

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**GAMA RADYASYONUNUN KOLZADA (*Brassica napus* L.) *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Behrouz ALİZADEH**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2017**

**Her hakkı saklıdır**



## TEZ ONAYI

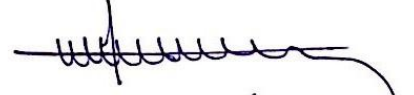
Behrouz ALİZADEH tarafından hazırlanan “Gama Radyasyonunun Kolzada (*Brassica napus* L.) *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması 10/02/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Mustafa YILDIZ  
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



### Jüri Üyeleri:

**Başkan:** Prof. Dr. Özer KOLSARICI  
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



**Üye:** Prof. Dr. Mustafa YILDIZ  
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



**Üye:** Prof. Dr. Serkan URANBEY  
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



**Üye:** Doç. Dr. Emine Selcen DARÇIN  
T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı,  
Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü



**Üye:** Doç. Dr. Alpaslan KUŞVURAN  
Çankırı Karatekin Üniversitesi Kızılırmak Meslek Yüksekokulu



**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN**  
Enstitü Müdürü



## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

10/02/2017

Behrouz ALİZADEH

# ÖZET

Doktora Tezi

## GAMA RADYASYONUNUN KOLZADA (*Brassica napus* L.) *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Behrouz ALİZADEH

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu çalışmada gama radyasyonunun, kolza bitkilerinde adventif sürgün rejenerasyonu *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkileri araştırmaya çalışılmıştır. Bu nedenle, hücre ve dokularda biyolojik ve fiziksel değişiklik yaratarak, *A. tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı ile gen geçişlerinin frekansının artırılması amaçlanmıştır. Bunun için, Kobalt 60-(Co-60/Co<sup>60</sup>) kaynaklı  $\gamma$  gama ışınının *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi belirlenmesi olmuştur. Ayrıca, bu çalışmada seleksiyon ile raportör özelliğini taşıyan markör genlerden aracılığıyla eksplantların gen aktarımı aşamasından sonra göstereceği gelişmeler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma da gama ( $\gamma$ ) radyasyonun düşük dozlarının hormesis etkisinin doku kültürü aşaması ve daha sonra gen aktarımı frekansına etkisi incelenmiştir. ( $\gamma$ ) radyasyonun doku kültürü ve bitki rejenerasyonu açısından kolza bitkisinde hipokotil eksplantına çok olumlu etkisi görülmemişken tohumlara uygulamaları gen aktarımında olumlu yönde etkisi gözlenmiştir. Gama ışın dozlarının *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi ise bu tezin araştırma sonuçlarına göre kolzanın Nelson çeşidi için gen transferi öncesi uygulanmış olan  $\gamma$  radyasyonunun 20 Gy'lik dozu transgenik bitki frekansını, gama kullanılmayan kontrol uygulamasına göre olumlu yönde etkilediği görülmüştür.

Şubat 2017, 74 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Kolza, gama radyasyonu, *Agrobacterium tumefaciens*, gen aktarımına, doku kültürü

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### THE EFFECT OF GAMMA RADIATION ON *Agrobacterium tumefaciens*- MEDIATED GENE TRANSFER IN RAPESEED (*Brassica napus* L.)

Behrouz ALIZADEH

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Field Crops, Faculty of Agriculture

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

This thesis studied effects of gamma radiation on rapeseed for adventitious shoot regeneration and effects on *A. tumefaciens*-mediated gene transfer. The aim of this study was to evaluate physical and biological changes in cells and tissues after *A. tumefaciens*-mediated genetic transformation that was carried out on the irradiated tissues using Cobalt 60 (Co-60) for the purpose. The study identified the effects on gene transfer by means of *A. tumefaciens* after irradiation by gamma rays. Additionally, this feature worked with the reporter gene with the selected marker genes during development stages, the benefits of which showed up after the gene transfer of the explants. Tissue culture techniques for gene transfer studies were also realized. However, the *Agrobacterium*-mediated gene transfer is associated with the biotic stresses caused pathogen attack on explants. In this study, investigated effects of low doses of the gamma ( $\gamma$ ) rays on tissue culture followed by investigating the effects on gene transfer frequency. The results further showed that rapeseed had positive effects of a dose of 20 Gy in transformation of cv. Nelson and Gladiator using cobalt 60 (Co60) as a source of gamma ( $\gamma$ ) radiation. Although it was not suitable for plant regeneration, it was suitable for seed gene transfer.

**February 2017, 74 pages**

**Key Words:** Rapeseed, gama radiation, *Agrobacterium tumefaciens*, the gene transfer, tissue culture

## TEŞEKKÜR

Bitki biyoteknoloji eğitimimin önemli kademeleri olan doktora programının sonuna gelmiş bulunuyorum. Bu alanda insanlık adına bilimde ufak bir faydamın olması umuduyla daha çok çalışıp, öğrenmem gerektiğinin farkında olarak,

Bu tez çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı)'a iyi niyetli ve hoşgörüle destekleri ve yardımlarından dolayı tez jürilerim Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Serkan URANBEY (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı)'e, kolza çalışmalarına ışık tutan ve bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof.Dr. Özer KOLSARICI (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) ve Doç. Dr. E. Selcen DARÇIN (T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı) ve ayrıca değerli hocam Doç. Dr Alpaslan KUŞVURAN (Çankırı Karatekin Üniversitesi)'na, ışınlama işlemi için Türkiye Atom Enerjisi Kurumuna ve bilhassa ilgisi ve desteğinden dolayı Sayın Dr. Çiğdem YILDIZ'a Ankara üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümündeki hocalarım ve Biyoteknoloji Enstitüsünden ders aldığım çok değerli hocalarımdan Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Prof. Dr. Ali ERGÜL'e, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü öğrenci işleri başta Sayın Mevlüt ERTEKİN ve Ayşegül ULUSOY hanım efendiye, labratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Murat AYCAN, Ehsan ARABAGHI, Deniz KÖM, Sabir DELPASAND, Mehdi TAHER ve Mustafa KAYAN'a ve Tarbiyotek laborantı Burak ÖNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yıllardır maddi ve manevi olarak yanımda olan ailem, babam Hokmalı ALIZADEH ve annem Kızbest VALIZADE'ye ve hayat yoldaşım ve sevgili eşim Maryam GHOLIZADEH'ye her zaman yanımda oldukları ve gösterdikleri sabır ve anlayış için çok teşekkür ediyorum.

Behrouz ALİZADEH  
Ankara, Şubat 2017



## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER DİZİSİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1 Doku Kültürü Çalışmaları .....	8
2.1.1 Kolzada yapılan doku kültürü çalışmaları .....	8
2.2 Gen Aktarımı Çalışmaları.....	11
2.3 Gama Işını Bitkilerinde Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	20
2.3.1 Gama ışınları .....	20
2.3.2 Radyasyon dozu .....	20
2.3.3 Radyasyonun hücreye etkisi.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1 Bitki Materyali .....	33
3.2 Ekipmanların Sterilizasyonu .....	33
3.2.1 Büyüme ortamları ve kültür koşulları .....	34
3.2.2 Tohumların yüzey sterilizasyonu.....	34
3.3 Eksplant İzolasyonu ve Rejenerasyonları.....	35
3.3.1 <i>In vitro</i> koşullarda elde edilen bitkilerin dış ortamına/koşullarına alıştırılması .....	35
3.4 Gen Aktarım Çalışmaları.....	36
3.4.1 Bakteri materyali .....	36
3.4.2 Antibiyotikler .....	36
3.4.3 Bakteri kültürünün saflaştırılması, büyütülmesi ve muhafazası.....	37
3.5 Işınlama Materyali $\gamma$ Radyasyonunun Uygulanması.....	37
3.6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Gen Aktarımı.....	38
3.6.1 Hipokotil eksplantlarına gen aktarımı.....	38
3.6.2 Kolza tohumlarına gen aktarımı .....	38

3.7 Histokimyasal GUS Analizi .....	39
3.8 DNA İzolasyonu .....	39
3.8.2 TE Tampon Hazırlanması .....	40
3.8.3 PCR Döngüleri.....	42
3.9 İstatistiki Analizler .....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	44
4.1 Doku Kültürü Çalışmaları.....	44
4.2 Gen Aktarım Çalışmaları .....	45
4.2.1 Kolzada en etkili kanamisin dozunun belirlenmesi .....	45
4.2.2 Kolzada farklı inokülasyon ortamlarının etkisi.....	48
4.2.3 Kolza bitkisinde gama radyasyonunun hipokotil eksplantına gen aktarımı üzerine etkisi .....	49
4.2.4 Kolzada tohuma uygulanan gama radyasyonun tohumlara gen aktarımı üzerine etkisi .....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	55
5.1 Kolzada <i>In Vitro</i> Doku Kültürü ve Transformasyon .....	55
5.2 <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Gen Aktarımı .....	58
5.2.1 <i>Agrobacterium</i> konsantrasyonu ve inokülasyon süresi.....	59
5.2.2 Kolzada en etkili kanamisin dozunun belirlenmesi .....	59
5.2.3 Acetosyringone'un etkisi.....	60
5.2.4 Kolzada farklı inokülasyon ortam etkisi .....	60
5.2.5 Ko-kültivasyondan sonra aşırı bakteriyi öldürmek için antibiyotikler .....	61
5.2.6 Kolzada gama radyasyonu uygulaması ve bitkide gen aktarımına etkisi .....	61
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ .....	73

## SİMGELER DİZİSİ

°C	Santigrat
µM	Mikromolar
µmhos/cm	Mikromhos/Cm
A	Adenin
C	Sitozin
EtOH	Etil Alkol
G	Guanin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikada Devir
T	Timin
α	Alfa ışını
β	Beta ışını
γ	Gama ışını
Co <sup>60</sup>	Kobalt 60
krad	Kilo rad
M <sub>1</sub>	Birini nesil

### Kısaltmalar

ABA	Absisik Asit
ACC	1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid
BA	Benziladenin
DNase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksiribonükleotit
MS	Murashige ve Skoog
PCR	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
BAP	6-benzylam6-benzylaminopurine
EDTA	Ethylendiaminetetra acetic acid
GUS	P-glucuronidase
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
K.O.	Kareler Ortalaması
Km	Kanamycin
MSO	Hormonsuz MS, MS sıfır veya MS0
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NPT-B	Neomycin-phosphotransferase-II
Npt-II	Neomycin-phosphotransferase-II geni

One	Oncogenes
PPO	Polyphenoloxidase
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
X-GLUC	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-P-D-gIucuronide



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>Brassica</i> L. cinsine ait farklı türler arasındaki genetik ilişkileri (Kimber ve Mcgregor 1995) .....	3
Şekil 1.2 NASA'nın çektiği gama ışını fotoğrafı .....	7
Şekil 4.1 Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından sürgün gelişimi .....	45
Şekil 4.2 Farklı kanamisin dozunun kolzada çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkisi .	46
Şekil 4.3. a. A. Kolzada rejenere olmuş 'Nelson', b. B. 'Gladiator' çeşitleri.....	47
Şekil 4.4. a. Işınlanmış olan kolzanın Gladitor çeşidinde transgenik aday bitkiler 0 Gy, b. 20 Gy .....	50
Şekil 4.5 Kolzanın Gladitor çeşidinden transgenik aday bitkilerin PCR sonucu.....	50
Şekil 4.6 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 0 Gy (kontrol) gama radyasyonunun <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi .....	52
Şekil 4.7 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 0 Gy (kontrol) gama radyasyonunun <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı sonucu gelişen transgenik aday bitkilerde <i>Npt-II</i> geni varlığının belirlenmesi.....	52
Şekil 4.8 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 20 Gy gama radyasyonunun <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi .....	53
Şekil 4.9 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 20 Gy gama radyasyonunun <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı sonucu .....	53
Şekil 4.10 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 40 Gy gama radyasyonunun <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi .....	54
Şekil 4.11 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 40 Gy gama radyasyonunun <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı sonucu .....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonlar .....	37
Çizelge 3.2 CTAB tampon hazırlanması için gerekli kimyasal ve miktarları .....	40
Çizelge 3.3 PCR işleminde kullanılacak primer dizileri .....	41
Çizelge 4.1 Kolzanın 8 çeşidine ait hipokotil eksplantlarının doku kültürü tepkisi .....	45
Çizelge 4.2 ‘Gladiator’ ve ‘Nelson’ çeşitlerinde gen aktarımı sonuçları .....	48
Çizelge 4.3 Farklı inokulasyon ortamlarının gen aktarımı üzerine etkisi .....	49
Çizelge 4.4 Farklı gama ( $\gamma$ ) radyasyonuna maruz bırakılan ‘Gladiator’ çeşidinin hipokotil eksplantına gen aktarımı .....	50
Çizelge 4.5 Farklı gama ( $\gamma$ ) radyasyon dozlarının kolzada ‘Gladiator’ çeşidinin tohumlarına yapılan gen aktarımı üzerine etkisi .....	51

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusu çok hızlı bir şekilde artmaktadır. Hızlı artış gösteren bu nüfusun beslenme, giyinme ve barınma gibi ihtiyaçlarının giderilmesi için elimizdeki kaynakların korunması ve doğru bir şekilde kullanılması gerekmektedir. İnsan beslenmesinde yağlar, karbonhidratlar ve proteinler, gerekli ve vazgeçilmez hayati değere sahip en önemli besinsel maddeler olarak sayılmaktadır. Enerji kaynağı olarak bilinen yağların bir bölümü hayvansal, bir bölümü ise bitkisel yağlardan sağlanmaktadır. Bitkisel yağlar ise yabani ve kültür formunda olan yağlı tohumlu bitkilerden elde edilmektedir. Dünyada bitkisel yağ üretimi başta palm yağı olmak üzere soya, kolza ve ayçiçeğinden karşılanmaktadır. Türkiye’de ise yağlı tohum ve bitkisel yağ üretiminin büyük bir kısmı ayçiçeğinden elde edilmektedir. Bunun dışında, pamuk tohumu (çiğit), soya, kolza, aspir, mısır ve zeytin bitkisel yağ elde edilen önemli bitkiler arasındadır.

Türkiye, bitkisel yağ ihtiyacının yaklaşık %70’ini yağlı tohum ve ham yağ ithalatı ile karşılamaktadır (Önder, 2013) Türkiye’de kişi başına yıllık bitkisel yağ tüketimi düşük olmasına rağmen, bitkisel yemeklik yağ açığı ortaya çıkmaktadır. (Gürbüz vd. 2003). Bu açık ham yağ ve yağlı tohum ithalatı ile giderilmektedir.

Ancak bitkisel yağ açığının giderilmesinde mevcut yağ bitkilerinin ekim alanlarını veya verimlerini artırılmasının yanısıra, mevcut yağ bitkilerinin yetiştirilemediği ekolojik şartlarda yetiştirilebilen alternatif yağ bitkileri üzerinde durulması gerekmektedir.

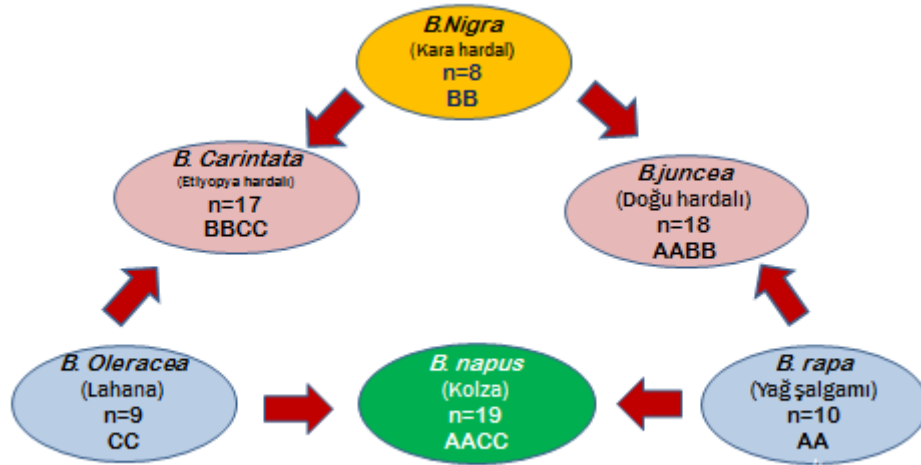
Türkiye’de yağlı tohum üretimi yıllık 2.3 ile 2.7 milyon ton arasında değişmektedir. Yağlı tohum bitkilerindeki prim desteğine rağmen yıllar itibariyle üretimde ciddi artış olmaması dikkat çekicidir. Ham madde ihtiyacının % 75’i ithalatla karşılanmaktadır. %25’i yerli üretimden sağlanmaktadır (Büyükhelvacıgil 2016). Bitkisel yağ sektöründe hammadde yetersizliği nedeniyle dışa bağımlılık artarak devam etmektedir. Tarım ürünleri ithalatı 2015 yılında 11 milyar dolar olurken; yağlı tohum ve türevleri 3.5 milyar dolarlık ithalatla ilk sırada yer almıştır. 2014’te ithalat 4.2 milyar dolaryken, sadece gıda amaçlı yağlı tohum ve ham yağ ithalatı için ödenen döviz 2.1 milyar dolar

olmuştur. Miktar olarak bakıldığında ise 2014 yılında 6 milyon 240 bin ton, 2015'te ise 5 milyon 951 bin ton, 2016 yılında ilk 7 aylık döneminde de 3 milyon 654 bin ton yağlı tohum ve türevleri ithal edilmiştir (Anonim 2016a). Bu yağ açığını kapatmak için ayçiçeği ile pamuk üretiminin yanı sıra alternatif olarak yağ bitkilerinin de üretime girmesinin sağlanması faydalı olacaktır. Bu nedenle alternatif yağ bitkileri içerisinde kolza ve keten de yer almaktadır. Protein ve karbonhidratça zengin olan buğday ve yağ üretimin en önemli kaynaklardan biri olan keten ve kolza bitkileri, dünya ve Türkiye'de bitkisel gıda ürünleri arasında özel bir öneme sahiptirler.

Yağlı tohumlu bitki türleri dünyada çok sayıda var olmasına rağmen, günümüzde yaygın şekilde kullanılan yağlı bitkiler olarak çığit, kolza (kanola), ayçiçeği, soya, susam, yerfıstığı, aspir, haşhaş, jojoba, keten, zeytin, hintyağı, hindistan cevizi ile palmdır. Türkiye'de genel olarak hindistan cevizi ile palm hariç, yağlı tohumlu sayılan bitkilerin hepsinin (ayçiçeği, kolza (kanola), çığit, soya, aspir, haşhaş, susam, yerfıstığı, kenevir ile keten) başarıyla kültürü yapılabilmektedir. Türkiye'de yağ bitkisi üretim miktarlarını 2014 yılı TÜİK verilerine göre %44.17 ayçiçeği, %41.52 çığit, %4.48 Soya, %3.69 Yerfıstığı, %3.28 Kolza %2.86 ise diğer yağ bitkileri oluşturmaktadır (Anonim 2016b).

Günümüzde öne çıkan yağlı tohumlu bitkilerin başında kolza (*Brassica napus L.*) gelmektedir. Kolza, *Brassica* ailesinde ekonomik ve tarımsal olarak en önemli cinstir ve tarla bitkilerinin arasında diğer cinslerden daha fazla kullanılmaktadır. *Brassica* ailesine ait 30'u aşkın yabancı tür bulunmaktadır. *Brassica* çeşitleri ve melezleri arasında *Brassica campestris*, *B. juncea*, *B. carinata* ve *B. napus* bulunur. Bunlar biyodizel üreten türlerdir (Şekil 1.1).





Şekil 1.1 *Brassica* L. cinsine ait farklı türler arasındaki genetik ilişkileri (Kimber ve Mcgregor 1995)

Kolza, soğuğa dayanıklılığı ve özellikle de diğer yağ bitkilerine göre daha yüksek verime sahip olması nedeniyle ülkemiz yağ açığını kapatma potansiyeline sahip yağ bitkilerinden biridir.

Kolza bitkisinin ekim alanları ve verimi ise dünyada 35 milyon 785 bin 227 ha alanda, 70 milyon 954 bin 404 ton kolza üretilmiştir. Kolza üretiminde, 15 milyon 555 bin tonla en büyük pay Kanada'ya aittir. Bu ülkeyi; Çin (11.600.015 ton), Hindistan (7.877.000 ton), Almanya (6.247.400 ton), Fransa (5.522.980 ton) ve Avustralya (3.832.000 ton) izlemektedir (Anonim 2016c).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine dayanarak, 2015 yılı için, 350 bin 817 dekar zirai alanda, 120 bin ton kolza üretilmiştir. Üretim açısından Tekirdağ, 220.520 da ekiliş alanı ve 73 bin 891 tonluk üretimle iller bazında ilk sırada yer alırken, İstanbul 47.525 da ekiliş ve 18.189 ton üretim ile ikinci, Kırklareli 22.848 da ekiliş ve 8.303 ton üretim ile üçüncü sırada yer almaktadırlar (Anonim 2016b).

Kolza tanesinin içinde bulunan protein oranı %16-24 ve yağ oranı %38-50'dir. Ayrıca zengin oleik ile linoleik asit oranının yanı sıra yağının yüksek kaynama noktası (238 °C)

sebebiyle önemli bir yağ bitkisi sayılmaktadır (Gizlenci vd. 2015). Bu bitkiden elde edilen yağ da, oleik asit (omega-9), linolenik asit (omega-3) ile linoleik asit (omega-6) içermesi ve yalnızca %7 civarında doymuş yağ olması (bu oran zeytinyağında %15, ayçiçeği yağındaysa %12) sebebiyle, sağlık için de faydalı olduğu tartışılmazdır. Yaklaşık %32 orta düzeyi olarak çoklu doymamış yağ ve yüksek düzeydeki tekli doymamış yağ (yaklaşık %61) içeriği ile bitkisel sıvı yağların içinde en iyi yağ asidi profiline sahiptir (Özfidan 2009).

Kolza yağı bu özelliklerinden dolayı toplam kolesterol ve LDL kolesterol oranlarını düşürmekte, diğer yağ asitlerini dengeleyici özellikler göstermekte ve insan sağlığı üzerine olumlu etkiler yapmaktadır (Hamam ve Shahidi 2006). Ayrıca, kolza bitkisi ülkelerin artan enerji ve yakıt ihtiyaçlarını karşılayabilmek için günümüzde farklı arayışlara girerek biyodizel üretiminde de kullanılmaktadır. (Nielsen 1997, Al-Barrak 2006).

Bu yönüyle kolza bitkisi, ilgi çekici ve araştırmaya değer olarak algılanmaktadır. Ayrıca, Türkiye’de ekiliş alanları giderek artış gösteren, Trakya bölgesinde tarım alanlarının büyük kısmını kaplamaya başlayan kolza Türkiye için, bitkisel yağ açığının kapatılmasında en iyi alternatifi oluşturmuş ve ekonomiye önemli ölçüde katkı sağlamaya başlamıştır. Kolza, kışlık olarak yetiştirilmesi nedeniyle ayçiçeğinden sonra verim ve gelir açısından daha yüksek paya sahip önemli bir yağ bitkisidir.

Fakat çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı dirençli bitkilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bilindiği gibi, türler arası çalışmalarda, istenilen özelliklerin bir genotipe toplanmasında klâsik bitki ıslahı yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Oldukça zaman alıcı ve masraflı olan klasik ıslah yöntemleriyle genetik çeşitlilik ya da varyasyon yaratılması çok yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle üretim veya potansiyel verimi arttıracak yöntemlerin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Söz konusu olan yöntemlerin içerisinde biyoteknolojik yöntemler arasında mutasyon ve gen aktarım çalışmaları en önemli konular arasında yer almaktadırlar.

Bitkilerde kolza dahil olmak üzere biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanıklılığa sahip, yüksek verimli yeni kültür bitkileri geliştirmek hedefiyle son yıllarda *A. tumefaciens* aracılığıyla yaygın biçimde gen aktarım çalışmaları yapılmaktadır. Fakat *A. tumefaciens* ile bitkilere gen aktarımının önemli ayrıcalıkları bulunurken, konukçu sınırlaması gibi bazı sınırlamalara da rastlanılmaktadır. *Solanaceae* ailesine ait türlere (tütün, patates ve patlıcan) çok rahatlıkla gen aktarımı yapılırken; buğdaygiller, baklagiller ve ağaç türleri gibi bitkilere gen aktarımı oldukça zordur. Ayrıca bu bitkilere *A. tumefaciens* ile gen aktarımı oldukça düşük frekanslarda gerçekleşirken, transgenik hücrelerinden rejenerasyonu da son derece düşüktür. Dolayısıyla tahıllar ve yağlı bitkilerde transgenik bitkilerin elde edilmesi için yoğun emek ve zamanın harcanması büyük önem arz etmektedir. Bu bitkilerde gen aktarımı frekansını artırmak için farklı uygulamalar ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi çok önemlidir.

Tarımsal önemlerinden ötürü, *Brassica*'lar birçok bilimsel çalışmanın ilgi odağı olmuştur. *Brassica* biyoteknolojisinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Moleküler yetiştirme ve transformasyon teknolojisi iki temel strateji olarak arzu edilen özelliklerin getirilmesi içindir. *Brassica* türleri için agronomik önem taşıyan birkaç gen tespit edilmiştir. Bitki rejenerasyonu ve transformasyon metotları ve ilgilenilen gen herhangi bir mahsülde gen aktarımının esas şartlarıdır. Rejenerasyon çeşitli eksplantlar kullanılarak organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla optimize edilmektedir. *B. juncea*, *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra* ve *B. carinata* gibi *Brassica*'nın hemen hemen tüm ekonomik açıdan önemli türlerinde transformasyon sistemleri geliştirilmektedir. Transformasyon, herbisit direnci, böcek direnci, tuz toleransı, yağ kalitesi iyileştirmesi, farmakolojik ve endüstriyel ürünlerin üretimi, erkek steril hatların geliştirilmesi ve restorasyon sistemi gibi pek çok özelliği için *Brassica* türleri için önem arz etmektedir. Farklı transformasyon yöntemleri arasında, *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon *Brassica* için en yaygın şekilde kullanılmaktadır. Birkaç cins ve bazı türler için genellikle oldukça verimli ve pratik yöntemdir. Bununla birlikte, hala genotip bağımlılığının üstesinden gelmek için etkin gen aktarım yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu yönde farklı uygulamalarla beraber, bazı araştışıcılar tarafından gen aktarımın frekansını yüksek oranda artıran, fiziksel mutagenler arasında gama ışınlarının kullanılması değerlendirilmektedir. Gama ışınları radyasyonun doğal kaynağı güneşten gelen formu olmaktadır. Radyasyonlar, gama dahil olmak üzere hücre duvarını oluşturan pektinlerin büyük oranda bozulmasına ve dokulardaki yumuşama ve hücreler arasındaki bağın kırılmasına sebep olmakta böylece bitki hücrelerine zarar vermektedir. Bitki doku hücrelerinde hücre duvarında bulunan pektik asitlerle kalsiyum ile etkileşerek kalsiyum pektat oluşturup, hücre duvarı yapısının korunmasında önemli rol taşımaktadır. Böylece kalsiyum iyonları, hücrelerin arasındaki bağı koruyarak hücre duvarı yapısındaki olası değişikliklerin engellenmesinde etkilidir (Kovacs ve Keresztes 2002).

