

*** PATATES BÖCEĞİ (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'ne DAYANIKLI
BİTKİLER ELDE ETMEK AMACIYLA PATATES (*Solanum tuberosum* L.)'in
GENETİK TRANSFORMASYONU**

Genetic Transformation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) to Produce Resistant
Plants for Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)

Semiha ÜNLÜ YÜCEER,
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Mukaddes KAYIM
Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÖZET: PCAMBIA1301 plazmidini içeren *Agrobacterium tumefaciens*'in EHA101 izolatu, iki patates çeşidinin genetik transformasyonunda kullanılmıştır. *Hpt* ve *Cry 1A(c)* genlerini taşıyan pCAMBIA1301 plazmidi higromisin B antibiyotiğine ve bazı böceklere karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Genetik transformasyon çalışması "Marfona" ve "Granola" patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerinin yaprak ve internodium doku parçalarında yapılmıştır. *Cry 1A(c)* genini içeren transgenik sürgünler 10 mg/l higromisin B içeren ortamda selekte edilmiştir. Higromisin B antibiyotiğine dayanıklı olarak seçilen toplam 55 adet patates bitkisinden 35 adedinin *Hpt* genini içerdiği PCR analizi ile çoğaltılan spesifik 700 bp DNA fragmenti ile saptanmıştır. "Marfona" patates çeşidine ait 5 adet transgenik yumrularda *Hpt* genin varlığında PCR analizi ile gösterilmiştir. *Hpt* geni içeren transgenik "Marfona" ve "Granola" patates çeşitleri Patates böceği ile biyolojik olarak testlenmiştir. Yapılan Biyolojik testlemede transgenik "Marfona" ve "Granola" bitkileri üzerinde beslenen Patates böceği larvalarında % 80-85 oranında ölüm meydana geldiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik Test, *Cry 1A(c)*, Genetik Transformasyon, Patates Böceği, PCR

ABSTRACT : EHA101 isolates of *Agrobacterium tumefaciens* harbouring pCAMBIA1301 plasmid was used for the genetic transformation of two potato varieties. The plasmid, pCAMBIA 1301 carrying *Hpt* gene provides resistance to antibiotic of hygromycin B, and *Cry 1A(c)* gene provides resistance to some insects. Genetic transformation was conducted on leaf and internodium explants of Marfona and Granola Potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. The transgenic potato plants containing *Cry 1A(c)* gene were selected in medium with 10 mg/l hygromycin B. Thirty-five plants out of fifty-five plants resistant to hygromycin B antibiotic, were determined by specific 700 bp DNA fragment reproduced with PCR analysis to have *Hpt* gene. In the five transgenic microtubers of Marfona variety

* Doktora Tezi- Phd. Thesis

was also determined to have *Hpt* gene. Transgenic Marfona and Granola potato varieties having *Hpt* gene were biologically tested with potato beetles. Testing showed that % 80-85 of larvas of potato beetles lived on transgenic Marfona and Granola varieties died.

Keywords: Biological Test, *Cry* IA(c), Genetic Transformation, Potato Beetle, PCR

Giriş

Patates ucuzluğu, birim alandan fazla verim sağlanması, besin değerinin yüksek olması, farklı şekillerde kullanılması ve her çeşit iklimde yetiştiriciliğinin yapılmasından dolayı, bugün ülkemizin de hemen her bölgesinde yetiştirilmektedir. Patateste ürün kayıplarına neden olan zararlılar arasında en önemlilerden birisi de Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'dir (Anonim 2009). Bu böceğin ergin ve larvaları bitkinin yapraklarını genellikle dıştan içe doğru veya, yaprakta bir delik açarak, bu deliği genişleterek yemek suretiyle, ileri aşamalarda ise çiçeklerle de beslenerek patates de zarar oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalarda bu zararlının patateste % 70-80'lere varan ürün kayıplarına neden olduğu belirlenmiştir (Oerke ve ark. 1994). Patates böceğinin beslenerek doğrudan yaptığı zararın yanı sıra patateste Kahverengi Çürüklük, İğ Yumru Viroidi ve Patates Halkalı Çürüklüğü Hastalıkları'nın yayılmasında taşıyıcı olarak da zarar yapmaktadır. Bu zararıya karşı insektisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bu kimyasallar sonucunda Patates Böceği'nde ilaçlara karşı dayanıklılık gelişmesi gibi problemler ile karşılaşmaktadır. Ayrıca kullanılan bu insektisitler sadece üretim maliyetini arttırmakla kalmayıp, insan, çevre ve doğal düşmanlar üzerinde de oldukça fazla olumsuz etkiler yapmaktadır (Anonim 2009).

