

## BÖCEKLERE DAYANIKLILIK ISLAHINDA GENETİK MÜHENDİSLİĞİNİN KULLANIMI

**Metin TOSUN İlknur AKGÜN Sevim SAĞSÖZ**  
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Erzurum

**ÖZET :** Zararlı böcekler, dayanıksız bitkilerin veriminde ve kalitesinde önemli düşüişlere neden olurlar. Zararlılarla mücadelede ekim nöbeti, biyolojik kontrol ve pestisit kullanımı gibi değişik yöntemler uygulanmaktadır. Bunlardan ekim nöbeti ve biyolojik kontrol uygulamalarından alınan sonuçlar sınırlıdır. Zararlılarla savaşta günümüzde pestisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, pestisitler çevre ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri yanında ekolojik dengenin bozulmasına da neden olmaktadır. Bu konuda en etkili uygulama dayanıklı çeşitlerin elde edilmesidir. Bu amaçla seleksiyon ve melezleme gibi geleneksel ıslah yöntemlerinin kullanımıyla başarıya ulaşmak zaman alıcı ve oldukça sınırlıdır. Günümüzde birçok alanda kullanılan ve 1970'li yıllarda başlayan genetik mühendisliğinden dayanıklılık ıslahı çalışmaları da yararlanılmaktadır. Fasulye tohumlarında bulunan arcelin geni ve yem börülçesi tohumlarında bulunan tripsin inhibitör geni kullanılarak bazı zararlılara karşı dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir. Hatta; bitkilerle ilişkisi olmayan farklı bir organizmadan (*Bacillus thuringiensis*), genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak *cryIA(b)* ve *cryIA(c)* genleri izole edilip pamuk, tütün ve domatese aktarılmıştır. Böylece *Lepidoptera*, *Coleoptera* ve *Diptera*'lara dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bu bitkiler üzerinde yapılan laboratuvar ve tarla testlerinden olumlu sonuçlar alınmıştır.

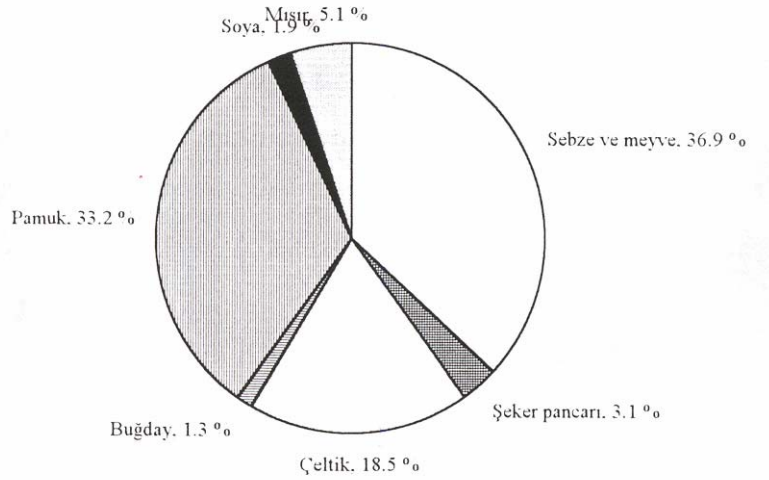
### THE USE OF GENETIC ENGINEERING IN BREEDING FOR INSECT RESISTANCE

**SUMMARY:** Harmful insect cause reductions in the yield and quality of susceptible plants. Some methods such as crop rotation, biological control and pesticides were used for insect control. The results obtained from crop rotations and biological control are limited. At present, pesticides are commonly used for pest control, but pesticides have negative effect on human and environment causing deterioration in ecological balance. In this subject, the best strategy is to breed resistant plants. Conventional breeding methods such as selection and hybridization are highly limited and take long time. At present, genetic engineering that are used in a number of areas and started in 1970s has also been used in breeding for resistance. Resistant transgenic plants to some pests were developed using arcelin gene in bean seeds and tripsin inhibitor gene in cowpea seeds. *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes isolated from different organism such as *Bacillus thuringiensis* that are not related to plants using methods of genetic engineering were transferred to cotton, tobacco and tomato. In this way, resistant transgenic plants to *Lepidoptera*, *Coleoptera* and *Diptera* were developed. These plants were tested in the field and laboratory and positive results were obtained.

