

Araştırma Makalesi
(Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2019, 56 (1):35-43
DOI: 10.20289/zfdergi.399041

Safa SÜMER^{1a}
İlhom RAHAMKULOV^{1b}
Ufuk DEMİREL^{1c}
Mehmet Emin ÇALIŞKAN^{1d}
Allah BAKHSH^{1e*}

¹Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde, Türkiye

^aOrcid : 0000-0003-1335-4783

^bOrcid : 0000-0002-7782-6332

^cOrcid : 0000-0002-3457-5086

^dOrcid : 0000-0002-4703-8853

^eOrcid : 0000-0003-3561-7863

*sorumlu yazar: allah.bakhsh@nigde.edu.tr

Anahtar Sözcükler:

Yabancı otlar, patates transformasyonu, Glifosata dirençlilik

Key Words:

Weeds losses, Potato transformation, Glyphosate resistance

Herbicide Dayanıklılık Geni (CP4-EPSP Sentez) İçeren Transgenik Patates Hatlarının Geliştirilmesi

Production of Transgenic Potato Lines Expressing Herbicidal Gene (CP4-EPSP Synthase)

Alınış (Received): 26.02.2018

Kabul Tarihi (Accepted): 17.07.2018

ÖZ

Amaç: Yabancı otlar diğer bitkilerde olduğu gibi patates bitkisinde de önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışmada herbisite dayanıklılık karakterinin Agrobacterium aracılığıyla iki farklı patatese aktarılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu amaçla, genetik aktarımı için "Lady Olympia" ve "Desiree" patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerinin yaprak ve boğumarası doku parçaları eksplant olarak kullanılmıştır. Gen aktarımı yapmak için pCAMHE-EPSPS plazmidini içeren *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin LBA4404 izolatları kullanılmıştır. Gen aktarım amacıyla kullanılan pCAMHE-EPSPS plazmidinde 35S promotörü kontrolü altında CP4-EPSPS geni bulunmaktadır. Çalışmada, T-DNA bölgesinde bulunan *gusA* geninin varlığı aday transgenik bitkilerin erken dönemde tespit edilmesini kolaylaştırmıştır.

Bulgular: In vitro besi ortamında transgenik hücrelerin seçimi için 1.5 mM'lik Glifosat N-(fosfonometil) glisin en uygun konsantrasyon olarak bulunmuştur. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerinde transformasyon etkinliği sırasıyla % 0,7 ve % 0,3 olarak hesaplanmıştır. Aday transgenik bitkilerde yapılan GUS histokimyasal analizi, PCR deneyleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR ve yatay akışlı ölçüm çubuğu analizleri sonucunda CP4-EPSPS geninin transgenik patates hatlarında işlevsel olarak yer aldığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Yapılan glifosat herbisit uygulaması sonucunda da CP4-EPSPS geninin patatese karşı etkinliğini ortaya koymuştur. Geliştirilmiş transgenik patates hatları ıslah programında gen kaynağı olarak kullanılabilirler.

ABSTRACT

Objective: Weeds incur significant losses to crop plants including potatoes. The present research work was conducted to introduce herbicide resistance trait in two potato cultivars Lady Olympia and Desiree via Agrobacterium mediated genetic transformation.

Material and Methods: For this purpose, Agrobacterium strain LBA4404 harboring pCAMHE-EPSPS binary vector was used to infect leaf and internodal explants of both cultivars. The plasmid contained CP4-EPSPS gene under the control of 35S promoter. The presence of *gusA* gene with in T-DNA region facilitated earlier screening of primary transformants.

Results: A concentration of 1,5 mM of Glyphosate N-(phosphonomethyl) glycine was found suitable for the selection of transformed cells in in vitro culture media. Overall transformation efficiency was calculated as 0,7 and 0,3% in "Lady Olympia" and "Desiree" respectively. The primary transformants were screened for gene integration and expression using standard molecular techniques i.e. PCR, Real time, and Lateral flow dipstick assay. The efficacy of transgenic plants against roundup ready was evaluated by glyphosate application assays using recommended dose.

Conclusion: The transgenic plants showed enhanced tolerance against glyphosate applications. The developed transgenic lines can be used as a germplasm in potato breeding programme.

GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum* L.) anavatanı Güney Amerika olan tek yıllık bir kültür bitkisidir. Dünyanın yaklaşık hemen her yerinde yetiştirilen patates ülkemiz tarım ve ekonomi açısından da önemli yere sahiptir. Yumrularında; nişasta halinde karbonhidrat, protein, vitaminler ve Fe gibi önemli besin maddelerini içeren patates, bu yönüyle insanlar tarafından doğrudan yemeklik olarak tüketildiği gibi, yüksek oranda nişasta içeren cips, konserve, alkol, nişasta, pudra, çocuk maması vb. yapımında hammadde olarak ve bir kısmı da havyan yemi olarak kullanılmaktadır (Arioğlu, 2002). 2017 yılında 4 800 000 ton üretimi yapılan patates 2016 yılında 4 750 000 ton yapılan üretim ile göre bir önceki yıla göre % 1.1 oranında artış göstermiştir. Niğde ilimizde 2016 yılında 237 851 da alanda 892 8297 ton üretilen patatesin Niğde için ortalama verimi 3.751 kg tespit edilerek Türkiye'deki patates üretiminin %19 unu gerçekleştirmiştir (TÜİK, 2017).

Patates tarımında yüksek verimler elde edebilmek için hastalık, zararlı ve yabancı otlarla mücadele büyük önem taşımaktadır (Bilgili ve Kadioğlu, 2003). Kültür bitkileri ile su, ışık, CO₂, mineral maddeler bakımından rekabete girip zarara yol açarlar. (Günçan, 2006; Özer vd., 2001; Tepe, 1997). Kültür bitkilerinin yabancı otların etki ettiği rekabetten etkilenmesi ekimden yaklaşık 1-1.5 ay içerisinde olmaktadır. Yabancı otlarla mücadele yapılmayan patates tarlalarında ürün kaybı %43 oranında tespit edilmiştir (Banaras, 1993). Yabancı otlar patates bitkisinde özellikle hasadı zorlaştırıp yumru büyüklüğü ile ve ağırlığının azalmasına neden olarak, birim alandan alınan verim miktarını önemli ölçüde azaltır (Zengin ve Günçan, 1993). Niğde merkezinde yapılan bir çalışmaya göre patates bitkisinde bulunan yabancı otlar genellikle melez horozibiği (*Amaranthus hybridus* L.), sirken (*Chenopodium album* L.), kırmızı köklü tilikuyruğu (*Amaranthus retroflexus* L.), siyah itüzümü (*Solanum nigrum* L.), kuş çobandeğneği (*Polygonum aviculare* L.) tarla sarmaşığı (*C. arvensis* L.), dağ minesi (*Myosotis arvensis* L.)'dir (Üstüner ve Günçan, 2003).