Karşılaşılan bu sorunlardan dolayı kimyasal mücadeleye alternatif, zararlılara tolerant veya dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Verimli, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genel olarak klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Klasik bitki ıslahı yöntemleri ile bitkilerin tarımsal özelliklerini iyileştirmede çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bunların başında, aktarılması istenilen genle birlikte istenmeyen genlerin de geçmesi, uyumsuzluk nedeniyle türler arasında gen değişiminin sınırlı kalması, uzun zaman ve emeğe ihtiyaç göstermektedir. Patates bitkisinin anfidiploid bir bitki oluşu, sterilit ve Patates Böceğine dayanıklı patates çeşitlerinin olmayışı gibi nedenlerle söz konusu zararıya karşı melezleme gibi klasik ıslah yöntemleri ile, bu zararıya dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi mümkün olamamaktadır (Beaujean ve ark. 1998). Bu sorunlara çözüm bulmada günümüzde somatik hibridizasyon, mutasyonlar oluşturma ve genetik transformasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır. 1980'li yıllarda özellikle böceklerle karşı insektisidal etkiye sahip *Bacillus thuringiensis*'in *Cry* toksin genlerinin klonlanarak bitkilere aktarımı bu konudaki çalışmalara hız kazandırmıştır. *B. thuringiensis Cry* δ -endotoksin protoksin halinde 130 kDa büyüklüğündedir. Bu toksin böcek tarafından alındığında orta bağırsak bölgesinde çözülmekte ve proteolitik aktive sonucunda 60 kDa büyüklüğündeki aktif formlarına dönüşmektedir (Grochulski 1995). Toksinin etki mekanizması; aktif haldeki toksinlerin bağırsak epitel hücrelerinde bulunan reseptör bölgelerine bağlanmasını

takiben hücre zarı üzerinde delikler oluşturması sonucu, bu hücrelerin parçalanmasına neden olmaktadır (Knowles ve Dow 1993). *Cry* δ -endotoksinlerden *Cry* IA(c) ve *Cry* IA(b) özellikle Lepidoptera, *Cry* II hem Lepidoptera hem de Diptera, *Cry* III Coleoptera ve *Cry* IV Diptera takımı böcek türlerine etki etmektedir. Patates Böceği (*L. decemlineata* Say.) Coleoptera takımına ait böcek türlerinden olup, ergin böceklerin yanı sıra dört larva dönemleri de patates yapraklarında ciddi zarar oluşturmaktadır. Lepidoptera takımı böcek türlerinde öldürücü etkisi olan *Cry* IA(c) geninin patates böceği larvalarında da etkisi araştırılmak amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve metod

Materyal

Araştırmada Bitki materyali olarak "Marfona" ve "Granola" patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerine ait *in vitro* bitkilerin internodium ve yaprak eksplantları transformasyonda bitki materyali olarak kullanılmıştır. Gen transferinde markör olarak higromisin dayanıklılık geni (*Hpt*) ile böceklerle karşı dayanıklılık sağlayan *Cry* IA(c) genini taşıyan pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA101 *A. tumefaciens* izolatu kullanılmıştır. Araştırmada kültür ortamı olarak 500 mg/l MES ile farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonları ilave edilmiş Murashige and Skoog (1962) temel besi ortamı kullanılmıştır (Unlu Yuceer, 2011).

Metod

***Agrobacterium tumefaciens* İzolatının Kültürü:** Gen transferinde kullanılan *A. tumefaciens*' in pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA101 izolatu 50 mg/l Kanamisin (Km) içeren 10 cm çapındaki cam petri kutularında bulunan katı YEP ortamı üzerine öze ile çizilerek 28 °C' de kültüre alınmıştır. Bakteri izolatından birkaç koloni öze ile alınarak, içerisinde 50 mg/l Km içeren 20 ml sıvı YEP ortamına inokule edilmiş ve 28 °C'de 200 devir/dakika' da çalışan bir çalkalayıcı üzerinde gece boyunca geliştirilmiştir (Kayım 1997). Bakteri süspansiyonu için 15 dakika 2200 devir/dakika'da santrifüj (Sigma Mikro Santrifuj 1-14) edilerek bakterilerin tüplerin tabanına çökmesi ile bakteri pelleti elde edilmiştir. Tüpün tabanındaki bakteri pelletinin üzerine transformasyon solüsyonu ilave edilmiştir. Bakteri solüsyonunun içine pH'yı sabitlemek amacı ile MES [2(N-Morpholino) ethanesulfonic acid] ve bakterilerin virülensliğini arttırarak bitki dokusuna girişini teşvik etmek için 1 mg/l 2.4-D, 20 mg/l asetosiringon ve 5 mM Betain ilave edilmiştir (Unlu Yuceer, 2011). Transformasyonda kullanılacak olan bakteri yoğunluğu spektrofotometre (DİĞİLAB, HITACHI, U-2800) yardımı ile Optik yoğunluk (OD)=550-600 nm'de ölçülerek transformasyon için uygun değer olan OD=0.2'ye ayarlanmıştır (Koc ve ark. 2007).