### GİRİŞ

Tarımda böceklerle savaşta pestisitlerin kullanımı ve ekim nöbeti uygulaması gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır. Ekim nöbeti aynı böcek türü için alternatif tüm besin kaynaklarını temin etmeyecek şekilde uygulanmalıdır. Günümüzde, böceklerin neden olduğu kayıpları önleyerek yüksek verimin elde edilmesi büyük oranda kimyasal pestisitlerin kullanımına bağlıdır. Ancak, bunun bazı dezavantajları söz konusudur. Bunlardan bazıları şu şekilde sıralanabilir:

1. Tarımsal ilaçlamanın yapılması hava koşullarına bağlıdır. Örneğin, yağışlı havalarda ilaçlama yapılamaz. Ayrıca, uygulanan kimyasalların çoğu ya buharlaşmayla veya bitki yüzeyinden yıkanmayla israf edilmektedir.
2. Kök, gövde veya meyvelerin iç kısmı gibi bitkinin en hassas kısımlarındaki böcekleri kimyasal maddelerle öldürmek zor olabilir. Yine, püskürtülen insektisitlerin bitkinin diğer yaprakları tarafından gölgelenen alt yapraklara ulaşması da zordur.
3. Böcek zararını önlemek için kimyasal maddelere harcanan para oldukça fazladır (Şekil 1). Yine, ilaçlamada kullanılacak püskürtme ekipmanı, işçilik ve yakıt giderlerinin genellikle ilaç maliyetine eşit olduğu kaydedilmiştir (Gatehouse, 1991).
4. Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Dayanıklı çeşit kullanımının en önemli yararı çevre ve insan sağlığı üzerinde hiçbir olumsuz etkisinin olmamasıdır. Dayanıklı bitkilerdeki aktif maddeler doğrudan bitki dokularında üretildikleri için kimyasal insektisitlerde olduğu gibi yeraltı suyunun kirlenmesi söz konusu değildir. Örneğin, *Bacillus thuringiensis* endotoksinleri ve tripsin inhibitörleri yüksek molekül ağırlığına sahip (sırasıyla 60.000 ve 13.000 kDa) doğal proteinlerdir. Bunlar, bakteriler aracılığıyla zehir etkisi olmayan ürünlere (amino asitlere) tamamen ayrıştırılabilirler (Meeusen, 1990).
5. Böceklerle uygulanacak kimyasal maddeler hedef organizmalara özgü değillerse, bu uygulamaya bağlı olarak yararlı organizmalar da ölebilirler. Bitkiler kendi doğal çevresinde besin için kendisine bağımlı böcekleri de kapsayan değişik organizmalar ile denge içerisinde yaşarlar. Bu böcekler öldüklerinde predatör böcekler, akarlar, kuşlar, balıklar ve memeliler için besin temin ederler. İlaçlamada sadece bitkiler dikkate alındığı için pestisitlerin hedef olmayan organizmalara toksiditesi genellikle gözardı edilmektedir (Gatehouse, 1991). Dayanıklı çeşit kullanılması durumunda kimyasal uygulamalarda ortaya çıkan bu olumsuzluklar görülmeyecektir.



Şekil 1. Ürünlere göre dünyada insektisit kullanımı için harcanan para (toplam 6075 milyon \$; Gatehouse, 1991).

Böceklerin kontrolünde kimyasal pestisitlerin kullanımı yanında alternatif uygulamalar da bulunmaktadır. Bu amaçla predatör ve parazit böceklerin kullanımı ve feromon (böcek salgısı) tuzaklar veya kısır böceklerin ortama bırakılmasıyla fertil yetişkinler arasında çiftleşmenin engellenmesi gibi biyolojik kontrol yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu konuda en etkili yöntem ise, böcek saldırısına karşı kalıtsal olarak dayanıklı bitkilerin geliştirilmesidir (Gatehouse, 1991).

