

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE GÜNCEL UYGULAMALAR VE DEĞERLENDİRMELER

Editörler

Güngör YILMAZ & Tünay KARAN



LIVRE DE LYON

Natural Sciences

2023

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE GÜNCEL UYGULAMALAR VE DEĞERLENDİRMELER

Editörler

Güngör YILMAZ & Tünay KARAN



LIVRE DE LYON

Lyon 2023

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE GÜNCEL UYGULAMALAR VE DEĞERLENDİRMELER

Editörler

Güngör YILMAZ & Tünay KARAN



LIVRE DE LYON

Lyon 2023

Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Uygulamalar ve Değerlendirmeler

Editors • Prof. Dr. Güngör YILMAZ • Orcid: 0000-0003-0070-5484

Assoc. Prof. Dr. Tünay KARAN • Orcid: 0000-0002-9114-8400

Cover Design • Motion Graphics

Book Layout • Motion Graphics

First Published • December 2023, Lyon

ISBN: 978-2-38236-635-6

copyright © 2023 by **Livre de Lyon**

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without prior written permission from the Publisher.

Publisher • Livre de Lyon

Address • 37 rue marietton, 69009, Lyon France

website • <http://www.livredelyon.com>

e-mail • livredelyon@gmail.com



LIVRE DE LYON

ÖNSÖZ

Değerli okurlar;

Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Uygulamalar ve Değerlendirmeler adlı bu kitapta yer alan bölümler alanında uzman değerli akademisyenler tarafından hazırlanmıştır. Bitki biyoteknolojisinin geleceği ve bitki genetik kaynaklarının korunması bölüm olarak ele alınmıştır. Kitapta kenevir bitkisinin in vitro doku kültürü çalışmaları, kenevir ıslahında moleküler teknikler, kannabinoidler ve terapötik etkileri hakkında bilgiler ve uygulamalar verilmekle birlikte transgenik bitki türleri, bitki doku kültürü çalışmaları, sekonder metabolit üretim teknikleri ve metalik nanopartiküllerin yeşil sentezi gibi güncel araştırmalardan da bahsedilmektedir. Ayrıca bitkilerdeki gelişmiş ekstraksiyon teknikleri, bitkisel protein tozu üretimi ve gıdalarda mikroenkapsülasyon çalışmaları mevcuttur. Son olarak da Veteriner Hekimlikte tedavi amaçlı kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler anlatılmıştır.

Kitap, bitki biyoteknolojisinin gıda, tıp, veteriner, ziraat, mühendislik, kimya gibi pek çok alan ve sektörde güncel araştırmalar ve bulgular ışığında harmanlanarak okuyucuya ve araştırmacılara sunulmuştur.

Kitabın oluşturulmasında emeği geçen ve katkı sağlayan tüm yazarlara ve yayın ekibine teşekkür ederiz.

Mesleki saygılarımızla
Prof. Dr. Güngör YILMAZ
Doç. Dr. Tünay KARAN

CONTENTS

ÖNSÖZ	I
BÖLÜM I. BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNİN GELECEĞİ VE BİTKİ GENETİK KAYNAKLARININ KORUNMASI <i>Sevgi DURNA DAŞTAN</i>	1
BÖLÜM II. KENEVİR ISLAHINDA MOLEKÜLER TEKNİKLERİN KULLANIMI <i>Ahmad ALSALEH & Muhsin İbrahim AVCI & Güngör YILMAZ</i>	17
BÖLÜM III. KENEVİR BİTKİSİNDE İN VİTRO DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI <i>Saber DELPASAND KHABBAZI & Güngör YILMAZ</i>	61
BÖLÜM IV. TRANSGENİK BİTKİ TÜRLERİ İÇİN İLGİLİ KARAKTER VE GENLER: İŞARET GENLERİ VE PROMOTÖRLER <i>İnanç BARAL & Taner DAŞTAN</i>	79
BÖLÜM V. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ: BİTKİ GELİŞİMİNİN YÖNLENDİRİLMESİ <i>Dilek ARSLAN ATEŞŞAHİN & Şeyda KAYA</i>	109
BÖLÜM VI. BİTKİLERDE GELİŞMİŞ EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ <i>Ferda ESER</i>	131
BÖLÜM VII. ASMADA BULUNAN SEKONDER METABOLİTLER VE İN VİTRO KOŞULLARDA ÜRETİM TEKNİKLERİ <i>Emine Sema ÇETİN</i>	149

- BÖLÜM VIII.** BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BİTKİ BAZLI
PROTEİN TOZU ÜRETİMİ 169
Fadime SEYREKOĞLU
- BÖLÜM IX.** BİTKİSEL GIDALARDA MİKROENKAPSÜLASYON
UYGULAMALARI 189
Şeyda ÖZTÜRK & Cemalettin BALTACI
- BÖLÜM X.** SALVIA CİNSİ BİTKİ EKSTRATLARI KULLANILARAK
METALİK NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ 211
Ramazan CEYLAN & Tünay KARAN
- BÖLÜM XI.** VETERİNER HEKİMLİKTE TEDAVİDE KULLANILAN
BİTKİLER 231
İmran GARİP

BÖLÜM IV

TRANSGENİK BİTKİ TÜRLERİ İÇİN İLGİLİ KARAKTER VE GENLER: İŞARET GENLERİ VE PROMOTÖRLER

*Associated Traits and Genes for Transgenic Plant Species:
Marker Genes and Promotors*

İNANÇ BARAL^{1*} & TANER DAŞTAN²

^{1}Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü, Genetik, Sivas, Türkiye
E-mail: inancbaral@gmail.com
ORCID: 0000-0001-7272-3724*

*²(Doç. Dr.) Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyokimya Bölümü, Sivas, Türkiye
E-mail: tdastan@cumhuriyet.edu.tr
ORCID: 0000-0003-0296-6979*

Özet

Transgenik bitki araştırmaları, istenen özellikleri kazandırmak için bitki türlerine yeni genlerin eklenmesini mümkün kılarak tarım alanında devrim yapmıştır. Bu bölümde transgenik bitki araştırmalarının temel yönlerine genel bir bakış sunulmuş ve özellikle promotor ve işaretçi genlerin kullanımına odaklanılmıştır. Promotorlar, gen ifadesini düzenlemede kritik bir rol oynar ve bitkilerin dokuya özgü ifadesi, uyarılabilir gen düzenlemesi ve transgenik bitkilerde artan stres toleransı sağlamak için farklı tipte promotorlar, örneğin floem özgül promotorlar, stres uyarılabilir promotorlar ve RuBisCo küçük alt birim promotorları gibi birçok tür kullanılmıştır. Neomisin fosfotransferaz II (nptII), yeşil floresan protein (GFP) ve β -glukuronidaz (GUS) gibi işaretçi genler, transgenik bitkilerin tanımlanması, seçilmesi ve karakterize edilmesinde

önemli rol oynamıştır. Bu işaretçi genler, gen ifadesi desenlerinin, dokuya özgü ifadesinin ve hücrel lokalizasyonun izlenmesini kolaylaştırmıştır. Ayrıca, çevresel riskleri azaltma ve düzenleyici onayı kolaylaştırma konularıyla ilgili endişeleri ele almak için seçilebilir işaretçi genlerin varlığı ile ilgili alternatifler olarak, işaretçisiz stratejiler ortaya çıkmıştır. Cre/lox veya FLP/FRT gibi site özgü rekombinasyon sistemlerini kullanarak, işaretçisiz transgenik bitkiler oluşturulabilir, çevresel riskleri azaltabilir ve düzenleyici onayı kolaylaştırabilir. Promotor ve işaretçi genlerin birleşimi, transgenik bitki araştırmalarını önemli ölçüde ilerletmiştir, böylece artan stres toleransı, daha iyi böcek direnci ve artmış verim gibi iyileştirilmiş özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş ürünlerin geliştirilmesini mümkün kılmıştır.

Anahtar Kelimeler: gen, işaretleyici, karakter, promotör, transgenik bitki

Abstract

Transgenic plant research has revolutionized the field of agriculture by enabling the introduction of novel genes into plant species to confer desired traits. This chapter provides an overview of the key aspects of transgenic plant research, focusing on the use of promoter and marker genes. Promoters play a crucial role in regulating gene expression, and various types of promoters, such as phloem-specific promoters, stress-inducible promoters, and RuBisCo small subunit promoters, have been employed to achieve tissue-specific expression, inducible gene regulation, and enhanced stress tolerance in transgenic plants. Marker genes, including neomycin phosphotransferase II (nptII), green fluorescent protein (GFP), and β -glucuronidase (GUS), have been instrumental in the identification, selection, and characterization of transgenic plants. These marker genes have facilitated the monitoring of gene expression patterns, tissue-specific expression, and subcellular localization. Additionally, marker-free strategies have emerged as alternatives to address concerns related to the presence of selectable marker genes in transgenic plants. By utilizing site-specific recombination systems, such as Cre/lox or FLP/FRT, marker-free transgenic plants can be generated, reducing potential environmental risks and facilitating regulatory approval. The combination of promoter and marker genes has significantly advanced transgenic plant research, enabling the development of genetically modified crops with improved traits, such as enhanced stress tolerance, improved insect resistance, and increased productivity.

Keywords: gene; marker; promoter; trait; transgenic plant

1. Giriş

Transgenik bitki türleri, diğer organizmalardan gelen yabancı genlerin tanıtılması yoluyla genetik olarak değiştirilmiş bitkilerdir. Bu genetik değişiklik, genetik mühendislik gibi tekniklerle elde edilir, burada belirli genler bitkinin genomuna istenen özellikleri veya karakteristikleri sağlamak amacıyla eklenir. Bu yabancı genler, diğer bitki türlerinden, bakterilerden ve hatta hayvanlardan gelmiş olabilir (Snow vd., 2003).

Transgenik bitkilerin geliştirilmesi, tarımı devrimleştirmiş ve gıda üretimi ile ekin iyileştirmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. Transgenik bitki türlerinin önemli olmasının başlıca nedenlerinden biri, ekin verimliliğini ve verimini artırma yetenekleridir. Genetik değişiklikler sayesinde bitkiler, zararlılara, hastalıklara ve herbisitlere karşı dirençli olacak şekilde tasarlanabilir, bu da kimyasal girdilere duyulan ihtiyacı azaltır ve ekilen ürünlerin verimini artırır (Low vd., 2018). Örneğin, *Bacillus thuringiensis* (Bt) bakterisinden gelen genlerin bitkilere tanıtılması, böcek zararlılarına karşı dirençli ürünlerin elde edilmesine neden olmuş ve bu da kimyasal böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltmıştır (Crickmore, 2006).

