

## **BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNE GÜNCEL BİR BAKIŞ**

### **A CURRENT OVERVIEW OF PLANT BIOTECHNOLOGY**

**Özge DEMİREL<sup>1</sup> , Oğuz AKVEÇ<sup>2</sup> , Canan CAN<sup>2</sup> **

<sup>1</sup>Gaziantep University, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Biology, Division of Biochemistry Science and Technology, Gaziantep, Turkey

<sup>2</sup>Gaziantep University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Division of Molecular Biology, Gaziantep, Turkey

\* Corresponding author: can@gantep.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 16.02.2022  
Kabul Tarihi / Accepted: 10.03.2022

Derleme Makalesi/Review Article  
DOI: 10.38065/euroasiaorg.937

### **ÖZET**

Açlık “insanların yaşamlarını sürdürebilmesi için gerekli olan yeterli miktarda gıdaya ulaşamaması” olarak tanımlanmakta ve gıdalara olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. İnsanoğlunun beslenmesinin temelini oluşturan gıda ve geçmişten günümüze kadar süregelen tarım, günümüzdeki faaliyetler sonucu ortaya çıkan yoğun nüfus artışı ve olumsuz yönde değişmekte olan iklim, çevre koşulları ve zorlayıcı diğer faktörler gibi pek çok sorun gıda güvenliğini ve tarımsal uygulamaları tehdit etmektedir. Mevcut durumun devam etmesi, oluşan/oluşmaya başlayan tehdidin gelecekte artarak çok daha büyük problemlere neden olacağını düşündürmektedir. Günümüz gelişmeleri göz önüne alındığında tarımsal üretimi artırmada biyoteknolojik tekniklerin moleküler teknikler ile birlikte kullanımı büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu açıdan bakıldığında tarımsal ve bitki biyoteknoloji farklı disiplinler alanlardan yararlanarak, dünyadaki gelişmeler doğrultusunda tarımdaki gelişmelere hız verebilecek, sorunları farklı bakış açıları geliştirerek kısa bir sürede çözebilecek bir multidisipliner alandır. Bu çerçevede güncel biyoteknolojik gelişmelerin hedefi ürünlerin kısıtlamalarını (abiyotik – biyotik stres, hastalıklar, ekonomik faktörler, vb.) ortadan kaldırarak verimini artırmaktır. Ayrıca sürdürülebilirlik kavramının da önem kazandığı bu alanda disiplinler arası bir süreç işlemektedir. Sürdürülebilir tarım, tarımsal üretim uygulamaları ve üretilen gıda maddeleri için doğal kaynakların yok edilmemesi ve verimli bir şekilde kullanılmasını esas almaktadır. Tarımsal anlamda bu kavram ile bitki biyoteknolojisinin uyumlu olması büyük önem taşımaktadır. Bu amaç için biyoteknoloji adı altında yer alan klasik biyoteknolojik tekniklerden başlayıp modern biyoteknolojik tekniklere kadar giden ve zaman geçtikçe de karmaşıklık düzeyleri artan çeşitli teknolojilerin ülkelerin bilim-teknolojideki gelişmişliklerine bağlı olarak tarım alanında değişik şekillerde kullanıldığı bilinmektedir. Tüm bunlara ek olarak biyoteknolojik yaklaşımlar dünyanın gıda güvenliğine katkıda bulunmak için muazzam bir potansiyele sahip olmasına rağmen, genetiği değiştirilmiş ürünlerin bir tehdit oluşturduğu konusunda çeşitli endişeleri de beraberinde getirmiştir. Bu derleme kapsamında bitkiler için biyoteknoloji, eskiden yeniye tarihsel bakış, biyoteknolojinin modern teknikleri, gen teknolojileri, yeni gıda üretim teknolojileri ve gıda güvenliği hakkında yaklaşımlarda bulunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Biyoteknoloji, Sürdürülebilirlik, Gıda, Tarım

### **ABSTRACT**

Hunger is defined as “the inability to reach the sufficient amount of food necessary for people to survive”, and the need for food is increasing day by day. Food that forms the basis of human nutrition, and agriculture, from the past to the present, threaten food security and agricultural practices with many problems such as excessive population growth released as a result of activities in today and negatively changing climate, environmental conditions and other compelling factors. The continuation of the current situation makes us think that the emerging/starting to emerge threat will increase and cause much bigger problems in the future. Considering today's developments, it is an undeniable fact that biotechnological methods, especially molecular techniques, provide advantages

in increasing agricultural production. From this point of view, agricultural and plant biotechnology are a multidisciplinary field that can accelerate the developments in agriculture in line with the developments in the world and solve the problems in a short time by growing different perspectives by making use of different disciplinary areas. The aim of current biotechnological developments in this framework is to increase the yield of product by removing the restrictions of products (abiotic - biotic stress, diseases, economic factors, etc.). Also, an interdisciplinary process operates in this field, where the notion of sustainability gains importance. Sustainable agriculture is based on agricultural production practices and the efficient use of natural resources for the foodstuffs produced. In agricultural terms, it is of great importance that this notion is compatible with plant biotechnology. For this purpose, it is known that various technologies, starting from classical biotechnology under the name of biotechnology to modern biotechnological methods and increasing in complexity as time passes, are used in agriculture in different ways depending on the development status of countries in science and technology. In addition to all these, although biotechnological approaches have enormous potential to contribute to the world's food security, they have also brought several concerns that genetically modified crops pose a threat. Within the scope of this review, approaches have been made about biotechnology for plants, historical perspective from old to new, modern techniques of biotechnology, gene technologies, new food production technologies and food safety.

**Keywords:** Biotechnology, Sustainability, Food, Agriculture

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlunun beslenmesinin temelini oluşturan ve hayatın devamlılığı için gerekli olan gıda kaynaklarına ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Bayramoğlu vd., 2018). Bu nedenle günümüz toplumu için gıda kaynakları, diğer birçok kaynaktan daha önemli bir yere sahip olmasıyla birlikte bir o kadar da stratejik bir konuma gelmiştir. Dünya üzerindeki bütün kaynaklar gibi gıda kaynakları içinde bazı sorunlardan etkilenen dengesiz bir dağılım söz konusudur. Buna ek olarak yeterli miktarda ve kalitede gıdaya ulaşamaması da ayrı bir sorunsaldır. Toplumların yeterli ve kaliteli gıdaya ulaşamamasından dolayı açlığı doğurmakta ve gıda-güvenliği kapsamında günümüz insanlığının en temel sorunları arasında yerini almaktadır (Erbaş ve Arslan, 2012; Gökırmaklı ve Bayram, 2018). Ayrıca geçmişten günümüze kadar süre gelen tarım, gıda kaynağının temelini oluşturmaktadır. Tarımında gıda kaynakları gibi pekçok sorun ile boğuştuğu bilinen bir gerçektir. Hem gıda hem de tarım açısından çözüm teknolojik gelişmelerden sürdürülebilirlik kavramı ile ilişkili olarak yararlanılmasıdır. Bu teknolojik gelişmeler aynı zamanda gıda güvenliğine katkıda bulunmak için de muazzam bir potansiyele sahiptir. Bu derleme kapsamında gıda-tarım-sürdürülebilirlik üçgeninde bitki biyoteknolojisi, tarihsel süreç, bitki biyoteknolojisindeki modern teknikler, gen ve yeni gıda üretim teknolojileri ve gıda güvenliği hakkında yaklaşımlarda bulunulmuştur (Şekil 1).



**Şekil 1.** Gıda-tarım-sürdürülebilirlik

### 1.1. Gıda

Beslenme için gerekli olan maddeler olarak tanımlanan gıda, beslenmenin en temel faktörüdür. İnsanlık tarihi kadar eskilere dayanan geleneksel biyoteknoloji kavramıyla ilişkili kullanılan tekniklerin ortak paydası gıda üretimi, işleme ve korunması üzerinedir. İnsanların bilinçli veya bilinçsiz bir şekilde mikroorganizmaların doğal aktivitelerini kullandıkları gıda biyoteknolojisi (klasik biyoteknoloji) asırlardır gıda üretimi için kullanılmaktadır. Günümüzde teknolojik değişimler bu alanda da etkili olmuş ve özellikle yeni gıda üretim tekniklerinin (modern biyoteknoloji) kapısı aralanmıştır (Mehta ve Gair, 2001).

Temel olarak açlık veya yetersiz beslenme çeken kişi veya toplumlar birçok sorun ile de yüz yüzedir. Genel olarak oluşan bireysel veya sosyal kargaşa/kavga sebepleri bu temel kavram etrafında toplanmaktadır. Böylece gıda-güvenliği çerçevesinde çok daha büyük tehlikelere yol açmaktadır. Günümüzde gıda-güvenlik ilişkisinin doğru şekilde yürütülmesi açlığın ve yetersiz beslenmenin önlenmesi için gerekli olarak görülmektedir. Gıda güvenliği, genel olarak, gıdanın kullanım amacına göre hazırlandığında ve/veya yenildiğinde tüketiciye zarar vermeyeceğinin güvencesini ifade etmektedir (Bass vd., 2022). Ancak henüz ne ulusal düzeyde ne de uluslararası düzeyde yürütülmüş/yürütülmekte olan çalışmalar soruna kalıcı bir çözüm getirememiştir.

Dünya çapında son yıllarda yapılan incelemelerde gıda fiyatlarının hızlı bir yükseliş gösterdiği görülmektedir (Premanandh, 2011). Hızlı nüfus artışının da önemli bir sorun olduğu günümüzde ekonomik çerçeve ile ilişkili olarak nüfusunda göz önünde bulundurulması oldukça önem arz etmektedir (DaMatta vd., 2010; Hanjra ve Qureshi, 2010). Böylece bazı toplumlar daha fazla besine rahatlıkla ulaşabiliyorken bazı toplumların sadece belli başlı besin kaynaklarına ulaşabilmekte ve sonuç olarak üretilen gıdanın dağıtımında bir dengesizlik oluşmaktadır. Buna ek olarak dünya çapında üretilen gıda maddelerinin dengesiz dağılımı hem açlık hem de obezite konularını gündeme getirmektedir. Bu da açlığın sadece yetersiz beslenmeden değil dengesiz besin dağıtımından veya bazı (nüfus, ekonomik vb.) sorunlardan da kaynaklanabileceğini bizlere göstermektedir. Aynı zamanda çağımızın hastalıklarından olan özellikle gençlik çağı obezitesinin de temelinde bu dengesiz gıda dağılımının olduğu görülmektedir. Bu ve benzeri sorunların çözülebilmesi nüfus ile orantılı olarak ekonomik çerçevede ulaşılabilir besin kaynağının teminiyle, üretilen gıdanın veriminin artırılmasıyla, tarımsal üretim teşviklerinin verilmesiyle ve üretim planlamalarıyla gerçekleşebilir. Ek

olarak bilimsel faaliyetler, gelişen bilim-teknik ve akıllı teknolojik uygulamaların da katkı sağlaması ile sorunlara çözümler getirilmektedir.

Gıda üretimini baskılayan birçok faktörden en önemlisi olan iklim, insan aktivitelerinden etkilenmektedir (Miraglia vd., 2009). Örneğin değişen iklim yağışı etkilemekte ve bu da bazı tarım alanlarının kuraklaşmasına veya sel suları altında kalmasına yol açmakta ve gıda üretimini etkilemektedir. Fosil-kaynaklı yakıtların yaygın kullanımı sonucu ortaya çıkan bazı gazların sera etkisi oluşturmasından dolayı atmosferdeki sıcaklığın yükseltmesi olarak tanımlanan küresel ısınma, iklim değişikliği olarak da bilinmektedir. Bu etken günümüz ve gelecek için oldukça önemli sorunları da beraberinde getirmektedir. Örneğin buzulların erimesi gibi olayların bir sonucu olarak da tarıma uygun ekilebilecek tüm alanların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişmekte, ekilebilir alanlar azalmakta ve de dolayısı ile ürünün veriminde azalmalar meydana gelmektedir. Bu kapsamda “Kyoto Protokolü gibi sera gazlarının salınımını sınırlayan anlaşmalar” uluslararası toplumlarca yapılmaya çalışılmaktadır. Ancak yine de bazı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler bu sınırlamalara uymayarak, fosil kaynaklı yakıtları yoğun bir şekilde kullanmaya devam etmektedirler (Erbaş ve Arslan, 2012).

## **1.2. Tarım**

Tarım bir başlangıç noktası olarak toplumların gıda-besin kaynaklarını elde ettikleri ilk alandır (Mahapatra vd., 2022). Bu açıdan inovasyon ve biyoteknolojinin de gözbebeği konumunda olup stratejik ve rekabetçi bir özelliğe sahiptir. Son yüzyıllar düşünüldüğünde ekin bitkileri çeşitli şekillerle değiştiğinden atalarıyla (yabani tip) çok daha az benzerlik göstermektedir. Bu değişiklikler, ekinleri yetiştiren insanlar için avantajlı olan özelliklerin bilinçli veya bilinçsiz seçilimi yoluyla meydana gelmektedir (Chawla, 2011). Önemli tarım ürünlerinin anavatanı olan ülkemiz için de bu alandaki çalışmalar büyük etkilere sahiptir. Tarımsal yani yeşil biyoteknolojinin en temel amacı toplumların yeterli-dengeli beslenmesidir. Bu kapsamda gıda üretimi için ekinlerin veriminin artırılması ya da istenilen özelliklere sahip ürünler üretilmesi arzulanmaktadır. Bitki bilimlerindeki mevcut araştırmaları ilerletmek ve yeni ürünler geliştirmek için bir dizi metodoloji uygulanmıştır (Ranabhatt ve Kapor, 2017). Uygulanılacak genetik değişikliklerin sağlandığı yenilikçi, bilimsel ve çevreyi koruyan alternatif teknolojik uygulamaların tek çatı altında toplandığı bir bilim dalı olan tarım da (Kar, 2019), gıdada olduğu gibi bazı sınırlamalarla doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir (Kutman, 2018). Özellikle tarımsal ekilebilir alanların azalmasının başlıca nedeni küresel ısınma olarak gösterilse de erozyon, hastalık ve zararlılarla kontamine olma, tarımsal faaliyetler dışında kullanılma ve miras amacı ile paylaşım parsel boyutlarındaki küçülmelere neden olmakta ve de verimsizleşmekte veya kullanım dışı kalabilmektedir (Yavuz, 2005; Premanandh, 2011; Erbaş ve Arslan, 2012; Kutman, 2018). Ayrıca gıda üretimi açısından tarım yapılabilecek arazilerin varlığının yanı sıra sürdürülebilir tarım çerçevesinde kullanılabilirliği, toprağın verimli-sağlıklı olması ve bitki biyoçeşitliliği de önem arz etmektedir (Nonhebel, 2005; Akbaş, 2019; Capabelli vd., 2022).

## **1.3. Sürdürülebilirlik**

Sürdürülebilirlik kavramı gıda başta olmak üzere disiplinlerarası bir süreçtir. Tarım için sürdürülebilirlik, “İyi Tarım Uygulamaları” kapsamında bugünün ve gelecek nesillerin ihtiyacını doğal maddeleri kullanarak karşılayan, doğal varlıkları (toprak, su ve biyolojik çeşitlilik, vb.) ve insan-hayvan sağlığını koruyan, teknolojik uygulamaların kullanıldığı bütüncül bir tarım sistemidir. Tarım alanlarının kalitesinin yükseltilmesi ve sürdürülebilirlik çerçevesinde kullanımı yeterli ve güvenli gıda temini için altın bir anahtar niteliği taşımaktadır (Baran vd, 2021). Gıda ve tarım alanları sürdürülebilirlik açısından birbirleri ile bağlantılıdır. Muhteşem bir dengeye ve güce sahip olan doğanın kaynakları asla sonsuz-tükenmez olarak değerlendirilmemeli ve sürdürülebilirlik için korunmalıdır (Ranabhatt ve Kapor, 2017). Bu amaçla her zaman güvenilir ürün talebinin sağlanması sürdürülebilirliğin en temel görevidir. Sürdürülebilir gıda sistemleri ile hem sağlıklı gıdalara ulaşmakta hem de çevresel-ekonomik-sosyal açıdan sürdürülebilirlik sağlanmaktadır. Çevre dostu biyomalzemelerden de yararlanan bu alanda çevreye olan olumsuz etkileri azaltılarak üretilen ürünler kullanım amacına uygun ve geri dönüştürülebilir veya biyobozunur yapıları olarak tasarlanmalıdırlar. Ayrıca akıllı tarım kapsamındaki akıllı paketleme, sulama vb. uygulamalar da

sürdürülebilirlik için oldukça önemli teknolojik gelişmelerdir. Ek olarak günümüzde sıkça adından söz ettiren biyoyakıt teknolojisinde kullanılan biyolojik atıklar sayesinde çevreci ve ekonomik bir yakıt eldesi sağlanmaktadır. Bu çerçevede tarımsal biyoteknolojinin oldukça önemli roller üstlendiği – üstleneceği asla unutulmamalıdır (Kutman, 2018; Kar, 2019). Multidisipliner çalışma ağı (nanoteknoloji, gıda-malzeme-doku mühendisliği, sentetik biyoloji vb.) oluşturulması günümüz ve geleceğin de korunmasında oldukça önemli bir basamak oluşturmaktadır

## 2. BİYOTEKNOLOJİ

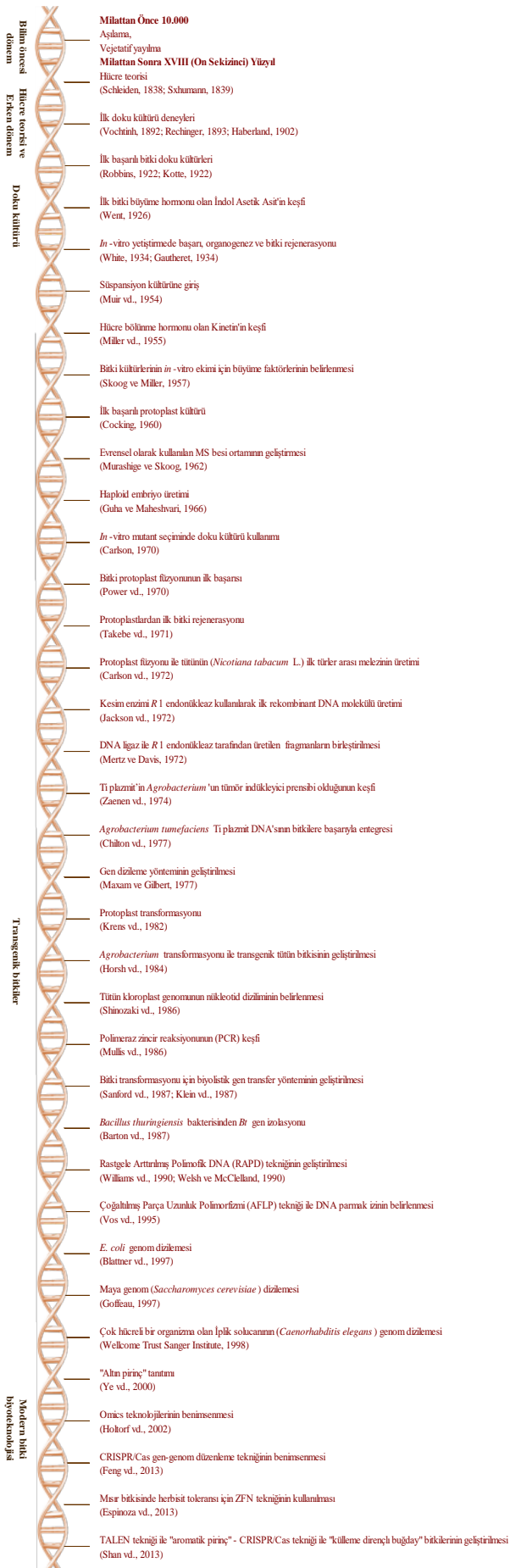
Biyoteknoloji terimi, 1919’da Macar bir mühendis olan Karl Ereky tarafından bildirilmiştir. Biyoteknolojinin kökeni insanoğlunun beslenmesi için ürettiği gıdalara dayanmaktadır. Bununla birlikte, biyoteknoloji, çeşitli gen teknolojilerinin geliştirilmesine yol açacak olan kesim enzimlerinin keşfiyle 1970’lerde yılın en büyük bilimsel devrimi olarak kabul edilmiş ve biyoteknolojik gelişmeler hız kazanmıştır (Muzaffar ve Prasad, 2017).

Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Anlaşması (1992)’na göre biyoteknoloji “Belirli bir kullanıma yönelik olarak ürünlerin ve proseslerin oluşturulması veya iyileştirilmesi için biyolojik sistemlerin, canlı organizmaların ya da bunların türevlerinin kullanıldığı her türlü teknolojik uygulama” olarak tanımlanmaktadır (Tunçgenç, 2014).

Son yıllarda popülerliği giderek artan biyoteknolojik çalışmalar insanoğlunun doğada var olmaya başladığı andan itibaren hayatın her alanında kullanılmaktadır (Verma vd., 2011; Steawart, 2016). Geleneksel biyoteknoloji adı altındaki uygulamalar insanoğlunun başlangıçta bilmeden kullandığı teknikleri (örneğin; maya teknolojisi, enzim teknolojisi, vb.) kapsamaktadır. Modern biyoteknoloji kavramı ise teknoloji ve bilimin ışığında kullanılan tekniklerdir (rekombinant DNA teknolojisi, gen teknolojileri, yeni gıda üretim teknolojileri vb.) (Özgen, 2007).

