

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Doktora TEZİ

**TÜRKİYE'DE BAZI ÖNEMLİ ÇELTİK ÇEŞİTLERİNDE
HERBİSİTLERE KARŞI DİRENÇLİLİK GEN AKTARIMI
ÇALIŞMALARI**

Mahsa POURALI KAHRIZ

Tarla Bitkileri ANABİLİM DALI


**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mahsa Pourali Kahriz tarafından hazırlanan “Türkiye’de Bazı Önemli Çeltik Çeşitlerinde Herbisitlere Karşı Dirençlilik Gen Aktarımı Çalışmaları” adlı tez çalışması 04/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Hasan Hüseyin GEÇİT
Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Cemalettin Yaşar ÇİFTÇİ
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fethi Ahmet Özdemir
Bingöl Üniversitesi, Fen edebiyet Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Uğur YILDIRIM
Uşak Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Tarla Bitkileri Bölümü



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

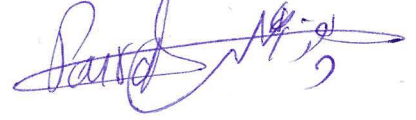
Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdür V.

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.

04.02.2016

Mahsa POURALI KHARIZ



ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'DE BAZI ÖNEMLİ ÇELTİK ÇEŞİTLERİNDE HERBİSİTLERE KARŞI DİRENÇLİLİK GEN AKTARIMI ÇALIŞMALARI

Mahsa POURALI KAHRIZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Türkiye’de çeltik tarımı Tarakya ve Anadolu’nun 32 ilde yapılmaktadır. Fideler döneminde itibaren çeltik bitkiler yaşam sürece her aşamada farklı tip yabancı otlar ve böceklerden zarar görmektedirler. Çeltik bitkisinde her iki sebepten gelen ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün elde etmek için her ikisine karşı dirençli bitkilerin ıslah edilmesi önem arz etmektedir. Türkiye’nin hızlı nüfus artış ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla geleneksel yöntemlerle biyoteknolojik yöntemlerin entegrasyon ile bu yöndeki çalışmalarına hız kazandırılması mümkün olabilmektedir. Bu tez kapsamında *Agrobacterium* aracılığıyla Türkiye’de yaygın olarak yetiştiricilik yapılan Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerine herbisitlere ve böceklerine karşı dirençli genleri aktararak, transgenik bitkilerin üretim sisteminin geliştirilmesi olmuştur. Çalışmalarında Çeltik Osmancık 97 ve Hamzadere çeşitlerinin tohumlarının sıvı olarak hazırlanmış BAP, NAA ve 2iP ile farklı sürede muamele edilip, düşük oran ve farklı kombinasyonda sitkinin- oksin içeren MS ortamda rejenerasyon yapılmıştır. Eksplant olarak kolriza, endosperm, embriyo, mezokotil ve kotiledon düğümü kullanılmıştır. En iyi sonuç mezokotil eksplantından eldedilmişken endosperm, ve kolriza eksplantından her hangi rejenerasyon sağlanamamıştır. Gen aktarım çalışmalarında ise *Agrobacterium tumefaciens*’nin GV2260::p35 GUS INT hattıyla Samsun Canik 2421 Tütün Çeşidinin yaprak eksplantları ve A281:: P35 Gus INT, *Agrobacterium rhizogenes*’nin 15834 PRGbar, GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT, LBA 4404:: pRGG bar ve cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar streyn ile çeltiğe başarılı şekilde gen aktarım çalışmaları yapılmıştır.

Şubat 2016, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, in vitro, rejenerasyon, çeltik, transformasyon, yüzey sterilizasyon.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GENETIC TRANSFORMATION STUDIES WITH HERBICIDE RESISTANT GENES ON SOME IMPORTANT TURKISH RICE CULTIVARS

Mahsa POURALI KAHRIZ

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

Supervisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Paddy cultivation in Turkey is carried out in 32 provinces of Thrace and Anatolia. Different types of stress are faced by rice plants at all stages of life from seedlings stage until harvest including weeds and insects. This results in reduction in yield of rice and makes it necessary to breed rice cultivars resistant to these types of stresses, for obtaining quality products. Integration of biotechnological techniques with traditional methods can help to facilitate in rapid breeding to meet the needs of rapid population growth in population of Turkey and accelerated efforts towards this direction is possible. In this context, the thesis presents studies related to *Agrobacterium*-mediated transformation of widely cultured Turkish rice cv. Hamzadere and Osmançık 97 by creating resistance against herbicides and insect resistance. Both cultivars were regenerated from cholerhiza, endosperm, embriyo, mesocotyl and cotyledon node after priming of seeds with high concentrations of BAP, NAA and 2ip plant growth regulators. The best regeneration was noted on mesocotyl explant and no regeneration was noted on cholerhiza and endosperm explants. In gene transfer studies *Agrobacterium tumefaciens* strain - GV2260 :: p35 GUS INT was studied on cv Samsun Canik 2421 of tobacco. Rice transformation of two cultivars was also made with *Agrobacterium* strains A281 :: P35 Gus INT *Agrobacterium rhizogenes*' 15834 pRGGbar, GV2260 (pGV2260) :: p35sgus-INT, and LB 4404 :: pRGGbar and pTF101AoPR1AcBar containing Cry1Ac gene. Successful genetic transformation results were obtained for both rice cultivars.

February 2016, 120 pages

Key Words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *in vitro*, regeneration, paddy, surface sterilization, transformation.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Türkiye’de bugüne kadar çeltik bitkisinde çok az sayıda doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları yapılmış olup, çok sınırlı miktarda literatür bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı başlıca çeltiğinin Hamzadere ve Osmancık 97 çeşidinde bir adventif sürgün rejenerasyonu sistemi geliştirilmeye yönelik *Agrobacterium* aracılığıyla transgenik çeltik bitkileri elde etmeye yöneliktir. Bu çalışmasıyla elde edilen bu sonuçların gelecekte temel bilgi kaynağı olarak kullanılacağını ve bilime katkı sağlayacağını düşünmekteyim.

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan, bilim sevgisi ve bilimsel yaklaşımı kendisinden öğrenmeye çalıştığım, bilimsel çalışmaların yanında her aşamada pratik çözümleriyle bir hoca bir arkadaş olarak destek olan, çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen danışman hocam ile bölümümüzün ders aldığım tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmalarım boyunca, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen ve gösterdikleri anlayıştan dolayı ve çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli babam, anneme, ve aziz kardeşlerime hürmet, saygı ve teşekkürler sunarım.

Mahsa Pourali Kahriz

Ankara, Şubat 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1 GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	15
2.1 Bitki Materyalinin Yüzey Sterilizasyonu.....	17
2.2 Doku Kültürü ile İlgili Bazı Çalışmaları.....	19
2.3 Gen Aktarım ile İlgili Bazı Çalışmaları	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1 Bitki Materyali	35
3.1.2 Hamzadere çeşidi.....	35
3.1.3 Osmancık 97 çeşidi	35
3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları.....	36
3.3 Bitki Büyümesini Düzenleyiciler ve Kültür Koşulları.....	37
3.4 Çeltik tohumlarının <i>in vitro</i> 'da çimlendirilmesi.....	38
3.5 Tez Kapsamında Çeltik Bitkisinde Yapılan Rejenerasyon çalışmaları	39
3.6 Bakteri Kültürü.....	40
3.6.1 Bakteri Materyali	40
3.6.2 Bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi.....	40
3.6.3 Bakteri kültürlerinin kısa ve uzun süreli korunması	41
3.6.4 Antibiyotikler	41
3.6.5 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'nin 15834 PRGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı.....	43
3.6.6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin A281 hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	43
3.6.7 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin GV2260:: p35 gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	44
3.6.8 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 4404::pRGG bar hattıyla çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	44
3.6.9 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin Yara uyarımlı (AoPR1) promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar hattıyla çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı.....	45
3.7 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi	46
3.7.1 Histokimyasal gus analizi.....	46
3.7.2 Polimeraze zincir reaksiyonu (PCR)	47
3.8 İstatistiksel Değerlendirmeler	51
4. Bulgular ve Tartışma	52
4.1 Yüzey sterilizasyonu	52
4.2 Rejenerasyon Çalışmaları	54

4.2.1	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları	54
4.2.2	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları	63
4.2.3	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü , Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları	70
4.2.4	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumları 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 1 gün MS ortamında bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerden kotiledon düğümü , Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları	76
4.2.5	Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinde kotiledon düğüm ve mezokotil eksplantları 1 gün MS de 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1gun tekrar MS ortamında daha sonra 0.025 mg/l , 0.05 mg/l , 0.1 mg/l ,ve 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamına alınması.....	82
4.3	Gen aktarım çalışmaları.....	87
4.3.1	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 Çeşitleri için Farklı Dozda Kanamacin İçeren Ortamında Yaşayan Bitkilerinin Oranı Gözlenerek LD ₁₀₀ (öldürücü dozu ₁₀₀ /Letal Dozu ₁₀₀) Dozunun Belirlenmesi	87
4.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'ın A281:: P35 Gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	89
4.3.3	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'ın 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı.....	91
4.3.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'ın GV2260:: p35 gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerine gen aktarımı	93
4.3.5	<i>A. tumefaciens</i> 'ın LBA 4404::pRGG bar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	95
4.3.6	AoPR1 promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	98
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	101
5.1	Değerlendirme	101
5.2	ÖNERİLER	105
	KAYNAKLAR	108
	ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

g	Gram
mg	mili gram
µg	mikro gram
°C	Derece santigrad
l	Litre
ml,	mili litre
µl	mikro litre
M	Molar
mm	mili metre

Kısaltmalar

BAP	6 Benzylaminopurine
Bas	Basta
bp	baz çifti
Bç/bp	baz çifti
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
Fosf	Fosfinotrisin
F	F testi
GA3	Giberellik asit
MSD4X2	1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS bazal besin ortamı
IBA	Indol 3 butirik asit
IAA	Indol 3 asetik asit
Kb	kilo baz
Km	Kanamisin monosülfat
K.O.	Kareler ortalaması
l	Litre
ml,	mili litre
µl	mikro litre
M	molar
mm	mili metre
1×MS	Murashige ve Skoog bazal besin ortamı
NAA	αNaftalen asetik asit

N	Normal
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NPTII	Neomisin fosfotransferaz II
<i>NptII</i>	Neomisin fosfotransferaz II geni
Onc	Onkogenik
Rif	Rifampisin
Strep	Streptomisin
S.D.	Serbestlik derecesi
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
T- DNA	Transfer edilmiş DNA
Ti	Tümör oluşturan
V.K.	Varyasyon kaynakları
X-gluc	5 bromo-4 kloro-3 indolil glukoronid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Çeltik bitkisinin bir şematik görüntüsü	2
Şekil 1.2	Türkiye'de çeltik tarımı	3
Şekil 1.3	Türkiye'de çeltik ekimi yapan iller Türkiye'de şeker pancarının ekim yapan iller	4
Şekil 1.4	Türkiye'de çeltik üretimin yapan Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Doğu Anadolu bölgelerine ait şema.....	7
Şekil 3.1	Bu tez kapsamında kullanılan çeltik bitki eksplantların şematik görüntüleri	39
Şekil 3.2	Yara uyarımlı (AoPR1) promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar bitki ekspresyon vektörün şematik temsili. Plazmid pTF101.1 bitki seçimi için kullanılan, bir bar genini içermektedir.....	46
Şekil 3.3	Çeltiğinin Hamzadere ve Osmancık 97 Transgenik Aday bitkilerin transformasyonunu tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonun yürütülmesi	49
Şekil 4.1	Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerin farklı oranda çamaşırsuyu içeren ortamı ile yüzey sterilizasyonu	53
Şekil 4.2	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları	63
Şekil 4.3	2ip ve aktif kömür içeren MS ortamında gelişen köklerde beyaz tüylerin oluşması	64
Şekil 4.4	Seleksiyon amacıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinde Kanamisin dozunu optimize ederek Letal dozun (LD 100) belirlenmesi 300 mg/l Kanamisin içeren MS ortamında Hamzadere çeşidi ve 250 mg/l Kanamisin içeren ortamında Osmancık 97 çeşidinden albino bitkilerin elde edilmesi	88
Şekil 4.5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in A281:: P35 Gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin kotiledon düğümü eksplantı vasıtasıyla gen aktarımı	90
Şekil 4.6	<i>A. rhizogenes</i> 'in 15834 PRGGbar hattıyla (a) Hamzadere ve (b) Osmancık çeşitlerine gen aktarımı sonucu yoğun kök oluşumu	92
Şekil 4.7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT hattı muamele sonucu çeltik çeşitlerinde gus ekspresyonu	94
Şekil 4.8	<i>A. tumefaciens</i> 'in LBA 4404::pRGG bar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	96
Şekil 4.9	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde gus ekspresyonu	98

Şekil 4.10 Araştırıcı deneme bitkileri incelerken a, b,c,d,e, f, g, h, i. elde edilmiş transgenik bitkileri.....	99
Şekil 4.11 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde Npt II genin (750 bp) amplifikasyonu sonuçları	99



ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 1.1	Türkiye çeltik ekiliş üretim tüketim verim	5
Şekil 1.2	Bölgelere göre çeltik üretimi (2013)	6
Şekil 1.3	Bölge ve İllere göre çeltik üretimi (2013)	7
Şekil 1.4	İllere göre çeltik ekim, üretim, verim (2013)	8
Şekil 1.5	Türkiye'nin çeltik ithalat ve ihracat miktarları	9
Şekil 1.6	Türkiye'nin pirinç ithalat ve ihracat miktarları	10
Şekil 3.1	Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklama koşulları	37
Şekil 3.2	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılanantibiyotikler/ kimyasal maddeler, çözücüler ve saklama koşulları	42
Şekil 3.3	Gen aktarım çalışmasında bakteriostatik (bakteri öldürücü) olarak kullanılan antibiyotiği çözücüler ve saklama koşulları	42
Şekil 3.4	PCR işleminde kullanılan primer dizileri	48
Şekil 3.5	PCR reaksiyon koşulları	50
Şekil 4.1	Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerin farklı oranda çamaşırsuyu içeren ortamı ile muamele sonucunda elde edilen çimlenme ve bulaşıklığı oranların ortalmaları ile ilgili sonuçları	54
Şekil 4.2	Çeltik Hamzadere çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerinin varyans analiz sonuçları	57
Şekil 4.3	Çeltik Hamzadere çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin ortalamaların Duncan testi sonuçları	58
Şekil 4.4	Çeltik Osmancık 97 çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin varyans analiz sonuçları	61
Şekil 4.5	Çeltik Osmancık 97 çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin ortalamalarının Duncan testi sonuçları	62

Şekil 4.6 Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin varyans analiz sonuçları	66
Şekil 4.7 Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin varyans analiz sonuçları	69
Şekil 4.8 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü, Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamına bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ili ilgili parametre ortalamalarının varians analizi sonuçları.....	74
Şekil 4.9 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkiciklerden kotiledon düğümü , mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ili ilgili parametre ortalamalarının Duncan testi sonuçları.....	75
Şekil 4.10 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamına ve 1 gün MS ortamına bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü , mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametre verilerinin varyans analizi sonuçları	80
Şekil 4.11 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamına ve 1 gün MS ortamına bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü , mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametre verilerinin varyans analizi sonuçları	82
Şekil 4.12 Çeltiğin Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinden kotiledon düğümü (nodu) ve mezokotil kullanılmış eksplantları 1 gün tekrar MS ortamında 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1gun tekrar MS ortamında ve daha sonra 0.025 mg/l , 0.05 mg/l, 0.1 mg/l ve 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamında alınıp farklı rejenerasyon parametrelerine ait verilerin varyans analizi.....	85

Şekil 4.13	Çeltiğinin Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinden kotiledon düğümü (nodu) ve mezokotil kullanılmış eksplantları 1 gün MS de 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1gun tekrar MS ortamında ve daha sonra 0.025 mg/l , 0.05 mg/l , 0.1 mg/l ,ve 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamında alınıp farklı rejenerasyon parametrelerine ait ortalamaların Duncan testi sonuçları	86
Şekil 4.14	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 Çeşitleri için Farklı Dozda Kanamacin İçeren Ortamında ölen Bitkilerinin Oranının Gözlenerek LD ₁₀₀ (öldürücü dozu ₁₀₀ /Letal Dozu ₁₀₀) Dozunu Belirlenmesi.....	88
Şekil 4.15	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in A281:: P35 Gus INT hattıyla çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	90
Şekil 4.16	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'in 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı ile ilgili parametrelerle ait varyans analizi sonuçları	92
Şekil 4.17	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'in 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı ile ilgili parametrelere ait ortalmaların t testi analiz sonuçları	93
Şekil 4.18	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT hattı muamele sonucu çeltik çeşitlerindetohum eksplant kullanarak elde edilen bitkilerde gus ekspresyonu	95
Şekil 4.19	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA4404: : pRGGbar hattıyla çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı	97
Şekil 4.20	Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde AoPR1) promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar bakteri hattıyla tohum muamelesiyle elde edilen bitkilerinde Npt II genin amplifikasyonu.....	100

1. GİRİŞ

Tahıllar içerisinde üretim miktarlarına göre mısır, çeltik ve buğday ilk üç sırayı paylaşmaktadır (FAO 2015). Üretim alanlarına göre bu sıralama buğday, mısır ve çeltik olarak değişmektedir. Dolayısıyla, bu bitkileri günümüzde sosyal, çevresel, stratejik ve ekonomik boyutlarıyla önemi çok büyüktür (Geçit vd. 2011).

Dünya nüfusunun hızlı artışı, tarım alanlarının son sınırlarına ulaşması, toplumlara ya da bölgelere özgü birçok nedenden dolayı dünyanın pek çok yerinde yetersiz ve dengesiz beslenme sorunu ortaya çıkmıştır (Eser ve Geçit 2010). Uzmanlar önümüzdeki 25 yıl içinde gıda talebinin tüm dünyada yaklaşık %64 ve gelişmekte olan ülkelerde neredeyse % 100 oranlarında artacağını tahmin etmektedirler (Anonim 2015a).

Nüfus artışına bağlı olarak artan gıda talebi, tarımsal üretimin yükselmesi yönünde baskı oluşturmaktadır. Yeryüzü kara alanları içinde tarım alanlarının oranı % 11,7'dir (Anonim 2015b). Dünya çapında tarımsal arazinin sürekli olarak azalması tarımsal üretim üzerindeki yükünü ağırlaştırmaktadır.

Beslenme ihtiyacının karşılanmasında tarıma dayalı endüstrinin hammadde kaynağının sağlanması açısından giderek önem kazanan çeltik, su içinde çimlenebilen ve kökleri suda erimiş oksijenden yararlanabilen tek tahıl cinsidir (Tsunoda and Takahashi 1984).

Çeltik, buğdaygiller (Gramineae) familyasından, *Oryza sativa* L. cinsinden otsu bir bitki türüdür (Anonim 2015c). Çeltik neredeyse 5000 yıldır insanlar tarafından tüketilen ve beslenmede önemli yeri olan tahıllardan biridir.

Çeltik, M. Ö. 3000 yılları civarında Güney Hindistan'dan Çin'e, M. Ö. 1000 yılları civarında Java'ya doğru yayılmış, Büyük İskender'in Asya seferleri sonunda M.Ö 300 yıllarında da Avrupa'da tanınmıştır (Kurt 2013). Çeltik yeryüzünün her kıtasında yetiştirilmekte olup (Şekil 1.1), Çin, Hindistan, Endonezya, Bangladeş, Vietnam,

Tayland, Filipin, Brezilya, Japonya Pakistan, A.B.D., Kamboçya, Güney Kore, Nepal, Nijerya, Sri Lanka, Peru, Kolombiya, Malezya, Gine, Ekvator, Uruguay, Mali, Arjantin ve Türkiye çeltik üretiminde en önemli ülkelerdir ve dünya toplam çeltik üretiminin %80den fazlasını karşılamaktadırlar (FAO 2015).



Şekil 1.1 Çeltik bitkisinin bir şematik görüntüsü (Kaynak Anonim 2015c)

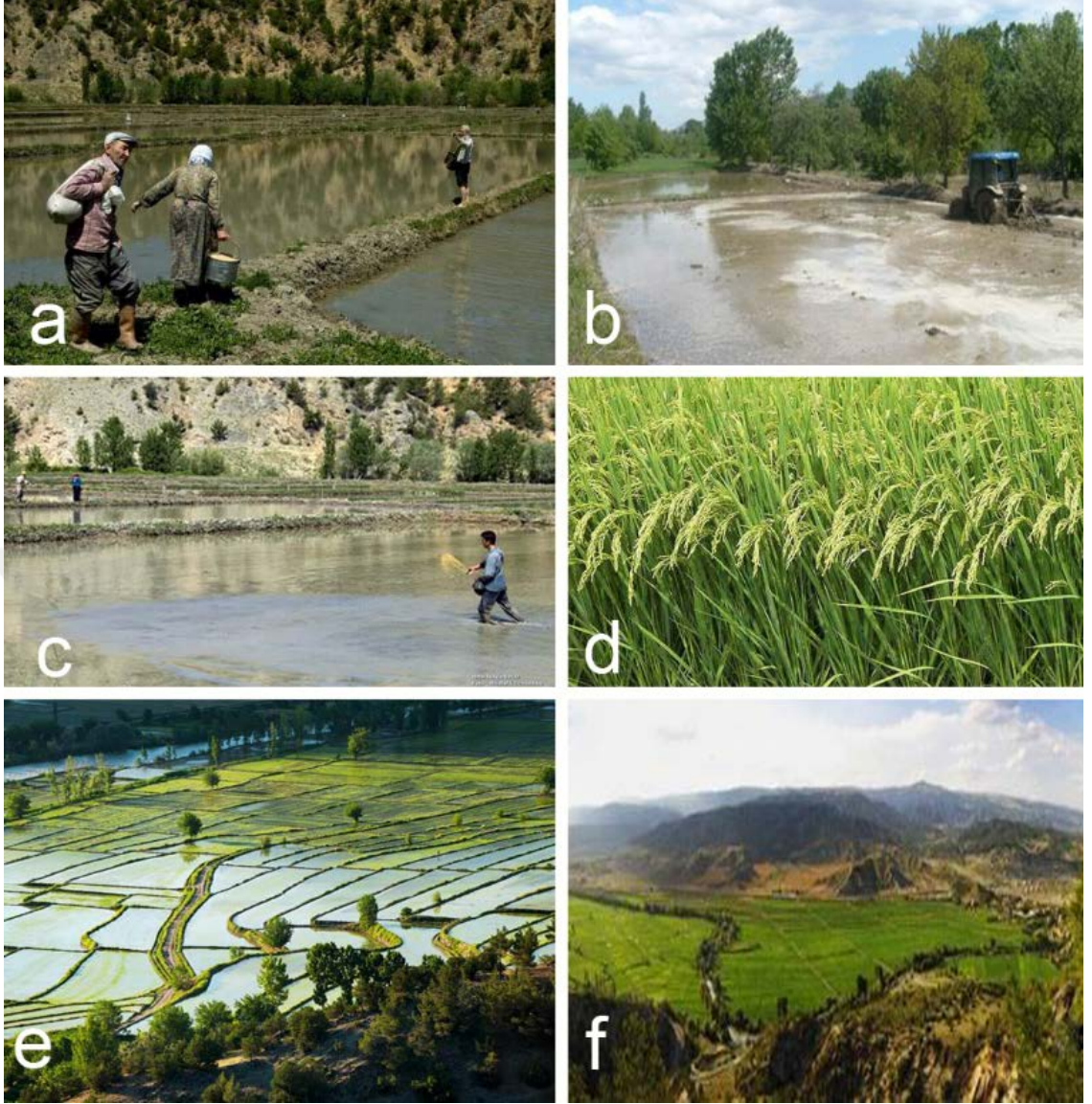
Çeltik üretiminin büyük bölümünün gelişmekte olan ülkelere sağlanmasına karşın, bu ülkelere verimlilik gelişmiş ülkelere oranla oldukça düşüktür.

Türkiye çeltikte kendine yeterli olmayıp, net ithalatçı konumundadır. Çeltik Üretimi Dünyada yaklaşık 1.5 milyar hektar alanda yapılmakta ve çeltik dünya tahıl ekiminin ortalama %22'sini karşılayarak üretimde %28'lik payı karşılamaktadır (Anonim, 2015d). Türkiye'nin birçok bölgesi ekolojik yönden çeltik üretimine uygun olup Türkiye'de çeltik üretiminin bölgelere göre dağılımı incelendiğinde Batı ve Doğu Marmara, Batı Karadeniz, Güneydoğu Anadolu en önemli ekim ve üretim bölgeleridir (Şekil 1.2, Anonim 2015e). Marmara Bölgesi % 67 ekim ve % 72 üretim payı ile ekiliş ve üretim bölgesi olarak ilk sırayı alırken bunu % 20 ekim ve üretim payı ile Karadeniz bölgesi takip etmekte ve bu iki bölge ülke toplam üretiminin % 90' ından fazlasını karşılamaktadır (Sade vd. 2011). Türkiye'de çeltik üreticisi iller arasında en önemli sırayı Tekirdağ, Edirne, Kırklareli, Balıkesir ve Çanakkale illeri almaktadır (Anonim. 2015f, Anonim. 2015). En fazla ekim alanına sahip olan Marmara Bölgesi'nde Edirne ilinde Meriç ve Ergene Çayı vadisi başta Enez olmak üzere İpsala, Keşan, Uzunköprü; Tekirdağ - Hayrabolu ve Malkara; İstanbul – Çatalca'da; Çanakkale'de Biga ve

Gelibolu; Balıkesir ili Gönen Çayı vadisi boyunca başta Gönen ve Manyas ilçelerinde; Bursa – Orhangazi ve Karacabey ilçelerinde yoğunluk kazanır. Karadeniz Bölgesi'nin ise Orta ve Batı kesimleri ile Kızılırmak ve Yeşilırmak vadilerinde yayılır. Samsun'un Bafra ve Terme'de; Sinop ilinde Gökırmak vadisinde Boyabat ve Saraydüzü'nde; Kastamonu Devrez vadisinde Ortalık (Şekil 1.2 Şekil 1.3 a,b,c,d,ef); Çorum'da Kızılırmak ve Yeşilırmak vadileri (Şekil 1.2c) yurdumuzda en yoğun çeltik tarımının yapıldığı yerlerdendir (Anonim 2008, 2014, Taşlıgil ve Şahin 2011a,b,c). GAP bölgesinde ise Şekil 1.3'te görüldüğü gibi Diyarbakır ve Şanlıurfa çeltik yetiştiriciliğinde en önemli illerden sayılmaktadır.



Şekil 1.2 Türkiye'de Çeltik çeltik ekimi yapan iller Türkiye'de şeker pancarının ekim yapan iller (Kaynak Taşlıgil ve Şahin 2011a,b, c değiştirerek, Anonim 2015k değiştirerek)



Şekil 1.3 Türkiyede çeltik tarımı, a. Kastamonu Devrez vadisinde Tosya'daki çeltik ekimin hazırlanması (Anonim 2015g), b. Türkiye Kastamonu ili Devrez vadisinde Tosya'daki çeltik tarlalarında serpmeye yöntemiyle ekimi (Anonim 2015g), c. Türkiye Sinop ili Gökırmak ilçesi, Hanönü'deki çeltik tarlalarında traktör ile çeltik ekimi (Anonim 2015h), d. E. Çeltik tarlasının bir şematik görüntüsü (Kaynak Anonim 2015i), f. Türkiye Çorum ilinin Kızılırmak ve Yeşilirmak'daki çeltik tarlaları (Anonim 2015j).

1994 yılında 32 ilde çeltik ekimi yapılırken 2008 yılına geldiğimizde 36 ilin üretime katıldığı gözlenmektedir (Taşlıgil ve Şahin 2011a).

Çizelge 1.1 Türkiye çeltik ekiliş üretim tüketim ve verimi

YILLAR	Ekiliş (ha)	Üretim (ton)	Pirinç Karşılığı (ton)*	Tüketim (ton)	Verim (kg/da)
2003	65.000	372.000	223.000	300.000	572
2004	70.000	490.000	294.000	565.000	681
2005	85.000	600.000	360.000	535.000	706
2006	99.100	696.000	418.000	555.000	702
2007	93.900	648.000	390.000	613.000	690
2008	99.500	753.325	452.000	557.000	757
2009	96.754	750.000	450.000	703.000	775
2010	99.000	860.000	516.000	527.000	869
2011	99.400	900.000	540.000	697.000	906
2012	119.725	880.000	528.000	570.000	735
2013	110.592	900.000	540.000	600.000	814

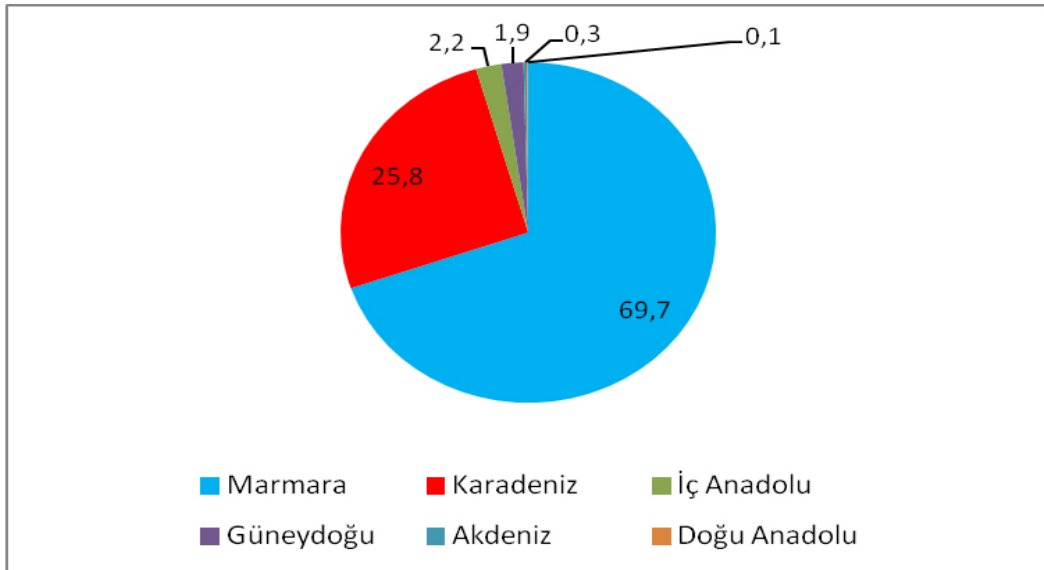
(*) Çeltiğin pirince işlenmesinde elde edilen sağlam pirinç oranı %60 olarak dikkate alınmıştır. (Kaynak Anonim 2015I)

TÜİK 2003-13 verilerine göre; 2003 yılında 65.000 ha ve 2013 yılında 110592 ha üzerinde çeltik ekim yapılmıştır. 2003 yılında 372.000 ton üretim (223.00 ton pirinç karşılığı) ve 2013 yılında ise 900.000 ton üretim (540.000 ton pirinç karşılığı) elde edilmiştir (Çizelge 1.1). Buna karşı, her zaman tüketim verim den fazla olmuştur. 2003 yılında 300.000 ton ve 2013 yılında ise 600.000 ton olmuştur. Türkiye son yıllarda çeltik verimi ve üretiminde önemli artışlar sağlamış olsa da henüz kendi iç tüketimini karşılayamamaktadır. 2012/13 dönemi pirinç yeterlilik oranı %86,9 olarak gerçekleşmiştir. Bu nedenle ihtiyaç duyulan pirincin bir kısmı ithal edilmektedir.

Çizelge 1.2 Bölgelere göre çeltik üretimi (2013)

BÖLGELER	Ekim Alanı		Üretim	
	Hektar	Payı (%)	Ton	Payı (%)
Marmara	75.870	68,6	627.678	69,7
Karadeniz	27.644	25,0	232.158	25,8
İç Anadolu	2.985	2,7	20.179	2,2
Güneydoğu	3.489	3,2	17.038	1,9
Akdeniz	465	0,4	2.408	0,3
Doğu Anadolu	139	0,1	539	0,1
TOPLAM	110.592	100,0	900.000	100,0

Türkiye’de Marmara bölgesinde %69,7, Karadeniz bölgesinde %25,8; İç Anadolu bölgesinde %2,2; Güney doğu Anadolu bölgesinde % 1,9; Akdeniz bölgesinde %0,3, ve %Doğu Anadolu bölgesinde ise %0,1 çeltik üretimi yapılmaktadır (Şekil 1.4, Çizelge 1.2 ve 1.3).