Gama ışınlarla beraber mikrodalgalar, radyo dalgaları ve X ışınları gibi göremediğimiz 2 tip radyasyon tipinden gama ışınları çarptığı atom ya da molekülde iyonlaşma ya da uyarılmaya neden olmaktadırlar. İyonlaştırıcı radyasyonların canlı sistemlere etki edebilmesi için bunların mutlaka absorbe edilmesi gerekir. Bu absorbe edilen enerji dokularda yayılarak molekül ve iyonların yapısındaki bağları etkiler ve bu bağları koparıp, yeni bağların oluşmasına neden olmaktadır. Gama ışınları canlı dokularda DNA' bağlarını etkileyerek moleküldeki kopmanın sebebi olur ve kırılmalarla birlikte mutasyonlar meydana getirmektedir.

Ancak gama radyasyon ışınına maruz kalan doku hücrelerin, pektin bozulmasından dolayı hücre duvarları, DNA gibi büyük hücresel makro moleküller ve membranlar iyonize radyasyondan biyokimyasal ve fiziksel olarak önemli ölçüde etkilenmektedir. (Nagata vd. 1999). Bunun sonucunda *A. tumefaciens* ile daha yüksek aktarım frekansı izlenmektedir.

Öte yandan gama ışınları, bitkilerin doku kültürü çalışmalarının gelişimini önleyebilmektedir. Buna rağmen, doku kültürü ortamlarında kullanılan büyüme düzenleyicilerle yapılan radyasyon sonrası uygulamalar ile tüm bitki oluşumu prosesinin gerçekleşmesi bilinmektedir. Işınlanan dokularda, kontrol dokulara göre yaş ağırlılığının artışı oranla daha az gözükmetedir. Radyasyona maruz kalan eksplantların

rejenerasyonları farklı büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonuna ilişkin değişiklik göstermektedir (Kerbauy ve Hell, 1979). Böylece gerek gama radyasyonun ve gerekse büyüme düzenleyicilerin optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir.



Şekil 1.2 NASA'nın çektiği gama ışını fotoğrafı (Web sitesi: [www.nasa.gov/missions/science/f\\_w49b.html](http://www.nasa.gov/missions/science/f_w49b.html) .11.12.2016)

)  
Bu tez çalışmasında gama radyasyonu, kolza genotipinde adventif sürgün rejenerasyonu *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmanın amacı hücre ve dokularda biyolojik ve fiziksel değişiklik yaratarak, *A. tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı ile gen geçişlerinin frekansının artırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Kobalt 60 ( $Co-^{60}$ ) kaynaklı  $\gamma$  gama ışınının *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi belirtilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada seleksiyon ile raportör özelliğini taşıyan markör genlerden kullanarak eksplantların gen aktarımı aşamasından sonra gösterdikleri tepkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece transgenik aday eksplantların antibiyotik içeren ortamlarda büyümelerini sürdürebildikleri nedeniyle transgenik aday bitkilerin seçimi yapılmıştır daha sonra gen aktarımını onaylayacak yöntemler olarak PCR analizi yapılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde kolza bitkisinde yapılan doku kültürü çalışmaları ayrı ayrı ele alınmıştır. Ayrıca kolza bitkisinde genel olarak gen aktarımı çalışmaları incelenmiştir. Daha sonra radyasyon ve  $\gamma$  ışınının tanıtımı ve bitkilere etkisi ile ilgili açıklama ve devamında radyasyon ve  $\gamma$  ışının bitkilerde uygulamaları ile yapılan literatür özetleri sunulmuştur.

### 2.1 Doku Kültürü Çalışmaları

#### 2.1.1 Kolzada yapılan doku kültürü çalışmaları

Sharma vd. (1990) *Brassica juncea* cv RIK-81-1'in kesilmiş kotiledonlarından yüksek frekanslı sürgün rejenerasyonu koşullarını optimize etmek için çalışmalar yapılmıştır. 5 günlük fidelerden elde edilen eksplantlar 5  $\mu$ M N6-benziladenin (BA) içeren Murashige ve Skoog ortamı (MS) üzerinde kültürle alındığında kallusların maksimum farklılaşması meydana gelmiştir. MS'de yalnız kökler oluşmuştur. Kök oluşumu, yaprakçık eksplantın ucunda 1-2 mm'lik doku ile sınırlandırılmıştır. Organogenezis ancak yaprak sapının proksimal kesim ucunun ortamla temas halinde oluşmuştur. Kök indüksiyon ortamı (MS) üzerinde 3 güne kadar kültürlenmiş kotiledonlar, hala MS + BA'ye transfer üzerine sürgünler oluşturmak için tüm potansiyellerini korumuşlardır. MS ortamında daha uzun inkübasyon ile eksplantların oluşum kapasitesi azalmıştır. 8 gün sonra tamamen kaybolmuştur. MS ortamında, filiz tomurcuğu indüksiyonu için en az 7 gün boyunca BA'ya (5  $\mu$ M) ihtiyaç duyulmuştur. *B. juncea* kotiledonlarının morfogenez ve genetik transformasyon ilişkin detaylı çalışmalar için deneysel bir sistem olarak olası faydaları tartışılmıştır.

Burnett vd. (1994) *Brassica campestris*'in Horizon çeşidinin çimlenmesinde MS ortamında BAP veya NAA eklenmesinin sürgün rejenerasyonuna belirgin bir şekilde etkisini tespit etmişlerdir. Eksplant olarak kotiledonun yaşı sürgünleri rejenerasyon oranına tesir ederken, en iyi sonuç 3 ila 4 günlük fidelerin eksplantlardan elde edildiğine rapor etmişlerdir. Bitki rejenerasyon ortamının 1.0  $\mu$ M içerdiği etilen inhibitörü AVG

(amino ethoxy vinyl glycine)'in sürgün rejenerasyonu etkisiyle 3 kat daha artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. AVG'nin kullanılan diğer etilen inhibitörlerinden de ( $\text{AgNO}_3$  ve MGBG: methyl glyoxal-bis-guanyl hydrazone) daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Ancak, tohum çimlenme ortamına etilen inhibitörlerinin ilave edilmesinin, kotiledon eksplantlarının rejenerasyon başarısını artırmadığını tespit etmişlerdir. Çimlenme ortamının hormon olarak BAP eklenildiğinde, çimlenen fidelerden izole edilen eksplantlara bakıldığında %19.2 oran olarak sürgünlerde rejenerasyon görülürken, MS çimlenme ortamında ise 4.44  $\mu\text{M}$  BAP içerdiğinde bu oranın da %33.2 olduğu belirtilmiştir. Sürgün rejenerasyonu için etilen inhibitörüne ihtiyaç duyulmamasına (Fry vd.1987, Radke vd. 1992) rağmen, diğer *Brassica* türlerinden elde edilen sürgün rejenerasyonlarında etilen inhibitörlerinin önemli roller oynadığı ( Sethi vd. 1990 ve Radke vd. 1992) belirtilmiştir.

Ono vd. (1994) 100 farklı kolza çeşidinin kotiledon eksplantları ve alınan eksplantların yaşıyla sürgün rejenerasyonu oranına etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, en iyi sürgün rejenerasyonunu belirtmek için 4 günlük fidelerden izole edilmiş kotiledonların 4.00 mg/L BAP eklenmiş MS ortamı üzerinde kültüre alındığında oluşturulmuştur. Sürgün rejenerasyon açısından kışlık ve yazlık kolza çeşitlerinde etkisinin olmadığını tespit edilmiştir. Rejenere edilen bitkiler 2.00 mg/L IBA içeren ortamda köklendirilmiştir.

Eapen ve George (1997) 5 farklı *Brassica* türlerinden olan *B. jincea*, *B. Craniaia* *B. campesîris*, *B. napus*, ve *B.nigra* çiçek sapılarının eksplantını gümüş tiyosülfatın ve gümüş nitrat'ın sürgün rejenerasyonu oranına etkisini incelemişlerdir. Çalışmada sürgün rejenerasyonu için MS ortamına 0.5  $\mu\text{M}$  NAA ile 10  $\mu\text{M}$  BAP ve ayrıca %0.9 agar eklenmiştir. Bu ortamda eklenen 30  $\mu\text{M}$  gümüş tiyosülfat veya gümüş nitrat ilave ettiklerinde oluşmuş olan sürgünlerden tomurcuk sayısının genotipe göre arttığı belirtilmiştir. Ayrıca gümüş iyonlarından dolayı etilenin fizyolojik aktivitesi inhibitör görevini yaptığı için rejenerasyon potansiyelinde artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Kalabak (2004) çalışmasında, kolza (*Brassica napus* L.) 'da en fazla kallus ve somatik embriyo oluşumu 2 mg/L BAP (Benzilaminopürin) ve 1 mg/L NAA (Naftalenasetikasit) eklenmiş olan MS besi ortamında genç yaprak ayası ve epidermal tabakası çıkartılmış

gövde kısımlarından elde edilmiştir. Araştırma sonuçları, NaCl konsantrasyonunun %0.25'den %1'e yükselmesi durumunda kallus ve somatik embriyo oluşumunu olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymuştur. En fazla kallus oranı en düşük NaCl (%0.25) konsantrasyonunun olduğu besi ortamında epidermal tabakası çıkartılmış gövde eksplantından elde edilmiştir. Bununla birlikte kültüre alınan en genç yaprak ayası eksplantı orta düzeyde kallus oluştururken, en az kallus ve somatik embriyo oluşum oranının petiol eksplantından elde edildiği saptanmıştır. Araştırma sonucunda; tuzluluğa dayanıklı kolza çeşitlerinin seçilmesinde 1 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP büyüme düzenleyicilerini eklenmiş olan MS besi ortamında genç yaprak ayalarının ve epidermal tabakası çıkartılmış gövde kısımlarından, eksplant olarak başarı elde edilmiştir.

Darçın (2003) bu çalışmada, altı kolza çeşidine ait hipokotil ve gövde eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicileri olarak 6-benzylaminopurine (BAP), Naphtaleneacetic acid (NAA), Thidiazuron (TDZ) kombinasyonları içeren MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, en yüksek adventif sürgün oluşumunu gövde eksplantının gösterdiği ve en yüksek sürgün rejenerasyonu oluşturan çeşidin %90 ile Spok olduğu belirlenmiştir. Spok çeşidi için en uygun ortamın ise, 3 mg/L BAP ile 0.2 mg/L NAA kombinasyonunu eklenmiş olan MS ortamı olduğunu belirlenmişlerdir.

Koç (2014) çalışmada, katkı maddesi ile bitkide büyüme düzenleyici olarak seçilmiş olan farklı konsantrasyonlardaki demir humat, bor humat ve potasyum humat kolza bitkisinin antioksidant olan enzim aktivitelerini, sürgün rejenerasyon oranı ve fizyolojik özellikleri üzerine etkisini incelenmiştir. Steril tohumlar %0.7 (w/v) agar ve %3 (w/v) sükröz ile her birinde 1, 3, 5 ve 7 ppm konsantrasyonları olarak demir humat, bor humat ve potasyum humat eklenmiş MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Antioksidant olan enzim aktiviteleri ile Fizyolojik özellikler bir haftalık olan bitkicikler de gözlenmiştir. Daha sonra 3-4 haftalık olan bitkiciklerinden alınmış olan gövde eksplantları 0.2 mg/L NAA ve 1 mg/L 6-benzylaminopurine eklenmiş MS ortamının üzerinde kültüre alınmıştır. Denemenin sonuçlarına bakıldığında, tüm humik madde içeren formlar kolzanın fizyolojik özellikleri üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu, ayrıca antioksidant



olan enzim aktivitesinde negatif bir etkisinin olduğu ve diğer taraftan sürgün rejenerasyon oranına etkisinin olmadığı da rapor edilmiştir.

## 2.2 Gen Aktarımı Çalışmaları

*B. juncea* (Barfield ve Pua 1991, Gaur vd. 1996), *B. napus* (Hachey vd. 1991), *B. rapa* (Radke vd. 1992) *B. oleracea* (De Block vd. 1989), *B. nigra* (Gupta vd. 1993) ve *B. carinata* (Yadav vd. 1997) gibi *Brassica*'nın hemen hemen tüm ekonomik olarak önemli türlerinde transformasyon sistemleri geliştirilmiştir

Transformasyon birçok özellik için *Brassica* türlerini geliştirmiştir. En belirgin özelliği herbisid direnci (HR) dir. Kanola, dünyadaki en çok dördüncü ekilen transgenik bitkidir. Imidazolin, glüfosinat ve glifosat gibi herbisitlere toleranslı kanola şimdi ticari olarak ABD ve Kanada'da mevcuttur. Herbisit direncinin diğer örnekleri arasında glüfozin direnci *B. rapa* (Qing vd. 2000), *B. napus*'da ki sülfonilüre direnci (Blackshaw vd. 1994) ve *B. napus*'taki bromoksinil direncidir (Zhong vd. 1997).

Biyodizel kalitesinin iyileştirilmesi kolzada gen aktarımının bir başka hedefi olmuştur. *Brassica* yağı, tohumlardaki özel ayarlanmış yağ asitlerinin profilleri, büyük bir küresel talep ve teknoloji gerektirmektedir. Endojen oleat desaturazının susturulması, *B. napus* ve *B. juncea*'da oleik asit düzeylerini arttırdı (Stoutjesdijk vd. 2000). Yüksek glinolenik asitli kanola, *d12-desaturaz* genlerinin mantar *Mortierella alpina*'dan (Liu vd. 2001) transformasyonu ile üretildi. Kanola'daki *Garcinia mangostana*'dan izole edilen bir asil-açıl taşıyıcı protein (ACP) tioesteraz olan *Garm FatA1*'i ifade ederek, (Hawkins ve Kridl 1998) artmış stearat seviyesine sahip kanola üretmeyi başarmışlardır.

Biyodizel kalitesini iyileştirmelerine ek olarak, *Brassica napus* L. transformasyonu, biyolojik olarak bozulabilir polimer poli (*b-hidroksibutirat*) (PHB) gibi farmakolojik ve endüstriyel ürünlerin üretimi için bir ürünü bir biyokimyasal fabrikaya ayrışabilir. Yağlı tohumluk *Brassica* L. türleri, PHB biyosentezinin ilk basamağı için gerekli substrat olan asetil-CoA'nın, yağlı tohumlu yağlı asit biyosentezinde yaygın olması nedeniyle,

PHB'nin ticari üretimi için ideal adaydır. Biyopolimer üretimi için gerekli üç gen (*phbA* veya *bktB*, *phbB* ve *phbC*) *B. napus*'da işlenmiş ve polimer lökoplastlarda üretilmiştir (Hu vd. 1999).

*B. carinata*, kan pıhtılaşma önleyici protein olan hirudin üretiminde kullanılmıştır (Chaudhary vd. 1998). Bir oleosin-hirudin füzyon proteini, *Agrobacterium* kullanılarak tasarlanmıştır. *Brassica* yağlı tohumları, hirudin gibi proteinlerle kaynaştırılmış biyolojik olarak aktif bileşenlerin üretimi için kullanmanın avantajı, santrifüjleme ile proteinin saflaştırılmasının kolaylığıdır. *B. napus* da insan vücudunda antioksidan olarak görev yapan karotenoidlerin (Shewmaker vd. 1999) üretiminde kullanılmıştır. Böcek direnci, *Brassica* bitkilerinde artan zararlı sorunları olduğu için hedef bir özelliktir. *Brassica* bitkileri, lahana yaprak güvesine duyarlı olduğundan kontrolü iyi bir araştırma odağı olmuştur, Bt *CryIA(c)* gibi bir *Bacillus thuringiensis* endotoksin kristal proteinini aşırı üretmektir. Bu gen *B. napus*'da (Liu vd. 2011, Wang vd. 2005), Çin *B. napus* çeşitlerinde ve rutabaga'da (Liu vd. 2011) tanıtılmıştır.

*Brassica* bitkilerinde transformasyonundaki bir diğer önemli ilerleme, erkek kısır hatların geliştirilmesi ve restorasyon sisteminin geliştirilmesidir. *B. juncea*'da, özgü promotör hızlandırıcılarla barnaz (barnase) genini ekleyerek erkek kısır bitkilerin elde edilmesi mümkündür (Jagannath vd. 2001). Erkek kısır hattın doğurganlığı, transgenik bir hat içeren bir barstar ile çaprazlanmasıyla restore edilmiştir (Jagannath vd. 2002).

Mısra (1990), kolzanın Westar çeşidinin gövde epidermal eksplantını kullanarak, *A. tumefaciens* (oktopin tipi tümör oluşturan *pTi B653-SE* plazmidini içeren) aracılığıyla fertil transgenik bitkiler elde etmiştir. Bir ile üç günlük kültüre alınmış eksplantlar (kallus oluşumu başladığında) 1/10 oranında seyreltilmiş bakteri kültürü ile 5 dk. inoküle etmiştir. Ko-kültivasyonda 48 saat beklettiği eksplantlar 10 mg/L BAP ve 0.50 mg/l NAA, 500 mg/L karbenisilin ve 100 mg/L kanamisin içeren seleksiyon ortamına aktarılmıştır. Transformasyon başarısının %2 olduğunu belirtmiştir.

Damgaard ve Rasmussen (1991), kolzanın 1046 çeşitlerinden 7 günlük hipokotif eksplantlarının *A. Rhizogenes* hatları ile inokülasyonu sonucunda saçak kök oluşum

yeteneğine sahip transgenik bitkiler elde etmişlerdir. İnokülasyondan sonra eksplantları ya ışıkta ya da karanlıkta bekletmişlerdir. Transforme edilmiş bitki verinin kök ve sürgünlerde opin analizi yapılmıştır ve %7-31 arasında transgenic pozitif bitki ispat edilmiştir. Elde edilen bitkilerin kanamisin içeren ortamda *Npt-II* geni içerdiğini tespit etmek amacıyla seleksiyon yapılmıştır.

Radke vd. (1992), *B. campestris ssp. oleifera* Tobin ve Emma çeşitlerinde hipokotil eksplantları kullanarak rejenerasyon ve transformasyon denemeleri yapmışlar ve  $AgNO_3$  ve 2,4-D'nin sürgün rejenerasyonunu artırdığını tespit etmişlerdir. *A. tumefaciens*'in *Npt-II* ve *GUS* genlerini taşıyan binary plazmidlerini içeren *EHA 101* hattını transformasyonda kullanarak üç haftada transgenik sürgün elde etmişlerdir. Tobin ve Emma çeşitlerinde transformasyon frekansını %1-9 olarak tespit etmişlerdir. En yüksek transformasyon frekansını (%9) 10 mg/L kanamisin içeren ortamdan elde etmişlerdir. Transformasyonu *Npt-II*, *GUS*, Southern blot ve kanamisin'e dayanıklılık testleri ile tespit etmişlerdir.

Sharon E (1992), Transgenik *Brassica rapa ssp.* elde etmek için, transformasyon ve rejenerasyon prosedürleri bitkilerde izlenmiştir. Rejenerasyon frekansları, gümüş nitratın muamele süresiyle 2,4-D miktarının ayarlanmasıyla artırılmıştır. Gen aktarımında neomisin fosfotransferaz geni (*Npt-II*) ve b-glukuronidaz geni (*GUS*) içeren ikili plazmid taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in *EHA101* hattı kullanılmıştır. *B. rapa* cvs. iki çeşidi olarak Tobin ve Emma'den alınan hipokotil eksplantları kullanılmıştır. İnokülasyona tabi tutulan hipokotil eksplantlarından gen aktarımı gerçekleştirmek için Ko-kültivasyondan sonra üç ay seleksiyon ortamında bekletilmiştir. Tobin ve Ema çeşitleri için transformasyon frekansları %1-9 olarak tespit edilmiştir. Gen aktarımının onay için, *Npt-II* dot blot testi, *GUS* florometrik testi, Southern analizi ve eksplantların kanamisin dirençlilik özelliği ayrıca yapılmıştır.

Gupta (1993), *Brassica nigra* (IC 257) için bir *Agrobacterium* ikili vektörünün yanı sıra bir plazmid vektörünün direkt DNA alımına dayalı genetik transformasyon sistemleri kurulmuştur. Her iki vektör türü de *Npt-II* geni ve *GUS* geni taşıdığı *Agrobacterium* kullanılmıştır. Transformasyon için, hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Eksplantların

%33' ünden seleksiyon ortamı üzerinde kallus üretilmiştir. Bunların hepsi histokimyasal boyamada *B-glukuronidaz* genini eksprese ettiği görülmüştür. Fidelerin hipokotil dokularından izole edilen protoplastlar, Plazmid vektörü, *VEG* aracılı vektör ve DNA üzerinde incelenmiştir. Her ikisi de yöntem kullanılarak verimli çok sayıda kanamisine dirençli bitkiler elde edilmiştir ve transforme olanlara Southern blot analizi ve *GUS* histokimyasal boyama ile teyit edilmiştir.

Turgut vd. (1994), kolzanın Cobra ve Topaz çeşitlerinde petiollü kotiledon eksplantı kullanarak gen aktarımında etkili bir yöntem bulmaya çalışmıştır. Seleksiyon ortamında 10, 15, 20, 25 ve 30 mg/L kanamisin dozlarını kullandığında 10 mg/L km dozunun yetersiz olduğunu, 20 mg/L km üzerindeki dozların ise rejenerasyonu tamamen durdurduğunu, en iyi oranının ise 15-20 mg/L olduğunu tespit etmiştir. Onkogenik yabancı tip *A. tumefaciens* hatları (C58, T37, A281, ACH5, A6 ve A136NC) gen aktarımı için kullanılmıştır. Bunlardan yalnızca C58 yabancı tip hattının % 20 oranda tümör oluşturduğunu belirtmiştir. Onkogenik olmayan C58C1 (pGV3850) pBI121 hattı ile gen aktarımı çalışmalarında ise istenilen başarıya ulaşılamadığı bildirilmiştir.

Berthomieu vd. (1994), hem non-onkogenik hem de yabancı tip *A. tumefaciens* hatları kullanılarak *B. Oleracea*-var. *capiata*'da transformasyon yöntemi geliştirmeye çalışmışlardır. Metodu, yabancı tip *A. tumefaciens* hattının bu bitkide sürgün tümörü oluşturması temeline dayandırmışlardır. Transformantlar, *GUS* aktivitesinin histokimyasal analizi ile belirlemişlerdir. *GUS* pozitif olan bitkileri Southern analizi yaparak bu bitkilerin, T-DNA taşıdığını belirlemişlerdir. İnoküle ettikleri eksplantlardan oluşan 25 sürgünden bir tanesinin transgenik olduğu tespit edilmiştir.

Hong vd. (1997), kolza Westar çeşidinin polen spesifik "polygalacturonase" klonlarından *Sta44G*'ye ait *A647-bp* 5'-flanking fragmentini, *GUS* marker geninin önüne klonlamışlardır. Daha sonra, *A647-GUS* genini *A. tumefaciens* aracılığıyla kolza bitkisine aktarmışlardır. Kotiledon eksplantlarını bir gece büyütülen *Agrobacterium* kültürüne değdirip, ko-kültivasyon ortamında üç gün, daha sonra 500 mg/L karbenisiilin ilave edilen ortamda yedi gün bekletmişlerdir. Ardından eksplantlar 20 mg/L kanamisin ilave edilen ortama aktarılmıştır. *Sta44/GUS* ile kolzaya transformasyon başarısını %12

olarak bulmuşlardır. Transgenik aday bitkilerinden farklı devrede alınan örneklerinden histokimyasal *GUS* analizi yapılmıştır. *GUS* aktivitesinin sporogenezis safhasında görülmediğini, ilk olarak, tomurcuk 2 mm iken gözlemlendiğini ve anter gelişmesiyle arttığını bildirmişlerdir.

