

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

*Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA HERBİSİTLERE TOLERANSLI KETEN  
(*Linum usitatissimum* L.)

GENOTİPLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Ousmane Sadou

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa Yıldız

Mayıs

2016

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ousmane Sadou



## ONAY

Prof. Dr. Mustafa Yıldız danışmanlığında Ousmane Sadou tarafından hazırlanan bu çalışma 10/05/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mustafa Yıldız

İmza:



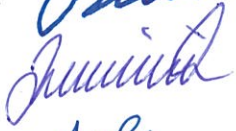
Üye: Prof. Dr. Cengiz Sancak

İmza:



Üye: Prof. Dr. Ali Ergül

İmza:



Üye: Prof. Dr. Serkan Uranbey

İmza:



Üye: Doç. Dr. Songül Gürel

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

*Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Herbisitlere Toleranslı Keten (*Linum usitatissimum* L.) Genotiplerinin Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar

Ousmane Sadou

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Mustafa Yıldız

Tez çalışmasında, üç keten (*Linum usitatissimum* L.) çeşidine (“Clarck”, “Madaras” ve “1886 Sel.”) *Agrobacterium tumefaciens*'nin 'GV2260 pTF101.1' hattı aracılığıyla “glifosinat amonyum” herbisite toleransı belirleyen *bar* geni aktarılmıştır. Çalışmada 0 (kontrol), 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 mg/L Bialofos herbisiti kullanılarak keten çeşitleri hipokotil eksplant üzerindeki en etkili dozu belirlemeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara sonuçlar incelediğinde ; kontrol dozunda Clark, Madaras ve 1886 Sel keten çeşitlerinde glifosinat amonyum herbisite karşı en düşük tolerans izlenmiştir. Tüm çeşitlerde seleksiyon için 0.75 mg/L Bialofos dozu optimum olarak kabul edilmiştir. Yapılan gen aktarımı çalışmaları inokulasyon, ko-kültivasyon, seleksiyon ve bitkilerin toprakta ~~saştırılması~~ saştırılması ile oluşmuşlardır. Çalışma sonucunda her 3 çeşitten de yabancı ot mücadelesinde yaygın olarak kullanılan “glifosinat amonyum” herbisitine karşı 48 adet toleranslı transgenik aday bitki elde edilmiştir.

2016, 91 sayfa

**Anahtar kelimeler:** *Agrobacterium tumefaciens*, keten, gen aktarımı, herbisit toleransı

## ABSTRACT

PhD Thesis

Studies on Improving Flax (*Linum Usitatissimum* L.) Genotypes Resistant to Herbicides  
via *Agrobacterium tumefaciens*

Ousmane Sadou

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Mustafa Yildiz

This thesis study included three linseed/flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars Clark", "Madaras" and "1886 Sel" for genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 pTF101.1' strain against glifosinat amonyum herbicide tolerance with bar gene. The study used 0 (control), 0.25, 0.50, 0.75 and 1 mg/L Bialofos herbicide on flax cultivars hypocotyl explant to find the most effective dose. Available data analysis found control dose as most ineffective doze glifosat ammonium against Clark, Madaras and 1886 Sel. 0.75 mg/L Bialofos was selected as the most optimum selection dose. The genetic transformation studies consisted of inoculation, co-cultivation, selection and transfer of plants to soil. The results confirmed putative genetic transformation of 48 plants from three flax cultivars for tolerance against "glifosinat amonyum" herbicide.

2016, 91 pages

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, flax, linseed, genetic transformation, herbicides tolerance

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmama başladığım andan itibaren tüm çalışmalarında olduğu gibi; tezimin planlanması, yürütülmesi ve yazılmasında da hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışması boyunca uyarı ve önerileri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi Üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL'e ve Sayın Prof. Dr. Serkan URANBEY'e teşekkür ederim.

Biyoteknoloji Enstitüsünde yönetim üyeleri Prof. Dr. Aykut ÖZKUL (Biyoteknoloji Enstitü Müdürü), Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ (Enstitü Müdür Yardımcısı) ve tüm hocalarıma ve idare personel herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tarla Biyotek Hocalarım Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN ve Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar Çalışma arkadaşlarım Değerli arkadaşlarım, Murat AYZAN, Deniz KÖM, Mustafa KAYAN, Mehdi TAHER, Behrouz ALIZADEH Burak ÖNOL'a, ayrıca PCR analizlerinin yapılmasında Dr. Canan YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Türkiye'de benim eğitimim ve konaklamam sağlayan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB) sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana sabır gösterip destek olan sevgili eşim ve kızım her aşamada yanımda olduklarını hissettiren ve destekleyen sevgili babama, anneme ve kardeşlerim herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En son olarak Nijer Devleti, Türkiye Devleti ve Türk Milleti'ne sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>5</b>
2.1. KETEN (LINUM USITATISSIMUM L.) .....	5
2.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ.....	8
2.3. GEN AKTARIMI.....	9
2.3.1. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS .....	9
2.3.2. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI .....	10
2.4. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN DURUMU.....	13
2.5. HERBİSİTLERİN TANIMI VE TARİHÇESİ.....	15
2.5.1. HERBİSİTLERİN SINIFLANDIRILMASI .....	15
2.5.2. BİALOFOS .....	17
<b>3. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>18</b>
3.1. KETEN İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR .....	18
3.2. DİĞER LİF BİTKİLERİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR .....	24

<b>3.3. GEN AKTARIM İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>29</b>
<b><u>4. GEREKÇE VE AMAÇ GAYET GÜZEL ☺.....</u></b>	<b>32</b>
<b><u>5. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b>33</b>
<b>5.1. MATERYAL .....</b>	<b>33</b>
5.1.1. BİTKİ MATERYALİ .....	33
5.1.2. EKSPANT MATERYALİ .....	33
5.1.3. BAKTERİ MATERYALİ .....	33
<b>5.2. YÖNTEM.....</b>	<b>34</b>
5.2.1. BESİN ORTAMLARININ HAZIRLANMASI .....	34
5.2.2. TOHUM STERİLİZASYONU .....	35
5.2.3. KETEN TOHUMLARININ ÇİMLENME VE FİDE OLUŞUMU .....	35
5.2.4. GEN AKTARIMINDA KULLANILAN BAKTERİLERİN HAZIRLANMASI .....	36
5.2.5. SIVI BESİYERİNDE BAKTERİNİN ÇOĞALTILMASI .....	36
5.2.6. İNOKÜLASYON .....	36
5.2.7. KO – KÜLTİVASYON ORTAMI .....	37
5.2.8. SELEKSİYON .....	37
5.2.9. TOPRAKTA GELİŞİM AŞAMASI .....	37
5.2.10. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN TAMPONLAR .....	38
5.2.11. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE DNA İZOLASYONU .....	38
5.2.12. PCR UYGULAMALARI.....	39
5.2.13. ELEKTROFOREZ KOŞULLARI .....	40
<b>5.3. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....</b>	<b>40</b>
<b><u>6. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>42</b>
<b>6.1. BİALOFOS'UN LETAL DOZLARININ BELİRLENMESİ.....</b>	<b>42</b>



6.1.1. CLARCK .....	42
6.1.2. MADARAS .....	43
6.1.3. 1886 SEL.....	44
<b>6.2. GEN AKTARIM SONUÇLARI.....</b>	<b>47</b>
6.2.1. CLARK KETEN ÇEŞİDİNE GEN AKTARIM SONUÇLARI .....	48
6.2.2. MADARAS KETEN ÇEŞİDİNE GEN AKTARIM SONUÇLARI.....	52
6.2.3. 1886 SEL KETEN ÇEŞİDİNE GEN AKTARIM SONUÇLARI.....	56
<b>6.3. FARKLI KETEN ÇEŞİDİNE BAR GENİ AKTARIM SONUÇLARI .....</b>	<b>60</b>
<b><u>7. TARTIŞMA VE SONUC.....</u></b>	<b><u>62</u></b>
7.1. TARTIŞMA .....	62
7.2. SONUÇ.....	64
7.2.1. ÖNERİLER .....	65
<b><u>8. KAYNAKLAR .....</u></b>	<b><u>66</u></b>
<b><u>9. EKLER.....</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>10. ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>KİŞİSEL BİLGİLER .....</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>EĞİTİM BİLGİLERİ .....</u></b>	<b><u>84</u></b>
<b><u>KURS VE SERTİFİKALAR.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>BRANŞ DIŞI FAALİYETLER .....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>YETENEKLER VE BİLİŞİM YETERLİLİĞİ.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>ULUSLARARASI KONGRELER.....</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>BİLGİSAYAR BİLGİSİ .....</u></b>	<b><u>86</u></b>

**YABANCI DİL BİLGİSİ ..... 86**

**11. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR ..... 87**



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Keten ( <i>Linum usitatissimum</i> L.) .....	5
Şekil 2.2. Keten ve Kenevir Türkiye’de ekim haritası (26). .....	7
Şekil 2.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (50).....	10
Şekil 2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı (56).....	11
Şekil 2.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ’in gen aktarım mekanizması (56) .....	13
Şekil 2.6. Dünyada GDO’ların ekim alanı (59).....	14
Şekil 2.7. Bialophos (107).....	17
Şekil 5.1. Çalışmalarda kullanılan eksplant materyali (25).....	33
Şekil 5.2. pTF101.1 Plazmid haritası (99).....	34
Şekil 6.1. Bialofos dozlarının Clarck keten çeşidi üzerindeki etkisi. ....	43
Şekil 6.2. Bialofos dozlarının Madaras keten çeşidi üzerindeki etkisi.....	44
Şekil 6.3. Bialofos dozlarının Sel 1886 keten çeşidi üzerindeki etkisi. ....	45
Şekil 6.4. Bialofos dozlarının keten üzerindeki etkisi. ....	46
Şekil 6.5. Keten çeşitlerinde rejenerasyon (%), Petride gelişen toplam sürgün sayısı ve toprakta gelişen bitki sayısı. ....	47
Şekil 6.6. Clark keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -1. ....	48
Şekil 6.7. Clark keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -2. ....	49
Şekil 6.8. Clark keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -3. ....	50
Şekil 6.9. Clark keten çeşidinde PCR chv geni görüntüsü.....	51

Şekil 6.10. Madaras keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -1.....	52
Şekil 6.11. Madaras keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -2.....	53
Şekil 6.12. Madaras keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -3.....	54
Şekil 6.13. Madaras keten çeşidinde PCR <i>chv</i> geni görüntüsü. ....	55
Şekil 6.14. Madaras keten çeşidinde PCR <i>bar</i> geni görüntüsü -1. ....	56
Şekil 6.15. 1886 Sel keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -2. ....	57
Şekil 6.16. 1886 Sel keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -3. ....	58
Şekil 6.17. 1886 Sel keten çeşidinde PCR <i>chv</i> geni görüntüsü. ....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5. 1. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları .	35
Çizelge 5. 2. PCR karışımı.	40
Çizelge 5. 3. PCR döngüleri.	40
Çizelge 6. 1. Bialofosun Clarck keten çeşidi üzerindeki etkisi	42
Çizelge 6. 2. Bialofosun Madaras keten çeşidi üzerindeki etkisi.	43
Çizelge 6. 3. Bialofosun 1886 Sel keten çeşidi üzerindeki etkisi.	44
Çizelge 6. 4. Bialofosun üç keten çeşidi üzerindeki etkisi	45
Çizelge 6. 5. Farklı keten çeşitlerine gen aktarım sonuçları.	47
Çizelge 9. 1. CLARK	75
Çizelge 9. 2. MADARAS	77
Çizelge 9. 3. 1886 SEL	80

## SİMGELER DİZİNİ

aadA	<i>Aminoglicosit 3'-adenililtransferaz geni</i>
<i>AoPRI</i>	<i>Asparagus officinalis PRI geni</i>
Bar	<i>Fosfinotrisin acetyl transferaz geni</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dioksi-Nükleotit Trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
<i>GUS</i>	<i>β- Glucuronidaz</i>
LB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in nopalın styrene ait sol sınır fragmanının kalan parçası
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
mM	Milimolar
MS	Murashige ve Skoog besin Ortamı
p35S	Lahana Mozaik Virüsünden p35S promotörü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pVS1	<i>Pseudomonas</i> 'dan geniş bir konakçı plazmidi
T-DNA	Transfer DNA
Tnos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in nopaline sintaz geninden 3' terminator
Tvsp	Soya bitkisel depolama proteini geni Tvsp 3' terminatör
μl	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

İnsanların çevresindeki bitkilerden yararlanması; insanlık tarihi kadar eskidir. Yaşamın başlangıcından itibaren insanlar bitkileri; gıda, yakacak, giyim, silah ve mesken yapımında kullanmıştır (1). İnsanlar kendi ihtiyaçlarının büyük bir kısmını direkt bitkilerden yahut bitkiler ile beslenen hayvanlardan temin ettikleri ürünlerden elde etmektedirler. Bu sebepten tarım, yeryüzünde insan ve canlıların hayatının devamı sağlamak için çok önemlidir (2). Her zaman değişen çevre koşulları ve çok hızla artan dünya nüfusu agronomik üretimde yeni çeşit ıslahın ve ıslah çalışmalarının önemini oldukça arttırmıştır (3). Dünya nüfusunun bu hızla artmasıyla 2020'da 8 milyar, 2050'da ise 11 milyar olacağı düşünülmektedir. Bu sebepten nüfusun en yoğun olduğu bölgelerdeki gıda maddesi ihtiyacının, 2025 yılında ikiye katlanması beklenmektedir (4).

Bugünlerde tarım yapılan araziler dünya yüzeyinin %3'ünü kaplamaktayken işlenen alanlar; tuzlulaşma, erozyon, asitleşme, aşırı otlatma ve yoğun tarım gibi sebeplerle hızla azalmaktadır. - Bu faktörler ve artan nüfusun etkisiyle; şu anda 0.26 hektar olan kişi başına işlenen alanın, 2050 yılına kadar 0.15 hektara düşeceği tahmin edilmektedir. Ek olarak, çağdaş tarım için ihtiyaç duyulan su kaynaklarının varlığı ; suların giderek kirlenmesi ve artan su tüketimi nedeniyle– azalacaktır (4) . İnsanlığın geleceğinde beklenen, doğal kaynakların kirlenmesine bağlı olarak ortaya çıkan dengesizlik ve yok oluşların sebep olduğu etki günden güne kendisini daha ağır bir şekilde hissettirmektedir (5). Bunların sonucunda bitki verimi, kalitesi ve büyümesi, olumsuz şekilde etkilenmektedir. Dolayısıyla, kirlilik kaynaklarının olumsuz etkilerinin gelecekte artarak devam etmesi beklenmektedir. Bir taraftan dünya nüfusunun her geçen gün artması, diğer taraftan da tarımda kullanılan alanların son sınırlarına yaklaştığının düşünülmesi, verim artışlarının gelecekte devam etmesini gerekli kılmaktadır(3). Günümüzde bitki- verimleri farklı sebeplerden dolayı beklenen verim değerlerinin altında görülmektedir. Bitkileri verim potansiyellerinin üzerine çıkarabilmek için onların genetik yapılarının ıslah edilmesi çok önemlidir.

Klasik yöntemler kullanılarak çok uzun zaman alan ıslahın başarısını, fenotipik anaçlardan gelen genetik faktörler ile içinde buldukları ortamın koşulları belirlemektedir (6) (7). Bitki ıslahında kantitatif özellikleri etkileyen genlerin klasik metodlarla yeni bireylere

aktarılmasında özellikle “linkage” gibi birçok sorunla karşılaşmaktadır. Klasik ıslah yönteminde melezleme ile aktarılan genin/genlerin özelliklerinin bitkiler üzerinde fenotipik karakterler olarak gözlenebilmesi için, çok sayıda bitki popülasyonuna ve bu bitkilerin yetiştirilebileceği çok büyük alanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkilerde istenmeyen özelliklerin ortadan kaldırılması, uzun yıllar geri melezlemeleri zorunlu kılmaktadır. Bunun gibi bazı sorunlar klasik bitki ıslahının önemli olumsuzluklarıdır (8). Biyoteknolojik yöntemlerin kullanıma girdiği zamana kadar yapılan ıslah çalışmalarında ürün miktarının ve kalitesinin artırılmasına çalışılmış, kültür bitkilerinde zararlılara ve hastalığa karşı dayanıklılık elde edilmesine daha az önem verilmiştir(9).

Bitki biyoteknolojisine yönelik ilk çalışmalar 1900’lü yılların başlarında gerçekleştirilmesine rağmen, modern biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılması 1980’li yıllara dayanır. Bu yıllarda *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin bitkilerde tümör oluşturma mekanizmasının moleküler düzeyde belirlenmesi sonucunda bitkilere dışarıdan gen aktarılabileceği fikri ortaya atılmıştır. Bitkilere ilk gen aktarımı 1983 yılında tütüne markör gen aktarımlarıyla gerçekleştirilmiştir. İlk yıllarda *A. tumefaciens* ile yalnızca iki çenekli bitkilere gen aktarımı yapılabilirken, günümüzde yeni geliştirilen gen aktarım vektörleri ve doku kültürü teknikleri sayesinde buğday, mısır ve çeltik gibi önemli bitki türlerine de gen aktarımı yapılabilmektedir. ~~Yapılan~~ Gerçekleştirilen yoğun araştırmalar sayesinde *A. tumefaciens* ile kültürü yapılan çok sayıda bitki türüne gen aktarımı yapılır hale gelmiştir. Bitkilere gen aktarımı için *A. tumefaciens* dışında partikül tabancası, protoplastlara gen aktarımı ve mikroenjeksiyon gibi çok sayıda gen aktarım yöntemi kullanılmasına karşın, *A. tumefaciens* ile gen aktarımının çok önemli üstünlükleri bulunmaktadır. *A. tumefaciens* ile gen aktarımının en önemli üstünlüğü sadece istenilen genlerin bitkilere düşük kopya sayısı ile aktarılmasıdır. Gen aktarımında amaç, aktarılan genin tek bir kopyasıyla yüksek oranda protein üretiminin gerçekleşmesidir. Ayrıca, *A. tumefaciens* ile bitkilere gen aktarımı oldukça ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bütün bu olumlu yönlerinden dolayı *A. tumefaciens* "bitkilerin doğal genetik mühendisi" olarak adlandırılmaktadır (10).

Diğer gen aktarım yöntemleriyle karşılaştırıldığında *A. tumefaciens* ile bitkilere gen aktarımının önemli üstünlükleri bulunurken, bazı sınırlamalarla da karşılaşmaktadır. Bunlardan en önemlisi ise konukçu sınırlamasıdır. Tütün, patates ve patlıcan gibi



*Solanaceae* familyasına ait türlere çok kolaylıkla gen aktarımı yapılırken; buğdaygiller, baklagiller ve ağaç türlerine gen aktarımı oldukça zordur. Bu bitkilere *A. tumefaciens* ile gen aktarımı son derece düşük frekanslarda gerçekleşirken, gen aktarımı yapılan hücrelerden bitki rejenerasyonu da oldukça düşük oranlarda olmaktadır. Bundan dolayı çok sayıda bitki türünde transgenik bitkilerin elde edilmesi için yoğun emek ve zaman harcanmaktadır. Bu nedenle, bitkilerde gen aktarım frekansını artıracak yeni yöntemlerin bulunması, izole edilen genlerin bitkilere kolaylıkla aktarılarak transgenik bitki elde edilmesini kolaylaştıracaktır.

*Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımının zor olduğu bitki türlerinde, gen aktarım oranını artırmak için farklı uygulamalar yapılabilmektedir. Bunlardan bakteri yoğunluğu, inokülasyon ve ko-kültivasyon süresinin optimize edilmesi, farklı bitki organ ve hücrelerinin kullanılması rutin uygulamalardır. Bu uygulamalara ilave olarak asetosiyringon gibi bitki fenolik bileşiklerinin inokülasyon ve ko-kültivasyon ortamlarına ilave edilmesi de bazı bitki türlerine gen aktarımını önemli oranda arttırabilmektedir (11) (12). Yaralanan bitki hücrelerinden salgılanan fenolik bileşikler, *A. tumefaciens* içerisinde bulunan Ti plazmidinde bulunan virülens genleri uyarmakta ve uyarılan *vir* genlerinin kodlamış olduğu enzimler de bakteriden bitki hücrelerine T-DNA aktarımını gerçekleştirmektedir.

Klasik ıslah yöntemleri , bitkisel üretimin artırılmasında oldukça başarılı olmasına karşın, doğası gereği yavaş ve zaman alıcıdır. Bu nedenle, günümüzde verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Daha önce farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme çok zor olarak görülmekteyken, klasik ıslahta yabancı gen kaynaklarından yararlanma çok zor ve hemen hemen imkansız görülmektedir(13) (14). Son yıllarda Integratif bitki ıslahında biyoteknolojik yöntemler adı verilen tekniklerden yararlanarak, bitkilerde ıslah sürecinin kısaltılmasına yönelik araştırmaların sayısı gittikçe artmaktadır (15) (16) (17). Bitki biyoteknolojisi; bitkilerin verim kalitesini artırmak, bitki verimliliğini sınırlayan hastalık, zararlı ve stres faktörlerini engellemek, azaltmak veya ortadan kaldırmak için, moleküler, hücre ve doku kültürü temelli teknolojilerin kullanıldığı bir süreçtir (18).

Bilindiği gibi başarılı bir gen aktarımı için etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi ön şarttır. Bitki doku kültürü çalışmalarında, en uygun eksplant ile büyüme düzenleyicilerinin en etkili konsantrasyon ve kombinasyonlarının belirlenmesi, üzerinde çalışılan bitkide en yüksek sürgün rejenerasyon frekansının elde edilebilmesi için uygulanan ilk adımdır. Ancak, Yıldız (19) tarafından geliştirilen ve *in vitro* şartlarda eksplantların rekabete teşvik esasına dayanan yöntemle, kullanılan eksplant ile büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonlarında herhangi bir değişiklik yapılmaksızın, sürgün rejenerasyon frekansı önemli ölçüde arttırılmıştır.

Keten iyi bir rejenerasyon sistemine sahip olan bir bitkidir. Rejenerasyon işlemi özellikle *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı yapıldıktan sonra oldukça zorlaşır. Genetik transformasyon çalışmalarının yapılabilmesinde bitki rejenerasyon kabiliyetine sahip eksplantların seleksiyonu, kültür koşulları ve gen aktarım metodu gibi birçok değişken etkilidir. Yabancı ot kontrolünde kullanılan herbisitler, kültür bitkilerinde gelişmede gerileme ve verim kaybı gibi bazı sorunlara neden olmaktadır. Yabancı ot kontrolünde, kimyasal mücadele en yaygın ve en etkili yöntemdir (5).

Başka bitkilerde- olduğu gibi keten bitkisi ilk gelişme dönemlerinde toprakta kendiliğinden gelişen yabancı otlar, kültür bitkileriyle su, besin maddesi ve ışık bakımından rekabete girmekte, keten bitkilerine zarar veren hastalık ve zararlılara da konukçuluk yapmaktadır (8). Bu dönemde fideler çok hassas olup, uygulanan kültürel ve kimyevi uygulamalardan yüksek oranda olumsuz etkilenebilmektedirler. Tezin amacı ise herbisitlere karşı dirençli transgenik keten bitkilerin geliştirilmesi olmuştur. Diğer taraftan, geliştirilen "glifosinat amonyum" herbisitleri, etkili yabancı ot kontrolü sağlamıştır. *Bar/pat* geninin bitkilere aktarılmasıyla, sırasıyla "glifosinat amonyum" herbisitlerine toleranslı transgenik bitkiler kolaylıkla elde edilebilmektedir. Herbisitlere toleranslı bitkilerin en önemli avantajları; işçilik, mekanizasyon ve akaryakıt maliyetlerinde sağladıkları tasarruftur. Herbisitlere toleranslı kültür bitkileri ise, ilk gelişme döneminde yabancı ot kontrolü amacıyla yapılan herbisit uygulamalarından etkilenmemekte ve böylece %100'e varan oranlarda yabancı ot kontrolü sağlanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla herbisitlere dayanıklı yeni keten (*Linum usitatissimum* L.) genotiplerinin araştırılması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. KETEN (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

Dünyanın en eski kültür bitkilerinden birisi Keten (*Linum usitatissimum* L) (Şekil 2.1.); Linaceae familyasına ait, 9 cins ve 150 türü içeren tohumları ve lifleri kullanmak amacıyla ekilen, tek yıllık dikotiledon yapıya sahip; boyu 30 ile 100 cm arasında değişen, mavi ve beyaz çiçekleri olan, küçük genoma sahip (15 çift kromozomlu) bir bitkidir (20) (21) (22). Türkiye’de; Marmara, Karadeniz, İç Anadolu ve Ege bölgelerinde tarımı yapılmaktadır. Uzun boylu (70-100 cm), kuvvetli liflere sahip ve yüksekte dallanan çeşitleri lif üretimi için ; kısa boylu (30-69 cm) kısmen alçaktan dallanan çeşitleri ise, yağ üretim için yetiştirilmektedir (23).



Şekil 2.1. Keten (*Linum usitatissimum* L.)

a. Ketenin görünümü, b. Keten tohumu, c. Keten çiçeği (24)

Türkiye’de keten tarımı oldukça eskilere dayanmaktadır. Keten’in insanoğlu tarafından en az dokuz bin senedir kullanıldığı bilinmektedir. Hatta bu süreye otuz bin sene diyen

kaynaklar da bulunmaktadır (25). Tarih öncesi eski devirlerde, İsviçre'nin Göl kıyılarındaki yaşam bölgelerinde ve eski Mısır mezarlarında ketenden materyallere rastlanmıştır. Bu da ketenin, kullanımının binlerce yıldan beri geliştiğini ortaya koymaktadır (26). Yapılan arkeolojik kazılarda, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin Çayönü beldesinde M.Ö. 7200-6500 tarihine ait keten kalıntılara rastlanmıştır. Ayrıca, Avrupa'da yapılan kazılarda da İsviçre'deki Göller Beldesi'nde gibi keten kalıntıları bulunmuştur. İlave olarak, eski Mısırlılar'da (M.Ö. 1000) keten kumaşına sarılı mumyalara ve eski Yunanlılar ve Romalılar'da da keteni, lifi ve tohumu için yetiştirdiklerine belgelere rastlanmıştır. Hindistan'da ise keten yağı, eskiden beri yerel dinsel törenlerde kullanılmaktadır (27).

Keten tarih boyunca, çadır bezi, gemi yelkeni, gaz maskesi, hortum, muşamba üretimi ve gemi halatı, gibi farklı amaçlarla da kullanılmıştır. Bunlara ilaveten cila, boya, sert kontraplak, boya mürekkebi, yağ püresi , kağıt ve reçine üretiminde de kullanıldığı bildirilmektedir (23). Keten tohumunun en önemli biyolojik aktivitesi laksatif etkisidir. Dâhilen başlıca kabızlık ve bazı bağırsak hastalıkları için kullanımının yanında zayıflama amacıyla kullanımına da sıkça rastlanmaktadır. Bununla birlikte kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülebilmesinde yardımcı olarak da kullanılmaktadır (28) (29) (30). Tohumlar başlıca  $\alpha$ -linolenik asitten ibaret olan önemli miktarda sabit yağ taşımaktadır. Ayrıca müsilaj ve fitoöstrojenik özellikteki lignan içeriğinden dolayı da önem arz etmektedir (28) (31) (32).

Tohumları yağ ve protein açısından oldukça zengindir. Yağlar genellikle boya ve verniklerde, lifler ise tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (33) (20) (21). Keten tohumu, yağ asitlerinin yaklaşık %55'ini oluşturan omega 3 yağ asitleri grubundaki  $\alpha$ -linolenik asidin en zengin kaynaklarından birisidir (22). Keten tohumunun kabuklarında bol miktarda lignan bulunmaktadır (34) (35). Keten tohumu, taşıdığı başlıca bileşenler olarak lignanlar ve sekoizolarisirezinol diglukozite ilaveten  $\alpha$ -linolenik asit ve lif açısından da zengindir. Çok fazla doymamış yağ asidi [özellikle  $\alpha$ -linoik asit (C18:3)] üretir. Yağın tüketilmesi içeriğindeki  $\alpha$ -linoik asitler ve antioksidanlar ile sağlık açısından, (özellikle kalp-damar rahatsızlıkları ve kanser gibi hastalıkları önleyip direnç geliştirmede) oldukça önemlidir (36) (37). Lignanların ön maddeleri antikarsinojenik aktiviteye sahip enterodiol ve enterolakton bileşikleridir. Keten tohumları lignan içeriğinden antikarsinojenik olarak

değerlendirilmektedir (38) (39), . Ayrıca keten bitkisi besin değeri olan ve olmayan bileşenler de içermektedir (34). Hayvanlarda yem olarak kullanıldığında, hayvanların etleri veya yumurtalarındaki  $\alpha$ -linoik asit miktarlarını arttırmaktadırlar (13).