Yabancı ot mücadelesinde başlıca kullanılan yöntemler kültürel, fiziksel, biyolojik ve kimyasal mücadelelerdir. Kimyasal mücadele yöntemi olarak kullanılan herbisitler diğer mücadele yöntemlerine göre daha kolay uygulanıp, mücadelesi zor olan yabancı otlara daha kolay etki gösterirler (Zoschke, 1994; Serim ve Özdemir, 2012; Bakhsh vd, 2015). 1970'li yıllardan itibaren herbisitlerin oldukça fazla kullanımı sonucunda üretim maliyetlerinde dengesiz artışlar, bilinçsiz ve yanlış kullanımı ile çevre kirliliği ve dayanıklılık problemleri gibi sorunlar ortaya çıkmıştır (Reed vd., 1989; Cotterman ve Saari, 1992; Doğan vd., 2004).

Herbisitlere karşı dayanıklılık problemleri herbisitlerin kontrolsüz bir şekilde ve sürekli olarak uygulanması sonucunda meydana gelmektedir (Avcı, 2009). Genetik mühendisliği ve bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerin herbisitlere dayanıklılık kazandırmak konusunda 3 farklı strateji izlenim göstermektedir. Bunlar, herbisit etkililiği enzimi bitkinin fazla üretmesi, herbisit etkililiği enzimin yerine aynı görevi yapacak olan başka bir enzimin bitki bünyesine sentezi ve bitki gerekli olan kendi metabolizma faaliyetlerini artırıp bünyesi içerisinde bulunan herbisiti detoksifikasyon yapması sonucunda gerçekleştirmesidir. Bu stratejiler sonucunda

herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Moss ve Nayler, 2002).

Bitkilerde gen transfer çalışmaları 1982-1983 yıllarında başlamış ve böylece genlerin etki ve mekanizmaları incelenmiştir (Arı, 2001). Bitkilerde günümüzde gen transformasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* olup daha kolay ve ekonomik olması bu yöntemde başarısı şansını arttırmıştır (Özcan ve Özgen, 1996).

Bugüne kadar herbisitlere dayanıklı bitkilerin geliştirilip elde edilmesinde en çok kullanılan yöntem, *Agrobacterium tumefaciens*'ten aktarılan EPSPS enziminin üretiminden sorumlu, total seçici olmayan bir herbisit olan glifosat herbisitinin bitkide EPSPS (5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentez) enzim sentezini etkileyerek ve böylece bitkinin amino asit sentezin engellenmesine engel olan bir gen aktarmakla mümkün olmaktadır (Padgette et al. 1995). Fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerinin üretiminden sorumlu olan EPSPS biyokimyasal zorunlu olan bir enzim olup; bunun durdurulması bitkide protein sentezinin engellenip, büyüme ve gelişmenin yavaşlayıp ölümüne neden olmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* CP4 ırkından izole edilmiş olan EPSPS geni CP4-EPSPS olarak isimlendirilmiştir. Şikimat-3-fosfat ve fosfoenolpiruvat (PEP) arasındaki reaksiyonu katalize eden EPSPS enzimi glifosatın bitkideki tek hedef enzimidir (Duke ve Powles, 2008).

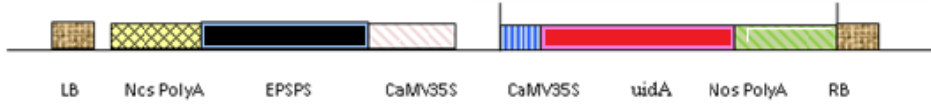
MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Transformasyon çalışmasında bitki materyali olarak Lady Olympia ve Desiree adlı iki patates çeşidi kullanılmıştır. Çalışma için yaprak ve boğumları eksplant olarak kullanılmıştır. Gen aktarım vektörü olarak, CP4 enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geninin mutant versiyonunu içeren pCAMHE-EPSPS bitki ifade vektörü kullanılmıştır. pCAMHE-EPSPS bitki ifade vektörü GUS-INT genini de içermektedir. pCAMHE-EPSPS bitki ifade vektöründeki T-DNA bölgesi 35S promotör ve nos terminatör tarafından yönetilmektedir (Şekil-1). Gen aktarımı için *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404 suju kullanılmıştır.

Yöntem

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



Şekil 1. pCAMHE-EPSPS vektörünün T-DNA bölgesinin şematik gösterimi
Figure 1. Schematic representation of T-DNA region of pCAMHE-EPSPS vector

Çalışmada kullanılan pCAMHE-EPSPS plazmid vektörlerini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattı, 50 mg/l rifampisin ve 50 mg/l kanamisin içeren 10 ml LB sıvı besin ortamı içerisinde 28°C'de, 200 rpm'de çalkalanarak bir gece boyunca büyütülmüştür. Bitkilerden uygun büyüklükteki yapraklar ve boğumarası steril kabin içerisinde kesilmiş ve üzerine 2 ml CP4-EPSPS genini içeren *A. tumefaciens* LBA4404 hattına ait sıvı bakteri süspansiyon eklenerek 45 dk süreyle ara ara hafif çalkalanarak inokülasyon yapıp bekletilmiştir. Bekletilip inoküle edilen eksplantlar daha sonra katı MS besi ortamı (% 3 sakkaroz ve ve % 0,8'lik agar ile katılaştırılan MS mineral tuz) içeren ko-kültivasyon ortamına aktararak 3 gün boyunca 25 °C ± 2 °C arasında sıcaklık, 16 saatlik ışık kapasiteli ve 8 saat karanlık bir fotoperiyot ve 47 µmol/m²/s ışık yoğunluğuna sahip olan büyütme kabininde ko-kültivasyon ortamında tutulmuştur. 3 gün sonra eksplantların steril kabin içerisinde steril saf su ve 1000 mg/l sulcid antibiyotigi kullanılarak 15 dk yıkama işlemi yapılmış ve steril kağıt üzerinde kuruması sağlanmıştır. Bu yıkama işlemi ise ko-kültivasyonda tutulan ve eksplantlarda bulunan bakterilerin ortamdaki uzaklaştırmak için yapılmıştır. Daha sonra eksplantlar rejene seleksiyon ortamına [2 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 2 mg/l trans zeatin ve 0,1 mg/l GA3, 1.5 mM PMG] 3 tekerürlü olacak şekilde aktarılmıştır. Büyütme kabininde tutulmuştur.

