



Transgenik Mısır (*Zea mays* L.) Bitkilerinin Geliştirilmesinde *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımının Rolü

Şeyma DOĞANCI^{1*}, Sevil SAĞLAM YILMAZ²

¹Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 40100, Kırşehir, Türkiye

²Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 40100, Kırşehir, Türkiye

Tüm yazarların orcid bilgileri: 0009-0005-6937-2755, 0000-0003-1302-9147

*Sorumlu yazar e-mail: seyma.doganci@tarimorman.gov.tr

Derleme Makalesi ÖZET

Makale Tarihiçesi:
Geliş tarihi: 08.12.2025
Kabul tarihi: 22.12.2025
Online Yayınlanma:
31.12.2025

Anahtar Kelimeler:
Agrobacterium
Transformasyon
Mısır
Transgenik
Doku kültürü

Mısır (*Zea mays* L.), gıda ve yem amaçlı kullanıma sahip dünyada en fazla yetiştirilen önemli bir sıcak iklim tahıl cinsidir. Günümüzde ve gelecekte tarımsal üretimin sürdürülebilirliği açısından son derece önemlidir. Biyoteknoloji alanındaki gelişmelerin bir çıktısı olan genetiği değiştirilmiş ürünler/organizmalar (GDO), hastalık ve zararlılara toleransın geliştirilmesinde, pestisitlere olan bağımlılığın azaltılmasında, gen kaynaklarının korunmasında, stres faktörlerine (kuraklık, don, tuzluluk vb.) toleransı yüksek yeni çeşitlerin ıslah edilmesinde, ürünlerin besin değerinin artırılmasında, raf ömrünün uzatılmasında, yenilebilir aşıların üretiminde, özellikle de tarımda sürdürülebilirliğin sağlanmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak, GDO'ların diğer ifadeyle transgenik organizmaların ürün çeşitliliğinin hızlı yaygınlaşması, düzenleyici gözetim ve izlenebilirlik açısından toplumlarda her zaman endişe uyandırmıştır. İlk transgenik mısır çeşitleri ticari olarak 1996 yılında Amerika'da üretime geçmiştir. Yapılan bilimsel çalışmalar yaklaşık otuz yıllık bir geçmişe sahip transgenik mısır bitkisinin insan ve hayvan sağlığı ile çevre üzerine önemli bir risk oluşturmadığını ortaya koymuştur. Mısır günümüzde dünya genelinde 68 milyon ha ekim alanıyla soyadan sonra ikinci en fazla üretimi yapılan genetiği değiştirilmiş bitkidir. Mısır bitkisine en fazla (%55) herbisit ve böceklere dayanıklılık özelliklerini birlikte kazandırmak amacıyla gen transformasyonu yapılmıştır. Bunu tek başına %33 oranında herbisitlere ve %14 oranında böceklere dayanıklılık özellikleri takip etmektedir. % 1 oranında ise diğer (kuraklığa, soğuğa dayanıklılık, besin değeri içeriğinin artırılması vb.) özellikler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu derlemede, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan *Agrobacterium* tabanlı gen aktarım protokolünün transgenik mısır bitkilerinin gelişimindeki rolü ile gelecek yaklaşımlara dair temel göstergeler incelenmiştir.

The Role of *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer in the Development of Transgenic Maize (*Zea mays* L.)

Reviews Article

Article History:
Received: 08.12.2025
Accepted: 22.12.2025
Published online:
31.12.2025

Keywords:
Agrobacterium
Transformation
Maize
Transgenic
Tissue culture

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is an important warm-season cereal crop, the most widely cultivated in the world for food and feed. It is crucial for the sustainability of agricultural production today and in the future. Genetically modified crops/organisms (GMOs), the outcome of advances in biotechnology, hold significant potential for improving tolerance to diseases and pests, reducing dependence on pesticides, preserving genetic resources, breeding new varieties with increased tolerance to stress factors (drought, frost, salinity, etc.), increasing the nutritional value of crops, extending shelf life, producing edible vaccines, and, particularly, ensuring sustainability in agriculture. However, the rapid proliferation of GMOs, also known as transgenic organisms, has always raised concerns in society regarding regulatory oversight



and traceability. The first transgenic corn varieties were commercially produced in the United States in 1996. Scientific studies, dating back nearly thirty years, have demonstrated that transgenic corn does not pose a significant risk to human, animal, or environmental health. Maize is currently the second most produced genetically modified crop after soybeans, with 68 million hectares of cultivated land worldwide. The majority of gene transformations (55%) have been conducted to confer herbicide and insect resistance traits together. This is followed by herbicide resistance alone (33%) and insect resistance (14%). Studies on other traits (drought, cold, increased nutritional content etc.) are ongoing for 1%. This review examines the role of the *Agrobacterium*-based gene transfer protocol, the most widely used gene transfer protocol in plant development, in the development of transgenic maize plants and key indicators for future approaches.

ISSN: 2979-9198

To Cite: Doğancı, Ş., & Sağlam Yılmaz, S. (2025). Transgenik mısır (*Zea mays* L.) bitkilerinin geliştirilmesinde agrobacterium aracılığıyla gen aktarımının rolü. *Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 133-144.

1. GİRİŞ

Orijini ve gen merkezi Amerika kıtası olan mısır (*Zea mays* L.) bitkisi gerek Dünya'da ve gerekse Türkiye'de bitkisel kökenli proteinlerin yeterli ve ekonomik üretimi için büyük önem taşımaktadır (Süzer, 2014). Mısır, değişik iklim koşulları altında yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip bir sıcak iklim tahıl cinsidir. Dünyada gıda, hayvan yemi, endüstriyel hammadde ve enerji arzının sağlanmasında kritik bir rol oynaması sebebiyle ekiliş, üretim ve tüketim açısından önemli bir kültür bitkisidir (Cerit ve ark., 2016). Ülkemizde yem bitkileri içerisinde silajlık mısır %19 ile ekim alanı ve %43 ile yeşil ot üretiminde yüksek bir öneme sahiptir (TÜİK, 2023). Mısır tanesinden elde edilen nişasta, protein ve yağ oranları gıda sanayinin farklı sektörlerinde, kanatlı hayvanların yemlerinde ve silaj yapımında çok yaygın bir şekilde kullanılmakta olmasından dolayı mısır çeşitlerinin ıslahı, ıslahçıların en önemli hedeflerinden biri haline gelmiştir (Taş, 2020).