Şekil 1.4 Türkiye’de çeltik üretimin yapan Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Doğu Anadolu bölgelerine ait şema

Türkiye’deki 10 ilin ekim alanları, üretim ve verim çizelge 1.4’de verilmiştir. Çizelgede verilmiş bilgilerine göre Edirne ili 43030 hektar ekim alanı (%38,9 payı), 361.918 ton üretim (%40.2 payı) ve 841 kg/da verim ile birinci sıra da ve Çankırı ili ise 2470 hektar ekim alanı (%2,2 payı), 14.760 ton üretim (%1,7 payı) ve 602 kg/da verim ile 10. sıra da yer almaktadır. Çeltik üretiminde il düzeyinde de yoğunlaşma vardır. Toplam 5 ilin üretimleri toplam üretimin %82’sini oluşturmaktadır. Edirne toplam üretimin %40’ına sahipken Samsun %14, Balıkesir %11, Çanakkale %10, Çorum %7’lik bir üretime sahiptir.

Çizelge 1.3 Bölge ve illere göre çeltik üretimi (2013) (Anonim 2015m)

BÖLGE	İL	EKİLİŞ (da)	ÜRETİM (ton)
Marmara (%69.7)	Edirne	430.301	361.918
	Balıkesir	129.714	99.467
	Çanakkale	113.477	90.295
	Diğer	85.205	75.998
	TOPLAM	758.697	627.678
Karadeniz (%25.8)	Samsun	144.128	122.710
	Çorum	77.263	65.523
	Diğer	55.053	43.925
	TOPLAM	276.444	232.158
İç Anadolu (%2,2)	Çankırı	24.700	14.760
	Diğer	5.155	5.419
	TOPLAM	29.855	20.179
Diğer Bölgeler (%2,3)		40.928	19.985

Çizelge 1.4 İllere göre çeltik ekim, üretim, verim (2013) Anonim 2015m

İLLER	EKİM ALANI		ÜRETİM		VERİM (kg/da)
	Hektar	Payı (%)	Ton	Payı (%)	
Edirne	43.040	38,9	361.918	40,2	841
Samsun	14.413	13,0	122.710	13,6	851
Balıkesir	12.971	11,7	99.467	11,1	767
Çanakkale	11.348	10,3	90.295	10,0	796
Çorum	7.726	7,0	65.523	7,3	848
Sinop	3.960	3,6	34.434	3,8	870
Tekirdağ	3.100	2,8	28.899	3,2	932
Kırklareli	2.611	2,4	25.769	2,9	987
Bursa	2.500	2,3	18.993	2,1	760
Çankırı	2.470	2,2	14.860	1,7	602
10 İl Toplamı	104.139	94,2	862.868	95,9	829
GENEL TOPLAM	110.592	100,0	900.000	100,0	814

Çizelge 1.5 Türkiye'nin çeltik ithalat ve ihracat miktarları (Anonim 2015m)

YILLAR	İTHALAT		İHRACAT	
	Miktar (Ton)	Değer (Bin ABD \$)	Miktar (Ton)	Değer (Bin ABD \$)
2002	292.024	48.803	187.000	173
2003	247.724	55.538	398.000	375
2004	35.432	15.254	298.000	334
2005	102.197	26.231	298.000	351
2006	105.005	28.786	238.000	292
2007	6.016	2.101	157.000	258
2008	45.307	19.823	235.000	269
2009	63.203	26.188	199.000	316
2010	409.199	172.977	307.000	371
2011	277.083	112.349	834.000	564
2012	227.539	88.819	363.000	349
2013	164.537	70.535	108.000	166

2002–2013 yılları arasında Türkiye çeltik ithalat-ihracat miktar ve değerlerine ilişkin veriler yukarıdaki çizelgelerde görülmektedir. 2010 yılında çeltik ithalatı 409.199 ton (172.977 ABD doları değeri) ile son dönemin en yüksek seviyesindedir (Çizelge 1.5). Çeltik ithalatının büyük çoğunluğu ABD, Rusya Federasyonu, Bulgaristan ve Yunanistan'dan yapılmaktadır. 2002–2013 yılları arasında Türkiye çeltik-ihracat miktarı 2011 yılında çeltik ihracatı 834000 ton (564000 ABD doları değeri) ile son dönemin en yüksek seviyesindedir.

Çizelge 1.6 Türkiye'nin pirinç ithalat ve ihracat miktarları (Anonim 2015m)

YILLAR	İTHALAT		İHRACAT	
	Miktar (Ton)	Değer (Bin \$)	Miktar (Ton)	Değer (Bin \$)
2002	131.431	37.031	222	222
2003	213.528	65.453	337	287
2004	103.887	39.496	475	760
2005	158.423	60.149	421	539
2006	113.175	43.267	465	590
2007	184.911	108.576	729	1.010
2008	179.603	144.310	4.058	4.986
2009	158.335	105.770	18.662	19.529
2010	125.643	91.340	50.825	46.549
2011	41.011	28.591	85.126	74.786
2012	25.111	17.688	86.335	68.960
2013	118.563	79.625	6.597	6.281

Çeltik, pişirilmemiş haşlanmış pirincin bileşiminde (100) gr mineral ve vitaminler, Sodyum (5) mg, Potasyum (115) mg, Kalsiyum (28) mg, Magnezyum (259) mg, Demir (0,8) mg, Fosfor (115) mg, E vitamini (0,11) mg, B1 vitamini (Tiyamin) 0,07 mg, B2 vitamini (Riboflavin) 0,049 mg içermesi nedeniyle insan beslenmesinde büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte çeltiğin iç kısmında düşük besin değerinde olan maddelerde bulunur. Çeltik tanesinin yapısına bakıldığında %1-2 perikarp, %4-6 aleuron ve tohum nüvesi, % 2-3 embriyo, %89-94 nişastalı endosperm içermektedir (Zhou vd. 2002). Nişasta, pirincin temel bileşeni olup kuru ağırlığın yaklaşık %90' ını oluşturmaktadır (Juliano,1972). Nişasta D-glukoz birimlerinin polimerleşmesinden oluşan bir polisakkarit olup kimyasal yapısında lineer bir polimer olan amiloz ile

dallanmış bir polimer olan amilopektin bulunmaktadır (Hoseney 1994). Pirinçte amiloz/amilopektin oranı çeşit, cinse göre farklılık gösterse de genel anlamda pirinç nişastasındaki amiloz oranı % 16.5-23.4 arasında, amilopektin oranı ise % 83.5-76.6 arasında değişmektedir (Zhou vd. 2002). Pirinçte nişastadan sonra en çok bulunan bileşen proteindir (Juliano 1972). Hububatlar iyi ve ucuz protein kaynağıdır ve birçok ülkede beslenmedeki toplam protein hububattan sağlanmaktadır. Protein içeriği, pirincin besin kalitesi bakımından önem taşımaktadır (Osborne1992). Pirinçte ham protein oranının çeşitlere ve çevre şartlarına göre % 7-8 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Koca ve Anil 2001). Pirinç düşük miktarda protein içermesine rağmen beslenme için önemli olan amino asitlerce zengin olması sebebiyle buğday ve mısırdan sonra ekim olmasına sahip olan ve dünya nüfusunun yarısından çoğunun beslenmesinde ilk sırada yer alan bir üründür (Gül 2003, Taşlıgil ve Şahin 2011). Sıcaklık koşullarının ve su gereksinmesinin yeterince karşılanabildiği uygun ekolojilerde tarımı yapılan bu bitkinin, öncelikle subtropikal iklim koşullarında yetiştirildiği; anavatanının Güneydoğu Çin olduğu (Şehirali ve Özgen 1987) aynı zamanda Doğu, Güneydoğu ve Güney Asya'da uygulanan değişik yetiştirme teknikleri ve ekolojik etmenler ile çok sayıda tiplerinin ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Sauer 1993).

Türkiye'de çeltik üzerinde klasik ıslah yöntemleriyle uzun zamandan beri araştırmalar yapılmaktadır. Son 100 yıl içerisinde, klasik bitki ıslahı yöntemleri sayesinde, özellikle melez çeşitlerden yararlanarak birim alandan elde edilen ürünün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmıştır. Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık ve bitkinin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli engellerle karşılaşmıştır (Kumlay ve Dursun 2003). Örneğin kısırılık ve uyuşmazlık nedeniyle türler arası melezleme çok zordur. Başarı oranı düşük olduğu için elde edilmiş bitki sayısının ve istenilen karakterlerin yeni bitkilerine aktarılması da azalmaktadır. Söz konusu karakterler değişik bitki türlerine aktarılabilirler dahi, istenmeyen özelliklerin melez döllere geçişini önlemek neredeyse olanaksız hale gelmekte, geri melezleme yöntemiyle bu olumsuzlukların ortadan kaldırılması ise oldukça uzun zaman almaktadır (Sleper and Poehlman 2006). Ayrıca, klasik bitki ıslah yöntemlerinden olan melezleme ve seleksiyon teknikleriyle sonuca ulaşmak oldukça yavaştır (Yüceer 2011). Oysaki kullanım alanı giderek yaygınlaşan bitki genetik mühendisliği teknikleriyle, bu

olumsuzluklar kolayca aşılabilmekte, orijinal bitkinin arzu edilen karakterlerini değiştirmeksizin bir ya da bir kaç gen, yeni özellikler kazandırmak amacıyla bitkilere kolayca aktarılabilmektedir. Bir başka deyişle, bitki genetik mühendisliği tekniklerinin kullanılmasıyla, ıslah süresinin kısaltılması ile melezlemede karşılaşılan engeller, genetiğe bağlı olan sorunları ve gen havuzlarından yararlanmadaki sınırlamalar kolayca ortadan kaldırılabilmektedir (Özcan ve Özgen 1996). Ancak, arzu edilen tarımsal özelliği belirleyen bir genin üzerinde çalışılan kültür bitkisine aktarılabilmesi, öncelikle etkin bir gen aktarma sisteminin geliştirilerek uygulamaya konulmasına bağlıdır.

Çeltik ekiliş alanlarını sınırlayan sulama suyu yetersizliğine rağmen çeltik, yaklaşık olarak dünya tahıl ekiliş alanlarının 1/5'ini kaplayıp üretimi yapılmaktadır (Sade vd. 2011). Islah edilmiş kültür bitkilerinin yabani formlarıyla karşılaştırıldıklarında birçok mantar, bakteri ve virüs hastalıkları ile zararlılara karşı daha duyarlı olduğu, bu durumun genelde uygulanan ıslah yöntemlerinin eksikliğinden kaynaklandığı görülmüştür (Gnanamanickam 2009).

Gerek ülkemizde ve gerekse de dünya genelinde çeltik ekim alanlarında sorun olan yabancı ot türlerine bakıldığında *Echinochloa* spp., *Cyperus* spp., *Scirpus* spp., *Alisma plantago-aquatica*, *Paspalum* spp. ve *Juncus* spp. cinsine ait türlerin önemli olduğu görülmektedir (Korkut ve Kasa 1981, Graham vd. 1996, Işık ve Mennan 2001, Işık vd. 2000, Osuna vd. 2002, Kuk vd. 2004, Damalas vd. 2006, Akçam vd. 2006, Galon vd. 2008, Norsworthy vd. 2013). *Cyperus* cinsi tarım alanlarında önemli sorun olan *Cyperus difformis* L. (Kız otu), *Cyperus esculentus* L. (Sarı topalak) ve *Cyperus rotundus* L. (Topalak) olmak üzere üç önemli türü barındırmaktadır (Okoli vd., 1997; Price vd. 2010, Juraimi vd. 2012).

Islah programlarında, seleksiyon çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulduğundan, hastalık, zararlılara karşı dayanıklılık (Özcan ve Özgen 1996) ve herbisitlere karşı dirençli bitkilerin eldesi her zaman ikinci planda kalmıştır. Yıllardan beri çeltik bitkisi, çeşitli biyotik ve abiyotik strelelere karşı kimyasal ilaçlarla korunmuş; ancak, kullanılan bu ilaçların ayrışmadan uzun süre kalabilmeleri insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir.

Çeltik yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede (Moody vd. 1985, 1989, 1991, Moorthy ve Manna 1993, Najib vd 2006, Pacanoski ve Glatkova 2009, Anwar vd 2012) olduğu gibi ülkemizde de bu üründe yabancı ot mücadelesi doğrudan herbisitlere bağımlı olarak sürdürülmektedir.

Toplam dayanıklı populasyonlar içerisinde tespit edilen türlerin 124'ü geniş yapraklı 87'si ise dar yapraklı türleri kapsamaktadır (Anonim 2015n). Bu sorunun zamanla katlanarak daha da büyüüp tarımsal üretimde herbisit kullanımını büyük ölçüde kısıtlayacağı ve üretimde büyük azalmaların meydana gelebileceği tüm araştırmacıların ortak kanısı haline gelmiştir. Yirmibir farklı herbisit grubuna 393 dayanıklı yabancı ot biyotipin bulunduğu günümüzde ALS inhibitörü herbisitler 127 dayanıklı biyotip sayısı ile ilk sırada yer almaktadır (Adamczewski ve Matysiak 2012).

Gerek dünyada gerekse de ülkemizde herbisit kullanımındaki artışa bağılı olarak tarımsal açıdan çeşitli sorunların ortaya çıktığı bu sorunlar içerisinde önemli bir yer tutan dayanıklılık olgusunun ise tarımsal üretimi tehdit edecek boyutlara ulaştığı bir gerçektir.

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeltik ekim alanlarında verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen hastalık, zararlı ve yabancı otlar bulunmaktadır. Kimyasal ilaçlar genelde yabancı otlara ve mantarlara karşı etkili olmakla birlikte, virüs, viroid ve bakterilere karşı yetersiz kalmaktadır. Bu durum, çeltik bitkisinde alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Khawar 2001).

Çeltik Türkiye için önemli bir kültür bitkisi olmasına rağmen toplam tahıl ekim alanı içinde ancak % 0,31, üretimde ise % 0,74 pay almaktadır. Ekiliş alanı ve üretim iç tüketimi karşılayacak nitelikte olmayıp her yıl 100-150 bin ton civarında pirinç ithal edilmektedir (Anonim 2014). Çeltik üretiminde ürün kaybına neden olan faktörlerin başında yabancı otlar gelmekte olup bu oran yetiştiricilik sistemlerine, çeltik çeşidine, yabancı ot türüne ve yoğunluğuna bağılı olarak % 30-100 arasında değişim göstermektedir (Smith 1988, Anonim. 2015f). Çeltikte karşılaşılan en önemli sorun yabancı ot kontrolüdür. İyi hazırlanmış, yabancı otlardan temizlenmiş bir tohum yatağına ekim yapılırsa çeltiğin fazla bir bakıma ihtiyacı yoktur. Yabancı ot kontrolü

genellikle elle yapılmaktadır (Rice 1995). Bütün koşullar iyi olsa dahi çeltik bir defa elle yabancı ot kontrollü yapılması faydalıdır (Pedroso vd. 2009). En etkili mücadele yöntemi elle yapılan olmasına rağmen iş gücünün pahalı olması nedeniyle herbisitler tercih edilmektedir. Ancak bilinçsiz kullanılan herbisitlerin çeltiğin çimlenmesinden başlayarak bitkinin bütün gelişme dönemlerinde olumsuz etkilerin bulunduğu belirlenmiştir. Bu sorunları ortadan kaldırmak için herbisitlere dayanıklı çeşitleri geliştirmek zorunlu hale gelmiştir. Klasik ıslah yöntemleriyle bu hedefe ulaşmak oldukça zordur. Bu sorunu çözebilmek için ilk önce çeltikte doku kültürü tekniklerini geliştirmek ve sonra da bunları gen aktarımında kullanarak herbisitlere karşı dayanıklı bitkiler elde etmek gerekmektedir (Özcan ve Özgen 1996, Khawar 2001).

Uzun yıllardan beri çeltik çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı kimyasal ilaçlarla korunmaktadır. Bilinçsiz kullanılan herbisitlerin çeltiğin çimlenmesinden salkım vermesine kadar hem verimini olumsuz etkilemekte hem de çevre kirliliğine sebep olmaktadır., Dolayısıyla çeltik bitkilerinde bu sorunlara karşı kimyasal ilaçların kullanılmaması için alternatif ıslah yöntemlerin kullanılması çok önemlidir. Bilinen en etkili mücadele yöntemi elle yapılan olmasına rağmen iş gücünün pahalı olması nedeniyle herbisitler tercih edilmektedir. Bu sorunları ortadan kaldırmak için herbisitlere dayanıklı çeşitleri geliştirmek zorunlu hale gelmiştir. Klasik ıslah yöntemleriyle bu hedefe ulaşmak zordur. Bugüne kadar Türkiye koşullarında çeltik bitkisinde yapılan doku kültürü çalışmalarında başarı oranı oldukça düşüktür ve *Agrobacterium* aracılığıyla transgenik çeltik bitkisi elde edilememiştir. Bu tezin amacı; öncelikle Türkiye’de yaygın olarak kullanılan 3 çeltik çeşidinde değişik eksplantlar kullanarak gen aktarımına uygun yüksek oranda bir sürgün rejenerasyon sistemi geliştirip, daha sonra *A. tumefaciens* aracılığıyla herbisitlere ve böceklere karşı dirençli genlere sahip transgenik bitkileri üretmektir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

Türkiye’de çeltik tarımı hem Trakya hemde Anadolu’da toplam 32 ilde yapılmaktadır. Yaşamı süresi boyunca çeltik bitkisi yabancı otlar ve farklı tip böceklerden zarar görmektedir. Çeltik tarlaları tohumlardan gelişen fideler döneminde ve yaşam sürecinde her aşamada biyotik ve abiyotik streslerin sebep olan tüm faktörlerin önlenmesi çok önem taşımaktadır. Çeltik bitkisinde böceklerin ve yabancı otlardan gelen bitkilere ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün elde etmek için hem herbisitlere ve hemde böceklere dirençli bitkilerin ıslah edilmesi önem arz etmektedir. Hızlı nüfus artış ve nüfus ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla geleneksel metodlarla biyoteknolojik yöntemlerin entegrasyon ile bu yöndeki çalışmaların hız kazandırılması büyük önem arz etmektedir. Bu tez kapsamında *Agrobacterium* aracılığıyla Türkiye’de yaygın olarak yetiştiricilik yapılan Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerine herbisitlere ve böceklere karşı dirençli genleri aktararak, transgenik bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu konuyla ilgili, daha önce yapılmış olan bazı doku kültürü ve gen aktarım çalışmalarının özetleri aşağıda verilmiştir.

2.1 Bitki Materyalinin Yüzey Sterilizasyonu

Rubluo vd. (1984), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bezelye yaprakçıklarından farklı oranda BAP, NAA, IBA ve IAA içeren MS besin ortamında 0.9-1.8 mm uzunluğunda sürgünler ve daha sonra onları köklendirerek tam bitkiler elde etmişlerdir. Oluşan sürgün yüzdesi, ortalama %26-38 arasında değişmiştir. BAP ve NAA içeren ortamında, olgunlaşmış yapraklardan gelişen sürgünlerin oranı % 7ye kadar düşmüştür. GA3in sürgün oluşumunda etkili olmadığı, pikloram ve 2,4-D nin ise olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Natalini ve Cavallini (1987) Bezelye ile yapılan bir çalışmada, sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi, genotip ve ortamda bulunan büyüme düzenleyicileri olduğu belirtilmiştir.

Khawar (2001) Tohumlarda yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının alınacağı en düşük dezenfektan dozunu (50 adet tohum için) belirlemeye çalışmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun (Axion) %50, %75, %100 lük dozları tohumlara oda sıcaklığında herbiri 4 farklı sürede (15 dakika, 20 dakika, 25 dakika, 30 dakika) uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5 kez durulanmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril Petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.8 agar ile katılaştırılan MSO besin ortamında 23° C’de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir.

Erdağ ve Yürekli (2000) Diğer bir çalışmada, Türkiye’de ekonomik öneme sahip Batı Anadolu endemiklerinden olan *Thymus sipyleus* Boiss’in (baharat) *in vitro* çoğaltılması araştırılmıştır. Sterilize edilmiş bitki tohumları modifiye edilmiş MS besi ortamı ve Heller besi ortamlarında çimlendirilmiştir.

Bürün ve Poyrazoğlu (2002). Embriyo kültürü ile ilgili diğer bir çalışmada, arpa (*Hordeum vulgare* L.)’nin olgun embriyolarının kültüründe besi ortamı bileşimi ve sterilizasyon yönteminin etkisi üzerinde durulmuştur. Kullanılan besin ortamları içerisinde embriyodan bitkicik gelişiminin en yüksek Randolph-Cox ortamında elde edildiği ve bunu sırasıyla MS, ½ MS ve B5 ortamlarının izlediği belirtilmiştir. Araştırılan sterilizasyon yöntemlerinden sodyum hipoklorit ile sterilizasyonu antibiyotik solusyonu ile muamele etme ve HgCl₂ ile yapılan sterilizasyon daha etkili bulunmuştur.

Goleniowski vd. (2003) Oregano (*Origanum vulgare* × *applii*)’ nun meristem uçlarının mikroçoğaltımı ile ilgili çalışmada, mikroçoğaltım için sterilizasyon süresince sürgün uçlarına zararın azaltılmasıyla ilgili bir yöntem geliştirilmiştir. Yeşil tipine oranla basit sürgün kısımları daha hassas bulunmuştur. *In vitro* ortamda gelişen genç bitkilerden alınan meristemler kültür süresince dış ortamda yetişenlere oranla az oksidasyon yapmışlardır. Büyüme düzenleyicilerinden BAP ve NAA’ nın çeşitli konsantrasyonlarının *O. vulgare* × *applii*’ nin mikroçoğaltımı üzerine etkileri araştırılmıştır

Akpınar (2006). Deney grubu bitkilerini elde etmek için tohumlardan çıkartılan olgun embriyolar kullanılmıştır. Bu amaçla tohumlara yüzey sterilizasyonu (2 dakika %70 alkolde, 2 dakika steril destile suda, 2 dakika %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde, ikişer defa 2 dakika süreyle steril destile suda bekletilmiştir) işlemi uygulanmıştır. Daha sonra steril kabin içerisinde embriyolar çıkartılarak tekrar yüzey sterilizasyon işlemi (1 dakika süre ile %70 alkolde, 1 dakika süre ile steril destile suda, 1 dakika süre ile %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde, ikişer defa 1'er dakika süre ile steril destile suda bekletilmiştir) yapılmıştır.

Çapan (2006) Deney grubu olarak kullanılacak *Cucurbita pepo* bitkilerinin elde edilmesi için tohumlara yüzey sterilizasyonu yapılmıştır (Kabuklu tohumlar %70 alkol içerisinde 10 dakika bekletilerek, steril destile suda 10 dakika süre ile 3 defa değiştirilerek yıkanmıştır. Daha sonra %5 lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Sonra yine steril edilmiş destile suda 10 dakika süre ile 3 defa değiştirilerek yıkanmıştır). Tohumların kabukları çıkartılarak aynı sterilizasyon işlemi tekrar uygulanmıştır. Tohumlardan, steril kabin içerisinde steril aletler kullanılarak embriyolar çıkarılmıştır.

Alkuş (2007)Yüzey sterilizasyonu için Beyşehir-98, Karatay-94, Kırıl-97 ve Konevi-98 arpa çeşitlerine ait tohumlar ilk olarak %70 etanolde 1 dakika bekletildikten sonra sırasıyla steril distile suda 1 dakika, %10 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 5 dakika tutulmuştur. Tohumlar son olarak steril distile su ile 10 kez 1'er dakika yıkanmıştır. En son yıkamada tohumlar 20 dakika steril distile suda bekletilerek, suları süzölmüştür. Tohumların sularının tam olarak süzülmesi için filtre kağıdına yayılarak bir süre bekletilmiştir.

Aktürk (2009) *In vitro* kültürlerde başlangıç *Prunus avium* eksplantı olarak kullanılan materyalin yüzey sterilizasyonunda; musluk suyu, %70'lik etil alkol, %53 NaOCl içeren ticari çamaşır suyu, Tween 20 ve steril saf su kullanılmıştır. Materyalin miktarına göre 100, 250, 500 veya 1000 ml'lik erlenmayer içerisinde steril saf su ile hazırlanan NaOCl solüsyonuna, yayıcı-yapıştırıcı olarak her 100 ml için 2 damla Tween 20 ilave edilerek ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Musluk suyunda yıkama dışında, sterilizasyonun

bütün aşamaları transfer odasında yapılmıştır. Kültürlerde, 20 veya 24 mm çaplı deney tüpleri kullanılmıştır. Her tüpe, MS besi ortamından 7-8 ml bırakılmış ve eksplant ekiminden sonra ağızları parafilm ile kapatılarak tüplükler içerisinde kültür odasına bırakılmıştır. Tomurcuk ve tohum ile yapılan deneylerde, başlangıç eksplantlarının yüzey sterilizasyonuna, solüsyonların konsantrasyon ve uygulama sürelerinin etkileri incelenmiştir. Kültürün 14. gününde sonuçlar alınmış ve her iki materyal için “Temiz Kültür Oranı” ile, tomurcuklar için “Yaşayan Kültür Oranı” ve tohumlar için “Çimlenme Oranı” belirlenmiştir. Temiz Kültür Oranı (%): Deney sonunda, bakteriyel veya mantar bulaşması görülmeyen kültürlerin ilk eksplant sayısına oranını ifade etmektedir. Yaşayan Kültür Oranı (%): Lateral tomurcuklarla yapılan deney sonunda, bakteriyel veya mantar bulaşması görülmeyen ve canlılığını devam ettiren, alt kültüre alınabilir haldeki kültürlerin ilk eksplant sayısına oranını ifade etmektedir. Çimlenme Oranı (%): Tohumlarla yapılan deney sonunda, çimlenen tohum sayısının, ekilen tohum sayısına oranını ifade etmektedir.

Baktemur (2009) Kavunda (*Cucumis melo* var. *inodorus*) Tozlanmadan 21–25 gün sonra olgunlaşmamış meyveler hasat edilmiştir. Hasat edilen meyveler Doku Kültürü Laboratuvarı'na getirilmiş önce çeşme suyuyla yıkanıp kurulandıktan sonra steril kabin içerisinde % 96'lık etil alkolle kuru yakma yöntemi ile dezenfekte edilmiştir.

Lotfi ve Salehi (2008) yılında yaptıkları bir diğer çalışmada da sıvı ortama alınan salatalık (hıyar) tohumların % 22'sinin enfeksiyon kapmasını bildirmişlerdir. Enfeksiyondan meydana gelen kayıpların Chlorox (kloroks) ile dezenfekte edilen tohumlarda % 7.8'den az iken, meyve dezenfeksiyonunda %35 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Sıvı kültürde enfeksiyon çok büyük bir problem oluşturmaktadır. Çünkü tek bir tohumda meydana gelen bir enfeksiyon bile kısa sürede tüm ortama bulaşmaktadır.

Tohumlara yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Bu işlem için bir behere 2/3 oranında klorak, 1/3 oranında saf su koyup, bu karışım içinde tohumlar 10-15 dakika çalkalanmak suretiyle bekletilmiştir. Daha sonra steril saf su ile iyice durulanan

tohumlar, %96'lık etil alkol içinde 5 dakika bekletilmiş ve son olarak alkolü gidermek için distile su ile yıkanmıştır. Bu işlemler her ekimden önce tohumlara uygulanmıştır.

2.2 Doku Kültürü ile İlgili Bazı Çalışmalar

Aalders (1958) Çeltik bitkisi doku kültüründe rejenere edildiğinde değişik özellikler yönünden mutasyonlar meydana gelmektedir. *In vitro* da ortaya çıkan somaklonal varyasyondan yararlanılarak, çeltik yanıklığı (*Pyricularia oryzae*)'na, yatmaya ve tane dökmeye dayanıklı, harmanlaması kolay ve pişme kalitesi çok iyi olan "Dama" isimli bir çeltik çeşidi geliştirilmiştir.

Sun vd.(1983). Çeltik bitkisi doku kültüründe rejenere edildiğinde değişik özellikler yönünden mutasyonlar meydana gelmektedir.

Stober ve Hess (1997), buğdayda embrioid indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu için anterlere soğuk uygulamasının sıcak uygulaması veya ön uygulama yapmamaya göre daha iyi sonuç verdiğini, ayrıca sıcaklık ön uygulamasının kontrole göre daha düşük sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Hezsky ve Simon-Kiss (1992). *In vitro* da ortaya çıkan somaklonal varyasyondan yararlanılarak, çeltik yanıklığı (*Pyricularia oryzae*)'na, yatmaya ve tane dökmeye dayanıklı, harmanlaması kolay ve pişme kalitesi çok iyi olan "Dama" isimli bir çeltik çeşidi geliştirilmiştir.

Khan, vd. (1999), Hint pirincinde, olgun embriyolardan kallus oluşumunu başlatarak bitkiyi rejenere edebilmek için 2,4 D'nin tek başına farklı miktarlarda kullanılması veya buna benziladeninin farklı miktarlarda eklenerek kullanılması gerektiğini açıklamışlardır. Çalışmamızda embriyo kültür ortamı olarak MS besiyerine 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA katılmıştır.

Gonzalez vd. (2001), *Triticum turgidum* Desf. kültürlerinin olgun embriyolarında, sert bir kallus olduğu takdirde, gelişim oranının %54-100 arasında olduğunu ve kallus oluşumunda genotip ve besiyeri içeriğinin önemli olduğunu bulmuşlardır. Sert kallus oluşumu veren ve bitki rejenerasyonun en iyi olduğu besiyerlerinin MS (30 g/l maltoz) ve MS40 (30 g/l sukroz ve 40 mM NaCl) olduğunu açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda, direkt embriyolar kullanılmış kallus oluşturulmamıştır.

Babaoğlu vd. (2002) Somatik embriyogenesisin belki de en önemli kullanım alanı bitkilere gen aktarımıdır. Bitkilere gen aktarımında değişik yöntemler geliştirilmiş olmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılan bitkilerin doğal genetik mühendisi olarak adlandırılan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri aracılığıyla tarımsal öneme sahip birçok gen, iki çenekli bitkilere kolaylıkla aktarılabilmektedir. Son yıllarda süper binary vektörlerin kullanılmasıyla *A. tumefaciens*'in tek çenekli bitkilere de gen aktarım yeteneğine sahip olduğu anlaşılmış olup, bu bakteri aracılığıyla transgenik arpa, mısır ve çeltik bitkileri elde edilmiştir. Günümüzde, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan araç *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri sayesinde hemen hemen tüm kültür bitki türlerinde transgenik bitkiler elde edilebilmiştir. Başlangıçta, buğdaygilleri de içeren tek çenekli bitkilere *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan gen aktarım çalışmalarında istenilen başarıya ulaşılamamış, bu engelleri aşabilmek için elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül bombardımanı gibi doğrudan gen aktarım teknikleri geliştirilerek, oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak, son yıllarda geliştirilen süper "binari" *Agrobacterium* vektörleri sayesinde mısır, çeltik, arpa ve buğday gibi tek çenekli buğdaygillere de başarılı gen aktarımı yapılabilmektedir.

Gomez ve Kalamani (2002), yeşil noktalı olma ve köklerinin fibrilli olması gibi özelliklerin, pirinçte (*Oryza sativa* L.) kallus gelişimi ve plantlet rejenerasyonu ile ilişkili karakterler arasında olduğunu belirtmişlerdir. Pirincin (*Oryza sativa* L.) kuraklığa dayanıklı yabani ırklarında, kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonu ile ilgili özelliklerin değişkenlik analizi yapılmıştır. Kallus gelişimi ve plantlet rejenerasyonu ile ilişkili olarak bitkinin yeşil noktalı olması ve köklerinin fibrilli olması bulunmuştur.

Farooq vd. (2004), üç buğday genotipinin (Bakhtawar-92, Punjab-96 ve İnqılab-91) kallus oluşturma potansiyellerini test etmişlerdir. Bakhtawar-92'nin kallus indüksiyonuna en çok karşılık veren genotip olduğu, bunu İnqılab-91 ve Punjab-96'nın izlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca Bakhtawar-92'nin diğer genotiplerle karşılaştırıldığında fazla miktarda kallus oluşturduğunu görmüşlerdir.

Ahsan vd. (2000) Mısırın (*Zea mays* L.) doku kùltürü ve kùltürde yetiştirilmesi konusunda da araştırmalar yapılmıştır. Mısırın zayıf hücre sıralarının geliştirilmesi, daha etkili bir biçimde çoğaltılması ve fazla miktarda ürün veren hibritlerin yetiştirilmesi, doku kùltürü ile başarılmıştır. Büyük hibritlerde genetik materyalin değiştirilmesi için somaklonal varyasyonların daha kullanışlı olduğu, doku kùltürü çalışmaları ile bilinen bütün infeksiyöz ajanlara karşı kullanılabilecek olan, hastalıklara dayanıklı süper klonların elde edildiği bildirilmiştir.