Dayanıklılık ıslahı çalışmalarına başlarken ilk önce uygun geni taşıyan kaynağın bulunması gerekmektedir. Bu amaçla geleneksel ıslah yöntemlerinde en fazla kullanılan kaynak kültür çeşitlerinin yabani akrabalarıdır. Ancak, yabani bitkilerden melezleme ile kültür çeşitlerine istenilen özelliği transfer etmek zaman alıcı ve zor olduğu gibi, yabani bitkilerdeki istenmeyen özellikler de kültür çeşitlerine geçebilmektedir. Bu nedenle geleneksel ıslah yöntemleriyle başarılı sonuçların elde edilmesi sınırlı kalabilmektedir. Diğer taraftan bitki genetik mühendisliğiyle hedef türe bitki, bakteri ve hayvanları kapsayan oldukça geniş bir kaynak çeşidinden tek bir gen transfer edilebilmektedir. Transgenik bitkiler fonksiyonel bakteriyel enzimler ve memelilerin immunoglobulinleri gibi yabancı proteinlerin sentezi konusunda gerekli temel biyosentetik kapasiteye sahiptirler. Böylece, genetik mühendisliği teknikleri sayesinde tür engellerinin üstesinden gelinebilmekte ve transgenik bitkilerin karakterleri üzerinde tam bir kontrol sağlanabilmektedir. Bu yöntemle gen yalnızca transfer edilmekle kalmaz, uygun gen promotörleri kullanılarak genin ekspresyon zamanı ve süresi de belirlenebilmektedir (Hiatt ve ark., 1989; Jenkins ve ark., 1997; Sachs ve ark., 1998).

Insektisidal bileşiklerin protein gibi bir gen ürünü olmaları durumunda bunları kodlayan genin elde edilmesinde ve aktarılmasında teknik bir engel bulunmamaktadır (en azından teorik olarak). Bununla birlikte, çok aşamalı özel bir biyokimyasal yolun ürünü olan insektisidal bileşiği üreten transgenik bitkilerin elde edilmesi bugün için mümkün değildir. Genellikle, böyle yollar tam olarak karakterize edilememekte, her bir aşamada oluşturulan enzimlerin neler oldukları tam olarak bilinmemekte ve saflaştırılmamaktadırlar. Bu nedenle, gerekli multiple genlerin elde edilmesi zordur. Ayrıca, multiple genleri transfer etmek ve fonksiyonel biyokimyasal bir yolu oluşturmak için genler arasındaki işbirliği henüz başarısızdır. Bundan dolayı, böcek saldırısına karşı yüksek derecede dayanıklılık sağlayan alkaloidler gibi bileşiklerden sorumlu genlerin transferinde bu yöntem kullanılmamaktadır (Gatehouse, 1991). Bu makalede, günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılan genetik mühendisliği sayesinde böceğe dayanıklılık konusunda elde edilmiş bazı başarılar üzerinde durulacaktır.

### BÖCEĞE DAYANIKLILIKTA ARCELİN GENİNİN KULLANIMI

Arcelin isimli maddenin üretiminden sorumlu gen kullanılarak genetik mühendisliği yöntemiyle böceğe dayanıklı bitki elde edilmesine, depolanmış fasulye tohumlarında ciddi kayıplara neden olan *Zabrotes subfasciatus* 'a dayanıklılık örneği verilebilir. Dayanıklılık kaynağı yabani tipler olmakla birlikte bunlar kültür fasulyesi (*Phaseolus vulgaris*) ile melezlenebilmektedirler. Ticari çeşide dayanıklılık kazandırmak amacıyla geleneksel ıslah yöntemleri kullanılabilir ve bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Dayanıklılığı sağlayan bileşiklerin belirlenmesi için dayanıklı bitkilerin tohumları SDS-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)

yöntemiyle analiz edildiğinde dayanıklı ve hassas genotipler arasında bant desenleri yönünden belirgin bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Dayanıklı hatların tamamı fasülye tohum proteininin önemli bir bileşeni olan arcelini (*Mr* 32.000-36.000) bulundurmalarına karşın, hassas bitkilerin hiçbirisi bu proteinleri içermemiştir. (Romero Andreas ve ark., 1986). Genotipler üzerinde daha ileri derecede bir araştırma yapıldığında, coğrafik orijinlerindeki farklılıklara bağlı olarak dört arcelin tipinin bulunduğu belirlenmiştir. Bunlar arcelin<sup>1-4</sup> olarak işaretlenmiş ve *Z. subfascinatus* 'a dayanıklı genotiplerde arcelin<sup>1,2,4</sup> tipleri bulunmasına karşın, arcelin<sup>3</sup>'e bunlarda rastlanmamıştır (Osborn ve ark., 1986).

Arcelin<sup>1</sup> ve arcelin<sup>4</sup> yapay olarak hazırlanmış böcek besinlerine ilave edildiğinde (diyet kuru ağırlığının %7'sinden fazla) *Z. subfascinatus* 'un gelişmekte olan larvalarına toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Arcelin<sup>4</sup> böcek tarafından alınan proteinin hazmalanmasını engelleyerek toksik etki göstermiştir (Osborn ve ark., 1988). Böylece, böceklerin gelişebilmeleri için hayati öneme sahip olan amino asitlerin oluşumu önlenmektedir (Minney ve ark., 1990).