Mısır tarımını tehdit eden zararlı organizmalar, mısır bitkisinin büyümesini, gelişimini ve sağlığını olumsuz yönde etkileyerek verimlilik ve ürün kalitesi açısından ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Mısır bitkisinde hastalıklar; kök ve kökboğazı çürüklüğü (*Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp.), yaprak yanıklıkları (*Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis*), mısır rastık hastalığı (*Ustilago maydis*), koçan çürüklükleri (*Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.) şeklinde sınıflandırılabilir (Genç Kesimci, 2022). Mısır bitkisinde zararlılar; mısır kurdu, (*Ostrinia nubilalis* Hbn.), mısır koçan kurdu (*Sesamia nonagrioides* Lef., *S. cretica* Led.), mısır maymuncuğu (*Tanymecus dilaticollis* Gyll.), mısır yaprak kurtları (*Pseudaletia unipuncta* Haworth, *Acantholeucania loreyi* Dup.), bozkurt (*Agrotis ipsilon* Hufn, *A. segetum* D.-S.), çizgili yaprak kurdu (*Spodoptera exigua* Hübn.), yeşilkurt (*Helicoverpa armigera* Hbn.) ve tel kurtları (*Agriotes* spp., *Melanotus fuscipes* Gyllenhal)'dır. Son yıllarda mısır bitkisinde ortaya çıkan bakteriyel gövde çürüklüğü (*Dickeya zeae*) olarak bilinen hastalık yapraklarda sararma, kahverengileşme, gövdede yumuşama, nekroz ve kötü koku gibi hastalık belirtilerine neden olmaktadır. *Dickeya zeae* etmeni topraktaki mikrobiyal aktivitenin zayıf, bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri oranının düşük olduğu toprakları tercih etmektedir (Kumar ve ark., 2017). Mücadelede ayrı bir öneme sahip olan mikrobiyal etmenler, üründe verim ve kaliteyi azaltmanın yanında, meydana gelen toksinler aracılığıyla insan ve hayvanlarda zehirlenmelere de neden olabilmektedir (mikotoksin zehirlenmesi) (Thrane, 2001). Çevresel faktörlere bağlı olarak yıldan yıla oranları değişen mikotoksinler dünya genelinde "gıda güvenliği" açısından önemli bir tehdit unsuru olarak nitelendirilmektedirler. Mısırın en önemli kontaminantı olan zeralenon (ZON) ilk kez, Urry ve ark. (1966) tarafından *Fusarium*'dan izole edilmiştir. *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. nivale* ve *F. oxysporum* türleri tarafından oluşturulan ZON toksininin insanlarda zehirlenmelere yol açtığı, bunun yansırı östrojen hormonunu da etkilediği bildirilmiştir (Morgavi ve Riley, 2007; Krska ve ark., 2007; Gromadzka ve ark., 2008).

Gen teknolojisi; transgenler oluşturarak akraba olmayan türler arasında genetik değişim ve rekombinasyon yapabilmek amacıyla biyolojik bariyerleri aşabilen ve böylece ıslah edilmiş bitki ve

hayvanların geliştirilmesinde kullanılan bir araçtır (Holst-Jensen, 2009). Gen teknolojilerinin uygulanmaya başlanmasıyla, konak bitkilere evrimsel olarak uzak olan diğer bitkilerin, fungusların, virüslerin, bakterilerin, hayvanların, hatta insanların bile genlerini aktarmak mümkün olmuştur. “Transgenik bitki” ve “genetiği değiştirilmiş organizma” kavramları bu şekilde ortaya çıkmış ve 1980’lerden itibaren mısır, soya, tütün, petunya, domates, çeltik, kereviz, kolza, buğday, üzüm, manyok, darı ve krizantem gibi genetik olarak kararlı gen aktarımlı bitkiler elde edilmiştir (Rivera ve ark., 2012). Genetik modifikasyonun avantajları, raf ömrü ve organoleptik kalitenin geliştirilmesi, besin değerinde yükselme, aşı ve ilaç elde edilmesi, sağlık alanında kullanımı, çevresel yararları, tarım ve gıda üretiminin artırılmasıdır.

Bitkilerde etkili transformasyon yöntemlerinin belirlenmesi transgenik bitki üretimindeki en zorlu noktalardan biridir. Uygun transformasyon tekniğinin seçilmesi ve geliştirilmesi kadar transgenik bitkilerin rejenerasyonu da otuz yıllık teknolojik ilerlemeye rağmen hala üzerinde çalışılması gereken konular olarak karşımızda durmaktadır (Altpeter, 2016). Bitkilere gen aktarımında kullanılan en yaygın metod dolaylı metod olarak da bilinen *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımıdır. Dolaylı gen aktarımında yabancı nükleik asit molekülünün konak bitkiye aktarımı çeşitli vektör bakteriler ile gerçekleştirilmektedir. *A. tumefaciens*, tümör oluşturan (Ti) plazmidinden bir DNA (T-DNA) segmentinin çıkarılması, T-DNA’nın konak bitki hücresine aktarılması ve T-DNA’nın bitki kromozomlarına entegre edilmesiyle bitkilerde taç tümörlerine neden olmaktadır (Nester ve ark., 1984) T-DNA, sitokin ve oksin sentezi genleri dahil olmak üzere, hücre çoğalmasına ve tümör oluşumuna neden olan gen içermektedir (Chilton ve ark., 1980). Gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan *Agrobacterium* hattı ise *Agrobacterium tumefaciens*’dir. *A. tumefaciens* bakterisi Rhizobiaceae familyasına ait olup, doğal genetik mühendisi olarak adlandırılmaktadır. *A. tumefaciens* gram (-) bir bakteridir. Enfeksiyon sonucu bitkilerde kök boğazı uru hastalığına sebep olmaktadır. Bunu da taşıdığı Ti (tümör oluşturan) plasmidi sayesinde sağlamaktadır. Ti plasmidi bitkilere gen aktarımı için virülens bölgesini ve T-DNA bölgesini taşımaktadır (Özcan ve ark., 2001). Bitkilere gen aktarımında kullanılan diğer bir *Agrobacterium* hattı ise *Agrobacterium rhizogenes*’dir. *A. rhizogenes* bakterilerinin taşıdıkları Ri (saçak kök oluşturan) plazmidleri ise normal şartlarda saçak kök hastalığına neden olmaktadır. *A. tumefaciens* gibi *A. rhizogenes*’de bitki hücrelerine istenilen yabancı nükleik asit moleküllerinin aktarımında kullanılmaktadır. Gen aktarımında doğrudan metodlar da kullanılmaktadır. Doğrudan gen aktarımı metodlarından en yaygın kullanılanı ise biyolistik (gen tabancası, partikül bombardımanı) metodudur. Diğer yöntemler protoplastlara gen aktarımı, makroenjeksiyon, mikroenjeksiyon, zigotik embriyoya gen aktarımı, sonikasyon, desikasyon, agolistik vd. daha az kullanıma sahip yöntemlerdir. Günümüzde doğrudan ve dolaylı gen aktarım yöntemleri kullanılarak mısır bitkisi de dahil birçok kültür bitkisine gen aktarımı yapılabilmektedir.

Bu derleme makalede, 1970’li yıllardan günümüze kadar uzanan transgenik mısır teknolojisi *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu özelinde tartışılmış ve gen transformasyon başarısını etkileyen faktörler incelenmiştir. Bu çalışma, *Agrobacterium* aracılı gen transformasyon sistemini kullanarak mısır bitkisi ve diğer bitkilerin genom düzenlemesi üzerinde çalışan okuyucular için faydalı olacak ve gelecekte bitki genetik transformasyonu için yeni yollar açacaktır.