Dünyada Keten bitkisinin üretiminde Rusya %70 ile başta gelmektedir. Polonya %20 ile ikinci sırada , sonrasında ise Fransa ve Belçika, takip etmektedir. İrlanda ve Romanya son sıralarda yer almaktadır. Son istatistiki verilere göre Türkiye’de de keten yalnız 3 ha alanda ekilmektedir. İrlanda keteni beyazlığı ve Fransız keteni ise parlaklığı ile ünlüdür (26). Türkiye’de keten yetistirciliği ; Batı Karadeniz’in Kastamonu – Çorum illerinde ve İç Anadolu’nun Kütahya illinde ve az olarak Marmara Bölgesi’nin İstanbul illinde yapılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Keten ve Kenevir Türkiye’de ekim haritası (26).

Keten lifi serin tutması için yazlık dış giyimde kullanılmaktadır. Ayrıca, ev tekstil ürünlerinde, ceket, gömlek ve pantolon de yapımında da kullanılmaktadır. Bunların yanında su tesisatlarında lif olarak, kaliteli kâğıt yapımı ve halat yapımında da kullanılmaktadır. Keten taraklanmış liflerinin boyu çoğunlukla 20–75 cm arasındadır. Bunların ortalama değeri 50 cm kadardır. Lif hücreleri, tek olduklarında 7–8 cm kadar olmaktadır. Lif oluşturan hücrelerin sayısına ve yetişme koşullarına göre lif kalınlığı değişmektedir. Ortalama lif kalınlığı 0,014–0,025 mm uzunluğu aralığındadır. Tek bir lif ise en az 3–6 hücrelerinden oluşmaktadır (26).

## 2.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bir bitkinin tek hücreden bütün organları kullanarak tam bir organizmaya dönüşebilmesi özelliğine Totipotensi (40) adı verilir ve bu özellikleri sayesinde petri içinde ve steril koşullar altında, herhangi bir parçasından tüm bir bitki yetiştirilebilmektedir. Bu özellik bitkilerin, *in vitro* koşullar altında ağır metallere, tuza, herbisitlere, düşük sıcaklıklara, hastalıklara direnç veya tolerans geliştirmelerini ve bu karakterler bakımından seleksiyona uğramalarını mümkün kılmaktadır. Başka bir ifade ile, binlerce dekarlık, alanda, büyük bir maliyet ve masraf gerektirerek yapılabilecek ıslah çalışmaları, çok daha uygun ve kolay bir şekilde laboratuvarda yapılabilmektedir.– Daha önce kullanılan ıslah yöntemlerinde, genlerde istenen karakterlerin bir genotip içinde toplanabilmesi oldukça uzun bir zamana ihtiyaç göstermekte ve aynı zamanda büyük masrafları ve iş gücü kaybını da beraberinde getirmekteydi. Klasik ıslah yöntemleri ile birlikte aralarında melezleme uygulanabilen türlerin miktarlarının az olması, başarıyı kısıtlayan önemli bir etmendir. Islahın başarısı popülasyondaki genetik olarak farklı çeşitlilikle doğru orantılıdır. Fakat genetik mühendisliği, doğada bulunan genetik kaynakları herhangi bir limit olmaksızın kullanabilmektedir. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla, herhangi bir organizmaya bir canlıdan (insan, bitki, hayvan, mikroorganizmalar) klonlanan bir gen rahatlıkla aktarılabilir. Örnek olarak, bakteriden klonlanan bir gen, böceklere direnç kazandırmak için bitki hücresine aktarılabilir ve bu aktarım genetiği değiştirilmiş veya transgenik bitki olarak ifade edilen organizmaların üretimine imkân sağlamaktadır. Aktarılan genler, organizmaya yerleştirildikten sonra doğal olarak bitki genleriyle birlikte replike olmakta ve protein üretmektedirler. Bu güne kadar genetik mühendisliği özel teknikleri kullanılarak yapılan son çalışmalarda ; ot ilaçları, böceklere dayanıklılık sağlayan genlerin bitkilere aktarılması üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Fakat son yıllarda; tuz, soğuk, sıcaklık, kuraklık gibi stres faktörlerinden en az etkilenen dayanıklı yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesi üstünde yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (24).

, Bitki dokunun kültürü; bitkilerden izole edilen doku parçasını yapay besin ortamında süresiz yaşatma tekniği olarak tanımlanır. Hücreler bölünerek ilgili büyüme düzenleyici hormonlar kullanılarak embriyo, kök, sürgün, yaprak veya tam bitki oluşturabilir. Bazen kültürdeki hücrelerden ve dokulardan istenilen durumlarda kallus olarak tanımlanan farklılaşmamış hücre topluluğu geliştirilebilmektedir. Bu teknikler , ekonomik önemi olan veya nesli tükenmekte olan bitkilerin klonlanarak çoğaltılmasında başarılı bir şekilde kullanılabilir. Bitkilerin doku kültürü bitkilerin yoğun üretimine ilave olarak , laboratuvarda sentezlenmeyen sekonder

metabolitlerin ve doğal kaynaklardan tıbbi bileşenlerin üretiminde de kullanılabilir (41).

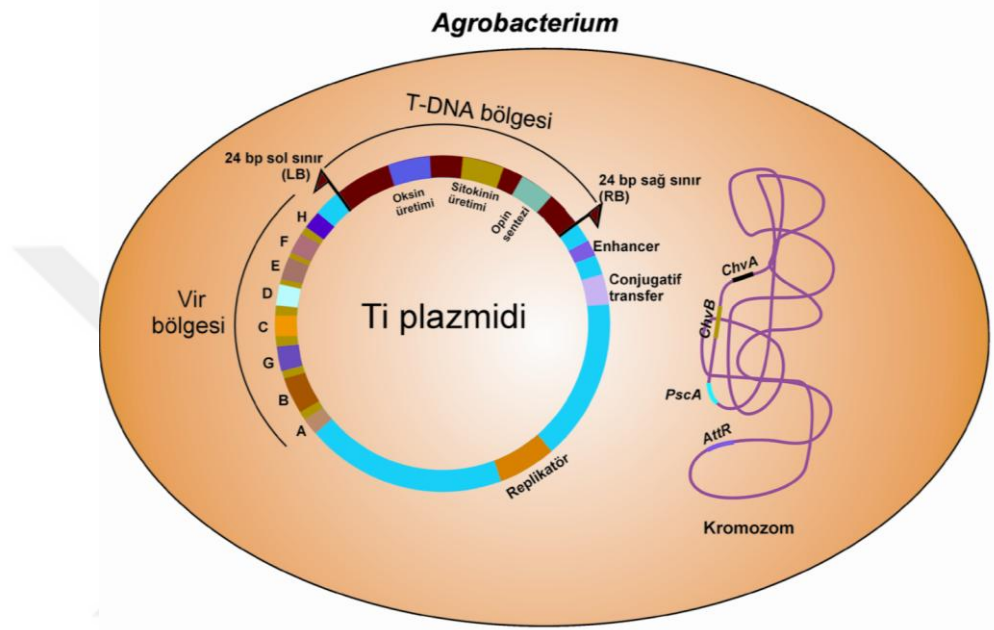
### 2.3. GEN AKTARIMI

Geçtiğimiz son 20 yılda gelişen teknolojiler arasında en çok tartışılan konulardan biri de genetik mühendisliği ve genetiği değiştirilmiş organizmalardır (42). Bitkilerin insanlar ve hayvanlar beslenmesinde kullanımı sebebiyle iyileştirilmesi çalışmalarında iki önemli dönem bulunmaktadır. Bunların ilki en son 60 yılda oluşan ve ‘Yeşil Devrim’ olarak bilenen, geleneksel bitki ıslahı ile ticari gübreler ve diğer argonomik yöntemlerin etkili olduğu zamandır. Sonraki dönem ise ‘Biyoteknoloji Devrimi’dir. Bu dönemde; geliştirilen etkili ve yeni teknikler sayesinde, kalitesi ve verimi yüksek bitki çeşitlerine bir ya da fazlası gen, yeni ve önemli özellikler kazandırmak amacıyla , aktarılabilir (43). Bin dokuzyüzlü yılların ortalarında DNA molekül yapısının tanımlanması, gen teknolojisinin milâdı olmuştur. Bulunduğu organizmanın tüm özelliklerini aminoasitler ile şifreleyen DNA’nın keşfedilmesi tür içi ve türler arası gen aktarımını mümkün kılmıştır (44). Gen aktarımı yöntemiyle, çeşitli çevresel stres faktörlerine, virüs, bakteri ve mantar kökenli hastalıklara, herbisitler (Ot öldürücü) gibi farklı çeşitli kimyasal bileşiklere dayanıklılık özelliği kazandırılması sağlanabilmektedir (45). Bitkilere gen aktarımı yönteminin temelini; seçilmiş olan geni taşıyan her hangi bir DNA kısmının doku içindeki hücre kromozomlarına yerleştirilmesi ve ondan sonra farklı teknikler kullanarak o hücrelerden genler aktarılmış (transgenik) yeni bitkilerin elde edilmesi, oluşturmaktadır. Genel olarak doku kültürü içerisinde çoğu zamanda zaman, gen aktarılmış olan hücrelerin oranı oldukça düşüktür. Bu nedenle, gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek adventif sürgün oluşumuna paralel olarak başarı da önemli derecede artmaktadır (3). Bitkide gen aktarımının başarısını etkileyen faktörlerden en önemlisi gen aktarılan hücrelerin rejenerasyon kabiliyetidir. - Rejenerasyon kabiliyetine sahip olmayan hücrelere gen aktarımı yapılması hiçbir anlam ifade etmemektedir. Bu nedenle tarımda öneme sahip bitkilere gen aktarımı, rejenerasyon kabiliyetine sahip hücre ve dokularda önem kazanmaktadır. (46).

#### 2.3.1. *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens*, Rhizobiaceae familyasına ait gram (-) bir bakteridir. Genellikle çift çenekli bitkilerin kökler boğazında oluşmuş olan yaralanmalarında bitkilerde enfeksiyona sebep olarak hastalığına yol açmaktadır. Tümör meydana getiren

*Agrobacterium* hatları ile yapılan çalışmalar, tümör oluşumu ve opin sentezinin, bakteride bulunan 150-250 kb büyüklüğünde bir DNA molekülü tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir (46). *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinde bulunan bu DNA molekülü Ti (Tumor including/Tümör oluşturan) Plazmidi olarak tanımlanmaktadır (47) (48). Leesman ve arkadaşları Ti Plazmidinin içerisine koyulan herhangi bir genin zorluk yapmadan bitki hücrelerine aktarım yapılabildiğini keşfetmiştir (49) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. *Agrobacterium tumefaciens* (50)

### 2.3.2. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı

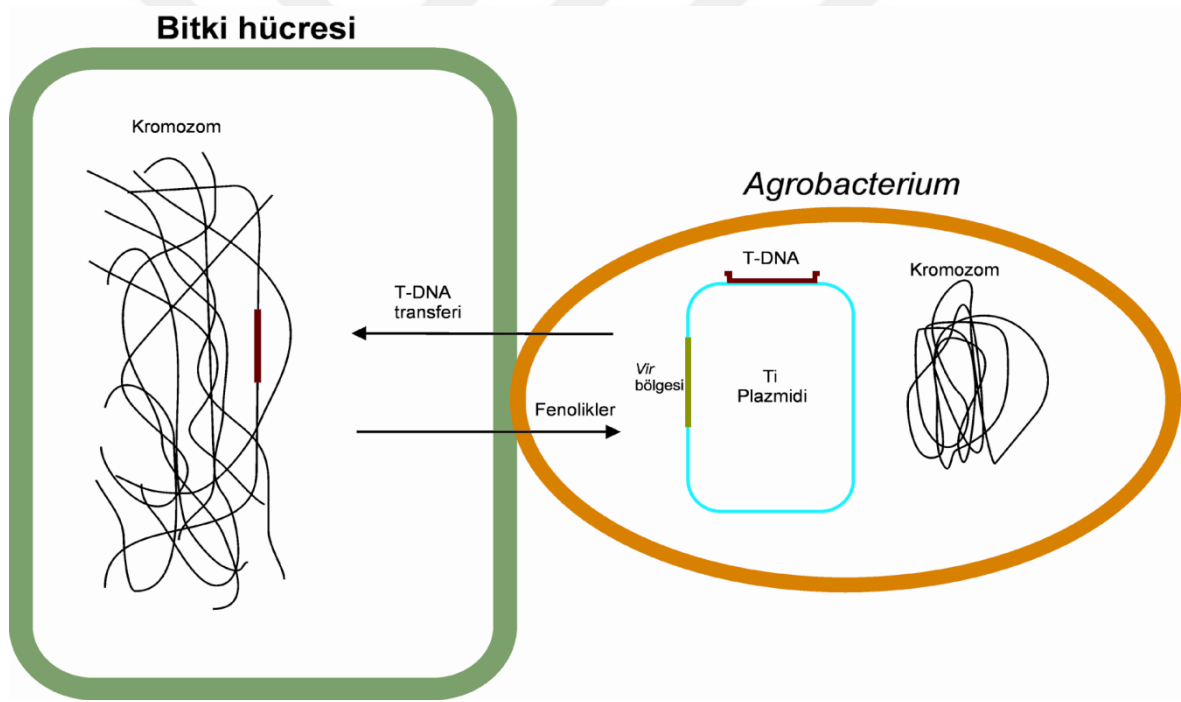
*Agrobacterium* bakterisi, bitki hücrelerine gen aktarımı yapabilmesi için aşağıdaki özelliklere sahiptir (Şekil 2.4); Ti plazmidi üzerinde bulunan T-DNA bölgesine sahip olmalıdır. Bakterinin T-DNA bölgesi, bitki hücrelerine aktarma yaparak bitkigenomu ile birleşen çok küçük bir DNA parçasıdır (50) (51). Opin ve napolin tipi plazmidlerin T-DNA bölgeleri, sağ ve soldan 25 bp uzunluğundaki düzensiz nükleotid dizileri ile sınırlanmışlardır. Bu sınırlar arasında ise tümör oluşturan genler bulunmaktadır (3). Yapılan araştırmalar sonunda ; bu iki sınır arasına yerleştirilen herhangi bir genin kolaylıkla bitki hücrelerine aktarılabildiği gösterilmiştir. Tümör oluşturan genlerin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek T-DNA dan uzaklaştırılmasının bitki hücrelerine gen aktarımını etkilemediği görülmüştür (52) (46) (3). Yapılan araştırmalar T-



DNA'nın sağ sınır nükleotid dizisinin gen aktarımında mutlak gerekli olduğunu ortaya koymuştur (53).

*Agrobacterium*'dan bitki hücresine gen aktarımında mutlak gerekli ikinci unsur ise T-DNA'nın dışında ve sol sınırına yakın olan yaklaşık 35kbç uzunluğundaki "Virulens (*vir*) genleridir. Yapılan araştırmalarda *vir* gen bölgesinin *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* ve *virG* genlerinden oluştuğunu göstermiştir Bu genlerin görevleri daha sonra yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir (54).

Bitki hücrelerine *Agrobacterium*'un gen aktarmasındaki mutlak gerekli olan üçüncü unsur ise , bakterinin kendi kromozomunda bulunan üç adet lokus olan *chvA*, *chvB* ve *pscA*'nın kodladığı ürünlerdir. Bunlar bakterinin bitki hücresinde tutunmasında önemli rol oynayan genlerdir (55) (56).



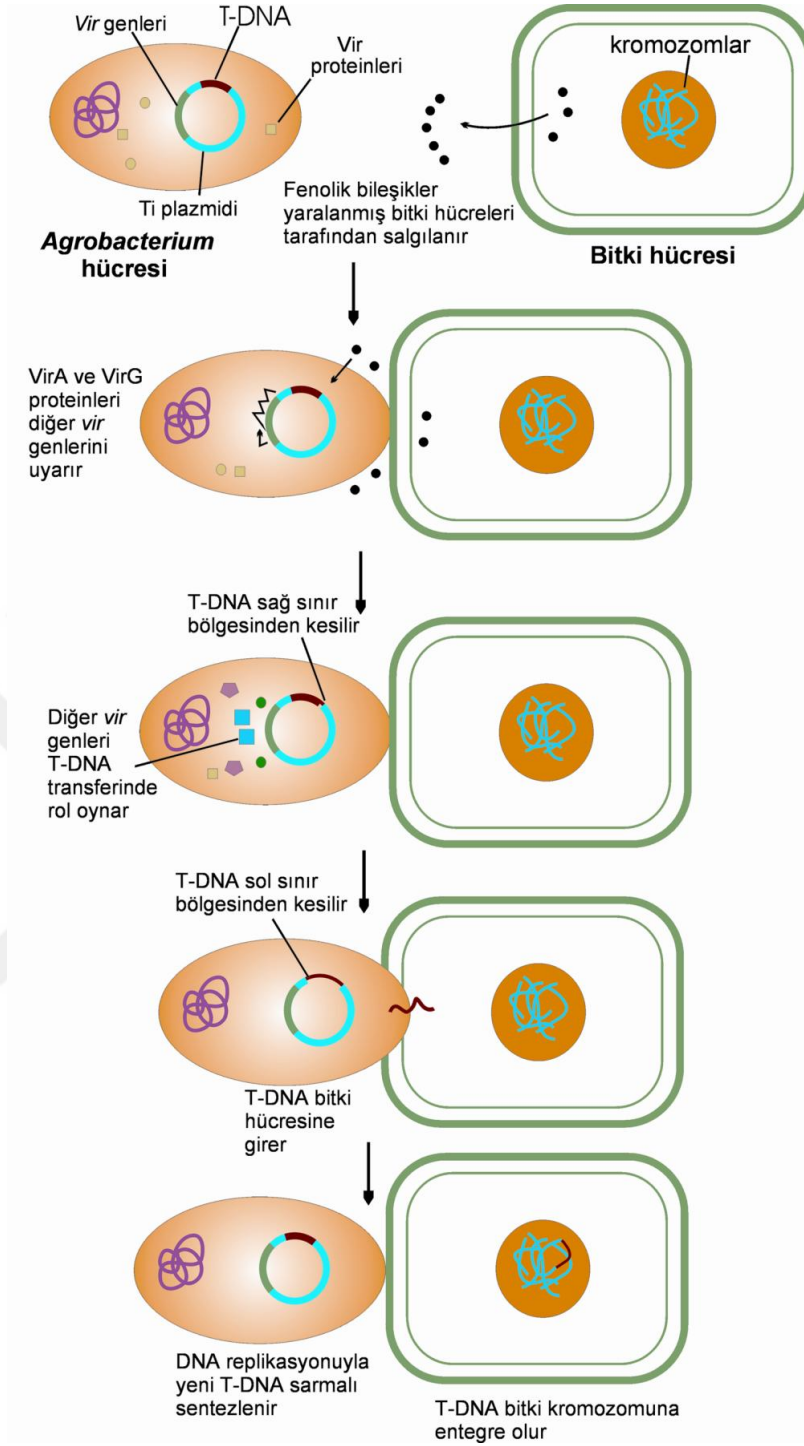
Şekil 2.4. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı (56).

Yaralanan bitki, fenolik bileşikler salgılar. Fenolik bileşikleri algılayan *Agrobacterium* bakterisi bitkinin yaralanmış hücrelerine tutunur. Bitkinin hücre duvarına tutunan bakteri hücresine, fenolik bileşikler girerek *vir* genlerini aktif hale getirir. *vir* genlerinin uyarılmasıyla T-DNA'nın alt sarmalı, *virD1* ve *virD2* genlerinin ürettiği bir endonükleaz enzimi tarafından alt sınır bölgesinden kesilir. *VirD2* proteini, plazmidin sağ sınır

bölgesinin 5' ucuna bağlanarak T-iplikciğinin serbest kalmasını sağlar (57). Serbest kalan tek sarmal T-DNA *VirE* proteini tarafından kaplanarak ortamda bulunan nükleaz enzimlerinin olumsuz etkilerinden korunur *VirD2* proteini, T-DNA'nın bitki hücresine aktarılmasında rol oynarken, *VirB* proteininin bakterinin hücre zarında T-DNA'nın geçebileceği büyüklükte bir açıklık oluşturduğu düşünülmektedir (10).

Bitki hücresine giren T-DNA, hücre çekirdeğine *VirD* proteinince taşınmakta, çekirdek içine girmesinde ise *VirE2* proteininin rol oynadığı tahmin edilmektedir (58) Böylece bitki hücre çekirdeğine giren T-DNA, bir veya birkaç kopya halinde rastgele bitki kromozomuyla birleşmektedir (57). (Şekil 2.5.).





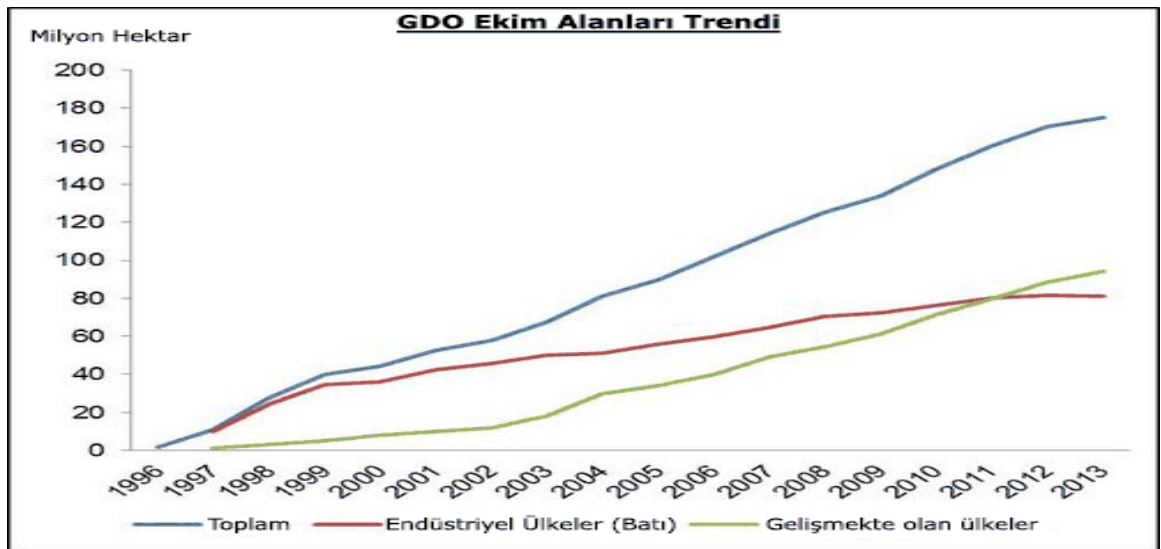
Şekil 2.1. *Agrobacterium tumefaciens*'in gen aktarım mekanizması (56)

#### 2.4. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN DURUMU

Dünya'da genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretimi hızla artmaktadır. Bu bitkilerin ekim alanı 1996 yılında 2,8 milyon hektar iken 2004 yılında 81 milyon hektara çıkmıştır. Üretimin en fazla yapıldığı ülkeler 2004 yılı bilgilerine göre; ABD, Arjantin, Kanada, Çin

ve geri kalan başka ülkeler olarak sıralanmaktadır. 1996-2004 yılları arasındaki verilere göre transgenik bitkilerden soya, mısır, pamuk ve kolza Dünya’da en fazla ekimi yapılan bitkilerdir. Bunlardan başka, kabak, patates papaya, domates ve tütün de fazla olmasa da yetiştirilir (59).

Türkiye’de Transgenik Bitkiler ilgili yasama çalışmaları ilk olarak, Transgenik olan Bitkiler ve Güvenlik için önlemleri konu başlığı ile Mart ve 1 Nisan 1998 tarihleri arasında yapılmıştır. Toplantının sonucunda; Transgenik bitkiler ve ürünlerin, Türkiye’ye giriş koşullarını ve belirlenen ana esaslar dahilinde teknik uygulamaların temellerini oluşturacak görüşler ortaya konmuştur. Sonrasında bu çalışmalara benzer olarak GDO üretilmesi ve pazara sunulması, gıda olarak kullanımı çalışmaları da son noktasına gelmiştir. Transgenik bitkilerin kullanıldığı alan denemeleri, 1998’den itibaren, Tarım Bakanlığına bağlı bulunan Araştırma Enstitüleri tarafından yürütülmüştür. Yeni bitki çeşitlerinin tescilinin sağlanması, ilgili yönetmelikte ihtiyac duyulan değişiklikler yapılmasına kadar, transgenik bitkilerinin yer alan denemeleri hakkında değişiklikler 1999. 03. 25 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Son olarak 1999 yılından itibaren belli illerdeki tarım araştırma enstitüleri tarafından alan denemeleri başlamıştır. Örneğin; Nazilli’de, Harran-Akçakale’de pamuk, Adana’da pamuk ve mısır, Niğde’de patates alan denemeleri yapılmaktadır. Alan çalışmalarında, tüm sıraladığımız ürünlerde risk değerlendirmesi ve risk analizi yapılabilmesi amacıyla gerekli tebbirler ve ölçümler hazırlanmıştır (59). (Şekil 2.6.).



Şekil 2.2. Dünyada GDO’ların ekim alanı (59).

## 2.5. HERBİSİTLERİN TANIMI VE TARİHÇESİ

Herbisit uygulamaları, sürdürülebilir tarımın gerçekleştiği alanlarda insanların kültüre almış olduğu bitkilerde, verimin azalmasına neden olan yabancı otlara karşı yapılan uygulamalardır. Yabancı otlara karşı kullanılan kimyasallara 'Herbisit' denir. Kısaca herbisitler, kültür bitkileri içerisinde ekonomik anlamda verim kaybına neden olan yabancı otların ve bu istenmeyen yerde yetişen yabancı otların zararlanması ve öldürülmesi için uygulanırlar. Tarımda kullanılan herbisitler, yabancı otlarda zarar meydana getirmek için seçicidirler. İçeriğindeki bileşiklerden dolayı bazı herbisitler yabancı otlarda yüksek seviyede zararlanmalar meydana getirirken bazılarında düşük derecede zararlanmalar meydana getirirler. Herbisitlerin uygulanması esnasında veya sonrasında kültür bitkilerinde bir takım üretim sorunları da herbisit kullanımının artışına paralel olarak artmıştır. Kültür bitkisi bazında bu sorunlar direkt kültür bitkisinde fitotoksite şeklinde, toprağa uygulanan bazı herbisitlerin bir sonraki ürüne zarar vermesi şeklinde, ürünlerde kalıntı, çevre kirliliği, aşırı kullanılmasından dolayı kültür bitkisinin gelişiminde zayıflama ve verim kaybı şeklinde ortaya çıkmaktadır.

Bu olumsuz etkilerin ana nedeni ise herbisitlerin püskürtülmesi esnasında hedefin kaçırılması, yanlış alet ve ekipmanların seçimi, uygulama aletlerinin uygulamadan önce kalibrasyonlarının yapılmaması, yanlış etki mekanizmasına sahip herbisitlerin seçimi, herbisitlerin önerilen fenolojik dönemde uygulanmaması ve uygulama esnasında çevresel koşulların uygunsuzluğu şeklinde sayılabilir (60).

### 2.5.1. Herbisitlerin Sınıflandırılması

Herbisitler aktivitelerine, kullanım alanlarına, kimyasal özelliklerine ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Bitki bünyesindeki etkinlik mekanizmasına göre herbisitler; fotosentezi önleyen, (urasil, üre bileşikleri, triazin), solunumu önleyen, (dinitrophenol, pentachlorophenol, anilin), mitoz bölünmeyi önleyen (carbamat, chloracylamid, anilin), çimlenmeyi önleyen (carbamatlar, anilin) ve *Asetil CoA karboksilaz* enzimini engelleyerek yağ metabolizmasını durduran herbisitler (diclofop, fluazifop, sethoxydim, quizalofop-P-ethyl, clethodim) olarak sınıflandırılabilir. Herbisitleri bitki dokularına nüfuz ettikleri dokulara göre de sınıflandırmak mümkündür. Bu açıdan toprak altı organlardan ve yapraklardan bitki dokularına nüfuz eden herbisitler mevcuttur. Bazı

herbisitler sadece temas ettikleri dokularda etki gösterirken (kontakt herbisitler), bazıları ise bitki taşınım sistemi ile tüm bitki dokularına dağılarak bitkide bütüncül etki gösterebilirler Ayrıca, hiçbir ayırım yapmadan tüm bitkileri öldüren total herbisitlerin yanı sıra özellikle dikotil bitkilere daha çok zarar veren seçici herbisitler mevcuttur. Dikotil ve monokotil bitkiler arasında morfolojik ve herbisit metabolizması bakımından farklılıkların varlığı hassaslık ve toleranslılığı ortaya çıkarır Seçici herbisitler genellikle buğday, arpa ve pirinç gibi monokotil tarım ürünlerinin tarımının yapıldığı ekim alanlarındaki geniş yapraklı dikotil bitkilerin yok edilmesinde kullanılır. Seçici herbisitlerin dikotil bitki metabolizmasına özgü metabolik yöntemlerle bu bitkilere seçici etki yaptığı düşünülmektedir. Zararlı otlarla mücadelede, zararlı otların gelişim evrelerine uygun zamanlarda farklı herbisitler kullanılmaktadır. Bu bakımdan herbisitler ekim öncesi (pre-sowing), ekim sonrası-çıkış öncesi (pre-emergence) ve çıkış sonrası (post-emergence) olmak üzere de gruplandırılabilir (61).

Herbisitleri çok farklı şekillerde sınıflandırmak mümkün olmakla birlikte, birçok karışıklık ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı en açıklayıcı sınıflandırma herbisitleri kimyasal yapılarına göre yapılan sınıflandırmadır. Herbisitlerin kimyasal yapılarına göre yapılan sınıflandırma (62) 'e göre özetlenmiştir.

