

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ŞEKER PANCARI (*Beta vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *Agrobacterium*  
ARACILIĞIYLA HERBİSİTLERE KARŞI DİRENÇLİLİK GEN AKTARIM  
ÇALIŞMALARI

Parisa POURALI KAHRIZ

Tarla Bitkileri ANABİLİM DALI

ANKARA  
2016

Her hakkı saklıdır

## TEZ ONAYI

**Parisa Pourali Kahriz** tarafından hazırlanan “Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla herbisitlere karşı dirençlilik gen aktarım 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. Cemalettin Yaşar ÇİFTÇİ  
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

**Üye :** Prof. Dr. Cafer Sırrı SEVİMAY  
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

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

**Üye :** Prof. Dr. Ercüment Osman SARIHAN  
Uşak Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi,  
Tarla Bitkileri 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.

Parisa POURALPKHRIZ

## ÖZET

Doktora Tezi

### ŞEKER PANCARI (*Beta vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *Agrobacterium* ARACILIĞIYLA HERBİSİTLERE KARŞI DİRENÇLİLİK GEN AKTARIM ÇALIŞMALARI

Parisa POURALI KAHRIZ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Türkiye’de Şeker pancarı (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) iki yıllık bir endüstri bitkisidir. Şeker pancarı üretiminde başta yabancı otlarla beraber böcek zararları tarafından elde edilmektedir. Bu tezin amacı Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen şekerpancar EMU 8, SG3 poligerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine bu sorunlarına karşı bir çözüm bulabilmesi için rejenerasyon ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transgenik bitkileri üretim sistemin geliştirilmesi olmuştur. Farklı oranda BAP-IBA, BAP-NAA ve TDZ içeren MS ortamda her 3 şeker pancarı genotiplerin yaprak sapı eksplantından farklı oranda adventif sürgün rejenerasyon elde edilirken yaprak eksplanttan adventif sürgün rejenerasyon elde edilmemiştir. BAP-IBA, BAP-NAA ve TDZ içeren MS ortamda gelişen sürgünlerin kök rejenerasyon için 0.5 ve 1.00 mg/l NAA içeren MS ortamda kök oluşüm gözlenmiştir. Gen aktarım çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens*’nın onkogenik A281 hattıyla inokulasyon sonucunda bitkilerde beklenen tümör oluşum gözlenmezken gus pozitif bitkiler elde edilmiştir. Benzer bir şekilde *A. rhizogenes* ile inokulasyon yapılmış eksplantlarından gelişen bitkilerde de saçak kök oluşum gözlenmezken gus pozitif bitkiler elde edilmiştir. *A. tumefaciens*’nın GV2260::p 35 Gus INT (*uidA* veya *gus* marker geni taşıyan) hattıyla yapılan çalışmalarında farklı oranda gus pozitive bitki elde edilmiştir. Bunun gibi, *A. tumefaciens*’nın LBA 4004:: pRGGbar (herbistler karşı dirençli geni taşıyan) hattıyla inokulasyon sonucunda hem 2.0 ile 2.5 mg/l fosfinotrisin dirençli bitkiler hemde gus positive bitkiler elde edilmiştir. Aksine, LBA 4404::cry 1 Ac ile inokulasyon sonucunda fosfinotrisin dayanıklı bitkiler elde edilememiştir. İklim dolabında gelişen bu bitkiciklerden yaprak örnekleri alınarak PCR analizi yapılmıştır. PCR analizine göre şeker pancarının her 3 genotipte farklı bakteri ile yapılmış çalışmalarında bir kaç bitkinin transgenik olduğu belirlenmiştir.

**Şubat 2016, 120 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, ebeveyen, in vitro, rejenerasyon, Şeker pancarı, transformasyon, yüzey sterilizasyon.

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### *Agrobacterium* MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF SUGAR BEET (*Beta vulgaris* L.) AGAINST HERBICIDE RESISTANCE GENES

Parisa POURALI KAHRIZ

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

Supervisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Sugar beet (*Beta vulgaris* var. *Saccharifera* L. Chenopodiaceae (chenopodiaceae) family, genus *Beta*) is grown as two years winter and summer industrial crop in Turkey. Sugar beet face large damages through weeds and insect pests. The objective of this thesis was to solve these problems by using monogerm Diamenta cultivar and poligerm EMU8 and SG3 lines for adventitious shoot regeneration and genetic transformation. In vitro regeneration of leaf and petiole explants on MS medium containing different concentrations of BAP-IBA, BAP-NAA and TDZ, showed variable regeneration on petiole explant only. Rooting could be induced on shoots regenerated on MS medium containing BAP-IBA, BAP-NAA and TDZ. Inoculation with oncogenic Line A281 of *Agrobacterium tumefaciens* did not yield tumor induction but had variable number of gus positive plants. Similarly, inoculation with line 15834 of *A. rhizogenes* did not yield any hairy root but the plants expressed gus positive. Plants induced on explants transformed with line GV2260::p35 gus INT of *A. tumefaciens* (that carried uidA or gus marker gene) induced variable number of gus positive plants. Likewise, variable number of regenerated shoots on line LB 4004 :: pRGGbar of *A. tumefaciens* (that carried gene providing resistance against Phosphinothricin) inoculated explants showed resistance against 2.0 and 2.5 mg / l Phosphinothricin in the selection medium and were also GUS positive. Contrarily, explants inoculated with line LB 4404 :: cry 1 Ac did not show resistance against Phosphinothricin. PCR results from leaf samples of kanamycin and Phosphinothricin selected plants growing in growth chamber showed positive results for transgenicity for all three genotypes variably.

**February 2016, 120 pages**

**Key Words:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *in vitro*, parent lines, regeneration, sugarbeet, surface sterilization, transformation.

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Türkiye’de bugüne kadar şeker pancarı bitkisinde çok az sayıda doku kültürü ve gen aktarma çalışmaları yapılmış olup, çok sınırlı miktarda literatür bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı başlıca şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına bir adventif sürgün rejenerasyonu sistemi geliştirilmeye yönelik *Agrobacterium* aracılığıyla transgenik şeker pancarı bitkileri elde etmeye yöneliktir. Şeker pancarı bitkisinde elde edilen bu sonuçların gelecekte temel bilgi kaynağı olarak kullanılacağını ve bilime katkı sağlayacağını düşünmekteyim.

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 manevi ve fikiri desteklerini esirgemeyen danışman hocam ile bölümümüzün ders aldığım yüksek lisans ve Dotor 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.

Parisa POURALI KAHRIZ

Ankara, Şubat 2016

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
1 GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ .....	9
2.1 Yüzey Sterilizasyon .....	9
2.2 Doku Kültürü ile İlgili Bazı Çalışmaları.....	13
2.3 Gen Aktarım ile İlgili Bazı Çalışmalar .....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	36
3.1 Bitki Materyali .....	36
3.2 Doku Kültürü Metotları .....	36
3.2.1 Besin ortamı ve kültür koşulları.....	36
3.2.2 Bitki büyüme düzenleyiciler .....	37
3.2.3 Tohumların in vitro koşullarda sterilizasyonu .....	38
3.2.4 Tohum canlılık testi .....	40
3.2.5 Şeker pancarı tohumlarının in vitro'da çimlendirilmesi .....	40
3.2.6 Köklendirilmesi.....	41
3.3 Genetik Transformasyon Çalışmaları.....	42
3.3.1 Bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi .....	42
3.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla şeker pancarına gen aktarım .....	43
3.3.3 Antibiyotikler .....	44
3.3.4 Gen aktarılmış bitkilerin belirlenmesi.....	45
3.3.5 Histokimyasal GUS analizi .....	45
3.4 Polimeraze Zincir Resaksiyonu (PCR) .....	45
3.4.1 DNA izolasyonu.....	45
3.4.2 Primer dizileri .....	48
3.4.3 PCR reaksiyon koşulları .....	48
3.4.4 Örneklerin agaroz jel elektroforezi.....	49
3.5 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi .....	50
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	51
4.1 Tohumların Canlılığı Testi.....	51
4.2 Yüzey Sterilizasyonu .....	51
4.3 Rejenerasyon Çalışmaları .....	57
4.3.1 Şeker Pancarının Monogerm Diamenta Çeşidi ile Poligerm Emu 8 (Baba Hattı), Sg3 (Anne Hattı) Şeker Pancarı Hatlarına Ait Sap Ve Kotiledon Yaprak Eksplantlarından Farklı Oranda Kinetin + IBA İçeren 1 × MS Ortamda Sürgün Rejenerasyonu .....	57
4.3.2 Şeker Pancarının monogerm Diamenta Çeşidi ile Poligerm EMU 8 baba hattı, SG3 anne hattına Ait yaprak sapı Ve yaprak	

eksplantlarından farklı oranda BAP + 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu.....	58
4.3.3 Şeker pancarının yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP + IBA içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu.....	64
4.3.4 Şeker Pancarının yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından farklı orandaTDZ İçeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu.....	68
4.6 Transgenik Çalışmaları.....	73
4.6.1 Onkogenik <i>A. tumefaciens</i> A281 pTiBo 542 ile Samsun Maden 2421 tütün çeşidine tümör oluşturmak amacıyla gen aktarımı ile ilgili bilgilerin araştırılması.....	73
4.6.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin Non onkogenik GV2260::p35 GUS INT hattının bakteriyel süspansiyon kullanarak Samsun Maden 2421 tütün çeşidine gen aktarımı.....	75
4.6.3 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda Kanamacin içeren ortamda yaşayan bitkilerinin oranın gözlenerek LD <sub>100</sub> dozunu belirlenmesi.....	77
4.6.4 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda fosfinotrisin içeren ortamda yaşayan bitkilerinin oranın gözlenerek LD <sub>100</sub> dozunu belirlenmesi.....	79
4.6.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla şeker pancarına gen aktarım.....	80
4.6.6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin A281 hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı.....	81
4.6.7 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'nin 15834 PRGbar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı.....	84
4.6.8 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı.....	89
4.6.9 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin pTF101 AoPR1 AcBar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı.....	99
5. TARTIŞMA ve SONOÇ.....	100
5.1 Değerlendirme.....	100
5.2 Öneriler.....	101
KAYNAKLAR.....	103
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
$\mu$ l	mikro litre
M	molar
mm	mili metre
1×MS	Murashige ve Skoog bazal besin ortamı
NAA	$\alpha$ Naftalen 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	Şeker pancarı bitkisinin bir şematik görüntüsü (Hubbard 2012).....	1
Şekil 1.2	Uşak şeker fabrikası (1926) ve yukarıda sol tarafta sergilenmiş fabrikasının açılış tabelasının bir görüntüsü.....	2
Şekil 1.3	Türkiye’de şeker pancarının ekim yapan iller .....	6
Şekil 1.4	Şeker pancarı tarlasının bir görüntüsü (Anonim 2015c.) .....	6
Şekil 3.1	Beyaz floresan ışığı altında (3000 luks) 16 saat ışık fotoperiyodunda $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta kültürlerin alınması .....	37
Şekil 3.2	Şeker pancarı tohumun şematik görüntüsü .....	39
Şekil 3.3	Köklenen bitkilerin iklim odasında torf içeren saksılara aktarılmasından önce araştırmacı tarafından ön hazırlık yaparak saksıların torf ile doldurulması .....	42
Şekil 3.4	Şeker pancarı’nin EMU 8, SG3 poligerm hatları ve DİMENTA monogerm çeşidine ait Transgenik Aday bitkilerin transformasyon tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonun yürütülmesi .....	47
Şekil 4.1	Şeker pancarı’nin monogerm (a) Diamenta çeşidi ile (b) poligerm EMU 8 (baba hattı), (c) SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatların ait tohumları sulfurik asit ile 80 dk muamele edilerek $3 \times 3$ dk saf su ile durulama yaptıktan sonra 6 gün sonra agar ile katılaştırılmış $1 \times \text{MS}$ ortamda fungal ( <i>Fusarium oxysporum</i> ) ve bakteriyel bulaşıklılığın görüntüleri .....	52
Şekil 4.2	Şeker pancarı hatların/çeşidin tohumların sulfurik asit ile 80 dk muamele edilmesi .....	53
Şekil 4.3	BKK/PPM - Bitki Koruyucu Karışımı /Plant Preservative Mixture (caisson labs ABD).....	54
Şekil 4.4	Şeker pancarı tohumların bir haftadan sonra çimlenmesi .....	55
Şekil 4.5	Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı ve monogerm SG3 (anne hattına ait sürgünleri 0.5 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi (a) araştırmacı alıştırılacak bitkilerin inceleme yaparken (b) bitkilerin saksılara aktarılması ve dış koşullarına aktararak alıştırılması .....	62
Şekil 4.6	Samsun maden tütün çeşidine ait bitki yapraklarında histokimyasal gus ekspresyonu .....	77
Şekil 4.7	Şeker pancarının EMU 8, SG3 poligerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait bitkilerin 2.50 mg/l fosphonitrisin içeren ortamda $\text{LD}_{100}$ belirlenmesi .....	80
Şekil 4.8	Agrobacteriuma. tumefaciens’nin A281 hattıyla gen aktarımı .....	83