Bitki Doku Parçalarının *A. tumefaciens* ile Transformasyonu: *Agrobacterium tumefaciens*' in pCAMBIA1301 plazmidini içeren EHA 101 izolatu daha önce *in vitro* da geliştirilen bitkilerin yaprak ve internodium doku parçaları ortak kültüre alınmıştır. Bitki doku parçaları bakteri solüsyonu içinde 10, 15, 20, 30 ve 40 dakika

bekletilmiştir. Bitki doku parçaları karanlık koşullarda 1, 2 ve 3 gün süre ile inkübe edilmiştir (Kayım 1997; Unlu Yuceer ve Koc 2006).

Transgenik Bitkilerin Regenerasyonu, Seleksiyonu ve Adaptasyonu: Bitki doku parçalarının iki gün süre ile bakteri ile birlikte kültüre alınmasından sonra bitki doku parçaları üzerindeki bakterileri uzaklaştırmak amacıyla eksplantlar 300 mg/l Karbenisilin (Cb), 250 mg/l Sefotaksim (Cf) ve 10 mg/l Higromisin (Hg) antibiyotiklerini içeren bitki rejenerasyon ortamları üzerinde kültüre alınarak Hg'li ortamlarda bitki seleksiyonu sağlanmıştır. Seleksiyon sonrası elde edilen tahmini transgenik bitkiler, farklı konsantrasyonlarda IBA (0.3, 0.5 ve 1 mg/l) ve NAA (0.1, 0.3, 0.5 ve 1 mg/l) içeren modifiye edilmiş MS ortamı üzerinde kültüre alınarak kök oluşumları teşvik edilmiştir.

Transgenik Olduğu Varsayılan Bitkilerin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi :

Genomik DNA İzolasyonu: Saksıda geliştirilmiş olan bitkiler belli bir büyüklüğe gelince yapraklardan DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu bazı değişikliklerle Koç ve ark. (2007)'nin yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

PCR Analizleri: Patates bitkisinden izole edilen DNA örnekleri *Hpt* geninin varlığı açısından PCR analizleri ile test edilmiştir (Roehorst ve ark., 2005). Bu genlere spesifik dizayn edilmiş primerler oligonükleotid sentezi yapan firmalardan temin edilmiştir. *Hpt* geni için (ileri 5' CGG AGT CGT GGC GAT 3'), (geri 5' AGT TCG ACA GCG TCT 3') primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı için 0.4 µl dNTPs (10 mM), 2.5 µl PCR bafı (50 Mm KCl, 10 Mm Tris-HCl (25°C'de pH:9.0), 1.5 mM MgCl₂ ve 0.1 % Triton X-100) (10x), 2.5 µl MgCl₂ (15 mM), 1 µl Primer 1 (100µM) , 1 µl Primer 2 (100µM), 1 µl DNA (50-100 ng), 0.2 µl Taq Polimeraz (1U), karıştırılmış ve toplam hacim ddH₂O ile 25µl olacak şekilde 0.5 ml'lik santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. PCR aleti (Techne) içerisine yerleştirilmiş ve program 94 °C'de 1 dakika 1 döngü, bunu takip eden diğer program, 94 °C'de 30 sn. dakika, 68 °C'de 45 sn. ve 72 °C'de 1 dakika olmak üzere 30 döngü olarak uygulanmıştır. Döngü tamamlandıktan sonra örnekler 72 °C'de 4 dakika daha inkübe edilmiştir.

Transgenik Patates Bitkilerinin Biyolojik Olarak Testlenmesi

Patates Böceği Üretimi: Üretim çalışmaları 26-27°C sıcaklık, % 60-65 orantılı nem 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında yapılmıştır (Nazarian ve ark. 2009).

Transgenik Bitkilerde Biyolojik Testleme: Elde edilen transgenik bitkiler sera koşullarında böcek kafesleri içerisinde Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'nin farklı dönem (3. ve 4.) larva ve erginlerinden bitki başına 4-5 adet olacak şekilde denemeleri kurulmuş, larva ve erginlerdeki ölüm oranı gözlenmiştir (Davidson ve ark. 2004; Nazarian ve ark. 2009). Patates böceğinin 3. ve 4. dönem larvaları transgenik "Marfona" ve "Granola" bitkileri ve kontrol ("Marfona" ve "Granola") bitkilerden alınan yapraklarla plastik petripler üzerinde 5 tekerrürlü deneme kurulmuştur. Kurulan denemede, petripler üzerine steril filtre kağıtları nemlendirilerek, kontrol ve transgenik bitkilerin yaprakları konmuştur. Her bir petri üzerine 4 adet patates böceği yerleştirilmiş olup, 4 gün süre ile beslenerek bu süre

sonunda larvaların ortalama ağırlığı alınarak elde edilen sonuçlar varyans analizi MSTAT-C paket programı kullanılarak istatistik analizleri yapılmıştır.