Mirici (2001), bu çalışmasında bazı önemli olan kolza bitkisinin (*Brassica napus* L. ssp. oleifera) çeşitlerinin, sürgün rejenerasyonu için petiollü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil ayrıca eksplantlarını kullanılmıştır. Farklı oranda NAA, TDZ, 2,4-D, kinetin ve BAP eklenmiş olan MS ortamda petiollü tam kotiledonun eksplantından en iyi oranla sürgün rejenerasyonu üretilmiştir. 4.00 mg/L ve 2.00 mg/L BAP içeren ortamda ise Spok çeşidinin için de %43.33 oranla sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Hansen ile Spok çeşidinde 2.00 mg/L NAA ve 0.50 mg/L BAP eklenmiş olan MS ortamı üzerinde olgun olmayan embriyo eksplantlarına bakıldığında sırasıyla %55.00 - %66.67 yüzdesinde adventif sürgün rejenerasyon tespit edilmiştir. Her 2 çeşit için olgun olmayan embriyo rotalarında %57.47 oranında olgu olmayan kotiledon eksplantı için %25.77 oranında daha yüksek sürgün rejenerasyonu oluşmuştur. Gen aktarım çalışmalarında farklı non-onkogenik olan *A. Rhizogenesis* ile *A. tumefaciens* hatları aracılığı ile Samsun çeşidi için yaprak diski eksplantları kullanarak gen transferi yapılmıştır. Higromisin ve kanamisin antibiyotiklerine mukavim sürgün oluşturmuş olan eksplant oranı açısından, %100 olarak EHA 101 pRGG hpt, 15834 pRGG hpt ve 2260 35S GUS-INT, ayrıca %95.00 ile 2260 AoPRİ NEOI en çok başarılı hat olmuşlardır. Kolza çeşitleri için petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantları için *A. tumefaciens* C58 ile A281 yabancı olan hatlarına hassasiyetlerinin incelendiği de, bakteri hattının tümör oluşturmak için yeteneği eksplant ve çeşide göre değişiklik göstermiştir. Çalışmada, C58 bakteri hattı ile hipokotil eksplantlarına inoküle edildikten sonra tümör oluşumu yüzdesi eksplantlarda test edilmiştir. Çeşitlere göre %20.00 ile %60.00 arasında, petiollü tam kotiledon eksplantı için de %20.00 ile %73.33 arasında farklılık göstermiştir. Ayrıca adventif sürgün rejenerasyonu araştırmalarında test edilmiş çeşitlerde başarılı olan Tarok, Spok, Quinta, Darmor, ve Helios çeşitleri ile kıyasta Westar çeşidinde petiollü tam kotiledon eksplantında pGV 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kanamisine dayanıklılık gösteren sürgün oluşturabilen eksplant oranı çeşitlerde %3.59 ile %19.20 arasında değişiklik

göstermiştir. Bu çalışmada 174 transgenik aday olan bitki yetiştirilmiş olup, bunların içinde sadece iki adet GUS Westar çeşidinde pozitif bitki olarak bulunmuştur. Transformasyon yüzdesi bu çalışmada %1.15 olarak rapor edilmiştir.

Khan (2003), *Brassica napus* L.'tan (Cyclone, Dunkled, Oscar, Rainbow ve KS75) oluşan beş çeşitte rejenerasyona yanıtı test edilmiştir. Denemede Cyclone çeşidi çok yüksek rejenerasyon sıklığı (%92) göstermiştir. Tohumların sterilizasyonda gümüş nitratın kullanımı rejenerasyonda olumlu etkilediğinden dolayı gerekli ön uygulama olduğu belirlenmiştir. Çalışmada hipokotiller, yüksek geçici GUS ekspresyonu temelinde transformasyon deneyleri için başlangıç materyali olarak seçilmiştir. Eksplantlar, seçilebilir işaretler olarak higromisine direnç veren, kanamisin, higromisin fosfotransferaz (*HPT*) genine direnç veren neomisin fosfotransferaz II (*Npt-II*) genini içeren bir pIG121Hm ikili vektörünü barındıran *Agrobacterium* EHA101 hattı ve (*GUS*) geni ile birlikte kültüre alınmıştır. Başarılı gen aktarımı için birlikte yetiştirildikten 7 gün sonra ön seçimi gereklidir. Kanamisine direnç seçimi için en etkin seçici kanamisin miktarda maksimum transformasyonu etkinliği %24 olarak belirtilmiştir. Yaprak dokularında *GUS* aktivitesi belirgindir. Tüm transgenik bitkiler, yabancı DNA'nın bitki genomuna varlığını teyit eden PCR analizi ile tespit edilmiştir.

Cardoza (2003), verimli transgenik *Brassica napus* L. cv. Üretimi için Westar çeşitlerinde, Ön uygulama zamanı ve ortak kültür süresi olarak iki önemli parametrenin optimizasyonu ile bir protokol geliştirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımında eksplant olarak hipokotil kullanılmıştır. Deneylerde, karnabahar mozaik virüs 35S promotörünün yapıcı ifadesi altında yeşil floresan proteinin (GFP) kodlayan genin iki varyantı olarak hem GFP5-ER hem de eGFP kullanılmıştır. 72 saat ön uygulama süresince beklettikten sonra *Agrobacterium* ile inokülasyon işlemi yapılmıştır ardından 48 saat ko-kültivasyon süresinin, transformasyon verimliliğinde artış sağlamıştır. Nitekim mGFP5-ER'de % 4 den % 25 %'e ve eGFP %17'den %25'e dönüşüm oranı olmuştur. Transgenik aday seçimi 200 mg/L kanamisinde yapılmıştır. %100 köklendirme kanamisin varlığında 10 g/L sükröz ve 0.5 mg/L IBA içeren ortamda gerçekleştirilmiştir.

Jonoubi (2005), *Brassica napus*'da kültür koşullarının modifikasyonu yoluyla sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium* ile gen aktarımı için verimli bir sistem geliştirilmiştir. Hipokotil eksplantlarının 7, 14 ve 21 günlük yaşındaki sürgün rejenerasyonu için farklı konsantrasyonlarda benziladenin (1.5, 3.0 ve 4.5 mg/dm<sup>-3</sup>) ve thidiazuron (0, 0.15 ve 0.30 mg/L) incelenmiştir. Maksimum sürgün rejenerasyon frekansı 21 günlük eksplantlarda, 4.5 mg/L benziladenin ile 0.3 mg/L TDZ kullanılarak elde edilmiştir. Bu kombinasyon ve kültür koşullarında, en yüksek sürgün rejenerasyon frekansı yüzdesi %200 olmuştur. Ayrıca seleksiyon ortamında yetiştirilen *Agrobacterium* ile enfekte edilmiş eksplantların %11.8 oranında transgenik sürgünlere neden olmuştur. 2 mg/L indol bütirik asit ve 10 mg/L kanamisin içeren ortamda köklendirme yapılmıştır. Köklenen bitkiler toprakta başarıyla aktarılmış ve verimli çiçekler ve canlı tohumlar geliştirilmiştir. Transformasyon için sonuçlar GUS testi ve PCR Analiz ile teyit edilmiştir.

Hensel vd. (2008), arpa, buğday ve tiritikale bitkilerinde olgunlaşmış embriyo eksen eksplantları, LBA4404 suşunu içeren binari pSB187 vektör (CaMV 35S-promoteri) bakteri hattı ile inokülasyon yapmışlardır. Daha sonra ise embriyo eksplantlarını alıp, arpa için BCIM ortamda, buğdayda WCIM ortamında ve tiritikalede BCIM ortamında kallus elde edilmiştir. Denemede MS (mineral salt) besi ortamı kullanılmıştır. 8 hafta boyunca bitkicikler vernalizasyon odasında 4°C'de 8 saat ışık ve 16 saat karanlık koşulları altında bekletilmiş ve daha sonra saksılara aktarılmıştır. Sonuç olarak arpada %86, buğdayda %10 ve tiritikalede %4 oranlarda transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Wu vd. (2008), çalışmalarında ekmeklik buğday bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon protokolü geliştirmişlerdir. Denemede *uidA* ( $\beta$ -glukuronidaz) geni içeren pAL156 plazmidi kullanmışlardır. Denemede embriyo eksplantı ve transformasyonda acetosyringone ve Silwet-L77 içeren inokülasyon tamponu kullanmışlardır. Transformasyonu gerçekleşen 44 bitkide normal morfoloji izlenmişlerdir. Transformasyonun frekansını % 0.3 - % 3.3 arasında değiştirmiştir. Marker genin varlığı ifadesi transgenik buğday bitkilerinde moleküler analizi sonucunda genoma entegre edildiği belirlenmiştir.

Shireen vd. (2009), çalışmalarında, ekmecli buğday bitkisinde *Agrobacterium* kullanarak gen aktarımını gerçekleştirmişlerdir. Denemede *uidA* ( $\beta$ -glukuronidaz) geni aktarmışlardı ve *uidA* genin aktivitesinin belirlenmesinde MUG (histochemical ve fluorometric) yönteminde yararlanmışlardı. Aday transgenik bitkileri PCR ve doğrudan yapraklara herbisit püskürtmesi ile test edilmiştir. Transformasyon frekansı %0.2 - 5.1 arasında değişmiştir.

Song G. (2012), Rutabaga (*Brassica napus* var. *Napobrassica*) çeşidinin "American Purple Top Yellow" 'in genetik transformasyonu için etkili bir protokol, gen aktarımı ve bitki rejenerasyonu etkileyen birkaç faktörü optimize ederek geliştirmiştir. Kanola'dan adapte edilen iki aşamalı bir rejenerasyon protokolü, hipokotil eksplantlar kullanılarak rejenerasyonu için optimize edilmiştir. Histokimyasal  $\beta$ -glukuronidaz (GUS) analizleri ile izlenen geçici ifade çalışmaları, *Agrobacterium tumefaciens* türü, kokültivasyon süresi ve kokültivasyon ortamı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin gen dağıtımını etkilediğini gösterilmiştir. Kararlı transformasyon için, önceden kültürlenmiş hipokotil eksplantlar, 16 saatlik bir ışık periyodu altında 6 gün bekletilmiştir. 100  $\mu$ M acetosyringone içeren kallus indüksiyon ortamı üzerine konulmuştur. Gen aktarılmış hücrelerin seçimi ve rejenerasyonu için seleksiyon ortamına 50 mg/L kanamisin ve 250 mg/L timentin eklenmiştir. Bu protokolü kullanarak, GUS- ve PCR-pozitif transformantlar, 3 ila 5 ay sonra üç *Agrobacterium* suşunun her biriyle inoküle edilen % 3.2 ila %4.2 hipokotil eksplanttan elde edilmiştir. Çoğu transformant normal fenotip göstermiştir. Southern blot analizi, T<sub>0</sub> bitkilerinde *gusA* transgenin stabil entegrasyonunu teyit etmiştir.

Manfroi vd. (2015), *A. tumefaciens* yoluyla buğdaya gen aktarımının düşük gen frekansı ana sınırlayıcı faktörlerden biridir. Enfeksiyondan sonra T-DNA ulaştırması ve eksplant rejenerasyonu için daha elverişli şartlar belirlemek için, bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada iki Brezilyalı çeşidi (BR 18 Terena ve PF-020037)'nin olgunlaşmamış embriyolar kullanılarak inokülasyon ve ko-kültivasyon ortamının sıcaklıklarda acetosyringone konsantrasyonu ve pH değişiminin kombinasyonları incelenmiştir. PF-020.037). *uidA* geçici ekspresyonu göre, T-DNA nakli için en uygun koşulların ko-kültivasyonu için 22 °C sıcaklıkta ve 25 °C ve 400 M acetosyringone takviyesi ile



birlikte, pH ise 5.0 -5.4 olan ortam da sonuçlar elde edilmiştir. Bu koşullar, embriyoların %81 mavi renk ile sonuçlandırmıştır. Ko-kültivasyon süresinde daha asidik pH'ya sahip bir ortamda *A. tumefaciens* fazla büyümesini azaltarak eksplant rejenerasyonunu iyileştirmiştir.

Teras (2015), Haploidler ve çift katlı haploidler (*Brassica* ssp.) anter veya izole edilmiş mikroskop Kültürleri kullanarak üretildi. 1982'den bu yana, Lichter izole bir mikro serme kültürü yöntemi geliştirdiğinde, bu teknik sürekli geliştirilmiş ve modifiye edilmiştir. *Brassica napus*'un Haploids ve DH genetik olarak genetik, niceliksel nitelik lokusunun yeri, markör/özellik ilişkilendirme çalışmaları ve genomik gibi çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca, kolza haploidi indüksiyon tekniği, mutasyona, melez çeşitlerin yetiştirilmesine, genetik dönüşüme ve *B. napus*'un yeniden sentezi gibi birkaç yeni yetiştirme kazanımına olanak tanıyan diğer çeşitli bitki biyoteknolojik teknikleriyle kolayca birleştirilebilir. Kolza da *in vitro* androjenezinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi DH popülasyonlarının geniş çapta elde edilmesine izin vermiştir. Günümüzde DH hatları, nicelik özelliklerinin genetik analizinde ve çevrenin tohum verimi ve kalitesi üzerindeki etkisinde kullanılmaktadır. Şu anda DH teknolojisi daha verimli hale geldi ve bu nedenle kışlık yağlı tohum yetiştiriciliğinde yaygın olarak uygulanabilir. Buna ek olarak, DH teknolojisi, yeni çeşitlerin yetiştirilmesi sürecini kısaltmak için kullanılır. Açık döllenmiş *B. napus* cv. Monolit (Bitki Islahı Strzelce Ltd., Co.), DH teknolojisi kullanılarak elde edilen ilk Polonya kışlık kolza çeşididir. Bu çeşidin ıslah döngüsü, klasik bir ıslah programına kıyaslayanda yaklaşık dört yıl kısadır. DH teknolojisi kullanılarak elde edilen ikinci Polonyalı çeşit, cv. Brendy (Bitki Islahı Smolice Ltd., Co.) benzer kısa bir sürede geliştirildi. Kolzanın yeni melez çeşitlerinin yetiştirilmesinde homozigot restoratör hatları da istifade edilmiştir. Temel araştırmalarımız, kolzanın kalitatif özelliklerini geliştirmeye odaklanan kolza DH teknolojisi kullanmış ve burada, Poznań'daki Ulusal Araştırma Enstitüsü - Bitki Islahı ve Uyumlaştırma Enstitüsü'nde yapılan büyük araştırmalara dayanarak sunulmuştur.

## 2.3 Gama Işını Bitkilerinde Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar

### 2.3.1 Gama ışınları

İlk kez, Paul Villard isimli Fransız fizikçi/kimyager radyum ile çalışmasında gama fotonlarını fark etti. Paul Villard'ın bu fark ettiği fotonlar için gama ışını veya "Rutherford" ismini vermiştir. Bu  $\Gamma$  ışınlarının esas kaynağını atom çekirdeği olduğunu belirtmişlerdir. Bilindiği gibi Gama ( $\gamma$ ) ışınları genel olarak atom parçacıkların etkileşimi neticesinde kaynaklanan ve belirli titreşim sayısına haiz olan bir "elektromıknatıssal" ışıdır. Uzayda gerçekleşen bu çekirdeksel tepkimelerin neticesinde oluşturulmaktadır. Çekirdeğin kararlı hâlinde olduğunda bir alfa ( $\alpha$ ) veya bir beta ( $\beta$ ) parçacığı olarak çıkarttıktan hemen sonra genellikle bozulabilir. Fazla kalmış olan çekirdek enerjisi ise bir elektromanyetik radyasyon şeklinde yayınlanmaktadır.  $\Gamma$  ve  $\beta$  ışınlarından çok daha yüksek enerjiye sahip olan ve dolayısıyla daha da girici ışınlar olmuşlardır.  $x$  ile  $\gamma$  ışınları maddenin içine nüfuz edebilme bakımından  $\alpha$  ve  $\beta$  parçacıklarından çok daha kabiliyetleri olmasına karşın iyonlaşmaya neden olma etkileri çok daha düşüktür.

Gama ışınları, elektromanyetik spektrumdaki başka elektromıknatıssal ışınları arasında en üst ve yüksek titreşim sayısına sahipken, en düşük dalga boyuna ve ayrıca en yüksek enerji seviyesine sahiptirler. Diğer ışınlara bakıldığında örneğin  $\alpha$  ışınları çok az santimetre kalınlığı olan kurşun levhasında yalnız belli bir bölüm durdurulabilmektedirler (Krane 1987).

### 2.3.2 Radyasyon dozu

Gama ışını tek bir fotonu gözükebilen bir ışık fotonundan 1 milyar kat çok daha enerjilidir. Normal ışığın insan yanağına dokunan bir tüy gibi farz edilirse, gama ışını bir mermi gibi düşünülebilir. Gama'nın yüksek enerjisi sebebiyle maddenin içine doğru yol alabilir, aynı zamanda ışık hızı ile yayılabilen, gazların da iyonlaştırıcı özelliklerini de sahip oldukları için yüksek enerji seviyesi sebebiyle yaşayan hücrelere çok önemli

bir biçimde zarar verebilecek özelliği taşımaktadırlar.

Hedef olan kütlenin tarafından, belirli bir zamanda, soğurulmuş olan radyasyon ışınının dozu canlılarda bazı biyolojik hasarların oluşumuna sebebiyet vermektedir. Biyolojik hasar veya etki radyasyon kaynağının tipine, iyonlaştırma, enerjisine, radyasyon ışınına maruz kalma müddetine, yeteneğine, biyolojik canlının ışın kaynağına göre olduğu mesafesine ve radyasyon çarpma süresine bağlıdır. Belirli bir sürede ve miktarın radyasyon dozuna maruz kalan canlılarda birtakım zararlı etkilerin ortaya çıkmasından dolayı eğer yeterli önlemler alınmazsa kaçınılmazdır. Radyasyonun etkisinin büyüklüğün nedenleri, radyasyonun çeşidine, aynı zamanda soğurulmanın miktarı ve hızı ile anlaşılır. Tüm faktörlerin bilindiği zamanda, canlı ve cansız maddelerin üzerinde bırakabileceği radyasyonun etkisi hesaplanabilir. (Lombardi 2007).

### **2.3.3 Radyasyonun hücreye etkisi**

Radyasyonun, hücre içindeki diğer moleküllerle, atom ve bilhassa da su ile karşılıklı etkileşimi olan önemli elemanlara varıp, zarar verici serbest olan radikalleri oluşturur. Radyasyon, genelde pektinlerin büyük oranda bozulmasına sebep olmaktadır. Bu etki dokuların yapısında yumuşaya ve ayrıca hücrelerin birbiriyle olan bağın kırılması, su içinde çözünebilen pektinlerin artışına bağlıdır. Membranın yapısının bozulması, radyasyon nedeniyle oluşmuş serbest olan radikallerin tarafından fosfolipidlerin esterleşmemesi sonucu meydana gelmektedir (Voisine vd. 1993).

Sitoplazma içinde radyasyon etkisine duyarlılığı en fazla olan organel mitokondridir. Canlı bir organizma da farklı dokular bulunmakta dolayısıyla radyasyona değişik derecede duyarlılık gösterirler. Radyasyonun yüksek dozları hücre seviyesindeki en bariz etkilerinden biri, hücre büyümesi için yaptığı baskılamadır. Özellikle hücrenin bölünme esnasında radyasyona tabi tutulan hücrelerde büyüme süreci kesintiye uğrar. Bu durum hücreyi oluşturan organlar olarak çekirdek ve bilhassa bölünme durumundaki kromozomlar, radyasyona çok fazla duyarlıdırlar. Radyasyon hücredeki kromozomların kırılmasına, kenetlenmesine, kırılmasına ve birbirine yapışmasına yol açabilir. Kromozomda oluşan kırıklar tekrardan organize ve onarılabilir, aynı kalabilir veya

başka bir kromozoma yapışıp, birleşebilir. Bütün bu sebeplerden dolayı mutasyon meydana gelebilir veya hücrenin ölümü gerçekleşebilir (Görpe ve Cantez 1992).

Radyasyonun iyonlaştırıcılığı bir canlının vücudunda biyolojik değişiklik ortaya çıkarabilmesi için radyasyonun enerjisi hücrenin tarafından içine soğurulması gerekmektedir. Soğurma sonucunda hedef moleküllerde uyarılmalar ve iyonlaşma yapılır. Gerçekleşen bu fiziksel etkileşim neticesinde ileriye dönük biyolojik hasarların başlamasında rolü olan iyonlaşmalar, hücrede kimyasal toksin maddelerin salgılanmasına ve DNA zincirlerinde oluşan kırılmalara neden olabilir. Hasar çok değilse DNA'da ortaya çıkan kırılmalar bazen onarılabilir. Ancak kimi kırılmalarda DNA onarım süresinde de hatalar oluşup, yanlış diziler olan kromozomlar oluşabilir. Hasarlı bir DNA yapısı düzgün onarılmadığı durumda hücre de kötü çalışan metabolizma ya sağ kalacak veya ölmüştür. Çok düşük dozların şiddeti, hızı ve enerjisi az olduğunda sadece hücrenin duvarına ve iç organlarına özellikle çekirdek ve organel mitokondriyi etkilemediği takdirde radyasyonun yüzeysel etkisi olumlu olabilecek varsayımı düşünülebilir. Radyasyonun bitki dokularında hormesis etkisinin gen aktarımında etkisi bu tez kapsamında ana fikir olarak düşünülmüştür dolayısıyla gen aktarım frekansını artırmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Literatürde gama ışının bitkilerde yarattığı etkiler ve bitki dokularının tepkileri değişik yönlerde aşağıda verilmiştir.

Çelik (1991), bu araştırma, Semu 209/82 RH ve Tower çeşitlerine 5 farklı doz seviyesinde (5, 15, 20, 30, 40 krad) Kobalt 60 ( $Co^{60}$ ) kaynağından uygulanan  $\gamma$  ışınının, bitkilerde ortaya çıkardığı değişimleri incelememiştir.  $M_1$  jenerasyonunda farklı ışın dozlarının, dikkate alınan özellikler üzerinde yüksek seviyelere ulaşan etkileri olmamıştır. Ancak popülasyonda, çiçeklenme ve olgunlaşma tarihleri arasında geçen sürenin kısaldığı ve dolayısıyla  $\gamma$  ışını ile erkenciliğin uyarıldığı belirlenmiştir. İncelenen  $M_1$  jenerasyonunda bütün dozlarda kapsüldeki tohum sayısında düşüş olmuştur. İlginç bir durumda, 40 krad ışınlamada üç bölmeli kapsül morfolojisi ile dikkat çekmiştir. Bitkilerde tohum renginde de geniş bir varyasyon gözlenmiştir. Farklı  $\gamma$  ışın dozları, hasatta yaşayan bitki sayısı üzerinde önemli bir etkiye neden olmamıştır. Bunun yanı sıra yükselen doz seviyelerinde steril bitki sayısında artış varsa da önemli

düzyey de değildir. Bu denemede bitkide tohum verimi, çıkan bitki sayısı, ana saptaki kapsül sayısı, bitki boyu, anasapa bağlı yandal sayısı gibi incelenen özelliklerde önemli değişim kaydedilmemiştir. Ancak denemede bazı değişimlerin hormesis olayına dayalı olabileceği düşünölmüştür.

Çavuş (1994), bu araştırmada; Tower ve Semu 209/82 RH yazlık kolza çeşitlerine 5 (5, 15, 20, 30, 40 krad) farklı doz kullanarak  $\gamma$  ışınının bitkilerde ortaya çıkardığı değişimler incelenmiştir. M- jenerasyonunda farklı  $\gamma$  ışın dozlarının dikkate alınan özelliklerin birçoğunda olumlu yönde değişim ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Özellikle önemli bir kriter olan çiçeklenme başlangıcı gün sayısı bakımından uygulanan dozlarla kontrol bitkiye göre erken içek açan hatlar elde edilmiştir. Anasaptaki kapsül sayısı bakımından uygulanan  $\gamma$  ışın dozlarının özellikle Tower çeşidi üzerinde olumlu yönde uyarıcı etkisinin olduğunu, Semu 209/82 RH çeşidinde ise dozlara bağlı olarak belirgin bir etkinin görülmediği belirlenmiştir. Kapsüldeki tohum sayısı, bitki başına tohum verimi ve toplam verim bakımından her iki çeşitte de uygulanan  $\gamma$  ışın dozlarının olumlu etkisi gözlenirken aynı dozlar hasatta yaşıyan bitki sayısı üzerinde kontrole göre artan bir etki yaratmış ancak en yüksek doz uygulaması olan 40 4R'lık dozda kontrole göre bir azalma olmuştur. Yapılan seleksiyon sonucu başta erkenci ve tohum verimi yüksek olan çok sayıda hat ML ve daha sonraki jenerasyonlarda tekrar denenmek üzere ayrılmıştır.

Dayanır (1996), bu araştırmada, Tower ve Semu 209/82 RH yazlık iki kolza çeşidi kullanılmıştır. Her iki çeşide de beş (5, 15, 20, 30 ve 40 krad) farklı doz seviyesinde ışın uygulanmış ve bitkilerde oluşturduğu değişimler incelenmiştir. Mb jenerasyonunda  $\gamma$  ışın dozlarının incelenen özelliklerinin birçoğunda olumlu yönde değişim oluşturduğu belirlenmiştir. Özellikle önemli bir kriter olan çiçeklenme başlangıcı gün sayısı bakımından uygulanan dozlarda kontrol bitkiye göre erken içek açan hatlar bulunmuştur. Ayrıca kapsül sayısı bakımından uygulanan  $\gamma$  ışın dozlarının özellikle Tower çeşidinde olumlu yönde etkisi belirlenirken, Semu 209/82 RH çeşidinde bu etki görülmemiştir. Kapsül sayısı toplam verim ve bin tohum ağırlığı bakımından  $\gamma$  ışın dozlarının olumlu etkisi gözlenirken, aynı dozlarda kontrole göre artan bir etki

olmuştur. Yapılan seleksiyon sonucunda başta erkenci ve tohum verimi yüksek birkaç hat  $M_e$  jenerasyonuna ayrılmıştır.

Arslan vd. (1998), bu çalışmada ketenin sarı 85 (*Linum usitatissimum* L.) çeşidinin tohumları 5 farklı doz olarak 10, 20, 30, 40 ve 50 kRad Gama radyasyonu ile ışınlanmıştır. Kontrol bitki ile kıyasta radyasyonun  $M_1$  jenerasyonuna ait bitki boyunda 20 kRad doz, bin tohum ağırlığında 30 ve 40 kRad dozlarında, yağ oranı 30 kRad, bitki başına kapsül sayısı 50 kRad dozu ve kapsüldeki tohum sayısında 20 kRad dozu verim ögeleri üzerindeki etkili oldukları belirtilmiştir. Genellikle radyasyonun düşük dozları, yüksek dozlara oranla daha fazla etkili olduğu rapor edilmiştir.

