



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**GENETİK OLARAK DEĞİŞTİRİLMİŞ SOYADA OMİK
ANALİZLER**

Sinan MERİÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şule ARI**

Ocak, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 3.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Çimen ATAK
T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen - Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCÜOĞLU
Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Aslıhan TEMEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2017-25627 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--



ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca, bana olan inancı ve güvenini her zaman hissettiğim, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana her türlü destek ve yardımda bulunan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şule ARI'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan ve tez çalışmamda T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi alt yapısını kullanmamı sağlayan T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Görevlisi ve çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Çimen ATAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında tezim için önerilerde bulunan ve bana olan inançlarını ve güvenlerini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı'ya, tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, laboratuvarımızda çalışan bütün araştırmacı arkadaşlarıma, özellikle bu süreçte bana her türlü destek ve yardımda bulunan çalışma arkadaşlarım Alp AYAN ve Tamer GÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili AİLEM'e ve sevgili eşim Zeynep Seda KUTLU MERİÇ'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Şubat 2022

Sinan MERİÇ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xx
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	8
2.1. SOYA (<i>GLYCINE MAX</i> (L.) MERR.)	8
2.2. BİTKİ ISLAHI	8
2.2.1. Klasik Bitki Islahı.....	9
2.2.2. Mutasyon Islahı	11
2.2.3. Genetik Mühendisliği ve Moleküler Islah	14
2.2.3.1. Bitkilerde <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Enfeksiyonu ve Transgenik Saçak Kök Kültürü	19
2.2.3.2. Transgenik Soya	23
2.3. BİYOGÜVENLİK VE RİSK DEĞERLENDİRMESİ	28
2.3.1. Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerde Beklenmedik Etkiler ve Belirlenmeleri	34
2.3.1.1. GD Bitkilerdeki Beklenmedik Etkilerin Genetik Temeli.....	36
Somaklonal Varyasyon	36
İnsersiyonel Etki	37
Transgenlerin Pleiotropik Etkisi.....	38
Pozisyon Etkisi.....	38
2.3.1.2. Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Beklenmedik Etkilerinin Değerlendirme Ölçütleri	39
2.4. BEKLENMEDİK ETKİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE KULLANILAN TEKNOLOJİ VE UYGULAMALAR.....	40
2.4.1. Moleküler Markırlar	40
2.4.1.1. Retrotranspozonlar ve IRAP (Retrotranspozonlar Arası Çoğaltım Polimorfizmi) Yöntemi	41

2.4.2.	Gen Anlatım Analizi.....	45
2.4.3.	Omik Teknolojiler	45
2.4.3.1.	<i>Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Proteomik Değerlendirilmesi ve 2-D Elektroforezi.....</i>	48
3.	MALZEME VE YÖNTEM.....	50
3.1.	BİTKİ MATERYALİ.....	50
3.2.	BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ	50
3.3.	M5 GENERASYONUNA AİT MUTANT VE KÖKENLENDİĞİ ATEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN TOHUMLARININ ÇOĞALTILMASI	51
3.4.	GDO ANALİZİ.....	51
3.4.1.	DNA İzolasyonu.....	51
3.4.2.	GDO Taraması.....	52
3.4.3.	Elektroforetik Analiz	53
3.5.	TRANSGENİK SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI.....	54
3.5.1.	Ataem-07 Çeşidi Soya Bitkilerine Gen Aktarımı İçin Kullanılacak pGFPUS+ Plazmidinin One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. coli Bakterilerine Elektroporasyon İle Transformasyonu.....	55
3.5.1.1.	<i>pGFPUS+ Plazmidinin Electrocomp™ E. coli Bakterilerine Elektroporasyon İle Transformasyonu</i>	56
3.5.1.2.	<i>Transformasyonun Koloni PZR İle Doğrulanması</i>	57
3.5.1.3.	<i>E. coli One Shot™ TOP10 Electrocomp™ Bakterilerinden Alkali Lizis Yöntemi İle pGFPUS+ Plazmidinin İzolasyonu.....</i>	59
3.5.2.	pGFPUS+ Plazmidinin Elektrokompotent Agrobacterium rhizogenes K599 Suşuna Elektroporasyon İle Transformasyonu	59
3.5.2.1.	<i>Agrobacterium rhizogenes K599 Suşu Kullanarak Elektroporasyon İçin Yeterli Hücre Oluşturulması.....</i>	60
3.5.2.2.	<i>pGFPUS+ Plazmidinin Agrobacterium rhizogenes K599 Suşuna Elektroporasyon İle Transformasyonu</i>	60
3.5.2.3.	<i>Transformasyonun Koloni PZR İle Doğrulanması</i>	61
3.5.3.	Ataem-07 Çeşidi Soya Bitkilerinin Agrobacterium rhizogenes K599 Suşu İle Enfeksiyonu	61
3.5.4.	Saçak Köklerde Gus dizilerinin PZR İle Belirlenmesi.....	64
3.5.5.	Saçak Köklerde rolA dizilerinin PZR İle Belirlenmesi	65
3.6.	IRAP (RETROTRANSPOZONLAR ARASI ÇOĞALTIM POLİMORFİZMİ) PZR YÖNTEMİ	65
3.6.1.	Köklerden Genomik DNA İzolasyonu	65
3.6.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Koşulları	66
3.6.3.	PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	67

3.6.4.	IRAP Bant Analizi ve Genetik Benzerliklerin Belirlenmesi	68
3.7.	TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 BİTKİLERİNDE BÜYÜME VE GELİŞİME AİT GENLERİN ANLATIM FARKLARININ ANALİZİ.....	68
3.7.1.	Total RNA İzolasyonu.....	68
3.7.2.	cDNA Sentezi	69
3.7.3.	qRT-PZR Analizleri	70
3.8.	TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ	72
3.8.1.	Protein İzolasyonu	72
3.8.2.	Proteinlerin Saflaştırılması	72
3.8.3.	Protein Konsantrasyonunun Tayini	73
3.8.4.	Sodyum dodesil sülfat - Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi	73
3.8.5.	Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları ve 2D Jel Elektforezleri 73	
3.8.6.	2DE Jellerin Analizi	74
3.8.7.	In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18.....	75
3.8.8.	MALDI TOF-TOF Analizi.....	75
3.9.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	76
4.	BULGULAR.....	77
4.1.	BİTKİLERİN GELİŞİMİ.....	77
4.2.	35S PROMOTÖRÜNÜN KALİTATİF OLARAK SAPTANMASI İLE TRANSGENİK BİTKİLERİN BELİRLENMESİ	79
4.3.	TRANSGENİK SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	80
4.3.1.	pGFP _{GUS} + Plazmidinin One Shot™ TOP10 Electrocomp™ <i>E. coli</i> Bakterilerine Elektroporasyon İle Transformasyonunun Gerçekleştirilmesi	80
4.3.2.	pGFP _{GUS} + Plazmidini İçeren Transformant <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 Bakterilerinin Elde Edilmesi.....	82
4.3.3.	Transgenik Saçak Kök Kültürlerinin Elde Edilmesi	83
4.3.3.1.	<i>Transformasyonun Doğrulanması</i>	84
4.4.	TRANSGENİK SAÇAK KÖK, TRANSGENİK, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN KÖKLERİNDE IRAP (RETROTRANSPOZONLAR ARASI ÇOĞALTIM POLİMORFİZMİ) PZR YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ	87
4.5.	TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNDE GELİŞİM GENLERİNİN ANLATIM PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ	92

4.6. TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN 2 BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ İLE PROTEOMİK ANALİZİ	94
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	110
KAYNAKLAR.....	128
ÖZGEÇMİŞ.....	147



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Transgenik Çeşitlerin Geleneksel Yolla Elde Edilen Çeşitlerin Ekim Alanlarına Göre Oranları (Milyon Hektar) (ISAAA, 2018).....	18
Şekil 2.2: Onaylanmış GD Bitkilere Aktarılan Özelliklerin Dağılımı (1992-2018) (ISAAA, 2018).	18
Şekil 2.3: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> aracılı bitki transformasyon sürecinin temel aşamaları.....	22
Şekil 2.4: Cucumopin tip <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599'un Ri plazmidinin T-DNA yapısı.....	23
Şekil 2.5: GTS40-3-2 gen kasedinin şematik gösterimi. P-35S: Karnabahar mozaik virüsü 35S promotörü, CTP4: <i>Petunia hybrida</i> kloroplast transit peptidi, CP4 EPSPS: <i>A. tumefaciens</i> (CP4) 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geni, T-nos: <i>A. tumefaciens</i> NOS terminatörü (Quercı ve Mazzara, 2006).	26
Şekil 2.6: Retrotranspozon temelli moleküler markır yönteminin işleyiş mekanizması; IRAP. a) baştan başa b) kuyruktan kuyruğa c) baştan kuyruğa. a) ve b) gösterimlerinde başarılı bir amplifikasyon için sadece tek bir primere ihtiyaç varken c) gösteriminde primer çiftine ihtiyaç vardır.	44
Şekil 3.1: pGFPGUS+ binary vektörünün haritası (Addgene, 64401).	55
Şekil 3.2: Ataem-07 soya bitkisinin <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 suşu ile enfeksiyonu.....	63
Şekil 4.1: Çimlenmiş Ataem-07, mutant, transgenik ve transgenik olmayan bitkiciklerin 5 günlük görüntüleri.	77
Şekil 4.2: Ataem-07 ve Mutant soya bitkilerinin VC (vejetatif kotiledon) evrelerinin karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.3: Ataem-07, mutant, transgenik ve transgenik olmayan bitkilerin V5 evresine ait görüntüler.	79
Şekil 4.4: Ataem-07 ve mutant bitkilerin haftalara göre fide boyu (ortalama) grafiği. Siyah: Ataem-07, Gri: Mutant.	79

- Şekil 4.5:** 35S promotör PZR jel elektroforezi. NTC: DNA bulunmayan kontrol; P: pozitif kontrol (Biotecon Diagnostics, Foodproof GMO screening Kit); T1-T5: Bitki örnekleri.....80
- Şekil 4.6:** A) Puc19 ve B) pGFPGUS+ plazmidleri ile elektroporasyona uğratılmış transformant One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterilerinin sırasıyla 50 µg/ml ampicilin ve 50 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerlerindeki görüntüleri. 81
- Şekil 4.7:** pGFPGUS+ plazmidinin (13,7 kb) ve pGFPGUS+ plazmidini içeren transformant One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterilerine ait kolonilerden *gfp* genine ait primerler ile gerçekleştirilen koloni PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüleri. NTC: DNA bulunmayan kontrol; GFP: Yeşil floresan proteini, 1 kb-100 bp: Markır. 81
- Şekil 4.8:** pGFPGUS+ plazmidini içeren transformant *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşuna ait kolonilerden *gfp* genine ait primerler ile gerçekleştirilen koloni PZR agaroz jel görüntüleri. 1K: 1. koloni; 2K: 2. koloni; 3K: 3. koloni; 4K: 4. koloni. 82
- Şekil 4.9:** *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme edilmiş bitkilerde 30 gün sonra gelişen saçak kökler.....84
- Şekil 4.10:** Transgenik saçak kök kültürlerinin kurulması. a) Ataem-07 bitkilerinin inokülasyonu b) Bitkilerin *A. rhizogenes* K599 suşu ile inokülasyonundan 15 gün sonra c) 20 gün sonra d) 25 gün sonra e) 30 gün sonra f-g) Bitki düzenleyicisi içermeyen MS besiyerinde 7 (100 ml erlen içerisinde) ve 14 (250 ml erlen içerisinde) günlük saçak kök kültürü.....85
- Şekil 4.11:** Transgenik saçak kök kültürlerinin, *rolA* genine ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile doğrulanması. TS1: Transgenik kök 1; TS2: Transgenik kök 2; TS3: Transgenik kök 3; TS4: Transgenik kök 4; TS5: Transgenik kök 5; NK: Negatif kontrol; 50 bp: Markır. 86
- Şekil 4.12:** Transgenik saçak kök kültürlerinin, *gusA* genine ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile doğrulanması. TS1: Transgenik kök 1; TS2: Transgenik kök 2; TS3: Transgenik kök 3; TS4: Transgenik kök 4; TS5: Transgenik kök 5; TS6: Transgenik kök 6; TS7: Transgenik kök 7; TS8: Transgenik kök 8; P: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol; 1 kb: Markır. 86
- Şekil 4.13:** Bag2 IRAP primeri ile farklı soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak kökten izole edilen DNA'lardan retrotranspozon bant profili. 1-6: Ataem-07 bitkilerinin kökleri; 7-11: Mutant bitkilerinin kökleri; 12-18: Transgenik Saçak Kök; 19-21: Transgenik bitkilerinin kökleri; 1 kb ve 100 bp : Markır; N: DNA içermeyen kontrol. 89
- Şekil 4.14:** Bag2 retrotranspozonunun transgenik, mutant, Ataem-07 ve Ataem-07'den elde edilmiş transgenik saçak köklerde polimorfizm yüzdeleri (%). A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik. 89
- Şekil 4.15:** Soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak köklerden izole edilen DNA'lardan Bag2 IRAP primerleri ile amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramı.

Kofenetik korelasyon katsayısı 0,948'dir. A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.....	90
Şekil 4.16: Nikita IRAP primeri ile farklı soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak köklerden izole edilen DNA'lardan retrotranspozon bant profili. 1-5: sırasıyla Ataem-07-1, Ataem-07-2, Ataem-07-3, Ataem-07-5, Ataem-07-6 bitkilerinin kökleri; 7-11: Mutant bitkilerinin kökleri; 12-18: Transgenik Saçak Kök; 19-21: Transgenik bitkilerinin kökleri; 1 kb ve 100 bp : Markır; N: DNA içermeyen kontrol.....	90
Şekil 4.17: Nikita retrotranspozonunun transgenik, mutant, Ataem-07 ve Ataem-07'den elde edilmiş transgenik saçak köklerde polimorfizm yüzdeleri (%). A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.	91
Şekil 4.18: Soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak köklerden izole edilen DNA'dan Nikita IRAP primerleri ile amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramı. A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.	92
Şekil 4.19: Farklı soya gruplarında (transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07) yaprak dokularında <i>dt1</i> , <i>e1</i> , <i>elf3</i> , <i>luxb</i> , <i>luxc</i> , <i>siz1a</i> gen anlatımı. Sütunlar mRNA transkript birikiminin V5 evresindeki değerlerini (<i>elf1b</i> ile normalize edilerek) ifade etmektedir. Veriler üç biyolojik ve iki teknik tekrarın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı, yıldızlar Tukey HSD posthoc testine göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı istatistiksel farkı göstermektedir.	93
Şekil 4.20: Transgenik soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.....	95
Şekil 4.21: Transgenik olmayan soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.....	95
Şekil 4.22: Mutant soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.	96
Şekil 4.23: Ataem-07 soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.....	96
Şekil 4.24: Transgenik, mutant ve bunların geleneksel karşılığı olan bitkilerde seçilen protein spotlarının karşılaştırmalı yoğunluk grafikleri. Kırmızı: Ataem-07, Yeşil: Mutant, Sarı: Transgenik olmayan; Mor: Transgenik.	98
Şekil 4.25: Mutant ve transgenik bitkilerde karşılık gelen geleneksel bitkilere kıyasla farklı anlatım düzeyi gösteren protein spotlarının sayısı.....	102
Şekil 4.26: Mutant ve transgenik bitkilerde karşılık gelen geleneksel bitkilere kıyasla farklı anlatım düzeyi gösteren protein spotlarının yüzdesi.....	102
Şekil 4.27: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve 2 kat azalmış poteinlerin dağılım grafiği.	103
Şekil 4.28: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 3 kat artmış ve 3 kat azalmış poteinlerin dağılım grafiği.	103

Şekil 4.29: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve 4 kat azalmış poteinlerin dağılım grafiği.	104
Şekil 4.30: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 5 kat artmış ve 5 kat azalmış poteinlerin dağılım grafiği.	104
Şekil 4.31: Mutant bitkilerde farklı anlatım düzeyi gösteren proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.....	105
Şekil 4.32: Transgenik bitkilerde farklı anlatım düzeyi gösteren bazı proteinlerin biyolojik işlevlerine göre sınıflandırılması.....	106
Şekil 4.33: Mutant bitkilerde, kökenlendiği soya bitkilerine göre, farklı anlatım düzeyine sahip bazı proteinlerin fonksiyonel ilişki ağı.	106
Şekil 4.34: Transgenik bitkilerde, transgenik olmayan bitkilerine göre, farklı anlatım düzeyine sahip bazı proteinlerin fonksiyonel ilişki ağı.	107

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Transgenik bitkilerin küresel ekim alanı, 23 Yıl, 1996'dan 2018'e (ISAAA, 2018).....	17
Tablo 2.2: Onaylanmış Genetiği Değiştirilmiş Soya (<i>Glycine max</i> L.) Çeşitleri (ISAAA, 2021).....	24
Tablo 2.3: Türkiye Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Tarafından Yem Olarak Kullanılmasına İzin Verilen Genetiği Değiştirilmiş Soya (<i>Glycine max</i> L.) Çeşitleri.....	31
Tablo 3.1: CTAB yöntemi ile DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler	52
Tablo 3.2: 35S Promotörü / <i>gus</i> / <i>rolA</i> PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.....	53
Tablo 3.3: 35S promotörü / <i>gus</i> / <i>rolA</i> PZR reaksiyon koşulları	53
Tablo 3.4: Koloni PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.....	58
Tablo 3.5: Koloni PZR reaksiyon koşulları.....	58
Tablo 3.6: Kullanılan koloni PZR primerlerine ait diziler ve Tm sıcaklıkları	58
Tablo 3.7: B&D (Broughton&Dilworth) besin solüsyonu içeriği	64
Tablo 3.8: <i>gus</i> PZR primerlerine ait diziler ve Tm sıcaklıkları.....	64
Tablo 3.9: <i>rolA</i> PZR primerlerine ait diziler ve Tm sıcaklıkları	65
Tablo 3.10: PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları	67
Tablo 3.11: PZR reaksiyon koşulları	67
Tablo 3.12: Kullanılan IRAP primerlerine ait diziler ve Tm sıcaklıkları.....	67
Tablo 3.13: cDNA sentezi reaksiyon karışımı bileşenleri ve hacimleri	70
Tablo 3.14: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	70
Tablo 3.15: Kullanılan qRT-PZR primerlerine ait diziler ve Tm sıcaklıkları	71
Tablo 3.16: qRT-PZR Reaksiyon Karışımı ve Konsantrasyonları	71
Tablo 3.17: qRT-PZR Reaksiyon Koşulları	71

Tablo 3.18: İzoelektrik Odaklama (IEF) voltaj, süre ve ayarları.....	74
Tablo 4.1: <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 suşu ile uygulama yapılan fidelerde saçak kök oluşum yüzdeleri	83
Tablo 4.2: İki boyutlu jel elektroforezi ile elde edilen, deney gruplarına (transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07) ait protein spotlarının sayısı ve oranı	97
Tablo 4.3: Tanımlanan proteinlerin spot (SSP) numarası, erişim kodu (Uniport), protein kütlesi ve hesaplanan pI değeri.....	108



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
~	: Yaklaşık olarak
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
¹³⁷ Cs	: Sezyum-137
⁶⁰ Co	: Kobalt-60
A	: Absorbans
Δ	: Delta
da	: Dekar
Da	: Dalton
D	: Dakika
g	: Gram
Gy	: Grey
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
ha	: Hektar
kg	: Kilogram
L	: Litre
m	: Metre
M	: Molar
m ²	: Metrekare
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MS	: Murashige & Skoog
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
rpm	: Dakikada döngü sayısı

sn	: Saniye
T_m	: Erime sıcaklığı
U	: Ünite
V	: Hacim
V	: Volt
W	: Ağırlık
μA	: Mikroamper
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

Kısaltmalar**Açıklama**

2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
2D	: İki boyutlu (2 Dimensional)
2DE	: İki boyutlu elektroforez (2 Dimensional Electrophoresis)
2ME	: 2-Merkaptoetanol
ACN	: Asetonitril
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
asRNA	: Antisens RNA
Bç	: Baz çifti
Bt	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	: Karnabahar Mozaik Virüsü (Cauliflower Mosaic Virus)
CAC	: Codex Alimentarius Komisyonu
cDNA	: Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
CRISPR	: Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromid
CTP-4	: <i>Petunia hybrida</i> kloroplast transit peptidi
CP4-EPSPS	: <i>A. tumefaciens</i> (CP4) 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geni
dH₂O	: Distile su
DIGE	: Fark jel elektroforezi (Difference gel electrophoresis)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
dsDNA	: Çift zincir DNA
DSB	: Çift zincir kırığı (Double-strand break)
DDT	: Dikloro difenil trikloroetan
EC	: Elektrik iletkenliği (Electrical Conductivity)
EC	: Avrupa Komisyonu
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
EMS	: Etil metan sülfonat
ENU	: Etilnitrozüre
EPSPS	: 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz
EST	: Anlatımı yapılan dizi etiketleri
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of United Nations)
FTIR	: Fourier transform infrared
FTMS	: Fourier transform kütle spektrofotometresi (Fourier transform mass spectrometry)
GC	: Gas chromatography
GD	: Genetiği değiştirilmiş
GDO	: Genetiği değiştirilmiş organizma
GDB	: Genetiği değiştirilmiş bitki
GM	: Genetically modified
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromografisi (High-performance liquid chromatography)
HR	: Homolog rekombinasyon (Homologous recombination)
IAA	: İyodoasetamid

IAEA	: Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu (International Atomic Energy Agency)
IEF	: İzoelektrik odaklama (Isoelectric Focusing)
IPG	: İmmobilize edici pH gradienti
IR	: Infrared
ISAAA	: Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)
iTRAQ	: Peptid rölatif kantifikasyonu için isobarik tag temelli yöntem (isobaric tag-based methodology for peptide relative quantification)
LC	: Sıvı kromatografi (Liquid chromatography)
MAB	: Moleküler markır destekli ıslah
MALDI	: Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu (Matrix-assisted laser desorption ionization)
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mRNA	: Haberci RNA
MS	: Kütle spektroskopisi
MVD	: Mutant Varyete Veritabanı (Mutant Variety Database)
MW	: Molekül ağırlığı
NaCl	: Sodyum klorür
NHEJ	: Homolog olmayan uç birleştirme (non-homologous end joining)
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NMU	: N nitroso-N-metilüre
NOS	: Nopalın sentaz
O.D.	: Optik yoğunluk
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
ORF	: Açık okuma çerçevesi (Open reading frame)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PAT	: Fosfinotrisin asetiltransferaz
pI	: İzoelektrik nokta (iso-electric point)
ppm	: Milyondaki partikül
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	: Rekombinant DNA
RFLP	: Kesilmiş Parça Uzunluklarında Farklılıklar (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
ROS	: Reaktif oksijen türevi (Reactive Oxygen Species)
SCV	: Somaklonal varyasyon
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE,	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SSR	: Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence repeats)
T-DNA	: Transfer DNA (<i>Agrobacterium</i> 'un tümör indükleyen plazmidinin tranfer edilen bölgesi)
T-nos	: <i>A. tumefaciens</i> NOS terminatörü
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TAGEM	: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

TALEN	: Transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleaz
TCA	: Trikloroasetik asit
TCEP	: Tris-2-karboksietil fosfin
TF	: Transkripsiyon faktörü
Ti	: Tümör-indükleme
TOF	: Uçuş süresi
UN	: Birleşmiş Milletler (United Nations)
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (United States Department of Agriculture)
UV	: Ultra viyole
WHO	: Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü
ZFN	: Çinko parmak nükleazları



ÖZET

DOKTORA TEZİ

GENETİK OLARAK DEĞİŞTİRİLMİŞ SOYADA OMİK ANALİZLER

Sinan MERİÇ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şule ARI

Mutasyon ıslahı ve genetik mühendisliğinden yararlanan moleküler ıslah, klasik bitki ıslahına destek olarak istenilen karakterleri taşıyan bitkilerin daha kısa süre içerisinde geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Özellikle genetik mühendisliği ile geliştirilen genetiği değiştirilmiş (GD) transgenik bitkiler biyogüvenlik, etik, çevresel değerlendirme ve risk yönetimi ile ilgili tartışmaları da beraberinde getirmiş, GD bitkiler için beklenen ve olası beklenmeyen değişikliklerin belirlenmesi biçimindeki risk değerlendirmeleri önem kazanmıştır. GD ürünlerinin güvenlik testleri için genel kabul görmüş 'temel eşdeğerlik' kavramı kullanılmakta olup son yıllarda bu kapsamda profil tabanlı genomik ve proteomik yaklaşımlar, güvenlik değerlendirmesindeki gücü ve doğruluğu nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında temel eşdeğerlilik kapsamında, transgenik, transgenik olmayan, mutant, mutantın kökenlendiği Ataem-07 soya bitkileri ve bu çeşitten elde edilmiş transgenik saçak köklerde transgenesiz ve mutagenesizin neden olduğu beklenmeyen etkilerin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amacıyla genomik, gen anlatımı ve proteomik çalışmaları yürütülmüştür. Bu karşılaştırmalar sonucunda deney grupları arasında genom, gen anlatımı ve proteom düzeyindeki farklılıklar belirlenmiştir. Transgenik, mutant, mutantın kökenlendiği Ataem-07

soya bitkilerinin kökleri ve transgenik saçak kökleri kullanılarak gerçekleştirilen genomik kapsamlı IRAP analizlerinde, hem *Bagy2* hem de *Nikita* retrotranspozonunun deney grupları arasında polimorfizm gösterdiği saptanmıştır. Ataem-07 ile karşılaştırıldığında *Bagy2* için polimorfizm oranı, deney grupları arasında en yüksekten en düşüğe olacak şekilde saçak kök, %0-69; transgenik, %20-42; mutant, %0-25 olarak belirlenmiştir. *Nikita* için ise bu değerler sırasıyla %0-71, %18-42, %0-36 olarak tespit edilmiştir. *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonları için en yüksek polimorfizm oranları sırasıyla transgenik saçak örneklerinde %56-69 (kök-5) ve %62-71 (kök-5) olarak saptanmıştır. Ataem-07 ile yapılan bu karşılaştırmalar, transgenesizin *Bagy2* ve *Nikita* ile ilişkili genom değişimleri bakımından mutasyona ıslahına göre daha fazla etki yarattığını düşündürmüştür.

Transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 soya çeşidi bitkilerinin hem gelişim ile ilişkili genlerinin anlatım profilleri belirlenmiş hem de proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Gen anlatım analizleri için, deney grupları arasında fide boyu ve çiçeklenme zamanı bakımından belirgin farklılıklar gözlemlendiğinden (beşinci üçlü yaprak evresinde Transgenik, 43 cm ve çiçeklenme yok; Transgenik olmayan, 61 cm ve çiçeklenme var; mutant, 18 cm ve çiçeklenme yok, Ataem-07, 22 cm ve çiçeklenme yok) gelişim ile ilişkili *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc* ve *siz1a* genleri seçilmiştir. Ataem-07 bitkilerinde, mutantlara göre *siz* ve *elf3* genlerinin, transgenik olmayan bitkilerde ise transgeniklere göre *dt1*, *e1*, *luxb* ve *luxc* genlerinin anlatımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, transgenesizin, gelişim ile ilişkili incelenen 6 gen bakımından gen anlatım profillerindeki farklılığa daha fazla neden olabileceğini düşündürmüştür.

Deney gruplarında protein profillerindeki farklılıkları değerlendirmek için yapılan 2-D elektroforez analizi sonuçları, protein spot sayılarının 533 ile 674 arasında değiştiğini ortaya koymuştur. Mutant bitkilerdeki toplam protein spotlarının %25,7'sinin kökenlendiği bitkilerde bulunmadığı, transgenik bitkilerdeki toplam protein spotlarının ise %11'inin transgenik olmayan bitkilerde yer almadığı saptanmıştır. Mutant ve transgenik bitki gruplarının sırasıyla Ataem-07 ve transgenik olmayan bitkilere göre anlatım düzeyi farklılık gösteren protein spotlarında yapılan dağılım grafiği analizleri sonucunda, anlatım düzeyi 2, 3, 4 ve 5 kat artan ve azalan proteinlerin dağılımının mutant bitkilerde transgenik bitkilere göre daha geniş bir yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Mutant bitkilerde anlatımı artan proteinlerin gelişim, stres tepkisi, fotorespirasyon ve ribozomal alt birim, mRNA işlenmesi, karbonhidrat metabolizması, homeostaz, kromozomal kararlılık ve transkripsiyon regülasyonu gibi biyolojik süreçlerle ilişkili oldukları saptanırken, transgenik bitkilerde anlatımı artan proteinlerin ribozomal alt birim, elektron taşınması, amino asit-nükleik asit ve karbonhidrat metabolizması, sinyal yolları ve hücre duvarı biyogenezi ile ilgili sınıflarda yer aldığı belirlenmiştir. Proteomik analiz sonuçları, hem anlatımı yapılmayan hem de anlatımları değişen protein sayısının, mutantlarda transgeniklere göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu durum, gama radyasyonunun genomda rastgele biçimde neden olduğu değişimlerin, transgen insersiyonu etkisine göre proteoma yansımalarının daha fazla olduğunu düşündürmüştür. Anlatım artışı gösteren proteinlerin her iki grupta da temel biyolojik yollarla ilişkili oldukları belirlendiğinden, mutasyonun proteomda yaratmış olduğu etkilerin transgenesize göre, incelenen protein çeşitleri bakımından önemli farklara neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada *Bagy2* ve *Nikita* bakımından retrotranspozon hareketliliği, *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc*, *siz1a* gelişim genleri ve 674 adet proteinin anlatım analizleri kapsamında elde edilen bulgular ile, transgenesizin genomdan proteoma giden yoldaki değişimleri mutagenesize göre, mutagenesizin ise gen anlatımının son kademesi olan proteomdaki değişimleri

transgenesize göre daha fazla etkilediği gösterilmiştir. Farklı ıslah yöntemlerinin bitkilerde beklenmeyen değişiklikleri meydana getirme potansiyeli ve buna bağlı olarak risk oluşturmaları üzerindeki tartışmalar GD organizmalara odaklanma eğilimindedir. Ancak, yapılageldiği gibi yeni özellikler kazandırılan bitkilerin herbirinin ayrı ayrı karakterize edilmesinin yanında, risk değerlendirmesi kapsamında bitki ıslahı için kullanılan mutasyondan, yeni nesil ıslah yöntemlerine kadar farklı yaklaşımların tümünün bu etkiler bakımından değerlendirilmesinin yararlı olacağı düşünölmektedir. Bitki ıslah yöntemleri ile meydana gelebilecek varyasyonların omik teknolojilerle karakterizasyonu bitki ve gıdaların bileşimi hakkında daha derin bilgi sağlayacak, üreticileri, tüketicileri, biyogüvenlik ve risk değerlendirmesine yönelik olarak yasa düzenleyicilerini ve diğer paydaşları bilgilendirmeye yardımcı olacaktır.

şubat 2022, 175 sayfa.

Anahtar kelimeler: GDO, Transgenik, Mutasyon Islahı, Soya, Proteomik

SUMMARY

Ph.D. THESIS

OMIC ANALYSES ON GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN

Sinan MERİÇ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Şule ARI

Mutation breeding and molecular breeding which utilizes genetic engineering, has enabled the development of plants with desired characteristics in a shorter time as an supportive to conventional plant breeding. Genetically modified plants that have been developed by genetic engineering approaches brought along debates on biosafety, ethics, environmental assessment and risk management. Therefore, evaluation of intended and potentially unintended changes contribute to the GM risk assessments. The commonly-held concept of 'substantial equivalence' has been used for many years for the safety assessments of GM products. In this context, profile-based genomic and proteomic approaches are often preferred due to their power and accuracy in safety assessment.

In this thesis, within the scope of substantial equivalence, it was aimed to conduct comparative genomic, proteomic and gene expression studies in transgenic (GM), non-transgenic, mutant, Ataem-07 soybean plants and *Agrobacterium*-mediated transgenic hairy roots of Ataem-07. Alterations in genome, gene expression and proteome level were detected by comparative

analyses of transgenic and mutant plants with their counterparts. Genomic comparison through *Bagy2* and *Nikita* retrotransposon mediated IRAP analysis revealed polymorphism between roots of transgenic, mutant, Ataem-07 soybean plants and transgenic hairy roots. According to *Bagy2*, polymorphism rates were determined as 0-69% for hairy root, 20-42% for transgenic; 0-25% for mutant compared to Ataem-07 among experimental groups from the highest to the lowest. Likewise, these values were determined as 0-71%, 18-42% and 0-36%, respectively for *Nikita*. The highest polymorphism rates for *Bagy2* and *Nikita* retrotransposons were detected as 56-69% and 62-71% in transgenic hairy samples, respectively. These results suggested that transgenesis exerts a greater effect on *Bagy2* and *Nikita*-related genome changes than mutation breeding in comparison to Ataem-07.

In transgenic, mutant, non-transgenic and Ataem-07 soybean cultivars, expression profiles of development related genes were determined and proteomic analyzes were performed. Development-related *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc* and *siz1a* genes were selected for gene expression analyses due to distinct differences in height and flowering time of experimental groups (in fifth trifoliolate stage, transgenic, 43 cm and no flowering; non-transgenic, 61 cm and with flowering; mutant, 18 cm and no flowering, Ataem-07, 22 cm and no flowering). It was determined that the expression of *siz1a* and *elf3* genes in Ataem-07 plants compared to mutants and *dt1*, *e1*, *luxb* and *luxc* genes in non-transgenic plants compared to transgenic plants were significantly decreased. For these 6 development related genes, transgenesis caused more differences in gene expression profiles.

The results of 2-D electrophoresis analysis in the experimental groups revealed that the protein spots varied between 533 and 674. It was determined that 25,7% of the total protein spots in mutant plants were not found in Ataem-07, and 11% of the total protein spots in transgenic plants were not found in non-transgenic plants. In addition, this study showed that many protein spots detected in mutant and transgenic plant groups have differences in expression levels compared to conventional counterpart soybean plants. Scatter plot analyzes revealed that the distribution of 2, 3, 4 and 5 times up- and down-regulated proteins showed a wider distribution in mutant plants than in transgenic plants. It has been determined that up-regulated proteins in mutant plants have various biological roles in processes such as development, stress response, photorespiration and ribosomal subunit assembly, mRNA processing, carbohydrate metabolism, homeostasis, chromosomal stability and transcription regulation. On the other hand, it has been determined that the up-regulated proteins in transgenic plants have biological roles related to ribosomal subunit assembly, electron transport, amino acid and nucleic acid metabolism, carbohydrate metabolism, signaling pathways and cell wall biogenesis. The proteomic analysis results showed that the number of both unexpressed and altered proteins were higher in mutants than transgenics. This suggested that the random changes in the genome induced by gamma radiation were more expressed in the proteome than the effect of transgene insertion. Since it was determined that the proteins presenting increased expression were related to basic biological processes in both groups, it was concluded that the effects of the mutation on the proteome did not cause significant differences in terms of the examined protein compared to transgenesis.

In conclusion, the findings of this study within the scope of retrotransposon mobility in terms of *Bagy2* and *Nikita*, expression analyzes of *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc*, *siz1a* development genes and 674 proteins showed that transgenesis affected changes more than mutagenesis in the genome and transcript level, and mutagenesis affected the changes more than transgenesis in the proteome which is the last stage of gene expression. Discussions on the potential of

unintended changes induced by different breeding methods in plants and their associated risks are biased focusing on GM organisms. However, we suggest that it would be beneficial to characterize each of the plants with new features individually, and all of the different approaches from mutations to new generation breeding methods used for plant breeding in terms of these effects should be evaluated within the scope of risk assessment. Characterization of the variations that may occur due to plant breeding methods by omic technologies will provide deeper insight into the composition of plants and foods, which will aid to inform producers, consumers, regulators and other stakeholders for biosafety and risk assessment.

February 2022, 175 pages.

Keywords: GMO, Transgenics, Mutation breeding, Soybean, Proteomics



1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun 2030 yılı itibarıyla 8,5 milyar 2050 yılında ise 9,7 milyarı geçmesi beklenmektedir (United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2019). Bu artış gıda üretiminin farklı öngörüler çerçevesinde %25 ile %75 arasında bir oranda arttırılmasının gerektiğini ortaya koymaktadır (Hunter ve diğ., 2017). Diğer yandan kentleşme, tuzluluk, çölleşme ve çevre kirliliği nedeniyle dünyanın ekilebilir alanlarında azalma meydana gelmektedir. Bu nedenlerle dünya nüfusunun beslenmesi için tarımsal verimliliğin sürdürülebilir bir şekilde geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Geçmişten günümüze kadar, bitki ıslahı teknikleri, gıda üretiminin arttırılmasındaki sorunların çözümünün önemli bir parçası olmaya devam etmektedir. Bitkilerin genetik olarak iyileştirilmesi çalışmaları yaklaşık 10.000 yıl önce başlamış, özellikle de son 300 yılda hibrit tohumların üretilmesiyle verimi yüksek, hastalık direncine sahip ve çeşitli stres koşullarına toleranslı tarımsal olarak iyileştirilmiş bitkiler geliştirilebilmiştir. *Dianthus caryophyllus* ve *Dianthus barbatus*'un çaprazlanması ile geliştirilen ilk yapay hibrit sonrasında sistematik bitki ıslahı başlamış ve yirminci yüzyılın başlarında Mendel yasalarının yeniden keşfi ve modern genetik sayesinde bitki ıslahı çalışmaları hız kazanmıştır. Bitki ıslah stratejilerinin geliştirilmesinden önce, ürünlerin iyileştirilmesi daha çok sulama, gübre uygulaması, yabani ot kontrolü, ürün rotasyonu, hastalık kontrolü, toprak hazırlama gibi çeşitli tarımsal süreçler ile yönlendirilmiştir. 20. yüzyılın erken dönemlerinde ise bitki doku kültürü tekniklerindeki ilerlemeler bitki ıslahına önemli katkılarda bulunmuştur. Ardışık yıllarda, özellikle 1940 ve 1960 yılları arasında sitoloji, beslenme, metabolizma, morfogenez, embriyogenez ve patoloji çalışmalarını içeren hücre davranışı, bitki modifikasyonu ve geliştirilmesi, patojensiz bitkilerin üretilmesi, germplazm muhafazası, klonal çoğaltım ve ürün oluşumu gibi alanlarda meydana gelen gelişmeler bitki ıslahının önünü açmıştır (Thorpe, 2007). Mikropropagasyon, *in vitro* fertilizasyon, embriyo kültür teknikleri, *in vitro* haploid üretimini takiben kromozom sayılarının katlanması gibi doku kültürü teknikleri, elit genotiplerin hızlı üretimi ve yakın akraba olmayan bitkilerin hibridizasyonu için sıklıkla kullanılmıştır. 1965-85 yılları arasında Yeşil Devrim olarak bilinen dönemde, geliştirilmiş sulama sistemleri, tarımda makineleşmenin

yaygınlaşması, gübre ve pestisit kullanımı ve genetik olarak geliştirilmiş çeşitlerin artışı ile küresel ürün veriminde %56 oranında artış sağlanmıştır (Thudi ve diğ., 2021). Klasik ıslah yöntemleri ile bitkilerin geliştirilmesi, en çok tercih edilen ıslah stratejilerinden birisi olmasına karşın türler arası hibridizasyonun sınırlı olması, temelinin frekansı oldukça düşük olan spontan mutasyonlara dayanması ve birçok bitki çeşidinin çoğu özellik için dar bir genetik varyasyona sahip olması yeni ıslah stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. 1930'ların ortasından bu yana kullanılmaya başlanan mutajenler yoluyla uyarılan mutasyonlara dayalı mutasyon ıslahı, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü/ Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu (FAO / IAEA) merkezinin, özellikle gelişmekte olan ülkelerde gıda güvenliği sorunlarına yönelik ürün üretimi için uyarılmış mutasyonların üretimini desteklemesi ve teşvik etmesi amacıyla 1964 yılında kurulmasından sonra, bitkilerin tarımsal olarak geliştirilmesinde sıklıkla tercih edilmiştir (Shu ve diğ., 2012; Ronald, 2014). Mutasyon ıslahı, sonraki yıllarda genetik çeşitliliğin artırılması ve zorlu yetiştirme koşullarında hayatta kalma yeteneği kazanmış bitkilerin yetiştirilmesi için etkin bir yöntem olarak benimsenmiştir. FAO / IAEA Mutant Çeşitleri Veritabanı (mvgs.iaea.org/About-MutantVarieties.aspx), günümüzde 173'ü soyadan oluşan toplam 3322 mutant bitki çeşidi olduğunu bildirmektedir (IAEA, 2020). Mutasyon ıslahı, kimyasal (örneğin etilmetan sülfonat) veya fiziksel (örneğin gama ışınları ve X-ışınları) mutagenlerin uygulanmasıyla genetik çeşitlilik yaratarak yeni çeşitlerin geliştirilmesini içerir. Mutasyon ıslahında iyonlaştırıcı radyasyonlar uygulama kolaylığı nedeniyle sıklıkla tercih edilir ve düşük dozlarda nükleotid değişikliklerine, yüksek dozlarda ise birçok fonksiyonel lokusun işlevini kaybetmesine veya tamamen yok olmasına neden olurlar. Dahası neden oldukları çerçeve kaymaları, amino asit sinyal dizilerindeki değişiklikler, alternatif kırılma (splicing) mutasyonları ve çeşitli delesyonlar gibi varyasyonlar sayesinde istenen karakterleri ortaya çıkarabilir ve faydalı fenotiplerin oluşmasına sebep olabilirler (Bolon ve diğ., 2011; Anai, 2012). Öte yandan, genomda geniş dağılım gösteren bu değişiklikler hedeflenenlerin yanı sıra hedeflenmeyen özelliklerin de ortaya çıkmasına neden olabilir. Her ne kadar mutasyon ıslahı ile geliştirilmiş bitkiler, işleme, ambalajlama, etiketleme, muhafaza, depolama, taşıma, piyasaya sürme, ithalat ve ihracata yönelik olarak özel yasal veya düzenleyici kısıtlamalar ile karşı karşıya kalmasa da, ortaya çıkabilecek tüm özelliklerin saptanabilmesi mutant hatların karakterizasyonu için son derece önemlidir. Mutant bitkilerin genetik ve fenotipik karakterizasyonları ve kökenlendikleri bitki hattına göre ne tür değişiklikler içerdiklerinin saptanması, moleküler markır yöntemlerinin ve yüksek işlem hacimli (high-throughput)

genomik, transkriptomik ve proteomik tekniklerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Mutasyon ıslahında mutagenlerin çoğunlukla ölümcül mutasyonlara yol açmaları ve uyarılan mutasyonların rastgele oluşu, her generasyonda hedeflenen karaktere ulaşmak için seleksiyon yapılma zorunluluğu, fiziksel veya kimyasal mutagenlere ulaşmanın zorluğu, mutagen dozlarının her doku ve her bitki çeşidi için optimizasyonunun gerekliliği mutasyon ıslahının kullanımını sınırlandırmıştır. 1980'li yılların ortalarından sonra markır destekli seleksiyonun (MAS) ortaya çıkması ile birlikte hem klasik bitki ıslahında hem de mutasyon ıslahında yapısal ve işlevsel genomikten yararlanılarak moleküler haritaların geliştirilmesi sayesinde mutasyonların doğrudan kullanılması, bitki verimi ve kalitesinin hızlı bir şekilde iyileştirilmesine yol açmıştır. Moleküler markır destekli ıslah (MAB) olarak bilinen bu yaklaşım, moleküler markırların bağlantı haritaları ve genomik ile birlikte kullanılmasını ve bitki özelliklerinin genotipik analizlere dayanarak değiştirilip geliştirilmesini içermektedir. DNA markırları, markır destekli seleksiyon yoluyla geleneksel ve mutasyon ıslahının verimliliğini geliştirmek için önemli katkılar sunmuştur. Çeşitli bitkiler için gerçekleştirilen çok sayıda kantitatif karakter lokus (QTL) haritalama çalışmaları, bol miktarda DNA markırı ve karakterin ilişkilendirilmesini sağlamıştır. SSR (Basit Dizi Tekrarları), ISSR (Basit Diziler Arası Tekrarlar) ve RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) gibi moleküler haritalama ve DNA parmak izi tekniklerini kullanan moleküler markır destekli seleksiyon, bitki ıslah sürelerini büyük ölçüde azaltmaktadır. Moleküler destekli seleksiyon, ıslah materyalinin markır destekli değerlendirilmesi; markır destekli geri çaprazlama (marker-assisted backcrossing); piramitleme (pyramiding); erken generasyon seleksiyonu ve fenotipik markırların MAS ile birlikte kullanıldığı karma MAS olmak üzere beş geniş alanda sınıflandırılabilir (Collard ve Mackill, 2008). Genel olarak, çeşit geliştirmek için, DNA markırları geleneksel şemalara entegre edilmiştir veya geleneksel fenotipik seleksiyonun yerine kullanılmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışından sonra, bitki ıslahında önemli gelişmeler yaşanmış ve bitkilere istenilen özelliklerin kısa süre içerisinde aktarılabilmesinin yolu açılmıştır. 1990'lı yılların ortalarından bu yana bitki ıslahçıların kullanmış olduğu klasik gen havuzu genetik modifikasyonlar sayesinde kayda değer biçimde genişletilmiş ve pek çok farklı transgenik bitki geliştirilebilmiştir. Genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanarak türler arası gen aktarımı ile tarımsal özellikleri iyileştirilmiş Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO)'lar tarımda artan biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Başlangıçta sadece böcek direnci

ve herbisit toleransı gibi üreticiye yönelik tarımsal amaçlar için geliştirilmeye başlanan transgenik ürünlerin ticarileştirilmesinin hız kazanmasının ardından, günümüzde iki veya daha fazla özelliğin (bir araya getirilmiş-stacked) birlikte kazandırıldığı GDO çeşitleri başta olmak üzere, hastalık direnci, abiotik stres toleransı, besin kalitesinde artış gibi hem üreticiye hem de tüketiciye yönelik olarak pek çok farklı özelliğe sahip transgenik bitki geliştirilmiştir. Tarımsal bitkilere kazandırılan bu özellikler sayesinde ekim alanlarından elde edilen ürün verimi önemli ölçüde artmaktadır. Doğru gen kombinasyonlarının katma değeri yüksek tarımsal bitkilere aktarılma çalışmalarının hız kazanması ile tarımsal ekonomide önemli kazançlar sağlayabilecek ürünler geliştirilmiştir. Bu süreçte başta *Glycine max* (soya), *Zea mays* (mısır), *Gossypium hirsutum* (pamuk), *Bassica napus* (kanola) olmak üzere, *Phaseolus vulgaris* (fasulye), *Solanum melongena* (patlıcan), *Cucumis melo* (kavun), *Carica papaya* (papaya), *Prunus domestica* (erik), *Beta vulgaris* (şeker pancarı) gibi meyve ve sebzeleri de içeren yaklaşık 30 farklı türde transgenik bitki onaylanmıştır (ISAAA, 2021). Genetik mühendisliğinde son yıllarda yaşanan gelişmeler daha kusursuz bitkilerin üretilmesine olanak sağlayarak ürün verimliliğinin artırılmasında önemli bir rol üstlenmiştir. Özellikle yakın zamanda geliştirilen yeni bitki ıslah teknikleri (NPBTs; new plant breeding techniques), bitkilerin ıslahı ve geliştirilmesi için büyük umutlar vaat etmektedir (Lusser ve diğ., 2012). Genom modifikasyonlarını yüksek hassaslıkla mümkün kılan çinko parmak nükleaz (ZFN), kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ile ilişkili nükleaz ve transkripsiyon aktivatör-benzeri efektör nükleaz (TALEN) sistemleri gibi yeni genom düzeltimi teknikleri rekombinant DNA içermeyen bitkilerin geliştirilmesinin önünü açmıştır. Genom düzeltim tekniklerinin yanı sıra, kısa zamanda benimsenen cisgenesiz/intragenesiz, RNA interferans gibi diğer yeni nesil bitki ıslahı teknikleri tahılların dışındaki bitkilere de uygulanmıştır.

Bitki ıslahında son yıllarda yaşanan gelişmeler yaratmış oldukları büyük fırsatların yanısıra biyogüvenlik, etik, çevresel değerlendirme ve risk yönetimi ile ilgili tartışmaları da beraberinde getirmektedir. Özellikle yakın dönemde genetik mühendisliği yaklaşımları ile geliştirilen taransgenik ve genomu düzeltilmiş bitkilerin güvenliği ve yasal düzenlenmeleri konusundaki tartışmalar giderek artmaktadır. Bu nedenle, transgenik teknoloji ile birlikte sayıları giderek artan GDO'ların güvenlik değerlendirmelerinin ayrıntılı bir biçimde gerçekleştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Biyogüvenlik, çevresel ve kişisel güvenliği sağlamak için benimsenecek ilke, prosedür ve politikaları tanımlar ve insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevre ve biyolojik

çeşitliliği korumak için GDO ve ürünleri ile ilgili faaliyetlerin güvenli bir şekilde yapılmasını vurgular. Risk değerlendirilmesi ise GDO ve ürünlerinin, genetik değişiklikten dolayı, insan, hayvan ve bitki sağlığı, biyolojik çeşitlilik ve çevre üzerinde sebep olabileceği risklerin ve risk kaynağının test, analiz, deneme gibi bilimsel yöntemlerle tanımlanması, niteliklerinin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve risk unsurlarının belirlenmesini kapsayan dört aşamalı süreci ifade etmektedir. GD bitkilerin ve onlardan türetilen gıda ve yemlerin risk değerlendirmesi, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için GD bitki ve ondan türevlenen ürünler hakkında bilgi üretmeyi, toplamayı ve değerlendirmeyi içermektedir. Risk değerlendirmesinde dört ayrı konuda ayrıntılı değerlendirmenin yapılması gerekmektedir. Bu değerlendirmeler, genetik modifikasyondan kaynaklanan ilgili değişikliklerin toksikolojik etkisinin, GD bitkiden elde edilen bütün gıdanın alerjenik potansiyelinin, GD bitkiden elde edilen gıda ve yemin besinsel etkisinin değerlendirmelerini ve aktarılan transgenin moleküler karakterizasyonunu içermektedir. Genetiği değiştirilmiş bitkilerden elde edilen gıda ve yemlerin risk değerlendirmesi kılavuzunda (EFSA, 2011) ise, GD bitkilerin ve onlardan türetilmiş gıda ve yemlerin güvenli bir kullanım geçmişine sahip geleneksel karşılıkları ile karşılaştırılmasının uygun bir strateji olacağı vurgulanmıştır. Transgenik bitkilerin güvenlik değerlendirmesi ile, bu bitkilerin tüketicinin sağlığı için herhangi bir ek veya yeni risk oluşturmadığı gösterilmektedir (OECD, 1993, 2006). Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), GD ve GD olmayan benzerlerinin risk değerlendirmesi için “temel eşdeğerlik” (substantial equivalence) kavramını önermiştir. GD bitkilerin geleneksel karşılıkları ile karşılaştırılmasında sahip oldukları değişikliklerin beklenen ve beklenmeyen etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Beklenen etkiler, söz konusu genlerin aktarılması sonucunda ortaya çıkması hedeflenen ve genetik modifikasyon sürecinin orjinal hedeflerini yerine getiren etkilerdir ve risk değerlendirmesi ve gıda güvenliği çerçevesinde analiz edilen değişikliklerin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Risk değerlendirilmesi kapsamında beklenmedik etkiler ise hedef genin beklenen etkileri dikkate alınarak transgenik bitkinin geleneksel karşılıklarına kıyasla fenotipte, koşullara cevapta veya moleküler bileşimde istatistiksel olarak anlamlı bir farkı ifade etmektedir.

Doku kültürü süreçleri, yabancı gen aktarımına bağlı olarak genomda ortaya çıkabilen transpozon hareketleri, çift zincir kırıklarının homolog olmayan uç birleştirme ile tamiri, transgenin pleiotropik ve pozisyon etkileri gibi genetik değişiklikler transgenik bitkilerde

beklenmedik karakterlerin ortaya çıkmasına neden olabilecek potansiyeldedirler ve bu değişikliklerin de biyogüvenlik ve risk değerlendirmesi kapsamında ele alınması tavsiye edilmektedir (EFSA, 2010; Ladics ve diğ., 2015).

Transgenik bitkilerde gen insersiyonu temelli genetik değişiklikler insersiyon bölgelerinin yeniden düzenlenmesine ve gen fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir. Bunun yanı sıra, beklenmedik etkiler gen insersiyonu sonrasında rasgele mutasyonların bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Bu beklenmedik etkilerin meydana gelmesindeki pek çok sebepten biri de bitki transformasyonu için, genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olabilen, *in vitro* kültür tekniklerinin kullanılmasıdır (Ladics ve diğ., 2015).

Hem mutasyon ıslahında hem de moleküler ıslahta beklenmedik etkilerin, neden olan mekanizmaların çeşitlilik göstermesi nedeniyle belirlenmesi ve değerlendirilmesi oldukça zordur. Dolayısıyla özellikle risk değerlendirmesinde kullanılacak beklenmedik değişimlerin analiz edilmesine olanak sağlayacak yeni ve uygun maliyetli yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir. Bir ürünün önemli ölçüde, karşılığı ile eşdeğer olup olmadığı, hedef (target-based) veya profil (profile-based) temelli yaklaşımlar ile ayrıntılı olarak değerlendirilebilir. Hedefe veya profile dayalı yaklaşımlar arasında, hedefe dayalı yaklaşımlar yetersiz sayıda ve sadece belirli hedef grubuna odaklanmasından dolayı beklenmedik etkilerin analiz edilmesi için sınırlı imkanlar sunmaktadır. Bu nedenle profil temelli yaklaşımların tercih edilmesi karşılaştırmalı analize olanak sağlayarak daha ayrıntılı değerlendirmelere imkan vermektedir. Profil temelli yaklaşımlarda en çok tercih edilen omik teknolojiler bir hücreyi, dokuyu, organizmayı oluşturan moleküllerin bütünsel bir görünümünü elde etmeyi amaçlar ve onların mekanizmasını, etkileşimini ve işlevini inceler. Sistem biyolojisi, biyoinformatik ve hesaplama araçlarıyla entegre olarak çalışan ve moleküler düzeyde hedeflenmemiş yüksek işlem hacimli analiz olanağı sunan omik teknolojiler genetik modifikasyonun neden olduğu değişikliklerin kantitatif ve karşılaştırmalı risk değerlendirmesine izin vermektedir. Genomik, proteomik ve metabolomik alanlardaki gelişmeler genetik transformasyonun sebep olduğu hücre içi ve bitki metabolizmasındaki değişikliklerin anlaşılması için önemli fırsatlar sunmaktadır (Davies, 2010; Huang, 2017). Bu teknolojilerin kullanılması ve güvenilir kabul edilen çeşitlerin referans olarak alınması ile birlikte yeni çeşit profillerinin hızlı bir biçimde değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir.

Bitkilerde beklenmedik karakterlerin ortaya çıkmasına neden olabilecek potansiyeldeki etkiler üzerindeki tartışmalar, herhangi bir geleneksel ıslah programıyla ilişkili genetik değişiklikler için de benzer düzeyde risk taşımasına karşın GDO'lar üzerinde odaklanma eğilimindedir. Transgenik bitkilerde transformasyon sonrası ortaya çıkabilecek beklenmedik etkilerin belirlenmesine yönelik, güvenli kabul edilen bitkiler ile karşılaştırmaya dayalı analizlerin yapılmasına devam edilmektedir (Tan ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2021). Gerçekleştirilen analizler transgenik bitkilerin ve transgenik olmayan kontrollerinin karşılaştırılmalarını sağlayarak risk değerlendirmelerine katkıda bulunmaktadır. Mutasyon ıslahı yaklaşımının ise klasik ıslah ve moleküler ıslah yaklaşımına göre beklenmedik genetik değişikliklere yol açma potansiyeli ile ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle mutasyon ve moleküler (genetik transformasyon) ıslah yaklaşımlarının genom ve proteom düzeyinde beklenmeyen değişimlere neden olma etkilerinin karşılaştırılması iki yaklaşımın sebep olabilecekleri potansiyel değişikliklerin anlaşılması ve değerlendirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında transgenik (GD), transgenik olmayan, mutant ve mutantın kökenlendiği (Ataem-07) soya çeşitlerine ait bitkiler ve Ataem-07 hattından elde edilmiş transgenik saçak kökleri ile karşılaştırmalı olarak genomik ve proteomik çalışmalar yürütüldü. Ayrıca bu farklı gruplara ait bitki hatlarında gelişimden sorumlu genlerin anlatım profilleri karşılaştırmalı analizler ile incelendi. Genomdaki potansiyel beklenmeyen değişimlerin, gen anlatım profillerinin ve proteom değişimlerinin analizi ile mutasyon ve moleküler ıslah yöntemlerinin beklenmeyen etkilere neden olma potansiyelleri karşılaştırıldı.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SOYA (*GLYCINE MAX (L.) MERR.*)

Soya, *Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae (Leguminosae) familyasından ve 3000 yıldan uzun bir süre önce Çin'den kökenlenen baklagil bitkisidir (Anderson ve diğ., 2019). *Glycine* cinsi, *Glycine* ve *Soja* olmak üzere iki alt türden oluşur. Tarımı yapılan soya, *Glycine max*, *Soja* alt cinsine aittir ve ticari çeşitleri nispeten dar bir genetik tabana sahiptir. Soya, Çin, Japonya, Kore, Rusya ve Tayvan'da yabani olarak yetişen tek yıllık bir tür olan *Glycine soja*'dan ıslah edilmiştir (Hymowitz, 2004). Soya genomu 1,1 milyar baz çiftinden oluşan nispeten küçük bir genomdur ve 20 çift kromozomdan oluşmaktadır (Song ve diğ., 2016). Williams 82, genomu tamamen dizilenen ilk soya hattıdır. Soya, ekonomik açıdan önemli bir küresel ürün olup hayvancılık, su ürünleri yetiştiriciliği, endüstriyel kullanım ve insan tüketimi için yüksek kalitede protein ve yağın ana kaynağıdır. Soya pek çok gıdanın önemli bir bileşenidir ve özellikle soya yağı gıdalarda standart katkı maddesi olarak kullanılmaktadır ve doymamış omega 3, 6 ve 9 yağ asitlerini içermektedir. Soya yağı, biyoyakıt ve biyoplastikler de dahil olmak üzere birçok endüstriyel kullanıma sahiptir (Anderson ve diğ., 2019).

Günümüzde, soya Çin ve diğer Asya ülkelerinde, ayrıca Avrupa, Güney Amerika ve ABD'de yoğun bir biçimde yetiştirilmektedir. Büyük ölçekli ticari soya üretimi ağırlıklı olarak batı yarımkürede gerçekleştirilmekte ve dünyadaki arzın %33'ünden fazlası ABD tarafından karşılanmaktadır. Ek olarak soya üretiminin %32'sini Brezilya ve %17'sini ise Arjantin sağlamaktadır (USDA, 2018). En büyük soya üreticilerinden biri olan ABD'deki soya verimi 1965'ten 2015 yılına kadar 1648 kg / ha'dan 3228 kg / ha'a yükselmiştir (Johansson, 2018). Türkiye'de, 2018 yılında, soya toplam 0,10 milyon metrik ton üretim ile bir önceki seneye göre 0,03 milyon ha olarak artış göstermiştir. Tüm bu verim artışı, genetik biliminin gelişmesi ve hassas ve dijital tarım da dahil olmak üzere tarım sistemlerindeki önemli ilerlemelere bağlanmaktadır (Specht ve diğ., 2014).

