

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***IN VITRO* REKABETİN
KETEN (*Linum usitatissimum* L.) HİPOKOTİL EKSPANTLARINDAN
SÜRGÜN REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

ÇAĞLAYAN SAĞLIK

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. MUSTAFA YILDIZ

ANKARA
2010

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ danışmanlığında, Çağlayan SAĞLIK tarafından hazırlanan bu çalışma 21/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ (Danışman)

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan URANBEY

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Enstitü Müdürü V.

***In Vitro* Rekabetin Keten (*Linum usitatissimum* L.) Hipokotil Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi**

ÖZET

Bu çalışma, *in vitro* rekabet ve stress arasındaki ilişkileri ve bunların keten hipokotillerinin doku kültürü tepkisine olan etkilerini araştırmak için yapılmıştır. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra hipokotil yaş ve kuru ağırlıkları, sürgün rejenerasyon yüzdesi, hipokotil başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı kaydedilmiştir. Sonuçlar, eksplantlar arasındaki mesafeyi daraltarak onların rekabete teşvik edilmesinin sürgün rejenerasyon kapasitesini bir noktaya kadar artırdığını, bundan sonra başlayan stresin bütün parametrelerde önemli düşüöşlere neden olduğunu göstermiştir. 1.0 cm'lik aralık mesafelerde kültüre alınan eksplantlar, doku kültürü tepkisi bakımından en yüksek sonuçları vermiştir. Bu nedenle, *in vitro*'da eksplantlar arasındaki rekabetten faydalanılması diğer türlerde doku kültürü çalışmalarının başarısını artırabilir.

Anahtar Kelimeler: Keten, hipokotil, *in vitro* rekabet, sürgün rejenerasyonu

The Effect of *In Vitro* Competition on Shoot Regeneration from Hypocotyl Explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.)

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the relationship between *in vitro* competition and stress and their effects on tissue culture response of hypocotyls of flax. Six weeks after culture initiation, hypocotyl fresh and dry weights, shoot regeneration percentage, shoot number per hypocotyl, shoot length and total shoot number per Petri dish were recorded. The results showed that encouraging explants for competition by decreasing the intervals among them increased shoot regeneration capacity till a certain point from where stress initiated and significant decreases in all parameters were observed. Explants cultured at 1.0 cm interval gave rise to the highest scores with respect to tissue culture response. Therefore, utilizing competition among explants *in vitro* may increase the success of tissue culture studies in other species.

Key Words: Flax, hypocotyl, *in vitro* competition, shoot regeneration

TEŐEKKÖR

Bana yüksek lisans tezimin konusunda ve deneylerim sırasında çok yardımcı olan Sayın Hocam Doç. Dr. Mustafa Yıldız'a teşekkürlerimi bildiririm.

En zor anımda bana yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Sabahattin Özcan'a saygılarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca en sıkışık ve zor zamanlarımda benim arkamda olan ve benim kendime güvenimi yitirdiğim anlarda bile bana güvenlerini yitirmeyen bu tezin asıl mimarı olan çok sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	10
3.2. Keten Bitki Materyali	10
3.3. Metot	10
3.3.1. Büyüme ortamı ve kültür koşulları	10
3.3.2. Keten tohumlarının <i>in vitro</i> 'da çimlendirilmesi	11
3.3.3. Hipokotil eksplantlarının <i>in vitro</i> 'da elde edilen steril keten fidelerinden izolasyonu	12
3.3.4. Hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	12
3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler	14
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	15
4.1. Ariane Keten Çeşidinde Farklı Aralık Mesafelerde Kültüre Alınan Hipokotil Eksplantlarına Ait Doku Kültürü Tepkileri	15
4.2. Verne Keten Çeşidinde Farklı Aralık Mesafelerde Kültüre Alınan Hipokotil Eksplantlarına Ait Doku Kültürü Tepkileri	18
5. KAYNAKLAR	24
ÖZGEÇMİŞ	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. <i>In vitro</i> gelişen keten bitkisi	12
Şekil 3.2. Sürgün rejenerasyonu için kültüre alınan hipokotil eksplantlarının farklı aralık mesafelerde petriye yerleştirilmesi	13
Şekil 4.1. Verne çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu	19
Şekil 4.2. Ariane ve Verne çeşitlerinde hipokotil başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından rekabet-stress eğrisi	23

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	11
Çizelge 4.1. Ariane keten çeşidinde farklı aralık mesafelerin doku kültürü tepkisi üzerine etkisine ait Varyans Analizi	16
Çizelge 4.2. Farklı aralık mesafelerde kültüre alınan Ariane çeşidinin hipokotil eksplantlarına ait doku kültürü tepkileri	17
Çizelge 4.3. Verne keten çeşidinde farklı aralık mesafelerin doku kültürü tepkisi üzerine etkisine ait Varyans Analizi	20
Çizelge 4.4. Farklı aralık mesafelerde kültüre alınan Verne çeşidinin hipokotil eksplantlarına ait doku kültürü tepkileri	21

SİMGELER DİZİNİ

GUS	β -glucuronidase
<i>npt-II</i>	Neomycin-phosphotransferase-II geni
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
BAP	6-benzylaminopurine
IBA	Indole-3-butyric acid
NAA	Naphthalene acetic acid
IAA	Indole-3-acetic acid

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun yıllık %1.5'lik artışla 2020 yılında 8 milyar, 2050 yılında da 11 milyar olacağı tahmin edilmektedir (Vasil 1998). Günümüzde tarım yapılan alanlar dünya yüzeyinin %3'ünü oluşturmaktadır. Ancak, işlenen alanlar erozyon, tuzlulaşma, asitleşme, yoğun tarım ve aşırı otlatma gibi nedenlerle hızla daralmaktadır. Tüm bu faktörler artan nüfusun da etkisiyle 2050 yılına kadar 0.26 hektar olan kişi başına işlenen alanın 0.15 hektara düşmesine neden olacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak, modern tarım için gerekli su kaynaklarının bulunması; artan su tüketimi ve suların giderek kirlenmesi nedeniyle zorlaşacaktır (Vasil 1998).

Dünyanın nüfus bakımından en yoğun olan bölgelerindeki gıda maddesi ihtiyacı 2025 yılında ikiye katlanması beklenmektedir (Vasil 1998). Halen, gıda maddeleri üretiminde klasik ıslah ya da işlenen alanların artırılması yoluyla meydana gelecek artışın bu ihtiyacı karşılaması mümkün görülmemektedir.