Rashid vd. (2004), yine pirinç bitkisinde kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4 D iğer N6 besiyerinde başarıldığını, kallus indüksiyonunun N6 besiyerinde %83.3 ve MS besiyerinde %75.05 olduğunu ağıklamışlardır. Araştırcılara göre, kallus rejenerasyonu en iyi 1 mg/l NAA iğer besiyerinde ve 5 mg/l BAP iğer besiyerinde (örneğin; %81.6) olmaktadır. Bu çalışmada da NAA ve BAP ilave edilmiş besiyeri kullanılmıştır ve mitotik aktivitenin yüksek olduğu hesaplanmıştır.

Serhantova vd. (2004), üç farklı oksin (dikamba, pikloram, 2.4-D) tipinin, kallus teşviki ve sonrasında rejenerasyon kapasitesine etkisini araştırmışlardır. Yüksek rejenerasyon yeteneği ile bilinen Golden promise çeşidi ve Çek Cumhuriyetine ait 12 yazlık arpa çeşidinde çalışmışlardır. Genotip ve oksin tipi, kallus oluşum oranını ve elde edilen yeşil rejenerant bitki sayısını büyük oranda etkilemiştir. Çalışılan çeşitlerin çoğunda, 2.4-D iđer ortamlar dikamba ve pikloram iđer ortamlarla kıyaslandığında, en yüksek ortalama da kallus teşviki ve sonrasında yeşil rejenerant bitki elde edilmiştir. Genotipler arasında ise, en yüksek yeşil rejenerant bitki sayısı (üç oksin tipinde), doku kùltürü kapasitesi yüksek model bitki Golden promise çeşidinde elde edilmiştir. Çek Cumhuriyetine ait çeşitlerden ise üçünün rejenerasyon yeteneğinin yüksek olduğu belirlenmiş ve genetik transformasyon çalışmaları için uygun bulunmuştur.

Sharma vd. (2005), yaptıkları çalışmada Avrupa orijinli arpa çeşitlerinin olgun embriyolarını, MS tuz ve vitaminlerine ilaveten 1 g/l kazein hidrozilat, 0.5 mg/l proline, 0.2 mg/l myo-inositol, 1 mg/l thiamine ve 1.25 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren modifiye edilmiş besin ortamında kültüre almışlardır. Kallus oluşumu için 2.4-D ve maltozun farklı konsantrasyonlarda kombinasyonlarını denerken, sürgün oluşumu içinse aynı ortamda 2.4-D ile düşük oranlarda BAP ve TDZ büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını denemişlerdir. Kallus oluşum oranlarına bakıldığında, 6 mg/l 2.4-D ile %6 (a/h) maltoz içeren ortam en iyi sonucu vermiştir. Sürgün oluşum oranlarına bakıldığında ise, düşük orandaki BAP oldukça etkili bulunmuştur. Bu protokol, bitki rejenerasyonunun (olgun embriyoların izolasyonundan, toprağa transfer edilecek bitkilerin elde edilmesine kadar tüm aşamalar) 16-20 hafta içerisinde tamamlanmasını sağlamıştır. Tüm çeşitlerde %25 ile %55 arasında embriyogenik kalluslar elde edilmiş ve embriyogenik kallus başına elde edilen ortalama yeşil bitki sayısı genotipe bağlı olarak %1.5 ile %7.5 arasındadır.

Ganeshan vd., (2003) tarafından, TDZ ve/veya BAP büyüme düzenleyicilerini içeren modifiye edilmiş (MS tuzları+ B5 vitaminleri+%3 maltoz+1 g/l kazein hidrozilat +0.7 g/l proline+5 μM bakır sülfat) besin ortamlarında, direk çoklu sürgün üretimi için farklı arpa genotiplerinin olgun embriyoları kültüre alınmıştır. Explant başına 5-6 sürgün ile, iki sıralı arpa genotipinde, 1 mg/l TDZ+1 mg/l BAP içeren ortamda, altı sıralı arpa genotipinde 1 mg/l TDZ+2 mg/l BAP içeren ortamda en iyi sonuç elde edilmiştir. Çalışılan tüm genotiplerde, sadece BAP içeren ortamlar sadece TDZ içeren ortamlara oranla çok daha düşük oranlarda sürgün gelişmiştir.

Bouamama vd. (2011) yaptıkları çalışmada, orijini Kerkena adası olan bir Tunus arpasının rejenerasyon yeteneğini somatik embriyogenesis ve organogenesis aracılığıyla araştırmışlardır. Çimlenmeyi azaltmak veya engellemek amacıyla yaralanmış ya da uzunlamasına ikiye ayrılmış olgun karyopsisleri, büyüme düzenleyicileri ile zenginleştirilmiş modifiye CP (Chee ve Pool 1987) besin ortamında kültüre almışlardır. En iyi embriyogenesis sonucu, yaralanmış karyopsislerin 2 mg/l CPA+2.5 mg/l Kinetin içeren CP besin ortamında kültüre alınmasıyla elde edilmiştir (%75.85). Embriyogenik kalluslar, büyüme düzenleyicisiz MS besin ortamında somatik embriyoların farklılaşma

aşamalarının (globular, torpido, kalp) tamamını geçirmişlerdir. Köklenen bitkiler başarılı bir şekilde toprağa transfer edilmiş olgun haline gelinceye kadar serada yetiştirilmiş ve fertil tohumlar 3 ay içinde üretilmiştir. Organogenesis ise, 2 mg/l 2.4-D+2.5 mg/l Kin içeren CP besin ortamında başarıyla tamamlanmıştır. Çalışılan arpa çeşidindeki bu etkili rejenerasyon sistemi transgenik bitkilerin elde edilmesini ve germplazm korunmasına olanak sağlamaktadır.

Uçar ve Turgut (2009) Bazı Dağ Çayı tohum çimlendirme denemeleri için, MS ortamına miliporfilitreden geçirilen GA3'ün farklı konsantrasyonları ilave edilerek MS0 (0 hormon seviyesi), MS1 (5mg/l GA3), MS2 (10mg/l GA3) ve MS3 (15mg/l GA3) olmak üzere 4 farklı ortam oluşturulmuştur. Daha sonra ortam iyice karıştırılıp 9 cm çapında olan Petrilere dökülmüştür. Ekimi yapılacak türlerin tohumları 1 hafta boyunca 4 °C' de bekletildikten sonra, ısıtıcılı karıştırıcıda saf su içinde 1 saat boyunca karıştırılıp ardından steril kabin içerisinde %20'lik sodyum hipokloritte (Domestos®) yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra, 4 farklı ortama her Petriye 10'ar tohum gelecek şekilde 3 tekerrürlü olarak ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra Petrilerin etrafı parafilm ile sarılmıştır.

Aydın vd. (2011) Bu çalışma buğdayda olgun embriyo kültürünü etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla yapılmıştır. Kallus, embriyogenik kallus, somatik embriyo oluşumu ve rejenerasyon kapasitesine genotipin, jel yapıcı maddenin, oksin tipleri ve dozlarının etkisi çok önemli olmuştur. Buğday olgun embriyo kültüründe oksin tipi olarak dikambanın, 2,4-D ve pikloramdan, yine jel yapıcı madde olarak phytagelin, agardan daha etkiliği olduğu saptanmıştır. En yüksek kallus, embriyogenik kallus ve somatik oluşumu ve de bitki rejenerasyon kapasitesi phytagel ortamındaki dikambanın 4 mg/l dozunda elde edilmiştir. Rejenerasyon ortamının rejenerasyon kapasitesine etkisi çok önemli olmuştur. En yüksek rejenerasyon kapasitesi R1 (0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP) içeren ortamda meydana gelmiştir.

2.3 Gen Aktarım ile İlgili Bazı Çalışmalar

Christou vd. (1991) Bir çalışmasında transgenik pirinç üretimi (*Oryza sativa* L) için olgunlaşmamış zigotik embriyoları dışsal DNA elektrik deşarj parçacığı hızlandırarak agronomik olarak önemli *indica* ve *japonica* tip çeltik çeşitlerine gen aktarım protokolü geliştirmişlerdir.

Gatehouse vd. (1997), GNA lektin genini kullanarak elde ettikleri transgenik patateslerde ekspresyon seviyesini %2 olarak belirlemişlerdir. *Lacania oleracea* (L.) yaptıkları deneylerde GNA geni bulunan bitkilerde yapraklardaki zararın %50 azaldığını, böcek popülasyonununun %45-65 oranında azaldığını bildirmişlerdir

Cheng vd. (1998), 9 farklı çeltik genotipinde *A. tumefaciens* ile *Chilo suppressalis* ve *Scirpophaga incertulas*'a dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Bu amaçla mısır *ubiquitin*, CaMV35S ve Bp10 (polen spesifik) promotorları ve NOS terminatörleri tarafından kontrol edilen *cryIAb* ve *cryIAc* genleri ile iki farklı *Agrobacterium* hattı (LBA4404 ve EHA105) kullanmışlardır. Çeltikte LBA4404 bakteri hattı süpervirulent EHA105 bakteri hattından daha etkili bulunmuştur. 35S promotoru bulunan bitkilerde toplam çözünebilir protein içerisinde toksin miktarı %0.01-0.15 arasında değişim gösterirken bu oran *ubiquitin* promotoru ile elde edilenlerden 10 kat daha düşük bulunmuştur. Polen spesifik Bp10 promotoru bulunan bitkilerde ise yaprak dokularında beklendiği gibi hiç ekspresyon seviyesi görülmemiştir. R1 transgenik bitkilerinde her iki böcek ile yapılan analizlerde 5 gün içerisinde %97 -100 ölüm oranı belirlemişlerdir.

De Maagd vd. (2000), *cryIAb*, *Ac*, *Ba*, *Da*, *E* ve *Fa* genlerinin I. ve II. Domanlerini *cryIcA* geninin III. domaini ile hibritlemişler ve hibrid ve ebeveyn genlerin *Spodoptera exiqua*'ya karşı etkilerini incelemişlerdir. *CryIcA-cryIcA* hibridi dışındaki bütün hibridlerin *S. exiqua*'ya karşı toksititesi artmıştır. Ayrıca *cryIcA-cryIcA* hibrid geninin *Manduca sexta* böceğe karşı oldukça etkil olduğunu bulmuşlardır.

Naimov vd. (2001), *CryI* delta endotoksinlerinin genellikle Lepidopterler üzerinde etki olduğunu bildirmişlerdir. Ancak *cry1Ba* ve *Cry1Ia*'nın düşük düzeylerde de olsa *Leptinotarsa decemlineata* gibi Coleopterler üzerinde etkili olduğunu ve bunların domainleri arasında yapılacak hibritlemelerle elde edilen yeni genlerde Coleopterlere karşı daha fazla dayanıklılık elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu amaçla yaptıkları hibritler sonucunda elde edilen 3 yeni gen *SN15(Ia/Ia/Ba)*, *SN16 (Ba/Ba/Ia)* ve *SN19 (Ba/Ia/Ba)* *L. decemlineata* karşı *Cry1Ia* ve *cry1Ba*'dan daha toksik bulunmuştur.

Thi Loc vd. (2002) Elit pirinç (*Oryza sativa*) çeşitlerine *Cry1Ac* Bt toksini (*Bacillus thuringiensis* δ -endotoksini) ve kardelen lektin kodlayan genler (GNA *Galanthus nivalis* agglutinin) bir transformasyon çalışması yapmıştır. Biyolistik transformasyon böcek öldürücü proteinler tatbik etmek için kullanılmıştır. Bitki transformasyon için aynı zamanda uygun bir gen yapısı içeren tüm plazmidler veya plazmidlerden kesilmiş vektör dizileri eksik lineer DNA fragmanları paralel deneyler olarak yürütülmüştür. Her iki transformasyon yöntemleri ile bir birinden bağımsız olarak benzer sayıda transformasyon olayları oluşturur. Seçilen R_0 klonal bitki hatlarında daha transgenlerin varlığı ve ifadesi için karakterize edildi. Pirinç bitkisinin önemli zararlıların böcek biyo-GNA eksprese eden transjenik bitkiler, kahverengi bitki zararlısına (*Nilaparvata lugens*) karşı dirençliliği göstermiştir ve *Cry1Ac* eksprese eden bitkiler şeritli sapı kurduna (*Chilo suppressalis*) karşı dirençliliği göstermiştir. Her iki transgen ifadesi, her iki zararlılara karşı koruma sağlanmış, ancak bu dirençliliği ile tek gen taşıyan bitkiler ile kıyaslama sonucu göze çarpan koruma görülmemiştir.

Marfa vd. (2002). Bir derlemede dah önce yapılmış çalışmalarında pirinç bitkisinin önemli zararlıların böcek biyo assay ile -GNA eksprese eden transjenik bitkiler elde ederek kahverengi bitki zararlısına (*Nilaparvata lugens*), karşı dirençliliği geliştirilmiş olduğunu göstermiştir ve *Cry1Ac* eksprese eden bitkiler şerit sapı kurduna (*Chilo suppressalis*) karşı korumuştur. Her iki transgen ifadesi, her iki zararlılara karşı koruma sağlamış, ancak tek bir insektisid transjeni ihtiva eden bitkilerde gözlenen seviyeleri üzerinde belirgin bir zararlı ya da karşı koruma artmamasını görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Espinoza, vd. (2003) tarafından pirinç hoja blanca virüsünün moleküler karakterizasyonu başlatılmıştır. Çalışmada yerli indica tipi çeşitlerin genom analizi yapılmıştır, bitki rejenerasyon sistemi geliştirilmiştir ve virüse karşı dirençli transjenik bitkilerin üretimi amacıyla yerel Kosta Rika indica pirinci çeşitlerini kullanılmıştır. Aşağıdaki araştırmanın ilk aşamasında bar genini ifade ederek, virüs ve herbisit PPT direnç vermek amacıyla, RHBV sekansları ile Kosta Rika çeşitlerinin genetik mühendisliği ile dayanıklı pirinç hatlarının geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır. Üretilen transjenik hatların RHBV' viruse, ve PPT'e karşı dirençliliği kontrol edilmiştir ve yerel alan koşulları altında bitkileri agronomik performans açısından değerlendirilmiştir. İleri aşamalarda transgenik bitkiler çiftçilere dağıtılarak tarlalarına götürülmüştür. Bu amaçla, RBP-CIBCM gıda ve çevre güvenlik değerlendirmesi yapılacaktır ve içeren çok adımlı bir yaklaşım izleyerek fikri mülkiyet hakları (FMH) sorunları çözmeye yönelik çalışmalar yapılacaktır.

Datta (2003) Kök kurdu Asya'da pirinç önemli verim kayıplarına neden olan ciddi bir haşeredir. Pestisitler, bu zararlıyı kontrol etmek için genel olarak kullanılmaktadır. Yetiştirme koşulları geniş bir yelpazede için transgenik Bt pirinç geliştirilen ve daha önce üzerinde bildirilmiştir. Bu çalışmada, 'Shanyou 63', çeşidinde cry1B / Cry1Ab geni kullanarak Bt pirinç bitkisi elde edilmiştir ve böceklere karşı davranışları T₄ nesiline kadar incelenmiştir. Bt-pirinç seleksiyon için hat hph serbest genleri kullanılmış ve değerlendirilmiştir. Bt genleri, tek başına ya da bitki koruma için diğer genler ile kombinasyon halinde pyramiding Transgen pirinçte geliştirilmiştir. Asya'da Bt pirinç pestisit kullanımını engelleme ve istilasından verim kayıplarını azaltırken, bitki koruma sağlamak için bir potansiyele sahiptir. Bir genin Piramid stratejisi kullanılarak böceklere karşı koruma genlerin dağıtım bitki koruma üst düzeye çıkartılması ve dirençli böceklerin gelişmesini mücadele için çok önemli bir strateji olarak sunulmuştur.

Chen vd. (2004) bu çalışmada Cre/lox enzim aracılığıyla gen keserek ticari çeltik bitkilerine aktarmıştır. Recombinat reporter gen sistemi de geliştirilmiştir. Bunlarda seleksiyon için 2 adet lox bölgeleri içerisinde rice actin 1 promoter ve promotörsüz gus A gen kullanılmıştır. Bu sistemde site spesifik rekombinasyon için gusA aktivasyon dan sonra GUS ekspresiyon görünür. Melezleme yaparak ore geni lox bitkilere

aktarılmıştır 30 adet hibrid To actin1 promoter lox hpt-lox –hpt-lox gus A ile 4 adet melezleme gerçekleştirilmiştir. 12 adet bitkide gus ve 9 adet bitkide higromisine karşı dirençli bitkiler bulundurulmuştur. Ayrıca, Cre/lox'ın hpt gen ile eilit indica tipi çeltik restorer Minghui -86'nın transformasyonu için modifiye edilmiş cowpea trypsin inhibitor gene sck ve *Bacillus thuringiensis* endotoxin gene cryIAC ile beraber kullanılmıştır. Elde edilen 77 adet transgenik bitkide 9 adet T₂ homozygous lox-hpt-lox-sck-cryIAC ile T₂ homozygous cre melezlerden elde edilen 56 adet bitkide higromisin hassasiyeti görülmüştür. Moleküler analiz sonucunda transgenik aday bitkilerinde higromisin hasasiyeti teyid edilmiştir.

Breitler vd. (2004), Espanya Delta de l'Ebre bölgesinde 2001 ve 2002 yılında Ariete (A) ve Senia (S), ticari çeltik çeşitlerinden elde edilen 7 adet homozigot hatlar cry1B ve cry1Aa Bt δ-endotoxin genleri akatararak striped stem borer (SSB) (*Chilo suppressalis*) zararları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre codon-optimized toxin geni constitutive ubi1 genin promotör veya mısırdan elde edilmiş wound-inducible mpi geni kontrol altında konulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre cry1B (A64.1, A33.1, A3.4 and S98.9 hatlarında) veya cry1Aa (S05.1 and A19.14 hatlarında) ubi1 promotör tarafından kontrol edilen genlerin varlığı ve kök, yaprak ve tohum dokularında kalıcı böcek öldürücü proteinin oluşturulması tespit edilmiştir. Buna karşı yaralı olmayan dokularda mpi promotör tarafından kontrol edilen Cry1B geni içeren bitkilerde her hangi toksin bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre doğal streslerinde wound inducible (yara uyarımlı) promotör faaliyetleri hızlandırmamaktadırlar. Ancak, A9unda 0.2% toksin çözülebilen proteininin varlığı tespit edilmiştir. Cry 1 Aa geni ile transformasyon yapılmış iki adet hat dışı Ebeveyn ve transgenik bitkilerin agronomic özellikleri arasında belirgin farklılık görülmemiştir. Transgenik bitkilerde farklı seviyede böcekler karşı dirençliliği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar sera denemelerinden elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir. Cry1B ve Cry1Aa geni ile transformasyona uğramış A3.4 ve S05 çeltik hattında SSB zararlarına karşı %100 dirençlilik tespit edilmiştir. Benzer şekilde, A9.1 çeltik hattında böceklerle karşı tatmin edici dirençlilik tespit edilmiştir.

Ramesh vd. (2004a) *Agrobacterium* aracılığıyla hibrid pirince kök kurduna karşı dirençli bitkiler elde edilmiştir. Bu çalışmada Karnıbahar mozaik virüsü 35S promoteri tarafından kontrol edilen ve darı ubikutin promotörü tarafından kontrol edilen Cry1Ab / cry1Ac genleri ve herbisid direnç geni bar ihtiva eden iki pSB111 süper ikili vektörleri kullanılmıştır. *Agrobacterium* ile ko-kültivasyonu takiben embriyogenik kalluslar fosfinotrisin içeren ortamda seçilmiştir. Kalıcı transformasyon ve Cry1Ab ve cry1Ac kodlayan dizileri kapsayan genlerin genomuna entegrasyonu Southern blot analizleri ile tespit edilmiştir. Transgen ayrılığı moleküler analizlerle teyit edildiği üzere: T₁ bitkileri monojenik desen (3:1) ile transgen segregasyonu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre T₁ projenilerinde (nesillerinde) Bar ve cry genlerinin birlikte aktarılması pirinçte transgenlerin tek bir bölgede entegre olduğunu ileri sürmektedir. Transformasyona uğramış bitkilerde 0.03 -0.13 arasında değişen çözünür Cry proteinlerin varlığı görülmüştür. Insektisidal proteinleri eksprese eden bu transgenik hatları, kök delici kurtlara karşı önemli bir seviye de dirençliliği bulundurmıştır. Bu melez pirinç geliştirilmesinde önemli rol oynayan elit ebeveyn hatlarının içine *Bacillus thuringiensis* (Bt) crygenlerin transformasyon ile ilgili ilk rapordur.

Ramesh vd. (2004b) yaptığı çalışmada *Indica* çeltik çeşitlerinin *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonun çok zor olduğu vurgulamışlardır. Bu çalışmada karnabahar mozaik virüsü 35S tarafından kontrol edilen herbisid direnç geni bar ile birlikte pirinç sakroz sentaz promoteri tarafından kontrol edilen *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin sentetik Cry1Ab ve darı ubikutin promotörü tarafından tahrik edilen cry1Ac genleri ve kardelen Lektin geni GNA içeren pSB111 süper ikili vektörler kullanarak böcek zararlılarına, duyarlı çeşitli *indica* pirinç hatları geliştirmeye çalışmışlardır. Bu transformasyon protokolünde *Agrobacterium* ile ko-kültivasyon esnasında pirinç eksplantlarında kallus hücreleri, T-DNA transferi sıklığını artırmak için optimize edilmiştir. GusA içeren pTOK233 vektörü ile transformasyon çalışmalarında kallusların kültürasyondan önce 100 mM asetosiringon ile muamele edilmiştir. Elde edilen kalluslarda geçici GUS ekspresyonunu gösteren eksplantların sayısında önemli bir artış (61,54-133,33%) tespit edilmiştir. *Agrobacterium* ile ko-kültivasyondan sonra embriyogenik kallusların ortamında fosfinotrisin konularak

seleksiyon yapılmıştır. PCR sonucu elde edilen bitkilerde GNA stabil entegrasyonu ortaya çıkmış olup baskın bir tek kopya entegrasyon ve T-DNA'nın herhangi bir yeniden düzenlenmesi olmayan pirinç genomuna kodlama cry genle ilgili dizilerinin entegrasyonu Southern blot analizleri. Northern blot analizleri ile tespit edilmiştir. Ayrıca, Çeltiğin T₁ hatında bar geni ve bar-TBMM eş segregasyon bar ve bar-gna genlerin pirinç genomunda tek bir yerde entegre olduğunu teyit edilmiştir. Daha sonar elde edilen sonuçlara göre 3 adet bitki transgenik bitkide öz suyu emici kök kurduna karşı dirençliliği tespit edilmiştir. .

Chen vd. (2005), çeltiğe *cry2A* genini *Agrobacterium* aracılığıyla aktarmışlardır. Yapılan PCR analizinde 102 adet bitkiden 71 tanesinin *cry2A* genini içerdiğini belirlemişler. Transgenik bitkilerde *Cry2A* protein miktarı 9.65 - 12.11 ug/g arasında değişim göstermiştir. Transgenik bitkilerin Lepidoptera takımına ait çeltik zararlılarına karşı önemli ölçüde koruma sağladığını gözlemişlerdir

Bashir vd. (2005) Bu denemede *cry1Ac* ve *cry2A* Bt geni taşıyan transgenik Indica tipi basmati çeltiğin tarla denemeleri hakkında bilgi vermiştir. 2001 ve 2002 yılında farklı transgenik hatları tarlalarında ekmiştir. Bu denemede suni olarak yellow stem borer (YSB, *Scirpophaga incertulas*) ve doğal olarak bulunan rice leaf folder (RLF, *Cnaphalochrochus medinalis*)'nın etkileri incelenmiştir. Transgenik bitkilerde kontrol bitkilere göre sırasıyla vejetatif ve çiçeklenme aşamada YSB'e karşı %100 ve %98 dirençliliği ve RLF'e karşı %98 dirençli olduğu görülmüştür. Ortalama başak sayısı, bitki boyu ve olgunlaşma süresinde varyasyon görülmüştür. Transgenik bitkilerde suni koşullarda kontrol bitkilerine göre %59 ve doğal koşullarda ise %8 daha fazla tohum oluşumu gözlenmiştir. Ticari olarak bulundurulan Bt pamuk, mısır ve patatese göre Cry protein ekspresiyon seviyesi daha da yüksek olmuştur. Böceklere karşı etkili; ancak, artan yaş ile bitkilerde toksisite seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Transgenik bitkileri Bt toksini kökler vasıtasıyla MS ortamı, hidroponik kültürleri ve toprağa kirletmesini ispatlanmasında ELISA testi kullanılmıştır ve pozitif sonuç elde edilmiştir.

Deng vd. (2014) Gelecekte Herbisit direnci ile fotoperiyot duyarlı genetik erkek steril (PGM) pirinç hatları hibrit tohum üretimi ve ot kontrolü mekanizasyonu için uygun

olacaktır. Çift herbisid toleranslı transjenik PGMS pirinç geliştirmek için, optimize edilmiş EPSPS geni ve bar geni taşıyan *Agrobacterium* aracılı transformasyon yoluyla, 7001S bir japonica PGMS pirinç çeşidine transformasyon yapılmıştır. EPSPS geni kodlama sekansı PCR analizi, EPSPS proteini enzim bağlı immünosorbent deneyi ve herbisite dayanıklı analizi ile doğrulanmıştır. Yapraklarda en fazla EPSPS proteini nispi nem ekspresiyon seviyesi, toplam çözümlü proteinlerin %9,02e ulaşmıştır. Transformantlar optimize EPSPS genini barındıran Bar geni de eş zamanlı olarak filizlenme aşamasında glifosat ve glufosinata karşı dirençli olan; dayanıklı dozajlar 0.375 g glufosinat/ m² ve 0,833 g glifosat m/2 olarak tespit edilmiştir.

Weng vd. (2014) bu çalışmada, yeni füzyon geni Cry2Aa # sırasıyla optimize edilmiş Cry2Aa geninin ucuna 3 'ucunda ve endoplazmik retikulum tutma sinyal peptid KDEL 5' PR1a sinyal peptidini kodlama dizisinin eklenmesi ile tasarlanmıştır. Cry2Aa # Bar genlerin *Agrobacterium* aktarma yöntemi kullanarak, 4008S, pirinç bir fotoperiyot duyarlı gen erkek steril (PGM) doğrultusunda transform edilmiştir. PCR ile teyit 65 rejenere bitkiciklerin toplam Southern blot analizi ile teyit edildiği gibi, sekiz transgenik tek kopyalı eklemeleri olan bitkilerde olduğu gibi üretilmiştir. Cry2Aa # gen ekspresyonunun yüksek değişkenlik tek kopya sokma bağımsız transgenik kuşaklar arasında gözlenmiştir. ve Cry2Aa protein ekspresyonunun uzaysal fark, her bir transgenik hatdan keşfedilmiştir. Sonuçlar transgenik hatlar sadece Cry2Aa geninin etkili optimizasyonu doğrulamışlardır, glufosinate, pirinç yaprağı rulo ve çizgili kök kurduna karşı son derece dayanıklı görülmüştür; ancak, aynı zamanda böcek dayanıklı ve herbisit toleranslı hibrit çeşitlerin ıslah için tohum üretilerek yararlı bir pirinç genetik materyalini ürettiğini gösterilmiştir.

Takaiwa vd. (2007) yaptığı bir çalışmada 7Crp peptid ekspresiyon gösteren transgenik çeltik bitkileri elde etmişlerdir. 7Crp peptid Japon cedar polen alergen Cryj1 ve Cryj2 orijinli 7 adet, insan T-hücrenden elde edilen epitop hibridlerden oluşmaktadır (7Crp peptid 7 adet insan T- hücre epitopların hybridizasyon sonucu elde edilmiştir ve Japon çam polen alerjenlerden elde edilmiştir) Yüksek miktarda RNA transkriptlerin yaprak, gövde ve tohum embriyosunda görülmesine rağmen; transgenik bitkilerde 7Crp geni çeltik AGPase large subunit veya mısır ubiquitin-1 promoterlern kontrol altında tohum

endosperm bölgelerde görülmüştür. konfokal ve ekektron mikroskop incelenme sonucu 7Crp peptidin endoplasmic reticulum esaslı I (PB-I). protein içeren cisimlerinde bulunmasını teyid edilmiştir. Yabancı rekombinant proteinlerin eldesinde başka dokulara göre endosperm dokuların daha avantajlı olduğunu ait bilgiler tespit edilmiştir.

Yarasi vd. (2008) Pirinç (*Oryza sativa*) verimlilik sayısız olumsuz biyotik ve abiyotik faktörler tarafından etkilenmektedir. Her yıl pirinç büyük miktarı biotik streslerden dolayı kayıp olmaktadır ve bunun ~%21% böcek zararlılarının saldırılarından kaynaklanan faktörlere bağlı olarak kaybolmaktadır. Bu yazıda *Allium sativum* yaprak aglutinin (asal) geni ve *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon yöntemi kullanılarak elit indica pirinç çeşitlerinde bu genin kendisinin ifadesi beyan ederken izolasyonu, klonlama ve karakterizasyonu rapor edilmektedir. Transgenik bitkilerde özsu emici zararlılara karşı kalıcı Asal gen ifadesi ekspresiyon göstererek dirençliliği kazandırılmıştır. Sonuçları Northern ve Western blot analizi ile transformasyon tespit edilmiştir.

Li vd. (2009) *Phytophthora ricotianae* ve *Verticillium* solgunluk karşı direncini arttırmak için McCHIT1 kitinaz (DQ407723) geni pirincin restorer hatına aktarılmış, olup, pirinç bitkisinde pirinç patlama ve *Rhizoctonia solani* (kılıf yanıklığı)'na karşı gelişmiş direnç göstermiştir. McCHIT1 geninin aşırı ekspresyonu, transgenik pirinç Bu iki önemli patojenlere karşı kısmi bir hastalığın azalmasına neden olabilir.

Xiao (2009) bu çalışmada herbisite dayanıklı transgenik çeltiği geliştirmek amacıyla restorer hatlarına ek olarak, ot öldürücü ilaç dayanıklılığı genleri arttırmak ve hibrid tohum saflığını belirlemek ve melez tohum üretim mekanizasyonunu gerçekleştirmek için Minghui 63, R752, T461, R402, nin, D68 ve E32 olarak elit restoratör hatları, iki satır sisteminin restoratör hatları olan D68 ve E32 olarak, herbisit direnci genleri ile doğrudan dönüştürülmüş ve diğerleri üç satır sistemi kullanmışlardır. Hemen hemen tüm önemli restoratör hatlarının indica çeşitleri ve birçok herbisit dirençli yakın izojenik restoratör hatları indica ve japonica çeşitleri geleneksel yöntemiyle melezleme yaparak geliştirilmiştir.

Taniguchi vd. 2010. Bispiribak, sodyum (L), bir pirimidinil karboksi herbisit, asetolaktat sintaz (ALS) aktivitesini gösteren iyi bilinen bir inhibitördür. ALS dallı zincirli amino asitler için biyosentetik bir yolda bulunan bir enzimdir. Pirinç ALS'nın bir mutant formu (OsmALS [W548L / S627I]) BS direnç veren, bitki transformasyonu için bir *in vitro* seçim marker geni olarak kullanılabilir. Indica ve indica kökenli çeşitlerde japonica tipi pirinçe göre daha düşük oranda BS hassasiyeti, indica tipi çeşitlerinde genetik transformasyon çalışmalarında seleksiyon markör olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, kallus ve sekiz farklı pirinç çeşitlerinde (beş indica türetilmiş çeşitlerin, iki indica çeşitlerin ve bir japonica çeşidi) ve fide BS duyarlılığı için test edilmiştir. Çalışmamız kallus indica ve indica kaynaklı çeşitlerin fidan daha BS yüksek hassasiyet göstermiş olup, ilk kez belirtilmiştir. Sadumpati vd. (2013) bu çalışmada patojen bağlı 1 (BjNPR1) Brassica Juncea Nonexpressor genleri *Agrobacterium* aracılı ticari indica pirinç çeşitleri içine genetik transformasyon amacıyla aktarılmıştır. Transjenik pirinç bitkileri Ti plasmid içeren *Agrobacterium* LBA 4404 Ti plasmid pSB111-. Bar BjNPR1- barındıran bakteri süşleri kullanılmıştır. Moleküler çalışmalarla BjNPR1 entegrasyon tespit edilmiştir. Transgenleri NPR1 ve bar stabil kalıtsal ve Mendel usullarına göre sonraki nesillerde co-ayrımı göstermiştir. BjNPR1 proteini ifade eden homozigot transjenik pirinç hatları Pirinç yanığı, kılıf yanıklığı ve bakteriyel yaprak yanıklığı hastalıklarına karşı direnç geliştirilmişlerdir. Transgenik bitkilerde göze çarpan seviyede bitki boyu, salkım uzunluğu, bayrak yaprağı uzunluğu, tohum / salkım ve tane verimi / bitki sayısında önemli artışlar göstermişlerdir. Genel sonuçları fazlasıyla pirinç başlıca patojenlere karşı direncinin kazandırılmasında BjNPR1 geni derin etkisini göstermektedir. Elde edilen sonuçlarına göre multipotent BjNPR1 geni çeşitli patojenlere karşı pirinç bitkisine direnç sağlayarak umut verici bir geni olarak görünmektedir.