Transgenik Bitkilerden Elde Edilen Vejetatif Yumruların Testlenmesi: Transgenik bitkilerden vejetatif dönem sonrasında elde edilen yumruların dormansilerini kırmak için 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Yumrular *in vivo* koşullarda kontrollü sera ortamında kültüre alınarak gelişmeleri sağlanmıştır. Elde edilen bitkilerden DNA izolasyonları yapılmış, ve Higromisin B antibiyotikğine dayanıklılık geninin (*Hpt*) varlığı PCR analizleri ile doğrulanmıştır.

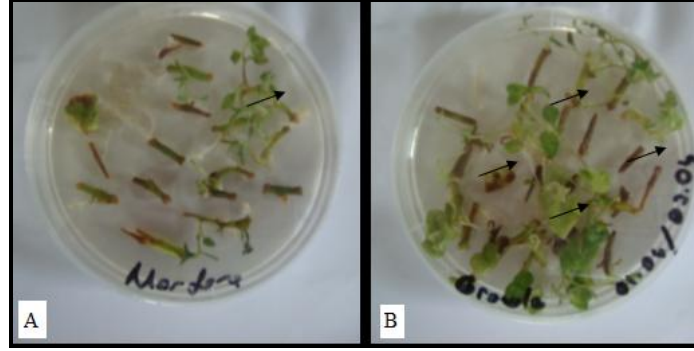
Araştırma Bulguları

Yumruların ekilmesinden 4-8 hafta sonra vejetatif gelişme olduğu gözlenmiştir. "Marfona" patates çeşidinin "Granola" çeşidine göre çıkış gücünün yüksek, hızlı ve yatık büyüdüğü saptanmıştır. Bitki doku parçaları standart yöntemlere göre sterilizasyon işlemi tamamlanmış deney tüpleri içinde klima odasında kültüre alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Buradan gelişimleri sağlanan bitkiler transformasyonda kullanılmıştır.

A. *tumefaciens* ile Patates Eksplantlarının Transformasyonu: Patates bitkisinde *A. tumefaciens*'in pCAMBIA 1301 plazmidini içeren EHA101 izolatu ile transformasyonları yapılmıştır. Transformasyonun ilk aşaması olan bakteri solüsyonun hazırlanması esnasında içerisine 20 mg/l asetosiringon, 5 mM betain ve 1 mg/l 2,4-D ilave edildiğinde transformasyon sıklığının arttığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar; Hamdi ve ark. (2003)'ün yapmış oldukları çalışmalarda da rapor edilmiştir. Internodium eksplantların bakteri solüsyonunda 20 dakika bekletilmesinin transformasyon sıklığı açısından en iyi sonucu verdiği saptanmıştır. Bu sürelerden daha uzun süre bakteri solüsyonu içerisinde bekleyen bitki doku parçalarında karar ve sonrasında antibiyotikli ortam üzerinde kültüre alındığında yoğun bakteri gelişiminin devam ettiği gözlenmiştir. Transformasyonu yapılan dokular antibiyotik içeren rejenerasyon ortamı üzerinde kültüre alınması sonucunda tahmini transgenik bitkilerin 2-3 hafta sonra geliştiği gözlenmiştir (Şekil 1). Transformasyonda kullanılan 90 adet internodium doku parçasından 81, 30 adet yaprak doku parçalarından ise 6 adet birbirinden bağımsız tahmini transgenik bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Böylece yaprak doku parçasında transformasyondan sonra oldukça düşük rejenerasyon meydana gelirken, internodium doku parçalarından daha yüksek rejenerasyon seviyesinde transgenik sürgün gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 1). Şekil 1, ve Şekil 2 A,C,D'den de anlaşıldığı gibi yapılan transformasyon çalışmalarından sonra tahmini transgenik doku parçalarında antibiyotikli ortamlar üzerinde rejenerasyonun oldukça iyi olduğu gözlenmiştir. Araştırmada bakteri ile gen transferi yapılmadan antibiyotik içeren ortamlar üzerinde kontrol amacıyla patatesin internodium doku parçaları kültüre alınmıştır. Kontrol amaçlı kültüre alınan internodium doku parçaları ilk haftalarda normal gelişimlerini sürdürürken daha sonraki haftalarda doku parçaların da sararma, klorofilsiz renk açılımları ve ölüm meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 2B).

Çizelge 1. *A. tumefaciens*'in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA 101 İzolatı İle Transforme Edilen İnternodium ve Yaprak Eksplantlarında Transformasyon Sıklığı

	Kul. Eksplant Sayısı	Elde Edilen Sürgün Sayısı	Transformasyon Başarısı (%)
İnternodium	90	81	90
Yaprak	30	6	20
Toplam	120	87	110