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

Gelişen transgenik aday sürgünleri daha sonra 2 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 2 mg/l trans zeatin ve 0,1 mg/l GA3 ve 1000 mg/l sulcid içeren MS besin ortamında magenta kutularına aktararak 25 °C ± 2 °C arasında sıcaklık, 16 saatlik ışık kapasiteli ve 8 saat karanlık bir fotoperiyot ve 47 µmol/m²/s ışık yoğunluğuna sahip olan büyütme kabininde köklendirilmiştir.

Transformasyon sonucu köklenen bitkiler yaklaşık 10-15 cm boya geldiğinde köklerin zedelenmemesi için büyüme

ortamlarından dikkatlice çıkarılmıştır. Çeşme suyu ile iyice yıkanıp temizlendikten sonra 1:1:1 oranında torf ve perlitle hazırlanan karışıma aktarılmıştır. Toprağa aktarılan bitkiler zamanla sık sık kontrol edilmiş ve sera şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır.

Aday transgenik bitkilerin belirlenmesi için genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu için DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cat No. 69106) ticari kiti kullanılmıştır. DNA miktarları spektrofometre (BioSpec-SHIMADZU) yöntemi ile ölçülmüş ve örnekler -20°C'de saklanmıştır.

Patates bitkisinden izole edilen DNA örnekleri CP4-EPSPS genlerinin varlığı kanıtlanması için PCR analizleri ile test edilip belirlenmiştir. Kullanılacak olan primerler hazırlanmış ve reaksiyon karışımı için gen spesifik primerler kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı, 1X PCR Buffer (50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂ ve 10mM Tris-HCl)- (7.5 µl mix Mm Buffer µl), 0.5 µl ileri primer (50 pmol/ul), 0.5 µl geri primer (50 pmol/ul), 1 µl genomik DNA (50 ng/ul) ve 10.5 µl ddH₂O ile 1 U Taq DNA polimeraz kullanılarak 20 µl toplam hacimde olacak şekilde hazırlanmış ve 0.2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. PCR ve qRT-PCR çalışmalarında patates bitkisinin Desiree ve Lady Olympia hatlarına ait aday transgenik bitkilerin teyit edilmesi için CP4-EPSPS, GUS ve ChvA geninin primer baz dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyutu belirlenmiştir (Tablo-1).

Tablo 1. PCR ve qRT-PCR çalışmalarında patates bitkisinin Desiree ve Lady Olympia hatlarına ait aday transgenik bitkilerin teyit edilmesi için CP4-EPSPS, GUS ve ChvA geninin primer baz dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün boyutu

Table 1. The sequence, product size and annealing temperature of primers used for CP4-EPSPS, GUS and ChvA genes in putative transgenic plants of Desiree and Lady Olympia in PCR and qRT-PCR assays

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

Tespit edilen PCR sonuçları, jel elektroforez yöntemi ile teyit edilmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) çalışması için (AMRESCO RiboZol™ RNA Extraction Reagent) kitine göre RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'dan cDNA oluşturulmuş ve cDNA sentezi, Fermentas cDNA synthesis kiti kullanılarak yapılmıştır. Toplam miRNA'lardan cDNA sentezi için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım için ilk olarak 1 µg toplam RNA (DNaz uygulanmış), 1 µl oligo dT primer (1000 µM) ve 12 µl'ye tamamlayacak hacimde DEPC suyu uygulanmıştır. Daha sonra bu karışım, 70 °C'de 5 dk inkübe edilmiş ve 1-2 dk buz üzerine alınarak soğutulmuştur. Soğutulan karışım üzerine 4µl 5× reaksiyon buffer, 1µl ribonukleaz inhibitör (20U/µl) ve 2µl dNTP karışımı (10mM) eklenmiştir. Ve arkasından 37°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Karışıma 1µl H minus M-MuLV ters transkriptaz (200U/µl) eklenmiş ve karışım 42 °C'de 60 dk inkubasyon yapılarak böylece cDNA sentez işlemi gerçekleşmiştir. Reaksiyonun son aşamasında ise karışım 70°C'de 10 dk bekletilmiş ve cDNA örnekleri gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi için 1:10 seviyesinde seyreltilmiştir. Aday transgenik bitkilerde CP4-EPSPS geninin ifade düzeyini belirlemek gerçek-zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizi yapılmıştır. Aday transgenik bitkiler için qRT-PCR çalışması 2 teknik tekrarlamalı olarak yürütülmüş ve analizden sonra sadece tek bir PCR ürünü oluşup oluşmadığını kontrol etmek için erime eğrisi analizi yapılmıştır. Sıcaklık döngüsü 95°C'de 15 dk inkübasyon, ardından 40 döngü olacak şekilde, 95 °C'de 10 sn, 55 °C'de 15 sn, 72 °C'de 20 sn inkübasyon yapılmıştır. Erime eğrisi analizi için PCR örnekleri 70 °C'den 99 °C'ye kadar 1 °C/dk olacak şekilde inkübe edilmiştir. qRT-PCR analizi çalışmaları Rotor-Gene Q cihazı (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. Cihazın kendi otomatik yazılımı sayesinde her bir örneğin Ct değeri ile birlikte bunlara ait standart sapma ve standart hata değerleri belirlenmiştir. Her bir aday transgenik bitkideki CP4-EPSPS geninin kontrol bitkideki (transgenik olmayan) CP4-EPSPS genine göre oransal ifade düzeyi 2-ΔΔCt hesaplama yöntemine göre belirlenmiştir.

Yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi ise, aday transgenik patates bitkilerinde CP4-EPSPS geninde protein seviyesi oranının belirlenmesi için yaprak disklerinden örnekler alınmış QuickStix™ Kit for Roundup Ready Plant Tissue (Envirologix AS010 LS) kiti kullanılarak protein analizi yapılmıştır.