Akıncı (1999), çalışmada, buğdayın makarnalık çeşidi olan "Sorgül" tohumlarına 6 farklı doz olarak 50, 100, 150, 200, 250 ile 300 Gy'lik  $\gamma$  radyasyonun etkisi  $M_1$  bitkilerinde tarlada ve sera da ve  $M_2$  bitkileri içinde tarlada kültüre alınıp ve gözlemler içinde yürütülmüştür.  $M_2$  bitkilerinde başakta bulunan tane ağırlığına, başakcık sayısına ve başakta tane sayısının özelliklerine  $\gamma$  radyasyonunun farklı dozlarının önemli etkilerin olduğunu tespit etmişlerdir.  $\gamma$  radyasyonu dozları artışıyla paralel bir şekilde  $M_1$  bitkileri için başaklanma zamanı uzadığında, incelenen öbür karakterlere ait değerler için düşüşler olduğunu belirtilmiştir. Doz artışı  $M_2$  bitkileri için klorofil de mutasyonların önemli oranda arttığını rapor etmişlerdir.

Charbaji ve Nabulsi (1999), çalışmada, asmaya ait iki çeşidin Cabernet ve Helwani ayrıca iki anacın olarak 3309 ve R.99 sürgünlerinin tek boğum ve uçlarını eksplant olarak 4 farklı gama olarak 0, 2, 5 ve 7 Gy dozlar ile ışınladıktan sonra DSD1 ortamı içinde 60 gün sürede kültüre almışlardır. Çalışmada, 7 Gy'lik dozu her iki çeşitte sürgün uzunluğu ve 5 Gy'lik dozunda Helwani çeşidi ile her iki anaçta bitkilerde kök sayısında artış bildirmişlerdir. Asmanın iki çeşidinde de 7 ve 2 Gy'lik dozlar ile yapılan ışınlama kök uzunluğuna, ışınlanmamış olan kontrole kıyasta önemli ölçüde yüksek olmuştur. 5 Gy'lik  $\gamma$  dozu R.99 anaçında kuru ağırlıkta artış varken, Cabernet ve Helwani çeşitlerinde de benzer etkiler 7 ve 2 Gy'lik dozlar için gözlenmiştir. Ayrıca 5 ve 7 Gy'lik dozlar için de bitkilerde yaprakların sayıları ışınlanmamış olan kontrole göre artış rapor edilmiştir.

Nagata vd. (1999), çalışmada, radyasyonun iyonlaştırıcı olarak yüksek olan dozlarının bitkilerde enzim aktivitesinin de başlatma, etilen üretimi için yükselme solunumunda artış ve bazı proteinlerin birikimi gibi benzer fizyolojik farklılıklara neden olduğu belirtmişlerdir. Ayrıca, DNA, membranlar, ve hücre duvarları gibi benzeri hücresel bir makro molekülün radyasyonun iyonlaştırıcı özelliğinden dolayı biyokimyasal ve fiziksel olarak önemli ölçüde etkilendiklerini belirtmişlerdir.

Öktem vd. (1999), bu çalışmada, buğdayın ekmeklik olarak Atay ve makarnalık olarak Çakmak çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarına partikül bombardımanı ile gen transferi yaptıkları bu çalışmalarında *pBSGUSINT* plazmidine bir kalsiyum nitrat yöntemi kullanarak unğsten partiküllerine bağlamışlardır. Araştırmada, olgun embriyolara değişik basınç ve hem de hazne vakumları ile bombardıman uygulamışlar, eksplantlar 24 saat bombardımandan sonra ya da embriyolar çimlenmesinin 7. günü GUS Analizi yapmışlardır. Yapılan bombardıman embriyoların %80'in için bu 7 günlük gelişen embriyoların fideleri *GUS* testine olumlu yanıtları görülmüştür.

Sayar vd. (1999), bu çalışmada, buğday çeşitlerinde diploid, tetraploid ayrıca heksaploid olan endosperm destekli olgunlaşmış embriyo tekniğiyle, tane de iriliğinin kallus oluşumu için etkisini araştırmışlardır. Bu buğday çeşitlerinin tohumları büyük ve küçük olarak ayırmışlar ve yüzey sterilizasyonundan sonra endospermin hafifçe ayrılıp, daha sonra 8 mg/L 2,4-D eklenmiş sıvı ortam içinde kallus oluşturmuştur. MS0 ortamında rejenerasyon kültürüne alınmıştır. Denemede tüm genotipler için büyük taneler, küçük tanelerden kallus oluşturmak için frekansı, kallusun ağırlığı, rejenerasyon oranı ve kültür oluşturma yeteneği önemli ölçüde yüksek değerlere sahip olduğu tohum ile kallus ağırlığı için ( $r = 0,86$ ) ve rejenerasyon oranı ile kallus ağırlığı için ( $r = 0,85$ ) ve aralarında önemli ilişkinin olduğu da büyük taneli olan buğdaylarda endospermli embriyo tekniği ile kullanılarak yüksek seviyede rejenerasyon olan kallus elde edilmiştir. Bu sebeple bu tekniğin olgun olmayan embriyolara bir alternatif olarak çalışmalara sunulmuştur.

Al-Safadi vd. (2000), çalışmada, patatesin 3 farklı çeşidine 4 farklı doz olarak (2.5, 5, 10 ve 15 Gy)  $\gamma$  radyasyonu *in vitro*'da mikroyumru oluşumu için etkilerini

araştırmışlardır. Düşük  $\gamma$  radyasyonunun dozları hem *in vivo* ve hem *in vitro*'da bitki gelişimi için teşvik ettiğini de bildirmişlerdir. Radyasyonun düşük dozları bir teşvik edici olarak etkilerinde, meyveler için erken olgunlaşma ve meyvelerin ağırlığında olan artış ve ayrıca tohumlarda yüksek çimlenme gibi bu özellikleri göstermiştir. Araştırmacılar;  $\gamma$  radyasyonun düşük dozları teşvik edici bir etkisinin de doku kültürü için gözlemlendiğini, fasulyede bitkisinde doku kültürünün gelişimin de artışı, tütün için doku kültüründe hücre değişikliğini teşvik ettiğini ve havuçta rejenerasyonunda hızlanma ve ayrıca patates için mikroyumru oluşumunda artışa neden olduğunu vurgulamışlardır.

Doonan (2000), çalışmada, mutasyona uğramış olan birkaç genin hücre bölünmesi ile gelişmesini etkilediği doğrultuda rapor etmiştir. Bunun için, yüksek doz  $\gamma$  radyasyonu kullandığında tahıllarda hücrenin bölünmesinde bir durdurma olduğu, morfolojik olarak bilinen yaprakların oluşmasın da artan bir hücre genişlemesiyle sağlanabilmektedir. Gelişen bu yapraklar az sayıda olup; münhasıran büyük hücreleri içerdiği belirtilmiştir.

Önde vd. (2001), çalışmada, partikül bombardımanı metoduyla korunga kotiledon eksplantlarına *pBI221.23* plazmidini aktardıkları denemelerde, geçici GUS analizi gözlemişlerdir. 1350 ve 1100 psi basınç, 9 ve 6 cm olarak atış mesafesinde, 1 pm ile 1.6 pm çapa sahip olan altın partikülleri de kullanmışlar, 48 ile 120 saat bombardımandan sonra GUS Analizi yapmışlardır. Neticede, 1350 psi olan basınç ve 6 cm olarak atış mesafesin de başarıya ulaşmış, 1 pm çaplı olan altın partikülleri istifade edilip, 48. saatte yapılan GUS testinden en yüksek sonuçlar alınmıştır. Mikroskop gözlemlerinde, altın olan partiküllerinin bir çoğunun epidermal olan hücre katmanında olduğu; ancak, sub-epidermal tabakada %1'den daha da az bir kısmının geçebildiği belirtilmiştir.

Budak ve Yıldırım (2002), bu çalışmada, buğdayın "Kundur" ve "Ege 88" makarnalık çeşidinin tohumları 5 farklı doz olarak 50, 100, 150, 200 ve 250 Gy  $\gamma$  radyasyonu kullanmıştır. Her jenerasyon için parsel verimi, bin tanede ağırlık, başaklanma tarihi, bitki boyu ve tanenin protein içeriği araştırılmıştır. Denemede, Ege 88 çeşidin de mutantlarında tane verimi ve Kunderu çeşidi için mutantları daha yüksek, ancak protein içeriğinde düşüş olduğu da bildirmişlerdir. Kunderu çeşidine ait olan tane verimi için 250 Gy'li  $\gamma$  radyasyonu kontrolden daha yüksek olduğu belirtilmiştir.



Kovacs ve Keresztes (2002), çalışmada, radyasyonun iyonlaştırıcı ve biyolojik materyallerin tarafından soğuruldu zaman, klorofil sentezini önediğini, hücre içindeki kritik olan noktaların etkilediğini bildirmişler. Araştırmada, hücrede radyasyonun etkisi atom, moleküllerle ayrıca özellikle suyla karşılıklı bir etkileşime ile önemli elemanlara ulaşır, zarar verebilecek serbest radikalleri oluşturmaktadır. Radyasyonun bu denli etkisi vejetatif hücrelerde hem de %80'nini sitoplazmada da suyun oluşturduğunun önemli olduğu da vurgulamışlardır. Hücrede morfolojik değişimlerin, değişik doku ile hücrelerin kimyasal ve biyolojik değişimlerinden kaynaklandığı bu çalışmada, radyasyonun pektinlerin büyük derecede bozulmasına sebep olduğunu; dokulardaki oluşmuş yumuşamanın ve hücrelerin birbiriyle bağının kırılması suda çözünebilen bu pektinlerin arttığından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Lage vd. (2002), çalışmada, radyasyon ile bitki hormonlarında ve sentezlerini olumsuz olarak etkilediğini; ışınlanmış olan hücrelerin büyüme uyarıcısı maddelere karşı duyarlılığını azalttığı yönde; isoperoksidazların hem dayanıklılığı hem de yaralanmaya olan tepki göstergesi için bitki fizyolojisinde çok önemli rol oynadığı enzimlerden olduğunu belirtmişlerdir. Radyasyon tatlı patates bitkisinin boğum segmentleri, sürgün ve kök oluşturulması için doza bağlı düşüşler gösterebildiğini bildirmişlerdir.

Hyun vd. (2003), çalışmada, çeltik bitkisinde azetidine-2-carboxylic acid "AZCA" dayanımını yükseltmek için *in vitro* kültüründe mutagenesisten yararlanmışlardır. Kalluslar 5 farklı doz olarak 30, 50, 70, 90 ve 120 Gy dozlara tabi tutulmuştur. Işınlanmış olan 50 ve 70 Gy'lik dozları kalluslarda önemli ölçüde AZCA dayanımı görülmüştür. AZCA'da ile seçilen ışınlanmış olan kallusların ışınlanmayanlara nazaran tuza daha tolerans gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca mutasyon uygulamasından dolayı yüksek ozmotik basınca karşı dayanıklılık sağlamıştır. Çalışmada serbest olan prolin seviyesi, AZCA'ya dayanıklılık gösteren hücreler hattında kontrolle kıyasta 3.5 kat artış gözlemlenmiştir. *In vitro*'da mutagenesis yolu ile yüksek prolinli hücre hatların da seçimi başarılı bir şekilde olmuştur. Ayrıca çeltik için bu yöntemin kullanımı strese tolerans gösteren çeşitlerin geliştirilmesini sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Hyun vd. (2003), araştırmada, *in vitro* da tuza tolerans gösteren eltik geliştirmek amacıyla  $\gamma$  radyasyonu kullanmıştır. Tuza toleranslı eltik hatları yüksek bitki boyu ile kök sayısı ve kök uzunluğu gibi bazı karakterler dikkate alınmış ve seçmişlerdir. Kontrolleri ile kıyaslandığı zaman, mutant hatlarda alkol ve  $\alpha$ -amilaz dehidrogenaz'ın aktivitelerinde önemli ölçüde artışlar görülmüştür. Mutantlar da canlı kalma açısından yüksek değerlere sahip ve tuz stresine karşı dayanıklı olmuştur. Tuz stresinin koşulları içinde, bitki hücrelerine ihtiyaç olan, serbest prolin seviyesinde önemli bir artış olduğu ve bunun için enzimler ve hücre zarı yapısının korunmasında çok etkili olduğu da belirtilmiştir.

Adu-Dapaah ve Sangwan (2004), çalışmada, yerfıştığında  $\gamma$  radyasyonunun yüksek bir genetik varyasyona sebep olduğunu ve hem de verimi artırmak amacıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Nagata vd. (1999), araştırmada *Arabidopsis thaliana* bitkisinin  $\gamma$  radyasyonuna tabi tutulmuş, kök hücrelerin de radyal gelişmesi ile kılcal kökler de uzama gözlenmiştir.  $\gamma$  radyasyonu sebebiyle kökte oluşmuş olan hem morfolojik değişiklikler hem de suyun hidrolizi olmasıyla ortaya çıkan daha aktif oksijen türleri nedeniyle artan etilen üretimine sebep olduğunu belirtmişlerdir.

Öztürk (2001), bu alışma, *Tribolium confusum* (kıрма bitinin) larva, pupa ve ergin bireylerinin biyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine malathion ve  $\gamma$  radyasyonunun etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bunun için söz konusu faktörlerin etkisi altında, böceğin ölüm oranları, DNaz ve SOD aktiviteleri, protein miktarları ve protein fraksiyonları araştırılmıştır. Malathionun doz artışına bağlı olarak *T. confusum* larva ve erginlerinin ölüm oranlarında artış görülmüştür.  $\Gamma\Gamma$  radyasyonu uygulanmış erginlerde de aynı durum görülmüştür. Malathion uygulanmış bireylerde, kontrol grubu ile kıyaslandığında doz artışına bağlı olarak, DNaz aktivitesinde ve protein miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir Larvalara uygulanan  $\gamma$  ışınları etkisi ile pupa döneminde, kontrol grubuna kıyasla DNaz aktivitesinde artış, protein miktarında ise azalma gözlenmiştir. Malathion uygulanmış erginlerde SOD aktivitesinde zamana ve doza bağlı olarak artış gözlenmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile

böceğin farklı gelişim evrelerinde, bazı protein fraksiyonlarının farklı olduğu, ergin dönemde larva ve pupaya oranla protein çeşidinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Larvalara uygulanan malathion etkisi ile ergin döneminde, protein fraksiyonlarında doza bağlı olarak, düzenli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Sarsu (2003), araştırmasının amacı değişik dozlarda uygulanmış olan  $\gamma$  ışınlanma, kolzanın kışlık iki (*Brassica napus* ssp. *olifera*) çeşitlerinde hem M<sub>1</sub> hem de M<sub>2</sub> bitkilerine etkisini belirlenmiştir. Bu amaçla; Cascade ve Hansen kolza çeşitlerinin tohumları 400, 600, 800, 1000 ve 1200 Gy gama dozlarında ışınlanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; Cascade ve Hansen çeşitlerinin sera ve tarla koşullarında yetiştirilen M<sub>1</sub> bitkilerinde çıkış oranı, en yüksek kontrol bitkilerden elde edilmekle beraber; artan dozlarda gama ışınlanması ile, diğer dozlarla karşılaştırıldığında 800 Gy ve 1000 Gy dozlarında, kontrolden az olan bir artış belirlenmiştir. M<sub>1</sub> bitkilerinin kök uzunluğu ve fide boyu, olgunlaşmada bin adet tohum ağırlığı, kapsülde bulunan tohum sayısı, ana saptaki kapsüllerin sayısı, bitki boyu ve ayrıca ana sapına bağlı olan yan dal sayısı M<sub>1</sub> jenerasyonunda canlılığın devamlılığı yönünden yapılan gözlem, ölçüm ve sayım sonucunda ele alınan bitki özellikleri artan mutagen dozlarına bağlı olarak, kontrole göre önemli düşüşlerin meydana geldiği saptanmıştır. M<sub>2</sub> bitkilerinin çıkış oranında; gama ışını dozlarının artmasıyla kontrole göre azalma olmuştur. M<sub>2</sub> bitkilerinde meydana gelen mutasyon frekansının dağılımı incelendiğinde ise; Cascade ve Hansen çeşitlerinde sırasıyla; klorofil mutasyonu frekansı % 1.92, 1.33, yaprak mutasyonu frekansı % 8.02, 2.94, antosiyanli bitki frekansı % 2.23, 2.72, kapsülde meydana gelen değişiklik frekansı % 0.87, 0.66, kısa boylu bitkilerin frekansı % 1.67, 1.47 olarak belirlenmiştir. Toplam mutasyon frekansı Cascade çeşidinde en yüksek 800 Gy dozunda % 18.86 en az 400 Gy dozunda % 8 olarak, Hansen çeşidinde ise en fazla 1000 Gy dozunda % 19.8, en az 400 Gy dozunda % 5.76 olarak saptanmıştır. Çalışmada her iki çeşit için  $\gamma$  ışının dozlarında artışla mutasyonun frekansı 1200 Gy dozuna kadar arttığı gözlenmiştir.

Zaka vd. (2004), çalışmada 5 günlük olan fideleri 0 ve 60 Gy arası olarak değişik dozlar ile  $\gamma$  radyasyonu uygulanmıştır. Çalışmada 2 jenerasyon sürecinde bitki gelişimi ve büyümesi araştırmışlardır. 60 Gy'den üstün dozların G<sub>1</sub> bitkilerinde verimliliğini ve

gelişimini önemli ölçüde önlemiş, 40 Gy'in üzerinde olan dozlarla ışınlanmışlarda fide gelişmemiştir. Ayrıca G<sub>2</sub> de daha şiddetli olarak etkisi yansımıştır. Işınlanmış olan G<sub>1</sub> ile G<sub>2</sub> bitkileri kontrole kıyasta daha önemli derecede kısa olmuşlar, ayrıca her ikisinde (G<sub>1</sub> ile G<sub>2</sub>) bitkilerine bakıldığında ortalama bakla sayısı için uygulanan bütün dozlarda en az %20'nin altında oran olarak azalma gözlenmiştir. Benzer bir şekilde, ortalama olarak hem yumurtalık ve hem de baklada normal olarak gelişmiş olan tohum sayıları da G<sub>1</sub>'de 10 Gy, G<sub>2</sub>'de ise 40 Gy'lik dozlar sonrası önemli ölçüde azalmıştır. Çalışmada G<sub>1</sub> ile G<sub>2</sub> bitkilerine 0 ila 10 Gy olan dozlarda yapılan ışınlamalar neticesinde mayozda görülen anormalliklere paralel bir biçimde erkek kısırlıkta da artış ortaya çıkmıştır. Ayrıca bitki gelişiminde izlenen bu uzun süreli değişiklikler  $\gamma$  radyasyon sebebiyle oluşmuş bir genomik dengesizliklerin işareti olmaktadır. Diğer taraftan, 0 dan 10 Gy'e uygulanan dozlar arasında G<sub>1</sub>'in tohumları için depo proteinlerinin miktarında ve kalitesi yönünde hiçbir değişiklik gözlenmemiştir.

Akıncı ve Baysal (2005), bu çalışmada, makarnalık buğdayın Sorgül çeşidine 7 farklı  $\gamma$  ışınlarının dozları olarak (0, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300) Gy'nin etkilerini incelemiştirler, M1 ile M2 jenerasyonları için bitkide başak sayısı, M2 de fertillemiş bitki oranı, 1000 tane ağırlığı; bitkide başaklanma süresi, başakta bulunan tane ağırlığı, bitki boyu, başak tane sayısı, bitki verimi, başak başakcık sayısı ve başak uzunluğunu incelemiştirler. Çalışmada artan  $\gamma$  radyasyonu dozları M1 bitkilerinde incelenmiş olan bütün karakterler için ve M2 bitkilerinin de başakta bulunan başakcık sayısında, başak tane sayısı ile başakta bulunan tane ağırlığı önemli şekilde etkilediği belirtilmiştir.

Li vd. (2005), çalışmada, iki farklı patates çeşidi için *in vitro* kültüründe yetişen fidelerden alınan eksplantlar 5 farklı  $\gamma$  radyasyonu dozu olarak (0, 2, 4, 6 ve 8) Gy'e tabi tutularak, *in vitro* da mikroyumru üretimi ile kalitesi için  $\gamma$  radyasyonunun teşvik edici özelliği incelemiştirler.  $\Gamma$  radyasyonunun 3 farklı dozu olarak da 4, 6 ve 8 Gy'ile mikroyumru oluşumunun süresi 10 ila 15 gün arası olarak uzamıştır. Ayrıca bitkiciklerin 4 Gy ışını hem mikroyumru sayısı için hem de tane ağırlığında önemli derecede artışlara sebep olmuştur. Ancak, radyasyonun daki düşük dozlar (2 ve 4 Gy) mikro yumrulara nişasta kapsamını yükseltirken, yüksek dozlar ise (6 ve 8 Gy) askorbik asiti artmış ayrıca şeker kapsamını da düşürmüştür. 4 ile 6 Gy'lik dozlar

da ise mikro yumruların proteinini önemli ölçüde artırmıştır.

Yılmaz vd. (2005), bu araştırmada pamuğun Acalpi-952 çeşidini Kobalt 60 kaynaklı 4 farklı  $\gamma$  radyasyonu dozular olarak 100, 200, 300 ve 400 Gy ile uygulanmış tohumlar kullanılmıştır. Doza ait ışınlanmış tohumlar M<sub>1</sub> jenerasyonunda yaşayabilen bitkilerden tohum alınmıştır. Daha sonra M<sub>2</sub> de her bitkiye ait olan tohumlar birer sıra şeklinde yetiştirilerek; kozanın kütlü ağırlığı, koza ağırlığı, koza sayısı, meyvede dal sayısı, bitki boyu, ve 100 tane ağırlığı gibi bazı karakterler gözlenmiştir. Kolzanın her iki jenerasyon için incelenmiş karakterler açısından ebeveyn çeşitlerine göre olumlu veya olumsuz doğrultuda varyasyonlar belirtilmiştir.

Başer vd. (2007), bu çalışmada, buğdayın iki farklı makarnalık çeşitlerine uygulanan 6 değişik  $\gamma$  radyasyonu dozu M1 ile M2 jenerasyonları için bitki gelişimi de etkisi incelenmiştir. M2 jenerasyonu için incelenmiş olan 7 farklı karakter yönünden mutant olmuş ve kontrol genotipleri birbiriyle karşılaştırıldığında, birkaç önemli özellik bakımından beklenen mutant tipleri üretilmiştir. Bu durum özellikle 200 Gy dozunun etkisinden dolayı seçilmiş olan mutant genotiplerin arasında bitki boyu doğrultusunda önemli derecede kısalmış genotipler üretilmiştir. Ana sap üzerinde başak tane ağırlığı, başakta bulunan tane sayısı, bitki hasat indeksi, bitki verimi ve başağın uzunluğu yönünden 300 Gy dozunun uygulaması beklenen özellikleri gösteren genotipler meydana gelmiştir. Mutagen uygulaması ile bitkide görülen kardeş sayısının artırdığını göstermiştir. Kontrol ile seçilmiş olan mutant genotiplerde SDS-PAGE metoduyla edilmiş olan protein bantları bakımından özellikle 300 ila 500 Gy dozlarında değişiklikler gözlenmiştir.

Necati vd. (2007), bu çalışmada *Triticum durum* Def. Berkmen 469 doubled haploid (DH) makarnalık buğday çeşidi gama ışınlaması ve doku kültürü çakışmasında kullanılmıştır. Işınlamadan önce kuru ve dorment haldeki DH Berkmen 469 tohumlarının nem miktarı % 5.491 olarak tespit edildi ve bu değer % 9.750' ye yükseltildi. Daha sonra tohumlar 137Cs kaynağı kullanılarak 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 Gray gama ışın dozları kullanılarak ışınlandı. Farklı  $\gamma$  radyasyonu dozlarının M1 jenerasyonundan elde edilmiş olan bitkiler için fide yaşayan bitki sayısı, uzunluğu,

bitki boyu ve kök karakterlerine etkileri belirlendi. Yapılan varyans analiz çalışmasına göre artan doz miktarlarına bağlı olarak ölçümü yapılan karakterlerde önemli farklılıklar bulunmuştur.

Yıldız (2009), bu araştırmada,  $\gamma$  radyasyonunun etkisini hücre ile dokularda yarattığı biyolojik ve fiziksel değişikliklerin sebep olması için partikül bombardımanı metodu ile yapılan gen aktarımı ve daha sonra bitki de rejenerasyonu artırmak yönünde hedeflenmiştir. Bu nedenle, öncelikle Cs<sup>137</sup> ile Co<sup>60</sup>dan  $\gamma$  radyasyonu ayrıca bunlara ilişkin  $\gamma$  dozlarının bitki rejenerasyonuna etkisi belirtilmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlara bağlı olarak uygun dozlar ve kaynağı belirtildikten sonra kaynaktan yararlanmış olup partikül bombardıman uygulaması ile bitki rejenerasyon araştırmalarına başlanmıştır. Olgun embriyolar ile kallus kültürü ve daha sonra bitki rejenerasyonu için çalışmalarda; Çakmak 79 ve Bezostaja-1 iki buğday çeşitlerinde incelenen karakterlerde en iyi sonuçların kontrol olarak 0 Gy doz uygulamasından elde edilmiş, bunu da 15 Gy olarak  $\gamma$  dozundan elde edilen sonuçlar izlemişlerdir. Radyasyon dozlarındaki artış ile paralel olarak sonuçlarda önemli düşüşler belirlenmiştir. 15 Gy'lik dozun üzerindeki  $\gamma$  radyasyonunun ışınlanmasına bağlı sürgün rejenerasyonu görülmüşse de bu sürgünlerden hiçbir bir bitkicik gelişimi görülmemiştir. Çalışmada kullanılmış olan her iki çeşit için en başarılı  $\gamma$  kaynağı olarak Kobalt<sup>60</sup> dan sonuçların elde edilmiştir. Fakat farklı kaynaklı olan  $\gamma$  radyasyon etkisinden edinilmiş kallustan gelişmiş olan bitkiciklerin yaprak hücreleri ile aynı yapraklardaki fotosentetik aktivite nin etkileri araştırıldığında, Co<sup>60</sup> kaynaklı olan 15 Gy'lik  $\gamma$  dozu ve kontrol uygulaması olarak (0 Gy) doz arasındaki fark incelenmiş bütün karakterler için ve her iki çeşit içinde önemli olmadığı belirlenmiştir. Ancak Sezyum<sup>137</sup> kaynaklı olmuş olan 15 Gy'lik  $\gamma$  ışınlanmasından edilen istatistikî sonuçlarında önemli ölçüde düşüşler tespit edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyali için daha önce *in vitro* kültür çalışmalarda başarılı bir sonuçlar vermiş olan kolza (*Brassica napus* L.)’da Gladiator, Nk petrol, Jura, Nelson, Elvis, Sary, Nk Caravel ve Tristan olarak 8 çeşit arasından bir çeşit seçilmiş ve kullanılmıştır. Çeşitler Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezinden temin edilmiştir.