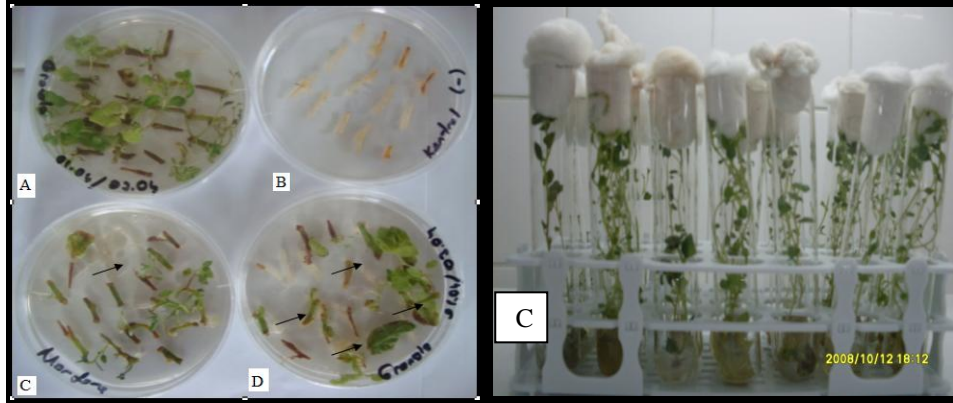


Şekil 1. Cry 1A(c) Genini Taşıyan *A. tumefaciens* ile Transformasyon Sonucunda 10 mg/l Hg ve 300 mg/l Cb İçeren Ortam Üzerinde Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından Gelişen Tahmini Transgenik "Marfona" ve "Granola" Patates Sürgünleri

Transformasyon yapılan dokulardan gelişen 5 haftalık tahmini transgenik sürgünler daha iyi gelişimlerini sağlamak için 15 ml katı ortam içeren cam deney tüplerine aktarılmıştır (Şekil 2C).

Transgenik Bitkilerin Köklendirilmesi ve Doğal Koşullara Adaptasyonları: Elde edilen tahmini transgenik bitkiler köklendirmek amacıyla Higromisin B (Hg) antibiyotiği içeren farklı hormonlarla denemeler kurulmuştur. En iyi kök gelişiminin 1 mg/l NAA içeren MS ortamında meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 3A). Kök oluşumu için 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan bitkilerde % 50 oranında köklenme olduğu belirlenmiş ve oluşan köklerin kısa ve zayıf kılcal köklerden meydana geldiği gözlenmiştir. Diğer köklendirme ortamında bitkilerde oluşan köklerin zayıf köklerden oluştuğu saptanmıştır. NAA'ın 1 mg/l konsantrasyonunu içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan bitkilerde 3 hafta sonra 15 cm uzunluğunda kök oluşturduğu gözlenmiştir. Bu transgenik bitkiler toprağa aktarılarak, doğal koşullara adaptasyonları sağlanmış ve normal büyüme göstermişlerdir. Gelişen bitkiler üzerinde çiçek ve yumru oluşumu bakımından herhangi bir anormallik gözlenmemiş, normal bitkiler gibi gelişim gösterdiği

belirlenmiştir (Şekil 3B). *In vitro* koşullardan *in vivo* koşullarına adaptasyon esnasında yaklaşık % 40 “Granola”, % 20 “Marfona” bitkisinde kayıplar meydana gelmiştir.



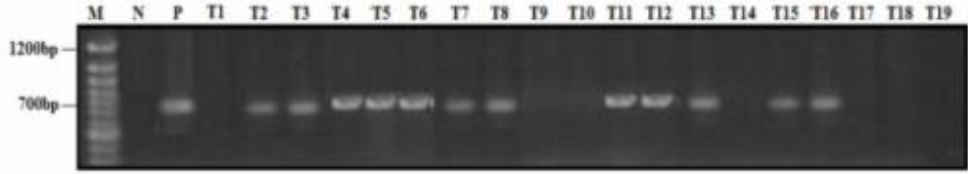
Şekil 2. Transformasyon Sonucunda Kültüre Alınan İnternodium Doku Parçalarından Gelişen Tahmini Transgenik “Marfona” (C) ve “Granola” (A, D) Sürgünleri, Transforme Edilmemiş Patates İnternodium Eksplantları (Kontrol:B) ve Cam Deney Tüplerinde Kültüre Alınan Transgenik Bitkiler (C)



Şekil 3. 10 mg/l Hg ve 1mg/l NAA İçeren MS Ortamlarında Kültüre Alınan Transgenik Patates Çeşitlerinde Kök Gelişimleri (A) ve Toprağa Adapte Edilen Transgenik Bitkiler (B)

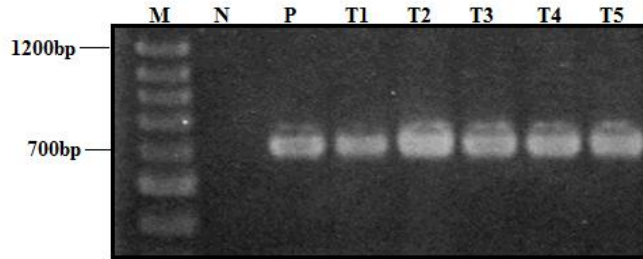
Transgenik Bitkilerden İzole Edilen DNA Örneklerinde Higromisin Dayanıklılık Geninin (*Hpt*) PCR Analizi: Transgenik patates bitkilerinde markör gen olan *Hpt* geni için PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4). Transgenik olmayan kontrol bitkiden izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı PCR sonucunda herhangi bir bant oluşmaz iken, pozitif kontrol olarak kullanılan bakterinin oluşturduğu DNA bandının büyüklüğü ile transgenik bitkilerden elde edilen DNA bandı büyüklüğü ile aynı