2.2. BİTKİ ISLAHI

Tarımsal bitkilerin verimi, uygulanan tarımsal yaklaşımlar ve ekilen tohumun genetik yapısı olmak üzere iki genel bileşen tarafından yönetilmektedir. Besin, su ve pestisit uygulamaları için

kullanılan hassas teknolojileri de içeren tarımsal yaklaşımlar, girdilerin azaltılmasına yönelik geliştirilen ve bunun sonucunda özellikle üreticiler için daha çok verim alınmasını sağlayan yaklaşımlardır. Bitkilerin genetik yapısı ile ilişkili bitki ıslahı ise, geniş anlamda, tarımın ortaya çıkışından bu yana meydana gelen spontan değişikliklerden moleküler tekniklerin uygulanmasına kadar, farklı araçların insanlar tarafından kullanımlarının bir sonucu olarak bitkilerde meydana gelen değişimler olarak tanımlanabilir. Özellikle klasik ıslah, mutasyon ıslahı, moleküler ıslah ve biyoteknolojideki ilerlemeler ve transgenik ürünlerin benimsenmesini, bitki ıslah stratejilerini ve bitki çeşitlerinin geliştirilmesi ve ticarileştirilmesini etkileyerek tarım endüstrisini önemli ölçüde değiştirmiştir (Anderson ve diğ., 2019).

2.2.1. Klasik Bitki Islahı

Klasik bitki ıslahı yöntemleri üç alt kategoride gruplandırılabilir; doğada veya geleneksel çeşitlerde görülen doğal varyantlara dayalı bitki seleksiyonu yoluyla gözlemlenen varyasyona dayalı bitki ıslahı, farklı ebeveynlerden istenen genlerin rekombinasyonunu taşıyan bitkilerin seleksiyonları yolu ile kontrollü eşleşmeye dayalı bitki ıslahı ve genom içi varyasyonu izlemek için moleküler araçlar kullanılarak spesifik genlerin veya markır profillerinin seçilmesiyle izlenen rekombinasyona dayalı bitki ıslahı. Bitki ıslahının temeli, verim, kalite, yetiştirme, hasat ve işleme kolaylığı, çevresel streslere tolerans ve zararlılara karşı direnç açısından varyasyon gösteren özelliklerin arasından daha iyisinin seçilmesidir. Bir özelliğin seleksiyonu, ilişkili diğer özellikleri bazen istenen yönde, bazen de olumsuz yönde değiştirebilir. Bu nedenle seleksiyon, normalde üründe gözlenebilen aralıkta ortaya çıkabilen ve dolayısıyla tüketiciler veya çevre için hiçbir risk oluşturmadığı varsayılan, beklenmeyen değişikliklere yol açabilir. Populasyonun genetik yapısı, kromozomlardaki genler arasındaki fiziksel bağlantı (linkage) ve genlerin pleiotropik etkileri nedeniyle farklı karakterler arasındaki genetik korelasyonlar, klasik bitki ıslahında ilgili tüm karakterleri aynı anda geliştirmeyi oldukça zorlaştırır. 1980'lerden başlayarak, farklı moleküler markır sistemlerinin geliştirilmesi, bitki yetiştiricileri ve genel olarak moleküler biyologlar için mevcut olan polimorfik markırların toplam sayısını büyük ölçüde arttırmıştır. Genetik markırlar, genlerin veya genetik lokusların alelik formları tarafından belirlenen ve bir nesilden diğerine aktarılabilen biyolojik özelliklerdir ve bu nedenle bir bireyi, bir dokuyu, bir hücreyi, nukleusu, kromozomu ve geni takip etmek için deneysel problemler veya etiketler olarak kullanılabilirler. Bu sayede markır destekli seleksiyon (MAS), bitki çeşitlerinin klasik ıslah yolu ile birlikte hızlı bir şekilde geliştirilmesi için sıklıkla kullanılan bir araç haline gelmiştir ve istenilen özellikleri daha doğrudan seçme imkanı

sağlamıştır. Geleneksel ıslah yaklaşımlarıyla karşılaştırıldığında, esas olarak DNA markır destekli ıslah, daha karmaşık ekipman ve moleküler araçlara ihtiyaç duyar. Moleküler markırlar, başlangıçta markır destekli seleksiyonun geleneksel fenotipik seleksiyona entegre edilmesiyle kullanılmıştır. Bitkilerde markır destekli ıslah (MAB) için genel olarak, kullanım ve analiz kolaylığı, düşük maliyet, az miktarda DNA gerekliliği, kodominansi, sonuçların tekrarlanabilirliği, yüksek düzeyde polimorfizm ve genom çapında dağılım ön koşulları esastır (Jiang, 2013). RFLP, AFLP, RAPD, SSR, SNP gibi farklı polimorfizm saptama tekniklerine veya yöntemlerine (nükleik asit hibridizasyonu, restiriksiyon enzim kesimi, PZR, DNA dizilemesi gibi) dayanan birçok DNA markır tekniği geliştirilmiştir. En dikkate değer yüksek işlem hacimli genotipleme sistemi, kantitatif karakter lokusu (QTL) keşfinde yoğun olarak kullanılan tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP'ler). Ekonomik öneme sahip kantitatif özellikleri iyileştirmeyi amaçlayan 12 bitki türünü kapsayan 120'den fazla çalışmada farklı markır sistemleri kullanan 10.000'den fazla QTL rapor edilmiştir (Crossa ve diğ., 2017). QTL haritalaması için bağlantı analizi (linkage analysis) ise iki ebeveynli populasyonlarda sıklıkla tercih edilmiştir.

Kromozomal rekombinasyon mekanizmaları bitki ıslahının temelini oluşturmaktadır ve bitki ıslahçıları bu temel özellikten yararlanmaktadır. Bitki genetik rekombinasyon mekanizmaları ökaryotlarda bulunan iki ana mekanizmaya ayrılır: (i) homolog rekombinasyon (HR) ve (ii) homolog olmayan rekombinasyon; homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ). Her iki mekanizma da, çift zincir kırıklarının (DSB) tamiri modellerine dayanmaktadır. Hem HR hem de NHEJ'de rekombinasyon teorik olarak kromozomların uzunluğu boyunca rastgele meydana gelebilir. Bununla birlikte, bitkilerde, diğer organizmalarda olduğu gibi, rekombinasyon kırılma noktaları için sıcak noktaların varlığı uzun zamandır bilinmektedir. Örneğin buğdayda, genler yakın kümeler halindedir ve gen bakımından zengin bölgeler rekombinasyon için sıcak noktalar (Gill ve diğ., 1996). Genel olarak, heterokromatin zengini olan sentromerler ve telomerler, genlerin tercihen konumlandığı bölgelere kıyasla çok daha düşük bir rekombinasyon oranı sergilerler (Faris, Haen ve Gill, 2000). Gen bakımından zengin bölgeler için bu durum bitki populasyonlarında yeni özelliklere sahip yeni alellerin ortaya çıkmasına izin veren bitki DNA rekombinasyonunun önemli bir özelliğidir (Schnable, Hsia ve Nikolau, 1998).

En yaygın olarak uygulanan geleneksel ıslah tekniği, istenen özelliğin ya tür içi hibridizasyon ile aynı tür içerisinde bir bireyden diğere ya da türler arası hibridizasyon yoluyla başka bir türden diğere bir türe, genellikle yabancı bir akrabadan, melezlenmesidir. Bu yaklaşımları kullanarak, elde edilen bitkiye sadece istenilen özellikten sorumlu genin aktarılması mümkün değildir. Genellikle, ilgilenilen geni çevreleyen büyük miktarlarda DNA dizisi eşzamanlı olarak aktarılır ve sonuçta arzu edilen özellik ile birlikte istenmeyen özellikler de aktarılmış olur. Bu durum bağlantı sürüklenmesi (linkage drag) olarak bilinir (Schnell ve diğ., 2015). Hibridizasyon tüm genom boyunca genetik değişikliğe yol açabilir. Bağlantı sürüklenmesinden dolayı istenen bir özelliğin melezlenmesine sıklıkla ilave beklenmedik özellikler eşlik eder ve bu durum DNA'nın genetik mühendisliği yöntemleri ile insersiyonuna kıyasla, giriş (introgresyon) bölgesine yakın genleri etkileyebilecek çok sayıda genetik elementin de eklenmesine neden olur (Schnell ve diğ., 2015).

2.2.2. Mutasyon Islahı

Bitki ıslahı, hem doğal genetik varyasyonu yapay seleksiyonla birlikte kullanarak hem de yapay yollarla yeni varyasyonları indükleyerek genetik yöntemlerden daima yararlanmıştır. Bitki yetiştiricileri için genetik çeşitlilik sadece hibridizasyon ile sınırlı kalmamış, aynı zamanda yapay tekniklerle de teşvik ve kontrol edilmiştir. Genetik varyasyon bitki ıslahı ve ürünlerin geliştirilmesi için temel kaynaktır. Farklı genotiplerin hibridizasyonu ve ardından belirli karakterlerin seleksiyonuna dayanan klasik ıslah (rekombinasyona dayalı), bitki ıslahında en yaygın uygulamalardan biri olsa da, soya da dahil olmak üzere ekonomik açıdan önemli bitkiler dar bir genetik çeşitliliğe sahiptir ve bu nedenle tarımsal önemi olan özelliklerin geliştirilmesi ve bitkilerin genomik olarak iyileştirilmesi çabaları belirli ölçüde sınırlandırılır.

1920'lerin sonunda ve 1930'ların başında Lewis John Stadler tarafından X-ışınları yoluyla genetik değişikliklerin indüklenmesi üzerine yapılan çalışmalar, mutasyon ıslahı olarak bilinen yeni bir tür bitki ıslahının temelini atmıştır (Shu, Forster ve Nakagawa, 2012). Çeşitlilik yaratma mekanizması olarak mutasyonlar ilk olarak Hugo de Vries tarafından 19. yüzyılın sonlarında tanımlanmıştır. Vries, bu olayı organizmalarda kalıtsal olan ve dolayısıyla organizmanın fenotipik görünümü üzerinde nispeten büyük etkiler yaratan hızlı değişiklikler olarak tanımlamıştır. Daha sonra 'mutasyon' terimini öne sürmüş ve yeni bir tür ve varyasyonun gelişmesine yol açan ve mevcut özelliklerde ani, şok benzeri değişikliklerin ortaya çıkmasına ilişkin entegre bir anlayış sunmuştur. "Mutasyon" terimi, Stamhuis, Meijer ve Zevenhuizen

(1999) tarafından tanımlanmış ve Forster ve Shu, 2012 tarafından rekombinasyondan ve segresyondan bağımsız olan bir organizmanın genetik materyalinde ani kalıtsal değişiklikler olarak özetlenmiştir. Geçmişte, kendiliğinden oluşan (spontan) mutasyonlar, bitki yetiştiricilerinin bitki ıslahı için yararlanabilecekleri özgün genetik çeşitliliğin tek kaynağıydı (Shu, Forster ve Nakagawa, 2012). Spontan mutasyonlar, ortaya çıkma zamanları açısından çok nadir ve rastgeledir, bu da onların bitkilere yeni özelliklerin kazandırılması için ıslah programlarında kullanımını zorlaştırır (Lönnig, 2005). Günümüzde canlı organizmalarda artan genetik varyasyonun önemli sebeplerinden biri olan mutasyonlar yapay olarak indüklenebilmektedir. İndüklenen mutasyonlar genom, kromozom ve gen mutasyonları olarak sınıflandırılmaktadır (Jain, Brar ve Ahloowalia, 1998; Bado ve diğ., 2015; Oladosu ve diğ., 2016; Raina ve diğ., 2016).

Mutasyon ıslahı, günümüzde klasik ıslah ve moleküler ıslah (transgenik yaklaşım) ile birlikte bitki ıslahının temelini oluşturur (Shu, Forster ve Nakagawa, 2012). Geliştirilmiş tarımsal performansa odaklanan bitki ıslahı ve yoğun seleksiyonlar, son derece tekdüze modern bitki çeşitlerinin ve dar bir genetik altyapının oluşturulmasına neden olmuştur (Hyten ve diğ., 2006; Campbell ve Stupar, 2016). Yeni karakterler için kaynakların oluşturulması ve sürdürülebilir verim artışı elde etmek için bitkilerin genetik varyasyonlarının artırılması esastır. Mutasyon ıslahı, kimyasal ve fiziksel mutageniz yoluyla genetik çeşitlilik yaratarak yeni çeşitlerin geliştirilmesini içerir. Mutageniz, genetik rekombinasyonun neden olmadığı, kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanların neden olduğu, bir organizmanın genetik bilgisinde ani kalıtsal değişikliklerin meydana geldiği süreçtir (Esnault, Legue ve Chenal, 2010; Roychowdhury ve Tah, 2013). Mutasyon ıslahında üç tip mutageniz süreci vardır. Bunlar, ışınlama (gama ışınları, X-ışınları, iyon ışınları) veya kimyasal mutajenlerle muamele sonucunda mutasyonların meydana geldiği indüklenmiş mutageniz; bir DNA molekülünde tanımlanmış bir bölgede bir mutasyon yaratma işlemi olan “site-directed” mutageniz; ve genetik transformasyon, T-DNA insersiyonu veya transpozon elementlerin aktivasyonu yoluyla DNA insersiyonuna bağlı insersiyon mutagenizidir (Kharkwal ve Shu, 2009; Forster ve Shu, 2012). İlk ticari mutant çeşidi 1934 yılında üretilen tütündür. 1995'ten önce, Acquah, (2007) mutageniz yoluyla geliştirilen 77 çeşit rapor etmiştir. 1995 yılında, ticari olarak piyasaya sürülen çeşitlerin sayısı 484'e yükselmiştir. Günümüzde ise mutasyon ıslahı ile üretilmiş çeşitlerin sayısı 3322'ye ulaşmıştır (IAEA, 2020).

Genetik transformasyon ve yabancı geri melezleme stratejileri, yararlı genetik varyasyonların genom içerisine sokulabilmesi için çok güçlü yöntemler olmasına karşın, bu stratejiler tüm karakterler ve bitki türleri için uygulanamamaktadır. Özellikle verimliliğin artırılması, kuraklık ve tuzluluğa tolerans gibi çok sayıda moleküler mekanizmanın kontrolü altındaki karakterlerin kazandırılması oldukça zordur. Bu gibi durumlarda, kimyasal mutajen veya ışınlama uygulamaları ile ortaya çıkacak rastgele mutagenез, varyasyonu artırmak ve yararlı karakterlerin ortaya çıkmasına destek olmak için önemli bir yaklaşımdır. Ayrıca, mutagenез klasik bir stratejidir ve bu yöntemlerle geliştirilen populasyonlar zaman alıcı genetik hibridizasyon veya doku kültürü çoğaltım teknikleri gerektirmez. Mutasyona uğratılmış bitkiler, yasal veya düzenleyici kısıtlamalar olmaksızın üretilebilir, kullanılabilir ve taşınabilir. Belirli bir bitkide mutasyon meydana getirmenin etkinliği çeşitli faktörlere bağlıdır; mutasyona uğramış doku tipi (örneğin tohumlar veya polen), mutajen tipi, mutajen dozajı, uygulama süresi ve uygulamadan sonra bitkinin hayatta kalma oranı. Doku tipleri içerisinde özellikle tohumlar mutajenin zarar verici etkiler karşısında hayatta kalabilme potansiyelleri ve uygulama kolaylığı nedeniyle mutasyon ıslahı için tercih edilmektedir. Geleneksel mutagenезde, araştırmacılar çoğu zaman farklı mutajen dozajlarını ve sürelerini test etmek için ön denemeler yaparlar ve tohumlara zarar vermeden önemli miktarda genetik varyasyonun ortaya çıkmasını sağlayan bir protokolü tanımlamaya ve optimize etmeye çalışırlar. Birçok araştırmacı, uygulama yaptıkları tohumların hayatta kalma oranlarını ölçer ve ~%40-80 arasında hayatta kalma oranı ile sonuçlanan dozu ve süreyi bulmaya çalışır (Anderson ve diğ., 2019). Bu parametreler tanımlandıktan bu mutagenез koşulları kullanılarak geniş populasyonların geliştirilmesine devam edilir.

İki ana bitki mutajen sınıfı, gama radyasyonu, X-ışınları, hızlı nötron ve iyon ışını ile ışınlamanın yanı sıra etilmetan sülfonat (EMS), N nitroso-N-metilüre (NMU) ve etil nitrosoüre (ENU) içeren kimyasal mutajenlerden oluşur. Her iki sınıf da soyada çok sayıda mutantın geliştirilmesi için başarıyla kullanılmıştır (Akao ve Kouchi, 1992; Cooper ve diğ., 2008; Dhanavel, Pavadaı ve Girija, 2010; Arase ve diğ., 2011; Bolon ve diğ., 2011). EMS, yüksek mutasyon oranı, maliyet olarak uygunluğu, bulunabilirliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle bitkilerde en yaygın kullanılan mutajendir. Bu kimyasal mutajenler, yüksek yoğunlukta tek nükleotid değişikliklerine (çoğunlukla nükleotit transisyonları) neden olurlar, bu da gen fonksiyonunda bir değişikliğe veya eliminasyona yol açabilecek “non-sense”, “mis-sense” ve

“mis-splicing” mutasyonları ile sonuçlanır (Anai, 2012). Esas olarak indüklenen mutasyonlar tüm genoma rastgele olarak dağılır. Birkaç çalışmadan da anlaşılabacağı gibi, nokta mutasyonları bitki gelişimine büyük delesyonlardan veya yeniden düzenlenmelerden daha az zararlıdır (Gilchrist ve Haughn, 2010). Gama radyasyonu (GR) ve hızlı nötronlar (FN) gibi ışınlar, gen susturulması ve bozulması için çok çeşitli boyutlarda delesyon oluşturma potansiyeli nedeniyle özellikle umut verici bir mutagenizasyon kaynağıdır (Bolon ve diğ., 2011). FN, bitki genomunda sadece küçük (birkaç baz çifti) veya büyük (birkaç megabaz) delesyon oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda belirli bölgelerin duplikasyonlarını, translokasyonlarını ve inversiyonlarını da indükleyebilir (Bolon ve diğ., 2014). Son yıllarda, iyon ışını (ion beam) DNA’da GR ve X ışınları gibi geleneksel radyasyon kaynaklarından daha şiddetli kopmalara neden olduğunun gösterilmesiyle mutasyon ıslahında kullanılmıştır (Arase ve diğ., 2011; Yamaguchi, 2018). Mutasyonların frekansı ışınlanmış populasyonlarda kimyasal mutajenler tarafından yaratılan mutant populasyonlarından daha düşüktür, ancak oluşan tek bir değişim yüksek bir etkiye sahip olabilir. Tek bir büyük delesyon yüzlerce geni susturabilir, oysa kimyasal olarak indüklenen tek nokta mutasyonu muhtemelen sadece tek bir geni etkiler.

2.2.3. Genetik Mühendisliği ve Moleküler İslah

Moleküler ıslah, genetik mühendisliği, moleküler markır destekli seleksiyon, genomik seçim dahil olmak üzere bitkilerde ve hayvanlarda ilgi duyulan karakterleri geliştirmek için DNA’da moleküler düzeyde gerçekleştirilen genetik manipülasyonun kullanımı olarak geniş anlamda tanımlanabilir. Özellikle son yirmi yılda, yeni genetik varyasyonların yaratılmasına ve özgün karakterler kazandırarak bitkilerin geliştirilmesine olanak sağlayan genetik mühendisliği yaklaşımları, bitki ıslahında başarıyla uygulanan moleküler ıslah yaklaşımları içerisinde sıklıkla tercih edilmiştir (Belhaj ve diğ., 2013; Benning ve Sweetlove, 2016; Alok ve diğ., 2017). Bitkilere yeni özelliklerin kazandırılmasını amaçlayan bu moleküler yöntemler, istenilen karakterleri taşıyan DNA’nın başarılı bir şekilde karakterize edilmesi, klonlanması, ihtiyaç halinde değiştirilmesi ve hücrelere aktarılmasını içermektedir. Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak yabancı genlerin aktarılması ile genetik yapıları değiştirilen ve bu yabancı genleri genomlarında sabit olarak taşıyan özellikleri değiştirilmiş organizmalar, “genetik yapısı değiştirilmiş organizma” (GDO) olarak adlandırılmaktadır.

Bitkilerde, DNA aktarımı için en yaygın kullanılan yöntemler *Agrobacterium* aracılı transformasyon ve biyolistik (mikropartikül bombardıman) sistemidir. Biyolistik yöntemi,

DNA kaplı altın veya tungsten mikropartüküllerinin ivme ile bitki hedef dokularına fiziksel olarak girişine dayanır. Kaplanmış parçacıklar bir parçacık tabancasına yüklenir ve genellikle basınçlı helyum gazı kullanılarak yüksek hıza ulaştırılır. Hücreye giriş yapan mikroparçacıkların üzerlerindeki transgenler bitkinin kromozomal DNA'sına giriş yapar. Hedef, bitki hücre süspansiyonları, kallus kültürleri veya dokular olabilir. DNA kaplanmış, hızlandırılmış parçacıkların transgeni hasar olmadan canlı bitki hücrelerine transfer edebilmesi için bu yöntemin bitki türü ve kullanılan dokunun özellikleri göz önünde bulundurularak optimize edilmesi gerekmektedir. *Agrobacterium* aracılı gen transferi ise, bitkilere gen transferinde en çok tercih edilen yöntem olarak öne çıkmaktadır. *Agrobacterium* aracılı transformasyon sisteminde *Agrobacterium tumefaciens* taç tümör oluşumuna *Agrobacterium rhizogenez* ise saçak kök hastalığına neden olmaktadır. *Agrobacterium* aracılı transformasyon, bu toprak bakterisinin, tümör indükleyici (Ti) ya da kök indükleyici (Ri) plazmidi üzerinde yer alan T-DNA'sının belirli bir kısmını kopyalaması, bitki hücresi nukleusuna transfer etmesi ve kromozomlarına entegre etmesi yeteneğinden yararlanır. Bu transformasyon süreci bakteriyel Vir proteinlerini ve bazı bitki faktörlerini de içerir. Diğer aktarım yöntemleri ise elektroporasyon, mikroenjeksiyon, sonikasyon, bitki virüsü aracılı gen aktarımı, polietilen glikol, liposom ve silikon karbid fiber aracılı gen aktarımı olarak sıralanabilir (Ganeshan ve Chibbar, 2010). Elektroporasyon, çok kısa bir süre boyunca yüksek voltajlı elektriğe maruz bırakılan hücrenin plazmasında geçici gözeneklere neden olarak DNA'nın hücreye aktarılmasıdır. Bitki hücresinin elektroporasyonu için genellikle protoplastları kullanır, çünkü kalın bitki hücre duvarları makromolekülün hareketini sınırlar. Mikroenjeksiyon ise, arzu edilen DNA'nın hedef hücreye mekanik olarak yerleştirilmesini içeren doğrudan fiziksel bir yöntemdir. Protoplastlar, kallus, embriyolar, meristemler gibi çeşitli hücre grupları modifikasyon için hedef olabilir. Silikon karbid fiber aracılı gen aktarımında, DNA, silisyum karbid fiberler ile hücre sitoplazmasına ve nukleusa iletilir. DNA'nın sitoplazmaya aktarılmasına aracılık eden fiberler, mikroenjeksiyona benzer ve bu fiberler hücre duvarına ve plazma zarına saplandığında DNA'yı hücrelere iletebilir. DNA kaplı silisyum karbid fiberler, süspansiyon kültürü veya kalluslar ile karıştırıldığında fiberlere yapışan DNA hücrelere giriş yapar ve konakçı genom ile kararlı bir şekilde bütünleşir. Diğer bir gen aktarım yöntemi olan polietilen glikol (PEG) aracılı aktarımda, PEG iki değerlikli katyonların varlığında, protoplastların plazma membranını destabilize eder ve onu DNA'ya karşı geçirgen hale getirir.

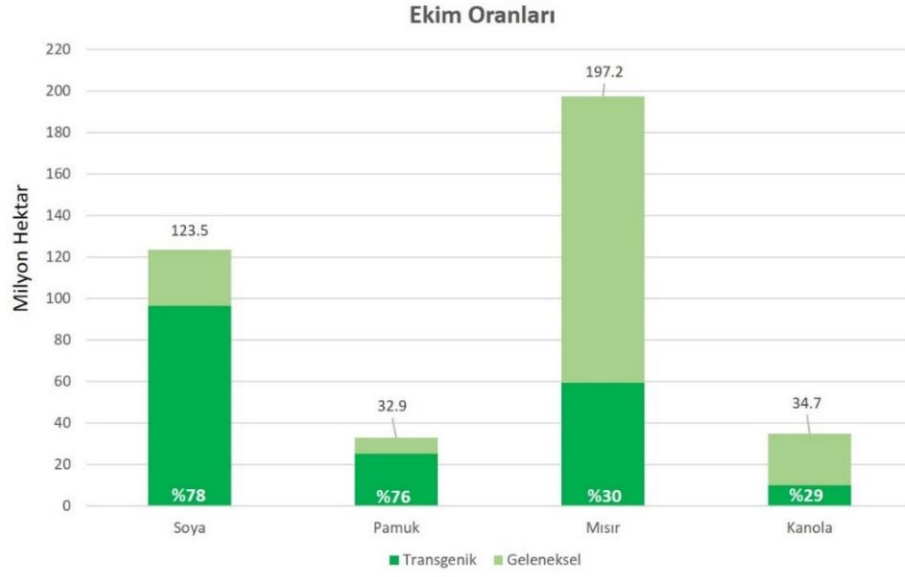
Bu şekilde DNA, protoplastların nukleusuna girer ve genomla bütünleşir (Ganeshan ve Chibbar, 2010).

Gen transferi yöntemleri ile geliştirilen biyoteknolojik bitkisel ürünlerin toplam ekim alanları 1996'da 1,7 milyon hektardan 2018'de 191,7 milyon hektara kadar yaklaşık 113 kat artmıştır ve bu durum transgenik teknolojiyi en hızlı uyum sağlanan ürün teknolojisi haline getirmektedir. Transgenik ürünlerin ticarileştirilmesinin ilk 23 yılında (1996-2018) toplam 2,5 milyar hektar veya 6,3 milyar dönüm ekim gerçekleştirilmiştir (ISAAA, 2018). Transgenik ürünlerin ekim alanlarının yıllara göre değişimi Tablo 2.1'de verilmiştir. 95,9 milyon hektar ile soya başta olmak üzere, mısır (58,9 milyon hektar), pamuk (24,9 milyon hektar) ve kanola (10,1 milyon hektar) ekimi en çok yapılan dört ana transgenik üründür. En çok ekimi yapılan transgenik çeşitlerin geleneksel çeşitlere göre ekim oranları ise Şekil 2.1'de sunulmuştur. Bu transgenik ürünler toplam biyoteknolojik ürün ekim alanlarının %99'unu kaplamaktadır. Daha küçük ölçekte ekilen diğer ürünler ise şeker pancarı, papaya, kabak, elma, patates, ananas, şeker kamışı ve yonca (alfalfa) olmuştur. Transgenik pamuk 15 farklı ülkede ekilirken, onu 14 ülke ile transgenik mısır ve 8 ülke ile transgenik soya takip etmiştir. 1996 ile 2018 arasındaki 23 yıllık dönem boyunca, herbisit toleransı, ekilen transgenik ürünlerin büyük bir bölümünü oluşturmuştur, ancak birden fazla özelliğin (örneğin hem böcek direnci hem de herbisit toleransı; IR/HT) bir arada bulunduğu “stacked” (bir araya getirilmiş) çeşitlerin artan önemi ile birlikte sadece herbisit tolerans özelliği taşıyan transgenik ürünlerin ekim alanları yıllar içinde yavaş yavaş azalmaktadır. 2018 yılında, soya, mısır, kanola, pamuk, şeker pancarı ve yoncada uygulanan herbisit toleransı (HT), dünya çapında 17 milyona yakın çiftçi tarafından ekilen 191,9 milyon hektar transgenik ürünün 87,3 milyon hektarını veya %45'ini oluşturmakla birlikte, bu oran 2017'ye kıyasla %1 veya 1,2 milyon hektarlık bir azalmayı göstermektedir. 2018'de soya, mısır ve pamukta kullanılan bir araya getirilmiş (IR/HT) özellikler yıllık %4'lük artışla toplam transgenik ekim alanının %42'sini oluşturmuştur. Herbisit toleransı, böcek direnci, hastalık direnci, tozlaşma kontrolü, değiştirilmiş ürün kalitesi, anti-alerji, gecikmeli meyve yumuşaması, gecikmeli olgunlaşma, A vitamini içeriğinin geliştirilmesi, modifiye alfa-amilaz, modifiye amino asit, modifiye yağ/yağ asidi, modifiye nişasta/karbonhidrat, nikotin azaltma, esmerleşmeyen fenotip, fitaz üretimi, azaltılmış akrilamid potansiyeli, azaltılmış kara leke (black spot bruising) gibi özellikler bitkilere aktarılmıştır ve bunların pek çoğu çeşitli kombinasyonlarda bir araya getirilmiştir (Şekil 2.2). Bir araya getirilmiş özellikler taşıyan

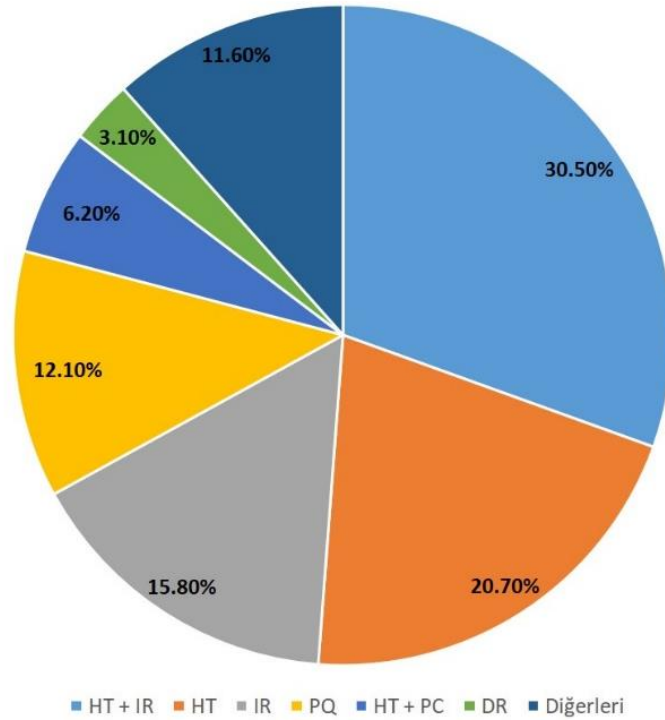
ürünler, özellikle Intacta™ soya ve BolgardIII/RRFlex® pamuğu, maliyet tasarrufu sağlayan teknolojileri nedeniyle çiftçiler tarafından tercih edilmektedir. 2018 yılında, yüksek oleik asit içeren kanola, isoksaflutol herbisitine toleranslı pamuk, herbisite toleranslı ve yüksek oleik asit içeren soya, herbisite toleranslı ve tuza dayanıklı soya, böceklere dirençli şeker kamışı, böceklere dirençli ve herbisite toleranslı mısır çeşitleri de dahil olmak üzere çeşitli kombinasyonlarda bir araya getirilmiş özelliklere sahip ürünlerin ekimine onay verilmiştir (ISAAA, 2018).

Tablo 2.1: 1996'dan 2018 yılına kadar transgenik çeşitlerin küresel ekim alanı, (ISAAA, 2018)

Yıl	Hektar (milyon)	Akre (milyon)
1996	1,7	4,2
1997	11,0	27,2
1998	27,8	68,7
1999	39,9	98,6
2000	44,2	109,2
2001	52,6	130,0
2002	58,7	145,0
2003	67,7	167,3
2004	81,0	200,2
2005	90,0	222,4
2006	102,0	252,0
2007	114,3	282,4
2008	125,0	308,9
2009	134,0	331,1
2010	148,0	365,7
2011	160,0	395,4
2012	170,3	420,8
2013	175,2	432,9
2014	181,5	448,5
2015	179,7	444,0
2016	185,1	457,4
2017	189,8	469,0
2018	191,7	473,7
Toplam	2531,2	6254,5



Şekil 2.1: Transgenik Çeşitlerin Geleneksel Yolla Elde Edilen Çeşitlerin Ekim Alanlarına Göre Oranları (Milyon Hektar) (ISAAA, 2018).



Şekil 2.2: Onaylanmış GD Bitkilere Aktarılan Özelliklerin Dağılımı (1992-2018) (ISAAA, 2018).

HT - Herbisit Toleransı; IR - Böcek Direnci; DR - Hastalık Direnci; PC - Tozlaşma Kontrolü; PQ - Değiştirilmiş Ürün Kalitesi: Anti-alerji; Gecikmeli Meyve Yumuşatma; Gecikmeli Olgunlaşma; A Vitamini İçeriğinin Geliştirilmesi; Modifiye Alfa-Amilaz; Modifiye Amino asit; Modifiye yağ/yag asidi; Modifiye nişasta/karbonhidrat; Nikotin Azaltma; Esmerleşmeyen Fenotip; Fitaz Üretimi; Azaltılmış Akrilamid Potansiyeli; Azaltılmış Kara Leke | Diğerleri: DR + IR; HT + PQ; ST; DR + HT + IR; AGY; PC; HT + IR + PQ; HT + IR + ST; DR + PQ; HT + ST; IR + PQ; IR + ST

2.2.3.1. Bitkilerde *Agrobacterium rhizogenes* Enfeksiyonu ve Transgenik Saçak Kök Kültürü

Agrobacterium aracılı genetik transformasyon, genlerin bitkilere aktarılmasında en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Pek çok doğrudan gen transfer yönteminden daha ucuzdur ve daha kolay uygulanabilir. *Agrobacterium* cinsinin üyeleri, taç tümörü (*A. tumefaciens* ve *A. vitis*), saçak kök (*A. rhizogenes*) ve cane tümörü (*A. rubi*) dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıkları oluşturma yetenekleriyle bilinirler (Gelvin, 2009; Özyiğit ve diğ., 2013). Bunlar arasında, ilk tanımlanan, 1930'larda *Proteobacteria*'nın alfa-2 alt sınıfından *Rhizobiaceae* ailesine ait *A. rhizogenes*'dir (Riker ve diğ., 1930; Willems ve Collins, 1993). *A. rhizogenes* flagella (1 ila 6 adet arasında) aracılığıyla hareket edebilen, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan, 0,6–1 µm x 1,5-3,0 µm boyutunda gram negatif bir toprak bakterisidir (Conn, 1942; Meyer ve diğ., 2000). Tüm *A. rhizogenes* suşları, bol miktarda kök indükleyen (Ri) plazmidinin varlığı ile karakterize edilir (Gelvin, 2003). *A. rhizogenes*'in (NCPB2659) genom büyüklüğü 5.114.385 bp'dir ve 2.622.758 bp'lik bir dairesel kromozom, 2.289.334 bp'lik bir doğrusal kromozom ve 202.292 bp'lik bir Ri plazmidinden (pRi2659) oluşmaktadır. Ayrıca 4716 protein şifreleyen geni bulunmakla birlikte, 54'ü tRNA, 12'si rRNA ve 4'ü ncRNA olmak üzere 70 RNA geni taşımaktadır (Tong ve diğ., 2018).

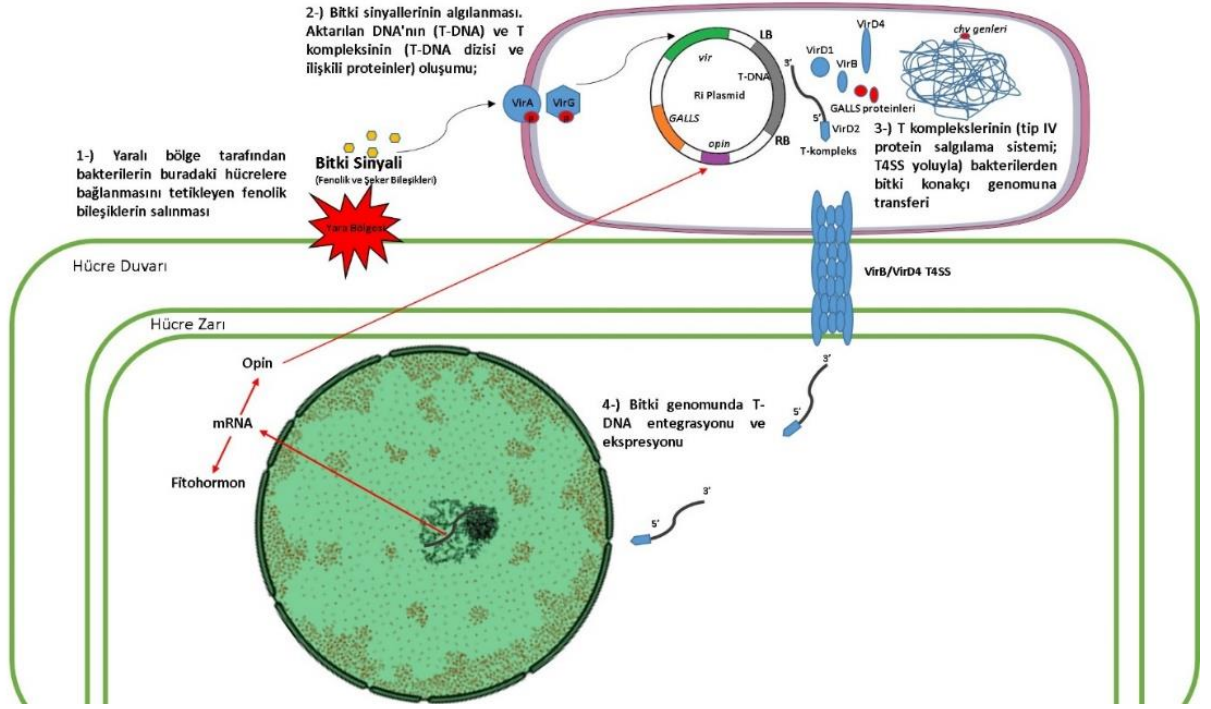
A. rhizogenes enfeksiyonunu takiben, saçak kök oluşumu doğrudan enfeksiyon bölgesinden ince tüylere benzeyen çok sayıda küçük kök şeklinde meydana gelir. Ri plazmidinde bulunan T-DNA, bir grup genin (oksin ve sitokin biyosentezinde yer alan enzimleri şifreleyen) genomik entegrasyonuna aracılık eder. Saçak kökler, bitki hücrelerinin kromozom bölgesine *Agrobacterium rhizogenes*'in *rol* genlerinin entegrasyonu sonucunda indüklenir (Chandra, 2012; Makhzoum ve diğ., 2013). Saçak kök sendromu, aşırı dallanan köklerin çoğalması ile karakterize edilen bir enfeksiyondur. Plagiotropik kök büyümesinin yanı sıra, saçak kök hastalığı kısa internodlar, yüksek derecede lateral dallanma, buruşuk yapraklar, azaltılmış apikal hakimiyet, azaltılmış üretkenlik, saçak köklerin bolluğu, anormal çiçek üretimi, gelişmiş çiçeklenme, artan çiçek sayısı, artan büyüme oranları ve değişen sekonder metabolit birikimi ile karakterize edilir (Özyiğit ve diğ., 2013). Yüksek genetik ve biyokimyasal stabilite ile birlikte ekzojen bitki büyüme düzenleyicileri olmaksızın *in vitro* koşullarda hızlı büyüme gibi çeşitli çekici özellikleri sayesinde değerli moleküllerin üretilmesi için kullanılmaktadırlar.

Son 30 yılda *A. rhizogenes* aracılı transformasyon, gen aktarımı, bitkilerdeki biyosentez yollarının incelenmesi ve fizyolojik süreçlerin aydınlatılması için önemli bir platform haline gelmiştir. *Agrobacterium* aracılı saçak kök indüklenmesi, bitki genetik mühendisliğinde çeşitli temel uygulamalar için yeni pencereler açmaktadır. *A. rhizogenes*'in, binary vektörde yer alan T-DNA bölgesini, Ri plazmidindeki T-DNA ile birlikte transfer etme kabiliyeti, ko-transformasyon ile yabancı bir genin entegrasyonunu ve transgenik saçak kök kültürlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır. Hızlı büyümeleri, kısa ikiye katlanma süreleri, bakım kolaylıkları ve çeşitli kimyasal bileşikleri ve proteinleri sentezleme yetenekleri sayesinde, saçak kökler bitki hücresi süspansiyon kültürlerine göre değerli sekonder metabolitlerin ve rekombinant proteinlerin üretimi için sürekli bir kaynak olarak avantaj sağlamaktadır (Chandra ve Chandra, 2011; Georgiev ve diğ., 2012; Gurusamy ve diğ., 2017). Ayrıca transforme edilmiş saçak kökler stabil transgenik dokular veya bitkiler üretmek (Makhzoum ve diğ., 2013; Yang ve diğ., 2013) veya "bileşik bitkiler" (composite plants) geliştirmek için kullanılabilir (Kereszt ve diğ., 2007; Fan ve diğ., 2020). Saçak köklerin bir başka önemli özelliği, ana bitkilerde belirlenemeyen metabolitleri biriktirebilmeleridir (Gyurkovska ve diğ., 2011; Pollier ve diğ., 2011). Saçak köklerin, organik ve inorganik kirleticilerin fitoekstraksiyon, fitostabilizasyon, rizofiltrasyon ve fitotransformasyonu gibi çeşitli fitoremediasyon stratejilerinin kilit yönlerini incelemek için değerli sistemler olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca bitkilerden türetilen çeşitli ilaç etken maddelerinin üretilmesi için sıklıkla tercih edilmişlerdir. Bu ilaç etken maddeleri arasında digitoksin (*Digitalis purpurea*'dan üretilmiştir ve kalp hastalıkları için reçete edilir), kodein (*Papaver somniferum*, yatıştırıcı), vinblastin ve vinkristin (*Catharanthus roseus*, lösemi tedavisi) ve kinin (*Cinchona officinalis*, sıtma) gibi moleküller örnek olarak verilebilir.

Transformasyon işlemi şu aşamaları takip etmektedir (Lee ve Gelvin, 2008; Chandra, 2012): (i) Yaralı bölge tarafından bakterilerin buradaki hücrelere bağlanmasını tetikleyen fenolik bileşikler salınır (ii) aktarılan DNA'nın (T-DNA) ve T kompleksinin (T-DNA dizisi ve ilişkili proteinler) oluşumu; (iii) T komplekslerinin (tip IV protein salgılama sistemi; T4SS yoluyla) bakterilerden bitki konakçı genomuna transferi; (iv) bitki genomunda T-DNA entegrasyonu ve anlatımı; ve (v) Saçak kök oluşumu (Şekil 2.3). Başarılı bir transformasyon için Ri plazmidinin *vir* bölgesindeki birkaç locus, T-DNA ve kromozomal virulans (*chv*) genleri gereklidir. Bunlar 25 baz çiftlik T-DNA sınır tekrar dizilerine bağlanan ve DNA'yı kesen proteinleri şifreleyen *virD1* ve *virD2*'yi içerir. *VirE1* ve *virE2* genleri tarafından şifrelenen proteinler de T-DNA

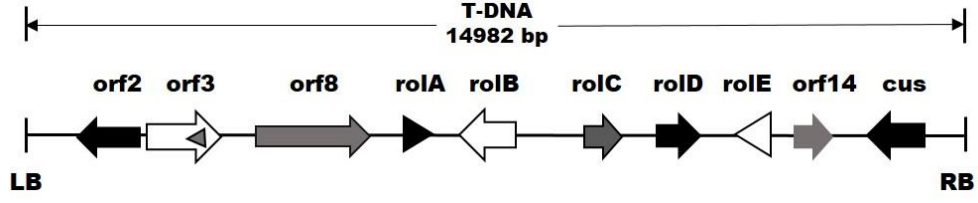
dizilerini nükleaz saldırılarından koruduğu ve bitki kromozomuna entegrasyonunu kolaylaştırdığı için önemlidir. Bazı *A. rhizogenes* suşları bu genlerden yoksundur, ancak yine de helikaz aktivitesi ve nükleer lokalizasyon sinyal proteinini şifreleyen pRi *galls* geninin varlığı sayesinde T-DNA dizisini etkili bir şekilde transfer ederler (Gelvin, 2009; Hodges ve diğ., 2009). T-DNA'nın sol (TL) ve sağ (TR) sınırları ile belirtilen iki bağımsız dizisi vardır (Chandra, 2012). TL-DNA ve TR-DNA genellikle bağımsız olarak konakçı bitki genomuna aktarılır ve entegre edilir, ancak saçak kökleri indüklemek için sadece TL-DNA yeterlidir. TL-DNA'nın dizi analizi, saçak köklerin indüksiyonu için gerekli olan dört açık okuma çerçevesini (*rolA*, *B*, *C* ve *D*) ortaya çıkarmıştır. *RolABCD* genlerinin ürünlerinin tümü saçak kök oluşumunda anahtar rol oynar, ancak *rolB* geni saçak kök indüksiyonundaki en önemli gendir, çünkü bu lokustaki fonksiyon kaybı, plazmidin avirulans olmasına neden olur (Georgiev, Ludwig-Müller ve Bley, 2010). Son zamanlarda *rolB*'nin reaktif oksijen türlerini (ROS) baskıladığı gösterilmiş ve böylelikle sadece hücre farklılaşmasında değil, ROS metabolizmasında da rol oynadığı rapor edilmiştir (Bulgakov ve diğ., 2012).

Genellikle köklerin genetik olarak transforme edildiğini ve saçak kökleri indükleyen bakterilerin elimine edildiğini doğrulamak için PZR (*rol* ve *virG* genlerini amplifiye etmek için tasarlanmış primerler kullanılarak), southern blot hibridizasyonuna ve / veya northern blotting gibi ileri analizler yapılır (Georgiev ve diğ., 2007; Gurusamy ve diğ., 2017). Transgenik saçak köklerin elde edilmesinden sonra bunların korunması ve kültüre alınması genellikle arzu edilir. Bunu yapmanın hem pratik hem de finansal sonuçları açısından birkaç yolu vardır. Katı besiyerleri üzerinde aylık alt kültürleme sıklıkla tercih edilse de pahalı ve zaman alıcıdır ve ayrıca yüksek kontaminasyon riski ile birlikte orijinal hatta kayıplar yaratabilir (Georgiev, Ludwig-Müller ve Bley, 2010). Bu nedenle genellikle alt kültürleme işlemleri için sıvı besiyerleri tercih edilir.



Şekil 2.3: *Agrobacterium rhizogenes* aracılı bitki transformasyon sürecinin temel aşamaları.

A. rhizogenes'in A4, LBA9402, R1601 ve K599 gibi pek çok suşu bitki biyoteknolojisinde aktif olarak kullanılmaktadır. Bu suşlar içerisinde K599, cucumopin tip *A. rhizogenes*'lerin bir suşu olarak Avustralyalı araştırmacı Allen Kerr tarafından topraktan izole edilmiştir (Savka, 1990). İçerdiği Ri plazmidini pRi2659, 14982 bp uzunluğunda T-DNA (GenBank erişim numarası: EU186381) taşımaktadır. Ayrıca bu T-DNA bölgesi *orf2*, *orf3*, *orf4*, *orf8*, *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* (*orf13*), *rolE* (*orf13a*), *orf14* ve *cus* olmak üzere 11 gen/ORF içermektedir (Mankin ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2016). Cucumopin tip *Agrobacterium rhizogenes* K599'un Ri plazmidinin T-DNA yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir. *A. rhizogenes* K599 suşu, çeşitli bitkiler özellikle baklagiller üzerinde yüksek bir enfeksiyon etkinliğine sahiptir. Saçak köklerin K599 suşu tarafından indüklendiği birçok çalışma bulunmaktadır (Kereszt ve diğ., 2007; Cao ve diğ., 2009; Fan ve diğ., 2020). K599 suşu hem tıbbi aromatik bitkilerin aktif bileşenlerinin üretiminde biyoreaktör olarak kullanılacak saçak köklerin indüklenmesinde (Hanafy ve diğ., 2016) hem de tüm bir transgenik bitkinin üretilmesinde kullanılabilirler (Jian ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2011).



Şekil 2.4: Cucumopin tip *Agrobacterium rhizogenes* K599'un Ri plazmidinin T-DNA yapısı.

Her ne kadar K599'daki pRi2659 plazmid dizisinin tamamı belirlenmiş olsa da, T-DNA üzerindeki *orf2* ve *orf4* genleri dahil olmak üzere plazmid üzerindeki şifreleme bölgelerinin çoğunun işlevleri ortaya çıkarılmamıştır. Saçak kök indüksiyonunda *role* (*orf13a*), *orf14* ve *orf8*'in gerekli olup olmadığı ve mekanizmalarının daha fazla araştırılması gerekmektedir. Öte yandan, *A. rhizogenes* K599 bazı dikotiledonlar, özellikle baklagiller üzerinde güçlü bir enfeksiyona sahipken mısır gibi monokotiledonlar üzerinde ise belirli düzeyde bir enfeksiyona sahiptir. Bununla birlikte, K599'un çeltik, buğday ve diğer önemli ekin bitkilerini enfekte edip etmediği bilinmemektedir. *Petunia hybrida*, *Lotus corniculatus* ve krizantem bitkilerinin K599 enfeksiyonu ile indüklenen saçak köklerden transgenik bitkilerin yeniden üretilmesi başarıyla gerçekleştirilmiş olsa da, soya fasulyesi ve diğer monokotiledon bitkilerin saçak köklerden rejenerasyonu konusunda hiçbir başarılı çalışma bildirilmemiştir (Xiang ve diğ., 2016).

2.2.3.2. Transgenik Soya

Mantar, bakteri ve virüs patojenleri, nematodlar, böcek zararlıları ve herbisit, tuzluluk, kuraklık gibi biyotik ve abiyotik stresler soya üretimini önemli derecede etkilemektedir. Son yıllarda transgenik teknolojiler, tüm bu biyotik ve abiyotik streslere karşı dirençli/toleranslı soya çeşitlerinin geliştirilmesini kolaylaştırmış ve hızlandırmıştır. Günümüze kadar onaylanmış genetiği değiştirilmiş soya çeşitleri Tablo 2.2'de verilmiştir. İlk transgenik soya bitkilerinin üretimi 1980'lerin ortalarında rapor edilmiştir (Hinchee ve diğ., 1988; McCabe ve diğ., 1988). Gen aktarım tekniklerinin geliştirilmesi ile birlikte soya bitkisinin tarımsal özellikleri diğer ıslah yöntemlerine göre çok daha hızlı bir şekilde iyileştirilmiş ve bu bitkilerin ekim alanlarında önemli derecede artışlar meydana gelmiştir.

Tablo 2.2: Onaylanmış Genetiği Değiştirilmiş Soya (*Glycine max* L.) Çeşitleri (ISAAA, 2021).

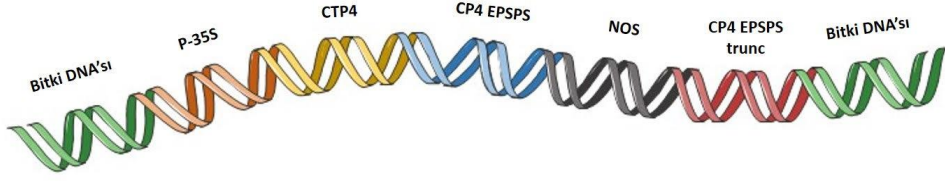
Adı	Kodu	Ticari Adı
A2704-12	ACS-GMØØ5-3	Liberty Link® soybean
A2704-21	ACS-GMØØ4-2	Liberty Link® soybean
A5547-127	ACS-GMØØ6-4	Liberty Link® soybean
A5547-35	ACS-GMØØ8-6	Liberty Link® soybean
CV127	BPS-CV127-9	Cultivance
DAS44406-6	DAS-44406-6	Mevcut değil
DAS68416-4	DAS-68416-4	Enlist™ Soybean
DAS68416-4 x MON89788	DAS-68416-4 x MON-89788-1	Mevcut değil
DAS81419	DAS-81419-2	Mevcut değil
DAS81419 x DAS44406	DAS-81419-2 x DAS-44406-6	Conkesta Enlist E3™ Soybean
DP305423	DP-3Ø5423-1	Treus™, Plenish™
DP305423 x GTS 40-3-2	DP-3Ø5423-1 x MON-Ø4Ø32-6	Mevcut değil
DP305423 x MON87708	DP-3Ø5423-1 x MON-877Ø8-9	Mevcut değil
DP305423 x MON87708 x MON89788	DP-3Ø5423-1 x MON-877Ø8-9 x MON-89788-1	Mevcut değil
DP305423 x MON89788	DP-3Ø5423-1 x MON-89788-1	Mevcut değil
DP356043	DP-356Ø43-5	Optimum GAT™
FG72 (FGØ72-2, FGØ72-3)	MST-FGØ72-3	Mevcut değil
FG72 x A5547-127	MST-FGØ72-3 x ACS-GMØØ6-4	Liberty Link® GT27™
GTS 40-3-2 (40-3-2)	MON-Ø4Ø32-6	Roundup Ready™ soybean
GU262	ACS-GMØØ3-1	Liberty Link™ soybean
HB4	IND-ØØ41Ø-5	Verdeca HB4 Soybean
HB4 x GTS 40-3-2	IND-ØØ41Ø-5 x MON-Ø4Ø32-6	Mevcut değil
MON87701	MON-877Ø1-2	Mevcut değil
MON87701 x MON89788	MON-877Ø1-2 x MON-89788-1	Intacta™ Roundup Ready™ 2 Pro
MON87705	MON-877Ø5-6	Vistive Gold™
MON87705 x MON87708	MON-877Ø5-6 x MON-877Ø8-9	Mevcut değil
MON87705 x MON87708 x MON89788	MON-877Ø5-6 x MON-877Ø8-9 x MON-89788-1	Mevcut değil
MON87705 x MON89788	MON-877Ø5-6 x MON-89788-1	Mevcut değil
MON87708	MON-877Ø8-9	Genuity® Roundup Ready™ 2 Xtend™
MON87708 x MON89788	MON-877Ø8-9 x MON-89788-1	Mevcut değil
MON87708 x MON89788 x A5547-127	MON-877Ø8-9 x MON-89788-1 x ACS-GMØØ6-4	Mevcut değil
MON87712	MON-87712-4	Mevcut değil
MON87751	MON-87751-7	Mevcut değil
MON87751 x MON87701 x MON87708 x MON89788	MON-87751-7 x MON-877Ø1-2 x MON87708 x MON89788	Mevcut değil
MON87769	MON87769-7	Mevcut değil
MON87769 x MON89788	MON-87769-7 x MON-89788-1	Mevcut değil
MON89788	MON-89788-1	Genuity® Roundup Ready 2 Yield™
SYHT0H2	SYN-ØØØH2-5	Herbicide-tolerant Soybean line
W62	ACS-GMØØ2-9	Liberty Link™ soybean
W98	ACS-GMØØ1-8	Liberty Link™ soybean

2018 yılına gelindiğinde, transgenik soyanın ekim alanı biyoteknolojik ürünlerin ekildiği küresel alanın %50'si olan 95,9 milyon hektara ulaşmıştır. ABD (34,1 milyon hektar), Brezilya (34,9 milyon hektar), Arjantin (18 milyon hektar), Paraguay (3,35 milyon hektar), Kanada (2,42

milyon hektar), Uruguay (1,26 milyon hektar), Bolivya (1,26 milyon hektar ve Güney Afrika (694 bin hektar) transgenik soya ekiminin yapıldığı ülkelerdir (ISAAA, 2018). Transgenik soya ekim alanında 2017 yılına göre 2018 yılında Brezilya, Paraguay, Uruguay ve ABD'de artışlar meydana gelirken, Arjantin, Kanada, Bolivya ve Güney Afrika gibi ülkelerin çoğunda kuraklık gibi olumsuz iklim koşulları nedeniyle hafif düşüşler yaşanmıştır. 95,9 milyon hektarlık toplam transgenik soya ekim alanının, 69,3 milyon hektarını herbisit toleransı (HT) ve 26,6 milyon hektarını böcek direnci ve herbisit toleransının bir araya getirildiği (IR/HT) çeşitler oluşturmaktadır. 2018 yılında soyanın toplam ekim alanı 123,5 milyon hektar iken bunun %78'ini (95,9 milyon hektar) transgenik soya oluşturmaktaydı. 1996-2016 yılları arasındaki 21 yıllık dönemde transgenik soya yetiştiren çiftçilerin gelirlerindeki artış 59,7 milyar ABD Dolar ve yalnızca 2016 için 6,9 milyar ABD Dolar olmuştur (Brookes ve Barfoot, 2018b,).

Ekimi yapılan transgenik soyalarda en çok tercih edilen özellik herbisite dirençliliğidir. Roundup Ready® (GTS-40-3-2) glifosata toleranslı soya, pazara ilk ulaşan ürünlerden biridir ve tüm biyoteknolojik tarım ürünlerinin yarısını oluşturmaktadır. GTS40-3-2 gen kasedinin şematik gösterimi Şekil 2.5'te verilmiştir. 2018'de ABD, Brezilya, Arjantin, Paraguay, Güney Afrika, Bolivya ve Uruguayda %90'ın üzerinde benimseme oranlarına sahip olmakla birlikte dünyada ekilen tüm soyaların neredeyse %80'i glifosata toleranslıdır (ISAAA, 2017). 2000'lerin ortalarından beri, ABD'de yetiştirilen tüm soyaların %90'ından fazlası, herbisit toleransı için transgeniktir (USDA-Economic Research Service, 2019). Bu dönemde, dünya genelinde çiftçiler sadece Roundup Ready soyayı ekerek gelirlerini 54,5 milyar dolar arttırmışlardır (Brookes ve Barfoot, 2018b,). Roundup Ready® soya (GTS-40-3-2), EPSPS (5-enolpiruvilşikimat-3 fosfat sentaz) enzimini şifreleyen ve böylelikle glifosat herbisitine tolerans sağlayan *epsps* geninin aktarılması ile üretilmiştir (Padgett ve diğ., 1995). *Epsps* geni aktif olan transgenik soya, geniş spektrumlu glifosat herbisiti uygulamalarına karşı toleranslıdır. İlk ticari herbisite toleranslı soya hattı GTS 40-3-2, Monsanto Canada Inc. tarafından glifosatın soya üretiminde alternatif bir ot kontrol sistemi olarak kullanılmasına izin vermek için geliştirilmiştir. GTS 40-3-2'nin geliştirilmesi, ticari soya çeşidi A5403'e (Asgrow Seed Company) *Agrobacterium tumefaciens* CP4 suşundan izole edilen *epsps* geninin glifosata toleranslı bir formunun aktarımını içeren rekombinant DNA teknolojisi temeline dayanmaktadır. Glifosat, aromatik amino asitler fenilalanin, tirozin ve triptofanın üretiminde yer alan şikimat biyokimyasal yolağın temel bir enzimi olan 5-enol-piruvilşikimat-3 fosfat

sentazın (EPSPS) rekabetçi bir inhibitörü olarak işlev görür. EPSPS inhibisyonu büyümenin baskılanması ve bitki ölümüyle sonuçlanır. Aktarılmış olan glifosat tolerans geni bitkilerde, mantarlarda ve mikroorganizmalar gibi her organizmada bulunan temel enzimin bakteriyel versiyonunu (*Agrobacterium tumefaciens*'in CP4 suşundan türetilmiş) şifreler ve bu enzim glifosata son derece duyarlıdır. Bu nedenle bitkinin aromatik amino asit ihtiyaçlarını karşılayabilir (Quercı ve Mazzara, 2006).



Şekil 2.5: GTS40-3-2 gen kasedinin şematik gösterimi. P-35S: Karnabahar mozaik virüsü 35S promotörü, CTP4: *Petunia hybrida* kloroplast transit peptidi, CP4 EPSPS: *A. tumefaciens* (CP4) 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geni, T-nos: *A. tumefaciens* NOS terminatörü (Quercı ve Mazzara, 2006).