- Şekil 4.9 Gus pozitif bitkilerin teyidi 1. ve 20. veya M kulvar markör 1000 bp, + veya 2. Kulvar transgenik samsun – maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi, - veya 19. Kulvar transgenik olmayan samsun – maden 22/41 tütün çeşidi, 4., 5., 6., 7., 8., 9. kulvar EMU8 poligerm baba hattına ait bitkilerinde *bar* genin varlığının pcr ile teyidi ..... 86
- Şekil 4.10 1. 19. veya M kulvar markör 1000 bp, + veya 2. Kulvar transgenik samsun – maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi, - veya 4. Kulvar transgenik olmayan samsun – maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi, 3., 6, Diamenta mono germ çeşidi, 7., 8., 10. ve 11. kulvar transgenik EMU 8 şeker pancarı poligerm baba hattı, 12., 13., 14., 18. Kulvar SG<sub>3</sub> şeker pancarı poligerm anne hattına ait transgenik bitkilerinde *npt II* genin varlığının pcr ile teyidi..... 89
- Şekil 4.11 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla (a,d) mono germ Diamenta çeşidi ile (b,e) poligerm EMU 8 (baba hattı) ve (c,f) SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına ait bitkilerinde gus pozitif ekspresyonları..... 91
- Şekil 4.12 1. veya M kulvar = markör 1000 bp, 2. Kulvar pozitif kontrol (transgenik Samsun – Maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi), - veya 19. kulvar - negatif kontrol. (transgenik olmayan Samsun – Maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi), 3., 4., 5., 6., monogerm Diamenta çeşidi, 7., 8., 9., 10., 11., şeker pancarı EMU8 poligerm baba hattına ait ve 12., 13., 14., 15., 16. ve 18. kulvar SG3 poligerm anne hattına ait transgenik bitkilerinde *bar* genin varlığının pcr ile teyidi..... 98

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye'de şeker pancarının ekim yapan 59 il, ekim yapan köy Şekil sayısı, pancar ekilen alan (dekar), mahsul taşıyan alan (dekar), bedeli ödenen pancar (ton) ve verim (ton/dekar) ile ilgili bilgileri (Anonim 2015d değiştirerek). ....	4
Çizelge 3.1 Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları.....	38
Çizelge 3.2 Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve Saklama sıcaklıkları .....	44
Çizelge 3.3 Ko kültüvasyondan sonra <i>A. tumefaciens</i> 'in gelişimini engellemek için kullanılan geniş spectrumlu antibiyotiği, kullanım oranı, stok miktarı ve saklama sıcaklıkları .....	45
Çizelge 3.4 PCR işleminde kullanılan primer dizileri.....	48
Çizelge 4.1 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına ayrı ayrı 16 saat ışık fotoperiyodunda ve karanlıkta bir hafta sürece çimlendirilmesi ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları .....	55
Çizelge 4.2 Şeker pancarı'nin EMU 8, SG3 poligerm hattında ve Diamenta mono germ çeşidinde 16 saat ışık fotoperiyodunda ve karanlıkta bir hafta sonra çimlenme oranları ile ilgili çimlenme oranları .....	56
Çizelge 4.3 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, SG3 anne hattı şeker pancarı hatlarına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları ....	59
Çizelge 4.4 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, SG3 anne hattı şeker pancarı hatlarına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait ortalamaların Duncan testi sonuçları .....	61
Çizelge 4.5 1.00 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA (SRO 1) ve 1.50 mg/l BAP +0.10 mg/l NAA (SRO 2) içeren MS ortam daki sürgünlerinde kök oluşumu ile ilgili verilerin ortlaması .....	63
Çizelge 4.6 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyasyon analizi sonuçları .....	64
Çizelge 4.7 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları .....	65
Çizelge 4.8 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı kombinasyonda BAP-IBA içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili verilerinin varyans analizi sonuçları .....	66

Çizelge 4.9 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı kombinasyonda BAP-IBA içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili verilerinin Duncan testi sonuçları.....	68
Çizelge 4.10 Şeker pancarının EMU8, SG3 poligerm hattında ve Diamenta monogerm hattında sap eksplantlarından TDZ içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları.....	69
Çizelge 4.11 Şeker pancarının Diamenta monogerm çeşidinin, EMU8 ve SG3 poligerm hattında sap eksplantlarından TDZ içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları .....	70
Çizelge 4.12 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı oranda TDZ içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili verilerinin varyansa analizi sonuçları .....	71
Çizelge 4.13 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı oranda TDZ içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili Duncan testi sonuçları.....	73
Çizelge 4.14 <i>A. tumefaciens</i> 'in onkogenik A281 hattının tütün Samsun Maden 2421 çeşidinin yaprak diski eksplantında tümör oluşumu üzerine etkisine ait sonuçları .....	74
Çizelge 4.15 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin Non Onkogenik GV2260::p35 GUS INT Hattının Bakteriyel Süspansiyon Kullanarak Samsun Maden 2421 Tütün çeşidine gen aktarımına ait ortalamaları .....	76
Çizelge 4.16 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda kanamisin içeren ortamda yaşayan bitkilerinin oranının gözlenerek LD <sub>100</sub> dozunu belirlenmesi .....	78
Çizelge 4.17 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda fosfotrisin içeren ortamda ölen bitkilerinin oranının gözlenerek LD <sub>100</sub> dozunu belirlenmesi .....	79
Çizelge 4.18 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin A281 pTiBo 542 hattıyla monogerm Diamenta şeker pancarı çeşidine ait gus ekspresiyon ve tümör oluşumu ile ilgili sonuçlar .....	81
Çizelge 4.19 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin A281 pTiBo 542 hattıyla EMU8 poligerm şeker pancarı hattına ait gus ekspresiyon ve tümör oluşumu ile ilgili sonuçlar .....	82
Çizelge 4.20 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin A281 PTIBO 542 hattıyla SG3 poligerm şeker pancarı hattına ait gus ekspresiyon ve tümör oluşumu ile ilgili sonuçlar .....	83

Çizelge 4.21	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'nin 15834::pRGGbar hattıyla Diamenta monogerm şeker pancarı çeşidine ait gus ekspresiyon ve kök oluşum ile ilgili sonuçlar .....	85
Çizelge 4.22	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'nin 15834::pRGGbar hattıyla EMU8 poligerm şeker pancarı hattına gus ekspresiyon ve kök oluşum ile ilgili sonuçlar.....	87
Çizelge 4.23	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'nin 15834::pRGGbar hattıyla SG3 poligerm şeker pancarı hattına gus ekspresiyon ve kök oluşum ile ilgili sonuçlar.....	88
Çizelge 4.24	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla emu8 (baba hattı) şeker pancarı hatına 2.0 mg/l fosfonitrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları .....	90
Çizelge 4.25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla Diamenta monogerm şeker pancarı çeşidine 2.5 mg/l fosfinothrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçlar .....	92
Çizelge 4.26	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla EMU8 (baba hattı) şeker pancarı hatına 2.0 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları .....	94
Çizelge 4.27	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 4404::pRGGbar hattıyla EMU8 (baba hattı) şeker pancarı hatına 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları .....	95
Çizelge 4.28	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatına hatına 2 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları.....	96
Çizelge 4.29	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla SG3 (anne hattı) şeker pancarı hattına 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları.....	98
Çizelge 4.30	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin PTF101AoPR1AcBar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı ile ilgili sonuçları .....	99

## 1. GİRİŞ

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L. Chenopodiaceae (Kazayağıgiller) familyası, Beta cinsi) iki yıllık yazlık bir endüstri bitkisidir (Şekil 1.1). Yaklaşık 1747 yılında yapılan çalışmalarında hayvan pancardaki şeker oranı % 1 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla Avusturya ile Purusya = Almanya'nın Silezya bölgesinde hayvan yemi olan pancarı ıslah çalışmaları başlatılmıştır. Günümüzde, yapılan ıslah ve çeşit geliştirme çalışmaları ile bazı ıslah edilmiş şeker pancarı (ZZ) çeşitlerinde şeker oranı % 24 – 28 arasında bulunmaktadır (Er 2012).



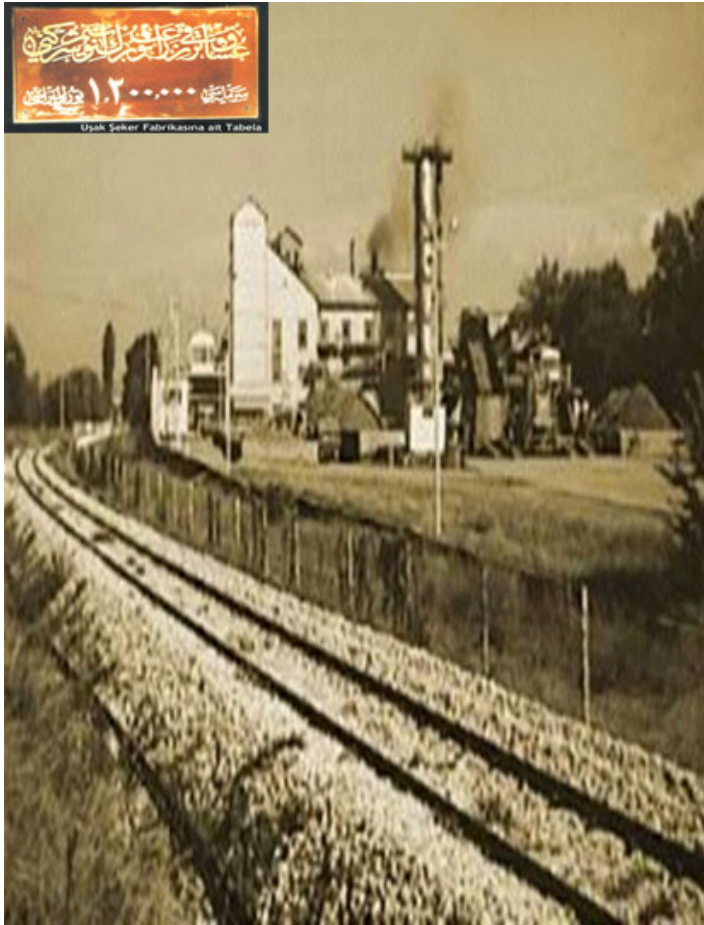
Şekil 1.1. Şeker pancarı bitkisinin bir şematik görüntüsü (Hubbard 2012 değiştirerek).

