

## Gen transferi ile böceklere karşı dayanıklı bitki elde etme çalışmaları

Osman ECEVİT \*

Celâl TUNCER \*

### Summary

#### Studies about the resistant plants to insects by gen transfer

Insects are important pests for agricultural crop production. Conventional methods of insect control, specially chemical control, have occurred various problems. Recently molecular biologists have developed new method to insect pest control, new genetic engineering of crops that produce insecticidal or antifeedant proteins continuously in the field. There are a few literature of success with this approach. The recombinant genes, which coding insecticidal or antifeedant proteins, were transmitted to progeny and resistance to insects was maintained. First genetically products will be expected to reach the market by the mid-1990's.

### Giriş

Nüfus artışına paralel olarak araştırmacılar besin üretimini artırmak amacıyla çeşitli yöntemler ve yenilikler geliştirirken bir taraftan da ürettiklerini değişik zararlı ve hastalıklardan korumak zorundadırlar. Her türlü mücadele yönteminin uygulanmasına rağmen üretilen besinlerin yaklaşık olarak %48'i muhtelif zararlılar (böcekler, patojenler, yabancı otlar, memeliler v.s.) nedeniyle kaybedilmekte (Pimentel, 1977) ve bu zararlılar arasında böcekler önemli bir yer işgal etmektedir.

Son yıllarda genetik mühendisliğindeki gelişmeler, tarımdaki zararlı mücadelesinde etkin ve değişik bir metotun kullanılma olanaklarını ortaya çıkarmıştır. Herbisitlere dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi (Hatzios 1989; Mazur and Falco, 1989) ve böceklere karşı mikrobiyal etmenlerin etkinliklerinin artırılması (Özbek, 1987) üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bunlara ilave olarak gen transferi ile böceklere dayanıklı bitkiler elde edilme-

\* O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye  
Alınış (Received) : 2.1.1991

si yolunda başarılı çalışmalar yapılmıştır. Sadece bir gen ekleme yolu ile yapılan transformasyon daha ileri çalışmalar için ümit kaynağı olmakta; fungus, bakteri, virüs, mikoplazma, nematod ve böcekler gibi zararlı organizmalara karşı dayanıklı bitki kazandırabilme imkanları vermesi büyük bir buluş olarak ortaya çıkmaktadır (Bachrach, 1983' a atfen Logan et al., 1987). Şimdiye kadar bu metotla böceklerle karşı başarılı sonuçların elde edildiğini gösteren araştırmalar (Barton et al., 1987 ; Fischhoff et al., 1987; Hilder et al., 1987; Vaeck et al., 1987) literatüre geçmiş bulunmaktadır.

## Gen transferi teknolojisi

Gen transferi çalışmalarının temelini kendi DNA'sının bir kısmını enfekte ettiği bitki hücresine nakletme yeteneğinde olan *Agrobacterium tumefaciens*'in bu özelliği teşkil etmektedir. 1980'lerin ilk yıllarında ABD ve Avrupa'daki bazı araştırmacılar bu bakteriyi kullanarak, bitki hücrelerine gen nakli ile gen transferinin yapıldığı bu hücrelerden bitki elde etmenin yollarını keşfetmişlerdir. Elde edilen bitkiler kendi genomlarına nakledilen genleri almışlar ve böylece yeni stabil ve kalıtsal özellikler kazanmışlardır (Meeusen and Warren, 1989).

*A. tumefaciens* enfekte ettiği bitkilerde tümör oluşumuna neden olan bir patojen bakteridir. Bitki hücresiyle temasa geldiğinde bakterinin Ti-plasmid kısmı bitki hücresine nakledilir. Ti-plasmidin özel bir kısmı olan T-DNA bitki hücresinin çekirdeğine transfer edilir ve bitki genomunun bir parçası haline gelir.

T-DNA bölgesindeki genlerin çeşitli görevleri vardır. T-DNA'nın sağ ve sol sınırındaki 25 baz çiftini içeren kısmın bitki genomuna transferde etkin olduğu zannedilmektedir. Bu kısmın ayrılması T-DNA'nın transferini engellemektedir. Diğer kısımların bu transferde önemli bir rolü olmadığı saptanmıştır. Bakteri, hayvan veya bitki geninin T-DNA'ya yerleştirilen kısmının bir diğer bitkiye aktarılması gerçekleştirilmiştir. Bu T-DNA'nın transferini sağlayan bölgeye dokunmaksızın, tümör oluşturan genetik bölgenin T-DNA'dan ayrılması yoluyla başarılmıştır.

İstenilen özelliklere sahip olan genler T-DNA'nın transferi sağlayan sağ ve sol sınırları arasına bir plasmid yardımıyla yerleştirilmektedir. Bu bakteri bitkileri enfekte ettiğinde, T-DNA'nın transferi sağlayan sınırları arasındaki DNA'nın tamamını bitkinin genetik materyaline transfer etmektedir (Agrios, 1988). Bu tekniğin başarılı bir şekilde kullanılmasından sonra böceklerle karşı dayanıklılık sağlayabilecek özellikleri idare eden genlerin bitkilere nakledilme düşüncesi doğmuştur. Bu konuda dikkat çeken ilk genler, uzun zamandan beri böceklerle mücadelede başarıyla kullanılan *B. thuringiensis*'in genleri olmuştur. Bunu bazı bitkilerde doğal olarak bulunan ve diğer bazı bitkilerde yararlanmalar sonucu sentezi artan protein inhibitörleri izlemiştir.