- 1) Alifatik asitler: Dalapon, glyphosat, TCA
- 2) Amidler ve tiyoamidler: Alachlor, carbetamid, chlorthiamid, diphenamid, napropamid, pentanachlor, propachlar, propyzamid, propanil
- 3) Benzoik asitler: Chloramben, dicamba, 2,3,6-TBA
- 4) Bipiridiliumlar: Diquat, paraquat
- 5) Karbamatlar: Asulam, barban, chlorpropham, cycloate, eptc, molinate, phepmedipham, propham, thiobencarp, vernalate
- 6) Dinitroanilinler: Butralin, ethalfluralin, nitralin, oryzalin, penoxalin, perdimethalin, trifluralin
- 7) Nitril bileşikler: Bromoxynil, dichlobenil, oxynil

- 8) Dinirotfenoller: Dinosebacetat, dinoseb- DNBP, DNOC
- 9) Fenoksi bileşikleri: Quizalofop-P-ethyl, 2,4-D, fenoprop-2,4,5-Tp, MCPA, MCPB, mecoprop, 2,4,5-T, dichlofop-methyl, 2,4-DB, fluazifop-buthyl, haloxyfop

### 2.5.2. Bialofos

Bialofosun kimyasal formülü aşağıda verilmiştir. Bialofos glutamik asit analogu moiety veya fosfotrisin [PTC yahut glufosinate = 2-amino-4-(hidroksimetilfosfinil) butanoat] iki adet alanin kalıntıları. Bialofos nitrojen asimilasyon aşamasında bir enzim inhibitör etkisine sahip olup, glutamine synthetaz (GS)'da rol oynamaktadır. İntracellullar peptidazlarıyla Alanin uzaklaştırdıktan sonra aktifleşmiş oluyor. Geri kalan glufosinat bileşik GS üzerinde inhibasyon yaparak toksik aşamalarına gelenekadar hem bitki hem de bakteride ammonia biriktirmeye başlar. Glufosinatın biyokimyasal ve toksikolojik özellikleri bunu non selektif herbisit yapmak için yeterli olmaktadır ve ticari olarak Crop Science (formerly Aventis), tarafından Basta® ve Liberty® olarak satılmaktadır. Meiji Seika, Japon tarafından da bialofos satılmaktadır. Bitkilerde herbisit tolerans geliştirmek için burada Fosfotrisini parçalayan bir enzimin ekspresyonu göstermek amacıyla bir strateji geliştirmiştir (107).



Şekil 2.3. Bialaphos (107)

### 3. KAYNAK ÖZETLERİ

#### 3.1. KETEN İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Ciamprova ve Pretova (63) kültür ortamına ilave edilen oksin ve stokinin gibi hormonlar büyümeyi teşvik etmekte ve bitkicik gelişimi için bir ön muamele oluştururlar. Araştırmacılar ayrıca embriyo gelişiminde % 20 - % 25 süt olumu aşamasındaki embriyoların, % 60 - % 65 kalp şeklindeki embriyoların ve % 85 - % 90 daha ileri aşamadaki embriyoların kültürde gelişimlerini tamamlayarak. Çimlenmeye hazır duruma geçtiğini, glutamin ilavesinin ketende embriyo gelişimi için önemli bir ön işlem olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada tozlanmadan sonra 14 günlük embriyoları kültüre aldıklarında bu embriyoların yeşil olduklarını ve embriyoların temel dokusu içerisindeki nişasta granülleri ve phytoferritin bileşimi bakımından iyi geliştiğini, süt olum dönemi boyunca plastidlerin büyüklüğünün azaldığını, kloroplastların iç yapısının giderek dağıldığını, 10 günlük kültür sonrası 24 günlük embriyoların yeşil renklerini kaybederek sarardıklarını ve stomaların farklı büyüklüklerde olduğunu, 20 günlük kültür sonrası 34 günlük embriyoların ise yeniden yeşil renklerini alarak asimilasyona ve çimlenmeye başladıklarını bildirmişlerdir.

Fu ve Sun (64) keten, anter doku kültürü tekniği ile farklı genotipler kullanarak haploid bitkiler istelenen elde etmişlerdir.

Pretova (65) keten embriyolarını % 5 şeker içeren Monnier ortamında ve bu ortama,  $\pm 0,4$  g/l glutamin,  $\pm 1,0$  g/L yaprak ekstraktı,  $\pm 0,05$  g/L BAP oranlarında hormonların ayrı ayrı ve birlikte ilave edildiği ortamlarda kültüre aldıklarında; a) hormon içermeyen yalın ortamın normal embriyo gelişimini sağladığını, b) yalnız yaprak ekstraktı ilavesi kök ekseninin büyümesini önlediğini, c) yalnız BAP ilavesinin sürgün oluşumunu ve sürgün gelişimini teşvik ettiğini, kotiledon ve hipokotil dokularında kallus oluşumuna sebebiyet verdiğini, d) üç hormonun (glutamin, BAP, yaprak ekstraktı) birlikte ilave edilmesi durumunda kuvvetli bir embriyogenik gelişmenin sağlandığını ve kök uçlarında büyümenin teşvik edildiğini, e) glutaminin bulunmadığı ortamlarda embriyoların pek azının yeşil renk gösterdiğini, f) BAP içeren ortamlarda embriyoların yeşil rengini aldığını, BAP içermeyen ortamlarda ise kültür süresi boyunca embriyoların yeşil rengini kaybederek solduğunu bildirmişlerdir.



Millam vd (66) keten doku kültüründe eksplantlarından hipokotil rejenerasyonu adventif sürgün üzerine sukroz, maltoz ve sellobioz benzeri karbonhidratlarının yarattığı etkiyi araştırmışlardır. In vitro yapılan kültürde sukroz, farklı eksplantlarında karbonhidrat gerektiği miktar karşılamak için genellikle karbon kaynağı en çok kullanılmıştır. Elde edilen sonuçları göre, yüksek sukroz miktarlarda kök gelişimi en etkili seviyede görülmüştür. Sellobiozun etkisine baktığımızda sukroza daha hafif görülmüştür. Sukroz miktarı en iyise 58 mM kullanıldığında bu rakam sürgün gelişimi en iyise sağlanmıştır.

Nichterlein ve Friedt (67) ebriyogenesis yoluyla keten bitkisi rejenerasyonu izlemek sebebiyle mikrospor kültürü metod seçilmiştir. Sıvı bir ortamda iki sıcaklık farklı olan kültüre teci edile mikrospordan birinci kısmı kallus donuştururken, ikinci kısım ise embriyo oluşumu direk gözlenmiştir. mikrosporlar oluşturulduğu kalluslar 1 mg/l 6 zeatin içeren hazırlanan katı ortamlara aktarıldığında sürgün rejenerasyonu elde etmesi sağlamıştır. IAA oluşan ortamlarda elde edilen sürgünler, ilk olarak vermikulite ve sonrasında toprağa şaşırtılmıştır. Bitkilerin serada çoğu zamanda başarılı bir şekilde olgunlaşmıştır.

Bretagne vd (68) keten yağlık ve iki liflik çeşitlerde BAP thidiazuron ve zeatin sitokininlerinin apeks eksplantlarında kotiledon ve hipokotil, sürgünler rejenerasyonu üstünde etkisini çalışılmıştır. Bu üç farklı sitokinin kaynağının göre rejenerasyon üzerine sebep olan etkisi hem yalnız, hem de NAA, 2,4-D ve IAA vasıtasıyla birlikte incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre kotiledon eksplantları kök oluşturmasında olumlu ve sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyon izlenmiştir. Hipokotilden en fazla sürgün rejenerasyonu 0.1 µM thidiazuron + 0.01 µM NAA içeren ortamdan elde edilmiştir.

Madhusudhan vd (69) Amerika Birleşik Devlet'inin North Dakota bölgesinde 1998 yılında hasad edilmiş Neche ve Omega keten tohumu çeşitlerini öğütüp, yağını uzaklaştırdıktan %70 metanol/su çözeltisiyle ekstraksiyon işlemine tabii tutmuşlar, NaOH ile bazik hidroliz işleminden sonra da HPLC-DAD cihazında SDG lignan bileşimini teşhis etmişlerdir. Neche ve Omega keten tohumu çeşitlerinde SDG lignan miktarını sırasıyla 12.9 ve 14.3 mg/g olarak saptamışlardır.

Yıldız (10) bu çalışmada adventif sürgün regenerasyonu üzerinde farklı eksplant kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Çalışmada; üç ayrı keten türünde (Madaras, 1886 Sel. ve Omega), hem invitro hem de sera ortamında, hipokotil ve sap eksplantlar üzerinde incelemeler yapılmış; explant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki toplam sürgün sayısı değerlendirilmiştir. Tüm çeşitlerde hipokotil eksplantlarda ve invitro ortamda daha iyi sonuç alınmıştır. Sürgün regenerasyonu açısından değerlendirildiğinde invitro kültürdeki hipokotilde en iyi sonuç izlenmiştir. Petride toplam sürgün sayısı gen aktarma ile ilgili iyi bir göstergedir. Keten çeşitlerinde seradaki hipokotil eksplantlar petrideki toplam sürgün sayısı açısından değerlendirildiğinde ciddi düşüşler tespit edilmiştir. Ketende gen aktarma ile ilgili yapılan önceki bazı çalışmalarda da aynı sonuçlar bulunmuştur.

Degenhardt vd. (39) öğütölmü ve yağı alınmış keten tohumunun %70 metanol/su ekstraksiyonunu takiben bazik hidroliz işlemleri sonrasında örnekteki SDG lignan miktarı HPLC-DAD cihazında tayin etmişlerdir. Araştırmacılar keten tohumunun SDG lignan miktarı 5.5 mg/g olarak saptamışlar.

Yıldız ve Er (70) yaptıkları çalışmada çamaşır suyunun (NaOCl) değişen konsantrasyon (%40, %60 ve %80) ve farklı sıcaklıklarının (0, 10, 20, and 30°C) in vitro koşullarda keten tohum çimlenmesi, canlılık, fidelerinin gelişimi ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon oranı üzerine etkisini beyan etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarına göre tohum çimlenmesi, fide gelişimi ve sürgün rejenerasyon oranının dezenfektanın artan konsantrasyonları ve sıcaklığından negatif etkilendiğini göstermiştir. Fide gelişimi ve sürgün rejenerasyonunda en az bulaşık oranı 10°C sıcaklıkta %40'lık konsantrasyon da çamaşır suyu dezenfektanın kullanılmasıyla elde edilmiştir.

Yıldız ve Er (71) yaptıkları diğer çalışmada, keten bitkisinin hipokotil eksplantlarında, epidermis tabakası uzaklaştırarak eksplantları Agrobacterium ile muameleden transgenik aday sürgün oranının artırılması hedeflenmiştir. Soyulmamış hipokotil eksplantlarında kallus ağırlığı, sürgün oluşturan hipokotil oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve petri kutu deki sürgün sayısı sırasıyla 0.8 g, %40.00, 4.24 adet ve 16.96 adet olarak görölmüştür. Diğer taraftan, epidermis tabakası soyulduğunda, kallus ağırlığı, sürgün oluşturan hipokotil

yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrikutu deki sürgün sayısı sırasıyla 1.35 g, %58.75, 8.15 adet ve 47.88 adet olarak yükselmiştir.

Eliasson vd. (72) İsviçre’de 2000 yılı hasadından 10 çeşit, 2001 yılı hasadından da bir önceki yıldan farklı 17 çeşit keten tohumundan elde ettikleri öğütülmüş keten tohumu küspesinde %50 etanol/dioksan çözeltisi ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu işlemi ve bazik hidroliz uygulamaları ve keten tohumlarının SDG lignan içeriğini HPLC-DAD cihazında tayin etmişlerdir. Araştırmacılar 2000 yılına ait 10 çeşit keten tohumunun SDG lignan içeriğinin 13.3-25.9 mg/g arasında değiştiğini; 2001 yılına ait 17 çeşit tohumda ise SDG lignan miktarının 11.9-19.8 mg/g arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çeşitler arasında önemli farklar bulunmuştur.

Pretova ve Obert (73) embriyo kültür tekniği embriyo gelişimi için gerekli koşullar; bitkisel hormonlar ve çevre ortamının embriyoların gelişmesine etkisi ve embriyoların beslenmesi gibi faktörler değerlendirilmesi amacıyla da uygulanmaktadır. Zigotik embriyoların kültürü vasıtasıyla Zigotik embriyonun büyüme koşulları belirlenebilmektedir. Embriyogenesis genç zigotik embriyolar, somatik embriyolar ve gametik embriyolar kültüre alınarak belirlenmektedir.

Yıldız vd. (74) ABD’den getirilen üç adet keten çeşidinin 7, 12, 17 günlük fidelerden elde edilen hipokotil eksplantları agar ve phytagel ile katılaştırılan MS ve B- 5 ortamında sürgün rejenerasyon çalışmaları yapmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı her üç çeşit ve tüm ortamlarda 12 günlük fidelerden elde edilen hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ve petri kutuda gelişen toplam sürgün sayısına göre Her 3 çeşitte en iyi sonuçlar MS ve katılaştırıcı olarak agarın kullanıldığı 7 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Wakjira vd. (75) Etiyopya’da yetiştirilen 60 çeşit keten tohumunun yağ asidi kompozisyonuna kültür çeşitliliğinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında tohumların doymamış yağ asidi içeriklerinin çeşide bağlı olarak %85.9-90.6 arasında değiştiğini ve bunun %47-59.10 -linolenik asit, %10.9-16.1 linoleik asit, %14.8-29.3 oleik asitten meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca tohumların doymuş yağ asidi içeriği %8.4-11.9 arasında olup, palmitik asitin %5.2-6.6 ve stearik asitin %2.9-5.7 arasında değiştiğini saptamışlardır.

Yıldız ve Özgen (76) üç keten çeşidinde, 1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA içeren MS ortamında, hipokotil eksplantlarını su içerisine geçici daldırılması sonucu kültüre alınmış eksplantlar üzerinde sürgün gelişimi ile rejenerasyon etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Su ile muamele edilen hipokotil eksplantlarının sürgün rejenerasyonunda her bakımından olumlu etkileri izlenmiştir

Yıldız vd. (8) sürgün rejenerasyon için TDZ ve BAP ile NAA'nın keten hipokotil eksplantlarından sürgün gelişimi üzerine olan etkisini bakmışlardır. Farklı TDZ dozları (1, 2, 4 ve 8 mg/l) arasında; sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve petri başına toplam sürgün sayısı bakımından en uygun dozun 2 mg/l olduğu belirlenmiş ve TDZ dozları BAP ve NAA ile karşılaştırılmıştır.

Krist vd (77) Avusturya'dan 2 çeşit ve Almanya'dan 1 çeşide ait keten tohumu yağ örneklerinin yağ asidi kompozisyonunu inceledikleri çalışmalarında, keten tohumu yağının yağ asidi kompozisyonunu elektro spray iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS)'nde teşhis etmişlerdir. İnceledikleri 3 çeşit keten tohumu yağının yağ asidi kompozisyonunun %50'nin üzerinde -linolenik asitten, %20'in altında linoleik ve oleik asitten, %85'in üzerinde ise bu üç yağ asidinden oluştuğunu belirtmişlerdir.

Yıldız ve Özgen (78) BAP, NAA ve TDZ'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının üç keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için kullanmışlardır. Keten, En iyi sonuçlar, 1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA içeren MS ortamından; Madaras, 1886 Sel. ve Clark çeşitlerinde sırasıyla eksplant ağırlığında 1054, 944 ve 800 mg, sürgün rejenerasyonunda %100.0, %96.7 ve %70.0, eksplant başına sürgün sayısında 9.8, 9.8 ve 15.4, petri başına toplam sürgün sayısında 98.0, 96.0 ve 108.0 olarak elde edilmiştir. 1 mg/l'nin üzerinde artan TDZ dozları, eksplant üzerinde toksik etki göstermiş ve sürgün rejenerasyon frekansı önemli derecede düşmüştür.

Beejmohun vd (79) Fransa'dan temin ettikleri Barbara keten tohumunun preslenmiş kekinin %70 metanol/su çözeltisiyle muamele ederek fenolik bileşiklerini ekstrakte etmişler, sodyum hidroksit ile bazik hidroliz işlemi uyguladıktan sonra SDG lignan bileşimini HPLC-DAD cihazında teşhis etmişlerdir. Preslenmiş keten tohumu kekinde SDG lignan bileşimini 16.1 mg/g olarak saptamışlardır.

Uysal (80) bu araştırma; düşük linolenik asit oranına sahip keten çeşitlerinin geliştirilmesinde embriyo kültürü tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde, 2004-2006 yıllarında yürütülmüştür. Kallus ve bitkicik oluşumu bakımından; araştırmada kullanılan % 12 şeker içeren Monnier (1990B), % 0 ve % 1 şeker içeren B5 ve 3 şeker içeren LS2.5 besi ortamları içerisinde en iyi sonuç LS2.5 besi ortamından elde edilmiştir. Araştırmada Monnier besi ortamına, ebeveynlerden 400 ve melez kombinasyonlardan 1038 olmak üzere toplam 1438 embriyo kültüre alınmış ancak bu embriyolarda farklılaşma sağlanamamıştır. Şeker içermeyen B5 ortamında ise, ebeveynlerden 21 ve melez kombinasyonlardan 104 olmak üzere toplam 125 embriyo kültüre alınmış ve bu embriyolardan da farklılaşma sağlanamamıştır. % 1 şeker içeren B5 ortamında kültüre alınan 73 ebeveyn embriyosundan 4 tane bitki ve 218 melez kombinasyon embriyosundan 10 tane bitki elde edilmiştir LS2.5 besi ortamında kültüre alınan toplam 720 embriyodan 217 kallus ve 109 bitki elde edilmiştir. Bu ortamda kültüre alınan 275 ebeveyn embriyosundan 74 kallus ve 27 bitki; 445 melez kombinasyon embriyosundan 143 kallus ve 82 bitki elde edilmiştir. Embriyolar; Monnier besi ortamında tozlanmadan itibaren 3., 4., 5. ve 6. günlerde, B5 ve LS2.5 besi ortamlarına ise, 5., 6., 7., 8., 9. ve 10. günlerde kültüre alınmıştır. En yüksek başarı oranı B5+% 1 şeker içeren besi ortamında kültüre alınan ebeveyn ve melez kombinasyonlarda 9 günlük embriyolardan elde edilirken; en iyi sonucun alındığı LS2.5 besi ortamında ise 8 günlük embriyoların kültüründen elde edilmiştir.

Choo vd. (81) Yeni Zelanda'da marketten aldıkları soğuk sıkılmış ve %2 keten tohumu küspesi içeren yedi adet keten tohumu yağının fenolik bileşiklerini hegzan ve metanol çözeltisi kullanarak ekstrakte edip toplam flavonoid miktar luteolin eşdeğeri üzerinden UV spektrofometrede tayin etmişlerdir. Araştırmacılar keten tohumu yağlarının toplam flavonoid miktarlarının 12.7-25.6 mg/100 g arasında değiştiğini saptamışlardır.

Bozan ve Temelli (82) Konya'dan yerli üreticiden temin ettikleri keten tohumundan serbest fenolikleri sulu metanol ile, esterleşmiş fenolikleri de asidik metanol ile ekstrakte etmişler, gallik asit eşdeğeri üzerinden tayin yapmışlardır. 100 gram keten tohumunda serbest fenolikleri 383 mg, esterleşmiş fenolikleri 1287 mg ve toplam fenolik madde miktarı ise 1670 mg olarak bildirmişlerdir.

Sağlık (83) bu çalışmada keten hipokotil eksplantlarının in vitro koşullarda rekabet ve stress arasındaki ilişkileri incelenmiştir. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra hipokotil eksplantı üzerinde gelişen sürgünlerin yaş ve kuru ağırlıkları, sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına oluşan sürgün sayısı, sürgün boyu ve petri kutduda gelişen toplam elde edilen sürgün sayısı (adet) olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, eksplantlar arasındaki mesafe daraltama sonucu olumsuz etkileri yaparak önemli derece de inhibasyon sağlamaktadır. Doku kültürü için optimum mesafe 1.0 cm olarak ölçülmüştür

Yıldız (19) tarafından yapılan çalışmada hipokotillerde eksplantlar arası rekabet etkisini in vitro doku kültürlerinde değerlendirmek amaçlanmıştır. Tüm çeşitlerde taze ve kuru ağırlıklar eksplantlar arası mesafeye göre fark gösterdi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Taze ve kuru ağırlıklar için en iyi sonuç eksplantlar arası mesafe 2.0 cm olduğunda alındı. Eksplantlar arası mesafe azaldıkça taze ve kuru ağırlık değerleri de azalmıştır. Sonuç olarak eksplantlar arası mesafe azaldıkça, stres artmıştır. Bu artışın sebebi, su ve besin miktarındaki azalmanın stresi uyarmasına bağlanabilmektedir.

### **3.2. DİĞER LİF BİTKİLERİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALARI**

Silvertooth vd (84) Upland pamuk çeşidinde 13 MART-8 Mayıs tarihleri arasında 3 farklı ekim zamanının verim ve bitki gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Yaptığı denemede 3 lokasyonda da geç ekimle ilgili olarak yüksek boy/boğum oranında belli olan vejetatif büyüme eğiliminin gözlemlendiğini; tüm çeşitlerde, geç ekimlerde, lif veriminin azalma eğilimi gösterdiğini tespit edilmiştir.

Rey (85) Malçlı pamuk ekim tekniğinin, İspanya, İtalya, Yunanistan ve İsrail’de kullanıldığını, özellikle de İspanya’da pamuk ekim alanlarının % 80 gibi büyük bir kısmının malçlı ekimle yapıldığını; bu yöntemin ekim dönemini 20-30 gün erkene alabildiğini ve çıkışın çok yeknesak olduğunu bildirmiştir.

Atakişi (86) Kenevir bitkisi *Cannabaceae* familyasına ait, *Cannabis* cinsinden *Cannabis sativa* L. türündendir. Anavatanı Orta Asya olan kenevir bitkisi, dünyanın çeşitli bölgelerinde çok eski dönemlerden beri lifi ve tohumu için yetistirilmektedir. Kenevir bitkisi Çin’de yaklaşık 4500 yıl önce yetistirilmeye başlanmış olup, liflerinin kullanıldığını gösteren kayıtlar, Neolitik (Cilalı tas) devirlere kadar ulaşmaktadır. Tarihsel kayıtlar

kenevirin Batı Asya ve Mısır'a M.Ö. 1000–2000 yıllarında, Avrupa'ya ise M.Ö. 1500'lü yıllarda iskitler tarafından götürüldüğünü, daha sonra da Akdeniz kıyılarına yerleştiğini göstermektedir. M.Ö. 700-800'lü yıllara ait kenevir liflerinin Anadolu'da bulunduğunu gösteren kayıtlar da mevcuttur.

Silvertooth vd (87) 13 Upland pamuk çeşidinde 3 ekim zamanı uygulamasının (4 Nisan, 21 Nisan ve 9 Mayıs) verim ve bitki gelişmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yürüttükleri tarla çalışmasında, genelde yüksek lif verimlerinin tüm çeşitler için en erken ekim zamanında (4 Nisan) ortaya çıktığını; geç ekimlerle birlikte verimde azalmaya doğru bir eğilimin olduğunu, uygun değer büyüme, gelişme ve verimin, çoğunlukla daha erken ekim zamanlarında görüldüğünü bildirmişlerdir.

Kocjanacko ve Baricevic (88) kenevir tohumunun çimlenme yeteneği üzerine depolama koşulları ve tohum yasının etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada, Novosadska Konoplja, Unico-B, Juso 11, Bialobrzskie ve Beniko kenevir tohum çeşitlerini kullanmışlardır. Araştırmada farklı ortamlarda (depolama koşulları oda sıcaklığında 20-25 C0 ve soğutucuda 4-7C0) ve farklı zamanlarda depolanan tohum örneklerinin laboratuvar ortamında çimlenme hızı ve ortalama çimlenme yüzdesi tespit edilmiştir. Sonuç olarak belirlenen bes çeşit için ortalama çimlenme yüzdesi % 96.1 olarak tespit edilirken, dolapta ve oda sıcaklığında üç yıl için depolanan tohumların çimlenme yüzdesi sırasıyla % 65.0 ve % 46.4 olarak bildirilmiştir.

Bilgi vd (89) Bu çalışmada, SG 125, PAUM 15ve PAUM 23 pamuk çeşit bitkilerinde Farklı zamanlarda geçeci plastik maçları kullanarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, normal zamanda yapılan ekim ile kütlü pamuk verimi, önemli düzeyde az olduğu; erkencilikte 20-30 güne varan bir dezavantaj sağlandığı; bitkideki koza sayısını olumsuz yönde etkilediği ve çırçır randımanının azaldığı saptanmıştır. Çalışmada, incelenen bitki boyu, ilk meyve dalı yüksekliği, koza sayısı, koza kütlü pamuk ağırlığı, erkencilik, çırçır randımanı, lif uzunluğu, lif inceliği, lif mukavemeti, lif yeknesaklığı, kısa lif içeriği, lif elastikiyeti, lif parlaklığı, lif sarılığı yönünden materyal olarak ele alınan çeşitler arasında, istatistiksel olarak önemli farklılıkların olduğu; 100 tohum ağırlığı özelliği yönünden oluşan farklılığın, istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

Kasapoğlu (90) Bu çalışmada, organik pamuk, organik pamuk üretimi ve sorunları, Türkiye ve Dünyada organik pamuk üretim durumları incelenmiş olup maliyet hesaplanmasına ait yöntemler ve üretim maliyetine etki eden faktörleri incelenerek model işletme üzerinde organik pamuk ipligine ait üretim maliyetleri hesaplanmış ve farklı numaralarda ve karışımlarda konvansiyonel ve organik pamuk iplik maliyetleri karşılaştırılarak maliyet analizi çıkartılmıştır. Organik pamuk üretimi ve organik tarım metodları bu çalışmada detaylı olarak incelenmiştir. Pamukta yetistirme tekniklerinin organik tarım açısından ele alınması, yetistigi ekolojiye göre degismekle birlikte dünyanın en kirletici tarımsal ürünlerden biri olan bu bitkinin sorunlarını çözme amacını tasımaktadır. Pamuk bitkisinden tüketicilerin “çevreyle dost” ve “sorumlu” tüketime ilgisi, organic pamugu, tarım ilaçları ve diger toksik maddeler ile islenerek yetistirilen pamuga alternatif olarak ortaya çıkarmıştır. Pamuk yetistirilmesinde kullanılan insane saglığına zararlı kimyasallara deginilerek zararlı etkilerinden bahsedilmiştir. Pamugun ve giysi fiyatlarının yüksekliğine ragmen organik pamuk yetistirilmesine ayrılan toprakların oranı ve tüketici talebi artışı detaylı olarak araştırılmıştır. Fiyatların düşmesini kolaylaştıracak etkenlere deginilmiş ve organik pamuk ürünlerinin belgelendirilmesi ve hedefe odaklı pazarlamanın geliştirilmesi ve organik tekstil ürün çeşitliliğinin artmasını sağlayacak etkenler araştırılmıştır. Bu etkenlere organik pamuk ipliginin fiziksel özelliklerindeki farklılıkların belirlenmesi için aynı makine ve çalışma şartlarında aynı ve ayrı numarada üretilen organik ve konvansiyonel pamuk iplikleri tüylülük, mukavemet, düzgünsüzlük ve iplik hataları örnek verilebilir.

Pınarkara (91) Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilerek, İstanbul Adli Tıp Kurumu tarafından fakültemize teslim edilen kenevir tohumları arasında akrabalık bulunup bulunmadığı RAPD dominant markörleri kullanılarak araştırılmıştır. Dominant markörlerin istatistiki analizlerinde kullanılan temel koordinatlar analizi, kümeleme analizi, kümelerin güven sınırları, Mantel testi ve Nei ve Li genetik mesafesi tanıtılmış ve elde edilen veriler üzerinde bu metotlar uygulanmıştır. Çalışmada 29 kenevir aksesyonu sera saksı ortamında DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınmaya kadar yetiştirilmiştir. Moleküler genetik çalışmalarda tek birey DNA (SET1) ve bulk DNA (SET2) setleri kullanılmıştır. PCR amplifikasyonları sonucunda SET1'de 264, SET2'de 241 DNA bantı skorlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiki analizleri sonucunda SET1'de kullanılan aksesyonlar arasında belirgin bir gruplaşma



gözlenmemiştir. SET2’de ise ülkemizin batısındaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları ile, doğusundaki illerden elde edilen kenevir aksesyonlarının iki farklı grup oluşturduğu gözlenmiştir.