Wang vd. (2014). bu çalışmada bitkileri ve yabancı otların arasındaki evrimsel etkileşimleri anlamak etkili ot yönetimini kolaylaştırabilir. Örneğin, yabancı veya çiroz yakınlarına bitkileri gen akışı alıcı toplumlarda hızlı bir evrim yol açabilir. Pirinç (*Oryza sativa*) 'de, transjenik bir bitki öldürücü rezistansı hibridizasyon ile conspecific otlu pirinç (*Oryza sativa*, *F. spontanea*) yaymak için beklenilmektedir. Bu çalışmada pirinçte glifosat direncini kazandıran geliştirilmiş spor transgenik etkisini aşırı

ekspresyonu gösteren, bir yerel 5-enolpyruvoylshikimate-3-fosfat sentaz (EPSPS) geni incelenmiştir. Fizyolojik bitki özellikleri incelenmiş olup tarla çalışmalarında epsps genin segregasyon incelenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde,transgenik F2 mahsul-ot melezleri ile glifosat uygulanmaksızın monoculture- ve karışık ekim tasarımlarda nontransgen kontrollere göre bitki başına 48-125% daha fazla tohum ürettiği görülmüştür. Transgenik bitkiler de nontransgen kontroller ile karşılaştırıldığında yüzde tohum çimlenme başına daha fazla EPSPS protein düzeyleri, triptofan konsantrasyonları ve fotosentez oranları bulunmuştur.

Zhao vd. (2014) *Bacillus thuringiensis* (Bt) kristal proteine karşı böcek direnci transgenik Bt ürünlerin uzun süreli kullanımı için büyük bir tehdittir. Gen istifleme böcek direnci gelişimini geciktirmek için kolayca konuşlandırılabilir bir stratejidir. Bu çalışmada self-cleaving peptides polycistronic viral geni kullanarak tek bir kasetinde Cry1Ab ve Cry2Ab geni insertlerle çeltikte gen aktarımı yapılmıştır. ve transgenik pirinçte yüksek seviyelerde ayrı bir kısmı Cry 1Ab 've Cry2Ab genlerin ifadesi not edilmiştir . Böcek biyo-deneyle transgenik bitkilerin lepidopteran haşerelerine karşı oldukça dirençli olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, 2A peptid transgen kültürlerde yüksek seviyelerde çoklu Bt genlerini ifade etmek için kullanılabilir olduğunu önerilmektedir.

Chandrasekhar vd. (2014). Bu çalışmada küresel olarak, yabancı ot ve sap-emici böcekler pirinç üretiminde önemli kısıtlamalar bulunmaktadır. Bu çalışmada IR-64 pirinç çeşidine mutasyona uğramış pirinç 5-enolpyruvyshikimate3-fosfat sentaz (Os-mEPSPS) geni ve sarımsak yaprağı lektin (*Allium sativum* yaprağı aglutinin, ASAL), geni aktarılmıştır. Elde edilen bitkiler PCR, Southern blot analizi, genom ve genom walking analizi ile transformasyonların kalıcı entegrasyonu ile tespit edilmiştir. Transgenik hatlarında moleküler analizi sonucu her iki Os-mEPSPS ve ASAL transkript ve bunların ilgili proteinleri etkin ekspresyonu saptandı ve glifosat ve kahverengi bitki zararlısına karşı direnci kazandığı tespit edilmiştir. bu çalışmada üretilen transgenik pirinç çeşitleri glifosat ve özsu emici böcek zararlılarına karşı dayanıklı direniş amaçlı pirinç ıslahında yeni bir genetik kaynak olarak hizmet vermektedir.

Chhapekar vd. (2015) bu çalışmada doğrudan ekilen pirinç tarımında (DSR) ot istilası çeltik verim kaybına sebep olan biyotik stres faktörlerinden biridir. Herbisite dirençli pirinç ekilişi Doğrudan Ekilen Pirinç Tarımında ot yönetiminin verimliliğini artırmak potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, popüler Indica tipi pirinç çeşidi IR64'ün genetic transformasyon için *Agrobacterium* aracılı *Petunia hybrida*'dan gelen gelen N-terminal kloroplast hedefleme peptitle bir kodon optimize edilmiş CP4 EPSPS-(5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz) geni ile transformasyon çalışmaları yapılmıştır. Seçilen pirinç bitkilerinin transgenlerin entegrasyonu Northern blot analizi ile yapılmıştır ve herbisit dayanıklılığı tahlilleri ile ilgili bilgileri teyid edilmiştir. Kontrol bitkilerine göre, transgenik bitkilerde EPSPS enzim aktivitesinin daha yüksek miktarda oluşumu gözlenmiştir. T₀, T₁ ve T₂ hatlarında yapılan herbisit biyoassay sonucunda elde edilen bitkilerde %1 Roundup herbisit kullanım ile beş kat daha fazla tolere edildiği görülmüştür. Ayrıca, bu çalışmada geliştirilmiş transgenik bitkileri yabancı ot tehdit üstesinden gelmek için etkili bir şekilde kullanılabilir.

3 MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılmış olan-Hamzadere ve Osmancık-97 çeltik çeşitleri Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Edirne'den temin edilmiştir.

3.1.2 Hamzadere çeşidi

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Demir × 83013-TR631-4-1-2 melezinden geliştirilen ve 2011 yılında tescil edilen bir çeşittir. Çeşidin Morfolojik Özellikleri olarak bitki boyu 95 cm'dir. Ya8raklar yarı dik ve yeşil renktedir. Sağlam saplı ve yatmaya dayanıklıdır. Salkımlar yarı dik yapıdadır. Çeltik taneleri sarı renkli ve uzundur. Çeltik 1000 tane ağırlığı 37-38 gr'dır. Hamzadere çeşidin Tarımsal Özellikleri olarak 130 günde olgunlaşan, yüksek verim potansiyeline sahip bir çeşittir. Hamzadere çeşidi çeltik yanıklık hastalığına orta derecede toleranslıdır. Kök boğaz çürüklüğü hastalığına dayanıklıdır. Kalite Özellikleri bakımından yüzde 60-65 arasında pirinç randımanı verir. Pirinç tane uzunluğu 6.6 mm ve genişliği ise 2.9 mm'dir. Tane görünüşü camsı ve mattır. Pirinç bin tane ağırlığı 27-28 gr arasındadır (Anonim 2015h).

3.1.3 Osmancık çeşidi

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Rocca × Europa melezinden geliştirilen ve 1997 yılında tescil edilen bir çeşittir.Osmancık-97 çeşidinin Morfolojik olarak 95-100 cm boyunda, sağlam saplı ve yatmaya dayanıklı,Çeltik bin dane ağırlığı 33-34 gr, Orta erkenci ve olgunlaşma süresi 130-135 gün, Kırıksız pirinç randımanı %65 in üzerinde, Pirinç bin dane ağırlığı 25-26 gr arasında değişmekte, pirinç tanesi camsı ve malt görünümündedir. Tarımsal özellikleri olarak Osmancık-97 çeşidi dekara 800-1000 kg arasında bir verim potansiyeline sahip ve bazı çiftçilerimiz, 1000 kg ın üzerinde verim alabilmektedirler. Patolojik bakımından salkım yanıklık hastalığına orta derecede toleranslı ve kök boğaz çürüklüğüne ise dayanıklıdır. Serin hava ve soğuk

sulama suyu koşullarından fazla etkilenmez. Ülkemizde çeltik ekimi yapılan, Marmara-Trakya, Karadeniz, Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde ekilmesi tavsiye edilebilir. Ekonomik olarak Osmancık-97 Çeşidi , diğer çeşitlerden en az dekara 150 kg, bir diğer ifade ile daha önce ekilen çeşitlerden % 20 daha yüksek verim vermektedir. 2006 yılında, ülkemizde çeltik ekili alanlarının %75 inde Osmancık-97 çeşidinin ekilmiş olması 80 milyon YTLveya 60 milyon Amerikan Dolar ekonomiye katkı sağlamıştır.Osmancık-97 çeşidi, 10 yıl önce, yerli üretim iç tüketimin ancak %35-40 nı karşılarken bugün %75 inden fazlasını karşılar duruma gelmiştir. (Anonim. 2015i)

3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige and Skoog 1962) ile % 3 sukroz ve % 0.65'lik agar (Duchefa) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlandığında bidistile su kullanılmış olup, MS besin ortamlarına deneme ihtiyaçlarına göre farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, NAA, ve IBA) ilave edilmiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmıştır.

Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.7 ± 0.1 'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C 'de 20 dk. tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık fotoperiyodunda $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulmuştur.

Büyümeyi düzenleyicilerin stok solüsyonları üretici firma tarafından tarif edildiği gibi (Çizelge 3.1) gerekli çözücülerle çözüldükten sonra saf su ile istenen miktarlarda ve oranlarda (Genel de 1mg/ml şeklinde) hazırlanmış olup, 4°C de saklanmıştır.

3.3 Bitki Büyüme Düzenleyiciler ve Kültür Koşulları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Duchefa, Merck. ve Sigma Aldrich Chemical Co. ve diğer firmalardan temin edilmiştir. Hormon dozları üreticinin tarif ettiği çözücüler ile çözüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Hormon dozları, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Hazırlanan Hormon dozlarının stok solüsyonları istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlayarak 4°C’de süre olarak altı ay kadar saklanmıştır. Hormon dozları, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklama koşulları

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama Koşulları (°C)
Sitokininler		
BAP (6-Benzylaminopurine (BAP))	1 N NaOH	+4
2iP (6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino) purine (2iP))	1N NaOH	+4
Tdz (1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea)	ethanol	+4
Oksinler		
IBA (Indole-3-butyric acid (IBA))	Etanol/1 N NaOH	+4
KNA (Naphthalene acetic acid potassium salt)	ethanol/su	+4
NAA (α -Naphthaleneacetic acid)	1 N NaOH	+4

Tüm kültürler beyaz floresan ışığında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24 °C’de tutulmuştur. Sterilizasyon ve tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yapılmıştır. Her muamele içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü Petri kutuları (100 x 10 mm) ya da kültür kapları (12 x 12 cm) kullanılmıştır. Ortamların, kültür kaplarının ve saf suyun

sterilizasyonunda 104 kPa basınç, 121 °C sıcaklıkta 20 dk ayarlı Hirayama markalı Japonya'da üretilmiş otoklav kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cam Petri kutuları 160 °C'de 2 saat etüvde steril edilmiştir. Çalışma ihtiyaçlarına göre bazen tek kullanımlı steril polystyrene Petri kutuları (100 x 10 mm) da kullanılmıştır.

3.4 Çeltik tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilmesi

Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinin (50 adet tohum için) ayıklanmış bitki tohumunun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için ilk önce tohumları 2 dk etanol ile muamele edip, gerekli çamaşır suyu konsantrasyon dozlarının (%10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, ve 100 lük dozları) ve 15 dk. sterilizasyon süresi farklı etki olup, olmadığını belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır ve çeltik çeşitleri için en uygun çamaşır suyu dozu belirlenmiştir.

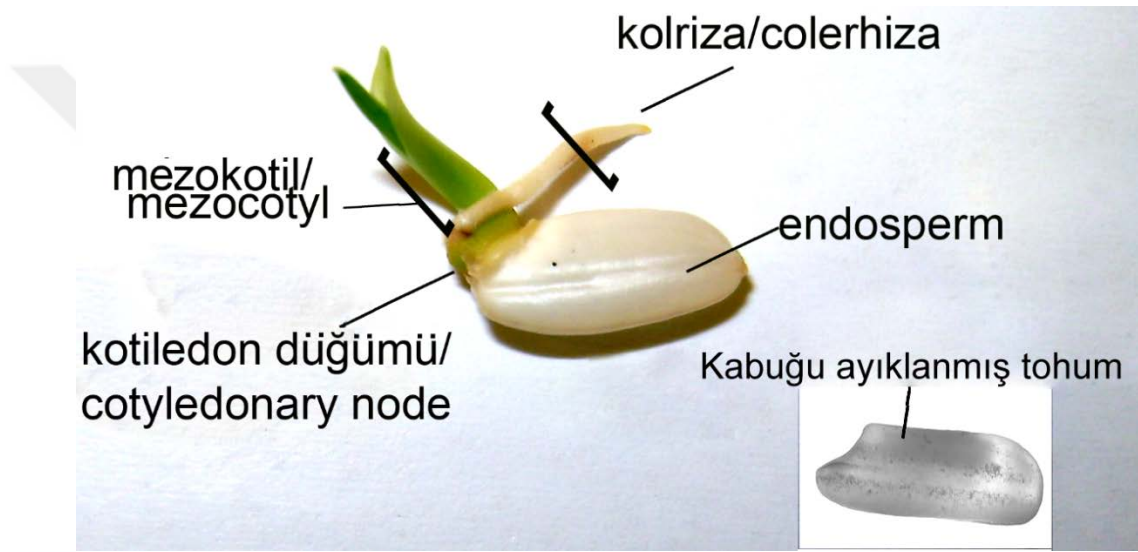
Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril Petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.8 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında (MS ortamında) $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir.

Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinin (50 adet tohum için) ayıklanmış bitki tohumunun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için ilk önce tohumları 2 dk etanol ile muamele edilip, gerekli çamaşır suyu (%5 hacim/hacim NaOCl içeren etken madde) konsantrasyon dozlarının (%10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, ve 100 lük dozları) ve 15 dk. sterilizasyon süresi farklı etki olup, olmadığını belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3×5 (3 kere 5 dk süre ile) durulanmıştır ve çeltik çeşitleri için en uygun çamaşır suyu dozu belirlenmiştir.

Steril edilen tohumlar yine steril Petri kapları içerisinde %3 (ağırlık/hacim) sakkaroz içeren ve %0.8 (ağırlık/hacim) agar ile katılaştırılan MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamında 23°C 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Çeltik tohumlarında

kültüre alındıktan 3-5 gün sonra çimlenme yüzdesi ve bulaşıklığının oranı belirlenmiştir (Khawar 2001).

Daha sonra 2 çeltik çeşidine ait bir iki günlük çimlenmiş tohumlardan farklı eksplantları (ayıklanmış çeltik/ pririnç tohumu (tohum), kotiledon düğümü (nod), mezokotil, kolriza (şekil 3.1) kullanarak gen aktarımına uygun yüksek oranda sürgün rejenerasyon sistemi geliştirip, ardından *A. tumefaciens* aracılığıyla herbisitlere/böceklere karşı dirençli transgenik bitkileri elde etmek amacıyla çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 3.1 Bu tez kapsamında kullanılan çeltik bitki eksplantlarının şematik görüntüleri

3.5 Tez Kapsamında Yapılan Rejenerasyon Çalışmaları

Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü, mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2iP içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları

Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamına ve 1 gün MS ortamına bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2iP içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 1 gün MS ortamında, 4 gün 20 mg/l 2iP içeren MS ortamında, ve daha sonra 1gün tekrar MS ortamında bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü ve mezokotil eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2iP içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

3.6 Bakteri Kültürü

3.6.1 Bakteri Materyali

Gen aktarımı denemelerinde bakteri materyali olarak 1 adet markör geni, ve 1 adet hem böceklerle hemde herbisitlere karşı dirençlilik geni taşıyan toplam 2 farklı *A. tumefaciens* bakteri hattı kullanılmıştır. Kullanılan bakteri hatları bitkisel seleksiyon amaçlı kanamisine dayanıklılığı sağlayan NPT-II geni veya herbisitlere karşı dirençli bar geni taşımaktadır.

Çalışmada *Agrobacterium tumefaciens*'in A281:: P35 Gus INT, GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT, LBA 4404:: pRGG bar ve cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar ile *A. rhizogenes*'in 15834 PRGGbar streynleri/ hatları kullanılmıştır.

3.6.2 Bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılması, nutrient agar (NA) besin ortamında büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanmış, tek koloniler steril lup ile alındıktan sonra gerekli antibiyotikleri içeren nutrient broth (NB) (Sigma Aldrich Chemical Co, St. Lo. Mo) bakteri büyütme ortamına konulmuştur. Daha sonra bakteri kültürleri çalkalamalı inkübatörde 28°C'lik sıcaklıkta 1 ya da 2 gün süreyle büyütülerek bu kültürler daha sonra gen aktarımında kullanılmıştır. Yeniden bireysel koloniler elde edebilmek için çok az miktarda bakteri kültürü agarlı besin ortamı üzerine steril bir lupla yayılarak, bu kültürleri içeren Petri kutuları ters çevrilerek 28°C'de inkübe edilmiştir. Herhangi bir bulaşmayı önlemek için bütün bakteriyel çalışmalar steril kabin içerisinde yapılmıştır.

3.6.3 Bakteri kültürlerinin kısa ve uzun süreli korunması

A. tumefaciens kültürleri, seçici antibiyotikler içeren 5-10 ml NB (Lab-Lemco Powder 1.0 g/l; Yeast extract 2.0 g/l; Pepton 5.0 g/l; Sodyum klorit 5.0 g/l) ortamında bir gece 28 °C'de 150 devir/d (rpm)'da inkübatörde büyütülmüştür. Kısa süre için kullanılmak amacıyla NA (Nutrient Agar) içeren ortamda çizilerek 28°C'de büyütülmüştür ve daha sonra elde edilen bakteri kültürleri streç film ile sarılmış, ters çevrilen Petri kutularında 4 °C'de 6 hafta korunmuştur.

Daha uzun süreli muhafaza işlemi eşit miktarda bakteri kültürü ve %40 gliserol içeren NB, 2 ml'lik kriyogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı bir şekilde dondurulup, -85 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür (Draper vd. 1988).

3.6.4 Antibiyotikler

Bakteriler büyütme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler (0.22µ) kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40-45 °C'ye düşmüş olan ortamlara ilave edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler ve

konsantrasyonları çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. GV2260 p35GUS-INT bakteri hattı büyütülürken ortama 50 mg/l rifampisin, 50 mg/l kanamisinmonosülfat eklenmiştir. Cry/Ac büyütülürken ise ortama 50 mg/l rifampisin ve 300 mg/l streptomycin ve 100 mg/l spectinomycin eklenmiştir. Rifampisin metanol, kanamisinmonosülfat ise su ile çözüldükten ve filtre sterilizasyonundan sonra stok çözeltiler -20 C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2 Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler/kimyasal maddeler, çözücüler ve saklama koşulları

Seçici antibiyotikler/ kimyasal madde	Kullanım oranları (mg/l)	Kullanım amacı	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama sıcaklık (°C)
Rifampisin	50	Bakteri seleksiyon	25/50	Metanol/ DMSO	-20
Kanamisin monosülfat	50	Bakteri/bitki seleksiyon	50	su	-20
Fosfinotrisin	2	Bitki seleksiyon	1	su	-20

Çizelge 3.3 Gen aktarım çalışmasında bakteriostatik (bakteri öldürücü) olarak kullanılan antibiyotiği çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Kullanım oranları (mg/l)	Kullanım amacı	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama koşulları (°C)
Doucid Pfizer (Duocid pfizer)	500	Ko kültürasyondan sonra <i>A. tumefaciens</i> 'in gelişimini engellenmesi	100	Su	-20

3.6.5 *Agrobacterium rhizogenes*'in 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerine ait 100'er adet tohum çimlendirildikten 2 gün sonra *A. rhizogenes*'in 15834 pRGGbar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantları 1 gün boyunca MS ortamında ko kültürasyon için bırakılmıştır. Ko kültürasyon yapılmış eksplantlarda kök oluşumu gözlenmek için tüm eksplantları 400 mg/l Duocid içeren MS ortamına kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 μ mol foton/m²/s ışık altında 24 \pm 1°C'de numaralandırarak kültüre alınmıştır. Daha sonra yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltileri eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Yaprak örneklerinin klorofillerini parçalamak ve gus genin ekspresyonu için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiş olup, alınan örneklerin maviye boyanması ile GUS pozitif bitkiler aranmıştır.

3.6.6 *Agrobacterium tumefaciens*'in A281 hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

A. tumefaciens'in onkogenik A281 hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantları 1 gün boyunca kanamisin içermeyen MS ortamında ko kültürasyon için bırakılmıştır. Ko kültürasyon yapılmış eksplantlarda kök oluşumünü gözlemek için tüm eksplantları 200 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamında kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 μ mol foton/m²/s ışık altında 24 \pm 1°C'de kültüre alınarak numaralandırılmıştır. Denemedeki bitkiden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir.

Yapılan denemelerde *A. tumefaciens* ile muamele edilmemiş bitkileri ile kıyaslama sonucu muamele edilmiş bitkilerde daha fazla ve kalabalık kök oluşumu gözlenirken her hangi bir tümör oluşumu gözlenmemiştir. Yaprak örneklerinin klorofillerini

parçalamak ve gus geninin ekspresiyonu için örnekler %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerin maviye boyanması ile GUS pozitif bitkiler aranmıştır.

3.6.7 *Agrobacterium tumefaciens*'ın GV2260:: p35 gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait tohumlar çimlendirildikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğümü ve endosperm eksplantlarıyla *A. tumefaciens*'ın GV2260:: p35 gus INT hattına ait süspansiyonuyla 45 dk inokulasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra Hamzadere çeşidine ait 1600 adet ve Osmancık çeşidine ait 1000 adet tohum eksplantları 1 gün boyunca MS ortamında ko kültürasyon için bırakılmıştır. Ko kültürasyon yapılmış eksplantlardan Hamzadere çeşidine ait eksplantları 350 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer ve Osmancık çeşidine ait eksplantları 250 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantları, numaralandırılmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m²/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınmıştır. Seleksiyon ortamda Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine materyel yöntemde belirtildiği gibi histokimyasal gus analizi yapılmıştır..

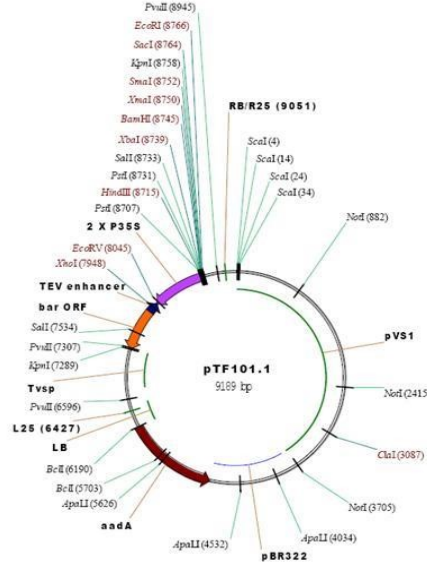
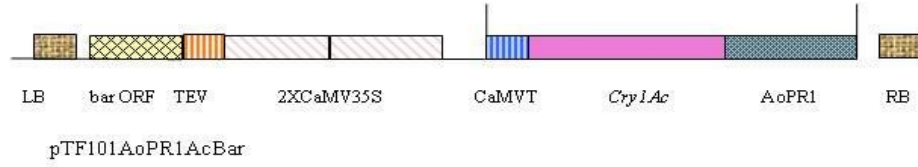
3.6.8 *Agrobacterium tumefaciens*'ın LBA 4404::pRGG bar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerine ait tohumlar çimlendirildikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğümü ve endosperm eksplantlarıyla *A. tumefaciens*'ın LBA 4404::pRGG bar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk inokulasyonuna tabii tutulmuştur. Daha sonra Hamzadere çeşidine ait 8000 adet ve Osmancık çeşidine ait 6000 adet eksplantlar 1 gün boyunca MS ortamında ko kültürasyon için bırakılmıştır. Ko kültürasyon yapılmış eksplantlardan Hamzadere çeşidine ait 4000 adet 2.5 mg/l fosfinotrisin + 350 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer ve 4000 adet 2 mg/l fosfinotrisin + 250 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Benzer şekilde ko kültürasyon yapılmış eksplantlarından Osmancık

çeşidine ait 3000 adet 2.5 mg/l fosfotrisin + 400 mg/l Duocid pfizer ve 3000 adet 2 mg/l fosfotrisin + 400 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlar, numaralandırılmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol ftons/m²/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınmıştır. Denemedeki bitkilerden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözelti eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir.

3.6.9 *Agrobacterium tumefaciens*'in Yara uyarımlı (AoPR1) promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait tohumlar çimlendirildikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğümü ve endosperm eksplantlarıyla *A. tumefaciens*'in yara uyarımlı (AoPR1) promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar (Şekil 3.2) hattına ait süspansiyonuyla 45 dk inokulasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra Hamzadere çeşidine ait 2600 adet ve Osmancık çeşidine ait 2200 adet eksplantları 1 gün MS ortamında ko kültüvasyon için bırakılmıştır. Ko kültüvasyon yapılmış eksplantlarından Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerine ait eksplantları 350 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer ve 250 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantları, numaralandırılmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol ftons/m²/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınmıştır. Denemedeki bitkilerden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözelti eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir.



Şekil 3.2 Yara uyarımlı (AoPR1) promotörün kontrolü altında *cryIAc* genini içeren *pTF101AoPR1AcBar* bitki ekspresyon vektörün şematik temsili. Plazmid pTF101.1 bitki seçimi için kullanılan, bir bar genini içermektedir.

3.7 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi

Seçici rejenerasyon ortamında gelişen aday transgenik sürgünler, kanamisinmonosülfat içeren besin ortamında köklendirildikten sonra bitkilerin transgenik olup, olmadıkları aktarılan genlere göre histokimyasal *GUS* ve PCR analizi ile teyit edilmiştir.

3.7.1 Histokimyasal gus analizi

Histokimyasal *GUS* analizi Jefferson (1987)'ın tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton X -100 ve 1 mM 5 bromo-4 chloro 3 indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 38 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular %100'lük alkolde yıkanarak mavi bölge belirlenmiştir.

3.7.2 Polmeraze zincir resaksiyonu (PCR)

DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, taze yaprak dokuları kullanılarak CTAB DNA ekstraksiyon protokolüne göre yapılmıştır. Transgenik aday bitkilerden alınan yaprak örnekleri -85 °C'de 15-20 dk bekletildikten sonra dondurularak ezilmiştir (Şekil 3.3). Yaprak örneklerinin bulunduğu 1.5 ml'lik her bir tüp içine 50 ul buffer (1M Tris pH=8; 0.5M EDTA; 5M NaCl; ddH₂O/Easy pure) eklenerek karıştırılmış ve üzerine 550 µL buffer daha ilave edip yaprak örneklerinin tam olarak ezilmesi sağlanmıştır. 65 °C'de su banyosunda tüpler yerleştirilerek 40-60 dakika inkübe edilmiştir. 13000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine eşit hacimde kloroform eklenmiştir. Herhangi bir katı kısmın alınmamasına dikkat edilmiştir. DNA'lar toplandıktan sonra örnekler 15000 rpm'de 13 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz yeni tüpe alındıktan sonra üzerine 750 µl soğuk isopropanol eklenmiştir. Örnekler 1 saat 20 °C'de bekletildikten sonra 30 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant döküldükten sonra soğuk %70'lik etil alkolden 200 µl eklenmiş ve 5 dakika 7000 rpm'de yeniden santrifüj edilmiştir. İçindeki alkol dökülerek DNA peleti iyice kurutulmuş ve 50 µl TE eklenerek çözülmüştür. Elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 3.3).

- a. DNA ekstraksiyon için vortex den önce Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97
 - b. çeşitlerinin disk örnekleri ezmek amacıyla 1 demir bilye/ependorf tüp şeklinde eklenmesi
 - c. Ezilmiş örnekler üzerinde DNA ekstraksiyon çözeltilerin eklenmesi
 - d. DNA ekstraksiyon amacıyla santrifüj yapılması
 - e. Mikro santrifüj tüpler içerisinde izole edilmiş DNA
- (e, f) Aktarılmış geni ile ilgili primer eklenerek trans DNA amplifikasyonu (çoğaltılması)

Primer dizileri

Transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II. Çizelge 3.5'de transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II bölgelerinin çoğaltımında kullanılan primer dizileri görülmektedir.

Çizelge 3.4 PCR işleminde kullanılan primer dizileri

Hedef	Baz Dizilişi	Hedef Büyüküğü
NPT-II geni	F- TGG ATT GCA CGC AGG TTC TC R-CAA GAA GGC GAT AGA AGG CG	750 bp



Şekil 3.3 Çeltiğinin Hamzadere ve Osmançık 97 Transgenik Aday bitkilerin transformasyonunu tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonunun yürütülmesi

Çizelge 3.5 PCR reaksiyon koşulları

Ingredients	1X (20ul)	16X
Forward Primer (10uM)	1.0	16.0
Reverse Primer (10uM)	1.0	16.0
10X PCR Buffer (10X)	2.0	32.0
dNTPs (10mM)	0.2	3.2
Taq Polymerase (5u/ul)	0.1	1.6
H ₂ O	14.7	235.2
Template DNA (50 ng/ul)	1.0	

PCR program

- 1 95°C 4 min
- 2 94°C 0 Sec Denatürasyon sıcaklığı
- 3 72°C 30Sec (34 döngü) Primerlerin uzatılması (2. Döngüden 34. Döngüsüne kadar)
- 4 72°C 7 min
- 5 25°C Pause

Örneklerin agaroz jel elektroforezi

PCR reaksiyonları %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Bunun için 1 g agaroz 100 ml 1XTBE (10.8 g/l Trizma-base, 5.5 g/l Borik asit, 4 ml 0.5 M EDTA pH=8) tamponunda mikrodalga fırında çözdürülmüş ve sıcaklığı 50-60 °C'ye düştüğünde DNA'nın UV'de görüntülenebilmesi için 5 µl etüdyumbromit eklenmiştir. Elektroforez işlemi 70 Voltta 1 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilmiştir.

3.8 İstatistiksel Değerlendirmeler

Deneme kapsamında, hormon konsantrasyonlarının ve eksplantların sürgün oluşum oranı (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu, kök oluşumu oranı (%), eksplant başına kök sayısı, kök uzunluğu vb gibi parametreleri belirlenecek ve değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler "IBM SPSS 20 for Windows" veya uygun programı yardımıyla varyans analizi, one way anova veya univariate analizine tabi tutulmuştur. Muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla t test, LSD testi, Duncan veya Tukeys b testi kullanarak post hoc testi uygulamaları yapılmıştır (Snedecor ve Cochran 1967). Denemenin her muamele, içerisinde en az üç tekerrür ve her tekerrürde 5 ile 10 adet eksplantın bulunduğu Petri kutuları, cam kavanozları, Magenta kutuları vb kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Yüzey sterilizasyon

Bir eksplantın yüzey sterilizasyonu için en etkili ancak en düşük dezenfektan dozunun belirlenmesi gerekmektedir (Kyte 1987). Tohum yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilirse de ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) en yaygın kullanıma sahiptir (Özcan ve Özgen 1996).

Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinin (50 adet tohum için) ayıklanmış bitki tohumunun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için ilk önce tohumlara 2 dk etanol ile muamele edip, gerekli çamaşır suyu konsantrasyon dozlarının (%10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, ve 100'lük dozları) ve 15 dk. sterilizasyon süresinin farklı etkide olup, olmadığını belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır ve çeltik çeşitlerinin yüzey sterilizasyonu için en uygun çamaşır suyu dozu belirlenmiştir.

Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril Petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.8 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Çimlendirmeye konan tohumlardan 10 gün içinde 5-6 cm uzunluğunda fideler gelişmiştir. Çeltik tohumlarında çimlenme yüzde olarak ifade edilmiş, bu değer Petride çimlenen tohumların toplam tohum sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur. Fide gelişimi yine % olarak belirtilmiş, bu değer fide oluşturan tohumların toplam çimlenmiş tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Çimlenme başlangıcından 4 gün sonra, farklı sürelerde uygulanan farklı çamaşır suyu dozlarının çimlenme ve bulaşıklık ortalamalarına ait sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre kullanıldığı % 10 - 100'lük çamaşır suyu dozları ve 15 dk. sterilizasyon süresi ile farklı oranda bulaşıklılığı ile beraber (şekil 4.1 a,b) Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde sırasıyla çimlenme oranı %80-100 ve %60 - 100 arasında değişmiştir. Ancak, Hamzadere çeşidinde %25, 30, 40, 75 ve 100 çamaşır dozu

muamelesiyle ve Osmancık çeşidinde ise %30, 40, 75 ve 100 çamaşır suyu 15 dk muamelesi ile tohumlarda %100 çimlenme tespit edilmiştir (Şekil 4.1c).