### *Bacillus thuringiensis* toksinleri ve gen transferi

*B. thuringiensis* böceklerle karşı mücadelede uzun yıllardan beri başarıyla kullanılmakta olan bir bakteridir. Bu bakteri sporulasyon sırasında protein yapısında toksik bir kristal (protoxin) üretir ve depolar. Böcek tarafından alınan kristaller, hassas böceğin midesinde proteazlar tarafından aktif toksinlere dönüşmek üzere ayrışır ve bu toksinler mideyi parçalarlar. Bu toksin  $\delta$ -endotoksin olarak isimlendirilir (Falcon, 1971).

Bu bakterinin farklı ırkları değişik böcek takımlarına karşı etkili olan toksinler üretirler. Örneğin *B. thuringiensis* var. *israeliensis* daha çok Diptera takımı türlerine, var. *kurstaki* ve var. *berliner* Lepidoptera'ya, var. *tenebrionis* ve var. *sandiego* Coleoptera türlerine karşı etkilidir (Shields, 1987).

Gen transferi çalışmalarında *B. thuringiensis*'in seçilmesinin nedeni bu bakterinin bazı avantajlara sahip olmasından dolayıdır. Bunlar;

a) *B. thuringiensis* endotoksin ABD'de 1960'den beri emniyetli bir şekilde kullanılmaktadır.

b) Emniyetli oluşu, ayrışma ve selektif olma özelliği çevre konusunda duyarlı uygulamalardaki kullanım için bu bakterinin tercih edilmesine neden olmuştur.

c) *B. thuringiensis* endotoksinin üretimini tek bir gen tarafından idare edilmektedir ve bu gen izole edilmiştir.

d) Endotoksin muhtemelen bütün Dünya'da en zararlı böcekler, Lepidopter türlerinin larvalarına karşı etkili olarak bilinmektedir. İnsektisit etkiye sahip bu proteinin emniyetli olması, etkinliği ve nisbeten basit olması gibi özellikleri, onu genetik mühendisliği ile böceklere dayanıklı bitki elde etme çalışmaları için en uygun aday yapmıştır (Meeusen and Warren, 1989).

Bu yöntemin kullanılmasıyla başarılı sonuçların elde edildiği ilk çalışma 1987'de Belçika'da yapılmıştır. Bu çalışmada *B. thuringiensis*'in toksin sentezleyen genlerini bütün bitkisine nakletmek için *Agrobacterium* yoluyla T-DNA transferi yöntemi kullanılmıştır.

*B. thuringiensis*  $\delta$ -endotoksini kodlayan genin bitkilere nakledilmesinde *B. thuringiensis*'in berliner 1715 ırkı (Vaecck et al., 1987) ve *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Fischhoff et al., 1987; Barton et al., 1987) kullanılmıştır. *B. thuringiensis* berliner 1715'den elde edilen bt 2 geninin kodladığı protein Bt 2 olarak adlandırılır ve 1115 amino asit uzunluğundadır. Bt 2 bir protoksindir ve tamamen toksik yapıya sahip Mr 60K'lık daha küçük polipeptid parçalara sahiptir. Bt 2'nin tamamen toksik etkiye sahip en küçük parçası proteinin NH<sub>2</sub> uç kısmında 29-607 amino asitler arasında yer almaktadır. Transformasyon çalışmalarında bir kısmı kesilmiş genler yanında bt 2 geninin tamamını kodlayan chimaeric genler de kullanılmıştır. Bu çalışmada T-DNA yapılarının bir kısmı bitkilerde fenotipik özellik meydana getiren bir chimaeric neomycin phosphotransferase geni (neo) içermektedir. Diğer yapılar neo geni ve bt 2 parçaları arasında meydana getirilen kombinasyonları taşımakta ve neo genin 5'sonuna birleşmeler bakteri ve bitkilerde kanamycin'e dayanıklılığı sağlamaktadır. pLB 884 plasmidi bt 884 gen parçasını taşır ve Bt-2 'nin NH<sub>2</sub> uç kısmından 610 aminoasit pozisyonuna kadar olan kısmı kodlamaktadır. Bu parça *Escherichia coli*' de böcek larvalarına tamamen toksik olan bir polipeptid üretmektedir. pLBKm 860 ve pLBKm 23 plasmidleri sırasıyla Bt-2'nin NH<sub>2</sub> uç kısmından 683 ve 724 aminoasit pozisyonuna kadar olan kısmı kodlayan bt:neo860 ve bt:neo23 füzyon genleri içermektedir. Bu plasmidleri taşıyan *E. coli* hücreleri kanamycin'e dayanıklı olmakta ve sırasıyla Mr 106 K değerlerine sahip olan Bt:NPT860 ve Bt:NPT23 füzyon proteinlerini üretmektedir (Vaecck et al., 1987).

