/2	18/07/12 10:15:54			233.50	1.69	0.07	6.039	3.656	82.902	0.202	0.193	1.000
19	KK rd 8/2	18/07/12 10:17:18			132.52	1.71	0.05	3.456	2.085	64.957	0.143	0.193	1.000
20	YS rd 3/3	18/07/12 10:18:20			527.12	1.58	0.16	13.444	8.587	82.902	0.266	0.193	1.000

## Ek-4.Nanodrop cihazında aday transgenik patateslerdetoplam RNA konsantrasyonu

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/07/12

Analyte:RNA

Page:3/6

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
21	YS rd 8/2	18/07/12 10:20:31			392.55	1.63	0.13	10.428	6.634	75.918	0.615	0.193	1.000
22	kontrol rd 9/2	18/07/12 10:23:07			363.18	1.58	0.13	10.447	7.113	71.618	1.367	0.193	1.000
23	YS+K rd 8/1	18/07/12 10:24:25			73.46	1.72	0.03	1.650	0.883	58.459	-0.187	0.193	1.000
24	kk rd 8/3	18/07/12 10:25:40			59.09	1.92	0.03	1.343	0.635	57.769	-0.134	0.193	1.000
25	ys+k rd 9/1	18/07/12 10:26:36			573.08	1.63	0.18	15.836	10.307	82.902	1.509	0.193	1.000
26	kontrol ys 2	18/07/12 10:27:49			412.95	1.63	0.13	10.924	6.952	82.902	0.600	0.193	1.000
27	ys rd 8/1	18/07/12 10:28:48			206.63	1.68	0.06	5.364	3.269	82.902	0.198	0.193	1.000
28	kontrol LO 3	18/07/12 10:30:33			235.76	2.01	0.07	6.253	3.296	82.902	0.359	0.193	1.000
29	prca 8/1	18/07/12 10:33:58			582.93	1.66	0.18	15.464	9.645	82.902	0.891	0.193	1.000
30	prca 8 kök	18/07/12 10:35:04			2543.17	1.00	1.00	82.902	82.902	82.902	19.322	0.193	1.000

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/07/12

Analyte:RNA

Page:4/6

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
31	kontrol rd 9/1	18/07/12 10:36:38			114.49	1.68	0.06	2.674	1.517	48.946	-0.188	0.193	1.000
32	ys rd 3/1	18/07/12 10:37:49			182.68	1.60	0.12	4.328	2.618	39.014	-0.239	0.193	1.000
33	35 S	18/07/12 10:39:20			90.70	1.76	0.06	2.170	1.189	35.605	-0.098	0.193	1.000
34	prca 10/1	18/07/12 10:40:36			139.86	1.73	0.05	3.418	1.942	66.585	-0.078	0.193	1.000
35	prca 10 kök	18/07/12 10:41:29			84.59	1.54	0.92	1.749	1.011	1.929	-0.366	0.193	1.000
36	ys rd 9/3	18/07/12 10:42:59			189.55	1.96	0.06	5.551	3.230	82.902	0.813	0.193	1.000
37	35 S 2	18/07/12 10:46:08			325.12	1.61	0.12	8.088	5.001	65.853	-0.040	0.193	1.000
38	ys rd 3/1	18/07/12 10:47:57			806.78	1.67	0.25	20.891	12.795	82.902	0.722	0.193	1.000
39	kontrol rd 8/2	18/07/12 10:50:15			168.33	1.81	0.13	4.259	2.379	31.298	0.050	0.193	1.000
40	prca 10/3	18/07/12 10:51:24			359.28	1.82	0.13	9.743	5.688	70.725	0.761	0.193	1.000