2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNÜN TRANSGENİK MISIR TEKNOLOJİSİNİN GELİŞİMİNE KATKILARI

Mısır araştırmalarında hücre ve doku kültürü yöntemlerinin etkili bir şekilde kullanılması, bitki rejenerasyonu yapılabilen kültürler gerektirir. Bu kültürlerin geliştirilmesi, geleneksel ve modern ıslah prosedürleriyle doğrudan bağlantılı olması bakımından oldukça önemlidir. Mısır bitkisi üzerine ilk rejenerasyon ve doku kültürü çalışması 1975 yılında Green ve Phillips (1975) tarafından yapılmıştır. Elli yıl önce yapılmış bu çalışma, transgenik bitkilerin geliştirilmesine temel teşkil eden ilk önemli gelişmedir. Bu çalışmada embriyo skutellar dokularından mısır kallusu bu kalluslardan ise bitkiler elde edilmiştir. Çalışmada inorganik bileşenler, vitaminler, amino asitler, 20 g/l sukroz, 8 g/l agar ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) kullanılmıştır. Kalluslar, her 21-28 günde bir alt kültüre alınmış ve 9 ay boyunca farklılaşma yeteneği takip edilmiştir. Bitkilerin rejenerasyonu, kallusun 30 gün boyunca 0.25 mg/l 2,4-D dozunda alt kültüre alınması ve ardından 2,4-D içermeyen kültür ortamına aktarılmasıyla sağlanmıştır. Bu yöntemle yaklaşık 200 bitki elde edilmiştir. Toprağa nakilden (aklimatizasyon) sonra bitkilerin %10 ila %15’i hayatta kalmış ve normal şekilde büyümüştür. Skutellar



kallus oluşumu için optimum embriyo yaşı ise tozlaşmadan 18 gün sonrası olarak belirlenmiştir. Yadava ve ark. (2017), mısırdaki transformasyonu başlatmak için genotip ve eksplant materyalinin seçimi ve doku kültürünün çeşitli aşamalarında kullanılacak farklı ortam türleri, transformasyon çalışmalarının sonuçları üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini bildirmişlerdir.

3. TRANSGENİK MISIR ÇEŞİTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANILAN GEN AKTARIM TEKNİKLERİ

Mısıra gen aktarımında en yaygın kullanılan teknikler *Agrobacterium* dayalı gen aktarımı, *Agrobacterium* dayalı *in planta* gen aktarımı, partikül bombardımanı (biyolistik, gen tabancası) ve protoplastlara (PEG ve elektroporasyon) gen aktarımıdır. Ancak ticari transgenik mısır bitkilerinin geliştirilmesinde bu yöntemlerin dışında silikon karbid fiberler ve mikropüskürtme gen aktarım (aerosol beam enjection) teknikleri de kullanılmıştır. Günümüzde 307 adet transgenik mısır çeşitinin ticareti yapılmaktadır. Bu çeşitlerin hangi gen aktarım metodları ile geliştirildiği Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Transgenik mısır çeşitlerinin geliştirilmesinde kullanılan gen aktarım teknikleri*

Gen Aktarım Tekniği	Adet
1 Silikon karbid fiberler aracılığıyla gen aktarımı	1
2 Mikropüskürtme gen aktarım tekniği (aerosol beam enjection)	1
3 Protoplastlara gen aktarımı	2
4 Elektroporasyon	2
5 Yöntemi bilinmeyen (not available)	6
6 Biyolistik	20
7 <i>Agrobacterium</i> dayalı gen aktarımı	42
8 Geleneksel ıslah-transgenik donör(ler)i içeren melezleme yoluyla	233
Toplam	307

*ISAAA GM Crops Approval Database, (2025)

3.1. *Agrobacterium* Aracılığıyla *in planta* Gen Aktarımı

Bu yöntemde, *A. tumefaciens* yeni oluşmuş dokulara bitki meristemlerine enjeksiyon yoluyla transfer edilerek yeni oluşan dokuların vejetatif çoğaltılmasıyla stabil transgenik bitkiler elde edilmektedir. Bu yöntem, bitkilerin aktif rejenerasyon kapasitesine dayanan rejeneratif aktiviteye bağlı bitki içi enjeksiyon iletimi (RAPD) yönteminin geliştirilmesiyle oluşmuştur. Mısır, tatlı patates, patates ve bayhop (*Ipomoea pes-caprae*) gibi farklı genotipler de dahil olmak üzere güçlü rejenerasyon kapasitesine sahip bitkilerin transformasyonu için başarıyla kullanılmıştır. Bu nedenle RAPD yöntemi, bitkilerde hızlı dönüşümü sağlamak için geleneksel yöntemlerin sınırlamalarını ortadan kaldıran ve aktif rejenerasyon yeteneğine sahip çok çeşitli bitki türlerine uygulanabilmektedir. Yüksek transformasyon oranı, kısa süre ve kolay uygulanabilir protokol avantajlarına sahip olan ve doku kültürü gerektirmeyen, *A. tumefaciens* aracılı, rejeneratif aktiviteye bağlı bitki enjeksiyonu uygulaması verimli ve kullanımı kolay bir transformasyon sistemi olarak bilinmektedir (Guoguo ve ark., 2024).

Polen tüpü aracılı *in planta* gen aktarımı ise ilk olarak pamukta ve çeltik bitkilerinde denenmiştir (Zhou ve ark., 1983; Luo ve Wu, 1989). Ancak, bu yöntemin transformasyon verimliliğinin düşük olduğu ve bu nedenle çok sayıda bitki arasından transformant seçim gerektirdiği ve yöntemin bazı durumlarda tekrarlanabilir olmadığı kanıtlanmıştır (Shou ve ark., 2002). Ayrıca, Booy ve ark. (1989) çalışmalarında, plazmit DNA'sının nükleaz tarafından sindirilmesinin, polen tanelerinin genetik dönüşüm için vektör olarak kullanılmasının önündeki en büyük engel olduğunu göstermiştir. Polen tanelerinin nükleazı denatüre ederken, canlılıklarını ve çimlenmelerini tamamen engellemediği öne sürülmüş ve bitki polenini vektör olarak kullanan bir genetik dönüşüm olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2001). Bu yöntemde, polen taneleri, sakaroz çözeltisinde ultrasonikasyon işlemlerinin yardımıyla yabancı genleri taşımak üzere programlanmıştır. Polen aracılı transformasyon, doku kültürü gerekliliğini atlayarak transgenik bitkiler üretmek için hızlı ve kolay bir alternatif yöntemdir. Kısa bir süre içerisinde genetiği değiştirilmiş bitkiler üretme potansiyeline sahip olmasından dolayı bu yöntem geleneksel tarıma dahil edilme potansiyeline sahiptir (Yang ve ark., 2017).