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

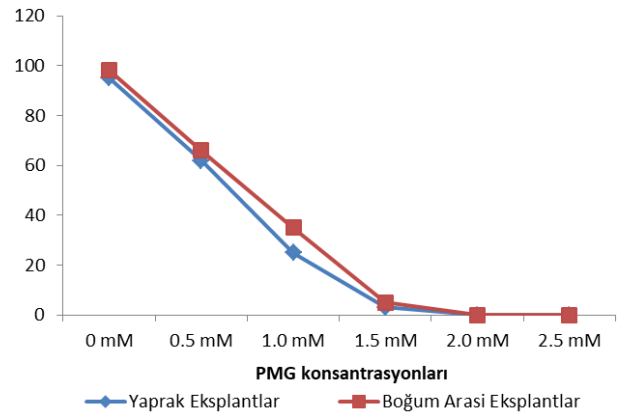
Bu çalışma 2016 ve 2017 yılları içerisinde Niğde Ömerhalisdemir Üniversitesi Ayhan Şahenk Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü çalışma sahalarında ,genetik transformasyon ve doku kültürü laboratuvarlarında yapılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çalışmada bakteri materyali olan -80°C' de bekletilen *A. tumefaciens* LBA4404 hatları gliserol stoklardan alınmış ve çoğaltılarak LB besin ortamına eklenmiştir. Besin ortamında

koloni oluşumu gözlemlenmiş ve oluşan kolonilerden koloni PCR yapılmıştır. Kalıp DNA olarak bir miktar koloni, 0,5 µM IF ileri primer, 0,5 µM IF geri primer, 100 µM dNTP, 1× PCR tamponu (50 mM KCl, 1.5mM MgCl2 ve 10mM Tris-HCl) ve 1 U Taq DNA polimeraz içeren toplam 20 µl hacimli karışım hazırlanmıştır. Karışım 94 °C'de 4 dk ön ısıtmaya maruz bırakıldıktan sonra, 35 döngü olacak şekilde 94 °C'de 40 sn, 55 °C'de 40 sn ve 72 °C'de 1 dk inkübe edilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünü %1 agaroz jelde koşurulmuş ve UV-ışığı altında görüntülenmiştir. Daha sonra pozitif olarak belirlenen koloniler seçilerek 50 µg/ml Kanamisin ve 50 µg/ml Rifampisin içeren sıvı LB besi ortamına inoküle edilmiş ve 28 °C'de, 200 rpm devirde shakerda çalkalanarak bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyütülen bu bakteriler gen aktarımında kullanılmıştır.

Patates çeşitleri genetik transformasyonu çalışması için optimum glifosat dozu belirlenmiştir. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerin yaprak ve boğum arası eksplantları, farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM) glifosat içeren MS besi ortamında 2 hafta süreyle standart büyütme koşullarında kültüre alınmıştır. Glifosat konsantrasyonu 1 mM üzerinde olan MS besi ortamında ekplantlarda kararma ve nekrosiz gözlenmiştir. Yapılan uygulamalar sonrası patates çeşitlerinin transformasyonu için en uygun glifosat konsantrasyonunun 1,5 mM olduğu bulunmuştur (Şekil-2).

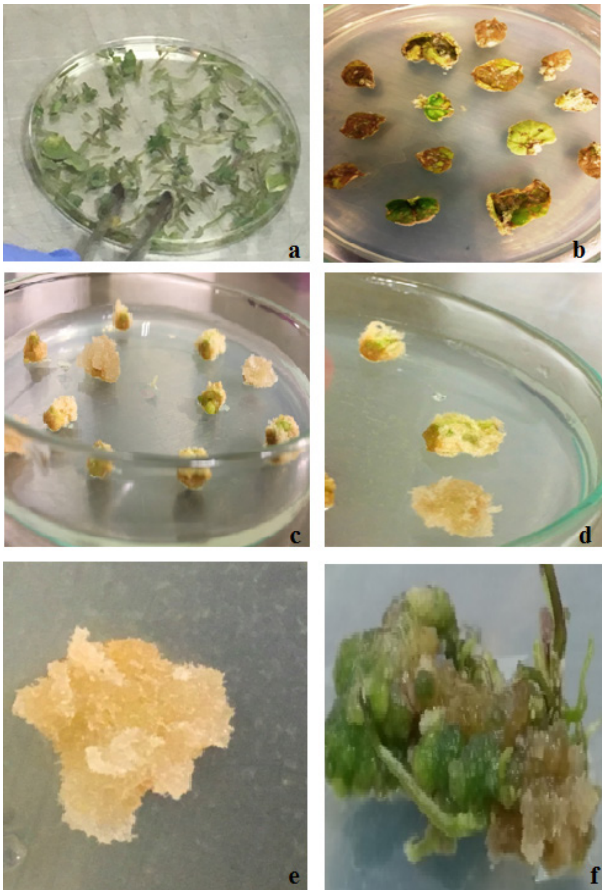


Şekil 2. Lady Olympia ve Desiree çeşitlerinde yaprak ve boğumarası eksplantları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda Glifosat N-(fosfonometil) glisin ile optimize edilmesi

Figure 2. The optimization of concentration of N-phosphonomethyl glycine (active gradient of Glyphosate) as plant selectable marker using leaf and internodal explants of Lady Olympia and Desiree cultivars

Transformasyon çalışmasında kullanılan Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinden yaprak diskleri ve bitki boğumaları alınarak transformasyon işlemi yapılmıştır. Transformasyon çalışmasının ardından bitkiler büyütme kabinlerinde bekletilmiş böylece aktarılan genin bitki hücrelerinin kromozomlara bağlanmasıyla kallus oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kallus oluşturan eksplantlardan 20-30 gün sonra sürgün oluşumu tespit edilip büyüyen transgenik adayı sürgünlerin sayımı yapılmıştır. Kallus oluşturmamayan bitki hücrelerinde ise 1 hafta sonra kararma gözlemlenmiş ve karamanın devamı gerekçesiyle kallus oluşturmadığı tespit edilmiştir (Şekil-3). Kallus oluşturup sürgünlene transgenik adayı bitkiler BAP (2

mg/l), NAA (0.2 mg/l), GA3 (0.1 mg/l), Trans-zeatin (2 mg/l) ve 1.5 mM içeren MS ortamlarında büyütülüp köklendirilmiştir. 10-15 cm boyunda köklenen sürgünler toprağa aktarılarak sera ortamında büyütülerek gelişmeleri takip edilmiştir. Transformasyon çalışmasında patates çeşitlerinden kesilen hem yaprak hem de boğumarası eksplantları, eksplant başına sürgün sayısı bakımından iyi sonuçlar ortaya koymuşlardır (Tablo-2, Tablo-3). Transformasyon etkinliğinin diğer kayıpları olarak serada transgenik bitkiler iyi büyürken herhangi bir olumsuz değişim gözlemlenmemiştir. Fakat, kanamisin kullanımının transgenik patates bitkilerinin rejenerasyonu için iyi bir seçim sistemi oluşturduğuna karar verilmiş olsa da (Sohail vd., 2012; Baksh vd. 2014), çalışmada gen kaçış olduğu fark edilmiştir. Yine benzer şekilde Horsch vd., (1985); McCormick vd. (1986) yaptıkları bir çalışmada kanamisinden kaynaklanan bir gen kaçışı olduğunu tespit etmişlerdir. Zhang vd., (2001) yaptıkları bir çalışmada ise eksplantların embriyojenik olmayan kallus, embriyojenik kallus ve somatik embriyoların kanamisine karşı duyarlılıkları farklı olarak gözlemlenmişlerdir. T-DNA' nın istikrarsızlığı, genetik alanında yapılan yeni düzenlemeler de kaçışların muhtemel nedenleri olabilir (McHugen ve Jordan, 1989).