Transgenik bitkiler aynı zamanda ekili ürünlerin besin içeriğini artırma potansiyeline sahiptir. Bitkilere vitamin, mineral veya esansiyel amino asit seviyelerini artırarak besin değerlerini artırmak için genler tanıtılabilir (Low vd., 2018). Bu da, belirli nüfuslardaki beslenme eksikliklerini ele alma potansiyeline sahiptir ve bu tarım ürünlerine dayalı olarak geçimlerini sağlayan bireylerin genel sağlığı ve refahını iyileştirebilir.

Tarım verimliliğini ve besin içeriğini artırmanın yanı sıra, transgenik bitki türleri çevresel sürdürülebilirliğe de katkı sağlayabilir. Bitkileri herbislere karşı dirençli hale getirerek, çiftçiler daha sürdürülebilir yabancı ot kontrol uygulamalarını benimseyebilirler, bu da toprağı korumaya ve erozyonu azaltmaya yardımcı olur (Inui ve Ohkawa, 2005). Ayrıca, transgenik bitkiler kuraklığa daha dayanıklı veya azot kullanım verimliliği artırılmış şekilde tasarlanabilir, bu da suyun korunmasına ve sentetik gübre ihtiyacının azaltılmasına yardımcı olabilir (Low vd., 2018).

Ancak, transgenik bitki türleri ile ilişkilendirilen potansiyel riskler ve zorlukları göz önünde bulundurmak önemlidir. Bir endişe, transgenik bitkilerden yabancı akraba bitki formlarına gen akışının olasılığıdır; bu, transgenlerin yayılmasına ve istenmeyen ekolojik etkilere yol açma potansiyeline neden olabilir (Saji vd., 2005). Diğer bir endişe ise zararlıların veya yabancı otların

transgenik bitkilere tanıtılan özelliklere karşı direnç geliştirmesi potansiyelidir (Teulon ve Losey, 2002). Ayrıca, transgenik bitki türlerinin kullanımıyla ilgili toplumsal ve etik düşünce unsurları bulunmaktadır, bunlar arasında halk algısı, tüketici kabulü ve geleneksel tarım uygulamalarına potansiyel etki bulunmaktadır (Heuvel vd., 2007; Nathalie vd., 2015).

Genel haliyle transgenik bitki türleri, belirli özelliklere veya karakteristiklere sahip olacak şekilde tasarlanmış genetik olarak değiştirilmiş bitkilere sahiptir. Bu bitkiler, tarım ürünlerinin verimliliğini artırma, besin içeriğini iyileştirme ve çevresel sürdürülebilirliğe katkıda bulunma potansiyeline sahiptir oldukları için önemlidir. Bununla birlikte, transgenik bitki türlerinin kullanımıyla ilişkilendirilen potansiyel riskler ve zorlukları dikkatlice düşünmek, güvenli ve sorumlu bir şekilde kullanımlarını sağlamak için önem taşımaktadır.

Tarım bilimlerindeki en önemli transgenik bitki uygulamalarından biri, "Bacillus thuringiensis" (Bt) bakterisinden böcek öldürücü proteinler üretmek üzere genetik olarak değiştirilmiş Bt ürünleridir (Tabashnik vd., 2013). Bu proteinler belirli böcek zararlılarına karşı toksiktir ve transgenik bitkilere yerleşik böcek direnci sağlar. Bt ürünleri geniş bir şekilde benimsenmiş ve böcek zararlılarına karşı azaltıcı etki ve kimyasal böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltma konusunda önemli bir etki yapmıştır (Tabashnik vd., 2013). Özellikle pamuk güvesi kurdu ve Batı Mısır kök kurdu gibi zararlılarla mücadelede etkili olmuşlardır (Baum vd., 2007). Bt ürünlerinin kullanımı, sadece bitki verimini artırmakla kalmamış, aynı zamanda böcek ilaçlarının çevresel etkisini azaltmıştır (Tabashnik vd., 2013).

Başka bir önemli transgenik bitki uygulaması ise, belirli herbisitlere dayanıklı olacak şekilde genetik olarak değiştirilmiş herbisitlere dayanıklı ürünlerdir (Ahmad vd., 2012). Bu özellik, çiftçilerin ekilen bitkilerine zarar vermeden herbisit uygulayarak yabancı otları daha etkili bir şekilde kontrol etme olanağı sağlar. Glyphosate dirençli ürünler, transgenik pamuk ve tütün gibi ürünler, geniş bir şekilde benimsenmiş olup, yabancı ot yönetim uygulamalarını devrim niteliğinde değiştirmiştir (Liu ve Cao, 2018). Bu ürünler, çiftçilere daha sürdürülebilir yabancı ot kontrol yöntemlerini benimsemelerini sağlamış, bu da toprağı korumaya ve erozyonu azaltmaya yardımcı olmuştur.

Besin içeriği artırılmış transgenik bitkiler de dikkate değerdir. Genetik değişiklikler yoluyla transgenik bitki türlerinde vitamin, mineral ve esansiyel amino asit seviyelerini artırmak için çaba sarf edilmektedir. Bu, belirli nüfuslardaki besin eksikliklerini ele almaya ve bu ürünlere dayalı olarak geçimini sürdüren bireylerin genel sağlık ve refahını iyileştirmeye potansiyel

taşıır. Ayrıca, kuraklığa daha dayanıklı veya azot kullanım verimliliği artırılmış transgenik bitkilere sahip olma potansiyeli, doğal su kaynaklarının korunmasına katkıda bulunma ve sentetik gübre ihtiyacını azaltma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, süs bitkileri yetiştiriciliği yönünden çiçek morfolojisi veya koku değişiklikleri gösteren transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Bu bitkiler benzersiz ve görsel olarak çarpıcı özellikler sergileyebilirler, bu nedenle bahçıvanlar ve süs bitkisi- bahçe bitkisi meraklıları arasında popülerdirler (Wang vd., 2011).

Sonuç olarak, transgenik bitki türleri tarım bilimlerine önemli katkılarda bulunmuştur. Bt ürünleri, herbisite dayanıklı ürünler, besin değeri artırılmış ürünler ve süs transgenik bitkiler bu alandaki en dikkat çeken örnekler arasındadır. Bu bitkiler, zararlılara karşı direnç, yabancı ot yönetimi, besin içeriği ve estetik çekicilik konularında iyileştirmeler sağlamışlardır. Ancak, kullanımlarıyla ilişkilendirilen potansiyel riskleri ve zorlukları düşünmek, güvenli ve sorumlu kullanımlarını sağlamak açısından önemlidir.

Bu kitap bölümünde kavramsal olarak genel bakışı sunulmuş olan ve tarım bilimleri için son derece kritik bir konu olan transgenik bitki türleriyle ilişkilendirilen genlere ve genetik karakterlere değinilecek ve özellikle bu bitki türleri için önemli olan işaret (markör) genler ve promotörler anlatılacaktır.

2. Transgenik Bitki Türleri İçin Genler ve Genetik Karakterler

2.1. Genel Bakış

Transgenik bitki türleri, gelişimleri ve istenen özelliklerinin elde edilmesi için önemli olan çeşitli genler ve özelliklerle ilişkilidir. Bu genler ve özellikler, transgenik bitkilere belirli özellikler kazandırmak, verimliliklerini artırmak ve zararlılara, hastalıklara ve çevresel streslere karşı dayanıklılıklarını artırmak konusunda kritik bir rol oynamaktadır.

Transgenik bitki türlerinde yaygın olarak kullanılan önemli bir gen, *Bacillus thuringiensis* (Bt) genidir. Bu gen, belirli böcek zararlıları için toksik olan böcek öldürücü proteinleri kodlar. Bitkilere tanıtıldığında, Bt geni yerleşik böcek direnci sağlar ve kimyasal böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltır (Lloyd vd., 2005). Bu gen, pamuk ve mısır gibi çeşitli ekinlere başarılı bir şekilde entegre edilmiştir ve onları yıkıcı böcek zararlarından korumak için kullanılmıştır.

Transgenik bitki türleri ile ilişkilendirilen diğer önemli bir özellik, herbisit direncidir. Bu özellik, belirli herbisitlere tolerans kazandıran genlerin tanıtılmasıyla elde edilir. Herbisite dayanıklı ürünler, çiftçilere herbisit uygulamalarını yaparken ekim yaptıkları bitkilerine zarar vermeden yabancı

otları daha etkili bir şekilde kontrol etme olanağı sağlar. Örneğin, glifosat'a dayanıklı ürünler, geniş bir şekilde benimsenmiş ve yabancı ot yönetim uygulamalarını devrim niteliğinde değiştirmiştir.

Metabolik yollarla ilgili genler, transgenik bitki türlerinde de önemlidir. Bu genler, ekilen bitkilerin besin içeriğini artırmak için tanıtılabilir, örneğin vitaminlerin, minerallerin veya esansiyel amino asitlerin seviyelerini artırarak daha üstün ürünler elde edilebilir (Krichevsky vd., 2012). Ayrıca, stres toleransı ile ilgili genler, kuraklık toleransı veya tuz toleransı gibi, transgenik bitki türlerinde büyük öneme sahiptir. Bu genler bitkilere zorlu çevresel koşullara dayanma yeteneği kazandırır ve genel verimliliklerini artırır (Zameer vd., 2022).

Gen düzenleme teknolojileri, CRISPR-Cas9 gibi, transgenik bitki araştırmalarında giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu teknolojiler, belirli genlerin hassas değişikliklerini yapma imkanı sağlar, istenen özelliklere sahip transgenik bitkilerin geliştirilmesine olanak tanır (Yang vd., 2023). Gen düzenleme, hastalık direnci, artırılmış verim veya geliştirilmiş besin içeriği gibi özelliklerle ilişkilendirilen belirli genleri tanıtmak veya değiştirmek için kullanılabilir (Yu vd., 2021).

Bazı durumlarda, transgenik bitkilerdeki transgenlerin varlığı istenmeyebilir. Bu nedenle, transgen içermeyen bitkilerin geliştirilmesi, transgenik bitki araştırmalarında önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Transgenik bitkilerden transgenleri ortadan kaldırmak veya ayırmak için çeşitli stratejiler kullanılmıştır, bunlar arasında seçilebilir işaretçilerin, gen çıkarma sistemlerinin ve genom düzenleme teknolojilerinin kullanılması bulunur (Yang vd., 2023; Du vd., 2019; He ve Zhao, 2019). Transgen içermeyen bitkilerin geliştirilmesi, istenen özelliklerin korunmasını sağlarken, transgenlerin varlığıyla ilişkilendirilen potansiyel endişeleri en aza indirir. Transgenleri bitkilere tanıtmamanın, hedeflenmeyen etkileri ve ekosistemlerde etkilere neden olabileceğini unutmamak önemlidir. Bu nedenle, transgenik bitki türlerinin potansiyel ekolojik etkilerini dikkatlice değerlendirmek ve olası riskleri en aza indirmek için stratejileri düşünmek önemlidir (Powell vd., 2007; Cheryatova ve Yembaturova, 2022).