Ekimi yapılan transgenik soyalarda en çok tercih edilen ikinci özellik ise böceklerle dirençtir. Böceğe dirençli soylar, soyanın *Bacillus thuringiensis*'e ait Bt genleri ile transformasyonu sonucunda elde edilmişlerdir. *Bacillus thuringiensis*, toprakta doğal olarak bulunan ve Cry proteinleri adı verilen oldukça spesifik böcek öldürücü endotoksinler üretebilen, spor oluşturan bir bakteridir. Kısaca Cry proteinleri epitel hücrelerinin parçalanmasına neden olan mide zehirleridir. Yuttuktan sonra, kristaller önce bağırsak yolunda kuvvetli alkali koşulda çözülür. Çözünmeden sonra, aktif olmayan protoksin molekülleri, olgun toksinleri oluşturmak için böcek proteazları tarafından protoksinin amino-terminal kısmından proteolitik kesilme yoluyla aktive edilir. Çözünürlüklerini ve aktivasyonlarını takiben Cry toksinleri, orta bağırsak epitelinin kitin bir kılıf olan peritrofik membrandan geçebilir. Aktif Cry proteinleri daha sonra hassas böceklerde orta bağırsaklarda yer alan spesifik reseptörlere bağlanır. Bağlanmayı takiben, toksin hızla ve geri dönüşümsüz olarak hücre zarına girer ve seçici katyon geçirgenliğinin bir sonucu olarak epitel hücre lizisine yol açan porlar oluşur. Fizyolojik düzeyde, epitel hücrelerinin parçalanması, böceğin sindirim sisteminin bozulmasına neden olur ve böcek yemeyi bırakır. Günümüzde Bt proteinleri en etkili ve türe özgü biyoinsektisitler olarak kabul edilmektedir ve 60 yılı aşkın süredir tarımda ve ormancılıkta biyolojik pestisit olarak kullanılmaktadırlar. Bugün bile böceğe dirençli soylar sadece böceklerden kaynaklanan

ürün kayıplarını azaltma yeteneği sayesinde ek 13,4 milyon ton soyanın daha hasat edilmesine yardımcı olmaktadır (Brookes ve Barfoot, 2018a,). Böceğe dirençlilik sağlayan transgenlerin klasik ıslah yöntemleri ile çaprazlanmaları (transgene pyramiding) da dahil olmak üzere Bt soyaaların dirençliliğini arttırmak için çok farklı yaklaşımlar denenmektedir (Ortega ve diğ., 2016). Böcek dirençliliğine sahip soyaaların çeşitli kombinasyonlarda çaprazlanması ile elde edilen yeni çeşitler, tek transgen aktarılmış soyalara göre daha fazla sayıda böcek türüne karşı direnç göstermektedir.

Gıda ve yem kaynağı olan soyaya kazandırılmak istenilen ve pazarın ihtiyacını karşılamaya yönelik diğer özellikler arasında besin değerlerinin geliştirilmesi yer almaktadır. Tüketicuyu doğrudan etkileyen özellikler ile ilgili olarak, yüksek oleik asit içeriğine sahip soyaalar dünya pazarında yer bulmaktadır. Transgenik herbisite toleranslı soyaaların ticarileştirilmesinin ardından, yüksek oleik ve düşük linolenik yağ profilleri ile yeni çeşitler piyasaya sürülmüştür (Demorest ve diğ., 2016). RNA-interferans (RNAi) tekniğindeki ilerlemeler sayesinde yüksek oleik asit içeriğine sahip soyaaların geliştirilmesi mümkün olmuştur (Zhang ve diğ., 2014). Soyada gerçekleştirilen genetik modifikasyonlar sayesinde protein miktarı ve protein kalitesi de geliştirilmiş ve soyanın besin kalitesi artırılmıştır (Zhang ve diğ., 2014).

Soyada özgün genetik varyasyonların oluşturulabilmesine yönelik olarak kullanılan yöntem ve teknikler genom düzeltim teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla daha da genişletilmiştir (Belhaj ve diğ., 2013; Hartung ve Schiemann, 2014). Genom düzeltimi sınıfındaki en yaygın teknikler çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör bazlı nükleazlar (TALEN'ler) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR/Cas9) olarak bilinmektedir. Bu tekniklerin tümü, önceden belirlenmiş yerlerde çift zincirli bir DNA molekülünün bir veya iki dizisini kesen ve sonraki modifikasyonlara izin veren özel nükleazlara dayanır. RNA interferans (RNAi), antisens RNA (asRNA), transkripsiyon aktivatör- benzeri efektör nükleaz (TALEN) teknolojileri kullanılarak geliştirilen çeşitler (USDA-APHIS, 2011; Zhang ve diğ., 2014; Demorest ve diğ., 2016) soyanın, mevcut endüstriyel kullanımlarını genişletme ve insan gıdalarındaki soya kalitesini ve değerini artırma potansiyeline sahiptir. Genom düzeltim sistemleri, daha yüksek besin değerine sahip ve daha verimli soya bitkilerinin geliştirilmesi için soya özelliklerini hızlı, etkin ve hassas bir şekilde değiştirmektedir (Jacobs ve diğ., 2015; Demorest ve diğ., 2016). Özellikle soyanın genom dizisi ve fonksiyonu ile ilgili

mevcut bilginin artması da göz önüne alındığında, CRISPR sistemlerinin göreceli kolaylığı ve etkinliği ile soya için genom düzeltim aracı olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Son yıllarda, CRISPR / Cas9 sistemi, soyada hedeflenen düzenleme için etkili bir şekilde kullanılmıştır (Li ve diğ., 2015; Cai ve diğ., 2018). Bu sistemlerin ek bir avantajı da birden fazla genin aynı anda düzenlenebilir olmasıdır (Kanazashi ve diğ., 2018).

Soyada piyasadaki mevcut özelliklerin çoğu transgenler veya genom düzeltimi yoluyla ve tek veya bir kaç genin meydana getirdiği özelliklerinden türetilir. Gelecek yıllarda ise, gen sentez teknolojilerinin (Kosuri ve Church, 2014) geliştirilmesi gıda, yem veya diğer uygulamalarda yüksek değerli bileşiklerin üretimine yol açan metabolik yolların birleştirilmesine yardımcı olacaktır (Eckert ve diğ., 2006; Pierce ve diğ., 2015; Park ve diğ., 2017). Metabolik mühendislik / sentetik biyolojinin etkinleştirilmesi, çok uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağların üretimi de dahil olmak üzere soyanın yeni kullanımlarının yolunu açacaktır (Wilkes ve Bringe, 2015).

2.3. BİYOGÜVENLİK VE RİSK DEĞERLENDİRMESİ

GD ürünlerinin üretiminin hızlı gelişimi, önemli ekonomik faydalar sağlamasıyla birlikte, öngörülemeyen gıda ve çevre güvenliği sorunlarına yol açabileceğine ilişkin tüketici endişesinin artmasına neden olmuştur. Sözü edilen GDO'ların ve ürünlerinin hem ekolojik risklerine hem de insan ve hayvan sağlığına olumsuz etkilerine yönelik bir biyogüvenlik sisteminin oluşturulması en önemli önceliklerden biri haline gelmiştir. Biyogüvenlik, Biyogüvenlik Kanununda “insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevre ve biyolojik çeşitliliği korumak için GDO ve ürünleri ile ilgili faaliyetlerin güvenli bir şekilde yapılmasını”, biyogüvenlik sistemi ise “biyogüvenliğin sağlanması için yürütülen her türlü faaliyet ile idari, hukuki ve kurumsal yapılanmanın tamamını” ifade etmektedir.

Avrupa Birliği'nin 90/220/EEC sayılı ve 23 Nisan 1990 tarihli Konsey yönetmeliğiyle birlikte GDO'ların kullanımına, çevreye salınımına, ekimine, ithalatına, gıda ve gıda katkısı olarak kullanımına ilişkin ana hükümler belirlenmiştir. GDO'ların düzenlenmesine yönelik bir diğer düzenleme 27 Ocak 1997 tarihli 97/258/EEC sayılı Özgün Gıda ve Özgün Gıda İçerikleri ile ilgili Avrupa Parlamentosu ve Konsey Yönetmeliğidir. Ayrıca, Avrupa Birliği üyelerinin de yer aldığı birçok devlet, Cartagena Biyogüvenlik Protokolü'nü 29 Ocak 2000 tarihinde kabul

etmiştir ve protokol 11 Eylül 2003 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Cartagena Biyogüvenlik Protokolü, Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi'nin ek bir protokolü olarak hazırlanmıştır. Bu protokolün amacı, insan sağlığı üzerindeki riskler göz önünde bulundurularak ve özellikle sınır ötesi hareketler üzerinde odaklanarak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir kullanımı üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilecek ve modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilmiş olan değiştirilmiş canlı organizmaların güvenli nakli, muamelesi ve kullanımı alanında yeterli bir koruma düzeyinin sağlanmasına katkıda bulunmaktır. Daha sonra gerçekleştirilen yeni düzenlemeler ile birlikte, 12 Mart 2001 tarihli 2001/18/EC sayılı Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Çevreye Bilinçli Salınımına İlişkin Avrupa Parlamentosu ve Konsey Yönergesi, 23 Nisan 1990 tarihli 90/220/EEC Konsey Yönergesini fesh ederek yeni prensipler getirmiştir. Daha sonra bu konuda önceki düzenlemelere göre iyileştirilmiş ve güncellenmiş daha açık ve bilgi verici iki yeni düzenleme yayınlanmıştır; 22 Eylül 2003 tarihli EC 1829/2003 Genetiği Değiştirilmiş Gıda ve Yemlere İlişkin Avrupa Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü ve 22 Eylül 2003 tarihli EC 1830/2003 Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların İzlenebilirliği ile Etiketlenmesine ve Genetiği Değiştirilmiş Organizmalardan Üretilmiş Gıda ve Yemlerin İzlenebilirliğine İlişkin Avrupa Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü. Bu tüzüklere göre ürünlerin %0,9'un üzerindeki bir oranda GDO içermesi durumunda etiketlenmesi gerekmektedir. Ayrıca 2011 yılında EFSA tarafından, GD gıda ve yemlere ilişkin (EC) 1829/2003 Sayılı Yönetmelik çerçevesinde, genetiği değiştirilmiş bitkilerden oluşan veya bunlardan üretilen gıda ve yemlerin risk değerlendirmesi için güncellenmiş bir kılavuz yayınlanmıştır (EFSA, 2011).

Ülkemizde GDO ile ilgili yasal düzenlemeler geçtiğimiz 10 yıl içerisinde oluşturulmuştur. Bu düzenlemelerin en önemlilerinden birisi 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan "Biyogüvenlik Kanunu"dur. Bu kanunun amacı bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esasları belirlemek olarak belirtilmiştir. Bu kanun genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünleri ile ilgili olarak araştırma, geliştirme, işleme, piyasaya sürme, izleme, kullanma, ithalat, ihracat, nakil, taşıma, saklama, paketlenme,

etiketleme, depolama ve benzeri faaliyetlere dair hükümleri kapsamaktadır. Bu kanuna göre yapılan her bir başvuru için bilimsel esaslara göre risk değerlendirmesi ve sosyo-ekonomik değerlendirme ayrı ayrı yapılır. Risk değerlendirmesinde laboratuvar, sera ve tarla testlerini içeren alan denemeleri ile gıda analizleri, toksisite ve alerji testlerinin sonuçlarını kapsamaktadır. Bu kanun kapsamında GDO ve ürünlerinin onay alınmaksızın piyasaya sürülmesi GDO ve ürünlerinin kurul kararlarına aykırı olarak kullanılması veya kullandırılması genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin Kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı, GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmıştır. Ayrıca bir ürünün belirlenen eşik değerin üzerinde GDO ve ürünlerini içermesi durumunda etiketlenerek GDO içerdiğinin açıkça belirtilmesi zorunlu tutulmuştur. 09 Temmuz 2018 tarihinde Biyogüvenlik Kanununda yapılan değişiklik ile Biyogüvenlik Kurulu'na yapılmış olan atıfların Cumhurbaşkanlığınca belirlenen kurul veya merciye yapılmış sayılacağı belirtilmiştir. 02 Ağustos 2018 tarihinde Cumhurbaşkanlığı 2018/3 sayılı Genelgesi ile Biyogüvenlik Kurulunun görev ve yetkilerinin Tarım ve Orman Bakanlığına verildiği Resmi Gazete'de yayınlanmıştır. Böylelikle GDO ve ürünleri ile ilgili yapılan başvuruların değerlendirilmesi için Biyogüvenlik Kanunu ve ilgili yönetmeliklerde belirtilen görevlerin Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından yürütülmesine karar verilmiştir. Türkiye'de Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından kabul edilen genetiği değiştirilmiş soya çeşitleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Türkiye Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Tarafından Yem Olarak Kullanılmasına İzin Verilen Genetiği Değiştirilmiş Soya (*Glycine max* L.) Çeşitleri.

Adı	Kodu	Ticari Adı
A2704-12	ACS-GMØØ5-3	Liberty Link®
A5547-127	ACS-GMØØ6-4	Liberty Link®
CV127	BPS-CV127-9	Cultivance
DAS-44406-6	DAS-444Ø6-6	Mevcut değil
DP356043	DP-356Ø43-5	Optimum GAT™
DP305423	DP-3Ø5423-1	Treus™, Plenish™
FG72	MST-FGØ72-2	Mevcut değil
MON40-3-2	MON-Ø4Ø32-6	Roundup Ready™
MON87701	MON-877Ø1-2	Mevcut değil
MON87701 x MON89788	MON-877Ø1-2 x MON-89788-1	Intacta™ Roundup Ready™ 2 Pro
MON87705	MON-877Ø5-6	Vistive Gold™
MON87708	MON-877Ø8-9	Genuity® Roundup Ready™ 2 Xtend™
MON89788	MON-89788-1	Genuity® Roundup Ready 2 Yield™
SYHT0H2	SYN-ØØØH2-5	Mevcut değil

Tüm bu biyogüvenlik düzenlemelerinin ve protokollerinin içerisinde risk yönetimi ve risk değerlendirmeleri ayrıca odaklanması gereken bir konu olarak önemli bir yer tutmaktadır. Risk, bir eylemin ardından potansiyel zararın ortaya çıkma olasılığı ve ciddiyet derecesinin bir birleşimidir. Risk değerlendirmesi bir faaliyetle ilişkili risk miktarını karakterize eder. Genetiği değiştirilmiş organizmalar ile ilişkili risk değerlendirilmesi ise, GDO ve ürünlerinin, genetik değişiklikten dolayı, insan, hayvan ve bitki sağlığı, biyolojik çeşitlilik ve çevre üzerinde sebep olabileceği risklerin ve risk kaynağının test, analiz, deneme gibi bilimsel yöntemlerle tanımlanması, niteliklerinin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve risk unsurlarının belirlenmesini kapsayan dört aşamalı süreci ifade etmektedir. GD bitkilerin ve onlardan türetilen gıda ve yemlerin risk değerlendirmesi, insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için GD bitki ve ondan türetilen ürünler hakkında bilgi üretmeyi, toplamayı ve değerlendirmeyi

içermektedir. Risk değerlendirmesinde dört ayrı konuda ayrıntılı değerlendirmenin yapılması gerekmektedir. Bu değerlendirmeler (EFSA, 2011);

- genetik modifikasyondan kaynaklanan GD bitki ve/veya ondan türetilmiş gıda ve yemdeki biyolojik olarak ilgili değişikliklerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkisini ele alan toksikolojik değerlendirmeyi,
- yeni proteinlerin ve ayrıca GD bitkiden elde edilen bütün gıdanın alerjenik potansiyelinin değerlendirilmesini,
- bir GD bitkiden elde edilen gıda ve yemin insanlar ve/veya hayvanlar için besinsel açıdan dezavantajlı olmadığını göstermeyi amaçlayan beslenme değerlendirmesini,
- aktarılan transgenin yapısı, anlatımı ve hedeflenen/beklenen özelliklerin stabilitesi hakkında bilgi sağlayan moleküler karakterizasyonunu içermektedir.

Transgenik bitkilerde moleküler karakterizasyon (i) donör organizmanın kökeni ve genin nasıl izole edildiği de dahil olmak üzere transformasyon için kullanılan genetik materyalin tanımlanması, (ii) transformasyon yönteminin tanımlanması, (iii) transgen lokusunun tanımlanması, (iv) transkript ve protein karakterizasyonu, (v) transgenin kalıtımı ve stabilitesi, (vi) transgenin saptanması ve tanımlanmasını içerir (Matsaunyane ve Dubery, 2018). Çevresel risk değerlendirmeleri ise ele alınması gereken yedi spesifik alanı içermektedir (EFSA, 2010). Bunlar, bitkiden bitkiye gen transferi de dahil olmak üzere GD bitkinin sürekliliği ve yayılabilirliğini; bitkiden mikroorganizmalara gen transferini; GD bitki ile hedef canlı organizma arasındaki etkileşimi; GD bitki ile hedef olmayan canlı organizma arasındaki etkileşimi; özel yetiştirme, yönetim ve hasat tekniklerinin etkisini; biyojeokimyasal süreçler üzerindeki etkileri; insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkileri içermektedir. Genetiği değiştirilmiş bitkilerden elde edilen gıda ve yemlerin risk değerlendirmesi kılavuzunda (EFSA, 2011) önerilen strateji, GD bitkilerin ve onlardan türetilmiş gıda ve yemlerin geleneksel karşılıkları ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu karşılaştırmalı yaklaşımın altında yatan varsayım, geleneksel olarak ekilen ürünlerin tüketiciler ve/veya evcil hayvanlar için güvenli bir kullanım geçmişine sahip olmasıdır. Transgenik bitkiler için güvenlik değerlendirmesinin amacı, bu yeni bitkilerin

(varsa) geleneksel karşılıkları kadar güvenli olduğunu ve tüketicinin sağlığı için herhangi bir ek veya yeni risk oluşturmadığını göstermektir. OECD, GD ve GD olmayan benzerlerinin risk değerlendirmesi için “temel eşdeğerlik” anlayışını önermiştir (OECD, 1993, 2006). Bu kavram kapsamında GD bitkilerin geleneksel karşılıkları ile karşılaştırılmasında ortaya çıkabilecek değişikliklerin beklenen ve beklenmeyen etkiler açısından dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Genetik modifikasyon sürecinin orjinal hedefi olan ve genlerin aktarılması sonucunda ortaya çıkması beklenen etkiler risk değerlendirmesi ve gıda güvenliği çerçevesinde analiz edilen değişikliklerin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Diğer yandan hedef genin beklenen etkileri dikkate alınarak, transgenik bitkinin geleneksel karşılıklarına kıyasla fenotipinde, koşullara cevabında veya moleküler bileşiminde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak ifade edilen beklenmedik etkiler, risk değerlendirmesi ile ilişkili olarak yalnızca temel eşdeğerlik kapsamında ve dolaylı yoldan değerlendirilmektedir. Risk değerlendirmeleri, insan ve hayvan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkilerle ilgili olarak her iki etkinin tanımlanmasına ve karakterizasyonuna odaklanmıştır.

Aktarılan DNA ideal olarak tek bir lokusta ve tek bir kopya halinde bulunmalıdır. Vektörün transfer edilen diziler dışında kalan kısmı bitkiye aktarılmamalı ve insersiyon endojen bir geni bozmamalı veya yeni bir kimerik protein oluşturmamalıdır. Lokuslarda gerçekleşebilecek yeniden düzenlenmeler minimum düzeyde ve gen yapısının bütünlüğü korunmuş olmalıdır. Transgenik bitkide, yeni anlatımı yapılan proteinin güvenliği, insersiyonun moleküler karakterizasyonu, insersiyonun bitki performansı ve bileşimi üzerindeki etkisi, çevresel etki ve ürünün bütünlüğü ile ilgili çalışmaları da içeren geniş güvenlik değerlendirmeleri yürütülmektedir (SCBD, 2000; FAO/WHO, 2003). Risk değerlendirmesi, belirli bir GD ürününün ithalatı, tarla testi veya ekimi gibi bir faaliyetin gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceği konusunda kararlar vermeye katkıda bulunur.

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Codex Alimentarius Komisyonu (CAC), Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), Avrupa Komisyonu (EC) ve diğer birçok uluslararası ajans, GD gıda güvenliği değerlendirmesinde beklenmedik etkilerin önemini vurgulamıştır. (FAO/WHO, 2003) tarafından tanımlanan gıda ve yem güvenliğine yaklaşım, GD ürününün geleneksel bir karşılığı ile delilin ispat kuvveti yaklaşımı kullanılarak karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu şekilde

değerlendirme, GD ürünündeki potansiyel yeni tehlikelerin veya tehlike düzeylerindeki değişikliklerin tanımlanmasına odaklanır. Avrupa Birliği'nin tüm GD bitkilerinin genel alerjenliğinin değerlendirilmesine ilişkin perspektifine göre, genetik modifikasyonu taşıyan türlerde bilinen bir alerjen olduğu durumlarda GD ürünü ve geleneksel karşılığındaki endojen alerjenlerin kalitatif ve kantitatif bileşimi karşılaştırılmalıdır. Bir bitki türü içindeki endojen alerjenlerin konsantrasyonu oldukça değişkendir ve karşılaştırmalı analiz, bitki çeşidinin ve ekim, hasat, depolama ve işleme koşullarının alerjenlerin anlatımı üzerindeki etkisini göz önünde bulundurmalıdır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kılavuzu ve Avrupa Komisyonu (EC) yönetmeliği, kontrollü tarla denemelerinden toplanan bitki materyallerinin karşılaştırmalı kompozisyon analizine anahtar endojen alerjenlerin de (OECD konsensus belgelerinde listelenenler gibi) dahil edilmesini tavsiye etmiştir. Bu, GD bitkinin geleneksel karşılığından daha alerjik olup olmadığını değerlendirmeyi amaçlamaktadır (EFSA, 2011; The European Commission, 2013).

2.3.1. Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerde Beklenmedik Etkiler ve Belirlenmeleri

Tarımsal bitkilerin genomları, geleneksel ıslah yoluyla kendiliğinden ortaya çıkan veya mutagenез yoluyla yaratılan istenen özelliklerin seleksiyonu ile insanlar tarafından şekillendirilmiştir. Geleneksel ıslahla ilişkili olarak meydana gelen genetik değişiklikleri taşımalarına karşın, geleneksel ürünlerin kullanımının güvenli olduğu kabul edilmektedir. GD bitkiler ile geleneksel karşılıkları değerlendirilirken, transgenin neden olduğu değişikliğin beklenen ve beklenmeyen etkilerini dikkate almak, yeni ortaya çıkabilecek güvenlik ile ilgili değişiklikleri saptamaya çalışmak ve temel besinlerdeki insan sağlığını ilgilendiren değişiklikleri belirlemek gerekmektedir (Cellini ve diğ., 2004). Bu başlıklar doğrultusunda GD ve geleneksel karşılıkları karşılaştırılmasında en önemli maddelerden biri olarak belirtilen beklenen ve beklenmeyen etkilerin araştırılmasından önce bu terimlerin tanımlamasının iyi ve belirgin bir şekilde yapılması gerekmektedir. Beklenen etkiler (intended effects), söz konusu genlerin aktarılması sonucunda ortaya çıkması hedeflenen ve genetik modifikasyon sürecinin orijinal hedeflerini yerine getiren etkilerdir. Birçok transgen, bilinen ve karakterize bir proteinin anlatımını yaptığından, proteini toksisite ve alerjenlik açısından doğrudan değerlendiren ve proteinin işleviyle ilişkili olabilecek metabolit düzeylerini ölçen prosedürler geliştirilebilir (Ladics ve diğ., 2015). Beklenmedik etkiler (unintended effects) ise hedef genin beklenen etkileri de dikkate alınarak GD bitkinin türetildiği ebeveyne kıyasla fenotipte, mevcut koşullara cevapta veya moleküler bileşiminde istatistiksel olarak anlamlı bir farkı ifade eder.

Beklenmedik değişiklikler, gen insersiyonunun bir sonucu olarak, transformasyon ve doku kültürü işlemleri sırasında meydana gelen rastgele mutasyonlardan veya aktarılan genin proteininin pleiotropik etkilerinden dolayı ortaya çıkabildiği için tek bir doğrudan test yoktur. Bu tür karşılaştırmalar, GD ve GD olmayan bitkilerin aynı koşullar altında yetiştirildiği durumlarda yapılmalıdır. Öngörülebilir beklenmedik etkiler (predictable unintended effects), hedef genlerin aktarılması sonucunda beklenen birincil etkilerin ötesine geçen, ancak bitki biyolojisi ve metabolik yolak entegrasyonu ve ara bağlantıları hakkındaki mevcut bilgilerimizle açıklanabilecek beklenmedik değişikliklerdir. Öngörülemeyen beklenmedik etkiler (unpredictable unintended effects) ise mevcut bilgimizin dışında kalan değişikliklerdir (Cellini ve diğ., 2004). Bu tür “beklenmedik etkiler”in potansiyel olarak ortaya çıkması bitkilerin geliştirilmesine yönelik olarak rekombinant DNA teknolojilerinin uygulanmasındaki en önemli endişelerden biridir.

GDO’ların kullanımlarının hızla artması ve bunun sonucunda meydana gelen risklerin anlaşılabilmesi için gerçekleştirilen çalışmalarda büyük artış gözlenmektedir. 1993 yılında, OECD, gıda güvenliği değerlendirmeleri için “temel eşdeğerlik” ilkesini önermiş ve yeni bir gıda veya gıda içeriğinin mevcut gıdalar veya gıda bileşenleriyle yaklaşık olarak aynı olması durumunda, bunların eşit derecede güvenli olduğunu belirtmiştir (OECD, 1993). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Codex Alimentarius Komisyonu (CAC), Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), Avrupa Komisyonu (EC) ve diğer bazı uluslararası kuruluşlar, GD’lerin ve ürünlerinin güvenlik değerlendirmesi sürecinde, özellikle uzun vadeli ve potansiyel gıda güvenliği sorunlarıyla ilgili olarak, beklenmeyen etkilere özellikle dikkat edilmesi gerektiği konusunda genel olarak hemfikirdir. Bu nedenle, birçok ülkede güvenlik değerlendirme ilkeleri ve teknolojik şemalar, beklenmeyen etkilerin güvenlik değerlendirmesini de önemli bir parça olarak dahil etmiştir (Deng ve diğ., 2008). Ayrıca, Ocak 2014’te Kanada’nın Ottawa kentinde Uluslararası Yaşam Bilimleri Enstitüsü/Sağlık ve Çevre Bilimleri Enstitüsü ve Kanada Gıda Denetleme Kurumu sponsorluğunda “Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerde Beklenmeyen Etkilerin Genetik Temeli” başlıklı uluslararası bir toplantı gerçekleştirilmiştir. Toplantıda bitkilerde istenmeyen etkiler konusunda daha fazla çalışma gerektiren alanlar belirlenmiş ve bu bilgilerin GD ürünlerinin risk değerlendirmelerini nasıl iyileştirebileceği tartışılmıştır.

2.3.1.1. GD Bitkilerdeki Beklenmedik Etkilerin Genetik Temeli

Transgenler gen transferi işlemi sırasında bitki genomuna rastgele olarak yerleşirler ve homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) veya bölgeye-özgü rekombinasyon yoluyla bitki genomuna entegre olurlar (Li ve diğ., 2009; Kohli, Miro ve Twyman, 2010). NHEJ, bir DSB mekanizması gerektiren transgen entegrasyonu için baskın rekombinasyon mekanizmasıdır (Saika, Nishizawa-Yokoi ve Toki, 2014). Transgenlerin kromozomal DNA'ya insersiyonu, tek kopya ile veya tekrarlı ve çoklu kopyalar ile sonuçlanabilir. Bağlantılı veya bağlantısız bölgelerde birden fazla insersiyon meydana gelebilir, ve karmaşık entegrasyon profilleri ortaya çıkabilir (Giraldo ve diğ., 2021). Bitki DNA'sında insersiyon bölgesinde T-DNA insersiyonuna bağlı kromozomal yeniden düzenlenmeler meydana gelebilmekte ve daha küçük T-DNA bölgelerinin integrasyonu da mümkün olabilmektedir (Schouten ve diğ., 2017). T-DNA vektörüne (Ti plazmid veya Ri plazmid) ait diziler de, *Agrobacterium* aracılı transformasyon ile elde edilen transgenik bitkilerin genomuna sıklıkla entegre edilebilmektedir (Gelvin, 2017). Genetik modifikasyon sürecinin neden olduğu beklenmedik etkilerin ortaya çıkışında bir çok farklı mekanizma rol oynamaktadır. Somaklonal varyasyonlar, insersiyonel etkiler, pleiotropik etkiler ve pozisyon etkileri beklenmedik etkilerin temel kaynağı olarak düşünülmektedir.

Somaklonal Varyasyon

Genetik mühendisliği uygulamalarına yönelik çalışmalarda bitkiler yetiştirilirken hücre veya doku kültüründen yararlanılabilir ve bu laboratuvar tekniği somaklonal varyasyon (SCV) olarak bilinen genomik düzeydeki değişikliklere yol açabilir. *In vitro* ortamda farklılaştırılmış bitki dokuları, çoğu bitki transformasyon yöntemi için kritik öneme sahiptir ve *in vitro* kültür beklenmedik değişikliklerin olası kaynağı olan somaklonal varyasyon olarak adlandırılan genetik ve epigenetik değişiklikleri indükler (Larkin ve Scowcroft, 1981). Her ne kadar somaklonal varyasyon yeni mutasyonların kaynağı olarak potansiyel yarara sahip olsa da, transgen aktarımının hedeflediği sınırlı, öngörülebilir değişiklikleri yaratma amacına aykırılık göstermektedir (Ladics ve diğ., 2015). Somaklonal varyasyon, tek nükleotid değişiklikleri, insersiyonlar, delesyonlar, yeniden düzenlenmeler veya kromozom sayısındaki değişiklikler şeklinde olabilir. Somaklonal varyasyonların önemli sebeplerinden birisi de hareketli elementler olarak bilinen transpozonların hücre ve doku kültüründeki aktivasyonudur.

İnsersiyonel Etki

Birkaç genetik haritalama çalışması, transgen entegrasyonunun tüm genom boyunca meydana gelebileceğini ve çeşitli bitki türlerinde rasgele olarak gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Gelvin, 2017). Transgen insersiyonu, rekombinasyon noktaları (recombination hotspot) da düşünüldüğünde, bitki doğal rekombinasyon mekanizması ile ortak olan çift zincir kırıklarının tamir mekanizmasını kullanmaktadır. Bu sebepten dolayı T-DNA'nın gen bakımından zengin bölgeleri tercih edebileceği düşünülmektedir. Böylelikle transgen, insersiyon noktasında fonksiyonel bir genin bozulmasına, gen kasetinin yeniden düzenlenmesine veya komşu genlerin anlatımlarının değişmesine neden olabilir (Cheng ve diğ., 2008). Dahası transgenlerin anlatımı, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin anlatımında artışa neden olabilir ve yaratılan biyosentetik yollardaki değişiklikler ile, biyotik veya abiyotik strese karşı tolerans düzeylerinin değişmesine neden olabilecek diğer bileşenlerin kullanılabilirliğini ve aktivitesini arttırmak veya azaltmak da dahil olmak üzere farklı etkileşimlere yol açabilir. İnsersiyon endojen bir genin veya düzenleyici elementin içinde veya yakınında meydana gelebilir. Böylelikle endojen gen(ler)'in anlatımı veya üretilen RNA ve proteinlerin doğası beklenmedik bir özellik ile sonuçlanacak biçimde etkilenebilmektedir (Schnell ve diğ., 2015). Eklenen DNA içindeki düzenleyici elementler, yakındaki endojen genlerin anlatımını da etkileyebilir. Endojen bir genin RNA'larının ve / veya proteinlerinin anlatımının yapıldığı dizilerin değiştirilmesi birçok mekanizma ile meydana gelebilir. Gen içerisindeki insersiyonlar, delesyonlar ve / veya yeniden düzenlenmeler genin kesilmesi, alternatif kırılma veya yeni bir kimerik genin meydana gelmesi ile sonuçlanabilir. Ancak, endojen genin işlevinin insersiyonel etkiler nedeniyle tehlikeye girdiği durumlarda, genin bitki genomunda birden fazla bulunması durumunda beklenmedik özellikler ortaya çıkmayabilir. Bitkilerde insersiyonel etkilere benzer genetik değişiklikler, transpozon hareketleri, homolog olmayan uç birleştirme ile çift zincirli kırıkların onarılması ve organel DNA'nın hücre içi transferinin bir sonucu olarak meydana gelir. Bu durum beklenmedik etkilerin hem geleneksel hem de moleküler ıslah programlarının bir sonucu olarak ortaya çıkabileceğini göstermektedir (Kok ve diğ., 2008; Weber ve diğ., 2012; Flint-Garcia, 2013). Bu nedenle bitkilerde kendiliğinden veya geleneksel ıslah yoluyla meydana gelen genetik değişikliklerin genetik mühendisliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkan insersiyonel etkilere benzer olup olmadığının belirlenmesi son derece yararlıdır.

Transgenlerin Pleiotropik Etkisi

Pleiotropik etkiler genoma sokulan DNA dizisi içindeki bir genin birden fazla özelliği değiştirdiğinde ortaya çıkan etkilerdir. Pleiotropik etkiler, transgen insersiyon bölgesinden bağımsızdır ve transgenin anlatımının neden olduğu tüm fenotipik etkilerin toplamıdır. Bu etkilerin ortadan kaldırılması oldukça zordur, bu nedenle güvenlik konusunda çeşitli sorunları da beraberinde getirirler. Pleiotropi beklenmedik etkilere sebep olma potansiyelindedir (Fagan, Antoniou ve Robinson, 2014). Hem pozitif hem de negatif etkiler aynı genden kaynaklandığında, bu durum antagonistik pleiotropi olarak adlandırılır. Antagonistik pleiotropinin bir örneği, metabolitlerin membran boyunca taşınmasında rol oynayan bir molekül olan ABC taşıyıcı proteini şifreleyen buğday (*Triticum aestivum*) geni *Lr34*'tür (Krattinger ve diğ., 2009). *Lr34*, çeşitli buğday hastalıklarına dayanıklılık sağlarken aynı zamanda hastalık yokluğunda potansiyel verimi azaltabilen bayrak yaprağının (yaprak ucu nekrozu) erken yaşlanmasına neden olur. Buğday *Lr34* geni arpaya (*Hordeum vulgare* L.) aktarılsa, olumsuz etki güçlenir ve bitkiler sterilite ve bodur büyüme gösterirler (Risk ve diğ., 2013). Bir transgenin aktarılmasını sonucu olarak pleiotropinin ve dolayısıyla beklenmedik etkiler olasılığının oluşup oluşmayacağının öngörülmesi, şifrelenen proteinin biyokimyasal mekanizması hakkındaki bilgiye bağlıdır. Birçok bitki karakterinin ihtiyaç duyduğu temel hücresel fonksiyonları etkileyen genlerin, pleiotropik olma olasılığı daha yüksektir. Benzer şekilde, mRNA öncesi alternatif kırılma meydana gelen veya birden fazla yolu etkileyen bir proteini şifreleyen genler, örneğin transkripsiyon faktörleri veya diğer düzenleyici proteinler veya moleküller, potansiyel olarak pleiotropik olabilirler. Eğer bir gen farklı türlerden aktarılmış ise aktarılan bitkide düzenleyici kontrollerin olmaması nedeniyle daha fazla pleiotropik etki meydana gelebilir (Risk ve diğ., 2013).

Pozisyon Etkisi

Transgenik sistemlerde, iyi bilinen ve beklenmedik etkilere neden olma potansiyelindeki diğer etkiler pozisyon etkileridir. Pozisyon etkileri insersiyon bölgesine bağlı olarak, aktarılan genlerin anlatımındaki varyasyonlardır (Betts ve diğ., 2019). Genomun belirli bir lokasyonuna bir transgenin aktarımı konum etkilerine neden olur ve mevcut organizasyona müdahale edebilecek bir etkileşim meydana gelir. Farklı entegrasyon bölgeleri nedeniyle, bu etkiler çeşitlilik gösterebilir. Transgen insersiyonunun rastgele doğası nedeniyle, transgenik DNA,

genomun transkripsiyonel olarak baskılanmış (heterokromatin) bölgelerine entegre olabilir ve bu da birçok durumda transgenin susturulmasına neden olabilir. Ek olarak, transgenler, transkripsiyon arttırıcıları (enhancers) veya baskılayıcıları (repressors) gibi çeşitli endojen düzenleyici dizilerin yanına dahil edilebilir ve bu da transgenin hatalı anlatımına neden olabilir.

2.3.1.2. Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Beklenmedik Etkilerinin Değerlendirme Ölçütleri

Genetiği değiştirilmiş bir bitkinin farklı gelişim dönemlerinde farklı beklenmedik etkiler ortaya çıkabilir. Diğer yandan farklı bireylerde aynı gelişim dönemlerinde farklı beklenmedik etkiler de belirlenebilir. Bu nedenle, genetiği değiştirilmiş bitkilerin beklenmedik tüm etkilerinin tek bir deneyle tanımlanması oldukça zordur. Önemli noktalardan biri de beklenmedik etkinin mutlaka tamamen zararlı anlamına gelmediğidir. Genetiği değiştirilmiş organizmaların biyogüvenliği değerlendirildiğinde istenmeyen/beklenmedik etkilerin hangi düzeye ulaştığına odaklanmak gerekir. Genetiği değiştirilmiş bitkilerdeki beklenmedik etkilerin değerlendirme kriterleri dört düzey olarak belirlenmiştir (Deng ve diğ., 2008).

Birinci düzey: Ne fenotipik ne de kalıtsal özellik ile ilgili varyasyonunun meydana gelmediğinin ve antibiyotik direnç geninin yatay transferinin gerçekleşmediğinin kanıtlanması,

İkinci düzey: Fenotipik veya kalıtsal karakteristik varyasyonların meydana geldiğinin, ancak varyasyonların gıda güvenliği üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı ve antibiyotik direnç geninin yatay transferinin gerçekleşmediğinin kanıtlanması,

Üçüncü düzey: Hem fenotipik hem de kalıtsal karakteristik varyasyonların meydana geldiğinin, ancak varyasyonların gıda güvenliği üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı ve antibiyotik direnç geninin yatay gerçekleşmediğinin kanıtlanması,

Dördüncü düzey: Aşağıdaki iki durumdan birinin meydana geldiğinin kanıtlanması. Bazı fenotipik ve / veya kalıtsal karakteristik varyasyonların meydana geldiğinin ve varyasyonların gıda güvenliği üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğunun veya antibiyotik direnç geninin yatay transferinin gerçekleştiğinin kanıtlanması.

2.4. BEKLENMEDİK ETKİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE KULLANILAN TEKNOLOJİ VE UYGULAMALAR

Bitkilerde hem doğal olarak hem de geleneksel ıslah uygulamalarının bir sonucu olarak ortaya çıkan birçok genetik değişiklik olmasına karşın, GD ürünlerin kimyasal bileşimi (örneğin protein, yağ, nem, kül, mineraller, vitaminler) geleneksel ürünlerin kimyasal bileşimine büyük ölçüde benziyorsa, insanlar ve hayvanlar için sağlık riski oluşturduğu düşünülmez (Huang, 2017). Bitkilerin geliştirilmesi sırasında kasıtlı olarak aktarılan (hedeflenen) yeni özelliklerin güvenliği, genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin pazara girmesinden önce analizi ve moleküler karakterizasyonu sırasında değerlendirilir. Buna karşın istenmeyen özellikler doğası gereği beklenmediktir ve doğrudan test edilmeleri oldukça zordur. Çoğu ülkede, genetik mühendisliği ile geliştirilmiş bitkilerin ve bu bitkilerden türevlenen gıda ve yemlerin pazar öncesi değerlendirmelerinde kullanılan karşılaştırmalı yaklaşımlar, beklenmedik etkilerin tanımlanmasına ve değerlendirilmesine imkan veren bir strateji sağlar. Karşılaştırmalı yaklaşıma dayalı değerlendirmeler, GD ürününde hedeflenen yeni özelliği tanımlamanın yanı sıra, beklenmedik özellikleri belirleyerek ve bu özelliklerin çevreyi olumsuz etkileme potansiyelini veya gıdaların güvenlik ve / veya besin kalitesini etkileme potansiyelini değerlendirerek ve / veya GD bitkilerden türevlenen yemlerin yararlılığını değerlendirerek işlev gösterir. GD ürünlerinin güvenli kullanım öyküsü olan, uygun, GD olmayan karşılıkları ile karşılaştırmalı kompozisyon analizi, kapsamlı bir risk değerlendirme yaklaşımının bileşenlerinden biridir. Bitkilerdeki genetik değişikliklerin doğasının ve etkisinin anlaşılması, GD bitkiler ve bu bitkilerden elde edilen gıda ve yemlerin piyasa öncesi değerlendirmelerini geliştirmek için kullanılabilir (Schnell ve diğ., 2015). GD bitkilerde beklenmedik etkilerin belirlenmesi için kullanılan geleneksel yöntemler arasında çevresel adaptasyon değerlendirmesi, kimyasal bileşimin analizi ve transgenik hat ile transgenik olmayan kontrolü arasındaki tarımsal karakter karşılaştırmaları bulunur. Son yıllarda ise moleküler markırlar, gen anlatım analiz yöntemleri ve omik teknolojiler beklenmedik etkilerin analizinde sıklıkla tercih edilmektedir.

2.4.1. Moleküler Markırlar

Moleküler markırlar, çeşitler arasındaki genetik varyasyonun tanımlanması için faydalı araçlardır. Bitkilerde, mikrosatellit, SSR (Basit Dizi Tekrarları), ISSR (Basit Diziler Arası

Tekrarları), RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) gibi moleküler belirteçler uzun yıllardır bitki çeşitlerine özgü DNA parmak izi çalışmalarında tercih edilmiştir. Bitki çeşitlerinin karakterizasyonu, önemli tarımsal özellikler için genlerin tanımlanması ve markır destekli seleksiyon gibi çeşitli uygulamalar için başarıyla kullanılan moleküler markır teknikleri, transgenik bitkilerin analizi için de uygulanabilir. Moleküler markır teknikleri genom karşılaştırması için hızlı ve uygun maliyetli yöntemler olduklarından genetik mühendisliği yöntemleri ile geliştirilmiş genetiği değiştirilmiş bitkilerin başlangıç değerlendirmesi için kolaylıkla kullanılabilir. RAPD tekniği, spesifik ve istenen özelliklerin ve klonal varyantların tanımlanmasına odaklanan çalışmalar için uygundur. Belirli kromozomlara veya kromozomal bölgelere yönelik mutasyonlar, insersiyonlar ve delesyonlar ise RFLP aracılığıyla incelenebilir. Transgenik bitkilerin araştırmalarında kullanıma potansiyeli olan bir diğer markır tekniği de, retrotranspozon temelli markırlardır. Bu tekniğin sağlamış olduğu en büyük avantaj, retrotranspozonların geniş kromozomal dağılım göstermesinin yanı sıra genoma rastgele olarak dağılmış olmasından kaynaklanmaktadır (Kalender ve diğ., 2011).

2.4.1.1. Retrotranspozonlar ve IRAP (Retrotranspozonlar Arası Çoğaltım Polimorfizmi) Yöntemi

Transpozonlar, bitki genomlarının tümünde ancak farklı düzeylerde bulunur. Örneğin, *Zea mays* genomunun > %80'i TE'lere benzerken, *Arabidopsis* genomunun sadece %18'i TE'lere benzerdir (Sahebi ve diğ., 2018). Soyada ise TE'ler genomun yaklaşık %59'unu oluşturmaktadır. Genomdaki TE duplikasyonları yaygın olarak bitki genomunun büyüklüğünü arttıran ana mekanizmalardan biri olarak kabul edilir (Wendel ve diğ., 2016). Transpozonlar, kendilerini genom boyunca kopyalayıp/kesip yerleştirilebilen DNA dizileridir. TE'lerin transpozisyonunun bitişik genleri etkileyerek genetik özelliklerde değişikliklere yol açabileceği ve genom büyüklüğüne, organizasyonuna ve evrimine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Gregory ve diğ., 2007; Wicker ve diğ., 2007; Bennetzen ve Wang, 2014). Transpozonlar genomdaki hareket mekanizmalarına göre DNA transpozonları ve retrotranspozonlar olarak iki ana gruba ayrılırlar (Orozco-Arias, Isaza ve Guyot, 2019). DNA transpozonları kes ve yapıştır mekanizmasıyla bulundukları genomik lokasyondan başka bir lokasyona hareket ederken, retrotranspozonlar aracı bir RNA molekülünün ters transkripsiyonu ile bir kopya yaratarak başka bir bölgeye insersiyon yapar ve bulunduğu yerden çıkarılmadan transpoze edilmiş olurlar

(Feschotte, Jiang ve Wessler, 2002). Retrotranspozonlar, genlere alternatif promotörler yaratabilir, genlerin transkripsiyonu sırasında güçlendirici (enhancer) olarak görev yapabilir, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon bölgesine transpoze olarak aktivitelerini engelleyebilir, gen dizisine transpoze olarak yapısını bozabilir, transkripsiyonu erken sonlandırabilir veya baskılayabilir. Bitkilerde en çok bulunan retroelement sınıfı, uzun terminal tekrarları (LTR'ler) içeren retrotranspozonlardır. LTR-retrotranspozonları “gypsy” ve “copia” elementleri olarak iki alt sınıfa ayrılırlar. Soya genomunun yaklaşık %42'si LTR retrotranspozonlarıdır (Du ve diğ., 2010). Bitkilerde, LTR retrotranspozonları, 4 kb'den başlayan ve 30 kb'ın üzerine çıkabilen elementlerdir ve LTR bölgeleri genellikle birkaç yüz baz çiftinden 5 kb'a kadar değişir (Orozco-Arias, Isaza ve Guyot, 2019). LTR-retrotranspozonları, gag ve poliprotein (pol) genlerini şifreleyen bir veya daha fazla açık okuma çerçevesine (ORF'ler) sahiptir. Retrotranspozonların neden olduğu insersiyon polimorfizminden moleküler markır olarak pek çok çalışmada faydalanılmıştır. Genom haritalaması, filogenetik araştırmalar, gen klonlama, mutagenез, bitki ıslahı, transgenik organizmaların elde edilmesi, yatay gen transferi araştırmaları retrotranspozonların diğer yaygın kullanım alanlarından (Hou ve diğ., 2010; Paszkowski, 2015; Neumann ve diğ., 2019; Ram ve diğ., 2019).

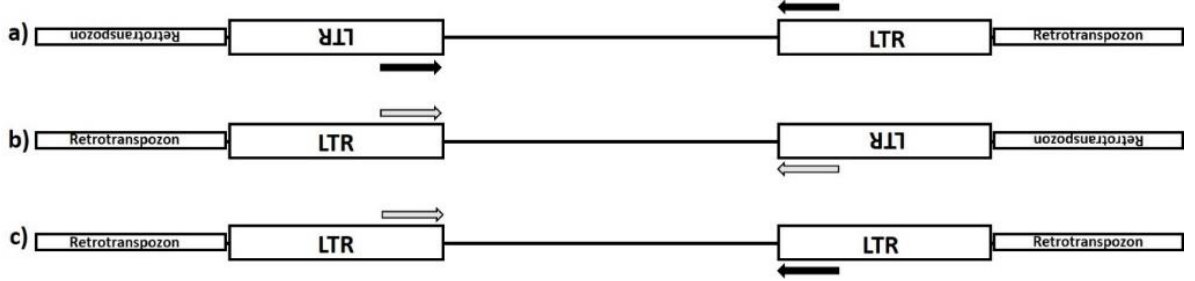
DNA dizilerinin genetik mühendisliği yöntemleriyle bitki genomuna aktarımı ile ortaya çıkan insersiyon etkisi, muhtemelen en çok “hareketli elementlerin (Transposable elements ; TE)” hareketi ile paralellik gösterir. Genetik mühendisliği yoluyla gerçekleştirilen transgen insersiyonlarına benzer şekilde, transpozonlar bir bitki geni içerisine veya yakınına insersiyon yaparak geni etkisiz hale getirebilir, anlatım düzeyini veya düzenini değiştirebilir veya o gen tarafından anlatımı yapılan RNA ve/veya proteinin doğasını değiştirebilir (Casacuberta ve Santiago, 2003). Yine genetik mühendisliği yoluyla gerçekleştirilen transgen insersiyonlarında olduğu gibi, transpozonların hareketi ile ilişkili insersiyonlar, delesyonlar ve yeniden düzenlenmeler bitki genlerinin doğasını ve / veya düzenlenmesini (regülasyonunu) değiştirebilir (Makarevitch ve diğ., 2015). Bu elementlerin bitki türleri arasındaki hareketleri rapor edilmiş olmasına karşın (El Baidouri ve diğ., 2014), genomun içindeki hareketleri çok daha yaygındır ve genetik değişime daha fazla katkı sağlamaktadır. Birçok durumda, transpozonların hareketleri bitki evriminde önemli rol oynamıştır (Lisch, 2013). Ayrıca, bitkilerin kültüre alınması veya bitkilerde çeşitlilik oluşturulması için kullanılmak üzere

tarımsal bitkilerin genomlarındaki transpozonların indüklediği çeşitli fenotipler bildirilmiştir (Vitte ve diğ., 2014).

Hareketli elementlerin transpozisyonu, çeşitli kromozomal mutasyonlara ve alelik çeşitliliğe neden olabilir ve genomun genişlemesini indüklemesi ile genom esnekliğine katkıda bulunur (Casacuberta ve diğ., 2016; Wendel ve diğ., 2016). Bu sayede genomdaki polimorfizmin artışında rol oynayan önemli etkenlerden biridir (Oliver ve Greene, 2009; Lee ve Kim, 2014). Bunun yanı sıra retrotranspozonların birçok ailesi ökaryotik organizmalarda, özellikle de tahıl bitkilerinin genomlarında çoklu kopyalarla temsil edilir. LTR retrotranspozon ailelerinin tekrarlanma sıklığı türler arasında ve hatta aynı türün çeşitleri arasında yüksek derecede değişkenlik gösterir (Vicient ve Casacuberta, 2017). Retrotranspozonların entegre kopyaları genetik olarak kalıtsaldır. Retrotranspozonların çoğu evrimsel süreçlerle etkisiz hale getirilmişse olsa da, biyotik ve abiyotik stres koşullarıyla aktive edilebildikleri bilinmektedir (Hamat-Mecbur ve diğ., 2014). *In vitro* doku kültürü uygulamaları, sıcaklık, ağır metaller gibi çevresel uyaranlar transpozisyonu tetikleyebilir (Hirochika ve diğ., 1996; Satoh-Nagasawa ve diğ., 2012; Cevrak ve diğ., 2014; Ito ve diğ., 2016; Cong ve diğ., 2019). Tüm bu nedenler, çeşitler arasındaki retrotranspozon insersiyon polimorfizmlerini DNA parmak izi çalışmalarında kullanılabilmesi için öne çıkarmaktadır. Retrotranspozonlar genom çapında dağılım göstermeleri nedeniyle de genetik markır olarak tercih edilmektedir (Kalendar ve diğ., 2011). Bu markırlardan biri, retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmidir (IRAP).

IRAP tekniği için, retrotranspozonların özel bir bölgesine primer bağlanması yeterlidir. IRAP sonuçları RAPD yöntemiyle üretilen sonuçların aksine tekrarlanabilir. Dahası, IRAP AFLP'den daha ucuz ve daha kolay uygulanabilir. IRAP tekniği, RFLP, SNP'ler, AFLP ve mikrosatellitler gibi diğer markır tekniklerine kıyasla genomdaki büyük değişiklikleri ortaya çıkarabilmek için yararlı bir tekniktir (Schulman ve diğ., 2012). IRAP yöntemi, DNA'nın iki retroelement arasındaki kısmını çoğaltarak retrotranspozonun insersiyonel polimorfizmlerini belirler. Bir LTR'den dışa dönük bir veya iki primer kullanır ve bu nedenle yakındaki iki retrotranspozonun arasındaki DNA bölgesini çoğaltır. IRAP, LTR'nin 5' veya 3' ucuyla eşleşen, ancak LTR'nin kendisinden uzağa yönlendirilmiş tek bir primer veya iki veya daha fazla primer ile gerçekleştirilebilir. İki primer aynı retrotranspozon element ailesinden veya farklı ailelerden

olabilir. Retrotranspozon temelli moleküler markır yönteminde primerlerin bağlanma durumları Şekil 2.6’da gösterilmiştir (Schulman ve diğ., 2012).



Şekil 2.6: Retrotranspozon temelli moleküler markır yönteminin işleyiş mekanizması; IRAP. a) baştan başa b) kuyruktan kuyruğa c) baştan kuyruğa. a) ve b) gösterimlerinde başarılı bir amplifikasyon için sadece tek bir primere ihtiyaç varken c) gösteriminde primer çiftine ihtiyaç vardır.

IRAP markır tekniği, DNA düzeyindeki değişiklikleri belirlemek ve populasyonlardaki farklılıkları analiz etmek için kullanılabilir (Yüzbaşıoğlu, Yılmaz ve Gözükırmızı, 2016). Polimorfizm analizinde, bantların varlığı/yokluğu, ilgili hareketli elementlerin transpozisyon aktivitesi ile bağlantılı insersiyon modellerini anlamada önemli bir rol oynar. Retrotranspozon temelli markır tekniği, IRAP, parmak izi, bağlantı analizi, haritalama ve genom değerlendirme analizi de dahil olmak üzere çeşitli genetik çeşitlilik çalışmalarında başarıyla uygulanmıştır (Kalender ve diğ., 2000; Manninen ve diğ., 2000; Bernet ve diğ., 2004; Yannic ve diğ., 2004). Birçok çalışma, IRAP markırlarının genetik varyasyonu yüksek doğrulukla değerlendirmede güvenilir ve etkili olduğunu göstermiştir (Sharma ve Nandineni, 2014; Cheraghi, Rahmani ve Hassanzadeh-Ghorttpeh, 2018). Çeltik bitkilerinde *Hobua*, *RIRE1*, *Tos17*, *Hopi*, *Osr30*, soya bitkilerinde *SIRE1*, arpa bitkilerinde *Nikita*, *Sukkula*, *Bagy2* retrotranspozonları populasyonlardaki polimorfizmin belirlenmesi için IRAP yöntemi ile analiz edilmiştir. Ayrıca *SIRE1*, *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonları transgeniklerin geleneksel karşılıkları ile karşılaştırılmasında ve genetik modifikasyonun neden olduğu beklenmedik etkilerin belirlenebilmesi için de tercih edilmiştir (Sahin ve diğ., 2020). *SIRE1*, Ty1-Copia retrotranspozon ailesinin sirevirus sınıfına ait yaklaşık 11 kb, bitkiye özgü LTR retrotranspozon'dur. Toplamda yaklaşık 10 kb büyüklükte olan ve 1520-1537 bp'lik LTR'ler içeren *Bagy2* retrotranspozonu ise ilk olarak arpada tanımlanmıştır (Shirasu, 2000). *Bagy2* 10 kb ve diğer gypsy-like elementlerine benzer şekilde düzenlenmiş protein şifreleme bölgesi içerir. *Bagy2* iç domaini GAG, proteinaz, ters transkriptaz, RNaz H ve integras domenlerini

kapsar (Vicent, 2001). *Bagy2* ayrıca aktif gibi görünen ENV domeni de içermektedir (Marakli, Yilmaz ve Gozukirmizi, 2012). Bir başka retrotranspozon *Nikita* ise poliploidlerde polimorfizmi, bitkilerde genetik çeşitliliği belirlemek, abiotik stresin neden olduğu polimorfizmi incelemek ve hibritlerin karşılaştırılması için kullanılmaktadır (Leigh ve diğ., 2003; Patel ve diğ., 2011; Bayram ve diğ., 2012; Sigmaz ve diğ., 2015).

2.4.2. Gen Anlatım Analizi

Moleküler tekniklerdeki gelişmeler, büyük miktarda genom bilgisine ihtiyaç olmaksızın ve uygun maliyetli olarak gen anlatımındaki farklılıkların analizini mümkün kılmıştır. Tek başına veya kombinasyon halinde birkaç yöntem, bitkilerde gen anlatım profillerinin analiz edilmesi için kullanılmaktadır. Bu teknikler differansiyel görüntüleme (differential display; DD), subtraktif hibridizasyon, temsili fark analizi (representational difference analysis; RDA) ve kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) olarak sıralanabilir. Bunların içerisinde qRT-PZR hassas ve yüksek özgünlükle, genlerin analizine olanak sağlarken, transgenlerin anlatım düzeylerini ölçmek için de yaygın olarak tercih edilmektedir (Matsaunyane ve Dubery, 2018). Yine transgenik bitkilerde beklenmedik etkilerin analizinde, genel bir taramadan daha çok hedef temelli yaklaşım olarak fenotipte gözlenen değişikliklerin sebebi olabilecek genlerin anlatım analizlerinde kullanılabilir.

2.4.3. Omik Teknolojiler

"Omik" teknolojileri belirli bir biyolojik örnekte genlerin (genomik), mRNA'nın (transkriptomik), proteinlerin (proteomik) ve metabolitlerin (metabolomik) geniş kapsamlı saptanmasını amaçlamaktadır. Çok büyük miktarda veri üretildiğinden dolayı omik çalışmalar istatistik ve biyoinformatik analizlerden sıklıkla yararlanır. Genomik, bir organizmanın genomunun sistematik olarak incelenmesini kapsarken, transkriptomik (gen anlatımı) çalışmalar transkriptomdaki değişiklikleri (belirli bir zaman noktasında bir hücrenin, dokunun veya organizmanın DNA transkripsiyonu ile üretilen RNA'nın tümü), proteomik çalışmalar toplam proteindeki değişiklikleri (proteom) ve metabolomik çalışmalar küçük moleküllerdeki (düşük moleküler ağırlık, <1500 Da) değişiklikleri analiz etmek için kullanılır. Omik teknolojiler, hastalıkların taraması, teşhisi, etiyolojisi, ilaçların toksisitesinin ve etkinliğinin değerlendirilmesi, kanser araştırmaları, kardiyovasküler ve obezite gibi hastalıklara karşı tedavi ve ilaç geliştirilmesi, tarımsal araştırmalar, bitki biyoteknolojisi ve sistem biyolojisine kadar geniş bir uygulama alanına sahiptir. Son 20 yıldır genetiği değiştirilmiş bitkilerin güvenlik

değerlendirmeleri için de omik teknolojilerden sıklıkla yararlanılmaktadır (Ricroch, Bergé ve Kuntz, 2011). Gıda güvenliği ile ilgili olarak, yüzlerce genin, proteinin veya metabolitin aynı anda ve profil temelli geniş ölçekli analizine izin veren teknolojiler, özellikle beklenmedik etkilerin çok daha ayrıntılı bir değerlendirmesi için potansiyel yaklaşımlar sunar. Bitkilerde beklenmedik etkileri belirlemek için mikroarray, RNAseq ve 2DE analizi gibi hedeflenmemiş profil oluşturma yöntemlerinin kullanımının, bir transgenik bitkinin geleneksel karşılığı ile “temel eşdeğerlik” kapsamında olup olmadığının belirlenmesinde etkili bir yol olduğu kanıtlanmıştır. Bitki biyoteknolojisi çalışmalarında, bu yöntemler tekrarlanabilir ve bilgilendirici bir şekilde uygulanabilir (Banerjee, Kumar ve Kumar, 2019). Mevcut risk değerlendirme süreçlerinde omik teknolojileri ve ilgili veri analizleri yeni bitki varyetesini uygun bir bitki ile karşılaştırmak (örneğin bir GD ürünü, geleneksel bir karşılığı ile) ya da yeni bitki varyetesini güvenli kabul edilen aynı türden daha büyük bir genotip seti ile karşılaştırmak üzere kullanılmaktadır (Fu ve diğ., 2019).