Multidisipliner bir yaklaşım benimsemesi ve farklı birçok alanda kullanımı ile biyoteknoloji hayatımızı adeta yeniden şekillendirmektedir. Doğa bilimleri (moleküler biyoloji, hücre ve doku biyolojisi, genetik, DNA bilimleri, mikrobiyoloji, fizyoloji, biyokimya, vb.) ile farklı mühendislik dallarından (makine, elektrik-elektronik, bilgisayar, vb.) yararlanan biyoteknoloji her alanda olduğu gibi bitki biyoteknolojisi alanına da faydalar sağlamaktadır (Şekil 2) (Kurt ve Şavşatlı, 2005). Günümüzde birçok besin biyoteknolojik gelişmeler ışığında üretilmekte ve korunmaktadır. Herkesin bildiği gibi gelecekte birçok alanda “Biyoteknoloji Çağı” yaşanacak ve bu teknolojik devrim özellikle baskın bir şekilde tarım-gıda alanlarındaki uygulamalarda sıklıkla kullanılacaktır.





Şekil 3. Bitki biyokimyasının tarihsel süreci

Dünyadaki biyolojik çeşitliliği korumak, yenilenebilir tüm kaynakları sürdürülebilirlik çerçevesinde kullanmak için insanoğlunun doğal yaşam ile uyum içerisinde yaşayacağı bir gelecek yaratılması amacı ile kullanılan Bitki Biyoteknolojisi'nin tarihsel süreci incelendiğinde 10.000 yıl öncesine dayandığı görülmektedir (Şekil 3). Farklı birçok uygulama alanının eşlik ettiği biyoteknoloji içinde yer alan bitki biyoteknolojisi amaca bağlı olarak birçok alanda kullanılmaktadır. (Doyle ve Persley, 1996; Özgen vd., 2005).

Bilim öncesi dönemdeki biyoteknolojide keşiflerin çoğu, esas olarak doğanın ortak gözlemlerine dayanmaktadır. Tarımın keşfi ve tarımsal uygulamalar için daha canlı ve verimli tohumları depolama yöntemi, muhtemelen biyoteknolojinin insanlar tarafından ilk kullanımlarından biri olarak görülmektedir. Tarım çiftçilik için uygun koşulların mevcudiyetini gerektirdiğinden dolayı avcı-toplayıcı dönemdeki insanların su, güneş ışığı ve verimli toprakların bulunduğu yerlere yerleşmesini zorunlu kılmıştır. Bu nedenden ötürüdür ki beslenmesi gereken insanoğlu evlerinden uzakta avlanma zorunluluğunu ortadan kaldırmak için yabancı hayvanların evcilleştirilmesini benimsemiştir. Aynı amaç doğrultusunda bitkilerin evcilleştirilmesi, insanların bitkileri ve bitki ürünlerini güvenilir bir besin kaynağı olarak kullanmaya başlamasıyla 10.000 yıldan daha uzun bir süre önce başlamıştır. Pirinç, arpa ve buğday ilk evcilleştirilen bitkiler arasında yer alırken; yabancı hayvanların seçici olarak evcilleştirilmesi ve yetiştirilmesi, biyoteknoloji ilkelerinin gözlemlenmesi ve uygulanmasının başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Muzaffar ve Prasad, 2017).

Spesifik, istenen özellikler için yapay seçim, insanlar tarafından çağlar boyunca kullanılmış ve tatlı mısır, yüksek süt verimine sahip inekler ve tüsüz kediler gibi çeşitli organizmalarla sonuçlanmıştır. Belirli özelliklere sahip organizmaların sonraki nesillerinin üretilmesi için seçilen bu tür seçimler, doğal olarak oluşan özelliklere bağlıdır. Mısır, seçici yetiştirme yoluyla belirli istenen özelliklerin geliştirildiği bir bitkinin dikkate değer ilk örneğidir. İlk mısır bitkileri (yaklaşık M.Ö. 5.000) çok az çekirdekli ve küçük koçanlara sahip iken; MS 1.500 civarlarında, mısır koçanları beş kat daha büyük ve nesiller boyu seçici üreme nedeniyle oldukça

besleyici çekirdeklerle doluydu. Melezleme aynı zamanda insanlar tarafından iki farklı cins veya türün safkan ebeveynleri ile organizmalar üretmek için de kullandığı en eski biyoteknolojik tekniklerden birisidir (Muzaffar ve Prasad, 2017).

Tarımın keşfinden ve vahşi hayvanların evcilleştirilmesinden sonra, insanlar peynir ve lor yapımı da dâhil olmak üzere gıda işlemeyle ilgili bazı yeni gözlemlerle karşılaşmışlardır. Biyoteknolojinin gelişimi sürecinde, maya ve bakterilerin her zaman ayrı bir yeri olmuştur (Muzaffar ve Prasad, 2017). İnsanların fermentasyonu tesadüfen keşfettiği ve bir mucize veya tanrılarından bir hediye olduğunu düşündükleri varsayılmaktadır. İnsanoğlunun ekmek, alkol ve sirke yapmak gibi çeşitli amaçlar için bu ilk teknolojik gelişmeyi kullandığı bilinen bir gerçektir. Bu nedenle maya bilinen en eski mikroorganizmalardan birisi olarak literatürde yerini almıştır.

XIX. yüzyıl başlarının insanların ortak gözlemlerinin çoğuna bilimsel bir dayanak aradığı yılları kapsadığı görülmektedir. Hollandalı bir tüccar Antonie van Leeuwenhoek basit bir mikroskop kullanarak kumaştaki çok küçük organizmaları gözlemlemiş ve çeşitli büyüteç lensleri ve mikroskoplar tasarlamıştır. Tasarladığı mikroskoplarla birçok mikroskobik organizmayı keşfetmiştir (Gest, 2004). Yaptığı çalışmalardan ötürü ilk mikrobiyolog olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak mikrobiyolojinin babası olarak bilinmektedir. Böylelikle bilim camiasında yepyeni bir mikroskobik yaşam dünyası açılmıştır. Aynı zamanda, bir İngiliz doğa filozofu Robert Hooke bir mantar parçasında boş gözeneklerin olduğunu keşfederek bunlara “Hücre” adını vermiştir. Mikroorganizmaları gözlemek için farklı mikroskoplar tasarlamış ve tüm çizimlerini-gözlemlerini bir anda en çok satan olan “Micrographia” kitabına kaydetmiştir (Hooke, 2003). “Hücre” terimi geniş bir kabul görmüş ve bitki biyoteknolojisinin gelişiminde önemli bir dayanak olmuştur. Bitki biyoteknolojisinin ilk zamanlarında hücrenin tüm canlıların temel yapı birimi olduğunu ifade eden Hücre Teorisi (Cell Theory) ortaya atılmış ve oldukça hızlı bir şekilde kabul görmüştür.

Son kırk yılda, bitki gelişimi için organ, doku ve hücre kültürleri tekniklerini kullanan bitki biyoteknolojisi uzmanlarının sayısında çok hızlı bir artış görülmüştür. O zamanlardan günümüze değişmeyen amaç bitkilerin verimini-kalitesini arttırmak, üretim ve verimliliklerini sınırlayan her türlü sorunla başa çıkmak, azaltmak ya da tümüyle ortadan kaldırmaktır. Bu amaç dâhilinde ilk uygulama bitki hücrelerinin totipotensi yeteneği üzerinedir. Bu kavram Schleiden (1838) ve Schwann (1839)’ın Hücre Teorisi’nin doğasında bulunmaktadır. Devam eden süreçte Hücre Teorisi, Vochting’in (1878) tüm bitki gövdesinin, bitki organlarının çok küçük parçalarından oluşturulabileceğine dair ileri görüşlü gözlemiyle büyük bir ivme kazanmıştır.

Bitki biyoteknolojisinin temellerinin atıldığı XIX. yüzyılın son çeyreğinde Vochting tarafından 1892’de yapılan ilk Bitki Doku Kültürü (Plant Tissue Culture) çalışmaları steril (aseptik) yapay bir besi ortamı içerisinde hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarının kontrollü sıcaklık ve ışık koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesini kapsamaktadır (Thorpe, 2006; Gözükırmızı ve Karlık, 2017). XX. yüzyıla gelindiğinde Haberlandt (1902)’ın bitki hücrelerinin totipotensi yeteneğini göstermek için deneyler yapan ilk kişi olduğu görülmektedir. Çalışmalarından ötürü bitki doku kültürünün babası olarak kabul edilmektedir (Chawla, 2011). Haberlandt çalışmalarında Knop’un (1865) seyreltilmiş besin çözeltisinde izole edilmiş yaprak hücrelerini kültürlemiş ve totipotensi üzerine incelemelerde bulunmuştur. Ancak deneysel materyallerin yetersiz seçimi, yetersiz besinsel içerik ve enfeksiyon nedeniyle büyük ölçüde başarısız olmuştur. Yine de, vejetatif hücrelerden yapay embriyolar üretmenin mümkün olduğunu cesurca öngörmüştür. Böylece bütün bitkileri kültürlenmiş hücrelerden yeniden üretme girişimlerini teşvik etmiştir. Hannig (1904) birkaç turpgil türünden (*Raphanus sativus*, *R. landra*, *R. caudatus* ve *Cochlearia donica*) embriyojenik doku kültürünü içeren yeni bir çalışma alanı başlatmıştır (Lin ve Kwan, (2012). Başarılı doku kültürü çalışmalarına kadar bilim insanları sürekli olarak bu konu üzerinde düşünmekte ve denemeler yapmaktadır. İlk başarılı doku kültürü çalışması birbirlerinden habersiz olan 1922 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde Robbins ve Almanya’da Haberlandt’in öğrencisi olan Kotte tarafından gerçekleştirilmiştir (Kotte, 1922a ve 1922b; Robbins, 1922a ve 1922b). Went (1926) ilk bitki büyüme hormonu olan İndol Asetik Asit’i keşfetti. 1934 yılına gelindiğinde ABD’de White ile



Fransa'da Gautheret yine birbirlerinden habersiz bir şekilde; besin içeriklerinin geliştirilmesi amacı ile uzun süreli veya belirsiz eksiz edilmiş domates köklerinin, tütün ve havucun kambiyal dokularının kültürlenmesi üzerine çalışmışlardır (Gautheret, 1934; White, 1934). Ve de bilinçli bitki materyali seçimi ve aseptik kültürlerin önemini takdir edilmesi gerektiğini her ikisi de ifade etmiştir. (Sussex, 2008; Vasil, 2008). Ball (1946) Beyaz acı bakla (*Lupinus albus* L.) ve Latin çiçeğinin (*Tropaeolum majus* L.) bütün bitkilerini sürgün ucu kültürü ile yetiştirdi. 1950'lere gelinceye kadar kök kültürleri ile ilgili yapılan deneysel çalışmalar; bitki büyümesinde vitaminlerin ve büyüme düzenleyicilerin rolüne dikkat çekmiş ve sürgün-kök ilişkisini hakkındaki bilgilerin gelişmesini sağlamıştır. 1953'te Muir, Kadife çiçeği (*Tagetes erecta* L.) ve Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkilerinin kallus parçalarının sıvı kültür ortamına aktarılırsa ve ortam karşılıklı bir çalkalayıcıda çalkalanırsa; kallus parçalarının, tekli hücrelerin ve hücre kümelerinin bir süspansiyonunu vermek üzere parçalandığını bildirmiştir. Ertesi yıl Muir vd. (1954) çalkalayıcıda büyüyen Kadife çiçeği ve Tütün bitkilerinin kalluslarından izole edilen tek hücrelerinde bölünmeyi indüklemek için Şartlandırma İlkesi'ni uygulamışlardır (Dagla, 2012). Miller vd. (1955) başlangıçta otoklavlanmış ringa sperm ve buzağı timusu (calf thymus) DNA'sından türetilen sentetik bir sitokin türü bileşik olan hücre bölünme hormonu olarak Kinetin'i keşfetmiş ve sitokinlerin normal bitki gelişimi için gerekli olan doğal olarak oluşan bitki hormonları olduğunu bildirmişlerdir. Skoog ve Miller (1957), besin ortamındaki sitokin/oksin oranının (indol 3-asetik asit ve ilgili bileşikler) bitki doku kültüründe köklerin ve sürgünlerin morfogenezini derinden etkilediğini göstermiştir. Sitokin oranının hücre genişlemesi, yaprak yaşlanmasının inhibisyonu, kloroplast gelişimi, besinlerin mobilizasyonu ve kök ve sürgün dallanması dâhil çok sayıda bitki gelişim sürecini etkilediğini bulmuşlardır (Eckardt, 2003). Steward vd. (1958) ve Reinert (1958 ve 1959) yabancı havucun (*Daucus carota*) kallus kümelerinden ve hücre süspansiyonundan embriyoları rejenere etmişlerdir. Cocking (1960) 0,6 M sakaroz içinde bir fungal selüloz (selülozu hidrolizleyen enzim) kullanarak hücre duvarının enzimatik yapısını bozarak protoplast ilk kez izole edilmiştir. Bu çalışma kök ucu hücrelerinden protoplastların salınmasıyla ilgili ilk başarılı protoplast kültür raporudur. Akabinde hücre duvarını parçalayan enzimler tarafından salınan protoplastlar birçok bitki dokusundan hazırlanmıştır. Bergmann (1960) hücre süspansiyonunu filtrelemiş ve kaplama yoluyla tek hücreleri izole etmiştir. Kanta (1960) Gelincik bitkisinde (*Papaver rhoeas* L.) ilk başarılı test tüpü gübrelemesi tekniğini geliştirmiştir. En evrensel olarak kullanılan yüksek tuz konsantrasyonlu MS ortamı, Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilmiştir. Mineral tuzlara ek olarak ortam, bir enerji kaynağı, vitaminler ve büyüme düzenleyicileri içermektedir.

XX. yüzyılın üçüncü çeyreğinde bitki doku kültürünün geliştirilmesinde bir başka dönüm noktası, Guha ve Maheshwari'nin (1966) Boru çiçeğinden (*Datura innoxia* Mill.) polen tanelerinden Anter kültürü ile haploid embriyolar elde etmesiyle haploid bitkilerin keşfini sağlamışlardır. Doku kültürlerinde bütün bitkilerin farklılaşması, sürgün ve kök farklılaşması yoluyla meydana gelebildiği gibi alternatif olarak hücreler, somatik embriyoları yol açmak için embriyojenik gelişimden geçirilerek de oluşturulabilmektedir. Ayrıca haploidler, sadece bir gen grubuna sahip olduklarından, teorik ve pratik amaçlarla mutasyonların tanıtılmasında son derece değerlidir. Bu yöntemle elde edilen homozigot diploidler, giderek daha önemli bir bitki yetiştirme yöntemi haline gelen hibrit canlılıktan yararlanmak için gerekli olan soy içi üreme üretimindeki uzun gecikmeleri ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle, bu tekniğin bitki ıslahı ve genetik araştırmalardaki potansiyel etkisi geniş kapsamlıdır (Pandey, 1973). Carlson (1970) doku kültüründen elde edilen varyasyonlar kullanılarak *in-vitro* biyokimyasal mutantların seçimini gerçekleştirmiştir. Power vd. (1970) ilk bitki protoplast füzyonunu keşfetmişlerdir. Takebe vd. (1971) protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Carlson vd. (1972) protoplast füzyonu ile tütünün (*Nicotiana tabacum* L.) ilk türler arası melezini üretmişlerdir. Jackson vd. (1972) kesim enzimi (*R1* endonuclease) kullanarak ilk rekombinant DNA molekülünü üretmişlerdir. Mertz ve Davis (1972) DNA ligazın aktivasyonu ile aynı kesim enzimi (*R1* endonuclease) tarafından üretilen, kökenlerine bakılmaksızın iki kesim fragmanını birleştirmişlerdir. Cohen vd. (1973) DNA ligaz kullanılarak bakterilerin dairesel plazmid DNA'sına DNA molekülünün *EcoR1* fragmanının hibrit plazmid yerleştirilmesini geliştirmek için Lobban ve Kaiser tekniğini kullanmış ve Afrika pençeli kara kurbağasından aldıkları geni bakterilerin

plazmid DNA'sına yerleştirmişlerdir. Reinhard (1974) bitki doku kültüründe biyotransformasyonu tanıtmıştır. Zaenen vd. (1974) Ti plazmid'in *Agrobacterium*'ün tümör indükleyici prensibi olduğunu keşfetmişlerdir. Gengenbach ve Green (1975) Mısır Yaprak Yanıklığı etmeni (*Helminthosporium maydis*) için T toksinine dirençli mısır kallus kültürlerinin *in-vitro* pozitif seçimini gerçekleştirmişlerdir. O'Farrel (1975) proteomiklerin geliştirilmesine olanak sunan yüksek çözünürlüklü 2 Boyutlu jel elektroforez prosedürünü geliştirmiştir. Seibert (1976) karanfilin dondurularak saklanan sürgün uçlarından sürgün başlamasını keşfetmiştir.

XX. yüzyılın son çeyreğinde, Rekombinant DNA (Recombinant DNA - rDNA) teknolojisinde devrim yaratan ve çeşitli ürünler için transgenik bitkilerin geliştirilmesine yol açan çeşitli gen transfer tekniklerinin geliştirilmesine tanık olmuştur. Ayrıca yine aynı yıllar içerisinde Kesim Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) tekniği geliştirilmiştir. Chilton vd. (1977) *Agrobacterium tumefaciens*'in Ti plazmid DNA'sını bitkilere başarıyla entegre etmişlerdir. Maxam ve Gilbert (1977) DNA zincirinin bozulmasına dayanan bir gen dizileme yöntemi geliştirmişlerdir. Melchers vd. (1978) domates ve patatesin somatik hibridizasyonu sonucunda domates elde etmişlerdir. Marton vd. (1979) bitki protoplastlarının *Agrobacterium* ile transformasyonu için ortak bir yetiştirme prosedürü geliştirmişlerdir. Zambryski vd. (1980) T37 tütün kök ur DNA'sının tüm *EcoR1* parçasını bir faj vektörüne klonlayarak T-DNA'nın yapısı üzerinde çalışmalar gerçekleştirerek T-DNA sınır dizilerinin izolasyonu sağlamış ve ayrıntılı incelemelerde bulunmuşlardır. Larkin ve Scowcroft (1981) somaklonal varyasyon terimini tanıtmışlardır. Krens vd. (1982) çıplak DNA'nın protoplastlar tarafından dâhil edilmesinin izole DNA'lı transformasyonla sonuçlandığını bildirmişlerdir. Pelletier vd. (1983) turpgiller (*Cruciferae*) ve kolza bitkisinde (*Brassica campestris* L.) türler arası sitoplazmik hibridizasyon gerçekleştirdiğini ifade etmişlerdir. Horsh vd. (1984) *Agrobacterium* ile transformasyon yoluyla transgenik tütün geliştirmişlerdir. Abel vd. (1986) TMV virüsüne dayanıklı tütün ve domates transgenik bitkilerini, TMV'nin kaplama protein geninin cDNA'sını kullanarak geliştirmişlerdir. Shinozaki vd. (1986) tütün kloroplast genomunun nükleotid dizilimini belirlemişlerdir. Mullis vd. (1986) polimeraz zincir reaksiyonunun keşfini sağlamışlardır. Sanford vd. ve Klein vd. (1987) bitki transformasyonu için biyolistik gen transfer yönteminin geliştirmişlerdir. Barton vd. (1987) *Bacillus thuringiensis* bakterisinin *Bt* genini izole etmişlerdir. Williams vd. ve Welsh ve McClelland (1990) Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) tekniğini geliştirmişlerdir. Fodor (1991) ışığa yönelik kimyasal sentez sistemini kullanarak DNA mikrodizi sistemini geliştirmiştir. Vos vd. (1995) Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP) tekniği ile DNA parmak izini belirlemişlerdir. Blattner vd. (1997) *E. coli* genomunu dizilemişlerdir. Goffeau (1997) maya genomunu (*Saccharomyces cerevisiae*) dizilemiştir. 1998 yılında "Wellcome Trust Sanger Enstitüsü" tarafından çok hücreli bir organizma olan İplik solucanı (*Caenorhabditis elegans*) genomu dizilenmiştir. Altın Pirinç kayda değer bir transgenik örnek olarak Ye vd. (2000) tarafından tanıtılmıştır.

Tüm genom çalışmalarının hız kazandığı XXI. yüzyıl Omik teknolojileri açısından büyük önem arz etmektedir. Holtorf vd. (2002) Omik teknolojisini benimsemişlerdir. Goff vd. ve Yu vd. (2002) pirinç (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) ve (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) genomlarını dizilemişlerdir. Mevcut moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılan ileri yaklaşımlardan biri, gen fonksiyonunu incelemek için bir organizmanın (veya tek bir hücrenin) genomunun spesifik olarak düzenlenmesidir (Li vd., 2015). Bu biyoteknoloji ve genetik mühendisliği tekniği, "Nature Methods" tarafından "2011-Yılın Metodu" olarak seçilen "genom düzenlemesi" olarak bilinmektedir. Bu çığır açan teknolojik gelişme peşi sıra birçok tekniğin gelişmesine ve keşfine yol açmıştır. Ek olarak, son on yılda, genetiğiyle oynanmış nükleazlar, genom düzenleme için umut verici araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Pekçok genom düzenleme teknoloji üzerinde çalışmış olan Feng vd. (2013) gen düzenleme teknolojilerinde CRISPR - Cas9 tekniğini başarılı bir şekilde uygulamışlardır. Son zamanlarda, çinko parmak nükleazları (ZFN'ler), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve kümelenmiş düzenli aralıklarla serpiştirilmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) - Cas sistemleri, bitkilerde istenen çeşitli özellikleri geliştirmek için spesifik genomik düzenleme için

kullanılmaktadır. (Urnov vd, 2010). Espinoza vd. (2013) mısır bitkisinde herbisit toleransı geliştirmek için bir transgen ekspresyon kasetini hassas ve bölgeye özgü olarak yerleştirmek adına ZFN tekniğini kullanmışlardır. Shan vd. (2013) TALEN aracılığıyla aromatik pirinç ve CRISPR - Cas sistemi aracılığıyla külleme dirençli buğday bitkileri geliştirmişlerdir.