Gedik (92) Bu araştırmanın ana hedefi kenevir liflerinin optimum ağartma koşullarının belirlenmesi olmuştur. Bu amaçla % 100 kenevir lifinden üretilmiş dokuma kumaşa yükseltgen (hidrojen peroksit, perasetik asit, potasyum permanganat, sodyum perborat, sodyum perkarbonat) ve indirgen (thioüre dioksit, sodyum borohidrit, glikoz) ağartma ajanları aplike edilmiştir. Ağartma işlemleri çektirme ve emdirme yöntemlerine göre ayrı ayrı yapılmıştır. Buna ek olarak, çektirme yönteminde yüksek beyazlık değerlerinin elde edildiği kimyasal konsantrasyonları ve proses şartları baz alınarak ultrason ve mikrodalga yöntemlerinin etkisi de incelenmiştir. Ağartılmış numunelerin beyazlık indeksleri ölçülmüş, yüksek beyazlık değerlerinin elde edildiği numuneler seçilerek mukavemet, eğilme uzunluğu, kırışıklık düzelme açısı ve hidrofilite özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca metilen mavisi testiyle oksiselüloz oluşumu incelenmiştir. Çektirme yöntemiyle yapılan uygulamalarda pad-batch (emdirme-soğuk bekletme) yöntemine göre daha yüksek beyazlık derecelerine ulaşılmıştır. Çektirmeyle yapılan ağartmalarda özellikle hidrojen peroksit, potasyum permanganat ve perasetik asit uygulamalarıyla beyazlık indeksleri açısından daha başarılı sonuçlar alınmıştır. Ulaşılan en yüksek beyazlık değeri 82.73 (Stensby), 60 °C’de 7g/l potasyum permanganat aplikasyonunu takiben 8 g/l oksalik asit uygulamasıyla elde edilmiştir. Hidrojen peroksit ağartmasında ise ikinci en yüksek beyazlık değerine (78.51) ağartılan numuneler içindeki en yüksek mukavemet değeri eşlik etmiştir. İndirgen ağartıcılarla yapılan uygulamalardan tatmin edici ağartma performansı alınamamıştır. Pad-batch yöntemi, tekstil endüstrisinde özellikle dokuma kumaşlar için sıklıkla kullanılan ucuz ve pratik bir yöntemdir. Bu çalışmada çektirme yönteminde yüksek beyazlıkların elde edildiği kimyasalların (hidrojen peroksit, perasetik asit, potasyum permanganat) pad-batch kasarındaki performansı incelenmiştir. Beyazlık değerleri birbirine yakın olmakla beraber, pad-batch yönteminde en yüksek beyazlık değeri potasyum permanganat uygulamasında elde edilmiştir.

Akköse (93) Pamuk bitkisi birçok farklı sanayide ham madde olarak kullanılan doğal liflere sahip ekonomik değeri yüksek yenilebilir bir tarla bitkisidir. Pamuk üretiminde verimi etkileyen başlıca ana etmenlerden birisi Verticillium solgunluğu olarak

tanımlanmaktadır. Verticillium hastalığını kontrol altına almak çeşitli sebeplerden dolayı henüz mümkün olmamıştır. Verticillium solgunluğuna karşı genetik çeşitliğinin yetersiz kalışı, hastalığa karşı direnç mekanizmaların yoksunluğu, dirençliliğin genetik altyapısının birden fazla gen bölgesi tarafından düzenlenmesi ve çevresel faktörlerden de önemli ölçüde etkilenmesinden dolayı ıslah çalışmaları ile başarılı bir sonuç alınamamıştır. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında Verticillium hastalığına karşı dirençli yeni pamuk hatlarının geliştirilmesi kaçınılmaz bir noktaya gelmiştir. Bu çalışmamızın amacı moleküler markör teknolojileri kullanarak Verticillium solgunluğuna dayanıklı pamuk hatlarının geliştirilmesidir. Bu amaçla, birbirinden farklı 118 bireyden oluşan doğal pamuk popülasyonu Verticillium dahliae patojenine karşı 5 tekerrür halinde testlenerek hastalığa karşı fenotipik çeşitlilik gözlenmiştir. Popülasyonun polimorfizmin belirlenmesi amacıyla 100 SSR markörü bireylere uygulanmıştır. Popülasyonun yapısı STRUCTURE 2.2.3 analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda popülasyon 2 gruba kümelenemiştir. Küme 1’de 44 birey varken küme 2’de 34 birey belirlenmiştir. 40 birey ise herhangi bir gruba atanamamıştır. Fenotipik çeşitlilik ile allelik veri arasındaki ilişki analizi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda, Verticillium solgunluğuna karşı dayanıklılık sağlayan gen bölgeleri ile ilişkili olan olası markörler belirlenmiştir. 30 SSR markörü Verticillium solgunluğu ile ilişkili bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). En anlamlı p değerine sahip SSR lokusu  $p = 0.0014$  ile DPL080-238 olarak belirlenmiştir. En yüksek dominant allelik etki değerine sahip SSR lokusu DPL188-130 iken, en yüksek resesif allelik etkiye sahip DPL223-251 olarak bulunmuştur. Bu çalışmamız ile bulunan yüksek güvenilirlik değerine sahip SSR lokusları ileriki QTL çalışmalarında ve bu sayede Verticillium solgunluğuna dirençli hatların geliştirilmesi için kullanılacak moleküler ıslah yöntemleri çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

Peynircioğlu (94) Bu çalışmada yurt dışından ve Nazilli Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü’ nün genetik stoklarından sağlanan 48 adet pamuk genotipi materyal olarak kullanılmıştır. Bu çalışma, pamuk genotiplerinin su stresine karşı tepkilerini ve su stresine dayanıklı/tolerant pamuk genotiplerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Denemeler Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Özaltın Tarım İşletmeleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi-Koçarlı deneme alanlarında olmak üzere iki lokasyonda tam (% 100) ve kısıntılı (% 50) sulama koşullarında damla sulama sistemi kullanılarak Augmented deneme deseninde dört tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Kısıntılı sulama uygulamasının tüm pamuk

genotiplerinde ortalama kütlü pamuk verimi, 1. ve 2. pozisyon koza tutma oranı, bitkide koza sayısı, lif uzunluğu, lif yeknesaklığı ve lif dayanıklılık değerlerini düşürdüğü, çırcır randımanı ve lif incelik değerlerini artırdığı, koza kütlü ağırlığı, lif esnekliği ve 100 tohum ağırlık değerlerini ise etkilemediği gözlenmiştir. Çalışmada yer alan pamuk genotiplerinin kütlü pamuk verimi, sulama suyu kullanım etkinliği ve kuraklık hassasiyet indeks değerleri bakımından birlikte değerlendirildiğinde; CABU/CS2-1-83, Coker 208, TKY 9409, TKY 9304, Semu SS/G, Nazilli 84-S ve Taşkent 1 genotiplerinin kuraklığa hassas, Lachata, MS-30/1, NGF-63, NP EGE 2009, Eva, NIAB 111 ve NIAB 999 genotiplerinin ise kuraklığa tolerant oldukları dolayısıyla su stresine tolerant yeni pamuk çeşitlerinin geliştirilmesinde ebeveyn olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Khudir (95) Bu çalışma, donma çözülme çevrimlerinin jüt fiber, çelik fiber, kireç ve taban külü ile iyileştirilmiş ince daneli zeminin (düşük plastisiteli silt) serbest basınç dayanımı üzerine etkisini incelemektedir. Üstelik iyileşme etkilerinden dolayı, kırılma indeksi be esneklik modülüne göre stabilize edilmiş zeminin gerilme-şekil değiştirme davranışı tartışılmıştır. 0, 1, 2 ve 3 donma çözülme çevrimlerinde serbest basınç dayanımı deneyleri uygulanarak kapsamlı bir laboratuvar çalışması yapılmıştır. Stabilizörlerin karışım oranları, kireç için 2%, 4%, 6%, 8% ve 10%, taban külü için 10%, 20%, 30%, 40% ve 50%, jüt ve çelik fiber için 0.25%, 0.5%, 0.75% ve 1% dir. serbest basınç dayanımı performansları ve maliyet-fayda avantajları birikte ele alındığında, stabilizörlerin etkin karışım oranları birbirlerinden bağımsız olarak kireç için 4%, taban külü için 20%, jüt fiber için 0.75% ve çelik fiber için 0.25% olarak bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen sonuçlar donma çözülme direncine karşı kireç, taban külü, jüt fiber ve çelik fiber kullanmanın oldukça umut verici olduğudur.

### **3.3. GEN AKTARIM İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR**

Tansı (96) Bu çalışmanın amacı, fazla prolin üretimi için metabolizma mühendisliği yoluyla tuza toleranslı transgenik bitkilerin geliştirilmesidir. Bu amaçla Ausonia çeşidi patateslerin yumru, yaprak ve gövde parçacıkları, bitkilerin prolin biyosentezinde anahtar enzim olan A<sup>+</sup>Pyrollin-S-Karboksilat Sentetaz (P5CS)'nı sentezinden sorumlu Arabidopsis thaliana genini CaMV35S promotörü kontrolünde (pR2-pl) ve rbcS promotörü kontrolünde (pR8-pl) taşıyan iki farklı plazmidi barındıran Agrobacterium tumefaciens (EHA105) ile

transforme edilmiştir. Yumru parçacıkları üç farklı *A. tumefaciens* suşu; EHA105::pGUSint, GV2260::pGUSint, ve LBA4404::pGUSint transforme edildiğinde histokimyasal GUS analizi transformasyon veriminin EHA105 suşu ile en yüksek olduğunu göstermiştir. Yumru parçalarından rejenerasyon çalışmaları sürgün oluşumunu 0.52 sürgün/parça olarak vermiştir. Ana kültür fidecikleri ile yumru parçalarının rejenerasyonundan ekle edilen fideciklerin mikrotuberizasyonunu karşılaştıran çalışmalar, sırasıyla 0.68 ve 0.63 mikrotuber/fidecik, ve  $106.2 \pm 18$  mg ve  $106,4 \pm 27$  mg ortalama mikrotuber ağırlığı ile sonuçlarda önemli bir fark ( $p < 0.05$ ) olmadığı göstermiştir. Transformasyon verimi yaprak parçalarında (pR2-pl ile % 22.8, pR8-pl ile % 4.2), gövde parçalarından (pR2-pl ile % 14.2, pR8-pl ile % 3.9) daha fazla olurken, yumru parçalarından transgenik sürgün elde edilememiştir. Bitkiciklerin transgenik yapısı klorofenol kırmızısı ayırıcı ile doğrulanmıştır. pR2-pl ile transforme edilmiş bitkiciklerin ikisinde, AtP5CS primerleri ile PCR yaparak AtPSCS geninin varlığı doğrulanmıştır. Kontrol fideciklerine göre transgenik fidecikleri önemli miktarda ( $p < 0.05$ ) daha fazla prolin akümüasyonu, daha düşük MDA derişimi ve 100 mM ve 200 mM tuz stresinde daha iyi kök gelişimi göstererek tuz stresi koşullarında daha iyi bir performans sergilemiştir.

Polat (97) Bu çalışmada, transgenik Bt mısırın sıçanların doğum öncesi (*prenatal*) ve doğum sonrası (*postnatal*) gelişimleri, üreme sistemleri ve üreme başarıları üzerine etkileri araştırılmıştır. Bir nesil çalışması olan bu çalışmada, kontrol, referans ve transgenik olmak üzere, her biri 10'ar dişi Wistar albino sıçandan oluşan, üç deney grubu oluşturulmuştur. Her grupta bulunan sıçanlar öğütülerek hazırlanan ve içinde % 20 oranında mısır (*Zea mays*) içeren yemlerle beslenmiştir. Kontrol grup yemi içine TTM 815 no'lu mısır, transgenik grup yemi içine DK 626 Bt no'lu mısır, referans grup yemi içine ise DK 626 kod numaralı mısır katılmıştır. Bu diyetle gebeliklerinin 1. gününden itibaren beslenen sıçanlardan 1. nesil, birinci nesilden de 2. nesil sıçanlar elde edilmiştir. Bu sıçanlar kendi aralarında çiftleştirilmiş, gebelik ve emzirme döneminin ardından deneye son verilmiştir. Birinci nesil gruplarının her birinden 4'er adet dişi sıçan gebeliklerinin 20. gününde disekte edilmiş; plasenta, uterus ve ovaryum dokuları histopatolojik inceleme yapılmak için tespit edilmiştir. Ayrıca, fötüs sayısı saptanmış, morfolojisine bakılmış, boy ve ağırlıkları ölçülmüştür. İkinci nesil dişi sıçanlar ise doğum ve yavru bakımının ardından disekte edilmiş; ovaryum ve uterus dokularının histopatolojik incelemesi yapılmıştır. Başarılı

çiftleşme döneminin ardından deney gruplarındaki erkek bireyler disekte edilerek; testis, prostat bezi, seminal kesecik, epididimis gibi organları histopatolojik inceleme yapılmak üzere alınmıştır. Bu bireylerde, seminal ve epididimis tübül ölçümleri, spermsayısı ve morfolojik inceleme yapılmıştır. Bt grubundaki fötüs boy ve ağırlığında istatistiksel olarak kontrolden farklılık bulunmuştur. Uygulama gruplarında bulunan dişi ve erkek sıçanların üreme sistemine ait dokularda kontrol sıçanlarından farklı bir histopatolojik bulguya rastlanmamıştır. Bu gruplarda bulunan sıçanların sperm sayıları bakımından kontrole benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Kalemtaş (98) Kennebec çeşidi patates (*Solanum tuberosum* L.), MYB4 transkripsiyon faktörünü kodlayan *Oryza sativa myb4* genini CaMV35S promotörü kontrolünde ve COR15a promotörü kontrolünde taşıyan iki farklı plazmidi barındıran *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) aracılığıyla transforme edilmiştir. Transgenik bitkilerde herhangi bir büyüme geriliğine rastlanmamış ve bu bitkiler yabancı tip bitkilerle karşılaştırıldıklarında yumru verimi açısından anlamlı bir farklılık ( $P < 0.05$ ) görülmemiştir. Yabancı tip ve gen aktarılmış olan bitkiler çeşitli abiyotik streslere tabi tutularak stres toleransları karşılaştırılmıştır. Bu bitkiler arasında bor, donma ve kuraklık toleransları bakımından herhangi bir farklılık olmadığı görülmüştür. Büyüme parametreleri açısından değerlendirildiklerinde transgenik hatlardan ikisinin tuz toleransının yabancı tip bitkilere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Biri *myb4*'ü 35S promotörünün kontrolünde, diğeri ise COR15a promotörünün kontrolünde ifade eden bu iki hat ve yabancı tip bitkilerin transkriptomları, *myb4*'ün kontrol ettiği prosesleri ve hedef genleri açığa çıkarmak amacıyla analiz edilmiştir. Transgenik hatlarda farklı ifade edilen genler, *myb4*'ün savunma, metabolizma ve büyüme gibi farklı hücresel prosesleri etkilemek suretiyle büyük ve karmaşık bir transkripsiyon ağını kontrol ettiğini göstermiştir. Transgenik bitkiler donma stresine tabi tutulduklarında sukroz sentezini düzenleyen bazı genler, bazı peroksidazlar ve CBF3 transkripsiyon faktörünün ifadesi artmıştır. Bu durum *myb4*'ün, patatesin düşük sıcaklığa karşı oluşturduğu tepkiyi oksidatif stres savunma mekanizmaları, ozmotik denge ya da CBF3 aracılığı ile soğuğa karşı direnç sağlayan bazı genleri aktive etmek suretiyle kontrol ettiğine işaret etmektedir. Stresle ilişkili olan bu genlerin ifadesinin artmasına rağmen, yapılan deneyler sonucunda transgenik bitkilerin kuraklık ve donma toleranslarının yabancı tip bitkilerden daha yüksek olmadığı görülmüştür.

#### 4. GEREKÇE VE AMAÇ GAYET GÜZEL

Keten (*L. usitatissimum* L.), yaygın olarak yetiştirilen bir bitki olup, gövdesinden elde edilen sklerankima lifleri tekstil sanayinde kullanılmaktadır. Tohumlarından elde edilen bezir yağı geçmişte sofralık yağ olarak ve günümüzde de boya sanayinde yaygın olarak değerlendirilir. Keten tohumu başlıca bileşen olarak lignanlar, özellikle de "sekoizolarisirezinol diglukozit" taşınmasına ilaveten " $\alpha$ -linolenik asit" ve lif açısından da zengindir. Lignanlar, antikarsinojenik aktiviteye sahip enterodiol ve enterolakton bileşiklerinin ön maddeleridir ve memeli lignanları olarak da bilinirler. Keten tohumu yiyecek olarak alındığında içindeki lignanlar insanlarda barsak florası tarafından enterodiol ve enterolaktona dönüştürülür. Keten tohumu lignan içeriğinden dolayı antikarsinojenik etkiye sahiptir ve besleyici özelliği vardır (38) (39). Ketenin önemi düşünüldüğünde, bu bitkinin birim alan verimini düşüren biyotik (hastalık ve zararlılar) ve abiyotik (yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, tuzluluk) stres faktörlerine karşı dayanıklılığını artıracak tarımsal bir genin bitki genomuna yerleştirilmesi yönünde yapılacak herhangi bir çalışmanın ne kadar değerli olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında, herbisitlere dayanıklı yeni keten (*Linum usitatissimum* L.) genotiplerinin araştırılması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## 5. MATERİYAL VE YÖNTEM

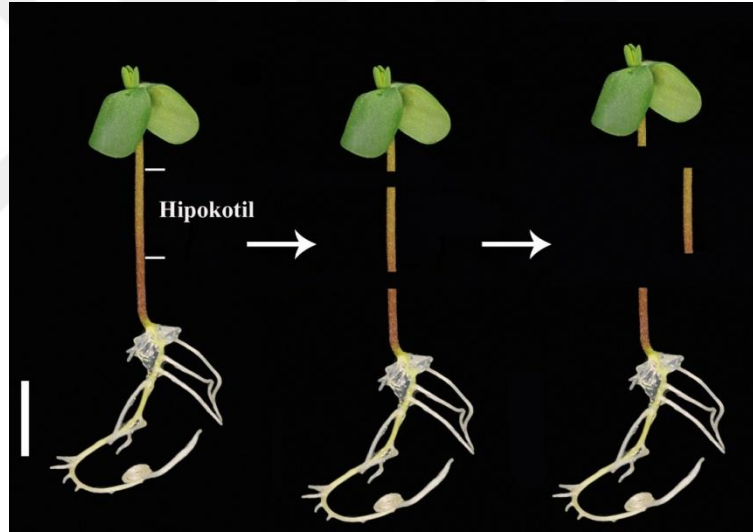
### 5.1. MATERİYAL

#### 5.1.1. Bitki materyali

Çalışmalarda bitki materyali olarak Amerika Birleşik Devletleri'nin Kuzey Dakota eyaletinde bulunan 'Crop Science laboratories'den temin edilen 'Clarck', 'Madaras', '1886 Sel' Keten (*Linum usitatissimum* L.) çeşitleri kullanılmıştır.

#### 5.1.2. Eksplant materyali

Steril edilen keten tohumlarının Magenta kaplarında çimlendirilmesi ile elde edilen 7 – 10 günlük keten fidelerinin hipokotil bölgeleri rejenerasyon ve gen aktarım çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 5.1.).

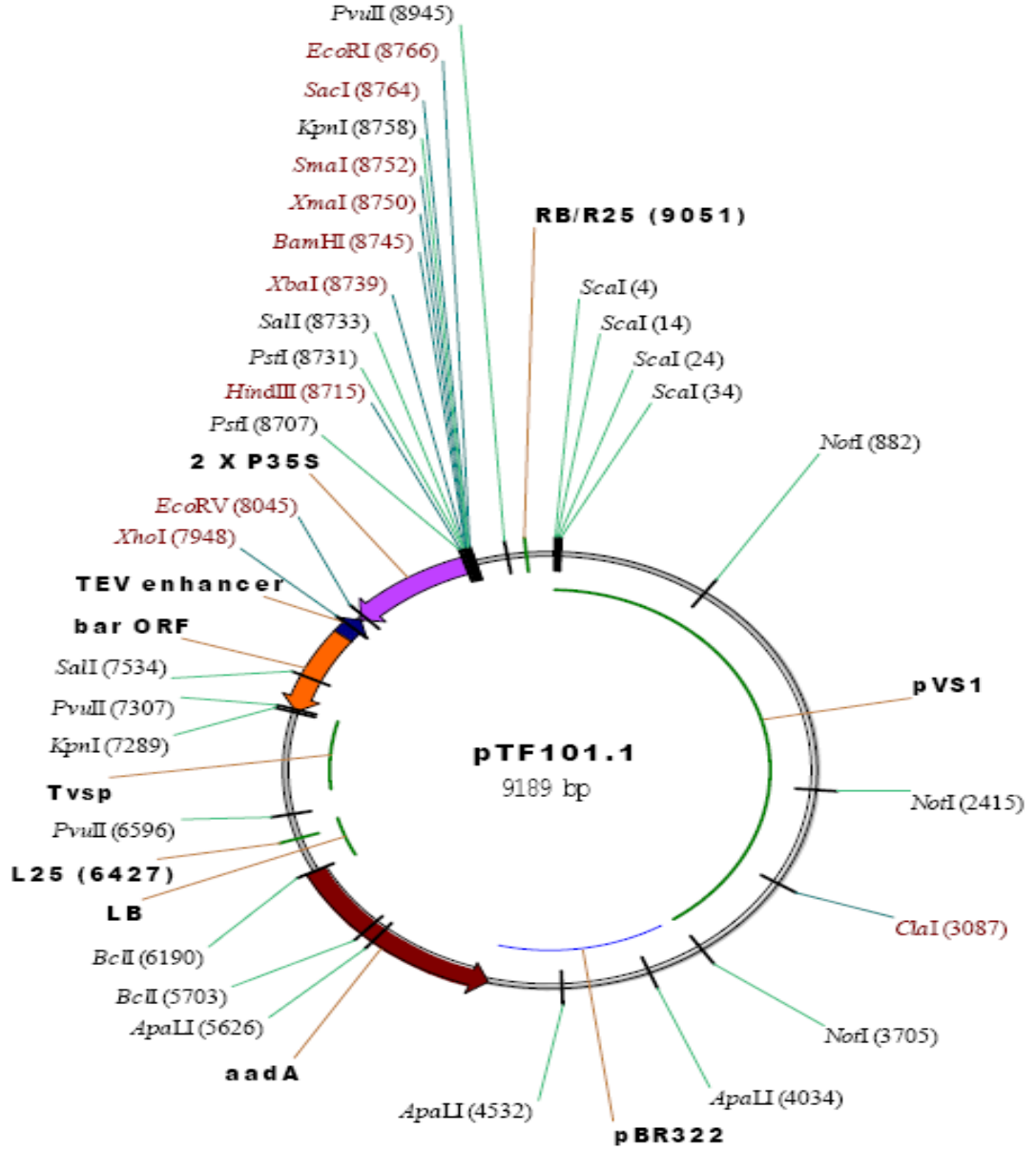


Şekil 5.1. Çalışmalarda kullanılan eksplant materyali (25).

#### 5.1.3. Bakteri Materyali

Bakteri materyali olarak 'bar' genini içeren 'pTF101.1' plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 hattı kullanılmıştır. Plazmidin T-DNA bölgesinde AoPR1 promotörü tarafından kontrol edilen ve gen aktarımı yapılan bitki hücrelerinin "glifosinat amonyum" içeren besin ortamında seçilebilmesini sağlayan *bar* geni bulunmaktadır (Şekil 5.2.). Aktarılmış geni taşıyan plazmid, "TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen

Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden Doç. Dr. Selma ONARICI'dan temin edilmiştir.



Şekil 5.2. pTF101.1 Plazmid haritası (99).

## 5.2. YÖNTEM

### 5.2.1. Besin Ortamlarının Hazırlanması

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (100) (Çizelge 5.1.) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır.



Ortamların hazırlığında distile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Steril edilen ortamlar 40°C'ye soğutularak içirişine gerekli büyüme düzenleyici hormon ve antibiyotikler eklenerek steril perti veya steril magenta kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

Çizelge 5. 1. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları (100).

<b>Besin Maddeleri</b>	<b>Konsantrasyon (mg/l)</b>	
<b>Makro Elementler</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Mikro Elementler</b>	KI	0.83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.30
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.60
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.85
	Na <sub>2</sub> EDTA.	37.25
	<b>Vitaminler</b>	Myo-Inositol
Nikotinik Asid		0.50
Pyrotinik Asid		0.50
Thiamin-HCl		0.10
Glysin		2.00

### 5.2.2. Tohum Sterilizasyonu

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için steril şartlar altında manyetik karıştırıcı üzerinde 10°C'lik sıcaklığa sahip %5 sodyum hipoklorid (NaClO) içeren %40'lık 10°C sıcaklıkta bulunan ticari çamaşır suyu içerisinde 5-10 dakika çalkalandıktan sonra, aynı sıcaklığa sahip steril saf su ile 3 kez durulanmıştır (70).

### 5.2.3. Keten Tohumlarının Çimlenme ve Fide Oluşumu

Keten tohumlarının çimlendirilmesinde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962; Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A, Sigma) ile

katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında distile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Steril edilen ortamlar steril magentalara dökülerek dondurulmuştur. Steril edilmiş keten tohumları bir magentaya 20 adet tohum olacak şekilde '4x5' ekim düzeninde ekilerek büyütme kabiniinde 7 gün bekletilerek fide oluşturmaları sağlanmıştır.

#### **5.2.4. Gen Aktarımında Kullanılan Bakterilerin Hazırlanması**

Gen aktarım çalışmalarında kullanılan 'pTF101.1' plazmidini içeren *Agrobacterium tumefaciens*'in (GV2260) hattı -80°C'de muhafaza edilen gliserol stoklardan alınarak 50 ml'lik steril tüplerde Kanamisin sülfat monohidrat ve rifampisin seçici antibiyotikleri içeren sıvı LB (Luria broth) besin ortamında 28°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültürlerinden örnekler lup ile alınarak petri kapları içerisinde seçici antibiyotikleri içeren katı LA (Luria agar) besin ortamına yayılmış, 2 gün süreyle 28°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Katı besin ortamlarında gelişen bakteri kültürleri 1 ay boyunca +4°C'de muhafaza altına alınarak, ihtiyaç durumunda kullanılmıştır.

#### **5.2.5. Sıvı Besiyerinde Bakterinin Çoğaltılması**

Steril falkon tüp içerisine daha önceden hazırlanmış olan steril LB (Lourant broth) dan 10 ml konulmuştur. Steril Luria broth sıvı besiyerinin üzerine 300mg/mL Streptomisin, 100mg/mL Spectinomisin ve 50mg/mL Rifampisin eklenilmiştir. İçerisine +4°C'de muhafaza edilen LA (Lourant agar) besiyerinden alınan *Agrobacterium tumefaciens* tek kolonisi, bakteri sıvı ortamın içerisinde koyularak 180 rpm, 28 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

#### **5.2.6. İnokülasyon**

10 günlük keten fidelerinden yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda kesilen eksplantlar steril cam petriler içerisinde 35 dakika kurumaya bırakılmıştır. Steril cam petrilerin içerisine 30 ml steril distile su koyulduktan sonra, üzerine 500 µl GV2260 eklenmiştir. 20 dakika tutulmuştur. İnokülasyon sonuna eksplantlar steril kurutma kağıtlarına kurutularak ko-kültivasyon ortamlarına aktarılmıştır.

### 5.2.7. Ko – kultivasyon Ortamı

Ko-kultivasyon ortamlarının hazırlanmasında MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) (Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında distile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Ortamlar 40°C'ye soğutularak, inoküle edilen explantlar bir petriye 20 explant olacak şekilde koyularak 24°C de 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyotta 2 gün bekletilmiştir.

### 5.2.8. Seleksiyon

Seleksiyon ortamlarının hazırlanmasında MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962)(Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında distile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Ortamlar 40°C'ye soğutularak içerisinde 0,75 mg/L Bialofos, 500 mg/L Duocid eklenerek steril cam petrilere dökülerek kullanılmıştır. İnoküle edilen eksplantlar bir petriye 20 eksplant olacak şekilde koyularak 24°C de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta 4 hafta bekletilmiştir. Seleksiyon sonunda Rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına düşen sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayıları kaydedilmiştir.

### 5.2.9. Toprakta Gelişim Aşaması

*In vitro* seleksiyon aşamasında sürgün gelişimine paralel olarak kök oluşumu sağlandığı için köklü bitkiler doğrudan toprağa aktarılmıştır. Bu şekilde *in vitro* köklendirme aşaması atlanarak kontaminasyon ve sürgünlerin köklenmemesi gibi olası olumsuzluklar engellenmiştir. Seleksiyondan sağ kurtulan sürgünler, içerisinde nemli torf – toprak karışımı bulunan magentalara aktarılmıştır. Magentaların üzerilerine nemli poşet geçirilerek belirli zaman aralıklarında üzerinde delikler açılmak suretiyle henüz dış ortam şartlarına alışmamış bitkiciklerin aniden su kaybederek ölmesi engellenmiştir. Toprağa

aktarılan muhtemel transgenik bitkicikler 16 saat ışık / 8 saat karanlık foto periyotta çalışan, 24°C ve % 60 nem içeren iklimlendirme kabininde 15 gün bekletilerek toprakta gelişen bitki sayısı kaydedilmiştir.

#### **5.2.10. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar**

İzolasyon Tamponu: 100 ml 1M Tris (Sigma), pH 8.0, 100 ml 0.5 M EDTA (Sigma) pH 8.0, 100 ml 5M NaCl (Sigma), 62.5 ml %20 SDS (Sigma) (a/h), distile su ile 1 Lt ye tamamlanmalıdır.