## Ek-5. Nanodrop cihazında aday transgenik patateslerde toplam RNA konsantrasyonu

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2018/07/12

Analyte:RNA

Page:5/6

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
41	prca 9/2	18/07/12 10:53:35			156.61	1.64	0.11	3.655	2.122	34.675	-0.260	0.193	1.000
42	kontrol LO	18/07/12 10:55:44			204.43	2.11	0.09	4.890	2.198	57.691	-0.220	0.193	1.000
43	kontrol kök	18/07/12 10:57:09			152.88	1.70	0.09	4.754	3.183	42.417	0.932	0.193	1.000
44	kk rd 8/1	18/07/12 10:58:38			291.50	1.62	0.12	7.415	4.620	63.143	0.127	0.193	1.000
45	ys+k rd 3/2	18/07/12 11:00:41			243.71	1.68	0.07	6.122	3.660	82.902	0.029	0.193	1.000
46	kontrol rd 8/3	18/07/12 11:02:03			222.49	1.80	0.08	6.128	3.651	72.981	0.566	0.193	1.000
47	ys rd 9/1	18/07/12 11:03:05			153.78	1.70	0.10	3.902	2.317	40.331	0.058	0.193	1.000
48	prca 8/3	18/07/12 11:04:21			176.67	2.05	0.12	8.954	6.688	41.958	4.537	0.193	1.000
49	kontrol rd 3/2	18/07/12 11:06:44			366.68	1.57	0.11	9.886	6.543	81.633	0.719	0.193	1.000
50	kontrol rd 8/1	18/07/12 11:08:08			309.56	1.59	0.10	7.647	4.789	76.939	-0.092	0.193	1.000