Arcelinin etkisi *Phaseolus herbivores* böceğinde de incelenmiş ve bu maddenin etkili olabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda (yaklaşık %10 w/w) bulunması gerektiği sonucuna varılmıştır (normalde %2.5'dir). Ancak, transgenik bitkilerin tohumlarında bunu başarabilmek zor olabilir. Dayanıklılık için yüksek konsantrasyonda bulunması gerekliliği, şimdiye kadar yapılan çalışmaların yalnızca bir böcek türü üzerinde yürütülmüş olmasından kaynaklanabilir. Eğer bu madde başka bir bitkiye transfer edilirse, yeni bitkinin böcek popülasyonları daha önce bu maddeye maruz kalmadıklarından, daha düşük seviyede bile etki gösterebileceği tahmin edilmektedir (Meeusen, 1990).

### **BİTKİ PROTEİNAZ İNHİBİTÖR GENİNİN KULLANIMI**

Yem bürülcesi (*Vigna unguiculata*) tohumlarında bulunan tripsin inhibitörünün (CpTI) yapılan biyo-analizler sonucunda insektisidal bir bileşik olduğu belirlenmiştir. Tripsin inhibitörünün herbivor böceklerde hazma müdahale ederek zarar verdiği inandırılmaktadır. Bu gen (CpTI) klonlanarak CaMV 35S promotörü ile kimerik bir gen oluşturulur ve *A. tumefaciens* aracılığıyla yapraklardan elde edilen hücre ekstraktına aktarılır. Yapay bir besinde inhibitörlerin miktarı artırıldığında, depolanmış yem bürülcesi tohumlarında zararlı olan *Callosobruchus maculatus* 'un larva gelişimi engellenmiştir. Aynı zamanda, bu bileşiğin ekonomik yönden önemli birçok tarla ve depo zararlısını kapsayan Coleoptera, Lepidoptera ve Orthoptera sınıftaki diğer zararlılara karşı da etkili olduğu görülmüştür (Tablo 1). Gen aktarımı konusunda dikkat edilmesi gereken bir durum, aktarılan genin oluşturduğu ürünün insan ve diğer memelilere karşı potansiyel toksiditesi olmamasıdır. Bu yönüyle CpTI gen ürünü olan tripsin çok az bir toksiditeye sahiptir. Çünkü bu bileşik hayvanlar tarafından yaygın olarak tüketilen yem bürülcesi tohumlarında doğal olarak bulunmaktadır (Gatehouse, 1991). Tripsin inhibitör geni aktarılmış transgenik bitkiler, ilgili genin ekspresyonu bakımından bağışıklık analizleri yoluyla test edilmiştir. CpTI geni tarafından üretilen protein yapraktaki toplam çözünebilir proteinin yaklaşık %1'i oranında olmuştur. Buna karşın, kontrol olarak kullanılan bitkilerde böyle bir protein belirlenmemiştir. Bu proteini en fazla üreten bir transgenik bitki vejetatif olarak klonlanmış ve elde edilen bitkilerin *Heliothis virescens* 'in ilk dönem larvasına karşı tepkisi incelenmiştir. Yedi günlük bir besin denemesinden sonra yapılan biyo-analizler sonucunda CpTI geni bulunan transgenik bitkilerde bu geni içermeyen kontrol bitkilere göre yaprak zararında 2 kat, böcek canlılığında 2 kat, böcek popülasyonunda ise 4 kat azalma olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar *H. zea* 'ya ve pamuk yaprak kurduna (*Spodoptera littoralis*) karşı da elde edilmiştir. Tütünde zararlı olan *Manduca sexta*, CpTI genine sahip transgenik bitkilere çok az zarar vermesine karşın, kontrol bitkilerde oldukça zararlı olmuş ve bitkiler neredeyse sadece sap kalıncaya kadar yenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar transgenik bitkilerde kazanılan dayanıklılığın stabil bir şekilde kalıtsal olduğunu göstermiştir. Tripsin inhibitörünün yüksek miktarda üretilmesiyle ortaya çıkan verim kaybı, bitkiler stres koşullarına maruz bırakıldığında bile, laboratuvar koşullarında önemsiz olmuştur. Bu bitkiler ticari amaçla kullanım için istenilen seviyede dayanıklılığa sahip olmuşlardır (Hilder ve ark., 1987).

Tablo 1. Yem Börülcesi Tripsin İnhibitörünün (CpTI) Etkili Olduğu Zararlı Böcekler ve Bu Böceklerin Zarar Verdikleri Ürünler (Gatehouse, 1991).