Son zamanlarda şeker pancarından elde edilen şeker; “Nişasta Bazlı Şeker” (NBS) olarak bilinmektedir (Anonim 2015a). Şekerin insan beslenmesindeki önemi, değeri ve yeri çok geniş kapsamlıdır. Şeker pancarı, şeker üretimi yanında, yan ürünlerle pancar küspesi ve melas gibi hayvancılık sektörünün girdi kaynağı ve ispirto alkol, kozmetik,



şekerleme, maya, biyolojik yakıt ve çikolata üretimiyle de içki ve maya sanayiinin hammaddesi olduğu için Türkiye’de önemli bir yere sahiptir (Draycott AP 1988).

Şeker pancarı tarımında dünyada farklı ekim zamanları uygulanmaktadır. Şeker pancarı ilkbahar ekimleri “yazlık pancar” veya “yazlık ekim”, sonbahar ekimleri ise “kışlık pancar” veya “kışlık ekim” olarak adlandırılmaktadır (Kıllı ve Altunbay 2012). Türkiyede şeker pancarı tarımı 1925 yılında Uşak'ta başlamış olup, şeker sanayi ile gelişerek yayılmıştır (ilk fabrika Uşak'ta 1926 yılında kurulmuştur – şekil 1.2). Bugün fabrikaların kurulduğu her yerde tarımı yapılmaktadır. Belirli iklim ve toprak isteği yoktur (Karbuz vd. 2008). Türkiye’de ise Şanlı Urfa illi hariç sadece yazlık olarak üretim yapılmaktadır. Türkiye’de şeker pancarı tarımı yapan 59 ilde yapılmaktadır (Şekil 1.2, Anonim 2015d).



Şekil 1.2 Uşak şeker fabrikası (1926) ve yukarıda sol tarafta sergilenmiş fabrikasının açılış tabelasının bir görüntüsü (Anonim. d)

Bu tanımlar kapsamında şeker pancarı dünyada kuzey yarım kürenin 30 – 60° enlemleri arasında ılıman ve soğuk iklime meyilli bölgelerde yazlık olarak, ılıman iklim bölgesinin altbölümü ile yarı sıcak iklim bölgelerinde (35 - 60° kuzey enlemleri arasında) İtalya, İspanya, Suriye, Türkiye, eski Rusya Federasyonu, Orta Asya ülkeleri, Avrupa kıtası özellikle Avrupa Birliği ülkelerinde ve İran) gibi ülkelerde değişik iklim kuşakları ve bölgelerde (Gencer 1988, Morillo-Velarde 1993). kışlık olarak da yetiştirilmektedir (Caliandro ve ark., 1997).

Bu özellikleri yanında münavebe ve çapa bitkisi olan şeker pancarı, düzenli bir toprak işlemeyi zorunlu kılıp, bitki koruma, sulama, gübreleme ve mekanizasyon girdileriyle bu sektörlerin gelişmesine de önemli katkıları bulunmaktadır (Morillo-Velarde 1993). Şekerpancarı çok hassas bitki olup, yetiştiriciliği için yüksek tarım kültürü bilgisi gerekmektedir (Er 2012).

Türkiye, Kuzey yarımkürede 36–42° Kuzey enlemleri arasında ve subtropikal iklim kuşağında yer alan bir ülkedir. İklim ve toprak şartlarının uygunluğu nedeniyle Türkiye'de üretilen şekerin tamamı, şeker pancarından elde edilmektedir (Anonim, 2015b). Türkiye'de de şekerpancarının kalitenin yükselmesi ve verimin artırılması yönelik çabalar devam etmektedir (Er 2012).

Şeker pancarı Türkiye'de şeker sanayinin hammaddesi olarak yetiştirilmektedir. Ayrıca, kıymetli yan ürünleri olan baş, yaprak, küspe ve melasın tarımsal kalkınmadaki katkıları nedeniyle ülke ekonomisi yönünden büyük önem arz etmektedir. Türkiye'de şeker pancarı tarımında şeker üretiminin yanı sıra, melas, küspe yaprak ve baş artıkları gibi yan ürünlerinden de hayvan yemi elde edildiği aynı zamanda melas, alkol ve ispirto sanayiinde kullanıldığı bildirilmiştir (Şiray 1990).

Türkiye'de şeker pancarı tarımı, şeker pancarı üretimiyle geçimini temin eden yaklaşık 500 bin çiftçinin, diğer bir ifadeyle 3 milyon insanın yanı sıra tarım, hayvancılık, yem, ilaç, et, süt, nakliye ve hizmet sektörleriyle de iç içe geçmiş durumdadır (Anonim 2015b).

Avrupa Birliği Ülkeleri'nin tamamına yakınında % 95 oranında pancar şekeri üretimi yapılmaktadır. Bu ülkeler daha ucuza kamış şekeri temin edebilecekleri halde pancar şekeri üretiminden vazgeçmemektedirler. Bunun nedeni pancar tarımının ve sanayisinin üreticilere sağladığı katma değerdir. Avrupa Birliği ülkelerinden Almanya ve Fransa dahil olmak üzere tüketiminin 2 katı şeker üretmektedir (Anonim 2015b).

Dünya şeker üretimi, pancar şekeri ve kamış şekerinden olmak üzere toplam 147 228 000 ton olarak görölmektedir. Avrupa Ülkeleri arasında şeker pancarı üretimi bakımından ilk beş sırayı Rusya, Fransa, Almanya, Ukrayna ve Türkiye almaktadır (Tan ve Ökten 2008).

Türkiye'de şeker fabrikalarına ait şeker pancarı ekiliş alanı 2013 yılında 291000 ha dır. Bu ekim alanıyla dünya sıralamasında şeker pancarı ekiliş alanları bakımından Rusya, ABD, Fransa, Ukrayna ve Almanya'nın ardından Türkiye beşinci sırada ve üretiminde 2012-2013 döneminde Rusya, ABD, Almanya, Fransa ve Ukrayna'nın ardından 6. sırada yer almıştır (FAO 2013). Türkiye'de şeker pancarı üretimi 2013 yılı verilerine göre 566426 hg/ ha, 16483000 ton verim elde edilmektedir (FAO 2015).

Çizelge 1.1 Türkiye'de şeker pancarının ekim yapan 59 il, ekim yapan köy sayısı, pancar ekilen alan (dekar), pancar verim (ton/dekar) ile ilgili bilgileri (Anonim 2015d değiştirerek).

Sayı	Pancar ekim yapan iller	Ekim Yapan Köy Sayısı	Pancar Ekilen Alan (Dekar)	Pancar verim (ton/dekar)	Pancar ekim şekli
1	Adana	10	3.700	6,15	Kışlık
2	Adıyaman	5	967	4,53	Kışlık
3	Afyonkarahisar	215	128.369	5,24	Kışlık
4	Ağrı	66	35.020	2,57	Kışlık
5	Aksaray	53	48.818	5,91	Kışlık
6	Amasya	24	5.920	4,48	Kışlık
7	Ankara	147	82.239	5,93	Kışlık
8	Antalya	38	17.079	4,98	Kışlık
9	Balıkesir	42	6.314	5,09	Kışlık
10	Bayburt	32	9.980	4,33	Kışlık
11	Bilecik	2	1.160	4,55	Kışlık
12	Bingöl	7	2.600	5,45	Kışlık
13	Bitlis	20	40.928	3,27	Kışlık
14	Burdur	93	40.379	5,02	Kışlık
15	Bursa	92	36.081	6,46	Kışlık
16	Çanakkale	9	1.005	4,75	Kışlık

Çizelge 1.1 Türkiye'de şeker pancarının ekim yapan 59 il, ekim yapan köy sayısı, pancar ekilen alan (dekar), pancar verim (ton/dekar) ile ilgili bilgileri (Anonim 2015d değiştirerek) (Devam)

Sayı	Pancar ekim yapan iller	Ekim Yapan Köy Sayısı	Pancar Ekilen Alan (Dekar)	Pancar verim (ton/dekar)	Pancar ekim şekli
17	Çankırı	21	6.414	4,62	Kışlık
18	Çorum	143	45.889	5,34	Kışlık
18	Denizli	95	35.095	4,91	Kışlık
20	Edirne	76	11.044	4,99	Kışlık
21	Elazığ	73	21.453	5,09	Kışlık
22	Erzincan	93	65.760	4,69	Kışlık
23	Erzurum	80	29.400	3,69	Kışlık
24	Eskişehir	192	146.788	5,56	Kışlık
25	Gaziantep	17	7.696	6,75	Kışlık
26	Gümüşhane	43	6.550	4,53	Kışlık
27	Iğdır	48	19.160	3,35	Kışlık
28	Isparta	17	10.493	5,57	Kışlık
29	İstanbul	1	307	2,36	Kışlık
32	İzmir	5	729	4,15	Kışlık
33	Kahramanmaraş	101	68.079	6,26	Kışlık
34	Karaman	46	91.964	6,27	Kışlık
35	Kars	17	11.210	3,91	Kışlık
36	Kastamonu	210	80.327	4,09	Kışlık
37	Kayseri	1	1.080	3,88	Kışlık
38	Kırıkkale	34	11.268	5,87	Kışlık
39	Kırklareli	46	7.190	3,88	Kışlık
40	Kırşehir	78	50.253	5,81	Kışlık
41	Konya	196	287.316	5,46	Kışlık
42	Kütahya	31	4.554	4,46	Kışlık
43	Muş	89	99.522	3,70	Kışlık
44	Malatya	53	14.662	4,20	Kışlık
45	Manisa	2	150	4,49	Kışlık
46	Muğla	4	817	5,00	Kışlık
47	Nevşehir	51	34.479	6,29	Kışlık
48	Niğde	26	25.910	4,81	Kışlık
49	Samsun	61	7.800	4,18	Kışlık
50	Sinop	17	1.893	4,91	Kışlık
51	Sivas	75	36.936	4,42	Kışlık
52	Şanlıurfa	3	10.058	4,44	Yazlık
53	Tekirdağ	51	6.257	4,22	Kışlık
54	Tokat	258	130.910	5,14	Kışlık
55	Tunceli	1	165	4,15	Kışlık
56	Uşak	38	10.520	4,91	Kışlık
57	Van	62	16.550	4,12	Kışlık
58	Yozgat	233	96.060	5,76	Kışlık
59	Diyarbakır	1	60	0,02	Kışlık
<b>Toplam</b>		3.544	1.973.327		
<b>Ortalama</b>				5,15	

Kaynak: Anonim 2015d. <http://www.bilgizenginleri.org/her-telden/12527-seker-pancari-hangi-illerde-yetisir.html> (Erişim 18.04.2015 değiştirerek)



Şekil 1.3 Türkiye’de şeker pancarının ekim yapan iller (Kaynak Anonim 2015e değiştirilerek)

Türkiye’de TÜİK (2013)’dan alınan verilerine göre 2013 yılında Türkiye’de toplam tarım alanı içerisinde yıllık şeker pancarı ekim alanı 1973.327 dekar, verim 5,5 ton/dekar olarak belirlenmiştir (FAO 2013, Şekil 1.3).



Şekil 1.4 Şeker pancarı tarlasının bir görüntüsü (Anonim 2015c.)