Saflaştırma Tamponu: 9,5 ml 3M NaOAc (Sigma), 49 ml absolut EtOH (Sigma), 36.5 ml otoklavlanmış distile su eklenmelidir.

#### **5.2.11. Doku Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu**

Gelişen bitkilerden numuneler alınarak steril porselen havan ile sıvı azot yardımıyla homojenize edilmiştir. Yöntemde (101) kullanılan tamponlar izolasyondan önce taze olarak hazırlanmıştır.

İzolasyon tamponu sıcak su banyosunda 65°C'ye ısıtılmıştır. Tampon ısıdıktan sonra her 10 ml tampon için 0.038 g NaHSO<sub>3</sub> (sodyum bisülfid) ve 20 µl 2-Mercaptoethanol eklenerek 65°C'de bekletilmiştir. Örnekler steril porselen havan içerisinde sıvı azot yardımıyla ezilip toz haline getirilerek 2 ml'lik tüplere koyulmuştur. Üzerinde 1 ml izolasyon tamponundan eklenmiş ve her bir tüpe 20 mg/ml proteinaz – K (Sigma) stoğundan 6 µl ilave edilerek vorteks yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Örnekler öncelikle 55°C'de 20 dakika ısıtma bloğunda, ardından 65°C'de 45 dakika sıcak su banyosunda her 15 dakika da bir ters düz edilerek bekletilmiştir. 45 dakika sonunda üzerinde 300 µl 5M KOAc (potasyum asetat) eklenerek iyice çalkalanıp 20 dakika buzda bekletilmiştir. Sonrasında +4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjlendikten sonra süpernatantı yeni 1.5 ml'lik tüplere aktarıp, eşit miktarda (1:1) Kloroform izoamil alkol (24:1) eklenip hafifçe karıştırılmıştır. Devamında 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, süpernatant, orta ve alt fazları karıştırmadan yavaşça pipetle alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerinde aynı miktarda (1:1) kloroform izoamil alkol eklenerek karıştırılıp, sonrasında 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletildikten sonra +4 °C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, üstte

kalan süperantant, orta ve alt fazları karıştırmadan yavaşça pipetle alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerine 1-1.5 katı bir oranda -20°C'den aldığımız izopropanol eklenerek bir gece -20°C'de bekletilmiştir. 12 saat sonra +4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. DNA'lar 5 dakika oda sıcaklığında kapakları açık tüplerde bekletilmiştir. Sonrasında üzerine 1 ml saf EtOH eklenerek dipte kalan pelleti hafifçe vurarak kaldırılıp, hafif çalkalandıktan sonra 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında +4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, santrifüj sonrasında üstte kalan sıvı kısım atılarak üzerinde %70 EtOH eklenerek dipte kalan pelleti hafifçe vurarak kaldırılmış, hafif çalkalandıktan sonra 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Devamında oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen DNA'lar %70 EtOH ile yıkandıktan sonra tüpler ters çevrilerek 1-2 saat kurumaya bırakılmıştır. DNA'lar kuruduktan sonra üzerine 100 µl DNA – RNA free su ve 2 µl RNAaz eklenerek 37°C'de 1-2 saat ısıtma bloğunda bekletilmiştir. DNA'lar Dnase, Rnase free suda çözüldükten sonra Nanodrop aleti yardımıyla miktar ölçümleri ve saflık derece ölçümleri yapılarak DNA'lar jelde yürütmek suretiyle kontrol edilmiştir. Üzeri etiketlenen tüpler -20°C'de daha sonra kullanılmak üzere bekletilmiştir.

### 5.2.12. PCR Uygulamaları

Gen aktarım çalışmalarında kullanılan 'pTF101.1' plazmidinin varlığını teyit edebilmek için *bar* genine özgü primerler kullanılmıştır. Primer dizisi ve ürün bilgileri aşağıdaki gibidir.

*bar*F: 5' TGC ACC ATC GTC AAC CAC TA 3'

*bar* R: 5' ACA GCG ACC ACG CTC TTG AA 3'

Bu primer yardımı ile 'pTF101.1' plazmidinde üretilen amplifikasyon ürününün büyüklüğü yaklaşık 3100 bp olmalıdır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen örnekler PCR uygulamasında kullanılmak üzere 100 ng/µl yoğunlukta olacak şekilde seyreltilmiştir. PCR uygulamasında kimyasallar ve enzimler Thermo marka kullanılmıştır. Her bir tüp için hazırlanan PCR karışımı ve PCR döngüleri Çizelge 5.2. ve 5.3.'de belirtilmiştir.

*Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla kromozomal viruans geninden (*chv*) tasarlanan primer yardımıyla kontrol PCR'ı yapılmıştır.

*chv* F: 5' CGA ACC GCT GTT CGG CCT GTG G 3'

*chv* R: 5' GTT CAG CAG GCC GGC ATC CTG G 3'

Bu primer yardımı ile *Agrobacterium tumefaciens* kromozomal geninden üretilen amplifikasyon ürününün büyüklüğü yaklaşık 850 bp olmalıdır. PCR uygulamasında kimyasallar ve enzimler Thermo marka kullanılmıştır. Her bir tüp için hazırlanan PCR karışımı ve PCR döngüleri Çizelge 5.2. ve 5.3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 5. 2. PCR karışımı.

Madde	Miktar
MgCl	2 mM
dNTP	0.25 mM
Forward	0.5 pM
Rewerse	0.5 pM
Taq DNA Polymeraz	0.625 U
DNA	100 ng/ µl
ddH <sub>2</sub> O	

Çizelge 5.3. PCR döngüleri.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C	7 dakika	-
95 °C	1 dakika	40
60 °C	30 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	10 dakika	-

### 5.2.13. Elektroforez Koşulları

Elde edilen PCR ürünlerin üzerine 6x yükleme boyası eklenmiş ve %1'lik agaroz jelde, 1x TAE solüsyonu ve %0.1 oranında EtBr solüsyonu eklenerek koşturulmuştur. Koşturma işlemi sonrasında UV ışık altına agaroz jellerin fotoğrafları çekilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

### 5.3. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her muamele içerisinde 20 adet eksplantın bulunduğu 5 tekrarlı 100x10 mm'lik petri kaplarından oluşmuştur. Denemeler en az 3 paralelli yürütülmüştür. Elde edilen veriler "SPSS for Windows"

programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerlere istatistik analizinden önce arcsin ( $\sqrt{X}$ ) transformasyonu uygulanmıştır (102).



## 6. ARAŞTIRMA BULGULARI

Lipit vesikülleri ve oluşturan ikili ve üçlü oluşumların spektroskopik, termodinamik, mikroskopik, boyut-potansiyel ve transfeksiyon özellikleri ile ilgili ölçümler yapıp, sonuçlar yorumlanmıştır.

### 6.1. BİALOFOS'UN LETAL DOZLARININ BELİRLENMESİ

#### 6.1.1. Clarck

Farklı dozlarda (0 (kontrol), 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/L) kullanılan Bialofosun Clarck keten çeşidi üzerindeki letal doz etkisini belirlemek amacıyla kurulan dene sonuçları Çizelge 6.1 ve Çizelge 6.4'de verilmiştir.

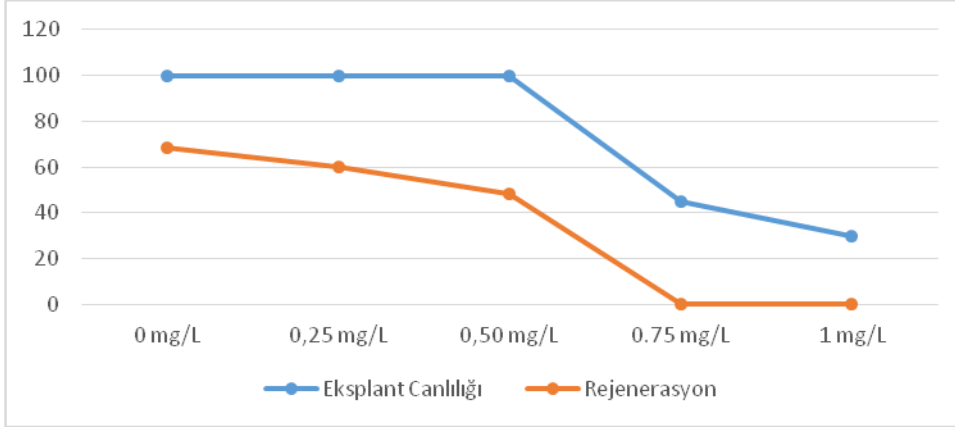
Çizelge 6.1. Bialofosun Clarck keten çeşidi üzerindeki etkisi

	Doz (mg/L)	Eksplant Canlılığı (%)	Rejenerasyon (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	En Uzun Sürgün Boyusu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (Adet)
<b>CLARK</b>	<b>0.00</b>	100.00±0.00a	68.33±4.40a	1.16±0.12a	0.84±0.11a	15.66±0.66a
	<b>0.25</b>	100.00±0.00a	60.00±2.88a	1.27±0.01a	0.95±0.28a	15.66±0.66a
	<b>0.50</b>	100.00±0.00a	48.33±3.33b	1.11±0.06a	1.03±0.16a	10.66±0.33a
	<b>0.75</b>	45.00±1.66b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	<b>1.00</b>	30.00±2.88c	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00c

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Bialofosun keten *in vitro* kültürü üzerinde eksplantın canlılığı, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler sırasıyla %100, %68.33, 1.16 adet, 0.84 cm ve 15.66 adet ile 0 mg/L (kontrol) uygulamadan alınmıştır. Diğer Bialofos dozları olan 0.25 ve 0.50 Bialofos dozlarında da kontrol ile benzer sonuçlar gözlenmiştir. Denemelerde seleksiyon yapabilmek adına yapılan bu çalışmada keten üzerinde yarı yarıya letal etki gösteren doz olan 0.75 mg/L Bialofos dozu Clarck keten çeşidi için seçilmiştir (Şekil 6.1., Şekil 6.4.).





Şekil 6.1. Bialofos dozlarının Clarck keten çeşidi üzerindeki etkisi.

### 6.1.2. Madaras

Farklı dozlarda (0 (kontrol), 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/L) kullanılan Bialofosun Madaras keten çeşidi üzerindeki letal doz etkisini belirlemek amacıyla kurulan dene sonuçları Çizelge 6.2 ve Çizelge 6.4’de verilmiştir.

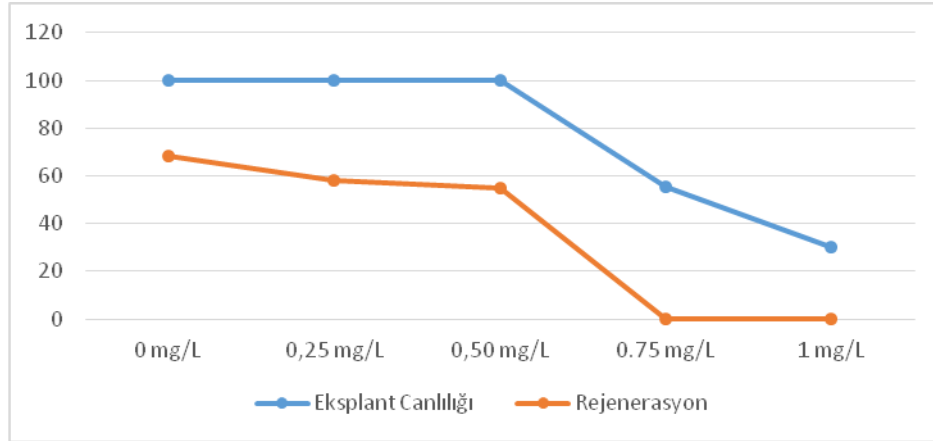
Çizelge 6. 2. Bialofosun Madaras keten çeşidi üzerindeki etkisi.

	Doz (mg/L)	Canlılığı (%)	Rejenerasyon (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı	En Uzun Sürgün Boyu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayı
<b>MADARAS</b>	<b>0.00</b>	100.00±0.00a	68.33±4.40a	1.29±0.08a	2.29±0.01a	18.66±0.88a
	<b>0.25</b>	100.00±0.00a	58.33±1.66b	1.34±0.01a	1.75±0.06b	15.66±0.33b
	<b>0.50</b>	100.00±0.00a	55.00±2.88b	1.26±0.07a	1.89±0.13b	14.00±1.52b
	<b>0.75</b>	55.33±2.88b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	<b>1.00</b>	30.00±2.88c	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Bialofosun keten *in vitro* kültürü üzerinde explantın canlılığı, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler sırasıyla %100, %68.33, 1.29 adet, 2.29 cm ve 18.66 adet ile 0 mg/L (kontrol) uygulamadan alınmıştır. Diğer Bialofos dozları olan 0.25 ve 0.50 Bialofos dozlarında da kontrol ile benzer sonuçlar gözlenmiştir. Denemelerde seleksiyon yapabilmek adına yapılan bu çalışmada keten üzerinde yarı yarıya letal etki

gösteren doz olan 0.75 mg/L Bialofos dozu Madaras keten çeşidi için seçilmiştir (Şekil 6.2., Şekil 6.4.).



Şekil 6.2. Bialofos dozlarının Madaras keten çeşidi üzerindeki etkisi.

### 6.1.3. 1886 Sel

Farklı dozlarda (0 (kontrol), 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/L) kullanılan Bialofosun 1886 Sel keten çeşidi üzerindeki letal doz etkisini belirlemek amacıyla kurulan dene sonuçları.

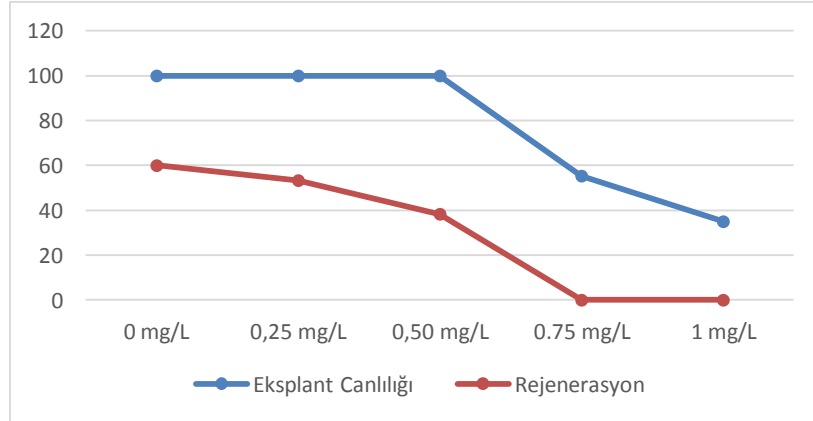
Çizelge 6. 3. Bialofosun 1886 Sel keten çeşidi üzerindeki etkisi.

	Doz (mg/L)	Canlılığı (%)	Rejenerasyon (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	En Uzun Sürgün Boyu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayı (adet)
<b>1886 SEL</b>	<b>0.00</b>	100.00±0.00a	60.00±5.00a	1.11±0.06a	1.01±0.05b	13.00±1.15a
	<b>0.25</b>	100.00±0.00a	53.33±4.00a	1.00±0.00a	1.20±0.08b	10.66±0.88a
	<b>0.50</b>	100.00±0.00a	38.33±6.66b	1.06±0.06a	1.58±0.11a	8.00±1.00b
	<b>0.75</b>	53.33±3.33b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	<b>1.00</b>	35.00±5.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Bialofosun keten *in vitro* kültürü üzerinde explantın canlılığı, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler sırasıyla %100, %60.00, 1.11 adet, 1.01 cm ve 13.00 adet ile 0 mg/L (kontrol) uygulamadan alınmıştır. Diğer Bialofos dozları olan 0.25 ve 0.50 Bialofos dozlarında da kontrol ile benzer sonuçlar gözlenmiştir. Denemelerde seleksiyon yapabilmek adına yapılan bu çalışmada keten üzerinde yarı yarıya letal etki

gösteren doz olan 0.75 mg/L Bialofos dozu 1886Sel keten çeşidi için seçilmiştir (Şekil 6.3., Şekil 6.4.).







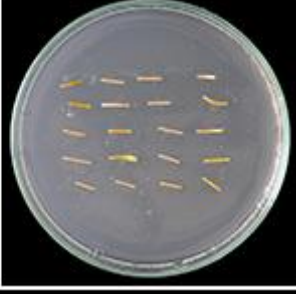
Şekil 6.3. Bialofos dozlarının Sel 1886 keten çeşidi üzerindeki etkisi.

Bialofosun Clark, Madaras ve 1886 Sel keten çeşitleri üzerinde eksplant canlılığı, rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün bayu ve petride gelişen toplam sürgün sayıları Çizelge 6.4’de verilmiştir. Tabloya bakıldığında, 0 mg/L (kontrol) Bialofos dozunda tüm değerlerin Clark, Madaras ve 1886 Sel keten çeşitlerinde en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Seleksiyon için gerekli olan lethal dozun ise tüm çeşitlerde 0.75 mg/L Bialofos dozundan elde edildiği görülmektedir.

Çizelge 6. 4. Bialofosun üç keten çeşidi üzerindeki etkisi

Çeşitler	Doz (mg/L)	Eksplant Canlılığı (%)	Rejenerasyon (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı	En Uzun Sürgün Boyu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayı
CLARK	0.00	100.00±0.00a	68.33±4.40a	1.16±0.12a	0.84±0.11a	15.66±0.66a
	0.25	100.00±0.00a	60.00±2.88a	1.27±0.01a	0.95±0.28a	15.66±0.66a
	0.50	100.00±0.00a	48.33±3.33b	1.11±0.06a	1.03±0.16a	10.66±0.33a
	0.75	45.00±1.66b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	1.00	30.00±2.88c	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00c
MADARAS	0.00	100.00±0.00a	68.33±4.40a	1.29±0.08a	2.29±0.01a	18.66±0.88a
	0.25	100.00±0.00a	58.33±1.66b	1.34±0.01a	1.75±0.06b	15.66±0.33b
	0.50	100.00±0.00a	55.00±2.88b	1.26±0.07a	1.89±0.13b	14.00±1.52b
	0.75	55.33±2.88b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	1.00	30.00±2.88c	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
1886 SEL	0.00	100.00±0.00a	60.00±5.00a	1.11±0.06a	1.01±0.05b	13.00±1.15a
	0.25	100.00±0.00a	53.33±4.00a	1.00±0.00a	1.20±0.08b	10.66±0.88a
	0.50	100.00±0.00a	38.33±6.66b	1.06±0.06a	1.58±0.11a	8.00±1.00b
	0.75	53.33±3.33b	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c
	1.00	35.00±5.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00c	0.00±0.00c

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Bialophos Dozları (mg/L)	Rejenerasyon Aşaması
0 Kontrol	
0,25	
0,50	
0,75	
1	

Şekil 6.4. Bialofos dozlarının keten üzerindeki etkisi.

## 6.2. GEN AKTARIM SONUÇLARI

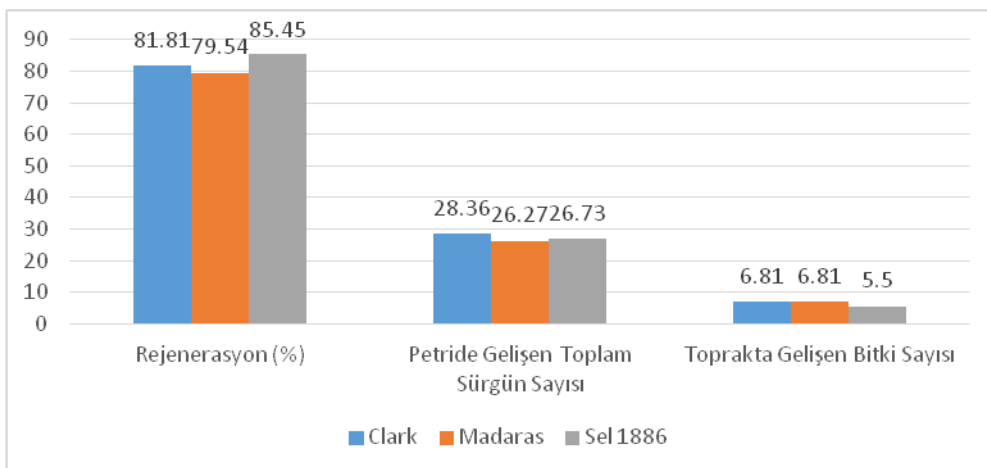
Farklı keten çeşitlerine ( Clark, Madaras ve 1886 Sel), LB besin ortamında büyütülen *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla keten hipokotil eksplantlarına gen aktarımı yapılmış, inokule edilen hipokotil eksplantları antibiyotik bulundurmeyen ko-kültivasyon ortamında 2 gün tutulmuş, daha sonra hipokotiller antibiyotik ve 0.75 mg/L Bialofos içeren seleksiyon ortamında kültüre alınarak transgenik sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır. Gen aktarım çalışmalarının sonuçları (şekil 6.19 ve Çizelge 6.5.) 'de verilmiştir.

Çizelge 6. 5. Farklı keten çeşitlerine gen aktarım sonuçları.

Çeşit	Rejenerasyon (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Eksplantta En Uzun Sürgün Boyu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (Adet)	Toprağa Aktarılan Köklenmiş Eksplant Sayısı (Adet)	Toprakta Gelişen Bitki Sayısı (Adet)
Clack	81.81a	1.69a	1.87b	28.36a	14.54a	6.81a
Madaras	79.54a	1.64a	2.37a	26.27a	14.90a	6.81a
1886 Sel	85.45a	1.54a	1.61b	26.73a	14.90a	5.5b

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

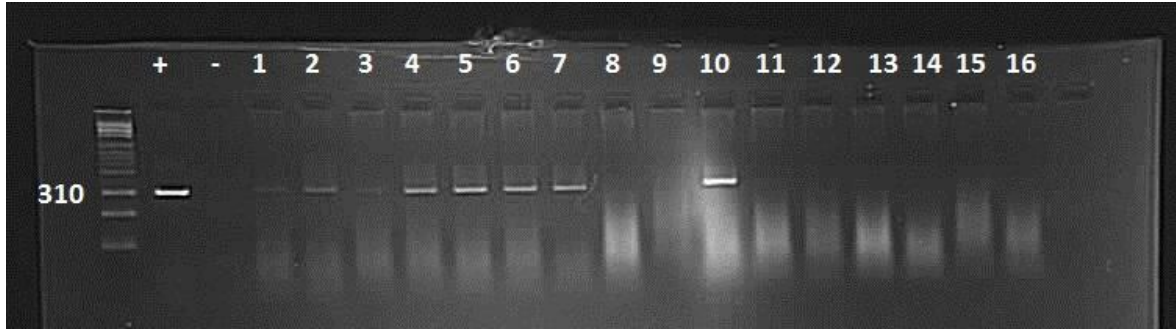
Keten hipokotil eksplantlarına yapılan gen aktarımı sonucunda, kültür başlangıcından 4 hafta sonra ölçümler alınmıştır. Çizelge 6.5. incelendiğinde, rejenerasyon yüzdesinde en yüksek sonuç 85.45 ile Sel 1886'da, petride gelişen toplam sürgün sayısına bakıldığında 28.36 ile 1886 Sel'da, toprağa aktarılan köklenmiş eksplant sayısı ve toprakta gelişen bitki sayısı bakımından ise 14.90 ve 6.81 ile Madaras keten çeşidi yüksek sonuçlar vermiştir. Toplam olarak en yüksek sonuçlar Clark keten çeşidinden alınmıştır (Şekil 6.5.).



Şekil 6.5. Keten çeşitlerinde rejenerasyon (%), Petride gelişen toplam sürgün sayısı ve toprakta gelişen bitki sayısı.

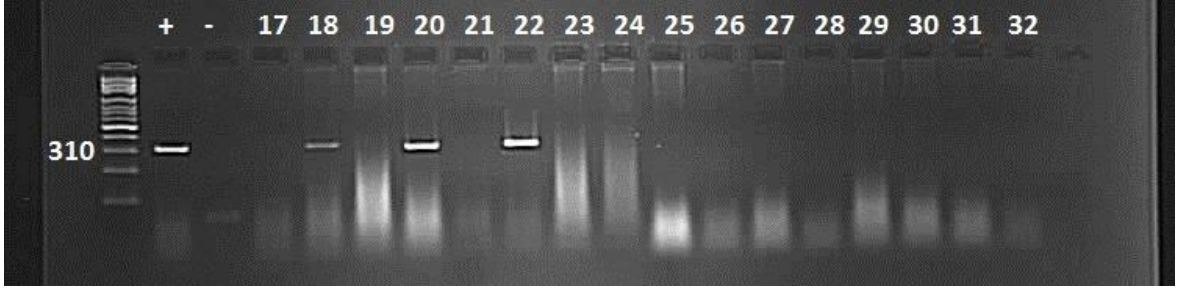
### 6.2.1. Clark Keten Çeşidine Gen Aktarım Sonuçları

Şekil 6.6., 6.7. ve 6.8 incelendiğinde, Clark keten çeşidine içerisinde *bar* geni bulunduran pTF101.1 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı sonucunda eksplantlar sırasıyla ko-kültivasyon, seleksiyon ve toprakta yetiştirilerek 48 adet transgenik adayı bitki elde edilmiştir. Transgenik bitki adaylarına yapılan PCR sonucunda 48 transgenik adayı bitkiden 17 tane PCR pozitif bitki elde edilmiştir.



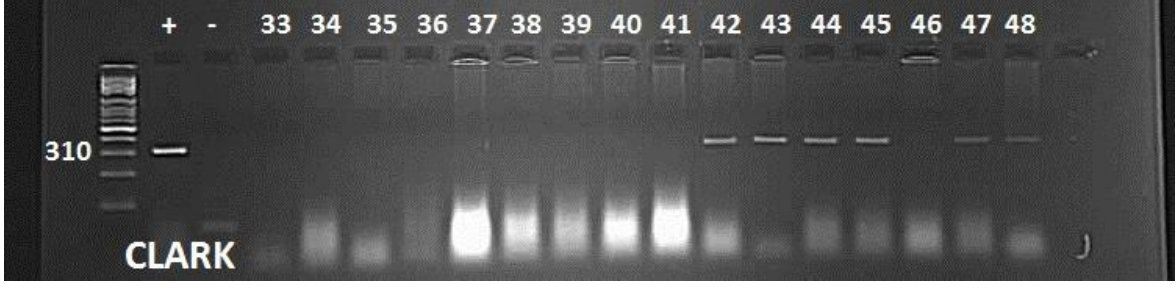
	Kuyu	<i>bar</i> Geni Varlığı
Ladder	L	-
Negatif (-) Kontrol	-	-
Pozitif Kontrol	+	+
	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
	6	+
	7	+
	8	-
	9	-
	10	+
	11	-
	12	-
	13	-
	14	-
	15	-
	16	-

Şekil 6.6. Clark keten çeşidinde PCR *bar* geni görüntüsü -1.



	<b>Kuyu</b>	<b><i>bar</i> Geni Varlığı</b>
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	17	-
	18	+
	19	-
	20	+
	21	-
	22	+
	23	-
	24	-
	25	-
	26	-
	27	-
	28	-
	29	-
	30	-
	31	-
	32	-

Şekil 6.7. Clark keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -2.

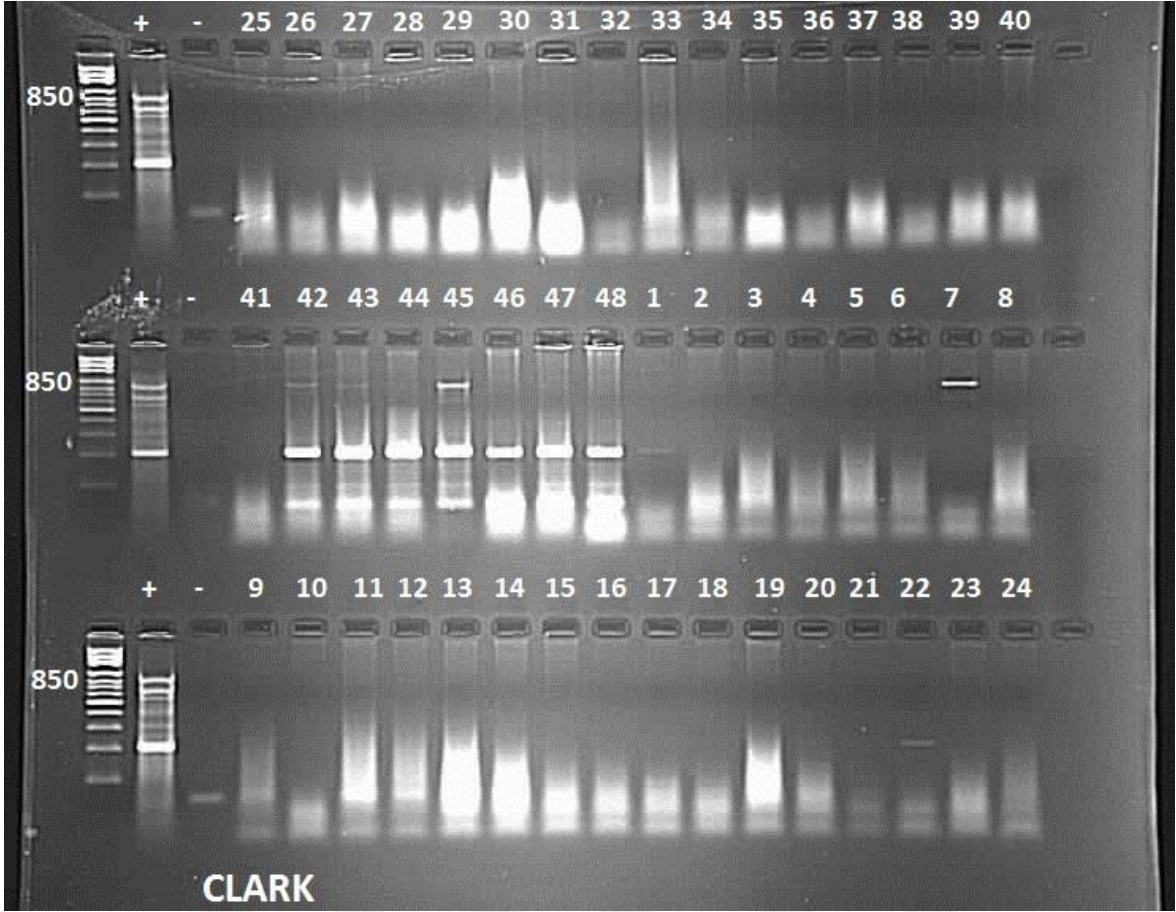


	Kuyu	<i>bar</i> Geni Varlığı
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	33	-
	34	-
	35	-
	36	-
	37	-
	38	-
	39	-
	40	-
	41	-
	42	+
	43	+
	44	+
	45	+
	46	-
	47	+
	48	+

Şekil 6.8. Clark keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -3.