2.2. Transgenik Bitki Türleri İçin Önemli Hedef Genler Ve Gen Grupları

Transgenik bitki türleri ile ilişkilendirilen genler ve özellikler, genetik değişikliğin belirli istenen özellikler ve hedeflerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Temel kategoriler halinde mevcut literatür bilgileri takip eden maddeler üzerinde durmaktadır.

1. Bt Genleri: *Bacillus thuringiensis* (Bt) genlerinin bitkilere tanıtılması, belirli böcek zararlılarına karşı direnç sağlar. Bu genler, zararlılara toksik olan böcek öldürücü proteinler üretir ve böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltır (Snow vd., 2003). Transgenik bitkilerdeki Cry1Ac (Zhu vd., 2012; Boddupally vd., 2018; Zhao vd., 2021), Cry2Ab (Teulon ve Losey, 2002; Zhu vd., 2003; Rabha vd., 2017) ve Cry1Ab (Stewart vd., 1997; Jones, 1999; Douches vd., 2001) gibi Bt genleri, belirli böcek zararlılarına (güve kurtları ve kök kurtları gibi) karşı direnç sağlamak amacıyla incelenmiştir. Çalışmalar, bu genlerin başarılı bir şekilde ifade edildiğini ve çeşitli ekinlerde zararlılara karşı direncin artırılmasında etkili olduklarını göstermektedir.

2. Herbisit Direnç Genleri: Transgenik bitkiler, belirli herbislere direnç sağlayan genlerle tasarlanabilir. Bu genler, bitkilerin herbisitlere dayanıklı olmasına olanak tanır, böylece ekin bitkilerine zarar vermeden daha etkili yabancı ot kontrolü sağlar (Shih vd., 2016). En yaygın kullanılan glifosat direnç geni, glifosattan etkilenmeyen bir enzimi kodlayan EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate sentaz) genidir (Owen ve Zelaya, 2005). Bu gen, transgenik bitkilerin glifosatinin inhibe edici etkilerini atlayarak esansiyel amino asitler üretmeye devam etmelerine olanak tanır. En yaygın kullanılan glufosinat direnç geni ise, glufosinatı detoksifiye eden bir enzimi kodlayan bar (phosphinothricin acetyltransferase) genidir (Inui ve Ohkawa, 2005). Bu gen, transgenik bitkilerin glufosinat uygulamasını hayatta kalabilecekleri şekilde yapmalarına olanak tanır. ALS inhibitör direncine sahip transgenik bitkiler, herbisite daha az duyarlı olan mutasyona uğramış ALS genlerinin tanıtılmasıyla geliştirilmiştir (Kawai vd., 2007a,b). Bu genler, transgenik bitkilerin ALS inhibitörlerinin varlığında bile normal amino asit sentezini sürdürmelerine olanak tanır. Bu herbisit direnç genleri, soya fasulyesi, mısır, pamuk ve kanola gibi çeşitli ekinlere başarılı bir şekilde entegre edilmiştir ve etkili yabancı ot kontrol seçenekleri sunmuştur. Ancak, herbisit direnç genlerinin transgenik bitkilerde kullanılması, herbisit dirençli yabancı otların olasılıkla gelişme endişelerine yol açmıştır. Tek bir etki mekanizmasıyla herbisitlerin sürekli kullanılması, yabancı ot popülasyonları üzerinde seçim baskısı oluşturarak herbisit dirençli yabancı otların evrimine yol açabilir (Owen ve Zelaya, 2005).

3. Metabolik Yol Genleri: Metabolik yollarla ilişkilendirilen genler, ekilen bitkilerin besin içeriğini artırmak için tanıtılabilir. Örneğin, vitaminlerin, minerallerin veya esansiyel amino asitlerin sentezine katılan genler, transgenik bitkilerde bu bileşenlerin seviyelerini artırmak için tanıtılabilir (Krichevsky vd., 2012). Çok sayıda ve karmaşık ilişkiler kuran genleri içeren bu kategoride hedefler

genel olarak son ürüne dayalı olarak belirlenmiştir. Bu açıdan bu kategorideki genler genel olarak azot metabolizmasıyla ilgili genler (Yanagisawa vd., 2004), vitamin sentezinde görevli genler (Naqvi vd., 2009), terpenoid sentez genleri (Lange vd., 2011), flavanoid sentez genleri (Qin vd., 2017) ve karotenoid sentez genleri (Zhu vd., 2008) olarak literatürde yer bulmuştur.

4. Stres Tolerans Genleri: Kuraklık, tuzluluk veya aşırı sıcaklık gibi çevresel streslere karşı dayanıklılık sağlayan genler, zorlu koşullarda başarılı olabilen transgenik bitkilerin geliştirilmesi için önemlidir. Bu genler, bitkilerin strese dayanabilme ve ondan kurtulabilme yeteneklerini artırabilir (Pruthvi vd., 2014; Jackson vd., 2004). Önemli çevresel şartlar dikkate alınarak bu yöndeki genler hedef çevre şartına bağlı olarak gruplandırılmaktadır ve bunlar kuraklığa dayanıklılık genleri (Bhatnagar-Mathur vd., 2007), tuz tolerans genleri (Gaxiola vd., 2001), oksidatif strese dayanıklılık genleri (Kim vd., 2011), sıcaklık tolerans genleri (Lu vd., 2013) ve soğukluk tolerans genleri (Yun ve Kwon, 2008) olarak ifade edilebilir. Yine, bu grupta yer alan genlerin büyük çoğunluğu aynı zamanda transkripsiyon faktörleri olarak görülmektedir.

5. Çiçeklenme Genleri: Çiçeklenme yollarında rol oynayan genler, transgenik bitkilerde çiçeklenme zamanını ve süresini kontrol etmek için manipüle edilebilir. Bu, daha iyi tozlaşma için çiçeklenmeyi senkronize etmek veya süs amaçları için çiçeklenme süresini uzatmak için kullanışlı olabilir (Matsuda vd., 2009). Bu gruptaki genler genellikle karmaşık ilişkiler kuran genlerden oluşmaktadır ve çok farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Genel olarak özetlenecek olursa elma ve armut bitkilerinde Arabidopsis FT geninin aşırı ifadesinin erken çiçeklenmeye neden olduğu (Tanaka vd., 2014; Matsuda vd., 2009), SEP3 ve LMADS3 gibi MADS-box transkripsiyon faktörlerinin ifadesinde değişiklik gösteren transgenik bitkilerin, erken çiçeklenme fenotipleri sergilediği (Tzeng vd., 2003; Gao vd., 2021), narenciye bitkilerinde CiFT geninin ve tütün bitkilerinde FBP21 geninin tanıtılmasının erken çiçeklenmeyi teşvik ettiği (Soares vd., 2020; Ma vd., 2010), flavonoid biosentezine katılan F3'5'H, F3'H ve DFR gibi genlerin ifadesinin azaltılması veya aşırı ifadesi ile çiçek renginde değişikliklere neden olduğu (Tanaka vd., 2009; Tanaka vd., 2010), çiçek gelişimi ile ilişkili genlerin, SOC1, AGL6 ve AGL24 gibi, manipülasyonunun çiçeklenme zamanında ve çiçek morfolojisinde değişikliklere neden olduğu (Fan vd., 2007; Giovannini vd., 1999), RoTFL1c ve CO gibi belirli genlerin ektopik ifadesinin çiçeklenme zamanını ve bitki büyümesini etkilediği (Wang vd., 2018; Hyun vd., 2016), OsRAA1 ve AINTEGUMENTA gibi belirli genlerin tanıtılmasının, çiçeklenme zamanını ve bitki büyümesini etkilediği (Wang vd., 2009; Kuluev vd., 2012) çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

6. Aktin ile İlişkilendirilen Protein Genleri: Aktin ile ilişkilendirilen proteinleri kodlayan genler, pamuk gibi kültür bitkilerinde lif gelişimi sırasında hücre uzunluğu ve ikincil hücre duvarı oluşumunda kritik bir rol oynar. Bu genlerin manipülasyonu, lif özelliklerini etkileyebilir ve ürün kalitesini artırabilir (Wang vd., 2008). Birçok çalışma, transgenik bitkilerde aktin ile ilişkilendirilen protein genlerinin manipülasyonunun etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmaların neticesinde (1) Aktin bağlama alanı 2 (ABD2) ifadesinin, yeşil floresan protein (GFP) ile birleştirilmesi, Arabidopsis köklerinde F-aktin'in canlı görüntülenmesine olanak tanımıştır (Lanza vd., 2012; Wang vd., 2007), (2) Aktin ile ilişkilendirilen proteinler, kök teli büyümesi, pamukta lif gelişimi ve polen tüpü büyümesi ile ilişkilendirilmiştir (Li vd., 2018; Wang vd., 2008; Vaškebová vd., 2017), (3) Aktin izoformları ve aktin bağlama proteinlerinin bitki gelişiminde farklı ifade desenlerine ve işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Kandasamy vd., 2002; Zhong vd., 1996), (4) Aktin ile ilişkilendirilen proteinler, oksidatif stres toleransı, patojenlere karşı savunma tepkileri ve hücre genişlemesinin düzenlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Cao vd., 2022; Barrero vd., 2003), (5) Aktin sitoskeleton organizasyonu ve dinamikleri, kloroplast hareketleri, simbiyotik etkileşimler ve kök nodülasyonu için kritik olduğu bulunmuştur (Wang vd., 2011; Zhang vd., 2018), (6) Aktin ile ilişkilendirilen proteinlerin çiçek gelişimini ve polen verimliliğini etkilediği gösterilmiştir (Kandasamy vd., 2007; An vd., 1996).