Bulaşıklılığı oranı bakımından Hamzadere ve Osmancık çeşidinde % 10, 15, 20, 25, 30, 40 oranları hariç tüm muamelelerde hiç bulaşıklık görülmemiştir. Kullanılan tüm çamaşır suyu dozlarında bulaşıklık olmayan en düşük dozu %50 çamaşır suyu 15 dk olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalarında çamaşır suyunun bu oranı tercih edilmiştir.

Ayrıca, ayıklanmamış tohumlarından yüzey sterilizasyon sağlanamamıştır.



Şekil 4.1 Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinin farklı oranda çamaşır suyu içeren ortamı ile yüzey sterilizasyonu. a. Hamzadere , b Osmancık 97 çeşitlerinde 15 dk yüzey sterilizasyon sonucu elde edilen fungal ve bakteriyel bulaşıklılık c%50 çamaşır suyu ile 15 dk olarak tohum sterilizasyon sonucu gelişen fideler

Çizelge 4.1 Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinin farklı oranda çamaşır suyu içeren ortamı ile muamele sonucunda elde edilen çimlenme ve bulaşıklığı oranlarının ortalamaları ile ilgili sonuçlar

Çamaşır suyu konsantrasyonları (hacim/hacim)	Hamzadere çeşidi		Osmancık 97 çeşidi	
	Çimlenme oranı	Bulaşıklığı oranı	Çimlenme oranı	Bulaşıklığı oranı
10	80.00	100.00	60.00	100.00
15	80.00	100.00	80.00	100.00
20	93.33	100.00	93.33	80.00
25	100.00	80.00	86.67	80.00
30	100.00	60.00	100.00	60.00
40	100.00	40.00	100.00	60.00
50	100.00	0.00	100.00	0.00
75	100.00	0.00	100.00	0.00
100	100.00	0.00	100.00	0.00

4.2 Rejenerasyon Çalışmaları

4.2.1 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Bu çalışmada Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait 90'er adet tohum yüzey sterilizasyonundan sonra ilk önce MS ortamında 4 gün çimlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra çimlenmiş tohumları 4 gün boyunca 100 mg/l NAA içeren MS ortamında bekletilmiştir. NAA içeren ortamda bekletilmiş tohumları tekrar 6 gün boyunca MS ortamında bekletilmiştir. Peş peşe 3 defa priming yapılmış tohumların kotiledon

düğümü leri ve mezokotil kısımları kesilip ayrı ayrı 0.1 mg/l ,02 mg/l,ve 0.3 mg/l 2ip 3gr/l aktif kömür içeren MS ortamına 40 gün boyunca rejenerasyona bırakılmıştır. Bu çalışma 3 tekerrürden oluşup her tekerrürde 10 adet kotiledon düğümü ve mezokotil kısımları kullanılmıştır. Bu denemede kardeşlenme yüzdesi (adet), kardeşlenme sayısı (adet), yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), yaprak çapı (cm), kök oluşumu yüzdesi (%), kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) parameterleri değerlendirilmiştir.

Hamzadere çeşidi

Elde edilen sonuçlar çizelge 2'de verilmiştir. Sürgün oluşum yüzdesi, Eksplant başına sürgün sayısı (adet), yaprak uzunluğu, ve kök uzunluğu bakımında ortamlar arasında farklılık bulunmamıştır. Bitki başına kök sayısı ve kök oluşum yüzdesi bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür.

Sürgün oluşum yüzdesi (%),Kök oluşum yüzdesi (%), Kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu (cm) bakımından eksplantlar arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), Yaprak uzunluğu (cm), Yaprak genişliği (cm) bakımından eksplantlar arasında farklılık görülmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), Yaprak uzunluğu (cm), Yaprak genişliği (cm), Kök oluşum yüzdesi (%), bakımından ortamlar ve eksplantlartlar arasında 0.01 düzeyinde ve kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) bakımından 0.05 düzeyinde bir etkileşim bulunmuştur.

Değerlendirilmiş parameterlerin ortalamaları arasında farklılığını belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.3'de verilmiştir.

Kotiledon düğüm eksplantlarında sürgün oluşum yüzdesi %3.00- 11.30 ve mezokotil eksplantında ise %10 – 63.00 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşumu 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Embryo eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 0.20 - 2.00 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 1.00 – 1.97 arasında değişmiştir.

Kotiledon düğüm eksplantında bitki başına yaprak sayısı 1.33 – 8.17 adet arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantında bitki başına yaprak sayısı 2.73 -7.63 adet arasında değişmiştir. En fazla yaprak oluşum 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğüm eksplantında bitki başına yaprak uzunluğu 4.33 - 12.50 mm arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantında yaprak uzunluğu 6.38 -13.67 mm arasında değişmiştir. En uzun yaprak 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında bitki başına yaprak genişliği 0.06 – 0.21 cm arasında ve mezokotil eksplantında is 0.10 -0.32 cm arasında değişmiştir. En geniş yaprak 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında kök oluşum % 6.00 – 21.00 arasında ve mezokotil eksplantında is %13.00 – 67.00 arasında değişmiştir. En fazla kök oluşumu 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında bitki başına kök sayısı 2.50 – 7.25 adet arasında ve mezokotil eksplantında is 6.40- 12.50 arasında değişmiştir. En fazla kök sayısı 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında kök uzunluğu 2.67 – 8.25 adet arasında ve mezokotil eksplantında is 4.50 – 10.06 arasında değişmiştir. En fazla kök sayısı 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamda mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 Çeltik Hamzadere çeşidinin tohumlarının 4 gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2iP içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerinin varyans analiz sonuçları

VK	sd	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Bitki başına Yaprak sayısı (adet)		Yaprak uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
ortamlar	2	0,10	3,31	0,48	0,69	15,63	1,65*	16,55	0,48
eksplant	1	0,29	9,28*	2,06	2,94**	1,74	0,18	6,90	0,20
ortamlar × eksplant	2	0,12	3,80**	3,47	4,94**	39,42	4,16**	73,90	2,18**
Hata	12	0,03		0,70		9,46		33,85	
Genel toplam	17								
VK	sd	Yaprak genişliği (cm)		Kök oluşum yüzdesi (%)		Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F	KO	F
ortamlar	2	0,005	0,34	0,12	3,42*	5,22	0,24	15,51	0,63
eksplant	1	0,008	0,56	0,21	6,11**	70,21	3,20**	17,90	0,73
ortamlar × eksplant	2	0,053	3,52**	0,12	3,51**	41,37	1,89*	37,68	1,53*
Hata	12	0,015		0,03		21,92		24,65	
Genel toplam	17								

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$

Çizelge 4.3 Çeltik Hamzadere çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin ortalamaların Duncan testi sonuçları

2ip (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)**		Kardeşlenme sayısı (adet)**		Yaprak sayısı (adet)**		Yaprak uzunluğu (mm)**	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	10.00a	63.00a	0.50b	1.56b	3.50b	2.73c	8.83b	6.38c
0.2	11.30a	10.00c	2.00a	1.00c	8.17a	4.50b	12,50a	9.33b
0.3	3.00b	30.00b	0.20c	1.97a	1.33c	7.63a	4.33c	13.67a
2ip (mg/l)	Yaprak genişliği (cm)**		Kök oluşum yüzdesi (%)**		Kök sayısı (adet)*		Kök uzunluğu (cm)*	
	Kotiledon düğümü (du)	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	0.18b	0.10c	21.00a	67.00a	5,83b	6,40c	7.00b	4,50b
0.2	0.21a	0.16b	23,00a	13.00c	7,25a	8,53b	8.25a	9.33a
0.3	0.06c	0.32a	6.00b	36.00b	2,50c	12.50a	2.67c	10.06a

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık bulunmuştur

** Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur

Osmancık çeşidi

Elde edilen varyans analiz sonuçları çizelge 4.4’de verilmiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Kök oluşum yüzdesi (%), Bitki başına kök sayısı (adet) bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde

farklılık bulunurken, yaprak uzunluğu, yaprak genişliği ve kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında her hangi bir farklılık bulunmamıştır.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet),yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), kök oluşum yüzdesi (%),ve kök uzunluğu (cm) bakımından eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık izlenmişken bitki başına kök sayısı (adet) bakımından eksplantlar arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık ölçülmüştür.

Sürgün oluşum yüzdesi (%),bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak genişliği (cm), kök oluşum yüzdesi (%),ve bitki başına kök sayısı (adet), yaprak genişliği bakımından 0.05 düzeyinde ve kök oluşum yüzdesi bakımından 0.01 düzeyinde ortamlar ve eksplantlar arasında bir etkileşim izlenmiştir. Diğer parametreler bakımından her hangi etkileşim izlenmemiştir.

Değerlendirilmiş parameterlerin ortalamalar arasında farklılıknı belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.5 de verilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantından yok denilecek kadar sürgün oluşumu gözlenmiştir. 0.1 ve 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamında %3 ve 0.2 mg/l 2iP içeren ortamında her hangi sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Mezokotil eksplantından ise %20 – 53.00 arasında sürgün oluşumgözlenmiştir. En fazla sürgün oluşum 0.2 mg/l 2iP içeren ortamından ve en az sürgün oluşum 0.3 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir.

Embriyo eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 0.00 - 1.00 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 1.26 – 2.02 arasında değişmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında bitki başına yaprak sayısı 1.67 – 4.00 adet arasında değişirken 0.2 mg/l 2iP içeren ortamında yaprak oluşumu izlenmemiştir. Mezokotil eksplantında bitki başına yaprak sayısı 5.75 -7.7.95 adet arasında değişmiştir. En fazla

yaprak oluşumu 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamında yaprak kılıfı eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında bitki başına yaprak uzunluğu 0.00 - 6.00 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantında yaprak uzunluğu 13.55 -17.20 mm arasında değişmiştir. En uzun yaprak 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamında yaprak kılıfı eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında bitki başına yaprak genişliği 0.00 – 0.10 cm arasında ve Mezokotil eksplantında ise 0.13 -0.23 cm arasında değişmiştir. En geniş yaprak 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamında yaprak kılıfı eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında kök oluşumu % 30.00 – 47.00 arasında ve Mezokotil eksplantında is %30.00 – 57.00 arasında değişmiştir. En fazla kök oluşumu 0.2 mg/l 2iP içeren MS ortamında yaprak kılıfı eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında bitki başına kök sayısı 4.61 – 7.15 adet arasında ve Mezokotil eksplantında is 11.18 – 15.28 arasında değişmiştir. En fazla kök sayısı 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamında yaprak kılıfı eksplantından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü eksplantında kök uzunluğu 5.90 – 6.88 adet arasında ve Mezokotil eksplantında is 6.83 – 9.03 arasında değişmiştir. En fazla kök sayısı 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamında mezokotil eksplantından elde edilmiştir.

Elde edilen bitkileri sera ortamda alıştırılmıştır (Şekil 4.2)

Çizelge 4.4 Çeltik Osmançık 97 çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin varyans analiz sonuçları

VK	sd	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Bitki başına yaprak sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
ortamlar	2	0,03	2,62*	0,91	1,56*	15,16	1,43*
eksplant	1	0,56	42,66*	6,95	11,98*	97,62	9,21*
ortamlar eksplant *	2	0,05	3,79*	0,31	0,543	1,39	0,13*
Hata	12	0,01		0,58		10,59	
Genel Toplam	17						
VK	sd	Yaprak uzunluğu (cm)		Yaprak genişliği (cm)		Kök oluşum yüzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
ortamlar	2	26,17	0,69	0,007	0,83	0,03	1,86*
eksplant	1	565,04	14,98*	0,09	10,72*	0,09	4,69*
ortamlar eksplant *	2	20,07	0,53	0,009	1,08*	0,11	5,86**
Hata	12	37,71		0,009		0,02	
Genel Toplam	17						
VK	sd	Bitki başına kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)			
		KO	F	KO	F		
ortamlar	2	26,49	2,01*	8,08	0,58		
eksplant	1	355,91	26,97**	22,84	1,65*		
ortamlar eksplant *	2	11,63	0,88	2,98	0,21		
Hata	12	13,19		13,82			
Genel Toplam	17						

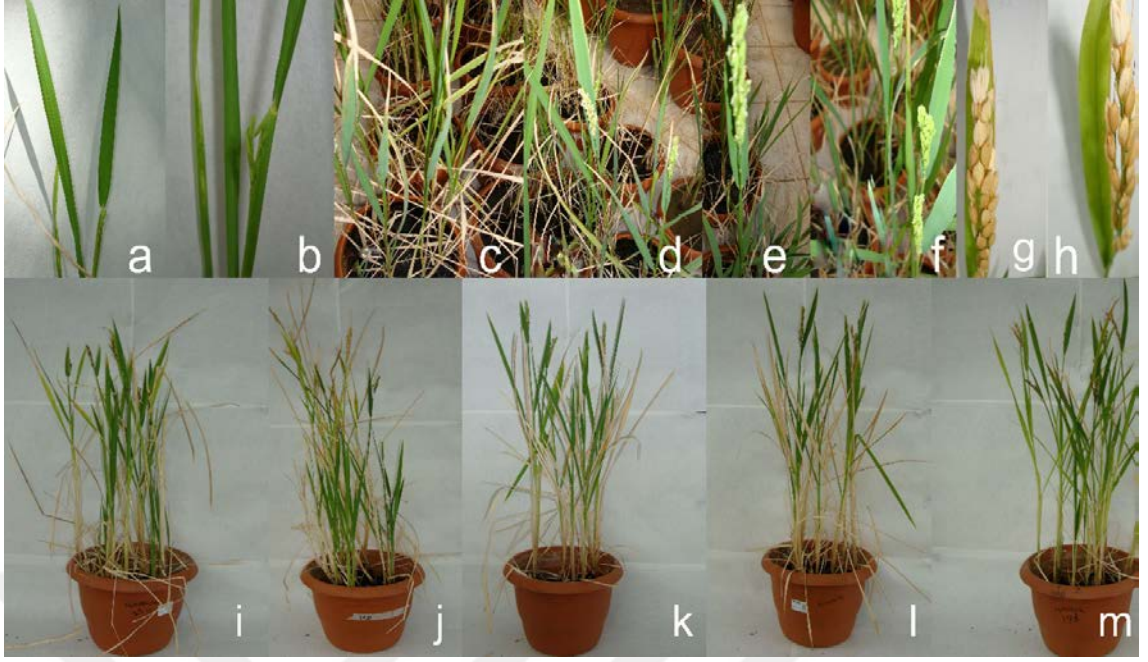
* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$

Çizelge 4.5 Çeltik Osmançık 97 çeşidinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 100 mg/l NAA ve 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin ortalamalarının Duncan testi sonuçları

2iP (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)*		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Bitki başına yaprak sayısı (adet)*		Yaprak uzunluğu (mm)	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	3.00a	40.00b	1.00	2.02	4.00a	7.95a	6.00	13.55
0.2	0.00b	53.00a	0.00	1.77	0.00c	5.75b	0.00	14.87
0.3	3.00a	20.00c	0.33	1.26	1.67b	5.93b	6.00	17.20
2iP (mg/l)	Yaprakgenişliği (mm)*		Kök oluşum Yuzdesi (%)**		Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (mm)	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	0.10a	0.23a	47.00a	43b	7.15	15.28	6.88	7.50
0.2	0.00c	0.22a	0.00c	57a	0.00	13.31	0.00	6.83
0.3	0.06b	0.13b	30.00b	30c	4.61	11.18	5.90	9.03

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık bulunmuştur

** Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur



Şekil 4.2 Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait bitkilerinin sera ortamlarda alıştırılması

4.2.2 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Bu çalışmada 90 adet tohum Hamzadere ve 90 adet tohum Osmancık çeşitlerinden alıp, yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Önce tohumlar MS ortamında 4gün çimlenmeyi bırakılmış; 4 gün boyunca 20 mg/l 2ip içeren MS ortamında ve daha sonra tekrar 6 gün MS ortamına kültüre alınmıştır. Elde edilen bitkiciklerden kotiledon düğümü ve Mezokotil, ayrı ayrı 0.1 mg/l ,02 mg/l,ve 0.3 mg/l 2ip ve 3gr/l aktif kömür içeren MS ortamlarında 40 gün boyunca rejenerasyon için bırakılmıştır. Yani çalışma 54 günde bitirilmiştir. Bu çalışma 3 tekerrürden oluşup her tekerrürde 10 bitki olmak üzere iki eksplant yani kotiledon düğümü ve Mezokotil kullanılmıştır. Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet). yaprak uzunluğu (mm), yaprakgenişliği (mm), kök oluşum yuzdesi(%)kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu ile ilgili parametrelere ait veriler değerlendirilerek varyans analizi yapılmıştır Osmancık ve Hamzadere çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP,

6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet). yaprak uzunluğu (mm), yaprakgenişliği (mm), kök oluşum yüzdesi (%) kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu ile ilgili parametrelere ait veriler değerlendirilerek varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.6).

2 iP içeren tüm ortamlarda köklerde beyaz tüyler gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 2ip ve aktif kömür içeren MS ortamında gelişen köklerde beyaz tüylerin oluşması

Yaprakgenişliği (mm), kök oluşum yüzdesi(%) ve kök sayısı (adet) bakımından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet). yaprak uzunluğu (mm) ve kök uzunluğu bakımından çeşitler arasında farklılık bulunmamıştır. 2ip ve aktif kömür içeren MS ortamında gelişen köklerde beyaz tüyleri oluşmuştur (Çizelge 4.7)

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından ortamlar arasında 0.05 ve kök oluşum yüzdesi(%) bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık izlenen bitki başına yaprak sayısı (adet). yaprak uzunluğu (mm), yaprakgenişliği (mm), kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (mm), yaprakgenişliği (mm), kök oluşum yüzdesi(%) ve kök sayısı (adet) bakımından eksplantlar arasında 0.01 ve kök uzunluğu bakımından 0.05 düzeyinde önemli farklılık izlenmiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (mm), yaprakgenişliği (mm) ve kök sayısı (adet) ve kök oluşum yüzdesi (%) bakımından 0.05 ve düzeyinde çeşitler ve ortamlar arasında önemli bir etkileşim bulunmuştur.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (mm), yaprakgenişliği (mm) ve kök uzunluğu bakımından 0.05 ve düzeyinde ve kök oluşum yüzdesi(%) ve kök sayısı (adet) bakımından ortamlar ve eksplantlar arasında önemli bir etkileşim bulunmamıştır.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak genişliği ve kök oluşum yüzdesi bakımından 0.01 düzeyinde, yaprak uzunluğu kök sayısı bakımından 0.01 düzeyinde ve kök uzunluğu bakımından çeşitler, ortamlar ve eksplantlar arasında önemli bir etkileşim bulunmamıştır.

Çizelge 4.6 Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında belettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin varyans analiz sonuçları

VK	sd	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Bitki başına yaprak sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	0,003	0,11	0,10	0,15	1,63	0,16
Ortamlar	2	0,070	3,11*	0,48	0,75*	0,76	0,07
Eksplant	1	0,840	37,34**	8,30	12,94**	62,72	6,25**
çeşit × ortamlar	2	0,070	3,11*	0,91	1,42*	30,04	2,99*
çeşit × eksplant	1	0,023	1,00*	0,71	1,12*	36,64	3,65*
ortamlar × eksplant	2	0,048	2,12*	0,86	1,35*	15,94	1,59*
çeşit × ortamlar × eksplant	2	0,123	5,48*	2,91	4,55*	24,87	2,48*
Hata	24	0,023		0,64		10,02	
Genel toplam	35						
VK	sd	Yaprak uzunluğu (mm)		Yaprak genişliği (mm)		Kök oluşum Yuzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	1,64	0,04	0,02	1,90*	0,05	2,14*
Ortamlar	2	8,17	0,22	0,00	0,01	0,14	5,15
Eksplant	1	348,44	9,73**	0,07	6,61**	0,29	10,75**
çeşit × ortamlar	2	34,55	0,96*	0,01	1,03*	0,01	0,55
çeşit × eksplant	1	223,50	6,24*	0,02	1,90*	0,01	0,43
ortamlar × eksplant	2	44,97	1,25*	0,01	1,21*	0,003	0,09
çeşit×ortamlar × eksplant	2	49,01	1,36*	0,04	4,05**	0,23	8,64**
Hata	24	35,78		0,01		0,02	
Genel Toplam	35						
VK	sd	Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)			
		KO	F	KO	F		
Çeşit	1	24,32	1,38*	0,83	0,04		
Ortamlar	2	4,13	0,23	1,13	0,05		
Eksplant	1	371,14	21,13**	40,59	2,11*		
çeşit × ortamlar	2	27,57	1,57*	22,46	1,16*		
çeşit × eksplant	1	54,98	3,13*	0,15	0,01		
ortamlar × eksplant	2	11,70	0,66	28,87	1,50*		
çeşit×ortamlar × eksplant	2	41,30	2,35*	11,79	0,61		
Hata	24	17,55		19,23			
Genel Toplam	35						

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$

Değerlendirilmiş parameterelerin ortalamalar arasındaki farklılık belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.7 de verilmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü eksplantından sürgün oluşum %10.10 -13.33 arasında ve Mezokotil eksplantından ise %10.0- 63.03 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde ise kotiledon düğümü eksplantından yok denilecek kadar az sürgünün oluşumu izlenirken Mezokotil eksplantından ise %20 - 53.33 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum 0.2 mg/l 2iP içeren ortamından ve en az sürgün oluşum 0.3 mg/l ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere Çeşidi kotiledon düğümü eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 0.33 – 2.00 adet ve Mezokotil eksplantından ise 1.00 -1.96 adet arasında değişmiştir. Osmancık çeşidi kotiledon düğümü eksplantından 0.2 ve 0.3 mg/l 2iP içeren ortamında 0.033 adet ve 0.3 mg/l 2iP içeren ortamında 1 adet sürgün elde edilmiştir. mezokotil eksplant başına sürgün sayısı ise 1.26 – 2.02 adet arasında değişmiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere çeşidi bitki başına yaprak sayısı bakımından kotiledon düğümü eksplantından 0.1 mg/l 2iP içeren ortamında ortalama 3.50 ve 0.2 mg/l 2iP içeren MS ortamında 8.16 ve 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamından 1.33 yaprak elde edilmiştir. Bitki başına Mezokotil eksplantından 2.73 – 7.63 adet yaprak izlenmiştir ve en fazla yaprak oluşumu 0.3 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir. Osmancık çeşidinde bitki başına yaprak sayısı bakımından kotiledon düğümü eksplantından 0.1 mg/l 2iP içeren ortamında ortalama 4.00 ve 0.2 mg/l 2iP içeren MS ortamında 0.33 ve 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamından 1.66 yaprak elde edilmiştir. Bitki başına Mezokotil eksplantından 5.75 – 7.95 adet yaprak izlenmiştir ve en fazla yaprak oluşumu 0.1 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere çeşidinde bitki başına yaprak uzunluğu bakımından kotiledon düğümü eksplantında 4.33-12.50 mm uzun yaprak elde edilmiştir. Bitki başına Mezokotil eksplantından 6.38 – 13.66 mm uzun yaprak izlenmiştir ve en uzun yapraklar 0.3 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir. Osmancık çeşidinde bitki başına yaprak

uzunluğu bakımından Kotiledon düğümü eksplantında 0.2 mg/l 2iP içeren MS ortamında 0.33 cm ken 0.1 ve 0.3 mg/l 2iP içeren ortamında 6şar mm uzun yaprak izlenmiştir.. Bitki başına Mezokotil eksplantından 13.55 –17.20 mm uzun yaprak izlenmiştir ve en uzun yapraklar 0.3 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere çeşidinde bitki başına yaprak genişliği bakımından kotiledon düğümü eksplantından 0.1 ve 0.3 mg/l 2iP içeren ortamında ortalama 0.06 ve 0.21 cm geniş yapraklar elde edilmiştir. Bitki başına Mezokotil eksplantından 0.10 – 0.32 cm geniş yaprak izlenmiştir ve en geniş yapraklar 0.3 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplantında yaprak genişliği 0.03 - 0.10 cm ve yaprak Mezokotil eksplantında 0.13 - 0.23 cm geniş yaprak izlenmiştir ve en geniş yapraklar 0.1 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere çeşidi kök oluşum yüzdesi %6.70 -23.30 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantından kök oluşumu %13.30 – 66.70 arasında değişmiştir ve en fazla kök oluşumu 0.1mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir. Osmancık çeşidi kök oluşumu %10.0– 46.70 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantından kök oluşumu %30.00 – 56.70 arasında değişmiştir ve en fazla kök oluşumu 0.2 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir.

Kotiledon düğümü, eksplantından gelişen bitki başına kök sayısı 2.50 – 7.25 adet arasında değişmiştir. En fazla kök sayısı 0.2 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir. Mezokotil eksplantından gelişen bitki başına kök sayısı 6.40 – 12.50 adet arasında değişmiş olup, en fazla kök sayısı ise 0.3 mg/l 2iP içeren ortamdan elde edilmiştir. Osmancık çeşidi Kotiledon düğümünden gelişen bitki başına kök sayısı 1.33 – 7.15 adet arasında değişmiştir. En fazla kök oluşumu 0.1 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir. Mezokotil eksplantından 11.18 – 15.28 adet arasında değişmiş olup, en fazla kök sayısı ise 0.1 mg/l 2iP içeren ortamından elde edilmiştir.

Hamzader çeşidi Kotiledon düğümünden gelişen bitkilerdeki sürgün uzunluğu 2.66 - 8.25 mm arasında değişmiştir . Aynı çeşidin yaparak kılıfı eksplantında n gelişen bitkilerde kök uzunluğu 4.50 -10.06 cm arasında değişmiştir. En uzun kök 0.3 mg/l 2iP

içeren ortamdan elde edilmiştir. Mezokotil eksplantından gelişen bitkilerdeki kök uzunluğu 6.83 – 9.03 mm arasında değişmiş olup, en uzun kök ise 0.3 mg/l 2iP içeren ortamdan elde edilmiştir.

Çizelge 4.7 Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2iP içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin ortalamalarının Duncan testi sonuçları

2 iP (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)*				Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	10,10b	63.03a	3.33b	40,40b	0,50b	1,56b	1,00a	2,02a
0.2	13,33a	10.00c	0.00c	53.33 a	2,00a	1,00c	0.33b	1,77b
0.3	13,33a	30.00b	33,33a	20.00c	0.33b	1,96a	0,33b	1,26c
2 iP (mg/l)	Bitki başına yaprak sayısı (adet)*				Yaprak uzunluğu* (mm)*			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	3,50b	2,73c	4,00a	7,90a	8,833	6,383	6,00	13,55
0.2	8,16a	4,50b	0.33c	5,75b	12,500	9,333	0.33	14,86
0.3	1,33c	7,63a	1,66b	5,93b	4,333	13,667	6,00	17,20
2 iP (mg/l)	Yaprak genişliği l (cm)**				Kök oluşum yüzdesi (%)**			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	0,18b	0,10c	0,10a	0,23a	21.7	66.70	46.70	43.30
0.2	0,21a	0,16b	0,06b	0,15b	23.3	13.30	10.00	56.70
0.3	0,06c	0,32a	0,03c	0,13c	06.70a	36.70	30.00	30.00
2 iP (mg/l)	Kök sayısı (adet)*				Kök uzunluğu (cm)*			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	5,83b	6,40c	7,15a	15,28a	7,00a	4,50c	6,88a	7,50b
0.2	7,25a	8,53b	1,33c	13,31b	8,25a	9,33b	3,83c	6,83c
0.3	2,50c	12,50a	4,61b	11,18b	2,66b	10,06a	5,90b	9,03a
2 iP (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)*				Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	10,10b	63.03a	3.33b	40,40b	0,50b	1,56b	1,00	2,02
0.2	13,33a	10.00c	0.00c	53.33 a	2,00a	1,00c	0.33	1,77
0.3	13,33a	30.00b	33,33a	20.00c	0.33b	1,96a	0,33	1,26

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur

Çizelge 4.7 Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin tohumlarının 4gün MS ortamı, 4 gün 20 mg/l 2iP, 6 gün MS ortamında ön uygulama yaptıktan sonra bir gün MS ortamında beklettikten sonra farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametrelerin ortalamalarının Duncan testi sonuçları (Devam)

2 iP (mg/l)	Yaprak uzunluğu (mm)*				Yaprak genişliği (cm)*			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	8,833	6,383	6,00	13,55	0,18b	0,10c	0,10a	0,23a
0.2	12,500	9,333	0,33	14,86	0,21a	0,16b	0,06b	0,15b
0.3	4,333	13,667	6,00	17,20	0,06c	0,32a	0,03c	0,13c
2 iP (mg/l)	Kök sayısı (adet)*				Kök uzunluğu (cm)*			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	5,83b	6,40c	7,15a	15,28a	7,00a	4,50c	6,88a	7,50b
0.2	7,25a	8,53b	1,33c	13,31b	8,25a	9,33b	3,83c	6,83c
0.3	2,50c	12,50a	4,61b	11,18b	2,66b	10,06a	5,90b	9,03a

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur

4.2.3 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkilerinden kotiledon düğümü, Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamına bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Bu çalışmada Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra eksplantları 24 saat boyunca 20 mg/l 2ip içeren MS ortamında bekletilmiştir. Daha sonra çimlenen tohumlardan izole edilmiş kotiledon düğümü, Mezokotil ve kolriza eksplantları 1 gün boyunca MS ortamında kültüre alınmış, olup, her 3 eksplant ayrı ayrı 0.1, 0.2, ve 0.3 mg/l 2ip ile 2gr/l aktif kömür içeren MS ortamına alınmıştır. Her 3 eksplantından sürügün oluşum yüzdesi, eksplant başına kardeşlenme, yaprak sayısı (adet), ortalama yaprak uzunluğu, ortalama yaprak genişliği (cm), kök oluşum yüzdesi, kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu ile ilgili verilere ait değerler varyans analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçları çizelge 4.8 de verilmiştir.

Kolriza eksplantından her hangi bir sürügün oluşumu elde edilmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), (%), bitki başına kök sayısı (adet) ve kök oluşum yüzdesi bakımından çeşitler arasında farklılık görülmemiştir ve Kök uzunluğu (cm) bakımından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), bitki başına kök sayısı (adet), Kök uzunluğu (cm) bakımından ortamlar arasında her hangi bir farklılık izlenmemiştir ve kök oluşum yüzdesi (%) bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), bakımından eksplantlar arasında farklılık görülmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına Yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), kök oluşum yüzdesi (%), bitki başına kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) bakımından eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir. Sürgün oluşum yüzdesi (%),yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), kök oluşum yüzdesi (%), bitki başına kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) bakımından çeşit ve ortamlar arasında her hangi bir etkileşim bulunmamıştır ve eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve bitki başına yaprak sayısı (adet) bakımından çeşitler ve ortamlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Sürgün oluşum yüzdesi (%),yaprak genişliği (cm) ve kök oluşum yüzdesi (%), bakımından çeşit ve eksplant arasında her hangi etkileşim bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), bitki başına kök sayısı (adet), Kök uzunluğu (cm) bakımından çeşitler ve ortamlar arasında farklılık 0.05 düzeyinde önemli olduğu gözlenmiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), kök oluşum yüzdesi (%), bitki başına kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) bakımından ortamlar ve eksplantlar arasında her hangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), bitki başına yaprak sayısı (adet), kök oluşum yüzdesi (%), bitki başına kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) bakımından çeşitler, ortamlar ve eksplantlar arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Yaprak uzunluğu ve yaprak genişliği (cm), (cm) bakımından çeşitler, ortamlar ve eksplantlar arasında farklılığın 0.05 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür.

Ortalamalar arasında önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.9 da verilmiştir.

Elde edilen etkileşim sonuçlarıyla ilgili Duncan testi sonuçları Çizelge de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde sürgün oluşum yüzdesi %6.67 ve 26.67 arasında ve Mezokotil üzerinde ise % 16.67 ve 36.67 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplantında sürgün oluşumu %16.67 ve 30 arasında ve Mezokotil üzerinde gelişen sürgün oluşumu %13.33 ile 23.33 arasında değişmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde eksplant başına sürgün sayısı 0.06 ile 1.76 adet arasında değişmiştir. Mezokotil üzerinde gelişen eksplant başına sürgün sayısı ise 0.36 ve 0.67 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde gelişen eksplant başına sürgün sayısı 0.67 ve 1.00 adet arasında ve Mezokotil üzerinde gelişen tüm ortamlar üzerinde gelişen eksplant başına sürgün sayısı ise 0.67 olarak belirlenmiştir.