## 2.2. Teknolojik Gelişmeler

Değişim ve gelişim dünya genelinde birçok alanda hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Teknolojik gelişmeler ve dijitalleşme ile birlikte bu hız inanılmaz seviyelere çıkmaktadır. Biyoteknolojinin de her geçen gün daha fazla ilerleme kaydettiği düşünüldüğünde, farklı pek çok alanda biyoteknolojinin etkisini ve biyoteknolojik ürünleri görmek bizleri şaşırtmamalıdır.

### 2.2.1. Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Metotlar

Klasik biyoteknoloji biyolojik organizmaların (maya, bakteri ve mantar vb.) genomik yapılarında herhangi bir değişiklik yapılmadan kullanıldığı ve istenilen ürünlerin üretilmesi amacıyla kullanılan teknikler bütünü olarak tanımlanmaktadır. Fermantasyon Teknolojilerinin kullanıldığı bu dönemde gelişen bilim ve teknolojinin bitki biyoteknolojisinde kullanılması modern biyoteknoloji çağının başlamasına neden olmuştur. Ekonomik bir değere sahip yeni ürünler elde edilmesi amacıyla bütün bilimsel metot ve tekniğin kullanımı olarak tanımlanan bu teknoloji bitki, hayvan ve mikroorganizma yapılarında *in-vitro* koşullarda değişiklikler-geliştirmeler yapıldığı yöntemler bütünüdür. Bitki biyoteknolojisi açısından modern biyoteknolojik teknik ve yöntemlerden yararlanılarak hastalık ve zararlılara, stres ve çevre koşullarına dayanıklı, besin içeriği yüksek, yüksek verim ve kaliteye sahip bitki ve tohumların üretimini kapsamaktadır (Polat ve Yağdı, 2021). Yeni teknolojiler, hedeflerin tanımlanması ve manipülasyonu için daha iyi bir yaklaşım sağlamanın yanı sıra türe özgü engellerin ortadan kaldırılmasını da sağlamaktadır (Chawla, 2011).

#### 2.2.1.1. Bitki Doku Kültürü

Biyoteknolojide *in-vitro* kültür veya Bitki Doku Kültürü (Plant Tissue Culture) terimi genel olarak bitkilerin, tohumların, bitki parçalarının (dokular, organlar, embriyolar, tek hücreler, protoplastlar vb.) aseptik (*in-vitro* yani laboratuvar veya steril ortam) koşullar altında besi ortamları içerisinde kültüre alınarak üretilmesini içermektedir (Wang ve Ha, 2007). Kısaca; bitkilerin *in-vitro* koşullarda, mevsime bağlı olmaksızın, küçük bir alanda ve fazla miktarda üretilmesi olarak tanımlanabilir. Teknik, genlerin ayrıntılı bir şekilde manipüle edilmesini sağlamakta ve bitki hücrelerinin totipotent özelliği ile yakından ilişkilidir. Buna ek olarak teknikte kullanılacak olan besi ortamları bitkilerin normal büyüme ve gelişimi için gerekli tüm besin maddelerini (makro ve mikro besinler, vitaminler, diğer organik bileşenler, bitki büyüme düzenleyicileri, karbon kaynağı ve katı ortam kullanılacaksa bazı jelleştirici ajanlar) içermektedir. Besi ortamlarının pH değeri (5.4 ile 5.8 aralığı ideal olan) hem bitkilerin büyümesini hem de bitki büyüme düzenleyicilerinin aktivitesini etkilediğinden oldukça önemlidir (Cardoza, 2008).

Oksin, sitokinin ve giberellin en yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir. Kullanılan hormonların türü ve konsantrasyonu temelde bitkinin türüne, kültürü yapılan doku veya organa ve gerçekleştirilecek deneyin amacına bağlı olarak belirlenmektedir. Oksin ve sitokinin dengesinin çok iyi ayarlanması gerekmektedir. Bu orandaki herhangi bir uyumsuzluk kallus olarak bilinen farklılaşmamış hücre kütlelerinin gelişmesine neden olacaktır. Oksinlerin yüksek konsantrasyonu genellikle kök oluşumunu desteklerken, sitokininlerin yüksek konsantrasyonu sürgün rejenerasyonunu desteklediği literatürde yer almaktadır (Rout, 2004). Giberellin ise gelişmiş büyüme ve hücre uzamasını teşvik etmek için kullanılır. Murashige ve Skoog ortamı (MS ortamı), birçok bitki türünün *in-vitro* vejetatif çoğaltılması için en yaygın şekilde kullanılmaktadır (Phillips ve Garda, 2019).

Gelişmekte olan bir teknoloji olarak, bitki doku kültürü artan dünya nüfusu taleplerini karşılamak amacı ile tarımsal anlamda birçok ülke tarafından hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitki materyali üretimi için sıklıkla başvurulan bir tekniktir. Bitki ikincil metabolitleri ilaç, koku, pigment, gıda katkı maddeleri ve pestisitler gibi ekonomik açıdan oldukça önemli pek çok alana hizmet etmektedir. İkincil

metabolitlerin kontrollü üretimi için, nesli tükenme tehlikesi altında olan veya endemik bitkilerin üretilmesi amacı ile de kullanılabilir (Cardoza, 2008). Bitkilerden tıbbi bileşiklerin üretimine alternatif arayışında, biyoteknolojik yaklaşımların, özellikle bitki doku kültürlerinin, biyoaktif bitki metabolitlerinin endüstriyel üretiminde geleneksel tarıma ek olarak büyük bir potansiyeli vardır (Ranabhatt ve Kapor, 2017).

Günümüzde birçok biyoteknolojik disiplin (gen aktarımı, gen tedavisi ve doku mühendisliği vb.) *in-vitro* kültür koşullarını temele alan bir multidisipliner çalışma ağı oluşmaktadır. Sentetik biyoloji, kapsamında çeşitli hücre kültürlerinin biyosentetik yetenekleri, son on yılda birkaç ülkedeki bir grup bitki bilimci, mikrobiyolog, tarafından araştırılmaktadır. Özellikleri geliştirmek için genetik mühendisliği, haploid indüksiyon veya somaklonal varyasyon gibi tüm biyoteknolojik yaklaşımlar, güçlü bir şekilde verimli bir *in-vitro* bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. *In-vitro* teknolojisi kriyoprezervasyon yoluyla tıbbi bitkilerin genetik çeşitliliğinin ve germplazmalarının korunmasını ve rekombinant DNA teknolojisi ve moleküler markörler aracılığı ile gen aktarımını sağlamaktadır (Narula vd., 2004). Bu doğrultuda tarımsal kalkınma ve verimlilikte büyük bir rol oynamakta ve günümüz modern tarım teknolojisinin vazgeçilmez bir aracı konumundadır.

### 2.2.1.2. Rekombinant DNA Teknolojisi

Bitki biyoteknolojisindeki heyecan verici yeni buluşlar; tekniklerin gelişimini hızlandırmaktadır. DNA yapısının anlaşılması, işlev ve fonksiyonlarının öğrenilmesi ile günümüz dünyasında var olan teknikler geliştirilmekte ve de gelişen birçok bilim dalı ile ortaklaşa çalışılması sorunların çözümü için yeni teknolojilerin gelişimini sağlamaktadır. Geliştirilen yeni teknikler eski tekniklerin duyarlılığını büyük ölçüde geliştirmektedir. Ancak yine de Gen klonlama ve Gen manipülasyonu süreçlerini açıklamak için bazı temel tekniklerin anlaşılması esastır.

Rekombinant DNA teknolojisi (Recombinant DNA Technology - rDNA) nin gelişimi ve hücre ve doku kültüründen morfogenezi kontrol eden verimli sistemler (Singh vd., 2004), bitkilerin hücresel düzeyde genetik manipülasyonu için fırsat sağlamıştır. Bitkilerdeki temel mekanizmaların moleküler düzeyde aydınlatılmasına çok büyük katkı sağlamıştır. Yapay veya rekombinant DNA teknolojisi için ilk itici güç, 1970'lerin başında *E. coli*'nin transformasyonu, DNA moleküllerinin kesilmesi ve birleştirilmesi ve kesme-birleştirme reaksiyon ürünlerinin izlenmesi için tekniklerin eşzamanlı olarak geliştirilmesiyle ortaya çıkmıştır (Curtis ve Mann, 2016).

Bitki genomunun yapısı ve ifadesi hakkındaki bilgimiz, büyük ölçüde rDNA veya gen klonlama tekniklerinin kullanılmasıyla elde edilmiştir. Bu teknoloji, belirli DNA parçalarının izolasyonuna ve karakterizasyonuna izin verir ve DNA dizilerini bakteri hücrelerine klonlayarak, analiz için büyük miktarlar verecek şekilde kopyalanabilirler. Gen yapısı ve ekspresyonu ile ilgili birçok temel bilgiyi sağlamanın yanı sıra rDNA teknolojisi, genetik materyali özel olarak manipüle etme ve bu materyali farklı organizmalar arasında taşıma fırsatı sağlar (Chawla, 2011).

### 2.2.1.3. Gen Klonlama

Gen klonlama kısaca, tek bir gen dizisinin, kopyalanabileceği bir bakteriye sokulmasıyla izolasyonu, amplifikasyonu ve yeniden konakçı genomuna dâhil edilmesi olarak tanımlanabilmektedir. Bir DNA parçasının klonlanması, tek bir orijinal molekülden belirsiz miktarlarda üretilmesine olanak tanımaktadır. Klonlama teknolojisi, farklı kaynaklardan gelen DNA dizilerini birleştirerek yeni DNA moleküllerinin oluşturulmasını içerdiğinden elde edilen ürünlere rekombinant DNA adı verilir. Bu tür kompozit veya yapay DNA moleküllerinin yapımı, biyokimyasal yollarla yeni genetik kombinasyonlar yaratma potansiyeli nedeniyle genetik mühendisliği veya gen manipülasyonu olarak da adlandırılmaktadır. Gen klonlama sürecini anlamak, yani rekombinant DNA molekülünün inşası için bir vektöre bir yabancı DNA parçası eklemek için, çeşitli vektörleri, DNA moleküllerini belirli bölgelerde kesme ve birleştirme mekanizmasını ve kesme-birleştirme reaksiyonunun izlenmesi için bir yöntem olarak jel elektroforezi kullanımını anlamak gerekmektedir. Gen klonlamada, gerekli bir gen ürününü kodlayan bir DNA parçası, konakçı organizmadan çıkarılmalı ve rekombinant DNA molekülü oluşturmak için bir vektör molekülüne (örneğin plazmid, faj, kozmid) taşınmalıdır. Bu da,

DNA moleküllerinin belirli bölgelerde kesilmesini ve kontrollü bir şekilde tekrar birleştirilmesini içermektedir.

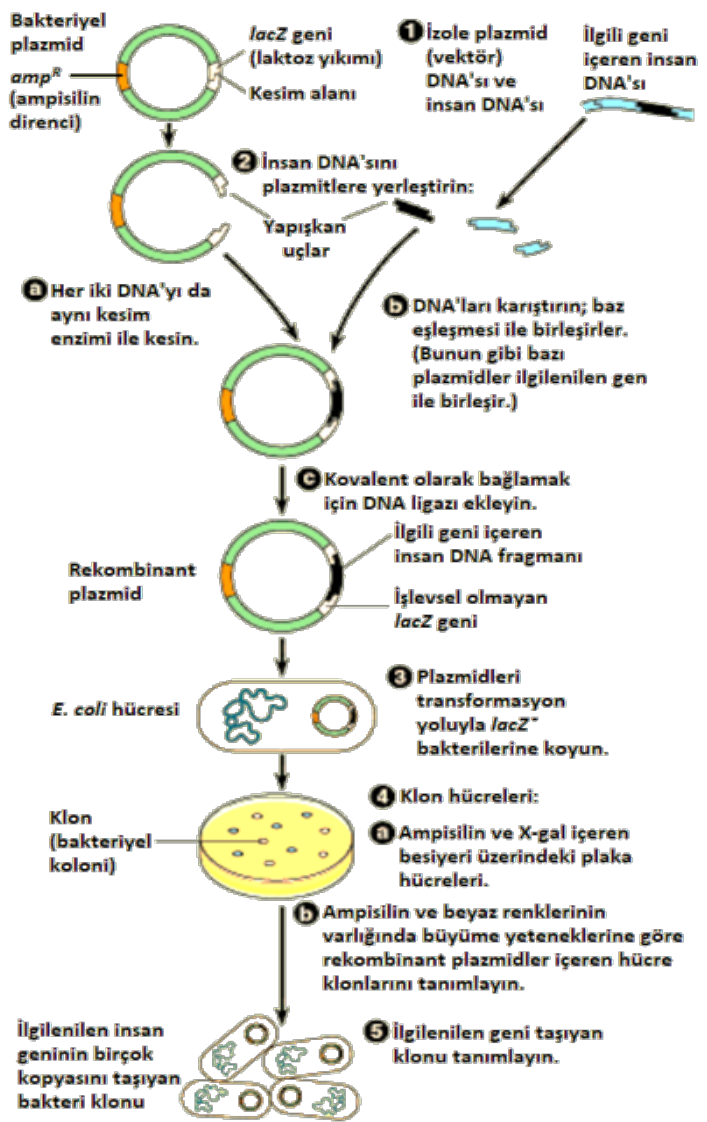
DNA parçalarını birleştirmek için kullanılan enzimlere DNA ligazları denir. DNA ligase nükleotidlerin fosfodiester bağ oluşumunu katalize eden bir enzimdir. Vektör DNA ve yabancı DNA'nın her ikisi de aynı kesim enzimi ile kesildiğinde, vektörün ve yabancı DNA'nın örtüşen uçları uyumlu ve tamamlayıcıdır. Bu DNA fragmanları ve vektör molekülleri, üst üste binen terminal tek sarmallı DNA dizileri arasında tamamlayıcı baz çiftleri oluşturarak birlikte karıştırılmaktadır. Ligazlar, 5' terminal fosfat gruplarıyla DNA substratları üzerinde etki ederek onları birleştirmek için iki DNA dizisi (vektör molekülü ve klonlanacak DNA) arasında fosfodiester bağını oluşturmaktadır. Bu, rekombinant bir DNA molekülünün yapımındaki son adımdır ve ligasyon olarak tanımlanmaktadır. Klonlama işlemi temel olarak 4 basamakta (izolasyon, birleşim, transfer ve seçme-görme) gerçekleşmektedir (Şekil 4) (Benjamin/Cummings, 2004).

Restriksiyon enzimleri ve plazmidler gen klonlama teknolojisinin iki temel bileşenidir.

### 2.2.1.3.1. Restriksiyon (Kesim) Enzimleri

Günümüz DNA teknolojisi, tamamen kesim endonükleazları ile belirli bölgelerde DNA moleküllerini kesme yeteneğine bağlıdır. 1970'den önce, çift iplikçikli bir DNA molekülünü kesmek için mevcut bir yöntem mevcut değildir. Konak kontrollü kesim ve modifikasyonla ilgili olguların anlaşılması ile kesimin spesifik endonükleazlar içerdiği keşfedilmiştir. Kesim, hücreye gelen DNA'nın (örn. bakteri) tanımlanması ve yabancı DNA olarak tanımlanması durumunda parçalara ayrılarak yok edilmesi anlamına gelmektedir (Chaw, 2011). Genetik mühendisliğinin doğuşu ve modern araştırmalarda moleküler tekniklerdeki ilerleme, kısıtlama endonükleazlarının keşfi sayesinde mümkün olmuş ve günümüz teknikleri için kesim endonükleazları genetik mühendisliğinin ayrılmaz bir parçası haline almıştır (Shankar vd., 2017).

DNA kesen enzimler topluluğu olan restriksiyon enzimleri DNA molekülünü, DNA dizisindeki nükleotidleri birleştiren fosfodiester bağını keserek birbirlerinden ayırmaktadır. Substrat özelliğinden dolayı tüm restriksiyon enzimleri DNA'yı aynı yerden kesmemekte ve DNA dizilerindeki tanıma ve bölünme pozisyon bölgelerine göre adlandırılmaktadırlar. Restriksiyon enzimlerinin keşfi ile birlikte bilim insanlarına gen klonlamayı mümkün kılan makasların keşfinin kapılarını açmıştır (Curtis ve Mann, 2016).



Şekil 4. Gen klonlama

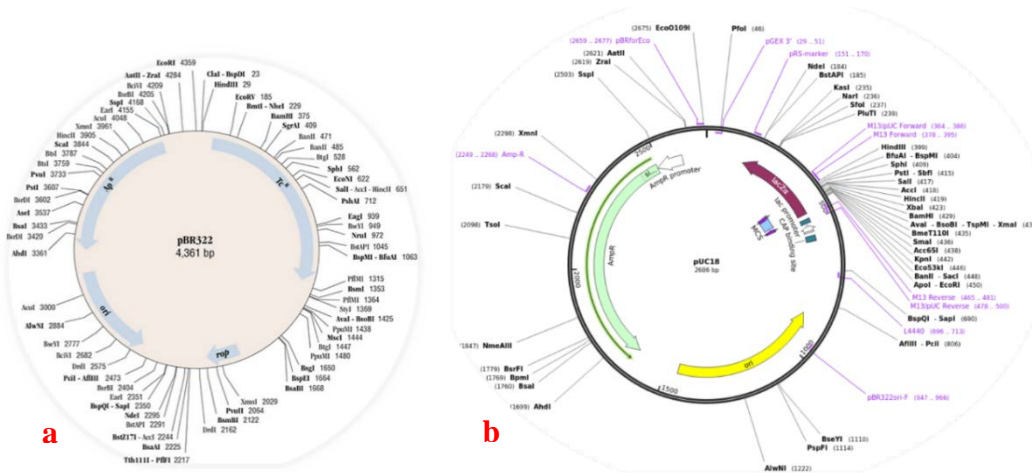
### 2.2.1.3.2. Plazmidler ve Vektörler

Plazmidler, hücrede kromozom dışı birimler olarak bulunan çift sarmallı, kapalı dairesel DNA molekülleridir. Kendilerini çoğaltarak bağımsız olarak kalıtılmaktadırlar. Çeşitli bakteri türlerinde bulunmakta ve yardımcı genetik birimler gibi davranmaktadırlar. Genel olarak toksin genlerini kodlayan virülans plazmidler, antibiyotiklere direnç kazandıran ilaca dirençli plazmidler ve bakteri konjugasyonu için gerekli genleri kodlayan plazmidler olmak üzere 3 çeşit plazmid mevcuttur. Plazmidlerin boyutu 1 ila 200 kb arasında değişmektedir. Temel olarak tüm moleküler klonlama yöntemleri, farklı plazmidlerin bazı yönlerini kullanan spesifik DNA parçalarını manipülasyonunu içermektedir.

Tanımlanmış olan plazmid kodlu genlerin çoğu, bakteri konakçısına bir miktar büyüme avantajı sağlamakta ve bir bakteri hücresinde, maya hücresinde ve hatta ökaryotik hücrelerin organellerinde (mitokondri) karakteristik sayıda kopyalar halinde bulunmaktadır. Bu plazmidler, hücre başına bir plazmid DNA olarak tutulan tek kopyalı plazmidler veya hücre başına 10-20 genom olarak tutulan çok kopyalı plazmidler olarak iki sınıf altında toplanabilir. Ayrıca rahat replikasyon kontrolü altında olan ve böylece çok büyük sayılarda (hücre başına 1000 kopyaya kadar) birikimlerine izin veren plazmidler de mevcuttur. Klonlamada kullanılan çoğu plazmit, rahat bir replikasyon moduna sahip özelliktedir.

Yabancı DNA'yı bakterilere klonlamanın içerdiği tehlike hakkındaki tartışmalar, vektörlerin muhafazayla ilgili olarak klonlanması gereksinimlerine yol açmıştır. Genetiğiyle oynanmış plazmidler (Genetically Engineered Plasmid - GEP) konjugasyon yoluyla doğada yayılamayacağından klonlama vektörleri kendi kendine bulaşan plazmidler olmamalıdır. Plazmidler, plazmid DNA'nın eşlenik transferinde yer alan pili üretimine izin veren transfer (*tra*) genleri içerdiklerinde kendi kendine bulaşabilmektedirler. Aynı hücrede bu *tra* genlerini içermeyen ikinci bir plazmid de mevcutsa, mobilizasyon (*mob*) genlerini içerdiği sürece o da aktarılacaktır. Bu tür plazmidlerin daha sonra mobilize oldukları literatürlerde mevcuttur. Bu bakımdan laboratuvar ortamında kullanılan plazmitlerin tamamından, laboratuvar ortamından kaçmaları durumunda rekombinant plazmidlerin kendi kendine iletim veya mobilizasyon olasılığını önlemek amacıyla *tra* ve *mob* genlerinin silinmesi gerekmektedir.

rDNA teknolojisindeki veya gen klonlamadaki en önemli unsurlardan biri vektördür. Rastgele bir DNA, bir cDNA segmenti veya spesifik gen, uygun konakçı hücrelerde çok sayıda çoğaltılabilen rDNA molekülünü oluşturmak üzere bir vektöre bağlanmaktadır. Bu bir klonlama vektörüdür. Farklı tipte konakçı hücrelerde kullanım için farklı tipte birçok klonlama vektörü mevcuttur. En çok bilinen plazmid vektörlerdir. Ayrıca kozmidler, fajlar, fajmidler, maya yapay kromozomları, transpozonlar, bakteriyel yapay kromozomlar vb. gibi klonlama vektörleri de kullanılan diğer vektör türleridir (Rai ve Arya, 2021). Klonlama teknolojisinde pBR322 ve pUC18 vektörleri sıklıkla kullanılan birer gen klonlama vektörüdür (Şekil 5) (Stewart, 2016).