#### 3.2 Ekipmanların Sterilizasyonu

*In vitro* doku kültür çalışmalarında, hem kullanılan laboratuvar hem de kullanılan bütün ekipmanların steril bir şekilde olması ve kontaminasyon olmadan daha başarılı sonuçlar almak amacıyla büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple her çalışmanın öncesinde tüm ekipmanlar özelliklerine ve biçimine göre otoklavda ve etüvde sterilize edilmiştir. Tüm tohumlar da yüzey sterilizasyon işlemi için kullanılan kavanoz şişeler, içine steril ortam dökülen veya başka amaçlar ile kullanılan cam petri kapları, magentalar gibi cam malzemeleri yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan kalın kağıtlara sarılmış olup, 200 °C’de 2 saat bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalar steril olan kabin içerisinde yapılmıştır. Kabinde kullanılan bistüri ve pens gibi tüm metal ekipmanların da sterilize edilmesinde önce %70’lik (v/v) etanol ile temizlendikten sonra kullanım esnasında 250 °C termal sterilizasyon cihazında metal aletlerin uçlarının sterilize etme işlemi gerçekleşmiştir. Eksplantların kesimi için kullanılan tüm bisturi uçları gerekli olduğundan özel korumasındaki yeni steril uç takılmış ve kullanılmıştır.

### 3.2.1 Büyüme ortamları ve kültür koşulları

Çalışmalarda büyüme düzenleyici maddeleri istenilen dozda, MS (Murashige ve Skoog 1962) olarak besin ortamına eklenerek %3'lük sukroz ekleyerek ve pH'sı, 5.8 için 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Ayrıca, ortamları otoklavlanmadan önce, katılaştırmak amacıyla 6.5 g/L agar ilave edilmiştir. Tüm ortamların hazırlığı için bidistile saf su kullanılmıştır. Daha sonra 1.4 atmosfer basınç altında 120°C'de 20 dk tutularak otoklavlanmıştır. *In vitro* koşullarda besin ortamına farklı amaçlar için değişik konsantrasyonlarda bitki düzenleyici maddeleri kullanılmıştır. Kolza bitkisinde MS ortamına 3.00 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA ilave edilmiştir. Bitki düzenleyici maddelerin stok solüsyonları, 1 mg/ml derişimde etanol veya 1N NaOH ile çözülüp, daha sonra 10 ml distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. büyüme düzenleyicileri stoktan kullandığında ortamları otoklavda steril edilmeden önce eklenmiştir. Tüm ortamların sterilizasyonu otoklavda 1.4 atmosfer basıncı altında 120°C'de 20 dk tutularak var edilmiştir. Çalışmalarda tüm kültürler iklim dolabında beyaz floresan ( $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ışığın altında 16 ışık 8 saat karanlık fotoperiyodunda  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulmuştur.

### 3.2.2 Tohumların yüzey sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında tohum veya eksplantların yüzey sterilizasyonu yöntemleri büyük önem taşımaktadır. Yüzey sterilizasyonu için eksplantlara uygulanacak olan kimyasalların, bitkiye zarar verme olasılığı çok yüksek olup, kullanılacak kimyasalların, en az miktarda ve en kısa sürede muamele edilmesi gerekmektedir.

Bitkiye ait tohumların bakteri, mantar vb. mikroorganizmalardan arındırmak için uygun dezenfektan dozu ve uygulama süresinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu hususta kolza tohumları için %10 luk (%5 NaOCl) kullanılmıştır. Tohumlar sodyum hipoklorit suyunda 25 dk çalkalandıktan sonra 3 kez 2'er dakika saf suda durulanmıştır. Yüzey sterilizasyon çalışmalarında manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Ardından yüzey sterilizasyonu yapılmış olan tohumlar MS ortamı içeren steril magentalara aktarılmıştır.



### 3.3 Eksplant İzolasyonu ve Rejenerasyonları

Kolza bitkisinin steril tohumlar hemen MS0 besi ortamda kültüre alınmıştır. Doku kültürü çalışmalarında steril tohumların çimlenmesi için ilk olarak 4.4 g/L MS 30 g/L sukroz ve katılaştırmak için 6.5 g/L agarı 5.8 pH'ya ayarlanmış besin ortamına aktarılıp  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta olan iklim odasında fide oluşumu için MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada eksplant olarak elde edilen fidelerden izole edilmiş hipokotil eksplantı ve tohum kullanılmıştır. İklim odasında (Growth Chamber)  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık ( $42 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) fotoperiyodu ayarlanarak 5-7 gün boyunca bekletilmiştir. Elde edilen hipokotil kısımları 5 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak 3.00 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA içeren ortamlarda adventif sürgün oluşumu için kültüre alınmıştır. Her peti kabında 20'şer eksplant olmak üzere 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Gelişen sürgünler, iklim odasında MS ortamında 4 hafta süreyle köklendirmeye bırakılmıştır. Daha sonra, yaklaşık 2.0 -4.0 cm uzunluğundaki sürgünler, torf içeren bidonlarda alt kültüre alınmıştır.

#### 3.3.1 *In vitro* koşullarda elde edilen bitkilerin dış ortamına/koşullarına alıştırılması

Steril doku kültürü ortamlarında yetişen sürgünlerin dış koşullara alıştırılmasında torf ve perlit karışımını içeren 5 litrelik su bidonları ortadan keserek ama kesilmiş kısmı ayırmaksızın kullanılmıştır. Daha sonra etrafını streç bantla kapatıp, iklim odasında birkaç gün %90 yüksek nisbi nem oranına kadar tutularak bitkilerin hem dış koşullara uyumu, hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır. Daha sonra, nem oranı kademeli olarak azaltılarak 5 gün sonra streç bantlar tamamen uzaklaştırılmıştır. Su bidonların içindeki bitkiler her 2 gün de bir sulanıp 3-4 hafta sonra yaklaşık 20-25 cm olan fideler seraya aktarılmıştır.

### 3.4 Gen Aktarım Çalışmaları

#### 3.4.1 Bakteri materyali

Gen aktarımı çalışmalarında p35S GUS-INT (35S promotor, neomisin fosfotransferaz (*Npt-II*) ve  $\beta$ -glukuronidaz (*GUS*) ve NOS terminatör) taşıyan plazmidini GV2260 suşu kullanılmıştır (Çöçü 2009).

Bakteriler 28°C'de seçici antibiyotikleri içeren sıvı LB (Luria Broth) ortamında büyütülmüştür. *A. tumefaciens* hatları 27-28°C'de uygun antibiyotik içeren MS besin ortamında 1-2 gün süreyle inkübatörde tutularak büyütülmüştür. Daha sonra yaralanmış eksplantlar sıvı olan rejenerasyon ortamında 1/50 oranında seyreltilerek bakteri kültürleri içerisinde 15-30 dk süreyle tutulmuş ve inokülasyon işlemi sağlanmıştır. İnokulasyondan sonra eksplantlar 1-2 günlük sürede ko-kültüvasyona alınmış ve daha sonra eksplantlar bitki seleksiyon ortamına aktarılmıştır. Bitki seleksiyon ortamında *Agrobacterium* bakterisinin gelişimini önlemek amacıyla da Duocid (500 mg/L) ve daha sonra gen aktarım işlemi yapılmış olan sürgünlerin seleksiyonu için kanamisin (50 mg/L) içeren MS rejenerasyon ortamları kullanılmıştır (Jonoubi 2009).

#### 3.4.2 Antibiyotikler

Bakteri ve bitki kültürlerinde farklı amaçlara göre farklı antibiyotikler kullanılmıştır. Bitkilerin seleksiyon ortamlarında Kanamisin ve Duocid, kullanmıştır ayrıca bakterilerin büyüme ortamlarına Kanamisin ve Rifampicin ilave edilmiştir. Çizelge 3.1'de kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonlar

Antibiyotikler	Konsantrasyonları (mg/L)	
	Bakteri Kültürü	Bitki Doku Kültürü
Ampicilin Duocid	--	500
Kanamisin (Km)	50	50
Rifampicin (Rif)	25	---

### 3.4.3 Bakteri kültürünün saflaştırılması, büyütülmesi ve muhafazası

Bakteri kültürlerinin büyütülmesi sıvı *A. Tumefaciens* kültürlerinin çoğaltılmasına, Luria-agar– LA (Oxford, England) besin ortamı içinde büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanmış, tek kolonileri steril lup aracılığıyla alındıktan sonra seçici antibiyotikler içeren 5-10 mL Luria broth - LB (5.0 g/L yeast extract, 10.0 g/L Tryptone, 0.5 g/L NaCl) ortamında 28°C’de 180 devir/dk da inkübatörde büyütülerek gen aktarımı işleminde kullanılmıştır. Ayrıca yeniden bireysel koloniler edinebilmek amacıyla, çok düşük miktarda bakteri kültürü için gerekli antibiyotik içeren agarlı besin ortamında steril bir lupla yayılmış olup, bu kültürleri içeren steril petri kutularını ters bir şekilde çevrilerek 28°C’de inkübe edilmiş olup, 2 gün sonra kolonilerin oluştuğu görülmüştür. Kontaminasyon olasılığını düşürmek ve ortadan kaldırmak amacıyla tüm bakteriyel çalışmalar steril kabin içerisinde yapılmıştır. Denemede GV2260 (p35S GUS-INT) bakteri hattı kullanılmış ve p35S GUS-INT plazmidin T-DNA bölgesinde seçici *Npt-II* geninin taşıdığından dolayı bakteri büyüme ortamında 50 mg/L kanamisin ve 25 mg/L Rifampisin kullanılmıştır (Khan 2003).

### 3.5 Işınlama Materyali $\gamma$ Radyasyonunun Uygulanması

Bu tez çalışmasında Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (SANAEM)’nde bulunan Kobalt 60 ( $Co^{60}$ ) gama ( $\gamma$ ) radyasyon kaynağı kullanılmıştır. Çalışmada “*Ob - servo sanguis*” gama ışınlama cihazı ile 440 Gy/h doz hızında istenilen dozlarda ışınlanmıştır. Bu kaynaktan eksplantlara

uygulanacak dozların belirlenmesi amacıyla yapılmış olan çalışmalarda 0, 20, 40, 80, 100, 120, 160 ve 180 Gy olarak gama ( $\gamma$ ) uygulanmıştır. Ayrıca kolza'nın tohumlarına için 0, 20 ve 40 Gy olarak farklı  $\gamma$  dozları uygulanmıştır. Optimize edilmiş dozlara göre *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı ve rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır.

### **3.6 *Agrobacterium tumefaciens* ile Gen Aktarımı**

#### **3.6.1 Hipokotil eksplantlarına gen aktarımı**

Kolza bitkisinde hipokotil eksplantları ve steril tohum sıvı ortamında *A. tumefaciens* süspansiyonu ile karıştırarak, kolza bitkilerinde hipokotil eksplantlar 25 dakika steril kurutma kağıt üzerinde beklettikten sonra 25 dakikada inokülasyona tabi tutulmuştur.

İnokülasyondan sonra eksplantlar 1-2 günlük sürede rejenerasyon ortamından ko-kültivasyona alınmıştır. Eksplantların rejenerasyon ortamında *Agrobacterium* bakterisinin gelişimini önlemek amacı için Duocid (500 mg/L), sadece gen aktarılma işlemi yapılmış sürgünlerin gelişimini sağlayabilmek amacıyla 50 mg/L kanamisin içeren MS seleksiyon ortamına aktarılmıştır. Seleksiyon ortamında gelişen sürgünler ilk önce sürekli bir şekilde kontrol altında izlenmiş olup büyütülmüştür. Daha sonra bu sürgünler, *in vitro* koşullarda köklendirilerek bitkiler geliştirilmiş olup, seraya adapte edildikten sonra aktarılan genler tespit edilmeye çalışılmıştır.

#### **3.6.2 Kolza tohumlarına gen aktarımı**

Kolza tohumlarının sterilizasyonundan hemen sonra kurutma kağıt üzerinde 20 dk kurutulmuştur. Daha sonra önceden çoğaltılmış ve OD'si 600 nm ayarlanmış bakterilerle sıvı ortamda inokülasyon işlemine geçilmiştir. Manyatik karıştırıcı kullanarak steril erlen de 24 saat tohumlar inokülasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 0.05 mM asetosiringon içeren MS ortamında 3-4 gün ko-kültivasyon ortamlarını iklim odasında beyaz floresan ( $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ışığın altında 16 ışık 8 saat karanlık

fotoperiyodun da  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta bekletilip izlenmiştir. Daha sonra çimlenmelerini sağlamak aynı zamanda oluşacak fideleri seçebilmek için seleksiyon ortamına alınmıştır. Seleksiyon ortamına ise MS0 ortamına 50 mg/L kanamisin ve 500 mg/L antibiyotik ilave edilmiştir.

### **3.7 Histokimyasal GUS Analizi**

Seçici rejenerasyon ortamı üzerinde gelişen transgenik aday sürgünler, kanamisin eklenmiş olan MS ortamında köklendirildikten sonra saksılara aktarılmıştır. Daha sonra bu bitkilerin transgenik adayı olmasını belirtmek için histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987)'in tarif ettiği biçimde yapılmıştır. Bitki dokuları X-GLUC (100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton X -100 ile 1 mM 5 bromo-4 Chloro 3 indolyl glucoronide) eklenmiş olan solüsyonda  $38^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra, bu dokular %96 'lık etanolde 2-3 gün bekletilerek eksplantdaki mavi bölgeleri belirlenmiştir.

### **3.8 DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu için kullanılan CTAB ekstraksiyon tamponu ve TE (Tris Elution) tampon için 1M Tris HCL (pH 8.0), 0.5 M EDTA (pH 8.0) ile 5M NaCl stok solüsyonu kullanılmıştır. Transgenik adayı bitkilerden alınan yaprak örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$ 'lik derin dondurucuya konarak PCR analizi için saklanmıştır. DNA izolasyonu için kullanılan ekstraksiyon tamponu ve TE (Tris Elution) tamponu aşağıda verildiği gibi stok halde hazırlanmıştır.

- I. CTAB (2%)
  - II. 1M Tris HCL (pH 8.0)
  - III. 0.5 M EDTA (pH 8.0)
  - IV. 5M NaCl
- Markaptoetanol

### 3.8.1 CTAB Tampon Hazırlanması

CTAB tamponu filtre steril edilen stok solüsyondan Çizelge 3.2’de verildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2 CTAB tampon hazırlanması için gerekli kimyasal ve miktarları

Açıklama	Hacim (1 örnek için)	Hacim (20 örnek için)
<b>CTAB</b>	12.5 mg	250 mg
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	360 µL	7.2 mL
<b>1M Tris</b>	62.5 µL	1.25 mL
<b>5M NaCl</b>	175 µL	3.5 mL
<b>0.5M EDTA</b>	25 µL	500 µL
<b>B-Mercaptoetanol</b>	1.25 µL	25 µL
<b>Toplam</b>		

### 3.8.2 TE Tampon Hazırlanması

TE tampon filtre sterilize edilen stok solüsyondan aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

- I. 10 ml 1 M Tris HCl pH 8.0
- II. 2 ml 0.5 M EDTA
- III. 1 L ddH<sub>2</sub>O .

1. Kesilen, yapraklar 1.5 ml’lik ependorf tüpler içerisinde sıvı azot kullanılarak ezilmiştir.

2. Toz haline getirilmiş yaprak dokusu üzerine 550 ml CTAB ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve 40-60 dk 65°C’de inkübe edilmiştir.

3. Daha sonra 13.000 rpm’de 7 dk santrifüj yapılmıştır.
4. Oluşan süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 550-750µl hacimde kloroform eklenmiştir. 15-30 dk 13.000 rpm’de santrifüj yapılarak örnekler çöktürülmüştür.
5. Oluşan süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak 750µl soğuk isopropanol eklendikten sonra 30 dk- gece boyunca -20 °C’de saklanmıştır.
6. Daha sonra 10-30 dk 13.000 rpm’de santrifüj yapılarak örnekler çöktürülmüştür.
7. Meydana gelen pellet, %70 ‘lik EtOH ile 7 dk 10.000 rpm’de santrifüj yapılarak kalan DNA çöktürülmüştür.
8. Pelletler havada kurutulmuş ve 50 µl TE içinde çözülmüştür.

Primer dizileri Transgenik bitkileri belirlemek için *Npt-II* ile *GUS* genleri PCR ile çoğaltılmış ve primer dizileri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 PCR işleminde kullanılacak primer dizileri

Hedef	Baz dizilişi
<i>Npt II</i> ileri primer	5’ - TTG CTC CTG CCG AGA AAG - 3’
<i>Npt II</i> geri primer	5’ - GAA GGC GAT AGA AGG CGA – 3’
<i>chv</i> ileri primer	5’ - CGA ACC GCT GTT CGG CCT GTG G - 3’
<i>chv</i> geri primer	5’GTT CAG CAG GCC GGC ATC CTG G 3’

*GUS* histokimyasal analizi sonucunda pozitif olan bitkilerin DNA izolasyonları yapıldıktan sonra PCR işlemine tabi tutulmuştur. İzole edilen DNA örnekleri PCR

analizi için reaksiyonları, biometra T-personal thermocycler da doğru koşulları her primere göre ayarlanarak gerçekleştirilmiştir.

*GUS*, *35S*, ve *Npt-II* genlerin transfer oldukları ve bitki genomuna entegre edilmesi açısından PCR analizleri yapılmıştır. PCR işleminde 35s promotor, *Npt-II* geni için hem sağ hem de sol sınır olarak ileri ve geri primerler kullanılmıştır. PCR analizi, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (15 mM), 0.5 mM dNTP (10 mM), 0.4 µM özgün ileri ve geri primerler, 1.4 × Taq DNA polimeraz tamponu (+KCl, -MgCl<sub>2</sub>), 100 ng genomik DNA, 1 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 2×steril destile su içeren toplam 25 µL hacmindeki karışımda gerçekleşmiştir. Ayrıca, her reaksiyon için bitki negatif kontrol (transgenik olmayan bitki), pozitif kontrol (plazmit) ve negatif kontrol (örnek yerine su, NTC) kullanılmıştır. PCR döngüsü bitikten sonra PCR'ın ürünleri ve molekül ağırlığı bilinen markör, ile birlikte agaroz jel elektroforezi yapılmıştır ve ayrıca DNA'nın UV de izletilebilmesi için Etidyum bromür eklenmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel UV lambası üzerinde izlenilmiş, fotoğrafı çekilmiştir.

### 3.8.3 PCR Döngüleri

- 1- 95° 7 DK
- 2- 95° 20 SANİYE
- 3- 58° 15 SANİYE
- 4- 72° 30 SANİYE
- 5- 72° 30 SANİYE
- 6- 4° PAUSE

2-4 40 DÖNGÜ

PCR MIX:

12.5 µl 2X kapa buffer

2 µl 5mM Primer (FW-RW) mix

0.2 µl Taq

10.3 Su

Üzerine 0.75 µl Önceki PCR mix



Kapa kodu: KK7251 Plant PCR kit

Yapılan gen aktarımın teyidi için yukarıda anlatıldığı PCR yapılmıştır. *A.tumefaciens* kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla kromozomal virülans geninde (*chv*) tasarlanan primer yardımıyla kontrol PCR yapılmıştır.

### **3.9 İstatistikî Analizler**

Denemeler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilmiş olan veriler bilgisayarda “MSTAT-C” programı aracılığıyla tesadüf parselleri deneme desenine göre analizler yapılmıştır. Ortalamaların değerlendirilmesi için t-test ve Duncan testleri uygulanmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizleri yapılmadan önce arcsin yüzde transformasyonuna tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Doku Kültürü Çalışmaları

Çalışmak istediğimiz çeşitlerin doku kültürü çalışmalarına uyumunu tespit etmek için ön deneme yapılmış ve 8 farklı kolza çeşidi *in vitro* şartlarında kültüre alınmıştır. Denemede çeşit olarak 'Gladiator', 'Nk Petrol', 'Nelson', 'Elvis', 'Nk Caravel' ve 'Tristan' kışlık ayrıca 'Jura' ve 'Sary' yazlık çeşitleri kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılmış kolza tohumları, MS0 ortamlarında çimlendirmeye alınmıştır. Daha sonra eksplant alımı için 7 günlük fideler elde edilmiştir. Bir haftalık fideden hipokotil eksplantları alınıp, 4 tekrürde her petri başına 20 eksplant olarak, 3.0 mg/L BAP 0.2 mg/L NAA ortamında 20 gün gelişmeye bırakılmıştır. Eksplantlardan oluşan sürgünlerin ölçümleri, sürgün rejenerasyon oranı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve kök oranı şeklinde yapılmıştır.

Varyans analizine göre çeşitler arasında *in vitro* ortamında rejenerasyon oranında ve sürgün sayısında 0.01 düzeyinde önemli farklılık göstermiştir. Ayrıca sürgün uzunluğu ve kök oranında 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır.

Rejenerasyon oranı %6.64-%77.29 olarak değişmiştir. En iyi rejenerasyon yüzdesi 'Nelson' çeşidinde bulunmuştur. Sürgün sayısı 0.50-3.41 olarak belirlenmiştir. En çok sürgün 'Jura' çeşidinde görülmüştür. Sürgün uzunluğu açısından 'Elvis' çeşidi 0.84 cm olarak 20 gün içinde en uzun sürgün olmuştur. Kök oranı %60.42-%100 arasında gelişme göstermiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından sürgün gelişimi

a. Elvis, b. Tristan, c. Nelson, d. Sary, e. Nk Caravel, f. Jura, g. Gladiator

Çizelge 4.1 Kolzanın 8 çeşidine ait hipokotil eksplantlarının doku kültürü tepkisi

Çeşit	Kültüre alınan eksplant sayısı	Rejenerasyon oranı (%)**	Sürgün sayısı (adet)**	Sürgün uzunluğu (cm)*	Kök oranı (%)*
Gladiator	80	34.83±3.15bc	2.33±0.45abc	0.69±0.06abc	100.09±0.00a
Nk petrol	80	58.22±4.81ab	0.50±0.17d	0.32±0.12bcd	100.00±0.00a
Jura	80	10.42±2.08c	3.41±0.82a	0.32±0.02bcd	100.00±0.00a
Nelson	80	77.29±6.10a	0.94±0.09cd	0.78±0.19ab	100.00±0.00a
Elvis	80	66.11±9.25a	1.23±0.14bcd	0.84±0.34a	88.89±11.14a
Sary	80	14.92±1.93c	2.31±0.15abc	0.21±0.01cd	100.00±0.00a
Nk Caravel	80	8.08±1.08c	2.50±0.28ab	0.18±0.01d	100.00±0.00a
Tristan	80	6.64±0.52c	1.66±0.33bcd	0.09±0.01d	60.42±20.51b

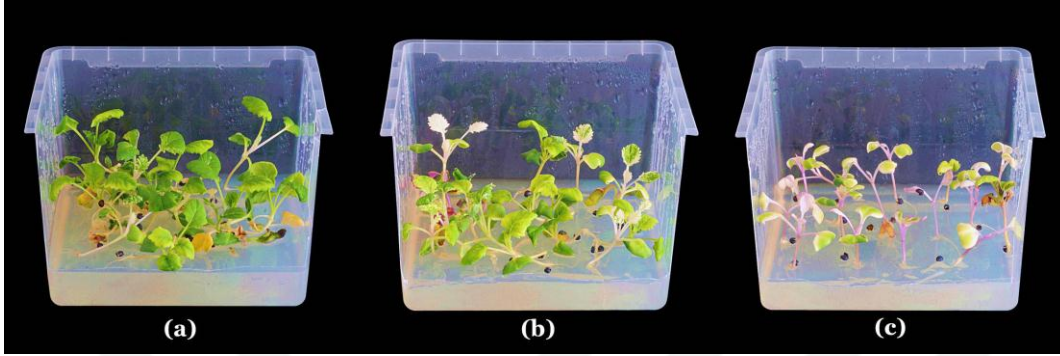
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar \*\* 0.01 düzeyinde ve\* 0.05 düzeyinde önemlidir.