Listanto ve ark. (2016), Endonezya'da *A. tumefaciens*'in *pIG121Hm-Cs* plazmidini kullanarak *nptII* ve *hpt* genlerini dört mısır hattının transformasyonunda kullanmışlardır. Transformasyon sonrasında transformant bitkilerin aklimatizasyonunu sağlamışlar ve seçilen bitkilerle PCR analizi yapmışlardır.

pIG121Hm-Cs plazmid, *nptII* ve *hpt* genlerine spesifik primerleri kullanarak PCR analizi ile 700 bp ve 500 bp büyüklükte transgenik dokuları belirlemişlerdir. Transformasyon frekansının %4-13 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. En yüksek transformasyon frekansına yaklaşık %13 ile ST-27 mısır hattının ulaştığı bildirilmiştir. Bu çalışmada mısır çiçek püskülünde *A. tumefaciens* aracılığıyla transformasyonun başarılı ve hızlı olduğu kanıtlanmıştır.

Başka bir çalışmada da benzer şekilde tropikal mısır için doku kültüründen bağımsız bir *in planta* transformasyon protokolü geliştirilmiştir. Protokol, *cry1Ab*, *gus* ve *bar* genlerini taşıyan pCambia3301 vektörünü içeren *Agrobacterium* EHA105 suşu kullanılarak geliştirilmiştir. T₀ bitkilerinde transgen *gus*'un ekspresyonu, floresan substrat 4-metilumbelliferil-beta-D-glukuronid (MUG) testinin hidroliz oranı ölçülerek doğrulanırken, *cry1Ab* geninin varlığı PCR ile doğrulanmış ve T₀ bitkilerinin olgunluğa ulaşana kadar serada tam bitki olarak büyümesine izin verilmiş ve T₁ neslinin tohumlarını üretmek için kendi kendine döllenmiştir. Transgenin varlığı ve ayrışması, T₁ neslinde Southern blot ve enzim bağlantılı immünosorbent testi ile incelenmiş ve sırasıyla transgenin varlığı ve ekspresyonu doğrulanmıştır. Geliştirilen protokol, herhangi bir doku kültürü prosedürü gerektirmeyen, maliyet etkin, verimli ve genotipten bağımsız bir yöntem olup, yaklaşık 75-90 gün içinde nispeten büyük sayıda transgenik bitki üretebilmektedir (Abhishek ve ark., 2016).

3.2. Partikül Bombardmanı (Biyolistik, Gen Tabancası)

Biyolistik yaklaşık 2 mikron çapındaki yüksek yoğunluklu taşıyıcı makropartiküllerin bitki hücrelerine doğru hızla atılması ve hücrelerden geçerken taşıdıkları DNA'yı hücre içine bırakmaları esasına dayanan bir gen aktarım yöntemidir. Partiküllerin toksik veya reaktif olmaması için hedef hücrenin çapından küçük olması gereklidir. DNA ile kaplanmış tungsten veya altın partiküllerini plazma membranına sokmak ve gen ifadesi sağlamak için gunpowder ivme sistemi kullanılmaktadır (Klein ve ark., 1987). Gen tabancası metodunda primer olarak bitki epidermis hücreleri kullanılmakta ve DNA kaplı partiküller dokulara sürüklenmektedir (Lu ve ark., 1996). Bu tekniğin etkinliği, partiküllere yüklenen DNA miktarı, partikül büyüklüğü ve aktarımın zamanlaması gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Buna ilaveten, DNA kaplı parçacıkların dağılımı, gen tabancası ile uygulanan ivmenin iyi ayarlanması ve partiküllerin plazmid ile kaplanma seviyesi de önemli diğer parametrelerdir (Uchida ve ark., 2002; Attar, 2017).

3.3. Protoplastlara Gen Aktarımı

Protoplast füzyonu ya da protoplast transformasyonu ile yapılan genetik çalışmalarda genetik özellikleri bilinen yeni bireyler elde edebilmek için protoplastların rejenerasyonları önemlidir. Katı besi ortamında protoplastların rejenerasyonu için osmotik dengenin sağlanması gereklidir. Protoplast transformasyonunun temeli osmotik stabilitenin varlığında lizozim yardımıyla hücre duvarının parçalanıp, bakteri hücresinden ayrılarak protoplast elde edilmesi esasına dayanmaktadır (Kaval ve Dostbil, 2003). Protoplastlara, kimyasal (PEG) ve elektriksel (elektroporasyon) yollarla gen aktarılabilir.

Polietilen glikol (PEG) aracılığıyla transformasyonda protoplastlar eksplant olarak kullanılmaktadır (Barampuram ve Zhang, 2011). Transformasyon için kullanılan protoplastlar genellikle yaprakların ya da fidelerin klorofil ve kloroplastlar bakımından zengin olan mezofil hücrelerinin enzimatik sindirimi ile izole edilmektedirler (Wang ve ark., 2015). Yöntem, DNA'nın izole edilmiş protoplast ile basitçe karıştırılması bakımından elektroporasyon yöntemine benzemektedir. Ancak sonrasında DNA'nın alınması elektriksel bir atım yerine PEG eklenmesi ile tetiklenmektedir (Barampuram ve Zhang, 2011). Kolay olması ve özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmaması gibi avantajlarının bulunmasına karşın transformasyon sıklığının düşük olması ve birçok türde protoplastlardan tüm bir bitkiye rejenerasyonun gerçekleşmemesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. PEG aracılığıyla transformasyon yöntemi ile transgenik mısır, arpa, arabis (Arabis thaliana), tütün, çeltik, üzüm geliştirilmiştir (Daveya ve ark., 2005; Barampuram ve Zhang, 2011; Zhang ve ark., 2011; Saumonneau ve ark., 2012; Tan ve ark., 2013; Cao ve ark., 2014).

Elektroporasyon, hücre zarının geçici olarak yoğun bir elektrik alanına maruz bırakılarak geçirgenliğinin artırılması prensibine dayanan bir gen aktarım tekniğidir. Hedef hücreler ilgilenilen



geni içeren bir çözeltiye konulmakta ve ardından hücreler hücre zarının geçici olarak açılmasına izin veren, yüksek voltajlı bir elektrik akımına kısa bir süre (25-30 µsec) maruz bırakılmaktadır (Kaya ve ark., 2019). Daha az kimyasal ve biyolojik tehlike içermesi bakımından avantajlıdır. Elektroporasyon fiziksel bir yöntem olduğundan birçok hücre tipi için yaygın olarak kullanılabilir. Kimyasal yöntemler veya viral vektörlerden farklı olarak, hücre zarının yüzey özelliklerine daha az bağımlı olması sebebiyle çok geniş bir hücre tipi için avantajlıdır. Elektroporasyonun en önemli uygulaması, hücrelere rekombinant DNA aktarılmasıdır. Elektroporasyon, hayvan hücreleri, bitki hücreleri, yosun veya maya gibi tek hücreli organizmalar, parazitler ve bakteriler dahil olmak üzere birçok farklı hücre tipine genlerin aktarılması amacıyla kullanılmıştır (Chang ve ark., 2006).