7. Seçilebilir İşaretçi Genler: Seçilebilir işaretçi genler, transgenik bitki yapısına genellikle dahil edilir ve dönüşmüş hücrelerin tanımlanmasını ve seçilmesini kolaylaştırmak için kullanılır. Bu genler, belirli antibiyotiklere veya herbisitlere direnç sağlar ve araştırmacılara transgenik bitkileri seçici olarak yetiştirip çoğaltma imkanı sunar (Sato vd., 2013; Milner vd., 2014). Seçilebilir işaretçi genler, transgenik bitki araştırmalarında hayati öneme sahiptir çünkü başarılı bir şekilde dönüştürülmüş hücrelerin tanımlanmasına ve seçilmesine olanak tanır. Bu genler genellikle belirli antibiyotiklere veya herbislere karşı direnç sağlarlar, böylece dönüştürülmüş hücrelerin büyümesine ve hayatta kalmasına izin verirken, dönüştürülmemiş hücrelerin büyümesini engellerler. Seçilebilir işaretçi genlerin kullanımı, istenen özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş bitki ırklarının verimli bir şekilde üretilmesini sağlayarak transgenik bitkilerin geliştirilmesini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Bununla birlikte, seçilebilir işaretçi genlerin kullanımı, çevre ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri nedeniyle endişelere yol açmıştır. Bu endişeleri ele almak için, seçilebilir işaretçi genlerin transgenik bitkilerde kullanımına gerek olmadan yapılabilen işaretsiz dönüşüm yöntemleri gibi alternatif stratejiler geliştirilmiştir.

Bu yaklaşımlar, seçilebilir işaretçi genlerin varlığıyla ilişkilendirilen potansiyel riskler olmadan işaretersiz transgenik bitkilerin üretilmesini amaçlar (Sato vd., 2013; Milner vd., 2014).

8. Transkripsiyon Faktör Genleri: Transkripsiyon faktörleri, çok sayıda genin ifadesini kontrol eden düzenleyici proteinlerdir. Belirli transkripsiyon faktörü genlerinin tanıtılması, hedef genlerin ifadesini değiştirebilir ve stres toleransı veya artırılmış verim gibi istenen özellikleri sağlayabilir (Pruthvi vd., 2014). Transgenik bitkilerin transkripsiyon faktörlerinin ifadesi veya aktivitesi üzerinde değişiklikler yapılabilir ve bu değişiklikler gen düzenleyici ağlarını incelemek ve bitki özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılabilir. Örneğin, DREB/CBF (dehidrasyon yanıt ögesi bağlanma/C-repeat bağlanma faktörü) gibi stres yanıtı veren transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesinin, transgenik ekinlerde abiyotik stres toleransını artırdığı gösterilmiştir (Sarkar vd., 2014; Morran vd., 2011). Benzer şekilde, çiçeklenmeye dahil olan transkripsiyon faktörlerinin, örneğin FT (Çiçeklenme Lokusu T), aşırı ifadesi, transgenik bitkilerde çiçeklenme zamanını manipüle etmek için kullanılmıştır (Aoyama ve Chua, 1997; Suzuki vd., 2005). Transkripsiyon faktörü genleri aynı zamanda transgenik bitkilerde gen düzenlemesi için araçlar olarak kullanılabilir. Örneğin, bir organizmadan DNA bağlama alanlarını diğer bir organizmadan transkripsiyonel aktivasyon alanlarıyla birleştirerek oluşturulan kimerik transkripsiyon faktörleri, hedef genlerin ifadesini düzenli bir şekilde kontrol etmek için kullanılabilir. Örneğin, indüklenebilir promotörlerle kimerik transkripsiyon faktörlerinin kullanımı, transgenik bitkilerde gen ifadesinin hassas bir şekilde kontrol edilmesine olanak tanımıştır (Moore vd., 1998). Ayrıca, transkripsiyon faktörü genleri, transgenik bitkilerin seçiminde kullanılan işaretleyici genlerin geliştirilmesinde de kullanılmıştır. Örneğin, belirli antibiyotiklere veya herbislere direnç sağlayan transkripsiyon faktörlerinin seçilebilir işaret olarak kullanılması, dönüştürülmüş hücrelerin tanımlanmasını ve seçilmesini kolaylaştırmıştır (Kawai vd., 2007a,b; Sloan vd., 1993).

Transgenik bitkilerde virüs aracılı gen susturma (VIGS) genleri kullanılarak hedef mRNA yıkımlaması ile bitki hücre ve doku fonksiyonlarının incelenmesi ile hem yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlanmış, hem de bitkilerdeki hücresel savunma mekanizmalarının anlaşılması mümkün olmuştur (Ratcliff vd., 1997; Ruíz vd., 1998). Bu öncü çalışmalar neticesinde çeşitli fenotiplerin virüs aracılı gen susturmayla elde edilebildiği çalışmalar şekillenmiştir (Bai vd., 2015). Metallothionein (MT) genleri de transgenik bitki

araştırmalarında üzerinde önemle durulmuş hedefler olmuştur ve farklı çevresel şartlara dayanıklılık (Jin vd., 2017), herbisitlere karşı dayanıklılığın geliştirilmesi (Inui ve Ohkawa, 2005) ve metabolit üretiminin yönlendirilmesi (Mihálik vd., 2020) konuları öne çıkmıştır. Süs bitkileri yönünden de estetik karakterlerin yönlendirilmesi için Rol genleri yaygın olarak incelenmiştir (Giovannini vd., 1999). Üretilen transgenik bitkilerin doğal çevre şartlarındaki ekolojik etkileri de önemli bir çalışma alanı olarak öne çıkmaktadır (Brunet ve Stewart, 2010).

3. Transgenik Bitki Araştırmalarında Promotör ve İşaretçi Genler

3.1. Transgenik Bitki Türlerinde Promotör Bölge Ve Genler

Promotorlar, gen ifadesini düzenlemede kritik bir rol oynar ve transgenik bitki araştırmalarının vazgeçilmez bileşenlerindedir. Bir genin bitkide ne zaman ve nerede ifade edileceğini belirlerler, bu da onları transgenik bitkilerde istenen özelliklere ulaşmak için önemli araçlar haline getirir. Burada, transgenik bitki türlerinde kullanılan ve önem arz eden promotorlar gözden geçirilerek ve genel bakış sunulacaktır.

Özsuyu özgül promotor, özellikle özsuyu dokusunda böcek öldürücü proteinlerin ifade edilmesi amacıyla transgenik pirinç bitkilerinde kullanılmıştır (Rao vd., 1998). Bu promotor, özsuyu emen böceklere karşı direnç kazandırmak için oldukça kullanışlıdır, çünkü bu böceklerin beslendiği yer özsuyu dokusudur ve böcek öldürücü proteinlerin burada hedeflenmiş bir şekilde ifade edilmesine izin verir. Rao ve diğerleri (1998) tarafından yapılan bir çalışma, pirinç kahverengi yaprak tırtılına karşı direnç kazandırmada özsuyu özgül bir promotorun etkililiğini göstermiştir. Özsuyu özgül bir promotor kullanarak, araştırmacılar, transgenik pirinç bitkilerinin özsuyu dokusunda böcek öldürücü bir protein ifade etmeyi başardılar ve bu, özsuyu emen böceklere karşı direnç sağlamıştır (Rao vd., 1998). Pirinç Tungro bacilliform virüsü (RTBV) kaynaklı özsuyu özgül promotor de yaygın bir şekilde incelenmiştir. Yin ve diğerleri (1997), bu promotorun, transgenik pirinç bitkilerinde güçlü özsuyu özgül bir raporcu gen ifadesini sürdürdüğünü bulmuşlardır. Bu promotorun özsuyu hücrelerine özgü olması, özsuyu gelişimini ve işlevini incelemek için değerli bir araç haline getirir. Ayrıca, özsuyu özgül promotor diğer bitki türlerinde de kullanılmıştır. Zhao ve diğerleri (2004), farklı bitki türlerinde transgen ifadesini sürdürmek için heterolog özsuyu özgül bir promotoru başarıyla kullanmışlardır. Bu promotor, Arabidopsis SUC2 geninden elde edilmiş olup hem homolog hem de heterolog bağlamlarda özsuyu özgül ifadeyi yönlendirmiştir. Özsuyu

özgül promotorların böceklere karşı bitki savunmasındaki önemi, Mondal ve diğerleri (2017) tarafından daha da vurgulanmıştır. Araştırmacılar, Arabidopsis Aktin-Depolimerize Edici Faktör3 (ADF3) genini ifade ederek özsuyu özgül SUC2 promotorunun yaprakbiti saldırısına karşı hassasiyeti düzeltebileceğini göstermişlerdir.

RuBisCO küçük alt birim promotoru, transgenleri veya seçilebilir işaretçileri ifade etmek için çeşitli bitki türlerinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bakhsh ve Husnain, 2012). Ayrıca, aktin, übikitin ve tubulin genlerinden türetilen promotorlar, transgenik bitkilerde gen ifadesinde esneklik ve çok yönlülük sağlamıştır. RuBisCo küçük alt birim promotoru, gen ifadesini çeşitli bitki türlerinde yönlendirmek için transgenik bitki araştırmalarında sıklıkla tercih edilmiştir. RuBisCo (ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oxygenaz) fotosentezde yer alan önemli bir enzimdir ve RuBisCo'nun küçük alt birimi, enzim montajı ve işlevi için temel bir rol oynamaktadır. Whitney ve diğerleri (2001) tarafından yapılan bir çalışma (Whitney vd., 2001), plastomik RuBisCo küçük alt birim genlerinin kontrolü altında tütün kloroplastlarında RuBisCo'nun küçük alt birimlerinin başarılı bir şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Küçük alt birimler, hegzadamerik RuBisCo kompleksine katlanabilmiş ve monte edilebilmiş, bu da RuBisCo küçük alt birim promotorunun uygun protein montajını yönlendirmedeki işlevselliğini vurgulamıştır. Başka bir çalışmada, Fukayama ve diğerleri (2018), transgenik pirinçte RuBisCo aktivaz (Rca) ifade seviyesini ve RuBisCo içeriği ile ilişkisini incelemişlerdir (Fukayama vd., 2018). Rca'yı aşırı ifade eden transgenik bitkilerde RuBisCo küçük alt biriminin transkript seviyelerinin arttığını bulmuşlar, bu da RuBisCo küçük alt birim promotorunun RuBisCo ifadesini düzenlemedeki potansiyel rolünü göstermektedir. RuBisCo küçük alt birim promotoru, stres yanıtları bağlamında da incelenmiştir. Xu ve diğerleri (2010), ısı stresi altında çok yıllık bir çim türünde hem RuBisCo büyük hem de küçük alt birimlerin ifade seviyelerinin azaldığını gözlemlemişlerdir (Xu vd., 2010). Bu bulgu, RuBisCo küçük alt birim promotorunun çevresel streslere yanıt olarak RuBisCo ifadesini düzenlemede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, RuBisCo küçük alt birim promotoru, fotosentezi artırmak amacıyla genetik mühendislik yaklaşımlarında da kullanılmıştır. Chen ve diğerleri (2022), tütün bitkilerinde, H. neapolitanus'tan gelen genlerle yerel olarak RuBisCo büyük alt birimini kodlayan geni genetik olarak değiştirmişler ve tütün bitkilerinde hızlı ve etkin bir RuBisCo enzimi üretmişlerdir (Chen vd., 2022). Bu yaklaşım, RuBisCo aktivitesini artırarak fotosentetik verimliliği artırmayı hedeflemiştir. Fotosentezdeki rolünün yanı sıra, RuBisCo küçük alt birim promotoru, gen ifadesi düzenlemesi bağlamında da incelenmiştir.