## 4.2 Gen Aktarım Çalışmaları

### 4.2.1 Kolzada en etkili kanamisin dozunun belirlenmesi

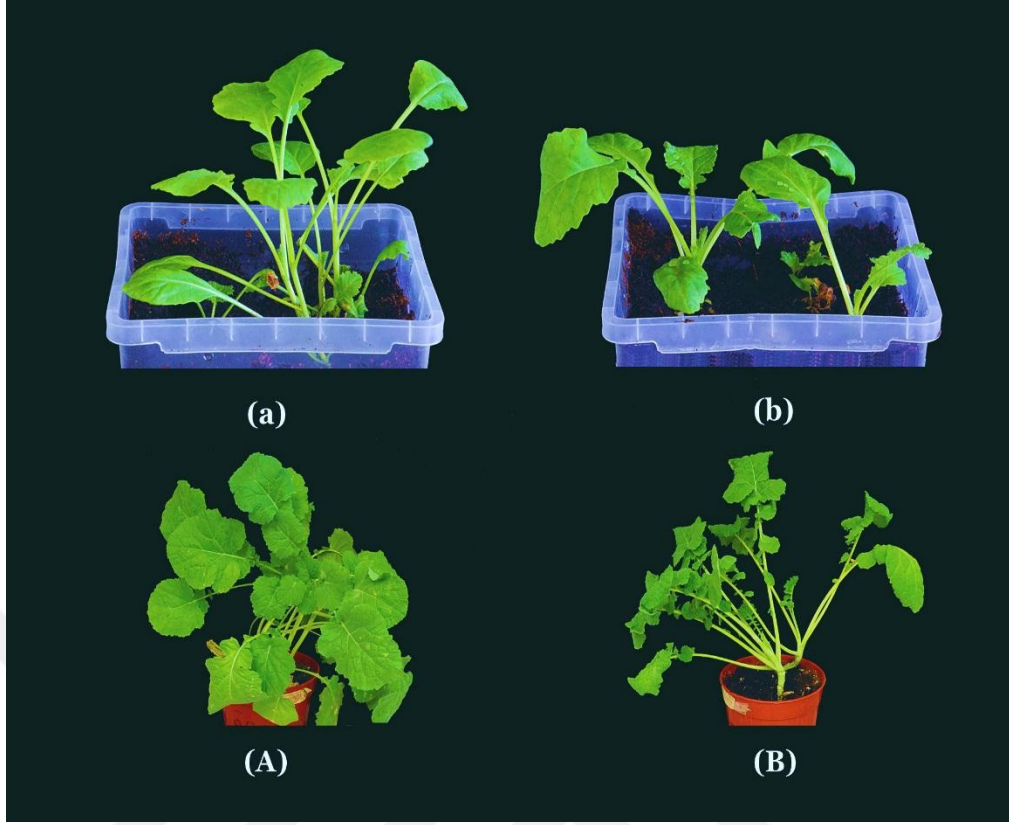
Transformasyon ve bitki seleksiyonu çalışmalarında markör seleksiyon geni olarak *Npt-II* geni içerdiğinden dolayı öncelikle kanamisin antibiyotiğinin en etkili dozu belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında en uygun kanamisin dozunu belirlemek amacıyla transgenik olmayan kolza tohumları 0, 25, 50, 100 ve 150 mg/L içeren MS besin ortamında 3 tekerrür ve her tekerrürde 20 tohum olarak çimlendirilmiştir. İki hafta sonra elde edilen sonuçlara göre MS0 kontrol ortamında tüm bitkiler %100 yaşarken, 25 mg/L kanamisin dozunda eksplantlar %27 oranında yaşayabilmiştir. Ayrıca, 50, 100 ve

150 mg/L kanamisin dozlarında, bitkilerin tümünde ölüm gerçekleşmiştir. Dolayısıyla denemenin sonucunda 50 mg/l kanamisin kolzada en uygun konsantrasyonu olarak aday transgenik bitkilerin seçiminde kullanılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Farklı kanamisin dozunun kolzada çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkisi  
a.b. c. 0, 25 ve 50 mg/L

Klizada 8 farklı çeşidin arasından seçilmiş olan ‘Nelson’ ve ‘Gladiator’ çeşidi *in vitro* doku kültürü çalışmalarının devamında kullanılmıştır. *A. tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı denemeleri için 10 tekrürde ‘Nelson’ ve ‘Gladiator’ çeşitleri, petri başı 20 hipokotil eksplantına inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra seleksiyon ortamlarında gelişmeye bırakılan kolza eksplantlarının 4 hafta sonra rejenerasyon oranı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, petri başına kallus sayısı, ile kök oluşumu oranı incelenmiştir. Ölçülmüş karakterlerin t-testinde *A. tumefaciens* ile inoküle edilmiş bitkilerde çeşitler arasında sürgün sayısı 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.3. a. A. Kolzada rejener olmuş 'Nelson', b. B. 'Gladiator' çeşitleri

Kolzada, 'Nelson' ve 'Gladiator' çeşitlerinin, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi ile inokülasyon çalışmasında rejenerasyon oranı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, petri başına kallus sayısı ve kök oluşumu oranı ortalamalarına bakıldığında, rejenerasyon oranı; 'Gladiator' çeşidinde %9.85 ve 'Nelson' çeşidinde %11.29 olarak belirlenmiştir. Sürgün sayısı bakımından en çok sürgün 'Gladiator' çeşidinde 2.70 adet saptanmıştır. Sürgün uzunluğu açısından 'Nelson' ve 'Gladiator' çeşitlerinde sırasıyla 0.91 cm ve 0.71 cm olarak gerçekleşmiştir. Petri başına kallus sayısında 'Gladiator' çeşidinde 12.80 adet ve 'Nelson' çeşidinde 20.70 adet kallus oluşmuştur. Kök oranı 'Gladiator' çeşidinde %43.75, 'Nelson' çeşidinde %39.50 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 ‘Gladiator’ ve ‘Nelson’ çeşitlerinde gen aktarımı sonuçları

Ortama	Rejenerasyon (%)	Sürgünsayısı (adet)	Sürgünuzunluğu (cm)	Kallus Oluşumu (%)	Kök Oranı (%)
Gladiator	9.85±0.90	2.70±0.21a	0.71±0.05	12.80±1.43	43.75±5.51
Nelson	11.00±0.09	1.41±0.14b	0.91±0.08	20.70±3.65	39.50±4.21

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar 0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.2 Kolzada farklı inokülasyon ortamlarının etkisi

*A. tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı frekansını yükseltmek düşüncesiyle kolzada farkı inokülasyon ortamları denenmiştir. Bu çalışmada inokülasyon ortamının kolzanın ‘Gladiator’ *A. tumefaciens* ile gen aktarırken, rejenerasyon oranına, sürgün sayısına, sürgün uzunluğuna, petri başına kallus sayısına ve kök oluşum oranına etkisi araştırılmıştır. İki farklı inokülasyon ortamı maya ekstrası pepton YEP (*yeast extract peptone*) ve su kullanılmıştır. Deneme 4 tekerrürde petri başına 20 hipokotil eksplantı ile yapılmıştır. Sürgün ve kallus sayısı 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.3 incelendiğinde, rejenerasyon oranı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, petri başına sürgün sayısı, kallus oluşumu ve kök oranına etkisinin ortalamalarına bakıldığında, rejenerasyon oranı, inokülasyonun su da gerçekleştirildiği durumda %15.62 ve YEP’de ise, %14.31 olarak belirlenmiştir. Sürgün sayısı adet olarak en çok su ortamında yapılan inokulasyonda 2.50 adet sayılmıştır. Sürgün uzunluğu açısından inokülasyonun su ve YEP’de gerçekleştirildiği ortamlarda sırasıyla 0.81 cm ve 0.55 cm olarak ölçülmüştür. Petri başına kallus sayısında inokülasyonun suda gerçekleştirildiği durumda 34.37 adet ve inokülasyonun YEP’de gerçekleştirildiği durumda ortalama 7.80 adet kallus oluşmuştur. Kök oranı inokülasyonun suda gerçekleştirildiği şartlarda %29.68, YEP’de gerçekleştirildiği durumda %33.87 ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Farklı inokulasyon ortamlarının gen aktarımı üzerine etkisi

Ortama	Rejenerasyon oranı (%)	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)	Kallus sayısı	Kök oranı (%)
SU	15.62±2.20	2.50±0.36a	0.81±0.16	34.37±4.97a	29.68±7.02
YEP	14.31±1.83	2.25±0.30b	0.55±0.04	7.80±1.91b	33.87±3.66

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar 0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.3 Kolza bitkisinde gama radyasyonunun hipokotil eksplantına gen aktarımı üzerine etkisi

Bu çalışmada, gama radyasyonu kullanılarak kolzada doku kültürü ve gen aktarımında etkisi araştırılıp, transgenik sürgün elde edilmeye çalışılmıştır. Bu denemede Kobalt 60 ( $Co^{60}$ ) gama ( $\gamma$ ) radyasyonun dozları olarak 20, 40, 60, 80, 120, 160 ve 200 Gy kullanılmıştır. Seleksiyon ortamlarında 1 ay boyunca *in vitro* gelişme sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir. Rejenerasyon incelenmesi ve gen aktarımı çalışmasını farklı dozlarda, sırasıyla canlılık oranında %10.42-%49.52 arasında değişiklik gösterilmiştir. Rejenerasyon oranı için gama dozları etkisi, sırasıyla %0.00-%15.19 arasında değişiklik bulunmuştur. Sürgün sayısında gama dozlarının etkisi, sırasıyla 0.00- 1.00 adet arasında farklılık göstermiştir. Sürgün uzunluğu karakteri açısından ise 0.00 – 0.33 cm olarak sonuç elde edilmiştir. Şekil 4.4'de 0 Gy ve 20 Gy dozlarında kolzanın Gladitor çeşidinden transgenik aday (kolza 458 bç *Npt-II* geni 20 Gy) bitkilerin Şekil 4.5'de PCR sonuçları verilmiştir. Dolayısıyla 0 ve 20 Gy dozlarında Gladitor çeşidinin hipokotil eksplantına gen aktarımında 60 adet eksplantın PCR (+) bitki sırasıyla 1 ve 2 adet transgenik aday bitki tespit edilmiştir (Şekil 4.4 - 4.5).

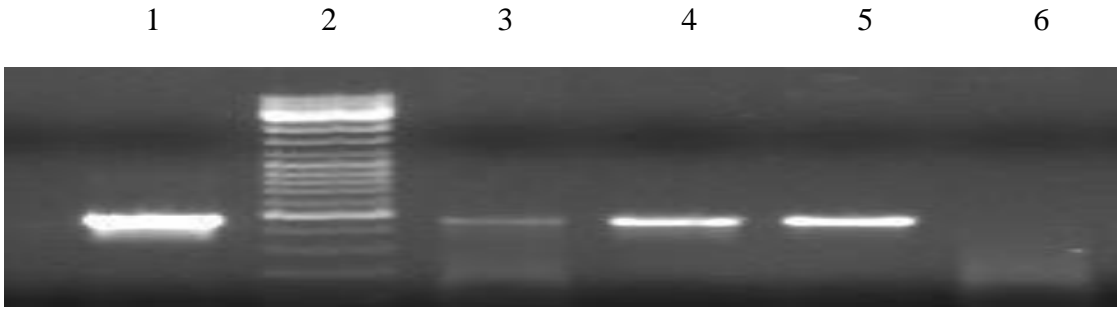


Şekil 4.4. a. Işınlanmış olan kolzanın Gladitor çeşidinde transgenik aday bitkiler 0 Gy, b. 20 Gy

Çizelge 4.4 Farklı gama ( $\gamma$ ) radyasyonuna maruz bırakılan 'Gladiator' çeşidinin hipokotil eksplantına gen aktarımı

Gama dozları	Rejenerasyon (%)	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)
20	15,19 a	1.00 a	0.33
40	0.00 b	0.00 b	0.00
60	0.00 b	0.00 b	0.00
80	0.00 b	0.00 b	0.00
100	0.00 b	0.00 b	0.00
120	0.00 b	0.00 b	0.00
160	0.00 b	0.00 b	0.00
180	0.00 b	0.00 b	0.00

Aynı sütunlarda farklı harflerle, gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.5 Kolzanın Gladitor çeşidinden transgenik aday bitkilerin PCR sonucu

1: Pozitif kontrol (Plasmid DNA) 2: ladder Mix (Fermentas) 3: 0 Gy Transgenik 4-5: 20 Gy Transgenik bitki (kolza 458 bp Npt-II geni) 6: Negatif kontrol (Transgenik olmayan bitki)



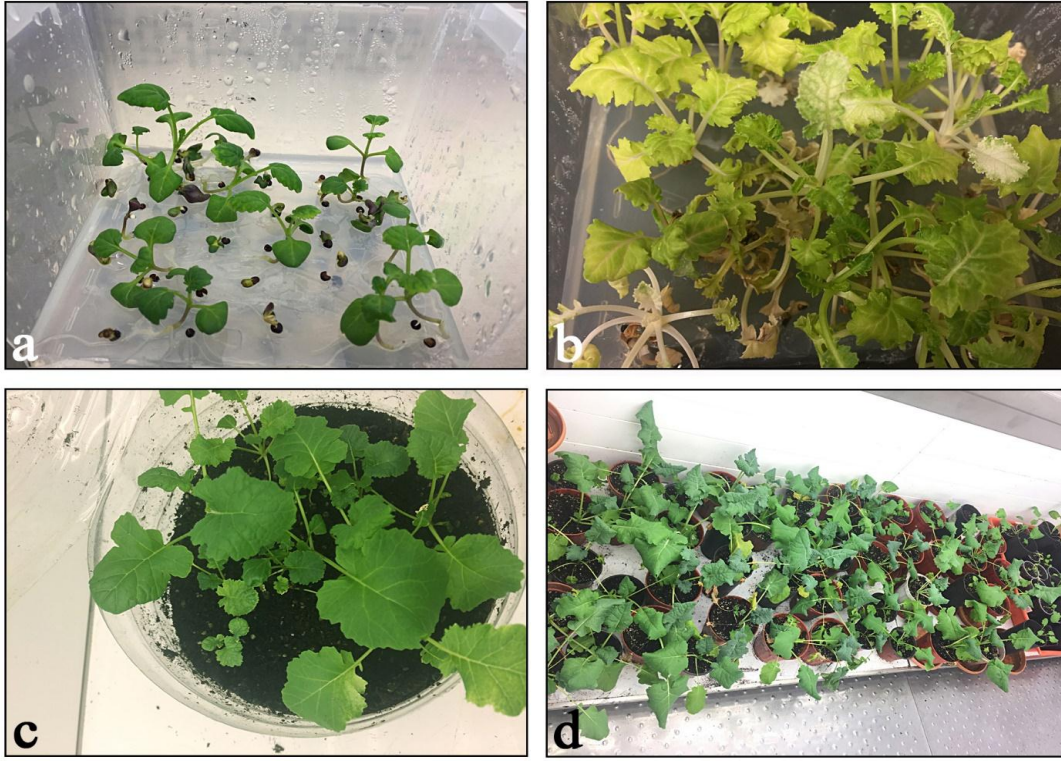
'Gladiator' çeşidinin seleksiyon ortamında 1 ay yaşadıkdan sonra transgenik aday bitkileri seçilmiştir. Bitkileri dış şartlara adapte etmek için ilk önce saksılarda toprağa şaşırtılmıştır ve daha sonra nemli poşetlerle kapatılmıştır. İklim odasında bitkilerin üzerindeki poşetleri 2-3 gün ara ile delerek ortama uyumu sağlandıktan sonra poşetleri kaldırıp 3 hafta boyunca sulama yapılmıştır.

#### 4.2.4 Kolzada tohuma uygulanan gama radyasyonun tohumlara gen aktarımı üzerine etkisi

Bu çalışmada kolzanın 'Gladiator' çeşidinin tohumları kullanılmıştır. 0, 20 ve 40 Gy gama uygulanıp, steril edilmiş tohumların 24 saat inokülasyon süresine tabi tutulan kolza tohumları daha sonra MS ortamında 3-4 gün ko-kültivasyon ortamlarını iklim odasında beyaz floresan ( $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ışığın altında 16 ışık, 8 saat karanlık fotoperiyodunda  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta bekletilip izlenmiştir. Daha sonra 50 mg/l kanamisin ve 500 mg/l duocid içeren MS ortamında 6 hafta gelişmeye bırakılmıştır. Bu çalışma üç gama dozu ve 20 tekrürde tesadüf parseller deneme desenine göre yapılmıştır. Her uygulamada 0, 20 ve 40 Gy'de 400 tohuma yapılan inokülasyondan sonra seleksiyon ortamında 6 hafta selekte edilmiş olan bitkiler toprağa aktarılmıştır (Şekil 4.6- 4.8). Toprakta gelişmiş olan bitki sayısı 0, 20 ve 40 Gy dozlarında sırasıyla 54, 42 ve 27 adet olarak belirtilmiştir. Çizelge 4.6'da çimlenen tohum sayısı, çimlenme yüzdesi (%), toprakta gelişen bitki sayısı ve *chv* geni analizinden sonra PCR(+) bitki sayısı verilmiştir (Şekil 4.7- 4.11).

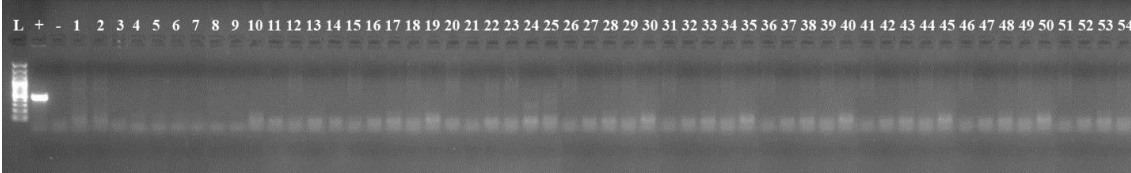
Çizelge 4.5 Farklı gama ( $\gamma$ ) radyasyon dozlarının kolzada 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına yapılan gen aktarımı üzerine etkisi

Gama Radyasyon Dozu (Gy)	İnoküle Edilen Tohum Sayısı (Adet)	Çimlenen Tohum Sayısı (Adet)	Çimlenme Yüzdesi (%)	Toprakta Gelişen Bitki Sayısı (adet)	<i>chv</i> geni Analizinden Sonra PCR (+) Bitki Sayısı
0	400	394	98.50	54	0.00
20	400	276	69.00	42	25.00
40	400	214	53.50	27	11.00



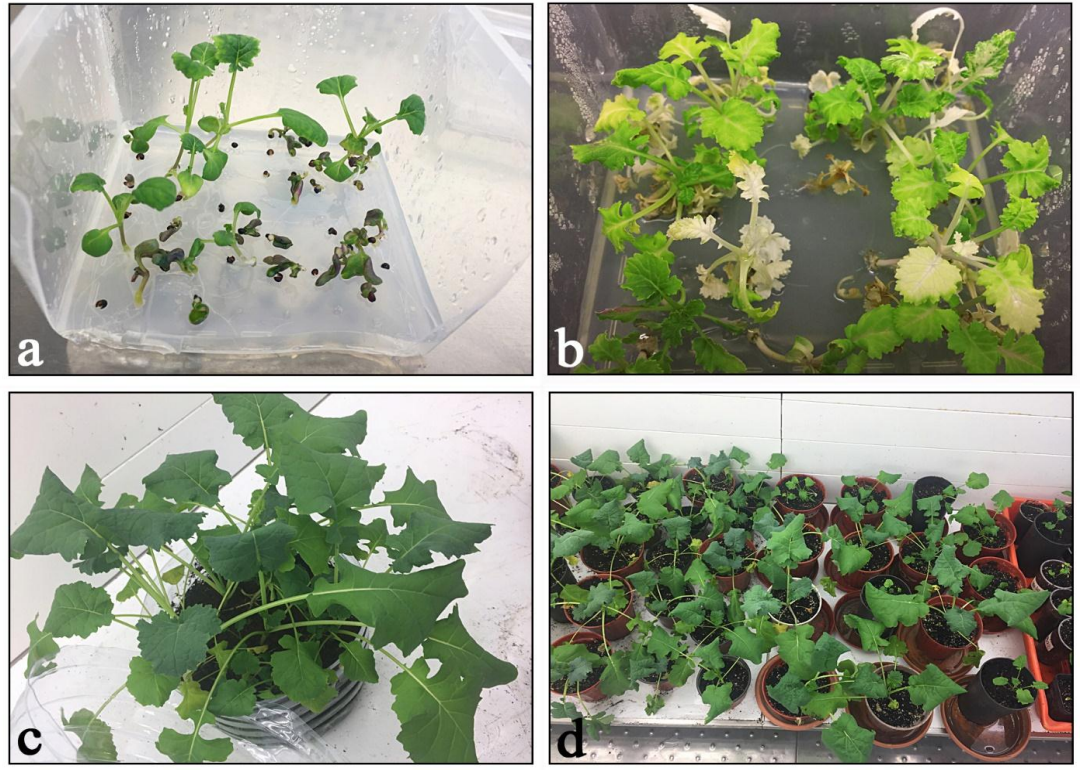
Şekil 4.6 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 0 Gy (kontrol) gama radyasyonunun *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi

a. İnoküle edilen tohumların seleksiyon ortamında çimlenmesi, b. Magenta kabında seleksiyon ortamında gelişen fideler, c-d. Toprakta bitki gelişimi



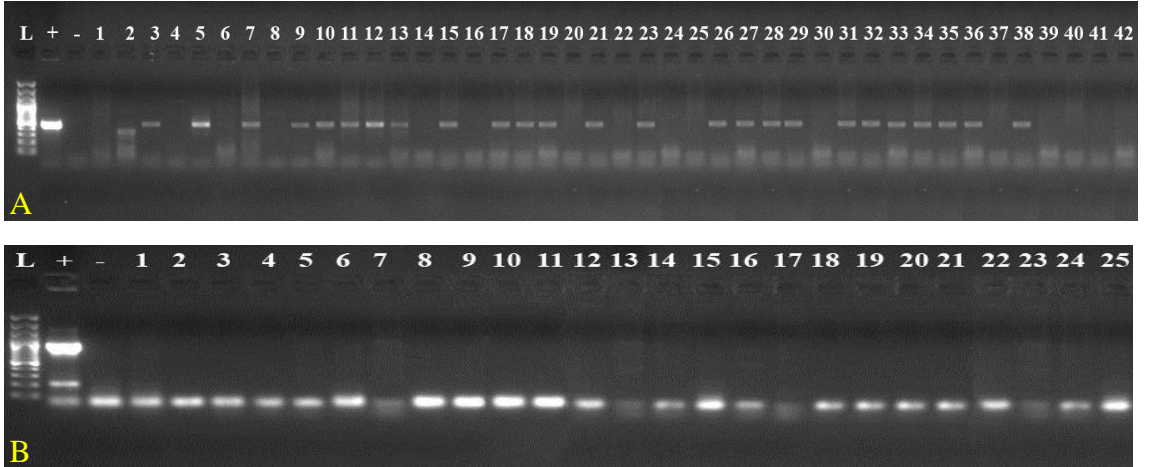
Şekil 4.7 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 0 Gy (kontrol) gama radyasyonunun *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı sonucu gelişen transgenik aday bitkilerde Npt-II geni varlığının belirlenmesi

Çizelge 4.6'da belirtildiği inoküle edilmiş gibi 400 'Gladiator' tohumunda 0, 20 ve 40 Gy dozlarında 6 hafta seleksiyon ortamında seçilmiş olan bitkilerin toprağa aktarıldıktan sonra PCR (+) bitki sayısı sırasıyla 0, 25 ve 11 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir.



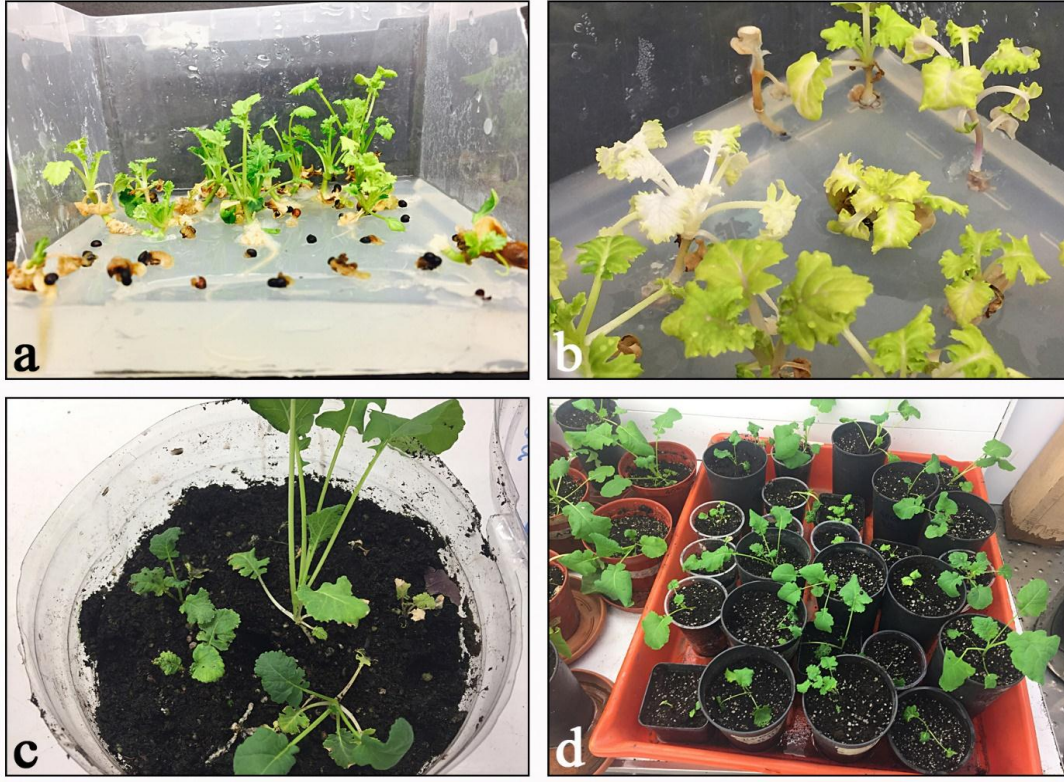
Şekil 4.8 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 20 Gy gama radyasyonunun *A.tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi

a. İnokule edilen tohumların seleksiyon ortamında çimlenmesi, b. Magenta kabında seleksiyon ortamında gelişen fideler, c-d. Toprakta bitki gelişimi



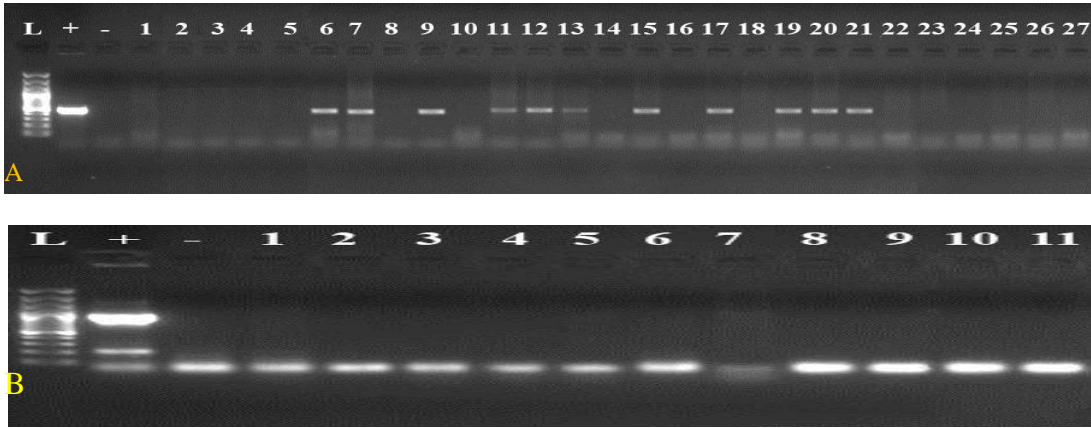
Şekil 4.9 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 20 Gy gama radyasyonunun *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı sonucu

A. Gelişen transgenik aday bitkilerde *npt-II* geni varlığının belirlenmesi B. PCR (+) bitkilerde *chv* geni varlığının kontrolü



Şekil 4.10 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 40 Gy gama radyasyonunun *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı üzerine etkisi

a. İnoküle edilen tohumların seleksiyon ortamında çimlenmesi, b. Magenta kabında seleksiyon ortamında gelişen fideler, c-d. Toprakta itki gelişimi



Şekil 4.11 Kolza 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan 40 Gy gama radyasyonunun *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı sonucu

A. Gelişen transgenik aday bitkilerde Npt-II geni varlığının belirlenmesi, B. PCR (+) bitkilerde chv geni varlığının kontrolü

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Brassica*, *Brassicaceae* familyasındaki ekonomik olarak en önemli cinstir. *Brassica*'ın birkaç çeşiti, önemli yağ bitkileri, sebzeler, yem bitkileri ve hardal gibi çeşnilerin üretiminde kullanılır. *Brassica* bitkileri arasında, yağlı tohumlar en yüksek ekonomik değere sahiptir. Yağlı tohumluk *Brassica*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, *Brassica rapa* (*Brassica campestris*) ve *Brassica napus*'ta toplamda bulunur ve genel olarak kolza denir. *Brassica* yağları, alifatik glukozinolatlar ve erusik asit açısından düşük olduğunda, çeşitleri giderek yaygınlaşan kolzaya Kanola adı verilmiştir. Genellikle *B. napus* olan Kanola, dünya genelinde sıkça ilgi görmüştür ve yakında kültürü yapılan en popüler yağlı tohumlarından olacağı ön görülmektedir. Şu anda kanola kalitesinde *B. rapa* ve *B. juncea* gibi türler bulunmaktadır. Kanola yağı, doymuş yağda çok düşük olduğu için pişirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. *Brassica nigra* esasen yağa ek olarak bir hardal çeşnisi olarak kullanılır. *Brassica* bitkilerinde yapılan araştırmaların çoğu yağlı tohum ve sebze biyotipleri üzerinde yapılmasına rağmen, son yıllarda çeşitli türlerden hızlı yaşam döngüsü olan *Brassica* biyotipleri dikkat çekmektedir. Bu hızlı yaşam döngüsüne sahip tipler, 20-60 gün arasında kısa ömürlü ve küçük boylu genetik seçimlerdir (Williams ve Hill 1986). Hızlı yaşam döngüsü olan *Brassica*, bazı genom boyutları nedeniyle, bu durumlarda *Arabidopsis thaliana*'nın sadece 3-4 kat daha büyük olması nedeniyle çekici model laboratuvar bitkileridir. *Brassica*'nın doku kültürü, transformasyon ve moleküler yetiştirme alanlarında önemli araştırmalar yapılmıştır.