Clark keten çeşidinde, elde edilen 17 adet PCR pozitif bitkide *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun varlığını kontrol etmek amacıyla *chv* kontrol PCR'ı kurulmuş örnekler agaroz jelde yürütülerek *chv* geninin varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 6.9.). Sonuçta transgenik oldukları tespit edilen 17 adet bitkiden 13 tanesinde *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir.



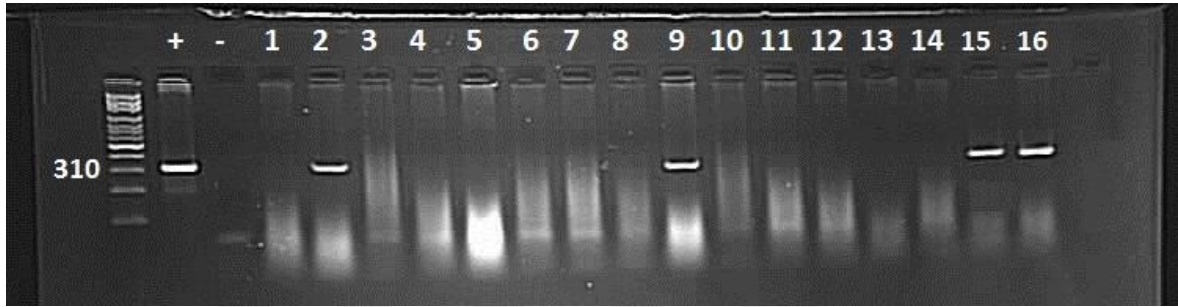


	<b>Kuyu</b>	<b><i>cvh</i> Geni Varlığı</b>
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
	5	-
	6	-
	7	+
	10	-
	18	-
	20	-
	22	-
	42	+
	43	+
	44	-
	45	+
	47	-
	48	-

Şekil 6.9. Clark keten çeşidinde PCR *cvh* geni görüntüsü.

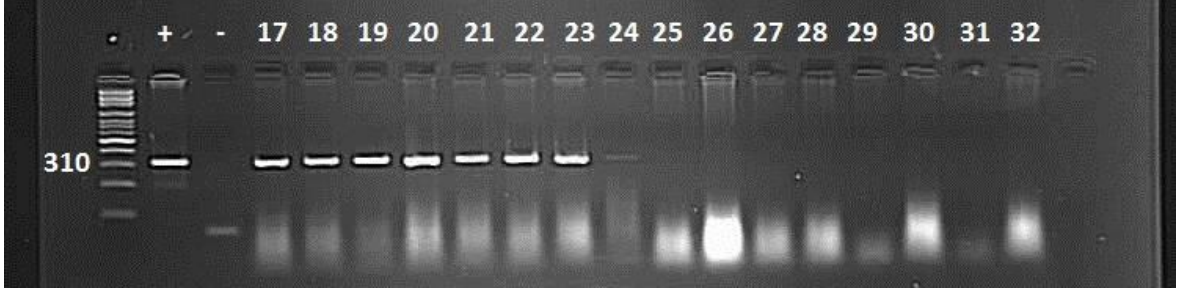
### 6.2.2. Madaras Keten Çeşidine Gen Aktarım Sonuçları

Şekil 6.10., 6.11. ve 6.12 incelendiğinde, madaras keten çeşidine içerisinde *bar* geni bulunduran pTF101.1 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı sonucunda eksplantlar sırasıyla ko-kültivasyon, seleksiyon ve toprakta yetiştirilerek 48 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. Transgenik bitki adaylarına yapılan PCR sonucunda 48 transgenik aday bitkiden 20 tane PCR pozitif bitki elde edilmiştir.



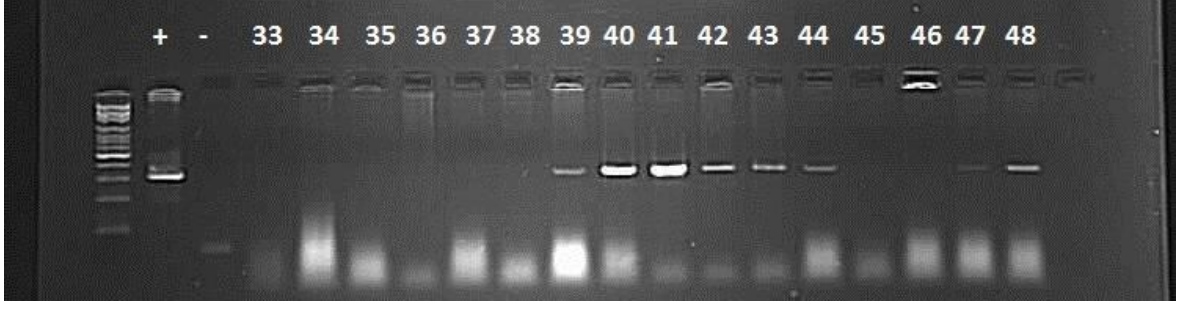
	Kuyu	<i>bar</i> Geni Varlığı
Ladder	L	-
Negatif (-) Kontrol	-	-
Pozitif Kontrol	+	+
	1	-
	2	+
	3	-
	4	-
	5	-
	6	-
	7	-
	8	-
	9	+
	10	-
	11	-
	12	-
	13	-
	14	-
	15	+
	16	+

Şekil 6.10. Madaras keten çeşidinde PCR *bar* geni görüntüsü -1.



	<b>Kuyu</b>	<b><i>bar</i> Geni Varlığı</b>
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	17	+
	18	+
	19	+
	20	+
	21	+
	22	+
	23	+
	24	+
	25	-
	26	-
	27	-
	28	-
	29	-
	30	-
	31	-
	32	-

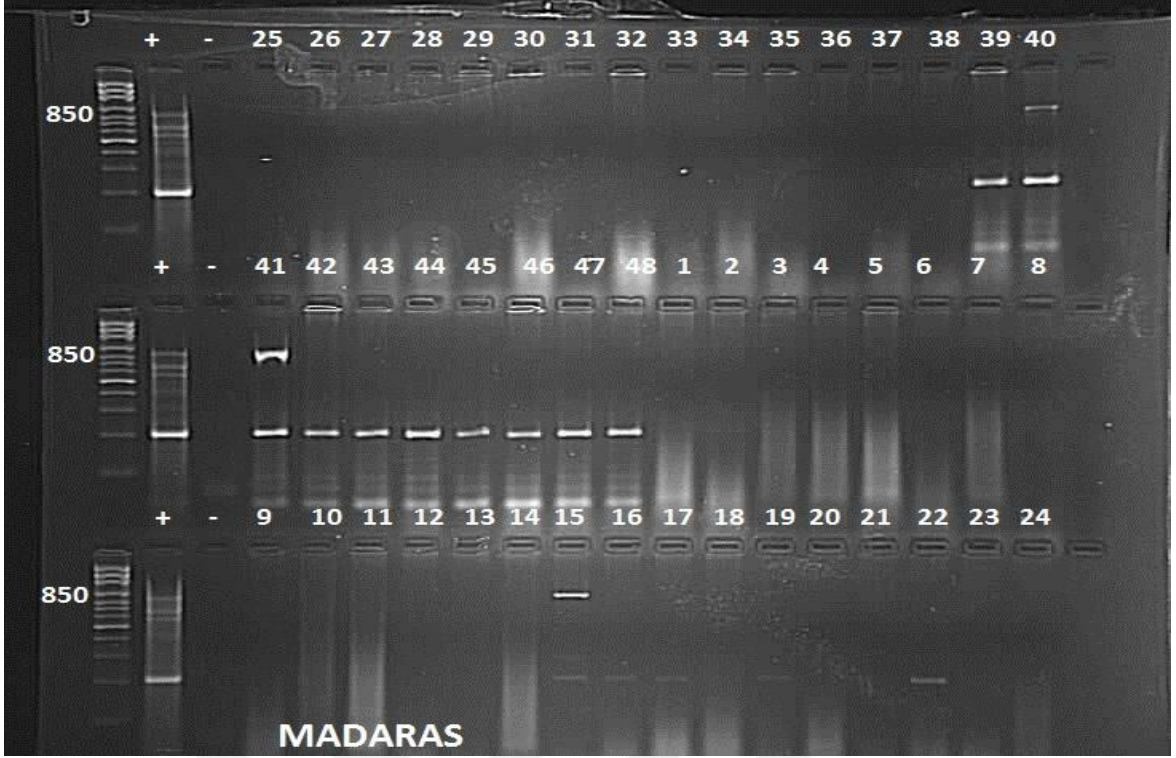
Şekil 6.11. Madaras keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -2.



	Kuyu	<i>bar</i> Geni Varlığı
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	33	-
	34	-
	35	-
	36	-
	37	-
	38	-
	39	+
	40	+
	41	+
	42	+
	43	+
	44	+
	45	-
	46	-
	47	+
	48	+

Şekil 6.12. Madaras keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -3.

Madaras keten çeşidinde, elde edilen 20 adet PCR pozitif bitkide *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun varlığını kontrol etmek amacıyla *chv* kontrol PCR'ı kurulmuş örnekler agaroz jelde yürütülerek *chv* geninin varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 6.13). Sonuçta transgenik oldukları tespit edilen 20 adet bitkiden 17 tanesinde *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir.

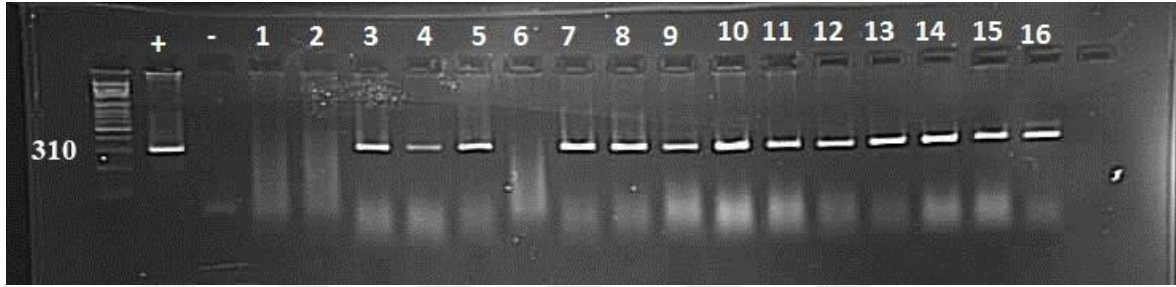


	<b>Kuyu</b>	<b><i>chv</i> Geni Varlığı</b>
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	2	-
	9	-
	15	+
	16	-
	17	-
	18	-
	19	-
	20	-
	21	-
	22	-
	23	-
	24	-
	39	-
	40	+
	41	+
	42	-
	43	-
	44	-
	47	-
	48	-

Şekil 6.13. Madaras keten çeşidinde PCR *chv* geni görüntüsü.

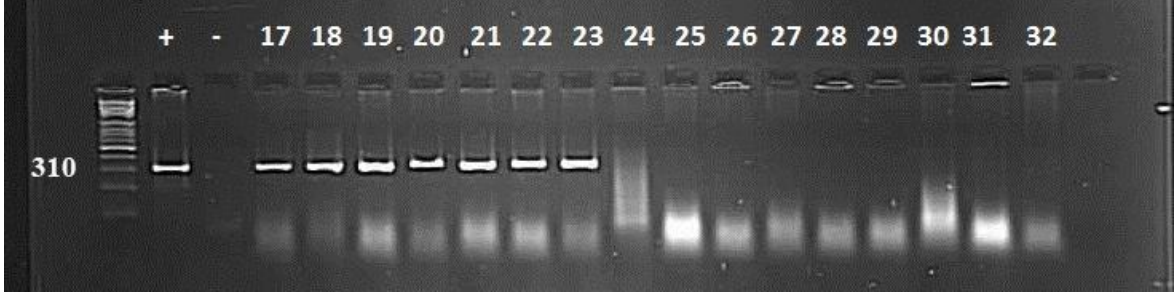
### 6.2.3. 1886 Sel Keten Çeşidine Gen Aktarım Sonuçları

Şekil 6.14. 6.15. ve 6.16 incelendiğinde, 1886 Sel keten çeşidine içerisinde *bar* geni bulunduran pTF101.1 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı sonucunda eksplantlar sırasıyla ko-kültivasyon, seleksiyon ve toprakta yetiştirilerek 48 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. Transgenik bitki adaylarına yapılan PCR sonucunda 48 transgenik aday bitkiden 25 tane PCR pozitif bitki elde edilmiştir.



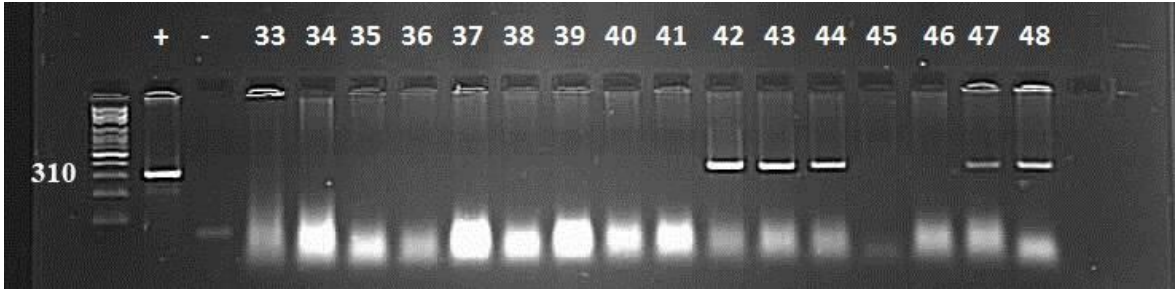
	Kuyu	<i>bar</i> Geni Varlığı
Ladder	L	-
Negatif (-) Kontrol	-	-
Pozitif Kontrol	+	+
	1	-
	2	-
	3	+
	4	+
	5	+
	6	-
	7	+
	8	+
	9	+
	10	+
	11	+
	12	+
	13	+
	14	+
	15	+
	16	+

Şekil 6.14. Madaras keten çeşidinde PCR *bar* geni görüntüsü -1.



	<b>Kuyu</b>	<b><i>bar</i> Geni Varlığı</b>
<b>Ladder</b>	L	-
<b>Negatif (-) Kontrol</b>	-	-
<b>Pozitif Kontrol</b>	+	+
	17	+
	18	+
	19	+
	20	+
	21	+
	22	+
	23	+
	24	-
	25	-
	26	-
	27	-
	28	-
	29	-
	30	-
	31	-
	32	-

Şekil 6.15. 1886 Sel keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -2.

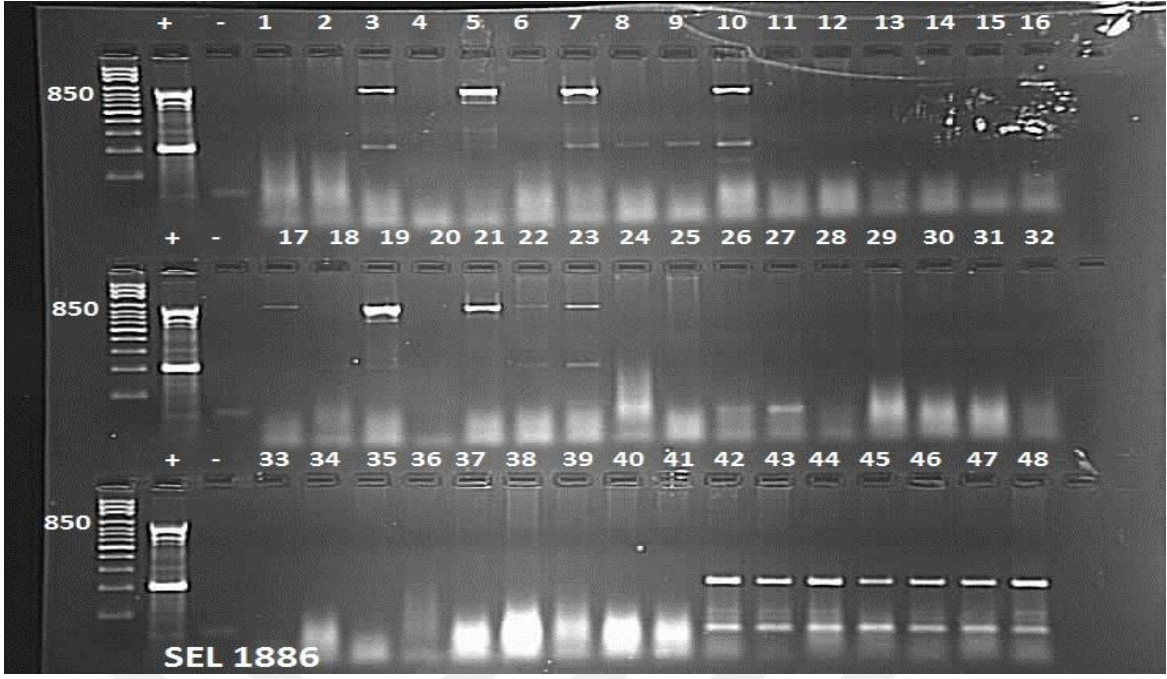


	Kuyu	<i>bar</i> Geni Varlığı
Ladder	L	-
Negatif (-) Kontrol	-	-
Pozitif Kontrol	+	+
	33	-
	34	-
	35	-
	36	-
	37	-
	38	-
	39	-
	40	-
	41	-
	42	+
	43	+
	44	+
	45	-
	46	-
	47	+
	48	+

Şekil 6.16. 1886 Sel keten çeşidinde PCR bar geni görüntüsü -3.

1886 Sel keten çeşidinde, elde edilen 25 adet PCR pozitif bitkide *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun varlığını kontrol etmek amacıyla *chv* kontrol PCR'ı kurulmuş örnekler agaroz jelde yürütülerek *chv* geninin varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 6.17). Sonuçta transgenik oldukları tespit edilen 25 adet bitkiden 15 tanesinde *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir.





	Kuyu	<i>chv</i> Geni Varlığı
Ladder	L	-
Negatif (-) Kontrol	-	-
Pozitif Kontrol	+	+
	3	+
	4	-
	5	+
	7	+
	8	-
	9	-
	10	+
	11	-
	12	-
	13	-
	14	-
	15	-
	16	+
	17	+
	18	-
	19	+
	20	-
	21	+
	22	+
	23	+
	42	-
	43	-
	44	-
	47	-
	48	-

Şekil 6.17. 1886 Sel keten çeşidinde PCR *chv* geni görüntüsü.

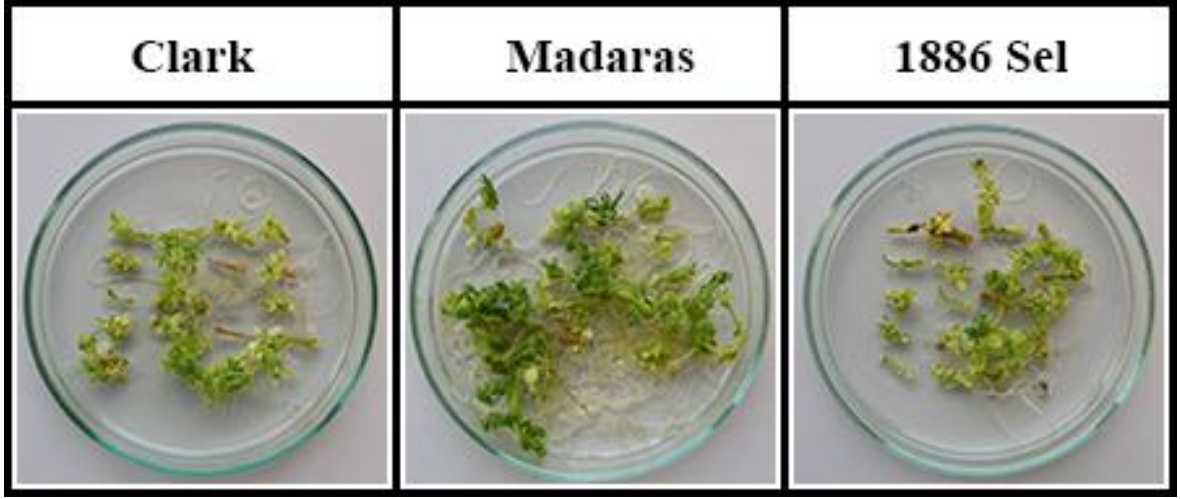
### 6.3. FARKLI KETEN ÇEŞİDİNE *BAR* GENİ AKTARIM SONUÇLARI

Çizelge 6.6. incelendiğinde, Clark, Madaras ve 1886 Sel keten çeşidine içerisinde *bar* geni bulunduran pTF101.1 plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı sonucunda eksplantlar sırasıyla ko-kültivasyon, seleksiyon ve toprakta yetiştirilerek her birinden 48 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. Transgenik bitki adaylarına aktarılmak istenen *bar* genini tespit etmek amacıyla yapılan PCR sonuçlarında;

Clark keten çeşidinde, elde edilen 17 adet PCR pozitif bitkide *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun varlığını kontrol etmek amacıyla *chv* kontrol PCR'ı kurulmuş örnekler agaroz jelde yürütülerek *chv* geninin varlığı kontrol edilmiştir. Sonuçta transgenik oldukları tespit edilen 17 adet bitkiden 13 tanesinde *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 6.6.). Madaras keten çeşidinde, elde edilen 20 adet PCR pozitif bitkide *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun varlığını kontrol etmek amacıyla *chv* kontrol PCR'ı kurulmuş örnekler agaroz jelde yürütülerek *chv* geninin varlığı kontrol edilmiştir. Sonuçta transgenik oldukları tespit edilen 20 adet bitkiden 17 tanesinde *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 6.6.). 1886 Sel keten çeşidinde, elde edilen 25 adet PCR pozitif bitkide *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun varlığını kontrol etmek amacıyla *chv* kontrol PCR'ı kurulmuş örnekler agaroz jelde yürütülerek *chv* geninin varlığı kontrol edilmiştir. Sonuçta transgenik oldukları tespit edilen 25 adet bitkiden 15 tanesinde *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 6.6.).

Çizelge 6.6. Keten çeşitlerine aktarılan *bar* geni toplam sonuçları

Çeşit	Transgenik Adayı Bitki Sayısı	<i>bar</i> geni Pozitif Bitki Sayısı	<i>chv</i> geni Pozitif Bitki Sayısı	Net Transgenik Bitki Sayısı
Clack	48	17	4	13
Madaras	48	20	3	17
1886 Sel	48	25	10	15



Şekil 6.18. Clark, Madaras ve 1886 Sel çeşitlerinde transgenik aday bitkiler



## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 7.1. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında ilk olarak seleksiyon için gereken Bialofos dozları optimize edilmiştir. Bialofos dozları faktör olarak aldığımızda transformasyon parametrelerinde değişiklikler gözlemlenmiştir. *Bialofos* dozlarının explant canlılığı üzerine etkisine baktığımızda tüm çeşitlerinde 0.00, 0.25 ve 0.50 mg/L *Bialofos* dozlarının hiç etki görülmemiştir. Ancak, 0.75 ve 1.00 mg/L Bialofos içeren ortamlarda sırasıyla Clark çeşidinde % 45 ve % 30 Madaras çeşidinde %55.33 ve % 30 ve 1886 Sel çeşidinde %53.33 olarak ortaya çıkmıştır.

Reneryasyon sonuçları baktığımızda ise sırasıyla 0.00 mg/L *Bialofos* dozlarında clark çeşidinde ve Madaras çeşidinde en fazla rejenerasyon tespit edilmiştir. 0.25 ve 0.5 mg/L dozlarında Clark çeşidinde en uygun sonuç gösteren her iki dozunda sırasıyla %60 ve % 48, esplant başına sürgün sayısına baktığımızda 0.00, 0.25 ve 0.50mg/l *Bialofos* dozlarında en yüksek rakamlar 1.29, 1.34 ve 1.26 adet Madaras çeşidinde sayılmıştır. En uzun Sürgün (cm) parametresine baktığımızda 2.29 cm olarak Madaras çeşidinde elde edilmiştir. Petride gelişen toplam sürgün sayısı 0.00 ve 0.25 mg/l Bialofos dozlarında Clark çeşidinde fark görülmemiştir. Madaras ve 1886 Sel keten çeşitlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. 0.50 mg/l Bialofos dozunda Clark çeşidinde 10.66 adet, Maradas çeşidinde 14.00adet ve Sel çeşidinde 8.00 adet toplam sürgün elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre Bialofos seleksiyonu için 0.75 mg/L olarak tercih edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına bağlı olarak sonraki adımda yapılan gen aktarım denemeleri yürütülmüştür.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre seleksiyon ortamlarda çeşitler arasında transgenik sürgün rejenerasyonu %79.54 - %85.45 arasında değişmiştir. En fazla sürgün rejenerasyon 1886 Sel çeşidinde ve en az ise Madaras çeşidinde izlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 1.54 – 1.69 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı Clark çeşidinde ve en az sayıda sürgün 1886 Sel çeşidinde izlenmiştir. En uzun sürgün boyu bakacak olursak 2.37 – 1.87 cm arasında tespit edilmiş, Madaras çeşidi ilk sırada ve Sel çeşidi ise son sırada yer almıştır. Toprağa aktarılan sürgün sayısında ise Madaras ve 1886 Sel çeşidinde aynı sayı/rakam ile 14.90 adet ve Clark çeşidinde istatistiksel olarak büyük bir farklılık görünmeden 14.52 adet sürgün toprağa aktarılmıştır. Toprakta 5,5 – 6.81 adet bitkisinde dış koşullarına adaptasyon sağlanmıştır. En fazla dış koşullarına adaptasyon

sağlayan bitki Clark ve Madaras çeşitlerinden elde edilmiş olup, iki çeşitten 6.81 adet ve 1886 Sel çeşidinde 5,5 adet bitkisinin toprağa adaptasyon sağlanmıştır.

Clark, Madaras ve Sel 1886 çeşitlerin gen aktarım sonuçları baktığımızda, her 3 çeşidinden transgenik pozitif bitkileri elde edilmiştir. Clark çeşidinden 48 bitkiden 13 adet bitki, Madaras çeşidinden 48 bitkiden 14 adet bitki, ve 1886 Sel çeşidinden 48 bitkiden 12 adet transgenik bitki elde edilmiştir. Dong ve McHughen (103) , p35S GUS INT plazmidini taşıyan GV2260 *A. tumefaciens* hattını keten bitkisine gen aktarmak amacıyla kullanmışlardır. İnokülasyon neticesinde 37 adet transgenik keten bitkisi elde edilmiştir. Bu bitkilerin histokimyasal GUS analizleri sonucunda, bitkilerin gövde ve yapraklarında yüksek oranlarda GUS aktivitesi gözlenmiştir. Mlynarova vd. (104) , agar ortamında çimlendirilen keten tohumlarından elde ettikleri hipokotil eksplantları binary pBI121 plazmidini içeren LBA 4404 *A. tumefaciens* streyni ile inoküle ederek kısa sürede, yüksek frekansta transgenik keten bitkileri elde etmişlerdir. Elde edilen 47 adet bitkiden 19 tanesi gelişme göstererek kanamisin içeren besin ortamında kallus üretmişlerdir. Bu 19 adet bitkinin yapraklarında GUS aktivitesi gözlenirken, PCR ile de GUS geninin bitkilerin genomuyla bütünleştiği teyit edilmiştir (105).