Şekil 5. (a) pBR322, (b) pUC18 vektörleri

pBR322 (plasmid Boliver&Rodriguez) ilk yapay klonlama vektörlerinden biridir ve şüphesiz şimdiye kadar en yaygın olarak kullanılan klonlama vektörü özelliğindedir. 4.36 kb uzunlukta çift sarmallı bir klonlama vektörüdür (Sambrook vd., 1989). Bu plazmit vektörü, doğal olarak oluşan üç farklı plazmidten kaynaklanan parçalardan bir araya getirilmiştir. Rahat çoğaltma kontrolü ile ColE1 çoğaltma ori içermektedir. pBR322 ve tüm türevleri çoğaltılabildiğinden plazmidlerin büyük miktarlarını izole etmeyi kolaylaştırmaktadır.

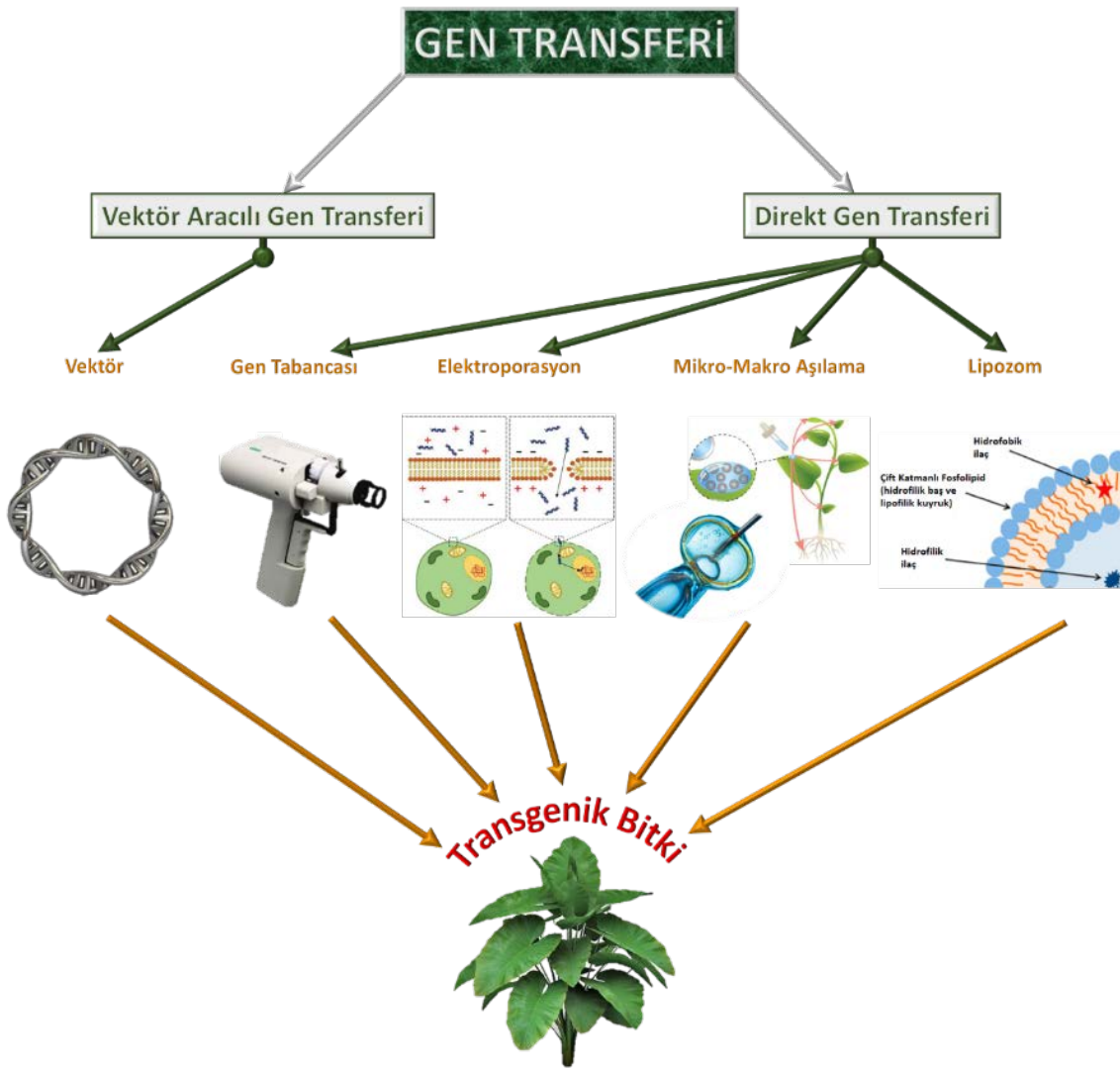
pBR322 antibiyotiğe dirençli iki gen içermektedir.  $\beta$ -laktamaz (ampisilini *E. coli* için toksik olmayan bir forma dönüştürür) kodlayan ampisilin direnci (ampR) geni ve diğeri tetrasiklini detoksifiye eden enzimleri kodlayan bir dizi tetrasiklin direnç (tetR) genidir. Bu iki direnç geninin mevcudiyeti, pBR322 ile transforme edilmiş bir bakterinin ampisilin ve tetrasiklin içeren bir ortamda büyüyebileceğini, buna karşın plazmidten yoksun hücrelerin büyüemeyeceğini göstermektedir. Plazmid, kesim enzimleri için 20 benzersiz tanıma bölgesi içermektedir. Bu bölgelerin altısı (EcoRV, BamHI, SphI, SalI, XmaIII ve NruI) tetrasiklin direncini kodlayan gen içerisinde yer almaktadır. HindIII ve ClaI bölgeleri tetrasiklin direnç geninin promotörü içinde yer alırken; PstI, PvuI ve Scal bölgeleri  $\beta$ -laktamaz geni içinde yer almaktadır (Chawla, 2011).

pUC18 (plasmid University of California) 18 ise ayırt etmek amacı ile verilen bir sayıdır. Bu plazmidler 2.7 kb'dir ve pBR322'ye benzer şekilde bir ColE1 replikasyon ori'sine sahiptir. Bu vektörler ampR genini ve  $\beta$ -galaktosidaz enzimini kodlayan *E. coli*'nin lac operonundan türetilen lacZ adlı yeni bir geni içermektedirler.

#### **2.2.1.4. Gen Transferi**

İstenen özelliğe sahip genlerin konak bitkilere transferinin ve transgenik bitkilerin oluşturulmasını sağlayan bitki doku kültürünün kullanıldığı teknolojilerdir. Ayrıca gelişen dünya ve bilim-teknik multidisipliner çalışmaların kapılarını aralamıştır. Bunlardan birisi olan ve son yüzyıla önemli katkıları bulunan Genetik Mühendisliği, belirli genetik bilgilerin bir organizmadan diğerine transferini içeren bir dizi yeni tekniği ifade etmektedir. Bu teknikler yalnızca hücre ve moleküler seviyelerde genetik manipülasyonu içermektedir (Low vd., 2018). Gen transfer teknolojilerinin bitki biyoteknolojisi ve ıslah programlarına entegre edilmesi bitkilerin genetik olarak iyileştirilmesinde, bitki popülasyonlarına genetik çeşitlilik kazandırmak, istenen özellikler için genleri taşıyan üstün bitkileri seçmek ve bitki çeşitlerinin çeşitliliğini korumak, hastalık ve zararlılara dirençli bitkiler, tohumlar geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu amaçlar dâhilinde geleneksel veya klasik tekniklerin kullanımı zaman, pratiklik ve verim-kalite açısından sorunlar yarattığından dolayı bitkilerde gen transfer teknolojisi tekniklerinin gelişimi oldukça hız kazanmıştır (Ranabhatt ve Kapur, 2017).

Gen transferinde aktarılan gen "Transgen" olarak bilinmektedir. Teknolojik tekniğin amacı, önemli genlerin (zararlı ve hastalık direnci, kuraklık ve soğuğa tolerans, herbisit direnci, gelişmiş ürün kalitesi, vb.) mevcut çeşitlere dâhil edilmesi yoluyla istenilen özellikteki gelişmiş çeşitler üretmektir. Ancak soru işaretleri ile dolu bir yöntem olması ve karmaşık-çok genlerle ilişkili özellikleri yöneten genlerin değişimi zordur (Singh vd., 2004). Gen transferi için bilinen 2 farklı yol mevcuttur (Şekil 6).



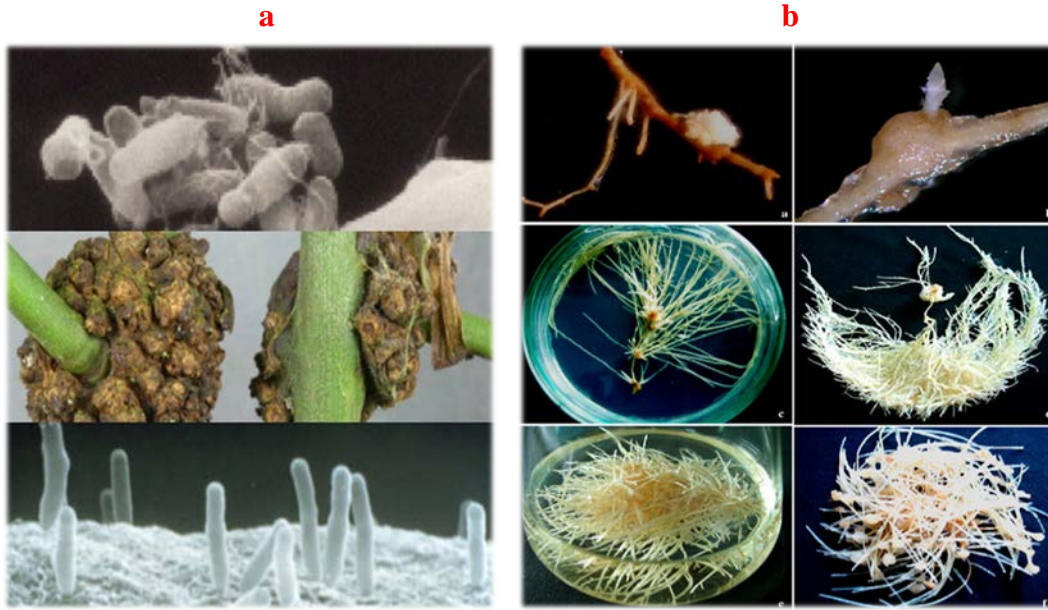
Şekil 6. Vektör aracılı ve Direkt gen transferi

### a. Vektör Aracılı Gen Transferi

Bitki gen vektörü terimi, hem bitkiler arasında genetik bilginin transferi hem de diğer organizmalardan (bakteri, mantar ve hayvanlar) bitkilere genetik bilginin transferi için bir potansiyele sahiptir. Vektöre bağlı gen transfer yöntemleri arasında, bitki hücrelerinde yabancı genlerin ekspresyonu için en yaygın olarak *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon kullanılmaktadır. *Agrobacterium* aracılı transformasyon, tarihsel olarak ilk başarılı bitki transformasyon sistemidir ve 1983'te bitki genetik mühendisliğinde çığır açan bir dönüm noktası olmuştur (Sah, 2017). Bitkilerde gen manipülasyonundaki atılım, bakteriyel bitki patojenleri *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* tarafından taşınan plazmidlerin karakterizasyonu ve bunlardan yararlanılması ile mümkündür (Curtis ve Mann, 2016).

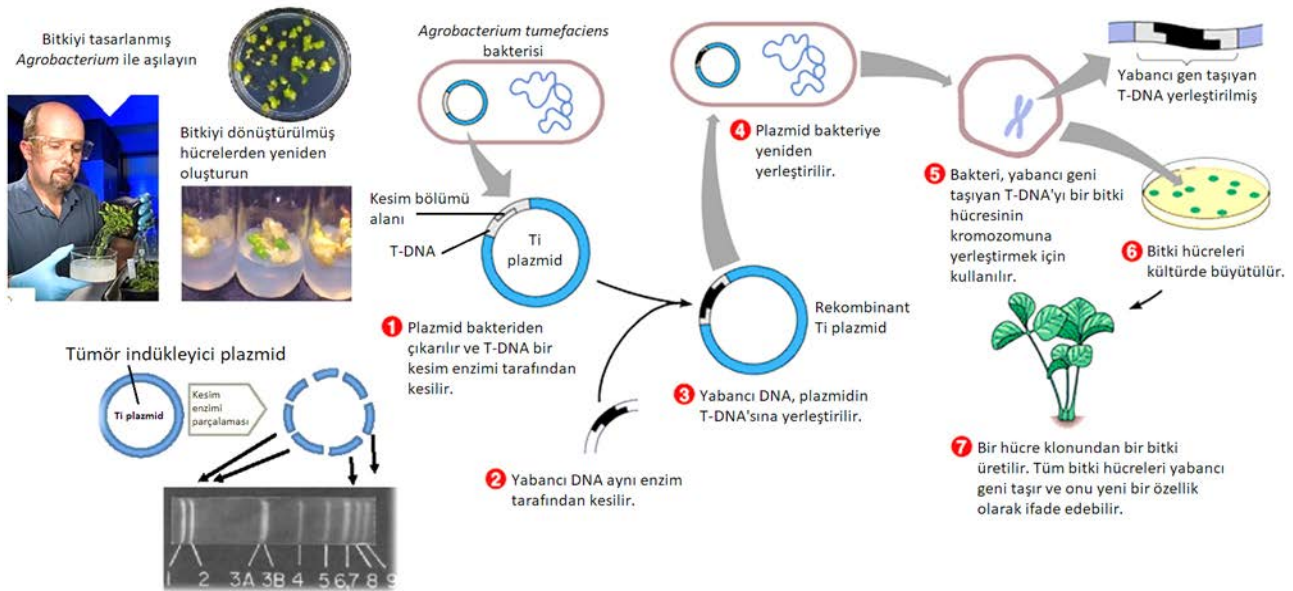
*Agrobacterium tumefaciens* (Carr, 2020) ve *A. rhizogenes* (Sudha ve diğ., 2013) toprak kaynaklı gram negatif bir bakterilerdir ve tümör oluşturucu plasmidindeki (Ti plasmidi) T-DNA bölgesini bitki genomuna sokmalarından ötürü bitkilerde kök ur ve tüylü kök hastalıklarına neden olmaktadır (Şekil 7) (Finer ve Dhillon, 2008).





Şekil 7. (a) Kök ur hastalığı-*Agrobacterium tumefaciens*, (b)Tüylü kök hastalığı-*Agrobacterium rhizogenes*

*Agrobacterium* aracılı transformasyon, daha düşük maliyetle, oldukça yüksek verimlilikte transgenleri çekirdeğe hedeflediği (Ranabhett ve Kapor, 2017) ve onları konakçı DNA'ya entegre ettiği için diğer yöntemlere göre bir avantaj sağlamaktadır (Şekil 8) (Chilton vd., 1977; Yadav vd., 1980; Benjamin/Cummings, 2004; American Society of Plant Biologists, 2014).



Şekil 8. Vektör aracılı (*Agrobacterium tumefaciens*) gen transferi

Virüs bazlı vektörler, bitki hücrelerinde stabil ve hızlı geçici protein ekspresyonu için alternatif bir yol sunar, böylece büyük ölçekte rekombinant protein üretimi için verimli bir ortalama sağlar.

## **b. Direkt Gen Transferi**

Doğrudan gen transferi, yabancı DNA'nın bitki genomlarına yerleştirilmesi için basit ve etkili bir tekniktir. Direkt gen transferi için gen tabancası, elektroporasyon, mikro-makro aşılama, lipozom (Gene-Gun, Electroporation, Micro-macro Injection, Liposome ) vb. teknikleri mevcuttur (Şekil 6) (Finer ve Dhillon, 2008).

Son zamanlarda başarılı transgenik bitkileri, partikül bombardımanı veya gen tabancası olarak bilinen yöntem transgenik organizmanın yaratılması için çok yönlü ve en etkili yoldur. Bu teknik ilk kez Klein vd. (1987) ve Sanford vd. (1987) tarafından ifade edilmiştir. Mikromermiler olarak adlandırılan tungsten veya altın parçacıklarının kullanıldığı teknikte helyum gazının basıncı ile mikro DNA taşıyıcı mermi atımı yapılmaktadır. Temiz ve güvenilir olması, evrensel dağıtım sistemi içermesi, birçok ticari çeşitten transgenik bitkilerin geri kazanılmasına olanak tanınması, rejener bitkilerde germ hattının kökenini netleştirmenin mümkün olması gibi avantajlarından dolayı bu teknik bitki türlerinin mühendisliği için bir tercih yöntemi haline getirmektedir. Ancak yine de bitkilerde kromozoma homolog olmayan entegrasyonlara yol açması, kimeral bitkilerin (birden fazla genotipteki hücre-dokunun canlı bir şekilde bir arada bulunması durumu) ortaya çıkması, genellikle hedef hücrelerde önemli hasara yol açan bombardıman hızı üzerinde kontrol eksikliği gibi bazı dezavantajları da mevcuttur.

Elektroporasyon, DNA'da dâhil olmak üzere büyük moleküllerin alımını kolaylaştırmak için hücre zarlarını tersine çevrilebilir şekilde geçirgen hale getirmek için yüksek alan kuvvetine sahip elektrik darbelerinin kullanıldığı işlemdir. Protoplastların geçici ve bütünleştirici transformasyonu için uzun süredir kullanılmaktadır. DNA alımına duyarlı dokular için bu yöntem uygun, maliyetsiz, basit, hızlı, düşük hücre toksisitededir. Ancak bitkileri protoplastlardan yenilenmesi zorluk getirmektedir.

Makro aşılama bitkilerin gelişen çiçek yan sürgünlerine mikropipetlerle DNA solüsyonunun enjekte edilmesidir. Mikro aşılama ise, DNA'nın mikroskopik kontrol altında belirli bir hedefe doğrudan mekanik olarak sokulmasıdır. Aşılama sırasında sağlam hücre duvarlarına temas gerçekleşebilmesi, kimerik bitkilerin üretilmesi, yavaş, pahalı ve deneyimli personel gerektirmesi gibi olumsuz etkilerinin yanı sıra konak aralığından bağımsız ve mutlaka bir protoplast rejenerasyon sistemi gerektirmemesi gibi olumlu etkilere de sahiptir.

Lipozomlar doku kültüründe hücrelere ilaç, protein vb. vermek için kullanılmış, sentetik bir fosfolipid zarı ile çevrili yapay lipid veziküllerdir. Lipozomların protoplast yüzeyine yapışması, yapışma bölgesinde lipozomların füzyonu ve hücre içinde plazmitlerin salınması işlemleriyle lipozom ile direkt gen transferi gerçekleştirilmektedir. Polietilen glikol (Polyethylene glycol – PEG) ile birlikte kullanıldığında daha yüksek verim göstermektedir. Bu tekniğinde bazı olumlu ve olumsuz yanları mevcuttur.

Herhangi bir gen transfer tekniği için ana hususlardan biri, alıcı hücrenin eklenen geni ifade etme potansiyelidir. Aktarılan DNA, DNA transfer sürecinden sonra sadece kısa bir süreliğine eksprese edilmekte ve buna geçici ekspresyon adı verilmektedir. Doğrudan gen transfer yöntemleriyle hücreye verilen DNA'nın yalnızca küçük bir kısmı, hücrenin kromozomuna kararlı bir şekilde entegre edilmektedir. Hücrelerin çoğuna verilen DNA zamanla ve hücre bölünmesiyle kaybolmaktadır. Neyse ki, bu geçici DNA hücrede ifade edilmekte ve son derece yararlı geçici analizlerin temelini oluşturmaktadır. Geçici analizler, gen ekspresyonunun analizi ve gen transferinin hızlı izlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gen transferi ile ilişkili farklı değişkenler, geçici ifade kullanılarak optimize edilebilmektedir. Aktarılan DNA, bitki nükleer veya plastid genomlarına entegre edildiğinde, kararlı dönüşüm meydana gelmekte ve buna kalıcı ekspresyon adı verilmektedir. Bu ekspresyon ile hücreye verilen DNA'nın tamamı zamanla ve hücre bölünmesiyle kaybolmamakta ve sonraki nesillere miras olarak kalmaktadır.

### **2.2.1.4.1. Transgenik Bitkiler, Genetiği Değiştirilmiş Organizma ve Sentetik Tohum**

1980'lerde ilk transgenik deneylerin başlamasıyla; ekin bitkilerinde yeni özellikler oluşturmak için birçok strateji değerlendirilmiştir. Bu çerçevede tarımsal özellikleri düzenlemek ve istenilen ürünlere

dâhil etmek için çeşitli DNA, RNA ve protein bazlı araçlar geliştirilmiştir. İlk transgenik organizmalarda en yaygın kullanılan mekanizma rastgele bir gen düzenlemesidir (Paszkowski vd., 1988) ve bitki bilimciler bir transfer DNA (T-DNA) aracılı olarak genleri transfer etmişlerdir (Park vd., 2015). Yeni Nesil Gen Düzenleme Teknolojileri haricindeki bu aracın kullanılması bazı olumsuz özellikteki mutant bitkiler elde etme olasılığının artmasına da neden olmaktadır. Buna ek olarak transgenik bitkinin oluşturulabilmesi esas olarak gen girişinin sıklığına ve dönüştürülmüş hücrelerin bitkilerdeki farklılaşma yeteneğine bağlıdır, yani etkili bir *in-vitro* rejenerasyon protokolü transgenik bitki üretmenin ana koşuludur (Singh vd., 2004). Esasen üstün bir hibrit tür yaratmak için bitki genlerinin değiştirilmesini içeren transgenik biyoteknolojisi ile elde edilen bitkiler, Aktarma-Genli veya Dönüştürülmüş Bitkiler (Transgenic Plants) adı verilmektedir. Son 20 yılda geliştirilen rDNA teknolojisi, gen transfer teknolojisi ve doku kültürü tekniklerinin etkin etkileşimi sonucunda bu tür bitkiler üretilebilmektedir.