Bu bağlamda 2013 yılında Trakya Bölgesi’nin Edirne ilinde 9888 da’lık alandan 51507 ton, Kırklareli ilinde 2052 da’lık alandan 9609 ton, Tekirdağ ilinde ise 1526 da’lık alandan 10760 ton ürün elde edilmiştir (Anonim 2015d). Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi en fazla köyde şeker pancarı ekilen iller Tokat, Yozgat ve Afyonkarahisar olup, en fazla ekim Konya da yapılmaktadır. Ton/dekar olarak en fazla verim Gaziantep’ten elde edilmektedir. İstanbul, Kayseri, Tunceli, ve Diyarbakır

illerinde yalnız birer köyde şeker pancarı ekimi yapılmaktadır. Verim olarak da en düşük verim 0.02 ton/da Diyarbakır'dan elde edilmektedir. Türkiye'de toplam 3544 köyde, 1973327 da şeker pancarı ekim yapılmaktadır ve ortalama verim 515 ton/da olarak hesaplanmaktadır. Şeker pancarı ekim yapan illerden sadece Şanlıurfa ilinde yazlık olarak üretimi kısıtlı bir alanda (3 adet köyde 10058 dekar üzerinde ile 4,44 ton/da verim ile) yapılmaktadır (Anonim 2015d).

Şeker pancarı üretiminde başta yabancı otlarla beraber çok sayıda böcek, fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar büyük sorun oluşturmaktadır. Bunların arasında bir çok sorunların ana kaynağı yabancı otlardan oluşan zararların önemi çok büyüktür. Yukarıda belirtilmiş tüm sorunlar pancardaki şeker miktarını ve kalitesinde olumsuz şekilde etkilemektedir. . Yabancı otları öldürmek için uzun zamandan beri kimyasal ilaçlar kullanılmaktadır.. Yaygın olarak kullanıldığı bu ilaçları şekerpancarı tohum çimlenmesinden pancar hasadına kadar olan sürede kullanılması çevreye zarar vermektedir (Merrington, et al.,2002).

Dünyada yabancı otlar nedeniyle oluşan ürün kayıpları bir çok kültür bitkisinde hastalık ve zararlıların toplamından fazla olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yabancı otlar nedeniyle ürünün kalite ve veriminde %10-15 arasında zarar oluşurken, bazı Asya ülkelerinde bu oran %45'e ulaşabilmekte ve her yıl 1-1.5 milyon ton arasında şekerpancarı yabancı ot rekabeti nedeniyle kaybolmaktadır (Gürsoy, 1982). Türkiye'de bu oran %2 - 100 arasında değişmekte ve ortalama zarar %40 - 50 arasında değişmektedir (Gürsoy, 1991, 2002). Yabancı otlarla mücadele de bilinen en etkili yöntem elle yapılan çapalama işlemi olmasına rağmen iş gücünün pahalı olması nedeniyle günümüzde çoğu zaman herbisitler tercih edilmektedir (Önen 1995). Doğal düşmanlarından bitkilerin korunması ve etkinliklerinin artırılması için mümkün olduğu kadar kimyasal mücadeleden kaçınarak entegre mücadele anlayışı çerçevesinde doğal dengenin korunması ve tarımda sürdürülebilirliğin sağlanması kaçınılmaz bir zorunluluktur (Metcalf 1975). Ancak, Bilinçsiz kullanılan herbisitlerin şeker pancarı çimlenmesinden başlayarak bütün aşamalarında olumsuz etkilerde bulunduğu ve bu olumsuzlukların verimi etkilediği, beklenen fayda yerine zararların ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Ascard 1988, Benbrook 1996, Benvenuti 2004, Fowler et al. 2000).

En etkili mücadele yöntemi elle yapılan mücadele olmasına rağmen iş gücünün pahalı olması nedeniyle çoğu kez işi kolaylaştırmak için böcekleri ve herbisitlere karşı kimyasal ilaçların kullanılması gittikçe artmakta ve tercih edilmektedir (Delen, vd. 2005. Durmusoglu 2007, Güngör, vd 2002). Bu sorunları ortadan kaldırmak için herbisitlere ve böceklere dayanıklı çeşitleri geliştirilmesi tarımsal açıdan çok önemlidir. Klasik bitki ıslahı yöntemleri sayesinde, özellikle melez çeşitlerden yararlanarak elde edilen ürünün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmıştır (Ulukan 2007). Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık ve bitkinin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli engellerle beraber istenilen karakterlerin yeni bitkilerine aktarılması çok yavaş ve zordur (Acquaah 2012). Söz konusu karakterler değişik bitki türlerine aktarılabilirler dahi, istenmeyen özelliklerin melez döllere geçişini önlemek neredeyse olanaksız hale gelmekte, geri melezleme yöntemiyle bu olumsuzluğun ortadan kaldırılması ise oldukça uzun zaman almaktadır. Ayrıca, klasik bitki ıslah yöntemlerinden olan melezleme ve seleksiyon teknikleriyle sonuca ulaşmak oldukça yavaş olmaktadır. Klasik ıslah yöntemleriyle bu hedefe ulaşmak çok zordur (Fischhoff et al 1987, Franck-Oberspach, Keller. 1996. Gould, 1997. James 1996).. Bugüne kadar, *Agrobacterium* aracılığıyla Türkiye koşullarında hem herbisitlere dayanıklı hemde böcekler karşı dayanıklı şeker pancarı bitkisi elde edilememiştir.

Bitki genetik mühendisliği tekniklerinin kullanılmasıyla, ıslah süresinin kısaltılması ile melezlemede karşılaşılan engeller, genetik bağlılık sorunları ve gen havuzlarından yararlanmadaki sınırlamalar kolayca ortadan kaldırabilmektedir (Özcan ve Özgen 1996). Genetiği değiştirilmiş (GD) şeker pancarı yetiştiricileri, gıda sanayi, tüketiciler için ve çeşitli avantajlar sunmaktadır. Tarımsal çevre. Toplam herbisit (THT) tartışılmış ve bunların avantajları hoşgörülüdür (Jassem 2000). Bu tezde şekerpancar *Diamanta* monogerm çeşidi, poligerm EMU 8 (baba hattı) ve poligerm SG3 (anne hattı) hatlarına sürgün rejenerasyon ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla transgenik bitkilerin üretim sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Türkiye’de şeker pancarı tarımı orta Anadolu’nun her dört etrafta yapılmaktadır. Yaşam sürece şeker pancarı bitkisi yabancı otlar ve farklı tip zararlılar negatif etkilenmektedirler görmektedir. Şeker pancarı tarlalarda her aşamada farklı tip böceklerden zarar görmektedir. Toprakta tohumlardan gelişen fideler döneminde ve yaşam sürecinde her aşamada şeker pancarı biyotik ve abiyotik streslerin sebep olan tüm faktörlerin önlenmesi çok önem taşımaktadır. Şeker pancarı tohum zararlıları ve yabancı otlardan gelen bitkilere ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün elde etmek için hem herbisitlere ve 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 mümkün olabilmektedir. Bu tez kapsamında *Agrobacterium* aracılığıyla şeker pancarı bitkisine herbisitlere ve Lepidoptera takımına ait böceklere karşı dirençli genler aktararak, direnç kazandırılmaya çalışılmıştır. Bu konyula ilgili, daha önce yapılmış olan bazı doku kültürü ve gen aktarım çalışmalarının özetleri aşağıda verilmiştir.

### 2.1 Yüzey Sterilizasyon

Rubluo vd (1984), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bezelye yaprakçıklardan farklı oranda BAP, NAA, IBA ve IAA içeren MS besin ortamında 0.9-1.8 mm uzunluğunda sürgünler ve daha sonra onları köklendireerek tam bitkiler elde etmişlerdir. Oluşan sürgün yüzdesi, ortalama %26-38 arasında değişmiştir. BAP ve NAA içeren ortamda, olgunlaşmış yapraklardan gelişen sürgünlerin oranı % 7'ye kadar düşmüştür. GA3'in 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 büyümeyi düzenleyicileri olduğu belirtilmiştir.



Cook vd (1989), su bitkisi *Kosteletzkya virginica*'nın tohumlarının yüzey sterilizasyonunda sülfirik asit ve etanol kullanmışlardır. Bir saat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile muamele edilen tohumlar, çeşme suyunda durulanmış ve %95'lik etanolde 10 dk. bekletilmiştir. Tohumlar gece boyunca steril saf suda bekletildikten sonra yine %95'lik etanolde 5 saniye bekletilmiş ve kurutulmuştur.

Straub vd (1989), su bitkisi *Distichlis sipicata*'nın olgun tohumların yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyu veya etanol kullanılmıştır. Tohumlar 15 dk. çamaşır suyunda bekletildikten sonra 3 defa steril saf su ile durulanmıştır. Diğer bir yöntemde ise, %95'lik etanolde 15 dk. bekletme ve durulamadan sonra kurutma uygulanmıştır.

Pancholi (1995), değişik muz klonları üzerinde yaptığı çalışmada, sterilizasyonu Domestos ile yapmıştır. eksplantlar steril kabin içerisinde 3 defa steril saf sudan geçirilerek meristem izolasyonuna hazır hale getirilmişlerdir. Meristem izolasyonundan sonra kontaminasyonla karşılaştırılması durumunda, eksplantlar tekrar % 2-3' lük Domestos'da 2-3 dakida bekletilmiştir.

Khawar (2001) Tohumlarda yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının alınacağı en düşük dezenfektan dozu (50 adet tohum için) belirlenmeye çalışılmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun (Axion) %50, %75, %100 lük dozları tohumlara oda sıcaklığında her biri 4 farklı sürede (15 dk., 20 dk., 25 dk., 30 dk.) 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 MS besin ortamında 23o 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). Emriyo 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 HgCl<sub>2</sub> 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 yöntemi geliştirilmiştir. Yeşil tipine oranla basit sürgün kısımları daha hassas bulunmuştur. İn vitro ortamda gelişen genç bitkilerden alınan meristemler kültür süresince dış ortamda yetişenlere oranla az oksidasyon yapmışlardır. Büyüme düzenleyicilerinden BA ve NAA’ in çeşitli konsantrasyonlarının *O. vulgare* × *applii*’ nin mikroçoğaltımı üzerine etkileri araştırılmıştır

Kishchenko vd. (2005) bu çalışmada vakum infiltrasyon kullanarak şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), bitkisinde *Agrobacterium*-aracılığıyla genetik transformasyonu için bir yöntem geliştirilmiştir. İki diploid O-tipi şeker pancarı soylarının (KS3 ve KS7) aseptik 3-haftalık soluk fidelikler genetik transformasyonu için kullanılmıştır. Muhabir b- glukuronidaz geni taşıyan transgenik şeker pancarı bitkileri glufosinat amonyum herbisite dayanıklılığı nedeniyle seçilmiştir. şeker pancarı genomu içine transgenlerin entegrasyonu, Gus ve bar genleri için primerler kullanılarak pcr ile teyit edilmiştir.

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

Çapan S. (2006 ) Deney grubu olarak kullanılacak bitkilerin elde edilmesi için tohumlara yüzey sterilizasyonu yapılmıştır (Kabuklu tohumlar %70 alkol içerisinde 10 dk. bekletilerek, steril destile suda 10 dk. süre ile 3 defa değiştirilerek yıkanmıştır. Daha sonra %5 lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dk. bekletilmiştir. Sonra, yine steril edilmiş destile suda 10 dk. 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 dk. bekletildikten sonra sırasıyla steril distile suda 1 dk., %10 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 5 dk. tutulmuştur. Tohumlar son olarak steril distile su ile 10 kez 1'er dk. yıkanmıştır. En son yıkamada tohumlar 20 dk. steril distile suda bekletilerek, suları süzölmüştür. Tohumların sularının tam olarak süzölmesi için filtre kağıdına yayılarak bir süre bekletilmiştir.