Suganami ve diğerleri (Suganami vd., 2020), pirinç bitkilerinde RuBisCo küçük alt birim geni ile RuBisCo aktivaz (RCA) arasındaki gen ifadesinin zirve zamanlamasındaki farklılıkları rapor etmişlerdir. Bu bulgu, RuBisCo küçük alt birim promotörünün yaprak gelişimi sırasında RuBisCo ifadesinin zamansal düzenlemesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Yerleşik (Natif) çoklu stres uyarılabilir promotörler, belirli stres koşullarına yanıt olarak genlerin uyarılabilir ifadesini elde etmek için kullanılmıştır (Sreedharan vd., 2013). Bu promotörler, kontrol edilmemiş stresli koşullarda minimal ifadeyi korurken, hedef genin stres altındaki koşullarda hemen uyarılmasını sağlar. Bu özgünlük, transgenik bitkilerde hassas gen düzenlemesi için kritik öneme sahiptir. Kasuga ve diğerleri tarafından yapılan dikkat çekici bir çalışma (Kasuga vd., 1999), tek bir stresle uyarılan transkripsiyon faktörünün, gen transferi yoluyla bitkiyi kuraklık, tuzluluk ve don stresine karşı daha dayanıklı hale getirilmesini başarıyla göstermiştir. Araştırmacılar, birden çok stres tarafından uyarılan Arabidopsis RD29A promotörünü kullanarak, transkripsiyon faktörü DREB1A/CBF3'ün ifadesini yönlendirmiştir. Transgenik bitkiler, geliştirilmiş stres toleransı sergilemiş, bu da doğal çoklu stresle uyarılan promotörlerin stres direnci sağlama konusundaki etkinliğini vurgulamıştır. Dey ve diğerleri (2015) tarafından yapılan bir derleme çalışmasında (Dey vd., 2015), yazarlar bitkilerde sentetik promotörlerin gelişimi ve önemini tartışmışlardır. Bunu, biyotik streslere uyarlanabilir ve abiyotik streslere uyarlanabilir promotörler olmak üzere farklı işlevsel rejimler altında kategorize etmişlerdir. Bu promotörler, streslere yanıt veren genlerin ifadesini yönlendirmek için kullanılmış ve transgenik bitkilerde stres savunma mekanizmalarının hedefli olarak etkinleştirilmesine olanak tanımıştır. Nakashima ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma, stres toleransını artırmak için stresle uyarılan promotörlerin kullanımını göstermiştir (Nakashima vd., 2007). OsNAC6 promotörü, OsNAC6'nın aşırı ifadesini yönlendirmek için kullanıldı ve bu, normal koşullarda OsNAC6'nın büyümeye olumsuz etkilerini bastırarak stres toleransını artırdı. Bu çalışma, stres koşullarında bitki performansını artırmak için gen ifadesini düzenlemede stresle uyarılan promotörlerin potansiyelini vurgulamaktadır. Ayrıca, Maruyama ve diğerleri (2004), mikroarray analizi kullanarak Arabidopsis DREB1A/CBF3 transkripsiyon faktörünün soğuğa uyarlanmış downstream genlerini tanımlamışlardır (Maruyama vd., 2004). DREB1A promotörü, DREB1A'nın aşırı ifadesini yönlendirmek için kullanılmış, bu da stresle uyarılan genlerin etkinleştirilmesine ve kuraklık, tuzluluk, don ve büyüme gerilemesine karşı geliştirilmiş toleransa yol açmıştır.

Pirinç RbcS gen promotorunun, tek çenekli türlerin genetik tasarımında tarımsal öneme sahip genlerinin ifadesi için kullanışlı olduğu gösterilmiştir (Kyozyuka vd., 1993). Bu promotor, hem gelişimsel olarak hem de ışıkla düzenlenir ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak gen ifadesini kontrol etmek için değerli bir araç olmuştur. RbcS geni, fotosentez için gerekli olan RuBisCo enziminin küçük alt ünitesini kodlar. Kyozyuka ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma, transgenik pirinç bitkilerinde domates RbcS-GusA füzyon geninin ışıkla düzenlenen ve hücreye özgü ifadesini göstermiştir (Kyozyuka vd., 1993). Pirinç RbcS gen promotoru, GUS rapor geninin ifadesini yönlendirmek için kullanılmış ve bu, yalnızca fotosentetik dokularda yüksek düzeyde ifade sağlamıştır. Bu çalışma, pirinç RbcS gen promotorunun tek çenekli türlerin genetik mühendisliğinde tarımsal olarak önemli genlerin ifadesi için kullanışlılığını vurgulamıştır. Başka bir çalışmada, Feng ve diğerleri (2020), transgenik pirinç bitkilerinde yeşil dokularla sınırlı bir hedef gen ifade etmek için pirinç RbcS gen promotorunu kullanmıştır (Feng vd., 2020). Promotor, gen ifadesini fotosentetik dokularla sınırlamak için etkiliydi ve transgenik bitkilerde doku özgü ifade elde etmek için kullanışlı bir araç sağladı. Ayrıca, pirinç RbcS gen promotoru işaretçi içermeyen transgenik bitkilerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Li ve diğerleri (2011), transgenik pirinç bitkilerinin belirli dokularında bir hedef gen ifade etmek için RbcS promotorunu kullandı ve çevreye salınan Bt toksininin seviyelerini azalttı (Li vd., 2011). Bu yaklaşım, pirinçte böcek direncini artırmayı hedeflerken potansiyel çevresel etkileri minimize etmeyi amaçlamıştır. Pirinç RbcS gen promotoru, bitki performansını artırma bağlamında da araştırılmıştır. Başka çalışmalarda ise (Garg vd., 2005; Kong vd., 2016), RbcS promotoru tarafından kontrol edilen bir F-box geninin ifadesini transgenik buğday bitkilerinde incelemesi gerçekleştirilmiştir. RbcS promotorunun kontrolündeki gen ifadesi ile, bitki büyümesi ve gelişimini etkilemeden kuraklık toleransının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, pirinç RbcS gen promotoru, belirli gen ifade desenlerini elde etmek için diğer düzenleyici elementlerle birleştirilmiştir. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar (Garg vd., 2005), RbcS promotorunu, RNA interferans ile birleştirerek pirinçte dokuya özgü gen susturma elde etmek için kullanmışlardır. Promotor, RNAi yapılarının hedeflenen ifadesine izin vererek belirli dokularda etkili gen susturmayı sağlamıştır.

Pirinç sitokrom c gen promotoru, tek çenekli bitkilerde yüksek düzeyde ve yaygın bir promotor olarak araştırılmıştır (Jang vd., 2002). Bu promotorun, kökler ve yapraklar dahil olmak üzere çeşitli dokularda yüksek düzeyde gen ifadesini yönlendirdiği gösterilmiş ve bu nedenle sağlam transgen ifadesi elde etmek için değerli bir araç olmuştur. Jang ve diğerleri (2002), yüksek düzeyde ve

evrensel ifade edilmiş pirinç sitokrom c geni (OsCc1) ve promotor aktivitesini transgenik bitkilerde gösterdiler. Pirinç sitokrom c gen promotoru, lüsiferaz rapor geninin ifadesini sürmek için kullanıldı ve sonuç olarak yapraklar ve kökler de dahil olmak üzere çeşitli dokularda güçlü ve düzenli bir ifade elde edildi (Jang vd., 2002). Bu çalışma, pirinç sitokrom c gen promotorunun tek çenekli türlerde güçlü transgen ifadesi elde etmek için kullanışlı bir araç olduğunu vurgulamıştır. Zhang ve diğerleri (2011), bürülce tripsin inhibitör geninin ifadesini artırmak için sitokrom c gen promotorunu transgenik pirinç bitkilerinde kullanmışlardır (Zhang vd., 2011). Bu yaklaşım, bitkilerin otoburlara karşı savunma mekanizmalarını artırmayı amaçlamaktadır. Feike ve diğerleri (2019), standart genetik parçaların karakterizasyonunu yapmış ve baklagil ve tahıl köklerinin genetik mühendisliği için ortak ilkeleri oluşturmuşlardır. Pirinç sitokrom c gen promotoru, bitki köklerinde belirli gen ifadesi desenlerini elde etmek için diğer düzenleyici unsurlarla bir arada kullanılmıştır (Feike vd., 2019).

Özetle, promotor seçimi başarılı transgenik bitki araştırmaları için kritiktir. Farklı promotorlar, doku özgül ifade, stresle uyarılabilir ifade veya yüksek düzeyde ifade gibi özel avantajlar sunar. Doğru promotor seçilerek araştırmacılar gen ifadesini hassas bir şekilde kontrol edebilir ve transgenik bitki türlerinde istenen özelliklere ulaşabilir.

3.2. Transgenik Bitki Türlerinde Kullanılan İşaretçi Genlere Genel Bakış

İşaretleme genleri, başka bir ifade ile işaretçi genler, transgenik bitki araştırmalarında çok önemli bir rol oynar. Bu genler, genellikle hedef genle birlikte tanımlanır ve transgenik bitkileri diğer transgenik olmayan bitkilerden ayırt etmeyi mümkün kılan seçilebilir veya puanlanabilir bir özellik sağlar. Transgenik bitki araştırmalarında yaygın kullanılan işaretleyici genler bu başlık altında gözden geçirilecektir.

Birçok bitki türünde, özellikle tütün, pirinç, mısır ve Arabidopsis gibi bitkilerde, kullanılan yaygın bir işaretleyici gen, neomisin fosfotransferaz II (nptII) genidir. Bu gen, kanamisin adlı antibiyotiğe karşı direnç sağlar. NptII geni, kanamisine karşı direnç sağlayarak, transgenik bitkilerin büyümesini desteklerken, transgenik olmayan bitkilerin büyümesini engelleyerek, dönüşmüş hücrelerin veya dokuların seçilmesine olanak tanır (Darbani vd., 2007; Chen vd., 1998).