Tüm ve değiştirilmiş *B. thuringiensis* toksin genleri, bitkiye transferi sağlayan vektörlerin (bt2 ve bt 884 için pGSH 160; bt:neo860 ve bt:neo23 için pGSH 150) T-DNA sınırları arasına yerleştirilmiştir. Farklı yapıdaki genlerin bitkilere transferi yapıldıktan sonra, 4 tip *B. thuringiensis* genini içeren transgenik bitkilerin yaprakları, toksin düzeylerinin insektisit etki sağlayıp sağlayamayacağını belirlemek üzere *Manduca sexta* larvalarına yedirilmişlerdir. Transgenik bitkilerinin yapraklarına 6 gün beslenmeden sonra ölüm oranları belirlenmiştir. Daha uzun füzyon protein Bt:NPT 23 taşıyan bitkilerin yaklaşık olarak 1/4'ü ve daha kısa füzyon protein Bt:NPT 860 taşıyanların yaklaşık 2/3'ü larvalarda %75-100 oranında ölüm meydana getirmişlerdir. Böylece Bt:NPT II kombinasyonları insektisit etki göstermeye yetecek düzeyde toksin taşıyan transformant bitkilerin elde edilmesini sağlamışlardır. İkinci olarak füzyon proteinlerce meydana getirilen toksisitenin transformant bitkilerin kanamycin'e dayanıklılığı ile doğrudan ilgili olduğu görülmüştür. bt 2 geninin bir kısmının kesilmesi ile elde edilen bt884 genini taşıyan bitkilerin 2/3'ünün larvalarda %75'den fazla ölüm meydana getirdiği saptanmıştır. bt 2 geninin tümünün nakledildiği transformant bitkilerinin hiçbirisi, NPT II taşıyan kontrol bitkilerde görülen düzeylerin üzerinde öldürücü etki göstermemiştir. Bunun nedeni bugün için bilinmemektedir.

Transformant bitkilerin böcek zararından etkili bir korunma meydana getirip getirmediğine dair incelemelerde, bitkilerin bir kısmına bırakılan larvalar önce normal olarak beslenirken 18 saat içinde beslenmeyi durdurmuşlar ve tamamı 3 gün içinde ölmüştür, bir tek larvanın yaptığı zarar ise 1-2 mm<sup>2</sup> ile sınırlı kalmıştır. Diğer bir kısım bitkiler biraz daha fazla zarar görmüşler, fakat larvaların tamamı 6 gün içinde ölmüştür. Kontrol bitkiler ise 4-6 gün içinde şiddetli bir zarara uğramış ve 12 gün içinde tamamen tüketilmişlerdir. Transgenik bitkilerdeki insektisit etki ile *Bacillus* protein miktarı arasında da bir ilişki tesbit edilmiştir. Bir kısmı kesilmiş bt 2 geni veya füzyon yapıları taşıyan bitkilerinin bt 2 geninin tamamını taşıyan bitkilerden aşağı yukarı 10 kat fazla *Bacillus* proteini taşıdığı görülmüştür. Proteinlerinin %0.004'ünden fazlasını toksin olarak üreten bitkiler 6 gün içinde larvalarda %100 ölüme neden olmuştur. Çalışmalarda elde edilen bazı bitkiler bu düzeyden 3-5 kat fazla toksin üretebilmektedirler. Bu bitkilerin böcek zararından iyi bir şekilde korunduğu gözlenmiştir. Toksik madde taşıma düzeyleri bt 2 serisine eklenen neo geni tarafından önemli oranda etkilenmemiştir; bu etki daha ziyade bt 2 parçasının uzunluğuna bağlıdır. Bu tip ek genler yüksek kanamycin dayanıklılığı meydana getirmelerinden dolayı, güçlü insektisit etkiye sahip transformant bitkilerin seçilmesinde kullanılabilirler (Vaeck et al., 1987).

Birçok lepidopter türü bu toksinlere hassas olmakla birlikte, *Heliothis* ve *Spodoptera* cinsine bağlı türler gibi önemli bir kısım zararlılar *B. thuringiensis berliner*'inde dahil olduğu genel *B. thuringiensis* ırklarına daha az hassastır. Bitkileri bu böceklerden korumak için daha yüksek düzeyde taşınmaya ihtiyaç olacaktır. Bu daha güçlü spesifik bitki promotor'leri içeren chimaeric *Bacillus* genleri kullanılarak başarılabılır. Örneğin CaMV (Cauliflower mosaic virus)'in 35 S promotori bitkilerde T-DNA promotor'den 10-50 kat daha fazla taşınma sağlamaktadır. Önemli böcek türlerine karşı daha yüksek spesifik aktiviteye sahip chimaeric toksin genlerinin yapıya ilavesi de bu soruna alternatif olabilir (Vaeck et al., 1987). Bu çalışmayı domateste (Fischhoff et al., 1987) ve tütünde (Barton et al., 1987) elde edilen başarılı sonuçlar izlemiştir. Fischhoff