*Agrobacterium* yöntemiyle tütünlere gen transferi yapılmış olup, indirekt organogenesisle tütünler seçici ortamda büyütüldükten sonra sırasıyla kavanozlara ve saksılara konulmuşlardır. Tohumlan higromisinli ortamda büyüyen ve GUS v1 boyamasıyla olumlu renk veren bitkiler ile PCR, RT-PCR, Sekans Analizi ve Northern Blot gibi moleküler ve genetik analizler yapılmıştır. Kalemtaş (2011) Kennebec çeşidi patates (*Solanum tuberosum* L.), MYB4 transkripsiyon faktörünü kodlayan *Oryza sativa* myb4 genini CaMV35S promotörü kontrolünde ve COR15a promotörü kontrolünde taşıyan iki farklı plazmidi barındıran *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) aracılığıyla transforme edilmiştir. Transgenik bitkilerde herhangi bir büyüme geriliğine rastlanmamış ve bu bitkiler yabani tip bitkilerle karşılaştırıldıklarında yumru verimi açısından anlamlı bir farklılık ( $P<0.05$ ) görülmemiştir. Kamçı, (106). Bu çalışmada *Agrobacterium* yoluyla mercimek Sultan 1 varyetesinin genetik modifikasyonu ve MBF1c eksprese eden transgenik bitkilerin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu durumun nedenlerini araştırabilmek üzere GUS int markör genini taşıyan ikinci bitki transformasyon vektörü pPZP101ManA-GUSint-MBF1c dizayn edilmiş ve bu vektörle mercimekte geçici GUS

geni ifadesine bakılmıştır. Klasik ıslah yöntemleri ile yeni çeşit geliştirmesi oldukça yavaş ve zaman alıcı olduğu için integratif bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile istenilen gen/genlerindöğrudan aktarılması ile farklı türler ve cinsler arası gen aktarımı kolaylaşmıştır ve çalışma süresinin kısaltılmasına yönelik araştırmalar gittikçe artmaktadır (16, 14, 15). Türkiye’de yabancı ot kontrolünde kullanılan herbisitlere rastgele kullanılmakta ve yabancı otlarla beraber kültür bitkilerinde en yaygın ve en etkili olmasına rağmen gelişmelerinde de oldukça olumsuz şekilde etkileme le beraber verim kaybı gibi sorunlara sebep olmaktadır (18). Bu tez kapsamında yapılmış çalışmasıyla, keten bitki Islahında Türkiye ve Nigerde herbisitlere karşı dirençliliği kazandırk amacıyla ilk adım atılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmanın klasik ıslah yöntemleriyle entegrasyon sonucu keten ıslah çalışmalarına hızlandırmak mümkündür.

Glufosinato de amonio Glutamina sintetasa inhibitör olan bir herbisiddir. Bu enzime bitkilerde amonio asimülasyonda ve azot regülasyonda yer almaktadır (17). Baklagil türlerinin *Phaseolus vulgaris* olarak glufosinato amonio 0.5mg/l kullanıldığında oldukça yeterlidir. Muamaleden sonra sekiz hafta geçtikten sonra Kalluslar %87 üzerinde nekrozu göstermiştir. Glüfosinat amonyum konsantrasyonlarında bulunduğu Farklıklardan Somatik embriyoların çoğalmasımı inhibe yeterli olan ve dokunun selüler kompozisyonu birbiri ile bağlama ihtimal vardır. Ayrıca, bazı çalışmalarında farklı herbisitlere karşı kullanan benzer bir sonuçlar seyredilmiştir,

## 7.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında üç adet keten Clark, Madaras ve 1886 Sel çeşidi kullanılmıştır. *Agrobacterium teumefaciens*’nin GV2260 'pTF101.1' hatıyla gen aktarımı yapılmıştır, Clark çeşidinden 48 bitkiden 13 (% 27.08) adet bitki, Madaras çeşidinden 48 bitkiden 14 (% 35.41) adet bitki ve 1886 Sel çeşidinden 48 bitkiden 12 (% 29.16) adet bitkisinde herbistlere karşı dirençli keten bitkisi elde edilmiştir. Türkiye ilk defa *bar* geni ile ketene gen aktarım çalışması yapılmış ve başarı ile sonuçlandırılmıştır.

### 7.2.1. Öneriler

Bu çalışmaların devamına ihtiyaç duyulmaktadır. Elde edilen bitkilerin T1 ve T2 nesillerinin alınması ve incelenmesi gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar Türkiye keten tarımı için önemli bir adımdır. Tansgeniklerin ileriki yıllarda tarımının yapılmasına izin verilmesi durumunda transgenik keten çeşidi hazır olacaktır.



## 8. KAYNAKLAR

1. Koç H. Bitkilerle Sağlıklı Yaşam. *Başbakanlık Basımevi* 2002:22.
2. Yıldırım A. Molecular marker facilitated pyramiding of resistance genes for fungal diseases of wheat. *Work. Genomics Marker Assist. Sel. Plant Breed.* 2005;3:7.
3. Yıldız M. Keten (*Linum usitatissimum* L.) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. *Ankara Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü, Tarla Bitk. Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi* 2000:135.
4. Vasil IK. Biotechnology and food security for 21st century: A real-world perspective. *Nat. Biotechnol.* 1998;16:300–400.
5. Ergül M. “Hayvansal Üretim ve Çevre Kirliliği.” *Çiftçi ve Köy Dünyası Dergisi*, 1989;5:57.
6. Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C. R. Bhatia and ST. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding. Mol. Breed.* 1997;3:87–130.
7. Allard RW. History of plant production genetics. *Annu. Rev. Genet.* 1999;1:33.
8. Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı, G., Yıldız M., Birsin, M., Ulukan, H., Emiroğlu, H., Koyuncu, N. ve Sancak C. Tarım Teknolojilerinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar. In: *Bitki Biyoteknolojisi, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*. Ankara; 2005:315–346.
9. Yıldız M. Evaluation of the effect of in vitro stress and competition on tissue culture response of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Biol. Plant.* 2010;3:35.
10. Yıldız M, Özcan S EC. . Keten (*Linum usitatissimum* L.)’ de DVENTİF Sürgün Rejenerasyon zerinde Farklı Eksplant Kaynaklarının. *Etkisi Turk J Biol* 2001;2:37–40.
11. Sunilkumar G. VK and VK. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing vir gene induction. *Plant Sci.* 1999;141:51–58.
12. Çöçü S. Böceklere Dayanıklı Transgenik Korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) Bitkilerinin Elde Edilmesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Tarla Bitk. Anabilmi Dalı, Doktora Tezi* 2009:97.
13. Simmonds, C.A., Turk P. Beamer, S., Jaczynski, J., Semmens, K. and Matak, K.E. The effect of a flaxseed oil-enhanced diet on the product quality of farmed brook



- trout (*Salvelinus fontinalis*) filets. *J. Food Sci.* 2011;76:192–197.
14. Philips RL and Eberhart SA. Novel methodology in plant breeding. In Proc. of the Int. Crop Sci. Cong. Ames, USA. *Crop Sci. Soc. Am.* 1993;1:647–648.
  15. Kurt O. *Bitki Islahı*. Ondokuz Ma.; 2004.
  16. Hatipoğlu R. Bitki Biyoteknolojisi Ders Kitabı. *Çukurova Üniversitesi Genel Yayın* 2001;1:58.
  17. Süle R. Farklı Oksin Çeşitlerinin Yonca (*Medicago sativa* L.) Somatik Embriyo Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. *Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Yüksek Lisans* 2005:157.
  18. Onay, A., Yıldırım, H., Piriç, V., Tilkat, E., Özden, Y., Akdemir, H., Süzer, V., Çalar, N., binici, M., Akdemir, Ö. F. ve Kılınc FM. .. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilim. Derg.* 2002;2:11–28.
  19. Yıldız, M., Sağlık, Ç., Telci, C. and Erkilic EG. The effect of in vitro competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turk. J. Botany* 2011;35:211–218.
  20. Marshall DR GA. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. *Euphytica* 1984;33:321–328.
  21. B G. Determination of cross-pollination in flax (*Linum usitatissimum*) using different experimental designs. *J Agric Sci* 1999;133:31–35.
  22. Bloedon, L. T. and Szapary OP. Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Nutr. Rev.* 2004;62:18–27.
  23. Kurt O. Ketenin (*Linum usitatissimum* L.) Üretimi ve Kullanım Alanları. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.* 1996;11:189–194.
  24. Aycan. M. acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuynun, ketende (*Linum usitatissimum* L.) adventif sürgün rejenerasyonunu ve gen aktarımı üzerine etkisinin araştırılması. *Ankara üniversitesi Fen Bilim. Tarla Bilim. Anabil Dalı Yüksek Lisans* 2015:74.
  25. Van Z, W. and Bakker-H JAH. Evidence for linseed cultivation before 6000 BC. *J. Archaeol* 1975;2:215–219.
  26. Başer İ. Elyaf Bilgisi. *Marmara Üniversitesi Yayınları* 1998;663:37–52.
  27. Özkaynak E. Türkiye’de yetiştirilen bazı yıllık keten tohumlarının (*linum*

- usitatissimum L.) Ve Filizlerinin biyoaktif bileşikler açısından incelenmesi üzerine bir araştırma. *ege üniversitesi fen Bilim. enstitüsü Yanları* 2011;2:75–85.
28. Lynn G and K. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) Monographs. . *Biddles Ltd* 2003;2:75–80.
  29. ( Physician’s Desk Reference PDR. herbal medicines. *New Jersey Med. Econ. comp* 2000;2:80–90.
  30. Kailash P. Flaxseed and cardiovascular health. *Cardiovasc Pharmacol* 2009;59:367–377.
  31. Evans WC. Trease and Evans pharmacognosy. . *Edinbg. Saunders* 2000;15:101–115.
  32. Fukumitsu S, Aida K, Ueno N, Ozawa S, Takahashi Y KM. Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *Br J Nutr* 2008;100:669–676.
  33. Kenaschuk E. flax breeding and genetics. in: harapiak jt (ed) oilseed and pulse crops in western canada. *West. canada Co-op. Fertil.* 1975;3:203–221.
  34. Collins, T. F. X , Wiesenfeld, P. W., Babu, U. S.,, Sprando, R., O’Donnell, M. W., Flynn, T. J., Black T. A cassette containing the bar gene of *S. Hygrosop’cus*: a selectable marker for plant transformat’ on. *Nucl Acid Res* 1990;18:1062.
  35. Dabrosin, C., Chen, J., Wang, L., and Thompson LU. Flaxseed Inhibits Metastasis And Decreases Extracellular Vascular Endothelial Growth Factor Ğn Human Breast Cancer Xenografts. *Cancer Lett.* 2002;185:31–37.
  36. Toure, A. and Xu XM. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010;9:261–269.
  37. Singh, K.K., Mridula, D., Rehal, J. and Barnwal P. . Flaxseed: a potential source of food, feed and fiber. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011;51:210–222.
  38. Raffaelli B., HoIkkala A., Leppala E. WK. Review Enterolignans. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002;777:29–43.
  39. Degenhardt A HS and WP. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 2002;943(299-302).
  40. Haberlandt G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungber. Maht.*

- Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* 1902;111:69–92.
41. Winkelmann, T., Geier, T. and Preil W. Commercial in vitro plant production in Germany. *Ger.* 1985;1:200.
  42. Zülal A. Gen Aktarımlı Bitkilerin Geleceği. *Bilim ve Tek.* 2000;388:92–94.
  43. Özcan S. Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: Genetiği değiştirilmiş (trasngenik) mısırın tarımsal üretime katkısı. *Derleme Derg.* 2009;2(01-34).
  44. Çırakoğlu B. Gen Teknolojisi: Bugün ve Yarın. I. In: *Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi.* İstanbul; 2005:50–60.
  45. Bajrović K. Bitkilere gen aktarımı. *Bilim ve Tek. Derg.* 2002;14:75–87.
  46. Özcan S. ve Özgen M. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi,* 1996;1:69–95.
  47. Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., and Schell J. Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 1974;86(109-127).
  48. Watson, J. D., Currier, T. C., Gordon, M. P., Chilton, M. D. and Nester EW. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol* 1975;123:255–264.
  49. Leemans, J., Langenakkens, J., De Greve, H., Deblaere, R. and Vanloy JBH. less seeded pumpkins: a new edible snackseed crop, In:JanickAnd J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops. Timber Pres, Portland, OR* 1990;2:403–407.
  50. Chilton, M. D., Saiki, R. K., Yadav, N., Gordon, M. P. and Quetier F. *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980;77(4060-4064).
  51. Willmitzer, L., De Beukeleer, M., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell J. DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plants. *Nature* 1980;287:359–361.
  52. Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M. and Schell J. Broad host range cloning vectors derived from the W-plasmid. *Sa. Gene* 1982;19:361–364.
  53. Van Haaren, M. J. J., Sedee, N. J. A., Schilperoort, R. A. and Hooykaas PJJ. Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucl. Acids. Res.* 1987;15:8983–8997.
  54. Stachel, S. E. and Neter E. The genetic and transcriptional organization of the vir

- region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 1986;5:1445–1454.
55. Douglas, C. J., Staneloni R. J., Rubin, R. A. and Nester EW. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bact* 1985;161(850-860).
56. Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J and Zoller M. Recombinant DNA. *Sci. Am. Books* 1996;2:123–135.
57. rel, E. ve Babaoglu M. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi. *Selçuk Üniversitesi Basımevi* 2001;2:112–159.
58. Zambryski, P, Depicker, A, Kruger, K, Goodman H. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* 1982;1:361–370.
59. Ayten.D. genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar. *OMÜ Zir. Fak. Derg.* 2006;21:249–260.
60. G. A. glifosat (herbisit)’ın sıçanlar zreinde toksik ve teratojenik etkilerinin incelenmesi. *Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans* 2010:97.
61. Benbrook C. “Do GM crops mean less pesticides use?”, *Pesticide Outlook*, Ekim, Royal Society of Chemistry. *R. Soc. Chem.* 2001;1:204–207.
62. Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer ST. Urban contributions of glyphosate and its degraade AMPA to streams in the United States. . *Sci. Total Environmen* 2006;354:191–197.
63. Ciamporova, M., Pretova A. .. Ultrastructural Changes of Plastids in Flax Embriyos Cultivated in vitro. *New Pyhtol* 1981;87(473-479).
64. Fu, W. and Sun H. Investigation of pollen plants in flax (*Linum usitatissimum* L.) and preliminary observation on performance of their progenies. *Acta Genet. Sin.* 1981;8:369–374.
65. Pretova, A., Williams, E. G. Direct Somatic Embriyogenesis From Immature Zygotic Embriyos of Flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol* 1986;126:155–161.
66. Millam, S., Davidson, D. And Powell W. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis in vitro the effect of different

- carbonhydrates. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 1992;28:163–166.
67. Nichterlein, K. and Friedt W. Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Rep* 1993;12:426–430.
68. Bretagne, B., Chupeau, M.C., Chupeau, Y. and Fouilloux G. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Rep.* 1994;14:120–124.
69. Madhusudhan, B., Wiesenborn, D., Schwarz, J., Tostenson, K., Gillespie JA. Dry mechanical method for concentrating the lignan secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed. *Leb. u.-Technol* 2000;33:268–275.
70. Yıldız, M. and Er C. The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften* 2002;89:259–261.
71. Yıldız, M. and Er C. Increasing the injured area on hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) leads to high frequency callus-based shoot regeneration. *Turkish J. Biol.* 2002;26:95–98.
72. Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., A man P. ., High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *J. Chromatogr. A* 2003;1112:151–159.
73. Pretova, A., Obert B. Flax (*Linum usitatissimum* L.)- A Plant System for Study of Embryogenesis. *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.* 2003;45:15–18.
74. Yıldız, M., Ulukan, H. ve Ozbay A. Ketende (*Linum usitatissimum* L.) farklı ortam, katılaştırıcı ve eksplant yaşının hipokotil eksplantlarından surgun rejenerasyonu üzerine etkisi. In: *XIII. Biyoteknoloji Kongresi.* Çanakale; 2003:137–144.
75. Wakjira, A., Labuschagne, M. T., Hugo A. Variability in oil content and fatty acid composition of Ethiopian and introduced cultivars of linseed. *J Sci Food Agric.*, 2004;84:601–607.
76. Yıldız, M. and Ozgen M. The effect of a submersion pretreatment on in vitro explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 2004;77:111–115.
77. Krist, S., Stuebiger, K., Bail, S., Unterweger H. Analysis of volatile compounds and triacylglycerol composition of fatty seed oil gained from flax and false flax. *Eur. J.*

- Lipid Sci. Technol* 2006;108:48–60.
78. Yıldız, M. and Ozgen M. A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food, Agric. Environ.* 2006;4:171–174.
  79. Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. and Mesnard F. Microwave-assisted extraction of the Main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochem. Anal* 2007;18:275–282.
  80. Uysal H. linolenik asit oranı düşük keten çeşitlerinin geliştirilmesinde embriyo kültürü tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Tarla Bitk. Anabilim Dalı Yüksek Lisans* 2007:104.
  81. Choo, W. S., Birch, J., Dufour JP. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Compos. Anal.* 2007;20:202–211.
  82. Bozan B. and Temelli F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresour. Technol.* 2008;99:6350–6359.
  83. Sağlık C. in vitro rekabetin keten (*linum usitatissimum* l.) hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi. *Ankara Univ. Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Yüksek Lisans* 2010:38.
  84. Silvertooth, J. C., P. W. Brown, E. R. Norton and BLU. evaluation of planting date effects on crop growth and yield for upland and pima cotton. *Bioresour. Technol.* 1999;2:49–69.
  85. REY F. İspanya ve Türkiye’de pamuk tarımı. *MAY-AGRO TEK Derg.* 1997;4:10–11.
  86. Atakisi .K. Lif Bitkileri Yetistirme ve Islahı. *Trak. Üniversitesi Tekirdag Ziraat Fakültesi Yayınları.* 1999;10:93–105.
  87. Silvertooth JC and ERN. Planting date effects on soil temperature, crop growth, and yield of Upland cotton. *Cotton, Univ. Arizona Rep.* 2000;121:7–18.
  88. Kocjanacko, D., Baricevic D. .. Influences of Seed Age and Storage Conditions on Germination Ability of Hemp Seed (*Cannabis Sativa* L. Var. *Sativa*). *Acta Agric. Slov.* 2004;83:85–94.
  89. Bilgi F C. plastik malçli pamuk (*gossypium hirsutum* l.) ekim yönteminin pamukta erkencilik verim ve verim unsurları ile lif teknolojik özellikleri üzerine etkisi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Tarla Bitk. Anabilim Dalı Yüksek Lisans*

- Tezi 2007:70.
90. Kasapoglu Ö. organik pamuk ve organik pamuk iplikçiliginde maliyet hesapları. *İstanbul Tek. Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Tekst. Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi* 2007:133.
  91. Pınarkara E. uyuşturucu tipi kenevir genotiplerinin rapd-pcr metodu ile karakterizasyonu ve kullanılan istatistiki yöntemlerin değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Zootek. Ana Bilim Dalı* 2007:116.
  92. Gedik G. kenevir liflerinden üretilen kumaşların optimum ağartma koşullarının ve yöntemlerinin belirlenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Yüksek Lisans* 2002:97.
  93. AKKÖSE A. molecular mapping of quantitative trait loci conferring resistance to verticillium wilt in cotton. *İzmir Inst. Technol. Eng. Sci.* 2014:107.
  94. Peynircioğlu C. kuraklık stresine dayanıklı pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşit ishahında kullanılacak pamuk genotiplerinin belirlenmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Tarla Bitk. Anabilim Dalı Doktora Tezi* 2014:149.
  95. Khudir A. effect of freeze-thaw cycles on the strength of fine-grained soil stabilized with bottom ash, lime, jute fiber and steel fiber. *Univ. Gaziantep Nat. Appl. Sci. İn Civ. Eng. Yuksel lisans* 2014:87.
  96. Tansı M S. patatesin P5CS geni ile transformasyonun ve transgenik bitkilerde tuz direncinin değerlendirilmesi. *Orta doğu Tek. üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Yüksek Lisans* 2002:115.
  97. Polat Seçil. transgenik bt mısırın sıçanların prenatal ve postnatal gelişimi üzerine etkileri. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Biyol. Anabilim Dalı Yüksek Lisans* 2005:125.
  98. Kalemtaş G. Transformation potato with MYB4 transcription factor and evaluation of abiotic stress tolerance and gene expression profiles in transgenic plant. *Orta Doğu Tek. Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Yüksek Lisans* 2011:93.
  99. White, J., Chang, SY, Bibb, M, Bibb M. A cassette containing the bar gene of *S. hygrosopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucl Acids Res* 1990;18:1062.
  100. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15(3):473–497.

101. K m D. Partik l Bombardımanı Y ntemi İle Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisine Gen Aktarımı. *İstanbul Üniversitesi Fen Bilim. Yüksek Lisans Tezi* 2013.
102. WG. SG and C. Statistical Methods. *Iowa State Univ. Press* 1967;1:12–23.
103. Dong J-Z MA. Transgenic flax plants from Agrobacterium mediated transformations: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Sci* 1993;91:139–148.
104. Mylnarova L. Pretova A. A High-efficiency Agrobacterium-mediated gene transfer to flax. *Plant Cell Rep* 1994;13:282–285.
105. Tuncer T. Transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) with antimicrobial PFLP gene and analysis of transgenic plants. *Orta doğu Tek.  niversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* 2006:162.
106. Kami H. Genetic transformation of lentil (*Lens culinaris* M. Cv. Sultan. 1) with a transcription factor regulator (MBF1c) and analysis of transgenic plants. *Orta doğu Tek.  niversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Doktora Tezi* 2011:150.
107. Goldstein, A.L. & McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553



## 9. EKLER

DNA kalite ve miktar ölçümleri amacı ile %1'lik jel ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 9. 1. CLARK

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
1	K1	1802.30	1.81	0.70
2	K2	1328.40	2.11	0.68
3	K3	1121.80	2.12	0.52
4	K4	851.40	2.15	0.42
5	K5	658.2	2.24	0.32
6	K6	464.30	2.07	0.70
7	K7	540.00	2.23	0.66
8	K8	1045.20	2.26	0.46
9	K9	1287.60	2.16	0.44
10	K10	1054.40	2.27	0.59
11	K11	1515.20	2.17	0.63
12	K12	951.80	2.22	0.47
13	K13	1532.40	2.2	0.74
14	K14	1268.4	2.18	0.60
15	K15	693.60	2.17	0.32
16	K16	626.90	2.13	0.29
17	K17	551.50	2.12	0.65
18	K18	810.70	2.19	0.49
19	K19	1913.60	2.10	0.68
20	K20	1273.50	2.14	0.67
21	K21	385.60	2.02	0.43
22	K22	341.50	2.13	0.40
23	K23	1674.50	1.92	0.55
24	K24	1198.90	1.98	0.45
25	K25	1459.10	2.02	0.79

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
26	K26	770.40	2.18	1.65
27	K27	1248.60	2.14	0.91
28	K28	1202.80	2.14	1.44
29	K29	1351.90	2.18	1.76
30	K30	2009.30	2.07	0.93
31	K31	2440.30	2.05	1.38
32	K32	675.50	2.17	1.43
33	K33	2113.90	1.82	0.70
34	K34	2478.40	2.11	1.22
35	K35	1837.5	2.10	1.47
36	K36	591.00	2.08	1.54
37	K37	2026.20	2.11	1.43
38	K38	1582.50	2.09	1.35
39	K39	2279.60	2.20	1.74
40	K40	1325.80	2.15	1.73
41	K41	1549.40	2.21	1.74
42	K42	1729.90	2.18	2.07
43	K43	1451.50	2.21	2.10
44	K44	1677.80	2.21	2.08
45	K45	360.90	2.14	2.09
46	K46	1111.90	2.17	2.17
47	K47	2385.9	2.14	1.75
48	K48	3197.40	2.14	1.95

Çizelge 9. 2. MADARAS

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
1	M1	1577.50	2.20	0.90
2	M2	1207.70	2.23	1.17
3	M3	835.80	2.24	0.23
4	M4	1004.10	2.23	0.57
5	M5	2155.30	2.16	1.09
6	M6	1030.50	2.18	0.44
7	M7	894.90	2.26	0.35
8	M8	533.30	2.24	0.76
9	M9	684.60	2.20	0.96
10	M10	505.10	2.17	0.78
11	M11	1381.40	2.21	0.59
12	M12	1313.80	2.19	0.63
13	M13	582.30	2.14	0.71
14	M14	758.20	2.22	0.37
15	M15	556.30	2.17	0.37
16	M16	678.00	2.22	0.69
17	M17	174.70	2.23	0.78
18	M18	984.20	2.20	0.70

Örnekler No	Çeşitler	ng/μl	260/280	260/230
19	M19	291.20	2.25	0.80
20	M20	961.30	2.24	1.38
21	M21	624.30	2.23	0.51
22	M22	707.80	2.22	0.82
23	M23	1006.10	2.22	0.82
24	M24	322.90	2.30	0.42
25	M25	2155.90	2.18	1.72
26	M26	3310.20	2.12	1.63
27	M27	1907.2	2.13	1.25
28	M28	2966.00	2.17	1.76
29	M29	1749.30	2.15	1.40
30	M30	750.10	1.91	0.69
31	M31	1306.20	2.11	1.02
32	M32	3059.20	2.27	1.05
33	M33	1934.60	2.19	1.60
34	M34	2767.20	2.05	1.16
35	M35	3425.70	2.11	1.57
36	M36	1370.00	2.17	1.61
37	M37	1562.30	2.19	1.51

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
38	M38	1160.30	2.18	1.44
39	M39	1866.40	2.16	1.76
40	M40	599.60	2.12	1.48
41	M41	722.00	2.16	1.50
42	M42	732.20	2.08	1.01
43	M43	776.60	2.09	1.13
44	M44	1070.00	2.15	1.50
45	M45	822.40	2.19	0.88
46	M46	1181.7	2.15	1.38
47	M47	1231.00	2.17	1.49
48	M48	1546.70	2.19	1.70

Çizelge 9. 3. 1886 SEL

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
1	S1	1250.70	2.15	0.54
2	S2	557.50	2.25	0.23
3	S3	949.20	2.25	1.38
4	S4	1239.90	2.23	1.68
5	S5	552.40	2.09	0.88
6	S6	1045.30	2.19	0.49
7	S7	468.40	2.19	1.04
8	S8	885.00	2.24	1.05
9	S9	1043.70	2.22	0.95
10	S10	1004.10	2.25	1.46
11	S11	945.50	2.27	1.26
12	S12	823.20	2.28	1.21
13	S13	461.30	2.18	0.59
14	S14	1103.40	2.27	1.91
15	S15	835.50	2.28	1.16
16	S16	569.40	2.17	0.91
17	S17	699.70	2.38	0.65
18	S18	398.20	2.18	0.47

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
19	S19	1055.90	2.27	1.48
20	S20	548.50	2.10	1.01
21	S21	1080.30	2.27	1.20
22	S22	909.90	2.30	1.67
23	S23	722.20	2.27	1.18
24	S24	791.80	2.27	0.25
25	S25	1677.40	2.19	1.70
26	S26	939.10	2.15	1.20
27	S27	1226.20	2.14	1.22
28	S28	650.20	2.16	1.27
29	S29	1633.70	2.10	1.08
30	S30	1544.60	2.20	1.52
31	S31	2241.90	2.21	10.77
32	S32	628.1	2.20	1.02
33	S33	930.60	2.22	1.03
34	S34	2817.40	2.19	1.68
35	S35	2474.50	2.14	1.35
36	S36	768.90	1.75	0.35

Örnekler No	Çeşitler	ng/µl	260/280	260/230
37	S37	3321.60	2.11	1.48
38	S38	3026.50	2.11	1.42
39	S39	2208.50	2.15	1.14
40	S40	2759.30	2.15	1.51
41	S41	2413.00	2.12	1.25
42	S42	1220.60	2.18	1.62
43	S43	1575.50	2.17	1.59
44	S44	900.70	2.20	1.60
45	S45	662.40	2.11	0.68
46	S46	1487.10	2.16	1.63
47	S47	1243.40	2.18	1.44
48	S48	3798.90	2.12	1.99



## 10. ÖZGEÇMİŞ

OUSMANE SADOU



### Adres Bilgileri

Ankara Üniversitesi Keçiören

Öğrenci Evi Fatih Caddesi

No:197 Keçiören/ANKARA

### Ev Tel

**(312) 380 8401**

### Cep Tel

(507) 544 95 84

### E-posta

[dicko1ousmane@gmail.com](mailto:dicko1ousmane@gmail.com)

### Kişisel Bilgiler

#### Cinsiyet

Bay

#### Doğum Tarihi

01.01.1982 – Nijer

#### Medeni Durum

Evli

#### Uyruk

Nijer

#### Sürücü Belgesi

B

## Eğitim Bilgileri

### Lise

Franco Arap Niamey Lisesi –Nijer

2003

### Lisans

‘‘Marta Abreu’’ de Las Villas Merkez Üniversitesi - Marta  
AbreuSanta Clara Cuba

Ziraat Fakóltesi

Ziraat Mühendisliği – 2010

### Yüksek Lisans

‘‘Marta Abreu’’ de Las Villas Merkez Üniversitesi - Marta  
AbreuSanta Clara Cuba

Ziraat Fakóltesi

Ziraat Mühendisliği – 2010

### Doktora

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Temel Biyoteknoloji ABD – 2012

## **Kurs ve Sertifikalar**

**2009-2010:** 7 Eylül 2009'den 12 Nisan 2010'a kadar

Santa Clara- Cuba'da, Küba Sosyal İletişim Birliğinde Pazarlama ve Görüşme.