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

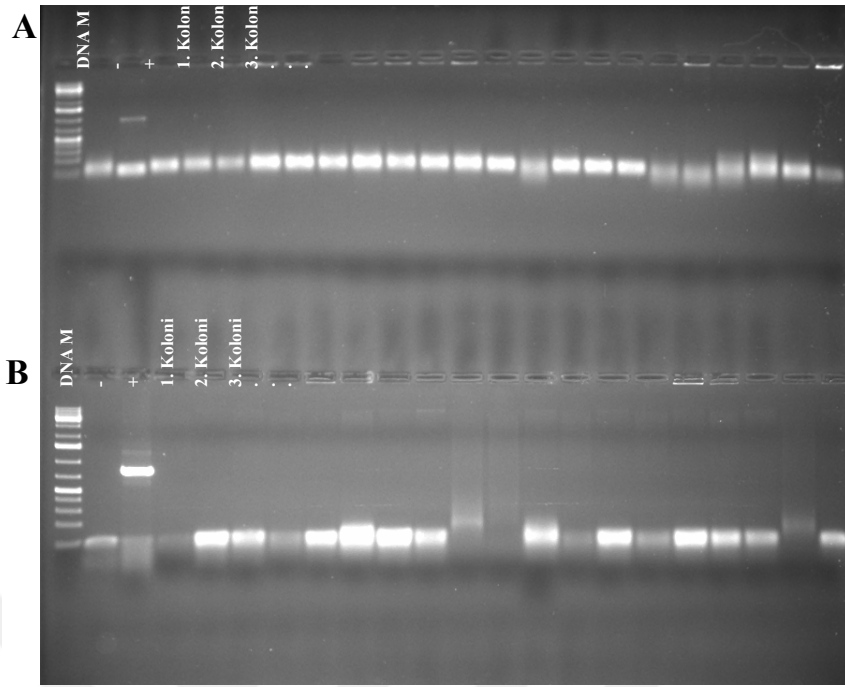
Date:2018/07/12

Analyte:RNA

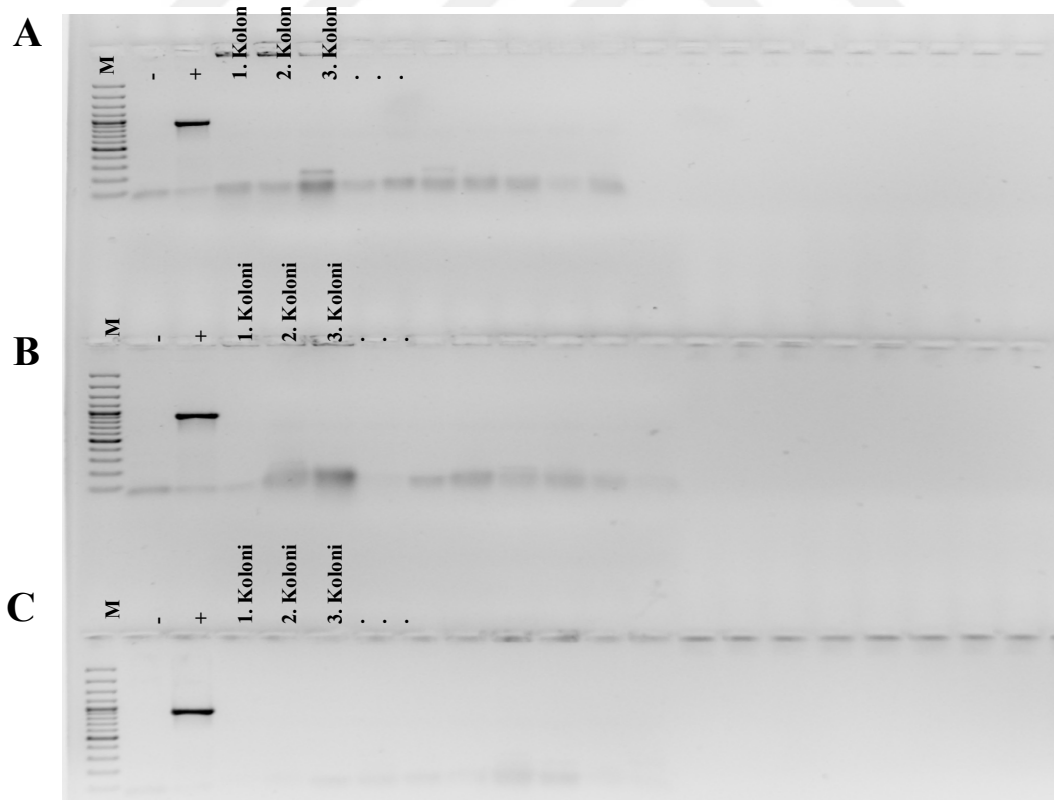
Page:5/6

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
51	ys+k rd 3/1	18/07/12 11:10:39			191.01	1.60	0.07	4.565	2.769	69.283	-0.210	0.193	1.000
52	kuraklık rd 8/2*	18/07/12 11:15:22			139.82	1.69	0.06	3.290	1.861	63.243	-0.206	0.193	1.000
53	kontrol rd 9/2*	18/07/12 11:19:20			488.29	1.99	0.16	12.291	6.225	75.880	0.084	0.193	1.000
54	prca 8/1	18/07/12 11:21:05			236.27	1.84	0.08	6.184	3.491	78.179	0.277	0.193	1.000
55	prca 8/2	18/07/12 11:22:22			339.88	1.74	0.10	8.403	4.790	82.902	-0.094	0.193	1.000
56	prca 8/1*	18/07/12 11:24:07			456.95	1.67	0.14	11.788	7.219	82.902	0.364	0.193	1.000
57	kontrol 3	18/07/12 11:32:30			177.54	2.00	0.07	4.754	2.535	65.733	0.316	0.193	1.000
58	belirsiz	18/07/12 11:33:30			903.37	1.66	0.28	23.472	14.517	82.902	0.887	0.193	1.000

