

## ÖZET

### RNAi YAKLAŞIMI KULLANILARAK PATATES BÖCEĞİNE (CPB) DAYANIKLI PATATES HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

HUSSAIN, Tahira

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü

Danışman:

Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN

Haziran 2018, 130 sayfa

Ticari olarak kullanılan böceklere karşı dirençli transgenik bitkilerin çoğu, *Bacillus thuringiensis*'ten izole edilen cry gen(ler)ini içerdikleri halde zararlı yönetimindeki sürdürülebilirlik ve dayanıklılık ile ilgili olarak Bt içeren kültür bitkilerinin yoğun olarak yetiştirilmesi yaklaşık yirmi yıldır sorgulanmaktadır. Bu çalışma, RNAi yaklaşımı kullanılarak patates böceğinin (Colorado Potato Beetle - CPB) metamorfoz ile ilişkili Ecdysone reseptörü (EcR) genini yüksek derecede özgünlük ile susturmaya odaklanmıştır. CPB'nin Ecdysone reseptör geninin kısmi cDNA'sı, sens ve anti-sens oryantasyonunda spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmış ve bir intronik dizi (pdk) ile çevrili pRNAi-GG vektörüne klonlanmıştır. Agria ve Lady Olympia çeşitlerinin yaprak ve internodal eksplantları, 35S promotörünün kontrolü altındaki EcR fragmanının sens ve antisens oryantasyonunu içeren plazmid pRNAi-CPB'yi barındıran *Agrobacterium* suşu LBA4404 ile enfekte edilmiştir. Neomisin fosfotransferaz (*nptII*) geni, 100 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonunda bitki seçim markörü olarak kullanılmıştır. Standart moleküler analizler aracılığıyla elde edilen birincil transformantlarda T-DNA'nın uygun şekilde bitki genomuna entegrasyonunu gösterilmiştir. Her iki çeşitte gelişen transgenik bitkiler, birinci, ikinci ve üçüncü evre CPB larvalarına karşı etkinlikleri açısından değerlendirilmiştir. Yaprak biyotoksitesite deneylerinde CPB'nin % 15-80 ölüm oranına ulaştığı gösterilmiştir. Transgenik bitkiler üzerinde beslenen böceklerde (0.87-4.14X) kontrolle (1.87-6.53X) karşılaştırıldığı zaman larva ağırlığında önemli ölçüde daha az değişiklik gözlemlenmiştir. Ayrıca, transgenik bitkiler üzerinde beslenen CPB larvaları, EcR-dsRNA'nın işlevselliğini gösteren azalmış EcR gen transkriptleri sergilemiştir. Bu çalışma sonucunda, patatesteki böcek zararlılarından kaynaklanan kayıpları azalttığı ve böylece artan ürün verimliliğine yol açtığı gösterilmiştir.

*Anahtar Sözcükler:* RNAi, Ecdysone reseptörü, Transgenik teknoloji, Böcek direnci, Molting

## SUMMARY

### DEVELOPMENT OF POTATO LINES RESISTANT TO COLORADO POTATO BEETLE (CPB) USING RNAi-BASED TRANSFORMATION APPROACH

HUSSAIN, Tahira

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor:

Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN

June 2018, 130 pages

Most of the commercialized insect resistant transgenic crops express cry gene (s) isolated from *Bacillus thuringiensis*, however, intensive cultivation of *Bt* crops over almost two decades has been questioned regarding its sustainability and durability in pest management. The present study was focused to knock down highly specific molting associated Ecdysone receptor (EcR) gene of Colorado Potato Beetle (CPB) using RNAi approach. The partial cDNA of Ecdysone receptor gene of CPB was amplified using specific primers in sense and anti-sense orientation and cloned in pRNAi-GG vector flanked by an intronic sequence (pdk). Leaf and internodal explants of Agria and Lady Olympia cultivars were infected with *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring plasmid pRNAi-CPB with EcR fragment under sense and antisense orientation under the control of 35S promoter. Neomycin phosphotransferase (*nptII*) gene was used as a plant selectable marker at a concentration of 100 mg L<sup>-1</sup>. The primary transformants obtained showed proper integration of T-DNA in plant genome by standard molecular analysis. The transgenic plants developed out of both cultivars were evaluated for their efficacy against first, second and third instar CPB larvae. The leaf biotoxicity assays revealed 15-80% mortality of CPB. A significantly lower fold change in larval weight was observed in insects fed on transgenic plants (0.87-4.14X) as compared to control (1.87-6.53X). Furthermore, CPB larvae fed on transgenic plants exhibited reduced transcripts of EcR gene indicating the functionality of EcR-dsRNA. The outcome of this research work is believed to reduce losses from insect pests in potato; thus leading to increased crop productivity.

*Keywords:* RNAi, Ecdysone receptor, Transgenic technology, Insect resistance, Molting