### 5.1 Kolzada *In Vitro* Doku Kültürü ve Transformasyon

*In vitro* kültür, bitki hücrelerinin totipotent doğasını 1958'da kullanan, Steward ve diğerleri tarafından ilk defa gösterilen, bitki biyoteknolojisinin önemli bir aracı olmuştur. *In vitro* kültür, üstün klonların hızla çoğaltılmasını kolaylaştırır ve genetik mühendislik tekniği ile bitkilerin geliştirilmesi için bir ön şarttır. Doku kültürü, haploidler, somaklonal ve gametoklonal ürün geliştirerek genetik değişkenlik yaratmak için kullanılmaktadır. Doku kültürü, genetik mühendislik teknikleriyle birlikte, gen aktarımıyla spesifik özelliklerin dahil edilmesi için başarıyla kullanılmıştır. Tohumların steril edilmesi ve daha sonra MS veya B5 besi ortamında bitki büyüme düzenleyicilerin

farklı kombinasyonlarıyla kolzanın doku kültürü çalışmalarında çimlenme ve rejenerasyon artış sağlanmaya çalışılmıştır. Burnett vd. 1994 Horizon çeşidinin çimlenmesinde MS ortamında BAP veya NAA eklenmesinin sürgün rejenerasyonuna belirgin bir şekilde etkisini tespit etmişlerdir. Çimlenme ortamının hormon olarak BAP eklenildiğinde, çimlenen fidelerden izole edilen eksplantlara bakıldığında %19.2 oran olarak sürgünlerde rejenerasyon görülürken, MS çimlenme ortamda ise 4.44 µM BAP içerdiğinde bu oranın da %33.2 olduğu belirtilmiştir. Sürgün rejenerasyonu için etilen inhibitörüne ihtiyaç duyulmamasına (Fry vd.1987, Radke vd. 1992) rağmen, diğer *Brassica* türlerinden elde edilen sürgün rejenerasyonlarında etilen inhibitörlerinin önemli roller oynadığı (Sethi vd. 1990, Radke vd. 1992) belirtilmiştir. Eapen ve George 1997 gümüş tiyosülfatın ve gümüş nitrat kullanmışlardır. Bu tez kapsamında tohumların %10 luk Sodyum Hipoklorit (%5 NaOCl) 25 dk çalkalandıktan sonra 3 kez 2'er dakika saf suda durulanması ile %98.5 çimlenme elde edilmiştir.

Organogenezis doku kültürü teknikleri, bitki transformasyonu ve rejenerasyonu için önemli bir araçtır. *Brassica* türleri doku kültürü amaçları için yaygın olarak kullanılmaktadır. *Brassica* türlerinin çoğunda araştırmacılar rejenerasyon protokolleri geliştirmişlerdir. Eksplant seçimi için organogenez yoluyla bitkilerin rejenerasyonu için kotiledon eksplantını (Sharma vd. 1990; Hachey vd. 1991, Ono vd. 1994, Gaur vd 1997), hipokotiller eksplantını (Burnett vd. 1994, Gaur vd. 1997, Darçin 2003 ve Das vd. 2006) ve yaprak (Radke vd. 1992), genç yaprak ve epidermal tabakası çıkartılmış gövde (Kalabak 2004), epidermal ve alt epidermal hücrelerin (, Klimaszewska ve Keller 1985 ve Mısra 1990) ince hücre katmanları, ezilmiş apikal tomurcuklar (Surya vd. 1991), pedankül segmentleri (Eapen ve George 1997), Kökler (Xu vd. 1982) ve protoplastlar (Kik ve Zaal 1993, Glimelius 1984 ve Hu vd. 1999) gibi çeşitli dokulardan elde edilmiştir. Bununla birlikte, hipokotil bölümler doku kültürü için en fazla istenen eksplant olmuş ve rejenere olma ihtimalinden dolayı çoğu *Brassica* türü ve kolza çalışmaları için kullanılmıştır. Bu tez kapsamında çalışmaların amacı gen aktarım gama stresinin etkisinden dolayı hipokotil eksplantlarından kayda değer sonuç alınmamıştır.

*Brassica*'da rejenerasyon, genotipe bağımlıdır ve çeşitli türlerde değişmektedir. *B. napus*'da test edilen 100 çeşite %0 ile % 91 arasında büyük bir varyasyon görülmüştür

(Ono vd 1994). bir başka çalışmada *B. napus* GSL 1, Westar'dan (transformasyonun standart çeşidi) daha iyi rejenerasyon elde edildiği belirtilmiştir (Phogat vd. 2000). Hint çeşitlerinde, *B. juncea*'daki Avustralya çeşitlerine göre daha iyi rejenerasyon oranları bulunmuştur (Pental vd. 1990). Yadav vd. 1991'da rejenerasyon frekanslarının kotiledon eksplantları kullanarak üç genotipte anlamlı olarak farklı olduğunu bulmuşlardır. *Brassica napus* L. ssp. *oleifera*'nın yazlık çeşidi olarak Hansen, Spok, Quinta, Kosa, Honk, Helios, Star, Darmor ve Bienveni ayrıca kışlık çeşidi olarak Spok Helios Quinta Tarok Darmor ve Westar çeşitlerini Mirici (2001) çalışmasında, çeşitlerin arasında doku kültürü çalışmalarında faktörlere benzerlik ve farklılığın olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında *Brassica napus* L. ssp. *oleifera*'da 2 yazlık (Sary ve Jura) ve 6 kışlık çeşit (Gladiator, Nk petrol, Nelson, Elvis, Nk Caravel ve Tristan) çeşitlerini rejenerasyon kabiliyeti olarak incelenmiştir daha sonra çeşitler arasından Gladiator ve Nelson çeşidi ile gen aktarımı uygulanması yapılmıştır. Daha sonra çimlenme yüzdesine bakıldığında %98.5 çimlenme oranına sahip olan 'Gladiator' çeşidinin kullanımı denemelerde tercih edilmiştir.

Eksplant yaşına bakıldığında çoğu *Brassica* türünde rejenerasyon eksplant yaşına bağlıdır. Genç eksplantların çoğu *Brassica* türünde eski eksplantlardan daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Çoğu araştırmacı, 3-4 günlük eksplantların optimal rejenerasyon oranlarına sahip olduğunu bulmuşlardır. Örneğin, *B. rapa* ssp *oleifera*'nın 3 günlük fidelerin eksplantları, 4 günlükten daha iyi rejenerasyon sağlamıştır (Burnett vd. 1994). *B. napus*'da, 4 günlük fidan eksplantlarının optimal olduğu kanıtlanmıştır ve %90 rejenerasyon oranı sağlanmıştır. (Ono vd. 1994). Hızlı yaşam döngüsü olan *B. rapa*'da fidelerdeki 3 günlük eksplant eskilerden daha iyi rejenerasyon göstermiştir. (Teo vd. 1997). Yukarıdaki tüm vakalarda fide yaşı 4 günden fazla yükseldiğinde rejenerasyon kapasitesi azaltmıştır. *B. juncea*'da (Mısra 1990, Sharma vd. 1990) ve *B. rapa*'da (Hachey vd. 1991), 3-5 günlük fideler optimal sürgün rejenerasyonuna sahipken (Burnett vd. 1994, Ono vd. 1994, Gaur vd. 1996 ve Zaka 2004) *Brassica juncea* cv RH 30 ve RH 8812'de kotiledon ve hipokotil eksplantlardan bitki rejenerasyon için optimum 5-6 günlük fidan bulunmuştur. 7 günlük fidelerden, Öktem vd. (1999), Damgaard ve Rasmussen (1991). Bu tez çalışmasında eksplantlar 7 günlük fidelerden elde edilmiştir. 1 haftalık fidelerden hipokotil eksplantları incelenmiştir.

MS ortam bileşenleri açısından incelediğinde; çeşitli kültür ortamlarının katkıları *Brassica*'daki rejenerasyon verimliliğini artırabilmektedir. Spermidin biyosentezinin bir inhibitörü olan metilglükoksal-bis- (guanilhidrazon) (MGBG), *Brassica* ve diğer cinslerde rejenerasyon frekanslarını % 7'den % 63'e yükseltmiştir (Sethi vd. 1990) ve diğer araştırmacılar, *B. napus*'un sürgün rejenerasyon üzerine MGBG'nin olumlu bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (O'Neill vd. 1996).

Çeşitli genetik mühendislik araçlarının varlığı, çeşitli mahsullerde tarımsal önemi olan yeni ve yararlı genlerin tanıtılması için geniş fırsatlar yaratmıştır. Bu tür teknolojilerin uygulanması, yabancı DNA'yı bitki hücrelerine sokmak için güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemlerin geliştirilmesini ve *in vitro* kültürlerden normal ve verimli transgenik bitkilerin rejenerasyonunu gerektirir. Bitki biyoteknolojisinin önemli bir bileşeni, yararlı genlerin girilmesini sağlayan genetik transformasyondur.

## **5.2 *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı**

*Agrobacterium tumefaciens*, taç hastalığına ve birçok agronomik ve spesifik özelliklerin taşınması açısından önemli transgenik bitkiler yaratmak için bir araç olarak kullanılmaktadır.

Turgut (1994) ve Hong (1997) kotiledon eksplantı ile çalışmışlardır halbuki (Burnett 1994) kotiledon ve hipokotil eksplantları arasında en iyi sonucu hipokotil eksplantından elde ettiğini belirtmiştir. Hipokotil eksplantlarını, Damgaard ve Rasmussen (1991), Radke (1992) ve Mirici (2001) daha sonra Wu (2009) tarafından bildirilen transformasyon çalışmalarının büyük bir kısmı için yaygın olarak kullanılmıştır. (De Block vd. 1989, Yadav vd. 1996, Yadav vd. (1997), Wang vd. 2005, Moghaieb vd. 2006 ve Kong vd. 2009) Kotiledonlar ve yaprak petiolleri Liu vd. (2011) gibi diğer eksplantların kullanımı konusunda başarılı raporlar olmasına rağmen, bu tez kapsamında tohum gen aktarımında transgenik bitkilerin gelişmesi için başarıyla kullanılmıştır.



Bazı araştırmacılar (Singh vd. 2009), eksplantların inokülasyon öncesi iki gün, Barfield ve Pua (1991) tarafından bir gün, oysa Das vd. (2006) kültür öncesi 3-4 gün kültür ortamında bekletilmesini *Brassica* türlerinin transformasyon frekansını arttırmasına olumlu etkisinin olduğunu önermişlerdir.

### **5.2.1 *Agrobacterium* konsantrasyonu ve inokülasyon süresi**

*Agrobacterium* konsantrasyonu genetik dönüşüm frekansını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Çeşitli araştırmacılar eksplantların enfeksiyonu için kullanılan bakteri konsantrasyonunun optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. *Brassica* transformasyonu için, *Agrobacterium* konsantrasyonu genellikle OD 600 nm'de 0.01 ve 1.0 arasında değişir (De Block vd. 1989, Wang vd. 2005, , Longdou vd. 2005, Das vd. 2006, ve Moghaieb vd. 2006 Wu vd. 2009). Eksplantların *Agrobacterium* ile inokülasyon süresinin birkaç dakika ile 30 dakika arasında değiştiği rapor edilmiştir. Li vd. 2009, eksplantlara sadece 1-2 dakika enfeksiyon vermişken, Singh vd. 2009, inokülasyon aşamasını 30 dakika uzatmıştır. Eksplantların yapısına göre değişen süre bu tez kapsamında hipokotik eksplantında 25 dk ve kolza tohumlarında ise OD 600 nm'de 0.06'ya ayarlanmış baktteri ile 24 saat süresince inokülasyon yapılmıştır.

### **5.2.2 Kolzada en etkili kanamisin dozunun belirlenmesi**

Transgenik hücre ve dokuların seçimi için kullanılan seleksiyon ortamına ilave edilecek kanamisin antibiyotiği dozunu belirlemek için gen aktarılacak tohumlara 0, 25, 50, 100 ve 150 mg/L kanamisin içeren ortamda kültüre alınmıştır. 50 mg/L ve üzerindeki kanamisin dozu çimlenme ve fide büyümesini tamamen durdurmuştur. Dokuların canlılığını kaybetmesine neden olan en düşük dozun 50 mg/L kanamisin olduğu görülmüş ve gen aktarımı çalışmalarında kullanılmıştır.

### 5.2.3 Acetosyringone'un etkisi

Bazı fenolik bileşikler, vir genlerinin ekspresyonunu indükleyen acetosyringone, çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiş genetik transformasyon deneylerinde sıkça kullanılmıştır. Cardoza vd. (2003)'de 0.05 mM acetosyringone kullanımını önermiştir daha sonra Moghaib vd. (2006) ve Wu vd. (2009), kolzada transformasyon için 100 µM kullanırken, Li vd. (2009)'da 200 µM acetosyringone konsantrasyonunun transformasyon deneyleri için uygun olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla doğal olarak yeterli miktarda vir genini indükleyici fenolik bileşik, acetosyringone ilavesi yapmayan bitkiler, ön kültür veya birlikte yetiştirme zamanında, bu bitkilerdeki transformasyon verimliliğini arttırdığı bulunmuştur. Bu tez kapsamında ise hipokotil eksplantı ve tohumlara inokülasyon sürecinde ve ko- kültürasyon ortamına 0.05 mM acetosyringone eklenmiştir.

### 5.2.4 Kolzada farklı inokülasyon ortam etkisi

*A. tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı frekansını yükseltmek düşüncesiyle kolzada farklı inokülasyon ortamlar denenmiştir. Bu çalışmada inokülasyon ortamının kolzada *A. tumefaciens* ile gen aktarırken, rejenerasyon oranına, sürgün sayısına, sürgün uzunluğuna, Petri başına kallus sayısına ve Kök oluşum oranına etkisi amaçlanmıştır. İki farklı inokülasyon ortamı YEP (yeast extract peptone) ve su kullanılmıştır. rejenerasyon oranı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, "petri başına sürgün" sayısı, kallus" oluşumu ve kök oranına etkisinin ortalamalarına bakıldığında rejenerasyon oranı, inokülasyonun su da gerçekleştirildiği ortamında %15.62 ve YEP'de ise, %14.31 olarak belirtilmiştir. Sürgün sayısı adet olarak en çok sürgün inokülasyonu suda ortamında 2.50 adet sayılmıştır. Sürgün uzunluğu açısından inokülasyonun su ve YEP' de gerçekleştirildiği ortamlarda sırasıyla 0.81 cm ve 0.55 cm olarak 30 gün içinde uzamıştır. Petri başına Kallus sayısında inokülasyonun su da gerçekleştirildiği ortamında 34.37 adet ve inokülasyonun YEP'de gerçekleştirildiği ortamında ortalama, 7.80 adet kallus oluşmuştur. Kök oranı inokülasyonun su da gerçekleştirildiği ortamında %29.68, inokülasyonun YEP'de gerçekleştirildiği ortamında %33.87 gelişme göstermiştir.

### 5.2.5 Ko-kültivasyondan sonra aşırı bakteriyi öldürmek için antibiyotikler

Birlikte yetiştirildikten sonra *Agrobacterium*'un büyümesi transformasyonun verimliliğini düşürür, bu nedenle *Agrobacterium*'un uzaklaştırılması gereklidir (Jabeen vd. 2009). Demek ki, eksplantların *Agrobacterium* hücreleri ile birlikte ekiminden sonra, bitki doku kültürü ortamı üzerindeki çoğalmasını ve büyümelerini durdurmak önemlidir. *Agrobacterium* büyümesini engellemek için kullanılan antibiyotikler son derece etkili, ucuz, kararlı olmalı ve bitki rejenerasyonu üzerinde olumsuz bir etkisi olmamalıdır. Sharma vd. (2009) bildirdiği gibi, karbenisilin, sefotaksim ve timentin (100-500 mg/L) *Agrobacterium* büyümesini baskılamak için en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Singh vd. (2009), Das vd. (2006), Wang vd. (2005), Moghaieb vd. (2006) ve Wu vd. (2009). Bu tez kapsamında antibiyotik 500 mg/L *Ampicilin* (Duocid) kullanılmıştır.

### 5.2.6 Kolzada gama radyasyonu uygulaması ve bitkide gen aktarımına etkisi

Gen aktarılmış olan sürgün frekansında %1 oranı bile gerçekleşse bu artış, çok önemli bir başarı sayılmaktadır. Bitkilere Gen aktarılmış sürgünlerin frekansında yükselişin görülmesi için bakterinin yoğunluğu ve ayrıca inokülasyonun süresi gibi parametrelerde birtakım değişiklikler uygulanmaktadır. Böyle yöntemlerle gen aktarılmış olan hücre ile sürgün frekansının artışı hedeflenmektedir. İnokülasyon metodundaki değişik uygulamalar da gen transferinde ve sonuç olarak transgenik sürgün oluşumunun frekansını önemli bir ölçüde artırabilmektedir.

İyonlaştırıcı olan radyasyonun yüksek uygulanan dozları bitkilerin solunumda artış, enzim aktivitesinin başlatılmasına yönelik, etilen üretimi için yükselme ve ayrıca bazı proteinlerin birikimi gibi fizyolojik değişme neden olmaktadır. Bitkide hücre duvarları ve membranlar ayrıca DNA gibi makromoleküller iyonlaştırıcı özelliğe sahip olan radyasyondan dolayı biyokimyasal ve fiziksel olarak önemli ölçüde etkilendiklerini belirtmişlerdir (Nagata vd. 1999). Yüksek radyasyon ile bitki hormonlarında ve sentezlerini olumsuz olarak etkilediğini; ışınlanmış olan hücrelerin büyüme uyarıcısı maddelere karşı duyarlılığını azalttığını bildirmişlerdir (Lage vd. 2002).

Yüksek dozların aksine düşük  $\gamma$  radyasyonunun dozları hem *in vivo* ve hem *in vitro*'da bitki gelişimi için teşvik ettiğini de bildirmişlerdir. Radyasyonun düşük dozları bir teşvik edici olarak etkilerinde, meyveler için erken olgunlaşma ve meyvelerin ağırlığında olan artış ve ayrıca tohumlarda yüksek çimlenme gibi bu özellikleri göstermiştir. Araştırmacılar;  $\gamma$  radyasyonun düşük dozları teşvik edici bir etkisinin de doku kültürü için gözlendiğini, fasulyede bitkisinde doku kültürünün gelişimin de artışı, tütün için doku kültüründe hücre değişikliğini teşvik ettiğini ve havuçta rejenerasyonunda hızlanma ve ayrıca patates için mikroyumru oluşumunda artışa neden olduğunu vurgulamışlardır (Al-Safadi vd. 2000).

Bu tez kapsamında kolzada farklı düşük dozlu gama ( $\gamma$ ) radyasyonunun etkileri doku kültürü çalışmalarında farklı aşamalarda değişik etkiler göstermiştir Yapılan çalışmanın gen aktarımından önce gama ışınının etkisi araştırılmıştır.

*A. tumefaciens*, bir patojen olarak ele alındığında inokülasyon süresinde saldırıyı gerçekleştirdiği zaman, bitki savunma fonksiyonunu çalıştırarak saldırıya karşı çıkmaya ve bu yapılmış saldırıyı en az zararla atlama için bazı çalışmalar yapılmıştır. Bitkide savunma mekanizması sebebiyle *A. tumefaciens*'inden kaynaklanan enfeksiyonundan sonra bitkilerde dokunun rejenerasyon yeteneği önemli ölçüde düşmektedir. Ayrıca bu düşüşün yanı sıra birde gama radyasyonunun bitki dokusuna etkisi ile bitkinin rejenerasyon düşüşü katlanmaktadır. Bu durumda bu tez çalışmalarında birinci olarak gama ışının gen aktarımına etkisi incelenmiştir. İlk gama ışınlarına maruz kalmış eksplantların rejenerasyonu incelenmiştir. Daha sonra gama radyasyon uygulanmış eksplantlara inokülasyon işlem sonrası etkileri izlenmiştir.

Kolzada Nelson ve Gladiator çeşitlerinin, *A. tumefaciens* bakterisi ile inokülasyon çalışmasında rejenerasyon oranı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, petri başına kallus sayısı ve kök oluşumu oranının ortalamalarına bakıldığında rejenerasyon oranı, Gladiator çeşidinde %9.85 ve Nelson'da %11.29 olarak belirtilmiştir. Sürgün sayısı adet olarak en çok sürgün Gladiator çeşidinde 2.70 adet sayılmıştır. Sürgün uzunluğu açısından Nelson ve Gladiator çeşitlerinde sırasıyla 0.90 cm ve 0.71 cm olarak uzamıştır. petri başına kallus sayısında Gladiator'da 12.80 adet ve Nelson'da ortalama, 20.70 adet kallus

oluşmuştur. Kök oranı Gladiator'da %43.75, Nelson'da %39.50 gelişme göstermiştir. Ayrıntılar Çizelge 4.2'de verilmiştir. dolayısıyla 'Gladiator' gen aktarım çalışmalarında tercih edilmiştir.

'Gladiator' çeşidi hipokotil eksplantlarına 20 Gy dozu olarak Kobalt 60 (Co<sup>60</sup>) gama ( $\gamma$ ) radyasyonu, *A. tumefaciens* ile gen aktarımında olumlu (%3.33) etkisine rağmen genel olarak uygun olmadığı sonucu belirlenmiştir. Halbuki 'Gladiator' çeşidinin tohumlarına uygulanan Kobalt 60 (Co<sup>60</sup>) gama ( $\gamma$ ) radyasyonu 20 Gy dozunda gen aktarımında %6.25 olarak neredeyse 2 kat artışa neden olmuştur. Bu durum ( $\gamma$ ) radyasyonu ışınının kolza tohumuna uygulandığında getirilen nokta ( $\gamma$ ) radyasyonu tohumlara uygulamasının etkisinden dolayı gelecekte araştırmacıların ilgisini kazanacaktır.

Sonuç olarak aşağıdaki öneriler uygun görülmüştür;

1. Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon çimlenmeyi doğrudan etkilemekte ve oldukça önemli olmaktadır. Sodyum Hipoklorit (%5 NaOCl) sterilizasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda Gladiator çeşidi için 25 dk %10 çamaşır suyu ile sterilizasyon sağlanmıştır.
2. Başlangıç denemelerinde sürgün rejenerasyonu için kullanılan hipokotil, eksplantlarında çoğunlukla çok düşük oranda sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır.
3. Tez kapsamında eksplant olarak kullanılan kolza tohumuna p35S GUS İNT plasmid içeren *A. tumefaciens* hattıyla gen aktarım çalışmalarında transgenik bitki elde etmek için Düşük gama radyasyonla ışınlanması uygun bulunmuştur.
4. Gama radyasyon etkisiyle elde edilen transgenik aday bitkiler kolayca MS ortamında köklendirilmiştir. Daha sonra aktarıldığı toprakta köklendirilmiş bitkilerin iklim odasında veya serada adaptasyonu sağlanmıştır.

5. Çalışma sonucunda optimize edilen gen aktarım sisteminin diğer *Brassica* türlerinde de uygulanması potansiyeli bulunmaktadır.