Bir yandan dünya nüfusunun her geçen gün arttığı, öte yandan tarımda kullanılan alanların son sınırına dayandığı düşünüldüğünde, verim artışının gelecekte de devam etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Aslında yapılan araştırmalar, bugünkü verim düzeyinin potansiyel verimin çok altında olduğunu göstermektedir. O halde, potansiyel verim düzeyine ulaşabilmek için bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi gerekir. Ancak, klasik bitki ıslahında, hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere bitkilerin diğer tarımsal özelliklerini iyileştirmede birçok sınırlamalarla karşılaşılmaktadır. Aralarında melezleme yapılabildiği tür sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyen

özelliklerin de birlikte geçişinin engellenememesi, istenmeyen karakterlerin geri melezleme yoluyla elimine edilmesinin çok uzun zaman alması klasik bitki ıslahının önemli dezavantajları arasındadır (Özcan ve Özgen 1996). Bu yüzden, verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen çevreyle dost biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması zorunludur. Bitki genetik mühendisliğinin son yıllardaki başarılı uygulamalarıyla, bir bitkinin orijinal karakteri değiştirilmeden bir veya birden fazla gen yüksek verimli çeşitlere kolayca aktarılabilmektedir.

Linaceae familyasında yer alan *Linum* L. cinsi daha çok Akdeniz havzası olmak üzere, Amerika'nın güneybatısı ve kuzeyinde, Asya'nın ılıman ve subtropikal bölgelerinde yayılış gösterir ve 200 kadar türü kapsamaktadır. Bu türe daha çok Anadolu ve Balkanlar'da rastlanmaktadır (Davis 1965).

Linum ekonomik açıdan önemli bir cinsdir. Özellikle *L. usitatissimum* L. türünün yaygın olarak ekimi yapılır ve gövdesinden elde edilen sklerankima lifleri tekstil sanayinde keten ipliği yapımında kullanılır. Tohumlarından elde edilen bezir yağı geçmişte sofralık yağ olarak ve günümüzde de boya sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Davis 1967).

Keten tohumu genel olarak Hindistan, Mısır, Brezilya, Kanada, Arjantin, Amerika, Rusya, Hollanda ve Avrupa'nın çeşitli yerlerinde üretilmektedir. *Linum* türlerine çoğunlukla Balkanlar ve Anadoluda rastlanmaktadır. *Linum* türleri bakımından Türkiye çok zengin bir ülkedir. Yurdumuzda son yıllarda bulunan bir türle beraber 39 türe rastlanmaktadır (Güner vd. 2000). Türkiye'de de Karadeniz, Marmara, Ege ve İç Anadolu bölgelerinde kültürü yapılmaktadır. Bitkinin tıbbi amaçlarla kullanımına Eski Mısır'da rastlanmaktadır (Wallis 1967, Baytop 1996).

Keten tohumu başlıca bileşen olarak lignanlar, özellikle de sekoizolarisirezinol diglukozit taşınmasına ilaveten α -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 enterediol ve enterolaktona dönüştürülür. Keten tohumu lignan içeriğinden dolayı antikarsinojenik etkiye sahiptir ve besleyici özelliği vardır (Degenhardt vd. 2002, Rafaelli vd. 2002).

Son zamanlarda, kanser kemoterapisinde podofilotoksin türeyen lignanlar kullanılmaktadır. Podofilotoksin bazıları tehlike altında olan ve doğal ortamından toplanarak elde edilen *Podophyllum* türlerinden izole edilmektedir. Podofilotoksin ve bundan türeyen lignanlar için alternatif kaynak, *Linum* ve *Podophyllum* türlerinin hücre kültürleri olabilir. Bu hücre kültürleri yüksek miktarda podofilotoksin ve 5-metoksi podofilotoksin üretmektedir. Lignanlar, çok geniş çeşitlilikte biyolojik aktiviteye sahiptir. Örneğin, buğday, çavdar veya keten tohumunda bulunan ve memeli lignanları olarak da adlandırılan enterolaktonlar hormon-bağımlı kanserlere karşı fitoöstrojenik aktiviteleri sayesinde koruyucu etki gösterirler. Podofilotoksin ve bunun türevi lignanlar sitotoksik ve antiviral aktiviteye sahiptir. Podofilotoksin papilloma virüsünün sebep olduğu genital organ tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Podofilotoksin mikrotübüllere bağlanarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği için kanser tedavisinde kullanılır. Podofilotoksinin yarı sentetik türevi olan tenipozit etopozit ve ethopospos kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Petersen ve Alfermann 2001).

In vitro kültürde bitki rejenerasyonu gen aktarımının ilk koşuludur (Jordan ve Mc Hughen 1988, Dong ve Mc Hughen 1993). Transgenik bitkilerin elde edilmesine bitki rejenerasyonu, rejenerasyon yeteneğine sahip eksplantların seğimi, kültür Őartları ve gen aktarım yöntemi gibi birçok faktör etkilidir. Gen aktarımında yüksek başarı sağlanabilmesi için adventif sürgün sayısının yüksek olması gerekmektedir.

Keten invitro Őartlarda hipokotil eksplantların sürgün rejenerasyonu ve tam bitki elde edilmesi başarılmıştır (Murray vd. 1977).

Tarla Şartlarında stres ve rekebetin bitkiler üzerine etkileri konusunda yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Bitkiler aralarında toprak üzerinde yaprak ve saplarıyla ışık için, toprak altında da kökleriyle su ve besin maddesi için rekebet ederler (Wilson 1988, McPhee and Aarssen 2001). Bu tez çalışması *in vitro* Őartlarda kültüre alınan eksplantlar arasında benzer bir rekabet ve stresin bulunup bulunmadığını araştırmak, eğer böyle bir durum varsa, bunun sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nichterlein vd. (1989) ve Sun ve Fu (1981), ketende, anter kültürü tekniği kullanılarak farklı genotiplerden haploid bitkiler elde etmişlerdir. Ancak, anter kültürüne oranla mikrospor kültürü bazı avantajlara sahiptir. Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesinde, haploid hücrelerin izolasyonu ve kültürü daha başarılıdır. Bu yöntemde elde edilen bitkilerin haploid olma olasılığı çok yüksektir.

Millam vd. (1992), keten hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine maltoz, sukroz ve sellobioz gibi karbonhidratlarının etkisini araştırmışlardır. *In vitro* kültürde sukroz, eksplantların karbonhidrat ihtiyacını karşılamak amacıyla en çok kullanılan karbon kaynağıdır. Araştırma sonucunda, yüksek sukroz oranlarında kök gelişimi en yüksek bulunmuştur. Sellobiozun etkisi ise sukrozdaki daha zayıf görülmüştür. 58 mM sukroz kullanıldığında en iyi sürgün gelişimi sağlanmıştır.

Dong ve McHughen (1993), p35S GUS INT plazmidini taşıyan GV2260 *A. tumefaciens* hattını keten bitkisine gen aktarmak amacıyla kullanmışlardır. p35S GUS INT plazmidinde bulunan GUS geni CaMV 35S promotörü tarafından kontrol edilirken, seçici NPT-II markör geni NOS promotörü tarafından kontrol edilmektedir. İnokülasyon neticesinde 37 adet transgenik keten bitkisi elde edilmiştir. Bu bitkilerin histokimyasal GUS analizleri sonucunda, bitkilerin gövde ve yapraklarında yüksek oranlarda GUS aktivitesi gözlenmiştir.