Şekil 3. Patates çeşitlerinde bazı genetik transformasyon aşamaları. Her iki eksplantın *Agrobacterium* ile inokulasyonu (a), seçici jenerasyon ortamında her iki eksplanttan kallus oluşumları (b) (c) (d) (e), aday transgenik sürgün oluşturan kallus (f)

Figure 3. The different steps of *Agrobacterium* mediated potato transformation. Inoculation with *Agrobacterium* suspension (a), Callus induction from both explants (b, c, d, e), regeneration of putative transgenic shoots from resistant callus (f)

Tablo 2. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin kullanılan yaprak eksplantlarının kallus ve sürgün verileri

Table 2. The callus induction (%) and shoot regeneration response of Desiree and Lady Olympia using leaf discs as explant

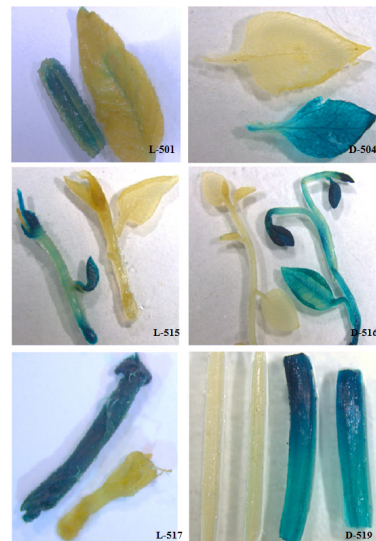
RSM Ortamı	BAP 2 mg/l + NAA 0,2 mg/l+ Trans zeatin 2 mg/l + GA3 0,1 mg/l+ PMG 1.5 Mm		Köklenme oranları
	Eksplant Sayısı	Kallus Oluşumu (%)	Ortalama Sürgün/Eksplant Sayısı
Lady Olympia	400	75	2.00
Desiree	400	70	2.33
			% 100

Tablo 3. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin kullanılan boğumarası eksplantlarının kallus ve sürgün verileri

Table 3. The callus induction (%) and shoot regeneration response of Desiree and Lady Olympia using internodes as explant

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

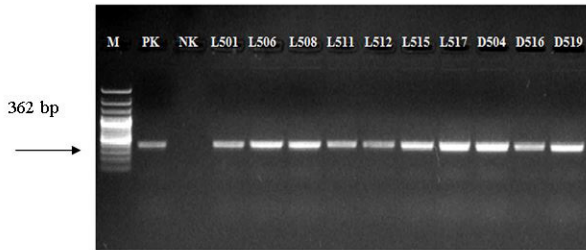
pCAMHE-EPSPS plazmidinin T-DNA bölgesinde GUS geninin bulunması nedeniyle, transgenik bitkilerin erken dönemde belirlenmesi daha kolay olmaktadır. Böylece bu çalışmada transgeniklerin taranması için histokimyasal GUS analizi uygulanmıştır. GUS geninin aktarıldığının göstergesi ise transgenik bitki dokularının mavi renge boyanmasıdır. İşlevsel olan uidA geni, GUS substratı olan X-Gluc ile muamele edildiğinde mavi renk oluşturmaktadır (Basu vd., 2004). Mavi renkli olan bitki kesitleri aday transgenik bitkiyi ifade ederken; mavi renkli olmayanlar kesitler ise transgenik aday olmayan bitkileri göstermektedir (Şekil-4).



Şekil 4. Yaprak ve boğumarasılarından oluşan kesilmiş eksplantların histokimyasal GUS analizi. Mavi renkli olan bitki kesitleri aday transgenik bitkiyi ifade ederken; mavi renkli olmayanlar kesitler ise transgenik aday olmayan bitkileri göstermektedir.

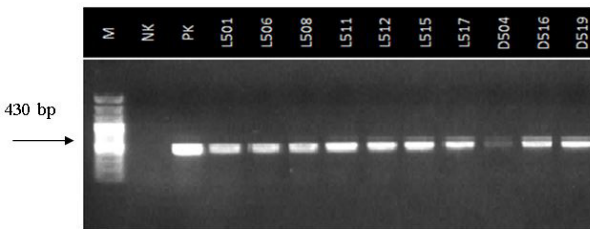
Figure 4. The GUS histochemical analysis of leaf and internodal explants along with non transgenic controls.

Serada yetiştirilen transgenik aday bitkilere aktarılan CP4-EPSPS geninin varlığını tespit etmek amacıyla çeşitli moleküler analizler yapılmıştır. Aday transgenik bitkilerde yapılan PCR analizi sonucunda CP4-EPSPS, GUS genlerinin bitkilerde varlığı tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde var olan genler çoğaltılmış ve PCR analizi sonucunda negatif kontrolde herhangi bir çoğalma olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil-5 ve 6). PCR sonuçlarına dayanarak transformasyon etkinliği belirtilmiştir (Tablo-4). PCR analizine göre transformasyon verimliliği Lady Olympia patates çeşidinde %28 iken ; Desiree çeşidinde ise % 12 olarak belirlenmiştir. Pozitif olarak belirlenen eksplanta göre ise transformasyon etkinliği Lady Olympia patates çeşidinde % 0.7 iken ; Desiree çeşidinde ise % 0.3 olarak belirlenmiştir. Transformasyon etkinliği, rejenerasyon ortamında hayatta kalan toplam bitki sayısı veya rejenerasyon ortamında hayatta kalan toplam bitkilerin içinden PCR pozitif olanların sayısına göre hesaplanabilmektedir. Önceki bilimsel raporlara dayanarak, farklı bitkilerdeki genetik transformasyon etkinliği farklı yöntemlerle hesaplanabilmektedir (Bakhsh vd., 2012; Sahoo vd., 2011).