Aktürk (2009) *In vitro* kültürlerde başlangıç 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 ağzıları 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 mantarî bulaşma görölmeyen kültürlerin ilk eksplant sayısına oranını ifade etmektedir. Yaşayan Kültür Oranı (%): Lateral tomurcuklarla yapılan deney sonunda, bakteriyel veya mantarî bulaşma görölmeyen 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*) Tozlamadan 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 tohumların % 22'sinin enfeksiyon kapıldığını bildirmişlerdir. Enfeksiyondan meydana gelen kayıpların Chlorox 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 dk. çalkalanmak suretiyle bekletilmiştir. Daha sonra steril saf su ile iyice durulanan tohumlar, %96'lık etil alkol içinde 5 dk. 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 Çalışmaları**

Gamborg vd (1974), bezelye (*Pisum sativum* L)'de apikal hücrelerden sürgün oluşturmayı başarmışlardır. Apikal hücreleri agar ile katılaştırılmış 0.2-5 µM BAP ve 1 µM NAA içeren 1 × MS ortamında 4-6 hafta içinde kallus ve sürgün oluşumunu gözlenmişlerdir; ancak, sürgünlerin köklendirilmesinde olumsuz sonuçlar almışlardır.

De greef ve Jacobs (1979) şeker pancarı bitkisinin yaprak eksplantları farklı ortamlarına aktararak inlenmiştir. Araştırmacılar ilk oluşan kallusların farklı hormon kombinasyonları

içeren ortamlara kültüre alarak 3-9 haftalık soğuk muamele yaptılar. Normal sıcaklığında bir adet kallus üzerinde sürgün ve bitki oluşum gözlenmiştir. Elde edilen kallus 12 alt kültürü ile bitki rejenerasyon yapmaktadır. Elde edilen kallustan tekrar kallus ve süspansiyon kültürü yapılmıştır. Elde edilen bitkilerin yaprak eksplantları hormonsuz ortamda kallus oluşturmuşlar

Mroginski ve Kartha (1981), bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde primordial yaprakları belirli aralıklarla, değişik oranlarda BAP ve NAA içeren 1 × MS vitaminler içeren B5 besin ortamında kültüre almışlardır. En fazla sürgün oluşumunu 0.1 µM NAA ve 10 µM BAP içeren 1 × MS vitaminler içeren B5 besin ortamından elde edilmiştir.

Harms vd. (1983). Bu çalışmada sürgün uçları kullanarak kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinde etkili bir klonal çoğaltım prosedür geliştirilmiştir. Çalışmada çoklu sürgün uçların oluşum ile çoğaltım gerçekleştirilmiştir. Histological çalışmalarıyla sürgün uçların üst epidermis tabaka olduğunu tespit edilmiştir.

Rubluo vd (1984), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bezelye yaprakçıklardan farklı oranda BAP, NAA, IBA ve IAA içeren 1 × MS besin ortamında 0.9-1.8 mm uzunluğunda sürgünler ve daha sonra onları köklendirekerek tam bitkiler elde etmişlerdir. Oluşan sürgün yüzdesi, ortalama %26-38 arasında değişmiştir. BAP ve NAA içeren ortamda, olgunlaşmış yapraklardan gelişen sürgünlerin oranı % 7'ye kadar düşmüştür. GA3'in sürgün oluşumunda etkili olmadığı, pikloram ve 2,4-D'nin ise olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Freytag vd. (1988) Altı şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), hatlar (GWI-248, SPB-11, MonoHy 55, SMS-1, EL45 ve FC607)2nin rejenerasyon için çalışmaları yapılmıştır. *In vitro* sürgün kültürleri olgunlaşmış tohumdan elde edilen sterilize edilmiş embriyolardan yapılmıştır. Kültürlenmiş sürgünlerden kesilen sapı içeren Gamborg B5 ortamı ve dört adet modifiye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamına alınmıştır. Ayrıca, 0,4 mg / 1 N6-benziladenin ile takviye MS inorganik tuzlar içeren bir ortam, 0,1 mg / 1 indol-3-butirik asit, on altı amino vitaminler ve asitler içeren RV adlandırılan ortamı kallus ve doğrudan sürgün rejenerasyonu için uygun görülmüştür. Rejenere

olmuş sürgünleri köklendirerek bitki elde edilmiştir. Sürgünleri köklendirmek amacıyla 5 mg / l indol-3-bütirik asit içeren Gamborg B5 ortamı kullanılmıştır. Adventif sürgün üretim yoluyla bitki elde etmek için 4-6 hafta çalışmaları yapılmıştır. Ortamlarda sürgün rejenerasyon ile beraber az da olsa somatik embriyogenez de izlenmiştir.

Polanco vd (1988), Üç İspanyol mercimek çeşidi ile yaptığı bir çalışmada kallus ve sürgün oluşumunda besin ortamı ve farklı eksplantların (sürgün ucu, birinci boğum ve ilk yaprak çifti) etkilerini incelemek amacıyla farklı oranda 2,4-D, BAP, NAA ve IAA içeren 1 × MS ve B5 besin ortamları kullanılmıştır.. 2,4-D içeren besin ortamında tüm eksplantlar üzerinde yalnız kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak, 2.25 mg/l BAP-0.186 mg/l NAA ve 2.25 mg/l IBA içeren 1 × MS besin ortamından çok sayıda sürgün elde edilmiştir. BAP içeren ortamda en fazla sürgün oluşum gözlenmesine rağmen köklenme üzerinde belirin azalmagörülmüştür. Sürgünlerin köklendirmek için yalnız NAA veya IAA içeren besin ortamları uygun olduğu tespit edilmiştir. En fazla sürgün oluşumu koltuk altı meristemden ve en az sürgün oluşumu yaprak eksplantından elde edildiği bildirilmiştir.

Doley ve Saunders (1989) bir çalışmada On dört (14) bitki accession den alınmış bitkilerden alınan eksplantların yaprak eksplanttan kallus oluşumu elde etmek için 1 × MS ortamı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre ortalama 96.7 günde %49.2 eksplantta şişme ile kallus oluşumu gözlenmiştir. 1mg/l BA içeren ortamda kallus oluşumunda 4-6 hafta gecikme görülmüştür. Elde edilen sonuçlarına göre 8/14 pancar çeşidi sürgün oluşumuna almıştır ve 3/14 çeşidinde kallus oluşum gözlenmiştir. Gartons White ve L53 çeşidinde somatik embriyogenesis ve kök oluşum oluşumu ile gözlenmiştir. Kök oluşum bakımından çeşitler arasında önemli farklılığı görülmüştür. Her çeşidinde 5 parametre incelenmiştir ve 4 parametere de önemli derecede varyasyonları bulunmuştur.

Ritchie ve ark. (1989), *In vitro*'da yaprak diplerinden, kalluslardan ve petiollerden sürgün rejenerasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada % 3 sukroz, 0,8 agar, vitaminler ile indikatör olarak NAA ve BAP eklene MS ortamından yararlanılmış olup; 6 tane pancar hattına ait tohumlar steril edilmiş, ancak yüzey sterilizasyonundaki

gelişmeler şüpheli bulunmuştur. 0,1 mmol BAP eklenen MS ortamında 25°C sıcaklıkta sadece 4 haftada belirgin olarak daha fazla yaprak oluşumu gözlenmiştir. Sadece 3 ay süre ile 5 mmol BAP ilave edilen MS ortamında ise *in vitro*'da sürgün kültüründe petiollerden sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Leuba ve Tourneau (1990), 25-50 µM Phenoxy acetic acid (PAA) içeren besin ortamında mercimek eksplantlarından kallus oluşturmuşlar, 5 µM ve daha fazla PAA konsantrasyonların mercimek dokularına toksik etki yaptığını bildirmişlerdir.

Abe vd (1991) Beta macrocarpa ve şeker pancarında adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleştirmek için yaprak sapı eksplantlarını kültüre almışlardı.

Jacq F ve ark. (1992), 21 günlük şeker pancarı fidelerinin hipokotil eksplantlarından. 0,3 mg/1 BAP, 0,1 mg/1 NAA, % 0,5 adenin, % 0,5 fruktoz, % 0,5 sukroz ve % 0,5 glikoz içeren MS ortamında basit ve tekrarlanabilen bir rejenerasyon sistemi geliştirmişler ve elde edilen sürgünler köklendirilerek seralarda büyütülmüşlerdir.

Goska ve Szota (1992) bir çalışmada 9 adet trisomik ve diploid pancar çeşitlerin vejetatif çoğaltım yapılarak her 2si arasında bir kıyaslama yapılmıştır. Eksplant olarak apikal meristem kullanılmıştır. Eksplantları 1µM BAP+0.1 µM NAA (rejenerasyon ortamı) 1 µM BAP + 5 µM NAA (çoğaltım ortamı) ve 0.1 µM 2iP + 15 µM IBA ile 100 mg/1 inositol, 0.4 mg/1 tiamin, %39 sucrose, %0.8 agar içeren ortamda kültüre alınmıştır. Trisomik bitkilerde önemli derecede rejenerasyon bakımından farklılığı görülmüştür. Diploid bitkilerde rejenerasyon açısından önemli farklılığı görülmemiştir. TR5 ve TR6 trisomik bitkilerinde çok sayıda, ancak zayıf bitki elde edilmiştir.

Haque ve Khanom (1993), farklı mercimek eksplantlarını (meristematik uç, epikotil, kotiledon boğumu, kotiledon ve olgunlaşmamış embriyo) kullanarak direkt veya kallus yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu üzerinde çalışmışlar yapmışlardır Araştırmacı farklı temel besin ortamları ile BAP, Kinetin ve NAA hormonların farklı konsantrasyonların

epikotil, kotiledon boğumu ve kotiledon eksplantları üzerinde sürgün rejenerasyon etkileri araştırmışlar. Elde edilen sonuçlarına göre 1.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l Kinetin ve 0.25 mg/l NAA içeren 1 × MS besin ortamında kalluslar üzerinde düşük oranda meristematik uç ve olgunlaşmamış embriyodan çok sayıda adventif sürgün elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı %, 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l Kinetin ve 0.2 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamında meristematik uçlardan elde edilmiştir.

Burke (1993), monogerm şeker pancarlarının *in vitro*'da çoğaltımları ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. MS ortamına eklenen IAA, NAA, BAP, 2,4-D ve TIBA ile elde edilen 2 haftalık fidelerden alınan sürgünler kotiledonların üzerinden kesilip çıkartılmış ve 0,3 mg/l içeren ortama yerleştirilmiştir. Yüksek oranda kallus verimi 2,4-D ile elde edilmiştir. Bu seviyeye 1mg/l kinetin veya BAP ile kombinasyon oluşturan NAA ile de ulaşılabilirken daha sonra yapılan çalışmalarda kök oluşumu da gözlenmiştir.

Zhong ve ark. (1993), şeker pancarında adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleştirmek için yaprak sapı eksplantlarını kültüre almışlardır. Yapılan bu çalışmada 6 çeşit üzerinde BAP, NAA ve farklı dozlarda sukroz denenerek en iyi sonuç araştırılmıştır. Neticede; % 3 sukroz ile 1 mg/l BAP içeren MS ortamından en yüksek sürgün rejenerasyonu elde edilirken, % 3 sukroz ve 1 mg/l NAA içeren yarı MS ortamının kullanılmasıyla en yüksek köklenmenin elde edildiği bildirilmiştir.

Barna ve Wakhlu (1994), olgunlaşmamış nohut (*Cicer arietinum L.*) yapraklarından oluşan kalluslardan organogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. En iyi kallus oluşumunu, 10 µM NAA ve 5 µM BAP içeren besin ortamından elde etmişlerdir. Epikotil eksplantlar için en iyi sürgün rejenerasyonu ortamının ise 10 µM BAP ve 0.1 µM IBA içeren 1 × MS besin ortamı olduğu bildirilmiştir. En iyi kök oluşumunu ise, 1 µM IBA içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Köksoy (1995), kallus kültürlerinin diğer organ kültürlerinden farklı olarak parankimatik dokuların hormon kapasitelerine sahip olmamaları nedeniyle hormona ihtiyaç duyduklarını bildirmişlerdir. Bu amaçla, bitki büyümeyi düzenleyicilerinden 2,4-



D, NAA ve IAA kullanılmıştır. Bu hormonların kallus gelişiminin ve hücre bölünmesinin teşvik edilmesinde esas rol oynayan faktörler olduğu bu çalışma sonucunda ifade edilmiştir.