Bitki başına yaprak sayısı bakımından Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde 2.67 ile 8.33 adet yaprak oluşum izlenmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen yaprak sayısı ise 2.47 ve 3.00 adet yaprak arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde yaprak sayısı 3.50 ve 4.47 adet arasında ve Mezokotil üzerinde gelişen yaprak sayısı ise 2.86-3.11 adet arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde yaprak uzunluğu 10.33 ile 29.47 cm ve Mezokotil üzerinde 8.33 ve 15.38 cm arasında izlenmiştir. Osmancık çeşidinde

kotiledon düğümü üzerinde 13.50 ve 25.33 cm arasında ve Mezokotil üzerinde yaprak uzunluğu 16.11 ile 19.16 cm arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde yaprak genişliği 0.05-0.24 cm arasında ve Mezokotil eksplantında ise yaprak genişliği 0.06 -0.11 cm arasında ve Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde 0.12 ve 0.21 cm arasında ve Mezokotil üzerinde gelişen tüm ortamlar üzerinde yaprak genişliği 0.07 -0.15 arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde %23.33 - 40.00 ve Mezokotil üzerinde %16.67-36.66 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde %23.33 ve 40.00 ve Mezokotil üzerinde gelişen tüm ortamlar üzerinde 13.33 ve 33.33 arasında değişmiştir. Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde 9.47-16.53 adet ve Mezokotil üzerinde 3.13-4.11 adet kök izlenmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde 6.67 - 9.91 ve mezokotil üzerinde tüm ortamlarda 3.87 ve 8.00 adet kök oluşumu izlenmiştir.

Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde 8.37 -10.47 cm uzun ve Mezokotil üzerinde 2.97 -5.17 cm ve Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü üzerinde 9.47 -11.01 cm uzun ve Mezokotil üzerinde gelişen ortamlar üzerinde 7.43 - 9.52 cm uzun kökler elde edilmiştir.

Çizelge 4.8 Çeltik Hamzadere ve Osmançık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü, Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamına bekletilip, farklı oranda 2iP içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ili ilgili parametre ortalamalarının varians analizi sonuçları

VK	Sd	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Bitki başına Yaprak sayısı (adet)	
		Ko	F	Ko	F	Ko	F
Çeşit	1	69,44	0,18	0,16	0,36	2,07	0,21
Ortamlar	2	36,11	0,09	0,29	0,66	5,09	0,53
Eksplant	1	69,44	0,18	1,44	3,26*	22,40	2,35*
çeşit × ortamlar	2	186,11	0,48	0,49	1,11*	10,48	1,10*
çeşit × eksplant	1	469,44	1,23	0,49	1,11*	4,74	0,49*
ortamlar × eksplant	2	52,77	0,13	0,12	0,28	4,47	0,47
çeşit × ortamlar × eksplant	2	602,77	1,58	0,17	0,39	6,67	0,70
Hata	24	380,55*		0,44		9,49	
Genel toplam	35						
VK	Sd	Yaprak uzunluğu (cm)		Yaprak genişliği (cm)		Kök oluşum yüzdesi (%)	
		Ko	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	61,72	0,36	0,001	0,07	177,77	0,53
Ortamlar	2	19,75	0,11	0,005	0,41	719,44	2,15*
Eksplant	1	235,00	1,37*	0,049	4,05*	711,11	2,13*
çeşit × ortamlar	2	71,87	0,42	0,008	0,64	19,44	0,05
çeşit × eksplant	1	101,20	0,59*	0	0,00	44,44	0,13
ortamlar × eksplant	2	89,78	0,52	0,007	0,61	352,77	1,05*
çeşit × ortamlar × eksplant	2	251,23	1,46*	0,026	2,18*	52,77	0,15
Hata	24	171,31		0,012		333,333	
Genel toplam	35						
VK	Sd	Bitki başına kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)			
		KO	F	KO	F		
Çeşit	1	5,81	0,19	59,650	2,93*		
Ortamlar	2	1,65	0,05	1,151	0,05		
Eksplant	1	262,60	8,92*	110,110	5,40*		
çeşit × ortamlar	2	22,96	0,78	2,964	0,14		
çeşit × eksplant	1	91,68	3,11*	17,389	0,85*		
ortamlar × eksplant	2	26,85	0,91*	7,983	0,39		
çeşit × ortamlar × eksplant	2	14,32	0,48	1,487	0,07		
Hata	24	29,43		20,362			
Genel toplam	35						

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Çizelge 4.9 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 24 saat 20 mg/l 2iP içeren MS ortamı, daha sonra çimlenmiş bitkiciklerden kotiledon düğümü, Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2iP içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ili ilgili parametre ortalamalarının Duncan testi sonuçları

2ip (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)*				Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	26.67	26.67	16.67	13.33	1,76	0,66	0,83	0,67
0.2	6.67	36.67	30.00	13.33	0,66	0,36	1,00	0,67
0.3	16.67	16.67	16.67	23.33	1,16	0,66	0,67	0,67
2ip (mg/l)	Bitki başına Yaprak sayısı (adet)				Yaprak uzunluğu (cm)			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	8,33	3,00	3,50	2,87	29,47a	8,33b	17,93b	16,22b
0.2	2,67	2,47	4,47	3,11	10,33c	15,38a	25,33a	16,11b
0.3	4,25	2,87	3,67	3,10	19,167b	9,86b	13,50c	19,16a
2ip (mg/l)	Yaprak genişliği (cm)*				Kök oluşum yüzdesi (%)			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	0,24a	0,10a	0,19b	0,07b	40,00	26,67	40,00	13,33
0.2	0,05b	0,11a	0,21a	0,07b	36,67	36,67	30,00	33,33
0.3	0,20a	0,06b	0,12c	0,15a	23,33	16,67	23,33	13,33
2ip (mg/l)	Bitki başına kök sayısı (adet)				Kök uzunluğu (cm)			
	Hamzadere		Osmancık		Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	16,53	3,13	7,85	3,86	10,46	2,96	11,01	7,77
0.2	9,46	4,11	9,91	5,93	8,66	5,16	9,46	7,43
0.3	10,41	3,38	6,66	8,00	8,37	4,71	10,58	9,52

** Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur

4.2.4 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumları 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 1 gün MS ortamında bekletildikten sonra çimlenmiş bitkilerden kotiledon düğümü, Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları

Bu çalışmada Hamzadere ve Osmancık çeşitlerin steril edilmiş tohumları 4 gün boyunca MS ortamında çimlendirilmiştir. Daha sonra çimlenmiş tohumları 1er gün boyunca 100 mg/l NAA içeren MS ortamına ön muamele yapmak için bekletilmiştir. Gelişen tohumlardan kotiledon düğümü 1 cm lik mezokotil ve 1 cm uzun kolriza eksplantları ayrı ayrı 0.1, 0.2 ,ve 0.3 mg/l 2ip ile 2gr/l aktif kömür içeren MS ortamında 27 gün rejenerasyona bırakılmıştır. Bu çalışma 3 tekrardan oluşup, her tekrarda 10 bitki olmak üzere her muamelede 30 eksplant kullanılmıştır.

Kolriza eksplantından her bir hangi rejenerasyon elde edilememiştir. kotiledon düğümü ve Mezokotil eksplant üzerinde uygulamaların etkileri Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), , Yaprak uzunluğu (cm), Yaprak genişliği (cm), Kök oluşum yüzdesine (%)ait veriler varyans analizine tabii tutulmuştur ve sonuçları Çizelge 4.10 de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, kök oluşum yüzdesi, bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında önemli bir farklılık izlenmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), kök oluşum yüzdesi ve bitki başına kök sayısı bakımından ortamlar arasında farklılık görülmemiştir. Bitki başına Yaprak sayısı (adet), yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, ve kök uzunluğu bakımından ortamlar arasında farklılık 0.05 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), yaprak uzunluğu, kök oluşum yüzdesi, bakımından explantlar arasında farklılık 0.01 düzeyinde önemli olduğu izlenmiştir. Bitki başına Yaprak sayısı (adet), bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından explantlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli olduğu izlenmiştir. Yaprak genişliği bakımından explantlar arasında herhangi bir farklılık izlenmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına yaprak sayısı (adet), yaprak genişliği, kök oluşum yüzdesi, bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından çeşit ve ortamlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli olduğu izlenmemişken, yaprak uzunluğu bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık izlenmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), yaprak genişliği, bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından çeşit ve eksplantlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli olmadığı görülmüştür. Yaprak uzunluğu ve kök oluşum yüzdesi bakımından çeşit ve eksplantlar arasında herhangi bir etkileşim izlenmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%), Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet), kök oluşum yüzdesi, bakımından ortamlar ve eksplantlar arasında herhangi bir farklılık izlenmemiştir. Yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından ortamlar ve eksplantlar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli olduğu izlenmiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%),yaprak genişliği, kök oluşum yüzdesi, bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından çeşitler, ortamlar ve eksplant arasında herhangi etkileşim izlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı (adet), Bitki başına Yaprak sayısı (adet) ve yaprak uzunluğu bakımından çeşitler, ortamlar ve eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Hamzadere kotiledon düğümü eksplantında sürgün oluşumu (%6.67) sadece 0.1 mg/l 2iP içeren MS ortamından elde edilmiştir. Mezokotil eksplantında ise sürgün oluşumu %63.33 – 93.33 arasında değişmiştir (çizelge 4.11). En fazla sürgün oluşumu 0.3mg/l 2ip içeren ortmından elde edilmiştir. Osmancık çeşidinde sürgün oluşum %3.33 - 10.00 arasında değişmiş olup, 2 mg/l 2ip içeren MS ortamından sürgün oluşumu elde edilememiştir. Buna karşı mezokotil eksplantından ise sürgün oluşum yüzdesi %40 – 76.67 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum 0.1 mg/l 2ip içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü eksplant, 0.1 mg/l 2 ip içeren MS ortamında gelişen bitkiler üzerinde gelişen sürgünlerin sayısı 1.33 olarak belirlenmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen eksplantlarda Eksplant başına sürgün sayısı ise 1.00 olarak tespit edilmiştir Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplant başına sürgün sayısı 0.33 ile 0.76 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde Mezokotil eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 1.04 arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü eksplant, 0.1 mg/l 2 ip içeren MS ortamında gelişen bitkiler üzerinde gelişen Bitki başına 1.33 adet yaprak sayılmıştır. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen eksplantlarda Bitki başına yaprak sayısı ise 3.67 -3.94 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü Bitki başına Yaprak sayısı 1.33 ile 2.67 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde Mezokotil bitki başına yaprak sayısı 13.52 – 14.41 arasında değişmiştir.

0.1mg/l 2ip içeren MS ortamı hamzadere çeşidi kotiledon düğümü eksplantı üzerinde gelişen bitkilerde yaprak uzunluğu 8.67 olarak ispat edilmiştir. Mezokotil üzerinde gelişen eksplantların yaprak uzunluğu 15.67 ile 19.27 cm arasında değişmiştir. En uzun yaprakları 0.3 mg/l 2ip içeren MS ortamından elde edilmiştir. Osmancık çeşidi yaprak uzunluğu 8.77 -9.33 cm arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantından gelişen bitkilerin yaprak uzunluğu 18.13 – 23.29 cm arasında değişmiştir ve en uzun yaprakları 0.3 mg/l 2iP içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü 0.1 mg/l 2ip içeren MS ortamında gelişen yaprakların genişliği 0.83 olarak belirlenmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerin yaprak genişliği 0.123 ile 0.213 cm arasında değişmiştir. En geniş yapraklar 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamından elde edilmiştir. Osmancık çeşidinde ise kotiledon düğümü üzerinde gelişen bitkilerin yaprak genişliği 0.06 ve 0.10 arasında değişmiştir. Yaprak kılıfı eksplant üzerinde gelişen bitkilerin yaprak genişliği 0.13 ile 0.14 cm arasında değiştiği gözlenmiştir.

Hamzadere kotiledon düğümü üzerinde kök oluşumu %36.67 olarak not edilmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök oluşumu %63.33 – 93.33 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplantı üzerinde gelişen bitkilerde kök oluşum yüzdesi 30.00 - 36.67 arasında değişmiştir. 0.2 mg/l 2ip içeren ortamında gelişen bitkilerde hiç kök oluşumu gözlenmemiştir. Osmancık çeşidi Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök oluşumu yüzdesi 50.00 – 76.67 arasında değişmiştir. En fazla ve en az kök oluşum sırasıyla 0.1 ve 0.3 mg/l 2ip içeren MS ortam üzerinde gelişen bitkilerde izlenmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü eksplant üzerinde gelişen bitkilerde bitki başına kök sayısı 10.36 adet olarak belirlenmiştir. Hamzadere Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök sayısı 5.88 ve 7.03 adet arasında değişmiştir. Osmancık çeşidi kotiledon düğümü eksplantı kök sayısı 0.10 - 4.00 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök sayısı 5.29 - 7.59 adet arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü üzerinde gelişen bitkilerin kök uzunluğu 9.67 cm olarak ölçülmüştür. Hamzadere çeşidi Mezokotil üzerinde gelişen bitkilerin kök uzunluğu 4.10 – 8.13 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidi kotiledon düğümü eksplantı üzerinde gelişen eksplantlar üzerinde gelişen bitkilerin kök uzunluğu 5.25 – 8.33 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidi Mezokotil üzerinde gelişen eksplantlar üzerinde gelişen bitkilerin kök uzunluğu 6.62 – 9.24 cm arasında değişmiştir.

Çizelge 4.10 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamına ve 1 gün MS ortamına bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerinden kotiledon düğümü, mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamda rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametre verilerinin varyans analizi sonuçları

VK	sd	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Bitki başına Yaprak sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	625,00	1,92*	0,16	0,81*	80,28	2,49*
Ortamlar	2	33,33	0,10	0,14	0,69	24,00	0,74*
Eksplant	1	42025,00	129,30**	5,32	26,20**	266,77	8,30*
çeşit * ortamlar	2	533,33	1,64*	0,16	0,81*	35,86	1,11*
çeşit * eksplant	1	1002,77	3,08*	0,13	0,63*	39,60	1,23*
ortamlar * eksplant	2	233,33	0,71	0,12	0,59	22,73	0,70
çeşit * ortamlar * eksplant	2	1211,11	3,72*	0,13	0,63	13,59	0,42
Hata	24	325,00		0,203		32,138	
Genel Toplam	35						
VK	sd	Yaprak uzunluğu (cm)		Yaprak genişliği (cm)		Kök oluşum yüzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	99,02	1,56*	0,138	0,77*	3802,77	5,92*
Ortamlar	2	64,29	1,01*	0,170	0,95*	8,33	0,01
Eksplant	1	1845,64	29,11**	0,003	0,01	14002,77	21,82**
çeşit * ortamlar	2	22,08	0,34	0,164	0,92*	1769,44	2,75*
çeşit * eksplant	1	0,25	0,00	0,087	0,48*	136,11	0,21
ortamlar * eksplant	2	86,15	1,35*	0,199	1,11*	252,77	0,39
çeşit * ortamlar * eksplant	2	16,46	0,26	0,176	0,99*	936,11	1,45*
Hata	24	63,388		0,178		641,67	
Genel Toplam	35						
VK	sd	Bitki başına kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)			
		KO	F	KO	F		
Çeşit	1	35,46	3,12*	0,37	0,05		
Ortamlar	2	5,89	0,52	12,56	1,87*		
Eksplant	1	7,99	0,70*	25,62	3,81*		
çeşit * ortamlar	2	10,58	0,93*	13,60	2,02*		
çeşit * eksplant	1	41,88	3,69*	39,25	5,84*		
ortamlar * eksplant	2	19,17	1,69*	53,97	8,04*		
çeşit * ortamlar * eksplant	2	19,27	1,70*	11,71	1,74*		
Hata	24	11,33		6,711			
Genel Toplam	35						

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$

Çizelge 4.11 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 1 gün MS ortamında bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerden kotiledon düğüm , Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametre verilerinin Duncan testi sonuçları

2iP (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)			
	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	6.67a	63.33c	3.33b	76.67a
0.2	0.00b	86.67b	0.00c	70.00a
0.3	0.00b	93.33a	10.00a	40.00b
2iP (mg/l)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	1.33	1,000	0,333	1,00
0.2	0.00	1,000	0.00	1,00
0.3	0.00	1,000	0,767	1,04
2iP (mg/l)	Bitki başına Yaprak sayısı (adet)			
	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	1,333	3,94	1,333	3,52
0.2	0.00	3,67	0.00	8,68
0.3	0.00	3,77	2,67	14,41
2iP (mg/l)	Yaprak uzunluğu (cm)			
	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	8,67	16,187	9,333	18,133
0.2	00	15,667	0	20,149
0.3	0	19,267	8,777	23,297

Çizelge 4.11 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinin tohumlarının 4 gün MS ortamında çimlendirilmiş olup, 1er gün 100 mg/l NAA içeren MS ortamında ve 1 gün MS ortamında bekletildikten sonra çimlenmiş bitkiciklerden kotiledon düğüm , Mezokotil ve kök uç eksplantları 24 saat boyunca MS ortamında bekletilip, farklı oranda 2ip içeren MS ortamında rejenerasyon çalışmaları ile ilgili parametre verilerinin Duncan testi sonuçları (Devam)

2iP (mg/l)	Yaprak genişliği (cm)			
	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.1	0,83a	0,14b	0,06a	0,13a
0.2	0,00b	0,21a	0,00b	0,13a
0.3	0,00b	0,12b	0,10a	0,14a
2iP (mg/l)	Kök oluşüm yuzdesi (%)			
	Hamzadere		Osmancık	
	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü
0.1	0,13a	36,67a	63,33b	36,67a
0.2	0,13a	0,00b	90,00a	0,00b
0.3	0,14a	0,00b	93,33a	30,00b
Bitki başına kök sayısı (adet)				
2iP (mg/l)	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
	1	10,36a	5,96b	4,00b
0.1	0,00	7,03a	0,00c	7,59a
0.2	0,00	5,88b	6,10a	5,29c
0.3	Kök uzunluğu (cm)			
2iP (mg/l)	Hamzadere		Osmancık	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
	1	9,667a	4,100c	5,253b
0.1	4,833c	8,133a	0,00c	9,24a
0.2	5,960b	7,023b	8,333a	9,04a
0.3				

** Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık bulunmuştur

4.2.5 Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinde kotiledon düğüm ve mezokotil eksplantları 1 gün MS de 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1gun tekrar MS ortamında daha sonra 0.025 mg/l , 0.05 mg/l , 0.1 mg/l ,ve 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamına alınması

Bu çalışmada Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinden 120 tohum kullanılmış eksplant olarak kotiledon düğümü ve yaprak kullanılmış.3 tekerrür her tekerrürde10 bitki den oluşmuştur. bu çalışmada tohumlar steril edildikten sonra 1 gün MS de 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1gun tekrar MS ortamlarına konulup ve sonra kotiledon düğümü zigot ve Mezokotil olarak kesilmiş ve 4 farklı ortama yani 0.025 mg/l , 0.05 mg/l , 0.1 mg/l ,ve 0.2 mg/l 2ip içeren 4 farklıMS ortamlarına alınmıştır .bu çalışma 2014.02.05 başlatıldı ve 2014 .04.18 son verilmiştir.ortamında 2g/l aktif kömür kullanmış bu çalışmada iki eksplant yani kotiledon düğümü ve yaprak kullanılmıştır. Tekerrür, eksplant başına sürgün sayısı, kardeşlenme,yaprak sayısı(adet),en uzun yaprak uzunluğu, yaprak genişliği(cm), kök oluşum yüzdesi, kök sayısı, en uzun kök uzunluğu değerleri alınmıştır..

Kolriza eksplantından her hangi bir rejenerasyon elde edilememiştir. kotiledon düğümü ve Mezokotil eksplantı üzerinde uygulamaların etkileri Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı, kardeşlenme,yaprak sayısı(adet),en uzun yaprak uzunluğu ,yaprak genişliği(cm), yüzdesi,kök sayısı,en uzun kök uzunluğu ,değerlerde alınmıştır,3 tekerrür olarak her tekerrür 10 bitkiden oluşmuştur. Her parametreye ait verilerin varyans analizi yapılmıştır ve sonuçları Çizelge 4.12 de verilmiştir.

Kök oluşum yüzdesi, dışı tüm parametreler bakımından çeşit, ortamlar ve eksplantlar arasında 0.05 düzeyinde önemli etkileşim izlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Hamzadere kotiledon düğümü eksplant başına sürgün oluşum yüzdesi %30.00-46.67 arasında değişmiştir (çizelge 4.13). Mezokotil eksplantından ise sürgün oluşum %10.13.33 arasında değişmiştir. Kotiledon düğümü eksplantından sürgün oluşum %16.00 43.33 arasında değişmiş olup, en fazla sürgün oluşum 0.025 mg/l 2ip içeren MS

ortamından sürgün oluşumu elde edilmiştir. Buna karşı Mezokotil eksplantından ise sürgün oluşum yüzdesi %10.00 -36.66 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum 0.02 mg/l 2ip içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Hamzadere çeşidinde kotiledon düğümü eksplant başına sürgün sayısı 1.28 ve 1.56 arasında değişmiştir. Mezokotil eksplantı üzerinde gelişen eksplant başına sürgün sayısı ise 0.66-1.66 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplant başına sürgün sayısı 3.38-18.21 arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde Mezokotil eksplant başına sürgün sayısı 2.23 -10.22 arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü eksplantında yaprak uzunluğu 11.00-25.38cm arasında değişmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen eksplantlarda Bitki başına Yaprak uzunluğu ise 3.58-17.66 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü Bitki başına Yaprak uzunluğu 16.61-21.77 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde Mezokotil Bitki başına Yaprak uzunluğu 10.22-16.76 cm arasında değişmiştir.

Hamzadere çeşidi kotiledon düğümü farklı oranda 2ip içeren MS ortamında gelişen yaprakların genişliği 0.16 -0.30 cm olarak belirlenmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerin yaprak genişliği 0.04 -0.21 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde ise kotiledon düğümü üzerinde gelişen bitkilerin yaprak genişliği 0.13-0.25 cm arasında değişmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerin yaprak genişliği 10.00 -36.67 cm arasında değiştiğini gözlenmiştir.

Hamzadere ve Osmancık çeşitlerin kotiledon düğümü ve Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök oluşumu %100.00 olarak tespit edilmiştir.

Hamzadere kotiledon düğümü üzerinde kök sayısı 6.07-9.53 adet olarak not edilmiştir. Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök sayısı 1.25-6.37 adet arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplantı üzerinde gelişen bitkilerde kök sayısı 5.18- 11.96 adet arasında değişmiştir. Osmancık 97 çeşidi Mezokotil

eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök oluşum sayısı 2.34- 5.72 adet arasında değişmiştir.

Hamzadere kotiledon düğümü üzerinde kök uzunluğu 6.07-9.53 cm olarak not edilmiştir. mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök uzunluğu 1.25 -6.37 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidinde kotiledon düğümü eksplantı üzerinde gelişen bitkilerde kök uzunluğu 5.18 -11.96 cm arasında değişmiştir. Osmancık çeşidi Mezokotil eksplant üzerinde gelişen bitkilerde kök uzunluğu 1.99 - 12.00 cm arasında değişmiştir.

Çizelge 4.12 Çeltiğin Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinden kotiledon düğümü ve mezokotil kullanılmış eksplantları 1 gün tekrar MS ortamında 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1gun tekrar MS ortamında ve daha sonra 0.025 mg/l , 0.05 mg/l, 0.1 mg/l ve 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamında alınıp farklı rejenerasyon parametrelerine ait verilerin varyans analizi

VK	sd	Sürgün oluşum yüzdesi		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Yaprak uzunluğu	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	533,33	1,35*	2,04	1,618*	102,399	1,341*
Ortamlar	3	261,11	0,66	,513	0,40	102,399	1,34*
Eksplant	1	4033,33	10,24*	5,62	4,44*	552,842	7,23*
çeşit * ortamlar	3	427,77	1,08*	1,73	1,37*	157,602	2,06*
çeşit * eksplant	1	4033,33	10,24*	0,02	0,02	10,416	0,13
ortamlar * eksplant	3	605,55	1,53*	1,40	1,11*	15,665	0,20
çeşit * ortamlar * eksplant	3	405,55	1,03*	0,69	0,55	13,390	0,17
Hata	32	393,75		1,26		76,382	
Genel Toplam	47						
VK	sd	yaprak genişliği		Bitki başına kök sayısı		Kök uzunluğu	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	0,00	0,01	300,00	,689*	128,491	3,832*
Ortamlar	3	0,01	0,52	247,22	,568	61,639	1,838*
Eksplant	1	0,06	5,52*	7008,33	16,096*	112,015	3,340*
çeşit * ortamlar	3	0,03	2,41*	483,33	1,110*	119,987	3,578*
çeşit * eksplant	1	0,004	0,36	3333,33	7,656*	,038	,001
ortamlar * eksplant	3	0,01	0,40	1413,88	3,247*	40,117	1,196*
çeşit * ortamlar * eksplant	3	0,01	0,67	794,44	1,825*	53,755	1,603*
Hata	32	0,012		435,41**		33,534	
Genel Toplam	47						

* $p < 0.05$

Çizelge 4. 13 Çeltiğinin Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinden kotiledon düğümü ve mezokotil kullanılmış eksplantları 1 gün MS de 4 gün 20mg/l 2ip ve sonra 1 gün tekrar MS ortamında ve daha sonra 0.025 mg/l , 0.05 mg/l , 0.1 mg/l ,ve 0.2 mg/l 2ip içeren MS ortamında alınıp farklı rejenerasyon parametrelerine ait ortalamaların Duncan testi sonuçları

2iP (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)				Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
	Hamzadere		Osmancık 97				Hamzadere	
	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.025	46,67c	10,00b	43,33a	16,66c	1,49	0,66	2,52	10,22
0.050	66,67a	13,33b	20,00b	33,33b	1,76	0,88	2,75	2,23
0.1	53,33b	13,33a	16,66c	10,00d	1,28	1,66	0,83	6,50
0.2	30,00d	13,33a	16,66c	36,6a	1,56	0,33	1,83	15,30
2iP (mg/l)	Yaprak uzunluğu				Yaprak genişliği (cm)			
	Hamzadere		Osmancık 97				Hamzadere	
	Kotiledon düğümü	Mezoko til	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.025	16,94	8,83	18,247	10,22	0,22	0,13	0,23	16,67
0.050	23,05	15,41	21,277	11,14	0,25	0,19	0,25	33,33
0.1	25,38	17,66	16,610	11,33	0,30	0,21	0,13	10,00
0.2	11,00	3,58	16,750	16,76	0,16	0,04	0,24	36,67
2iP (mg/l)	Kök sayısı (adet)				Kök uzunluğu			
	Hamzadere		Osmancık 97		Hamzadere		Osmancık 97	
	Kotiledon düğümü	Mezoko til	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil	Kotiledon düğümü	Mezokotil
0.025	9,53a	3,33b	11,96a	5,72	9,53a	3,33b	11,96a	12,00a
0.050	6,07c	6,37a	11,71a	2,34	6,07d	6,37a	11,71a	10,22b
0.1	8,63b	6,33a	5,18bc	4,16	8,63b	6,33a	5,18b	5,03c
0.2	6,68c	1,25c	6,75b	5,17	6,68c	1,25c	6,75b	1,99d

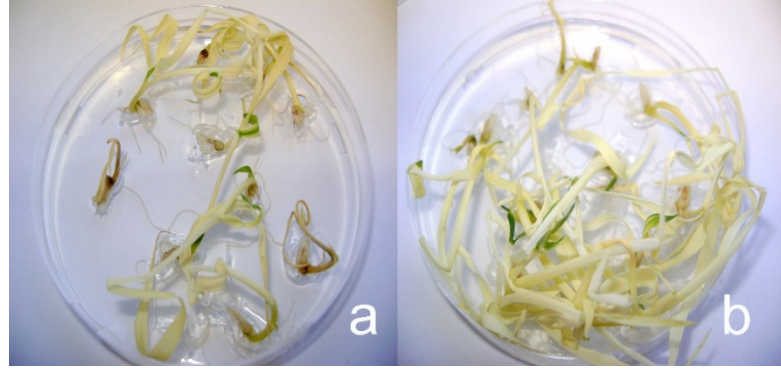
*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık bulunmuştur

4.3 Gen Aktarım Çalışmaları

4.3.1 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 Çeşitleri için Farklı Dozda Kanamacin İçeren Ortamında Yaşayan Bitkilerinin Oranı Gözlenerek LD₁₀₀ (öldürücü dozu₁₀₀ /Letal Dozu₁₀₀) Dozunun Belirlenmesi

Bitki transformasyon çalışmalarında seleksiyon için kanamisin dozunun ayarlanmasıGV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT yalnız kanamisine karşı karşı direnç taşımaktadır. Çalışmada gen aktarım için kullanılan hattı kullanarak seleksiyon yapabilmesi için çeltiğin her iki çeşidine ait tohum eksplantlarından rejenerasyon yaparak ayrı ayrı kanamisine karşı letal dozu belirlenerek transformasyon çalışmalarında kolaylık sağlanmıştır.

Farklı oranda kanamisin içeren MS ortamında her iki çeltik çeşitlerine ait 100'er adet tohum 4 tekerrürle bölünerek seleksiyon için çimlendirilmiş olup, 15 gün sonra yaşayan bitkilerin sayısı belirlenmiştir. Her Petri (tekerrür)'de 5'er adet tohum kullanarak 20'şer Petri ile ve 100 adet tohumu ile çalışmaya devam edilmiştir. Elde edilen sonuçları çizelge 4.14'de verilmiştir. Sonuçlara göre Hamzadere çeşidinde 350 ve 400 mg/l kanamisin içeren ortamında ve Osmancık çeşidinde ise 250, 300, 350 ve 400 mg/l kanamisin ile 15 gün içerisinde çimlenmiş tohumlarda %100 albinolaşma görülmüştür. Dolayısıyla daha sonra ki transformasyon çalışmalarında Hamzadere çeşidinde 350 mg/l ve Osmancık çeşidinde 250 mg/l kanamisin dozunu seleksiyon amacıyla kullanılmıştır (Şekil 4.3 a, b).



Şekil 4.4 Seleksiyon amacıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinde kanamisin dozunu optimize ederek Letal dozun (LD 100) belirlenmesi 300 mg/l Kanamisin içeren MS ortamında Hamzadere çeşidi ve 250 mg/l Kanamisin içeren ortamında Osmancık 97 çeşidinden albino bitkilerin elde edilmesi

Çizelge 4.14 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 Çeşitleri için Farklı Dozda Kanamacin İçeren Ortamında ölen Bitkilerinin Oranının Gözlenerek LD100 (öldürücü dozu100 /Letal Dozu100) Dozunu Belirlenmesi

Kanamisin (mg/l)	50	100	150	200	250	300	350	400
Hamzadere çeşidi	13.39	20.00	16.66	23.33	40.00	90.00	100.00	100.00
Osmancık çeşidi	46.66	46.66	56.66	60.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Bitkilerde ilk genetik transformasyon çalışması 1983 yılında *Agrobacterium tumefaciens* vektörü ile gerçekleştirilmiştir. (Caplan vd 1983, Zambryski vd 1983). Transformasyon çalışmalarında gen aktarım yöntemleri ile beraber gen aktarılmış hücrelerden yeni transgenik bitkilerin elde edilmesi çok önemlidir. Dünya çapında gen aktarılan bitkilerin sayısı sürekli olarak artmaktadır; ancak, Türkiye’de çeltik bitkisinde gen aktarımı konusunda çalışmalar bulunmamaktadır.

4.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*'in A281:: P35 Gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait 200'er adet tohum çimlendirildikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğümü ve endosperm eksplantlarıyla *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantları 1 gün boyunca kanamisin içermeyen MS ortamında ko kültürasyonu için bırakılmıştır. Ko kültürasyonu yapılmış eksplantlarda kök oluşumunu gözlemek için tüm eksplantlara 200 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamında kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m²/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınarak numaralandırılmıştır. Denemedeki bitkilerden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir.

Yapılan denemelerde *A. tumefaciens* ile muamele edilmemiş bitkiler ile kıyaslama sonucu muamele edilmiş bitkilerde daha fazla ve kalabalık kök oluşumu gözlenirken her hangi bir tümör oluşumu gözlenmemiştir. Yaprak örneklerinin klorofillerini parçalamak ve gus geninin ekspresyonu için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerin maviye boyanması ile GUS pozitif bitkiler aranmıştır.

Her iki çeşide ait tohum ve kotiledon düğümü eksplantından gelişen transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri incelenince %100 gus pozitif bitki elde edilmiştir (çizelge 4.15). Muamele edilmiş bitkilerde her hangi bir oranda tümör oluşumu gözlenmemiştir; ancak, normal orandan fazla kök oluşum gözlenmiştir (Şekil 4.5). Her iki bitkiye ait endosperm eksplantından her hangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir.