Table 1. Insect Pests Against which Cowpea Trypsin Inhibitors (CpTI) Are Effective (Gatehouse, 1991).

Sınıf	Zararlı Böcek	Zarar Verdikleri Başlıca Ürünler
<b>Tarla Zararlıları</b>		
Lepidoptera	<i>Heliothis virescens</i> <i>Heliothis zea</i> <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Chilo partellus</i> <i>Autographa gamma</i> <i>Manduca sexta</i>	Tütün, pamuk Mısır, pamuk, soya, tütün Pamuk, soya, mısır, sorgum Mısır, çeltik, pamuk, tütün Mısır, sorgum, şeker kamışı, çeltik Şeker pancarı, marul, lahana, soya, patates
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i>	Domates, tütün, patates
Coleoptera	<i>Diabrotica undecimpunctata</i> <i>Costelytra zealandica</i> <i>Anthonomus grandis</i>	Yabani ve kültür buğdaygilleri Mısır Buğdaygiller, üçgül Pamuk
<b>Depo zararlıları</b>		
Coleoptera	<i>Callosobruchus maculatus</i> <i>Tribolium confusum</i>	Yem börülcesi, soya Birçok bitki türünün unlarında

Zararlı böceklerle karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde CpTI proteini yanında diğer proteaz inhibitörleri de kullanılmaktadır. Örneğin, patates inhibitörleri transgenik tütün bitkilerinde *Manduca sexta* saldırısına karşı bir dereceye kadar dayanıklılık sağlamışlardır (Johnson ve ark., 1990).

### BAKTERİYEL TOKSİN GENİNİN KULLANIMI

Genetik mühendisliği sayesinde her hangi bir kaynaktan alınan gen bitkilere aktarılabilir. Bir toprak bakterisi olan *Bacillus thuringiensis* spor üretimi süresince delta ( $\delta$ ) endotoksin ve beta ( $\beta$ ) eksotoksin olmak üzere iki çeşit böcek toksini üretmektedir. Bunlardan  $\delta$ -endotoksin larva tarafından alındıktan sonra mide zehiri şeklinde etki göstererek bazı böcekleri selektif olarak öldürmekte, ancak insanlara, hayvanlara ve bitkilere etki etmemektedir (Whitten ve Oakeshott, 1990). Bu kristal protein endotoksin (protoksin) bağırsak sıvısında çözünerek toksik polipeptitleri oluşturmak için proteaz enzimleri aracılığıyla indirgenmektedir. Endotoksin mideye alındıktan sonra 30 dakika ile 3 gün içerisinde böceklerin ölümlerine neden olmaktadır. *B. thuringiensis* 'in değişik özelliklere sahip olan 100'ün üzerinde farklı ırkı vardır. Bunlar böceklerde etkili olma durumlarına göre beş gruba ayrılmıştır: **1.** Lepidoptera'lara özgü olanlar, **2.** Diptera'lara karşı etkili olanlar, **3.** Coleoptera'lara ve sivri sineklere özgü olanlar, **4.** hem Lepidoptera hem de Diptera'lara karşı aktif olanlar ve **5.** toksidite oluşturmayanlar (Dart, 1990).

*B. thuringiensis* 'in *B. thuringiensis* ssp *kurstaki*, *B. thuringiensis* ssp *israelensis* ve *B. thuringiensis* ssp *galleriae* ırklarının spor preparasyonlarına benzer kimyasal formülasyonlar ticari amaçla (örneğin pamukta *Heliothis* 'le mücadelede) yaklaşık 30 yıldan beri kullanılmaktadır. Bu ırklar yalnızca  $\delta$ -endotoksin sentezlemekte, eksotoksin üretmemektedirler. Ancak, yüksek maliyetten dolayı bu formülasyonların tarımda kullanımı azalmıştır (Burges, 1986). Üstelik bu toksinler tarlada ultra viyole ışınlar tarafından 1-5 gün içerisinde bozuldukları ve yağmurlarla yapraktan yıkandıkları için bu süre sonunda yeniden uygulanmaları gerekmektedir (Whitten ve Oakeshott, 1990). Ayrıca, *Heliothis* gibi böceklerin kimyasal insektisitlere dayanıklı ırklar geliştirmeleri nedeniyle *B. thuringiensis* toksininin kullanımı ümitvar gözükmemektedir. Bu nedenle söz konusu toksinin üretiminden sorumlu genin bitkilere aktarılabilir dayanıklı duruma getirilmeleri amaçlanmıştır.