İnsanlığın ilk zamanlarında avcı-toplayıcı özellikteki topluluklarda genetik değişim yapılabilecek herhangi bir teknik bilinmediği için güvenle yenebilecek yiyecekleri toplamakta veya avlamaktaydılar. 1900’de Avrupalı bilim adamları, gıda çeşitliliğini korumak ve geliştirmek için bitki türlerini manipüle etmek ve iyileştirmek istemekteydiler. Genetikteki gelişim ve DNA’nın yapısının keşfi gibi bilimsel bilgilerin çalışmalarla birleştirilmeleri sonucunda bir organizmanın DNA’sını başka bir organizmanın DNA’sına tanımlama veya ekleme gibi yetkinliklerin önü açılmıştır. Böylelikle gelişen rekombinant DNA teknolojisi modern biyoteknolojinin kapısının aralanmasını sağlamıştır. Genetiği değiştirilmiş ilk bitkiler tütün ve domatestir. Biyomühendislik yolundaki bu ilk adım yabancı tip domatese çürümeye karşı direnç kazandırılmasını sağlamıştır. Günümüzde, antikorlar ve aşılarda gibi protein ve diğer tıbbi maddeleri üretmenin en umut verici yöntemlerinden biri transgenik bitkilerin kullanılmasıdır. Transgenik bitkiler, fermentasyona dayalı üretim sistemlerine ekonomik bir alternatif sunmaktadır. Bitkilerde insan hastalıkları bulunmadığından ve virüsler ve bakteriyel toksinler için tarama maliyetlerini azalttığından, bitki yapımı aşılarda veya antikorlar (bitki antikorları) için özellikle dikkat çekicidir (Ranabhatt ve Kapor, 2017).

Genetiği değiştirilmiş gıdalar (Genetically Modified Food – GMF) ticari üretim için onaylandığında çok daha popüler hale gelmiş ve yaygın olarak üretilmişlerdir (Watson ve Preedy, 2015). Günümüz dünyasında pek çok (buğday, patates, pamuk, papaya, kabak, kanola, mısır, yonca, elma, patlıcan, havuç, çilek, marul, kavun ve şeker pancarı vb.) genetiği değiştirilmiş gıda bulunmaktadır. Bunun en büyük nedeni biyoteknolojinin bilimle birlikte tarımda kullanımıyla nüfus artışına bağlı olarak insanların beslenme taleplerinin karşılanma gerekliliğidir.

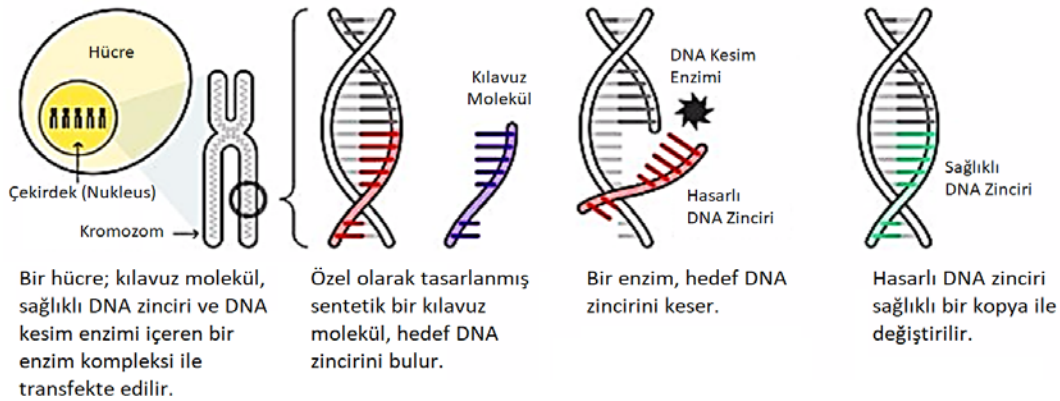
Bilimsel olarak genetiği değiştirilmiş organizmalar (Genetically Modified Organisms – GMO), bir organizmanın belirli bir özelliği için genetik materyalinin (DNA) değiştirilmesi olarak tanımlanır. GMO üretmek için çeşitli teknolojilerden (modern biyoteknoloji, gen teknolojileri, rDNA teknolojisi ve genetik mühendisliği teknolojileri) yararlanılmaktadır. Genetiği değiştirilmiş ürünler günümüzde Biyoteknoloji Aracılığı ile Elde Edilmiş Ürünler (Biotechnology Products - BPs) olarak isimlendirilmektedir. BPs ilgili düşünceler, çevre üzerindeki etkiler, ekonomik etkiler ve etik hakkında bir dizi soruyu gündeme getirmektedir. Bu sorunlar haricinde en önemli olan konu ise bu ürünleri tüketmenin güvenli ve sağlıklı olup olmadığıdır (Ranabhatt ve Kapor, 2017). Gelecekte daha fazla sayılara ulaşacağı düşünülen BPs geçmişten günümüze kadar halen tartışılan ve tartışılmaya devam edecek bir konudur.

Sentetik tohumlar, yapay olarak kapsüllenmiş somatik embriyolar, sürgün tomurcukları, hücre kümeleri veya tohum olarak ekim için kullanılabilen ve *in-vitro* (laboratuvar koşullarında) veya *ex-vitro* (sera ve benzeri kapalı sistemler) koşullarda bitkiye dönüşme kabiliyetine sahip olan ve bunu koruyan dokulardır. İlk sentetik tohumlar ekonomik anlamda somatik embriyoların kullanımı ile üretilirken; yakın geçmişte sürgün tomurcukları, sürgün uçları, organojenik veya embriyojenik kallus vb. gibi diğer mikropropagüller (mikroçoğaltıcılar) de üretimde kullanılmaktadır. Sentetik tohum teknolojisi uygulamaları, kapsülleme için bitkilere dönüşebilen canlı materyallerin büyük ölçekli üretiminde *in-vitro* kültür sistemlerinin manipülasyonunu gerektirmektedir (Ranabhatt ve Kapor, 2017). Yapay tohum üretim teknolojisi bitki biyoteknolojisinde yeni ufuklar açmıştır. Tarım alanında

en büyük avantajı seçici ve nesli tükenmekte olan/tükenmiş bitki türlerinin germplazmasının korunması üzerinedir. Teknoloji, bitki hücre ve doku kültüründe heyecan verici ve hızla büyüyen bir araştırma alanı olmasına rağmen, pratik kullanımı için birçok sınırlama mevcuttur. En temel engel somatik embriyoların herhangi bir koruyucu olmadan saklamaya ve işlemeye elverişsiz olmalarıdır. Bundan dolayı sentetik tohum teknolojisinin amacı; bitki biyoteknolojisi, bilim ve gelişen tekniklerin kullanımıyla klonal bitki çoğaltma ve germplazm muhafazası için bir birim olarak kullanılabilir şekilde depolama ve işleme özelliklerine sahip somatik embriyolar üretmektir.

### 2.2.1.5. Gen Düzenleme

Biyoteknolojinin gelişmesi ve moleküler araçlarla ortaklaşa kullanımı ileri biyolojik çalışmaların önünü açarak gen mühendisliği ve sentetik biyoloji alanlarına büyük katkılar sunmaktadır (Rönspies vd., 2021). Bu alanlar için biyolojik süreçlerin tam olarak anlaşılmasını gerekmektedir. Genetik dizisinin açık, kullanışlı, hatasız ve hassas bir şekilde manipülasyonuna Genom Düzenleme adı verilmektedir (Sah, 2017). Tüm organizmaların genomundaki DNA dizileri, bir dizi mesaj ve talimat koduna sahiptir. Genom düzenleme teknikleri kullanılarak yapılmak istenilen; bu dizilerin değiştirilmesi yoluyla dolaylı olarak mesajların değişiminin sağlanmasıdır. Bu, DNA'da kesikler ya da kırıklar (Double Strand Break – DSB) oluşturulması sonrasında hücrenin doğal DNA onarım mekanizmalarının aktifleşerek istenilen değişikliklerin yapılmasını sağlamak amacı ile kandırma yapılması ile mümkündür (Şekil 9) (Massachusetts Institute of Technology, 2015). Günümüzde yeni genom düzenleme teknikleri (New Genome Editing Techniques - NGET) için özellikle en hızlı, en ucuz ve en kolay yöntemlerden birisi olan CRISPR bu iş için oldukça uygun görülmektedir (Vidyasagar, 2018; Tastan vd., 2020; Lopes Filho vd., 2021).



Şekil 9. Gen düzenlemesi

Son yıllarda, bilgisayar kullanımının bütün alanlara yayılması genom araştırmalarının da büyük bir evrim geçirmesine yol açmıştır. Artık genlerin izole edildikten sonra tek tek tanımlanması çok eskilerde kalmıştır. Bunun yerine, çok kısa bir zamanda tüm gen/genom (whole gene/genome) veya belli bir gen grubunun işlevini belirlemek oldukça kolaydır. Bu pek çok çalışma alanında; DNA-RNA dizileme yöntemlerinin geliştirilmesini, bilgisayar ve özellikle yazılım programlarının tasarlanmasını ve geliştirilmesini sağlayarak bu denli büyük ölçekteki verilerin değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Böylelikle, biyoinformatik ve sentetik biyoloji gibi bilim alanlarının da içinde bulunduğu bilgisayar-temelli son teknolojik teknikler biyolojik sistemlerin ayrıntılı olarak incelenmesine olanak sağlamaktadır (Fernandez-Gutierrez ve Gutierrez-Gonzalez, 2021; Sing vd., 2022).

Mühendislik Endonükleaz sistemlerini kullanan Genom Düzenleme (GEEN - Genome Editing using Engineered Endonuclease) teknolojilerinin bu denli hızlı gelişim sağlamanın altında yeni yöntemlerle biyoteknolojinin ortaklaşa çalışması yatmaktadır. Dünya nüfusunun hızlı artışı ile ekilebilir arazi miktarlarının azalması, tarımsal üretkenliği artırmak için yeni arayışlara girilmesine neden olmakta ve bitki verimliliği-kalitesi-dayanıklılığı için NGET kullanılması gerekliliğini gözler

önüne sermektedir (Ray vd., 2013; Malzahn vd., 2017; Chen vd., 2019; Hüdig vd., 2022). Hem besleyici gıdalara erişimi arttırmak için gıda kaynaklarında hem de birçok sorunla boğuşan tarım sektörü için yenilikçi gen/genom teknolojilerinin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır.

Gen düzenleme teknolojisi teknikleri yabancı genleri bitki genomuna sokmadan basitçe bitkinin kendi DNA'sındaki birkaç nükleotidin değiştirilmesiyle yeni çeşitler ve transgenik bitkiler elde etmek için son derece kullanışlıdır (Malzahn vd., 2017). Elde edilen bu yeni Genomu Düzenlenmiş Bitki (GEP - Gene Editing Plants) geleneksel transgenik bitkilerden oldukça farklıdır (Transgen-free) (Metje-Sprink vd., 2019). Oldukça umut vaad eden NGET kullanılarak üretilen yeni bitki çeşitleri, transgenik olmayan olarak kabul edilebilmekte ve transgenik bitkilerin halk tarafından reddedildiği toplumlarda çok daha kabul görebilmektedir (Wolt vd., 2016).

DNA'da hedeflenen bölgeye bağlanarak gen/genom düzenlemesi yapılabilmesini sağlayan ZFN, ODM, TALEN ve CRISPR birer NGET'idir ve birer dizi spesifik nükleaz olarak görev almaktadırlar (Puchta ve Fauser, 2014). Bu çığır açan teknikler ile genler mutasyona uğratılmakta, susturulmakta veya değiştirilmektedir. Gen düzenleme teknolojisi; restriksiyon endonükleaz kesim enzimine benzer olarak DNA'nın istenilen bölgesindeki çift iplikçikli zincir kesilerek tamir mekanizması yollarının uyarılması ile bölgenin tamir edilmesi gibi işlemlerin birbirini takip ettiği gelişmiş teknolojik uygulamalar topluluğudur. Ancak kullanılan tamir mekanizmasına göre genomda bazı değişimler oluşabilmektedir. Kırılmanın homolog olmayan uç birleştirme ile hatalı onarımı, ekleme/silme mutasyonlarını indükleyebilirken, homolog rekombinasyon, eksojen olarak sağlanan bir şablondan eklemeleri veya gen onarımını indükleyebilmektedir (Jinek vd., 2012).

Günümüz teknolojisinde genetik mühendisliğinin de gelişimi ile hedeflenen bölgedeki DNA kesikleri NGET'leri kullanılarak yapay olarak da yapılabilmektedir (Akbudak ve Kontbay, 2017). Bu çeşitli gelişmiş mühendislik nükleazların bitkilerde kullanılması yeni devrimler yaratmaktadır (Voytas ve Gao, 2014; Gudeta, 2019; Bhoi vd., 2022). Genomların verimli manipülasyonu için kullanıldığında bu tür düzenleme sistemleri, mutant ve transgenik bitkilerin yaratılması da dahil olmak üzere karmaşık sorunları çözebilir (Noman vd., 2016; Gupta ve Karkute, 2021) Ayrıca, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, epigenomların incelenmesi ve hücre döngüsünde kromozom lokuslarının davranışı için de oldukça kullanışlı birer araç olarak kullanılmaktadır (Cong vd., 2013; Petolino ve Davies, 2013; Lowder vd., 2016). Özellikle bilinmeyen bir genetik sekansın ilişkili olduğu fenotipin çözülmeye çalışılmasına yönelik bir genetik araştırma yaklaşımı olan ters genetik çalışmalarının yürütülmesi için en iyi araçlardan biri olarak günümüzde kullanılmaktadır (Malzahn vd., 2017). Gelişmiş teknolojik teknikler topluluğu, multidisipliner bir alan olan biyoteknoloji sayesinde temel biyolojiyi incelemek için de çok yönlü bir bakış açısı geliştirmektedir. Bu kapsamda programlanabilir nükleazların kullanıldığı gen düzenleme teknolojisi, muhtemelen bitki biyoteknolojisinde geleceğin önemli bir bileşeni olarak bitki biyolojisi araştırmalarını ilerletecek ve bitki genini-genomunu doğrudan düzenleyerek verimliliğine, kalitesine, hastalık ve zararlılara karşı direncine, besin içeriklerinin arttırılmasına önemli ölçüde katkıda bulunacaktır.

#### 2.2.1.5.1. ZFN

İlk kez 1996'da, Çinko Parmak Nükleaz (ZFN - Zinc Finger Nucleases) genomda değiştirilmek istenilen bölgeye özgü tasarlanmış ardışık altı ila dokuz baz çiftinden oluşan ilk kimerik protein yapılı nükleazlardandır (Kim vd., 1996). Bu icatla ilk kez her gen hedeflenebilmiştir. Bağlanma (binding) ve kesim (cleavage) olarak 2 parçalı ZFN'lerin modüler bağlanma domaini çinko parmak (ZF) proteini yapılı olup 30 aminoasit tek bir çinko atomuna bağlıdır. Her ZFN monomeri birkaç ZF'nin bir araya getirilmesi ile her bir ZF bir üçlü nükleotit tanıyacak şekilde tasarlanmıştır (Pabo vd., 2001). ZFN'ler için hedef olarak seçilen bölgenin dimerliği büyük önem arz etmektedir. Benzer yapılı bu ikinci kısım ilk ZFN'den yaklaşık 6 nükleotit uzaktaki karşı DNA zincirindeki bir 18-36 bp DNA dizisini tanımak ve ona bağlanmak üzere tasarlanmıştır (Carroll, 2014). Bu doğrultuda bölge dimerliğe sahip değilse ZF protein monomerleri öncelikle bölgeyi çalışmaya uygun hale getirir sonrasında da *Flavobacterium okeanoikoites* bakterisinden izole edilmiş FokI kesim enzimi ile

koordineli olarak bölge üzerinde kesikler oluşturur. Bu kesikler tamir mekanizması yollarını uyararak bölgenin tamir edilmesini sağlar (Carroll, 2011; Akbudak ve Kontbay, 2017).

ZFN'ler, hedeflenen genom modifikasyonu için bitkilerde etkin bir şekilde kullanılmıştır (Townsend vd., 2009; Zhang vd., 2010; Carroll, 2014; Gudeta, 2019; Basak vd., 2021). Buna ek olarak bitki biyoteknolojisi için çok yönlü bir araç olan çinko parmakların kanıtlanabilir birçok faydası bulunmaktadır (Novak, 2019). Ancak her teknikte olduğu gibi bu teknik için de bazı sınırlandırıcı unsurlar bulunmaktadır. Ayrıca ZFN tasarımının önemli ölçüde moleküler biyoloji uzmanlığı gerektirmesi ve de amaçlanan DNA dizisini tanıma-parçalamada ki yüksek başarısızlık oranı bu tekniğin diğerlerine oranla çok daha az tercih edilmesine neden olmaktadır (Voytas, 2013).

#### **2.2.1.5.2. TALEN**

Devam eden çabalar, araştırmalar ve de hedef genomik DNA'nın verimli ve seçici manipülasyonu için arayışlar, Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleazlar (TALEN - Transcription Activator Like Effector Nucleases) gibi yeni gen/genom düzenleme araçlarının geliştirilmesinin yolunu açmıştır (Jankele ve Svoboda, 2014; Baltacı ve Arslan, 2020). İlk kez, bu proteinlerin DNA bağlama yeteneği 2007'de tanımlanmış (Römer vd., 2007) ve hemen ardından hedef DNA dizisini tanıma kodu çözülmüştür (Boch vd., 2009). Dizi spesifik kimerik nükleazların ikincisi olan TALEN tekniği ZFN'nin bir alternatifi olarak genom düzenleme bölgelerinin çok daha kolay bir şekilde hedeflenmesine olanak tanımıştır (Boch vd., 2009). ZFN gibi TALEN de 2 kısma sahiptir ve FokI ile koordineli olarak çalışmaktadır. Ek olarak yine seçilen DNA bölgesinde dimer varlığı nükleaz aktivasyonu için oldukça önem teşkil etmekte ve de modüler bir bağlanma domaininden söz edilmektedir (Boch, 2011). Aralarındaki en önemli farklılık ise bağlanma domaininin yapısal farklılığı olan 30-35 aminoasit yapıları TAL efektör proteinleridir. Bu protein yapı ilk olarak *Xanthomonas* bakterisinde keşfedilmiştir. Efektör proteinlerin diğer birçok bitki patojeni tarafından da üretildiği bilinmektedir. TALEN tekniğinde sırası ile FokI ile kesim işleminden sonra Tekrar Değişken Çift Kalıntısı (RVD - Repeat Variable Di-residue) adı verilen 2 bitişik aminoasit kısmı (12. ve 13.) hedef DNA'nın dizileri ile baz eşleşmesi sağlayarak (NI-Adenin, NG-Timin, NN-Guanin ve HD-Sitozin) DNA dizisini yeniden şekillendirir. Bu ikinci gen düzenleme tekniği de bitki biyoteknolojisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır (Li vd., 2012; Qin vd., 2021; Arimura, 2022).

Spesifikliği yüksek olmasına rağmen bu teknikte ZFN gibi bazı sorunlarla karşı karşıya kalabilmektedir (Mushtaq vd., 2018). Ek olarak TALEN'lerin tasarlanması, her bir hedef için yeni bir proteinin yeniden yapılandırılmasını gerektirdiğinden zorluk yaratmaktadır (Kamburova vd., 2017). Ancak pahalı teknikler yerine spesifikliğinin yüksek olmasından ötürü halen popüler teknikler arasında yer almaktadır (Gudeta, 2019).