et al. (1987), *Bacillus thuringiensis kurstaki* genlerini domates bitkisine nakletmişlerdir. Bu varyetede endotoksini kodlayan gen hemen tamamen *berliner* varyetesindeki gen ile benzer yapıdadır. Endotoksini kodlayan gen üzerinde yapılan çalışmalarda, proteinin N uç kısmının letal etki için esas olduğu, C uç kısmının gerekli olmadığı saptanmıştır. İlk 646 amino asiti içeren protein toksik etkiyi sağlarken, ilk 565 amino asitin bu etkiyi sağlamadığı, yine ilk 125 amino asidin çıkarılması halinde letal etkinin ortadan kalktığı görülmüştür. Önceki denemede yapıldığı gibi, endotoksini kodlayan gen bütün olarak veya belirli amino asit sınırlarından kesilmiş parçalar olarak domatese nakledilmişlerdir. Bu çalışma sonunda kesilmiş parçaların nakledildiği transformant bitkilerin diğerlerinden daha toksik etki göstermesi üzerine çalışmalar, kesilmiş gen parçalarının nakli üzerinde yoğunlaştırılmıştır. *B. thuringiensis* toksin geninin 1-725 amino asit kısmını içeren pMON9711 ve 1-646 amino asit parçasını içeren pMON9714 plasmidlerini taşıyan *Agrobacterium* ırkları domates bitkilerinin transformasyonunda kullanılmıştır. *M. sexta* ile yapılan beslenme denemelerinde, 10 adet birinci dönem larva kontrol bitkisinden alınan bir yaprağı 4 gün içinde tamamen tüketirken, larvalarda ölüm görülmemiş ve 5 kat büyüme saptanmıştır. pMON9711 transgenik bitki yaprağında beslenen larvalar 48 saat içinde tamamen ölmüşler ve yaprakta çok az beslenme görülmüştür. Bütün bir domates bitkisi üzerinde yapılan beslenme denemesi de benzer sonuç vermiştir. Kanamycin'e dayanıklılık gösteren 17 pMON9711 transgenik bitkisinden 10 tanesi larvalara yüksek oranda letal etki (% 90-100) göstermiş; 2 bitki daha düşük (% 20-50) ve 5 tanesi hiç etki göstermemiştir. pMON9713 transgenik bitkilerden 4/5 'i yüksek oranda etki göstermiştir. Bu transgenik bitkilerin diğer lepidopter (*Heliothis zea*, *H. virescens*) larvaları üzerine etkileri de incelenmiştir. Transgenik bitkilerin bir kısmı *H. virescens* larvalarının %100'ünü öldürürken, diğerleri tamamen etkisiz bulunmuştur. Ancak ölmeyen larvaların kontrole oranla büyümesi şiddetli bir şekilde engellenmiştir. *H. zea* için sadece bir bitki denenmiş ve bir dereceye kadar *H. virescens* 'ten daha az ölüm görülmüştür. Bu larvalarda da büyüme şiddetle engellenmiştir. Bu çalışmada domates meyvesinde bir miktar *B. thuringiensis kurstaki* faaliyetinin olduğuna dair ilk delillerde gözlenmiştir.

Barton et al. (1987), *B. thuringiensis kurstaki*'nin  $\delta$ - endotoksini kodlayan genini tütün bitkisine transfer etmişlerdir. Birbirinden farklı 100 transformant bitki üzerinde yapılan denemede bitkilerin yaklaşık olarak %25'inde beslenen *M. sexta* larvalarının tamamının 4 gün içinde öldüğü gözlenmiştir. Daha dayanıklı bitkilerde denemenin ilk birkaç saatinde larva beslenmesinin çok az olduğu görülmüştür. Toksik etki taşımadığı sonucuna varılan diğer birçok bitki kontrol bitkilerine oranla larvaların büyüme oranlarını ve beslenmesini azaltmışlardır. Bu bitkiler *H. zea*, *H. virescens* ve *Spodoptera exiqua* larvalarıyla denemeye alındıklarında kontrol bitkilerine nisbeten larvaların ölüm oranlarında artış ve beslenmelerinde azalma saptanmıştır.

Pamuk, mısır ve sebze gibi diğer ürünlerde zararlı lepidopter türlerine karşı buna benzer sonuçların elde edilmesi için yoğun çabalar sarfedilmektedir. Halihazırda böceklerle dayanıklı bitkilerin tarla denemeleri domatesten bir, lütünde 2 yıldır sürmektedir. Gen transferi ile böceklerle dayanıklı ilk bitki tohumlarının 1992-1995 yılları arasında piyasaya çıkması beklenmektedir (Meeusen and Warren, 1989).