6. Bu tez kapsamında sunulan bu yöntemle çok daha hızlı şekilde transgenik bitkiler elde edilmesinin yanısıra aynı zamanda kaçak transgenik bitkilerin tesbiti sera şartlarında büyüyen bitkilerin çok daha hızlı ve tasarruflu şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır.

7. Bu tez kapsamında elde edilmiş, sonuçlara dayanarak transgenik bitkilerin hızı ve yoğun üretiminde ve bu konu ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara yardımcı olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

8. PCR ile tespit edilmiş transgenik bitkilere her ne kadar moleküler düzeyde genin aktarıldığı kanıtlanmış olsa da, sera koşullarında T1, T2 ve T3'e kadar detaylı çalışmalar yapılmalı ve aktarılmış genlerin ne derecede etkili olduğunu belirlemek için yeni çalışmaların planlanması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adu-Dapaah, H.K. and Sangwan, R.S. 2004. Improving bambara groundnut productivity using Gama irradiation and in vitro techniques. African Journal of Biotechnology 3, 260- 265.
- Akıncı, C. 1999. Sorgül makarnalık buğday çeşidinin (*Triticum durum* Desf.) tohumlarına uygulanan farklı dozlardaki gama ışınının M1 ve M2 bitkilerinin bazı özelliklerine etkisi üzerine araştırma. Doktora Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
- Akıncı, C. ve Baysal, İ. 2005. Farklı Dozlarda Gama Işını Uygulamasının Makarnalık Buğdayda Klorofil Mutasyonları ve Fide Özellikleri Üzerine Etkisi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Cilt II, 695-700, Antalya.
- Al-Barrak, K.M. 2006. Irrigation interval and nitrogen level effects on growth and yield of canola ( *Brassica napus* L.). Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences), 7, 87-103.
- Al-Safadi, B. Ayyoubi Z. and Jawdat D. 2000. The effect of  $\gamma$  irradiation on potato microtuber production *in vitro*. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61, 183-187.
- Anonim. 2016a. Web sitesi: [https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key\\_findings\\_wpp\\_2015.pdf](https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf), Erişim Tarihi: 20.03.2016.
- Anonim. 2016b. Web sitesi: <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>, Erişim tarihi: 04.10.2016.
- Anonim. 2016c. Web sitesi: [http://www.bysd.org.tr/Haber\\_Goruntule.aspx?ID=174](http://www.bysd.org.tr/Haber_Goruntule.aspx?ID=174), Erişim Tarihi:07.12.2016.
- Anonymous. 2016. Web sitesi: [www.nasa.gov/missions/science/f\\_w49b.html](http://www.nasa.gov/missions/science/f_w49b.html) (11.12.2016)
- Arslan, O. Bal, Ş. Yenice1, Y. ve Mirici, S. 1998. Keten ( *Linum usitatissimum* L. ) Tohumları na Uygulanan Farklı Gama Dozlarının M1 Generasyonundaki Etkileri. Tarım Bilimleri Dergisi, 4 (1) 21-23.
- Başer, İ. Bilgin, O. Korkut, Z.K. ve Balkan, A. 2007. Makarnalık Buğdayda Mutasyon Islahı İle Kantitatif Karakterlerin Geliştirilmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 13(4), 346- 353.
- Barfield, D.G. and Pua, C. 1991. Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Plant Cell Reports, 10, 308–14.
- Berthomieu, P. Béclin, F. Doré, C. and Jouanin, L. 1994. Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleracea*) molecular evidence for regeneration of chimeras, 96(1–2), 223-235.
- Blackshaw, R.E. Kanashiro, D. Moloney, M. M. and Crosby, W. L. 1994. Growth, yield and quality of canola expressing resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. Canadian Journal of Plant Science, 74, 745–51.

- Budak, N. and Yıldırım, M.B. 2002. Heritability, correlation and genetic gains obtained in the populations of Ege 88 and Kunduru durum wheats irradiated with gamma ray. *Cereal Research Communications* 30: 47-53.
- Burnett, L. Arnoldo, M. Yarrow, S. and Huang, B. 1994. Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp. *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. *Journal of Plant Cell Tissue Organ Cult*, 37, 253–256.
- Büyükhelvacıgil, T. 2016. Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Bitkisel Yağ Sektörü. Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Bitkisel Yağlar Konferansı. İstanbul, Turkey.
- Cardoza, V. and Stewart, C.N. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Journal of Plant Cell Repair*, 21, 599–604.
- Charbaji, T. and Nabulsi, I. 1999. Effect of low doses of Gama irradiation on in vitro growth of grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57, 129-132.
- Chaudhary, S., D.L. Parmenter and M.M. Moloney. 1998. Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds. *Plant Cell Reports* 17:195-200.
- Çavuş, G. 1994. Yazlık kolza çeşitlerinde tohuma uygulanan farklı Gama dozlarının M3 generasyonundaki etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi. 84.
- Çelik, V. ve Turgut-Balık, D. 2007. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO), Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 23 (1-2), 13-23.
- Çöçü, S. 2009. Böceklerle Dayanıklı Transgenik Korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) Bitkilerinin Elde Edilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 97, Ankara.
- Das, B. Goswami, L. Ray, S. Ghosh, S. Bhattacharyya, S. Das, S. and Majumder, A. L. 2006. *Agrobacterium* mediated transformation of *Brassica uncea* with a cyanobacterial (*Synechocystis* PCC6803) delta-6 desaturase gene leads to production of gammalinolenic acid. *Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 219–31. Damgaard, O. and Rasmussen. O.S. 1991. Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* mation of *Brassica napus* winter cultivars, *Transgenic Res*, 6, 279-288.
- Darçın, S. 2003. Bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde doku kültürü yöntemiyle bitki rejenerasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 115.
- Dayanır, N. 1996. Yazlık kolza (*brassica napus* ssp. *oleifera* l.) çeşitlerinde tohuma uygulanan farklı Gama dozlarının M5 generasyonundaki etkileri. Yüksek lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 76, Ankara.
- De-Block, M. Herrera-Estrella, L. Van-Montagu, M. Schell, J. and Zambryski, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *Journal of EMBO*, 3(1), 681–9.
- Doonan, J. 2000. Social controls on cell proliferation in plants. *Journal of Current Opinion in Plant Biotechnology*, 3, 482-487.



- Eapen, S. and George, L. 1997. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed Brassica species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 51, 229–232.
- Fry, J. Barnason, A. and Horsch, R.B. 1987. Transformation of Brassica napus with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors , *Journal of Plant Cell Rep.* 6, 321-325.
- Gaur, A. Chowdhury, V. K. Yadav, R. C. and Chowdhury, J. B. 1996. High frequency plant regeneration from seedling explants of *Brassica juncea* L. Coss and Czern. *Cruciferae Newsletter*, 19, 59–60.
- Gizlenci, Ş. Acar, M. Dok, M. 2015. <http://arastirma.tarim.gov.tr/ktae/Belgeler/brosurler/Kolza%20Tarimi.pdf>, Erişim Tarihi: 20.11.2015.
- Glimelius, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyls protoplasts in some *Brassicaceae*. *Journal of Plant Physiology*, 61, 38–44.
- Görpe, A. ve Cantez, S. 1992. *Pratik Nükleer Tıp*. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Nobel Tıp Kitapevi, 34, 87-91.
- Gupta, V. 1993. Genetic transformation of Brassica nigra by agrobacterium based vector and direct plasmid uptake. *Plant Cell Reports*, 12, 418-421.
- Gürbüz, B. Kaya, M.D. ve Demirtola, A. 2003. *Ayçiçeği Tarımı*. Hasad Yayıncılık, 100.
- Hachey, J. E. Sharma, K. K. and Moloney, M. M. 1991. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 9, 549–54.
- Hamam, B. and Shahidi, A. 2006. Structured lipids from high laurate canola oil and long-chain omega 3 fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 82, 731-735.
- Hawkins, D.J. and J.C. Kridl. 1998. Characterization of acylACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola *Plant J.* 13:743–752.
- Hensel, G.Valkov, V. J. Middlefell-Williams, and Kumlehn, J. 2008. Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 71–82.
- Hong, H.P. Gerster, J.L. Datla, R.S.S. Albani, D. Scoles, G. and Keller, W. 1997. The promoter of a *Brassica napus* polygalacturonase gene directs pollen expression of  $\alpha$ -glucuronidase in transgenic *Brassica* plants. *Plant Cell Rep.* 16, 373–378.
- Hu, Q. Anderson, S. B. and Hansen, L. 1999. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 59, 189–96.
- Hyun, D.Y. Lee, I.S. Kim, D.S. Lee, S.J. Seo, Y.W. and Lee, Y. 2003. Selection of azetidine-2-carboxylic acid resistant cell lines by *in vitro* mutagenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biotechnology*, 5, 43-49.
- Jabeen, N. Mirza, B. Chaudhry, Z. Rashid, H. and Gulfraz, M. 2009. The Study of the factors affecting *Agrobacterium*-mediated gene transformation in tomato

(*Lycopersicon esculentum* MILL.) CV. riogrande using rice chitinase (CHT-3) gene. Pakistan Journal of Botany, 41(5), 605–14.

- Jagannath, A. Bandyopadhyay, P. Arumugam, N. Gupta, V. Burma, P. K. and Pental, D. 2001. The use of a spacer DNA fragment insulates the tissue specific expression of a cytotoxic gene (barnase) and allows high frequency generation of transgenic male sterile lines in *Brassica juncea* L. Journal of Molecular Breeding, 8, 11–23.
- Jagannath, A. Arumugam, N. Gupta, V. Pradhan, A. Burma, P. K. and Pental, D. 2002. Development of transgenic barstar lines and identification of a male sterile (barnase)/restorer (barstar) combination for heterosis breeding in Indian oilseed mustard (*Brassica juncea*). Journal of Current Science, 82, 46–52.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter, 5, 387-405.
- Jonoubi, P. mousavi1, A. Majd, A. Salmanian, H. Jalali, J. and Daneshian, J. 2005. Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Biologia Plantarum, 49(2), 175-180.
- Kalabak, C. 2004. Kolzada (*Brassica napus* L.) farklı eksplant, besi ortamı kombinasyonu ve NaCl tuzunun kallus ve somatik embriyo oluşumu üzerine etkisi. Yüksek lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 52, Ankara.
- Kerbaury, G.B. and Hell, K.G. 1979. Effect of  $\gamma$  radiation on the *in vitro* growth of excised pith cells of *Nicotiana tabacum* L. cv IAC-70. International Journal of Radiation Biology, 35, 273-276.
- Khan, M. 2003. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*). Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75, 223–231.
- Kik, C. and Zaal, M. A. C. M. 1993. Protoplast culture and regeneration from *Brassica oleracea* ‘rapid cycling’ and other varieties. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 35, 107–14.
- Kimber, D. S. and McGregor, D. I. 1995, *Brassica* Oilseeds. Production and Utilization, CAB International, Cambridge, 3.
- Klimaszewska, K. and Keller, K. 1985. High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. Journal of Plant Cell Tissue & Organ Culture, 4,183–97.
- Koç, Y. Yıldız, M., Ergin, N. ve Darçın, E. S. 2014. In Vitro Koşullarda Farklı Humik Madde Konsantrasyonları İlavesinin Bitki Besin Maddesi Noksanlığının Giderilmesinin Kolza Bitkisinin Fizyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. Ulusal Botanik Bitki Bilimi Kongresi, 25-28 Ekim, Bildiri
- Kong F, Li J, Tan X, Zhang L, Zhang Z, Qi C and Ma X. 2009. A new time-saving transformation system for *Brassica napus*.m African Journal of Biotechnology 8(11): 2497–2502.
- Kovacs, E. and Keresztes, A. 2002. The Effect of  $\gamma$  and UV-B/C radiaiton on plant cells. Journal of Micron, 33, 199-240.

- Krane, K.S. 1987. Introductory Nuclear Physics. Third Edition, Wiley Press, 419-438, Manhattan.
- Lage, C.L.S. Vasconcellos, A.G. Silva, N.C.B. and Esquibel, M.A. 2002. Changes in electrophoretic profiles of *Ipomoea batatas* (Sweet Potato) induced by  $\gamma$  irradiation. Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology, 45, 177-182.
- Li, H.Z., Zhou, W.J., Zhang, Z.J., Gu, H.H., Takeuchi, Y., Yoneyama, K. 2005. Effect of  $\gamma$ -radiation on development, yield and quality of microtubers in vitro in *Solanum tuberosum* L. Biologia Plantarum 49: 625-628.
- Li-li, T. Gui-xiang, Y. Li-pu, D. Zheng-yuan, S. Mao-yun, S. Hui-jun, X. and Xing-guo, Y. 2011. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Agricultural Sciences in China, 10(3), 317-326.
- Liu, H. Guo, X. Naeem, M. S. Liu, D. Xu, L. Zhang, W. Tang, G. and Zhou, W. 2011. Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture, 106, 143–51.
- Lombardi, M.H. 2007. Radiation safety in nuclear medicine. Second Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Longdou, L. Wu, J. Wang, J. Duan, H. and Li, R. 2005. Expression of chitinase gene in transgenic rape plants. Journal of TOM, 167–72.
- Manfroi, E. Yamazaki-Lau, E. Grando, M.F. and Roesler, E.A. 2015. Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Genetics and molecular biology, 38(4), 470-6.
- Mirici, S. Özcan, S. Sancak, C. ve Arsalan, O. 2001. Kolza (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*) ya *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Türkiye XII. Biyolekoloji kongresi, 17-21 Eylül, Ayvalık, Balıkesir.
- Misra, S. 1990. Transformation of *Brassica napus* L with a disarmed octopine plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Experimental Botany, 41, 224-269-275.
- Moghaieb, R. E. A. El- wady, M. A. Mergawy, R. G. E. Youssef, S. S. and El-Sharkawy, A. M. 2006. A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). African Journal of Biotechnology, 5(2), 143–8.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.
- Nagata, T. Todoriki, S. Hayashi, T. Shibata, Y. Mori, M. Kanegae, H. and Kikuchi, S. 1999.  $\gamma$ - Radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology, 120, 113-119.
- Necati, H. 2007. Gama ışınlanmanın makarnalık buğday bitkisinde (*Triticum durum* desf.) haploid embriyo üretimi ve bitki regenerasyonuna etkisi. Yüksek Lisans

Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı 66, Isparta.

- Nielsen, D. C. 1997. Water use and yield of oilseed rape under dry land conditions in the central Great Plains. *Journal of Production Agriculture*, 10, 307–313.
- O'Neill, C. M. Arthur, A. E. and Mathias, R. J. 1996. The effects of proline, thioproline and methylglyoxal-bis-(guanyhydrzone) on shoot regeneration frequencies from stem explants of *B. napus*. *Plant Cell Reports*, 15, 695–8.
- Ono, Y. Takahata, Y. and Kaizuma, N. 1994. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Reports*, 14, 13–17.
- Öktem, H.A. Eyidoğan, F. Ertuğrul, F. Yücel, M. Jenes, B. ve Toldi, O. 1999. Marker gene delivery to mature embryos via particle bombardment. *Turkish Journal of Botany*, 23, 303-308.
- Önde, S. Sancak, C. Altınok, S. Birsin, M. ve Özgen, M. 2001. Transient expression of  $\beta$ - glucuronidase reporter gene in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) cotyledons via microprojectile bombardment. *Turkish Journal of Biology*, 25, 171-176.
- Önder, M. 2013. KOP bölgesinde yeni bir yağ bitkisi Ketencik [*Camelina sativa* (L.) Crantz.]. Ulusal KOP bölgesel Kalkınma Sempozyumu, 14-16 Kasım, Konya.
- Özfidan, D. 2009. [http://www.tavsiye.ediyorum.com/makale\\_3185.htm](http://www.tavsiye.ediyorum.com/makale_3185.htm), Erişim Tarihi: 20.11.2015.
- Öztürk, F. 2001. Malathion ve Gama radyasyonun kırma biti (*tribolium confusum* j. du. val.)'nin gelişim evreleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji bölümü, 65, Kayseri.
- Pental, D. Pradhan, A. K. Sodhi, Y. S. and Mukhopadhyay, A. 1990. Variation amongst *Brassica juncea* cultivars for regeneration from hypocotyls explants and optimization of conditions for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Journal of Plant Cell Reports*, 12, 462–7.
- Phogat, S. K. Burma, P. K. and Pental, D. 2000. High frequency regeneration of *Brassica napus* varieties and genetic transformation of stocks containing fertility restorer genes of two cytoplasmic male sterility systems. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 9, 73–9.
- Qing, C. M. Fan, L. Lei, Y. Bouchez, D. Tourneur, C. Yan, L. and Robaglia, C. 2000. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. *Journal of Molecular Breeding*, 6, 67–72.
- Radke, S.E. Turner, J.C. and Facciotti, D. 1992. Transformation and Regeneration of *Brassica rapa* Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 11(10), 499-505.
- Sarsu, F. 2003. Kışlık Kolza (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) Çeşitlerine Uygulanan Farklı Gama Işını Dozlarının M1 ve M2 Bitkilerinin Bazı Özellikleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 108, Ankara.

- Sayar, M. Birsin, M.A. Ulukan, H. ve Özgen, M. 1999. The Effect of seed size on the tissue culture response of callus from mature embryos of wheat species. *Journal of Wheat Information Service*, 89, 1-6.
- Sethi, U. Basu, A. and Mukherjee, S. G. 1990. Role of inhibitors in the induction of differentiation in callus cultures of *Brassica*, *Datura* and *Nicotiana*. *Journal of Plant Cell Reports*, 8, 598–600.
- Singh, Y. P. Koundal, K. R. Bansal, K. C. Mishra, A. K. Kumar, A. and Kumar, S. 2009. Optimization and development of regeneration and transformation protocol in Indian mustard using lectin gene from chickpea. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1(9), 306–10.
- Sharma, K. K. Bhojwani, S. S. and Thorpe, T. A. 1990. Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Journl of Plant Science*, 66, 247–53.
- Sharma, M. Sahni, R. Kansal, R. and Koundal, K. R. 2004. Transformation of oilseed mustard *B. juncea*. var. PJK with Snowdrop lectin gene. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 97-102.
- Sharon, E. 1992. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 1(1), 499- 505.
- Shewmaker, C. K. Sheehy, J. A. Daley, M. Colburn, S. and Ke, D. Y. 1999. Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal*, 20, 401–12.
- Shireen, K. Assem, Ebtissam, H.A. Hussein, Hashem A. Hussein, Sara, B. A. 2009. Transformation of the salt-tolerance gene BI-GST into Egyptian maize inbred lines. *Agricultural Genetic Engineering Research Institute*, 3(2), 828-835.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Song, G. 2012. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*) cultivar American Purple Top Yellow. *Journal of In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 48, 383–389.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K .1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am J Bot* 45: 705–708.
- Stoutjesdijk, P. A. Hurlestone, C. Singh, S. P. and Green, A. G. 2000. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by cosuppression of endogenous delta 12-desaturases. *Journal of Biochemical Society Transactions*, 28, 938–40.
- Surya, P. Sharma, D. R. Chowdhury, J. B. and Yadav, R. C. 1991. High frequency regeneration from crushed apical buds in *Brassica juncea* L. *Eucarpia ruciferae Newsletter*, 15, 96.
- Teo, W. Lakshmanan, P. Kumar, P. Goh, C. J. and Swarup, S. 1997. Direct shoot formation and plant regeneration from cotyledon explants of rapid cycling *Brassica rapa*. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 33, 288–92.

- Teras, C. 2015. Doubled haploids as a material for biotechnological manipulation and as a modern tool for breeding oilseed rape (*Brassica napus*). *BioTechnologia Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 96(1), 7-18.
- Turgut, K. 1994. Bitkilere Gen Transferi. *Attürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7, 101-107.
- Voisine, R. Vezina, L.P. and Willemot, C. 1993. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of  $\gamma$ -irradiated cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Plant Physiology*, 102, 213-218.
- Wang, J. Chen, Z. Du, J. Sun, Y. and Liang, A. 2005. Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Reports*, 24, 549– 55.
- Williams, P. H. and Hill, C. B. 1986. Rapid cycling populations of Brassica. *Journal of Science*, 232, 1 385–9.
- Wu, H. Doherty, A. and Jones, H.D. 2009. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes. *Transgenic Research*, 17, 425-436.
- Xu, Z. H. Davey, M. R. and Cocking, E. C. 1982. Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Journal of Plant Science Letters*, 24, 117–21.
- Yadav, R. C. Kamada, H. and Kikuchi, F. 1991. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledonary explants of *Brassica juncea* (L.) Coss & Czern. *Annals of Biology*, 7(2), 119–24.
- Yadav, R. C. Konishi H, Kamada H and Kikuchi F. 1996. Transformation of *Brassica carinata* A. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Eucarpia Cruciferae Newsletter*, 18, 44–5.
- Yadav, R. C. Konishi, H. Kamada, H. and Kikuchi, F. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Brassica carinata* L.Braun. *Eucarpia Cruciferae Newsletter*, 19, 61–2.
- Yıldız, Ç. 2009. Gama radyasyonunun buğdayda (*Triticum* sp.) partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımına ve bitki rejenerasyonuna etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, 137, Ankara.
- Yılmaz, A. Cevheri, C. Beyyavaş, V. ve Haliloğlu, H. 2005. Gama ışınlamasının (Cobalt- 60) Acalpi-952 pamuk (*G.hirsutum* x *G.barbadense* L.) çeşidinde M1 ve M2 generasyonlarında mutasyon etkilerinin saptanması. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, 1053-1058.
- Zaka, R. Chenal, C. and Miseet, M.T. 2004. The Effects of low doses of short-term Gama irradiation on growth and development through two generations of *Pisum sativum*. *The Science of Total Environment*, 320(2-3), 121-9.
- Zhong, R. Zhu, F. Liu, Y. L. Li, S. G. Kang, L. Y. and Luo, P. 1997. Oilseed rape transformation and the establishment of a bromoxynil-resistant transgenic oilseed rape. *Acta Botanica Sinica*, 39, 22–7.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : BEHROUZ ALIZADEH  
Doğum Yeri : Miyandoab –(Batı Azerbaycan -İran)  
Doğum Tarihi : 23.08.1980  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : Türkçe, Farsça ve İngilizce

### **Eğitim Durumu**

Lise : Reahedaneş High School, Miyandoab, İran, 09/1994-04/1998.  
Lisans : Tebriz Azad Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım ve Bitki İslahı Bölümü, (2004)  
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü , Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, (2008)

### **Çalıştığı Kurumlar**

Miyandoab Azad Üniversitesi, Biyoloji Laboratuvar Sorumlusu, Miyandoab, İran, 2002-2004.  
Türkiye Tarım ve Araştırma Merkezi, Ankara, Türkiye, 2013-2015.

### **Yayınlar**

#### **Hakemli Dergilerdeki Yayınlar**

**Alizadeh B**, Danashvar-Royandezagh S, Khawar KM and Ozcan S. 2013. Micropropagation of garlic chives (*Allium tuberosum* Rottl. ex Sprang) using mesocotyl axis. The Journal of Animal & Plant Sciences, Page:543-549, 23(2): 2013.  
Amir Rezaei Osalou, Sheida Daneshvar Rouyandezagh, **Behrouz Alizadeh**, Celal Er and Cafer Sirri Sevimay, 2013 A Comparison of Ice Cold Water Pretreatment and ?-Bromonaphthalene Cytogenetic Method for Identification of Papaver Species, , THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL ISSN NO 1537-744X.





## Uluslararası Kongre Bildiriler

- Aycan, M. Kayan, M. Taher, M. **Alizadeh, B.** Darcın, S.Yıldız, M. 2014 Buğday'da in vitro tohum çimlenmesi fide gelişmesi ile kallusun doku kültürü tepkisi üzerine tohum büyüklüğünün etkisi. Botanik Kongresi, 25-28 Ekim, Antalya, Türkiye.
- Beyaz, R., Kahramanoğulları Telci, C., **Alizadeh, B.**, Gürel, S. and Yildiz, M. 2012. Vegetative and generative development of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes at different ploidy level. 1st International Anatolian Sugar Beet Symposium, 20-22 September, Kayseri, Turkey.
- Alizadeh, B.**, Kahramanogullari Telci, C., Beyaz, R. and Yildiz, M. 2012. The effect of co-cultivation between wheat (*Triticum* sp.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) on shoot regeneration capacity of explants. 15th European Congress on Biotechnology, New Biotechnology 29: S28, 23-26 September, İstanbul, Turkey.
- Kahramanogullari Telci, C., Beyaz, R., **Alizadeh, B.** and Yildiz, M. 2012. The effect of magnetic field on in vitro seed germination, seedling growth and shoot regeneration from cotyledon node explants of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. 15th European Congress on Biotechnology, New Biotechnology 29: S138, 23-26 September, İstanbul, Turkey.
- Kahramanogullari Telci, C., **Alizadeh, B.**, Beyaz, R. and Yildiz, M. 2012. Modification of explant's metabolic activity to increase regeneration capacity of flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments. 15th European Congress on Biotechnology, New Biotechnology 29: S196, 23-26 September, İstanbul, Turkey.
- Yildiz, M., **Alizadeh, B.**, Taher, M. and Aycan, M. 2013. A novel method for gene transfer to durum wheat (*Triticum durum* Desf.) via *Agrobacterium tumefaciens*. European Biotechnology Congress 2013, Current Opinion in Biotechnology 24S: S38, 16-18 May, Bratislava, Slovakia.
- Yildiz, M., **Alizadeh, B.**, Beyaz, R., Telci Kahramanogullari, C. and Aycan M. 2013. A new method for high transgenic shoot regeneration frequency via *Agrobacterium tumefaciens*. European Biotechnology Congress 2013, Current Opinion in Biotechnology 24S: S40, 16-18 May, Bratislava, Slovakia.

## Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

- Yıldız, Ç., Telci Kahramanoğulları, C., **Alizadeh, B.** ve Yıldız, M. 2013. İyonize radyasyonun bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılması. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül, Konya.
- Alizadeh B.**, Danashvar-Royandezagh S, Khawar KM, Ozcan S. “*Allium tuberosum*'un in vitro Hızlı Çoğaltımı”, Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Hatay, 2009.