*B. thuringiensis* toksin geni birçok farklı bakteri izolatından elde edilmiştir. Ancak, genetik mühendisliğiyle yalnızca Lepidoptera zararlılarına karşı dayanıklı bitkiler geliştirilebilmiştir. Endotoksinler tek bir genin kontrolünde olduklarından gen transferi üzerinde yapılacak çalışmalar nisbeten kolaydır (Schnepf ve Whiteley, 1981). Bu genlerin transgenik bitkilere aktarılması amacıyla sözkonusu maddenin üretiminden sorumlu gen *B. thuringiensis* 'den izole edilerek *E. coli* 'de veya *Agrobacterium* 'un T-DNA'sı içerisinde klonlanır. Değişik yapılardan ibaret olan tam bir gen ya da gen parçası, yaprak diski transformasyon yöntemi kullanılarak aktarılır. Daha sonra elde edilen rekombinant polipeptit, Lepidoptera larvalarına etkili toksin olarak kullanılır. Ancak, bu genin ekspresyonu genellikle çok düşük olduğu için oluşan ürün yapraktaki toplam çözünebilir proteinlerin yalnızca %0.02'si kadarını oluşturmaktadır. Bununla birlikte çeşitlere göre önemli derecede varyasyon bulunduğu belirlenmiştir (Gatehouse, 1991). Bu varyasyon T-DNA'nın kromozomlara

yerleştirildiği bölgeye göre fenotipik ifade düzeyinin değişmesinden veya yüksek toksin düzeyinin bitki gelişmesini olumsuz yönde etkilemesine bağlı olarak düşük toksin üretimi yönünde seleksiyon meydana gelmiş olmasından kaynaklanabileceği kaydedilmiştir. Düşük derecede ekspresyonuna (1 g yaprak proteininde 30 ng) rağmen, *B. thuringiensis* toksin genini içeren transgenik bitkiler biyoanalizler yoluyla test edildiğinde, *M. sexta* 'ya ve *Heliothis* türlerine karşı etkili bir dayanıklılık göstermiştir (Meeusen, 1990; Gatehouse, 1991). Tarla koşullarında yapılan bir denemede *B. thuringiensis* toksin genine sahip domates bitkisinin *H. zea* 'ya karşı kısmen, *Keiferia lycopersicella* 'ya karşı ise önemli derecede dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Fuchs ve ark., 1989). Böceklerde ölümlere neden olan *B. thuringiensis* toksin geninin ekspresyonunun yüksek, larvalar ölmeden önce yenilen yaprak miktarının az ve *Heliothis* ve *Spodoptera* zararlıları üzerine toksik etkisi fazla olan transgenik bitkilerin elde edilmesi yönünde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Fischhoff ve ark., 1987; Vaeck ve ark., 1987; Dart, 1990) Lepidoptera'lara karşı toleranslı *B. thuringiensis* toksin üreten transgenik tütün (Şekil 2), pamuk ve domates bitkileri elde edilmiş ve bunların kontrollerine göre oldukça dayanıklı oldukları belirlenmiştir.



Şekil 2. *B. thuringiensis* toksin genine sahip dayanıklı transgenik tütün bitkisi (sağda) ve kontrol bitki (solda) (Meeusen, 1990).