Başka bir yaygın olarak kullanılan işaretleyici gen, ifade edildiğinde gözle görülür yeşil floresans üreten yeşil floresan protein (GFP) genidir. GFP, transgenik bitkilerde gen ifadesini, doku özgül ifadeyi veya alt hücrel konumlandırmayı izlemek için görsel bir işaretleyici olarak yaygın bir şekilde

kullanılmıştır (Tamaoki vd., 2006). GFP işaretleyici, ek seçim ajanlarına ihtiyaç duymadan transgenik gen ifadesinin doğrudan görselleştirilmesine olanak tanır.

Bitki dokularında kullanılan β -glukuronidaz (GUS) geni, β -glukuronit substratlarını hidrolize edebilen bir enzimi kodlayan başka bir önemli işaretleyici genidir. GUS geni, transgenik bitkilerde gen ifade desenlerini, promotör aktivitesini ve doku özgül ifadeyi değerlendirmek için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Chen vd., 1998). GUS analizi, GUS aktivitesinin mavi bir çözelti oluşturarak tespitini sağlar ve transgen ifadesi için görsel bir işaretleyici sunar.

Son yıllarda, transgenik bitkilerde seçilebilir işaretleyici genlerin varlığı ile ilgili endişeleri ele almak için işaretleyici olmayan stratejiler dikkat çekmektedir. Bu stratejiler, işaretleyici genin transgenik bitkilerden çıkarılması için Cre/lox veya FLP/FRT gibi site özgü rekombinasyon sistemlerinin kullanılmasını içerir (Zhang vd., 2003; Wang vd., 2005). İşaretleyici olmayan yaklaşımlar, seçilebilir işaretleyici genlerin varlığı olmadan transgenik bitkilerin üretilmesine olanak tanır. Bu yaklaşım potansiyel çevresel endişeleri azaltabilir ve yasal onay almayı kolaylaştırabilir. Bu nedenle son zamanlarda bu yaklaşıma yönelik çalışmalar artış göstermektedir.

Yukarıda anlatılanların haricinde, örneğin, fosfinotricin asetiltransferaz (bar) genine direnç sağlayan, ve antibiyotik higromisine direnç sağlayan higromisin fosfotransferaz (hpt) geni gibi diğer seçilebilir işaretleyici genler bitki dönüşümünde yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Woo vd., 2011). Bu seçilebilir işaretleyiciler, özel herbisitlere veya antibiyotiklere direnç sağlayarak transgenik hücrelerin veya dokuların seçimini mümkün kılar ve daha özgül seçilebilirlik sağlamaktadır.

Özetlemek gerekirse, transgenik bitki türlerinde kullanılan önemli işaretleyici genler arasında neomisin fosfotransferaz II (nptII) geni, yeşil floresan protein (GFP) geni, β -glukuronidaz (GUS) geni, fosfinotricin asetiltransferaz (bar) geni ve higromisin fosfotransferaz (hpt) geni bulunmaktadır. Bu işaretleyici genler, transgenik bitkilerin tanımlanması, seçilmesi ve karakterize edilmesinde etkili olmuş, araştırmacılara gen ifadesini, doku özgül ifadeyi ve alt hücresele konumu inceleme olanağı sağlamıştır. Ayrıca, işaretleyici genlerin varlığıyla ilgili endişeleri ele almak için işaretsiz stratejiler, transgenik bitkilerde seçilebilir işaretleyici genlerin varlığına ilişkin endişeleri ele almanın alternatifleri olarak ortaya çıkmıştır.

4. Sonuç

Sonuç olarak, transgenik bitki araştırmalarında kullanılan promotör ve işaretleme genleri, gen ifadesini hassas bir şekilde düzenlemeyi, dönüştürülmüş

hücrelerin seçilmesini ve transgenik bitkilerin karakterizasyonunu sağlayarak bu alandaki önemli bir ilerlemeye yol açmıştır. Phloem (floem, özsu) özgül promotör, RuBisCoküçük alt birim promotörü ve stresle uyarılan promotörler gibi promotörler, dokusal spesifik ifade elde etmek, uyarlamalı gen düzenlemeyi gerçekleştirmek ve transgenik bitkilerin stres toleransını artırmak için değerli araçlar sunmuştur. Neomisin fosfotransferaz II (nptII), yeşil floresan protein (GFP) ve β -glukuronidaz (GUS) gibi işaretleyici genler, transgenik bitkilerin tanımlanması, seçilmesi ve karakterizasyonunda kritik roller oynamıştır. Bu genler, gen ifadesinin, doku özgül ifadesinin ve hücresel konumun izlenmesini kolaylaştırmış, gen işlevi ve bitki gelişimi hakkında bilgi sağlamıştır. Ayrıca, seçilebilir işaretçi genlerin transgenik bitkilerde bulunmasına ilişkin endişeleri ele almak için “marker-free” (işaretleyici içermeyen) stratejiler ortaya çıkmıştır. Bu stratejiler, site-spesifik rekombinasyon sistemlerini kullanan, seçilebilir işaretçi genler gerektirmeyen transgenik bitkilerin oluşturulmasına izin vermiştir. Bu yaklaşımlar, potansiyel çevresel riskleri azaltmak ve düzenleyici onayı kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Promoter ve işaretçi genlerin bir araya gelmesi, genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin istenen özelliklere sahip olarak geliştirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Bu araçlar, gen düzenlemesi, bitki gelişimi ve stres yanıtlarının anlaşılmasına katkıda bulunurken, sürdürülebilir tarım ve ürün iyileştirmesi için fırsatlar sunmaktadır.

Toparlanırsa, transgenik bitki araştırmalarında yaygınlaşan promotör ve işaretçi genlerin kullanımı ile hassas gen düzenlemesi, dönüştürülmüş hücrelerin seçimi ve transgenik bitkilerin karakterizasyonu için güçlü araçlar elde edilmiştir. Bu gelişmeler, iyileştirilmiş özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş ürünlerin geliştirilmesinin yolunu açmış ve yiyecek, yem ve lif üretiminin sürdürülebilir ve verimli bir şekilde yapılmasına katkıda bulunmuştur.

Kaynaklar

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N. & Al-Qurainy, F. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*, 30(3), 524-540. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.006>

An, Y., Huang, S., McDowell, J., McKinney, E., & Meagher, R. (1996). Conserved expression of the arabidopsis act1 and act3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *The Plant Cell*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.2307/3870065>

Aoyama, T. and Chua, N. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, 11(3), 605-612. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11030605.x>

Bai, S., Tuan, P., Tatsuki, M., Yaegaki, H., Ohmiya, A., Yamamizo, C., ... & Moriguchi, T. (2015). Knockdown of carotenoid cleavage dioxygenase 4 (*ccd4*) via virus-induced gene silencing confers yellow coloration in peach fruit: evaluation of gene function related to fruit traits. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 257-264. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0920-8>

Bakhsh, A. and Husnain, T. (2012). Endeavours of rubisco small subunit promoter as a tool of green tissue specific expression. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 48(1), 1-9. <https://doi.org/10.17221/34/2011-cjgpb>

Barrero, R., Umeda, M., Yamamura, S., & Uchimiya, H. (2003). Over-expression of *arabidopsis cap* causes decreased cell expansion leading to organ size reduction in transgenic tobacco plants. *Annals of Botany*, 91(5), 599-603. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg056>

Baum, J., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G., Feldmann, P., Ilagan, O., ... & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through rna interference. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1322-1326. <https://doi.org/10.1038/nbt1359>

Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. (2007). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27(3), 411-424. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0474-9>

Boddupally, D., Tamirisa, S., Gundra, S., Vudem, D., & Khareedu, V. (2018). Expression of hybrid fusion protein (*cryIacasaI*) in transgenic rice plants imparts resistance against multiple insect pests. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26881-9>

Brunet, J. and Stewart, C. (2010). Impact of bee species and plant density on alfalfa pollination and potential for gene flow. *Psyche a Journal of Entomology*, 2010, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2010/201858>

Cao, T., Qin, M., Zhu, S., & Li, Y. (2022). Silencing of a cotton actin-binding protein *ghwlim1c* decreases resistance against *verticillium dahliae* infection. *Plants*, 11(14), 1828. <https://doi.org/10.3390/plants11141828>

Chen, L., Marmey, P., Taylor, N., Brizard, J., Espinoza, C., D'Cruz, P., ... & Fauquet, C. (1998). Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotechnology*, 16(11), 1060-1064. <https://doi.org/10.1038/35111>

Chen, T., Riaz, S., Davey, P., Zhao, Z., Sun, Y., Dykes, G., ... & Liu, L. (2022). Producing fast and active rubisco in tobacco to enhance photosynthesis. *The Plant Cell*, 35(2), 795-807. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac348>

Cheryatova, Y. and Yembaturova, E. (2022). Transgenic plants - a threat to local flora?. *Ecological Genetics*, 20(1S), 54-55. <https://doi.org/10.17816/ecogen112372>

Crickmore, N. (2006). Beyond the spore - past and future developments of bacillus thuringiensis as a biopesticide. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 616-619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02936.x>

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C., & Camargo, W. (2007). Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal*, 2(1), 83-90. <https://doi.org/10.1002/biot.200600182>

Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., & Maiti, I. (2015). Synthetic promoters in planta. *Planta*, 242(5), 1077-1094. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2377-2>

Douches, D., Kisha, T., Coombs, J., Li, W., Pett, W., & Grafius, E. (2001). Effectiveness of natural and engineered host plant resistance in potato to the colorado potato beetle. *Hortscience*, 36(5), 967-970. <https://doi.org/10.21273/hortsci.36.5.967>

Du, D., Jin, R., Guo, J., & Zhang, F. (2019). Construction of marker-free genetically modified maize using a heat-inducible auto-excision vector. *Genes*, 10(5), 374. <https://doi.org/10.3390/genes10050374>

Fan, J., Li, W., Dong, X., Wei, G., & Shu, H. (2007). Ectopic expression of a hyacinth agl6 homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in arabidopsis. *Science in China Series C Life Sciences*, 50(5), 676-689. <https://doi.org/10.1007/s11427-007-0083-4>

Feike, D., Korolev, A., Soumpourou, E., Murakami, E., Reid, D., Breakspear, A., ... & Miller, J. (2019). Characterizing standard genetic parts and establishing common principles for engineering legume and cereal roots. *Plant Biotechnology Journal*, 17(12), 2234-2245. <https://doi.org/10.1111/pbi.13135>