#### **2.2.1.5.3. ODM**

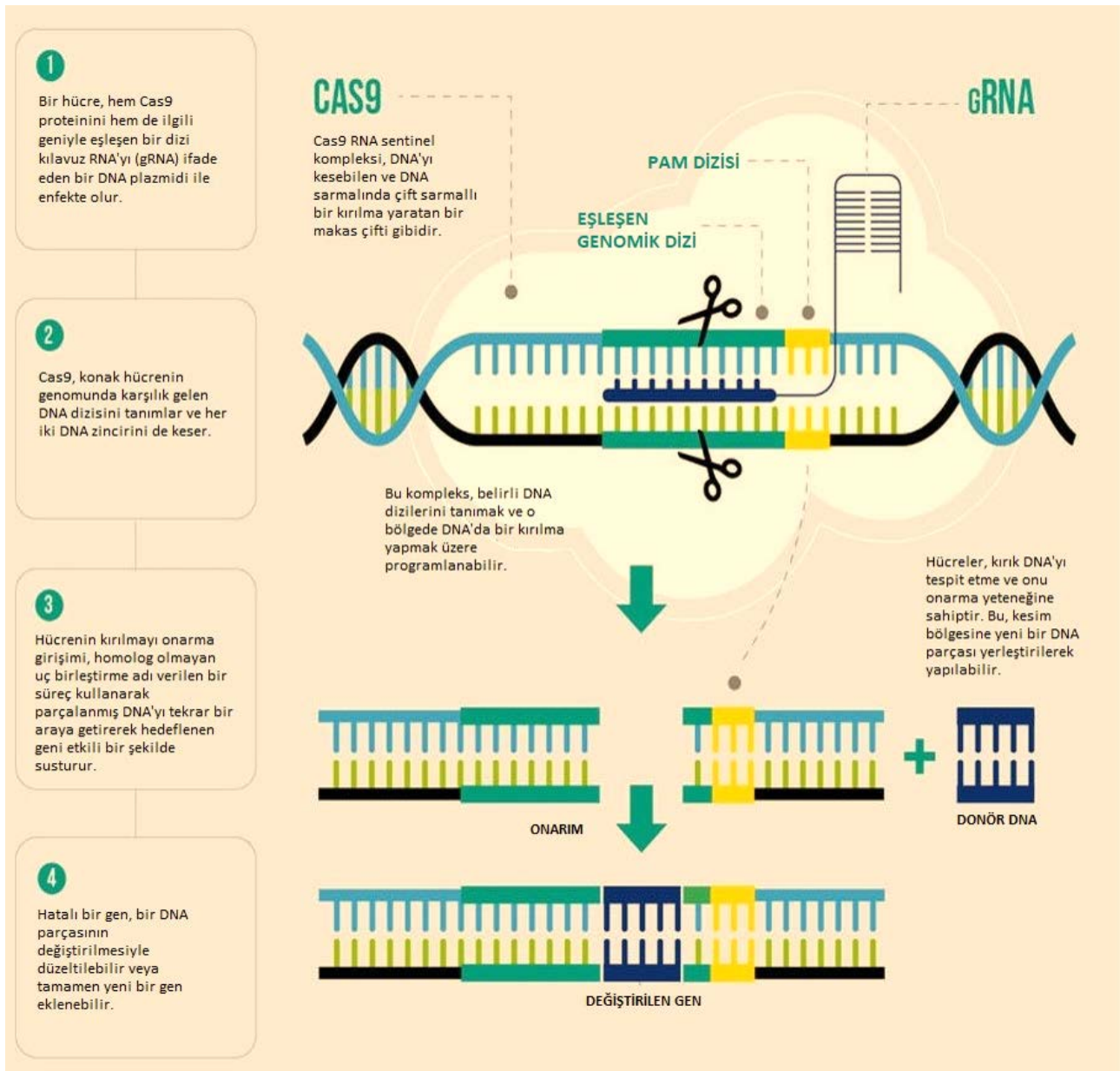
Oligonükleotit Yönelimli Mutajenez (Oligonucleotide Directed Mutagenesis - ODM), bitkiler için yeni bir gen düzenleme aracıdır. ODM, tek bir baz çifti hariç dizisi genomdaki hedef diziyi aynı olan 20-100 bazlık spesifik bir oligonükleotitten oluşmaktadır. Hedef genin belirli bir bölgesiyle homolojiye sahip bu sentetik oligonükleotitler veya onarım şablonları, çeşitli spesifik dağıtım yöntemleri kullanılarak geçici olarak bitki hücrelerine maruz bırakıldıklarında, hedeflere bağlanıp hücredeki tek uyumsuzluğu tanıyan doğal onarım mekanizmasını harekete geçirirler. Ardından onarım işlemi yoluyla bu uyumsuzluğu veya mutasyonu hedef diziyeye kopyalarlar. Bu, bitki hücresi onarım şablonu oligonükleotidi bozarken, yeni işlev veya özellik kazandıran bitki genomunda istenen hedeflenmiş tek nükleotit veya baz düzenlemesini üretir. Doku kültürü yöntemleri kullanılarak düzenlenmiş dizilere (sekans) sahip hücreler daha sonra yeniden üretilir (rejenere edilir) ve geleneksel üreme yoluyla geliştirilmiş özelliklere sahip genomu düzenlenmiş yeni çeşitler geliştirilir (Sauer vd., 2016; Kamburova vd., 2017).

#### **2.2.1.5.4. CRISPR**

Evrimsel bir gen/genom düzenleme yaklaşımı arayışı, "Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar (CRISPR- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)" adı

verilen bir sistemin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Jansen vd., 2002; Gözükırmızı ve Karlık, 2017). 23 ve 47 bp arasında yer alan palindromik tekrarlar CRISPR lokusu içinde tipik olarak aynı uzunluk ve diziye sahiptirler. Bu tekrarlayan nükleotid dizileri DNA'nın yapı taşları olarak bilinmektedir. Tekrar dizisindeki aralayıcılar, rekombinasyonun ardından bakteri genomuna entegre olmuş yabancı DNA'dan (viral veya plazmit) türetilen tekrarlanan diziler arasına serpiştirilmiş kısa DNA parçalarıdır. Buradaki amaç bakterilerin virüsleri tanıyarak gelecekte gerçekleşecek herhangi bir saldırıya/saldırlara karşı savaşmasını sağlamaktır (Vidyasagar, 2018). Bitki biyoteknolojisinde yeni bir devrin başlamasına ve gen mühendisliği çalışmalarının hız kazanmasına yol açan bu RNA aracılı nükleaz tekniğinde CRISPR lokuslarına bir tekli kılavuz RNA (sgRNA), Cas-9 proteinleri ve iki kodlama yapmayan CRISPR-RNA (crRNA) eşlik etmektedir.

Cas proteinleri nükleik asitlerle etkileşim içinde olan helikazlar, nükleazlar ve RNA bağlanma proteinleri gibi çeşitli proteinlerden oluşmaktadır. Bu sistemde ki Cas proteinleri mevcut olup yabancı DNA'yı gördüğü anda onu kesen bir enzim görevi görmektedirler. Ancak belirli Cas proteinleri sadece belirli CRISPR sistem tipleri ile ilişkili olduğundan moleküler mekanizmalarında da farklılıklar bulunmaktadır (McGinn ve Marraffini, 2019). Cas9 aracılı bu sistemin ön koşulu bir hedef gen üzerinde veya ona bitişik konumlanmış (bakteri türüne göre değişen), 2-6 nükleotitten oluşan (kısa DNA dizileri), korunmuş (etiket işlevi gören) bir Ön-aralık Bitişik Motifleri (PAM - Protospacer Adjacent Motifs) dizisinin varlığıdır. Cas9 proteini PAM dizisi olmadan istenilen bölgeyi tanımamakta ve dolayısı ile kesim işlemini gerçekleştirmemektedir (Jiang ve Doudna, 2017). Cas proteinleri CRISPR RNA'ları olarak adlandırılan iki tip RNA molekülüne bağlanarak işlem göreceği alana taşınmaktadır. Eğer hedef DNA PAM içeriyor ise bir kesim ve ardından tamir mekanizması ile işlem devam edecektir. Ama bir hedef DNA PAM içermiyor ise Cas kesim yapmayarak gen düzenlemesi yapılamayacaktır (Şekil 10) (Gudeta, 2019).



Şekil 10. CRISPR – Cas

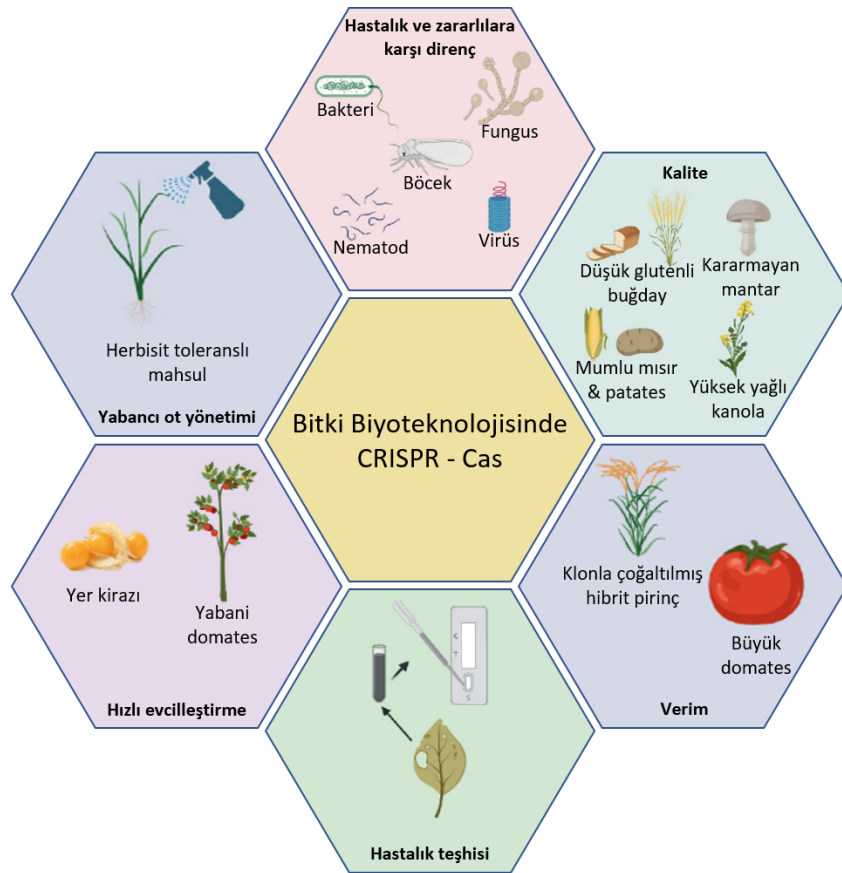
Bir aralayıcı eklendiğinde veya tekrarlayan virüs saldırılarında, CRISPR RNA'da (crRNA – 20 nükleotid uzunluğunda) kopyalanan bir kısım CRISPR işlenir. İşlem sırasında CRISPR nükleotid dizileri, tek zincirli RNA'nın tamamlayıcısı olan bir diziyi oluşturma görevi görmektedir. Bu kodlama yapmayan crRNA'lar; bir trans-aktif edici-crRNA (tra-crRNA) ve bir öncü-crRNA (pre-crRNA)'dan oluşmaktadır. Pre-crRNA'lar, CRISPR lokuslarından kopyalanırken tra-crRNA, pre-crRNA içindeki tekrarlara yönelik küçük bir trans kodlanmamış RNA tamamlayıcılığını sağlamaktadır (Gudeta, 2019). Yani her bir crRNA bir nükleotid tekrarı ve bir boşluk bölümünden oluşmaktadır.

Cas9 nükleaz ve tek bir kılavuz RNA'dan (sgRNA – Single Guide Ribonucleic Acide) oluşan RNA güdümlü bir genom düzenleme aracı olan CRISPR - Cas9 tekniğinde; sgRNA (yaklaşık 20 baz uzunluğunda) Cas9'un belirli bir hedef DNA dizisini tespit etmesine ve parçalamasına (kesime) izin vererek sistemin hedefleme özgüllüğünü sağlamaktadır. Diğer tekniklerdeki gibi onarım mekanizmalarını aktive etmekte ve genom düzenleme için umut vaat eden sonuçlar sunmaktadır (Xie ve Yang, 2013; Zhu vd., 2020).



CRISPR - Cas9 sistemi tarafından hedef bölge tanıma, kimerik TALEN proteinlerinden farklı olarak hedef bölgenin kılavuz (kodlayıcı olmayan) RNA'sı ve DNA'sı ile kılavuz RNA arasındaki tamamlayıcı dizi bazlı etkileşimi yolu ile gerçekleştirilmektedir. Ek olarak, Cas9 nükleazlarının kullanılarak çift sarmallı DNA'nın tam bölünme için Cas protein kompleksi bir nükleaz aktivitesine sahiptir (Cong vd., 2013; Graham ve Root, 2015).

En yeni NGETs olarak birçok alanda kendinden söz ettiren bakteriyel tip II prokaryotik adaptif bağışıklık sisteminden türetilen bu gen düzenleme tekniği son yıllarda biyolojik alanlarda başarılı bir genom düzenlemesi sağlamaktadır (Belhaj vd., 2015; Wada vd., 2020). NGETs arasında CRISPR - Cas9 tekniğinin tek bir moleküler yapıya sahip birden fazla genin eşzamanlı olarak hedeflenmesi onun en önemli avantajıdır (Svitashev vd., 2015). Bunun yanı sıra basitliği, verimliliği, özgüllüğü, tasarımlarının kolaylığı, minimum hedef dışı etkileri ve çoğullamaya yatkınlığı da tercih edilme sebepleri arasında yer almaktadır (Kamburova vd., 2017; Khan vd., 2022).



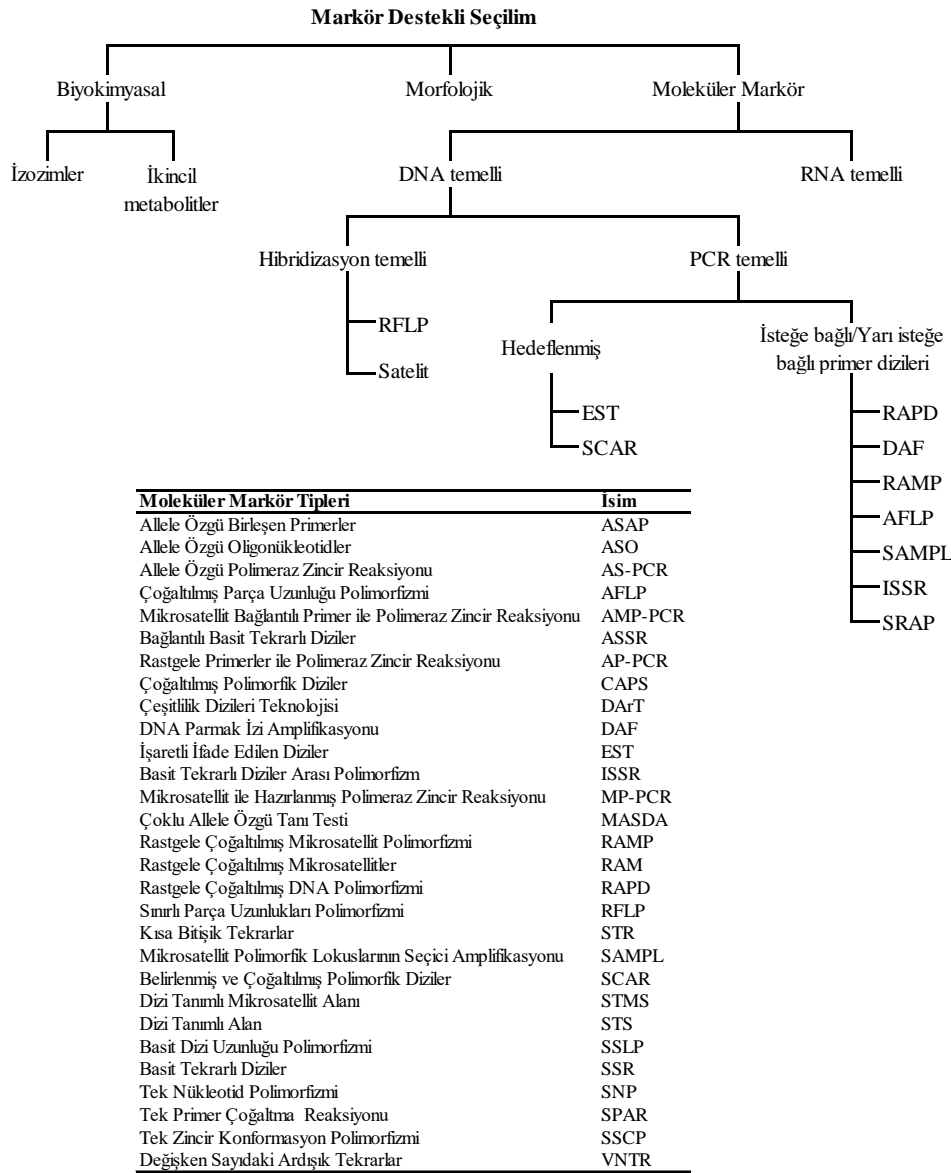
Şekil 11. Bitki biyoteknolojisinde CRISPR – Cas

Günümüz tekniği olarak adlandırılan CRISPR bitki biyoteknolojisi kapsamında pek çok bilimle ortaklaşa olarak (Demirer vd., 2021); çoğu üründe yaygın olarak kullanılmıştır (Şekil 11) (Sharma vd., 2017; Bao vd., 2019; Nadakuduti ve Enciso-Rodríguez, 2021; Galli vd., 2022; Pandita, 2022). Ayrıca transgen içermeyen ürünlerin elde edilmesi için de kullanılabilirliği; gıda tedariki ve tarım açısından muazzam etkiler yaratmaktadır. Bu teknikle verim, kalite, biyotik ve abiyotik stres direnci gibi etkenlerle ilgili kesin özellik iyileştirmelerinin yolu açılmıştır (Borelli vd., 2018; Chen vd., 2018; Tastan vd., 2020). Oldukça spesifik bir teknik olması, aynı anda birden fazla bölgeyi hedefleyebilmesi ve de sgRNA'ların tasarımının kolaylığı bu teknolojik tekniği diğer nükleaz gen düzenleme tekniklerinden avantajlı konuma getirse de PAM dizisi gereksinimi nedeniyle hedef seçimi sınırlıdır (Mushtaq vd., 2018 ). Yine DNA'nın amaçlanan hedef dışındaki bölgelerde kesilmesiyle elde

edilebilecek istenmeyen mutasyonların ortaya çıkması ve beraberindeki pek çok karmaşık sorun ve endişe bu tekniği sınırlayan bir diğer önemli faktördür (Vidyasagar, 2018; Tastan vd., 2020).

### 2.2.1.6. Markör Destekli Seçilim

Bitki biyoteknolojisi alanında moleküler destekli seçilim, polimorfizm gibi bazı özelliklerin anlaşılması için oldukça kullanışlı bir moleküler tekniktir. Markör destekli seçilim kısaca biyokimyasal temelli, morfolojik temelli ve moleküler temelli markörler olmak üzere üç tipe ayrılabilir. Yapılacak çalışmalara bağlı olarak, çeşitli markörler arasından belirli bir markör kolaylıkla seçilebilmektedir (Şekil 12) (Kesawat ve Kumar, 2009).



Şekil 12. Markör destekli seçilim

Biyokimyasal temelli markörler özellikle izoenzimler bitki ıslahı ve genetik alanlarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu proteinler, elektroforez ve boyama ile izole edilmekte, tanımlanabilmekte ve markör olarak kullanılmaktadırlar. Enzim aktiviteleri aynı olan izoenzimler elektroforetik ayırma tabii tutulduğunda farklılık görülmektedir. Düşük polimorfizm, ağır iş yükü, zaman alıcı analizler tercih edilmelerini azaltarak morfolojik temelli markörlerin kullanımına geçilmiştir (Özsensoy ve Kurar, 2012).

Morfolojik markörlerle ayırım görsel özelliklere karşılık gelmekte ve bazı sorunlar kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Çoğunlukla, tanımlanması ve manipüle edilmesi basit olabilen genetik polimorfizmleri belirtmektedirler. Başlıca avantajları, kolay izleme ve ekonomik uygulanabilirliktir. Ayrıca bu belirteçler çevresel koşullardan ciddi şekilde etkilenmektedir. Ek olarak morfolojik özellikler bir organizma genomunun yalnızca belli bir kısmını kapsamaktadır (Sanghvi ve Dave, 2017).

Moleküler temelli markörler yüksek polimorfik özellikte olup son yüzyılda sıklıkla tercih edilmektedir. Biyoteknolojideki Polimer Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR) keşfiyle doğru orantılı olarak gelişen moleküler markörler kesin-doğru sonuçlar verebildiği, genoma bağlı, tekrarlanabilirliği yüksek ve çevreden etkilenmeyen özellikleriyle geleneksel morfolojik ve biyokimyasal temelli markörlerden daha fazla tercih edilmektedir (Khan vd., 2017). Ayrıca gelişen teknolojiyle yaşanan sorunlara hızlı, ekonomik ve pratik çözümler geliştirilebilmesi için özellikle PCR destekli moleküler markörler birçok multidisipliner alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak; günümüz dünyasında yaşanan sorunlara karşı ürün taleplerindeki artış özellikle ürün verimliliği ve kalitesinde ciddi azalmalara gidildiğini göstermektedir. Ürün talebindeki artışlar; kirlilik, patojen ve zararlıların yeni ırk ve biyotiplerinin ortaya çıkması ve iklim değişikliğinin olumsuz etkileri gibi faktörlerle baş etmek zorundadır (Collard ve Mackill, 2008). Ancak günümüz koşullarında bu talebi karşılamak tarımsal üretim yapanlar açısından oldukça zorlayıcıdır. Bitki biyoteknolojisi bilim ışığında gelişen teknoloji ile birleştirildiğinde; bitkide hastalık ve savunma mekanizmalarını tespit etmek, ürün raf ömrü uzatılması gibi uygulamaların altında yatan genetik mekanizmalar anlaşılmalı ve özellikle ürün iyileştirme, verim ve kaliteye yönelik birçok araştırma rahatlıkla yapılabilir (Prasad vd., 2017). Bu amaçla kullanılan markör destekli seçim bitki biyoteknolojisi için devrim niteliğindedir.

Modern biyoteknoloji sayesinde bitki genetiği hakkındaki bilgilerimizi artırabilecek ve yeni bitki yetiştirme teknikleri ile birlikte kullanımıyla bitki geliştirmeyi kolaylaştıracak yeni araçlar geliştirilmektedir (Datta vd., 2011). Markör teknolojisinin durdurulamaz yükselişiyle birlikte, çeşitli birçok markör sistemi keşfedilmiş ve karşılaşılan birçok problemin üstesinden gelmek için yardımcı olmaktadır. Ayrıca, moleküler markörler ile daha yakın zamanda sıkça kullanılmaya başlanan yüksek verimli yeni nesil genom dizileme teknolojisi işbirliğinin bitki biyoteknolojisi alanında önemli ölçüde başarılı sonuçların elde edilme olasılığını artırdığı söylenebilir (Moose ve Mumm, 2008).