Şekil 5. Lady Olympia ve Desiree aday transgeniklerde GUS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markörü, Fermentas

Figure 5. PCR analysis to detect GUS gene in putative transgenic plants of Lady Olympia and Desiree (M) 1 kb DNA Marker, (L) Lady Olympia putative transgenic plants, (D) Desiree putative transgenic plants, (PK): Positive control, (NK): Negative control



Şekil 6. Lady Olympia ve Desiree aday transgeniklerde CP4-EPSPS PCR analizi (M):1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA markör, Fermentas

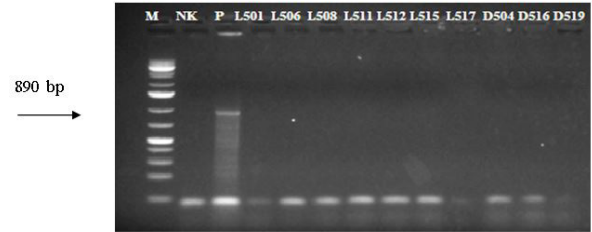
Figure 6. PCR analysis to detect GCP4-EPSPS gene in putative transgenic plants of Lady Olympia and Desiree (M) 1 kb DNA Marker Thermoscientific, (L) Lady Olympia putative transgenic plants, (D) Desiree putative transgenic plants, (PK): Positive control, (NK): Negative control

Tablo 4. Desiree ve Lady Olympia çeşitlerinin PCR analizine göre transformasyon etkinliği

Table 4. Transformation efficiency in Desiree and Lady Olymppia by PCR assay

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

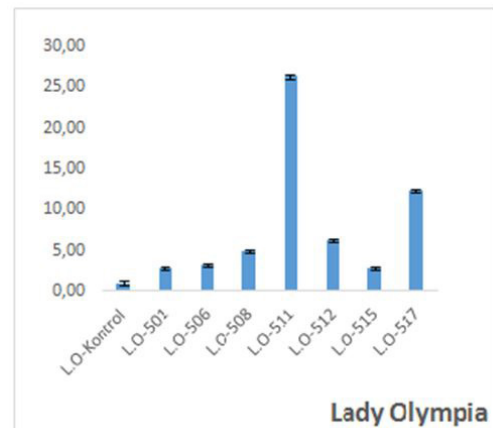
Agrobacterium'un konak bitkiyi enfekte edebilmesi ChvA genleri ile birlikte Vir genlerinin aktive edilmesine bağlıdır. ChvA, bakterinin konak hücreye tutunmasından sorumlu olan bir gendir (Nester, 2015). Bu nedenle, transgenik bitkilerde Agrobacterium kontaminasyonu olup olmadığı ChvA ve Vir genlerine özgü primerler kullanılarak PCR analizi ile doğrulanmıştır. Elde edilen jel ile transgenik bitkilerde Agrobacterium kontaminasyonu görülmemiştir (Şekil-7).

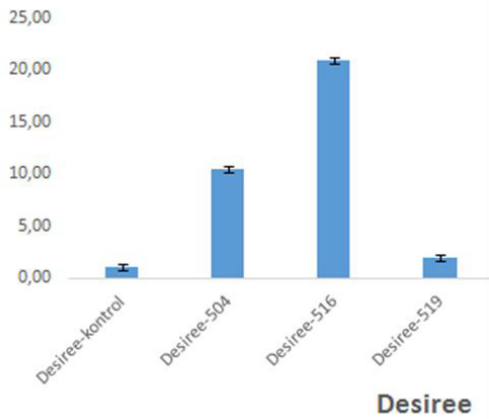


Şekil 7. Lady Olympia ve Desiree transgenikler bitkilerde ChvA geni için PCR sonuçları (M):1 kb plus DNA markörü, (NK): Negatif kontrol, (P): Pozitif kontrol, Agrobacterium LBA4404 kolonisi, (L): Lady Olympia, (D): Desiree bitkisi

Figure 7. PCR assays with ChvA gene in transgenic plants of Lady Olympia and Desiree (M) 1 kb plus DNA marker, (NK) Negative control, (P) Positive control, Agrobacterium LBA4404 colony, (L) Lady Olympia, (D), Desiree plants

Daha önce yapılmış olan GUS ve PCR molekül analizlerine göre pozitif olarak belirlenen bitkilerden qRT-PCR analizi yapılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), genlerin hücrelerde ifade edilip edilmediğini belirlemek için günümüzde hassas ve standart bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır. (Maqbool vd 2010; Rao vd., 2011; Anayol vd., 2016). Sonuçlara göre CP4-EPSPS geninin transgenik patates hatlarında işlevsel var olduğu tespit edilmiştir (Şekil-8). Ancak



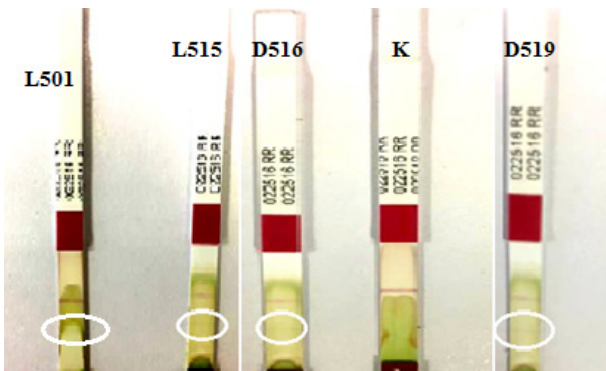


Şekil 8. qRT-PCR analizi ile CP4-EPSPS geninin transgenik bitkilerde kontrol bitkilere oranla kat değişimleri. Verilerin normalizasyonun için ef1a geni kullanılmıştır. D: Desiree, LO: Lady Olympia.

Figure 8. The relative fold expression of CP4-EPSPS transcripts in primary transformants using qRT-PCR. EF1a gene was used as internal control to normalize data. D: Desiree, LO: Lady Olympia

aktarılan gen çeşitli transgenik bitkilerde farklı olarak ifade edilebilir. Böylece bitkiye aktarılan genin bitki genomunda yerleştiği yere, aktarılan genin nükleotid dizisindeki herhangi bir değişikliğe, aktarılan genin kopya sayısı bağlı olarak gen ifade düzeyleri değişiklik gösterebilmektedir (Rao, 2005).