Feng, Z., Yuan, M., Zou, J., Wu, L., Wei, L., Chen, T., ... & Zuo, S. (2020). Development of marker-free rice with stable and high resistance to rice black-streaked dwarf virus disease through rna interference. *Plant Biotechnology Journal*, 19(2), 212-214. <https://doi.org/10.1111/pbi.13459>

Fukayama, H., Mizumoto, A., Ueguchi, C., Katsunuma, J., Morita, R., Sasayama, D., ... & Azuma, T. (2018). Expression level of rubisco activase negatively correlates with rubisco content in transgenic rice. *Photosynthesis Research*, 137(3), 465-474. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0525-9>

Gao, W., Zhang, L., Wang, J., Liu, Z., Zhang, Y., Xue, C., ... & Zhao, J. (2021). Zjsep3 modulates flowering time by regulating the lhy promoter. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03305-x>

Garg, A., Sawers, R., Wang, H., Kim, J., Walker, J., Brutnell, T., ... & Wu, R. (2005). Light-regulated overexpression of an arabidopsis phytochrome

a gene in rice alters plant architecture and increases grain yield. *Planta*, 223(4), 627-636. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0101-3>

Gaxiola, R., Li, J., Undurraga, S., Dang, L., Allen, G., Alper, S., ... & Fink, G. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *avp1* *h⁺*-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11444-11449. <https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>

Giovannini, A., Zottini, M., Morreale, G., Spena, A., & Allavena, A. (1999). Ornamental traits modification by *rol* genes in *osteospermum ecklonis* transformed with *agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(1), 70-75. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0012-2>

He, Y. and Zhao, Y. (2019). Technological breakthroughs in generating transgene-free and genetically stable crispr-edited plants. *Abiotech*, 1(1), 88-96. <https://doi.org/10.1007/s42994-019-00013-x>

Heuvel, T., Renes, R., Gremmen, B., Woerkum, C., & Trijp, J. (2007). Consumers' images regarding genomics as a tomato breeding technology: "maybe it can provide a more tasty tomato". *Euphytica*, 159(1-2), 207-216. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9474-7>

Hyun, K., Oh, J., Park, J., Noh, Y., & Song, J. (2016). Structural analysis of *frigida* flowering-time regulator. *Molecular Plant*, 9(4), 618-620. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.009>

Inui, H. and Ohkawa, H. (2005). Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian *p450* monooxygenase genes. *Pest Management Science*, 61(3), 286-291. <https://doi.org/10.1002/ps.1012>

Jackson, M., Stinchcombe, J., Korves, T., & Schmitt, J. (2004). Costs and benefits of cold tolerance in transgenic *arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*, 13(11), 3609-3615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02343.x>

Jang, I., Choi, W., Lee, K., Song, S., Nahm, B., & Kim, J. (2002). High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome *c* gene *oscc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant Physiology*, 129(4), 1473-1481. <https://doi.org/10.1104/pp.002261>

Jin, S., Xu, C., Li, G., Sun, D., Li, Y., Wang, X., ... & Liu, S. (2017). Functional characterization of a type 2 metallothionein gene, *ssmt2*, from alkaline-tolerant *suaeda salsa*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18263-4>

Jones, D. (1999). Natural pesticides and the evolution of food plants. *Pesticide Science*, 55(6), 634-636. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9063\(199906\)55:63.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199906)55:63.0.co;2-1)

Kandasamy, M., Burgos-Rivera, B., McKinney, E., Ruzicka, D., & Meagher, R. (2007). Class-specific interaction of profilin and adf isovariants with actin in the regulation of plant development. *The Plant Cell*, 19(10), 3111-3126. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052621>

Kandasamy, M., McKinney, E., & Meagher, R. (2002). Functional nonequivalency of actin isovariants in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(1), 251-261. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0342>

Kasuga, M., Li, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17(3), 287-291. <https://doi.org/10.1038/7036>

Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Fukuda, A., Tanaka, Y., & Shimizu, T. (2007a). Functional analysis of transgenic rice plants expressing a novel mutated *als* gene of rice. *Journal of Pesticide Science*, 32(4), 385-392. <https://doi.org/10.1584/jpestics.g07-08>

Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, T., Fukuda, A., & Tanaka, Y. (2007b). A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to *als*-inhibiting herbicides. *Journal of Pesticide Science*, 32(2), 89-98. <https://doi.org/10.1584/jpestics.g06-40>

Kim, K., Kim, Y., Lim, G., Lee, M., & Jung, Y. (2011). Expression of catalase (*cat*) and ascorbate peroxidase (*apx*) in musk transgenic tobacco under cadmium stress. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 44(1), 53-57. <https://doi.org/10.7745/kjssf.2011.44.1.053>

Kong, X., Zhou, S., Yin, S., Zhao, Z., Han, Y., & Wang, W. (2016). Stress-inducible expression of an *f-box* gene *tafb1* from wheat enhanced the drought tolerance in transgenic tobacco plants without impacting growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01295>

Krichevsky, A., Zaltsman, A., King, L., & Citovsky, V. (2012). Expression of complete metabolic pathways in transgenic plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 28(1), 1-14. <https://doi.org/10.5661/bger-28-1>

Kuluev, B., Knyazev, A., Lebedev, Y., Postrigan, B., & Chemeris, A. (2012). Obtaining transgenic tobacco plants expressing conserved regions of the *antegen* gene in antisense orientation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(3), 307-317. <https://doi.org/10.1134/s1021443712030107>

Kyozuka, J., McElroy, D., Hayakawa, T., Xie, Y., Wu, R., & Shimamoto, K. (1993). Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcs-gusa* and rice *rbcs-gusa* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiology*, 102(3), 991-1000. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.991>

Lange, B., Mahmoud, S., Wildung, M., Turner, G., DAVIS, E., Lange, I., ... & Croteau, R. (2011). Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 16944-16949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111558108>

Lanza, M., García-Ponce, B., Castrillo, G., Catarecha, P., Sauer, M., Rodríguez-Serrano, M., ... & Leyva, A. (2012). Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Developmental Cell*, 22(6), 1275-1285. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.008>

Li, J., Chen, S., Wang, X., Shi, C., Liu, H., Yang, J., ... & Jia, H. (2018). Hydrogen sulfide disturbs actin polymerization via s-sulfhydration resulting in stunted root hair growth. *Plant Physiology*, 178(2), 936-949. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00838>

Li, J., Jiang, D., Zhou, H., Li, F., Jiang, Y., Hong, L., ... & Zhuang, C. (2011). Correction: expression of rna-interference/antisense transgenes by the cognate promoters of target genes is a better gene-silencing strategy to study gene functions in rice. *Plos One*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/annotation/6818176e-4f00-4229-a133-a83d0c3b11da>

Liu, F. and Cao, Y. (2018). Expression of a bacterial *aroA* gene confers tolerance to glyphosate in tobacco plants. *Turkish Journal of Biology*, 42(2). <https://doi.org/10.3906/biy-1712-56>

Lloyd, A., Plaisier, C., Carroll, D., & Drews, G. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 2232-2237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409339102>

Low, L., Yang, S., Kok, D., Abdullah, J., Tan, N., & Lai, K. (2018). Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method.. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79369>

Lu, X., Guan, Q., & Zhu, J. (2013). Downregulation of *csd2* by a heat-inducible *mir398* is required for thermotolerance in arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(8), e24952. <https://doi.org/10.4161/psb.24952>

Ma, G., Ning, G., Zhang, W., Zhan, J., Lv, H., & Bao, M. (2010). Overexpression of petunia *soc1*-like gene *fbp21* in tobacco promotes flowering without decreasing flower or fruit quantity. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(3), 573-581. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0263-4>

Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream

genes of the arabidopsis *dreb1a/cbf3* transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38(6), 982-993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02100.x>

Matsuda, N., Ikeda, K., Kurosaka, M., Takashina, T., Isuzugawa, K., Endo, T., ... & Omura, M. (2009). Early flowering phenotype in transgenic pears (*pyrus communis* L.) expressing the *cift* gene. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(4), 410-416. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.78.410>

Mihálik, D., Lančaričová, A., Mrkvová, M., Kaňuková, Š., Moravčíková, J., Glasa, M., ... & Kraic, J. (2020). Diacylglycerol acetyltransferase gene isolated from *euonymus europaeus* L. altered lipid metabolism in transgenic plant towards the production of acetylated triacylglycerols. *Life*, 10(9), 205. <https://doi.org/10.3390/life10090205>

Milner, S., Ferradini, N., Nicolia, A., Veronesi, F., Salvi, S., & Rosellini, D. (2014). Copy number estimation of a plant-derived selectable marker gene by high resolution melting analysis: a tool to simplify transgenic plant breeding. *Crop Science*, 54(3), 1133-1138. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.09.0631>

Mondal, H., Louis, J., Archer, L., Patel, M., Nalam, V., Sarowar, S., ... & Shah, J. (2017). Arabidopsis actin-depolymerizing factor3 is required for controlling aphid feeding from the phloem. *Plant Physiology*, 176(1), 879-890. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01438>

Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J., & Palme, K. (1998). A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 376-381. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.376>

Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., ... & Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of *dreb/cbf* factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230-249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>

Nakashima, K., Tran, L., Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a *nac*-type transcription factor *osnac6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4), 617-630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03168.x>

Naqvi, S., Zhu, C., Farré, G., Ramessar, K., Bassié, L., Breitenbach, J., ... & Christou, P. (2009). Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(19), 7762-7767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901412106>

Nathalie, H., Eloiza, A., Priscila, A., & Juliana, V. (2015). Biotechnology in agriculture: the perception of farmers on the inclusion of genetically modified organisms (gmos) in agricultural production. *African Journal of Agricultural Research*, 10(7), 631-636. <https://doi.org/10.5897/ajar2014.9323>

Owen, M. and Zelaya, I. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61(3), 301-311. <https://doi.org/10.1002/ps.1015>

Powell, J., Gulden, R., Hart, M., Campbell, R., Levy-Booth, D., Dunfield, K., ... & Klironomos, J. (2007). Mycorrhizal and rhizobial colonization of genetically modified and conventional soybeans. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4365-4367. <https://doi.org/10.1128/aem.00594-07>

Pruthvi, V., Rama, N., & Nataraja, K. (2014). Simultaneous expression of abiotic stress responsive transcription factors, *atdreb2a*, *athb7* and *atabf3* improves salinity and drought tolerance in peanut (*arachis hypogaea* l.). *Plos One*, 9(12), e111152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111152>