4. *Agrobacterium* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMININ TRANSGENİK MISIR ÇEŞİTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNDEKİ ROLÜ VE ÖNEMLİ GELİŞİMSEL OLAYLAR

Mısır bitkisine ilk defa yaklaşık kırk yıl önce 1986 yılında *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı yapılmıştır (Graves ve Goldman, 1986). Çalışmada, *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonunun ilk olarak yalnızca dikotiledon bitkilerin dönüştürülmesinde kullanıldığı varsayılsa da, T-DNA ekspresyonu ile bağlantılı enzim aktivitelerinin tespitinin Liliaceae ve Amaryllidaceae familyalarından monokotillerde de gösterilmiş olduğu bildirilmiştir. Bu bildiride, ticari açıdan önemli bir Gramineae üyesinin de *A. tumefaciens* tarafından yönlendirilen dönüşüme maruz kaldığına dair kanıtlar sunulmuştur. Skutellar boğum ve mezokotil içeren eksplantlar bakteri ile muamale edilmiş ve T-DNA transkriptlerinin translasyonu ile ilişkili enzim aktivitesi tespit edilmiştir. *Agrobacterium* bakteri suşlarının T-DNA transferinde oldukça önemli ve iyi büyümüş olması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Boulton ve ark. (1989), yaptıkları çalışma sayesinde, mısırdaki mısır çizgi virüsünün (MSV) tarımsal enfeksiyonunu etkileyen parametreler belirlemişlerdir. MSV genomunda bir dizi bölgeye klonlanmış monomerik üniteler enfeksiyöz olmamış ancak kısmi duplikasyonlar içeren multimerik üniteler, dimerik klonlar kadar eşit derecede enfeksiyöz olmuştur. Farklı *Agrobacterium* suşlarına konjuge edilmiş ard arda dizili dimerik ünitelerin aşılınması, hem *A. tumefaciens* hem de *A. rhizogenes*'in mısıra DNA aktarabildiğini ve bu yeteneğin Ti veya Ri plazmitlerine özgü olduğunu göstermiştir.

Sahi ve ark. (1990), yaptıkları çalışmada, mısır fidelerinde homojenatların *A. tumefaciens*'in büyümesini ve asetosiringon (AS) tarafından Ti plazmit virülans (vir) genlerinin indüksiyonunu engellediğini bildirmişlerdir. Isıya duyarlı inhibitörlerin (2,4-dihidroksi-7-metoksi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) 1.5 mM veya daha yüksek konsantrasyonlarının iki haftalık fideler üzerinde etkin olduğu sonucuna varmışlardır. 0.1 mM konsantrasyondaki DIMBOA, 100 pM AS ile vir geninin indüksiyonunu tamamen engellemiş ve büyüme oranını %50 oranında azaltmıştır. DIMBOA'nın *A. tumefaciens*'in vektör olarak kullanıldığı mısır bitkisinin transformasyon sürecinde önemli bir etkiye sahip olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Gould ve ark. (1991), mısır bitkisine *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı yapmışlar ve bitki rejenerasyonu ile T₁ yavru döllerde aktarılan genleri tespit etmişlerdir. Mısırın Funk's G90 çeşidinin sürgün uçları, kanamisin direnci (*npt-II*) ve B-glukuronidaz (*gus*) genlerini içeren *pGUS3* plazmidini barındıran *A. tumefaciens*'in EHA1 hattı ile kültüre alınmıştır. Eksplantlar 4 ile 6 hafta içerisinde gelişim göstermiş ve elde edilen yaprak ve olgunlaşmamış tohumlarda yapılan florometrik GUS analizleri düşük GUS aktivitesi olduğunu göstermiştir. *Nos* ve *gus* gen parçaları, orijinal transforme bitkilerden birinin T₁ nesillerinden izole edilen DNA'da polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Southern analizi, GUS ve NPT problemlerinin T₁ yavrularının birçoğunda DNA ile melezleştiği görülmüştür. Bu da *gus* ve *nptII* genlerinin yüksek moleküler ağırlıklı DNA'ya dahil edildiğini göstermektedir. Bu veriler, gen transferinin başarılı olduğunu ve genlerin kalıtım yoluyla aktarıldığını göstermektedir.

2000 yılına gelindiğinde bile *A. tumefaciens* ile gen aktarımının tahıllarda kullanımının sınırlı olduğu düşünülüyordu. Düşük transformasyon verimliliğinin, VirA/VirG sistemdeki virülans genlerinin ekspresyonu indüklemeye kapasitesi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, *Zea mays* fidelerinin kök salgısının virülans gen ekspresyonunu engellediği belirlenmiştir. VirA/VirG iki bileşenli düzenleyici sistem tarafından sinyal algısına karşı yönlendirilen ve doğal olarak oluşan inhibitörlerin konak savunmasında önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır (Zhang ve ark., 2000).

Mısır bitkisinde *A. rhizogenes* ile ilk defa yine 2000'li yılların başında gen transformasyonu yapılmıştır. Oluşturulan tüylü kökler ve tüylü kök kültürlerinde rejeneratif bitki üretimi çalışması gerçekleştirilmiştir. Mısırın tüylü kökleri, 15 günlük kallusların *A. rhizogenes* ile enfekte edilmesiyle oluşturulmuştur. Hormonsuz ortamda kültüre edilen tüylü kökler, güçlü büyüme ve tipik tüylü kök özellikleri sergilemiştir. Transgenik bitkiler, 1.6 mg/l ZT ve 0.4 mg/l NAA eklenmiş MS ortamındaki tüylü köklerden üretilmiştir. PCR-Southern hibridizasyonu ile T-DNA'nın transgenik bitkilerin kromozomuna entegre olduğu bildirilmiştir (Xu ve ark., 2006).

A. tumefaciens ile yapılmış başka bir gen aktarım çalışmasında başlangıç materyali olarak çimlenen mısır tohumları kullanılmıştır. Tohumlara inokülasyon öncesinde kesik atılmıştır. T₀ ve T₁ bitkileri ilk olarak higromisin seleksiyonu ile taranmış ve seçilmiştir. Ardından PCR amplifikasyonu, PCR-Southern ve Southern-blot analizleri ile yabancı genin mısırın kendilenmiş hatlarına dahil edildiği gösterilmiştir. Çalışmada T₀ fidelerinin yaklaşık %29'unun transgenik olduğu tespit edilmiş ancak toplam tohum sayısı değerlendirildiğinde ise transformasyon frekansının yalnızca %0.6 olduğu bildirilmiştir (Jingxue ve ark., 2007).

Goetz ve ark. (2009), mısırın olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak önce rejenerasyon sağlamışlar ardından rejeneratif hücrelere *A. tumefaciens* aracılığıyla DNA transferi yapmışlardır. Çalışma sonunda %24 oranında stabil transgenik bitkiler elde etmişlerdir.