spesifik band oluşturdıkları Şekil 4'de görülmektedir. Antibiyotikli ortamlar üzerinde seleksiyonu yapılan transgenik bitkilerden bazı bitkilerin PCR analizi sonucunda herhangi bir DNA bandı oluşmadığı belirlenmiştir. Buda bazen antibiyotikli ortam üzerindeki gen kaçışlarının olduğunu göstermektedir (Davidson ve ark. 2004; Kumar ve ark. 2010). Transgenik bitkiler arasından tesadüfi olarak seçilen 19 adet transgenik bitkilerin *Hpt* geninin varlığı açısından yapılan PCR analizinde 12 tane transgenik bitkilerin PCR sonucunda spesifik bantlar oluşturduğu belirlenmiştir. Spesifik bantlar oluşturmayan bitkilerde PCR sonrası sentezlenen DNA'nın elektroforezde kayba uğrayabileceği yada dejenere olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4. “Marfona” (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9) ve “Granola” (T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19) Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerde *Hpt* Geni İçin PCR Analizi; M; 100bp DNA Ladder Plus, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19; Transgenik Bitkiler, P; EHA101 İzolatı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi

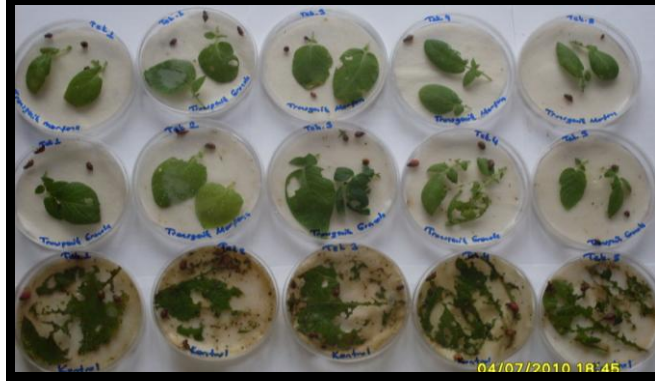
Transgenik Bitkilerden Elde Edilen Vejetatif Yumruların Higromisin Dayanıklılık Geni (*Hpt*) İçin PCR Analizi: Transgenik patates bitkilerinden elde edilen vejetatif yumruları saksılara dikilmiş ve çıkışları gözlenmiştir. Dikimi yapılan 10 adet “Marfona” yumrularından 5 tanesinde bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerden DNA izolasyonları yapılmış ve *Hpt* geni için PCR analizleri yapılmış ve spesifik 700 bp. büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir. Böylece aktarılan genin stabil olarak yumrulara geçtiği kanıtlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. “Marfona” Patates Çeşitlerinden Elde Edilen Transgenik Bitkilerin Yumrularının *Hpt* İçin PCR Analizi; T1, T2, T3, T4, T5; Transgenik Yumru, P; *A. tumefaciens*' in pCAMBIA1301 Plazmidini İçeren EHA101 Irkı, N; Transformasyon Yapılmamış Patates Bitkisi

Transgenik Patates Bitkilerinin Biyolojik Olarak Testlenmesi: Transgenik “Marfona” ve “Granola” çeşidi patates bitkilerinde higromisin geninin varlığı açısından PCR analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda pozitif bant oluşumu gösteren transgenik bitkiler seçilerek *Cry 1 A(c)* geninin varlığını tespit etmek için biyolojik testlemeler yapılmıştır. *Cry 1 A(c)* geni içeren transgenik patates bitkileri test etmek için sera koşullarında böcek kafesleri içerisinde 3. ve 4. dönem patates böceği (*L. decemlineata* Say.) larvalarının bitkiler üzerinde beslenmeleri sağlanmıştır. Kurulan deneme sonucunda kontrol bitki ve transgenik bitkilerden alınan yapraklar ile beslenen patates böceği larvalarının 4 gün sonra % 80-85 oranında larva ve % 50 oranında pupa ölümü meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 6). Kontrol olarak kullanılan patates bitkisinin yaprakların üzerinde beslenen larvalar canlılıklarını korumuşlardır. Davidson ve ark. (2004), *Cry 1 Ac9* genini *A. tumefaciens* aracılığı ile patates bitkilerine aktararak Lepidoptera takımından olan patates güvesine karşı dayanıklı bitkiler elde etmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkilerin böcek larvalarında yüksek oranda ölümlere neden olduğunu saptamışlardır. Kamenova ve ark. (2008) *Cry 3 A* geni ile üç farklı patates çeşitlerine gen aktarımı yapmışlar ve patates böceğine (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Elde ettikleri transgenik bitkileri biyolojik testleme amacıyla patates böceği farklı dönemlerindeki larvalarının beslenmelerini sağlamışlar ve larvaların dönemlerine göre 2-9 gün içerisinde öldüklerini tespit etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmalarda da Lepidoptera takımı zararlılar üzerinde etkili olan *Cry 1A(c)* geninin patates bitkisine aktarılması sonucunda elde edilen transgenik patates bitkilerinin *Cry* genlerinin toksik etkisinden dolayı patates böceğinin larvalarına karşıda etkili olabileceği gözlenmiştir. Transgenik bitkiler üzerinde beslenen patates böceklerinde % 10-15 oranında bir zarar meydana gelirken, transformasyon yapılmamış kontrol olarak kullanılan bitkinin yaprakları üzerinde beslenen patates böceği % 90 oranında bir zarar meydana getirmiştir (Şekil 6).