Qin, L., Hou, Y., Meng, X., Lin, J., Li, Y., & Hou, B. (2017). Ectopic expression of glycosyltransferase *ugt76e11* increases flavonoid accumulation and enhances abiotic stress tolerance in *arabidopsis*. *Plant Biology*, 20(1), 10-19. <https://doi.org/10.1111/plb.12627>

Rabha, M., Sharma, S., Acharjee, S., & Sarmah, B. (2017). Isolation and characterization of *bacillus thuringiensis* strains native to assam soil of north east india. *3 Biotech*, 7(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0935-y>

Rao, K., Rathore, K., Hodges, T., Fu, X., Stöger, E., Sudhakar, D., ... & Gatehouse, J. (1998). expression of snowdrop lectin (*gna*) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal*, 15(4), 469-477. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00226.x>

Ratcliff, F., Harrison, B., & Baulcombe, D. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276(5318), 1558-1560. <https://doi.org/10.1126/science.276.5318.1558>

Ruíz, M., Voinnet, O., & Baulcombe, D. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell*, 10(6), 937-946. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937>

Saji, H., Nakajima, N., Aono, M., Tamaoki, M., Kubo, A., Wakiyama, S., ... & Nagatsu, M. (2005). Monitoring the escape of transgenic oilseed rape

around japanese ports and roadsides. *Environmental Biosafety Research*, 4(4), 217-222. <https://doi.org/10.1051/ebr:2006003>

Sarkar, T., Thankappan, R., Kumar, A., Mishra, G., & Dobaría, J. (2014). Heterologous expression of the *atdrebl1a* gene in transgenic peanut-conferred tolerance to drought and salinity stresses. *Plos One*, 9(12), e110507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110507>

Sato, H., Shimizu, T., Kawai, K., Kaku, K., Arakawa, A., Tachibana, T., ... & Takamizo, T. (2013). Herbicide-resistant tall fescue with cytoplasmic male sterility selected by a mutated rice acetolactate synthase gene. *Crop Science*, 53(1), 201-207. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0199>

Shih, P., Liang, Y., & Loqué, D. (2016). Biotechnology and synthetic biology approaches for metabolic engineering of bioenergy crops. *The Plant Journal*, 87(1), 103-117. <https://doi.org/10.1111/tpj.13176>

Sloan, J., Schwartz, B., & Becker, W. (1993). Promoter analysis of a light-regulated gene encoding hydroxypyruvate reductase, an enzyme of the photorespiratory glycolate pathway. *The Plant Journal*, 3(6), 867-874. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1993.03060867.x>

Snow, A., Pilson, D., Rieseberg, L., Paulsen, M., Pleskac, N., Reagon, M., ... & Selbo, S. (2003). A bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications*, 13(2), 279-286. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[0279:abtrha\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[0279:abtrha]2.0.co;2)

Soares, J., Weber, K., Qiu, W., Stanton, D., Mahmoud, L., Wu, H., ... & Grosser, J. (2020). The vascular targeted citrus flowering locus *t3* gene promotes non-inductive early flowering in transgenic carrizo rootstocks and grafted juvenile scions. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78417-9>

Sreedharan, S., Shekhawat, U., & Ganapathi, T. (2013). Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *musapip1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnology Journal*, 11(8), 942-952. <https://doi.org/10.1111/pbi.12086>

Stewart, C., All, J., Raymer, P., & Ramachandran, S. (1997). Increased fitness of transgenic insecticidal rapeseed under insect selection pressure. *Molecular Ecology*, 6(8), 773-779. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1997.00239.x>

Suganami, M., Suzuki, Y., Kondo, E., Nishida, S., Konno, S., & Makino, A. (2020). Effects of overproduction of rubisco activase on rubisco content in transgenic rice grown at different n levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1626. <https://doi.org/10.3390/ijms21051626>

Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., & Mittler, R. (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiology*, 139(3), 1313-1322. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070110>

Tabashnik, B., Brévault, T., & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6), 510-521. <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>

Tamaoki, M., Imai, H., Takahashi, H., Toda, Y., Niwa, Y., Nakajima, N., ... & Saji, H. (2006). Development of visible markers for transgenic plants and their availability for environmental risk assessment. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(5-6), 377-386. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-614>

Tanaka, N., Ureshino, A., Shigeta, N., Mimida, N., Komori, S., Takahashi, S., ... & Wada, M. (2014). Overexpression of arabidopsis ft gene in apple leads to perpetual flowering. *Plant Biotechnology*, 31(1), 11-20. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.0912a>

Tanaka, Y., Brugliera, F., & Chandler, S. (2009). Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5350-5369. <https://doi.org/10.3390/ijms10125350>

Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., Senior, M., Dyson, B., Nakamura, N., ... & Chandler, S. (2010). Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 74(9), 1760-1769. <https://doi.org/10.1271/bbb.100358>

Teulon, D. and Losey, J. (2002). Issues relating to the practical use of transgenic crops for insect pest management. *New Zealand Plant Protection*, 55, 396-404. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2002.55.3914>

Tzeng, T., Hsiao, C., Chi, P., & Yang, C. (2003). Two lily sepallata-like genes cause different effects on floral formation and floral transition in arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), 1091-1101. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026997>

Vaškebová, L., Šamaj, J., & Ovečka, M. (2017). Single-point act2 gene mutation in the arabidopsis root hair mutant der1-3 affects overall actin organization, root growth and plant development. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx180>

Wang, F., Lian, L., Liu, Y., Zhang, Y., Fang, R., & Liu, Q. (2018). Rotfl1c of rosa multiflora has a dual-function in suppressing reproductive growth and promoting vegetative growth of arabidopsis. *Science China Life Sciences*, 61(12), 1599-1601. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0082-1>

Wang, F., Yang, C., Wang, L., Zhong, N., Wu, X., Han, L., ... & Xia, G. (2011). Heterologous expression of a chloroplast outer envelope protein from *Suaeda salsa* confers oxidative stress tolerance and induces chloroplast aggregation in transgenic arabidopsis plants. *Plant Cell & Environment*, 35(3), 588-600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02438.x>

Wang, H., Wang, J., Gao, P., Jiao, G., Zhao, P., Li, Y., ... & Xia, G. (2008). Down-regulation of *ghadf1* gene expression affects cotton fibre properties. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), 13-23. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00367.x>

Wang, J., Chong, K., & Xu, Y. (2009). Overexpression of *osraa1* promotes flowering and hypocotyls elongation in arabidopsis. *Chinese Science Bulletin*, 54(22), 4221-4228. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0627-z>

Wang, X., Singer, S., & Liu, Z. (2011). Silencing of meiosis-critical genes for engineering male sterility in plants. *Plant Cell Reports*, 31(4), 747-756. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1193-9>

Wang, Y., Chen, B., Hu, Y., Li, J., & Zhang, L. (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the *cre/lox* site-specific recombination system. *Transgenic Research*, 14(5), 605-614. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-0884-9>

Wang, Y., Yoo, C., & Blancaflor, E. (2007). Improved imaging of actin filaments in transgenic arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the c- and n-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist*, 177(2), 525-536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02261.x>

Whitney, S., Baldet, P., Hudson, G., & Andrews, T. (2001). Form I rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts. *The Plant Journal*, 26(5), 535-547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01056.x>

Woo, H., Suh, S., & Cho, Y. (2011). Strategies for developing marker-free transgenic plants. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(6), 1053-1064. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0519-3>

Xu, Y., Gianfagna, T., & Huang, B. (2010). Proteomic changes associated with expression of a gene (*ipt*) controlling cytokinin synthesis for improving heat tolerance in a perennial grass species. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3273-3289. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq149>

Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H., & Miwa, T. (2004). Metabolic engineering with *dof1* transcription factor in plants: improved

nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7833-7838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402267101>

Yang, L., Machin, F., Wang, S., Saplaoura, E., & Kragler, F. (2023). Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nature Biotechnology*, 41(7), 958-967. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01585-8>

Yin, Y., Zhu, Q., Dai, S., Lamb, C., & Beachy, R. (1997). Rf2a, a bzip transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *The Embo Journal*, 16(17), 5247-5259. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5247>

Yu, K., Liu, Z., Gui, H., Geng, L., Wei, J., Liang, D., ... & Chen, X. (2021). Highly efficient generation of bacterial leaf blight-resistant and transgene-free rice using a genome editing and multiplexed selection system. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02979-7>

Yun, S. and Kwon, H. (2008). Ecophysiological changes in a cold tolerant transgenic tobacco plant containing a zinc finger protein (pif1) gene. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 27(4), 389-394. <https://doi.org/10.5338/kjea.2008.27.4.389>

Zameer, M., Shafique, S., Shafique, S., Tahir, U., Zahra, N., Rashid, B., ... & Afzaal, R. (2022). Physiological and biochemical response of transgenic cotton plants to drought stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 31(4), 3909-3918. <https://doi.org/10.15244/pjoes/146461>

Zhang, D., Tu, X., Li, P., & Bao, L. (2011). Transgenic plants of petunia hybrida harboring the cyp2e1 gene efficiently remove benzene and toluene pollutants and improve resistance to formaldehyde. *Genetics and Molecular Biology*, 34(4), 634-639. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572011005000036>

Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peschke, V., ... & Gilbertson, L. (2003). Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*zea mays* L.) plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(7), 1157-1168. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1368-z>

Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., ... & Kong, Z. (2018). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *medicago truncatula*. *New Phytologist*, 221(2), 1049-1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>

Zhao, S., Wang, F., Zhang, Q., Zou, J., Xie, Z., Li, K., ... & Zhou, Z. (2021). Transformation and functional verification of cry5aa in cotton. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82495-8>

Zhao, Y., Li, Q., & Davis, R. (2004). Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. *Plant Cell Reports*, 23(4), 224-230. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0812-0>

Zhong, H., Sun, B., Warkentin, D., Zhang, S., Wu, R., Wu, T., ... & Sticklen, M. (1996). The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. *Plant Physiology*, 110(4), 1097-1107. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1097>

Zhu, B., Lawrence, J., Warwick, S., Mason, P., Braun, L., Halfhill, M., ... & Stewart, C. (2003). Stable bacillus thuringiensis (bt) toxin content in interspecific fl and backcross populations of wild brassica rapa after bt gene transfer. *Molecular Ecology*, 13(1), 237-241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2004.02018.x>

Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P., & Capell, T. (2008). Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18232-18237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809737105>

Zhu, J., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J., Qi, H., Wei, Z., ... & Li, S. (2012). Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsrna of an insect-associated gene ecr. *Plos One*, 7(6), e38572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038572>