Genomik, yeni nesil dizileme (NGS) yöntemlerinden yararlanarak, tek nükleotid polimorfizmleri, transpozon hareketleri, insersiyonlar ve delesyonlar gibi genetik transformasyon ile meydana gelen genom varyasyonlarını belirlemek için kullanışlı bir araç haline gelmiştir. FLX, Solexa ve SOLiD gibi farklı dizileme platformları ile dizi bilgisine sahip olmadan GDO taraması ve karakterizasyonu yapılabildiği gibi insersiyon kopya sayısı ve transgenin komşu dizileri de detaylı olarak belirlenebilmektedir.

Transkriptomik çalışmalarda ise, mikroarray analizi ve RNAseq gibi dizileme teknolojileri, transgenik ve transgenik olmayan izogenik bitkiler arasındaki anlatım farklılıklarını gösteren genleri saptamak için kullanılan önemli yöntemler arasındadır (Abdeen ve diğ., 2010; Fu ve diğ., 2019). DNA mikroarray, çok sayıda genin anlatım düzeylerini aynı anda ölçmek için kullanılır ve eğer GD bitkilerin gen anlatım haritasının ebeveyn hatlarıyla karşılaştırılması sonucunda bazı önemli farklılıklar belirlenirse, bu farklılıklar beklenmedik etkilerin habercisi olabilir (Huang, 2017). Mikroarray, bir hücredeki veya dokudaki gen anlatımına genel bakış sağlar ve kullandığı dizi fragmanlarının kaynağı, genomik klonlar, EST (anlatımı yapılan dizi etiketleri) klonları veya ORF (açık okuma çerçevesi) dizileri olabilir. Bu tekniğin avantajı, aynı mikroarray üzerinde çok sayıda genin eş zamanlı analizinin yapılabilmesidir. Ek olarak, teknik örneklerin ikili olarak karşılaştırılmasına izin verir. Bu tekniğin önemli bir dezavantajı ise,

mikroarray'lerin tasarımı için doğru bir dizi veri tabanının ve ayrıca gen anlatım analizini gerçekleştirmek için de başlangıç materyali olarak büyük miktarda mRNA'nın gerekliliğidir. Yeni nesil dizilemenin ortaya çıkmasıyla geliştirilen RNAseq ise transkriptomdaki farklı RNA türlerindeki değişiklikleri analiz etmek için son yıllarda sıklıkla kullanılır ve bitki örneklerinde RNA'ların varlığı ve miktarı hakkında ayrıntılı bilgi verir. RNAseq, transkriptoma yansıyan genetik değişikliklerin ve mutasyonların belirlenmesine izin verir ve ayrıca farklı gruplar arasındaki, örneğin transgenik ve geleneksel karşılıkları, gen anlatım farklılıklarının analizlerini kolaylaştırır.

Proteomik çalışmalar, proteinlerin son ürün olması nedeniyle genetiği değiştirilmiş bitkilerde metabolizmanın anlaşılmasında ve beklenmedik etkilerin değerlendirilmesinde hayati bir rol oynar. Proteomikte kantitasyon için üç ana teknik kullanılmaktadır; kütle spektrometrisine bağlı iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE), kararlı izotop etiketleme ve kararlı-izotop etiketlemeserbest shotgun proteomik (stable-isotope labelling – free shotgun proteomics). Özellikle, kütle spektrometrisi (MS) ile birleştirilmiş iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE), transgenik ve transgenik olmayan ürünlerin karşılaştırmalı proteomik çalışmalarında önemli verilerin elde edilmesinde sıklıkla kullanılmıştır (Vidal ve diğ., 2015; Wang ve diğ., 2015; Tan ve diğ., 2017; W. Liu ve diğ., 2020). 2-DE yönteminde proteom farklılıkları jel karşılaştırmaları ile belirlenir, ancak yöntemin tekrarlanabilirliğini sağlamak, jel boyamalarının farklı etkinlikte olmasından kaçınmak ve membran proteinleri gibi analizi zor bazı protein sınıflarının analizini sağlayabilmek için özen gösterilmelidir. Alternatif bir teknik olarak shotgun proteomik, karmaşık bir protein örneğinin triptik sindirimini ve ardından sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) tekniklerini kullanarak peptit analizini içermektedir. Bu durumda, üretilen peptit sayısının yüksek olması nedeniyle örneğin artan karmaşıklığı birincil zorluktur, ancak analizi zor belirli protein sınıflarının daha iyi analiz edilebilmesi nedeniyle 2-DE ile karşılaştırıldığında verim kapasitesi daha yüksektir.

Tarımsal bitkilerin kalitesi (doku, lezzet, koku ve raf ömrü) ve besin değeri (vitaminler, antioksidanlar ve besinler) metabolit içeriğinin bir fonksiyonudur. Metabolitler gen ve protein anlatımı sürecinin ürünleri olarak biriktiği için, hücrenin aktivitesini fenotipik (fonksiyonel) düzeyde daha iyi yansıtır (Davies, 2010). Metabolomik analizler için, spektroskopi ve bir dizi analiz yöntemine (esas olarak kütle spektrometresi) bağlı yüksek çözünürlüklü

kromatografiye dayanan çok çeşitli teknolojiler kullanılmaktadır. Çoğu laboratuvar transgenik bitkilerin karşılaştırmalı analizlerinde, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, gaz kromatografisi - kütle spektrometresi (GC-MS), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografisi - kütle spektrometresi (LC-MS) kullanır. Ayrıca, LC-NMR gibi bir dizi alet ve cihazın kombinasyonları da analizlerde sıklıkla tercih edilmektedir. GC yüksek çözünürlüğe sahiptir ve bilinmeyen yapıya sahip metabolitleri ölçebilen alev iyon dedektörü (GC / FID) veya kütle spektrometresi (GC / MS) ile birlikte kullanılabilir. HPLC, bitkilere ait hedef bileşikler analiz etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir. Ayrıca NMR, çeşitli metabolitler hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Genom bilgisine büyük ölçüde dayanan transkriptomik ve proteomik analizlerin aksine, metabolomik esas olarak türden bağımsızdır ve bu da protokollerin optimizasyonunda büyük bir değişiklik olmadan çeşitli türlere uygulanabileceği anlamına gelir.

2.4.3.1. Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Proteomik Değerlendirilmesi ve 2-D Elektroforezi

Proteomik yöntemler, protein çeşitliliğini tanımlama gücü ve doğruluğu nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Gen ürünleri olarak proteinler, bitki gelişimi ve metabolizmasında belirleyici roller oynadıkları ve toksik ve alerjenik biyogüvenlik risklerinden sorumlu oldukları için, transgenik/mutant bitkiler ve geleneksel karşılıkları arasındaki istenmeyen değişiklikleri değerlendirme potansiyeline sahiptirler. Proteinler, tek nükleotid polimorfizmleri, pre-mRNA'da alternatif uç birleştirme (alternative splicing), RNA düzeltimi (editing), translasyonel çerçeve kaymaları ve atlama, translasyon sonrası modifikasyon ve proteinin proteolitik parçalanması gibi farklı mekanizmalar nedeniyle gen düzeyinde tanımlanamayan çok sayıda varyasyona veya izoforma sahiptir. Özellikle, transgenik ve transgenik olmayan ürünlerin karşılaştırmalı proteomik çalışmalarında kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmiş iki boyutlu jel elektroforezinin (2-DE) kullanılması ile önemli veriler elde edilmiştir (Barros ve diğ., 2010; Vidal ve diğ., 2015; Wang ve diğ., 2015; Tan ve diğ., 2017).

Jel elektroforezi proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrımını yapmak üzere uzun yıllar önce geliştirilmiştir (Laemmli, 1970). Daha sonra ise Gronow ve Griffiths (1971) izoelektrik odaklama (isoelectric focusing) yöntemini geliştirerek proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılabilmesini sağlamıştır. Bu iki yöntem Macgillivray ve Wood (1974)'un birleştirmesine kadar iki farklı yöntem olarak kullanılmış ancak daha sonra birleştirilmeleri ile iki boyutlu

poliakrilamid jel elektroforezi (2-DE) olarak kullanılmaya devam edilmişlerdir. Bu gelişmelerden kısa süre sonra (O'Farrell, 1975) 5000 kadar protein spotunun analiz edilmesine olanak sağlayan yüksek çözünürlüklü 2-DE elektroforez yöntemini ortaya koymuştur. 1975 yılında kullanılmaya başlanan 2-D jel elektroforezi (2-DE) analizi, protein araştırmalarında devrim yaratmıştır (Klose, 1975; O'Farrell, 1975) ve proteomik'in gelişimine yardımcı olmuştur. 2-DE yöntemi biyolojik örneklerden izolasyonu gerçekleştirilen total proteinlerin yüksek kapasitede ve verimde ayrılmasına olanak sağlayan önemli bir yöntem olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Bu yöntem, birinci boyutta proteinlerin pH gradienti altında izoelektrik noktalarına (pI) göre ayrılmasını ve ardından ikinci boyutta proteinlerin SDS Laemmli veya Tris – Trisin tamponları kullanılarak molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlamaktadır. Birinci boyutta genel olarak izoelektrik odaklama (IEF) kullanılırken, ikinci boyutta genel olarak SDS-PAGE yöntemi kullanılır. 2-DE yöntemi ile genomik ve transkriptomik olarak belirlenemeyecek post ve ko-translasyonel protein modifikasyonlarını belirlemek mümkündür. Ayrıca proteinlerin karakterizasyonu ve biyomarkırların belirlenmesi için de sıklıkla kullanılmaktadır (Rabilloud ve Lelong, 2011; Magdeldin ve diğ., 2014).

2-D jel elektroforezinin (2DE), kütle spektrometrisi (MS) veya sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS) ile kombine edilen karşılaştırmalı proteomik stratejileri, genetik modifikasyonun soya, mısır, kanola, pamuk, çeltik gibi birçok GD ürününün proteomları üzerindeki etkisini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Liu ve diğ., 2015, 2021; Wang ve diğ., 2015; Tan ve diğ., 2017; de Campos ve diğ., 2020; W. Liu ve diğ., 2020). Bu çalışmalar GD bitkilerin güvenlik değerlendirmesini ve fonksiyonel karakterizasyonunu içermektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında erken çiçeklenme özelliğine sahip Ataem-07 soya çeşidi ve bu çeşit kullanılarak geliştirilen mutant hat kullanılmıştır. Ataem-07 soya çeşidine ait tohumlar Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlanmıştır. Ataem-07 soya çeşidinden Cs-137 gama radyasyonu kaynağında 150, 200 ve 250 Gy gama radyasyonu ile ışınlama sonrası *in vitro* ve *in vivo* seleksiyonları tamamlanarak tuzluluğa ve kuraklığa toleranslı olarak geliştirilmiş M4 generasyonuna ait soya tohumları ise T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir. Transgenik ve transgenik olmayan soya çeşitlerine ait tohumlar 2013 yılında Yem Sanayicileri Derneği'nden sağlanmıştır. Temin edilen transgenik soya tohumlarının bu tez projesi kapsamında sadece araştırma amacıyla kapalı alanda (İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü GDO laboratuvarında) kullanımına dair Tarım ve Orman Bakanlığı, TAGEM'e bildirim yapılmıştır.

3.2. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ

Deneylerde kullanılan tohumlar çimlenmeleri için 14 cm çapında 17 cm yüksekliğinde saksılarda bulunan özel karışımlı Seltop marka toprağa her saksıda 1 tohum olacak şekilde ekildi. Transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri, iklim odasında optimum koşullarda 24 °C'de 500 lux led ışık altında 16 saat ışık/ 8 saat karanlık periyodunda yetiştirildi. Çimlenip 3 yapraklı aşamaya ulaşan bitkilerin yetiştirilmesine toprağa iki gün aralıklar ile eklenen Hoagland çözeltisi (Hogland, 1950) ile devam edildi. Toprakta yetiştirilen deney gruplarına ait soya bitkilerinden V5 (beşinci üçlü yaprak) evresine ulaşan bitkilerin aynı yöne bakan birinci ve ikinci üçlü yaprakları gerçekleştirilecek analizler için toplandı ve kullanılıncaya kadar -80 derin dondurucuda saklandı.

3.3. M5 (BEŞİNCİ) GENERASYONUNA AİT MUTANT VE KÖKENLENDİĞİ ATEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN TOHUMLARININ ÇOĞALTILMASI

M4 (dördüncü) generasyonundaki mutant ve kökenlendiği Ataem-07 soya çeşidine ait 25'er adet tohum 9x5 kuyucuklu ve özel karışımli Seltop marka toprak içeren viollere ekildi. Ekilen mutant tohumlardan çıkan fideler T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki bitki büyütme odası koşullarında (16 saat gün/ 8 saat karanlık periyodu, 25 °C) 17 cm çapında 16 cm derinliğinde Seltop marka özel karışımli toprak dolu saksılarda yetiştirildi. Bitkiler tohum elde edilene kadar besin çözeltisi (Hogland, 1950) ile sulandı. Çiçeklenme dönemini takiben bakla oluşumu gözlemlendiğinde, tarla koşullarında soya bitkilerine uygulanan 25 kg/dekar oranında amonyum sülfat gübresi tüm bitkilere uygulandı. Baklaların olgunlaşmasıyla birlikte tek bitki hasadı yöntemi ile tohumlar toplanarak etiketlendi.

3.4. GDO ANALİZİ

3.4.1. DNA İzolasyonu

Tez kapsamında “transgenik”, ve “transgenik olmayan” deney materyalinin tanımlanması için Yem Sanayicileri Derneği'nden elde edilen tohumlarda GDO taraması yapıldı. Soya bitkilerinin yapraklarından CTAB (setil trimetil amonyum bromid) yöntemi (Meriç ve diğ., 2014) ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. 100 mg olarak tartılan örnekler sıvı azot ve havan yardımı ile homojenize edildi. Homojenat üzerine 800 µl CTAB solüsyonu (Tablo 3.1) eklenip 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve ters düz edilerek karıştırıldı. Örnekler, 20 µl proteinaz K (20 mg/mL) (Sigma, P2308) eklenmesinin ardından 65 °C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 20 µl RNaz A (10 mg/mL) (Sigma, R4642) eklenerek karıştırılıp yeniden 65 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandığında örnekler 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarılan süpernatantın üzerine 500 µl kloroform (Sigma, C2432) eklenerek 30 saniye çalkalandı. Örnekler yeniden 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Üst fazın 500 µl'si 500 µl kloroform içeren santrifüj tüpüne aktarıldı ve çalkalandı. 16000 g hızda 5 dakika santrifüj gerçekleştirildikten sonra üst faz temiz tüplere aktarıldı. Aktarılan üst fazın üzerine hacminin iki katı (v/v) kadar CTAB çöktürme solüsyonu eklendi ve mikropipet kullanılarak karıştırıldı. Örnekler, 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 16000 g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve elde edilen pellet 350 µl 1,2 M NaCl içersinde çözöldü. Örnekler, 350 µl kloroform eklenerek

30 saniye çalkalandı ve 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Temiz tüplere aktarılan üst fazın üzerine hacminin 0,6'sı kadar (v/v) izopropanol (Sigma, I9516) eklenip çalkalandı. 16000 g hızda 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve üzerine 500 µl %70'lik (v/v) etanol (Sigma, E7023) eklendi. Karıştırılan örnekler 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. İzole edilen DNA'nın kantitatif analizi Implen NanoPhotometer NP80 cihazında 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yardımı ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların kalitatif analizi ise %0,8'lik agaroz jel elektroforezi ile (3.4.3. Elektroforetik Analiz başlığı altında anlatılacaktır) gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: CTAB yöntemi ile DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.

Solüsyonun Adı	Solüsyonun İçeriği
CTAB tamponu	20 g/l CTAB (Setiltrimetil amonyum bromür), 1,4 M NaCl (Sodyum klorür), 0,1 M Tris-HCl (Tris-Hidroklorür, Sigma, PHG0002) , 20 mM Na ₂ EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit disodyum, Sigma, E5134).
CTAB çöktürme tamponu	5 g/l CTAB (Sigma, H6269), 0.04 M NaCl
NaCl	1,2 M NaCl (Sigma, S5886)

3.4.2. GDO Taraması

GDO taraması için 35S promotörü dizilerine özgü primerler ile PZR gerçekleştirildi. PZR için P35S-cf3; 5'- CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG-3' ve P35S-cr4; 5'- TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3' primer çifti kullanıldı. Pozitif kontrol olarak 35S dizisi içeren DNA (Biotecon Diagnostics, foodproof GMO screening Kit) kullanılırken Ataem-07 genomik DNA'sı negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca kontaminasyon riskinin kontrolü için de DNA içermeyen kontrol tüpleri (NTC) hazırlandı. PZR'ler, Prima-Duo™ (HiMedia) PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PZR karışım bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.2'de, PZR reaksiyon koşulları ise Tablo 3.3'te belirtilmiştir. Çoğaltılan gen bölgesi için beklenen 123 bp büyüklüğündeki DNA bantının varlığına dayalı olarak %2'lik agaroz jel elektroforezi ile doğrulanan örnekler, ileriki aşamalarda kullanılan ve “transgenik” olarak tanımlanan, 123 bp büyüklüğündeki DNA bantını taşımayanlar ise “transgenik olmayan” olarak tanımlanan deney grubunu oluşturdu.

Tablo 3.2: 35S Promotörü / *gus* / *rolA* PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.

	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	14,5	-
10X Taq Reaksiyon Tamponu (Invitrogen, 10342053)	2,5	1 X
25 mM MgCl ₂	2,5	2,5 mM
10 mM dNTP	0,5	0,2 mM
İleri Primer (10 µM)	1	0,4 µM
Geri Primer (10 µM)	1	0,4 µM
DNA (50 ng)	2	-
1U/µL Taq DNA Polimeraz (Invitrogen, 10342053)	1	1 U/ reaksiyon
TOPLAM	25	-

Tablo 3.3: 35S promotörü / *gus** / *rolA* PZR reaksiyon koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyonu	95	300	1
Denatürasyon	95	30	35
Primer Bağlanma	56, 59*	30	
Uzama	72	30	
Son Uzama	72	600	1

* *gus* geni için primer bağlanma sıcaklığı

3.4.3. Elektroforetik Analiz

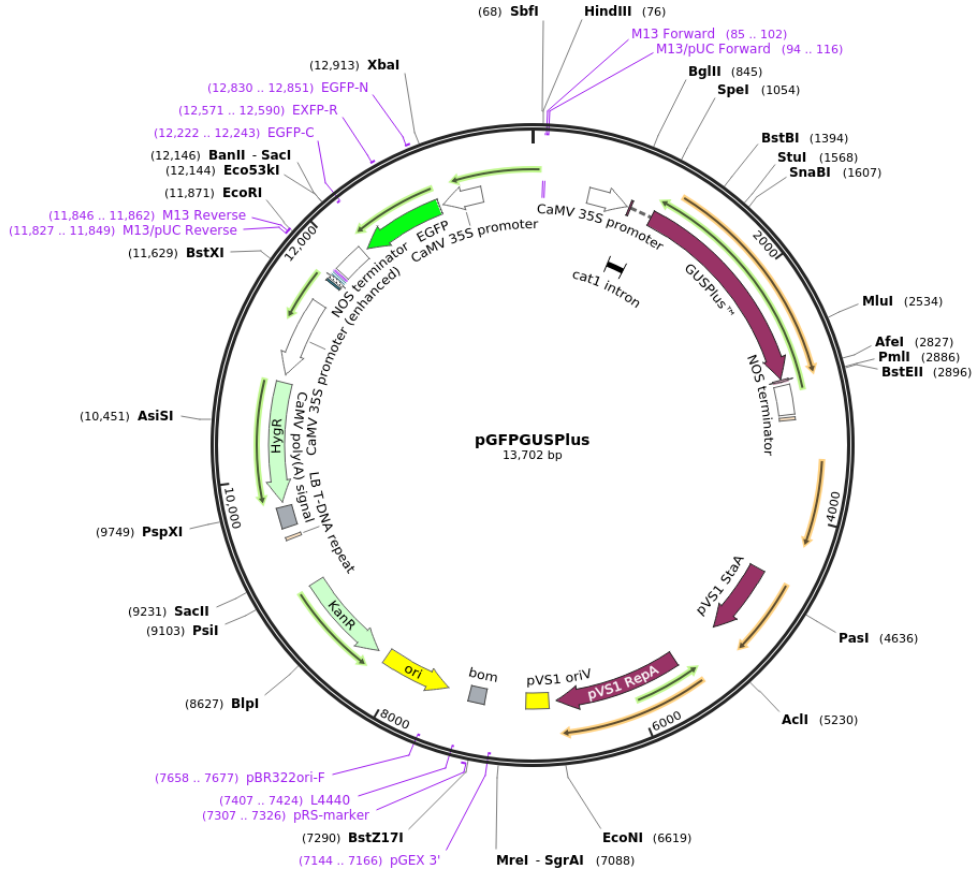
PZR ürünlerinin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezinden yararlanıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jellerde 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanılarak 80 V sabit elektrik akımında 40 dakika süreyle yürütüldü. Yürütme sonunda agaroz jeller ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) kullanılarak görüntüledi. %2'lik jel 1,6 g agarozun (Sigma, A9539) üzerine stok 50X TAE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 80 mL 1X TAE tamponunun eklenmesi ile mikrodalga kullanılarak hazırlandı. Soğutulan jele son konsantrasyonu 0.5 ng/µL olacak şekilde 4 µL Safe-t-stain (Bioshop Canada, ETB66611) eklendi. Örnekler 6 µL örneğin 1µL yükleme tamponu (ThermoFisher, R0611) ile karıştırılmasından sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklendi.

3.5. TRANSGENİK SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

İthal transgenik tohumlara ek olarak, tez çalışmasında transgenik saçak kök kültürlerinin kullanılması için *Agrobacterium rhizogenes* K599 aracılığı ile transformasyon yapıldı. Transformasyon çalışmalarında hem *E. coli* hem de *Agrobacterium rhizogenes* K599'da çoğalabilme özelliğindeki binary vektör olarak pGFPGUS+ plazmidi kullanıldı. *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ve pGFPGUS+ plazmidi (Şekil 3.1) (Vickers ve diğ., 2007) Avustralya Queensland Üniveritesi Legüm Araştırma Merkezinden temin edildi (19.09.2017).

Ataem-07 soya bitkilerine gen aktarımı için kullanılacak pGFPGUS+ plazmidinin *E. coli*'ye transformasyonu amacıyla elektroporasyon yöntemi kullanıldı. Daha sonra koloni PZR ile pGFPGUS+ plazmidini taşıdığı belirlenen *E. coli* bakterilerinden alkali lizis yöntemi ile izole edilen pGFPGUS+ plazmidinin *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşuna elektroporasyon ile transformasyonu gerçekleştirildi. Kotiledonları henüz açılmamış olan Ataem-07 çeşidi soya bitkilerinin hipokotil bölgesi pGFPGUS+ plazmidini taşıyan *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile inoküle edilerek transformasyon gerçekleştirildi.

pGFPGUS+ binary vektörün β -glukuronidaz (*uidA/gus*) ve *gfp* (green fluorescent protein) olmak üzere iki reportör geni vardır ve bunların her ikisi de konstitütif karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotörü tarafından kontrol edilmektedir. *Gus* reportör geni, glukuronidaz anlatımının ökaryotik hücrelerde sağlamak için şifreleme dizisi içinde bir katalaz intron bölgesi (cat1 intron) içerir. *Higromisin fosfotransferaz* (*hptII*) geni ayrıca T-DNA sınırları arasında konumlandırılarak pozitif transformantların higromisin ile seçimine izin vermektedir.



Şekil 3.1: pGFPGUS+ binary vektörünün haritası (Addgene, 64401).

3.5.1. Ataem-07 Çeşidi Soya Bitkilerine Gen Aktarımı İçin Kullanılacak pGFPGUS+ Plazmidinin One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* Bakterilerine Elektroporasyon İle Transformasyonu

Gen aktarım çalışmaları için One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterileri kullanıldı. Çalışmaların bu bölümünde pGFPGUS+ plazmidinin One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterilerine elektroporasyon ile aktararak çoğaltılması ve alkali lizis yöntemi ile izole edilerek saklanması hedeflenmiştir.

3.5.1.1. *pGFPGUS+ Plazmidinin Electrocomp™ E. coli Bakterilerine Elektroporasyon İle Transformasyonu*

Transformasyon için gerekli işlemler aşağıda sıralandığı şekilde yapıldı.

- 1- 1 mL'lik tüp içerisindeki One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterileri (Invitrogen, C404052) buz içerisinde çözündürüldü.
- 2- Bakterilerin bulunduğu tüpe 1 µl'lik (30 ng) pGFPGUS+ plazmidinden eklendi ve pipet ucu ile pipetaj yapmadan karıştırıldı.
- 3- Karışım, 30 d buz içerisinde bekletilmiş elektroporasyon küvetlerine (Bio-Rad, 0,1 cm, 1652089) nazik bir biçimde aktarıldı.
- 4- Küvet Bio-Rad Mikropulser cihazının (Bio-Rad, 165-2100) içerisine yerleştirildi ve 1,80 kV, 1 pulse elektroporasyon koşullarında uygulama gerçekleştirildi.
- 5- Uygulama sonrası bakterilerin üzerine gecikme olmaksızın 250 µl SOC besiyeri eklenerek nazik bir biçimde karışmaları sağlandı.
- 6- Karışım 15 mL'lik kapaklı tüplere (Falcon) aktarılarak plazmid içerisindeki antibiyotik direnç geninin anlatımı için 120 d 37 °C'de çalkalamalı etüv (New Brunswick Excella E25) içerisinde inkübasyona bırakıldı.
- 7- İnkübasyon sonrası bakteriler 100 µl olarak 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerlerine yayma yöntemi ile ekildi.
- 8- Deneyin pozitif kontrolü olarak pUC19 plazmidi kullanıldı ve aynı basamaklar kontrol grubu içinde aynı şekilde uygulanarak transformasyon şartları kontrol edildi.

LB besiyeri hazırlamak için 10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g NaCl bir miktar suyun içerisinde çözündürüldü ve 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlandı. LB agar için ise aynı bileşime ek olarak 15 g agar eklendi ve çözelti 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

Çalışmada kullanılan SOC besiyeri için öncelikle SOB besiyeri hazırlandı. SOB besiyeri hazırlamak için 20 g tripton, 5 g maya özütü, 0,5 g NaCl, 2,5 mL 1 M KCl bir miktar suyun içerisinde çözündürülmüş ve 10 M NaOH ile pH 7'ye ayarlandı. Solüsyon otoklavlandıktan sonra üzerine filtreden geçirilerek steril edilmiş 10 mL hacimde 1 M MgCl₂ eklendi ve son hacim 1 litreye tamamlandı. SOC besiyeri hazırlamak için ise SOB besiyerindeki bileşenlere ek olarak filtreden geçirilerek steril edilmiş 20 mL hacimde 1 M glukoz solüsyona eklendi ve son hacim 1 litreye tamamlandı. TB tamponu hazırlamak için 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂,

250 mM KCl karıştırılarak pH 6,7 olarak ayarlandı. Daha sonra 55 mM MnCL₂ eklenerek solüsyon 0,45 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Solüsyon kullanılana kadar 4°C’de saklandı.

3.5.1.2. Transformasyonun Koloni PZR İle Doğrulanması

Elektroporasyon sonrası LB agar besiyerinde üreyen koloniler ile gfp primerleri kullanılarak koloni PZR gerçekleştirildi ve pGFPGUS+ plazmidini taşıyan One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* kolonileri belirlendi. Bu amaçla yapılan işlemler aşağıda sırasıyla verildi.

- 1- 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerlerinde gelişen en az 8 koloni markır kalemi ile işaretlenerek numaralandırıldı.
- 2- Her bir koloniden 10 µL’lik mikropipet ucu yardımı ile bir miktar alınarak PZR tüpü içerisinde 20 µL’lik steril dH₂O ile çözündürüldü.
- 3- Süspansiyonlar 10 d boyunca 80 °C’de Prima-Duo™ (HiMedia) PZR cihazında bekletildi.
- 4- 20 sn santrifüj edildikten sonra üst faz PZR reaksiyonu için kullanıldı.

Koloni PZR için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları, reaksiyon koşulları ve primerler Tablo 3.4, 3.5 ve 3.6’da verilmiştir. PZR sonucu çoğaltılan DNA’ların görüntülenmesi için “3.4.3 Elektroforetik Analiz” başlığı altında anlatıldığı gibi agaroz jel elektroforezi analizi yapıldı.

Tablo 3.4: Koloni PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.

	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	14,3	-
10X Taq Reaksiyon Tamponu (Invitrogen, 10342053)	2,5	1 X
25 mM MgCl ₂	2,5	2,5 mM
10 mM dNTP	0,5	0,2 mM
İleri Primer (10 µM)	1	0,4 µM
Geri Primer (10 µM)	1	0,4 µM
Bakteri Süspansiyonu	3	-
5U/µL Taq DNA Polimeraz (Invitrogen, 10342053)	0,2	1 U/ reaksiyon
TOPLAM	25	-

Tablo 3.5: Koloni PZR reaksiyon koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyonu	95	300	1
Denatürasyon	95	30	35
Primer Bağlanma	59	30	
Uzama	72	45	
Son Uzama	72	600	1

Tablo 3.6: Kullanılan koloni PZR primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.

Primer	Primer Dizisi	T _m Sıcaklığı (°C)
gfp F	5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAGCG-3'	59
gfp R	5'-TCGTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'	59

3.5.1.3. *E. coli One Shot™ TOP10 Electrocomp™* Bakterilerinden Alkali Lizis Yöntemi İle pGFPGUS+ Plazmidinin İzolasyonu

pGFPGUS+ plazmidinin izolasyonu için aşağıda verilen işlem basamakları uygulandı.

1. 15 ml 50 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerinde 0,6 OD olarak üretilen *E. coli* kültürü 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Bakteriler maksimum hızda 5 dakika santrifüjlendi. Üst faz döküldü ve basamak iki kez daha tekrar edildi.
 2. Mikrosantrifüj tüpüne 200 µl hücre süspansiyon tamponu eklendi ve içerik pipetaj ile karıştırıldıktan sonra buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
 3. Karışımın üzerine 200 µl lizis tamponu eklendi ve mikrosantrifüj tüpü 4-5 kez hafifçe alt üst edilerek karıştırıldı.
 4. Karışımın üzerine 200 µl nötralizasyon tamponu eklendi ve mikrosantrifüj tüpü 4-5 kez hafifçe alt üst edilerek karıştırıldı.
 5. Mikrosantrifüj tüpü daha sonra 10 dakika 7500 g hızda santrifüj edildi.
 6. Üst faz 1,5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
 7. Üst faza 0,8 hacim izopropanol eklendi ve mikrosantrifüj tüpü alt üst edilerek karıştırıldı.
 8. Örnek 15 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi.
 9. Santrifüjden sonra süpernatant döküldü ve oluşan pellete 300 µl %70 etanol eklendi. Tüp maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi.
 10. Üst faz döküldükten sonra fazla alkol buharlaştırıldı.
 11. Alkolün tamamı buharlaştıktan sonra, pellete 50 µl TE tamponu eklendi.
- Hücre süspansiyon tamponu: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNaz A
 Lizis tamponu: 0,2 M NaOH; %1 (w/v) SDS (Sigma marka, 436143)
 Nötralizasyon tamponu: 3 M Potasyum asetat (Sigma marka, P1190), pH 5,5
 TE tamponu: 10 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1 mM EDTA

3.5.2. pGFPGUS+ Plazmidinin Elektrokompotent *Agrobacterium rhizogenes* K599 Suşuna Elektroporasyon İle Transformasyonu

Ataem-07 çeşidi soya bitkilerine gen aktarımı için aracı olarak kullanılacak *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşunun binary vektör pGFPGUS+ plazmidi ile transformasyonu gerçekleştirildi. Öncelikle *E. coli* One Shot™ TOP10 Electrocomp™ bakterilerine aktarılan pGFPGUS+ plazmidi, bakterilerde çoğaltıldıktan sonra alkali lizis yöntemi ile izole edildi. Daha sonra *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşuna ait bakteriler YMB (Yeast mannitol broth)

besiyerinde kültüre alındı ve elektrokompotent hale getirildi. Transformasyon yöntemi olarak elektroporasyon kullanıldı. YMB besiyerinin hazırlanmasında 1000 ml distile suda 12,8 gram YMB besiyeri (HiMedia, M716) süspanse edildi. 100 ml'lik erlenlere dağıtılan besiyeri 1 atm basınç, 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edildi.

3.5.2.1. *Agrobacterium rhizogenes* K599 Suşu Bakterilerinden Elektroporasyon İçin Yeterli Hücre Oluşturulması

Bu amaçla yapılan işlemler sırasıyla aşağıda verildi.

- 1- YMA (Yeast Mannitol Agar) besiyerinde üretilen taze *Agrobacterium rhizogenes* kültüründen 8-10 tane büyük koloni alınarak 1 mL YMB (Yeast Mannitol Broth) besiyerinde 28 °C'de, 225 devir/dakikada çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Excella E25) OD600: 0,6 olana kadar üretildi.
- 2- Kültür 10 dakika buzda tutuldu.
- 3- 4 °C'de, 3000 devir/dakika hızda, 10 dakikada santrifüjleme yapıldı.
- 4- Oluşan pellet üzerine 80 mL soğuk TB tamponu eklenip 10 dakika buzda bekletildi.
- 5- 4 °C'de, 3000 devir/dakika hızda, 10 dakika santrifüjleme yapıldı.
- 6- Pellet üzerine 20 mL soğuk TB tamponu eklenip yavaşça süspanse edildi ve 10 dakika buzda tutuldu.
- 7- Hücre süpsansiyonu küçük hacimlere bölünüp sıvı azotta şok dondurma yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.
- 8- 200 µL hücre süpsansiyonları ile transformasyon gerçekleştirildi.

3.5.2.2. *pGFPGUS+* Plazmidinin *Agrobacterium rhizogenes* K599 Suşuna Elektroporasyon İle Transformasyonu

pGFPGUS+ plazmidinin elektrokompotent *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşuna elektroporasyon ile transformasyonu gerçekleştirildi. Yapılan işlemler sırasıyla aşağıda verildi.

- 1- 1 mL'lik santrifüj tüpü içerisindeki elektrokompotent bakteriler buz içerisinde çözündürüldü.
- 2- Bakterilerin bulunduğu tüpe 1 µL'lik (30 ng) *pGFPGUS+* plazmidinden eklendi ve pipet ucu ile pipetaj yapmadan karıştırıldı.
- 3- Karışım, 30 d buz içerisinde bekletilmiş elektroporasyon küvetlerine (Bio-Rad, 0,1 cm, 1652089) nazik bir biçimde aktarıldı.

- 4- Küvet Bio-Rad Mikropulser cihazının (Bio-Rad, 165-2100) içerisine yerleştirilmiş ve 2,2 kV, 1 pulse elektroporasyon koşullarında uygulama gerçekleştirildi.
- 5- Uygulama sonrası bakterilerin üzerine gecikme olmaksızın 250 µL YMB besiyeri eklenerek nazik bir biçimde karışmaları sağlandı.
- 6- Karışım 15 mL'lik kapaklı tüplere (Falcon) aktararak plazmid içerisindeki antibiyotik direnç geninin anlatımı için 120 d 28 °C'de çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Excella E25) inkübasyona bırakıldı.
- 7- İnkübasyon sonrası bakteriler 100 µL olarak 50 µg/mL kanamisin ve rifampisin içeren YMA besiyerlerine yayma yöntemi ile ekildi.
- 8- Deneyin pozitif kontrolü olarak pUC19 plazmidi kullanılmış ve aynı basamaklar kontrol grubu içinde aynı şekilde uygulanarak transformasyon şartları kontrol edildi.

3.5.2.3. Transformasyonun Koloni PZR İle Doğrulanması

Elektroporasyon sonrası YM agar besiyerinde üreyen kolonilerden gerçekleştirilen koloni PZR ile pGFPUS+ plazmidini taşıyan *Agrobacterium rhizogenes* K599 kolonileri belirlendi. İşlem basamakları “3.5.2. Transformasyonun Koloni PZR İle Doğrulanması” başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.5.3. Ataem-07 Çeşidi Soya Bitkilerinin *Agrobacterium rhizogenes* K599 Suşu İle Enfeksiyonu

Ataem-07 çeşidi soya bitkilerinden transgenik saçak köklerin elde edilebilmesi amacıyla, yaklaşık 6-7 cm boyunda kotiledonları açılmamış fidelerin hipokotil bölgelerine *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile inokülasyonu gerçekleştirildi. İşlem basamakları aşağıda maddeler halinde verildi.

- 1- Bitkiler transgenik köklerin elde edilebilmesi için nem oranının korunabildiği kapaklı ve şeffaf Magenda kaplarında yetiştirildi. Çimlendirmeden önce, mikrobiyal kontaminasyonun engellenmesi için tohumlar steril edildi. Sterilizasyon için tohumlar, %70'lik etanolde 1 dakika, %20'lik ticari çamaşır suyunda 20 dakika karıştırılarak bekletildi. Çamaşır suyu kalıntılarının uzaklaştırılması için ardışık 3 steril distile su yıkamasından geçirilen tohumlar fazla suyun uzaklaştırılması için kurutma kağıtlarında bekletildi .
- 2- Steril tohumlar, içlerine 1-2 cm derinliğinde perlit (Genper marka) konduktan sonra otoklav ile steril edilmiş Magenda kaplarına ekildi. Magendalar 28 °C'de bitki büyütme kabinine

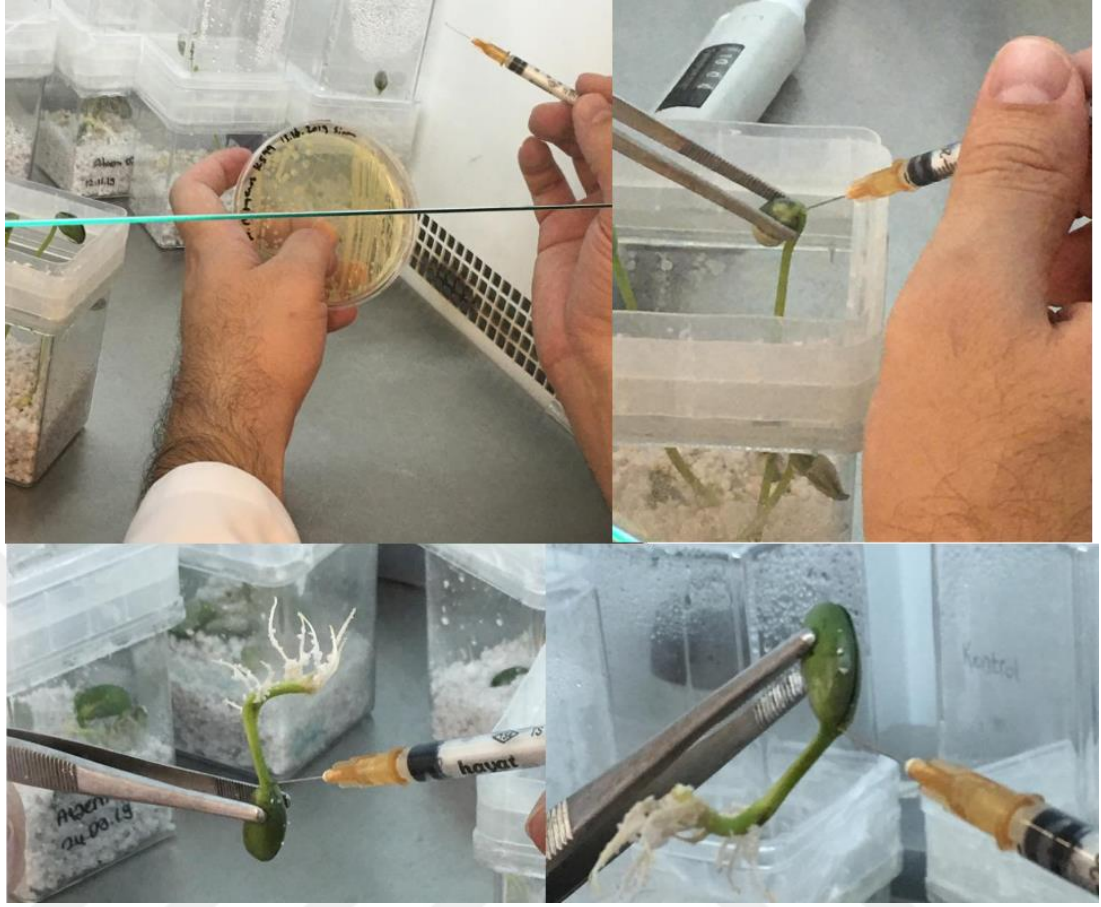
(Nüve, GC400) yerleştirilerek 3 gün ara ile 5 ml B&D (Tablo 3.7) (Broughton ve Dilworth, 1971) solüsyon ile sulandı.

3- Tohumların ekiminin gerçekleştirildiği gün yabani tip *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu uygun antibiyotik içeren (rifampicin, 50 µg/ml) YMB besiyerine ekildi ve 28 °C’de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Üreyen bakteriler uygun antibiyotik içeren YMA besiyerine azaltma yöntemi ile öze yardımı ile ekilerek 28 °C’de 3 gün inkübasyona bırakıldı. Oluşan tek koloniler taze besiyerlerine alındı. 2. Aşamada ekilen tohumların inkübasyonunun 7. Gününde kotiledonları açılmamış fidecikler gen aktarım uygulaması için seçildi. Uygulama için koyu yeşil bitkicikler kullanıldı.

4- 3. Aşamada elde edilen kolonilerin, steril koşullar altında fideciklerin kotiledon nod bölgesine enjektör yardımı ile inokülasyonları gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Transformasyon etkinliğinin düşmemesi için kotiledona yakın bölgeler seçildi ve enjektörün hipokotilin merkez bölgesine batırılmasına özen gösterildi. Enjektörün batırıldığı bölgeye birkaç defa daha bakteri kolonilerinden inokülasyon gerçekleştirildi.

5- Saçak köklerin oluşması ve gelişmesi için yüksek nem oranının sağlanmasına yönelik Magenda kaplarının etrafı parafilm ile sıkıca sarıldı. Bitkiler saçak kök oluşumu için 16 sa aydınlık / 8 sa karanlık döngüsünde 28 °C’de bitki büyütme kabininde 2 hafta kadar tutuldu. Bu zaman içerisinde steril B&D solüsyon ile sulamalara geçilerek saçak kök gelişimleri desteklendi.

6- Saçak kökler 5-10 cm uzunluğuna ulaştığında MS (Murashige and Skoog) vitamin içeren sıvı MS besiyerlerine aktararak gelişimleri 21 gün süreyle takip edildi. Gelişimi devam eden saçak köklerin yeni besiyerlerine alınması ile alt kültürleri yapıldı.



Şekil 3.2: Ataem-07 soya bitkisinin *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile enfeksiyonu.

MS (Murashige ve Skoog) Besiyerinin hazırlanması;

- 1- Erlen içerisinde 400 ml distile suya 4,4 MS (Duchefa, M0221) tuz karışımı eklendi. Erlen tuz karışımı tamamen eriyene kadar sürekli ve hafifçe karıştırıldı.
- 2- Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra, 1N NaOH/HCL kullanılarak ortamın pH'sı 5,75 olarak ayarlandı.
- 3- Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Soğutulmuş besiyerine 1 mg/L son konsantrasyonunda MS vitamin eklendi.

Tablo 3.7: B&D (Broughton&Dilworth) besin solüsyonu içeriği.

Stok	Kimyasal Adı	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Stok Konsantrasyonu (mM)	1 L Solüsyon İçin Alınan Stok Miktarı (µL)
A	CaCl ₂	110,98	2000	500
B	KH ₂ PO ₄	136,086	1000	500
C	Fe-Sitrat	244,94	20	500
D	MgSO ₄	120,36	500	500
	K ₂ SO ₄	174,26	500	
	MnSO ₄	151,00	2 mM	
	H ₃ BO ₄	77,83	4 mM	
	ZnSO ₄	161,44	1 mM	
	CuSO ₄	159,60	4 mM	
	CoSO ₄	154,99	0,2 mM	
	Na ₂ MoO ₄	205,92	0,2 mM	

3.5.4. Saçak Köklerde *Gus* dizilerinin PZR İle Belirlenmesi

MS besiyerinde gelişimini sürdüren saçak köklerin transgenik olup olmadığını saptamak için *gus* (Bkz. Şekil 3.1) dizilerine özgü primerler ile PZR gerçekleştirildi. PZR için Tablo 3.8’de belirtilen *gus* primer çifti kullanıldı. Pozitif kontrol olarak 5 ng pGFP_{GUS}+ plazmid DNA’sı kullanılırken binary vektör içermeyen *A. rhizogenes* K599 tarafından indüklenen saçak köklerin genomik DNA’sı negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca kontaminasyon riskinin kontrolü için de DNA içermeyen kontrol tüpleri (NTC) kullanıldı. PZR karışım bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.2’de, PZR reaksiyon koşulları ise Tablo 3.3’te belirtildi. Çoğaltılan gen bölgesi için beklenen büyüklükteki ürünler %2’lik agaroz jel elektroforezi (Bkz. 3.5.2) ile doğrulandı.

Tablo 3.8: *gus* PZR primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.

Primer	Primer Dizisi	T _m Sıcaklığı (°C)
<i>gus</i> F	5'- GATGATAGTTACAGAACCGACG -3'	59
<i>gus</i> R	5'- CATTCGGAATCTCCACGTTAC -3'	59

3.5.5. Saçak Köklerde *rolA* dizilerinin PZR İle Belirlenmesi

Saçak köklerin transgenik olup olmadığını saptamak için *gus* PZR kontrolünün yanında, ayrıca *rolA* gen dizilerine özgü primerler ile de PZR gerçekleştirildi. PZR için Tablo 3.9’da belirtilen *rolA* primer çifti kullanıldı. Ataem-07 saçak köklerinin genomik DNA’sı negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca kontaminasyon riskinin kontrolü için de DNA içermeyen kontrol tüpleri (NTC) kullanıldı. PZR karışım bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.2’de, PZR reaksiyon koşulları ise Tablo 3.3’de belirtildi. Çoğaltılan gen bölgesi için beklenen büyüklükteki ürünler %2’lik agaroz jel elektroforezi ile (Bkz. 3.5.2) doğrulandı.

Tablo 3.9: *rolA* PZR primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.

Primer	Primer Dizisi	T _m Sıcaklığı (°C)
<i>rolA</i>	5’ - AGGATGGAACTAGCCGGAAT-3’	59
<i>rolA</i>	5’ - CAAGCTCTGCAATTTGGTCA-3’	59

3.6. IRAP (RETROTRANSPONONLAR ARASI ÇOĞALTIM POLİMORFİZMİ) PZR YÖNTEMİ

Transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkilerinin kök örnekleri ile Ataem-07 çeşidinden *Agrobacterium rhizogenes* aracılığı ile indüklenmiş transgenik saçak kök örnekleri IRAP yöntemi ile karşılaştırıldı.

3.6.1. Köklerden Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu kolon sistemi kullanan DNA izolasyon kiti (Qiagen marka, DNeasy® Plant Mini Kit 69104) ile gerçekleştirildi. İzolasyon, transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkilerinin kök örneklerinden ve Ataem-07 çeşidinden *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu aracılığı ile elde edilmiş transgenik saçak kök örneklerinden 300 mg kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan işlem basamakları aşağıda verildi.

1. Kök örnekleri sıvı azot kullanılarak havan ve havan eli yardımı ile ezildi.
2. Örneklerin üzerine 400 µl kit içeriğinde bulunan AP1 tamponu ve 4 µl RNaz A (100 mg/ml) eklendi. Örnekler 65°C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında tüpler 2-3 kez ters-düz edildi.

3. Örneklerin üzerine 130 µl kit içeriğinde bulunan P3 tamponu eklendi. Örnekler karıştırıldıktan sonra 5 dakika buzun üzerinde inkübe edildi.
4. Lizat 20000 x g'de (14000 rpm) 5 dakika santrifüjlendi.
5. Lizat 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilen kit içeriğinde bulunan QIAshredder kolonuna aktarıldı ve 20000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi.
6. Pellete dokunmadan üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1,5 kat kit içeriğinde bulunan AW1 solüsyonu eklendi. Alt üst edilerek karıştırıldı.
7. Karışımın 650 µl'sini 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş kit içeriğinde bulunan DNeasy Mini kolonuna aktarıldı. ≥ 6000 x g'de (≥ 8000 rpm) 1 dakika santrifüjlendikten sonra santrifüj tüpüne akan sıvı atıldı ve basamak tekrar edildi.
8. Kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µl kit içeriğinde bulunan AW2 tamponu eklendi ve ≥ 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj tüpüne akan sıvı atıldı ve basamak tekrar edildi.
9. Örnekler 20000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi ve spin kolonu yeni bir 1,5 ml veya 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11. Elüsyon için 50 µl kit içeriğinde bulunan Buffer AE eklendi ve oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika inkübe edildi. ≥ 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi.

İzole edilen DNA'nın kantitatif analizi Implen NanoPhotometer NP80 cihazında 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yardımı ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'ların kalitatif analizi ise %0,8'lik agaroz jel elektroforezi (Bkz. 3.4.3. Elektroforetik Analiz) ile gerçekleştirildi.

3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Koşulları

Transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkilerinin kökleri (Ataem-07) ile Ataem-07 çeşidinden *Agrobacterium rhizogenes* aracılığı ile üretilen transgenik saçak köklerinde retrotranspozon temelli polimorfizmi göstermek için moleküler markır tekniklerinden olan IRAP kullanıldı. IRAP-PZR, Bioline marka MyFi™ DNA Polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.10'te gösterildi. PZR reaksiyonları Prima-Duo™ (HiMedia) PZR cihazı kullanılarak Tablo 3.11'de belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi. Kullanılan primerler ve bu primerlere ait bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.12'de sunulmuştur.

Tablo 3.10: PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.

	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	17,5	-
5X MyFi Reaksiyon Tamponu (5 mM dNTPs + 15 mM MgCl ₂)	5	1 X
DNA (30ng)	1	1,2 ng/ µL
Primer (10 µM)	1	0,4 µM
Myfi DNA Polimeraz (2U)	0,5	1 U/ reaksiyon
TOPLAM	25	-

Tablo 3.11: PZR reaksiyon koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyonu	95	60	1
Denatürasyon	95	30	
Primer Bağlanma	55	30	40
Uzama	72	150	
Son Uzama	72	600	1

Tablo 3.12: Kullanılan IRAP primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.

Primer	Primer Dizisi	T _m Sıcaklığı (°C)
Nikita	5'-CGCATTTTGTTC AAGCCTAAACC-3'	54
Bagy2F	5'-TCGAAAGGTCTATGATTGATCCC-3'	54
Bagy2R	5'-CATGAAAGCATGATGCAAAATGG-3'	54

3.6.3. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

IRAP primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarının ürünleri %1,8'lik agaroz jellerde 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanılarak 80 V sabit elektrik akımında 3 saat süreyle yürütüldü. Yürütme sonunda agaroz jeller ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) kullanılarak görüntüldü. %1,8'lik jel 1,44 g agarozun (Sigma, A9539) üzerine stok 50X TAE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 80 mL 1X TAE tamponunun eklenmesi ile mikrodalga kullanılarak hazırlandı. Soğutulan jele son konsantrasyonu 0,5 ng/µL olacak şekilde 4 µL Safe-t-stain (Bioshop Canada, ETB66611) eklendi. Örnekler 6 µL örneğin 1µL yükleme tamponu (ThermoFisher, R0611) ile karıştırılmasından sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklendi.

3.6.4. IRAP Bant Analizi ve Genetik Benzerliklerin Belirlenmesi

IRAP primerleri ile gerçekleştirilen PZR uygulamalarında tekrarlı olarak elde edilen bantlar her bir jelde, 1 ve 0 olarak kayıt edildi. ‘1’ bantın varlığını ‘0’ ise bantın yokluğunu göstermektedir. D-UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.php>) genetik analiz programı kullanılarak transgenik (GD), mutant, Ataem-07 ve Ataem-07’den elde edilmiş transgenik saçak köklere ait agaroz jel fotoğraflarından elde edilen binary veri ile her bir retrotranspozon elementi için dendrogram, benzerlik matrisi ve uzaklık matrisi oluşturuldu. Program bir benzerlik matrisi hesaplayarak, benzerlik katsayılarını mesafelere dönüştürmekte ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritmasını kullanarak bir kümeleme yapmaktadır. Jaccard katsayısı, değişken kümeler (sets of variables) arasında karşılaştırma yapmak için kullanıldı.

3.7. TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 BİTKİLERİNDE BÜYÜME VE GELİŞİME AİT GENLERİN ANLATIM FARKLARININ ANALİZİ

Deney grupları arasında fide boyu ve çiçeklenme zamanı bakımından belirgin farklılıklar gözlemlendiğinden, gen anlatım analizleri için büyüme ve gelişimle ilişkili *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc* ve *siz1a* genleri seçildi. Transgenik ile transgenik olmayan ve mutant ile Ataem-07 bitkilerinde *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc* ve *siz1a* genlerinin anlatım farklılıklarının analizi karşılaştırmalı olarak gerçekleştirildi.

3.7.1. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 bitkilerine ait yapraklardan 100 mg kullanılarak, TRIzol™ Reagent (Invitrogen, 15596026) ile gerçekleştirildi. RNA izolasyonunda kullanılacak havan ve havan elleri etüvde 180 °C sıcaklıkta 180 d bekletilerek RNaz kontaminasyonundan arındırıldı. İzolasyon sırasında nükleaz içermeyen pipet uçları ve santrifüj tüpleri kullanıldı. Çalışmanın gerçekleştirileceği alan içerisindeki yüzeyler ve pipetler RNaz kontaminasyonunu engellemek için RNaseZap™ dekontaminasyon solüsyonu (Invitrogen, AM9780) kullanılarak temizlendi.

- 1- Sıvı azot yardımı ile havan ve havan eli kullanılarak homojenize edilen 100 mg örnek 2 mL hacminde mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve donan örneğin çözünmesine izin vermeden üzerine 1 mL TRIzol Reagent eklendi.
 - 2- Nükleoprotein kompleksinin tamamen çözülebilmesi için örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
 - 3- Lizis için kullanılan her 1 mL TRIzol için 0,2 mL kloroform (Merck marka, 288306) eklenen tüpler 20 sn kadar alt-üst edilerek karıştırıldı.
 - 4- Oda sıcaklığında 3-5 d kadar inkübe edilen örnekler +4 °C'de 12000 g hızda 15 d santrifüj edildi. Bu aşamada karışım, kırmızı fenol-kloroform alt faz (organik faz), ara faz ve renksiz sıvı üst faz olmak üzere 3 faza ayrıldı.
 - 5- RNA içeren renksiz üst faz pipet yardımı ile 45 °C'lik bir açılı ile 2 mL hacminde yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu aşamada organik faz veya ara fazın yeni tüpe aktarılmasına dikkat edildi.
 - 6- Üst fazın üzerine 0,5 mL izopropanol (Merck marka, 109634) eklendi ve yavaş bir biçimde alt-üst edilerek karıştırıldı.
 - 7- Örnekler +4 °C'de 10 d inkübe edildi.
 - 8- +4 °C'de 12000 g hızda 10 dakika santrifüj edilen örneklerde oluşan pellete dokunmadan üst faz uzaklaştırıldı.
 - 9- Pellet 1 mL %75 etanol (Merck marka, 100983) içerisinde yavaş bir biçimde çözündürüldü.
 - 10- +4 °C'de 7500 g hızda 5 d boyunca santrifüj edilen örneklerden üst faz uzaklaştırıldı ve RNA pelletleri 5-10 d kadar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
 - 11- Son olarak pelletler 40 µL RNaz içermeyen su ile çözündürüldü.
- İzole edilen DNA'nın kantitatif analizi Implen NanoPhotometer NP80 cihazında 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yardımı ile gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların kalitatif analizi ise %1,2'lik agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi.

3.7.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi ve Bio-Rad iScript cDNA sentez kiti (170-8891) kullanıldı. Reaksiyon bileşenlerinin karışımı ve reaksiyon koşulları üretici firma prosedürüne uygun bir şekilde Tablo 3.13 ve Tablo 3.14'te gösterildi.

Tablo 3.13: cDNA sentezi reaksiyon karışımı bileşenleri ve hacimleri.

Bileşen	Reaksiyon Hacmi (µL)
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Reverse Transkriptaz	1
Nükleaz içermeyen su	13
RNA (500 ng)	2
Toplam Hacim	20

Tablo 3.14: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre (d)
Primer bağlanması	25 °C	5
Reverse transkripsiyon	46 °C	20
RT inaktivasyon	95 °C	1
	4 °C	∞

Sentez edilen cDNA'lar ileri analizlere kadar -20'de saklandı. Belirlenen gen bölgelerine ait primerler primer3plus (<https://primer3plus.com/>) ile tasarlandı ve HPLC düzeyinde saflaştırılmış spesifik primerler sentezletirildi (Tablo 3.15).

3.7.3. qRT-PZR Analizleri

Dt1, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc* ve *siz1a* genlerinin transgenik ve mutant bitkilerdeki anlatım profilleri kantitatif-RT-PZR (qRT-PZR) yöntemi ile belirlendi ve sırasıyla transgenik olmayan ve Ataem-07 bitkilerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Kantitatif-RT-PZR, iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, 170-8880) reaksiyon karışımı kullanılarak üretici firma prosedürüne uygun olarak CFX Connect Real-Time PZR (Bio-Rad, 1855200) sisteminde gerçekleştirildi (Tablo 3.16 ve Tablo 3.17). *Elf1b* geninin referans gen olarak kullanılmasıyla normalizasyon gerçekleştirildi ve hedef genlerin anlatım düzeylerindeki değişimler rölatif olarak “delta-delta Ct” yöntemine göre belirlendi (Pfaffl, 2001). Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.15: Kullanılan qRT-PZR primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.

Primer	Primer Dizisi	T _m Sıcaklığı (°C)
Elf1b	F: 5'-GTTGAAAAGCCAGGGGACA-3'	57 °C
	R: 5'-TCTTACCCCTTGAGCGTGG-3'	
Dt1 (tfl1)	F: 5'-TGAGAGAGCACTTGCACTGG-3'	57 °C
	R: 5'-GTCCCTTGAAGTGGGTGGAG-3'	
Luxb	F: 5'-TCACAAGAGGTTCTGTGGACG-3'	57 °C
	R: 5'-ACTGGGAGGAGCAGAGTCAT-3'	
Luxc	F: 5'-AATGTCGCAAGCCATCTCCA-3'	57 °C
	R: 5'-ACTGGGAGGAGCAGAGTCAT-3'	
Sız1a	F: 5'-GGTGTTCTGTTCGTGCAAC-3'	60 °C
	R: 5'-TGCGAGCATCACATCCTGTT-3'	
	R: 5'-GTATCGGACTGCCCATCCTG-3'	
E1	F: 5'-AGTAGACTCTTGCTGGCTGC-3'	57 °C
	R: 5'-AGAACGAGTTGGTGCATGGA-3'	
Elf3	F: 5'-TGCTTACAGCTGGAGTGTGG-3'	57 °C
	R: 5'-GTATCGGACTGCCCATCCTG-3'	

Tablo 3.16: qRT-PZR Reaksiyon Karışımı ve Konsantrasyonları.

Bileşen	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
iQ TM SYBR [®] Green supermix (2x)	10 µL	1x
İleri ve geri primerler	0.6 µL	300 nM
cDNA	1 µL	50 ng
H ₂ O	8,4 µL	-
Total reaksiyon hacmi	20 µL	-

Tablo 3.17: qRT-PZR Reaksiyon Koşulları.