Kurulan deneme sonucunda transgenik “Marfona” ve “Granola” çeşidi üzerinde beslenen patates böceğinin ağırlıklarında ilk günlerde farklılaşma olmadan 3. ve 4. günlerde ağırlıklarında azalma meydana gelmiştir. Dört günlük takiplerde böceklerin % 80-85'inde ölüm gözlendiği bazı böceklerde ise pupa oluşumunun meydana geldiği gözlenmiştir. Daha sonraki kontrollerde ise oluşan pupalarda kurumalar meydana gelmiş ve ergin çıkışına rastlanmamıştır. Kontrol, Transgenik “Marfona” ve “Granola” bitkileri ile beslenen larvaların ortalama değerleri incelendiğinde, kontrole göre transgenik bitkiler ile beslenen böceklerde önemli düzeyde ağırlık kaybı saptanmıştır. İki çeşit arasında özellikle “Marfona” çeşidinde diğer çeşide göre daha düşük ağırlık saptanmasına karşın bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 2).



Şekil 6. Transjenik “Marfona” (Üstten İlk Sıra) ve “Granola” (Üstten İkinci Sıra) ve Kontrol Bitkilerin Yaprakları (Üstten Üçüncü Sıra) Üzerinde Beslenen Patates Böceği (*L. decemlineata* Say) Larvalarının Oluşturduğu Zarar

Çizelge 2. Transjenik “Marfona” ve “Granola” Üzerinde 4 Gün Beslenen Patates Böceği (*L. decemlineata* Say.) Larvalarının Ağırlıklarındaki Farklılaşma

Uygulama	GÜNLER				Ortalama
	1	2	3	4	
Konrol	76.0	81.4	96.0	113.0	91.60 a*
Transjenik Granola	58.0	51.8	48.0	38.0	48.45 b*
Transjenik Marfona	46.0	42.4	35.0	24.4	36.95 b*
Ortalama	60.0	58.5	59.7	58.5	59.17
LSD					16.18

* Aynı harf ile gösterilen ortalamalar LSD 0.05 olasılık düzeyinde benzerdir.

Tartışma ve Sonuçlar

Cry IA(c) delta endotoksinlerinin Lepidoptera takımı böcekler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Burada yapılan çalışmada aktarılan *Cry* IA(c) geninin Coleoptera takımına bağlı patates böceği larvalarında da etkili olabileceği gösterilmeye çalışılmıştır. Burada elde edilen sonuçlar ile literatürde yapılan çalışma sonuçlarının uyum içerisinde olduğu görülmüştür. *Cry* kristal proteinleri *Bacillus thuringiensis*'den izole edilmiş 200 den fazla grup ve en az 50 tane alt gruptan oluşmaktadır. İzole edilmiş farklı *Cry* genleri arasında yapısal bazı farklılıkların olması nedeniyle farklı *Cry* genleri meydana gelmiştir. *Cry* genlerinin yapısında (domain I, II ve III) 3 farklı domain bölgelerinden meydana gelmiştir. Domain II ve domain III bölgeleri konukçu ile reseptör bölgesini tanıyarak bağlanmakta ve bu şekilde konukçu hücreye toksik etkisini oluşturmaktadır (Davidson ve ark. 2004). *Cry* IA(c) geni özellikle Lepidoptera takımı böceklerde toksik etki yarattığı düşünülmektedir rağmen Kumar ve ark. (2010) yapmış oldukları biyolojik analizlerde Coleoptera

takımı böceklerle de *Cry IA* genlerinin etkili olduğunu göstermişlerdir. Mohammed ve ark. 2000 yaptıkları biyolojik testlemelerde *Cry II* geninin Lepidoptera ve Coleoptera takımlarında etkili olduğu, *Cry Ib* geninin ise, Coleoptera, Lepidoptera ve Diptera takımlarına ait böceklerle karşı da etkili olduğu, *Cry IA* ve *Cry II* genleri kullanılarak yaptıkları biyolojik testlemelerde bu genlerin kodladığı aktif proteinlerin Lepidoptera ve Coleoptera takımı böceklerle de etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu şekilde araştırma sonucunda bazı *Cry* proteinlerinin birden fazla böcek takımlarında öldürücü etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Nitekim bu çalışmada da *Cry IA(c)* geninin Coleoptera takımı Patates böceği larvalarında da toksik etki yarattığı kanıtlanmıştır.