Nichterlein ve Friedt (1993), ketende ebriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu için mikrospor kültürü yöntemini kullanmışlardır. Sıvı ortamda iki farklı sıcaklıkta kültüre alınan mikrospordan bir kısmı kallus oluştururken, bir kısmında direk embriyo oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşturan mikrosporların kallusları 1 mg/l

zeatin içeren katı ortamlara aktararak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Daha sonra IAA içeren ortamlarda köklendirilen sürgünler, önce vermikulite, oradan da toprağa şaşırtılmıştır. Bitkilerin çoğu serada başarılı şekilde olgunlaşmıştır.

Bretagne vd.(1994), iki liflik ve bir yağlık keten çeşidinde thidiazuron, BAP ve zeatin sitokininlerinin hipokotil, kotiledon ve apeks eksplantlarında sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu üç sitokinin kaynağının rejenerasyon üzerine olan etkisi gerek yalnız, gerekse NAA, IAA ve 2,4-D ile birlikte incelenmiştir. Araştırma sonucunda kotiledon eksplantları kök oluştururken, apeksten gen aktarımı için gerekli seviyede sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. En iyi sürgün rejenerasyonu 0.1 µM thidiazuron ve 0.01 µM NAA birlikte kullanıldığı hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir. Araştırmacılara göre, thidiazuron kullanılarak sağlanan sürgün rejenerasyonu daha önce bildirilen sonuçlardan 3-4 kat fazla bulunmuştur.

Mlynarova vd. (1994), agar ortamında çimlendirilen keten tohumlarından elde ettikleri hipokotil parçalarını binary pBI121 plazmidini içeren LBA 4404 *A tumefaciens* straini 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.

Yıldız (2000), Ariane ve Verne keten çeşitlerine ait hipokotil eksplantlarını kullanarak yaptığı araştırmasında, sırasıyla sürgün rejenerasyon yüzdesini %25.00 ve %22.50, hipkotil başına sürgün sayısını 2.10 ve 2.60, petride gelişen sürgün sayısını ise 5.25 ve 5.85 olarak belirlemiştir.

Yıldız vd. (2002), Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerine ait olup, *in vitro* ve serada yetiştirilen fidelerden alınan hipokotil ve sap eksplantlarını, sürgün veren eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki toplam sürgün sayısı bakımından karşılaştırmışlardır. Eksplantlar arasında hipokotil en iyi rejenerasyonu vermiştir. Eksplant kaynağı olarak *in vitro* yetiştirilen fideler, serada yetiştirilen fidelere göre daha uygun bulunmuştur.

Yıldız ve Er (2002a), yaptıkları çalışmada sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltilerinin konsantrasyon (%40, %60 ve %80) ve sıcaklıklarının (0, 10, 20, and 30°C) tohum çimlenmesi, *in vitro* canlılık, keten fidelerinin gelişimi ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon kapasitesi üzerine etkisini belirlemişlerdir. Sonuçlar, tohum çimlenmesi, fide gelişimi ve sürgün rejenerasyonunun dezenfektanın artan konsantrasyon ve sıcaklığından olumsuz etkilendiğini göstermiştir. Fide gelişimi ve sürgün rejenerasyonunda en iyi sonuçlar, %40'lık konsantrasyondaki dezenfektanın 10°C sıcaklıkta kullanılmasıyla elde edilmiştir.

Yıldız ve Er (2002b), yaptıkları araştırmada, keten bitkisinin hipokotil eksplantlarında, epidermis tabakası soyularak yaralanan yüzeyin genişletilmesi ile *Agrobacterium* inokulasyonundan sonra transgenik olmaya aday sürgün frekansının artırılması amaçlamışlardır. Soyulmamış hipokotil eksplantlarında kallus ağırlığı, sürgün oluşturan hipokotil yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki sürgün sayısı sırasıyla 0.8 g, %40, 4.24 adet ve 16.96 adet olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, epidermis tabakası soyulduğunda, kallus ağırlığı, sürgün oluşturan hipokotil yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki sürgün sayısı sırasıyla 1.35 g, %58.75, 8.15 adet ve 47.88 adete yükselmiştir.

Yıldız vd. (2003), yurt dışından getirilen üç keten çeşidini kullanarak yaptıkları çalışmada, steril edilen tohumlardan gelişen farklı yaşlardaki (7, 12, 17 gün) fidelerden elde edilen hipokotil parçaları agar ve phytigel ile katılaştırılan MS ve B-5 ortamlarında sürgün rejenerasyonuna almışlardır. Sonuçta, en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi her üç çeşitte ve tüm ortamlarda 12 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlarından elde edilirken; eksplant başına sürgün sayısı ve petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler denemeye alınan üç çeşitte de ortam olarak MS ve katılaştırıcı olarak agarın kullanıldığı 7 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Yıldız ve Özgen (2004), üç keten çeşidinde, 1 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) and 0.02 mg/l NAA (naphthaleneacetic acid) içeren MS ortamında, hipokotil parçalarının su içerisine geçici olarak daldırılmasının *in vitro* eksplant gelişimi ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Su ile muamele edilen hipokotil eksplantlarının sürgün rejenerasyon yüzdesi, hipokotil başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, petri başına sürgün sayısı, başarılı köklenme ve bitkicik oluşumu bakımından en yüksek değerleri verdiği gözlenmiştir. Bu yöntemin, *in vitro* kültüre alınan diğer türler için de uygulanabileceği vurgulanmıştır.

Yıldız vd. (2005), son yıllarda sürgün rejenerasyonunu artırmada yaygın olarak kullanılan TDZ'nin (thidiazuron) keten hipokotil eksplantlarından sürgün gelişimi üzerine olan etkisini BAP ve NAA ile karşılaştırmışlardır. Özellikle gen aktarımı yapıldıktan sonra, gen aktarılmış dokulardan transgenik sürgünlerin rejenerasyonu son derece önemlidir. Başarılı bir gen aktarımı için adventif sürgün rejenerasyonunun ve özellikle de eksplant başına rejenere olan sürgün sayısının yüksek olması gerekmektedir. Keten hipokotil eksplantlarından yüksek adventif sürgün elde etmek

için rejenerasyon ortamında yaygın olarak BAP ve NAA kullanılmaktadır. 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.

Yıldız ve Özgen (2006), benzylaminopurine (BAP), naphtalene acetic acid (NAA) ve thidiazuron (TDZ)'un farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının üç keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkisi araştırmışlardır. Bitki rejenerasyonu, biyoteknolojide transgenik bitkilerin elde edilmesinde sınırlayıcı önemli bir faktördür. Keten (*Linum usitatissimum* L.), yüksek kaliteli kuruyan yağı ve lifi nedeniyle önemli bitkilerden biridir. Keten bitkileri, *in vitro* teknikler kullanılarak hipokotil kısımlarından kolaylıkla rejener olmaktadır. 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. TDZ'nin ketenin *in vitro* kültüründe yalnız başına kullanılması önerilmemiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılacak tüm kimyasal maddeler Sigma Chemical Co., Merck ya da Duchefa'dan temin edilmiştir.