Real-Time PZR Sistemi	Mod	Polimeraz aktivasyonu ve DNA Denatürasyonu 95 °C	DNA Denatürasyonu 95 °C	Primer Bağlanması ve Plate Okuma	Döngü Sayısı	Erime Eğrisi
Bio-Rad [®] CFX Connect TM sistemi	SYBR [®]	3 d	15 sn	60 sn	40	55-95 °C arasında her 3 sn'de 0,5 °C artış

3.8. TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZLERİ

Transgenik ile transgenik olmayan ve mutant ile Ataem-07 bitkileri arasındaki proteomik değişiklikleri belirlemek amacı ile iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile karşılaştırmalı analizler gerçekleştirildi.

3.8.1. Protein İzolasyonu

Deney gruplarında yer alan bitki örneklerinden proteinlerin izolasyonu için TCA-aseton yöntemi kullanıldı. Her bir gruptan alınan 300 mg örnek 1,8 mL soğuk trikloroasetik asit (TCA) – merkaptoetanol (2ME) – aseton solüsyonu ile havan içerisinde homojenize edildi ve 2 mL hacimli santrifüj tüplerine aktarıldı. Örnekler -20 °C’de 15’er d aralıklarla çalkalanarak 1 saat bekledildikten sonra +4 °C’de 10000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 1,8 mL aseton – 2ME solüsyonu ile çözündürülerek -20 °C’de 15’er d aralıklarla çalkalanarak 1 saat bekletildi ve +4°C’de 10000 g hızda 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez daha tekrar edilerek pelletin pigmentlerden arındırılması sağlandı. Örnekler konsantrator cihazında (Eppendorf, Concentrator Plus) vakum altında kurutuldu. Kurutulmuş protein pelletleri her 1 mg kütlesi için 60 µL Bio-Rad ReadyPrep Rehidrasyon/Protein Çözme tamponu ile çözüldü. 1 d vorteks uygulaması ile karıştırılan örnekler ardışık olarak 2 kez 25 °C’de 10000 g hızda 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar yeni santrifüj tüplerine alındı (Méchin, Damerval ve Zivy, 2007).

3.8.2. Proteinlerin Saflaştırılması

İzolasyonu tamamlanan proteinler, Bio-Rad ReadyPrep™ 2-D CleanUp saflaştırma kiti kullanılarak 2 boyutlu jel elektroforez tekniğine uygun bir biçimde saflaştırıldı. Her 100 µL protein örneği üzerine 300 µL çöktürme ajanı I (precipitation agent I) eklendi ve alt-üst edilerek karıştırıldı. Örnekler 15 dakika buz içerisinde inkübe edilmiş ve daha sonra tüplere 300 µL çöktürme ajanı II (precipitation agent II) eklendi. Tüpler yine alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 12000 g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Örnekler yeniden 12000 g hızda 30 saniye santrifüj edildikten sonra üst faz kalıntıları uzaklaştırıldı. Pelletler 40 µL yıkama solüsyonu I (wash reagent I) ile yıkandıktan sonra 12000 g hızda 5 dakika santrifüj yapıldı. Meydana gelen üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve pelletler 25 µL proteomik kullanım için uygun saflıkta su ile çözündürüldü (Devraj ve diğ., 2009).

3.8.3. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonlarının tayini için protein standartları ve örnek dilüsyonları hazırlandı. Ölçümler Nano Drop 1000 (Thermo Scientific) cihazında Lowry yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Konsantrasyonlar μg protein/ μL cinsinden hesaplandı. Proteinler hızlı dondurma işlemi sonrasında kullanılabilecek kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (Lowry *et al.*, 1951).

3.8.4. Sodyum dodesil sülfat - Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi

Konsantrasyonları ölçülen her bir protein örneği 20 μg olacak şekilde %12'lik SDS poliakrilamid jellere yüklendi ve jeller 160 V elektrik akımında 60 dakika yürütüldü. Jellerin fiksasyonu 60 dakika boyunca %10 asetik asit ve %40 metanolden oluşan fiksasyon solüsyonunda gerçekleştirildi. Jeller fiksasyon sonrasında Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, 115444) boyası içerisinde bantlar görünür hale gelene kadar boyandı. Boya fazlalıkları distile su ile yıkama yapılarak uzaklaştırıldı ve jeller kurutuldu. Bant keskinlikleri ile örnek konsantrasyonları karşılaştırılarak, örneklerin iki boyutlu elektrofrez için uygunlukları değerlendirildi (Laemmli, 1970).

3.8.5. Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları ve 2D Jel Elektrofrezleri

Protein örneklerinin izoelektrik odaklanmaları ve 2D jel elektrofrezleri için IPG stripler (şerit) kullanıldı. Çalışmada 11 cm ve 3-10 pH aralığında stripler kullanıldı. Herbir örnek için 250 μg kadar protein 185 μL 2DE rehidrasyon tamponu (10 ml 8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, %0.2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, bromofenol mavisi) içerisinde çözündürüldü. Proteinlerin IPG striplerin üzerine yerleşebilmesini sağlamak için rehidrasyon tepsisinde (rehydration/equilibration tray) PROTEAN® i12™ IEF (Bio-Rad) cihazı içerisinde $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 14 saat boyunca rehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. Rehidrasyon sırasında örneklerin buharlaşmasını engelleyebilmek için IPG striplerin üzeri 2-3 mL mineral yağı (Bio-Rad, 1632129) ile kapatıldı. Rehidrasyon işlemi bittiğinde IPG striplerin üzerinde yer alan fazla miktardaki mineral yağ kurutma kağıdı ve su yardımı ile temizlenmiş ve stripler yeni bir odaklama tepsi (focusing tray) içerisine yerleştirildi. Üzerlerine yeniden mineral yağ eklendikten sonra odaklama tepsi cihaza yerleştirilerek Tablo 3.18'de yer alan koşullar altında izoelektrik odaklama gerçekleştirildi. Proteinler sahip oldukları izoelektrik değerlere göre IPG strip üzerinde sıralandı.

Tablo 3.18: İzoelektrik Odaklama (IEF) voltaj, süre ve ayarları.

	Voltaj (V)	Eğim	μAmp	Değer	Birim
1. Adım	250	Lineer	50	0:20	Saat:Dakika
2. Adım	10000	Lineer	50	2:30	Saat:Dakika
3. Adım	10000	Seri	50	40000	Volt
4. Adım	750	-	50		

Stripler ikinci boyut elektroforez işleminden önce dengeleme tamponu I (equilibrum buffer I; 6 M üre, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 DTT) ve dengeleme tamponu II (equilibrum buffer II; 6 M üre, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 (w/v) iodoasetamid) içerisinde 10 dakikalık sürelerle yıkandı. Daha sonra stripler, Criterion TGX Stain-Free jellere (Bio-Rad, 5678091) yerleştirildi ve bu jeller Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad, 1654138) cihazına konuldu. Proteinler, 20 °C'de 200 V'de 60 dakika çalıştırılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Elektroforez aşaması tamamlandıktan sonra jeller en az bir saat %40 metanol ve %10 asatik asit içerisinde fikse edilip Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası içerisinde bir gece boyunca boyanmaya bırakıldı (Laemlli, 1970).

3.8.6. 2DE Jellerin Analizi

Bir gece boyunca boyanan jellerin görüntüleri VersaDoc 4000MP sistemi (Bio-Rad, 170-8640) ile beyaz ışık altında çekildi. Jel görüntüleri PDQuest Advanced (Bio-Rad, 170-9630) programı ile analiz edildi.

Üç tekrarlı olarak yürütülen 2D jelleri, PDQuest yazılımında deney tasarımına dayalı olarak transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 olarak gruplandırıldı. En ufak ve en büyük protein spotları, belirlenen tüm spotları tek bir sanal jelde birleştirip “master” jel elde etmek için merkez bölgelerinden işaretlendi. Yazılım, oluşturulan “master” jele dayalı olarak, tüm jel görüntülerinin normalizasyonunu gerçekleştirdi. Böylelikle, protein örneklerindeki farklılıklarla ilgili olmayan ve jel elektroforez uygulamasındaki teknik aksaklıklardan kaynaklanan varyasyonlar düzeltildi. Analiz setleri, Student t-testinde %90 anlamlı olan spotlar arasındaki kat değişimlerine göre yazılım tarafından otomatik olarak oluşturuldu. Oranlarına göre kantitatif tablo raporu oluşturularak anlatım düzeyi artan ve azalan spotların listesi oluşturuldu.

Gerçekleştirilen analizler ile her bir jeldeki protein spotları bitki grupları (transgenik, transgenik olmayan, mutant, Ataem-07 soya bitkileri) içerisinde karşılaştırılarak, proteinlerin

anlatım profilleri belirlendi. Protein spotları ayrı ayrı ve karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde, transgenik ve mutant bitkilerin karşılıklarına göre anlatımı 2-kat artmış veya azalmış olan spotlarının bir kısmı seçildi ve seçilen spotlar Spot-cutter robotu (Bio-Rad, 1657201) ile kesildi. Kesim sonucunda elde edilen spotların MALDI-TOF/TOF MS analizleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Bölümü DEKART Proteomiks Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.8.7. In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18

Kesim sonucunda elde edilen protein spotlarından, proteinlerin peptidlerine ayrılabilmesi ve ardından jellerden izole edilebilmeleri gerekmektedir (Shevchenko ve diğ., 2006). Buna yönelik olarak protein spotları boyanın uzaklaştırılabilmesi için çalkalayıcı yardımı ile %50 asetonitril (ACN) ve 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde yıkandı. Yıkama sonrası protein örnekleri disülfid bağlarının kopması için %10 tris-2-karboksietil fosfin (TCEP) içeren 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde 60 °C'de 10 d inkübe edildi. Daha sonra spotlar indirgenmiş sistin yan zincirlerinin metillendirilmesi (alkylation) için 100 mM iyodoasetamid (IAA) içeren 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat bekletildi. Spotlar %100'lük ACN içerisine alındıktan sonra, ACN'nin uzaklaştırılmasının ardından son konsantrasyonu 10 ng/μL olan tripsin (Sigma, T6567) ile 30 °C'de gece boyunca kesime bırakıldı. Örneklerin Zip-Tip işleminden önce uçlar ACN ve %0,1 triflorik asit ile dengelendi. Örneklerin yaklaşık 30 defa pipetlenmesinin ardından, MALDI matriks (4-alfa siyanosinaminik asit) ile MALDI plate üzerine elüsyonu gerçekleştirildi.

3.8.8. MALDI TOF-TOF Analizi

MALDI platelere yerleştirilen örnekler AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analiz edildi. Elde edilen verilerin online MASCOT data bankasında (<http://www.matrixscience.com>) ProteinPilot™ (AbSciex™) programı kullanılarak değerlendirilmesi sonucunda proteinler tanımlandı. Proteinler arasındaki biyolojik ilişkilerin anlaşılması ve hücresel yolların belirlenebilmesi için IPA (Ingenuity Pathway Analysis), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) ve STRING (<https://www.string-db.org/>) programlarından ve UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) veribankasından yararlanıldı. MALDI kalibrasyonu için içsel ve dışsal kalibrantlar kullanılırken her spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanıldı. Tüm spektrumlar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, monoizotopik kütle değerleri, fıkse

edilmiş olarak karbamidomethyl (sistein), peptid yükü +1, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı $\pm 0,25$ Da olarak belirlendi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

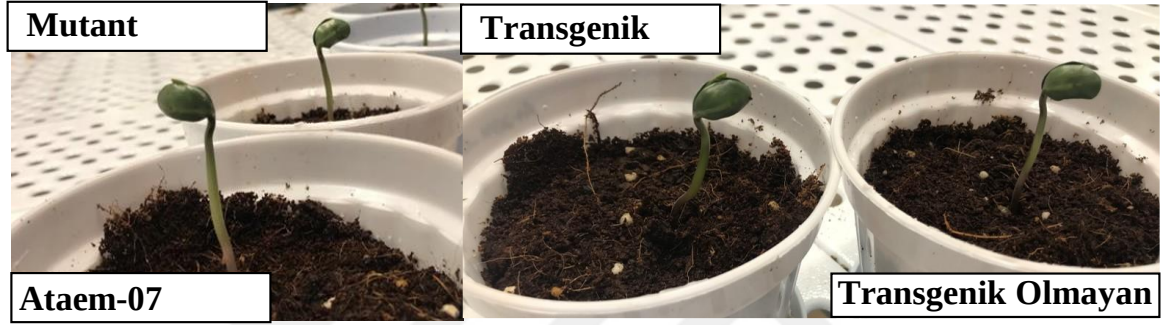
Tüm denemeler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Her bir bitki grubuna (transgenik, transgenik olmayan, mutant, Ataem-07 soya bitkileri) ait gen anlatım profilleri ve proteomik sonuçları, her bir analiz içerisinde birlikte değerlendirildi. Genlerin kantitatif RT-PZR reaksiyonlarından elde edilen gen anlatım sonuçları GraphPad Prism 9 programı ve one-way Anova istatistiksel testi ile değerlendirildi. Geleneksel bitkilere göre transgenik ve mutant soya bitkilerinde farklı şekilde anlatım gösteren protein spotlarının yüzdeleri arasındaki fark z-testi (iki populasyon oranı için hipotez testi) ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Spot seçimi, aykırı değerleri ortadan kaldıran Student t-Testi kullanan istatistiksel validasyon ile bir spotun istatistiksel önemini belirleyerek PDQuest 2-D analiz yazılımı tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

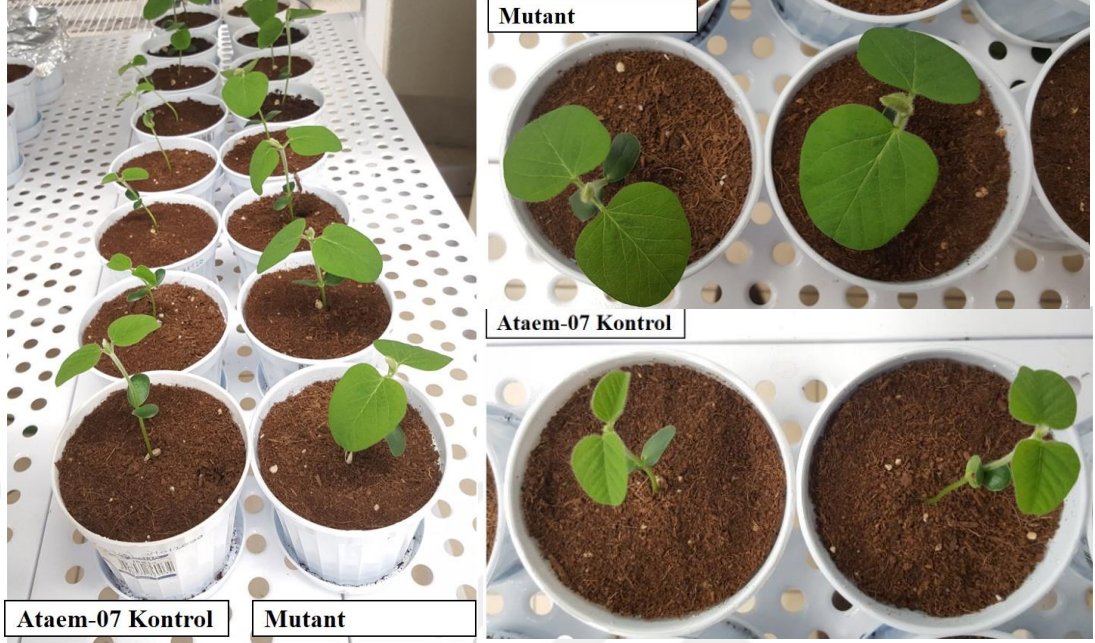
4.1. BİTKİLERİN GELİŞİMİ

Transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri uygulanan koşullar altında başarıyla çimlenip (Şekil 4.1) V5 (beşinci üçlü yaprak) evresine kadar sağlıklı bir şekilde gelişimlerini sürdürmüşlerdir.



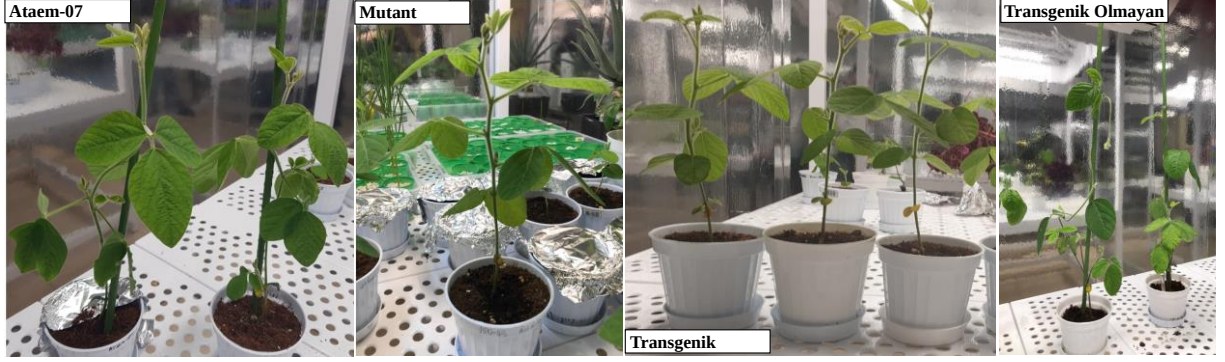
Şekil 4.1: Çimlenmiş Ataem-07, mutant, transgenik ve transgenik olmayan bitkiciklerin 5 günlük görüntüleri.

Bu tez kapsamında kullanılan Ataem-07 ve mutant bitkilerin “Mutasyon İslahı ile Soyada (*Glycine max* L.) Tuzluluğa ve Kuraklığa Toleranslı Bitkilerin Geliştirilmesi” TAGEM projesi (Proje No: TAGEM-16-AR-GE-56) kapsamında elde edilen 2018 yılı verim denemelerinde, Ataem-07 bitkilerinin ortalama bitki boyunun 141,2 cm, mutant bitkilerin ise ortalama bitki boyunun 128,7 cm olduğu belirlenmiştir (Atak ve diğ., 2020). Ataem-07 ve mutant bitkilerin gelişimleri incelendiğinde iki yapraklı evrede (VC; kotiledon) özellikle mutant bitkilerin yapraklarının Ataem-07 bitkilerine göre daha geniş yüzey alanına sahip oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Ataem-07 soya hattı, transgenik olmayan hatta göre 1 hafta kadar daha geç çiçeklenmesi ile birlikte çiçeklenme başladığında bitkilerin ortalama olarak V8-V10 evresinde oldukları ve çok sayıda yaprağa sahip oldukları gözlemlenmiştir. Çiçeklenmeden 3 hafta sonra bitki başına 30-40 bakla, çiçeklenmeden 4 hafta sonra ise bitki başına 45-55 bakla meydana getirmişlerdir. Mutant bitkilerin mutant hattın kökenlendiği Ataem-07 hattına ait bitkilere göre daha kısa boylu oldukları ve benzer şekilde ortalama V9 evresinde çiçeklenme gösterdikleri ancak çiçeklenmeden 3 hafta sonra bitki başına 7-12 bakla, çiçeklenmeden 4 hafta sonra bitki başına 28-32 bakla ve 40-45 baklacık oluşturdukları gözlemlenmiştir.

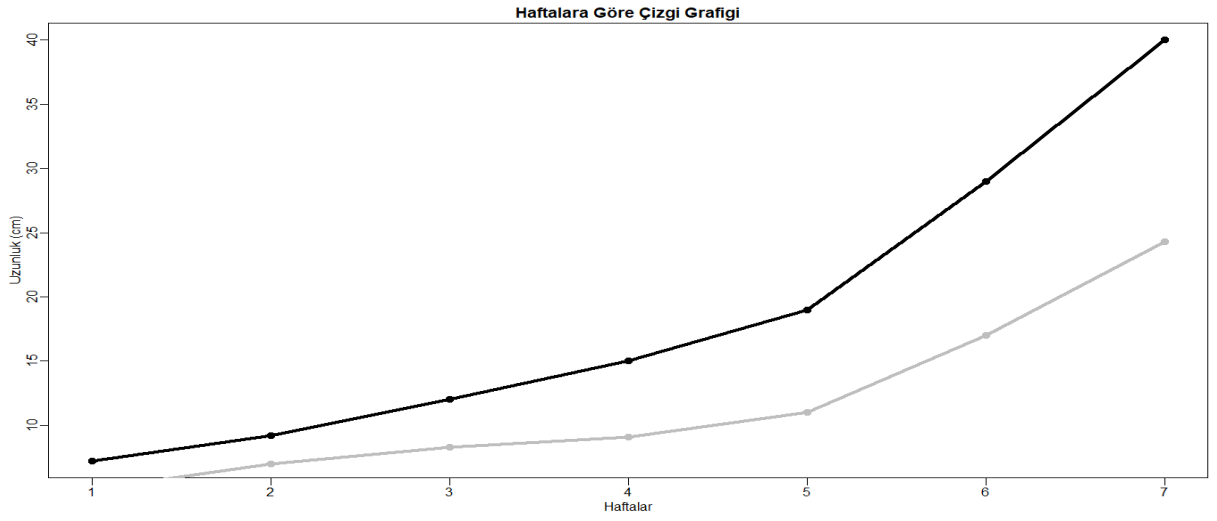


Şekil 4.2: Ataem-07 ve Mutant soya bitkilerinin VC (vejetatif kotiledon) evrelerinin karşılaştırılması.

Transgenik ve transgenik olmayan bitkilerin gelişimleri incelendiğinde, transgenik olmayan bitkilerin transgenik bitkilere göre çok daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca gelişimleri boyunca az sayıda noda sahip oldukları, V5 evresinden sonra çiçeklenmeye başladıkları (R1 evresi) ve kısa sürede bakla bağlayarak R3 evresine ulaştıkları gözlemlenmiştir. Transgenik olmayan bitkilerin Ataem-07 ve mutant gruplarına göre çok az sayıda bakla oluşturdıkları ve çiçeklenme sonrasında yeni nod oluşturmada yapraklarını dökmeye başladıkları gözlemlenmiştir. Bu bitki grubunun, baklalarının olgunlaşmasını takiben gerçekleştirilen tek bitki hasadı sonucunda, çok az sayıda tohum ürettiği belirlenmiştir. Transgenik bitkilerin ise V5 evresindeki fide boyu uzunluklarının ortalama 43 cm ile transgenik olmayan bitkilerden, ortalama 61 cm, oldukça kısa olduğu gözlemlenmiştir. Ancak elde edilen az sayıdaki transgenik bitkinin gerçekleştirilecek analizler için kullanılması nedeniyle V5 evresinden sonraki gelişim özellikleri belirlenememiştir. Moleküler analizler için kullanılmak üzere V5 evresine kadar yetiştirilmiş bitkiler Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Ataem-07 ve mutant bitkilerin fide boylarının haftalara göre değişimi Şekil 4.4'te verilmiştir.



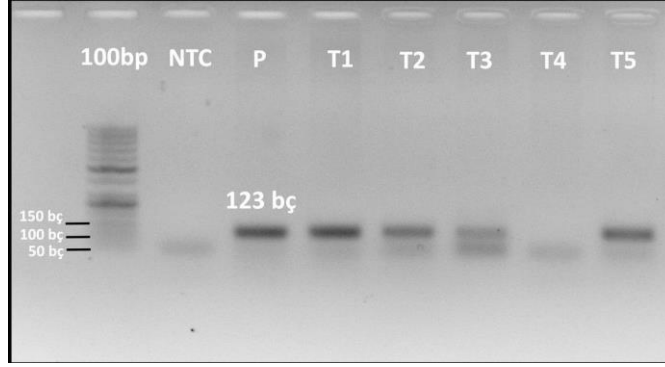
Şekil 4.3: Ataem-07, mutant, transgenik ve transgenik olmayan bitkilerin V5 evresine ait görüntüler.



Şekil 4.4: Ataem-07 ve mutant bitkilerin haftalara göre fide boyu (ortalama) grafiği. Siyah: Ataem-07, Gri: Mutant.

4.2. 35S PROMOTÖRÜNÜN KALİTATİF OLARAK SAPTANMASI İLE TRANSGENİK BİTKİLERİN BELİRLENMESİ

Transgenik bitkiler, 35S promotör dizisine ait bir bölgenin (123 bç) “elemente özgü PZR” yöntemiyle başarılı bir şekilde çoğaltılması ile belirlendi. 123 baz çiftlik bu bölgenin çoğaltılamadığı bitkiler ise transgenik olmayan bitkiler olarak isimlendirildi. Olası kontaminasyonun belirlenebilmesi amacı ile hazırlanan ve DNA bulunmayan kontrol tüpünde (NTC) ise beklendiği üzere 35S dizileri saptanamadı. 35S promotör taramasının sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir.



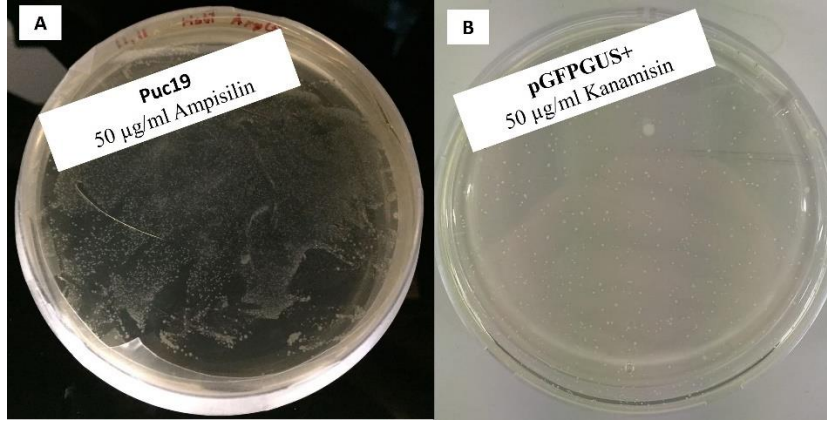
Şekil 4.5: 35S promotör PZR jel elektroforezi. NTC: DNA bulunmayan kontrol; P: pozitif kontrol (Biotecon Diagnostics, Foodproof GMO screening Kit); T1-T5: Bitki örnekleri.

4.3. TRANSGENİK SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNİN ELDE EDİLMESİ

Saçak kökler bitkilerin hipokotil ve kotiledon sınır bölgesine *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşunun enfeksiyonu ile başarılı bir şekilde geliştirilmiştir.

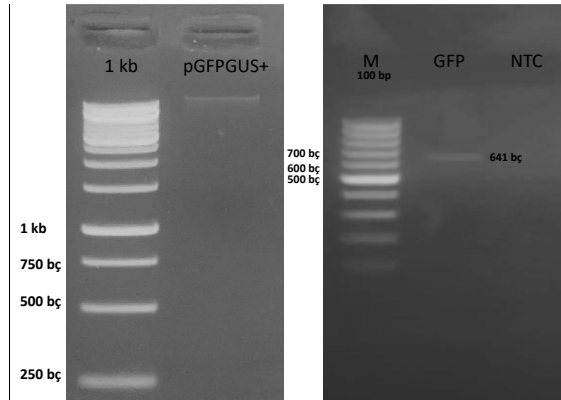
4.3.1. pGFPGUS+ Plazmidinin One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* Bakterilerine Elektroporasyon İle Transformasyonunun Gerçekleştirilmesi

Elektrokompotent One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterilerine elektroporasyon ile pGFPGUS+ plazmidinin transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektroporasyon sırasında sistemin kontrolü için Puc19 plazmidi kullanılmıştır. Puc19 plazmidi ile elektroporasyonu gerçekleştirilen One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterileri Puc19 plazmidinin taşıdığı antibiyotik direnç genine uygun olarak ekildikleri 50 µg/mL ampisilin içeren besiyerlerinde çok sayıda koloni oluşturmuştur. Benzer şekilde pGFPGUS+ plazmidi ile elektroporasyonu gerçekleştirilen One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterileri ise pGFPGUS+ plazmidinin taşıdığı antibiyotik direnç genine uygun olarak ekildikleri 50 µg/mL kanamisin içeren besiyerlerinde çok sayıda koloni oluşturmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: A) Puc19 ve B) pGFPGUS+ plazmidleri ile elektroporasyona uğratılmış transformant One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterilerinin sırasıyla 50 µg/ml ampisilin ve 50 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerlerindeki görüntüleri.

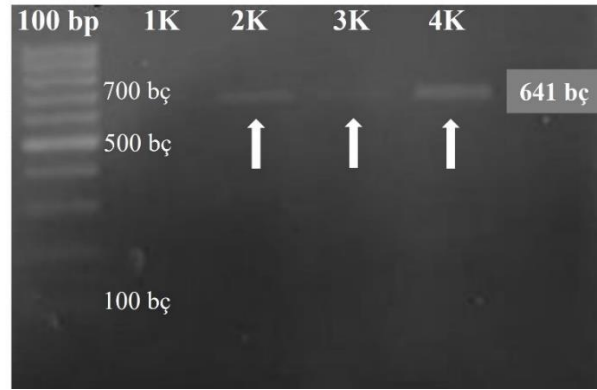
Gerçekleştirilen koloni PZR sonucunda *gfp* gen bölgesine ait 641 bç boyutundaki dizinin başarıyla çoğaltıldığı transformant koloniler, pGFPGUS+ plazmidini taşıyan koloniler olarak belirlenmiştir ve bu kolonilerin kullanılmasıyla 50 µg/mL kanamisin içeren LB sıvı besiyerlerinde kurulan kültürlerden başarılı bir şekilde plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: pGFPGUS+ plazmidinin (13,7 kb) ve pGFPGUS+ plazmidini içeren transformant One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* bakterilerine ait kolonilerden *gfp* genine ait primerler ile gerçekleştirilen koloni PZR sonuçlarının agaroz jel görüntüleri. NTC: DNA bulunmayan kontrol; GFP: Yeşil floresan proteini, 1 kb-100 bp: Markır.

4.3.2. pGFPGUS+ Plazmidini İçeren Transformant *Agrobacterium rhizogenes* K599 Bakterilerinin Elde Edilmesi

Elektrokompotent *Agrobacterium rhizogenes* K599 bakterilerine elektroporasyon ile pGFPGUS+ plazmidinin transformasyonu gerçekleştirilmiştir. pGFPGUS+ plazmidi ile elektroporasyonu gerçekleştirilen *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu 50 µg/mL kanamisin ve 35 µg/mL rifampisin içeren YMB agar besiyerlerine ekilerek inkübe edilmiştir ve çok sayıda koloni elde edilmiştir. Koloni PZR sonucunda *gfp* gen bölgesine ait 641 b boyutundaki dizinin başarıyla çoğaltıldığı koloniler, pGFPGUS+ plazmidi içeren transformantlar olarak belirlenmiştir (şekil 4.8). Transformant koloniler 50 µg/mL kanamisin ve 35 µg/mL rifampisin içeren YMB besiyerlerinde üretilerek soya bitkilerine gen transformasyonu yapılmıştır.



şekil 4.8: pGFPGUS+ plazmidini içeren transformant *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşuna ait kolonilerden *gfp* genine ait primerler ile gerçekleştirilen koloni PZR agaroz jel görüntüleri. 1K: 1. koloni; 2K: 2. koloni; 3K: 3. koloni; 4K: 4. koloni.

4.3.3. Transgenik Saçak Kök Kültürlerinin Elde Edilmesi

In vitro'da yetiştirilen mutantın kökenlendiği Ataem-07 soya fidelerinin hipokotil bölgesinin, pGFPGUS+ plazmidini içeren transformant *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile inokulasyonundan 30 gün sonra *rol* genlerinin bitki genomuna aktarılması ile transgenik saçak kökler elde edilmiştir. İnoküle edilen 118 bitkiden 76'sında saçak kök gelişimi gözlenmiştir. Gelişen köklerin bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyerlerine aktarımını takiben 45 adedinin hızlı gelişim gösterdiği ve bunların içerisinde de 35 adedinin alt kültürlemeler ile haftalar boyunca gelişimlerini sürdürdüğü belirlenmiştir. Uygulanan yöntemle Ataem-07'de alt kültürü devam ettirilebilen saçak kök kültür oranı %30 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Örnek saçak kök görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.1: *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile uygulama yapılan fidelerde saçak kök oluşum yüzdeleri.

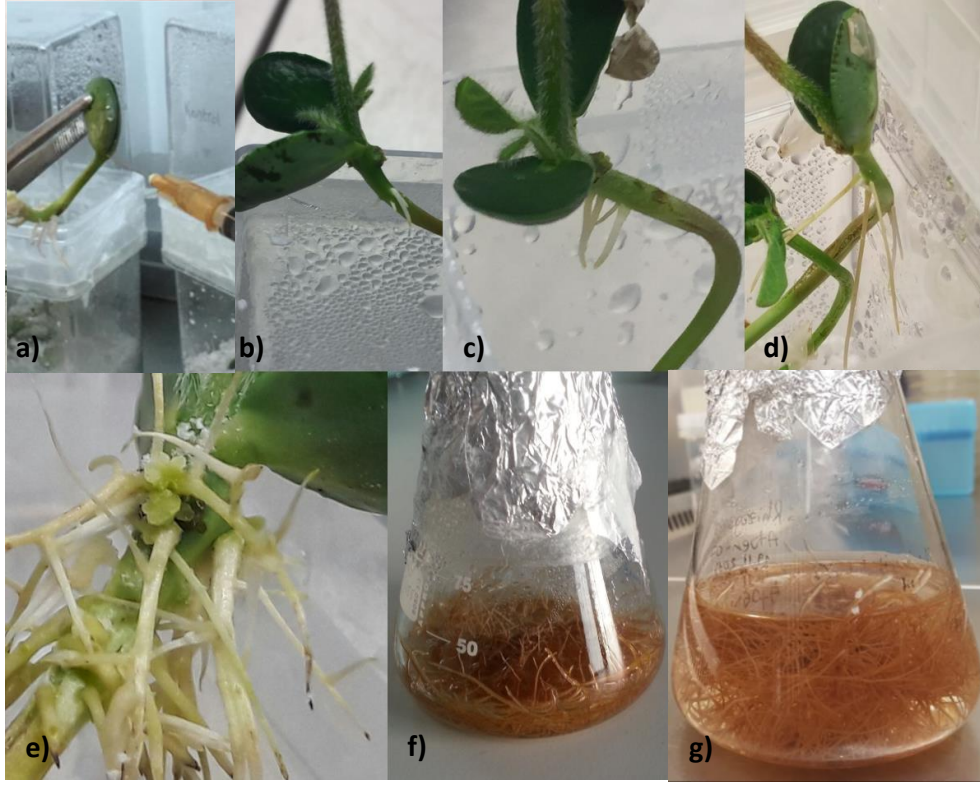
Yöntem	Uygulama Yapılan Bitki Sayısı	Saçak Kök Çıkışı Gözlenen Bitkiler	Gelişimi Sürdürülerek Kültürü Kurulan Saçak Kökler	Alt Kültürü Devam Ettirilebilen Saçak Kök Kültürü
İnokülasyon	118	76	45	38



Şekil 4.9: *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme edilmiş bitkilerde 30 gün sonra gelişen saçak kökler.

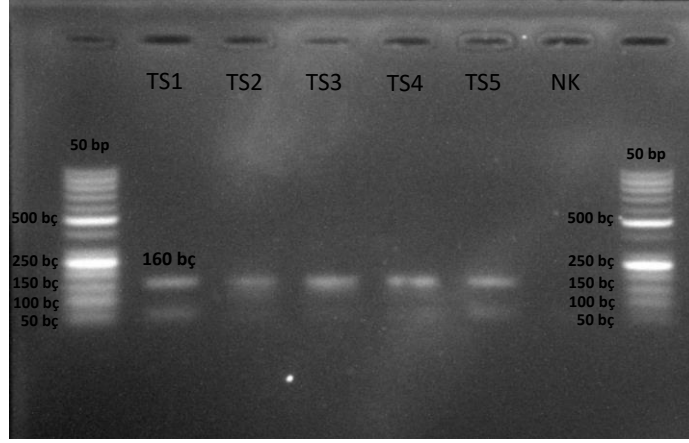
4.3.3.1. Transformasyonun Doğrulanması

Ataem-07 bitkilerinin hipokotil bölgelerinin *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile inokülasyonundan 15 gün sonra kök çıkışları başlamış ve 30. günün sonunda saçak kök oluşumları gözlemlenebilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen 30 ml MS besiyerine alınan saçak köklerden gelişimlerini sürdürenlerin alt kültürlenmesine devam edilmiştir (Şekil 4.10). *Agrobacterium rhizogenes* K599 suşu ile uygulama yapılan fidelerden elde edilen saçak köklerin Ataem-07 soya çeşidine ait kontrol köklerine göre bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besiyerlerinde daha hızlı ve daha çok dallanma göstererek gelişmeleri transformasyonun gerçekleşmiş olduğunu göstermiştir.

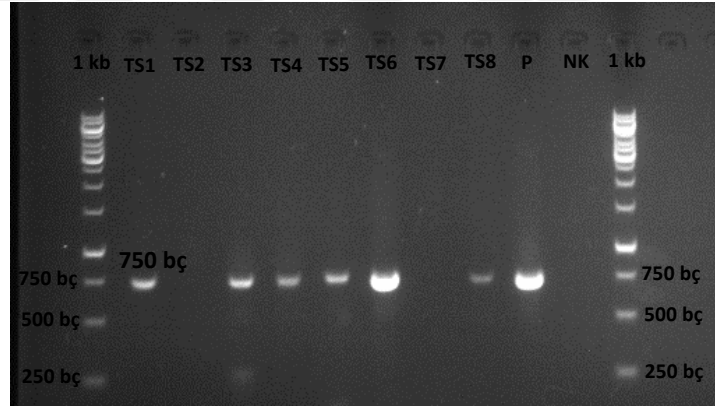


Şekil 4.10: Transgenik saçak kök kültürlerinin kurulması. a) Ataem-07 bitkilerinin inokülasyonu b) Bitkilerin *A. rhizogenes* K599 suşu ile inokülasyonundan 15 gün sonra c) 20 gün sonra d) 25 gün sonra e) 30 gün sonra f-g) Bitki düzenleyicisi içermeyen MS besiyerinde 7 (100 ml erlen içerisinde) ve 14 (250 ml erlen içerisinde) günlük saçak kök kültürü.

Elde edilen saçak köklerden izole edilen DNA'lar ile *rolA* ve *gus* genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucunda sırasıyla beklenen 160 bp'lık ve 750 bp'lık bölgelerin başarılı bir şekilde çoğaltılmış olması, *rolA* ve *gus* genlerinin bitki genomuna integrasyonunun gerçekleşmiş olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Kontrol bitkilerinde ise aynı primerler ile *rolA* ve *gus* genine ait herhangi bir amplifikasyon gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.11: Transgenik saçak kök kültürlerinin, *rolA* genine ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile doğrulanması. TS1: Transgenik kök 1; TS2: Transgenik kök 2; TS3: Transgenik kök 3; TS4: Transgenik kök 4; TS5: Transgenik kök 5; NK: Negatif kontrol; 50 bp: Markır.



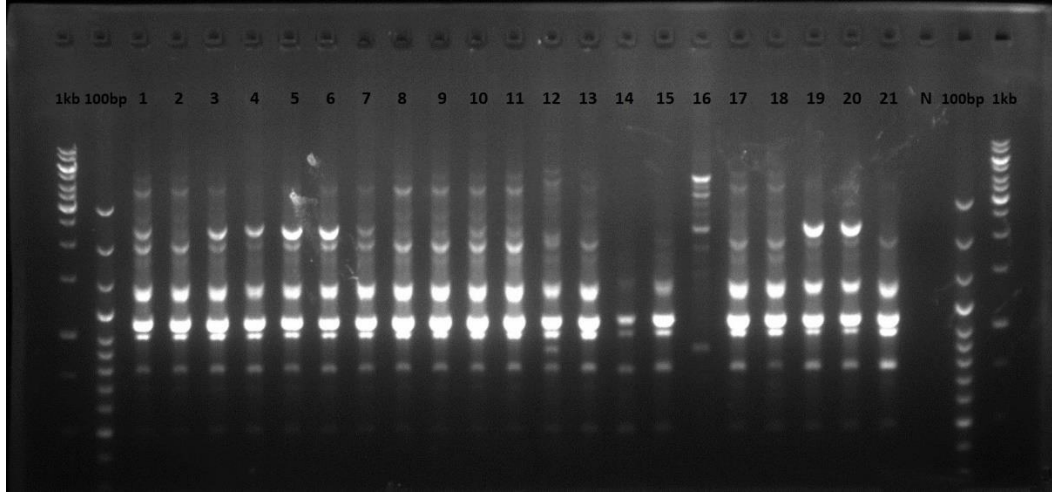
Şekil 4.12: Transgenik saçak kök kültürlerinin, *gusA* genine ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile doğrulanması. TS1: Transgenik kök 1; TS2: Transgenik kök 2; TS3: Transgenik kök 3; TS4: Transgenik kök 4; TS5: Transgenik kök 5; TS6: Transgenik kök 6; TS7: Transgenik kök 7; TS8: Transgenik kök 8; P: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol; 1 kb: Markır.

4.4. TRANSGENİK SAÇAK KÖK, TRANSGENİK, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN KÖKLERİNDE IRAP (RETROTRANSPOZONLAR ARASI ÇOĞALTIM POLİMORFİZMİ) PZR YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ

Çalışmamızda transgenik, mutant, Ataem-07 ve Ataem-07'den elde edilmiş transgenik saçak köklerden elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak IRAP primerleri ile IRAP PZR gerçekleştirilerek bant profilleri elde edilmiştir. *Bagy2* retrotranspozonuna ait primerler ile gerçekleştirilen IRAP PZR sonucunda *Bagy2* retrotranspozonu için toplam 18 bant içerisinden 11 bant polimorfik, 7 bant ise monomorfik (6 bant, farklı gruplardan 21 birey içerisinden sadece tek bir bireyde fark gösterdiği için monomorfik olarak sınıflandırılmıştır) olarak değerlendirilmiştir. Polimorfizm oranı %61,11 olarak belirlenmiştir. *Bagy2* retrotranspozonuna ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.13'te verilmiştir. 21 örnek için toplam 219 bant elde edilmiş olup bu bantların 78 tanesi (%35,62) polimorfik bulunmuştur. *Nikita* retrotranspozonuna ait primerler ile gerçekleştirilen IRAP PZR sonucunda ise elde edilen toplam bant sayısı 18 iken polimorfik bant sayısı 11, monomorfik bant sayısı ise 7 (6 bant, farklı gruplardan 21 birey içerisinden sadece tek bir bireyde fark gösterdiği için monomorfik olarak sınıflandırılmıştır) olarak değerlendirilmiştir. Polimorfizm oranı %61,11 olarak belirlenmiştir. *Nikita* retrotranspozonuna ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.16'da verilmiştir. 21 örnek için toplam 211 bant elde edilmiş olup bu bantların 77 tanesi (%36,49) polimorfik bulunmuştur. *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonlarının polimorfizm yüzdeleri (%) Şekil 4.14 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. Çalışmada DendroUPGMA yazılımı ile üretilen genetik benzerlik matrisinden yararlanarak dendogramlar elde edilmiştir (Şekil 4.15 ve 4.18). Polimorfik ve monomorfik bantlar Jaccard benzerlik katsayısına göre değerlendirilmiştir. Transgenik (GD), mutant, Ataem-07 ve Ataem-07 çeşidinden elde edilmiş transgenik saçak köklerin arasındaki retrotranspozon polimorfizmine dayanan genetik ilişki için oluşturulan dendogramların kofenetik benzerlik katsayısı *Bagy2* için 0,94 ve *Nikita* için 0,96 olarak bulunmuştur.

Retrotranspozonların bireyler arasındaki doğal olarak meydana gelen hareketlerini incelemek amacıyla her deney grubunda birden fazla bitkinin IRAP analizleri gerçekleştirilmiştir. *Bagy2* IRAP-PZR sonucunda deney gruplarında, 200 ile 4000 bp arasında değişen bant büyüklüklerine sahip 7-13 bantlık profiller elde edilirken, *Nikita* IRAP analizi sonucunda ise 300 ile 6000 bp

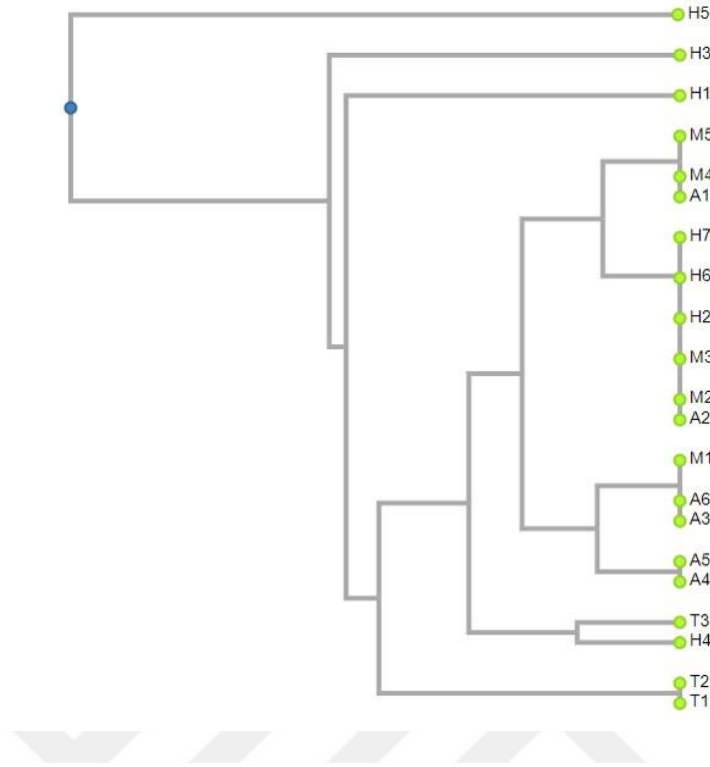
arasında değişen bant büyüklüklerine sahip 6-13 bantlık profiller elde edilmiştir. Farklı deney gruplarında hem *Bagy2* hem de *Nikita* retrotranspozonunun hareketine yönelik gerçekleştirilen IRAP analizi sonucunda farklı bant profilleri elde edilmiştir. Tüm deney gruplarında birçok monomorfik bant belirlenmiştir. Ataem-07 deney grubu ile karşılaştırıldığında, transgenik, transgenik olmayan ve mutant bitkilerdeki *Bagy2* retrotranspozonuna ait en yüksek polimorfizm %56-69 polimorfizm oranı ile transgenik saçak kök-5 deneğinden elde edilmiştir. *Nikita* retrotranspozonuna ait en yüksek polimorfizm ise %62-71 polimorfizm oranı ile yine transgenik saçak kök-5 deneğine aittir. Dört farklı gruptan bitkilerin polimorfizm verileri kullanılarak oluşturulan dendogramda, *Bagy2* retrotranspozonu için transgenik saçak kök-1, 3 ve 5 deneklerinin diğer kümelerden ayrı kümeler oluşturduğu gözlenmiştir. UPGMA dendrogramına dayalı kümelemede birinci ve ikinci kümeler sadece bir denekten oluşmuştur; sırasıyla transgenik saçak kök-5 ve transgenik saçak kök-3. Diğer denekler ile oluşturulan üçüncü küme içerisinde 7 alt küme gözlenmiştir; transgenik saçak kök-1; mutant 4, mutant 5, Ataem-07-1; mutant 2, mutant 3, Ataem-07-2, transgenik saçak kök-2, transgenik saçak kök-6, transgenik saçak kök-7; mutant 1, Ataem-07-3, Ataem-07-6; Ataem-07-4, Ataem-07-5; transgenik-3, transgenik saçak kök-4; transgenik-1, transgenik-2. *Bagy2* retrotranspozonu için oluşturulan dendogramda aynı deney gruplarında yer alan deneklerin birbirine yakın kümelerde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4.15). *Nikita* retrotranspozonu için oluşturulan dendogramda da *Bagy2* retrotranspozonuna benzer bir şekilde 2 ana küme gözlenmiştir ve bu kümelerden birinci grup sadece transgenik saçak kök-5 deneğinden oluşurken ikinci grup bir çok alt kümeye ayrılmıştır. Genel olarak *Nikita* retrotranspozonu için oluşturulan dendogramda da aynı deney gruplarında yer alan deneklerin birbirine yakın kümelerde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4.18).



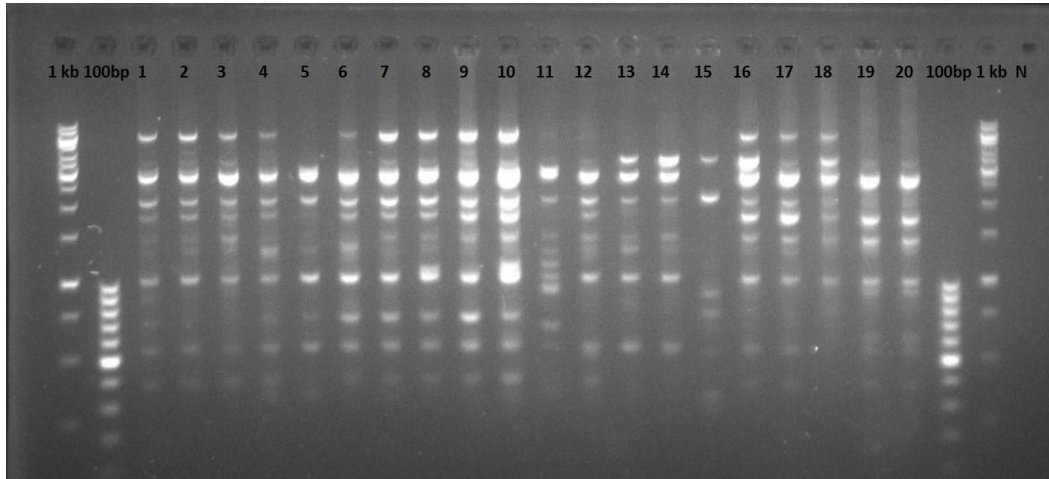
Şekil 4.13: *Bagy2* IRAP primeri ile farklı soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak kökten izole edilen DNA'lardan retrotranspozon bant profili. 1-6: Ataem-07 bitkilerinin kökleri; 7-11: Mutant bitkilerinin kökleri; 12-18: Transgenik Saçak Kök; 19-21: Transgenik bitkilerinin kökleri; 1 kb ve 100 bp : Markır; N: DNA içermeyen kontrol.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	M1	M2	M3	M4	M5	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	T1	T2	T3
A1	-	8	8	17	17	8	8	8	8	0	0	33	8	42	25	56	8	8	33	33	33
A2		-	17	25	25	17	17	0	0	8	8	40	0	36	18	63	0	0	42	42	27
A3			-	9	9	0	0	17	17	8	8	29	17	36	18	63	17	17	27	27	27
A4				-	0	9	9	25	25	17	17	36	25	30	10	69	25	25	20	20	20
A5					-	9	9	25	25	17	17	36	25	30	10	69	25	25	20	20	20
A6						-	0	17	17	8	8	29	17	36	18	63	17	17	27	27	27
M1							-	17	17	8	8	29	17	36	18	63	17	17	27	27	27
M2								-	0	8	8	40	0	36	18	63	0	0	42	42	27
M3									-	8	8	40	0	36	18	63	0	0	42	42	27
M4										-	0	33	8	42	25	56	8	8	33	33	33
M5											-	33	8	42	25	56	8	8	33	33	33
H1												-	40	57	43	67	40	40	39	39	39
H2													-	36	18	63	0	0	42	42	27
H3														-	22	88	36	36	50	50	33
H4															-	75	18	18	30	30	11
H5																-	63	63	73	73	81
H6																	-	0	42	42	27
H7																		-	42	42	27
T1																			-	0	22
T2																				-	22
T3																					-

Şekil 4.14: *Bagy2* retrotranspozonunun transgenik, mutant, Ataem-07 ve Ataem-07'den elde edilmiş transgenik saçak köklerde polimorfizm yüzdeleri (%). A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.



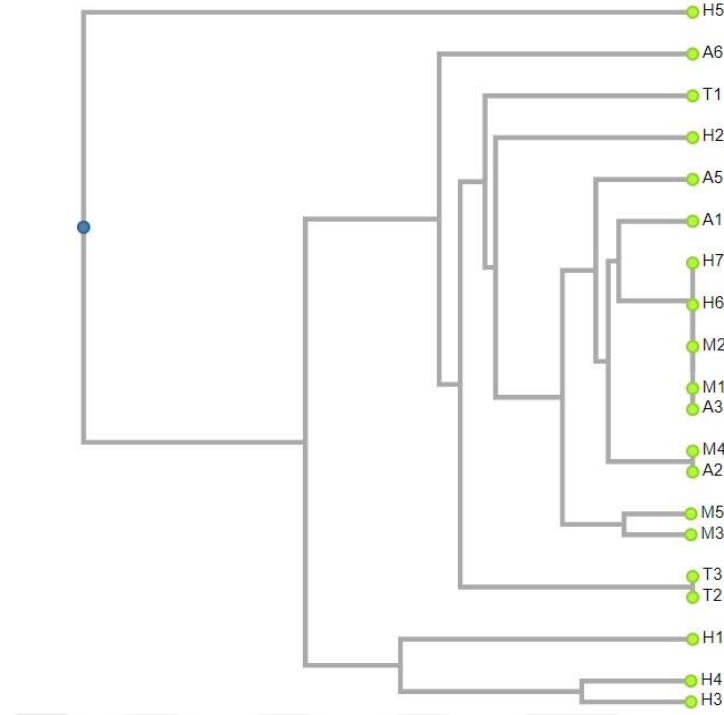
Şekil 4.15: Soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak köklerden izole edilen DNA'lardan Bag2 IRAP primerleri ile amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramı. Kofenetik korelasyon katsayısı 0,948'dir. A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.



Şekil 4.16: Nikita IRAP primeri ile farklı soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak köklerden izole edilen DNA'lardan retrotranspozon bant profili. 1-5: sırasıyla Ataem-07-1, Ataem-07-2, Ataem-07-3, Ataem-07-5, Ataem-07-6 bitkilerinin kökleri; 7-11: Mutant bitkilerinin kökleri; 12-18: Transgenik Saçak Kök; 19-21: Transgenik bitkilerinin kökleri; 1 kb ve 100 bp : Markır; N: DNA içermeyen kontrol.

	A1	A2	A3	A5	A6	M1	M2	M3	M4	M5	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	T1	T2	T3
A1	-	15	8	15	31	8	8	15	15	21	53	25	33	42	71	8	8	25	29	29
A2		-	8	15	31	8	8	15	0	21	53	25	46	42	71	8	8	25	29	29
A3			-	8	25	0	0	8	8	15	50	18	42	36	69	0	0	18	23	23
A5				-	17	8	8	15	15	21	53	25	46	42	62	8	8	25	29	29
A6					-	25	25	31	31	36	57	27	50	46	67	25	25	42	31	31
M1						-	0	8	8	15	50	18	42	36	69	0	0	18	23	23
M2							-	8	8	15	50	18	42	36	69	0	0	18	23	23
M3								-	15	8	43	25	46	42	71	8	8	25	29	29
M4									-	21	53	25	46	42	71	8	8	25	29	29
M5										-	47	31	50	46	73	15	15	31	21	21
H1											-	42	36	30	67	50	50	54	43	43
H2												-	30	22	75	18	18	36	25	25
H3													-	13	73	42	42	46	46	46
H4														-	70	36	36	40	42	42
H5															-	69	69	75	62	62
H6																-	0	18	23	23
H7																	-	18	23	23
T1																		-	39	39
T2																			-	0
T3																				-

Şekil 4.17: *Nikita* retrotranspozonunun transgenik, mutant, Ataem-07 ve Ataem-07'den elde edilmiş transgenik saçak köklerde polimorfizm yüzdeleri (%). A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.

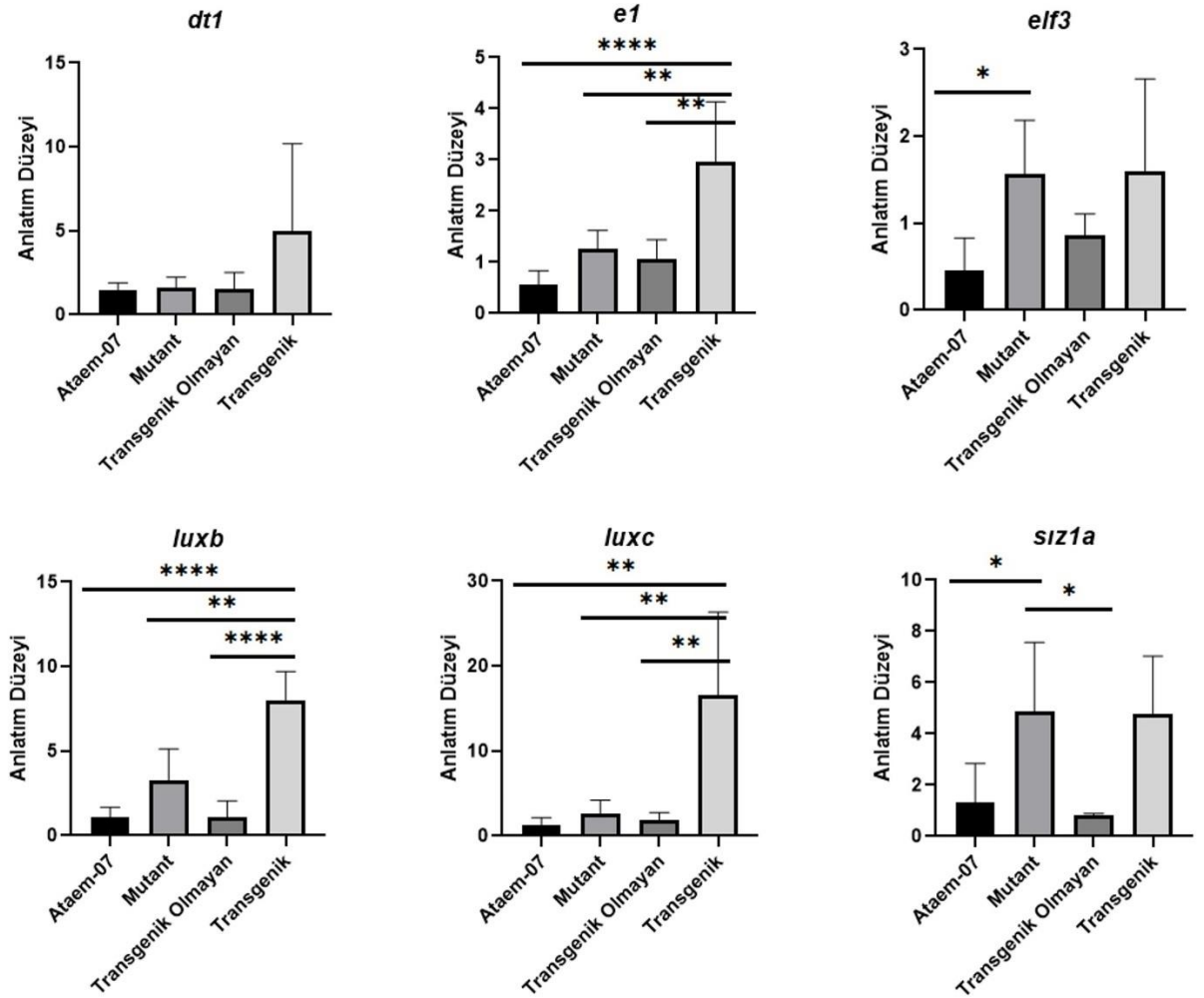


Şekil 4.18: Soya çeşitlerinin (transgenik, mutant ve Ataem-07 soya bitkileri) köklerinden ve transgenik saçak köklerden izole edilen DNA'dan Nikita IRAP primerleri ile amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramı. A: Ataem-07; M: Mutant; H: Transgenik saçak kök; T: Transgenik.