Cao ve ark. (2013), benzer şekilde doku kültürü temelli bir sürgün çoğaltım sistemi geliştirmişler ve *A. tumefaciens* aracılığıyla mısıra gen transformasyonu yapmışlardır. Transformasyonda *A. tumefaciens* suşu, genotip, doku kültürü aşaması, ortam bileşimi, kültür sıcaklığı ve yüzey aktif madde oranı olmak üzere altı faktörün etkili olduğunu bildirmişlerdir. Agropin tipi bakterilerin (*EHA101* ve *AGL1*), mısır sürgün dokularının transformasyonunda oktopin tipi suştan sekiz kat daha etkili olduğu belirlenmiştir. 14 adet mısır genotipi üzerinde yapılan çalışmada glukuronidaz (GUS) pozitif eksplantların ortalama sıklığı %36 ile %76 arasında değişmekte olduğu görülmüştür. Genç sürgün dokularının *Agrobacterium* enfeksiyonuna en duyarlı olanlar olduğu sonucuna varmışlardır. Transformantlar, PCR ve Southern Blot hibridizasyon analizleri ile tanımlanmıştır. Transformasyon frekansı % 2 olarak tespit edilmiştir.

YU Gui Rong ve ark. (2013), birkaç elit mısır hattının olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak *A. tumefaciens*'in *EHA105* ve *LBA4404* suşları ile gen aktarımı yapmışlardır. Çalışmada transformasyon verimliliğinde; olgunlaşmamış embriyoların, enfeksiyondan önce farklı ısıl işlem sürelerinin, ko-kültüvasyon ortamına L-sistein'in eklenmesinin, farklı seleksiyon ve yetiştirme yöntemlerinin etkisi karşılaştırmışlardır. Optimum koşullar altında, glifosat dirençli *2mG2-EPSPS* geni, 78599, Zong 31 ve BA dahil olmak üzere birkaç tipik mısır genotipine transforme edilmiştir. Çalışma sonucunda; *EHA105*'in *LBA4404*'ten daha bulaşıcı olduğu gösterilmiştir. Ko-kültür ortamına L-sistein (100 mg/l) eklenmesi ve olgunlaşmamış embriyoların enfeksiyondan önce 3 dakika ısıtılması, transformasyon verimliliğinde önemli bir artışa yol açtığı da bildirilmiştir. Eksplantların ko-kültüvasyon ortamında 4-10 gün boyunca bekletilmesinin, dirençli kallusların hayatta kalması için faydalı olduğu sonucuna varmışlardır. Rejenerasyon ortamına yüksek konsantrasyonda 6-BA (5 mg/l) ve düşük konsantrasyonda 2,4-D (0.2 mg/l) eklenmesinin rejenerasyonu önemli ölçüde artırdığı sonucuna varmışlardır. Transgenik hatlarla yapılan biyoassay uygulamasında yapraklara glifosat herbisiti püskürtülerek 66 adet glifosata dirençli transgenik bitki elde edilmiştir. Transformasyon verimliliği PCR ve Southern-blot analizleri ile %8 olarak belirlenmiştir.

Char ve ark. (2017), CRISPR/Cas9 sisteminin birçok monokotiledon ve dikotiledon bitkide güçlü bir genom düzenleme aracı olduğunu bildirmişlerdir. CRISPR/Cas9'un uygulaması diğer nükleaz tabanlı genom düzenleme araçlarına kıyasla daha basittir. Ancak; optimizasyon, doğruluk ve verimlilik elde etmek için belirli bir türde DNA iletimi ve doku rejenerasyon yöntemlerinin dikkate alınması gerekmektedir. Kullandıkları sistem, bir *Escherichia coli* klonlama vektörü ve bir *Agrobacterium* ikili vektöründen oluşmaktadır. Tek veya çoklu gen hedeflemesi için dört adet kılavuz RNA kullanılmaktadır. Bu çalışmada dört mısır geni (*ZmAgo18a*, *ZmAgo18b*, *dihydroflavonol 4-reduktaz*; *antosyaninsiz gen*) kullanarak mutagenез sıklığı ve kalıtım açısından değerlendirme yapılmıştır. Çeşitli allelik mutasyon kombinasyonlarını taşıyan T₀ transgenik bitkilerin, hem Hi-II hem de B104 genotiplerinde %70'in üzerinde mutant oranı meydana getirdiği bildirilmiştir. Genetik ayırma yoluyla,



CRISPR transgeni olmadan yalnızca istenen mutant alelleri taşıyan ayrışmalarda T₁ döllerü üretilebilmektedir. Aktif bir CRISPR/Cas9 transgeninin kalıtımı, sonraki nesillerde ek hedefe özgü mutasyonlara yol açmaktadır. Farklı Cas9/gRNA modülleri barındıran iki ayrı *Agrobacterium* suşunun mısırın olgunlaşmamış embriyolarında maliyet verimliliğini artırmak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Ajith ve ark. (2018), süper ikili plazmid vektör *pSB1*'i, mısır bitkisinin transformasyonunda kullanmışlardır. Bazı vektörlerin boyutunun büyük olmasından dolayı klonlanmanın zorlaştığı, genom ile bütünleşme sürecinin zahmetli ve verimsiz olduğu ve bazı *Agrobacterium* suşlarında kendiliğinden mutantlara yol açtığı bilinmektedir. Bu sınırlamalar, yüksek verimli vektör oluşturmada önünde önemli engeller oluşturmaktadır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada mısır transformasyonunda eş-entegrasyon adımı gerektirmeyecek şekilde geliştirilmiş olan plazmidleri kullanarak küçük, basit ve çok yönlü üçlü vektör sistemi oluşturulmaya çalışmışlardır. Bu yeni tanımlanan plazmitlere, *pSB1*'de kusurlu olduğu tespit edilen virülans genlerini geri kazandırmanın yanında başka virülans genlerini de eklemişlerdir. Yardımcı plazmitlerin farklı konfigürasyonlarının T-DNA ikili vektörüyle birlikte üçlü vektörler olarak test edilmesi, mısırdaki hem transformasyon sıklığını hem de transformasyon sayısını neredeyse iki katına çıkarmaktadır. Yeni tanımlanan üçlü vektörler, elit akraba hatları için hızlı bir mısır transformasyon yönteminin geliştirilmesini sağlamıştır.