Ghanem (1995), yaptığı çalışmada, kallus ve sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçlar, 0.5 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l Kinetin içeren 1 × MS ortamından elde etmiştir.

Krens vd. (1996) bu çalışmada inatçı şeker pancarı bitkisinde hücrel rejenerasyon ve genetik transformasyon yetkinliği incelenmiştir. *Agrobacterium* aşılama için eksplantlar olarak kotiledon ve hipokotil sapı arasındaki geçiş bölgesinden seçilmiştir. Adventif sürgünlerin *de novo* rejenerasyon oranı %60-70 olarak izlenmiştir. Fazla sitokinin kullanarak rejenerasyon oranı artılamamıştır. Eksplantlar üzerinde direkt sürgün rejenerasyon gözlenmiştir. 2,4-D muamele sonucu transformasyon frekansı da artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, eksplantlar NAA ile ön-muamele üzerine kendi rejeneratif kapasitesinin korumuşlardır. Burada tarif edilen prosedür kullanılarak, şeker pancarı bitkilerinde %1 frekans ile 250 mg/l kanamisin üzerinden seleksiyon yapılmıştır.

Polanco ve Ruiz (1997), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış mercimek tohum eksplantlarını, 30 g/l sukroz ve farklı BAP, Kinetin, GA3, IAA ve NAA içeren 1 × MS besin ortamında 25° C ve 16 saatlik fotoperiyotta çimlendirmeye bırakmışlardır. Tohum eksplantlar, 4, 8 ve 4+4 (4 hafta 1 × MS ve 4 hafta 1 × MS + BAP, Kinetin, GA3, IAA ve NAA) hafta çeşitli BAP, Kinetin, GA3, IAA ve NAA konsantrasyonları içeren 1 × MS besin ortamında çimlendirilmiştir. Yaklaşık 4 hafta sonra, 2.25 mg/l BAP içeren 1 × MS besin ortamında % 25 oranında kallus oluşumu gözlenmiş olup, 0.25 ve 2.25 mg/l BAP içeren besin ortamında çok sayıda sürgün uçları elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre 0.225 mg/l BAP veya 1 × MS ortamında köklendirilmiştir. Araştırmacılar BAP'ın *in vitro* koşullarda köklenmeyi olumsuz yönde etkilediğini vurgulamışlardır.

Gurel ve Wren (1995a) Şeker pancarı bitkisinin Primo çeşidinin yaprak ve yaprak sapı eksplantından NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyon ve daha sonra kök oluşum elde

edilmiştir. Sürgün rejenerasyon ve kök oluşumunu scanning elektron mikroskopi ve ışık mikroskopi ile incelenmiştir. İncelenme sonucunda rejenerasyonunun iletişim borularına yakın meristematik primoordiyum hücrelerden olduğunu ve daha sonra çoğaltılan intrafascicular cambium bölgelerinden devam getirdini izlenmiştir. Primordiyumların oluşum eksplantların kültüre alındıktan 4 gün ve kök oluşum 6 gün sonra izlenmiştir. Kök oluşum için en az 24 saat NAA muamelesi uygun görülmüştür. Köklendirme ortamda 4 günlük bekletme olumlu ve 5 - 10 bekletmesi olumsuz etkileri bırakmıştır.

Gurel ve Wren (1995b) yaptığı bir çalışmada şeker pancanndan (*Beta vulgaris* L.) alınan küçük yaprak disklerinde (8 mm), polifenol oksidaz (PPO) aktivitesini ölçmek için güvenilir bir metot geliştirildi. Fenolik bir adsorbant olan PVPP (polyvinyl polyprolidone)'nin kullanılmasıyla PPO aktivitesinde önemli artışlar sağlandı ve PVPP'nin etkinliği de uygulandığı aşamaya bağlı olarak değişti. Enzim, 20-35 °C arasındaki sıcaklıklara duyarlı gözüktü ve en yüksek reaksiyon oranı pH 7.0 de elde edildi. Geliştirilen metodun tekrarlanabilirliği yapılan bir ön denemeyle teyit edildi.

Gurel (1996) bir çalışmada pancar (*Beta vulgaris* L.) yaprak örnekleri *in vitro* kültüründe daha önceki denemelerinden materyaller arasında gözlenen varyasyonlar incelenmiştir. Bu çalışmada çeşit, bitki, organ olarak farklı seviyelerde 10 adet ticari pancar çeşidine ait yaprak eksplantların kök oluşumunu kapistesei bakımından karşılaştırıldığında büyük farklılıklar ortaya çıkmıştır. Aynı çeşidin farklı bitkiler içerisinde bitkiler arası ve birki içi yaprakları içerisinde önemli farklılıkları görülmüştür. Fakat, yaprakın farklı bölgelerinden alınan örnekler benzer sonuç vermişlerdir. Primo şeker pancarı çeşidine ait bir popülasyon da polifenol oksidaz aktivitesi yönünden iki kat daha fazla varyasyon gözlenmiş. Fakat enzim çalışması için kullanılan aynı yapraklardan alınan örneklerin kültüre alınması ile yapılan karşılaştırmada her ne kadar siyahlaşma oranı ile kök oluşturma kapasitesi arasında zayıf bir negatif ilişki belirlendiği se de enzim aktivitesi ile kök oluşum veya eksplant dokusunun siyahlaşması arasında bir ilişki gözlenmedi.

Toldi ve diğ. (1996) in vitro bir koşullarda şekerpancarı (*Beta vulgaris* L.), ince uzun epicotyls ince tabakayı eksplantı olarak kullanılmıştır ve hızlılı çoğaltım için bir yöntem geliştirmişlerdir. Araştırıcılar şeker pancarının karanlıkta ve 0,2 mg/1 BAP, 2 mg/1 GA3 ve 0.1 mg/1 IAA içeren besin ortamında kùltür sonucu uzayan epikotillerini 5-8 mm uzunlukta, 2-3 mm genişlikte ve 0,8-1 mm kalınlığında keserek, 1 mg/1 BAP ve 1 mg/1 TIBA içeren ortamlarda kùltüre almışlar ve bu paręalardan eksplant başına 6,3 adet adventif sürgün elde edilmiştir.

Araştırıcılar, 14-günlük fidelerin bozulmamış epicotyls kotiledon üzerinde hipokotillerinden eksplantları 0.2 mg/1 6-benzyladenine, 0.2 mg/1 gibberellic acid and 0.1 mg/1 indole-3-acetic acid içeren De Greef ve Jacobs ortamına karanlıkta kùltüre almışlardır. Daha sonra, 5-8 mm uzunluğunda 2-3 mm genişliğinde ve 0,8-1,0 mm kalınlığında teğet kesitler yarıya epicotyls dış kısımlarından uzunlamasına hazırlanmıştır. Bu ince tabaka eksplantlar çeşitli büyüme düzenleyiciler ihtiva eden hızlı çoğaltım ortamı üzerinde inkübe edilmiştir. En fazla sürgün oluşumu 1,0 mg/1 BAP ve ve 2,1 mg/1 TIBA içeren ortamına hızlı çoğaltım amacıyla alınmıştır. En fazla  $6,3 \pm 0,2$  mikro sürgün 1.0 mg/1 Tiba içeren ortamdan elde edilmiştir.

Roussy et al. (1996). bu ęalıřmada eksplantları sera koşullarda 3 mg/1 TIBA ile ön muamele ederek kallustan sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir. Kontrol bitkilerde sürgün oluşum gözlenmemiştir. Protkol kullanarak 100lerce bitki oluşturuldu. Ekplant başına sürgün sayısı incelediğinde her alt kùltürde sürgün oluşumda azalma gözölmüştür. En iy sürgün rejenerasyon 0.1 mg/1 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1 mg/1 N-6 benzylaminopurine veya 2.2 mg/1 thidiazuron içeren ortamdan elde edilmiştir. Ancak, TIBA ile muamele edilmiş eksplantların TDZ ile muamele sonucu çok sayıda sürgün elde edilmiştir. TIBA ile muamele edilmiş ve edilmemiş bitkiler arasında bir kiyaslama sonucu TIBA ile muamele edilmiş bitkilerde fazla miktarda peroksidaz aktivitesi bulunmuştur.

Grieve vd. (1997) yaptığı bir ęalıřmada ęalıřmada 6 elit pancar (*Beta vulgaris* L.) çeşitlerin petiol eksplantından rejenerasyon elde edip bitki elde edilmiştir. ęalıřmada

genotip, BAP konsantrasyonları ve yüksek sıcaklığı muamelesinin pancar bitkisinin rejenerasyonunda önemli şekilde etki yaptığını izlenmiştir.

Yıldız ve ark. (1997), şeker pancarının *in vitro* rejenerasyon kabiliyetini önemli ölçüde düşüren eksplant kararmasının ortadan kaldırılması için yaptıkları araştırmada, farklı şekillerde yetiştirilen şeker pancarı fidelerinin kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırma sonucunda; steril fidelerden alınan eksplantlar kültürden önce steril edildiğinden kararmanın kullanılan dezenfektan ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, ortamda bulunan şeker konsantrasyonunun düşürülmesinin eksplantlardaki kararmayı azalttığı ifade edilmiştir.

Çolak ve Tokur (1999) Bu çalışmada *Beta vulgaris* L.cv. KWSTR-239 (şeker pancarı) tohumlarının *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi sonucu elde edilen hipokotil eksplantlarının Murashige-Skoog temel besi ortamlarında, bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin organogenetik etkilerine bağlı olarak adventif tomurcuk verme ve sürgün rejenerasyon etme imkanları araştırıldı. Çalışmada oksin olarak Naftalenasetik asit (NAA) ve 2,4- Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), sitokinin olarak Kinetin (K) ve 6-Benzilaminopurinin (BAP) 8 farklı kombinasyon ve konsantrasyonu kullanıldı. Neticede *Beta vulgaris* L.cv.KWSTR-239 (şeker pancarı) hipokotil eksplantlarının adventif tomurcuk verimi ve sürgün rejenerasyonunda en etkin oksin-sitokinin kombinasyonu NAA-BAP olarak belirlendi. Bunu NAA-K kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar izledi. Ancak 2,4-D-K kombinasyonu içeren besi ortamlarında kültüre alınan hipokotil eksplantlarında, birbirini takip eden üç alt kültür gerçekleştirilmesine rağmen hiçbir zaman organogen faaliyetlere tanık olunamadı.

Altunok (2002) Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarlarında 1999-2001 yılında yürütülmüştür. Çalışmada farklı dozlarda BAP, NAA ve IBA kullanılarak ELK345, ÇBM 315 ve M114 hatlarına ait petiol ve yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyon belirlenmiştir. ELK 345 hattına ait petiol eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonu kapasitesi (%15.00) 2mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA ve 10 g/l sukroz içeren MS ortamında elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu ÇBM 315 hattına ait petiol eksplantından (%9.66) 1 mg/l BAP ve 0.2

mg/l NAA içeren MS ortamına yerleştirilen M114 hattına ait petiöl (%96.17) eksplantlarından elde edilmiştir. M114 hattına ait yaprak eksplantlarında ise yüksek oranda (91.81%) nekroz görülmüştür. Bununla birlikte kahvernegileşme petiöl eksplantlarında daha fazla olmuştur.