## Proteinase inhibitör geni ve gen transferi

Bitkilerde böceklere karşı dayanıklılık oluşturulmasında kullanılan genler sadece *B. thuringiensis* genleri değildir. Böceklere karşı dayanıklılık sağlayan birçok genel mekanizma bitkilerde doğal olarak mevcuttur. Bu dayanıklılık yapısal (örneğin, bitki yüzeyinde böceklerin yakalanmasını sağlayan yapışkan madde salgılayan kıllar veya zehirli etki gösteren antibiyotikler) veya böceğin beslenme ve yumurta koymasını engelleyen bitkinin sekonder kompleks bileşiklerine bağlı olabilir. Bu tip dayanıklılık muhtemelen poligenik karakterdedir ve klasik ıslah metodları için daha uygun özelliklerdir. Bunlarla birlikte, bitkileri böcek zararından korumada, tek başına klonlanabilir genlerin teşhisinde önemli gayretler sarfedilmektedir. Bu konuda ümit vadeden gen gruplarından birisi bitkilerde yaralanmayla birlikte artan "protease inhibitör"lerdir. Bazı bitkiler mekanik olarak veya bir böceğin saldırısı ile yaralandığında "protease inhibitörünü artıran faktör" (PIIF) salgılar ve bu durum birkaç protein protease inhibitörünün sistemik sentezini artırır (Shields, 1987). Yaralanma; hem yaralanmış yapraklarda hem de uzaktaki yaralanmamış yapraklarda proteinase inhibitör proteinlerini kodlayan genlerin faaliyetlerinin artmasına neden olur (Bowles, 1990). Bu inhibitörler mikrobiyal protease'lere ve böceklere karşı yöneltilir ve onlar böcek midesindeki sindirimi bozarak saldırıya karşı bitkilerin korunmasını sağlayabilirler. Bu protease inhibitörlerinin bir kısmını kodlayan genler elde edilmiş ve diğer bitkilere nakledilmiştir. Patates proteinase inhibitör II'yi kodlayan genin tütüne transfer edildiği denemelerde, tütün yaralandığında veya koparılan yapraklar PIIF ile muamele edildiğinde tütünde proteinase inhibitör gene homolog herhangi bir gen olmamasına rağmen, nakledilen gen proteinase inhibitörün ortaya çıkışını teşvik etmiştir (Thornberg et al., 1987'ye atfen Shields, 1987).

Börülcede bulunan börülce tripsin inhibitörleri (CpII)'de böyle bir mekanizmayı içermektedir. Börülce tohumlarındaki CpII'nun düzeyi börülcenin başlıca zararlısı *Callasobruchus maculatus*'a karşı tarla dayanıklılığıyla ilgilidir. Daha da önemlisi, CpII ile beslenme denemeleri bu inhibitörlerin *Heliothis*, *Spodoptera*, *Diabrotica* ve *Tribolium* cinsleri gibi önemli zararlıları içine alan birçok böceğe karşı antimetabolik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Tripsin inhibitör geni tütüne nakledildikten sonra, bu bitki için önemli bir zararlı olan *H. virescens*'in yeni çıkmış larvalarıyla bulaştırılmıştır. Sonuçta kontrol bitkilere oranla transforme edilmiş bitkilerin böcek yaşamı ve zararını azalttığı tesbit edilmiştir. Böcekteki gelişmenin gerilemesinin bitki yapraklarındaki inhibitör miktarıyla açık bir ilişkiye sahip olduğu görülmüştür. *H. virescens* larvaları kontrol bitkilerinde gelişip onları tamamen tüketirken, gen nakli yapılan bitkiler üzerindeki larvalar çok az beslenerek, çok sınırlı oranda zarar vermekle birlikte daha sonra ya ölmüşler ya da gelişmelerini tamamlayamamışlardır. Araştırma sonuçları bir proteinase inhibitörünün tek başına böcek saldırısını önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir (Hilder et al., 1987).

### Dayanıklılığın kalıtımı

*B. thuringiensis* genleri nakledilen tütün bitkilerinin serada yetiştirilmesi sonucu, bitkilerin tamamı normal olarak büyümüş ve büyüme gücü ile morfolojik açıdan kontrol bitkilerinden ayırdedilememişlerdir. Bir kısım transgenik bitkilerden elde edilen

F<sub>1</sub> dölü bitkiler etkinin kalıtımını test etmek için denenmiş ve insektisit etkisinin ebeveyn bitkilerde gözlenene benzer olduğu saptanmıştır. Yapılan beslenme denemelerinde F<sub>1</sub> dölü bitkiler 6 gün içinde *M. sexta* larvalarında %100 ölüme neden olmuştur (Vaeck et al., 1987).

Tripsin inhibitör geninin nakledildiği tütün bitkileri normal gelişme göstermiştir. Endotoksin genlerinde olduğu gibi bu yeni özelliğin hem stabil hem de kalıtsal olduğu tesbit edilmiştir (Hilder et al., 1987). Yapılan diğer çalışmalarda da (Fischhoff et al., 1987; Barton et al., 1987) insektisit etkinin bitkilerin sonraki döllerine başarıyla aktarıldığı gözlenmiştir.

## Gen transferi ile böceklere dayanıklı bitki elde etme imkânları

Elde edilen başarılı sonuçlara rağmen gen nakli ile dayanıklı bitki varyetelerinin böceklerle mücadeledeki kullanılma durumu üzerinde tartışmalar başlamıştır. Bu yöntemi savunanlar (çoğunlukla moleküler biyoloji çalışanları) geliştirilen bitkilerin geleneksel insektisit kullanımının yerini alacağını düşünmektedirler. Buna karşı olanlar ise (çoğunlukla agro-kimya endüstri çalışanları), ıslahçıların böceklere dayanıklılık sağlamak için bitkilerin genetiği ile fazlaca oynadığını ve çarpıcı birçok başarıya rağmen kimyasal insektisitlere olan ihtiyacın önceki gibi zorunlu olacağını düşünmektedirler. Bu yöntemin gelecekte kabul görmesi klasik mücadele yöntemlerine olan üstünlüklerine bağlıdır. Bu teknoloji, etkinlik ve uygulama maliyeti, geliştirme maliyeti ve çevre açısından avantajlara sahiptir. Bununla birlikte böceklerin dayanıklılık geliştirmesi, hukuki engeller ve patent hakkının korunması gibi belirsizlikler bu metodun uygulanabilirliğini etkileyecektir. Bu husustaki problemlerin aşılması için *B. thuringiensis* endotoksin genlerini içeren ürünlerin test edilmesi ve uygun değerlendirmeleri gerekmektedir (Meeusen and Warren, 1989).