3.2. Keten Bitki Materyali

Çalışmada bitki materyali olarak kullanılan Ariane (liflik) ve Verne (yağlık) keten çeşitlerine ait tohumlar A.B.D.'nin Kuzey Dakota eyaletinde bulunan "Northern Crop Science Laboratories"den sağlanmıştır.

3.3. Metot

3.3.1. Büyüme ortamı ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS0) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmış, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilâve edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24°C'de tutulmuştur. Her muamele, içerisinde 11 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur.

Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

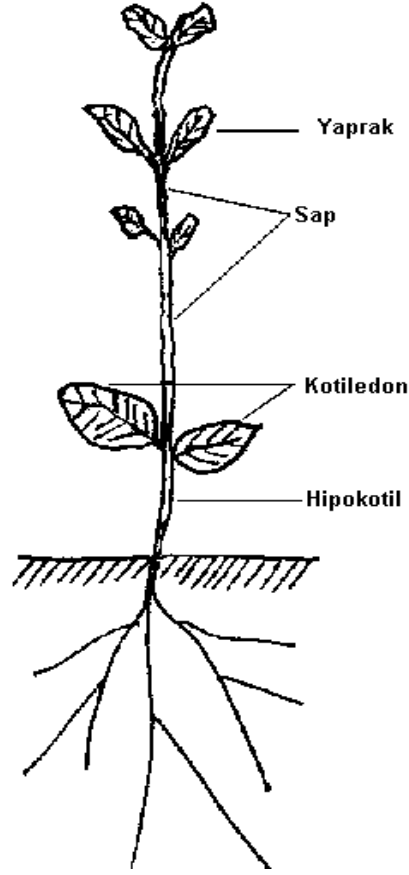
Ortamda Bulunan Maddeler	Konsantrasyonu (mg/l)
Makro Elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
Vitaminler	
Inisitol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2

3.3.2. Keten tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilmesi

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için manyetik karıştırıcı üzerinde 10°C'lik sıcaklığa sahip %40'lık ticari çamaşır suyu içerisinde 10-15' çalkalandıktan sonra, aynı sıcaklığa sahip steril saf su ile 3 kez durulanmıştır (Yıldız ve Er 2002). Steril edilen tohumlar yine steril Magenta kapları içerisinde, %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar ile katılaştırılan MS besin ortamında, 24°C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilmiştir.

3.3.3. Hipokotil eksplantlarının *in vitro*'da elde edilen steril keten fidelerinden izolasyonu

7-10 günlük steril fidelerin hipokotil kısımları (Şekil 3.1) 5 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına her petride 11 adet olmak üzere farklı 4 aralık mesafede (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm) yerleştirilmiştir (Şekil 3.2).

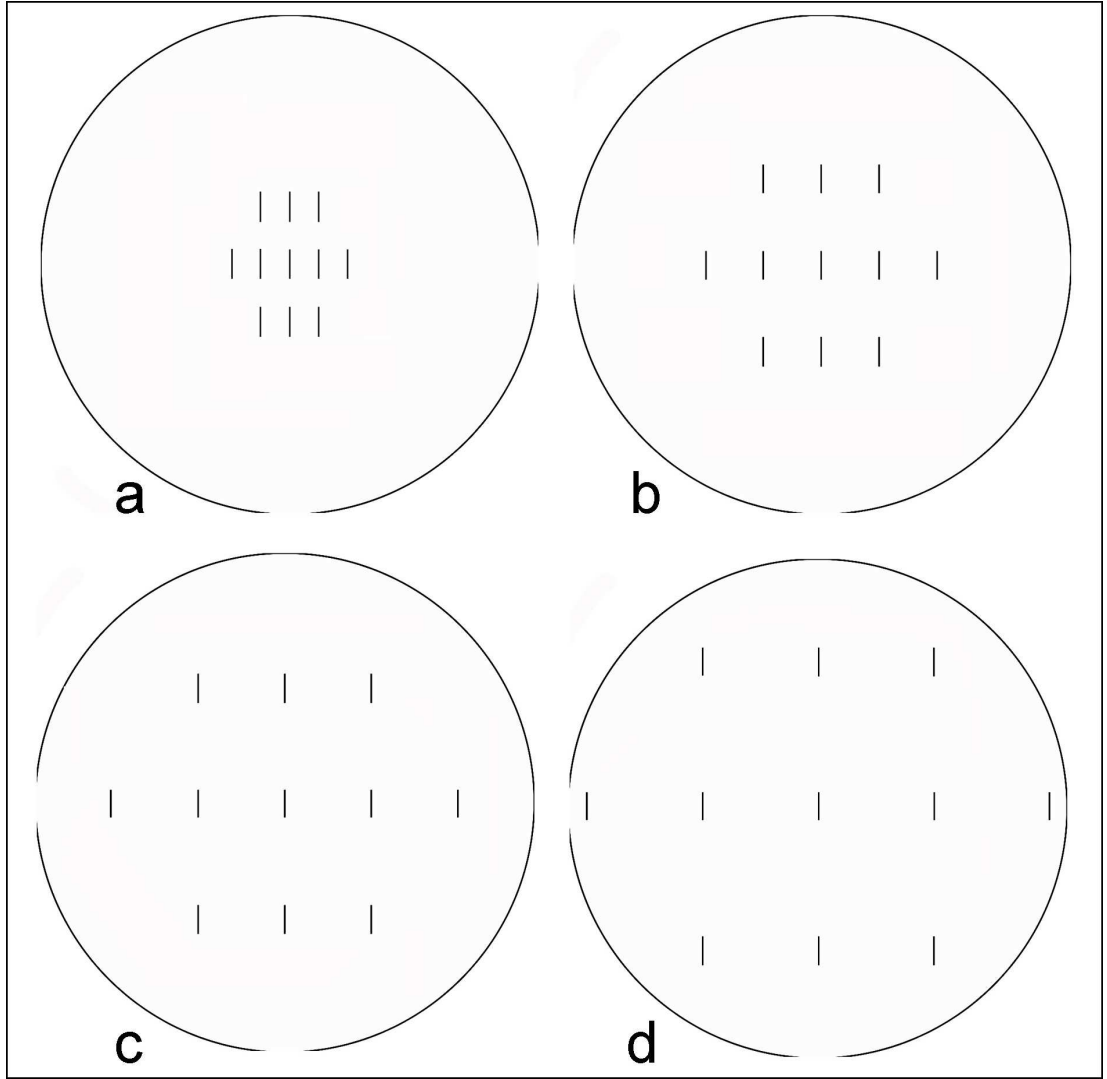


Şekil 3.1. *In vitro* gelişen keten fidesi (Yıldız 2000)

3.3.4. Hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmıştır. Sürgün rejenerasyon ortamına 1.00 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) ve 0.02 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) konulmuştur.