4.5. TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNDE GELİŞİM GENLERİNİN ANLATIM PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 soya bitkilerinin (Ataem-07) yaprak dokularında gelişim ile ilişkili genlerin kantitatif PZR anlatım profilleri Şekil 4.19'da gösterilmektedir. *Dt1* geninin anlatımının transgenik bitkilerde diğer bitki gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde *e1* geninin anlatımının transgenik bitkilerde diğer bitki gruplarına göre daha fazla olduğu ve diğer grupların anlatım profilleri arasında anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır. *Elf3* geninin anlatımının ise Ataem-07 bitkilerinin yaprak dokularında düşük olduğu gözlenirken mutant bitkilerin yaprak dokularında artış gösterdiği ve bu artışın anlamlı olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. *Luxb* geninin anlatımının *dt1* ve *e1* genlerinde olduğu gibi transgenik bitkilerde artış gösterdiği ve bu artışın 8.4 kat olarak gerçekleştiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Mutant bitkilerinin yaprak

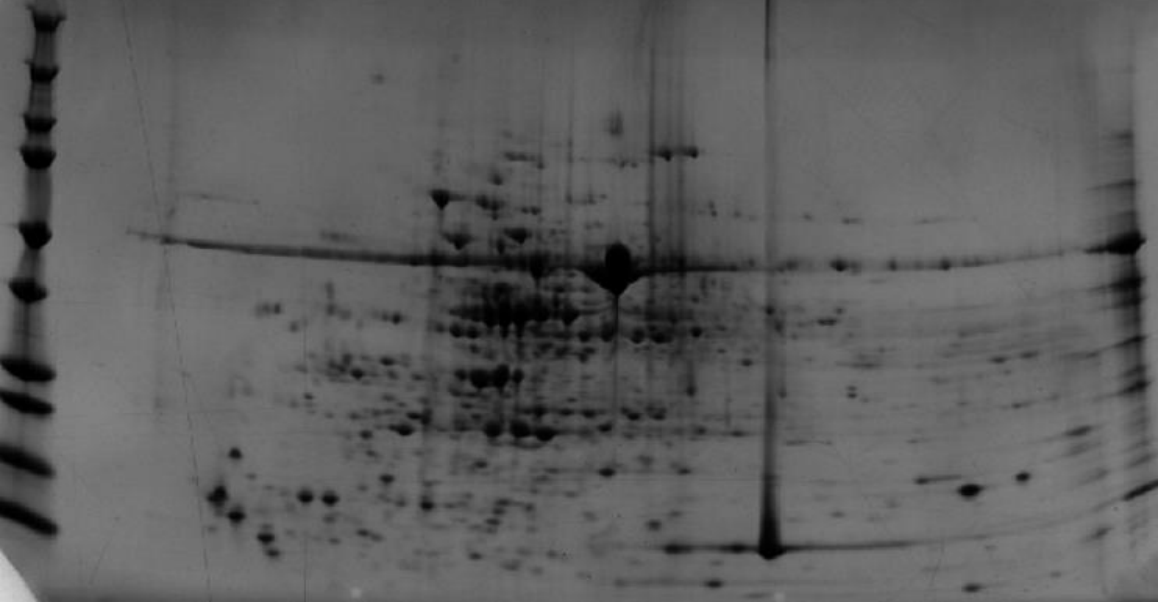
dokularında *luxb* geninin anlatımında ise kökenlendiği soya bitkilerine göre belirli bir artış gözlemlense de bu düzeyde bir artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *Luxc* genine ait mRNA miktarının yine transgenik bitkilerin yaprak dokularında diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak arttığı ve özellikle transgenik olmayan bitkilere göre yaklaşık 9 kat artış gösterdiği saptanmıştır. *Sız1a* geninin anlatımı ise mutant bitkilerin yaprak dokularında, kökenlendiği ve transgenik olmayan soya bitkilerine göre anlamlı olarak artış göstermekle birlikte transgenik soya bitkileri ile benzer bir profil ortaya koymuştur.



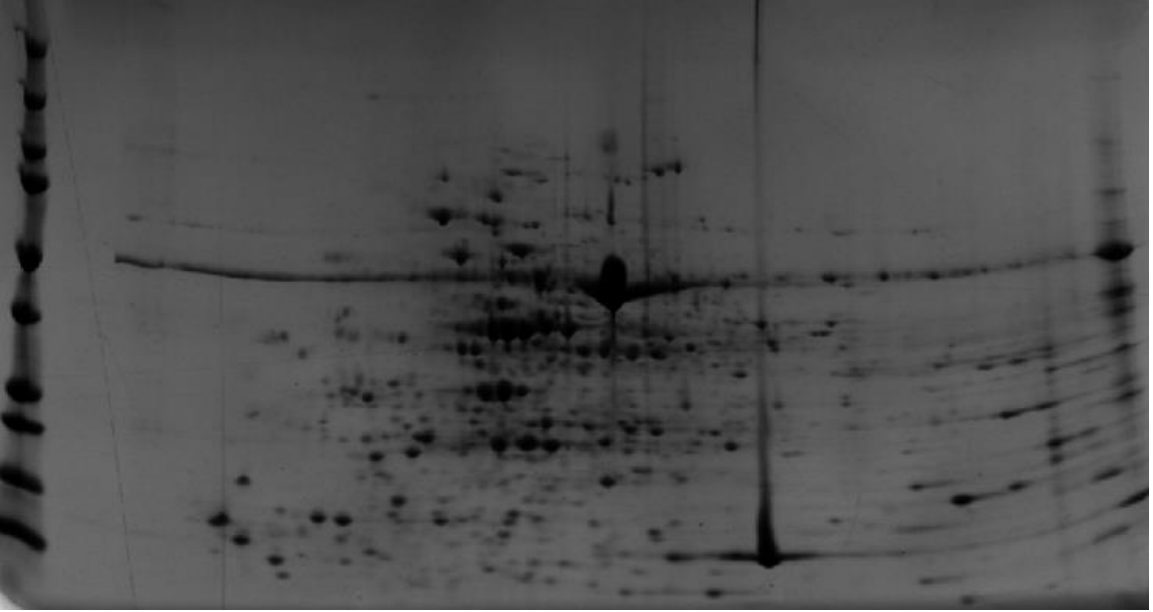
Şekil 4.19: Farklı soya gruplarında (transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07) yaprak dokularında *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc*, *sız1a* gen anlatımı. Sütunlar mRNA transkript birikiminin V5 evresindeki değerlerini (*elf1b* ile normalize edilerek) ifade etmektedir. Veriler üç biyolojik ve iki teknik tekrarın ortalamasıdır. Barlar ortalama ve standart hatayı, yıldızlar Tukey HSD posthoc testine göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı istatistiksel farkı göstermektedir.

4.6. TRANSGENİK, TRANSGENİK OLMAYAN, MUTANT VE ATAEM-07 SOYA BİTKİLERİNİN 2 BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ İLE PROTEOMİK ANALİZİ

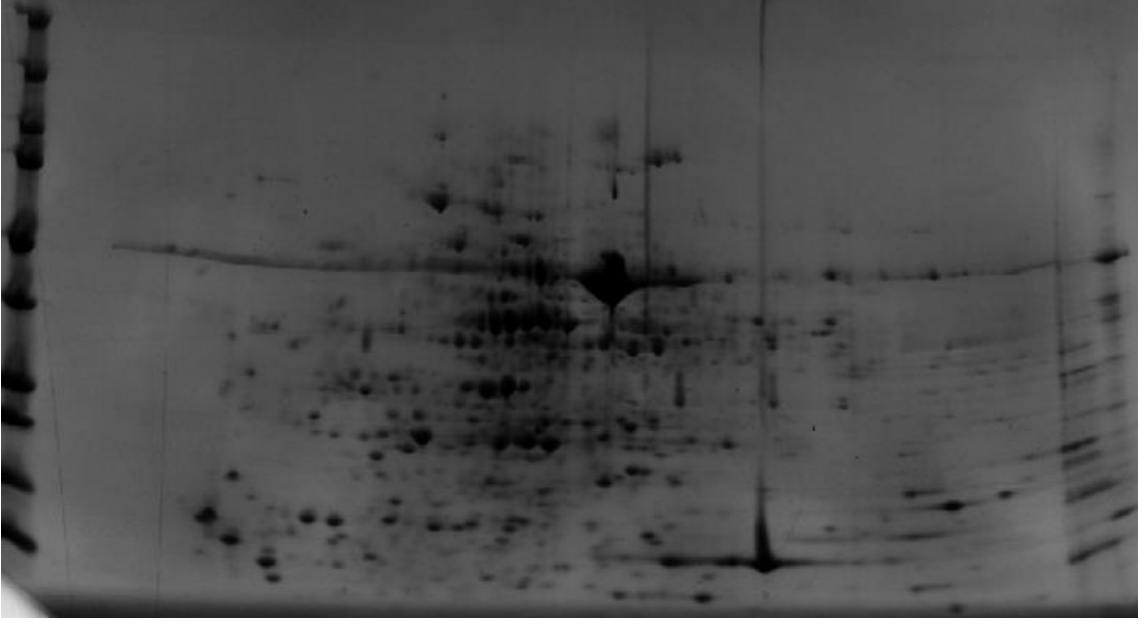
Transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07’de protein profillerindeki farklılıklar, karşılaştırmalı 2-D elektroforez ile moleküler düzeyde değerlendirilmiş, jel görüntüleri sırasıyla Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de verilmiştir. PDQuest™ Advance jel analiz yazılımında otomatik spot algılama kullanılarak farklı gruplara ait 2-DE jeller üzerinde farklı yoğunluklar gösteren 533 ile 674 arasında protein spotu belirlenmiştir (Tablo 4.2). Bu spotların içerisinde anlatım farklılığı gösterenlerin bazıları Şekil 4.24’da gösterilmiştir. Tüm protein spotları arasından 417 protein spotu, bitki gruplarının hepsinde hatasız bir şekilde eşleşme göstermiştir. Mutant ve kökenlendiği bitkilerin proteomik karşılaştırılmasında, hem mutant bitkilerinde hem de kökenlendiği hatta 462 özdeş protein spotu tespit edilirken, deney gruplarından sadece birinde yer alan ve diğerinde bulunmayan 231 spesifik protein spotu belirlenmiştir. Mutant bitkilerdeki toplam protein lekelerinin %25,7’sinin kökenlendiği bitkilerde bulunmadığı tespit edilmiştir. Transgenik ve transgenik olmayan bitkilerin proteomik karşılaştırılmasında, hem transgenik bitkilerde hem de transgenik olmayan karşılıklarında 576 özdeş protein spotu tespit edilirken, 174 protein spotunun deney gruplarından sadece birinde (transgenik veya transgenik olmayan karşılığı) yer aldığı belirlenmiştir. Bu protein spotlarının 76’sı sadece transgenik bitkilerde tespit edilirken, 98 protein spotu transgenik olmayan bitkilerde belirlenmiştir.



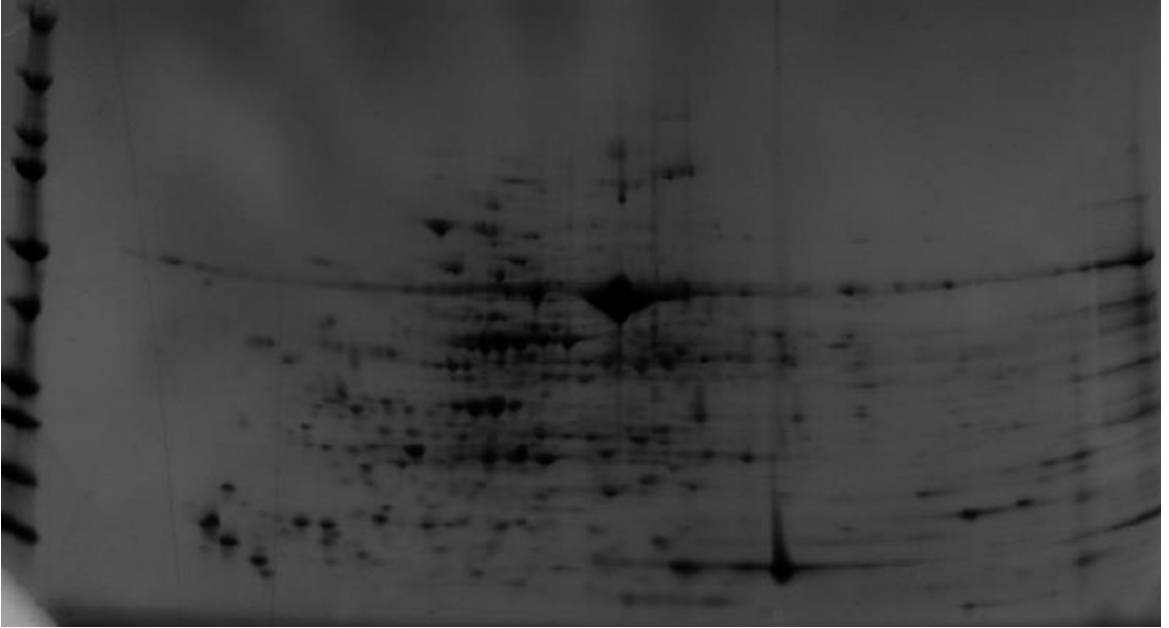
Şekil 4.20: Transgenik soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.



Şekil 4.21: Transgenik olmayan soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.



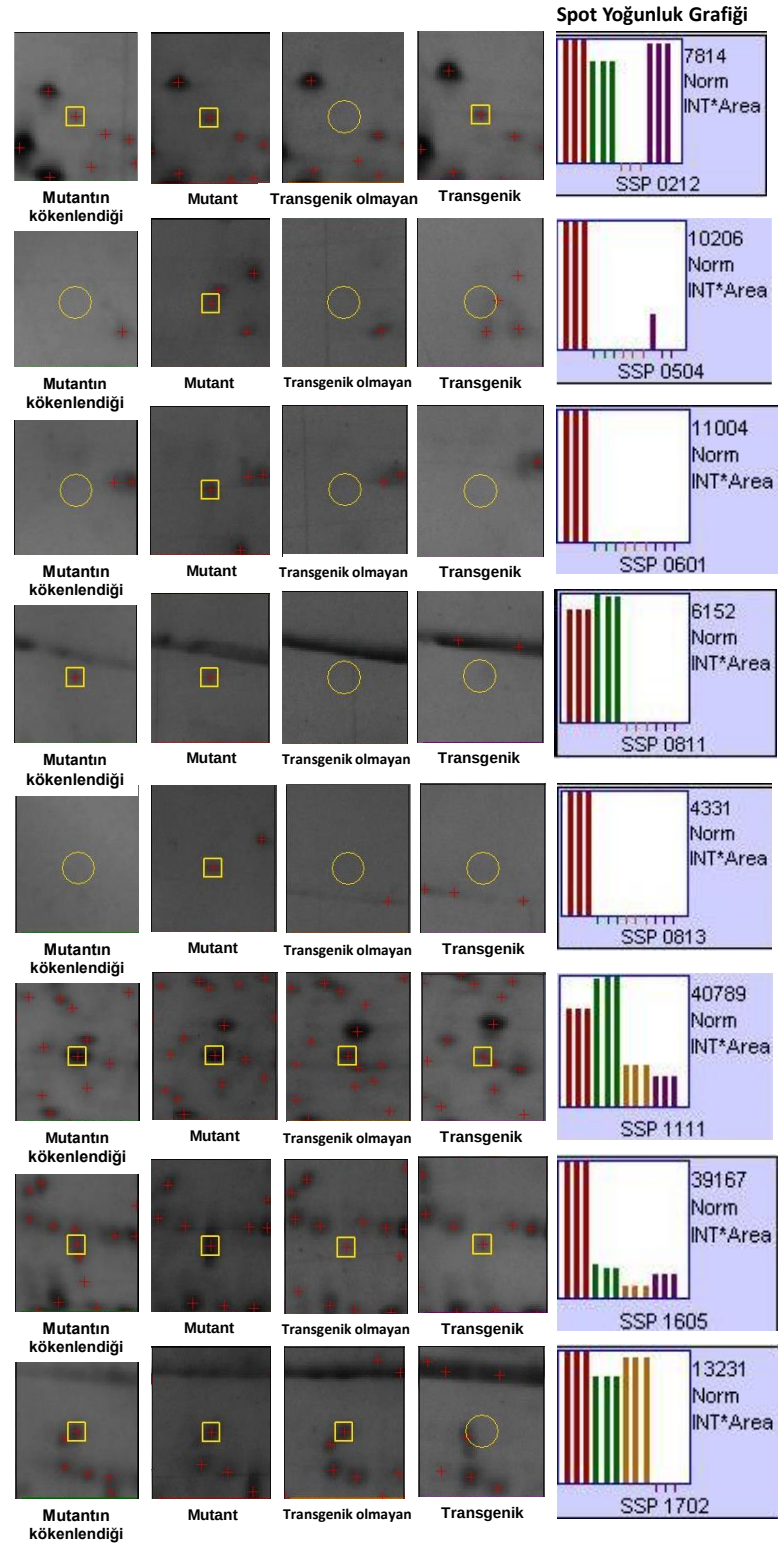
Şekil 4.22: Mutant soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.



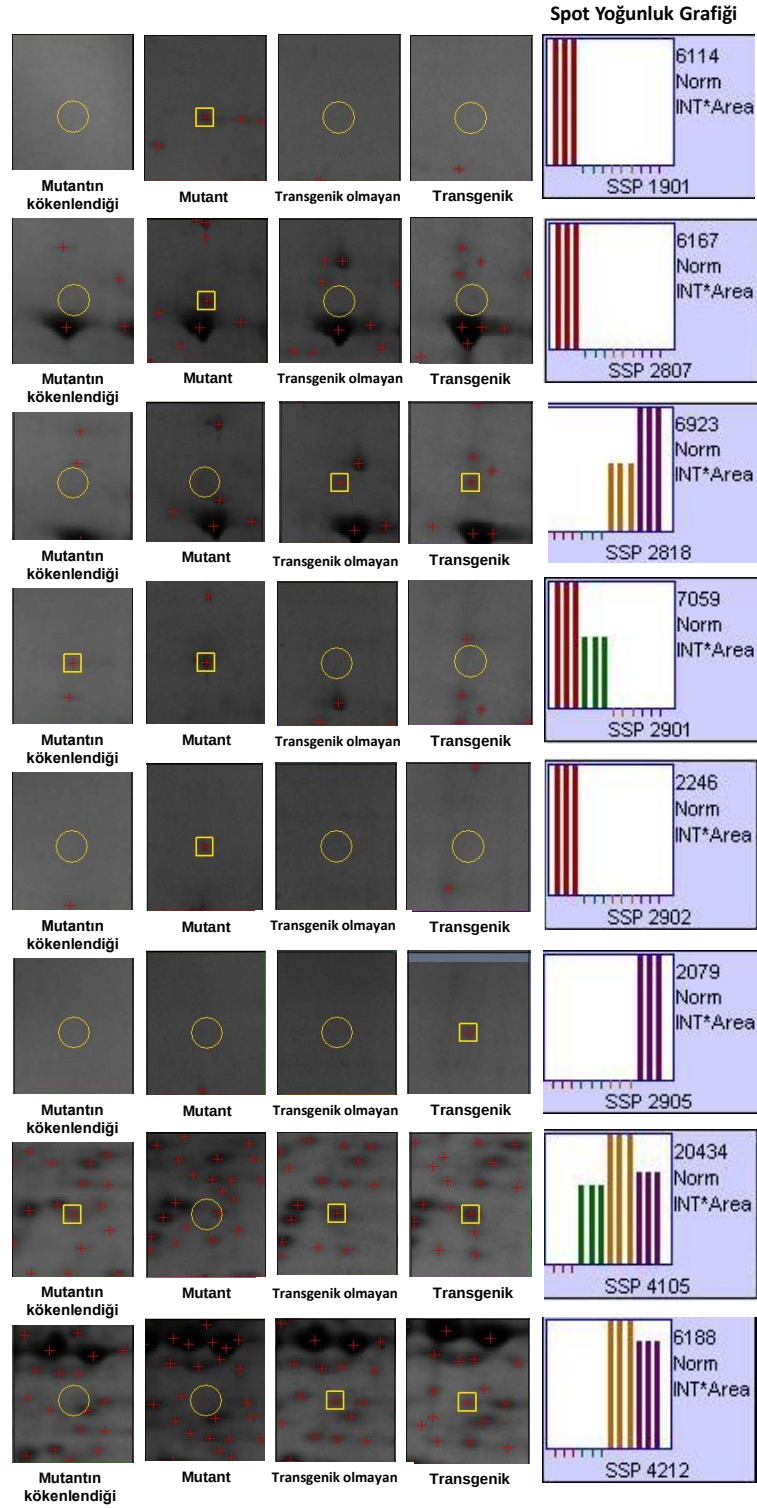
Şekil 4.23: Ataem-07 soya bitkisine ait iki boyutlu protein profili.

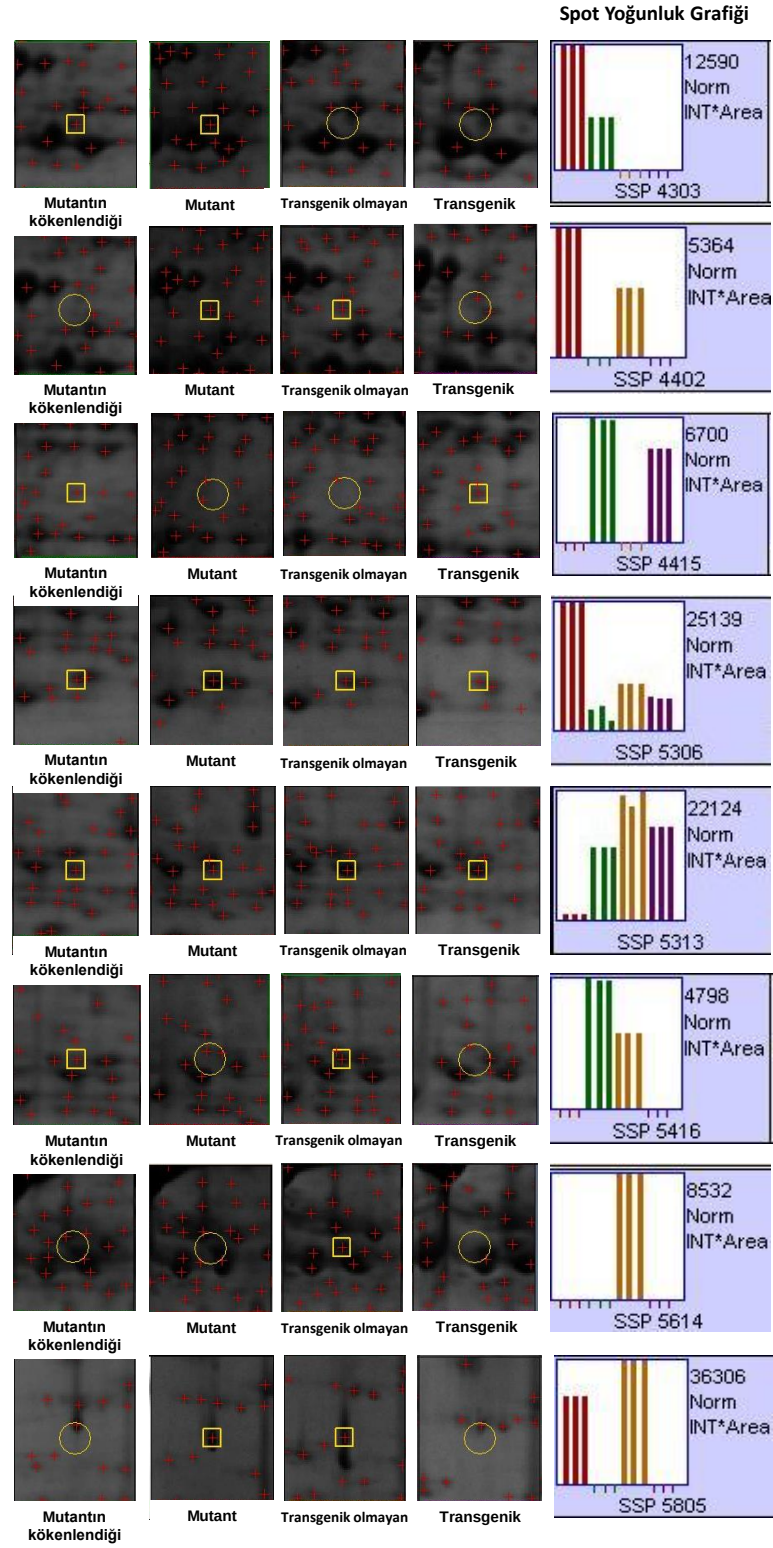
Tablo 4.2: İki boyutlu jel elektroforezi ile elde edilen, deney gruplarına (transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07) ait protein spotlarının sayısı ve oranı.

Grup	Protein spotlarının sayısı	Spesifik spot sayısı	Spesifik spotların yüzdesi (%)	Protein spotlarının sayısı (birleşik)	Her grupta yer alan spotların sayısı
Mutant hat	622	160	25,7	693	417
Mutantın kökenlendiği Ataem-07	533	71	13,3		
Transgenik hat	652	76	11,7	750	
Transgenik olmayan hat	674	98	14,5		

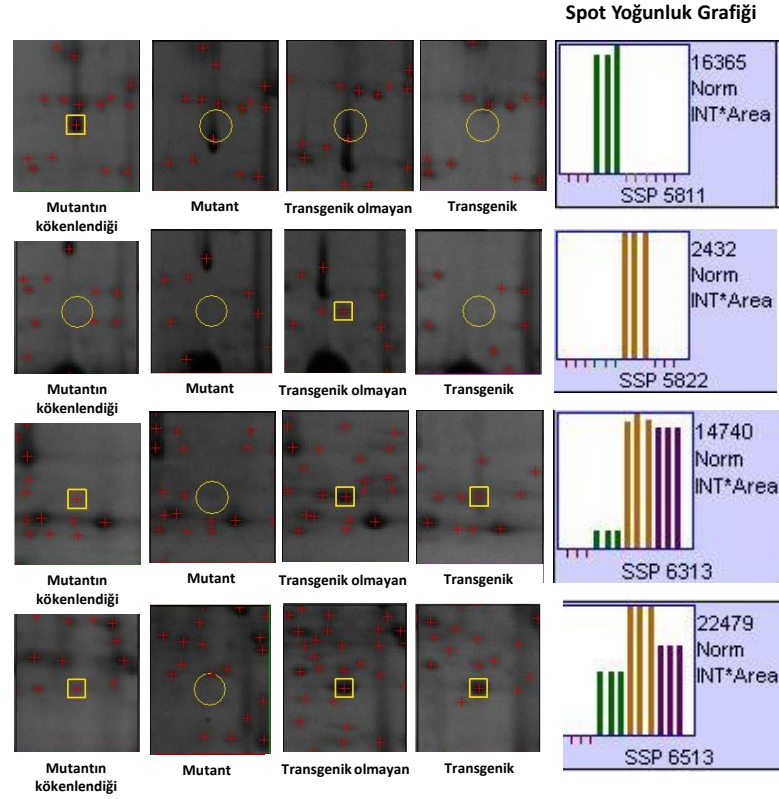


Şekil 4.24: Transgenik, mutant ve bunların geleneksel karşılığı olan bitkilerde seçilen protein spotlarının karşılaştırmalı yoğunluk grafikleri. Kırmızı: Ataem-07, Yeşil: Mutant, Sarı: Transgenik olmayan; Mor: Transgenik.





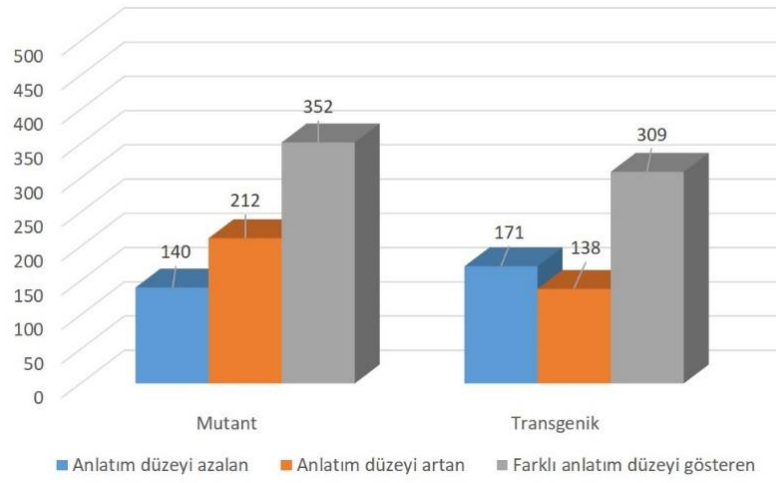
Şekil 4.24 (devam): Transgenik, mutant ve bunların geleneksel karşılığı olan bitkilerde seçilen protein spotlarının karşılaştırmalı yoğunluk grafikleri. Kırmızı: Ataem-07, Yeşil: Mutant, Sarı: Transgenik olmayan; Mor: Transgenik.



Şekil 4.24 (devam): Transgenik, mutant ve bunların geleneksel karşılığı olan bitkilerde seçilen protein spotlarının karşılaştırmalı yoğunluk grafikleri. Kırmızı: Ataem-07, Yeşil: Mutant, Sarı: Transgenik olmayan; Mor: Transgenik.

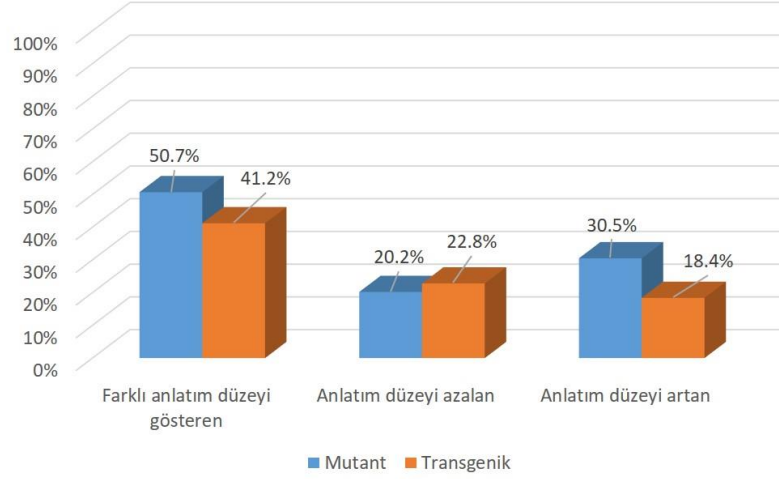
Protein spot eşleştirmelerinin yanı sıra, mutant ve transgenik bitki gruplarında saptanan birçok protein spotunun geleneksel karşılığı olan soya bitkilerine göre anlatım düzeylerindeki farklılıklar (2 kat artan ve azalan) belirlendi. Bu farklılıkların özeti Şekil 4.25'de verilmiştir. Mutantlarda, kökenlendiği hatta göre anlatım düzeyinde farklılık gösteren protein spotlarının oranı %50,7 iken, transgenik bitkilerde, transgenik olmayan hatta göre bu oran %41,2'dir (Şekil 4.26). Mutant ve transgenik bitki grupları arasında anlatım düzeyi azalan protein spotlarının oranları (%) açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken, anlatım düzeyi artan protein spotlarının oranları (%) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (z-testi ile $p < 0,05$). Anlatım düzeyinde farklılık gösteren (azalan veya artan) toplam protein spotlarının oranları da, mutant ve transgenik bitkiler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir.

Farklı Anlatım Düzeyi Gösteren Protein Spotları



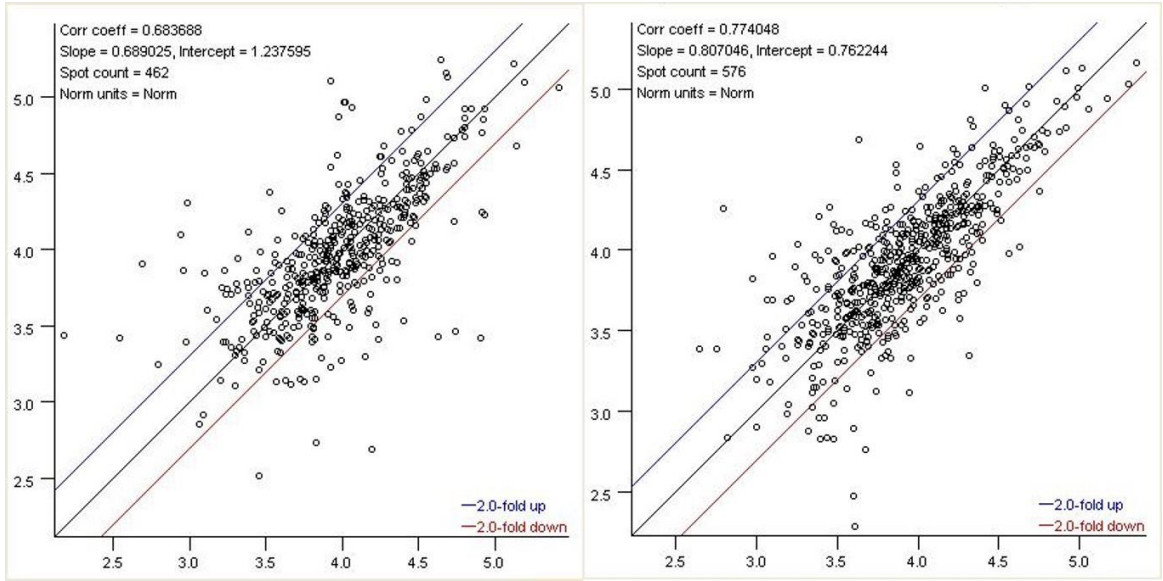
Şekil 4.25: Mutant ve transgenik bitkilerde karşılık gelen geleneksel bitkilere kıyasla farklı anlatım düzeyi gösteren protein spotlarının sayısı.

Farklı Anlatım Düzeyi Gösteren Protein Spot Oranları

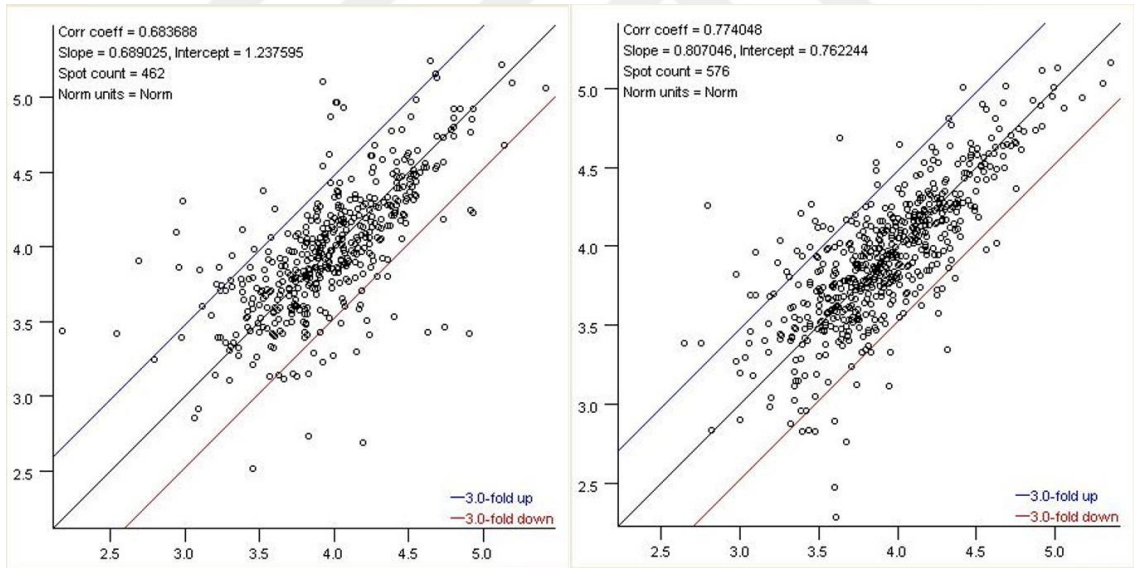


Şekil 4.26: Mutant ve transgenik bitkilerde karşılık gelen geleneksel bitkilere kıyasla farklı anlatım düzeyi gösteren protein spotlarının yüzdesi.

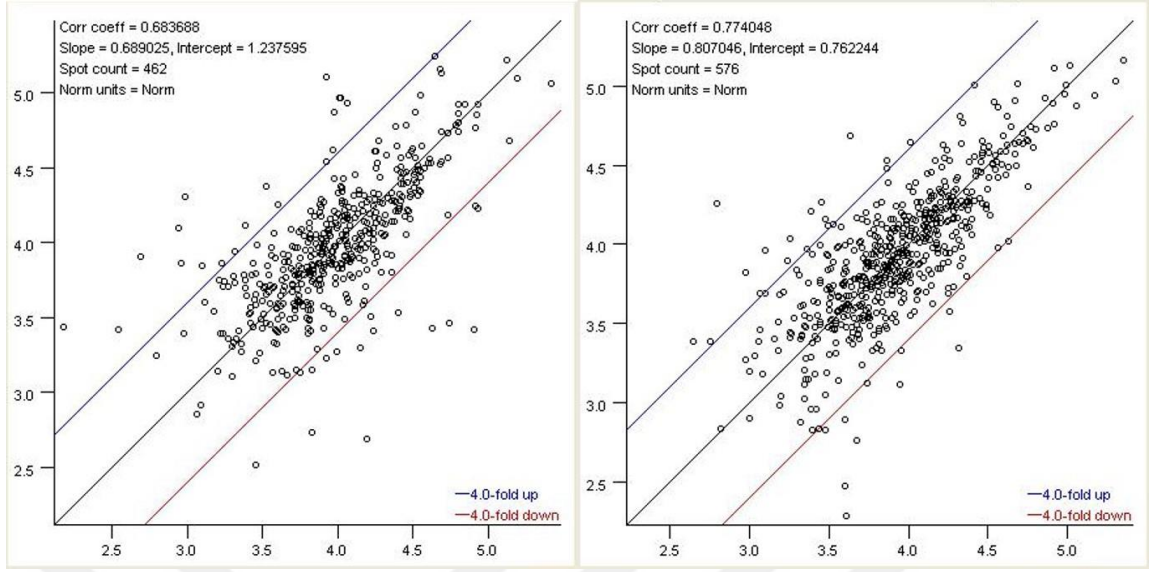
Ek olarak, dağılım grafiği (scatter plot) analizi, mutant bitkilerde anlatım düzeyi 2, 3, 4 ve 5 kat artan ve azalan proteinlerin dağılımı açısından transgenik bitkilerden daha geniş bir yayılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da sırasıyla anlatım düzeyi 2, 3, 4 ve 5 kat artan ve azalan proteinlerin dağılım grafikleri sunulmuştur.



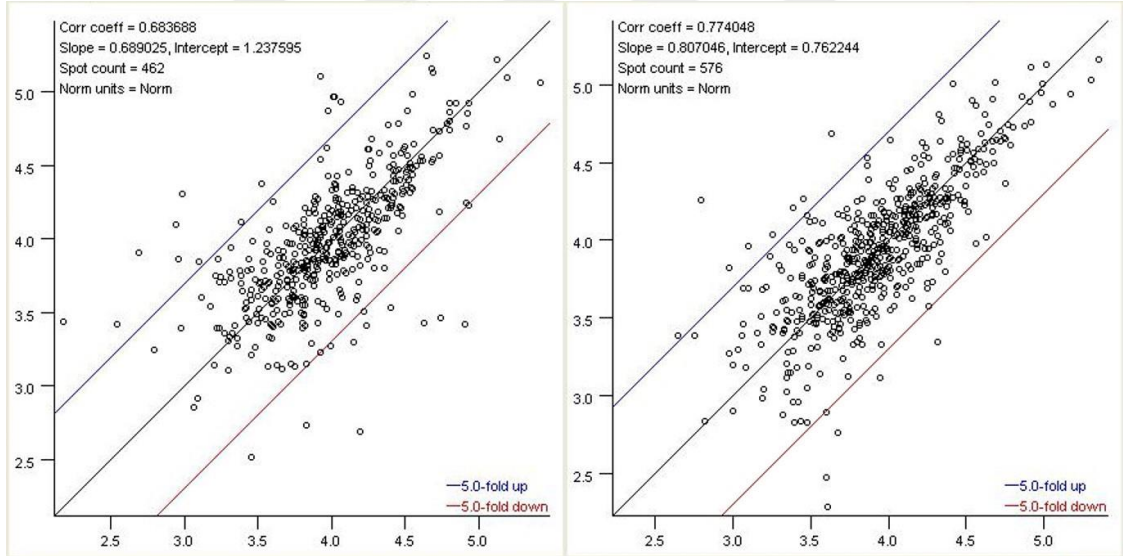
Şekil 4.27: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 2 kat artmış ve 2 kat azalmış proteinlerin dağılım grafiği.



Şekil 4.28: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 3 kat artmış ve 3 kat azalmış proteinlerin dağılım grafiği.



Şekil 4.29: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 4 kat artmış ve 4 kat azalmış proteinlerin dağılım grafiği.

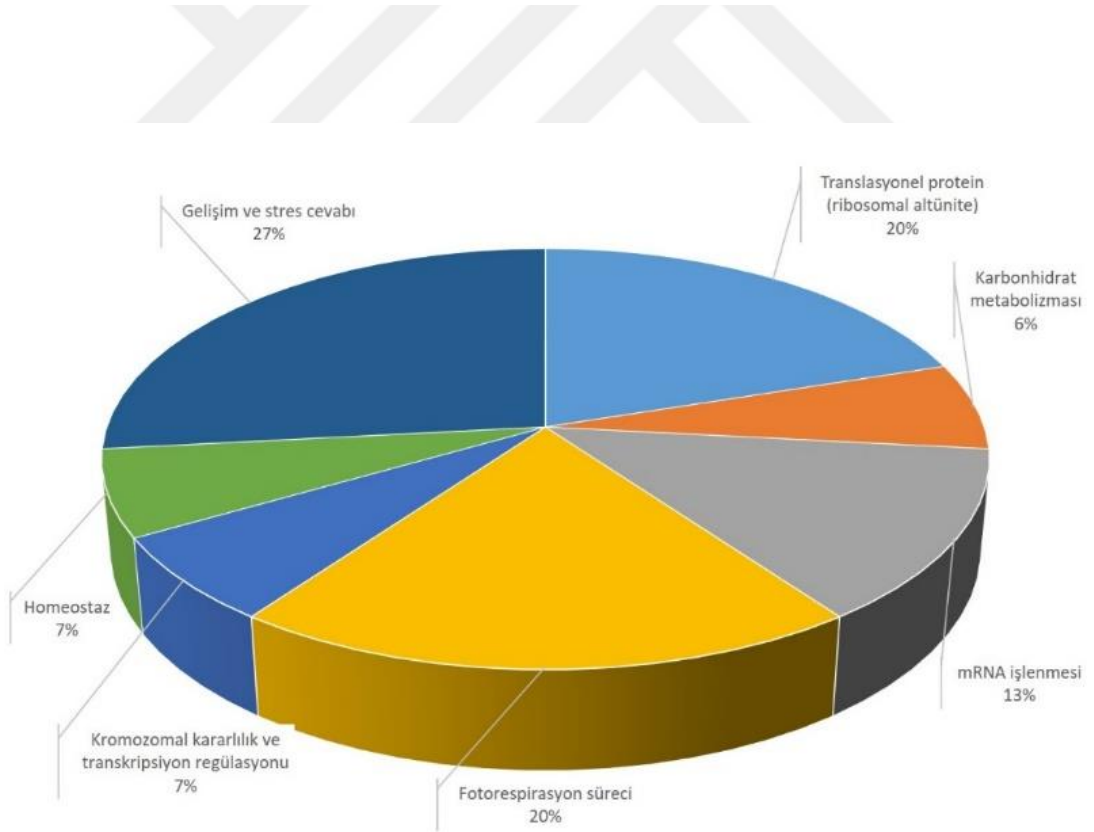


Şekil 4.30: Mutant (sol) ve transgenik (sağ) bitkilerin karşılık gelen geleneksel bitkilere göre anlatım düzeyi 5 kat artmış ve 5 kat azalmış proteinlerin dağılım grafiği.

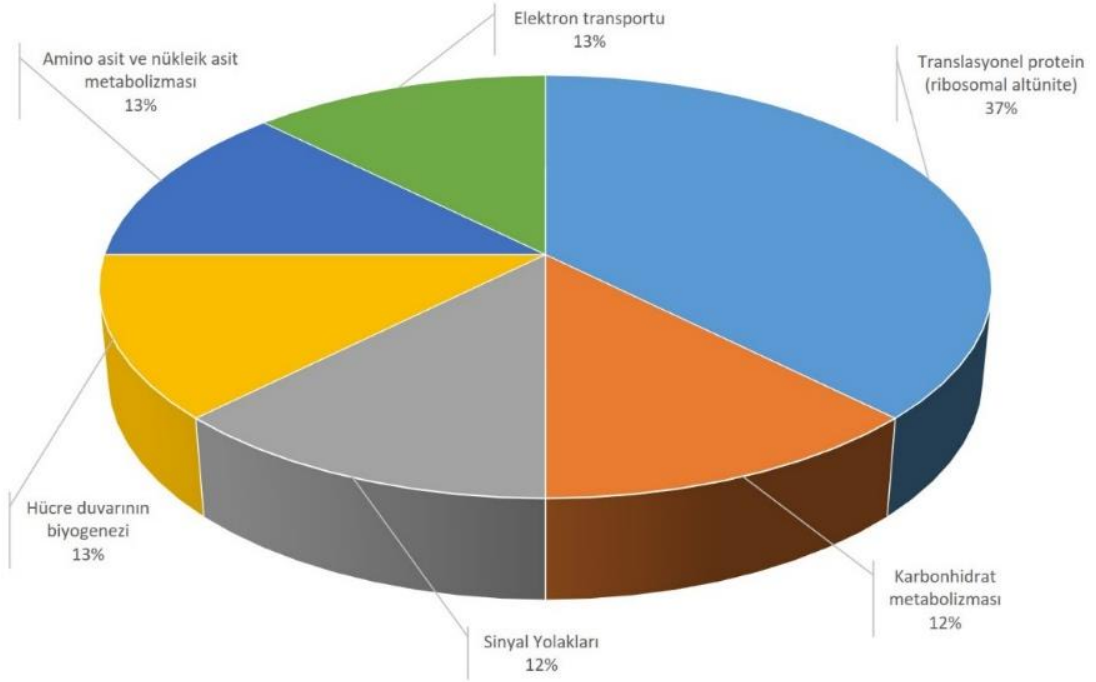
Mutant ve transgenik bitkilerde bulunan ve karşılık gelen geleneksel bitkilere göre farklı anlatım düzeyleri gösteren tüm protein spotları arasından önemli ölçüde değişim gösteren protein spotları seçilmiş ve bu proteinler MALDI-TOF/TOF MS ile analiz edilmiştir. Özellikle mutant ve transgenik bitkilerde, geleneksel karşılıklarına göre keskin bir biçimde anlatım

farklılıkları gösteren 28 proteinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.3). Tanımlanan bu proteinler, biyolojik süreçlerdeki işlevlerine ve rollerine göre sınıflandırılmıştır.

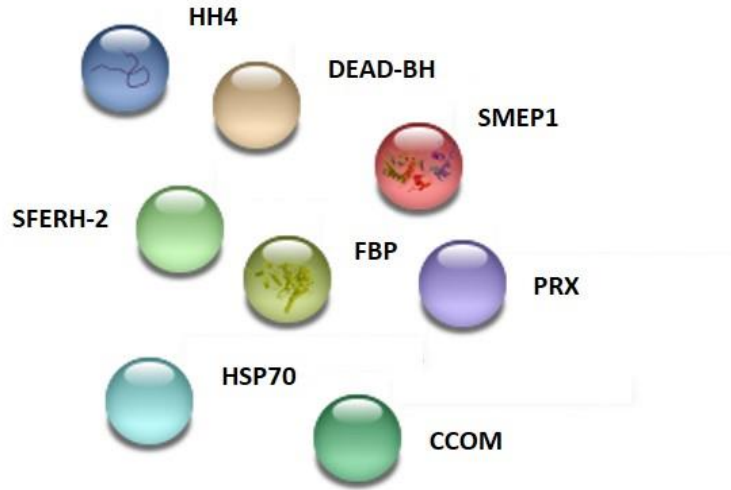
Mutant bitkilerde anlatım düzeyi artan proteinlerin, gelişim, stres cevabı, fotorespirasyon, ribozomal alt birim kurulumu, mRNA işlenmesi, karbonhidrat metabolizması, homeostaz, kromozomal stabilite ve transkripsiyon regülasyonu gibi süreçlerde çeşitli biyolojik rollere sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31). Öte yandan transgenik bitkilerde anlatım düzeyi artan proteinlerin, ribozomal alt birim kurulumu, elektron taşınması, amino asit ve nükleik asit metabolizması, karbonhidrat metabolizması, sinyal yolları ve hücre duvarı biyogenezi ile ilgili süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Şekil 4.32). Fonksiyonel protein-protein etkileşim analizi (STRING) ise, mutant bitkilerde tanımlanan proteinlerin birbiriyle etkileşim göstermediğini (Şekil 4.33), ancak transgenik bitkilerde tanımlanan proteinlerin birkaçının birbiriyle etkileşim gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.34).



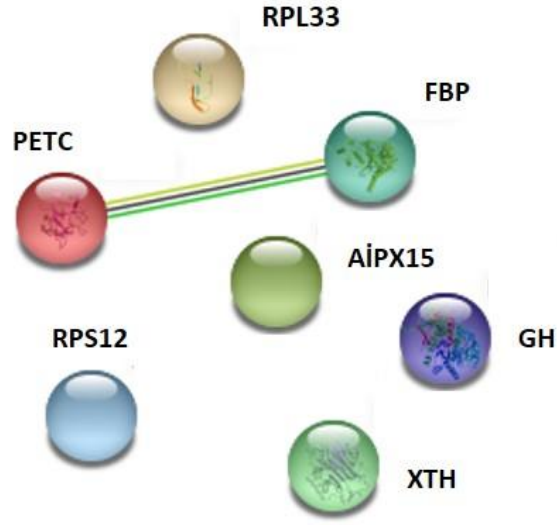
Şekil 4.31: Mutant bitkilerde farklı anlatım düzeyi gösteren proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.



Şekil 4.32: Transgenik bitkilerde farklı anlatım düzeyi gösteren bazı proteinlerin biyolojik işlevlerine göre sınıflandırılması.



Şekil 4.33: Mutant bitkilerde, kökenlendiği soya bitkilerine göre, farklı anlatım düzeyine sahip bazı proteinlerin fonksiyonel ilişki ağı.



Şekil 4.34: Transgenik bitkilerde, transgenik olmayan bitkilerine göre, farklı anlatım düzeyine sahip bazı proteinlerin fonksiyonel ilişki ağı.

Tablo 4.3: Tanımlanan proteinlerin spot (SSP) numarası, erişim kodu (Uniport), protein kütlesi ve hesaplanan pI değeri.

Örnek Numarası	Spot numarası	Erişim Kodu	Protein Adı	Protein Kütlesi	pI
1	212	Q42796	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic	43869	5,17
2	504	Q2PMN9	30S ribosomal protein S15, chloroplastic	10983	10,86
3	601	Q9FVV4	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 55	52403	9,27
4	811	O49224	60S ribosomal protein L41	3128	12,85
5	813	P27066	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52576	6
6	1605	I1J8R4	Peroxidase 49	36141	8,73
7	1702	I1NBD6	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 24	82999	5,61
8	1901	P27066	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52576	6
9	2902	P0CG89	Histone H4	11402	11,48
10	2901	I1MJU7	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	75469	5,22
11	2807	I1MJU7	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	75409	5,22
12	5805	P27066	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52576	6
13	4402	C6T2E2	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	27981	5,55
14	4303	Q94IC4	Ferritin-2, chloroplastic	28716	5,77
15	5811	P27066	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52576	6

Tablo 4.3 (devam): Tanımlanan proteinlerin spot (SSP) numarası, erişim kodu (Uniport), protein kütlesi ve hesaplanan pI değeri.

Örnek Numarası	Spot numarası	Erişim Kodu	Protein Adı	Protein Kütlesi	pI
16	4212	A8Y7Z9	Plastoquinol--plastocyanin reductase	24227	8,63
17	4105	C6SVV7	40S ribosomal protein S12	15285	5,35
18	6513	P93164	Gamma-glutamyl hydrolase	37653	6,08
19	5614	I1JIM3	Fructose-bisphosphate aldolase	38422	6,38
20	2818	Q2PMQ2	30S ribosomal protein S11, chloroplastic	14992	12,1
21	2905	P33082	Auxin-induced protein X15	9200	5,7
22	5822	P27066	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	52576	6
23	5416	P10743	Stem 31 kDa glycoprotein	29262	6,72
24	6313	Q2PMQ2	30S ribosomal protein S11, chloroplastic	14992	12,1
25	4415	Q2PMR3	50S ribosomal protein L33, chloroplastic	7599	9,93
26	5313	Q39857	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 1	34413	8,4
27	1111	Q2PMN9	30S ribosomal protein S15, chloroplastic	10983	10,86
28	5306	P29136	Metalloendoproteinase 1	34023	6,29

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında biyogüvenlik temeline dayalı olarak genetiği değiştirilmiş bitkiler için geçerli temel eşdeğerlilik kapsamında, transgenik, transgenik olmayan, gama radyasyon uygulaması ile geliştirilmiş mutant, mutantın kökenlendiği Ataem-07 soya bitkileri ve bu çeşitten elde edilmiş transgenik saçak köklerde transgenesiz ve mutagenesizin neden olduğu beklenmeyen etkilerin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amacıyla genomik, gen anlatımı ve proteomik çalışmaları yürütülmüştür. Mutasyon ve transgenik ıslah yaklaşımlarının genom ve proteom düzeyinde sebep oldukları değişiklikler belirlenmiş ve beklenmeyen değişimlere neden olma etkileri karşılaştırılmıştır. Bitkilerin gelişimleri sırasında gösterdikleri gelişim farklılıkları incelenmiş ve genom düzeyinde gösterdikleri polimorfizmler moleküler markır yöntemi IRAP ile değerlendirilmiştir. Ayrıca gelişim farklılıkları ile ilişkili olabilecek genetik farklılıkların anlaşılması için gen anlatım analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı ıslah yaklaşımları ile geliştirilen bitkilerin proteomlarındaki farklılıklar ise iki boyutlu jel elektroforezi ve MALDI-TOF/TOF MS analizleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Bitki ıslahı, hem doğal genetik varyasyonu yapay seleksiyonla birlikte kullanarak hem de yapay yollarla yeni varyasyonları indükleyerek genetik yöntemlerden daima yararlanmıştır. Özellikle transgenik teknoloji ile birlikte sayıları giderek artan GDO'ların güvenlik değerlendirmelerinin ayrıntılı bir biçimde gerçekleştirilmesi ve GD ürünlerinin geleneksel çeşitler ile eşdeğer olduğunun analiz edilmesi gerekli hale gelmiştir. Temel eşdeğerlik kavramı, başlı başına bir güvenlik değerlendirmesi olmamakla birlikte, güvenlik değerlendirmesi sürecinde önemli adımlardan biridir. Bu kavram, yeni transgenik ürünler ile geleneksel karşılıkları arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları belirlemek için kullanılır. Potansiyel güvenlik sorunlarının belirlenmesine yardımcı olurken, transgenik bitkilerden elde edilen gıdaların güvenlik değerlendirmesi için en uygun stratejilerden biri olarak kabul edilir (ISAAA, 2021).

Klasik ıslah, mutasyon ıslahı ya da transgenik ıslah programlarıyla geliştirilen bitkilerde hedeflenen karakterlerin yanı sıra hedeflenmeyen ve dolayısı ile beklenmeyen değişikliklerin ortaya çıktığı bilinmektedir (Schnell ve diğ., 2015). GD bitkilerin artan kullanımı ile birlikte biyogüvenlik değerlendirmeleri genel olarak transformasyon sürecinin olası etkilerinden kaynaklanabilecek alerjeniteye, toksisiteye, GD'lerin moleküler karakterizasyonuna, GD

bitkilerin çevresel yayılımına ve bu yayılımın etkilerine odaklanmıştır. Ancak GD bitkilerde transgenin insersiyonu sırasında meydana gelebilecek genom üzerindeki beklenmedik etkilerin yaratabileceği değişimlerle ilişkili araştırmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Yine transgenden üretilen proteinin pleiotropik etkisinin ve transformasyon sürecinin bir parçası olan bitki doku kültürü uygulamalarının neden olabileceği etkiler üzerine incelemeler de kısıtlıdır. Klasik ıslah ve mutasyon ıslahı gibi diğer ıslah yöntemlerinde ise çeşit aday bitkilerin hedeflenen özelliklerine yönelik fizyolojik ve genetik karakterizasyonlar dışında genomlarında ya da proteomlarında ortaya çıkabilecek varyasyonların tamamı değerlendirilmemekte ve test edilmemektedir (Resmi Gazete, 2008). Dahası geleneksel olarak geliştirilmiş ve güvenli kullanım geçmişine sahip bu bitkilerin detaylı karakterizasyonlarına ve değerlendirilmelerine yönelik olarak herhangi bir yasal mevzuat bulunmamaktadır.

Bu tez kapsamında transgenik (GD), transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 soya bitkilerinin gelişimleri incelendiğinde gruplar arasında çok keskin farklılıkların meydana geldiği gözlemlenmiştir. Özellikle mutant bitkilerin, kökenlendikleri soya bitkilerinden gelişim bakımından önemli farklılıklar taşıdıkları ve mutant bitkilerinin boylarının gelişim süresince Ataem-07 bitkilerine göre daha kısa oldukları saptanmıştır. Bu sonuçlar, gama radyasyonu uygulamasından sonra gerçekleştirilen ardışık seleksiyonlar sonucunda bitkilerin fizyolojilerinin ve gelişimlerinin değiştiğini bildiren önceki araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, düşük doz gama radyasyonunun buğdayda (Melki ve Marouani, 2010), çeltikte (Harding ve diğ., 2012), mısırdaki (Marcu ve diğ., 2013), nohutta (Umayathi ve Mullainathan, 2015), hint yağı bitkisinde (Lopes ve diğ., 2017) ve soyada (Kusmiyati ve diğ., 2018) gövde ve kök sistemlerinin gelişimi üzerinde önemli değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Radyasyon uygulaması sonrasında M2-M5 generasyonu mutant bitkilerinin kökenlendikleri bitkilere göre belirgin fenotip ve gelişim farklılıkları gösterdikleri de pek çok kez bildirilmiştir (Hussain ve diğ., 2021; Du ve diğ., 2022). Bitkilerin diğer gelişim özellikleri değerlendirildiğinde ise, mutant bitkilerinin çiçeklenmesinin (R1 evresine geçiş) V9-V11 (dokuzuncu ve onuncu üçlü yaprak) evresinden sonra başladığı, Ataem-07 bitkilerinin çiçeklenmesinin ise V6-V7 (altıncı ve yedinci üçlü yaprak) evrelerinde daha erken bir dönemde başladığı gözlemlenmiştir. Yüksek gama dozlarının genomda meydana getirmiş olduğu varyasyonlar ile protein sentezini, hormon dengesini ve enzim aktivitesini etkilediği ve böylece fizyolojik farklılıklara neden olduğu rapor edilmiştir (Jan ve diğ., 2012). Morfolojik, yapısal ve

fonksiyonel değişikliklerin gama radyasyonu uygulamalarından radyasyon dozu ve süresine bağlı olarak indüklendikleri bildirilmiştir. Benzer şekilde, mutasyon ıslahının neden olduğu gelişimsel farklılıklar transgenik ve transgenik olmayan bitkiler arasında da saptanmıştır. Transgenik bitkilerin, V5 (beşinci üçlü yaprak) evresinde transgenik olmayan bitkilere göre çok daha kısa boylu oldukları gözlemlenmiştir. Çoğu soya çeşidi, yaygın olarak apikal gövde büyümesinin sonlanma zamanlamasına bağlı olarak, “determinant” ve “indeterminant” tipler olarak bilinen iki gövde büyüme fenotipine göre sınıflandırılır. İndeterminant bitkiler çiçeklenmeden sonra ana gövde büyümesine ve nod üretimine devam ederken, determinant bitkiler çiçeklenmeden kısa bir süre sonra ana gövde büyümesini sonlandırırlar (Tian ve diğ., 2010). Transgenik olmayan soya bitkilerinin fide boyu uzunluklarının diğer tüm gruplara göre daha fazla olmasına karşın gelişimlerinde “determinant” bitki tipine benzerlik gösterdiği ve çiçeklenme sonrasında ana gövde büyümesini sonlandırarak yeni nod üretmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca transgenik olmayan soya bitkilerinin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında çok daha kısa sürede ve V5 evresinden hemen sonra üreme evresine geçtiği ve çiçeklendiği, dahası mutant ve Ataem-07 çeşidi soya bitkilerine göre oldukça düşük sayıda baklaya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Transgenik ve transgenik olmayan soya bitkileri arasındaki gelişimsel farklılıkların temelinde yatan sebeplerden birisinin, bitkilerin söz konusu özelliklerinin yönetildikleri genom bölgelerinde transgen insersiyonu nedeniyle meydana gelebilecek rastgele varyasyonlar olduğu düşünülmektedir (Rahman ve diğ., 2012). Ancak bu durumun kanıtlanabilmesi için transgenin insersiyon bölgelerinin belirlenmesi, insersiyon bölgelerinde yaratabileceği varyasyonların saptanması ve bu varyasyonların fenotipe yansımalarının analiz edilmesi gerekmektedir (Anderson ve diğ., 2016). Ayrıca transgenin gene özgü PZR ile belirlenmesi ve neden olabileceği pleiotropik etkilerin araştırılması son derece önemlidir. Rahman ve diğ., 2012, transgenik bitkilerin fenotipik özelliklerinin karşıtlarına göre oldukça farklı olduğunu ve özellikle transgenik bitkilerin, boy ve boğumlar arası uzunluk bakımından karşıt bitkilere göre daha kısa olduklarını ve erken olgunlaşma gösterdiklerini bildirmişlerdir. Byeon ve Back (2014) ise aktardıkları genin biyokütle, salkım sayısı, çiçeklenme süresi ve tane verimi gibi özelliklerde pleiotropik etkilere yol açtığını ve bitki büyümesi ve üremesinde bir sinyal molekölü gibi davrandığını göstermişlerdir.