Rodrigues ve ark. (2020), hem *A. tumefaciens* hem de *A. rhizogenes* aracılığıyla mısır genomlarına hedeflenen nokta mutasyonlarının etkili bir şekilde uygulanmasını sağlamak amacıyla düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) aracılı baz düzenleme yöntemi geliştirmişlerdir. CRISPR, bilim insanlarının bakterilerde keşfettiği tekrarlayan DNA kümesidir. *RecA*'da fonksiyon kaybı mutasyonları içeren *EHA105* suşlarını üretmişler ve bu mutasyonların mısır transformasyonu için işlevsel olduğunu bildirmişlerdir. *A. rhizogenes*'in K599 suşu tarafından kök gelişiminin sağlanmasında *RolB* ve *RolC*'nin önemini vurgulamışlardır. Kullandıkları transformasyon yöntemi 10 koloniden 9'unda oldukça etkili olmuş ve hücrelerin en az %80'inde düzenlemeler yapılabildiği açıklanmıştır. *EHA105* ve K599 ile yapılan bu çalışmada hedef dışı mutasyonların, Cas9'dan bağımsız oldukları ve kullanılan sitidin deaminazın aktivite noktaları olarak TC motiflerinin önemini göstermiş olması bakımından önemlidir. CRISPR aracılı baz düzenlemenin, daha verimli bitki transformasyonu sağlamak için *Agrobacterium* suşları ile birlikte kullanılması önemli bir gelişmedir.

Agrobacterium aracılı bitki gen transformasyonu, gen(ler)in ürünlere aktarılması için doğal *Agrobacterium* sistemini taklit eden bir tekniktir. Bu teknik sayesinde, bugüne kadar birçok bitki türüne farklı ve önemli tarımsal özellikler kazandırılmış ve bitkilerin genetik yapıları modifiye edilmiştir. Bu teknik, transgenin kararlı entegrasyonu, uygun maliyet gibi birçok avantaja sahip olmasının yanında bitkilerin *Agrobacterium*'a dirençli olmasından kaynaklı düşük transformasyon verimliliği, hedef dışı transgen entegrasyonu gibi bazı zorlukları da taşımaktadır. Bu nedenle mısırdaki ve diğer bitkilerde genetik transformasyon verimliliğini artırmak için *Agrobacterium* aracılı transformasyonun daha iyi anlaşılması gerekmektedir (Rahman ve ark., 2024).

5. SONUÇLAR

Son yıllarda gen aktarım teknolojilerindeki hızlı gelişim, artan dünya nüfusunun ihtiyaç duyduğu gıda ve biyolojik madde gereksinimlerini karşılamak anlamında da büyük öneme sahiptir. Günümüze kadar mısır bitkisi de dahil olmak üzere en yaygın olarak kullanılan gen aktarım yöntemi, *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı olmuştur. Bu yöntemin tercih edilmesinin başlıca nedenleri, yabancı genlerin bitki genomuna stabil bir şekilde entegrasyonunun sağlanması, düşük maliyetli olması ve gen transformasyonu sonrası yüksek oranda bitki rejenerasyonu imkanı sunmasıdır. *A. rhizogenes* ise daha sınırlı sayıda çalışmada yer almakta olup, genellikle kök türevi transformasyonlar için kullanılan bir yöntemdir. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımında, gen aktarım oranı son derece düşük olduğundan, gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek oranda sürgün oluşumu gen aktarma çalışmalarının başarısında önemli rol oynamaktadır. Bu problemin çözülmesi için bu kültürlerin morfojenetik kapasitelerini etkileyen fizyolojik, ekolojik ve genetik faktörlerin net olarak bilinmesi gerekmektedir.

Türkiye’de *Agrobacterium* aracılığıyla mısır bitkisine gen aktarımı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Oysa ülkemizde mısır oldukça yaygın üretilen bir tahıldır. Amerika’dan ve diğer kıtalardan büyük oranda transgenik mısır ürünü ithal edilmekte ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. 2025 yılı itibariyle ülkemize ithali gerçekleştirilen 41 transgenik ürünün 28 tanesinin transgenik mısır olduğu düşünüldüğünde ülkemizde de bu alanda çalışmaların biran önce yapılmaya başlanmalıdır. Bu araştırma ve üretim faaliyetlerinin ithal mısıra ayrılan harcamaların/dövizin ülkemizde kalacağı anlamına gelmektedir. Bu şekilde ülkemiz kendi yem ihtiyacını kendisi karşılamış olacak ve ülke ekonomisine katkı sağlanabilecektir. Ancak bunun için temelde ilk olarak yapılması gereken şey, Biyogüvenlik Kanunu’nda gerekli düzenlemelerin gün geçmeden yapılması olacaktır. Ayrıca, *Agrobacterium* aracılı transformasyonla ilişkili zorluk ve sorunların günümüzde ve gelecekte CRISPR/Cas9 ve benzeri modern biyoteknolojik sistemler ile entegrasyonu daha çok tartışılmalıdır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makalenin yazarları arasında bilinen ya da olası bir çıkar çatışması yoktur.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Abhishek, A., Kumari, R., Karjagi, C. G., Kumar, P., Kumar, B., Dass, S., & Ramteke, P. W. (2016). Tissue culture independent *Agrobacterium tumefaciens* mediated in planta transformation method for tropical maize (*Zea mays* L). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(2), 375-384.
- Ajith, A., Bass, S. H., Wu, E., Wang, N., McBride, K. E., Annaluru, N., Miller, M., Hua, M., & Jones, T. J. (2018). An improved ternary vector system for *Agrobacterium*-mediated rapid maize transformation. *Plant Molecular Biology*, 97, 187–200.
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., ... & Stewart Jr, C. N. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 28, 1510–1520.
- Attar, A. (2017). Gen terapisi yöntemleri: Fiziksel ve kimyasal metotlar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 74(1), 103–112.
- Barampuram, S., & Zhang, Z.J. (2011). Recent Advances in Plant Transformation. In: Birchler, J. (eds) *Plant Chromosome Engineering. Methods in Molecular Biology*, vol 701.
- Booy, G., Krens, F. A., & Huizing, H. J. (1989). Attempted pollen-mediated transformation of maize. *Journal of Plant Physiology*, 135, 319–324.
- Boulton, M. I., Buchholz, W. G., Marks, M. S., Markham, P. G., & Davies, J. W. (1989). Specificity of *Agrobacterium*-mediated delivery of maize streak virus DNA to members of the Gramineae. *Plant Molecular Biology*, 12(1), 31–40.
- Cao, J., Yao, D., Lin, F., & Jiang, M. (2014). PEG-mediated transient gene expression and silencing system in maize mesophyll protoplasts: A valuable tool for signal transduction study in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(5), 1271–1280.
- Cao, S.-L., Masilamany, P., Li, W.-B., & Pauls, K. P. (2013). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of corn (*Zea mays* L.) multiple shoots. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(2), 208–216.
- Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., Hatipoğlu, R., & Özkan, H. (2016). Melez mısır ıslahında *in-vivo* katlanmış haploid tekniğinde kullanılan farklı inducer genotiplerin haploid indirgeme oranlarının belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(Özel sayı 1), 52–57.
- Chang, D. C., & Meyers, R. A. (2006). Electroporation and electrofusion. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (2nd ed., pp. 135–157).
- Char, S. N., Neelakandan, A. K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M. H., ... & Yang, B. (2017). An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 15, 257–268.
- Chilton, M. D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P., & Quetier, F. (1980). [Article title missing]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 4060–4064.