Transgenik patates bitkilerinde CP4-EPSPS geninde protein seviyesi oranının belirlenmesi için yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi yapılmıştır. Yapılan analize göre transgenik bitkilerde pozitif test çizgisi görülürken transgenik olmayan negatif olan

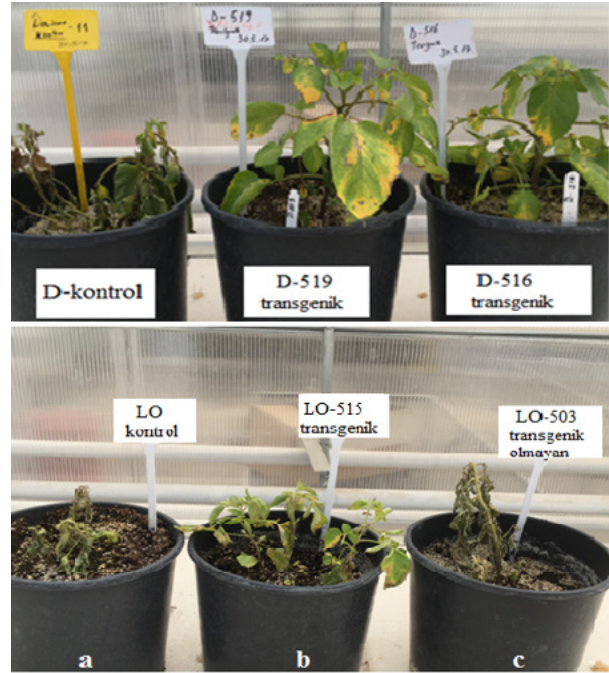


Şekil 9. CP4-EPSPS geni bulunduran transgenik bitkilerde yapılan yatay akışlı ölçüm çubuğu analizi. (İşaretli kısımlar pozitif test çizgisini göstermektedir)

Figure 9. CP4-EPSPS positive plants subjected to lateral flow dipstick assay was performed to detect EPSPS expression in transgenic plants.

kontrol bitkilerde ise bu çizgi görülmemiştir (Şekil-9). Bu analiz transgenik bitkilerin sera koşullarında çabuk ve hızlı tespiti için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu analizin saptama hassasiyeti, ELISA tabanlı analizler kadar etkili değildir (Posthuma-Trumpie vd, 2009).

Serada büyütülen aday transgenik bitkilerden CP4-EPSPS geninin glifosata dayanıklılığını belirlemek için bitkileri herbirine glifosat herbisiti uygulanmıştır. Herbisit uygulandıktan 5 gün sonra sonra transgenik bitkilerde kloroz ve yaprak zayıflamaları görülmüş olsa bile glifosata karşı dayanıklı olduğu, negatif kontrol ile transgenik olmayan

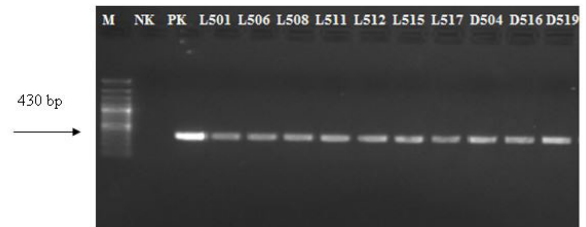


Şekil 10. Lady Olympia ve Desiree çeşidinde glifosata uygulamasıyla serada bitkilerden görünüm (herbisit uygulaması ile 5 gün sonra kontrol ve transgenik bitkilerin tipik belirtileri)

Figure 10. The Glyphosate applications assays on Lady Olympia and Desiree transgenic plants in green house conditions (The transgenic as well as control plants started showing effect of Glyphosate applications after 5th days)

bitkilerin öldüğü görülmüş, transgenik bitkilerde ise yaprakların yeşil kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil-10).

Yapılan moleküler analizlerle olumlu sonuç edilen pozitif T0 patates çeşitleri serada iyi bir şekilde büyütülmüş ve çıkış gücü yüksek olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra transgenik T0 patates çeşitlerinde yumru hasadı yapılmıştır. PCR analizi için serada hasat edilen yumrulardan DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cat No. 69106) ticari kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Hasat edilen yumrulardan CP4-EPSPS geninin genoma yerleşip yerleşmediği PCR analizi ile belirlenmiştir (Şekil-11).



Şekil 11. Lady Olympia ve Desiree transgenik yumrulardan yapılan CP4-EPSPS PCR analizi (M): 1 kb DNA marker, (L): Lady Olympia hattının aday transgenik bitkileri, (D): Desiree hattının aday transgenik bitkileri, (PK): Pozitif kontrol, (NK): Negatif kontrol (M): 1 kb plus DNA marker, Fermentas

Figure 11. PCR assay to detect CP4-EPSPS gene in transgenic plants of Lady Olympia and Desiree obtained from first tuber generation (M) 1 kb DNA marker Thermoscientific, (L): Lady Olympia transgenic plants, (D): Desiree transgenic plants, (PK): Positive control, (NK): Negative control

SONUÇ

Genellikle yabancı otlar patates bitkisinde büyüme ve gelişme zamanında zarar oluşturmaktadır. (Bhan vd., 1970). Herbisitlerin etki mekanizmaları zarara neden olan yabancı otların gösterdiği tepkiye ve ekolojik faktörlere göre değişebilmektedir (Medd vd., 2001). Yabancı otların seçici herbisitlere karşı dirençlerinin artması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde tarımsal işletme alanlarının genişlemesi, buna karşın tarım işçilerinin sayısının azalmasına bağlı olarak glifosata dirençli bitkilerin üretilmesi, yabancı ot mücadelesinin daha kolay, daha başarılı ve daha ucuza yapılabilmesini sağlamıştır.