*B. thuringiensis* ssp *kurstaki* 'nin HD-1 ve HD-73 ırklarında sırasıyla *cryIA(b)* ve *cryIA(c)* genleri bulunmaktadır (Benedict ve ark., 1993). Bu genler tarafından kodlanan CryIA(b) ve CryIA(c)  $\delta$ -endotoksinleri (insektisidal proteinler) oluşturan ticari pamuk çeşitleri elde edilerek sentetik insektisidlerden kaynaklanan çevre kirliliğinin azaltılması, iş güvenliğinin sağlanması ve yetiştirici karının artırılması amaçlanmıştır (Gasser ve Fraley, 1989). *B. thuringiensis* ssp *kurstaki* 'den  $\delta$ -endotoksinleri kodlayan geni içeren transgenik upland pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkileri üzerinde ilk tarla denemesi 1989 yılında başlamıştır. Transgenik pamuk bitkisi üzerinde yapılan ilk denemeler, genin orijinal yapısı bozulmadan aktarılması durumunda pamukta böcek kontrolünde çok etkili olmadığını göstermiştir. Bu nedenle ilgili gende modifikasyonlar yapılma yoluna gidilmiştir (Perlak ve ark., 1990; Jenkins ve ark., 1991). Nitekim, *cryIA(b)* ve *cryIA(c)* yapısal genlerinin anahtar bölgesinde modifikasyonlar yapılarak pamuk bitkisinde orijinal gene göre modifiye genin ekspresyonunda 100 kat artış sağlanmıştır. Modifiye edilmiş genlere sahip pamukta CryIA(b) ve CryIA(c) proteinlerinin seviyesi toplam çözünebilir proteinin %0.05-0.10'u arasında değişmiştir (Perlak ve ark., 1990). Bunun sonucunda da dayanıklılıkta varyasyonlar ortaya çıkmaktadır. Örneğin, CryIA insektisidal protein genlerini ekspresleyen pamuk bitkisinde *Heliothis virescens* 'in davranışı, gelişimi, canlılığı ve oluşturduğu zarar gibi özellikler bakımından transgenik bitkiler arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Benedict ve ark., 1996). Ekspresyondaki bu değişim genin kromozoma yerleştirilme pozisyonundaki farklılıklara, somaklonal varyasyona, doğrudan kantitatif etkilere sahip olan diğer genler ile interaksiyona (epistasi) ve değişen çevresel

koşullara bağlı olarak bitkiden bitkiye varyasyon ortaya çıkmasına yada bu faktörlerden birkaçının birlikte etkisine bağlanmıştır. Bu faktörlerin *cryIA* gibi yaygın olarak aktarılan genleri nasıl etkiledikleri henüz tam olarak bilinmemektedir (Sachs ve ark., 1998).

Modifiye edilmiş bu genlerin bazı zararlılara karşı etkili olduğu laboratuvar testleri ile kanıtlanmıştır. Örneğin Jenkins ve ark. (1997), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 'nin *cryIA(b)* ve *cryIA(c)* genlerini taşıyan transgenik pamuk bitkilerini *H. virescens*, *Helicoverpa zea* ve *Spodoptera frugiperla* zararlılarına dayanıklılık bakımından laboratuvar koşullarında test etmişlerdir. Araştırmacılar, 7 günlük bir denemeden sonra transgenik bitkilerde *H. virescens* ve *Helicoverpa zea* 'nın canlı larva ağırlıklarının kontrollerinin yalnızca %10-15'i kadar olduğunu, *S. frugiperla* 'nın ise transgenik bitkilerde belirgin bir şekilde daha az olduğunu kaydetmişlerdir. Daha sonra yapılan tarla denemelerinde modifiye genleri taşıyan bitkilerin bu özelliklerini tarlada da korudukları bildirilmiştir.

Böceğe dayanıklılık için diğer bir yaklaşım *B. thuringiensis* 'in berliner 1715 izolatından klonlanan *Bt2* toksin geninin kullanımıdır. Bu gen bazı böceklerle karşı tam toksik aktiviteye sahip olup, 1155 amino asit uzunluğunda *Bt2* proteinini üretmektedir. İlgili gen bütün bitkilerine *M. sexta* 'ya karşı dayanıklılık kazandırmak için kullanılmıştır (Vaecck ve ark., 1987; Rohde ve ark., 1991).

Transgenik bitkiler geliştirilirken şu iki aşama göz önünde bulundurulmalıdır. Birincisi, aktarılmış genlerin tarımsal özellikler üzerine büyük olumsuz etkileri olmayacak şekilde transgenlerin istenilen düzeyde ekspreslenmesini sağlayacak transformasyon yöntemi seçilmeli. İkincisi, transgenik bitkiler elde edildikten sonra aktarılan genin ekspresyonu incelenmeli ve bitki tarımsal özellikler yönünden değerlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