Kültür başlangıcından 6 hafta sonra petrilere hipokotil yaş ağırlığı (g), hipokotil kuru ağırlığı (g), sürgün rejenerasyonu (%), hipokotil eksplantı başına sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm) ve petride gelişen toplam sürgün sayısı (adet) belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Sürgün rejenerasyonu için kültüre alınan hipokotil eksplantlarının farklı aralık mesafelerde petriye yerleştirilmesi. **a.** 0.5 cm, **b.** 1.0 cm, **c.** 1.5 cm ve **d.** 2.0 cm

3.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her muamele içerisinde 11 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kaplarından oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce "arcsin" değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Ketenin *in vitro* kültüründe en uygun eksplantın hipokotil (Millam vd. 1992, Dong ve Mc Hughen 1993, Yıldız 2000, Yıldız ve Er 2002a, Yıldız ve Özgen 2004) ve en iyi bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonunun da 1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA (Dong ve McHughen 1993, Yıldız ve Er 2002a, Yıldız ve Özgen 2004) olduğu daha önce yapılan araştırmalarla vurgulanmıştır. Ketende kallus gelişimi ve adventif sürgün oluşumu BAP'nin 1 mg/l dozuna kadar artmakta, bunun üzerindeki BAP dozlarında keskin düşüşler göstermektedir (Xiang-can vd. 1989). Tüm bu nedenlerden dolayı, tez çalışmasında eksplant kaynağı olarak hipokotil ve sürgün regenerasyon ortamı olarak da 1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır.

Araştırmada Ariane ve Verne keten (*Linum usitatissimum* L.) çeşitlerinde petride farklı aralık mesafelerde (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm) kültüre alınan hipokotil eksplantlarında 4 hafta sonunda eksplant yaş ağırlığı, eksplant kuru ağırlığı, sürgün rejenerasyon yüzdesi, hipokotil başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı gibi parametreler incelenmiştir.

4.1. Ariane Keten Çeşidinde Farklı Aralık Mesafelerde Kültüre Alınan Hipokotil Eksplantlarına Ait Doku Kültürü Tepkileri

Farklı aralık mesafelerin hipokotil eksplantlarının yaş ağırlığı, kuru ağırlığı, hipokotil başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı üzerine etkisine ait Varyans Analizi sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ariane keten çeşidinde farklı aralık mesafelerin doku kültürü tepkisi üzerine etkisine ait Varyans Analizi

İncelenen Karakterler	Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Eksplant Yaş Ağırlığı	Aralık Mesafe	3	0.007	4.381*
	Hata	8	0.002	
	Toplam	11		
Eksplant Kuru Ağırlığı	Aralık Mesafe	3	0.000	25.192**
	Hata	8	0.000	
	Toplam	11		
Hipokotil Başına Sürgün Sayısı	Aralık Mesafe	3	2.185	11.287**
	Hata	8	0.194	
	Toplam	11		
Sürgün Uzunluğu	Aralık Mesafe	3	1.404	9.016**
	Hata	8	0.156	
	Toplam	11		
Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı	Aralık Mesafe	3	263.639	11.339**
	Hata	8	23.250	
	Toplam	11		

** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Ariane çeşidinde ait eksplant yaş ağırlığında, en yüksek değer 0.53 g ile 2.0 cm mesafede kültüre alınan eksplantlardan elde edildiği görülmektedir. Eksplantlar arası mesafe daraldıkça, yaş ağırlık değerlerinde düşüşler gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Farklı aralık mesafelerde kültüre alınan hipokotil eksplantlarının 4 hafta sonunda elde edilen kuru ağırlıkları dikkate alındığında, en yüksek değer yaş ağırlıkta olduğu gibi, 2.0 cm'lik mesafeden alındığı görülmektedir. Hipokotil eksplantlarına ait kuru ağırlık değerleri, azalan mesafelerle birlikte düşüş göstermiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı aralık mesafelerde kültüre alınan Ariane çeşidinin hipokotil eksplantlarına ait doku kültürü tepkileri

Kültüre Alınan Eksplant Arası Mesafe (cm)	Eksplant Yaş Ağırlığı (g)	Eksplant Kuru Ağırlığı (g)	Sürgün Rejenerasyonu (%)	Hipokotil Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı* (Adet)
0.5	0.42 b	0.033 c	100	2.97 b	3.16 b	32.7 b
1.0	0.44 b	0.035 c	100	4.03 a	4.14 a	44.3 a
1.5	0.47 ab	0.042 b	100	2.61 bc	2.92 b	28.7 bc
2.0	0.53 a	0.047 a	100	2.00 c	2.53 b	22.0 c

Her değer 3 adet rakamın ortalamasıdır.

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark 0.01 ve 0.05 düzeyinde önemlidir.

* Petride gelişen toplam sürgün sayısı = sürgün oluşturan eksplant sayısı x hipokotil başına sürgün sayısı

Kültüre alınan hipokotil eksplantlarında tüm aralık mesafelerde sürgün rejenerasyonu görülmüş ve %100 olarak gerçekleşmiştir. Bir başka ifade ile rejenerasyona konulan tüm hipokotiller sürgün oluşturmuştur. (Çizelge 4.2).

Hipokotil başına düşen sürgün sayısına bakıldığında, en yüksek değer 4.03 adet ile 1.0 cm'lik aralık mesafeden alındığı görülmektedir. Bu aralık mesafesinin altında (0.5 cm) ve üzerinde (1.5 ve 2.0 cm) alınan sonuçların düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Değişik mesafelerde kültüre alınan hipokotillerin verdiği sürgünlerin uzunluğu incelendiğinde, en yüksek değere 1.0 cm mesafesinde 4.14 cm ile ulaşılmış, daha düşük ve daha yüksek aralık mesafelerinde alınan sonuçların düşüş gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.2).

Dört hafta sonunda petrilere gelişen toplam sürgün sayılarına bakıldığında, kültüre alınan eksplantlardan en yüksek sayıda sürgün 44.3 adet ile 1.0 cm'lik aralık

mesafesinden elde edilmiştir. 1.0 cm'nin altındaki ve üstündeki aralık mesafelerinde alınan sonuçlarda düşüşler gözlenmiştir.