Khawar vd. (2004), mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) mercimek çeşitlerinden Ali Dayı ve Kayı-91 çeşitlerine ait yaprak, gövde, gövde boğumu ve kotiledon boğum eksplantları farklı oranlarda TDZ içeren 1 × MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Kotiledon ve gövde boğumlarından, başlangıç kallus gelişimini takiben organogenesis aracılığıyla adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Yaprak ve gövde eksplantlarında ise kallus ve sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Her iki çeşitte de en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.25 mg/l TDZ içeren 1 × MS besin ortamlarında kotiledon boğumlarından elde edilmiştir. Elde edilen 10-20 mm uzunlukta sürgünler 0.25 mg/l IBA içeren 1 × MS ortamında köklendirilmiş ve köklenen sürgünler son olarak kum içeren saksılara aktarılmıştır.

Altunok ve Er. 2013. Bu çalışmada; farklı dozlarda benzil amino pürin (BAP), naftalen asetik asit (NAA) ve indol-3-bütirik asit (IBA) kullanılarak şeker pancarı (ELK 345, ÇBM 315 ve M 114) hatlarına ait petiöl ve yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu ve kararma kapasiteleri belirlenmiştir. Petiöl eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyon kapasitesi (% 15,00) 2 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA ve 10 g/l sukroz içeren MS ortamına yerleştirilen ELK 345 hattına ait eksplantlarda elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu 0,5 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren MS ortamına yerleştirilen ÇBM 315 hattına ait petiöl eksplantlarında (% 9,66) tespit edilmiştir. Maksimum kararma 2 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA içeren rejenerasyon ortamına yerleştirilen M 114 hattına ait petiöl (% 96,17) eksplantlarından elde edilmiştir. M 114 hattına ait yaprak eksplantlarında da yüksek oranda (ort. % 91,81) kararma görülmüştür. Bununla birlikte kararma petiöl eksplantlarında daha fazla olmuştur.

Chun-Lai vd (2004) bir şeker pancarı germplazm geliştirmek amacıyla ileri doku kültür teknolojisinin uygulanması gerekmektedir. Bu çalışmada SDM 3, 5, 8, 9, 10, 11, HB 526, ve CMS 22003 ile Roberta ve Gala ticari şeker pancarı çeşitlerin

kotiledon, hipokotil, kök/hipokotil/sürgün geçit bölgesinin dokuları, ve yaprak lamina ve petiol dan oluşan kallus eksplantların adventif sürgün rejenerasyon oluşum yeteneğini incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre genotip ve kullanılmış hormonları oranları kallus indüksiyon ve adventif sürgün rejenerasyonuna önemli etkilenmiştir. SDM 11, 5, ve 9hattına SDM 3 ve 10 hattının kotiledon ve hipokotil explantlardan BA ile 2,3,5-triiodobenzoic acid ve 2,3,5-triiodobenzoic acid ve ya 1-naphthaleneacetic acid (NAA) içeren ortamda daha fazla sayıda sürgün elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre SDM 9, 10 ve HB 526 hatların hipokotil-kök veya hipokotil-sürgün geçiş bölgesi dokusundan BAP içeren 1 × MS ortamdan %25 oranda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. SDM3 ve 9 hattının yaprak explantından da BAP ve NAA içeren ortamda da kallus ve daha sonra adventif sürgün rejenerasyon elde edilmiştir. SDM10 ve CMS 2003 hatlarında yalnız BA içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir.

Nourouzi vd (2005)'nin yaptığı çalışmalarına göre şeker pancarı bitkisinde tekralanabilir transforasyon protokol yoktur. Araştırmacılar farklı eksplantlarıyla transformasyon yapmaya çalışmışlardır. Araştırma sonucunda yaprağın ana damara yakın hücreleri genetik transformasyon için en uygun hücre olarak değerlendirilmiştir.

### **2.3 Gen Aktarım ile İlgili Bazı Çalışmalar**

Hussey vd (1989), bezelye dokularının meristem uçlarını *Agrobacterium tumefaciens* (C58 ve Ach 5) ve *A. rhizogenes* (9402)'in yabani hatları ile inokule etmiş olup, tümör ve saçak kök oluşturduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, meristematik dokuların *A. rhizogenes* ile mumle sonucunda çok sayıda saçak kök elde etmişlerdir.

Genga vd (1990), fasulye bitkisinin *Phaseolus vulgaris* ve *Phaseolus coccineus* türlerinde onkogenik *A. tumefaciens* hatlarıyla transformasyon çalışması ile iki genotipte tümör oluşumu gözlenmiştir. Ancak tümör oluşma frekansı, tümör çapı ve

bitki türlerine bağılı olarak değişmişlerdir. Bitkilerde NPTII transformasyonu PCR ile teyid edilmiştir.

Pounti-Kaerlas vd (1990), bezelye bitkisine *A. tumefaciens* aracılığıyla bazı markör genleri (NPTII, HPT-II) aktararak higromisin ve kanamisin antibiyotiğine dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada sap ve epikotil eksplantları kullanılmıştır. Transgenik kalluslar 15 mg/l higromisin ve 75 mg/l kanamisin içeren besin ortamında seçilmiştir. Higromisin içeren besin ortamında çok az sayıda sürgün elde edilmiştir. Ancak, kanamisin içeren besin ortamında ise hiç sürgün elde edilememiştir. Rejenere olan sürgünler köklendirilerek gelişen bitkicikler seraya aktarılmıştır. PCR analizi ile kallusların ve bitkiciklerin transgenik olduğu ispat edilmiştir.

Ehlers vd (1991) yaptığı bir çalışmada transgenik pancar köklerde pancar necrotik sarı damar virus (BNYVV) coat protein virüs aracılığıyla gen aktarak pancar necrotik sarı damar virus (BNYVV) coat protein'a karşı direnç kazandırılmıştır. CP genin için cDNA ve 5 terminal untranslated lider sekans BNYVV RNA 2 adet oligodeoxynucleotides den oluşturulmuş her iki strand nın primer sentesis yapılmıştır. cDNA 2. Strand sentez ve amplifikasyon Taq DNA polimeraz ile yapılmıştır. Elde edilen immunoaktif CP den klonlanmış cDNA sekans transkripsiyon elde edilen immunoaktif CP translasyon edilmiştir. CP geni Lahana mozaik virüs ve 35 S promotor ile kontrol edilen virüs konulmuştur ve *Agrobacterium rhizogenes* vasıtasıyla pancar dokuların transformasyon yapılmıştır. Pancar saçak köklerde dokularında kalıcı ekspresiyon ve entegrasyon için Northern ve Western blot anlizisi yaparak transformasyonunu teyid edilmiştir.

Lülsdorf vd (1991), yaptıkları çalışmada, bazı *A. tumefaciens* hatlarıyla (EHA 101 ve LBA 4404) bezelye (*Pisum sativum* L.) uç meristemlerini inokule ederek, 2, 3 ve 4 gün süreyle ko-kültivasyona bırakmışlardır. *A. tumefaciens* EHA 101 (pB 11042) hattı ile inokule edilen eksplantlar, en yüksek oranda kallus oluşturmuştur. Bu hatla inokule edilen eksplantların % 76'sı kanamisin (50 mg/l), % 77'si ise higromisin (25 mg/l) içeren besin ortamında kallus oluşturmuştur. Buna karşılık, LBA 4004 hattı ile inokule

edilen eksplantların %63'ü higromisin, % 17'si kanamisine dayanıklı kallus oluşum görülmüştür.

Warkentin and Mc Hughen (1992), mercimek sap ucu, epikotil ve kök eksplantlarını GV 2260 p35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inoküle etmişlerdir. İnoküle edilen epikotil ve kök eksplantlarında yaklaşık 9 gün, sap uçlarında ise 17 gün sonra GUS ekspresyonu gözlenmiştir.

Fontana et al. (1993), nohut apikal meristemlerini LBA4404 (NPTII ve GUS geni içeren) bakteri hattı ile inoküle etmişlerdir. Ko-kültüvasyondan sonra eksplantları kanamisin içermeyen ortamda 3 hafta tuttuktan sonra 50 mg/l kanamisin içeren ortama alarak transgenik adayı sürgünleri belirlemişlerdir. Kanamisin içeren ortamda köklenme olmadığı için köklendirme işlemini kanamisin içermeyen ortamda gerçekleştirmişlerdir. Transformasyon frekansını %4 olarak belirlemişlerdir.

Schroeder vd (1993), pMCP3 plazmid vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* aracılığıyla bürülceden izole edilen A1 geni bezelyeye aktararak bezelyede alfa amilaz sentezi engellenmiştir. A1 geni, T5 jenerasyonuna kadar gösterilmiş ve kullanılan bu yöntemle mercimek bitkisine gen aktarabileceği ortaya konmuştur.

Stewart vd. (1996), kolza (*Brassica napus*)'da cryIAc (35S promotörü tarafından kontrol edilen) geni içeren *A. tumefaciens* ile gen aktarımı yapmışlardır. 57 adet transgenik adayı bitkide Southern analizi sonucunda transgen kopya sayısını 1-12 arasında belirlemişlerdir. Toplam çözünebilir protein içerisinde ekspresyon seviyesini % 0-0.4 arasında olduğunu gözlemişler. Bu bitkilerin *Plutella xylostella* ve *Trichoplusiani*'ye karşı tamamen dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

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



Grant vd. (1995), olgunlaşmamış kotiledonları kullanarak *A. tumefaciens* aracılığıyla bezelyeye gen aktarmışlardır. Bolero, Trounce, Bohatyr ve Huka bezelye çeşitlerinden transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Kullanılan *A. tumefaciens* hattının plazmidinde, fosfinotrisin ve kanamisine dayanıklılığı kodlayan NPTII ve bar genler bulunduğundan, transgenik bezelye bitkilerinin seleksiyonu, 10 mg/l fosfinotrisin içeren besin ortamında yapılmıştır. Ayrıca, transgenik bitkilerde fosfinotrisin asetil transferaz enzim testi yapılarak BAR geni tespit edilmiştir.

Hall vd. (1996) bu çalışmada şeker pancarı bitkisinin stomatal guard cell protoplastlarına PEG kullanarak bialopfos (pat geni) dirençli DNA transformasyon tekniği geliştirmişlerdir. Transgenik bitkilerin çoğunu 8-9 haftada elde edilmiştir. Genom karakterizasyon ile transgen entegrasyonunu teyid edilmiştir ve projeni analizi ile mendelian segregasyon izlenmiştir.

Cheng vd. (1998), 9 farklı çeltik genotipinde *A. tumefaciens* ile Chilo supressalis 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.

Cho et al. (1998), yaptıkları çalışmada *Agrobacterium rhizogenes* ile Çin gevenine (*Astragalus sinicus*) gen aktarımını başarmışlardır. Çalışmada kullanılan pB121 binari vektörünü taşıyan DC-AR2 *A. rhizogenes* ırkı, plazmidinde GUS aktivitesini kodlayan uidA genini içermektedir. Gen aktarımı, mikimopin ve histokimyasal GUS analizi ile belirlenmiştir. *In vitro* da çimlendirilen bitkiciklerin oluşan kökleri, DC-AR2 *A. rhizogenes* ırkı ile inoküle edilmiştir. Enfeksiyondan 15 gün sonra test edilen köklerin

%46'sı GUS pozitif bitkileri bulunmuştur. Daha sonra GUS aktivitesi gösteren bitkiler Southern Blot analizi ile teyit edilmiştir.

Datta vd. (1998), çeltikte değişik promotorların cryIAb geni ekspresyon seviyesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla 35SCaMV ve Actin -1 ile doku spesifik PEPC (pepcarboxylase) promotor kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre 35S promotoru Actin-1'den daha etkili bulunmuştur. PEPC promotoru kullanılarak elde edilen bitkilerde cryIAb proteini seviyesi konstitütif promotorlarla karşılaştırıldığında oldukça etkili sonuç elde etmişlerdir. Elde edilen 800 adet bitkiden 81 adet bitkisinde Scirpophaga incertulas larvalarına karşı dirençli olduğunu tespit edilmiştir.