- Daveya, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C., (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23(2), 131–171.
- Genç Kesimci, T. (2022). Mısır Fungal Hastalıkları ve Mücadelesi. Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü. <https://eskisite.igdir.edu.tr/Addons/Resmi/uploads/files/dr-ogr-uyesi-tuba-genc-kesimci-misirda-hastaliklar-ve-mucadelesi.pdf>. 20.11.2025.
- Goetz, H., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., & Kumlehn, J. (2009). *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International Journal of Plant Genomics*, Article 835608.
- Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E. C., Peterson, G., & Smith, R. H. (1991). Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiology*, 95, 426–434.
- Graves, A. C., & Goldman, S. L. (1986). The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 7(1), 43–50.
- Green, C. E., & Phillips, R. L. (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science*, 15(3), 417–421.
- Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J., & Golinski P. (2008). Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 209–220.
- Guoguo, M., Ao, C., Yaru, W., Shuquan, L., Minyi, W., Yilong, H., Xu, L., & Xingliang, H. (2024). A simple and efficient *in planta* transformation method based on the active regeneration capacity of plants. *Plant Communications*, 5, 100822.
- Holst-Jensen, A. (2009). Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*, 27(6), 1071–1082.
- ISAAA GM Crops Approval Database. (2025). <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=6&Crop=Maize>. 23.11.2025.
- Jingxue, W., Yi, S., & Yi, L. (2007). *Zea mays* genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 46, 51–55.
- Kaval, E., & Dostbil, N. (2003). Protoplast transformasyon metodu kullanılarak alkalo-tolerant *Bacillus* sp. ksilanaz geninin Gr (+) bakterilere transferi ve ekspresyon düzeyinin araştırılması. *Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 56–65.
- Kaya, C., Akar, M., Genç, M. D., & Çevik, M. (2019). Reprodüktif biyoteknolojide kullanılan gen transfer yöntemleri: Spermatozoon aracılı gen transferi. *International Black Sea Coastline Countries Symposium 2*, July 20–22.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., & Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327, 70–73.
- Krska, R., Welzig, E., & Boudra, H. (2007). Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 241–264.
- Kumar, A., Singh, M., Kaur, H., Rawal, R., & Singh, P. (2017). A review on bacterial stalk rot disease of maize caused by *Dickeya zeae*. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(2), 1214–1225.
- Listanto, E., Riyanti, E. I., & Sustiprijatno. (2016). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *in-planta* transformation of Indonesian maize using pIG121Hm-Cs plasmid containing *nptII* and *hpt* genes. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 17(2), 49–56.
- Lu, B., Scott, G., & Goldsmith, L. A. (1996). A model of keratinocyte gene therapy: Preclinical and therapeutic considerations. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 108(2), 165–172.
- Luo, Z. X., & Wu, R. (1989). A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Molecular Biology Reporter*, 7, 69–77.
- Morgavi, D.P., & Riley, R.T. (2007). An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 201–212.
- Nester, E. W., Gordon, M. P., Amasino, R. M., & Yanofsky, M. F. (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis.
- Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, L., Gürel, E., & Babaoğlu, M. (2001). *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı. *Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları*. (ss. 112–159). ISBN: 975-6652-05-5.

- Rahman, S. U., Khan, M. O., Ullah, R., Ahmad, F., & Raza, G. (2024). *Agrobacterium*-mediated transformation for the development of transgenic crops: Present and future prospects. *Molecular Biotechnology*, 66(8), 1836–1852.
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345.
- Rodrigues, S. D., Karimi, M., Impens, L., Van Lerberge, E., Coussens, G., Aesaert, S., ... & Pauwels, L. (2020). Efficient CRISPR-mediated base editing in *Agrobacterium* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS). (Submitted/Contributed by Marc Van Montagu, November 24, 2020).
- Sahi, S. V., Chilton, M.-D., & Chilton, W. S. (1990). Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 3879–3883.
- Saumonneau, A., Laloi, M., Lallemand, M., Rabot, A., & Atanassova, R. (2012). Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1495–1510.
- Shou, H. X., Palmer, R. G., & Wang, K. (2002). Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 325–334.
- Süzer, S. (2014). Trakya koşullarında farklı toprak işleme sistemlerinin kışlık buğdayda verim yönünden karşılaştırılması. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 1(1–2), 36–43.
- Tan, B., Xu, M., Chen, Y., & Huang, M. (2013). Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114(1), 11–18.
- Taş, T. (2020). Bazı atdışi hibrit mısır (*Zea mays indentata* Sturt) çeşitlerinin tane özellikleri ile tane verimi arasındaki ilişkilerin belirlenmesi. *ISPEC Tarım Bilimleri Dergisi*, 4(2), 222–233.
- Thrane, U. (2001). Development in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites “Alınmıştır: *Fusarium* (eds) Summerell, B.A., Leslie, J.F. Backhouse, D. Bryden, W.L. and Burgess, L.W., Paul. E. Nelson, *Memorial Symposium APS Press*, St. Paul, MN, USA. pp. 29-49”.
- TÜİK. (2023). <https://www.tuik.gov.tr>.
- Uchida, M., Natsume, H., Kobayashi, D., Sugibayashi, K., & Morimoto, Y. (2002). Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a Helios gun system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 690–693.
- Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B., & Hidy, P. H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 27, 3109-3114.
- Wang, H., Wang, W., Zhan, J., Huang, W., & Xu, H. (2015). An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes. *Scientia Horticulturae*, 191, 82-89.
- Wang, J., Sun, Y., Cui, G., & Hu, J. (2001). Transgenic maize plants obtained by pollen-mediated transformation. *Acta Botanica Sinica*, 43, 275–279.
- Xu, H., Zhou, X., & Lu, J. (2006). Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* and production of regenerative plants in hairy root cultures in maize. *Science in China Series C: Life Sciences*, 49, 305–310.
- Yadava, P., Abhishek, A., Singh, R., Singh, I., Kaul, T., Pattanayak, A., & Agrawal, P. K. (2017). Advances in maize transformation technologies and development of transgenic maize. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1949.
- Yang, L., Cui, G., Wang, Y., Hao, Y., Du, J., Zhang, H., Wang, C., Zhang, H., Wu, S.-B., & Sun, Y. (2017). Expression of foreign genes demonstrates the effectiveness of pollen-mediated transformation in *Zea mays*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 383.
- Yu, G.-R., Liu, Y., Du, W.-P., Song, J., Lin, M., Xu, L.-Y., Xiao, F.-M., & Liu, Y.-S. (2013). Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated immature embryo transformation system and transformation of glyphosate-resistant gene 2mG2-EPSPS in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 12(12), 2134–2142.
- Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, A. N., & Lynn, D. G. (2000). At the maize/*Agrobacterium* interface: Natural factors limiting host transformation. *Chemistry & Biology*, 7, 611–621.



- Zhang, Y., Su, J., Duan, S., Ao, Y., Dai, J., Liu, J., Wang, P., Li, Y., Liu, B., Feng, D., Wang, J., & Wang, H. (2011). A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7(1), 1–14.
- Zhou, G., Weng, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., & Liu, G. (1983). Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 101, 433–481.