4.2. Verne Keten Çeşidinde Farklı Aralık Mesafelerde Kültüre Alınan Hipokotil Eksplantlarına Ait Doku Kültürü Tepkileri

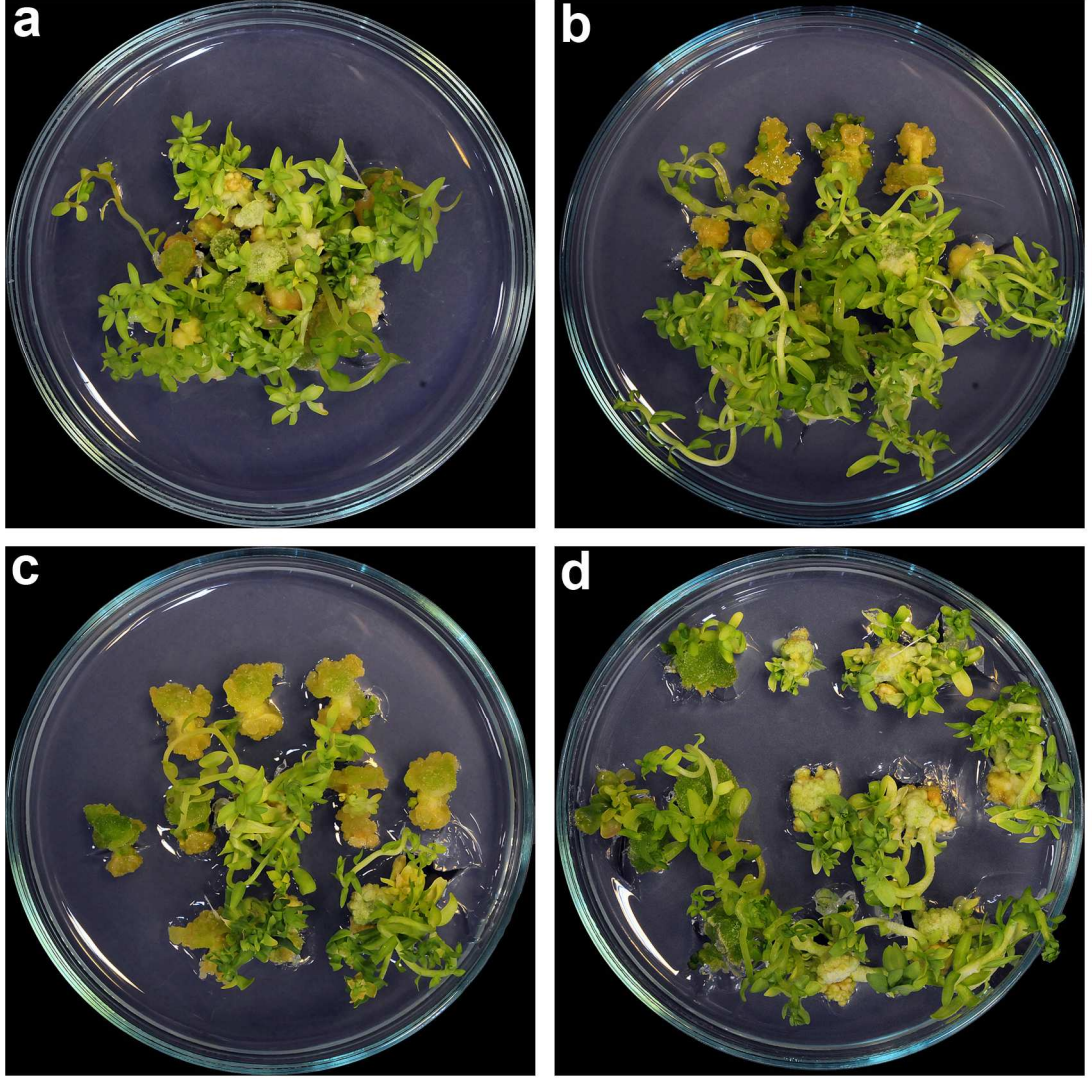
Farklı aralık mesafelerin hipokotil eksplantlarının yaş ağırlığı, kuru ağırlığı, hipokotil başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı üzerine etkisine ait Varyans Analizi sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Verne çeşitine ait hipokotiller farklı aralık mesafelerde kültüre alındığında, eksplant yaş ağırlığının aralık mesafe arttıkça yükseldiği görülmektedir. En yüksek eksplant yaş ağırlığı 0.56 g ile 2.0 cm'lik aralık mesafeden alınmıştır (Çizelge 4.4).

Kültüre alınan hipokotil eksplantlarının 4 hafta sonundaki kuru ağırlıkları incelendiğinde, aralık mesafe arttıkça kuru ağırlık değerlerinin de arttığı görülmektedir. Buna göre en yüksek değer 2.0 cm aralık mesafesinden 0.047 g ile alınmış, en düşük değer ise 0.031 g ile 0.5 cm'lik aralık mesafesinden elde edilmiştir. (Çizelge 4.4).

Verne çeşidine ait hipokotil eksplantlarında tüm aralık mesafelerde sürgün oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 4.1, Çizelge 4.4).

Kültür sonunda hipokotil başına düşen sürgün sayısına incelendiğinde, en yüksek değer 3.09 adet ile 1.0 cm'lik aralık mesafeden alındığı görülmektedir. Bu aralık mesafesinin altında (0.5 cm) ve üzerinde (1.5 ve 2.0 cm) alınan sonuçların düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.1. Verne çeşidinde farklı aralık mesafelerde (a. 0.5 cm, b. 1.0 cm, c. 1.5 cm ve d. 2.0 cm) kültüre alınan hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.3. Verne keten çeşidinde farklı aralık mesafelerin doku kültürü tepkisi üzerine etkisine ait Varyans Analizi

İncelenen Karakterler	Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Eksplant Yaş Ağırlığı	Aralık Mesafe	3	0.22	5.842*
	Hata	8	0.004	
	Toplam	11		
Eksplant Kuru Ağırlığı	Aralık Mesafe	3	0.000	5.892**
	Hata	8	0.000	
	Toplam	11		
Hipokotil Başına Sürgün Sayısı	Aralık Mesafe	3	1.246	8.966**
	Hata	8	0.139	
	Toplam	11		
Sürgün Uzunluğu	Aralık Mesafe	3	4.727	10.079**
	Hata	8	0.469	
	Toplam	11		
Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı	Aralık Mesafe	3	151.639	9.053**
	Hata	8	16.750	
	Toplam	11		

** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Hipokotil eksplantlarından gelişen sürgünlerin uzunluğu incelendiğinde, en uzun sürgünlerin 1.0 cm'lik aralık mesafesinden elde edildiği gözlenmiştir. En kısa sürgünler ise 2.0 cm aralık mesafesinde görülmüştür (Çizelge 4.4).

Petride gelişen toplam sürgün sayısına bakıldığında, en yüksek değer 34.0 adet ile 1.0 cm aralık mesafesinde kaydedilmiştir. 1.0 cm'nin altındaki ve üstündeki aralık mesafelerinde alınan sonuçlarda düşüşler gözlenmiştir. (Çizelge 4.4).

Tarla şartlarında stres ve rekabetin bitkiler üzerine etkisini inceleyen birçok araştırma bulunmaktadır. Bitkiler, toprak üzerinde yaprak ve gövdeleri ile ışık için, toprak altında da kökleri ile su ve besin maddeleri için birbirleriyle rekabet ederler (Wilson

1998, McPhee ve Aarssen 2001). Bitki sıklığı biyotik stres faktörü olarak kabul edilmekte ve doğal koşullarda bitkiler arasındaki rekabetin temel nedeni olarak gösterilmektedir (De Klerk 2007).