### Potansiyel avantajlar

#### 1. Etkinlik ve uygulama maliyeti

*B. thuringiensis* endotoksini üreten bitki varyeteleriyle zararlılara karşı mücadelenin yetiştirici açısından geleneksel yöntemlere nisbeten 4 üstün yönü bulunmaktadır. Birincisi; yetiştiriciler hava şartlarına bağlı olmaktan kurtulacaklardır. İklim şartları insektisit uygulanmasına izin vermediği veya tarlaların ilaçlama aletlerinin girmesine engel olacak kadar çamurlu olduğu zamanlarda yetiştiricinin ürünü korunmuş olacaktır. İkincisi; kökler, gölgede kalan alt yapraklar ve insektisit uygulamaları arasındaki sürede çıkan yeni organlar gibi insektisitlerin ulaşmasının zor olduğu kısımların korunmasıdır. Üçüncü avantaj; kontrolü sağlayan unsur tarlada daima hazır ve böylece uygun ilaçlama zamanını tesbit etmek için yetiştiricinin tarlasını kontrol etmesine gerek yoktur. Ayrıca zararlı yumurtaların bırakılma ve açılma zamanı gibi kavramlar önemini yitirecektir. Endotoksinin bitki dokularında her zaman mevcut olmasından dolayı böcekler beslenmeye başlar başlamaz etkisini göstermektedir. Bu an zararlının endotoksine en hassas olduğu zamandır. Son olarak, pamuk gibi yoğun insektisit kullanılan ürünlerde maliyet, kimyasal madde masraflarıyla yakından ilgilidir. Dayanıklı bir bitki tarafından sağlanan

mücadele sadece insektisit masraflarını ortadan kaldırmakla kalmaz, aynı zamanda yetiştiricinin ilaçlama aletleri giderini, işgücü kaybını ve yakıt masrafını azaltır (Meeusen and Warren, 1989).

## 2. Geliştirme maliyeti

Bugün için yeni bir kimyasal insektisit sentezi, geliştirilmesi, lisans ve üretim maliyetleri 25 milyon doların üzerindedir (Metcalf, 1980) ve yeni bir tesis gerekiyorsa bu miktar daha da artmaktadır. Buna karşılık yeni bir bitkisel varyetenin geliştirilme maliyeti 1 milyon doların altındadır. Genetik mühendisliğindeki pahalı moleküler araştırmalar için birkaç milyon dolarlık ilave masraf olsa bile, maliyet kimyasal madde üretiminden oldukça azdır (Meeusen and Warren, 1989).

## 3. Çevre ve kullanım açısından avantajlar

Çevre ve insan sağlığı açısından bu bitkiler cezbedici faydalar sunmaktadır. Aktif maddenin doğrudan bitki dokusunda üretilmesinden dolayı, etkili maddenin havaya ve yeraltı suyuna karışması önlenmektedir. Çalışmalarda kullanılan iki dayanıklılık faktörü olan Bt endotoksin ve tripsin inhibitörünün her ikisi de yüksek moleküler ağırlığa (60 ve 30 kd) sahip doğal proteinlerdir. Böylece tamamen toksik olmayan ürünlere parçalanabilirler. Tarlada aktif maddenin belirli dozunu alacak tek organizma, ürün üzerinde beslenen böcek olduğundan diğer organizmalar zehirli etkiden kurtulacaklardır (Meeusen and Warren, 1989).

İlave maddeler zamanla tamamen ayrışacağından insan ve hayvan tüketiminde emniyet sağlamış olacaktır. Kimyasal insektisitlerin kullanımından doğan riskler, pahalı kalıntı analizi ve toksikolojik denemeleri gerektirmektedir. Buna karşılık yeni bir genin bir bitkiye nakledilmesinden önce, yapısal olarak ne getireceği tamamen belirlenebilir. Şayet ortaya sorun çıksa bile bunların daha az sıklıkta oluşması beklenecektir. Bu metodun klasik ıslah yöntemlerinden daha emniyetli olacağı düşünülmektedir. Klasik ıslahta dayanıklılık genlerinin bitkide ürettiği insektisit etkinin ne olduğu bilinmeden kullanılmaktadır. Gen transferi yapılan bitkilerde bu tip bilgi eksikliği yoktur (Meeusen and Warren, 1989).

## Muhtemel dezavantajlar

Bu teknolojinin gelecekte böcek mücadele yöntemlerinin önemli bir parçası haline geleceği yönündeki ikna edici görüşlere rağmen, kullanımını sınırlayabilecek teknik ve hukuki belirsizlikleri de unutmamak gerekir.