- Benedict, J.H., E.S. Sachs, D.W. Altman, D.R. Ring, T.B. Stone, S.R. Sims, 1993. Impact of  $\Delta$ -endotoxin producing transgenic cotton on insect-plant interactions with *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol., 22: 1-9.
- Benedict, J.H., E.S. Sachs, D.W. Altman, W.R. Deaton, R.J. Kohel, D.R. Ring, S.A. Berberich, 1996. Field performance of cottons expressing transgenic CryIA insecticidal proteins for resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 89: 230-238.
- Burges, H.D., 1986. Impact of *B. thuringiensis* on pest control with emphasis on genetic manipulation. MIRCEN J. 2: 101-120.
- Dart, P.J., 1990. Agricultural Microbiology: Introduction. In: Agricultural Biotechnology, Opportunities for International Development (Ed. Persley, G.J.). CAB Intern. Wallingford Oxon OX10 8DE, UK, p 53-77.
- Fischhoff, D. A., K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.M. McCormick, J.G. Niederyemer, D.A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester, S.G. Rogers, R.T. Fraley, 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/Technology, 5: 807-813.
- Fuchs, R.L., S. MacIntosh, G. Kishore, F. Perlak, D. Dean, T. Stone, S. Sims, N. Hoffman, J.T. Greenplate, P. Marrone, D.A. Fischhoff, 1989. Enhanced expression/efficiency of transgenic plants which express the *Bacillus thuringiensis* insect control protein. Agbiotech, 89: 210.
- Gasser, C.S., R.T. Fraley, 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. Science, 244: 1293-1299.
- Gatehouse, J.A., 1991. Breeding for Resistance to Insects. In: Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology (Ed. Murray D. R.), CAB International Wallingford Oxon, p 250-276.
- Hiatt, A., R. Cafferkey, K. Bowdish, 1989. Production of antibodies in transgenic plants. Nature, 342: 76-78.
- Hilder, V.A. A.M.R. Gatehouse, S.E. Sheerman, R.F. Barker, D. Boulter, 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature, 330: 160-163.
- Jenkins, J.N., W.L. Parrot, J.C. McCarty, Jr. K.A. Barton, P.F. Umbeck, 1991. Field test of transgenic cotton containing a *Bacillus thuringiensis* gene. Miss. Agric. For. Exp. Stn. Tech. Bull., 174.
- Jenkins, J.N., J.C. McCarty, Jr. R.E. Buehler, J.Kiser, C. Williams, T. Wafford, 1997. Resistance of cotton with  $\delta$ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on selected lepidopteran insects. Agron. J. 89: 768-780.
- Johnson, R., J. Narvaez, G. An, C.A. Ryan, 1990. Expression of potato proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effect on natural defence against *Manduca sexta* larvae. Proceed. National Acad. Sci. (USA), 86: 9871-9875.
- Meeusen, R.L., 1990. Insect and Disease Resistance. In: Agricultural Biotechnology, Opportunities for International Development (Ed. Persley, G.J.). CAB Intern. Wallingford Oxon OX10 8DE, UK, p 108-122.
- Minney, B.H.P., A.M.R. Gatehouse, P. Dobie, J. Denedy, C. Cardona, J.A. Gatehouse, 1990. Biochemical bases of seed resistance to *Zabrotes subfasciatus* (bean weevil) in *Phaseolus vulgaris* (common bean): a mechanism for arcelin toxicity. J. Insect Physiology, 36: 757-767.
- Osborn, T.C., T. Blake, P. Gepts, F.A. Bliss, 1986. Bean arcelin 2: genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. Theor. Appl. Genet., 71: 847-855.
- Osborn, T.C., D.C. Alexander, S.S.M. Sun, C. Cardona, F.A. Bliss, 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. Science, 240: 207-210.
- Perlak, F.J., W.R. Deaton, T.A., Armstrong, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate, D.A., Fischhoff, 1990. Insect resistant cotton plants. Bio/Technology, 8: 939-942.
- Rohde W., A. Marocco, F. Salamini, 1991. Genetic Engineering in Crop Improvement. In: Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part A (Eds. Gupta P.K. and T. Tsuchiya), Elsevier Sci. Publ., Amsterdam-Netherlands, p 27-69.
- Romero Andreas, J., B.S. Yandell, F.A. Bliss, 1986. Bean arcelin 1: inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effects on seed composition. Theor. Appl. Genet., 72: 123-128.
- Sachs, E.S., J.H. Benedict, D.M. Stelly, J.F. Taylor, D.W. Altman, S.A. Berberich, S.K. Davis, 1998. Expression and segregation of genes encoding cryIA insecticidal proteins in cotton. Crop Sci. 38: 1-11.

- Schnepf, H.E., H.R. Whiteley, 1981. Cloning and expression of the *B. thuringiensis* crystal protein gene in E.coli. Proceed. of the National Acad. Sci. (USA), 78: 2893-2897.
- Vaeck, M., A. Reyznaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. De Beukeleer, 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 328: 33-37.
- Whitten, M.J., J.G. Oakeshoff, 1990. Biocontrol of insects and weeds. In: Agricultural Biotechnology, Opportunities for International Development (Ed. Persley, G.J.). CAB Intern. Wallingford Oxon OX10 8DE, UK, p 1123-142.