Şekil 4.5 *Agrobacterium tumefaciens*'ın A281:: P35 Gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin kotiledon düğümü eksplantı vasıtasıyla gen aktarımı

(a, b) Hamzadere çeşidinde ve (b) Osmancık çeşidinde bitkilerde yoğun kök oluşumu
(c) Yaprak örneklerinde histokimyasal gus analizi yöntemi ile gus ekspresiyonu

Çizelge 4.15 *Agrobacterium tumefaciens*'ın A281:: P35 Gus INT hattıyla çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeşit	Bakteri	Eksplant	Canlı kalan bitki sayısı (adet)	Tümör oluşum oranı (%)	Gus pozitive bitki oranı (%)
Hamzadere	A281	Tohum	200.00	0.00	100.00
	A281	Kotiledon düğümü	200.00	0.00	100.00
	A281	Endosperm	0.00	0.00	0.00
Osmancık	A281	Tohum	200.00	0.00	100.00
	A281	Kotiledon düğümü	200.00	0.00	100.00
	A281	Endosperm	0.00	0.00	0.00

4.3.3 *Agrobacterium rhizogenes*'ın 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait 100'er adet tohum çimlendirildikten 2 gün sonra *A. rhizogenes*'ın 15834 PRGGbar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantlar 2 gün boyunca MS ortamında ko kültürasyonu için bırakılmıştır. Ko kültürasyonu yapılmış eksplantlarında kök oluşumunu gözlemek için tüm eksplantlar 400 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamında kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta $35 \mu \text{ mol fotons/m}^2/\text{s}$ ışık altında $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. Çalışmada %100 sürgün oluşum elde edilmiştir.

Dolayısıyla, varyans analizi yapılmamıştır. Geri kalan parametrelere ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.16'de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre kardeşlenme, yaprak sayısı ve yaprak genişliği bakımından çeşitler arasında 0.01 düzeyinde ve kuru ağırlığı bakımından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür. Sürgün oluşum yüzdesi, yaprak uzunluğu, kök oluşum yüzdesi ve yaş ağırlığı bakımından çeşitlerde her hangi bir farklılık görülmemiştir. Ortalamalar arasında farklılığı belirlemek amacıyla yapılan t testi sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Osmancık çeşidi Hamzadere çeşidine göre yaprak genişliği hariç her bakımından üstün olarak belirgin farklılık göstermiştir. Bu denemede Test edilmiş her iki çeşide ait transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri incelenince %100 gus pozitif bitki elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki çeşidinde sürgün oluşum yüzdesi (%100) ve kök oluşum yüzdesi (%100) bakımından her iki çeşit arası her hangi bir farklılık görülmemiştir. Yapılan denemelerde *A. rhizogenes* ile muamele edilmemiş bitkileri ile kıyaslama sonucu muamele edilmiş bitkilerde daha fazla ve kalabalık kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *A. rhizogenes*'in 15834 PRGGbar hattıyla, a. araştırmacı çalışmasonuçları imcelerken, b. Hamzadere ve c. Osmancık çeşitlerine gen aktarımı sonucu yoğun kök oluşumu

Çizelge 4.16 *Agrobacterium rhizogenes*'in 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı ile ilgili parametrelerle ait varyans analizi sonuçları

VK	sd	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Kardeşlenme (adet)		Yaprak sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	0,00	0,00	0,27	4,15**	25,06	10,03**
hata	6	0,00		0,06		2,49	
Genel toplam	7						
VK	sd	Yaprak uzunluğu (cm)		Yaprak güneşliği (cm)		Kök oluşum yüzdesi (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	1,14	0,56	0,04	4,19**	0,00	0,00
hata	6	2,00		0,01		0,00	
Genel toplam	7						
VK	sd	Yaş ağırlığı (g)		Kuru ağırlığı (g)			
		KO	F	KO	F		
Çeşit	1	3,36	0,29	0,12	1,08*		
hata	6	11,38		0,11			
Genel toplam	7						

* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$

Çizelge 4.17 *Agrobacterium rhizogenes*'ın 15834 PRGGbar hattıyla Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı ile ilgili parametrelere ait ortalmaların t testi analiz sonuçları

Çeşitler	Sürgün oluşum yüzdesi (%)	Kardeşlenme (adet)**	Yaprak sayısı (adet)**	Yaprak uzunluğu (cm)	Yaprak güneşliği (cm)**
Hamzadere	100,00	1,742**	11,82**	26,58	0,48**
Osmancık	100,00	2,11	15,36	27,34	0,33
Çeşitler	Kök oluşum yüzdesi (%)	Yaş ağırlığı (g)	Kuru ağırlığı (g)*	Gus pozitif bitki oranı	
Hamzadere	100,00	30,86	1,85	100,00	
Osmancık	100,00	32,16	2,09	100,00	

*Aynı sütünde ortalamalar arasındaki farklılıklar t testine göre 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır.

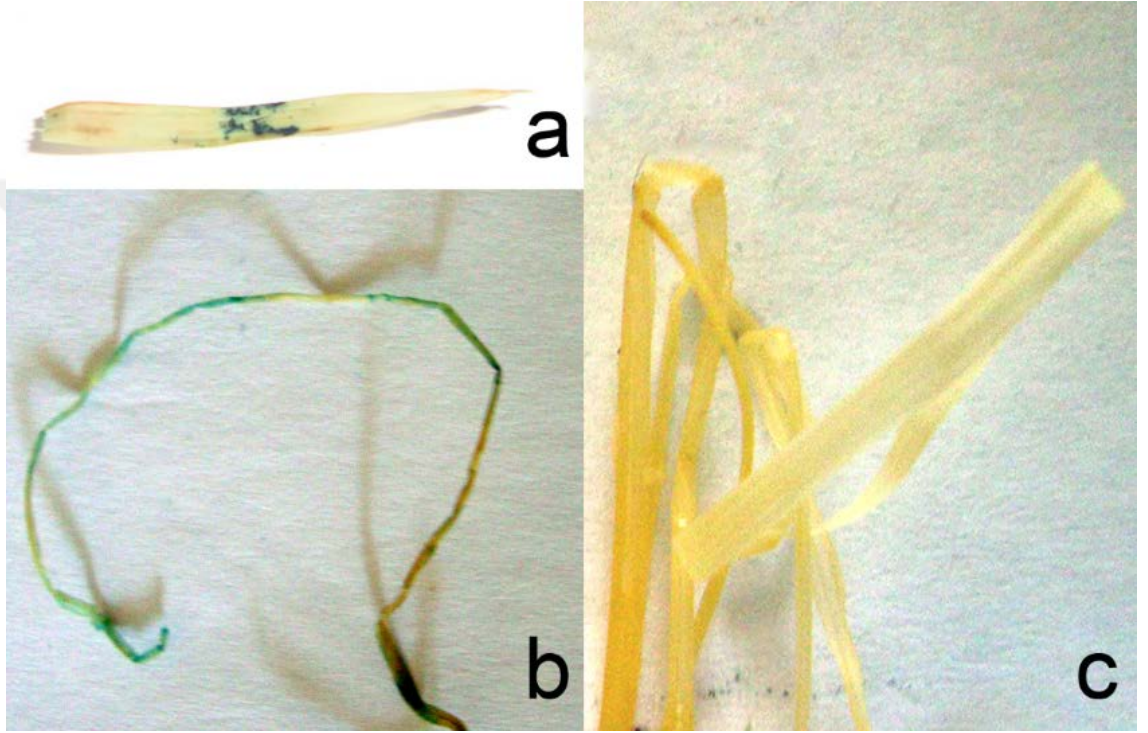
** Aynı sütünde ortalamalar arasındaki farklılıklar t testine göre 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır.

4.3.4 *Agrobacterium tumefaciens*'ın GV2260:: p35 gus INT hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerine gen aktarımı

Daha sonra, GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT *A. tumefaciens* hattıyla yapılan çalışmalarda Hamzadere çeşidinin seleksiyonu için 300 mg/l kanamisin ve Osmancık çeşidinin seleksiyonu için 250 mg/l kanamisin dozun kullanılmıştır.

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait tohumlar çimlendirdikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğümü ve endosperm eksplantlarıyla *A. tumefaciens*'ın GV2260:: p35 gus INT hattına ait süspansiyonuyla 45 dk inokulasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra Hamzadere çeşidine ait 1600 adet ve Osmancık çeşidine ait 1000 adet tohum eksplantları 1 gün boyunca MS ortamında ko kültürasyon için bırakılmıştır. Ko kültürasyon yapılmış eksplantlardan Hamzadere çeşidine ait eksplantları 350 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer ve Osmancık çeşidine ait eksplantlar 250 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid pfizer içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Tüm eksplantları numaralandırılmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol

fotons/m²/s ışık altında 24 ±1°C’de kültüre alınmıştır. Seleksiyon ortamında Hamzadere çeşidinden 25 adet ve Osmancık çeşidine ait 18 adet bitki canlı kalmıştı (çizelge 4.18). Canlı kalan bitkilerden 1’er adet yaprak örneği alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde konularak, üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C’de bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm canlı kalan bitkilerde gus pozitif sonuçlar izlenmiştir ve mavi boyama görülmüştür (şekil 4.7)..



Şekil 4.7 *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT hattı muamele sonucu çeltik çeşitlerinde gus ekspresyonu. a. Hamzadere çeşidi ve b. Osmancık 97 çeşidinde gus pozitif ve c Hamzadere çeşidinde gus negatif ekspresyonu

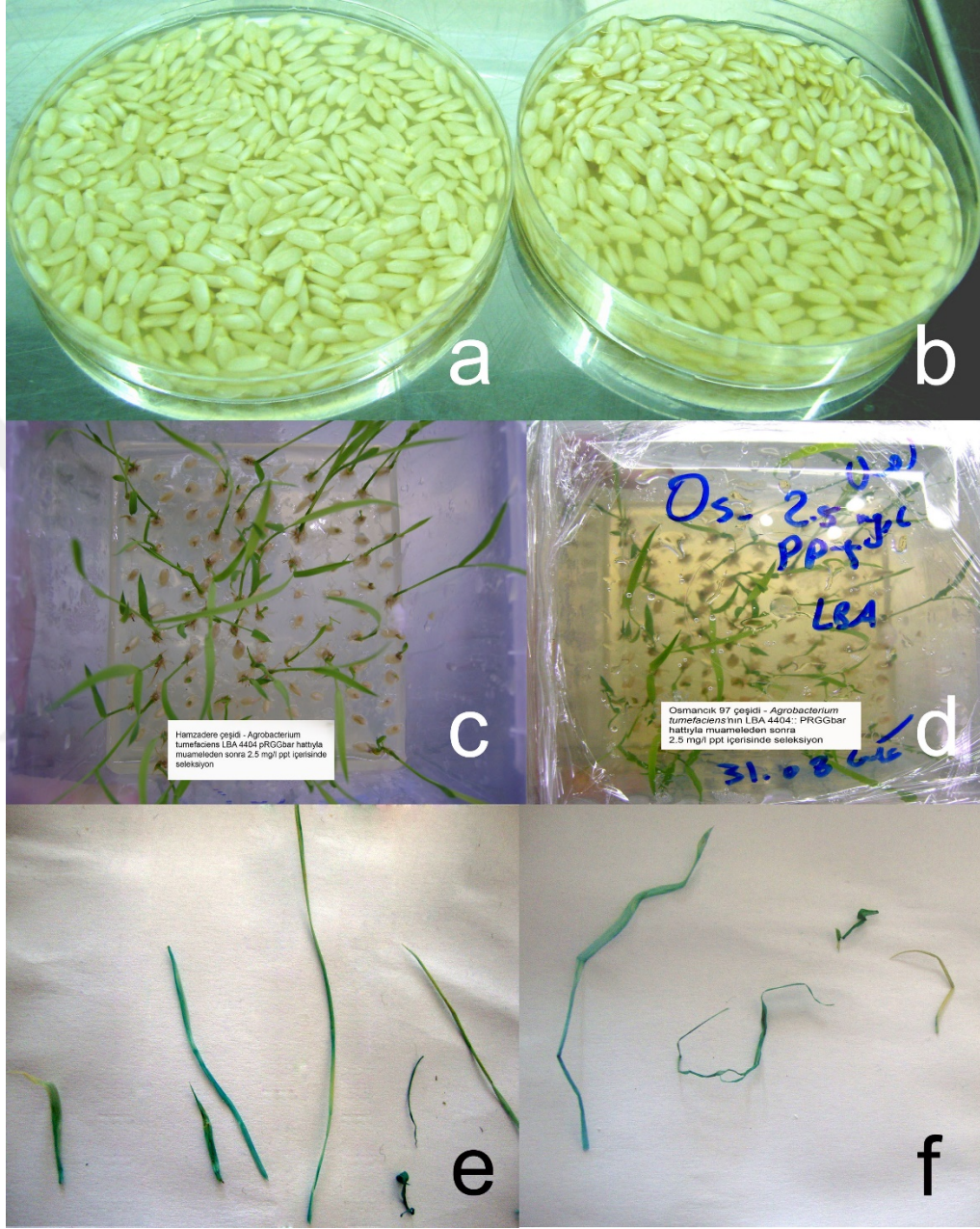
Çizelge 4.18 *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT hattı muamele sonucu çeltik çeşitlerindetohum eksplant kullanarak elde edilen bitkilerde gus ekspresyonu

Çeşit	Bakteri	Tohum sayısı (adet)	Bakteri ile moamile süresi-(dk)	Kökültivasyon ortamı ve süresi (dk)	Kanamisin miktarı (mg/l)	Duocid pfizer miktarı (mg/l)	Canlı kalan bitki sayısı (adet)
Hamzadere	(pGV2260)	1600	45 dk	MS ortamında 24 saat	350	400	25/1600
Osmancık	GV2260 ::p35SGUS-INT	1000	45 dk	MS ortamında 24 saat	250	400	18/1000

4.3.5 *A. tumefaciens*'in LBA 4404::pRGG bar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait tohumlar çimlendirildikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğümü ve endosperm eksplantlarıyla *A. tumefaciens*'in LBA 4404::pRGG bar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk inokulasyonuna tabii tutulmuştur. Daha sonra Hamzadere çeşidine ait 8000 adet ve Osmancık çeşidine ait 6000 adet eksplantlar 1 gün boyunca MS ortamında ko kültüvasyon için bırakılmıştır. Ko kültüvasyon yapılmış eksplantlardan Hamzadere çeşidine ait 4000 adet 2.5 mg/l fosfinotrisin + 400 mg/l Duocid ve 4000 adet 2 mg/l fosfinotrisin + 400 mg/l Duocid içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Benzer şekilde ko kültüvasyon yapılmış eksplantlarından Osmancık çeşidine ait 3000 adet 2.5 mg/l fosfinotrisin + 400 mg/l Duocid ve 3000 adet 2 mg/l fosfinotrisin + 400 mg/l Duocid içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlar, numaralandırılmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta $35 \mu \text{ mol foton/s}^2$ ışık altında $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. Denemedeki bitkilerden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözültisi eklenerek 24 saat 38°C 'de bekletilmiştir (Şekil 4.8).

Elde edilen sonuçlara göre her hangi bir canlı bitki elde edilmemiştir ve denemeye devam edilmemiştir (Çizelge 4.19).



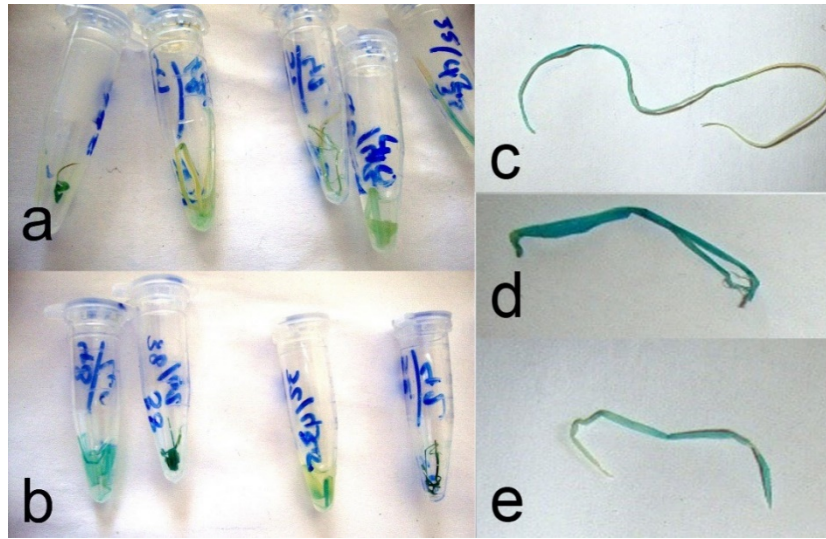
Şekil 4.8 *A. tumefaciens*'ın LBA 4404::pRGG bar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı. (a). *A. tumefaciens*'ın LBA 4404::pRGG bar hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine inokulasyonu Hamzadere ve Osmancık çeşitlerinin bitkilerinin 2.5 mg/l fosfonotrisin içeren MS ortamında seleksiyonu (e)Hamzadere ve (f) Osmancık çeşitlerinin bitkilerinin yaprak örneklerinde gus ekspresyonu

Çizelge 4.19 *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404: : pRGGbar hattıyla çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine tohum eksplantı kullanarak elde edilen bitkilerde gen aktarımı

Çeşit	Tohum miktarı (adet)	Bakteri ile muamile süresi (dk)	Kökültüvasyon ortamı ve süresi	Bakteriostatik Duocid (mg/l)	Seleksiyon için kullanılan fosfinotrisin (mg/l)	Süre (gün)	Canlı kalan bitki sayısı
Hamzadere	4000	45	MS ortamı / 24 saat	400	2.5	15	0
	4000	45	MS ortamı / 24 saat	400	2.0	15	0
Osmancık	3000	60	MS ortamı / 24 saat	400	2,5	15	0
	3000	60	MS ortamı / 24 saat	400	2.0	15	0
Çeşit	Tohum miktarı (adet)	Bakteri ile muamile süresi (dk)	Kökültüvasyon ortamı ve süresi	Bakteriostatik Duocid (mg/l)	Seleksiyon için kullanılan fosfinotrisin (mg/l)	Süre (gün)	Canlı kalan bitkisayı
Hamzadere	4000	45	MS ortamı / 24 saat	400	2.5	15	0
	4000	45	MS ortamı / 24 saat	400	2.0	15	0
Osmancık	3000	60	MS ortamı / 24 saat	400	2,5	15	0
	3000	60	MS ortamı / 24 saat	400	2.0	15	0

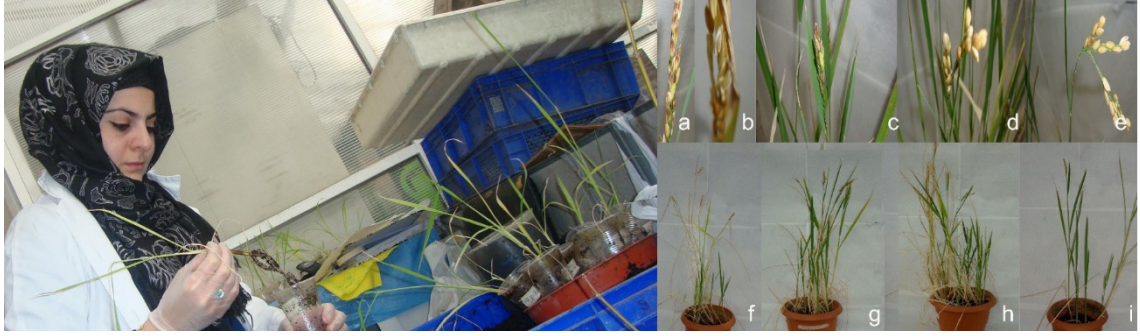
4.3.6 AoPR1 promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar *Agrobacterium tumefaciens* hattıyla Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine gen aktarımı

Çeltik Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait tohumlar çimlendirildikten 2 gün sonra tohum, kotiledon düğüm ve endosperm eksplantlara sırasıyla *A. tumefaciens*'in Cry1Ac hattına ait süspansiyonuyla 45 ve 60 dk inokulasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra Hamzadere çeşidine ait 2600 adet ve Osmancık çeşidine ait 3000 adet eksplantı 1 gün boyunca MS ortamında ko kültürasyonu için bırakılmıştır. Ko kültürasyonu yapılmış eksplantlardan Hamzadere çeşidinin eksplantları 350 mg/l kanamisin + 400 mg/l Duocid ve Osmancık çeşidine ait eksplantların 400 mg/l Duocid+250 mg/l kanamisin içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm eksplantları, numaralandırılmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 μ mol foton/m²/s ışık altında 24 \pm 1°C'de kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre seleksiyon ortamında Hamzadere çeşidinden 92 adet ve Osmancık çeşidinden 32 adet canlı bitki elde edilmiştir (Şekil 4.8-4.9, Çizelge 4.20).

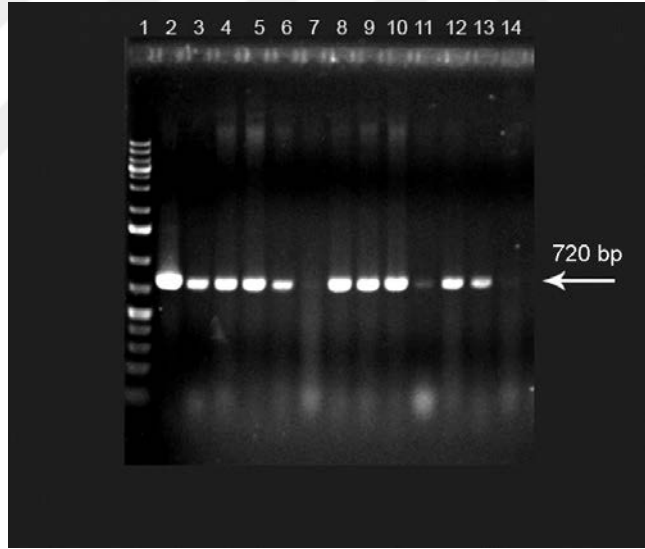


Şekil 4.9 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde gus ekspresyonu, a. Hamzadere, b. Osmancık 97 çeşitlerinin yaprak örneklerinin histokimyasal gus analizi için yaprak örneklerinin ependorf tüplerine konulması, c, d. Hamzadere çeşidinin, e. Osmancık 97 çeşidinin yaprak örneklerinde gus ekspresyonu

Hamzadere ve Osmancık çeşitlerine ait aday transgenik bitkileri plastik bardaklarına aktarılmış olup, seraya şaşırtılmıştır (Şekil 4.10) ve daha sonra bitki genomlarında npt II genin varlığı pcr ile teyid edilmiştir (4.11).



Şekil 4.10 Araştırmacı deneme bitkileri incelerken a, b, c, d, e, f, g, h, i. elde edilmiş transgenik bitkileri



Şekil 4.11 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde Npt II genin (720 bp) amplifikasyonu sonuçları; a. Kulvar 1 1 kb Marker (Fermentas), Kulvar 2: Pozitif Kontrol (Plasmid) , Kulvar 3, 4, 5, 6, 8 Hamzadere çeşidinde ait transformatantları Kulvar 7 Hamzadere çeşidinde ait transgenik negatif bitkisi, Kulvar 9 -13 Osmancık çeşidinde ait ana transformatantları, kulvar 14: negatif kontrol (transgenik olmayan çeltik bitkileri)

Çizelge 4.20 Çeltik Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitlerinde AoPR1) promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar bakteri hattıyla tohum muamelesiyle elde edilen bitkilerinde Npt II genin amplifikasyonu

Çeşit	Bakteri	Tohum sayısı (adet)	Bakteri ile muamele süresi (dk)	Kökültivasyon ortamı ve süresi	Kanamisin miktarı (mg/l)	Duocid pfizer miktarı (mg/l)	Canlı kalan bitki sayısı (adet)
Hamzadere	pTF101AoPR1AcBar	2600	45	MS-24 saat	350	500	92
Osmancık		2200	60	MS	250	500	32

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1 Değerlendirme

Türkiye’de çeltik tarımı 32 ilde yapılmaktadır. Yaşamı süresince çeltik bitkisi yabancı otlar ve farklı tip böceklerden zarar görmektedir ve ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün elde etmek için geleneksel ıslah yöntemleriyle beraber biyoteknolojik ıslah yöntemlerinin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Bu tez kapsamında ön uygulamaların bitki rejenerasyonundaki etkileri ve *Agrobacterium* aracılığıyla Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerine markör ile herbisitlere ve böceklere karşı dirençli genleri aktararak, transgenik bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçları farklı başlıklar altında tartışılmıştır.

Bitki Materyalinin Yüzey Sterilizasyonu

Bir eksplantın yüzey sterilizasyonu için en etkili ancak en düşük dezenfektan dozunun belirlenmesi gerekmektedir (Kyte 1987). Tohum yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilirse de ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) en yaygın kullanıma sahiptir (Özcan ve Özgen 1996).

Hamzadere ve Osmancık çeltik çeşitlerinin (50 adet tohum için) ayıklanmış bitki tohumunun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için ilk önce tohumları 2 dk etanol ile muamele edip, gerekli çamaşır suyu konsantrasyon dozlarının (%10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, ve 100’lük dozları) ve 15 dk. sterilizasyon süresinin farklı etki olup, olmadığını belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır ve çeltik çeşitlerin yüzey sterilizasyonu için en uygun çamaşır suyu dozu belirlenmiştir.

Bulaşıklık oranı bakımından Hamzadere ve Osmancık çeşidinde % 10, 15, 20, 25, 30, 40 oranları hariç tüm muamelelerde hiç bulaşıklık görülmemiştir. Kullanılan tüm çamaşır suyu dozlarında bulaşıklık olmayan en düşük doz %50 çamaşır suyunda 15 dk olarak

belirlenmiştir. Dolayısıyla bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalarda çamaşır suyunun bu oranı tercih edilmiştir.

Ayrıca, bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda ayıklanmamış çeltik tohumlarından yüzey sterilizasyonu sağlanamamıştır. Khawar (2001) mercimek tohumların yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarımın alınacağı en düşük dezenfektan dozu (50 adet tohum için) belirlemeye çalışılmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun (Axiom) %50, %75, %100 lük dozları tohumlara oda sıcaklığında herbiri 4 farklı sürede (15 dakika, 20 dakika, 25 dakika, 30 dakika) uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5 kez durulanmıştır.

Akpınar (2006). Deney grubu bitkilerini elde etmek için tohumlardan çıkartılan olgun embriyolar kullanılmıştır. Bu amaçla tohumlara yüzey sterilizasyonu (2 dakika %70 alkolde, 2 dakika steril destile suda, 2 dakika %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde, ikişer defa 2 dakika süreyle steril destile suda bekletilmiştir) işlemi uygulanmıştır. Alkuş (2007)Yüzey sterilizasyonu için Beyşehir-98, Karatay-94, Kırıl-97 ve Konevi-98 arpa çeşitlerine ait tohumlar ilk olarak %70 etanolde 1 dakika bekletikten sonra sırasıyla steril distile suda 1 dakika, %10 sodyum hipoklorit (NaOCI)'te 5 dakika tutulmuştur. Tohumlar son olarak steril distile su ile 10 kez 1'er dakika yıkanmıştır.

Doku Kültürü Çalışmaları

Doku kültürü çalışmalarında ön muameleler ile eksplant tipinin rejenerasyona büyük oranda etkileri izlenmiştir. Rejenerasyon açısından tohum ve mezokotil en iyi eksplant olarak tespit edilmiştir. Kolriza ve kotiledon düğümü rejenerasyon açısından çok olumlu sonuç vermeyerek yetersiz kalmışlardır. Natalini ve Cavallini (1987) Bezelye ile yapılan bir çalışmada, sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi, genotip ve ortamında bulunan büyümeyi düzenleyicileri olduğu belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre farklı süre ve farklı hormonlarla yapılan on muamele ve rejenerasyon çalışmalarında eksplant tipi, hormon muamelesinin etkilerine rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlara daha önce yapılmış çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Tyagi vd. (1999), Khan, vd. (1999), Hint pirincinde, olgun embriyolardan kallus oluşumunu

başlatarak bitkiyi rejenere edebilmek için 2,4 D'nin tek başına farklı miktarlarda kullanılması veya buna benziladeninin farklı miktarlarda eklenerek kullanılması gerektiğini açıklamışlardır. Çalışmada embriyo kültürü ortamı olarak MS besiyerine 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA katılmıştır. Ahsan vd. (2004) Mısırın (*Zea mays* L.) doku kültürü ve kültürde yetiştirilmesi konusunda da araştırmalar yapmışlar. Mısırın zayıf hücre sıralarının geliştirilmesi, daha etkili bir biçimde çoğaltılması ve fazla miktarda ürün veren hibritlerin yetiştirilmesi, doku kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Rashid vd., (2004), yine pirinç bitkisinde kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4 D içeren N6 besiyerinde başarılı olduğunu, kallus indüksiyonunun N6 besiyerinde %83.3 ve MS besiyerinde %75.05 olduğunu açıklamışlardır.

Uçar ve Turgut (2009) Bazı Dağ Çayı tohum çimlendirme denemeleri için, MS ortamına miliporfilitreden geçirilen GA₃'ün farklı konsantrasyonları ilave edilerek MS0 (0 hormon seviyesi), MS1 (5mg/l GA₃), MS2 (10mg/l GA₃) ve MS3 (15mg/l GA₃) olmak üzere 4 farklı ortam oluşturulmuştur.

Khan vd. (1999), Hint pirincinde, olgun embriyolardan kallus oluşumunu başlatarak bitkiyi rejenere edebilmek için 2,4 D'nin tek başına farklı miktarlarda kullanılması veya buna benziladeninin farklı miktarlarda eklenerek kullanılması gerektiğini açıklamışlardır. Çalışmada embriyo kültürü ortamı olarak MS besiyerine 0.5 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA katılmıştır. Ahsan vd. (2000) Mısırın (*Zea mays* L.) doku kültürü ve kültürde yetiştirilmesi konusunda da araştırmalar yapmışlardır. Mısırın zayıf hücre sıralarının geliştirilmesi, daha etkili bir biçimde çoğaltılması ve fazla miktarda ürün veren hibritlerin yetiştirilmesi, doku kültürü ile başarılıdır.

Rashid vd. (2004), yine pirinç bitkisinde kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4 D içeren N6 besiyerinde başarılı olduğunu, kallus indüksiyonunun N6 besiyerinde %83.3 ve MS besiyerinde %75.05 olduğunu açıklamışlardır. Uçar ve Turgut (2009) Bazı Dağ Çayı tohum çimlendirme denemeleri için, MS ortamına miliporfilitreden geçirilen GA₃'ün farklı konsantrasyonları ilave edilerek MS0 (0 hormon seviyesi), MS1 (5mg/l GA₃), MS2 (10mg/l GA₃) ve MS3 (15mg/l GA₃) olmak üzere 4 farklı ortam oluşturulmuştur.

Gen Aktarım Çalışmaları

Çeltik bitkisinin Hamzadere ve Osmancık 97 çeşitleriyle yapılan çalışmada farklı *Agrobacterium* streylerini transformasyon frekans üzerinde farklı şekilde etkilediği görülmüştür. Hem rejenerasyon hemde genetik transformasyonu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi, genotip ve kullanılan *Agrobacterium* hattı olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde daha önce yapılmış çalışmalarda Thi Loc vd. (2002) Elit pirinç (*Oryza sativa*) çeşitlerine Cry1Ac Bt toksini (*Bacillus thuringiensis* δ -endotoksini) ve kardelen lektin kodlayan genler ile (GNA *Galanthus nivalis* agglutinin) bir transformasyon çalışması yapılmıştır ve zararlılara karşı koruma sağlanmış, ancak bu dirençlilik tek gen taşıyan bitkiler ile kıyaslandığında göze çarpan koruma görülmemiştir. Chen vd. (2004) bir çalışmada Cre/lox enzim aracılığıyla gen keserek ticari çeltik bitkilerine aktarmıştır. Rekombinat reporter gen sistemi de geliştirilmiştir. Bunlarda selksiyon için 2 adet lox bölgelerinin içerisinde rice actin 1 promoter ve promotörsüz gus Agen kullanılmıştır. Breitler vd. (2004), striped stem borer (SSB) (*Chilo suppressalis*) zararları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre cry1B (A64.1, A33.1, A3.4 and S98.9 hatlarında) veya cry1Aa (S05.1 and A19.14 hatlarında) ubi1 promotör tarafından kontrol edilen genlerin varlığı ile kök, yaprak ve tohum dokularında kalıcı böcek öldürücü proteinin oluşturduğunu tespit edilmişlerdir. Ramesh vd. (2004b) yaptığı bir çalışmada Indica çeltik çeşitlerinin *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonun çok zor olduğunu vurgulamışlardır. Bir çalışmada karnabahar mozaik virüsü 35S tarafından kontrol edilen herbisid direnç geni bar ile birlikte pirinç sakroz sentaz promoteri tarafından kontrol edilen *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin sentetik Cry1Ab ve darı ubikutin promotörü tarafından tahrik edilen cry1Ac genleri ve kardelen Lektin geni GNA içeren pSB111 süper ikili vektörler kullanarak böcek zararlılarına, duyarlı çeşitli indica pirinç hatları geliştirmiştir. Daha sonra elde edilen sonuçlara göre 3 adet bitki transgenik bitkide öz suyu emici kök kurduna karşı dirençlilik tespit edilmiştir.