Bitkilerin transgenik teknoloji gibi çeşitli ıslah yöntemleri ile geliştirilmeleri sonucunda genomlarında meydana gelebilecek varyasyonlar uzun yıllardır çeşitli DNA markır yöntemleri

ile analiz edilmektedir. Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, *in vivo* koşullarda yetiştirilmiş transgenik, mutant, mutantın kökenlendiği Ataem-07 soya bitkilerinin köklerinde ve *Agrobacterium rhizogenes* aracılı transformasyon ile indüklenmiş *in vitro* kültürde geliştirilen transgenik saçak köklerde, genom düzeyindeki dizi farklılıklarının gösterilmesi amacıyla *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonlarına yönelik olarak IRAP moleküler markır tekniği ile analizler gerçekleştirilmiştir. Soya bitkilerinin genomuna, transgen insersiyonu ve transformasyon sürecinin etkisi ile mutasyon ıslahında kullanılan gama radyasyonunun etkisi karşılaştırmalı bir şekilde analiz edilmiştir. Abiyotik ve biyotik streslerin, alglerden kapalı tohumlu bitkilere kadar fotosentetik ökaryotlarda uzun terminal tekrar (LTR) retrotranspozonlarını aktive ettikleri bilinmektedir. Retrotranspozonlar, bitki genomlarının ana bileşeni olduğundan, hareketlerinin anlaşılması bitki genomlarının yapısını ve değişimini anlamak için önemlidir. Genel olarak retrotranspozonlar mobil öğeler olarak çevresel koşullardan kolayca etkilenebilir ve savunma mekanizmalarında önemli roller oynayabilir. Çünkü LTR'ler, aktifleştirilmiş savunma genlerinde bulunan motiflere benzer “cis-acting” elementler içerir (Alzohairy ve diğ., 2014). Çoğu LTR bitki retrotranspozonu normal bitki gelişiminde etkisizdir ve sıklıkla stres koşulları altında veya çevresel değişikliklere yanıt olarak aktive edilir. Bu tür çevresel uyaranlar bazen *in vitro* doku kültürü uygulamaları kaynaklı olabilirken, bazen de sıcaklık, ağır metal, herbisit ve tuz gibi abiyotik stress faktörleri olabilir (Hirochika ve diğ., 1996; Satoh-Nagasawa ve diğ., 2012; Cavrak ve diğ., 2014; Ito ve diğ., 2016; Yılmaz ve diğ., 2018; Cong ve diğ., 2019; Sahin ve diğ., 2020). Finatto ve diğ., 2015, bitki LTR retrotranspozonlarının transkripsiyonel aktivasyonunun ve mobilizasyonunun, hücrel farklılaşmayı veya bitki savunma yanıtlarının aktivasyonunu içeren *in vitro* doku kültürlerinin kurulmasından sonra veya çeşitli biyotik ve abiyotik çevresel zorluklara yanıt olarak ortaya çıkabileceğini göstermiştir. LTR retrotranspozonlar, epigenetik regülasyon yoluyla aktiviteleri ve mutajenik potansiyelleri nedeniyle konakçı genomlarının bütünlüğüne yönelik bir tehdit oluşturabilir (Alzohairy ve diğ., 2014; Cong ve diğ., 2019).

Bu tez çalışmasında tercih edilen, IRAP markır tekniğinin diğer markırlara kıyasla önemli avantajları vardır. Spesifik retrotranspozonların genom boyunca dağılmış olmaları ve kopya sayılarına bağlı olarak çoğaltılabilen fragmanlara sahip olmaları moleküler markır olarak kullanımlarının en önemli avantajları arasındadır. IRAP tekniği için, retrotranspozonların özel bir bölgesine primer bağlanması yeterlidir. RAPD yöntemiyle üretilen sonuçların aksine IRAP

sonuçları tekrarlanabilir. Dahası, IRAP AFLP'den daha ucuz ve daha kolay uygulanabilir. IRAP tekniği, RFLP, SNP'ler, AFLP ve mikrosatellitler gibi diğer markır teknikleri gibi genomdaki büyük değişiklikleri ortaya çıkarabilmek için yararlı bir tekniktir (Schulman ve diğ., 2012). Son yıllarda retrotranspozon temelli moleküler belirteçler, bitkilerde retrotranspozon aktivitesi ile ilişkili genetik çeşitliliğin ve genomik değişikliklerin belirlenmesi için yaygın olarak tercih edilmektedir (Bonchev ve Parisod, 2013; Yuzbasıoglu ve diğ., 2016; Yilmaz ve diğ., 2018; Sahin ve diğ., 2020). IRAP marker tekniğinin DNA düzeyindeki değişiklikleri belirlemek için kullanılabileceği pek çok çalışmada gösterilmiştir (Cheraghi, Rahmani ve Hassanzadeh-Ghorttaped, 2018). Bu tez çalışmasında IRAP-PZR ile analizi gerçekleştirilen *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonlarının her ikisi de, farklı deney gruplarında (transgenik, mutant, Ataem-07 bitkilerinin kökleri ve *Agrobacterium rhizogenes* ile indüklenmiş transgenik saçak kök) birbirinden farklı bant profilleri sergilemiştir. Tüm örnekler arasında *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonlarının polimorfizm oranlarının sırasıyla %0-88 ve %0-75 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, iki retrotranspozonun (*Bagy2* ve *Nikita*) transpozisyon olaylarının ve genom dinamiklerinin, kullanılan ıslah yaklaşımlarından (moleküler/transgenik veya mutasyon ıslahı) ve genomda varyasyona neden olan bitki ıslah yöntemlerinden etkilendiğini düşündürmektedir. Hem *Bagy2* hem de *Nikita* retrotranspozonu için pek çok bant (%61,11) polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Dört grup içerisinde yer alan tüm örneklerdeki toplam bant sayıları değerlendirildiğinde ise *Nikita* retrotranspozonunun (%36,49) *Bagy2* retrotranspozonu ile (%35,62) benzer polimorfik banta sahip olması, her ikisinin de bitki çeşitlerinin arasındaki polimorfizmi göstermede tercih edilebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızla benzer şekilde, *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonları çeşitli bitki türlerinde ve bitki dokularında popülasyonların genomlarını analiz etmek için sıklıkla tercih edilmiştir (Chesnay ve diğ., 2007; Bayram ve diğ., 2012; Marakli ve diğ., 2012; Yilmaz ve diğ., 2014; Cakmak ve diğ., 2015; Sahin ve diğ., 2020). Dendogram analizlerine göre ise tüm retrotranspozonlar için en yüksek polimorfizm *Agrobacterium rhizogenes* aracılı transformasyon ile indüklenmiş *in vitro* kültürde geliştirilen transgenik saçak köklerde saptanmıştır. Ataem-07 soya bitkileri ve transgenik saçak kökleri arasındaki polimorfizm oranı *Bagy2* için %0-69 ve *Nikita* için %0-71'dir. Bu durum hem gen insersiyonunun hem de *in vitro* kültür ortamının transpozon hareketini indükleyebileceğini gösteren çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (Hirochika ve diğ., 1996; Bayram ve diğ., 2012; Yilmaz ve diğ., 2014; Sahin ve diğ., 2020). Transgenik saçak kökleri kendi aralarında *Bagy2* için %0-88, *Nikita* için ise %0-75 arasında farklı polimorfizm

oranları göstermişlerdir. Bu durum her bir transgenik saçak kök kültürünün, transgenin genoma rastgele girişi ve tek bir dallanmış saçak kökten köken almasından dolayı ayrı birer klon olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. *Agrobacterium rhizogenes* aracılı transformasyon ile indüklenmiş *in vitro* kültürlerde polimorfizm oranının, ticari transgenik bitkilerin köklerine göre daha yüksek bulunması, moleküler karakterizasyonu yapılmamış transgenik saçak köklerde birden fazla insersiyonun gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmüştür. Transgenlerin kromozomal DNA'ya insersiyonu, tek kopya ile veya tekrarlı ve çoklu kopyalar ile sonuçlanabildiğinden karmaşık entegrasyon profillerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Giraldo ve diğ., 2021). Bu durum bitki genomunda meydana gelebilecek çoklu insersiyonel etkiler nedeniyle retrotranspozonlar arası bölgelerde dahil olmak üzere farklı varyasyonların indüklenmesine neden olabilir. Transgenik saçak köklerde, transgenin varlığı, retrotranspozonların hareketini T-DNA kopya sayısı ve entegrasyon alanı etkisi yoluyla etkileyebilir. Ticari transgenik bitkilerde ise transformasyon sonrası moleküler karakterizasyonunun yapıldığı ve insersiyonun tek bir noktada gerçekleştiği bitkilerin üretim için seçildiği bilinmektedir (Querci ve Mazzara, 2006). Ayrıca transgenik soya bitkilerinin kökleri ile transgenik olmayan (Ataem-07) soya bitkileri arasındaki polimorfizm oranı *Bagy2* için %20-42 ve *Nikita* için %18-42 olarak bulunmuştur. *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonları transgenik ve transgenik olmayan soya bitkilerinin karşılaştırmalı analizlerinde daha önceki çalışmalarda da tercih edilmiştir. Sahin ve arkadaşları (2020) artan tuz stresi koşulları altında transgenik ve transgenik olmayan soya bitkilerinde *SIRE1*, *Bagy2* ve *Nikita* transpozisyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, bu üç retrotranspozonunun da belirli koşullarda aktif olarak DNA polimorfizmine neden olduklarını ve çalışmamızla uyumlu olarak transgenik soyada *Bagy2* ve *Nikita* polimorfizmlerini bildirmişlerdir.

Ataem-07 ve mutant bitkiler arasında ise *Bagy2* retrotranspozonu açısından %0-25 arasında *Nikita* için ise %0-36 polimorfizm olduğu belirlenmiştir. Ancak Ataem-07 bitkilerinin bireyleri arasında *Bagy2* retrotranspozonu açısından %0-25, *Nikita* için ise %8-31 polimorfizm göstermesi ve mutant bitkilerinin bireyleri arasında *Bagy2* retrotranspozonu açısından %0-17 *Nikita* için ise %8-21 polimorfizm göstermesi, Ataem-07 ve mutant bitkilerin arasındaki polimorfizmin mutasyon ıslah sürecinden kaynaklanmayabileceğini düşündürmüştür. Aynı tür bitkilerin bireyleri arasında doğal olarak meydana gelen bu tür retrotranspozon hareketleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2018). Bitki genomları dinamiktir ve LTR

retrotranspozon ailelerinin prevalansı türler arasında ve hatta aynı türün çeşitleri arasında bile belirgin olan yapısal varyasyonun önde gelen kaynaklarıdır (Vicent ve Casacuberta, 2017; Krasileva, 2019). Mutant bitkilerin kökenlendikleri bitkiler ile benzer bir polimorfizm oranına sahip olmaları, mutasyon ıslahının genom üzerinde *Bagy2* ve *Nikita* retrotranspozonlarının hareketi açısından önemli bir varyasyona neden olmadığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında bitkiler arasında genom düzeyinde belirlediğimiz farklılıkların gen anlatımı bakımından da etkisini incelemek için gen anlatım analizlerinin yapılmasının bilgi verici olacağı düşünülmüştür. Bitki genomunda gelişim ile ilgili genlerin anlatım düzeylerinde farklılık yaratabilecek varyasyonların ortaya çıkması, bitkilerin fizyolojilerinde ve gelişimlerinde önemli farklılıklar yaratabilmektedir. Transgenik ve transgenik olmayan bitkiler ile mutant ve kökenlendikleri Ataem-07 bitkileri arasında gelişim ve çiçeklenme zamanı ile ilişkili sonuçlarda farklılık olduğundan *dt1*, *e1*, *elf3*, *luxb*, *luxc* ve *sız* genlerinin karşılaştırmalı anlatım profilleri incelenmiştir. Bu bitki gruplarının gelişim genlerinin anlatım profillerinde farklılıklar saptanmıştır. Hem mutasyon ıslahı hem de transgenik ıslahın transkriptomik değişikliklere neden olabileceği belirlenmiştir.

İncelenen genlerden *Dt1* geni, soya TFL1b proteini için aday genlerden biri olarak ifade edilmektedir. Bitkilerde sürgün apikal meristeminde (SAM) vejetatif fazdan üreme fazına geçiş, “leafy” (LFY), “apetala1” (AP1) ve “terminal lower1” (TFL1) gibi pozitif ve negatif düzenleyicilerin etkileşimi ile kontrol edilir. *Lfy* ve *ap1*, çiçek meristemi ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini şifreler ve her ikisinin de gelişimin en erken aşamalarından itibaren genç çiçek meristemi boyunca anlatımı yapılır. Çiçeklenme başlangıcında TFL1’in oynadığı rol, LFY ve AP1’inkinin tam tersidir. *Arabidopsis*’in (*Arabidopsis thaliana*) *tfl1* geni fonksiyon göstermeyen mutantlarının erken çiçek açtığı ve SAM’ın terminal bir çiçeğe dönüştürüldüğü gösterilmiştir (Shannon ve Meeks-Wagner, 1991). *Tfl1*’in ektopik olarak anlatımını gerçekleştiren transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde ise, hem vejetatif hem de üreme fazları büyük ölçüde uzamaktadır. Sonuç olarak, bu bitkiler genel morfolojilerinde önemli değişiklikler sergilerler, genişlemiş bir vejetatif yaprak rozeti üretirler, ardından son derece dallı bir çiçeklenme ve sonunda normal çiçekler oluştururlar. *Arabidopsis*’teki *tfl1* geni, çiçek meristem kimlik genlerinin (meristem-identity genes) anlatımının arttırılmasını geciktirerek SAM’ın belirsiz büyümesini sürdürmesini sağlar (Ratcliffe ve diğ., 1998). Bitki mimarisi için

temel genlerden biri *dt1* genidir ve bu genin dört bağımsız yanlış anlamlı (missens) aleli, “determinant” bitki tipinin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Pek çok çalışmada gerçekleştirilen genetik analizler, soyanın “determinant” özelliklerinin “determinate stem (*dt1*)” lokusunda yer alan çekinik bir alel tarafından kontrol edildiğini ortaya koymuştur (Liu ve diğ., 2010). Bitkilerde genel olarak “terminal flower (*tfl1*)” olarak bilinen genlerin ortoloğu olarak ifade edilen soya *tfl1a* ve *tfl1b* genlerinin farklı dokularda ve farklı gelişim evrelerinde farklı transkripsiyonel profiller ortaya koyduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2010). *Tfl1b* kök ve sürgün apikal meristeminde (SAM'ler) anlatım gösterirken, *Tfl1a* ise esas olarak olgunlaşmamış tohumda anlatım göstermiştir. Özellikle *tfl1b* transkripti, erken vejetatif büyüme sırasında sürgün apikal meristeminde birikmektedir. *Tfl1b* gövde gelişiminde etkin rol oynamasının yanı sıra daha fazla nod üretilmesine ve terminal çiçeklenmenin gecikmesine neden olmaktadır. Bitkilerde gövde gelişimi ve çiçeklenme üzerine gerçekleştirilen araştırmalarda, virus kaynaklı gen susturma (VIGS) çalışmaları ile *dt1* ve *tfl1b* genlerinin özdeş genler oldukları gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2010). Çalışmamızda *dt1* geninin anlatım düzeyini incelediğimizde transgenik olmayan bitkiler başta olmak üzere mutant ve Ataem-07 soya bitkilerinde de *dt1*'in anlatımlarının transgenik bitkilere göre düşük olduğu saptanmıştır. Dt1 transkriptlerinin düşük düzeyde olması, Ataem-07 ve transgenik olmayan bitkilerin erken çiçeklenme özellikleri ile uyum sağlamakla birlikte, çiçeklenmeleri daha geç başlayan ve vejetatif gelişimleri daha uzun süre alan mutant bitkilerin özellikleri ile uyumlu değildir. Ayrıca mutant ve Ataem-07 bitkilerinin transgenik olmayan bitkilerden farklı olarak, çiçeklendikten sonra, ana gövde uzamasına devam etmelerinin temelinde diğer olgunluk ve gelişim genlerinin etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda dokuz olgunluk geni (*e1-e8* ve *J*) moleküler olarak tanımlanmış ve soyanın çiçeklenme ve olgunlaşmasının kontrolünde önemli roller oynadığı belirlenmiştir. Soyada hem olgunluk (*e1*, *e2*, ve *e3* gibi) genleri hem de yapısal genler bitki boyunu etkilemektedir. Bu tez çalışmasında da bitki boyu, çiçeklenme ve olgunlaşmanın kontrolünde görev aldığı bilinen *e1* geninin anlatım profilleri de incelenmiştir. Liu ve diğ., (2020), *e1-e4*'ün farklı alel kombinasyonlarının etkisini daha fazla araştırmak için, bu dört *E* lokusunda tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP'ler) dayalı Kompetitive Alel Spesifik PZR (KASP) gerçekleştirmiş ve olgunluk açısından geniş bir yelpazeye sahip bitki çeşitlerinde *e1-e4* genlerini genotiplendirmişlerdir. Bu çeşitlerde *e1-e4* genleri için toplamda yirmi bir alel kombinasyonu

tanımlanmış ve dört *E* lokusundaki çeşitli mutasyon kombinasyonları, soya çeşitlerinin çiçeklenme ve olgunluk süresinin çeşitliliğine yol açmıştır. Dört *E* lokusunun hepsi için mutasyona sahip çeşitler çok erken çiçeklenmiş ve olgunluğa erişmiştir. Özellikle *e1* ve *e2*, soyanın çiçeklenme ve olgunlaşma süresini önemli ölçüde etkilemiştir. Bir kısa gün bitkisi olan soya büyüme mevsimi boyunca daha yüksek enlemlerde uzun gün koşullarında fitokrom A genlerinin (*e3* ve *e4*) ve çiçek repressörü *e1*'in fonksiyonunun engellenmesi ile çiçek açma yeteneği kazanabilmektedir. Çalışmamızda Ataem-07 bitkilerinin çiçek repressörü *e1* geninin anlatımında mutant bitkilerine göre ortalama 2,27 kat daha az anlatım göstermesi, Ataem-07 bitkilerinin mutant bitkilerine göre daha erken çiçeklenmesi ile uygunluk göstermektedir. Benzer şekilde erken çiçeklenme gösteren transgenik olmayan bitkiler de *e1* geninin anlatımında transgenik bitkilere göre 2,85 kat daha az anlatım göstermiştir. Bu durum, *e1* geninin transgenik olmayan bitkilerde çiçeklenmenin erken bir şekilde V5 evresinde gerçekleşmesi ve çiçeklenme sonrasında ana gövde gelişiminin devam etmemesi ile uygunluk göstermektedir. *E1* geninin anlatımının yüksek olduğu transgenik bitkilerde ise V5 evresinde çiçeklenme gözlenmemiştir. Miranda ve arkadaşları (2020) çeşitli soya hatları ile birden fazla ortamda tarla denemesi kurarak gerçekleştirdikleri çalışmada, çiçeklenme günlerini (DTF), olgunluk günlerini (DTM) ve bitki boylarını karakterize etmiş ve genotip ile fenotipi ilişkilendirmek için her bir soya hattına yönelik alelik kombinasyonları belirlemişlerdir. Sonuçlar, DTF ve DTM için genotipe dayalı önemli farklılıklar olduğunu göstermiş ve bu genlerin farklı varyant alellerinin karşılaştırılmasına izin vermiştir. *J* ve *e1*'in mutant alellerinin, DTF ve DTM üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve bu genlerin alellerinin, DTF için birbirleriyle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Ayrıca soyadaki fotoperiyot duyarsızlığı, *e1*, *e3* ve *e4*'teki çeşitli alellerin kombinasyonları tarafından kontrol edilir (Tsubokura ve diğ., 2013, 2014; Xu ve diğ., 2013; Zhai ve diğ., 2015). Soya olgunluk lokusları (maturity genes), *e1* ile *e4*, bitki çeşitlerinin farklı enlemlere uyum sağlama yeteneğini belirleyen ana çiçeklenme lokuslarıdır. Yapılan araştırmalarda *e1*, *e3* ve *e4* lokuslarındaki alellerden bir kaçında fonksiyon kaybı yaratılarak elde edilen alelik kombinasyonları (Tsubokura ve diğ., 2013, 2014; Xu ve diğ., 2013; Jiang ve diğ., 2014), bitkilerde fotoperiyoda karşı çeşitli hassasiyetler ortaya çıkarmıştır. Özellikle *e1lb* (*E1-Like b*; *E1* homeologu) alelinde fonksiyon kaybı olan soya hatlarının çiçeklenme lokusu (FT) ortologları *ft2a* ve *ft5a*'nın anlatımında artış gösterdiği ve uzun gün koşullarında *e1lb* fonksiyonu olanlardan daha erken çiçeklendiği gösterilmiştir (Zhu ve diğ., 2019). Bu durum uzun gün koşullarında (16 saat aydınlık 8 saat karanlık) yetiştirilen ve erken

çiçeklenme gösteren Ataem-07 bitkilerinde *e1* geninin anlatımının azalması ile uygunluk göstermektedir.

Bu tez çalışmasında gen anlatım analizi gerçekleştirilen ve transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 bitki gruplarının gelişimlerdeki farklılıklar ile ilişkili olduğu düşünülen diğer genler sirkadiyen ritim ile ilişkili akşam kompleksini oluşturan *elf3*, *luxb* ve *luxc* genleridir. Sirkadiyen saat, büyüme, çiçeklenme, fotosentez, nişasta metabolizması ve hastalık direnci dahil olmak üzere çoklu yolların düzenlenmesini sağlar (Greenham ve McClung, 2015). Bitkilerde sirkadiyen saat sistemi, uygun çiçeklenme zamanlamasını sağlamak için çevresel sinyalleri endojen ritimlerle senkronize etmedeki rolüyle bilinmektedir (Gehan ve diğ., 2015). Çalışmamızda mutant bitkilerde *elf3* geninin anlatımı Ataem-07 bitkilerine göre yaklaşık 3,4 kat artış göstermiştir ve Ataem-07 bitkileri mutant bitkilerine göre erken çiçeklenme göstermiştir. Benzer şekilde, transgenik bitkilerde *elf3* geninin anlatımı transgenik olmayan bitkilere göre 5,5 kat artış göstermiştir ve transgenik olmayan bitkiler transgenik bitkilere göre erken çiçeklenme göstermiştir. Akşam kompleksinin (ELF3 ELF4-LUX) sirkadiyen ritmin korunmasında ve büyüme ve gelişmenin senkronize edilmesinde hayati bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Huang ve Nusinow, 2016). ELF4-ELF3-LUX proteinlerinin oluşturduğu kompleks, bir bitkide sirkadiyen saatin ayrılmaz bir bileşeni olarak düşünülmektedir. LUX Arrhythmo (LUX) bu kompleksin ana bileşenlerinden birisi olarak sirkadiyen ritimde ve çiçeklenmede önemli bir rol oynamaktadır (Liew, Singh ve Bhalla, 2017). Mutant bitkilerde *luxb* geninin anlatımı *elf3* geni ile uyumlu bir şekilde Ataem-07 bitkilerine göre 3 kat artış göstermiştir. Transgenik bitkilerde ise transgenik olmayan bitkilere göre bu oran yaklaşık 7 kat olarak belirlenmiştir. Diğer bir gen *luxc*'nin anlatımı, *elf3* ve *Luxb* genlerinin anlatımı ile uyumlu olarak, mutant bitkilerde Ataem-07 bitkileri ile karşılaştırıldığında 2 kat artmışken, transgenik bitkilerde transgenik olmayan bitkiler ile karşılaştırıldığında yaklaşık 9 kat artış göstermiştir.

Bu tez çalışmasında anlatım profili analiz edilen gelişim ile ilişkili diğer bir gen, *siz1a* genidir. Hem mutant hem de transgenik bitkilerde karşıtlarına göre *siz1a* geninin anlatımında artış belirlenmiştir. Ataem-07 ve transgenik olmayan bitkilerin sırasıyla mutant ve transgenik bitkilere göre gelişimsel farklılıklar göstermesi, *siz* geninin anlatımındaki farklılıklar ile uyum göstermektedir. *Siz1*, *Arabidopsis* bitkisinde hedef proteinlerin translasyon sonrası SUMO

modifikasyonuna aracılık eden ve böylece gelişimsel süreçleri ve hormonal ve çevresel stres tepkilerini düzenleyen küçük bir ubikuitin ile ilişkili değiştirici (SUMO) E3 ligaz olarak tanımlanmıştır. *Siz1* geni SUMOlasyon ile ilişkili modifikasyondan sorumlu bir gendir. SUMOlasyon, bağışıklık, stres tepkileri, DNA onarımı ve transkripsiyonel düzenleme dahil olmak üzere biyolojik süreçleri derinden etkiler (Enserink, 2015). Ayrıca, SUMOlasyon, protein-protein etkileşimlerini, protein hedeflemeyi, enzimatik aktiviteyi ve protein stabilitesini etkileyen hızlı ve geri dönüşümlü posttranslasyonel modifikasyondur (Cubéñas-Potts ve Matunis, 2013). Soyada SUMO E3 ligaz, SIZ1a ve SIZ1b olarak karakterize edilmiştir. *Siz1a*, kök, gövde, yaprak, çiçek ve tohumda *siz1b*'den daha yüksek düzeylerde anlatım göstermesine karşın, her iki gen de SUMO E3 ligaz aktivitesine sahip proteinleri şifrelemektedir (Cai ve diğ., 2017). Çalışmamızda transgenik olmayan bitkilerin tamamında *siz* geninin anlatımının azalmış olması, bu bitkilerin V5 sonrası gövde büyümesini sonlandırarak yeni nod üretmemesi ile uyum göstermektedir. *Siz1a* veya *siz1b*'nin, *siz1* genleri susturulmuş *Arabidopsis thaliana*'da heterolog anlatımı, cücelik de dahil olmak üzere *Arabidopsis* mutantının mevcut fenotipini yeniden düzenlemiştir (Cai ve diğ., 2017).

Bu tez çalışmasında, farklı ıslah yöntemleri ile geliştirilmiş bitkilerin proteomlarında da genomdaki beklenmeyen değişimlerin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülen farklılıklar tespit edilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile hem gama radyasyonunun kullanıldığı mutasyon ıslah yaklaşımı ile geliştirilen mutantın, kökenlendiği Ataem-07 soya çeşidine göre hem de genetik mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen transgenik bitkinin transgenik olmayan bitkiye göre proteomlarında önemli farklılıklar belirlenmiştir. Proteomik, yaygın olarak kabul gören bir yöntem haline gelmiştir ve son 20 yılda mutasyon ıslahı ve moleküler ıslah çalışmalarında birçok bitki türünün analizi için kullanılmıştır (Wang ve diğ., 2015; Mesnage ve diğ., 2016; Çelik ve diğ., 2021). Özellikle, kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmiş 2-DE, bitki proteomlarının analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve yüzlerce protein bu yöntemle tanımlanabilmektedir (Gong ve diğ., 2012; Tan ve diğ., 2017; de Campos ve diğ., 2020; W. Liu ve diğ., 2020). Profil temelli proteomik yaklaşımlar genetik modifikasyonun sebep olduğu genetik değişikliklerin kantitatif ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine izin verir. Profil temelli proteomik yaklaşımlardaki gelişmeler genetik transformasyonun sebep olduğu hücre içi ve bitki metabolizmasındaki değişikliklerin anlaşılması için de önemli fırsatlar sunmaktadır (Davies, 2010). Bu yaklaşımların kullanılması ve güvenilir kabul edilen çeşitlerin referans

olarak alınması ile birlikte yeni varyete profillerinin hızlı bir biçimde değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir (Davies, 2010; Liu ve diğ., 2015; Mesnage ve diğ., 2016). Bitkilerde beklenmedik karakterlerin ortaya çıkmasına neden olabilecek potansiyeldeki etkilerin, hem transgenik, hem mutasyon, hem de herhangi bir geleneksel ıslah yaklaşımı için de benzer biçimde varyasyona neden olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Barros ve diğ., 2010; Anderson ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2018, 2021).

Transgenik bitkinin toplam protein spot sayısının transgenik olmayana göre %41,2'sinin farklı düzeyde anlatım göstermesi transgenesizin genomda ve dolayısıyla proteomda çeşitli varyasyonlara neden olabileceğini göstermiştir. Transgenik ve transgenik olmayan soya bitkilerinin 2-DE ile elde edilen jellerinin karşılaştırılmasında, transgenik soya bitkisinde 76, transgenik olmayan soya bitkisinde ise 98 spesifik protein spotu belirlenmiştir. Sadece transgenik bitkide belirlenen 76 protein spotunun toplam protein spot sayısına oranı %11,7'dir. Bu durum beklenmedik etkilerin temelinde yatan süreçler ile açıklanabilir. Transgenler, insersiyon bölgesinde yeniden düzenlenmelere neden olabilir ve potansiyel olarak doğal genlerin işlevini bozabilir. Transgenlerin neden olabilecekleri insersiyon etkilerine ek olarak, somaklonal varyasyon ve pleiotropi gibi diğer mekanizmalarla da beklenmedik etkileri indükledikleri bilinmektedir. Tüm bu değişiklikler ile birlikte meydana gelebilecek post-translasyonel modifikasyonlar proteom üzerinde önemli varyasyonlara neden olmaktadır. Genomdaki varyasyonların belirli oranda da olsa proteomda değişikliklere neden olabileceği bir çok çalışmada gösterilmiştir (Zolla ve diğ., 2008; Brandão, Barbosa ve diğ., 2010; Barbosa ve diğ., 2012; Wang ve diğ., 2015; Tan ve diğ., 2017; W. Liu ve diğ., 2020). Zolla ve diğ., (2008) genetik modifikasyon nedeniyle ortaya çıkabilecek beklenmedik etkilerin tanımlanabilmesi için gerçekleştirdiği proteomik çalışmada, gerçekleştirdikleri iki boyutlu jel elektroforez yöntemi ile transgenik bitkilerdeki 43 proteinin izogenik kontrollerine göre anlatım düzeylerinin farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu değişimlerin tek bir genin genoma insersiyonu ile ilişkili olabileceğini ve gen insersiyonuna bağlı genomun yeniden düzenlenmesinin bir sonucu olarak transgenik bitkilerin aynı çevresel koşullar altında farklı cevaplar verdiklerini rapor etmişlerdir. Bu tez çalışması, transgenik bitkisine spesifik olan ve transgenik olmayan bitkide yer almayan proteinlerin translasyonel protein-ribozomal altünitesi (translational protein-ribosomal subunit assembly) (%37), amino asit ve nükleik asit metabolizması (% 13), elektron transportu (% 13), hücre duvarı biyogenezi (%13), karbonhidrat

metabolizması (%12), sinyal yolları (%12) olarak altı fonksiyonel kategoriye dağıldığını ortaya koymuştur. Protein-protein etkileşim analizleri ise etkileşimde bulunan proteinlerin karbonhidrat metabolizması proteinleri ve elektron transport proteinleri olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, ticari transgenik Bt+CpTI SGK321 pamuk çeşidi ile onun transgenik olmayan SY321 yabani çeşidinin karşılaştırmalı proteomik analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmada, 58 farklı anlatım göstermiş proteinden bir kısmının karbonhidrat taşınması ve metabolizması, post-translasyonel modifikasyon ile ilişkili şaperonlar ve enerji üretimi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2015). Ayrıca pamuk genomuna transgen insersiyonunun karbon fiksasyonunu, fotosentezi, glioksilat ve dikarboksilat metabolizmasını ve oksidatif pentoz fosfat yolunu etkilediği gösterilmiştir. Luo ve diğ., (2009) transgenik ve yabani endosperm hücreleri arasındaki proteomik karşılaştırma sonucunda 103 proteinin anlatımlarında önemli farklılıklar belirlemişlerdir. Özellikle, transgenik pirinç endospermde endojen depolama proteinleri ve karbonhidrat metabolizmasıyla ilgili proteinlerin çoğunun anlatımında azalma meydana geldiği diğer bir yandan 26S proteazomla ilgili proteinler ve şaperonların anlatımında artış meydana geldiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, transgenik ve transgenik olmayan bitkiler arasında anlatım düzeyinde farklılık gösteren proteinlerin depolama proteinleri (%33), hücre savunma ve kurtarma (%25), enerji (%17) ve metabolizma (%17) olarak dört fonksiyonel kategoriye ayrıldığı gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2015). Yine çalışmamızla benzer bir şekilde NK603 ile onun izogenik kontrolünün karşılaştırıldığı çalışmada, bu bitkilerin kabul edilebilir ölçüde eşdeğer olmadığı rapor edilmiş ve proteom profilinde glikoliz ve TCA döngüsündeki enzimlerin düzeylerinde değişikliklerin meydana geldiği kanıtlanmıştır (Mesnage ve diğ., 2016). Ayrıca transgenik ve transgenik olmayan bitkilerin proteomik farklılıkların 2-DE tekniği ile analiz edildiği ve protein farklılıklarının farklı biyolojik fonksiyonlara sahip olduğunu bildiren pek çok çalışma bildirilmiştir (Vidal ve diğ., 2015; Tan ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2021). Fitaz-transgenik (PT) ve transgenik olmayan (NT) mısır tohumlarının 2-DE ve iTRAQ tekniklerini kullanarak karşılaştırmalı proteomik analizleri gerçekleştirildiğinde PT'de 106 anlatımı azalan ve 42 anlatımı artan protein dahil olmak üzere toplam 148 anlatım farklılığı gösteren protein (DEP) tanımlanmıştır. Fonksiyonel sınıflandırma sonucunda post-transkripsiyonel modifikasyonlar, ribozomal proteinler ve ısı şoku proteinleri ile ilişkili DEP'lerin transgen insersiyonuna cevap olarak ortaya çıkabileceği bildirilmiştir. Protein-protein etkileşim analizleri ise ribozomal proteinler ve ısı şoku proteinleri arasında interaksiyonların olduğunu göstermiştir (Tan ve diğ., 2017).

Liu ve diğ., 2021, genetik olarak modifiye edilmiş (GD) iki çeltik hattını (T2A1 ve T1C-19) ve bunların transgenik olmayan izogenik çeşidini (MH63), genetik modifikasyonun beklenmedik etkilerine yönelik olarak iTRAQ (isobaric tag-based methodology for peptide relative quantification) temelli proteomik analizler ile değerlendirmişlerdir. Çalışmada iki GD çeltik hattının tohumlarında 54 ortak farklı şekilde anlatım gösteren protein belirlenmiştir. Bu ortak farklı şekilde anlatım gösteren proteinlerin protein-protein etkileşim analizi, bazı etkileşen proteinlerin endoplazmik retikulum ve metabolik yollarda protein işlemede yer aldığını, diğerlerinin ise ribozom bileşenleri olarak tanımlandığını göstermiştir. Diğer yandan, transgenik bitkilerin proteomlarının non-transgenik karşılıkları ile benzer olabileceğini rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır (Balsamo ve diğ., 2011; Gong ve diğ., 2012).

Ayrıca transgenik olmayan genotipik çeşitler arasındaki protein anlatımlarındaki farklılıkların, genetik modifikasyonun neden olduğu farklılıklardan daha büyük olduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2018; W. Liu ve diğ., 2020). MON810 çeşitlerinin hibriti olan PR33P67 ve DKC6575 ile bu çeşitlerin GD olmayan kontrolleri PR33P66 ve Tietar'ın tohum proteomlarında 1,1 ile 1,8 kat arasında anlatım farklılığı gösteren birkaç protein spotu belirlenmiş ancak GD çeşitlerinin proteomlarının kontrolleri ile neredeyse aynı olduğu gösterilmiştir (Coll ve diğ., 2011). Bir başka çalışmada ise, Barros ve diğ., (2010), transgen ve non-transgenik isogenik bitkilerin karşılaştırmalı genomik, proteomik ve metabolomik profillerinde, transgenesizin çevresel faktörlere göre daha az varyasyon ürettiğini rapor etmişlerdir. Transgen aktarımından kaynaklanan istenmeyen etkilerin, hibridizasyonun doğal değişkenliği ve doğal konakçı proteomlarında bulunanlara benzer aralıkta meydana geldiği bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2015).

Mutant bitkisinin toplam protein spot sayısının kökenlendiği bitkiye göre %50,7'sinin farklı düzeyde anlatım göstermesi gama radyasyonu ile gerçekleştirilen mutasyon ıslahının genomda ve dolayısıyla proteomda transgenesize göre çok daha fazla sayıda varyasyona neden olduğunu göstermiştir. Mutant soya bitkisinin ve onun kökenlendiği bitkinin 2-DE ile elde edilen jellerinin karşılaştırılmasında, mutant soya bitkisinde 160, kökenlendiği soya bitkisinde ise 71 spesifik protein spotu belirlenmiştir. Dahası sadece mutant bitkide belirlenen 160 protein spotunun toplam protein spot sayısına oranı %25,7'dir. Gama ışınları, düşük dozlarda nükleotid değişimlerine sebebiyet verirken yüksek dozlar fonksiyonel birçok lokusun fonksiyonunu

kaybetmesine ya da tamamen yok olmasına neden olmaktadır. Gama radyasyonunun genomda yaratmış olduğu varyasyonların proteoma da yansıdığı düşünülmektedir. Diğer yandan, mutant bitkisine spesifik olan ve kökenlendiği bitkide yer almayan proteinlerin fonksiyon analizleri yapıldığında, gelişim ve stres cevapları (%27), translasyonel protein-ribozomal altünitesi (translational protein-ribosomal subunit assembly) (%20), foto-solunum süreçleri (%20), mRNA işlenmesi (%13), homeostasi (%7), kromozomal stabilite ve transkripsiyon düzenlenmesi (%7), karbonhidrat metabolizması (%6) olarak yedi fonksiyonel kategoriye ayrıldığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, transgenik soya bitkisinde, mutagenesis ile benzer bir şekilde, transgenik olmayana göre protein spotlarının %22,8'inin anlatımının azaldığı belirlenmiştir. Ancak anlatımı artan protein spotları %18,4 ve tüm anlatımında farklılık gösteren protein spotları %41,2 ile mutagenesis'te belirlenenden (%50,7) çok daha düşük oranda tespit edilmiştir. Bu önerme, mutasyon ıslahının genomun işlevini etkileme olasılığının genetik mühendisliğinden daha yüksek olduğunu gösteren birkaç gen anlatım çalışması tarafından desteklenmektedir. Örneğin, çeltik bitkilerinde mutagenesis sonucunda, genetik mühendisliği ile geliştirilmiş transgenik çeltik bitkilerine göre gen anlatımında daha fazla değişiklik meydana gelmiştir (Batista ve diğ., 2008). Ek olarak çalışmamızda dağılım grafiği analizleri ile elde ettiğimiz veriler mutant bitkilerinde anlatımlarında, 2, 3, 4 ve 5 kat artış ve azalış olan proteinlerin dağılım açısından, daha az sayıda protein spotuna sahip olmalarına karşın, transgenik bitkilerden daha geniş bir yayılma gösterdiğini ortaya koydu. Buğday ve soyada gösterildiği gibi, geleneksel olarak ıslah edilen çeşitler arasındaki gen anlatımındaki farklılıklar, genetik olarak değiştirilmiş bir bitki ile gen aktarılmamış bir izogenik arasında olduğundan çok daha büyük yada benzerdir (Baudou ve diğ., 2006; Cheng ve diğ., 2008). Ayrıca transgenik ıslah yaklaşımının neden olduğu varyasyonların mutasyon ıslah yaklaşımının neden olduğu varyasyonlara benzer olduğu da bildirilmiştir (Anderson ve diğ., 2016).

Mutant soya bitkisindeki proteinlerin %20,2'sinin anlatımının kökenlendiği bitkilere göre azalmış, %30,5'inin ise artmış ve toplamda %50,7'sinin anlatım farklılığı göstermiş olması mutasyon ıslahı ile meydana gelen varyasyonun büyüklüğünü ortaya koymaktadır. Bu durum pek çok mutasyon ıslah çalışmasında bir çok proteinin anlatım düzeylerinin artış ve azalış göstermesiyle benzerlik göstermektedir. Genom ve proteomdaki varyasyonların yapay olarak

gama radyasyonu gibi mutajenler ile indüklenemediği ve canlı organizmalarda artan genetik değişimin önemli sebeplerinden biri olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (Ghaffari ve diğ., 2014; Bado ve diğ., 2015; Oladosu ve diğ., 2016; Islam ve diğ., 2020; Çelik ve diğ., 2021). Gama radyasyonu ile indüklenen mutagenesizin proteomda yaygın bir biçimde varyasyona neden olması ve pek çok proteinin anlatım düzeyini önemli ölçüde değiştirebilmesi ve ardışık gerçekleştirilen yapay seleksiyonlar bitkilerin bir çok farklı özelliğinin geliştirilebilmesini sağlamaktadır. Ayrıca soya bitkisinde verimliliğin (Karthika ve Subba Lakshmi, 2006; Mudibu ve diğ., 2012), protein içeriğinin (Lee ve diğ., 2011; Costa Nobre ve diğ., 2019), hastalık direncinin (Khan, Tyagi ve Dar, 2013) ve buna benzer karakterlerin mutasyon ıslahı yöntemiyle geliştirildiği birçok çalışma rapor edilmiştir. Bir mutasyon uygulaması sonucunda geliştirilen mutantlar, olumlu ve / veya arzu edilen yeni ve aktarılabilir özellikler kazanabilirler. Mutasyon ıslah yöntemi, son yıllarda tohum kalitesi, verimlilik, hastalık direnci, abiotik stres toleransı (kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık vb.) herbisit toleransı, erken olgunlaşma, erken çiçeklenme, hasat zamanı, fenotip (çiçek rengi, tohum rengi, rhizome vb.), biyomolekül içeriği (protein, yağ, nitrat, kurkumin, nişasta, vitamin C, erusik asid, kapsin, amiloz vb.) gibi özelliklerin iyileştirilmesi için yaygın olarak tercih edilen ve başarıyla kullanılan bitki ıslah tekniklerinden biri haline gelmiştir (IAEA, 2020).

Sonuç olarak, çalışmamızda farklı ıslah teknikleri ile elde edilen bitkilerin genomları, proteomları ve ayrıca bu farklı gruplara ait bitkilerin gelişimden sorumlu genlerinin anlatım profilleri açısından da farklılıklar gösterdikleri bulunmuştur. DNA düzeyindeki beklenmedik değişiklikler retrotranspozon hareketleri aracılığı ile belirlenmiştir. Deney grupları içerisindeki en yüksek polimorfizm transgenik saçak köklerde gözlenirken, saçak köklerin kendi aralarında da anlamlı profil farklılıkları olduğu belirlenmiştir. Bu durum transgenesizin retrotranspozonlar ile ilişkili genom düzeyindeki varyasyonların tetiklenmesinde mutagenesize göre daha etkin olduğunu düşündürmüştür. Her bir transgenik saçak kökün, birbirinden oldukça farklı bant profili göstermesinin nedeninin, transgenin bitki genomuna rastgele ve farklı kopya sayılarında insersiyonundan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Gen anlatım profilleri değerlendirildiğinde, transgenik, transgenik olmayan, mutant ve Ataem-07 bitki gruplarında karşılaştırmalı olarak analizi gerçekleştirilen genlerin, bitkilerin gelişimlerdeki farklılıklar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Mutant ve Ataem-07 bitkileri *siz1a* ve *elf3* genlerinin anlatımı haricinde benzer profil göstermişlerdir. Transgenik ve transgenik olmayan bitkilerde ise *dt1*,

e1, *luxb* ve *luxc* genleri birbirinden farklı profile sahipken *elf3* ve *siz1a* genlerinin anlatımı benzer profil sergilemiştir. Ek olarak sirkadiyen ritm ile ilişkili akşam kompleksini oluşturan *elf3*, *luxb* ve *luxc* genleri birbirleriyle uyumlu gen anlatım profilleri göstermişlerdir. Proteomik profiller değerlendirildiğinde ise, hem transgenik hem de mutant bitkiler proteomdaki beklenmedik etkiler bakımından geleneksel bitkilere göre farklılıklar sergilemiştir. Ancak gama ile indüklenmiş mutasyon ıslahının proteomda yaratmış olduğu varyasyonların transgen insersiyonuna göre çok daha büyük miktarda olduğu belirlenmiştir. Hem transgenik bitkilerde hem de mutant bitkilerde tanımlaması yapılan az sayıdaki proteinin farklı biyolojik kategorilere dağıldığı saptanmıştır. Ayrıca mutant bitkilerin proteom profilindeki protein spotlarının anlatım düzeyleri açısından transgenik bitkilere göre çok daha geniş bir dağılım gösterdiği ortaya konmuştur.

Biyoteknolojik gelişmeler, yarattıkları büyük fırsatların yanı sıra biyogüvenlik, biyoetik, çevresel değerlendirme ve risk yönetimi tartışmalarını da beraberinde getirmektedir. Özellikle son yıllarda geliştirilen yeni ıslah tekniklerinin uygulanması ile yeni biyoteknolojik tohumların gıda güvenliği ve yasal düzenlemeleri konusundaki tartışmalar artmaktadır. Bu nedenle bitkiler yeni özellikler kazanması için geliştirilirken ortaya çıkabilecek beklenmedik varyasyonların incelenmesi ve bu değişimlerin etkilerinin anlaşılması son derece önemlidir. Farklı ıslah yöntemleri ile geliştirilmiş bitkilerin temel eşdeğerlik kapsamında genomik ve proteomik karşılaştırılmasının ilk defa yapıldığı bu tez çalışmasında, elde edilen sonuçlar beklenmedik etkilerin sadece transgenikler ile sınırlı olmadığını ortaya koymuştur. Yasal veya düzenleyici kısıtlamalar olmaksızın yetiştirilebilen, gıda ve yem olarak kullanılabilen ve taşınabilen mutant bitkilerde, mutasyon ıslah yöntemleri sonucunda istenmeyen etkilerin ortaya çıktığı açıktır. Bu nedenle genom düzeltim tekniklerinden mutasyon ıslah yöntemlerine kadar farklı ıslah stratejileri ile geliştirilen bitkilerin herbirinin ayrı ayrı karakterize edilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Ancak genetiği değiştirilmiş bitkilerin temel eşdeğerlilik kapsamında güvenli kabul edilen geleneksel karşılıkları ile karşılaştırılmaları gerçekleştirilse de, güvenlik değerlendirmesinde hangi varyasyon aralığının güvenli kabul edilebileceği hususunda güvenilir ölçütler bulunmamaktadır. Bununla birlikte, geleneksel bitkilerin doğal varyasyonuna ilişkin gen, protein ve metabolit profillerine ait veri tabanlarının bulunmaması, alternatif ıslah sistemlerinde beklenmedik etkilerin belirlenmesi ve değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Ek olarak, yeni nesil ıslah yöntemleri ile geliştirilmiş bitkiler de dahil olmak üzere, genetiği

değiştirilmiş bitkilerde beklenmedik etkilerin belirlenmesi ile ilgili güvenlik değerlendirmesine uygulanabilecek kapsamlı bir sistemin oluşturulmasına, beklenmedik etkilerin ayrıntılı değerlendirilmesi için daha hassas ve profil temelli tekniklerin geliştirilmesine ve küresel veri tabanlarının oluşturulmasına ihtiyaç vardır. Bu bilgiler ve gelişmeler temelinde, transgenik bitkilerin bileşimi ve kalitesine yönelik beklenmedik etkilerin kapsamı ve niteliği en eksiksiz şekilde değerlendirilebilecek ve tüketicilerin, yasa düzenleyicilerin ve diğer paydaşların bilgilendirilmesine yardımcı olacaktır.



KAYNAKLAR

- Abdeen, A., Schnell, J., and Miki, B., 2010, Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor ABF3, *BMC genomics*, 11(1), 1–21.
- Acquaah, G., 2007, *Principles of Plant Genetics and Breeding*, Wiley-Blackwell, ISBN: 978-1-119-62632-9.
- Akao, S., and Kouchi, H., 1992, A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar enrei, *Soil science and plant nutrition*, 38(1), 183–187.
- Alok, A., Kumar, J., Sharma, S., Verma, S., Sood, H., 2017, *Engineering in Plant Genome Using Agrobacterium: Progress and Future*, Metabolic engineering for bioactive compounds: strategies and processes, In: Kalia V., Saini A. (ed.), Chapter 6, Springer, Singapore, ISBN: 978-981-13-5414-4, 91–111.
- Alzohairy, A.,M., Sabir, J.,S.,M., Gyulai, G., Younis, R.,A.,A., Jansen, R.,K., and Bahieldin, A., 2014, Environmental stress activation of plant long-terminal repeat retrotransposons, *Functional plant biology*, CSIRO, 557–567.
- Anai, T., 2012, Potential of a mutant-based reverse genetic approach for functional genomics and molecular breeding in soybean, *Breeding science*, 61(5), 462–467.
- Anderson, E.,J., Ali, M.,L., Beavis, W.,D., Chen, P., Clemente, T.,E., Diers, B.,W., Graef, G.,L., Grassini, P., Hyten, D.,L., McHale, L.,K., Nelson, R.,L., Parrott, W.,A., Patil, G.,B., Stupar, R.,M., and Tilmon, K.,J., 2019, *Soybean [Glycine max (L.) Merr.] Breeding: History, Improvement, Production and Future Opportunities*, Advances in plant breeding strategies: legumes, In: Khayri J., Jain S., Johnson D. (ed.), Chapter 12, Springer, Cham, ISBN: 978-3-030-23400-3, 431-516.
- Anderson, J.,E., Michno, J.,M., Kono, T.,J.,Y., Stec, A.,O., Campbell, B.,W., Curtin, S.,J., and Stupar, R.,M., 2016, Genomic variation and DNA repair associated with soybean transgenesis: A comparison to cultivars and mutagenized plants, *BMC biotechnology*, 16(1), 1–13.
- Arase, S., Hase, Y., Abe, J., Kasai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Narumi, I., Tanaka, A., and Kanazawa, A., 2011, Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants, *Plant biotechnology*, 28(3), 323–329.
- Atak, Ç., Çelik, Ö., Ayan, A., Meriç, S., ve Erdoğan, M., 2020, *Mutasyon Islahı ile Soyada (Glycine max L.) Tuzluluğa ve Kuraklığa Toleranslı Bitkilerin Geliştirilmesi*, Proje No: TAGEM-16 AR-GE-56, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı.
- Bado, S., Forster, B.,P., Nielen, S., Ali, A.,M., Lagoda, P.,J.,L., Till, B.,J., and Laimer, M., 2015, *Plant Mutation Breeding: Current Progress and Future Assessment*, Plant breeding reviews: volume 39, In: Janick, J. (ed.), Chapter 2, Wiley-Blackwell, New Jersey, ISBN: 978-1-119-10771-2, 23–88.
- El Baidouri, M., Carpentier, M.,-C., Cooke, R., Gao, D., Lasserre, E., Llauro, C., Mirouze, M., Picault, N., Jackson, S.,A., and Panaud, O., 2014, Widespread and frequent horizontal transfers of transposable elements in plants, *Genome research*, 24(5), 831–838.

- Balsamo, G.,M., Cangahuala-Inocente, G.,C., Bertoldo, J.,B., Terenzi, H., and Arisi, A.,C.,M., 2011, Proteomic Analysis of Four Brazilian MON810 Maize Varieties and Their Four Non-Genetically-Modified Isogenic Varieties, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11553–11559.
- Banerjee, R., Kumar, G.,V., and Kumar, S.,P.,J., 2019, *Omics-based approaches in plant biotechnology*, WILEY-Scrivener Publishing, ISBN: 978-1-119-50993-6.
- Barakat, A., Gallois, P., Raynal, M., Mestre-Ortega, D., Sallaud, C., Guiderdoni, E., Delseny, M., and Bernardi, G., 2000, The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic Arabidopsis and rice, *FEBS letters*, 471(2–3), 161–164.
- Barbosa, H.,S., Arruda, S.,C.,C., Azevedo, R.,A., and Arruda, M.,A.,Z., 2012, New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 299–314.
- Barros, E., Lezar, S., Anttonen, M.,J., van Dijk, J.,P., Röhlig, R.,M., Kok, E.,J., and Engel, K.,-H., 2010, Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics, *Plant biotechnology journal*, 8(4), 436–451.
- Batista, R., Saibo, N., Lourenço, T., and Oliveira, M.,M., 2008, Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 105(9), 3640–3645.
- Baudo, M.,M., Lyons, R., Powers, S., Pastori, G.,M., Edwards, K.,J., Holdsworth, M.,J., and Shewry, P.,R., 2006, Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding, *Plant biotechnology journal*, 4(4), 369–380.
- Bayram, E., Yilmaz, S., Mecbur, H.,H., Kartal-Alacam, G., and Gozukirmizi, N., 2012, Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant omics*, 5(3), 211–215.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V., 2013, Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system, *Plant methods*, 9(1), 39.
- Bennetzen, J.,L., and Wang, H., 2014, The Contributions of Transposable Elements to the Structure, Function, and Evolution of Plant Genomes, *Annual review of plant biology*, 65(1), 505–530.
- Benning, C., and Sweetlove, L., 2016, Synthetic biology for basic and applied plant research, *The plant journal*, 87(1), 3–4.
- Bernet, G., P., Mestre, P., F., Pina, J., A., and Asíns, M., J., 2004, Molecular Discrimination of Lemon Cultivars, *HortScience*, 39(1), 165–169.
- Betts, S.,D., Basu, S., Bolar, J., Booth, R., Chang, S., Cigan, A.,M., Farrell, J., Gao, H., Harkins, K., Kinney, A., Lenderts, B., Li, Z., Liu, L., McEnany, M., Mutti, J., Peterson, D., Sander, J.,D., Scelonge, C., Sopko, X., Stucker, D., Wu, E., and Chilcoat, N.,D., 2019, Uniform Expression and Relatively Small Position Effects Characterize Sister Transformants in Maize and Soybean, *Frontiers in plant science*, 10, 1209.
- Bolon, Y.,-T., Haun, W.,J., Xu, W.,W., Grant, D., Stacey, M.,G., Nelson, R.,T., Gerhardt, D.,J., Jeddeloh, J.,A., Stacey, G., Muehlbauer, G.,J., Orf, J.,H., Naeve, S.,L., Stupar, R.,M., and Vance, C.,P., 2011, Phenotypic and Genomic Analyses of a Fast Neutron Mutant Population

- Resource in Soybean, *Plant physiology*, 156(1), 240–253.
- Bolon, Y.,-T., Stec, A.,O., Michno, J.,-M., Roessler, J., Bhaskar, P.,B., Ries, L., Dobbels, A.,A., Campbell, B.,W., Young, N.,P., Anderson, J.,E., Grant, D.,M., Orf, J.,H., Naeve, S.,L., Muehlbauer, G.,J., Vance, C.,P., and Stupar, R.,M., 2014, Genome Resilience and Prevalence of Segmental Duplications Following Fast Neutron Irradiation of Soybean, *Genetics*, 198(3), 967–981.
- Bonchev, G., and Parisod, C., 2013, Transposable elements and microevolutionary changes in natural populations, *Molecular ecology resources*, 13(5), 765–775.
- Brandão, A.,R., Barbosa, H.,S., and Arruda, M.,A.,Z., 2010, Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds, *Journal of proteomics*, 16:73(8), 1433–1440.
- Brookes, G., and Barfoot, P., 2018a, *Biotech crop adoption leads to greater sustainability and socioeconomic opportunities for global farmers and citizens*, PG Economics and ISAA.
- Brookes, G., and Barfoot, P., 2018b, Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2016: Impacts on pesticide use and carbon emissions, *GM crops & food*, 9(3), 109–139.
- Broughton, W.,J., and Dilworth, M.,J., 1971, Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans, *Biochemical journal*, 125(4), 1075–1080.
- Bulgakov, V.,P., Gorpenchenko, T.,Y., Veremeichik, G.,N., Shkryl, Y.,N., Tchernoded, G.,K., Bulgakov, D., V., Aminin, D.,L., and Zhuravlev, Y.,N., 2012, The rolB Gene Suppresses Reactive Oxygen Species in Transformed Plant Cells through the Sustained Activation of Antioxidant Defense, *Plant physiology*, 158(3), 1371–1381.
- Byeon, Y., and Back, K., 2014, An increase in melatonin in transgenic rice causes pleiotropic phenotypes, including enhanced seedling growth, delayed flowering, and low grain yield, *Journal of pineal research*, 56(4), 408–414.
- Cai, B., Kong, X., Zhong, C., Sun, S., Zhou, X.,F., Jin, Y.,H., Wang, Y., Li, X., Zhu, Z., and Jin, J.,B., 2017, SUMO E3 Ligases GmSIZ1a and GmSIZ1b regulate vegetative growth in soybean, *Journal of integrative plant biology*, 59(1), 2–14.
- Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T., and Hou, W., 2018, CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean, *Plant biotechnology journal*, 16(1), 176–185.
- Cakmak, B., Marakli, S., and Gozukirmizi, N., 2015, SIRE1 retrotransposons in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Russian journal of genetics*, 51(7), 661–672.
- Campbell, B.,W., and Stupar, R.,M., 2016, Soybean (*Glycine max*) Mutant and Germplasm Resources: Current Status and Future Prospects, *Current protocols in plant biology*, 1(2), 307–327.
- de Campos, B.,K., Galazzi, R.,M., dos Santos, B.,M., Balbuena, T.,S., dos Santos, F.,N., Mokochinski, J.,B., Eberlin, M.,N., and Arruda, M.,A.,Z., 2020, Comparison of generational effect on proteins and metabolites in non-transgenic and transgenic soybean seeds through the insertion of the cp4-EPSPS gene assessed by omics-based platforms, *Ecotoxicology and environmental safety*, 202, 110918.