Kaynaklar

- ANONİM, 2009. Patates Hastalık ve Zararlıları İle Mücadele, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü.
- BEAUJEU, A., SANGWAN, R.S., LECARDONNEL, A., and SANGWAN-NORREEL, B.S., 1998. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Three Economically Important Potato Cultivars Using Sliced Internodal Explants: An Efficient Protocol of Transformation. *Journal of Experimental Botany*, Vol.49:1589-1595.
- DAVIDSON, M.M., TAKLA, M.F.G., JACOBS, J.M.E., BUTLER, R.C., WRATTEN, S.D., and CONNER, A.J., 2004. Transformation of New Zealand Potato Cultivars with a *cry1Ac9* Gene Confers Resistance to The Potato Tuber Moth. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 32, 39-50.
- GROCHULSKI, P., 1995. *Bacillus thuringiensis Cry 1A(a)* Insecticidal Toxin-Crystal Structure and Channel Formation. *J. Mol. Biol.*, 254:447-464.
- HAMDI, M., ROUVIERE, C., ROJAS-BELTRAN, J., and JARDIN, P., 2003. Optimization of Potato Genetic Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* Using Hygromycin Resistance as Selective Marker. *Biotechnologie*, Vol:7:183-188.
- KAMENOVA, I., BATCHVAROVA, R., FLASINSKI, S., DIMITROVA, L., CHRISTOVA, P. SLAVOV, S., ATANASSOV, A., KALUSHKOV, P., AND KANIEWSKI, W., 2008. Transgenic resistance of Bulgarian potato cultivars to the Colorado potato beetle based on Bt technology. *Agron. Sustain. Dev.* 28:481-488
- KAYIM, M., 1997. Kütüden Limon (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) Çeşidinde Genetik Transformasyon ve Transgenik Bitkilerin Elde Edilmesi. Doktora Tezi Ç.Ü. Fen Bilimleri Enst. Adana, 176.
- KNOWLES, B.H., and DOW, J.A.T., 1993. The Crystal Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*-Models For Their Mechanisms of Action on the Insect Gut. *BioEssays*, 15:469-476.
- KOÇ, N.K., KAYIM, M., YETİŞİR, H., SARI, N., UNLU YUCEER, S., and ARICI, Ş. E., 2007. The Improvement of Resistance to Bacterial Speck in Transgenic Tomato Plants by *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation. *Russian Journal of Plant Physiology*. Vol:54 (1) pp:89-96.

- KUMAR, M., CHIMOTE, V., SINGH, R., MISHRA, G.P., NAIK, P.S., PANDEY, S.K., and CHAKRABARTI, S.K., 2010. Development of Bt Transgenic Potatoes for Effective Control of Potato Tuber Moth by Using Cry 1Ab Gene Regulated by GBSS Promoter. *Crop Protection* 29:121-127.
- MURASHIGE, T., and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- MOHAMMED, A., DOUCHES, D.S., PETT, W., GRAFIUS, E., COOMBS, LISWIDOWATI, J., LI, W., and MADKOUR, M.A., 2000. Evaluation of Potato Tuber Moth (Lepidoptera:Gelechiidae) Resistance in Tubers of Bt-Cry5 Transgenic Potato Lines. *J. Econ.Entomol.* 93(2):472-476.
- NAZARIAN, A., JAHANGIRI, R., JOUZANI, G.S., SEIFINEJAD, A., SOHEILIVAND, S., BAGHERI, O., KESHAVARZI, M., and ALAMISAEID, K., 2009. Coleopteran-Specific and Putative Novel Cry Genes in Iranian Native *Bacillus thuringiensis* Collection. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 101-109.
- OERKE, E.C., DEHNE, H.W., SCHONBECK, F., and WEBER, A., 1994. *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 808 pp.
- ROENHORST, J.W., JANSEN, C. C. C., KOX, L. F. F., DE HAAN, E. G., VAN DEN BOVENKAMP, G. W., BOONHAM, N., FISHER, T., and MUMFORD R. A., 2005. Application of Real-Time RT-PCR for Large-Scale Testing of Potato for *Potato spindle tuber pospiviroid* . *EPPO Bulletin* 35 (1), 133–140.
- UNLU YUCEER, S., and KOC, N.K., 2006. *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Regeneration of Cotton Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol:53, pp. 413-417.
- UNLU YUCEER, S 2011. Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'Ne Dayanıklı Bitkiler Elde Etmek Amacıyla Patates (*Solanum Tuberosum* L.)'İN Genetik Transformasyonu. Doktora Tezi Ç.Ü. Fen Bilimleri Enst. Adana, 134.