**Ek-6.** Klonlama aşamasında yapılan ve negatif çıkan koloni PCR sonuçları



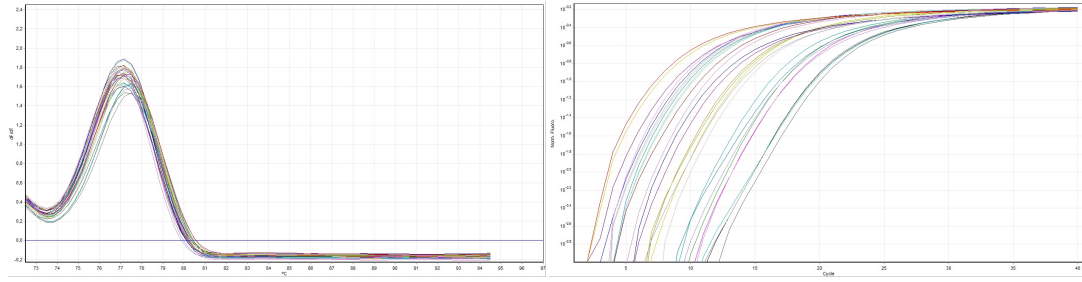
**Ek-7.** Klonlama aşamasında yapılan ve negatif çıkan koloni PCR sonuçları



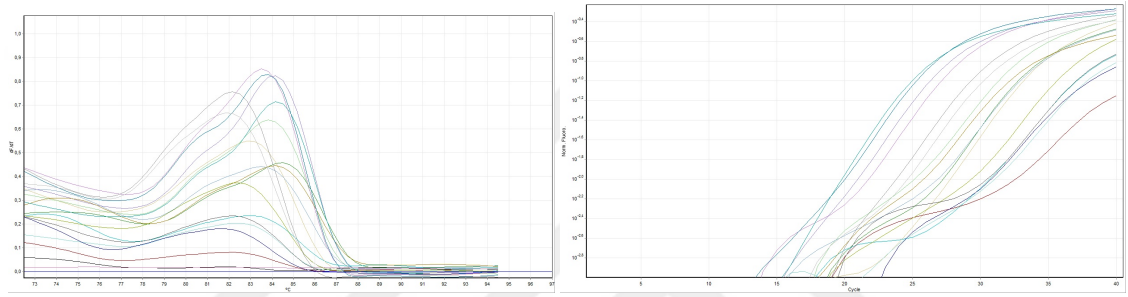
**Ek-8.** Aday transgenik bitkilerinden doğrulama yöntemlerinin sonuçları

Sıra No:	Tarnsgenik aday bitkilerinin adı	Histokimyasal GUS analizi	PCR sonucu	GUS Fluorogenik analizi	qRT-PCR sonucu
1	LO-pRCA-1	-			
2	LO-pRCA-2	+	+		
3	LO-pRCA-3	+	+		
4	LO-pRCA-4	+	+		
5	LO-pRCA-5	+	+		
6	LO-pRCA-6	-			
7	LO-pRCA-7	+	+	+	+
8	LO-pRCA-8	+	+		
9	LO-pRCA-9	+	+		
10	LO-pRCA-10	+	+	+	+
11	LO-pRCA-11	+	+		
12	LO-pRCA-12	+	+		
13	LO-pRCA-13	-			
14	LO-pRCA-15	+	+		
15	LO-pRCA-16	+	+		
16	LO-pRCA-17	-			
17	LO-pRCA-18	-			
18	LO-pRCA-19	+	+		
19	LO-pRCA-20	+	+		
20	LO-pRD29A-1	+	+		
21	LO- pRD29A-2	+	+		
22	LO- pRD29A-3	+	+	+	+
23	LO- pRD29A-4	+	+		
24	LO- pRD29A-5	+	+		
25	LO- pRD29A-6	+	+		
26	LO- pRD29A-7	+	+		
27	LO- pRD29A-8	+	+	+	+
28	LO- pRD29A-9	+	+	+	+
29	LO- pRD29A-10	+	+		
30	LO- pRD29A-11	-			
31	LO- pRD29A-12	+	+		
32	LO- pRD29A-13	-			
33	LO- pRD29A-14	+	+		
34	LO- pRD29A-15	+	+		
35	LO-35S-1	+	+		
36	LO-35S-2	+	+	+	+
37	LO-35S-3	+	+		
38	LO-35S-4	-			
38	LO-35S-5	-			
40	LO-35S-6	+	+		
41	LO-35S-7	-			
42	LO-35S-8	-			
43	LO-35S-9	-	+		
44	LO-35S-10	-			
45	LO-kontrol-1	-			
46	LO-kontrol-2	-			