### 1. Dayanıklılık

Başarılı bir yöntem olmasına rağmen, hedef alınan böcek popülasyonlarında dayanıklılık meydana getirebileceğine dair endişeler vardır. Bt endotoksin içeren ürünler için, geçmiş deneyimlere göre dayanıklılığın hızlı bir şekilde oluşmayacağı üzerine bazı belirtiler bulunmaktadır. Endotoksine dayalı preparatlar çeyrek yüzyıldan beri önemli bir dayanıklılık oluştuğu bildirilmeksizin kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu sonuçlar bö-



cek popülasyonunun ilaçlarla belirli aralıklarla karşı karşıya geldiği uygulamalardan elde edilmişlerdir (Meeusen and Warren, 1989). Ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis* preparatları  $\delta$ -endotoksin ve  $\beta$ -endotoksin içeren bakteri sporlarının kompleks karışımlarıdır ve uygulamadan sonra nisbeten bir yarı ömüre sahiptir. Bu faktörlerin hiçbirisi zararlılarda dayanıklılık oluşması için uygun değildir. Fakat yoğun seleksiyon altında (örneğin, toksinlerin uygulandığı depolanmış ürünlerde) dayanıklılık çok hızlı oluşabilir (Mc Gaughey, 1985).

Endotoksinin besinde sürekli olarak mevcut olduğu durumlar dayanıklılık açısından bir soru olarak kalmaktadır. Gerçekten bir *B. thuringiensis* preparatına dayanıklılık oluştuğunu bildiren tek sonuç, böyle bir sürekli maruz kalmanın sonunda elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar diğer bir tür için bu sonucu doğrulamıştır. Fakat dayanıklılığın büyük oranda endotoksinin kendine değil, onu içeren bakteriye karşı olduğu ileri sürülmüştür. Bu sebepten dolayı, muhtemelen endotoksin içeren bitkilere dayanıklılık preparatlara olandan daha hızlı gelişmeyecektir. Zararlıların dayanıklılık kazanması bu ürünlerin ömrünü belirleyebilir ve çok kısa bir ömür bu tekniğin kullanımını ciddi bir şekilde engelleyebilir (Meusen and Warren, 1987).

Tek bir genin kontrolünde olan dayanıklılığa sahip bitkilerin geniş çapta kullanımının böceklerde dayanıklılık oluşturup, oluşturmayacağı şüphesinin cevabı aynı bitkiye birkaç dayanıklılık genini nakletmek olabilir (Shields, 1987).

## 2. Hukuki düzenlemeler

Gen transferi ile böceklere dayanıklı bitki elde etme çalışmalarının henüz çok yeni olması ve değişik bir durum ortaya koyması nedeniyle hukuki bazı aşamalardan geçmesini gerektirmektedir. Ayrıca bu aşamaların neler olacağı konusu da henüz açıklığa kavuşmuş değildir.

Dokularında Bt endotoksin üreten bir bitki, kurumlar için hukuki zorluklar meydana getirmektedir. ABD'de Federal pestisit kanunlarındaki tanımlamalara girmesinden dolayı, çevre koruma kuruluşu (EPA)'nın bitkinin bir pestisit olarak tescilini istemesi ihtimal dahilindedir. Bu tescil istenmese dahi, Besin ve İlaç Bakanlığı (FDA) mevcut kanunlara göre besin katkı maddeleri sınıfına dahil edilebilir. Ayrıca, Tarım Örgütü (USDA), Federal zararlı otlar ve bitki zararlıları kanununa göre, tarım için zararlı olma ihtimali bulunan bitkiler üzerindeki düzenleyici gücünü kullanmak isteyecektir. Böylece gen transferi yapılmış bitki bir kuruluş için pestisit, bir diğeri için besin katkı maddesi ve bir üçüncüsü için zararlı bir bitki konumunda olacaktır (Meeusen and Warren, 1989).

Bu tip düzenlemeler geliştirme maliyeti 1 milyon doların altında olan varyeteler için tescil işlemlerinde çok daha fazla masraf gerektirmesi gibi zorlukları meydana çıkarmaktadır. Böyle bir bitki varyetesinin tescili için 7-10 milyon dolar harcama yapmak; bu yöntemin ekonomi, çevre ve üreticiye olan olumlu katkılarına rağmen benimsenmesine engel olabilecektir. Kurumlar kanunları yaparken Bt endotoksinin halen tescilli bir pestisit olmasından dolayı yanlışlığa düşmekten çekineceklerdir. Bu yönde sarfedilen çabalara rağmen henüz birçok belirsizlikler vardır (Meeusen and Warren, 1989).

### 3. Patent hakkı

Bu yöntemin masrafları, kimyasal insektisit geliştirilme masraflarından daha az olmakla birlikte, klasik ıslaktan daha pahalıdır. Bu yüzden bu bitkilerin geleceğini etkileyen son büyük sorun, yatırımcıların buluşlarını koruyabilme ile kârlılık durumudur. Şayet diğer firmalar yeni tohumdan bir miktar alıp, yeni geni melezlemeyle kendi varyetelerine nakletme hakkına sahip olur ve bunun için hiçbir ödemede bulunmazlarsa, hiçbir firma bu yeni teknolojiye yatırım yapmayacaktır (Meeusen and Warren, 1989).