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

KAYNAKLAR

- Anayol, E., Bakhsh, A., Karakoç, Ö.C., Onarıcı, S., Köm, D., Aasim, M., Özcan, S.F., Barpete, S., Khabbazi, S.D., Önal, B. and Sancak, C. 2016. Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton. *Plant Biotechnol Repor*, 10(2), 83-94.
- Arı, Ş. 2001. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları (Ed. S. Özcan, E. Gürel ve M. Babaoğlu), pp. 160-189.
- Arioğlu, H.H. 2002. Nişasta ve Seker Bitkileri Ders Kitabı. Genel Yayın Mo 188, Ders Kitapları Yayın No. A-57. Adana, 234.
- Avcı M.Ç. 2009. Çukurova Bölgesi Buğday Ekim Alanlarında Sorun Olan *phalaris brachystachys* Link (Kanlı Çayır)'in Bazı Buğday Herbisitlerine Karşı Oluşturduğu Dayanıklılık Sorunlarının Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Adana.
- Bakhsh, A., E. Husnain and S.F. Özcan. 2014. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. *Emir J Food Agric*, 26, 259-264.
- Bakhsh, A., F.S. Baloch, R. Hatipoğlu and H. Özkan. 2015. Use of genetic Engineering, benefits and health concerns. In book: Handbook of Vegetable Preservation and Processing, Second Edition, Edition: Second, Chapter: 4. Use of Genetic Engineering: Benefits and Health Concerns, Publisher: CRC Press Taylor and Francis Group Editors: Y. H. Hui and E. Özgül Evranuz, pp.81-112.
- Bakhsh, A., S. Siddiqand T. Husnain. 2012. A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (*Cry1Ac*) expression in cotton. *Euphytica*, 183, 65-74.
- Banaras, M. 1993. Impact of Weed Competition on Poststo Production. *Pak J Agric Res*, 14(1), 64-71.
- Basu, C., A. Albert, P. Kauschb and J.M. Chandlee. 2004. Use of β -glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(1), 7-10.
- Bhan, V.M., M. Singh and R. A. Maurya. 1970. Weed control in fiel crops at Panthagar. India-Research Report 1968-9. Department of Agronomy, Up. Agr. Univ. Panthagar, Nainital, India Pans 116, 690-701.
- Bilgili, A., İ. Kadioğlu. 2003. Tokat ili ve çevresinde Patates tarlalarında ortaya çıkan yabancı ot türlerinin yoğunlukları, dağılımları ve yöredeki yabancı ot florasının belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(2), 17-24.
- Cotterman, J.C., L.L. Saari 1992. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) Biotype SR4/84. *Pest Biochem Physiol*, 43, 182-192.
- Doğan, M.N ve Albay, F. 2004. Tarım Alanlarında Sorun Olan Yabancı Otların Kimyasal Mücadelesinde Azaltılmış Herbisit Dozlarının Etkinliğinin Araştırılması TÜBİTAK, Proje No:2688.
- Duke, S.O., S.B. Powles. 2008. Glyphosate: A once in a century herbicide.

Çalışmada herbisitlere dayanıklı olarak geliştirilen transgenik patates çeşitleri tarımsal ıslah programlarında başka yeni çalışmalar olarak yürütülüp mükemmel bir gen kaynağı olarak kullanılabilirler. Herbisite dayanıklı kültür bitkilerinin tarımının yapılmasıyla, total herbisitler kullanılarak tek bir seferde, hızlı ve kolay bir biçimde yabancı ot mücadelesi yapılabilmektedir. Böylece, tarımsal uygulamalarda daha az herbisit uygulaması yapılmakta ve traktör kullanımı azaltılarak yakıt tüketimi düşürülmektedir. Böylece bu teknoloji kullanılarak yabancı ot mücadelesi ile verim artırılarak kaliteli üretim sağlanabilmektedir. Sonuç itibariyle verimin artması ve ekonomik gelirin artmasıyla tarım üreticilerine avantajlar sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada Tübitak 115022 numaralı projeden faydalanılmıştır. Bu projeden faydalanıp çalışma imkanı sağlayan ve desteklerini esirgemeyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz. Ayrıca laboratuvarımızda mikroskopik tesisleri kullandığımız için Doç Dr Halil Oktay a teşekkür ederiz

Pest Manag Sci, 64(4), 319-325.

Günçan, A. 2006. Yabancı Otlar ve Mücadele Prensipleri. Selçuk Üniversitesi, Konya 238.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G.R., T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and M.W. Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO J*, 6(13), 3901-3907.

Maqbool, A., Abbas, W., Rao, A.Q., Irfan, M., Zahur, M., Bakhsh, A., Riazuddin, S., T. Husnain. 2010. *Gossypium arboreum* GHSP26 enhances drought tolerance in *Gossypium hirsutum* L. *Biotechnol Progress*, 26, 21-25.

McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., R. Horsch, R., R. Fraley. 1986. Leaf disc transformation of ultivated tomato (*L. sculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep*, 5, 81-84.

McHughen, A., M.C. Jordan. 1989. Recovery of transgenic plants from "escape" shoots. *Plant Cell Rep*, 7, 611-614

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

Moss, S.R., R.E.L. Naylor. 2002. Herbicide-resistant weeds. *Weed management handbook*, 9, pp.225-252.

Nester, E.W. 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci*, 5: 730.

Özcan, S ve M. Özgen. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi*, 69-95.

Özer, Z., Kadioğlu, G., Önen, H. and N. Tursun. 2001. Herboloji (Yabancı Ot Bilimi) Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:20 Kitap seri No:10 Tokat.

Padgett, S.R., H. Kolacz, X. Delannay and D.R. Re. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci*, 35, 1451-1461.

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

Rao, A.Q., A. Bakhsh and T. Husnain. 2011. Phytochrome B mRNA expression enhances biomass yield and physiology of cotton plants. *Afr J Biotechnol*, 10, 1818-26.

Rao, C.K. 2005. Transgenic Bt technology 3, expression of transgenes. http://www.monsta.co.uk/news/uksho_wlib.phtml?uid=9304. Accessed 15 Ocak 2019

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

Sahoo, K.K., Tripathi, A.K., Pareek, A., Sopory, S.K., S.L.S. Pareek. 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods*, 7(1),49.

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

Sohail, M.N., Karimi, S.M., Asad, S., Mansoor, S., Zafar, Y., Z. Mukhtar. 2012. Development of broad-spectrum insect-resistant tobacco by expression of synthetic cry1Ac and cry2Ab genes. *Biotechnol Lett*, 34(8),1553-1560.

Tepe, I. 1997. Türkiye’de tarım ve tarım dışı alanlarda sorun olan yabancı otlar ve mücadeleleri. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Yayınları No:32, Ziraat Fakültesi Yayınları No:18, Van.*

Turkish Statistical Institute 2017. Retrieved on March 8.

Üstüner, T., A. Güncan. 2003. Mekanik, Kimyasal ve Entegre Yabancı Ot Mücadelesi Yöntemlerinin Patates Verimi ve Yumru Çapı Üzerine Etkisi. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 6(2), 9-20.

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

Zhang, B.H., Liu, F., Liu, Z.H., Wang, H.M., C.B. Yao. 2001. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. *Plant Growth Reg*, 33, 137-149

Zoschke, A. 1994. Toward reduced herbicide rates and adapted weed management. *Weed Technol*, 8, 376-386.