Bashir vd. (2005) bir denemede cry1Ac ve cry2A Bt geni taşıyan transgenik Indica tipi basmati çeltiğin tarla denemeleri hakkında bilgi vermiştir. Bu çalışmada pirinçte glifosat direncini kazandıran geliştirilmiş spor transgenik etkisini aşırı ekspresyonu gösteren, bir yerel 5-enolpyruvoylshikimate-3-fosfat sentaz (EPSPS) geni incelenmiştir. Chandrasekhar vd. (2014) çalışmalarında küresel olarak, yabancı ot ve sap-emici böceklere karşı IR-64 pirinç çeşidine mutasyona uğramış pirinç 5-enolpyruvilshikimate-3-fosfat sentaz (Os-mEPSPS) geni ve sarımsak yaprağı lektin (*Allium sativum* yaprağı aglutinin, ASAL) geni aktarılmıştır. Elde edilen bitkileri PCR, Southern blot analizi, genom ve genom walking analizi ile transformasyonları kalıcı entegrasyonu ile tespit edilmiştir. Transgenik hatlarda moleküler analizi glifosat ve kahverengi bitki zararlısına karşı direnç kazandığı tespit edilmiştir. Bu senaryoda, bu çalışmada üretilen transgenik pirinç çeşitleri glifosat ve özsuyu emici böcek zararlılarına karşı dayanıklı pirinç geliştirilmiş ve yeni bir genetik kaynak olarak kullanılmaktadır.

Chhapekar vd. (2015) bir çalışmada Indica tipi pirinç çeşidi IR64'ün genetik transformasyon için *Agrobacterium* aracılı *Petunia hybrida*'dan gelen N-terminal kloroplast hedefleme peptid bir kodon optimize edilmiş CP4 EPSPS-(5-enolpiruvilshikimate-3-fosfat sentaz) geni ile transformasyon çalışmaları yapılmıştır. Kontrol bitkilerine göre, transgenik bitkilerde EPSPS enzim aktivitenin daha yüksek miktarda oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada geliştirilmiş transgenik bitkiler yabancı ot tehlikesinin üstesinden gelmek için etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

5.2 Öneriler

- i. Türkiye'de çeltik bitkisi üzerinde doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları hemen hemen bulunmamaktadır. Bu çalışmada çeltik bitkisine ait iki tescilli çeşit Hamzadere ve Osmancik 97 kullanılmıştır.
- ii. Tohum steril etmeden önce çeltik tohumlarının ayıklanması yüzey sterilizasyonuna olumlu etkiler göstermiştir. Ayıklanmamış tohumların sterilizasyonunda sorunlar görülmüştür.

- iii. Bu tez kapsamında kullanılan çeşitlere ait tohumların ön muamele sonucu çeltik bitki çeşitlerinde rejenerasyon üzerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir.
- iv. Genel anlamda, mezokotil, kolriza, kotiledon düğümü ve tohum eksplant olarak kullanılmıştır. Rejenerasyon açısından en başarılı sonuçlar tohum ve mezokotil eksplantlarından elde edilmiştir. Kotiledon düğümünden az sayıda ve kolriza eksplantından hiç rejenerasyon gözlenmemiştir ve kotiledon düğümünden elde edilen sonuçlar yetersiz kalmıştır.
- v. Elde edilen sonuçları 16 saat Işık ve 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında yapılan denemlerinde elde edilmiştir. Fotoperiyot koşulları değiştirilince bitki rejenerasyonu üzerinde olumlu veya olumsuz etkilerinin olacağı beklenmektedir.
- vi. Çeltik bitkisinin iki çeşidinde yapılan çalışmalar sonucu NAA, 2iP ön muamelleri bitki rejenerasyonuna olumlu katkılar sağladığı belirlenmiştir. Ancak, rejenerasyon çalışmalarında her iki çeşide ait eksplantlardan farklı rejenerasyon sonuçları oluşmuştur. Yapılan tüm çalışmalarla sürgün rejenerasyonu açısından ortamlar arasında belirgin farklılar görülmüştür. Çeltik bitkisinde rejenerasyon zordur ve hormon ön uygulamaları bitki reseptörü ile koordine olarak bitki morfolojisi ve bitki kompozisyonunu etkilemektedir.
- vii. Öldürücü dozu₁₀₀ – letal dozu₁₀₀ (LD₁₀₀) Kanamisin dozunu belirlenmiştir.
- viii. Kanamisine karşı LD₁₀₀ dozu 15 gün sonra canlı kalmayan/ albinolaşmış bitkileri sayarak çalışma başlamadan önce ortamında kültüre alınmış tohumların sayısı ile kıyaslayarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Hamzadere çeşidine ait tohumları 350 mg/l kanamisin ve Osmancık çeşidine ait bitkilerin seleksiyonu için 250 mg/l kanamisin miktarı seleksiyon için uygun görülmüştür.
- ix. Seleksiyon ortamında gelişen A281, pRGG 15834, LBA4404 ve AoPR1 hatlarına ait bitkilerin histo kimyasal analizi ve pcr yapılmıştır. PCR analizi

sonucunda rastgele seçilmiş örneklerde 8 adet bitkide olumlu sonuç gözlenmiştir.

- x. Yapılan bu tez çalışması sonucunda 2 adet çeltik çeşidinde, tohum eksplantı kullanarak transgenik bitki elde edilmiştir. Bundan sonra, Türkiye’de yapılan çeltik ile ilgili biyoteknolojik çalışmalarda elde edilen sonuçlara bağlı olarak başka hormonlarla rejenerasyon çalışmalarının yapılması ile yeni boyutlar kazanacaktır. Transgenik çalışmalarında farklı biyotik ve abiyotik streslere karşı dirençliliğin kazandırılması büyük bir önem arz etmektedir.
- xi. Bu uygulamaların (doku kültürü ve genetik transformasyon) çeltik bitki gelişmelerinde önemli etkileri/katkıları olduğu tespit edilmiştir. Mevcut gözlemler hem ilk ve yenidir hem de çeltik sürgün rejenerasyon davranışları ve çeltiğin genetik transformasyonu üzerinde önemli etkiler göstermektedir. Türkiye’de çeltik biyoteknolojisi açısından doku kültürü ve genetik transformasyon çalışmaları bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Aalders, K.E.O. 1958. Monoploidy in cucumbers. *Journal of Heredity*, 49: 41-44.
- Adamczewski, K. and Matysiak, K. 2012. The mechanism of resistance to ALS-inhibiting herbicides in biotypes of wind bent grass (*Apera spica-venti* L.) with cross and multiple resistance. *Polish Journal of Agronomy*, 10; 3–8.
- Ahsan, M., Mehdi, S.S. and Khaliq, I., 2000 “Tissue Culture and Breeding of Maize (*Zea mays*) a Review” *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3 (11); 1885-1888.
- Akçam, O., E., Demiray, H. Yardım, D., 2006. Bor Fazlalığının Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.cv. Sambro No.5) Bitkisinin İn Vitro koşullarda Kök Gelişimi ve Anatomisi Üzerine Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(2);145-152.
- Akpınar G. 2006. Embriyonik kültür yöntemiyle yetiştirilen ve soğukta muhafaza edilen ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkilerinde karyolojik ve anatomik incelemeler. Yüksek Lisans Tezi Biyoloji Ana Bilim Dalı. 77. Edirne.
- Aktürk, Z. 2009. Kırazı (*Prunus avium* L.) *in vitro* mikroçoğaltımı. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı 190. Diyarbakır.
- Alkuş, A. 2007. Bazı Türk Arpa Çeşitlerinin Alüminyuma Karşı Olan Toleranslarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 56. Kahramanmaraş.
- Anonim, 2015a. <http://www.diyadinnet.com/YararliBilgiler-167&Bilgi=tar%C4%B1m-ve-beslenme-sorunu> (Erişim 4.11.2015).
- Anonim, 2015b. <http://www.diyadinnet.com/YararliBilgiler-167&Bilgi=tar%C4%B1m-ve-beslenme-sorunu> (Erişim 4.11.2015)
- Anonim, 2015c. <http://tr.millermagazine.com/?p=66> (Erişim 4.11.2015)
- Anonim, 2015d. <http://www.weedscience.com>. (Erişim 4.11.2015).
- Anonim, 2015e. <http://www.tarlasera.com/ttae-yeni-celtik-cesitleri-gelistirmeye-devam-ediyor/> erişim: 30.08.2015.
- Anonim, 2015f. <http://www.diyadinnet.com/YararliBilgiler-167&Bilgi=tar%C4%B1m-ve-beslenme-sorunu> (Erişim 4.11.2015)

- Anonim, 2015g. http://tosya.bel.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=142&Itemid=139
- Anonim, 2015h. <http://www.haberler.com/hanonu-nde-celtik-ekimi-basladi-5991232-haberi/> (Erişim 6.11.2015).
- Anonim, 2015i. <http://weedscience.org> (Erişim 4.11.2015)
- Anonim, 2015j. http://www.mefastarim.com.tr/tr/images/Icerik/rice_field4_20120127_224900.JPG (Erişim 5.11.2005).
- Anonim, 2015k değiştirerek https://www.google.com.tr/search?q=t%C3%BCrkiye&espv=2&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIkVod4ODfyAIVCo0sCh3vnQ1M#tbm=isch&q=turkey+map&imgcr=nRGZE34bZ18cRM%3A (Erişim 11.04. 2015).
- Anonim, 2015l. http://tosya.bel.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=142&Itemid=139
- Anonim, 2015m. <http://www.haberler.com/hanonu-nde-celtik-ekimi-basladi-5991232-haberi/> (Erişim 6.11.2015)
- Anonim, 2015n. <http://www.weedscience.com>. (Erişim 4.11.2015)
- Anwar, M.P., Juraimi, A.S., Puteh, A., Selamat, A., Rahman, M.M. and Samedani, M. (2012b). Seed priming influences weed competitiveness and productivity of aerobic rice. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 62,499-509.
- Aydin, M., Sağsöz, S., Haliloğlu, K. ve Tosun, M. 2011. Buğdayda Olgun Embriyo Kültürünü Etkileyen Faktörle Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi. *Dergisi*. 42 (1); 1-10, 2011 Journal of Agricultural Faculty of Atatürk University, 42 (1); 1-10.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2002: 2-167.
- Baktemur, G. 2009. Kavunda (*Cucumis melo* var. *inodorus*) ışınlanmış polenle uyarılmış haploid embriyoların ayrılmasında kullanılacak farklı yöntemler. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. 75. Adana.
- Bashir, K., Husnain, T., Fatima, T. Riaz, N. Makhdoom, R. and Riazuddin, S. 2005. Novel indica basmati line (B-370) expressing two unrelated genes of *Bacillus thuringiensis* is highly resistant to two lepidopteran insects in the field. *Crop Protection*, 24,10; 870-879.

- Bouamama, B., Salem, A.B., Youssef, F.B., Chaieb, S., Jaafoura, M.H., Mliki, A. and Ghorbel, A. 2011. Somatic Embryogenesis And Organogenesis From Mature Caryopses Of North African Barley Accession “Kerkenen” (*Hordeum vulgare* L.), *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 4, 321–327.
- Breitler, J.C., Vassal, J.M., Del M.C., Meynard, D., Marfa, V., Melé, E., Royer, M., Murillo, I., San Segundo, Guiderdoni B. and Messeguer E. 2004. Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter; Protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 2, (5); 417-430.
- Bürün, B. and Poyrazoğlu, E. 2002. “Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.)” *Turkish Journal of Biology*, 26;175-180.
- Chandrasekhar, K., Reddy, G.M., Singh, J., Vani, K., Vijayalakshmi, M., Kaul, T. and Reddy, M.K. 2014. Development of Transgenic Rice Harbouring Mutated Rice 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase (Os-mEPSPS) and *Allium sativum* Leaf Agglutinin (ASAL) Genes Conferring Tolerance to Herbicides and Sap-Sucking Insects. *Plant Molecular Biology Reporter*. 32,(6); 1146-1157
- Chee, R. and Pool, R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae*, 32,85-95.
- Chen, H., Tang, W., Xu, C., Li, X., Lin, Y. and Zhang, Q. 2005. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic cry2A* gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theoretical Applied Genetics*. 111; 1330–1337.
- Chen, S.B., Liu, X., Peng, H.Y., Gong, W.K., Wang, R., Wang, F. and Zhu, Z. 2004. Cre/lox-mediated marker gene excision in elite Indica rice plants transformed with genes conferring resistance to lepidopteran insects. *Acta Botanica Sinica*. 46,(12);1416-1423.
- Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H. ve Altosaar I. 1998. Applied Biological Sciences *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* Vol. 95, pp. 2767–2772.
- Chhapekar, S.A., Raghavendrarao, S.A., Pavan, G.A., Ramakrishna, C.A., Singh, V.K.A., Phanindra, M.L.V.A., Dhandapani, G.A., Sreevathsa, R.A. and Ananda Kumar, P. 2015. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate. *Plant Cell Reports*, 34(5);721-31. doi; 10.1007/s00299-014-1732-2.

- Christou, P., Ford, T.L. and Kofron, M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos Nature Biotechnology, 9(10); 957-962.
- Çapan, S. 2006. Cucurbita pepo l. (kabak) bitkisi embriyo kültürlerinde kromozom sayısı ve mitoz aktivitesinin incelenmesi Yüksek Lisans Tezi T. C. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71. Edirne.
- Damalas, C.A., Georgiou, E.B., and Theodorou, M.G. 2006. Pesticide use and safety practices among Greek tobacco farmers; a survey. Int Journal of Environmental Health & Research,. 16(5); 339–348.
- Datta, S.K., Chandel, G., Tu, J., Baisakh, N. and Datta, K. 2003. Engineering of Bt Transgenic Rice for Insect Pest Protection. Journal of New Seeds, 5, 2-3; 77-91.7.
- Datta, S.K., Datta, K., Soltanifar, N., Donn, G. and Potrykus, I., 1992. Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts.. Plant Molecular Biology, 20,(4);619-629.
- De Maagd, R.A., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W. and Bosch, D. 2000. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specific determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. Applied Environmental Microbiology, 66;1559–1563.
- Deng, L.H., Weng, L.S. and Xiao, G.Y. 2014. Optimization of Epsps gene and development of double herbicide tolerant transgenic PGMS rice Journal of Agricultural Science and Technology. 16,(1); 217-228.
- Erdağ, B. and Yürekli, K. 2000. “Thymus sipyleus Boiss. (Lamiaceae)’un İn Vitro Çoğaltılması” Turkish Journal of Biology, . 24; 81-86.
- Eser, D. ve Geçit, H.H. 2011. Ekoloji (Düzeltilmiş 2. Baskı). Yayın No. 1584. Ders kitabı No. 536. Ankara Üniversitesi Yayın evi.
- Espinoza, A.M., Sittenfeld, A. and Salazar, S. 2003 Developing transgenic rice at the university of Costa Rica; Perspectives and considerations for managing intellectual property rights. Interciencia. 28 , (2); 111-117.
- FAO. 2015. FAO.org.

- Galon, L., Panozzo L.E., Noldin, J.A., Concenço, G., Tarouco, C.P., Ferreira, E.A., Agostinetto, D., Silva, A.A., and F.A. Ferreira. 2008. Herbicide resistance of *Cyperus difformis* to ALS-inhibitors in paddy rice of Santa Catarina. *Planta Daninha*. 26,419-427.
- Ganeshan, S., Baga, M., Harvey, B. L., Rossnagel, B. G., Scoles, G. J. and Chibbar, R. N., 2003. Production Of Multiple Shoots From Thidiazuron-Treated Mature Embryos And LeafBase / Apical Meristems Of Barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 57-64.
- Gatehouse, A.M.R., Davison, G.M., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Burgess, E.P.J., Gilbert, R.J.C. and Gatehouse, J.A., 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *lacanobia oleracea*; growth room trials. *Molecular Breeding*, 3, 163-173.
- Geçit H.H., Çiftçi C.Y., İkincikarakaya Ünver ,S., Kaya, M. 2015. Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Uygulama Kılavuzu Yayın No.1588 ders kitabı No. 540. Düzeltilmiş 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Yayın evi.
- Gnanamanickam, S.S. 2009. Biological control of bacterial blight of rice, In *Biological control of rice diseases*. Springer pp. 67-78.
- Gomez, M.S. ve Kalamani, A. 2002. "Variability Analysis of Traits Related to Callus Growth and Plant Regeneration in Drought Resistant Local Land Races of Rice (*Oryza sativa*)" *Asian Journal of Plant Sciences*, 1(5); 583-584.
- Gonzalez, JM., Frierio, E. ve Jouve, N. 2001. "Influence of Genotype and Culture Medium on Callus Formation and Plant Regeneration From Immature Embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars", *Plant Breeding*. 120 ,(6); 513.
- Graham, R.J., Pratley, J.E., Slater, P.D. and Baines, P.R. 1996. Herbicide resistant aquatic weeds, a problem in New South Wales rice crops. In; *Proc. 11th Australian Weeds Conference*. Melbourne, Australia. pp. 156-158.
- Gül, U. 2003. Piriç, Bakış, Tarımsal Ekonomik Araştırma Enstitüsü Yayınları, Sayı; 3, Nüsha; 15, Ankara.
- Hoseney, R. C. 1994. Starch; Gelling and retrogradation. In *Principles of cereal science and technology*, 2nd edition, pp. 48–52. American Association of Cereal Chemists International, St Paul, USA.
- Işık, D. ve Mennan, H., 2001. "Çeltikte Darıcan (*Echinochloa Crus-Galli* (L.) P.Beauv), Kurbağa Kaşığı (*Alisma Plantago Aquatica* L.) Ve Sandalye Sazının (*Scirpus Mucranatus* Pollich) Rekabet Yeteneklerinin Araştırılması", *Türkiye Herboloji Dergisi*, cilt.4, ss.47-57.

- Işık, D., Mennan, H. ve Ecevit, O., 2000. "Samsun İli Çeltik Ekim Alanlarında Görülen Yabancı Ot Türlerinin Belirlenmesi. ", Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15; 99-104.
- Jefferson, R.A., Klass, M., Wolf, N. and Hirsh, D. Expression of chimeric genes in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Molecular Biology,. 1987 Jan 5;193(1);41-46
- Juraimi, A.S., Ahmad-Hamdani, M.S., Anuar, A.R., Azmi, M., Anwar, M.P. and Uddin, M.K. 2012. Effect of water regimes on germination of weed seeds in a Malaysian rice field. Australian Journal of Crop Science. 6 (4); 598-605.
- Khan, Z. I., Hussain, A. and Sadiq, M. 1999 "Optimization of Different Media for Plant Regeneration From Callus Culture of Indica Rice (*Oryza sativa*) genotype D.M. 25" Pakistan Journal of Biological Sciences. 2(3); 984-987.
- Khawar, K.M., 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik)'te doku kültürü çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 147. Ankara.
- Koca, A.F. ve Anıl, M. 2001. Çeltikte Kalite Özellikleri ve Değerlendirilmesi. O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. 103-108., 16, 1.
- Korkut, İ. ve Kasa, M. 1981. Karadeniz Bölgesi'nde soğanlarda (*Allium cepa* L.) zararlı olan yabancıotlar ve bunlarla savaşım olanakları üzerinde ön çalış malar. Zir. Müc, Araş. Yıl!., (16), 166.
- Kuk, Y.I., Kim, K.H., Kwon, O.D., Lee, D.J., Burgos, N.R., Jung, S. and Guh, J.O. 2004. Cross-resistance pattern and alternative herbicides for *Cyperus difformis* resistant to sulfonyleurea herbicides in Korea. Pest Management Sciences, 60;85-94.
- Kumlay, AM. ve Dursun, A. 2003. Bitki Genetik Mühendisliği ve Ekonomik Öneme Sahip Bazı Bitkilerde Genetik Mühendisliği Uygulamaları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34 (2), 209-216.
- Kurt, V. 2013. Monokültür ve polikültür tarım uygulamalarının *Oryza sativa* L. (çeltik) bitkisinin gelişimine olan etkilerinin incelenmesi. yüksek lisans tezi biyoloji ana bilim dalı. T.C. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 64. Edirne.
- Li, P., Pei, Y., Sang, X., Ling, Y., Yang, Z. and He, G. 2009. Transgenic indica rice expressing a bitter melon (*Momordica charantia*) class I chitinase gene (McCHIT1) confers enhanced resistance to *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology, 125(4); 533-543.

- Li, Z., Upadhyaya, N.M., Meena, S., Gibbs, A.J. and Waterhouse, P.M. 1997. Comparison of promoters and selectable marker genes for use in Indica rice transformation. *Molecular Breeding*, 3(1);1-14.
- Lu, Y.L., Burgos, N.R., Wang, W.X. and Yu, L.Q. 2014. Transgene Flow from Glufosinate-Resistant Rice to Improved and Weedy Rice in China. *Rice Science*. 21 (5); 271-281
- Marfa, V., Mele, E., Vassal, J.M. and Messeguer, J. 2002. *In vitro* insect-feeding bioassay to determine the resistance of transgenic rice plants transformed with insect resistance genes against striped stem borer (*Chilo suppressalis*). *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38, (4); 310-315.
- Moody, K. 1991. Weed control in upland rice with emphasis on grassy weeds. In *Tropical grass weeds* Baker, F.W.G. and Terry, P.J. Eds. pp. 164-178. CAB Intl., Wallingford, UK .
- Moody, K. and Cordova, V.G. (1985) Wet-seeded Rice. In *Women in rice farming*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, p. 467-480.
- Moody, K. 1989. Weeds Reported in Rice in South and Southeast Asia. International Rice Research Institute.
- Moorthy, B.T.S., Manna, G.B. 1993. Studies on weed control in direct seeded upland rainfed rice. *Indian Journal of Agricultural Research*, 27;175- 180.
- Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S. and Maagd, R.A. 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Applied Environmental Microbiology*, 67; 5328-5330.
- Najib, M.Y.M., Juraimi, A.S., Anua, A.R., Azmi, M. and Shamsuddin, Z. 2006. Critical period of weed competition in direct-seeded rice under minimal water condition. *Agriculture Congress*. pp 65-66.
- Natalini, L. ve Cavallini, A. 1987. "Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plantlets by *in vitro* culture of immature embryos" *Plant Breeding*, 99; 172-176.
- Norsworthy, J.K., Bond, J. and Scott, R.C., 2013. Weed management practices and needs in Arkansas and Mississippi rice. *Weed Technology*, 27; 623-630.
- Okoli, C., Shilling, D.G., Smith, R.L. and Bewick, T.A. 1997. Genetic diversity in purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.). *Biological Control*, 8;111-118.

- Osborne, B. and Mycotoxins, G. 1992. and the cereals industry. *Journal of Food Technology*, 17; 1-9.
- Osuna, M.D., Vidotto, F., Fischer, A.J., Bayer, D.E., Prado, De, and Ferrero R., A. 2002. Cross resistance to bispyribac–sodium and bensulfuron-methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 73;9–17.
- Pacanoski, Z. and Glatkova, G. 2009. The use of herbicides for weed control in direct wet seeded rice in rice production region in the Republic of Macedonia. *Plant Protection Science*, 45 (3); 113-118.
- Pedroso, R.M., Boddy, L.G., and Fischer, A. 2013. Propanil resistance in smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis* L.); a new challenge to rice growers in California. <http://wssaabstracts.com/public/17/acreabstract-11.html>. Accessed. 4.11.2015.
- Price, J.N., Wright, B.R., Gross, C.L. and Wal R.D.B., 2010. Comparison of seedling emergence and seed extraction techniques for estimating the composition of soil seed banks. *Methods in Ecology and Evolution*, 1; 151–157.
- Ramesh, S., Nagadhara, D., Reddy, V.D. and Rao, K.V. 2004b. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of tumefaciens *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*. 166, Issue 4, April 2004, Pages 1077-1085.
- Ramesh, S., Nagadhara, D., Pasalu, I.C., Kumari, A.P., Sarma, N.P., Reddy, V.D. and Rao, K.V. 2004a. Development of stem borer resistant transgenic parental lines involved in the production of hybrid rice. *Journal of Biotechnology*, 111(2); 131-141.
- Rashid, H., Saleem, M., Chaudhry, Z., Gilani, T.S. and Qureshi, A.S. 2004. “Studies on Developing a High Regeneration From Seed Derived Calli of Rice (*Oryza sativa* L.) C.v. Super Basmati” *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2); 273-276.
- Rice, E.L. 1995. *Biological Control of Weeds and Plant Diseases ; Advances in Applied Allelopathy*. University of Oklahoma Press .
- Rubluo, A., Kartha, K. K., Mroginiski, L. A. and Dyck, J. 1984. Plant regeneration from pea leaflets cultured *in vitro* and genetic stability of regenerants. *J. Plant Physiol.*, 117; 119-130.

- Sade, B., Soylu, S., Sezer, D., Başer, N., Srek, H., şahin, M. ve Yetiş, AT. 2011. Ulusal hububat konseyđ eltđk raporu. http://www.pdd.org.tr/libs/filemanager/28_11_2011_ELT_K_ULUSAL_HUBUBAT_KONSEY_RAPORU.pdf (Ulaşım 26.08.2015)
- Sadumpati, V., Kalambur, M., Vudem, D.R., Kirti, P.B. and Khareedu, V.R. 2013. Transgenic indica rice lines, expressing Brassica juncea Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (BjNPR1), exhibit enhanced resistance to major pathogens. *Journal of Biotechnology*, 166(3); 114-121.
- Sauer, J. 1993. *Historical Geography of Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Serhantova, V., Ehrenbergerova, J. and Ohnoutkova, L. 2004. Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech republic. *Plant Soil Environment*, 50; 456-462.
- Smith, R.J. Jr. 1988. Weed thresholds in Southern US; rice (*Oryza sativa*) *Weed Technol.* 2; 232-241.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G. 1967. *Statistical methods*. Iowa state University Press, Iowa, Ames
- Stober, A. and Hess, D. 1997. Spike Pretreatments, Anther Culture Conditions, and Anther Culture Response Of 17 German Varieties Of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*, 116; 443-447.
- Sun, Z., Zhao, C., Zheng, K., Qi, X. and Fu, Y. 1983. Somaclonal genetics of rice *Oryza sativa* L. *Theoretical Applied Genetics*, 67; 67-73.
- şehirali, S. ve zgen, M. 1987. *Bitki genetik kaynakları*. Ankara niv. Ziraat Fak. Yayınları No; 1020. Ders Kitabı; 294, Ankara.
- Sleper, D.A. and Poehlman, JM. 2006. *Breeding Field Crops*, 5th Edition. Wiley-Blackwell. NY. pp 424.
- Takaiwa, F., Takagi, H., Hirose, S. and Wakasa, Y. 2007. Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, .5; 84-92
- Taniguchi, Y., Kawata, M., Ando, I., Shimizu, T. and Ohshima, M. 2010. Selecting genetic transformants of indica and indica-derived rice cultivars using bispyribac sodium and a mutated ALS gene. 29 (11); 1287-1295.

- Taşlıgil, N. ve Şahin, G. 2011c. Türkiye’de Çeltik (*Oryza sativa* L.) Yetiştiriciliği ve Coğrafi Dağılımı. Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 6(4); 182 - 203
- Taşlıgil, N. ve Şahin , G. 2011a. türkiye’de çeltik (*Oryza sativa* L.) yetiştiriciliği ve coğrafi dağılımı. Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 4(6); 182-203.
- Taşlıgil, N., Şahin, G. 2011b. Türkiye’de çeltik (*Oryza sativa* L.) yetiştiriciliği ve coğrafi dağılımı Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 4 (6); 182-2006.
- Thi Loc, N., Tinjuangjun, P., Gatehouse, A.M.R., Christou, P. and Gatehouse, J.A. 2002. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding*, 9(4); 231-244.
- Tsunoda, S. and Takahashi, N. (Eds.)1984. *Biology of Rice*. Elsevier, Academic Press.
- Anonim, 2014. <http://www.tuik.gov.tr/Start.do;jsessionid=F2g1W5qfyTrQqkg2LhgVXkbnjy4GzJdj7FcGmL2qvVX4PyGyCWdS!787359118> (Erişim 4.11.2015)
- Anonim, 2008. İstatistik Göstergeler 1923 – 2007, Yayın No; 3206, Ankara.
- Tyagi, A.K., Mohanty, A., Bajaj, S., Chaudhury, A. and Maheshwari, S.C. 1999. Transgenic rice; A valuable monocot system for crop improvement and gene research *Critical Reviews in Biotechnology*, 19(1);41-79.
- Uçar, E. and Turgut, K. 2009. Bazı Dağ Çayı (*Sideritis*) türlerinin in vitro çoğaltımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 22(1), 51–57 51
- Wang, W., Xia, H., Yang, X., Xu, T., Si, H.J., Cai, X.X., Wang, F., Su, J., Snow, A.A. and Lu, B.R. 2014. A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase transgene for glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice (*Oryza sativa*) without herbicide. *New Phytologist* .202, 2. 679-688.
- Weng, L.a., Deng, L.A., Lai, F.b., Xiao, G. 2014. Optimization of the Cry2Aa gene and development of insect-resistant and herbicide-tolerant photoperiod-sensitive genic male sterile rice. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 50(1); 19-25
- XIAO, G.Y. 2009. Recent Advances in Development of Herbicide Resistant Transgenic Hybrid Rice in China. *Rice Science*, 16 (3); 235-239

- Yarasi, B., Sadumpati, V., Immani, C.P., Vudem, D.R. and Khareedu, V.R. 2008. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) exhibits high-level resistance against major sap-sucking pests. *BMC Plant Biology*. 8; Article number 102.
- Yüceer, SÜ. 2011. Patates böceği (*Leptinotarsa Decemlineata* Say.)'ne dayanıklı bitkiler elde etmek amacıyla patates (*Solanum tuberosum* L.)'ın genetik transformasyonu. Bitki Koruma Anabilim Dalı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Zhao, Q., Liu, M., Tan, M., Gao, J. and Shen, Z. 2014. Expression of Cry1Ab and Cry2Ab by a polycistronic transgene with a self-cleavage peptide in rice. *PLoS ONE* 9,(10), 15 Article number e110006.
- Zhou, Z.K., Roboards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. 2002. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37; 849-868.

ÖZGEÇMİŞ

Adı – Soyadı : Mahsa POURALI KAHRIZ
Doğum yeri : Iran, Azarbaijan Gharbi, Urmia,
Medeni Hali : Bekar
Yabancı dili : Türkçe, İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Derece	Üniversite /Bölüm/dal/Ana bilim dalı	Yıl
Lisans	: Azad Islami Üniversitesi Orumieh, Ziraat Fakültesi, Iran, Bitki Islah ve Agronomi	2006
Yuksek Lisans	: Ankara Üniversitesi, Ankara, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, Tarla Bitkileri	2009
Doktora	: Ankara Üniversitesi, Ankara, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, Tarla Bitkileri	2016

Yayınlar

SCI yayınlar

1. Pouralii **Kahriz, Mahsa**; Pourali Kahriz,P; Ozgen, A. Murat. 2012. Determination of physical band patterns to find genetic relationship by A-PAGE among 25 wheat cultivars. Eurobiotech Agriculture Symposium Location: Erciyes Univ, Kayseri, TURKEY Date: APR 12-14, 2012. Sponsor(s); European Biotechnol Themat Network Assoc. Journal of Biotechnology 161 (Supplement: S); 31-31 Published; NOV 2012(SCI dergi).
2. Ozdemir FA, Yildirim MU, **Pourali Kahriz M**, 2014 Efficient Micropropagation of Highly Economic, Medicinal and Ornamental Plant *Lallemantia iberica* (Bieb.) Fisch. and C. A. Mey. BioMed Research International, Article ID 476346, 5 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/476346> (SCI expanded dergi).

Ulusal Kongreler

1. Birsin MA, **Kahriz MP**, Özgen M, Açıkgöz E. 2012. Bazı fiğ türlerinde doku kültürü parametrelerine büyüme düzenleyicilerinin etkisi. 9. Tarla bitkileri kongresi. 12-15 eylül 2011. Bursa. Pp 1487-1492.
2. Kahriz Pourali P, **Kahriz Pourali M**, Özdemir FA, Yildirim MU, Khawar KM. 2015. Türkiye'nin önemli şeker pancarı Diamenta monogerm çeşidine çeşidine sülfürik asit, NaOCl ve PPM kullanarak tohum sterilizasyonu. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Çanaklae, Türkiye.
3. **Kahriz Pourali M**, Kahriz Pourali P, Yildirim MU, Özdemir FA, 2015. Türkiye'nin iki önemli çeltik çeşidine NaOCl'nın in vitro koşullarda tohum sterilizasyonu ve çimlenme üzerindeki etkileri. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Çanaklae, Türkiye.