**2009-2010:** 20 Şubattan 31 Temmuz'a kadar

Santa Clara- Cuba'da, Küba Sosyal İletişim Birliğinde, Pazarlama hizmetleri

**2009 -2010:** 18 Eylül'den 22 Aralık'a kadar

Santa Clara- Cuba'da, Küba Sosyal İletişim Birliğinde, Pazar Tanımlaması

**2009-2010:** 10 Eylül 2009'dan 29 Nisan 2010'a kadar

Santa Clara- Cuba'da, Küba Sosyal İletişim Birliğinde, Halkla İliş

**2013-2014** 29 Marttan 15 Haziran kadar Ankarada Ululararası Öğrenci Akademisi Seminerleri.

## **Branş dışı faaliyetler**

- İki (2) yıl süreyle "Marta Abreu" de Las Villas Merkez Üniversitesinde, tüm Ulusların öğrenci hareketi başkanlığı
- Üç (3) yıl süreyle fakültesinin Üniversite Öğrenci Federasyon ununda, örgüt Sekreterliği
- Akademik kariyerinin 5 yıl süresince, sınıfının sorumlusu
- "Marta Abreu" de Las Villas Merkez Üniversitesinde, öğrenci bilimsel günlüğüne Birçok katkı yaptı ve liyakate sahip oldu.

## **Yetenekler ve Bilişim yeterliliği**

2005 tarihinde, Joven Club" Isla de la Juventud-Cuba'da Mikro bilgisayar operatörlüğü ve eğitim belgesi..

2006 tarihinde ' Joven Club'' Santa Clara-Cuba'da Microsoft Word ve PowerPoint Eğitim belgesi.

2007 tarihinde, ' Joven Club'' Santa Clara-Cuba'da Microsoft Excel eğitim belgesi.

### Uluslararası Kongreler

**SADOU, O., KAYAN, M., AYCAN, M., ONOL, B., YILIDZ, M., The Effect of Endogenous Plant Hormones on Shoot Regeneration from Hypocotyl Explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.), 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 2014, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.**

### Bilgisayar Bilgisi

Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint, İyi

### Yabancı Dil Bilgisi

#### Kullandığı diller.

**Fransızca:** Akıc1

**İngilizce:** İyi

**İspanyolca:** Akıc1

**Fulan dili:** Akıc1.

**Arapça:** İyi

**Zerma dili:** Akıc1

**Türkçe:** İyi

## 11. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 9 (1): 09-13, 2016  
ISSN: 1308-3945, E-ISSN: 1308-027X, www.nobel.gen.tr

### Tuz Stresinin Ayçiçeğinin (*Helianthus annus L.*) Fide Gelişimi Üzerine Etkisi

Ousmane SADOU<sup>1</sup> Murat AYCAN<sup>2\*</sup> Mehdi TAHER<sup>2</sup> Mustafa KAYAN<sup>2</sup> Mustafa YILDIZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Tandoğan, Ankara

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Dışkapı, Ankara

\*Sorumlu yazar:

E-mail: drmurataycan@hotmail.com

Geliş Tarihi: 11 Mart 2016

Kabul Tarihi: 1 Nisan 2016

#### Özet

Günümüzde yaygın olarak görülen tuzluluk problemi, dünyadaki toplam karasal alanın %7'sini etkilemektedir. Önümüzdeki çeyrek yüzyıl içerisinde tarım alanlarının %30'unun tuzdan etkileneceği bildirilmektedir. Bu çalışmada farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarının (0-kontrol, 50, 150 ve 250 mM) ayçiçeğinin fide gelişim döneminde morfolojik ve fizyolojik karakterler üzerine etkisi araştırılmıştır. Morfolojik karakterler olarak; bitki boyu, bitki yaş ve kuru ağırlıkları, ikincil ve üçüncül yaprakların alanı ile fizyolojik olarak; klorofil kapsamları, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Artan tuz konsantrasyonu bitki boyu, kök uzunluğu ve yaprak alanının azalmasına neden olmuştur. Klorofil kapsamları bakımından en yüksek değerler 250 mM tuz konsantrasyonundan elde edilmiştir. Artan tuz konsantrasyonlarında katalaz (CAT) aktivitesi dışında tüm fizyolojik karakterler düşmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Ayçiçeği, Tuz stresi, Morfolojik karakter, Fizyolojik karakter

### The Effect of Salt Stress on Seedling Growth of Sunflower (*Helianthus annus L.*)

#### Abstract

Salinity problem which is seen most common nowadays, affects 7% of total terrestrial area in the world. It has been reported that 30% of agricultural areas will be affected from salinity in forthcoming quarter century. In this study, the effects of different salt (NaCl) concentrations (0-control, 50, 150 and 250 mM) on morphological and physiological characters in seedling growth stage of sunflower were examined. Plant height, plant fresh and dry weights, secondary and tertiary leaf areas as morphological characters; chlorophyll contents, superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), ascorbate peroxidase (APX), and catalase (CAT) activities as physiological characters were determined. Increasing salt concentrations caused to decrease in plant height, root length and leaf area. The highest values regarding chlorophyll contents were obtained from 250 mM salt concentration. All physiological characters decreased in increasing salt concentrations except catalase (CAT) activity.

**Keywords:** Sunflower, Salt stress, Morphological character, Physiological character

## GİRİŞ

Yeryüzünde karaların kapladığı alan 14 milyar hektar olup, halen bu karasal alanın %10'luk kısmında bitkisel üretim yapılmaktadır. Dünyadaki toplam toprak alanının %7'si tuzdan etkilenebilmektedir. Bilinçsiz sulama ve çoraklık sebebiyle bu alanlar artmaya devam etmektedir. Tuzluluğun artışına bağlı olarak sürdürülebilir tarım alanlarının önümüzdeki 25 yıl içerisinde %30'unun, 21. yüzyılın ortalarında ise %50'sinin tahrip olabileceği bildirilmektedir [1, 2, 3]. Türkiye'de 1.5 milyon ha alanda tuzluluk problemi bulunmaktadır [4]. Bu alanların %60'ı tuzlu, %19.6'sı orta derecede tuzlu, %0.4'ü orta derecede alkali, %12'si hafif tuzlu-alkali, %8'i ise orta derecede tuzlu-alkali olarak sınıflandırılmaktadır [5]. Tuzluluk; yıkanarak yeraltı suyuna karışan çözünabilir tuzların, yüksek taban suyuyla birlikte kapilarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır. Tuz stresi; özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır [6, 7, 8].

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri; bitkinin çeşidine, uygulanan tuz çeşidi ile miktarına ve maruz kalma süresine

bağlı olarak değişmektedir. Tuzlu ortamlarda bitkiler genotipik farklılıklara bağlı olarak çok farklı cevaplar verirler [9]. Tuzluluğa karşı verilen bu farklı büyüme cevapları sadece farklı iki bitki türü için değil aynı türün farklı çeşitleri için de geçerlidir [1]. Tuzluluk, artan insan nüfusu ile birlikte besin maddesi üretimini önemli düzeyde kısıtlayan çevresel faktörlerden birisidir [10].

Son yıllarda tuza dayanıklılığın/toleransın belirlenmesinde bitki doku ve organellerinde iyon ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$ ) birikimi, bitkide taşınımı ve dağılımı ile bu iyonların birbirine olan oranları ( $\text{K}/\text{Na}$ ) [11], bitkilerin organik madde biriktirme ve sentezleme yetenekleri ile hücre düzeyinde meydana gelen oksidatif stresten kaynaklanan zararlanmalar üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır [12, 13].

Tuz stresi bitkiyi doğrudan öldürebileceği gibi, bitkinin tuza dayanıklılığı/toleransı ve ortamın tuz konsantrasyonuna bağlı olarak büyüme engelleyen, yaşlı yapraklardan başlayan klorofil ve membran parçalanmasına, yani kloroz ve nekrozlara neden olmaktadır. Diğer birçok stres faktöründe olduğu gibi tuz stresi altındaki bitkiler su kaybını azaltmak için stomalarını kapatmakta böylece  $\text{CO}_2$  gazının girişi de

engellenmektedir. Karbondioksit fiksasyonunda kullanılmayan elektronlar ile absorbe edilen ışık enerjisi, O<sub>2</sub>'nin aktivasyonunda kullanılmaktadır. Stres altındaki bitkilerde artan ROS (Reaktif Oksijen Türleri) hücrelere zarar vermekte, protein membran lipitleri, nükleik asitler ve klorofil gibi hücre bileşenlerinde zararlar meydana getirmektedir [14]. Tuz stresi sonucunda oluşan ROS'u zararsız bileşiklere dönüştüren antioksidan miktarları ve antioksidan enzim aktiviteleri bitkilerin oksidatif strese karşı en önemli dayanım mekanizmalarıdır [15].

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada bitki materyali olarak 'Trakya Tanımsal Araştırmalar Enstitüsü'nden temin edilen 'TARSAN-1018' yağlık ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşidi kullanılmıştır.

### Metot

Denemelerde 100 g torf yerleştirilen 500 ml'lik saksılara her bir tuz dozu için 10 saksıya, her saksıda 1 adet bitki olacak şekilde ekim yapılmıştır. İlk sulamada can suyu olarak tüm saksılara 50 ml normal su verilmiştir. Ekimden 1 hafta sonra toprak yüzeyine çıkan fideler, ikişer gün arayla farklı konsantrasyonlarda (0-kontrol, 50, 150 ve 250 mM) tuz (NaCl) içeren sularla, her saksıya 50 ml olacak şekilde iki hafta boyunca sulanmıştır. Tüm denemeler iklim kontrollü büyüme kabinlerinde, beyaz floresan ışığı (27 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) altında, 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24±1°C'de gerçekleştirilmiştir.

### Morfolojik ve Fizyolojik ölçümler

İki hafta sonunda bitkilerde morfolojik (bitki boyu, kök uzunluğu, bitki yaş ve kuru ağırlıkları, ikincil ve üçüncül yaprakların enleri ve boyları, ortalama yaprak alanı) ve fizyolojik (klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) aktiviteleri) ölçümler yapılmıştır. Yetiştirilen fidelerde, fide ve kök uzunlukları milimetrik cetvelle ölçülerek cm cinsinden belirlenmiştir.

Klorofil kapsamı, fotosentezi direk etkilemekte [16, 17, 18] ve dokulardaki fotosentetik kapasitenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [19, 20, 21]. İki haftalık fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri Curtis ve Shetty [22] tarafından bildirilen protokol kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için, 50 mg yeşil materyal, 3 ml metanol içine konularak 23°C'lik sıcaklıktaki karanlık ortamda 2 saat süreyle tutulmuş ve yeşil materyalde bulunan klorofilin metanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda sıvı kısımdan (klorofil içeren metanol) 1.5 ml alınarak 650 ve 665 nm'de spektrofotometre aracılığıyla optik yoğunluğu (OD) ölçülerek farklı formüller kullanılarak klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları "µg klorofil/g taze doku" cinsinden belirlenmiştir.

Süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, askorbat peroksidaz aktivitesi ve katalaz aktiviteleri Çakmak ve Marschner [23] ve Çakmak [24] tarafından bildirilen yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her muamele içerisinde 10 adet bitki bulunan 10 tekrarlamalı 500 ml'lik saksılarda kurulmuştur. Elde edilen veriler 'SPSS for Windows' programı yardımıyla varyans analize tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile

karşılaştırılmıştır. Yüzde değerlere istatistik analizinden önce arcsin transformasyonu uygulanmıştır [25].

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'ne farklı konsantrasyonlarda (0-kontrol, 50, 150 ve 250 mM) uygulanan tuzun bitki boyu, kök uzunluğu, ikincil ve üçüncül yaprak alanları üzerine etkisi Çizelge 1'de verilmiştir.

Kontrol uygulamasında 14.8 cm olan bitki boyunun 150 mM tuz konsantrasyonunda 17.3 cm'e çıktığı görülmektedir. En yüksek tuz konsantrasyonu olan 250 mM'da ise bitki boyu 16.0 cm ile kontrol uygulaması geçmiş, ancak 150 mM tuz konsantrasyonundan düşük gerçekleşmiştir. Görüldüğü gibi, tuz stresi altında bitki boyunu artırarak cevap vermiştir. Ancak, kontrole göre bu artış 150 mM'lık tuz konsantrasyonuna kadar daha yüksek olmuş, 250 mM'lık konsantrasyonda ise en yüksek stres derecesinde bitki boyu bakımından ortaya çıkan artış diğer tuz konsantrasyonlarının altında kalmıştır. Kök uzunluğuna incelendiğinde; kontrol uygulamasında 19.8 cm olarak ölçülen kök uzunluğu, tuz konsantrasyonu arttıkça azalmış ve en düşük değere 16.6 cm ile 250 mM'lık tuz konsantrasyonunda düşmüştür. 150 mM'lık tuz konsantrasyonunda bitki, kök uzunluğunu artırmak için bir mücadele vermiş ve 18.5 cm çıkarmıştır (Çizelge 1, Şekil 1).

Bitkide gelişen ikincil yapraklarda alan bakımından en yüksek sonuç 45.716 cm<sup>2</sup> ile kontrol uygulamasından alınırken, en düşük değer 33.793 cm<sup>2</sup> ile 250 mM tuz konsantrasyonundan elde edilmiştir. 150 mM'lık tuz konsantrasyonunda ikincil yaprak alanı 35.025 cm<sup>2</sup> ile 50 mM ve 250 mM'lık tuz konsantrasyonlarından daha yüksek gerçekleşmiştir. Üçüncül yaprak alanları incelendiğinde, en yüksek değer 17.558 cm<sup>2</sup> ile 150 mM'lık tuz konsantrasyonundan elde edildiği görülmektedir. Üçüncül yaprak alanında en düşük değer 9.883 cm<sup>2</sup> ile, en yüksek tuz konsantrasyonu olan 250 mM uygulamasından alınmıştır (Çizelge 1, Şekil 2).

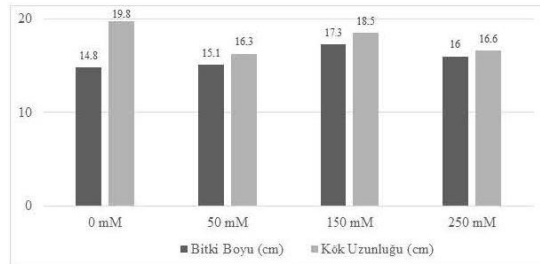
**Çizelge 1.** Farklı tuz konsantrasyonlarının ayçiçeğinde fide gelişim döneminde morfolojik karakterler üzerine etkisi

Tuz Konst. (mM)	Bitki Boyu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)	İkincil Yaprak Alanı (cm <sup>2</sup> )	Üçüncül Yaprak Alanı (cm <sup>2</sup> )
0	14.8 b	19.8 a	45.716 a	16.438 ab
50	15.1 b	16.3 b	30.066 c	16.535 ab
150	17.3 a	18.5 a	35.025 b	17.558 a
250	16.0 ab	16.6 b	33.793 ab	9.883 b

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Morfolojik karakterler bakımından genel bir değerlendirme yapılacak olursa, 150 mM'lık tuz konsantrasyonunda incelenen tüm karakterlerde elde edilen değerlerin, 50 mM ve 250 mM tuz konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, 150 mM tuz konsantrasyonunda ölçülen bitki boyu ve üçüncül yaprak alanının tuz uygulaması yapılmayan kontrole göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, ayçiçeğinde 150 mM tuz konsantrasyonunun eşik değer olduğunu, bir başka

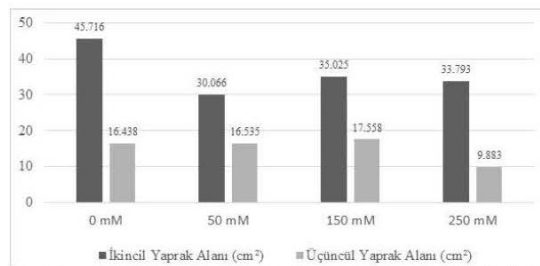
ifade ile bitkinin bu konsantrasyonda tuz stresinin olumsuz etkilerini en aza indirmek için bir mücadele verdiğini göstermektedir.



Şekil 1. Farklı tuz konsantrasyonlarının ayçiçeğinde bitki boyu ve kök uzunluğu üzerine etkisi

Morfolojik karakterler bakımından genel bir değerlendirme yapılacak olursa, 150 mM'lık tuz konsantrasyonunda incelenen tüm karakterlerde elde edilen değerlerin, 50 mM ve 250 mM tuz konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, 150 mM tuz konsantrasyonunda ölçülen bitki boyu ve üçüncül yaprak alanının tuz uygulaması yapılmayan kontrole göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, ayçiçeğinde 150 mM tuz konsantrasyonunun eşik değeri olduğunu, bir başka ifade ile bitkinin bu konsantrasyonda tuz stresinin olumsuz etkilerini en aza indirmek için bir mücadele verdiğini göstermektedir.

Bitki stres şartları altında, birçok hayati fonksiyonunu (fotosentez, solunum, büyüme gibi) durdurmakta ya da en düşük seviyeye çekmektedir. Stres faktörleri altında mitoz bölünme yavaşladığı için kütsel olarak bitki büyümesi de gerilemektedir. Araştırmamızda, 250 mM'lık tuz konsantrasyonunda bitki boyu, kök uzunluğu, ikincil ve üçüncül yaprak alanları bakımından elde edilen değerlerin kontrol uygulamasından düşük olması, stres faktörü altında bitki kütsel gelişiminin mitoz bölünmenin yavaşlaması sonucu düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Çizelge 1) [26].



Şekil 2. Farklı tuz konsantrasyonlarının ayçiçeğinde ikincil ve üçüncül yaprak alanları üzerine etkisi

Ayçiçeği fidelerine uygulanan farklı tuz konsantrasyonlarının yaprak klorofil kapsamı üzerine etkisi Çizelge 2 ve Şekil 3'de verilmiştir. Klorofil a bakımından en yüksek değer 647.245 µg klorofil/g doku ile 250 mM tuz konsantrasyonunda elde edilmiştir. 50 ve 150 mM'lık tuz konsantrasyonlarında elde edilen klorofil a kapsamı değerleri kontrol uygulamasından düşük olmuştur. Klorofil b kapsamı incelendiğinde, en yüksek değer 241.732 µg klorofil/g doku ile 250 mM tuz konsantrasyonundan alındığı görülmektedir. Kontrol uygulamasında, yapraklardaki klorofil b kapsamı, 176.220 µg klorofil/g doku olarak gerçekleşmiştir. Toplam

klorofil kapsamı bakımından en yüksek değer 298.630 µg klorofil/g doku ile 250 mM tuz dozundan elde edilmiştir. Tuz kullanılmayan kontrol uygulamasında toplam klorofil kapsamı bakımından 217.982 µg klorofil/g doku değeri ölçülmüştür (Çizelge 2, Şekil 3). Tuz stresi altında bazı bitkilerin fotosentetik aktivitelerinde azalma gözlenirken bazı bitkiler ise tuz stresinden daha az etkilenmektedir [27].

Çizelge 2. Farklı tuz konsantrasyonlarının ayçiçeği yapraklarının klorofil kapsamı üzerine etkisi

Tuz Konst. (mM)	Klorofil a (µg klorofil/g doku)	Klorofil b (µg klorofil/g doku)	Toplam Klorofil (µg klorofil/g doku)
0	473.593 b	176.220 b	217.982 b
50	391.438 c	159.778 c	191.512 c
150	445.002 b	168.976 b	207.548 b
250	647.245 a	241.732 a	298.630 a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

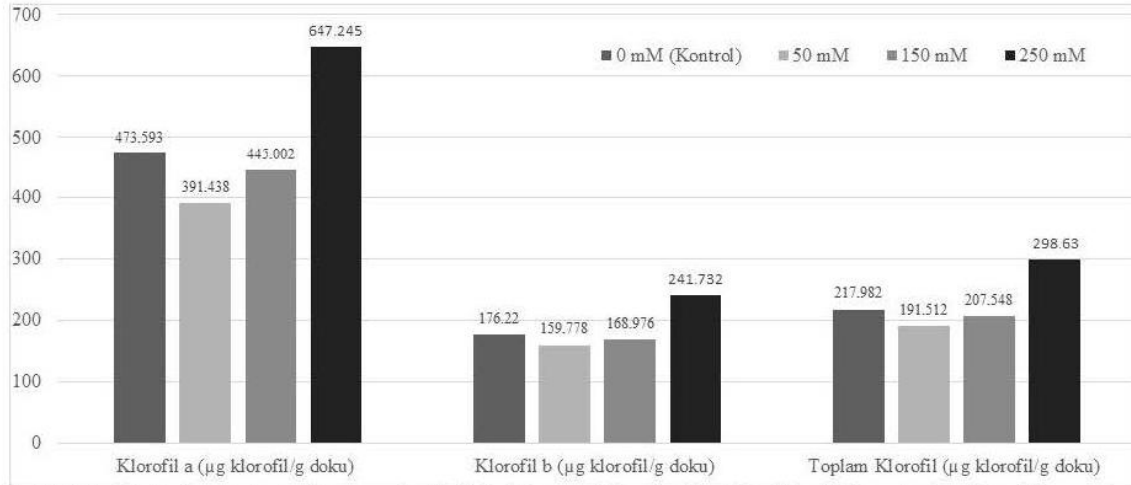
Ayçiçeğinde fide gelişim döneminde uygulanan farklı tuz konsantrasyonlarının fizyolojik karakterler üzerine etkisi Çizelge 3'te verilmiştir. Çizelge 3 incelendiğinde, tüm fizyolojik karakterlerde en yüksek değerlerin en yüksek tuz konsantrasyonu olan 250 mM'dan elde edildiği görülmektedir. Tüm fizyolojik karakterlerde en düşük değerler ise tuz uygulanmayan kontrole ortaya çıkmıştır. Bu durum, artan tuz konsantrasyonunun zararını azaltmak için ayçiçeği bitkisinde antioksidatif enzimlerin daha çok çalıştığını göstermektedir.

Çizelge 3. Farklı tuz konsantrasyonlarının ayçiçeğinde fide gelişim döneminde fizyolojik karakterler üzerine etkisi

Tuz Konst. (mM)	Süperoksit Dismutaz (SOD)	Glutatifyon Redüktaz (GR)	Askorbat Peroksidaz (APX)	Katalaz (CAT)
0	0.178 b	114.220 b	5137.053 b	275.063 d
50	0.246 a	162.663 a	5808.800 a	417.783 c
150	0.259 a	167.333 b	5998.310 a	492.230 b
250	0.266 a	173.443 a	6040.777 a	594.090 a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan aktif oksijen türevlerinden süperoksit radikalının yok edilmesinden sorumlu olan süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak artış göstermiştir. Glutatifyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimleri antioksidan savunma mekanizması içerisinde yer alıp kloroplastlardaki ve mitokondrideki hidrojen peroksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) temizlenmesinde etkili rol oynamaktadır. Katalaz (CAT) enzimi



**Şekil 3.** Farklı tuz konsantrasyonlarının ayçiçeği fidelerinin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamı üzerine etkisi

de oksidatif stres sonucu oluşan hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerinin suya ve moleküler oksijene dönüşerek yok edilmesinde görev yapmaktadır.

## SONUÇ

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), topraktaki tuz stresine karşı hassas bir bitkidir. Ancak, gerek ülkemizde ve gerekse dünyada tarım yapılan topraklardaki tuz miktarının giderek arttığı düşünüldüğünde, kültürü yapılan tüm bitkilerde tuza toleranslı/dayanıklı yeni çeşitler geliştirebilmek için bitkilerin tuz stresine olan tepkilerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Araştırmamızda ayçiçeğinin fide döneminde toprak tuzluluğuna gösterdiği morfolojik ve fizyolojik tepkiler incelenmiştir. Artan tuz konsantrasyonlarında ayçiçeği tuzun oluşturduğu zararları en aza indirme yönünde olumlu tepki verdiği görülmektedir. Bu durum, özellikle 150 mM'lık tuz konsantrasyonunda incelenen morfolojik karakterlerde (bitki boyu, kök uzunluğu, ikincil ve üçüncül yaprak alanları), kontrol uygulamasına göre bazen daha yüksek değerler vermesi (bitki boyu ve üçüncül yaprak alanında), bazen de kontrol uygulamasına yakın değerlere ulaşması (kök uzunluğu ve ikincil yaprak alanı) açıkça görülmektedir. Aynı şekilde, incelenen fizyolojik karakterlerde (klorofil kapsamı, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, askorbat peroksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri) en yüksek değerlerin 250 mM tuz konsantrasyonundan elde edildiği dikkate alındığında, bitkinin yüksek tuz konsantrasyonlarının ortaya çıkardığı olumsuz şartları aşmak için metabolik olarak çalıştığını göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Munns, R. 2002. "Comparative physiology of salt and water stress", *Plant Cell and Environment*, 25, 239-250.
- [2] Bonilla, I., El-Hamdaoui, A., Bolanos, L. 2004. "Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress", *Plant Soil*, 267(1-2), 97-107.
- [3] Ahmadi, A., Emam, Y., Pesarakli, M. 2009. "Response of various cultivars of wheat and maize to salinity

stress", *Journal of Food, Agriculture Environment*, 7(1), 123-128.

[4] Sönmez, B. 2008. "Türkiye çoraklık kontrol rehberi", Ankara: Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları.

[5] Tepe, A., Ertok, R., Yılmaz, M. 2008. "Bazı hıyar (*Cucumis sativus* L.) genotiplerinin fide döneminde tuza tolerans düzeylerinin belirlenmesi", *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 25(2), 35-43.

[6] Kuşvuran, 2010. "Kavunlarda Kuraklık ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar". Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 355 sayfa.

[7] Nawaz, K., Hussain, K., Majeed, A., Khan, F., Afghan, S., Ali, K. 2013. "Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects", *African Journal of Biotechnology*, 9(34), 5475-5480.

[8] Bayat, R.A., Kuşvuran, Ş., Elliaktoğlu, Ş., Üstün, A.S. 2014. "Tuz stresi altındaki genç kabak (*Cucurbita pepo* L. ve *C. moschata* Poir.) bitkilerine uygulanan prolinin antioksidatif enzim aktiviteleri üzerine etkisi", *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1, 25-33.

[9] Dajic, Z. 2006. *Stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, ISBN-13 978-1-4020-4224-9, Dordrecht, Salt the Netherlands, 345p.

[10] Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 2005. *Plant Adaptive Responses to Salinity Stress, Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing Ltd., 270p.

[11] Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, A.V. 1986. "Cellular mechanisms of salinity tolerance", *Horticultural Science*, 21, 1317-1324.

[12] Aktaş, H. 2002. "Biberde Tuza Dayanıklılığın Fizyolojik Karakterizasyonu ve Kalıtım", Ç.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Adana, 105 s.

[13] Daşgan, H.Y., Aktaş, H., Abak, K., Çakmak, İ. 2002. "Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses", *Plant Science*, 163, 695-703.

[14] Kuşvuran, 2010. "Kavunlarda Kuraklık ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar". Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 355 sayfa.

[15] Ashraf, M., Ali, Q. 2007. "Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the



key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.)", Environmental and Experimental Botany, 63, 266-273.

[16] Rensburg, L.V., Kruger, G.H.J. 1994. "Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L.", Journal of Plant Physiology, 143, 730-737.

[17] Kyparissis, A., Petropoulou, Y., Manetas, Y. 1995. "Summer survival of leaves in a softleaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: Avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents", Journal of Experimental Botany, 46, 1825-1831.

[18] Jagtap, V., Bhargava, S., Sterb, P., Feierabend, J. 1998. "Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench", Journal of Experimental Botany, 49, 1715-1721.

[19] Pal, R.N., Laloraya, M.M. 1972. "Effect of calcium levels on chlorophyll synthesis in peanut and linseed plants", Biochemie und Physiologie der Pflanze, 163, 443-449.

[20] Wright, G.C., Nageswara, R.R.C., Farquhar, G.D. 1994. "Water use efficiency and carbon isotope discrimination in peanut under water deficit conditions", Crop Science, 34, 92-97.

[21] Nageswara, R.R.C., Talwar, H.S., Wright, G.C. 2001. "Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using chlorophyll meter", Journal of Agronomy and Crop Science, 189, 175-182.

[22] Curtis, O.F. and Shitty, K. 1996 "Growth medium effects of vitrification, total phenolics, chlorophyll and water content of in vitro propagated oregano clones", Acta Horticulturae, 426, 489-497.

[23] Çakmak, I., Marschner, H. 1992. "Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves", Plant Physiology, 98, 1222-1226.

[24] Çakmak, I. 1994. "Activity of ascorbate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium deficient leaves, but not in phosphorus deficient leaves", Journal of Experimental Botany, 45, 1259-1266.

[25] Snedecor, G.W., Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

[26] Telci, C., Yıldız, M., Pelit, S., Önel, B., Erkiş, E.G. and Kendir, H. 2011. The effect of surface-disinfection process on dormancy-breaking, seed germination, and seedling growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. under *in vitro* conditions. Propagation of Ornamental Plants, 11, 10-16.

[27] Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmon, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Annals of Botany, 78: 389-398.