- Cao, D., Hou, W., Song, S., Sun, H., Wu, C., Gao, Y., and Han, T., 2009, Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean, *Plant cell, tissue and organ culture*, 96(1), 45–52.
- Casacuberta, J.,M., Jackson, S., Panaud, O., Purugganan, M., and Wendel, J., 2016, Evolution of Plant Phenotypes, from Genomes to Traits, *G3 genes|genomes|genetics*, 6(4), 775–778.
- Casacuberta, J.,M., and Santiago, N., 2003, Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes, *Gene*, 311, 1–11.
- Cavrak, V., V., Lettner, N., Jamge, S., Kosarewicz, A., Bayer, L.,M., and Mittelsten Scheid, O., 2014, How a Retrotransposon Exploits the Plant's Heat Stress Response for Its Activation, *PLoS genetics*, 10(1), s. 1004115.
- Çelik, Ö., Ayan, A., Meriç, S., and Atak, Ç., 2021, Comparison of tolerance related proteomic profiles of two drought tolerant tomato mutants improved by gamma radiation, *Journal of biotechnology*, 330, 35–44.
- Cellini, F., Chesson, A., Colquhoun, I., Constable, A., Davies, H.,,, Engel, K.,,, Gatehouse, A.,M.,,, Kärenlampi, S., Kok, E.,,, Leguay, J.,-J., Lehesranta, S., Noteborn, H.,P.,J.,,, Pedersen, J., and Smith, M., 2004, Unintended effects and their detection in genetically modified crops, *Food and chemical toxicology*, 42(7), 1089–1125.
- Chandra, S., 2012, Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism, *Biotechnology letters*, 34(3), 407–415.
- Chandra, S., and Chandra, R., 2011, Engineering secondary metabolite production in hairy roots, *Phytochemistry reviews*, 10, 371-395.
- Cheng, K.,C., Beaulieu, J., Iquira, E., Belzile, F.,J., Fortin, M.,G., and Strömvik, M., V. 2008, Effect of Transgenes on Global Gene Expression in Soybean Is within the Natural Range of Variation of Conventional Cultivars, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(9), 3057–3067.
- Cheraghi, A., Rahmani, F., and Hassanzadeh-Ghorttapeh, A., 2018, IRAP and REMAP based genetic diversity among varieties of *Lallemantia iberica*, *Molecular biology research communications*, 7(3), 125–132.
- Chesnay, C., Kumar, A., and Pearce, S., 2007, Genetic diversity of SIRE-1 retroelements in annual and perennial Glycine species revealed using SSAP, *Cellular & molecular biology letters*, 12(1), 103–110.
- Coll, A., Nadal, A., Rossignol, M., Puigdomènech, P., and Pla, M., 2011, Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields, *Transgenic research*, 20(4), 939–949.
- Collard, B.,C.,Y., and Mackill, D.,J., 2008, Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century, *Philosophical transactions of the royal society b: biological sciences*, 363(1491), 557.
- Cong, W., Miao, Y., Xu, L., Zhang, Y., Yuan, C., Wang, J., Zhuang, T., Lin, X., Jiang, L., Wang, N., Ma, J., Sanguinet, K.,A., Liu, B., Rustgi, S., and Ou, X., 2019, Transgenerational memory of gene expression changes induced by heavy metal stress in rice (*Oryza sativa* L.), *BMC plant biology*, 19(1), 1–14.

- Conn, H.,J., 1942, Validity of the Genus *Alcaligenes*, *Journal of bacteriology*, 44(3), 353-360.
- Cooper, J.,L., Till, B.,J., Laport, R.,G., Darlow, M.,C., Kleffner, J.,M., Jamai, A., El-Mellouki, T., Liu, S., Ritchie, R., Nielsen, N., Bilyeu, K.,D., Meksem, K., Comai, L., and Henikoff, S., 2008, TILLING to detect induced mutations in soybean, *BMC plant biology*, 8(1), 9.
- Costa Nobre, D.,A., Sigueyuki Sedyama, C., Macedo, W.,R., Piovesan, N.,D., and Arthur, V., 2019, Gamma radiation to produce soybean mutants for better plant performance and chemical composition of seeds, *Emirates journal of food and agriculture*, 511.
- Crossa, J., Pérez-Rodríguez, P., Cuevas, J., Montesinos-López, O., Jarquín, D., de los Campos, G., Burgueño, J., González-Camacho, J.,M., Pérez-Elizalde, S., Beyene, Y., Dreisigacker, S., Singh, R., Zhang, X., Gowda, M., Roorkiwal, M., Rutkoski, J., and Varshney, R.,K., 2017, Genomic Selection in Plant Breeding: Methods, Models, and Perspectives, *Trends in plant science*, 22(11), 961–975.
- Cubeñas-Potts, C., and Matunis, M.,J., 2013, Sumo: A Multifaceted Modifier of Chromatin Structure and Function, *Developmental cell*, 24(1).
- Davies, H., 2010, A role for “omics” technologies in food safety assessment, *Food control*, 21(12), 1601–1610.
- Demorest, Z.,L., Coffman, A., Baltes, N.,J., Stoddard, T.,J., Clasen, B.,M., Luo, S., Retterath, A., Yabandith, A., Gamo, M.,E., Bissen, J., Mathis, L., Voytas, D.,F., and Zhang, F., 2016, Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil, *BMC plant biology*, 16(225).
- Deng, P.,-J., Zhou, X.,-Y., Yang, D.,-Y., Hou, H.,-L., Yang, X.,-K., Li, Y.,-H., Yang, Y.,-C., Wang, X.,-L., Fang, S.,-S., Wu, S.,-Q., and Liu, J., 2008, The definition, source, manifestation and assessment of unintended effects in genetically modified plants, *Journal of the science of food and agriculture*, 88(14), 2401–2413.
- Devraj, K., Geguchadze, R., Klinger, M.,E., Freeman, W.,M., Mokashi, A., Hawkins, R.,A., and Simpson, I.,A., 2009, Improved membrane protein solubilization and clean-up for optimum two-dimensional electrophoresis utilizing GLUT-1 as a classic integral membrane protein, *Journal of neuroscience methods*, 184(1), 119–123.
- Dhanavel, D., Pavada, P., and Girija, M., 2010, Effect of Gamma Rays on some Yield Parameters and Protein Content of Soybean in M 2 , M 3 and M 4 Generation, *Current plant science and biotechnology in agriculture*, 1(6), 08–11.
- Du, J., Grant, D., Tian, Z., Nelson, R.,T., Zhu, L., Shoemaker, R.,C., and Ma, J., 2010, SoyTEDb: A comprehensive database of transposable elements in the soybean genome, *BMC genomics*, 11(1), 1–7.
- Du, Y., Feng, Z., Wang, J., Jin, W., Wang, Z., Guo, T., Chen, Y., Feng, H., Yu, L., Li, W., and Zhou, L., 2022, Frequency and Spectrum of Mutations Induced by Gamma Rays Revealed by Phenotype Screening and Whole-Genome Re-Sequencing in *Arabidopsis thaliana*, *International journal of molecular sciences*, 23(2).
- Eckert, H., LaVallee, B., Schweiger, B.,J., Kinney, A.,J., Cahoon, E.,B., and Clemente, T., 2006, Co-expression of the borage $\Delta 6$ desaturase and the *Arabidopsis* $\Delta 15$ desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean, *Planta*, 224(5), 1050-1057.

- EFSA 2010, Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants, *EFSA journal*, 8(11), 1879–1990.
- EFSA 2011, Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants, *EFSA journal*, 9(5), 2150.
- Enserink, J., 2015, Sumo and the cellular stress response, *Cell division*, 10(1).
- Esnault, M.,A., Legue, F., and Chenal, C., 2010, Ionizing radiation: Advances in plant response, *Environmental and experimental botany*, 68(3), 231–237.
- Fagan, J., Antoniou, M., and Robinson, C., 2014, *GMO myths and truths: An evidence-based examination of the claims made for the safety and efficacy of genetically modified crops*, London.
- Fan, Y.,L., Zhang, X.,H., Zhong, L.,J., Wang, X.,Y., Jin, L.,S., and Lyu, S.,H., 2020, One-step generation of composite soybean plants with transgenic roots by *Agrobacterium* rhizogenes-mediated transformation, *BMC plant biology*, 20(1), 1–11.
- FAO/WHO 2003, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from the recombinant-DNA plants, *Risk analysis*, CAC/GL 45.
- Faris, J.,D., Haen, K.,M., and Gill, B.,S., 2000, Saturation mapping of a generic recombination hot spot region in wheat, *Genetics*, 154, 823–835.
- Feschotte, C., Jiang, N., and Wessler, S.,R., 2002, Plant transposable elements: Where genetics meets genomics, *Nature reviews genetics*, Nature Publishing Group, 329–341.
- Flint-Garcia, S.,A., 2013, Genetics and consequences of crop domestication, *Journal of agricultural and food chemistry*, American Chemical Society, 8267–8276.
- Forster, B., and Shu, Q., 2012, *Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications*, Plant mutation breeding and biotechnology, In: Shu, Q., Forster, B., and Nakagawa, H. (ed.), Chapter 1, CABI, Wallingford, ISBN: 978-1-780-64085-3, 09–20.
- Fu, W., Wang, C., Xu, W., Zhu, P., Lu, Y., Wei, S., Wu, X., Wu, Y., Zhao, Y., and Zhu, S., 2019, Unintended effects of transgenic rice revealed by transcriptome and metabolism, *GM crops and food*, 10(1), 20–34.
- Ganeshan, S., and Chibbar, R.,N., 2010, *Gene transfer methods*, Transgenic crop plants principles and development, In: Kole, C., Michler, C.H., Abbott, A.G., and Hall, T.C. (ed.), Chapter 3, Springer, Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-642-04808-1, 57–83.
- Gehan, M.,A., Greenham, K., Mockler, T.,C., and McClung, C.,R., 2015, Transcriptional networks — crops, clocks, and abiotic stress, *Current opinion in plant biology*, 24, 39–46.
- Gelvin, S.,B., 2003, Improving plant genetic engineering by manipulating the host, *Trends in biotechnology*, 21(3), 95–98.
- Gelvin, S.,B., 2009, *Agrobacterium* in the genomics age, *Plant physiology*, 150(4), 1665–1676.
- Gelvin, S.,B., 2017, Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome, *Annual reviews*, 27(51), 195–217.

- Georgiev, M.,I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., and Xu, J., 2012, Genetically transformed roots: From plant disease to biotechnological resource, *Trends in biotechnology*, 30(10), 528-537.
- Georgiev, M.,I., Ludwig-Müller, J., and Bley, T., 2010, *Hairy root culture: copying nature in new bioprocesses.*, Medicinal plant biotechnology, In: Arora, R. (ed.), Chapter 10, CABI, ISBN: 978-1-845-93678-5, 156–175.
- Georgiev, M.,I., Pavlov, A.,I., and Bley, T., 2007, Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances, *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6), 1175–1185.
- Ghaffari, A., Gharechahi, J., Nakhoda, B., and Salekdeh, G.,H., 2014, Physiology and proteome responses of two contrasting rice mutants and their wild type parent under salt stress conditions at the vegetative stage, *Journal of plant physiology*, 171(1), 31–44.
- Gilchrist, E., and Haughn, G., 2010, Reverse genetics techniques: engineering loss and gain of gene function in plants, *Briefings in functional genomics*, 9(2), 103–110.
- Gill, K.,S., Gill, B.,S., Endo, T.,R., and Taylor, T., 1996, Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat, *Genetics*, 144(4), 1883–1891.
- Giraldo, P.,A., Shinozuka, H., Spangenberg, G.,C., Smith, K.,F., and Cogan, N.,O.,I., 2021, Rapid and Detailed Characterization of Transgene Insertion Sites in Genetically Modified Plants via Nanopore Sequencing, *Frontiers in plant science*, 11, 2292.
- Gong, C.,Y., Li, Q., Yu, H.,T., Wang, Z., and Wang, T., 2012, Proteomics insight into the biological safety of transgenic modification of rice as compared with conventional genetic breeding and spontaneous genotypic variation, *Journal of proteome research*, 11(4), 3019-3029.
- Greenham, K., and McClung, C.,R., 2015, Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants, *Nature reviews genetics* 2015 16:10, 16(10), 598–610.
- Gregory, T.,R., Nicol, J.,A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I.,J., Murray, B.,G., Kapraun, D.,F., Greilhuber, J., and Bennett, M.,D., 2007, Eukaryotic genome size databases, *Nucleic acids research*, 35, 332-338.
- Gronow, M., and Griffiths, G., 1971, Rapid isolation and separation of the non-histone proteins of rat liver nuclei, *FEBS letters*, 15(5), 340–344.
- Gurusamy, P.,D., Schäfer, H., Ramamoorthy, S., and Wink, M., 2017, Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L., *PLoS one*, 12(8).
- Gyurkovska, V., Alipieva, K., Maciuk, A., Dimitrova, P., Ivanovska, N., Haas, C., Bley, T., and Georgiev, M., 2011, Anti-inflammatory activity of Devil's claw in vitro systems and their active constituents, *Food chemistry*, 125(1), 171–178.
- Hamat-Mecbur, H., Yilmaz, S., Temel, A., Sahin, K., and Gozukirmizi, N., 2014, Effects of epirubicin on barley seedlings, *Toxicology and industrial health*, 30(1), 52–59.
- Hanafy, M.,S., Matter, M.,A., Asker, M.,S., and Rady, M.,R., 2016, Production of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* L. and their antimicrobial activity, *South african journal of botany*, 105, 9–18.

- Harding, S.,S., Johnson, S.,D., Taylor, D.,R., Dixon, C.,A., and Turay, M.,Y., 2012, Effect of Gamma Rays on Seed Germination, Seedling Height, Survival Percentage and Tiller Production in Some Rice Varieties Cultivated in Sierra Leone, *Journal of experimental agriculture international*, 2(2), 247–255.
- Hartung, F., and Schiemann, J., 2014, Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU, *The plant journal*, 78(5), 742–752.
- Hinchee, M.,A.,W., Connor-Ward, D., V., Newell, C.,A., McDonnell, R.,E., Sato, S.,J., Gasser, C.,S., Fischhoff, D.,A., Re, D.,B., Fraley, R.,T., and Horsch, R.,B., 1988, Production of Transgenic Soybean Plants Using Agrobacterium-Mediated DNA Transfer, *Nature biotechnology*, 6(8), 915–922.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., and Kanda, M., 1996, Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture., *Proceedings of the national academy of sciences*, 93(15), 7783–7788.
- Hodges, L.,D., Lee, L.,-Y., McNett, H., Gelvin, S.,B., and Ream, W., 2009, The Agrobacterium rhizogenes GALLS Gene Encodes Two Secreted Proteins Required for Genetic Transformation of Plants, *Journal of bacteriology*, 191(1), 355–364.
- Hogland, D.,R., 1950, The Water Culture Method for Growing Plants without Soil, *University of california college of agriculture, Agricultural experiment station*, Circular, 347.
- Hou, Y., Rajagopal, J., Irwin, P.,A., and Voytas, D.,F., 2010, Retrotransposon vectors for gene delivery in plants, *Mobile dna*, 1(1), 1–9.
- Huang, H., and Nusinow, D., 2016, Into the Evening: Complex Interactions in the Arabidopsis Circadian Clock, *Trends in genetics : tig*, 32(10), 674–686.
- Huang, K., 2017, *New technology used in GMO safety assessment*, Safety assessment of genetically modified foods, In: Huang, K., (ed.), Chapter: 6, Springer, Singapore, ISBN: 978-981-10-3487-9, 181–206.
- Hunter, M.,C., Smith, R.,G., Schipanski, M.,E., Atwood, L.,W., and Mortensen, D.,A., 2017, Agriculture in 2050: Recalibrating Targets for Sustainable Intensification, *BioScience*, 67(4), 386–391.
- Hussain, M., Gul, M., Kamal, R., Iqbal, M.,A., Zulfiqar, S., Abbas, A., Röder, M.,S., Muqaddasi, Q.,H., and Mehboob-Ur-rahman, 2021, Prospects of Developing Novel Genetic Resources by Chemical and Physical Mutagenesis to Enlarge the Genetic Window in Bread Wheat Varieties, *Agriculture*, 11(7), 621.
- Hymowitz, T., 2004, *Speciation and Cytogenetics*, Soybeans: improvement, production, and uses, volume 16, third edition, In: Shibles, R.M., Harper, J.E., Wilson, R.F., and Shoemaker, R.C. (ed.), Chapter 4, The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Singapore, ISBN: 978-981-10-3487-9, 97–136.
- Hyten, D.,L., Song, Q., Zhu, Y., Choi, I.,Y., Nelson, R.,L., Costa, J.,M., Specht, J.,E., Shoemaker, R.,C., and Cregan, P.,B., 2006, Impact of genetic bottlenecks on soybean genome diversity, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 103(45).

- IAEA 2020, *Mutant Variety Database, Joint fao/iaea*. Available at: <https://mvd.iaea.org/#!/Search>.
- ISAAA 2018, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change, Brief No: 54.
- ISAAA 2021, *GM Approval Database | GMO Database | GM Crop Approvals - ISAAA.org.*, <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>, (Ziyaret Tarihi: 23 Ekim 2021).
- ISAAA, I.,S., for the A., of A.,A., 2017, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years, *Isaaa*, Brief 53.
- Islam, N., Krishnan, H.,B., and Natarajan, S., 2020, Proteomic Profiling of Fast Neutron-Induced Soybean Mutant Unveiled Pathways Associated with Increased Seed Protein Content, *Journal of proteome research*, 19(10), 3936–3944.
- Ito, H., Kim, J.,M., Matsunaga, W., Saze, H., Matsui, A., Endo, T.,A., Harukawa, Y., Takagi, H., Yaegashi, H., Masuta, Y., Masuda, S., Ishida, J., Tanaka, M., Takahashi, S., Morosawa, T., Toyoda, T., Kakutani, T., Kato, A., and Seki, M., 2016, A Stress-Activated Transposon in Arabidopsis Induces Transgenerational Abscissic Acid Insensitivity, *Scientific reports*, 6(1), 1–12.
- Jacobs, T.,B., LaFayette, P.,R., Schmitz, R.,J., and Parrott, W.,A., 2015, Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9, *BMC biotechnology*, 15(16).
- Jain, S.,M., Brar, D.,S., and Ahloowalia, B.,S., 1998, *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, Current plant science and biotechnology in agriculture*. Editör S.M. Jain, D.S. Brar, and B.S. Ahloowalia. Dordrecht: Springer Netherlands (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture).
- Jan, S., Parween, T., Siddiqi, T.,O., and Mahmooduzzafar, X., 2012, Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products, *Environmental reviews*, 20(1), 17–39.
- Jian, B., Hou, W., Wu, C., Liu, B., Liu, W., Song, S., Bi, Y., and Han, T., 2009, Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Superroot-derived Lotus corniculatus plants: A valuable tool for functional genomics, *BMC plant biology*, 9(1), 1–14.
- Jiang, B., Nan, H., Gao, Y., Tang, L., Yue, Y., Lu, S., Ma, L., Cao, D., Sun, S., Wang, J., Wu, C., Yuan, X., Hou, W., Kong, F., Han, T., and Liu, B., 2014, Allelic Combinations of Soybean Maturity Loci E1, E2, E3 and E4 Result in Diversity of Maturity and Adaptation to Different Latitudes, *PLOS one*, 9(8).
- Jiang, G.,-L., 2013, *Plant breeding from laboratories to fields*, Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants, In: Andersen, S. (ed.), IntechOpen, ISBN: 978-953-51-1090-3.
- Johansson, R., 2018, Designate, *National agricultural statistics service (nass), agricultural statistics board, united states department of agriculture (usda)*.
- Kalendar, R., Flavell, A.,J., Ellis, T.,H.,N., Sjakste, T., Moisy, C., and Schulman, A.,H., 2011, Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers, *Heredity*, 106(4), 520–530.

- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E., and Schulman, A.,H., 2000, Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence, *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6603–6607.
- Kanazashi, Y., Hirose, A., Takahashi, I., Mikami, M., Endo, M., Hirose, S., Toki, S., Kaga, A., Naito, K., Ishimoto, M., Abe, J., and Yamada, T., 2018, Simultaneous site-directed mutagenesis of duplicated loci in soybean using a single guide RNA, *Plant cell reports*, 37(3), 553–563.
- Karthika, R., and Subba Lakshmi, B., 2006, Effect of gamma rays and EMS on two varieties of soybean, *Asian journal of plant sciences*, 5(4), 721–724.
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C.,D.,T., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., and Gresshoff, P.,M., 2007, Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology, *Nature protocols*, 2(4), 948–952.
- Khan, M.,H., Tyagi, S.,D., and Dar, Z.,A., 2013, *Screening of soybean (Glycine max (l.) merrill) genotypes for resistance to rust, yellow mosaic and pod shattering*, Soybean - pest resistance, In: El-Shemy, H. (ed.), IntechOpen, ISBN: 978-953-51-0978-5.
- Kharkwal, M.,C., and Shu, Q.,Y., 2009, *The role of induced mutations in world food security*, Induced plant mutations in the genomics era, In: Shu, Q.Y. (ed.), Cabi, Rome, FAO/IAEA, ISBN: 33–38 978-92-5-106324-8. .
- Klose, J., 1975, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals., *Humangenetik*, 26(3), 231–43.
- Kohli, A., Miro, B., and Twyman, R.,M., 2010, Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements, *Transgenic crop plants*, 1, 201–237.
- Kok, E.,J., Keijer, J., Kleter, G.,A., and Kuiper, H.,A., 2008, Comparative safety assessment of plant-derived foods, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 50(1), 98–113.
- Kosuri, S., and Church, G.,M., 2014, Large-scale de novo DNA synthesis: Technologies and applications, *Nature methods*, 11, 499–507.
- Krasileva, K., V. 2019, The role of transposable elements and DNA damage repair mechanisms in gene duplications and gene fusions in plant genomes, *Current opinion in plant biology*, 48, 18–25.
- Krattinger, S.,G., Lagudah, E.,S., Spielmeier, W., Singh, R.,P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.,L., and Keller, B., 2009, A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat, *Science*, 323(5919), 1360–1363.
- Kusmiyati, F., Sutarno, Sas, M.,G.,A., and Herwibawa, B., 2018, Mutagenic effects of gamma rays on soybean (*Glycine max* L.) germination and seedlings, *IOP conference series: earth and environmental science*, 102(1).
- Ladics, G.,S., Bartholomaeus, A., Bregitzer, P., Doerr, N.,G., Gray, A., Holzhauser, T., Jordan, M., Keese, P., Kok, E., Macdonald, P., Parrott, W., Privalle, L., Raybould, A., Rhee, S.,Y., Rice, E., Romeis, J., Vaughn, J., Wal, J.,-M., and Glenn, K., 2015, Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants, *Transgenic research*, 24(4), 587–603.

- Laemmli, U.,K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Larkin, P.,J., and Scowcroft, W.,R., 1981, Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theoretical and applied genetics*, 60(4), 197–214.
- Lee, K.,J., Kim, J.,B., Kim, S.,H., Ha, B.,K., Lee, B.,M., Kang, S.,Y., and Kim, D.,S., 2011, Alteration of seed storage protein composition in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mutant lines induced by γ -irradiation mutagenesis, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12405–12410.
- Lee, L.,-Y., and Gelvin, S.,B., 2008, T-DNA Binary Vectors and Systems, *Plant physiology*, 146(2), 325–332.
- Lee, S.,-I., and Kim, N.,-S., 2014, Transposable Elements and Genome Size Variations in Plants, *Genomics & informatics*, 12(3), 87.
- Leigh, F., Kalendar, R., Lea, V., Lee, D., Donini, P., and Schulman, A.,H., 2003, Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques, *Molecular genetics and genomics*, 269(4), 464–474.
- Li, Z., Liu, Z.,-B., Xing, A., Moon, B.,P., Koellhoffer, J.,P., Huang, L., Ward, R.,T., Clifton, E., Falco, S.,C., and Cigan, A.,M., 2015, Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean, *Plant physiology*, 169(2), 960–970.
- Li, Z., Xing, A., Moon, B.,P., McCardell, R.,P., Mills, K., and Falco, S.,C., 2009, Site-Specific Integration of Transgenes in Soybean via Recombinase-Mediated DNA Cassette Exchange, *Plant physiology*, 151(3), 1087–1095.
- Liew, L., Singh, M., and Bhalla, P., 2017, A novel role of the soybean clock gene lux arrhythmo in male reproductive development, *Scientific reports*, 7(1).
- Lisch, D., 2013, How important are transposons for plant evolution?, *Nature reviews genetics*, 14, 49–61.
- Liu, B., Watanabe, S., Uchiyama, T., Kong, F., Kanazawa, A., Xia, Z., Nagamatsu, A., Arai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Masuta, C., Harada, K., and Abe, J., 2010, The soybean stem growth habit gene dt1 is an ortholog of *Arabidopsis* terminal flower1, *Plant physiology*, 153(1), 198–210.
- Liu, L., Song, W., Wang, L., Sun, X., Qi, Y., Wu, T., Sun, S., Jiang, B., Wu, C., Hou, W., Ni, Z., and Han, T., 2020, Allele combinations of maturity genes E1-E4 affect adaptation of soybean to diverse geographic regions and farming systems in China, *PLOS one*, 15(7).
- Liu, W., Chen, H., Li, L., Dong, M., Zhang, Z., Wan, Y., and Jin, W., 2021, Proteomic analysis of the seeds of transgenic rice lines and the corresponding nongenetically modified isogenic variety, *Journal of the science of food and agriculture*, 101(5), 1869–1878.
- Liu, W., Li, L., Zhang, Z., Dong, M., and Jin, W., 2020, iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of transgenic and non-transgenic maize seeds, *Journal of food composition and analysis*, 92.
- Liu, W., Xu, W., Li, L., Dong, M., Wan, Y., He, X., Huang, K., and Jin, W., 2018, iTRAQ-based quantitative tissue proteomic analysis of differentially expressed proteins (DEPs) in non-transgenic and transgenic soybean seeds, *Scientific reports*, 8(1), 1–10.

- Liu, Y., Zhang, Y.,X., Song, S.,Q., Li, J., Neal Stewart, C., Wei, W., Zhao, Y., and Wang, W.,Q., 2015, A proteomic analysis of seeds from Bt-transgenic *Brassica napus* and hybrids with wild *B. juncea*, *Scientific reports*, 5(1), 1–13.
- Lönnig, W.,-E., 2005, Mutation breeding, evolution, and the law of recurrent variation, *Research signpost india recent res. devel. genet. breeding*, Research Signpost, SISBN: 8130800071, 45-70.
- Lopes, A.,M., Bobrowski, V.,L., e Silva, S.,D., do. A., and Deuner, S., 2017, Morphophysiological and biochemical alterations in *Ricinus communis* L. seeds submitted to cobalt⁶⁰ gamma radiation, *Anais da academia brasileira de ciências*, 89(3), 1925–1933.
- Lowry, O.,H., Rosebrough, N.,J., Farr, A.,L., and Randall, R.,J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *The journal of biological chemistry*, 193(1), 265–75.
- Luo, J., Ning, T., Sun, Y., Zhu, J., Zhu, Y., Lin, Q., and Yang, D., 2009, Proteomic analysis of rice endosperm cells in response to expression of HGM-CSF, *Journal of proteome research*, 8(2), 829–837.
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., and Rodríguez-Cerezo, E., 2012, Deployment of new biotechnologies in plant breeding, *Nature biotechnology*, 30, 231-239.
- Macgillivray, A.,J., and Wood, D.,R., 1974, The Heterogeneity of Mouse-Chromatin Nonhistone Proteins as Evidenced by Two-Dimensional Polyacrylamide-Gel Electrophoresis and Ion-Exchange Chromatography, *European journal of biochemistry*, 41(1), 181–190.
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E., and Yamamoto, T., 2014, Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis, *Clinical proteomics*, 11(1), 16.
- Makarevitch, I., Waters, A.,J., West, P.,T., Stitzer, M., Hirsch, C.,N., Ross-Ibarra, J., and Springer, N.,M., 2015, Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress, *PLoS genetics*, 11(1).
- Makhzoum, A.,B., Sharma, P., Bernards, M.,A., and Trémouillaux-Guiller, J., 2013, *Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications*, Phytochemicals, plant growth, and the environment, In: Gang, D., (ed.), Chapter 6 , Springer New York, New York, ISBN: 978-1-4614-4065-9, 95–142.
- Mankin, S.,L., Hill, D.,S., Olhoft, P.,M., Toren, E., Wenck, A.,R., Nea, L., Xing, L., Brown, J.,A., Fu, H., Ireland, L., Jia, H., Hillebrand, H., Jones, T., and Song, H.,S., 2007, Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPBP2659) plasmid pRi2659, *In vitro cellular and developmental biology - plant*, 43, 521-535.
- Manninen, O., Kalendar, R., Robinson, J., and Schulman, A.,H., 2000, Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley, *Molecular and general genetics* *mgg*, 264(3), 325–334.
- Marakli, S., Yilmaz, S., and Gozukirmizi, N., 2012, BARE1 and BAGY2 Retrotransposon Movements and Expression Analyses in Developing Barley Seedlings, *Biotechnology & biotechnological equipment*, 26(6), 3451–3456.

- Marcu, D., Damian, G., Cosma, C., Cristea, V, 2013, Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*), *Springer*, 39, 625–634.
- Matsaunyane, L.,B.,T., and Dubery, I.,A., 2018, *Molecular Approaches to Address Intended and Unintended Effects and Substantial Equivalence of Genetically Modified Crops*, Transgenic crops - emerging trends and future perspectives, In: Khan, M., Malik, K. (ed.), IntechOpen, ISBN: 978-1-83962-493-3.
- McCabe, D.,E., Swain, W.,F., Martinell, B.,J., and Christou, P., 1988, Stable Transformation of Soybean (Glycine Max) by Particle Acceleration, *Nature biotechnology*, 6(8), 923–926.
- Méchin, V., Damerval, C., and Zivy, M., 2007, *Total protein extraction with tca-acetone*, Plant proteomics, In: Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Mechin, V. (ed.), Chapter 1, Humana Press, New Jersey, ISBN: 978-1-58829-635-1, 1–8.
- Melki, M., and Marouani, A., 2010, Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat, *Environmental chemistry letters*, 8(4), 307–310.
- Meriç, S., Çakir, Ö., Turgut-Kara, N., and Ari, Ş., 2014, Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples, *Genetics and molecular research*, 13(1), 1160–1168.
- Mesnage, R., Agapito-Tenfen, S.,Z., Vilperte, V., Renney, G., Ward, M., Séralini, G.,E., Nodari, R.,O., and Antoniou, M.,N., 2016, An integrated multi-omics analysis of the NK603 Roundup-tolerant GM maize reveals metabolism disturbances caused by the transformation process, *Scientific reports*, 6(1), 1–14.
- Meyer, A., Tempe, J., and Costantino, P., 2000, *Hairy root: a molecular overview functional analysis of Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes*, Plant-microbe interactions, In: Stacey, G. and Keen, N. (ed.), APS Press, Minnesota, 93–139.
- Miranda, C., Scaboo, A., Cober, E., Denwar, N., and Bilyeu, K., 2020, The effects and interaction of soybean maturity gene alleles controlling flowering time, maturity, and adaptation in tropical environments, *BMC plant biology* 2020 20:1, 20(1), 1–13.
- Mudibu, J., Nkongolo, K.,K.,C., Kalonji-Mbuyi, A., and Kizungu, R., V 2012, Effect of Gamma Irradiation on Morpho-Agronomic Characteristics of Soybeans (*Glycine max* L.), *American journal of plant sciences*, 3, 331–337.
- Neumann, P., Novák, P., Hošťáková, N., and MacAs, J., 2019, Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification, *Mobile dna*, 10(1), 1–17.
- O'Farrell, P.,H., 1975, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins., *The journal of biological chemistry*, 250(10), 4007–21.
- OECD 1993, *Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: Concepts and principles*, OECD Publishing, Paris.
- OECD 2006, *An Introduction to the Food Feed Safety Consensus Documents of the Task Force*. OECD Environment, Health and Safety Publications, Paris.

- Oladosu, Y., Rafii, M.,Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H.,A., Miah, G., and Usman, M., 2016, Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review, *Biotechnology and biotechnological equipment*, 30, 1-16.
- Oliver, K.,R., and Greene, W.,K., 2009, Transposable elements: powerful facilitators of evolution, *BioEssays*, 31(7), 703–714.
- Orozco-Arias, S., Isaza, G., and Guyot, R., 2019, Retrotransposons in plant genomes: Structure, identification, and classification through bioinformatics and machine learning, *International journal of molecular sciences*, 20(15).
- Ortega, M.,A., All, J.,N., Boerma, H.,R., and Parrott, W.,A., 2016, Pyramids of QTLs enhance host–plant resistance and Bt-mediated resistance to leaf-chewing insects in soybean, *Theoretical and applied genetics*, 129(4), 703–715.
- Ozyigit, I.,I., Dogan, I., and Artam Tarhan, E., 2013, *Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation and its biotechnological applications in crops*, Crop improvement: new approaches and modern techniques, In: Hakeem, K., Ahmad, P., Ozturk, M. (ed.), Chapter 1, Springer Boston, Boston, ISBN: 978-1-4899-7357-3, 1-48.
- Padgett, S.,R., Kolacz, K.,H., Delannay, X., Re, D.,B., LaVallee, B.,J., Tinius, C.,N., Rhodes, W.,K., Otero, Y.,I., Barry, G.,F., Eichholtz, D.,A., Peschke, V.,M., Nida, D.,L., Taylor, N.,B., and Kishore, G.,M., 1995, Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line, *Crop science*, 35(5), 1451-1461.
- Park, H., Weier, S., Razvi, F., Peña, P.,A., Sims, N.,A., Lowell, J., Hungate, C., Kissinger, K., Key, G., Fraser, P., Napier, J.,A., Cahoon, E.,B., and Clemente, T.,E., 2017, Towards the development of a sustainable soya bean-based feedstock for aquaculture, *Plant biotechnology journal*, 15(2), 227–236.
- Paszkowski, J., 2015, Controlled activation of retrotransposition for plant breeding, *Current opinion in biotechnology*, 32, 200–206.
- Patel, D., Power, J.,B., Anthony, P., Badakshi, F., Heslop-Harrison, J.,S., and Davey, M.,R., 2011, Somatic hybrid plants of *Nicotiana × sanderae* (+) *N. debneyi* with fungal resistance to *Peronospora tabacina*, *Annals of botany*, 108(5), 809-819.
- Pfaffl, M.,W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research*, 29(9), 45.
- Pierce, E.,C., LaFayette, P.,R., Ortega, M.,A., Joyce, B.,L., Kopsell, D.,A., and Parrott, W.,A., 2015, Ketocarotenoid production in soybean seeds through metabolic engineering, *PLoS one*, 10(9).
- Pollier, J., Morreel, K., Geelen, D., and Goossens, A., 2011, Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Journal of natural products*, 74(6), 1462–1476.
- Querci, M., and Mazzara, M., 2006, *Characteristics Of Roundup Ready Soybean, Mon810 maize and Bt-176 maize*, The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms user manual, In: Querci, M., Jermini, M., and Eede, G. Van den (ed.), European Communities, Luxembourg.
- Rabilloud, T., and Lelong, C., 2011, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial, *Journal of proteomics*, 74(10), 1829–1841.

- Rahman, M., Rao, A.,Q., Batool, F., Azam, S., Shahid, A.,A., and Husnain, T., 2012, Transgene Copy Number and Phenotypic Variations in Transgenic Basmati Rice, *J. anim. plant sci*, 22(4).
- Raina, A., Laskar, R., Khursheed, S., Amin, R., Tantray, Y., Parveen, K., and Khan, S., 2016, Role of Mutation Breeding in Crop Improvement- Past, Present and Future, *Asian research journal of agriculture*, 2(2), 1–13.
- Ram, H., Soni, P., Salvi, P., Gandass, N., Sharma, A., Kaur, A., and Sharma, T.,R., 2019, Insertional mutagenesis approaches and their use in rice for functional genomics, *Plants.MDPI AG*, 310.
- Ratcliffe, O.,J., Amaya, I., Vincent, C.,A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E.,S., and Bradley, D.,J., 1998, A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants, *Development*, 125(9), 1609–1615.
- Resmi Gazete 2008, *BİTKİ ÇEŞİTLERİNİN KAYIT ALTINA ALINMASI YÖNETMELİĞİ*, Türkiye. <https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Yonetmelikler/BitkiCesitKayit.pdf> (Ziyaret Tarihi: 23 Aralık 2021).
- Ricroch, A.,E., Bergé, J.,B., and Kuntz, M., 2011, Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques, *Plant physiology*, 155(4), 1752–1761.
- Riker, A.,J., Banfield, W.,M., Wright, W.,H., Keitt, G.,W., and Sagen, H.,E., 1930, Studies on infectious hairy root of nursery apple trees, *Journal of agricultural research*, 41, 507–540.
- Risk, J.,M., Selter, L.,L., Chauhan, H., Krattinger, S.,G., Kumlehn, J., Hensel, G., Viccars, L.,A., Richardson, T.,M., Buesing, G., Troller, A., Lagudah, E.,S., and Keller, B., 2013, The wheat Lr34 gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley, *Plant biotechnology journal*, 11(7), 847–854.
- Ronald, P.,C., 2014, Lab to Farm: Applying Research on Plant Genetics and Genomics to Crop Improvement, *PLoS biology*.Editör S. Kamoun, 12(6).
- Roychowdhury, R., and Tah, J., 2013, *Mutagenesis-a potential approach for crop improvement*, Crop improvement: new approaches and modern techniques, In: Hakeem, K., Ahmad, P. and Ozturk, M. (ed.), Chapter 4, Springer Boston, Boston, ISBN: 978-1-4899-7357-3, 149–187.
- Sahebi, M., Hanafi, M.,M., van Wijnen, A.,J., Rice, D., Rafii, M.,Y., Azizi, P., Osman, M., Taheri, S., Bakar, M.,F.,A., Isa, M.,N.,M., and Noor, Y.,M., 2018, Contribution of transposable elements in the plant's genome, *Gene*, 665, 155–166.
- Sahin, O., Karlik, E., Meric, S., Ari, S., and Gozukirmizi, N., 2020, Genome organization changes in GM and non-GM soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under salinity stress by retro-transposition events, *Genetic resources and crop evolution*, 67(6), 1551–1566.
- Saika, H., Nishizawa-Yokoi, A., and Toki, S., 2014, The non-homologous end-joining pathway is involved in stable transformation in rice, *Frontiers in plant science*, 560.
- Satoh-Nagasawa, N., Mori, M., Nakazawa, N., Kawamoto, T., Nagato, Y., Sakurai, K., Takahashi, H., Watanabe, A., and Akagi, H., 2012, Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (OsHMA2) restrict the translocation of zinc and cadmium, *Plant and cell physiology*, 53(1), 213–224.

- Savka, M.,A., 1990, Induction of Hairy Roots on Cultivated Soybean Genotypes and Their Use to Propagate the Soybean Cyst Nematode, *Phytopathology*, 80(5), 503.
- SCBD 2000, *Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity: annex III, risk assessment*, Montreal, Canada, <http://bch.cbd.int/protocol/text/>.
- Schnable, P.,S., Hsia, A.,-P., and Nikolau, B.,J., 1998, Genetic recombination in plants, *Current opinion in plant biology*, 1(2), 123–129.
- Schnell, J., Steele, M., Bean, J., Neuspiel, M., Girard, C., Dormann, N., Pearson, C., Savoie, A., Bourbonnière, L., and Macdonald, P., 2015, A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments, *Transgenic research*, 24(1), 1–17.
- Schouten, H.,J., vande Geest, H., Papadimitriou, S., Bemer, M., Schaart, J.,G., Smulders, M.,J.,M., Perez, G.,S., and Schijlen, E., 2017, Re-sequencing transgenic plants revealed rearrangements at T-DNA inserts, and integration of a short T-DNA fragment, but no increase of small mutations elsewhere, *Plant cell reports*, 36(3), 493–504.
- Schulman, A.,H., Flavell, A.,J., Paux, E., and Ellis, T.,H.,N., 2012, *The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants*, Mobile genetic elements, In: Bigot, Y. (ed.), Chapter 7, Springer Science+Business Media, LLC, ISBN: 978-1-61779-602-9, 115–153.
- Shannon, S., and Meeks-Wagner, D.,R., 1991, A Mutation in the Arabidopsis TFL1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development., *The plant cell*, 3(9), 877–892.
- Sharma, V., and Nandineni, M.,R., 2014, Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems, *Molecular phylogenetics and evolution*, 73, 10–17.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J., V. and Mann, M., 2006, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature protocols*, 1(6), 2856–2860.
- Shirasu, K., 2000, A Contiguous 66-kb Barley DNA Sequence Provides Evidence for Reversible Genome Expansion, *Genome research*, 10(7), 908–915.
- Shu, Q.,Y., Forster, B.,P., and Nakagawa, H., 2012, *Principles and applications of plant mutation breeding*, *Plant mutation breeding and biotechnology*, CABI, Wallingford, ISBN: 978-1-780-64085-3.
- Sigmaz, B., Agar, G., Arslan, E., Aydin, M., and Taspinar, M.,S., 2015, The role of putrescine against the long terminal repeat (LTR) retrotransposon polymorphisms induced by salinity stress in *Triticum aestivum*, *Acta physiologiae plantarum*, 37(11), 1–9.
- Song, Q., Jenkins, J., Jia, G., Hyten, D.,L., Pantalone, V., Jackson, S.,A., Schmutz, J., and Cregan, P.,B., 2016, Construction of high resolution genetic linkage maps to improve the soybean genome sequence assembly Glyma1.01, *BMC genomics*, 17(33).
- Specht, J.,E., Diers, B.,W., Nelson, R.,L., Toledo, J.,F.,F., de, Torrión, J.,A., and Grassini, P., 2014, *Soybean*, Yield gains in major u.s. field crops, In: Stephen, S., Diers, B., Specht, J., and Carver, B. (ed.), Chapter 12, The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, ISBN: 978-0-891-18619-9 , 211–355.

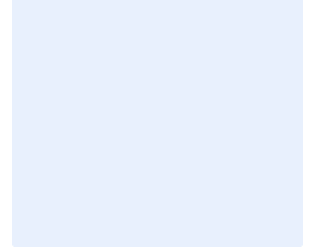
- Stamhuis, I.,H., Meijer, O.,G., and Zevenhuizen, E.,J., 1999, Hugo de Vries on heredity, 1889-1903. Statistics, Mendelian laws, pangenes, mutations., *Isis; an international review devoted to the history of science and its cultural influences*, 90(12).
- Tan, Y., Tong, Z., Yang, Q., Sun, Y., Jin, X., Peng, C., Guo, A., and Wang, X., 2017, Proteomic analysis of phytase transgenic and non-transgenic maize seeds, *Scientific reports*, 7(1), 1–11.
- Tanksley, S.,D., Ganai, M.,W., Prince, J.,P., De Vicente, M.,C., Bonierbale, M.,W., Broun, P., Fulton, T.,M., Giovannoni, J.,J., Grandillo, S., Martin, G.,B., Messeguer, R., Miller, J.,C., Miller, L., Paterson, A.,H., Pineda, O., Roder, M.,S., Wing, R.,A., Wu, W., and Young, N.,D., 1992, High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes, *Genetics*, 132, 1141–1160.
- The European Commission 2013, Commission implementing regulation (EU) No 503/2013 of 3 April 2013 on applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council and amending Commisssi, *Official journal of the european union*.
- Thorpe, T.,A., 2007, History of plant tissue culture, *Molecular biotechnology*, 37(2), 169–180.
- Thudi, M., Palakurthi, R., Schnable, J.,C., Chitikineni, A., Dreisigacker, S., Mace, E., Srivastava, R.,K., Satyavathi, C.,T., Odeny, D., Tiwari, V.,K., Lam, H.,M., Hong, Y., Bin, Singh, V.,K., Li, G., Xu, Y., Chen, X., Kaila, S., Nguyen, H., Sivasankar, S., Jackson, S.,A., Close, T.,J., Shubo, W., and Varshney, R.,K., 2021, Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture, *Journal of plant physiology*, 257.
- Tian, Z., Wang, X., Lee, R., Li, Y., Specht, J.,E., Nelson, R.,L., McClean, P.,E., Qiu, L., and Ma, J., 2010, Artificial selection for determinate growth habit in soybean, *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(19), 8563–8568.
- Tong, X., Li, Y., Xiang, T., Chen, Z., Wang, L., Zhang, C., Feng, M., and Wu, L., 2018, The complete genome sequence of cucumopine-type *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659), a nature's genetic engineer inducing hairy roots, *International journal of agriculture and biology*, 20(5), 1167-1174.
- Tsubokura, Y., Matsumura, H., Xu, M., Liu, B., Nakashima, H., Anai, T., Kong, F., Yuan, X., Kanamori, H., Katayose, Y., Takahashi, R., Harada, K., and Abe, J., 2013, Genetic Variation in Soybean at the Maturity Locus E4 Is Involved in Adaptation to Long Days at High Latitudes, *Agronomy*, 3(1), 117–134.
- Tsubokura, Y., Watanabe, S., Xia, Z., Kanamori, H., Yamagata, H., Kaga, A., Katayose, Y., Abe, J., Ishimoto, M., and Harada, K., 2014, Natural variation in the genes responsible for maturity loci E1, E2, E3 and E4 in soybean, *Annals of botany*, 113(3), 429–441.
- Umavathi, S., and Mullainathan, L., 2015, Physical and chemical induced mutagenesis study for identifying lethality dose in chick pea (*Cicer arietinum* L.) Var. Co - 4, *International letters of natural sciences*, 08, 1–5.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs 2019, *World Population Prospects 2019: Highlights*, New York.
- USDA-APHIS 2011, *Monsanto improved fatty acid profile MON 87705 soybean petition 09- 201-01p Final Environmental Assessment*, Riverdale.

- USDA-Economic Research Service 2019, *USDA ERS - Recent Trends in GE Adoption*. <https://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us/recent-trends-in-ge-adoption.aspx>.
- USDA 2018, *World Agricultural Production - U.S. Department of Agriculture - Circular Series - WAP 3-18, Circular series*.
- Vicient, C.,M., 2001, Envelope-Class Retrovirus-Like Elements Are Widespread, Transcribed and Spliced, and Insertionally Polymorphic in Plants, *Genome research*, 11(12), 2041–2049.
- Vicient, C.,M., and Casacuberta, J.,M., 2017, Impact of transposable elements on polyploid plant genomes, *Annals of botany*, 120(2), 195–207.
- Vickers, C.,E., Schenk, P.,M., Li, D., Mullineaux, P.,M., and Gresshoff, P.,M., 2007, pGFPGUSPlus, a new binary vector for gene expression studies and optimising transformation systems in plants, *Biotechnology letters*, 29, 1793-1796.
- Vidal, N., Barbosa, H., Jacob, S., and Arruda, M., 2015, Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses, *Food chemistry*, 180, 288–294.
- Vitte, C., Fustier, M.,-A., Alix, K., and Tenaillon, M.,I., 2014, The bright side of transposons in crop evolution, *Briefings in functional genomics*, 13(4), 276–295.
- Wang, L., Wang, X., Jin, X., Jia, R., Huang, Q., Tan, Y., and Guo, A., 2015, Comparative proteomics of Bt-transgenic and non-transgenic cotton leaves, *Proteome science*, 13.
- Wang, S., Song, Y., Xiang, T., Wu, P., Zhang, T., Wu, D., Zhou, S., and Li, Y., 2016, Transgenesis of *Agrobacterium rhizogenes* K599 orf3 into plant alters plant phenotype to dwarf and branch, *Plant cell, tissue and organ culture*, 127(1), 207-215.
- Weber, N., Halpin, C., Hannah, L.,C., Jez, J.,M., Kough, J., and Parrott, W., 2012, Editor's Choice: Crop Genome Plasticity and Its Relevance to Food and Feed Safety of Genetically Engineered Breeding Stacks, *Plant physiology*, 160(4), 1842–1853.
- Wendel, J.,F., Jackson, S.,A., Meyers, B.,C., and Wing, R.,A., 2016, Evolution of plant genome architecture, *Genome biology*, 17(1), 37.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.,L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., and Schulman, A.,H., 2007, A unified classification system for eukaryotic transposable elements, *Nature reviews genetics*, 8, 973-982.
- Wilkes, R.,S., and Bringe, N.,A., 2015, *Applications of Trait Enhanced Soybean Oils*, Trait-modified oils in foods, In: Orthoefer, F. and List, G. (ed.), Chapter 5, John Wiley & Sons, Ltd, UK Chichester,, ISBN: 978-0-8138-0872-7, 71–92.
- Willems, A., and Collins, M.,D., 1993, Phylogenetic analysis of *Rhizobia* and *Agrobacteria* based on 16s rna gene sequences, *International journal of systematic bacteriology*, 43(2), 305–313.
- Xiang, T., Wang, S., Li, Y., Zhang, T., Wu, D., and Zhou, S., 2016, Cucumopine Type *Agrobacterium Rhizogenes* K599 (NCPBP2659) T-DNA Mediated Plant Transformation And Its Application, *Bangladesh journal of botany*, 45(4), 935-945.

- Xu, M., Xu, Z., Liu, B., Kong, F., Tsubokura, Y., Watanabe, S., Xia, Z., Harada, K., Kanazawa, A., Yamada, T., and Abe, J., 2013, Genetic variation in four maturity genes affects photoperiod insensitivity and PHYA-regulated post-flowering responses of soybean, *BMC plant biology*, 13(1), 1–14.
- Yamaguchi, H., 2018, Mutation breeding of ornamental plants using ion beams, *Breeding science*, 68(1), 71–78.
- Yang, Y., Jittayasothorn, Y., Chronis, D., Wang, X., Cousins, P., and Zhong, G.,-Y., 2013, Molecular Characteristics and Efficacy of 16D10 siRNAs in Inhibiting Root-Knot Nematode Infection in Transgenic Grape Hairy Roots, *PLoS one*, 8(7).
- Yannic, G., Baumel, A., and Ainouche, M., 2004, Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (*Poaceae*), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast, *Heredity*, 93(2), 182–188.
- Yilmaz, S., Marakli, S., and Gozukirmizi, N., 2014, BAGY2 retrotransposon analyses in barley calli cultures and regenerated plantlets, *Biochemical genetics*, 52(5–6), 233–244.
- Yilmaz, S., Marakli, S., Yuzbasioglu, G., and Gozukirmizi, N., 2018, Short-term mutagenicity test by using IRAP molecular marker in rice grown under herbicide treatment, *Biotechnology and biotechnological equipment*, 32(4), 923–928.
- Yuzbasioglu, G., Yilmaz, S., and Gozukirmizi, N., 2016, Houba retrotransposon-based molecular markers: a tool for variation analysis in rice, *Turkish journal of agriculture and forestry*, 40, 456–464.
- Zhai, H., Lü, S., Wu, H., Zhang, Y., Zhang, X., Yang, J., Wang, Y., Yang, G., Qiu, H., Cui, T., and Xia, Z., 2015, Diurnal Expression Pattern, Allelic Variation, and Association Analysis Reveal Functional Features of the E1 Gene in Control of Photoperiodic Flowering in Soybean, *PLOS one*, 10(8).
- Zhang, D., Xiang, T., Li, P., and Bao, L., 2011, Transgenic plants of *Petunia hybrida* harboring the CYP2E1 gene efficiently remove benzene and toluene pollutants and improve resistance to formaldehyde, *Genetics and molecular biology*, 34(4), 634–639.
- Zhang, L., Yang, X.,D., Zhang, Y.,Y., Yang, J., Qi, G.,X., Guo, D.,Q., Xing, G.,J., Yao, Y., Xu, W.,J., Li, H.,Y., Li, Q.,Y., and Dong, Y.,S., 2014, Changes in oleic acid content of transgenic soybeans by antisense RNA mediated posttranscriptional gene silencing, *International journal of genomics*, 921950.
- Zhang, Y., Scherthaner, J., Labbé, N., Hefford, M.,A., Zhao, J., and Simmonds, D.,H., 2014, Improved protein quality in transgenic soybean expressing a de novo synthetic protein, MB-16, *Transgenic research*, 23(3), 455–467.
- Zhu, J., Takeshima, R., Harigai, K., Xu, M., Kong, F., Liu, B., Kanazawa, A., Yamada, T., and Abe, J., 2019, Loss of Function of the E1- Like-b Gene Associates With Early Flowering Under Long-Day Conditions in Soybean, *Frontiers in plant science*, 9.
- Zolla, L., Rinalducci, S., Antonioli, P., and Righetti, P.,G., 2008, Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications, *Journal of proteome research*, 7(5), 1850–1861.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sinan MERİÇ
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bülent Ecevit Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	24.06.2010

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Uluslararası Hakemli / SCI-Expanded Özgün Makale Çelik Özge, Ayan Alp, Meriç Sinan, Atak Çimen, (2021), Comparison of tolerance related proteomic profiles of two drought tolerant tomato mutants improved by gamma radiation, Journal of Biotechnology, 0168-1656, 330, 35-44. Özgün Makale Şahin Olcay, Karlık Elif, Meriç Sinan, Arı Şule, Gözükırmızı Nermin, (2020), Genome organization changes in GM and non-GM soybean [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.] under salinity stress by retro-transposition events, Genetic Resources and Crop Evolution, 0925-9864, 67, 6, 1551-1566.	

Özgün Makale Öğrüş Ildız Gülce, Çelik Özge, Atak Çimen, Yılmaz Ayberk, Kabuk Hayrunnisa Nur, Kaygısız Ersin, Ayan Alp, Meriç Sinan, Rui Fausto, (2019). EXPRESS: Raman Spectroscopic and Chemometrics Investigation of Lipid-Protein Ratio Contents of Soybean Mutants. Applied Spectroscopy, 370281985994, Doi: 10.1177/0003702819859940 (Yayın No: 5193117).

Özgün Makale Çelik Özge, Meriç Sinan, Ayan Alp, Atak Çimen, (2018). Epigenetic analysis of WRKY Transcription Factor Genes in Salt Stressed Rice (*Oryza sativa* L.) plants. Environmental and Experimental Botany, Doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.12.015 (Yayın No: 4544610).

Özet Bildiri Ayan Alp, Çelik Özge, Meriç Sinan, Atak Çimen, (2017). Inducing salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) varieties by gamma radiation. Journal of Biotechnology, 256, 103-104., Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1154 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4162584).

Özet Bildiri Meriç Sinan, Çelik Özge, Ayan Alp, Atak Çimen, (2017). Investigation of Tos-17 transposon mobility in salt stressed rice (*Oryza sativa* L.) plants by IRAP method. Journal of Biotechnology, 256, 105-106., Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1161 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4162602).

Özet Bildiri Çelik Özge, Meriç Sinan, Ayan Alp, Atak Çimen, (2017). Magnetic field induced production of anti-cancer agent vincristine from Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*) plant. Journal of Biotechnology, 256, 106, Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1163 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4162619).

Özet Bildiri Ayan Alp, Çelik Özge, Meriç Sinan, Atak Çimen, (2017). Two-dimensional protein profiles of drought tolerant tomato (*Solanum lycopersicum*) mutants improved by gamma radiation. Journal of Biotechnology, 256, 106, Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1162 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4162611).

Özet Bildiri Özbilgiç Resul, Meriç Sinan, Sahin Olcay, Tombul Nagihan, Arı Şule, (2016). Investigation of horizontal gene transfer (HGT) from genetically modified plants to bacteria. The FEBS Journal, 283, 127-427., Doi: 10.1111/febs.13808 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 4503303).

Özgün Makale Meriç Sinan, Çakır Özgür, Turgut Kara Neslihan, Arı Şule, (2014). Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples. Genetics and Molecular Research, 13(1), 1160-1168., Doi: 10.4238/2014.February.25.2 (Yayın No: 4503365).

Özgün Makale Mandacı Merve, Çakır Özgür, Turgut Kara Neslihan, Meriç Sinan, Arı Şule, (2014). Detection of genetically modified organisms in soy products sold in Turkish market. Food Science and Technology (Campinas), 34(4), 717-722., Doi: 10.1590/1678-457X.6441 (Yayın No: 4503397).

Kitap ve Kitap Bölümleri

Kitap Bölümü, Ayan Alp, Gümüş Tamer, Meriç Sinan, Atak Çimen, 2021, Next generation of transgenic plants: from farming to pharming, Genetically Modified Plants and Beyond, ISBN 978-1-83969-876-7: IntechOpen Limited.

Kitap Bölümü, Meriç Sinan, Gümüş Tamer, Ayan Alp, 2021, Plant-based Vaccines: The Future of Preventive Healthcare?, Botany - Recent Advances and Applications, ISBN: 978-1-83969- 259-8: IntechOpen Limited.

Kitap Bölümü Meriç Sinan, Ayan Alp, Atak Çimen, 2020, Molecular Abiotic Stress Tolerant Strategies: From Genetic Engineering to Genome Editing Era, Abiotic Stress in Plants, ISBN: 978-1- 83881-062-7: IntechOpen.

Kitap Bölümü Çelik Özge, Ayan Alp, Meriç Sinan, Atak Çimen, 2020, Heavy Metal Stress-Responsive PhytomiRNAs, Cellular and Molecular Phytotoxicity of Heavy Metals, 137 - 155, ISBN:978-3-030-45975-8: Springer, Cham.

Kitap Bölümü Çelik Özge, Meriç Sinan, Ayan Alp, Atak Çimen, 2019, Biotic stress tolerant plants through small RNA technology, *Plant Small RNA: Biogenesis, Regulation and Application*, Guleria P., Kumar V., Eds., Academic Press Elsevier Science, Oxford/Amsterdam.

Kitap Bölümü Çakır Özgür, Meriç Sinan, Arı Şule, 2017, GMO analysis methods in Food: From Today To Tomorrow, *Food analysis: Innovative Analytical Tools for Safety and Quality Assessment*, Spizzirri G., Cirillo G., Eds., Scrivener Publishing LLC in cooperation with John Wiley and Sons Ltd.

Kitap Bölümü Çakır Özgür, Meriç Sinan, Arı Şule, 2015, Detection of Genetically Modified Organisms in Feeds, *Genetically Modified Organisms in Food: Production, Safety and Public Health*, Watson R.R., Preedy V.R., Eds., Academic Press Elsevier Science, Oxford/Amsterdam.

Bildiriler

Aydın Tuğçe, Sinan Meriç, Tamer Gümüş, Alp Ayan, Çimen Atak (2021). Induction of Hairy Root Cultures of *Calendula Officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Genetic Transformation and Production of Secondary Metabolites. Third International Green Biotechnology Congress (Özet Bildiri/Poster).

Meriç Sinan, Ayan Alp, Atak Çimen, (2019). Optimization of Tissue Culture Media Inducing Essential Oil Production of Lavender (*Lavandula angustifolia*). II. International Green Biotechnology Congress (Özet Bildiri/Poster).

Atak Çimen, Çelik Özge, Ayan Alp, Meriç Sinan, Gümüş Tamer, (2019). ROS Scavenging Differences of Tomato Cultivars Under Salt Stress. II. International Green Biotechnology Congress (Özet Bildiri/Poster).

Ayan Alp, Meriç Sinan, Çelik Özge, Atak Çimen, (2019). RAPD Analysis of Salinity and Drought Tolerant Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) Mutants Generated by Gamma Radiation. II. International Green Biotechnology Congress (Özet Bildiri/Poster).

Sahin Olcay, Meriç Sinan, Gürle Deniz, Arı Şule (2017). Genomic Analysis of Feeder Soybean Seeds Under Salinity Stress. International Green Biotechnology Congress, 93-93. (Özet Bildiri/Poster).