ABD'deki bitki varyetelerini koruma kanunu son zamanlara kadar ıslahçılar için sadece ilmi mülkiyet hakkını sağlamakta, fakat bu kanun diğer ıslahçılara yeni varyeteler geliştirmek için tescilli varyetelerin serbestçe kullanımlarına izin veren bir araştırma muafiyeti de tanımaktadır. Yargı organlarınca 1985'te alınan kararlar, genetik yol ile elde edilen yeni bitkilere patent hakkı verebileceği yolunda ümit verici kararlar almış olmasına rağmen pratikte halen önemli sorunlar vardır. Patent hakkı Bt endotoksin içeren bütün bitkileri kapsayacak mıdır, yoksa her yeni bitki için ayrı patent mi verilecektir? Patent hakkı endotoksin genini elde edene mi, endotoksin içeren bitkiyi geliştirene mi, yoksa her ikisine mi verilecektir? Patent sahibi tohumu kendi tarlasından elde eden yetiştiricileri kontrol edebilecek midir? Eski kanuna göre germplasm'ı ıslah amacıyla serbestçe kullanmaya alışmış ıslahçılar, yeni uygulamaları kabul edecekler midir? Bu ürünleri 1990 ortalarında pazara çıkacağı ve konuyla ilgili davalar ve üst mahkeme kararlarının birkaç yıl alacağı farzedilirse, bütün bu sorunların cevabının bu yüzyılın sonundan önce açıklığa kavuşması beklenmemelidir (Meeusen and Warren, 1989).

### Sonuç

Gen transferi konusudaki çalışmalar gelişerek devam etmektedir. Bu yöntem ile böceklere dayanıklı bitkiler elde edilmiş ve bu bitkilerin tohumlarının yakında piyasaya çıkması beklenmektedir. Bu metodun diğer mücadele metodlarına nisbeten bazı önemli üstünlükleri olmakla birlikte henüz çözülmesi gereken bazı bilimsel, teknik ve kanuni sorunlar çözüm beklemektedir.

### Özet

Bitkisel üretimde zararlılar önemli kayıplara neden olmakta ve bunlara karşı uygulanan geleneksel mücadele yöntemleri arasında özellikle kimyasal mücadelenin ortaya çıkardığı sorunlar araştırmacıları yeni mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine zorlamaktadır. Son yıllarda genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler canlılar arasındaki gen transferini mümkün kılmış ve bu buluş zararlılara dayanıklı bitki elde edilmesinde yeni bir aşama olarak ortaya çıkmıştır.

*Bacillus thuringiensis'* de endotoksini kodlayan gen ile bazı bitkilerde yaralanma sonucu salgılayan proteaz inhibitörlerini kodlayan genlerin bitkilere nakledilmesi yoluyla böceklere karşı dayanıklı bitki elde edilmesinin başarılı örnekleri bulunmaktadır. Bu mukavemet karakterlerini bitkilerin döllerine aktardığı tesbit edilmiştir. Bu metod ile elde edilen dayanıklı bitki tohumlarının birkaç yıla kadar piyasaya çıkması da beklenmektedir.

## Literatür

- Agrios, G.N., 1988. Plant Pathology. Third edition. Academic Press Inc. 803 s.
- Barton, K. A., H. R. Whiteley and N. Yong, 1987. *B. thuringiensis* delta endotoksin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.*, **85** : 1103-9.
- Bowles, D., 1990. Signals in the wounded plant. *Nature*, **343** (25 January 1990) : 314-315.
- Falcon, L. A., 1971. Use of Bacteria for Microbial Control (Microbial Control of Insect and Mites. Ed. H. D. Burges and N. W. Hussey) 67-95.
- Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. C. Perlack, P. G. Marrane and S. M. Mc Gormic, 1987. Insect tolerant transgenic tomato plant. *Biotechnology*, **5** : 807-13.
- Hatzios, K.K., 1989. Biotechnology Application in Weed Management. Now and in the Future. *Advances in Agronomy*, **41** : 325-375.
- Hilder, V. A, A. M. R. Gatehouse, S. E. Sherman, R. F. Barker and D. Boulter, 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, **330**:160-63.
- Logan, S. H., H. O. Carter and L. Lohr, 1987. Agriculturel policy implications of biotechnology. *California Agriculture*, **41** (No. 7-8) : 20-21.
- Mazur, B. J. and S. C. Falco, 1989. The development of Herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40** : 441-470.
- Mc Gaughey, W. H., 1985. Insect resistance to the biological insecticide *B. thuringiensis*. *Science*, **229** : 193-195.
- Meeusen, R. L. and G. Warren, 1989. Insect control with genetically engineered crops. *Ann. Rev. Entomol.*, **34** : 373-81.
- Metcalf, R., 1980. Changing role of insecticides in crop production. *Ann. Rev. Entomol.*, **25** : 219-56.
- Özbek, H., 1987. Genetik mühendisliği ve biyolojik insektisitler. *Türk. entomol. Derg.*, **11** (4) : 247-257.
- Pimentel, D., 1977. The ecological basis of insect pest, patogen and weed problems (Origin of pest, parasite, disease and weed problems, Ed. J. M.Cherrrett and G.R. Sagar) 3-34 p. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Sihelds, R., 1987. Towards insect resistant plants. *Nature*, **328** : 12-13.
- Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. D. Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. V. Montagu and J. Leemans., 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **328** : 33-37.