Çizelge 4.4. Farklı aralık mesafelerde kültüre alınan Verne çeşidinin hipokotil eksplantlarına ait doku kültürü tepkileri

Kültüre Alınan Eksplant Arası Mesafe (cm)	Eksplant Yaş Ağırlığı (g)	Eksplant Kuru Ağırlığı (g)	Sürgün Rejenerasyonu (%)	Hipokotil Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı* (Adet)
0.5	0.35 b	0.031 c	100	1.85 b	3.48 b	20.3 b
1.0	0.44 ab	0.037 bc	100	3.09 a	5.02 a	34.0 a
1.5	0.48 a	0.041 ab	100	1.88 b	2.54 b	20.7 b
2.0	0.56 a	0.047 a	100	1.70 b	2.23 b	18.7 b

Her değer 3 adet rakamın ortalamasıdır.

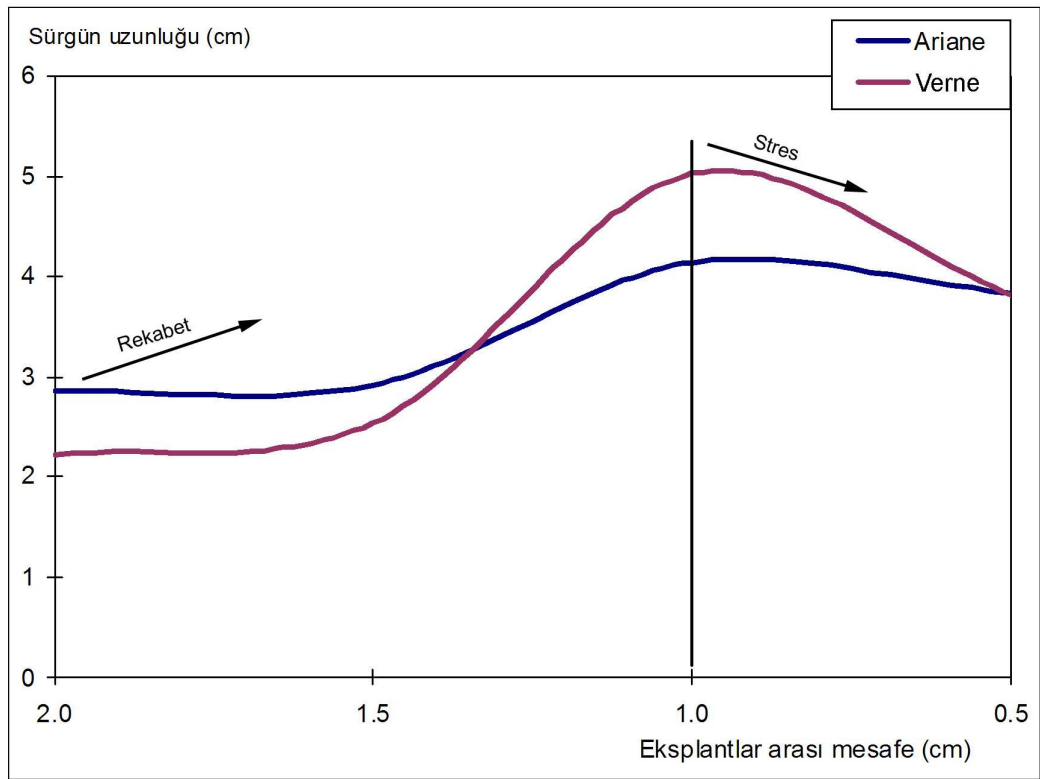
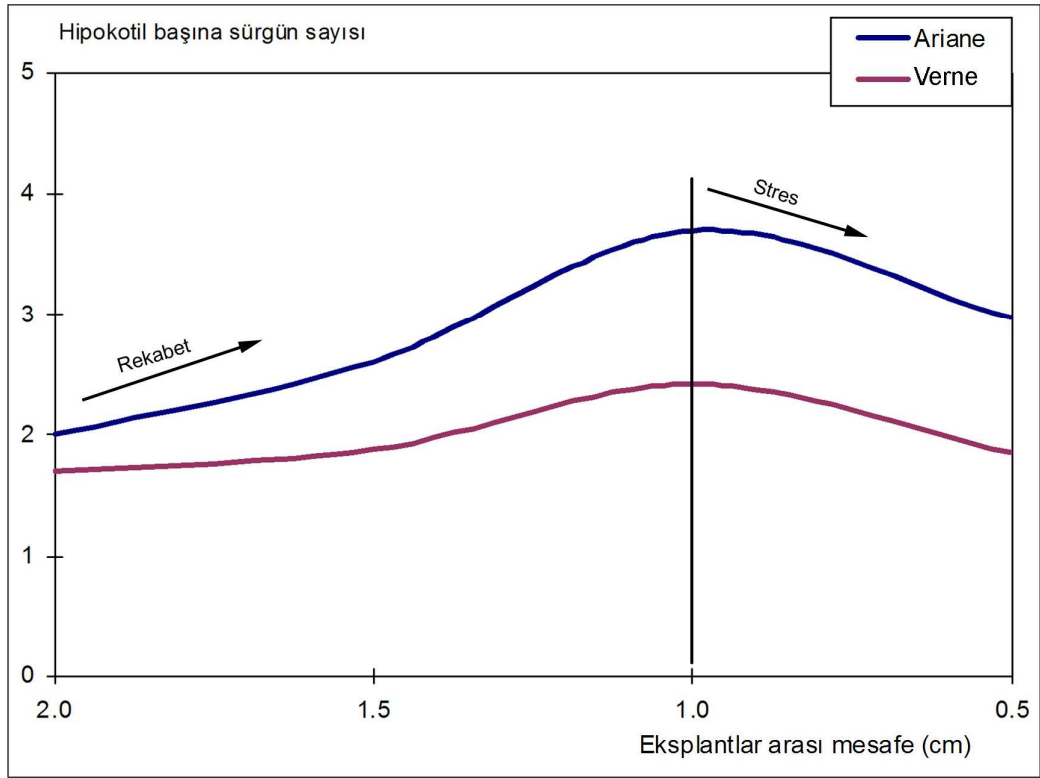
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasındaki fark 0.01 ve 0.05 düzeyinde önemlidir.

* Petride gelişen toplam sürgün sayısı = sürgün oluşturan eksplant sayısı x hipokotil başına sürgün sayısı

Araştırma sonuçları incelendiğinde, her iki çeşitte de benzer sonuçların alındığı görülmektedir. Eksplant yaş ağırlığı ve eksplant kuru ağırlığı bakımından en yüksek değerler 2.0 cm'lik aralık mesafesinden elde edilmiştir. Bu sonuçlar, yalnız gelişen bitkilerin, birlikte gelişen bitkilere göre daha fazla biyokütle ve verim verdiklerini bildiren Yıldız (2010), Gersani vd. (2001) ve Maina vd. (2002) ile benzerlik göstermektedir. Yaş ve kuru ağırlıktaki artışlar, su ve diğer komponentlerin besin ortamından yüksek miktarda absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır (Dale 1988). Sunderland (1960), kuru ağırlıktaki artışın hücre bölünmesi ve yeni materyal sentezi ile yakından ilişkili olduğunu bildirmektedir.