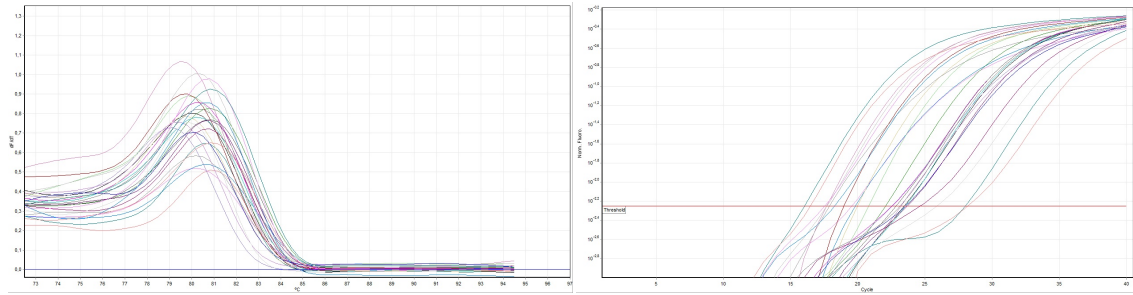
**Ek-9.** *pRCA* ve *35S CaMV* transgenik patateslerde 18S rRNA referans geninin erime sıcaklığı ve çoğalma eğrisi



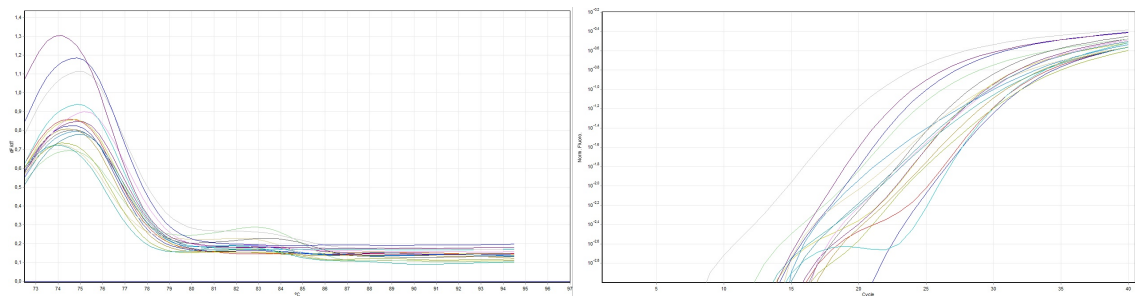
**Ek-10.** *pRCA* ve *35S CaMV* transgenik patateslerde GUS geninin erime sıcaklığı ve çoğalma eğrisi



**Ek-11.** *pRD29A* transgenik patateslerde *ef1a* referans geninin erime sıcaklığı ve çoğalma eğrisi



**Ek-12.** *pRD29A* transgenik patateslerde GUS geninin erime sıcaklığı ve çoğalma eğrisi



## ÖZ GEÇMİŞ

Ilhom RAHAMKULOV 02.03.1990 tarihinde Türkmenistan'ın Magdanly şehrinde dünyaya geldi. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Magdanly şehrinin 1'inci ortaokulunda tamamladı. Liseden sonra 2008-2010 yılları arasında Türkmenistan'da askerliğini yaptı. Ardından 2011 yılında Türkiye'de Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nü kazandı. 2016 yılında lisans eğitimini bitirdikten sonra, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Tarımsal Genetik bölümünde yüksek lisansa başladı. Yüksek lisans sırasında Erasmus programı ile İngiltere'deki (İskoçya) The James Hutton Enstitünde 3 ay CRISPR teknolojisi ile ilgili stajını yaptı.