### **3. BİYOGÜVENLİK VE BİYOETİK**

“Biyogüvenlik” terimi BPs ile ilgili faaliyetlerin güvenli bir şekilde yapılması için başlangıçta tarımı, hayvancılığı ve çevreyi korumak olarak kullanılmaktayken sonrasında insan sağlığının korunmasının da eklenmesi ile tanımı genişletilmiştir. Kısaca biyogüvenlik Biyogüvenlik unsurlar risk yani “olay ve işlemin nasıl bir tehlike oluşturacağına belirlenmesi” ile ilişkili olarak 5 farklı şekilde (risk tanımı, risk analizi, risk değerlendirme, risk yönetimi ve risk iletişimi) değerlendirilmektedir (Kılıç vd., 2019; Arvas ve Kocaçalışkan, 2020).

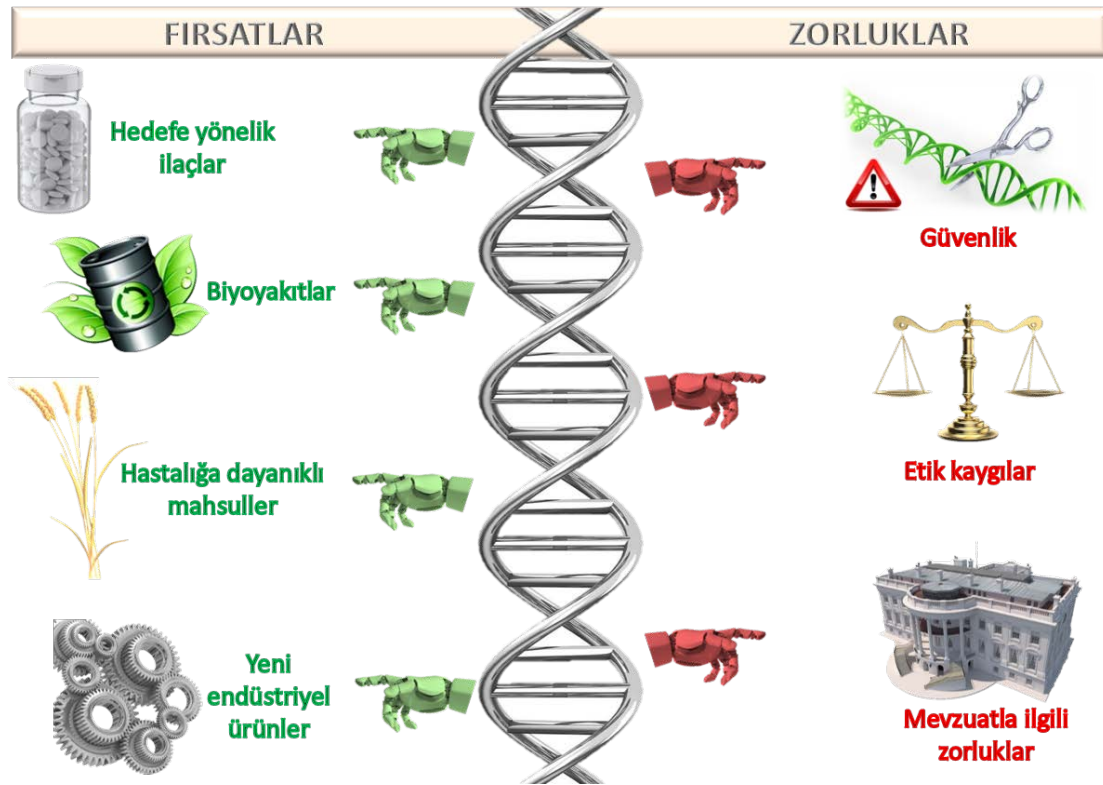
Biyoetik, Yunanca kökenli bir kelime olarak etik ile canlı bilimlerinin kesiştiği noktayı ifade etmektedir. Temelde bilimsel gelişmelerin ahlaki değerlere uygunluğunun sorgulandığı; tıp ve biyolojik bilimlerdeki uygulamaların etik açısından kapsamlı olarak açıklanması olarak tanımlanabilmektedir (Ricroch vd., 2018; Pierron ve Varobieff, 2019). Gelişen bilim ve teknoloji ile birlikte disiplinlerarası alanlarda Biyogüvenlik ve Biyoetik’in önemi de artmaktadır.

İnsanoğlunun beslenmesi ve sağlığını koruma-iyileştirme de biyoteknolojinin kullanımı, çevreyi koruma ve çevre zararlılarının azaltılması-yok edilmesinde de etkin bir görev üstlenmektedir. Günümüze gelene kadar uzun bir süreçten geçtiği bilinen bitki biyoteknolojisinde kullanılan bazı teknikler insanları endişelendirmekte ve tepki çekmektedir (Kurt ve Şavşatlı, 2005; Dederer vd.,

2019). Buna rağmen teknolojinin ve bilimin gelişimiyle tüm tekniklerin de gelişimi hızla devam etmektedir.

Nüfusun hızla artışı ve iklim değişikliği gibi etkenler dengeli ve iyi besin alımının homojen olarak dağılmamasına neden olmakta ve açlık sorununu gözler önüne sermektedir. Bu nedenle teknolojik gelişmelerin bilim ile birleştiği gen düzenleme teknolojilerinin gıda ve tarımda kullanımı, açlığı engelleme adına başvurulacak en yeni gelişme olmasının yanı sıra yasal sorunları da beraberinde getirmektedir (Miraglia vd., 2009; Chassy, 2010).

Gen transfer teknolojisinin bir ürünü olan BPs günümüz sorunlarına çözüm sağlamak amacı ile pekçok multidisipliner çalışma alanı (modern biyoteknoloji, gen teknolojileri, rDNA teknolojisi ve genetik mühendisliği teknolojileri) tarafından üretilmektedir. Çevreye ve insan sağlığına etkileri, ekonomik etkileri ve biyogüvenlik-biyoetik hakkında cevabı aranan bir dizi soru BPs ile gündeme gelmektedir (Şekil 13) (El-Mounadi vd., 2020).



Şekil 13. BPs'ye bakış

Biyoteknolojinin gelişerek bitki-tarım-gıda alanlarında bilimde ilerlemeler sağlayarak insanlığın faydasına kullanılabileceği gibi yanlış kullanım ve uygulamalar insan sağlığı ve çevre için potansiyel tehditler oluşturabilmektedir. Genetiğiyle Oynanmış Mikroorganizmaların (Genetically Engineered Microorganisms - GEM) çevreye doğrudan veya dolaylı etkileri olabilmektedir. Buna ek olarak BPs'in gıda ürünlerinde kullanımının artması-yaygınlaşması tartışma ve endişeleri de beraberinde getirmiştir (Ishii ve Ishii, 2021). Ayrıca büyük pazar payına sahip şirketlerin gıda etiketlemelerinde bu gibi ürünlere yer verilmemesi de ayrı bir tedirginlik yaratmaktadır. Özellikle günümüz NGETs'den CRISPR - Cas9 ve sentetik biyoloji kapsamında yapay doku-organ-organizma geliştirme uygulamaları biyogüvenlik endişelerini de beraberinde getiren en güncel alanlardan ikisidir (Zhou vd., 2019).

Öncelikle beslenmemizin temelini oluşturan gıda yönünden bakarsak; günümüzdeki en temel sorunların ve endişelerin yaşandığı konu olduğunu görebiliriz (Bradford, 2019). Günümüzde gıda arzının, nüfus ve kentleşme ile orantılı olarak artış göstermesi gıda hakkında üretim, arz-talep ilişkisi

ve sürdürülebilirlik kapsamında politik stratejiler geliştirilmesini sağlamıştır. Verimlilik ve üretimin artırılması da geliştirilen stratejilerle yakından ilişkilidir. Gıdaya ulaşım, erişim ve sağlıklı gıda temini için gıda güvenliğinin sağlanabilmesi gerekmektedir (Ramazan ve Somuncu, 2021). Bu konunun biyoteknolojik çıktılarının olumlu/olumsuz sonuçları ile birlikte biyoetik çerçevesinde değerlendirilmesi oldukça önem arz etmektedir. Gıda biyoetiği insanlığın en eski zamalarından günümüze kadar uzanan süreçte insan haklarının temelinde yer almaktadır. Farkındalığın artması sorunun çözümünün evrenselleştirilmesine ve de multidisipliner bakış açılarının geliştirilmesine yol açmaktadır. Bu kapsamda bilinçlendirici faaliyetlerin sayısındaki artış, ülkenin gelişmişlik düzeyi ve gelir seviyesi ile ilişkili olarak olumlu ya da olumsuz olarak etkilenecektir. Buna ek olarak çiftçi ve gıda üretimi yapanların bu faaliyetlerle bilinçlendirilmesi, yapıcı politikaların benimsenmesiyle yeni teknolojilerden faydalanılması ve yeni teknolojiler geliştirilmesi gıdanın güvenliğinin sağlanması açısından bir bütün olarak ele alınmalıdır. Gıda güvenliğinin sağlanmasıyla daha sağlıklı bireylerin yetiştirilmesi, açlık ve besin eksikliği gibi sorunların yaşanmaması, ülkelerin refah seviyesindeki artışlar gibi birçok konu da olumlu çıktılar elde edilebilir. Bunun yanı sıra raf ömrü uzatılması, yeni işleme tekniklerinin keşfi, işleme tekniklerinin etkin kullanımı, fonksiyonel besin üretimi, temel besin maddelerinin içeriğinin zenginleştirilmesi, besin elementlerinden düzgün-doğru yararlanım konularında da yararlar sağlayacaktır (Erbaş ve Arslan, 2012).

Tarım alanlarının da ikinci sırada etkilendiği güvenlik kapsamında; biyoteknolojik teknikler tarım alanlarının korunması ve işlevselliğinin artırılmasına katkılar sağlamaktadır (Viana vd., 2022). Önemli gelişmeler göz önüne alındığında modern biyoteknolojik tekniklerin tarımsal üretimi artırmada avantajlar sunduğu açık bir gerçektir. Hastalıklara karşı dirençli tohumların ekimi hem üreticiye hem de gıda tedariğinin sağlanmasına fayda sağladığı için gelişen teknolojilerin bilim ışığında her alanda kullanımı sağlanmalıdır. Bilinçlenen çiftçi geliştirilen teknolojik teknikler iyi tarım uygulamaları ile birleştirilerek hasat öncesi ve sonrasında ki kayıpların önüne geçebilecektir.

Disiplinlerarası bütüncül bir sistem olan sürdürülebilirlik açısından güvenlik kapsamında ilk olarak dikkat edilmesi ve çözümünün sağlanması gereken küresel ısınmaya neden olan fosil kaynakların kullanımı konusudur. İnsanoğlu ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlayabilmek adına sera gazı üreten fosil yakıtları kullanmaktadır. Ancak bu hem çevreyi olumsuz etkilemekte hem de pek çok soruna ev sahipliği yapmaktadır. Bunun yerine çevre dostu enerji kaynaklarının tercih edilmesi sürdürülebilir gıda güvenliği kapsamında ilk tercihlerden olmalıdır. Böylelikle temiz çevre ve temiz tarımsal faaliyetlerle biyoteknolojik tekniklerin kullanımının birleştirilmesi besin içeriğince zengin, hastalısız kaliteli ürünler ve verimli ekim alanları sağlayacaktır (Sircaik, 2021). Buna ek olarak çölleşmeye yüz tutmuş ekim yapılamayan arazilerin güneş panelleri ile donatılması ülkelerin enerji arzını karşılayacak ve tarıma elverişsiz alanların da değerlendirilmesinin önünü açacaktır.

Son olarak tüketicinin de bazı görev ve sorumlulukları güvenliği etkilemektedir. Refah seviyesi yüksek olan ülkelerdeki bilinçli insanlar israfı engelleyerek yerel kaynakların kullanımını tercih etmelidir. Böylelikle yerel üretici-çiftçi kalkınacak ülkenin refah seviyesine katkı sağlanacak ve gıda talebinin karşılanmasında daha az girdi olacaktır. Dolaylı yollarla küresel ısınma sorununa katkı azalacak ve sürdürülebilir bir gıda güvenliği sağlanmış olacaktır. Bilim insanlarının desteklenmesi ile yeni teknikler keşfedilerek biyoetik ve biyogüvenlik kapsamında değerlendirilerek her alanda kullanımı sağlanıp ülke kalkınmasına katkıda bulunulacaktır.

#### **4. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Artan nüfus sadece gıdayı değil yeraltı ve yerüstünde sınırlı olarak tanımlanan bütün kaynakları baskılamaktadır. Bugünlerde yaşamış olduğumuz sıkıntılar göz önüne alındığında; gıda talebinin halen tam olarak karşılanamaması, bazı kaynakların tükenmeye başlaması (yeraltı ve yerüstü su kaynakları, toprak, maden, mineral, yakıt) vb. gibi sorunlar/problemler küresel anlamda önem teşkil etmekte ve yapılacak her türlü çalışma öncelikli olarak değerlendirilmektedir. Günümüz ve gelecek için geçmişteki hor kullanım nedeni ile özellikle gıda talebinin de karşılanabilmesi amacıyla tüm kaynakların sürdürülebilirlik çerçevesinde kullanılması gerekmektedir. Modern biyoteknolojik

gelişimler bu kullanım için eşsiz fırsatlar sunmaktadır. Bu kapsamda ilk olarak besin temini için gıdanın ve paralelinde de tarımın etkilendiği büyük gelişmeler gelecek nesiller için ekonomik-sosyal-kültürel anlamda oldukça umut vaat etmektedir. Teknolojinin doğru kullanımı ile geçmişten beri süregelen sorunların/problemlerin de çözüme kavuşacağı öngörülmektedir. Bunun yanı sıra artan bilinçli birey sayısının da bu açıdan pozitif bir etkisi bulunmaktadır. Bu da multidisipliner bir bakış açısı ile teknolojik gelişmelerin bilinçli bireyler tarafından daha etkin kullanılabileceğini bizlere düşündürmektedir. Teknolojik gelişmelerin düzgün ve amaca uygun kullanımı nesillerimizin de devamlılığını sağlayarak sürdürülebilir bir dünyada yaşanmasını sağlayabilir. Ancak insanoğlunun bir kısmı bu gelişmelere tepkili, endişeli ve korku ile yaklaşmaktadır. Bu anlamda akla ilk gelen gıda güvenliği/güvencesi konusu olmaktadır. Konunun etkin ve düzgün işleyişi ile küresel ısınma, nüfus artışı, tarımsal sorunlar, gıda üretimi/tüketimi gibi sorunlar da en aza indirilebilir. Bütüncül tedbirlerle birlikte tüm ekosistem daha sağlıklı, daha mutlu ve huzur dolu bir yaşam sürebilir.

## KAYNAKLAR

- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., & Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232(4751), 738-743.
- Akbaş, B. (2019). Sürdürülebilir tarımda entegre mücadele çalışmalarının ülkemiz açısından değerlendirilmesi. *Yalvaç akademi dergisi*, 4(1), 32-40.
- Akbudak, M. A., & Kontbay, K. (2017). Yeni nesil genom düzenleme teknikleri: ZFN, TALEN, CRISPR'lar ve bitkilerde kullanımı. *Tarla bitkileri merkez araştırma enstitüsü dergisi*, 26(1), 111-126.
- Albustanlıoğlu, T., & Yılmaz, İ. (2021). Gastroarkeoloji: arkeolojik gıda kalıntılarından antik DNA'nın geri kazanımı. *Journal of tourism and gastronomy studies*, 5, 42-60.
- American Society of Plant Biologists. (2014). Agrobacterium tumefaciens pathogen and useful tool *Agrobacterium tumefaciens*. <https://slidetodoc.com/agrobacterium-tumefaciens-pathogen-and-useful-tool-agrobacterium-tumefaciens/>
- Arimura, S. I. (2022). MitoTALENs: A method for targeted gene disruption in plant mitochondrial genomes. In *Plant Mitochondria*, Humana, New York, 335-340.
- Arvas, Y. E., & Kocaçalışkan, İ. (2020). Genetiği değiştirilmiş bitkilerin biyogüvenlik riskleri. *Türk doğa ve fen dergisi*, 9(2), 201-210.
- Ball, E. (1946). Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. *American journal of botany*, 33, 301-318.
- Baltacı, A. M., & Arslan, M. (2020). Bitki ıslahında CRISPR/Cas9 uygulamaları. *Erciyes tarım ve hayvan bilimleri dergisi*, 3(2), 32-40.
- Bao, A., Burritt, D. J., Chen, H., Zhou, X., Cao, D., & Tran, L. S. P. (2019). The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing. *Critical reviews in biotechnology*, 39(3), 321-336.
- Baran, M. F., Bellitürk, K., & Çelik, A. (2021). Türkiye'de sürdürülebilir tarım uygulamaları: zorluklar ve potansiyeller. *İksad publishing house*.
- Barton, K. A., Whiteley, H. R., & Yang, N. S. (1987). *Bacillus thuringiensis* endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to *Lepidopteran* insects. *Plant physiology*, 85(4), 1103-1109.
- Basak, N., Verma, V. C., Kumar, R., & Kumar, G. (2021). Mechanism of ZFN-mediated genome editing: scope and opportunities. In *Genome Editing in Plants: Principles and Applications*, CRC Press, UK&USA, 13-27.

- Bass, S. B., Brajuha, J., Kelly, P. J., D'Avanzo, P., Lambertini, E., Nordhagen, S., & Monterrosa, E. C. (2022). Changing behavior, attitudes, and beliefs about food safety: a scoping review of interventions across the world and implications for empowering consumers. *Foodborne pathogens and Disease*, 19(1), 19-30.
- Bayramoğlu, Z., Tekin, M., & Ağızan, K. (2018). Türkiye’de biyoekonomi girişimciliğinin tarımdaki önemi. *Kahramanmaraş sütçü imam üniversitesi tarım ve doğa dergisi*, 21, 227-236.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current opinion in biotechnology*, 32, 76-84.
- Benjamin-Cummings. (2004). Genetic engineering using *Agrobacterium*. Pearson Education, Inc. <https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/PH/GMOs/GMOs3.html>
- Bergmann, L. (1960). Growth and division of single cells of higher plants *in-vitro*. *The journal of general physiology*, 43(4), 841-851.
- Bhoi, A., Yadu, B., Chandra, J., & Keshavkant, S. (2022). Mutagenesis: a coherent technique to develop biotic stress resistant plants. *Plant stress*, 3, 100053.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462.
- Boch, J. (2011). TALEs of genome targeting. *Nature biotechnology*, 29(2), 135-136.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512.
- Borrelli, V. M., Brambilla, V., Rogowsky, P., Marocco, A., & Lanubile, A. (2018). The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. *Frontiers in plant science*, 9, 1245.
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Bradford, J. (2019). *The Future is Rural: Food System Adaptations to the Great Simplification*. Post Carbon Institute, USA.
- Cappelli, S. L., Domeignoz-Horta, L. A., Loaiza, V., & Laine, A. L. (2022). Plant biodiversity promotes sustainable agriculture directly and via belowground effects. *Trends in Plant Science*, (2260), 14.
- Cardoza, V. (2008). Tissue culture: the manipulation of plant development. *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*, 113-134.
- Carlson, P. S. (1970). Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Science*, 168(3930), 487-489.
- Carlson, P. S., Smith, H. H., & Dearing, R. D. (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. *Proceedings of the national academy of sciences*, 69(8), 2292-2294.
- Carr, J. (2020). *Agrobacterium tumefaciens*. 365 Days of Microscopy. <https://jcarrbiomed.com/agrobacterium-tumefaciens/>
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782.
- Carroll, D. (2014). Genome engineering with targetable nucleases. *Annual review of biochemistry*, 83, 409-439.
- Chassy, B. M. (2010). Food safety risks and consumer health. *New Biotechnology*, 27(5), 534-544.
- Chawla, H. (2011). *Introduction to plant biotechnology*. CRC Press, New York.

- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436-439.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual review of plant biology*, 70, 667-697.
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263-271.
- Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187(4741), 962-963.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in-vitro*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 70(11), 3240-3244.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the royal society B*. 363(1491), 557-572.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Curtis, M. D., & Mann, D. G. (2016). Recombinant DNA, vector design, and construction. *Plant biotechnology and genetics: Principles, techniques, and applications*, 181-210.
- Çetiner, S., & Tuzla, İ. (2005). Türkiye ve dünyada tarımsal biyoteknoloji ve gıda güvenesi: sorunlar ve öneriler. GDO Bilgi Platformu, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, 18. <https://www.inovasyon.gen.tr/images/makaleler/sizdenBize/S.Cetiner.Inovasyon.org.pdf>
- DaMatta, F. M., Grandis, A., Arenque, B. C., & Buckeridge, M. S. (2010). Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food research international*, 43(7), 1814-1823.
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture. *Resonance*, 17(8), 759-767.
- Datta, D., Gupta, S., Chaturvedi, S. K., & Nadarajan, N. (2011). Molecular markers in crop improvement. *Indian institute of pulses research*, 208, 24.
- Dederer, H. G., & Hamburger, D. (2019). Regulation of genome editing in plant biotechnology. *Cham: Springer International Publishing*.
- Demirer, G. S., Silva, T. N., Jackson, C. T., Thomas, J. B., Ehrhardt, D. W., Rhee, S. Y., Mortimer, J. C., & Landry, M. P. (2021). Nanotechnology to advance CRISPR–Cas genetic engineering of plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 243-250.
- Dietrich, L., Meister, J., Dietrich, O., Notroff, J., Kiep, J., Heeb, J., Beuger, A., & Schütt, B. (2019). Cereal processing at Early Neolithic Göbekli Tepe, southeastern Turkey. *PLoS One*, 14(5), e0215214.
- Doyle, J. J., & Persley, G. J. (1996). New biotechnologies, an international perspective In: *Investment Strategies for Agricultural and Natural Resources Research*. CAB Int., Wallingford, UK.
- Eckardt, N. A. (2003). A new classic of cytokinin research: cytokinin-deficient *Arabidopsis* plants provide new insights into cytokinin biology. *Plant cell*, 15(11), 2489-2492.
- El-Mounadi, K., Morales-Floriano, M. L., & Garcia-Ruiz, H. (2020). Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9. *Frontiers in plant science*, 11, 56.
- Erbaş, M., & Arslan, S. (2012). Açlığın önlenmesi ve gıda güvenesinin sağlanması. *Gıda mühendisliği dergisi*, 36, 50-59.



- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232.
- Fernandez-Gutierrez, A., & Gutierrez-Gonzalez, J. J. (2021). Bioinformatic-based approaches for disease-resistance gene discovery in plants. *Agronomy*, 11(11), 2259.
- Finer, J., & Dhillon, T. (2008). Transgenic plant production. *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*, 245-274.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., & Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251(4995), 767-773.
- Galli, M., Hochstein, S., Iqbal, D., Claar, M., Imani, J., & Kogel, K. H. (2022). CRISPR/SpCas9-mediated KO of epigenetically active MORC proteins increases barley resistance to Bipolaris spot blotch and Fusarium root rot. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-7.
- Gautheret, R. J. (1934). Culture du tissu cambial. *C. R. Acad Sci (Paris) Sér III*, 198, 2195–2196.
- Gengenbach, B. G., & Green, C. E. (1975). Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin 1. *Crop science*, 15(5), 645-649.
- Gest, H. (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes and records of the royal society of london*, 58(2), 187-201.
- Goff, S. A. et al. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296(5565), 92-100.
- Goffeau, A. et al. (1997). The yeast genome directory. *Nature*, 387(6632), 5-6.
- Gökırmaklı, Ç., & Bayram, M. (2018). Gıda için gelecek öngörülleri: Yıl 2050. *Akademik gıda*, 16(3), 351-360.
- Gözükırmızı, N., & Karlık, E. (2017). Bitki biyoteknolojisinde tarihsel gelişmeler. *TÜRKTOB - Türkiye tohumcular birliği dergisi*, (24), 4-11.
- Graham, D. B., & Root, D. E. (2015). Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome biology*, 16(1), 1-21.
- Gudeta, D. (2019). Genome editing: tools and application in plants. *Journal of microbiology & biotechnology*. 4(1), 000135, 13.
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in-vitro*. *Nature*, 212(5057), 97-98.
- Gupta, O. P., & Karkute, S. G. (2021). Genome editing in plants: principles and applications. CRC Press.
- Haberlandt, G. (1902). Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. In *Plant tissue culture*, Springer, Vienna. 1-24.
- Hanjra, M. A., & Qureshi, M. E. (2010). Global water crisis and future food security in an era of climate change. *Food policy*, 35(5), 365-377.
- Hannig, E. E. (1904). *Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen*. A. Felix.
- Holtorf, H., Guitton, M. C., & Reski, R. (2002). Plant functional genomics. *Naturwissenschaften*, 89(6), 235-249.
- Hooke, R. (2003). *Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon*. Courier Corporation, Mineola, New York.

- Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., & Hoffmann, N. (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223(4635), 496-498.
- Hüdig, M., Laibach, N., & Hein, A. C. (2022). Genome editing in crop plant research-alignment of expectations and current developments. *Plants*, 11(2), 212.
- Ishii, M., & Ishii, T. (2021). Proving that a genome-edited organism is not GMO. *Trends in Biotechnology*.
- Jackson, D. A., Symons, R. H., & Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 69(10), 2904-2909.
- Jankele, R., & Svoboda, P. (2014). TAL effectors: tools for DNA targeting. *Briefings in functional genomics*, 13(5), 409-419.
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505-529.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Kamburova, V. S., Nikitina, E. V., Shermatov, S. E., Buriev, Z. T., Kumpatla, S. P., Emani, C., & Abdurakhmonov, I. Y. (2017). Genome editing in plants: an overview of tools and applications. *International journal of agronomy*. 315351, 15.
- Kanta, K. (1960). Intra-ovarian pollination in *Papaver rhoeas* L. *Nature*, 188(4751), 683-684.
- Kar, B. (2019). Modern tarımsal biyoteknoloji alanları ve faydaları. *EJONS - International journal on mathematics, engineering & natural sciences*, 12.
- Kesawat, M. S., & Kumar, B. D. (2009). Molecular markers: it's application in crop improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(4), 169-181.
- Khan, M. A., Kiran, U., Ali, A., Abdin, M. Z., Zargar, M. Y., Ahmad, S., Sofi, P. A., & Gulzar, S. (2017). Molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. In *Plant Biotechnology: Principles and Applications*, Springer, Singapore, 295-328.
- Khan, Z., Khan, S. H., & Ahmad, A. (2022). Challenges and future prospects of CRISPR technology. In *The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing*, Springer, Singapore, 311-333.
- Kılıç, İ., Doğan, İ., & Saraçlı, S. (2019). The assessment of laboratory safety in terms of biosafety: an application in Afyon Kocatepe University. *Kocatepe Veterinary Journal*, 12(1), 82-88.
- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., & Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327(6117), 70-73.
- Kotte, W. (1922a). *Wurzelmeristem in Gewebekultur*. Ber. Deut. Ges. 40, 269-272.
- Kotte, W. (1922b). *Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen*. Beitr. Allg. Bot. 2, 413-434.
- Krens, F. A., Molendijk, L., Wullems, G. J., & Schilperoort, R. A. (1982). *In-vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, 296(5852), 72-74.
- Kurt, O., & Şavşatlı, Y. (2005). Bitkisel biyoteknolojiye genel bir bakış. *Anadolu tarım bilimleri dergisi*, 20(3), 129-133.

- Kutman, B. Y. (2018). *Biyoteknoloji çağına hoş geldiniz!*, Tarımsal biyoteknoloji, 79-119.
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60(4), 197-214.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*, 30(5), 390-392.
- Li, Y., Yuan, F., Wen, Z., Li, Y., Wang, F., Zhu, T., Zhuo, W., Jin, X., Wang, Y., Zhao, H., Pei, Z. M., & Han, S. (2015). Genome-wide survey and expression analysis of the *OSCA* gene family in rice. *BMC plant biology*, 15(1), 1-13.
- Lin, S. Y., & Kwan, H. S. (2012). Recent advances of in vitro embryogenesis of monocotyledon and dicotyledon. In *Embryogenesis*. IntechOpen.
- Lopes Filho, J. H., da Silva, V. C. H., dos Santos, J. C., Dante, R., Gerhardt, I., Yassitepe, J. D. C., & Fernandes, F. (2021). Introduction to genome editing in plants. *Embrapa Informática Agropecuária-Capítulo em livro científico (ALICE)*.
- Low, L. Y., Yang, S. K., Kok, D. X. A., Ong-Abdullah, J., Tan, N. P., & Lai, K. S. (2018). Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method. *New visions in plant science*. Intech Open, London, 41-61.
- Lowder, L., Malzahn, A., & Qi, Y. (2016). Rapid evolution of manifold CRISPR systems for plant genome editing. *Frontiers in plant science*, 7, 1683.
- Mahapatra, D. M., Satapathy, K. C., & Panda, B. (2022). Biofertilizers and nanofertilizers for sustainable agriculture: phycoprosects and challenges. *Science of the total environment*, 803, 149990.
- Malzahn, A., Lowder, L., & Qi, Y. (2017). Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell & bioscience*, 7(1), 1-18.
- Marton, L., Wullems, G. J., Molendijk, L., & Schilperoort, R. A. (1979). In-vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 277(5692), 129-131.
- Massachusetts Institute of Technology. (2015). <https://www.weforum.org/agenda/2015/11/how-gene-editing-is-changing-the-world/>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(2), 560-564.
- McGinn, J., & Marraffini, L. A. (2019). Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature reviews microbiology*, 17(1), 7-12.
- Mehta, M. D., & Gair, J. J. (2001). Social, political, legal and ethical areas of inquiry in biotechnology and genetic engineering. *Technology in society*, 23(2), 241-264.
- Melchers, G., Sacristán, M. D., & Holder, A. A. (1978). Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg research communications*, 43(4), 203-218.
- Mertz, J. E., & Davis, R. W. (1972). Cleavage of DNA by R1 restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proceedings of the national academy of sciences*, 69(11), 3370-3374.
- Metje-Sprink, J., Menz, J., Modrzejewski, D., & Sprink, T. (2019). DNA-free genome editing: past, present and future. *Frontiers in Plant Science*, 1957.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the american chemical society*, 77(5), 1392-1392.
- Miraglia, M., Marvin, H. J. P., Kleter, G. A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R. W. A., Noordam, M. Y., Pisante, M., Piva, G.,

- Prandini, A., Toti, L., van den Born, G. J., & Vespermann, A. (2009). Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and chemical toxicology*, 47(5), 1009-1021.
- Moose, S. P., & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant physiology*, 147(3), 969-977.
- Muir, W. H., Hildebrandt, A. C., & Riker, A. J. (1954). Plant tissue cultures produced from single isolated cells. *Science*, 119(3103), 877-878.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in-vitro*: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 51, 263-273.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Mushtaq, M., Bhat, J. A., Mir, Z. A., Sakina, A., Ali, S., Singh, A. K., Tyagi, A., Salgotra, R. K., Dar, A. A., & Bhat, R. (2018). CRISPR/Cas approach: a new way of looking at plant-abiotic interactions. *Journal of plant physiology*, 224, 156-162.
- Muzaffar, S., & Prasad, B. D. (2017). History of biotechnology. In *Plant Biotechnology*, Apple Academic Press, Boca Raton, 3(1)-25.
- Nadakuduti, S. S., & Enciso-Rodríguez, F. (2021). Advances in genome editing with CRISPR systems and transformation technologies for plant DNA manipulation. *Frontiers in plant science*, 11, 2267.
- Narula, A., Kumar, S., Bansal, K. C., & Srivastava, P. S. (2004). Biotechnological approaches towards improvement of medicinal plants. In *Plant Biotechnology and Molecular Markers*, Springer, Dordrecht, Springer Science & Business Media, Boston, 78-116.
- Noman, A., Aqeel, M., & He, S. (2016). CRISPR-Cas9: tool for qualitative and quantitative plant genome editing. *Frontiers in plant science*, 7, 1740.
- Nonhebel, S. (2005). Renewable energy and food supply: will there be enough land? *Renewable and sustainable energy reviews*, 9(2), 191-201.
- Novak, S. (2019). Plant biotechnology applications of zinc finger technology. In *Transgenic Plants*, Humana Press, New York, 295-310.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, 250(10), 4007-4021.
- Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı, G., Yıldız, M., Birsin, M., Ulukan, H., Emiroğlu, H., Koyuncu, N., & Sancak, C. (2005). Tarım teknolojilerinde yeni yaklaşımlar ve uygulamalar: bitki biyoteknolojisi. *Türkiye ziraat mühendisliği VI. teknik kongresi*, 1, 315-346.
- Özgen, Ö. (2007). Tüketiciler ve modern biyoteknoloji: model yaklaşımlar. *Ankara üniversitesi biyoteknoloji enstitüsü yayınları*. (1), 254.
- Özsensoy, Y., & Kurar, E. (2012). Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(2), 11.
- Pabo, C. O., Peisach, E., & Grant, R. A. (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 313-340.
- Pandey, K. K. (1973). Theory and practice of induced androgenesis. *New phytologist*, 72(5), 1129-1140.
- Pandita, D. (2022). CRISPR/Cas-mediated genome editing technologies in plants. *Plant abiotic stress physiology: responses and adaptations*, 1, 293.

- Park, S. Y., Vaghchhipawala, Z., Vasudevan, B., Lee, L. Y., Shen, Y., Singer, K., Waterworth, W. M., Zhang, Z. J., West, C. E., Mysore, K. S., & Gelvin, S. B. (2015). *Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins. *The plant journal*, 81(6), 934-946.
- Paszkowski, J., Baur, M., Bogucki, A., & Potrykus, I. (1988). Gene targeting in plants. *The EMBO journal*, 7(13), 4021-4026.
- Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chetrit, P., Remy, R., & Renard, M. (1983). Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Molecular and general genetics MGG*, 191(2), 244-250.
- Petolino, J. F., & Davies, J. P. (2013). Designed transcriptional regulators for trait development. *Plant science*, 201, 128-136.
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In-vitro cellular & developmental biology plant*, 55(3), 242-257.
- Pierron, J. P., & Varobieff, L. (2019). Bioethics and plant biotechnologies. *Revue francaise d'ethique appliquee*, (2), 101-112.
- Polat, P. K., & Yağdı, K. (2021). Bazı ekmeklik buğday genotiplerinde SSR (Mikrosatalit) markörü kullanılarak kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr10*'un belirlenmesi. *Kahramanmaraş sütçü imam üniversitesi tarım ve doğa dergisi*, 24(4), 850-858.
- Power, J. B., Cummins, S. E., & Cocking, E. C. (1970). Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*, 225, 1016-18.
- Prasad, B. D., Sahni, S., Kumar, P., & Siddiqui, M. W. (2017). *Plant biotechnology: principles, techniques and applications*, CRC Press, USA, (1), 415-454.
- Premanandh, J. (2011). Factors affecting food security and contribution of modern technologies in food sustainability. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(15), 2707-2714.
- Puchta, H., & Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The plant journal*, 78(5), 727-741.
- Qin, Y., Park, T. S., Cho, Y. S., & Lim, M. H. (2021). TALEN-mediated bar-knockout rice production and transcriptome profiling. *Plant breeding and biotechnology*, 9(1), 32-44.
- Rai, P., & Arya, H. (2021). Molecular cloning. In *The Design & Development of Novel Drugs and Vaccines*, Elsevier Science Publishing Co Inc, San Diego, United States, 135-163.
- Ramazan, K., & Somuncu, M. (2021). Gıda güvenliği konusunda türkiye için bir değerlendirme. *Ankara üniversitesi çevrebilimleri dergisi*, 8(2), 1-11.
- Ranabhatt, H., & Kapor, R. (2017). *Plant biotechnology*. WPI - Woodhead Publishing India, (1), 542.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PloS one*, 8(6), e66428.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften*, 45, 344-345.
- Reinert, J. (1959). Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 53(4), 318-333.
- Reinhard, E. (1974). Biotransformations by plant tissue cultures. In *Tissue Culture and Plant Science*. 433-459.
- Ricroch, A. E., Guillaume-Hofnung, M., & Kuntz, M. (2018). The ethical concerns about transgenic crops. *Biochemical journal*, 475(4), 803-811.

- Robbins, W. J. (1922). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Botanical gazette*, 73(5), 376-390.
- Robbins, W. J. (1922b). Effect of autolized yeast and peptone on growth of excised corn root tips in the dark. *Botanical gazette*, 74(1), 59-79.
- Rout, G. R. (2004). Effect of cytokinins and auxins on micropropagation of *Clitoria ternatea* L. *Biol. lett*, 41(1), 21-26.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., & Lahaye, T. (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318(5850), 645-648.
- Rönspies, M., Dorn, A., Schindele, P., & Puchta, H. (2021). CRISPR–Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology. *Nature plants*, 7(5), 566-573.
- Sah, N. K. (2017). Scope of plant biotechnology in the developing countries. In *Plant Biotechnology: Principles, Techniques, and Applications*, CRC Press, USA, (1), 45-67.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular cloning: a laboratory manual.*, (2).
- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D., & Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate science and technology*, 5(1), 27-37.
- Sanghvi, G. V., & Dave, G. S. (2017). Molecular markers in plant biotechnology. In *Plant Biotechnology: Principles, Techniques, and Applications*, CRC Press, USA, (1), 415-454.
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R., Schöpke, C. R., & Gocal, G. F. W. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant biotechnology journal*, 14(2), 496-502.
- Seibert, M. (1976). Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C. *Science*, 191(4232), 1178-1179.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J. J., Qiu, J. L., & Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(8), 686-688.
- Shankar, S., Uddin, I., & Afzali, S. F. (2017). Restriction endonucleases. *Plant Biotechnology: Principles, Techniques, and Applications*, CRC Press, USA, (1), 235-259.
- Sharma, S., Kaur, R., & Singh, A. (2017). Recent advances in CRISPR/Cas mediated genome editing for crop improvement. *Plant biotechnology reports*, 11(4), 193-207.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., & Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The EMBO journal*, 5(9), 2043-2049.
- Singh, M., Jaiswal, U., & Jaiswal, V. S. (2005). *In-vitro* regeneration and improvement in tropical fruit trees: an assessment. In *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Springer, Dordrecht, Springer Science & Business Media, Boston, 228-244.
- Singh, V., Bhattacharjee, G., Gohil, N., Maurya, R., Lam, N. L., & Alzahrani, K. J. (2022). An introduction to advanced technologies in synthetic biology. In *New Frontiers and Applications of Synthetic Biology*, Elsevier Science, Academic Press, (1), 1-9.
- Sircaik, S. (2021). Biotechnology in agriculture: development, potentials and safety. In *Crop Improvement*, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, London, New York, 1-21.

- Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In-vitro symp soc exp biol.*, 11, 18-131.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cell. *American Journal of Botany*, 45(10), 705-708.
- Stewart, C. N. (2016). *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*, John Wiley & Sons, Canada.
- Sudha, C. G., Sherina, T. V., Anand, V. A., Reji, J. V., Padmesh, P., & Soniya, E. V. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the medicinal plant *Decalepis arayalpathra* and production of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. *Plant cell, tissue and organ culture- PCTOC*, 112(2), 217-226.
- Sussex, I. M. (2008). The scientific roots of modern plant biotechnology. *The plant cell*, 20(5), 1189-1198.
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S. C., & Cigan, A. M. (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant physiology*, 169(2), 931-945.
- Takebe, I., Labib, G., & Melchers, G. (1971). Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58(6), 318-320.
- Tastan, C., Yaşar, S., Tanyolaç, M., Turgut, K., Şireli, U., Atak, C., Haliloglu, K., Benlioglu, K., Taşkın, K. M., Barlas, N., & Yıldız, G. (2020). CRISPR-of-things: applications and challenges of the most popular gene editing tool in the fields of health, agriculture and environment. *International journal of innovative approaches in science research*, 4(4) 153-190.
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2013). *Introduction to biotechnology*. Pearson Education. (3), 408.
- Thorpe, T. A. (2006). History of plant tissue culture. *Plant cell culture protocols*, 9-32.
- Townsend, J. A., Wright, D. A., Winfrey, R. J., Fu, F., Maeder, M. L., Joung, J. K., & Voytas, D. F. (2009). High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 459(7245), 442-445.
- Tunçgenç, M. (2014). *Dünyada ve Türkiye’de biyoteknoloji sanayisine bakış*. Lap Lambert Academic Publishing. 45.
- Van der Maessen, L. J. G. (1972). *Cicer L., a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (Cicer arietinum L.), its ecology and cultivation* (Doctoral dissertation, Veenman).
- Vasil, I. K. (2008). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 387-394.
- Verma, A. S., Agrahari, S., Rastogi, S., & Singh, A. (2011). Biotechnology in the realm of history. *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, 3(3), 321.
- Viana, C. M., Freire, D., Abrantes, P., Rocha, J., & Pereira, P. (2022). Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: a systematic review. *Science of the total environment*, 806, 150718.
- Vidyasagar, A. (2018). What is CRISPR? *Live Science Contributor*, Nicoletta Lanese published, <https://www.livescience.com/author/aparna-vidyasagar>.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.

- Voytas, D. F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual review of plant biology*, 64, 327-350.
- Voytas, D. F., & Gao, C. (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS biology*, 12(6), e1001877.
- Wada, N., Ueta, R., Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2020). Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. *BMC Plant Biology*, 20, 1-12.
- Wang, M., & Ha, Y. (2007). An electrochemical approach to monitor pH change in agar media during plant tissue culture. *Biosensors and bioelectronics*, 22(11), 2718-2723.
- Watson, R. R., & Preedy, V. R. (2015). *Genetically modified organisms in food: Production, safety, regulation and public health*. Academic Press, Elsevier Inc, 516.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
- Went, F. (1926). On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. In *Proc Kon Akad Wetensch Amsterdam*, 30, 10-19.
- White, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant physiology*, 9(3), 585.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Wolt, J. D., Wang, K., & Yang, B. (2016). The regulatory status of genome-edited crops. *Plant biotechnology journal*, 14(2), 510-518.
- Xie, K., & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Molecular plant*, 6(6), 1975-1983.
- Yadav, N. S., Postle, K., Saiki, R. K., Thomashow, M. F., & Chilton, M. D. (1980). T-DNA of a crown gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. *Nature*, 287(5781), 458-461.
- Yavuz, F. (2005). Türkiye’de tarım. *Tarım ve köyişleri bakanlığı yayınları*, Ankara, 1-252.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303-305.
- Yu, J. et al. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 296(5565), 79-92.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., & Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of molecular biology*, 86(1), 109-127.
- Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicker, A., Schell, J., Van Montagu, M., & Goodman, H. M. (1980). Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science*, 209(4463), 1385-1391.
- Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., Li, X., Pierick, C. J., Dobbs, D., Peterson, T., Joung, J. K., & Voytas, D. F. (2010). High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 12028-12033.
- Zhou, D., Song, H., Wang, J., Li, Z., Xu, S., Ji, X., Hou, X., & Xu, J. (2019). Biosafety and biosecurity. *Journal of biosafety and biosecurity*, 1(1), 15-18.
- Zhu, H., Li, C., & Gao, C. (2020). Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature reviews molecular cell biology*, 21(11), 661-677.