Yıldız (2000), Ariane ve Verne keten çeşitlerine ait hipokotil eksplantlarını kullanarak yaptığı araştırmasında, sırasıyla sürgün rejenerasyon yüzdesini %25.00 ve %22.50, hipokotil başına sürgün sayısını 2.10 ve 2.60, petride gelişen sürgün sayısını ise 5.25 ve 5.85 olarak belirlemiştir. Bu tez çalışmasında, Ariane ve Verne çeşitlerinde sırasıyla sürgün rejenerasyon oranı %100 ve %100, hipokotil başına sürgün sayısı 4.03 ve 3.09, petride gelişen toplam sürgün sayısı da 44.3 ve 34.0 olarak kaydedilmiştir. Görüldüğü gibi, kültüre alınan eksplantlar arasındaki mesafeden yararlanarak eksplantları sürgün rejenerasyonu için rekabete teşvik etmek, doku kültür tepkisini önemli derecede artırmış, incelenen tüm karakterlerde çok yüksek sonuçlar alınmıştır.

Hipokotil başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı incelendiğinde, en yüksek değerlerin 1.0 cm'lik aralık mesafesinden alındığı görülmektedir. Alınan bu sonuçlar Yıldız (2008) ile paralellik göstermektedir. Bu sonuçlara göre, 1.0 cm'lik aralık mesafesinden sonra en yüksek değerler 0.5 cm'den elde edilmiş olup, bu mesafede ortamda bulunan belli miktardaki su ve besin maddesine karşı eksplantlar arası rekabet şiddetlenmiş, hatta eksplantlar bu mesafede strese girmeye başlamışlardır. 1.5 ve 2.0 cm'lik aralık mesafelerinde ise eksplant başına düşen yaşam alanının genişmesi ve dolayısıyla eksplantların ihtiyaç duydukları su ve besin maddelerini kolayca bulabilmeleri sonucu rekabet ortadan kalkmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Ariane ve Verne çeşitlerinde hipokotil başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından rekabet-stress eğrisi

5. KAYNAKLAR

- Baytop, T. 1996. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, p.: 262-263.
- Bretagne, B., Chupeau, M.C., Chupeau, Y. and Fouilloux, G. 1994. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Rep.* 14: 120-124.
- Dale, J.E. 1988. The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39: 267-295.
- De Klerk, G.J. 2007. Stress in plants cultured *in vitro*. *Propagation of Ornamental Plants* 7(3): 129-137.
- Degenhardt, A., Habben S., Winterhalter P. 2002. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 943: 299-302.
- Dong, J.Z. and Mc Hughen, A. 1993. An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 88: 61-71.
- Gersani, M., Brown, J.S., O’Brien, E., Mania, G.M. and Abramsky, Z. 2001. Tragedy of the commons as a result of root competition. *J. Ecol.* 89: 660-669.
- Güner, A., Özatay, N. and Başer, K.H.C. 2000. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Vol.11. Edinburg: University Pres, p:73.

- Jordan, M.C. and Mc Hughen, A. 1988. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Rep.* 7: 285-287.
- Maina, G.G., Brown, J.S. and Gersani, M. 2002. Intra-plant versus inter-plant root competition in beans: avoidance, resource matching or tragedy of the commons. *Plant Ecol.* 160: 235-247.
- McPhee, C.S. and Aarssen, L.W. 2001. The separation of above- and below-ground competition in plants. A review and critique of methodology. *Plant Ecol.* 152: 119-136.
- Millam, S., Davidson, D. And Powell, W. 1992. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 163-166.
- Mlynarova, L., Bauer, M., Nap, J.P. and Petrova, A. 1994. High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax. *Plant Cell Rep.* 13: 282–285.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nichterlein, K., Umbach, H. and Friedt, W. 1989. Investigation on androgenesis in breeding of linseed (*Linum usitatissimum* L.). XII. Eucarpia Congress, 13-25.
- Nichterlein, K. and Friedt, W. 1993. Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Rep.* 12: 426-430.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi*, 1: 69-95.

- Raffaelli B., Hoikkala A., Leppala E., Wahala K. 2002. Review Enterolignans. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 777(1): 29-43.
- Petersen, M. and Alfermann, A.W. 2001. The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 135-142.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Sunderland, N. 1960. Cell division and expansion in the growth of the leaf. J. Exp. Bot. 11: 68-80.
- Sun, H. and Fu, W. 1981. Investigation of pollen plants in flax (*Linum usitatissimum* L.) and preliminary observation on performance of their progenies. Acta Genet. Sinica 8: 369-374.
- Vasil, I.K. 1998. Biotechnology and food security for 21st century: A real-world perspective, Nature Biotechnology 16: 399-400.
- Wallis, T.E. 1967. Textbook of Pharmacognosy. Londra: J. & A. Churchill Ltd., p.: 216.
- Wilson, J.B. 1998. Shoot competition and root competition. J. Appl. Ecol. 25: 279-296.
- Xiang-can, Z., Jones, D.A. and Kerr, A. 1989. Regeneration of shoots on root explants of flax. Annals of Botany 63: 297-299.
- Yıldız, M. 2000. Keten (*Linum usitatissimum* L.) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı.

Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.

Yıldız, M. and Er, C. 2002a. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften* 89: 259-261.

Yıldız, M. and Er, C. 2002b. Increasing the injured area on hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) leads to high frequency callus-based shoot regeneration. *Turkish J. Biology* 26: 95-98.

Yıldız, M., Özcan, S. and Er, C. 2002. The effect of different explant sources on adventitious shoot regeneration in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Turkish J. Biology* 26: 37-40.

Yıldız, M., Ulukan, H. ve Özbay, A. 2003. Ketende (*Linum usitatissimum* L.) farklı ortam, katılaştırıcı ve eksplant yaşının hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi. XIII. Biyoteknoloji Kongresi. 137-144, Çanakkale.

Yıldız, M. and Özgen, M. 2004. The effect of a submersion pretreatment on *in vitro* explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 111-115.

Yıldız, M., Koyuncu, N. ve Özgen, M. 2005. Adventitious shoot regeneration from hypocoty explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi. 369-373, Antalya.

Yıldız, M. and Özgen, M. 2006. A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment 4: 171-174 (2006).

Yıldız, M. 2010. Evaluation of the effect of *in vitro* stress and competition on tissue culture response of flax (*Linum usitatissimum* L.). Biologia Plantarum (Baskıda).

ÖZGEÇMİŞ

Çağlayan SAĞLIK, 1 Mayıs 1980 tarihinde Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Niğde’de tamamladıktan sonra 1999 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi kazanarak üniversite öğrenimine başladı. 2003 yılında bu fakülteyi bitirip Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü’sünde tezli yüksek lisansa başladı. 2004 yılından itibaren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı’nda geçici kadro edindi ancak 2006 yılında çeşitli sebeplerden dolayı tezini bitiremeden Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden ayrıldı ve 2006’nın aralık ayında Uyanış Eczanesi’ni açarak ticaret hayatına başladı.