Gürel ve Gürel (1998) bu çalışmada, ankara şeker enstitüsünde geliştirilen diploid erkek kısır bir şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) islah hattından alınan döllenmemiş yumurtalıklardan elde edilen bitki rejenerasyonuna ait yöntem tanımlanmıştır. Yumurtalık eksplantları, 2.0 mg/l benzilaminpürin (BAP) içeren Murashige & Skoog (1 × MS ) ortamında kültüre alınmıştır. İki farklı muamele denenmiş olup; eksplantaların tamamı 15 gün karanlıkta tutulduktan sonra, yarısı normal (i) ışık ortamına aktarılırken, diğer yarısı da bütün kültür boyunca (ii) karanlık ortamda bırakılmıştır. Her iki ortamda kültüre alınan eksplantlarda aşağı yukarı aynı oranlarda kallus oluşmuştur. Ancak, muameleler arasında eksplantaların sürgün-oluşturma kapasiteleri bakımından önemli farklar meydana gelmiş olup; karanlıktaki ön inkübasyon döneminden sonra ışığa aktarılanlar, sürekli karanlıkta tutulanlara göre daha fazla sayıda sürgün oluşturmuştur (% 14.6'ya karşın % 4.2). Ayrıca, eksplantların kallus ve sürgün-oluşturma kapasiteleri arasında ters orantılı bir ikili gözlenmiştir. Sürgünler 2.0 mg/l naftelenasetik asit (NAA) ve 2.0 mg/l gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) içeren 1 × MS ortamına aktarıldıklarında, iki hafta içerisinde köklenme başlanmıştır. Elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri rejenerantların yaprak örneklerinde yapılan kromozom sayımları ile belirlenerek, elde edilen bütün bitkilerin diploid olduğu gözlenmiştir.

Gebhard ve Smalla (1999) bir çalışmada Rizomania'ya dayanıklı pancar (*Beta vulgaris*) bitkilerin den bakterilere yatay gen aktarım incelemek amacıyla bu çalışmalarını yürütülmüştür. Transgenik bitkilerde kanamisine dayanıklı nptII geni ve glufosinat

ammoniyum'a karşı dirençli genleri bulunmuştur. Her genin toprak ve bakterilere transferi kontrol edebilmesi için spesifik ve hassas primerler kullanılmıştır. Toprak örnekleri analiz yapmak amacıyla bakterileri selektif ve selektif olmayan ortamlarda kültüre alınmıştır. Toplanmış transgenik DNA analiz etmek amacıyla elde edilen DNA ekstraksiyon dan sonra spesifik primerler kullanarak analizi yapılmıştır. Deneme sonucunda 2 yılına kadar hem çevredeki toprak hemde bitkilerde bakteri genin varlığını tespit edilmiştir. Konstrukt spesifik sekans dot blot analizi ile tespit edilememiştir.

Gürel ve Kazan (1999) bir çalışmada , 10 ayçiçeği ( *Helianthus annuus* L.) genotipinin, reporter bir genin (GUS) ekspresyonunun belirlenmesine dayanan *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen transferine uygunluğu değerlendirilmiştir. Sürgün-ucu eksplant tipi (bölünmüş/split ve bölünmemiş/intact), bakteri suşu/binary vektör kombinasyonu ve bölünmemiş sürgün-ucu eksplantlarının partikül bombardımanı ile yaralanması gibi faktörler incelenmiştir. Transformasyon etkinliği bakımından genotipler arasında önemli farklılıklar gözlenmiş, ortalama %GUS pozitif eksplant oranları %0.0 ile %82.7 arasında değişmiştir. Hibrit genotipler, kendilenmiş hatlara göre *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı daha duyarlı olmuşlardır. Bölünmemiş (intact) eksplantlarla karşılaştırıldığında, bölünmüş (split) sürgün-ucu eksplantlarının kullanılması, transformasyon etkinliğini artırmazken AGL-1/pKIWI suş/vektör kombinasyonunun, LBA4404/pTOK233 kombinasyonuna göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Eksplantların, *Agrobacterium* ile inoküle edilmeden önce partikül bombardımanı ile yaralanmasının ise transformasyon üzerine herhangi bir olumlu etkisi görülmemiştir.

Şeker pancar bitkisinin primo çeşidinde 30 mg/l-naphthalene acetic acid içeren ortamda lamina ve prtiol nodu eksplantından kök oluşumu scanning elektron mikroskopi ve ışık mikroskopi ile incelenmiştir. Primordileri iletişim borularına yakın yerde meristematik hücre çoğaltılan intrafascicular cambium bölgelerinde izlenmiştir. Primordial oluşum kültüre alındıktan 4 gün ve kök oluşum 6 gün sonra izlenmiştir. Kök oluşum için en az 24 saat NAA muamelesi uygun görülmüştür. Köklendirme ortamda 4 günlük bekletme olumlu ve 5-10 bekletmesi olumsuz etkileri bırakmıştır.

Yılmazlar (1999), korunga, çayır üçgülü ve İskenderiye üçgülünün kotiledon, hipokotil, kök, gövde ve yaprak eksplantlarını *in vitro* gelişen bitkiciklerden izole ederek A281 ve A136 NC *Agrobacterium tumefaciens* hatlarıyla inoküle etmiştir. İnokülasyondan 6 hafta sonra çayır üçgülü eksplantlarının hiçbirinde tümör oluşumu gözlenmemesine karşı kullanılan korunga ve İskenderiye üçgülü eksplantlarında yüksek oranda tümör oluşumu gözlenmiştir. Her iki bitkide de en yüksek tümör oluşumu A281 hattı ile inoküle edilen hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Hashimoto ve Shimamoto (1999). bir çalışmada bitki transformasyonda antibiyotik veya herbisitlere karşı dirençli genler içeren selektif markerler kullanılmaktadır. Ancak, selektif markerlerde de bazı sorunlar var. (1) Seleksiyon için ortama eklenmiş antibiyotikler bitki gelişmelerinde olumsuz etkiler bırakmaktadırlar (2) selektif marker genler ile çevreye olumsuz şekilde zarar vermektedirler. Bu çalışmada, sukroz enzimleri biyosentez ile sorumlu geni sucrose-phosphate synthase (SPS) (selektive gen içermeyen genleri) ile transformasyon çalışmaları yapılmıştır. Mısırdan elde edilen SPS geni çeltik Cab promotör etki altında şeker pancarı yaprak eksplantları vasıtasıyla bitkilere aktarılmıştır. Sonuç olarak, sukroz sentez aktivitesinde fazlalığı görülmüştür. Selektif marker siz pBSPS vektör partikül tabancasıyla şekerpancarı bitkisine aktarılmıştır. Elde edilen sonuçları PCR ve southern blot analizi ile teyid edilmiştir. 24 adet transformasyonuna uğramış bitkilerden 12 adet bitkisinde SPS genin varlığı ispat edilmiştir.

Ivic ve smigocki (2001) Bir patatin gen promotörüne kaynaşık bakteriyel sitokinin biyosentez geninin transformasyon ile şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) bitkisi incelenmiştir. Sonuçta İki bağımsız tip transformatörleri Karıncalar, 1 Pat-IPT ve 2 yaygın sitokininlerin tarafından uyarılan ayırt morfolojik değişiklikler, yani daha az kök büyümesi, azaltılmış yaprak yüzey alanı, ve artan aksiller sürgün gelişiminin bir dizi sergilenmiştir. Sitokininlerin zeatin ve zeatin ribosidden konsantrasyonları ana köklerinde de iki kat artarak 7- yapraklı aşamada 18 kat daha fazla olarak nitelendirilmiştir. Yaprak sukroz ve glukoz konsantrasyonları glukoz düzeyleri dokuz kat yüksek bulunmuştur Pat-ut 2'de dışında kontrol bitkilerinde olanlardan anlamlı bir

farklılık izlenmemiştir. Normal kazık kök gelişiminde ciddi inhibasyon görüldüğü için ana köklerinde sakaroz konsantrasyonu azalmıştır.

Kimoto ve Shimamoto (2001) bir çalışmada şeker pancarı bitkisinde Karnıbahar armyworm (*Mamestra brassicae*)a karşı, iki adet kristal protein (ICP)e sorumlu cry I A (b) veya cry I C ile beraber kanamisine karşı dirençli NPT II geni (selektif marker olarak) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla şeker pancarı bitkisine aktarılmıştır. Transformasyonuna uğramış bitkiler ICP genin varlığı PCR-Southern hybridization ile teyid edilmiştir. 14 adet cry I A ve 10 adet cry I C geni taşıyan transgenik ve transgenik olmayan bitkisine ait bitkilerin second-instar karnıbahar armyworm kurtlarına yedirilmiştir. Transgenik bitkilerinde yaprakları yedirilmiş kurtlar tarafından önemli seviyede ölüm görülmüştür.

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

Krishnamurthy vd (2000) tarafından 4 farklı nohut çeşidinin embriyo eksenleri GV 2260 p35GUS-INT ve EHA 101 Pib-GUS *A. tumefaciens* hatlarıyla inoküle edilmişlerdir. *A. tumefaciens* p353S GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlar, 0.5 mg/l BAP ve 100 mg/l kanamisin içeren 1 × MS besin ortamına, EHA101 *A. tumefaciens* hattı ile inokule edilenler ise 10 mg/l fosfinotrisin içeren 1 × MS ortamına aktarılmıştır. Bu ortamlarda rejenere olan transgenik aday sürgünlerde GUS geninin varlığı teyit edilmiştir. Transgenik aday sürgünlerin beş gün karanlıkta geliştirilen fideler üzerine aşı yapılarak olgunlaşmış bitkiler elde edilmiştir. Gen aktarımı Southern blot analizi ile teyid edilmiştir.

Hashimoto ve Shimamoto, (2001) bir çalışmada *R. solani* [*Thanatephorus cucumeris*] hastalığından gelişen fidecilik blight ve root rot infeksiyonuna karşı pumpkin chitinase gene şeker pancarı bitkisine aktarılarak transgenik bitki geliştirilmiştir. PCR ve

Southren hibridizasyon sonuçlarından elde edilen sonuçlarına göre bazı bitkilerde chitinaz genin varlığı Kayıd edilmiştir. Biyo assay sonuçlarında da transgenik bitkilerinde *R. solani* hastalığına karşı dirençliği görülmüştür.

Snezana ve Ivic-Haymes · ( 2005) bir çalışmada serada şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) bitkisinde partikle tabancasıyla transformasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada osmotin or proteinase inhibitor II gene promoter ile kaynatılmış *uidA* geni partikül tabancası kullanarak aktarılmıştır. Transformasyon olmuş kalluslardan %0.3 – 3.7 oranda gus pozitif bitkiler ele edilmiştir. Southern analizi ile transformasyon teyid edilmiştir.

Naimov vd. (2001), CryI delta endotoksinlerinin genellikle Lepidopterler üzerinde etki olduğunu bildirmişlerdir. Ancak cryIba ve cryIIa'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 SNI5(Ia/Ia/Ba), SNI6 (Ba/Ba/Ia) ve SNI9 (Ba/Ia/Ba) *L. decemlineata* karşı cryIIa ve cryIba'dan daha toksik bulunmuştur. SNI9 geni cryIIa'dan 7 defa, cryIba'dan 21 defa daha toksik bulunmuştur ve bu genin Coleopterlerle mücadelede cry3A'ya alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Gürel Vd. (2001) yaptığı bir çalışmada kallus üretimi için, farklı şeker pancar (*Beta vulgaris* L.) ıslah hatlarının fidelerinden alınan hipokotil, kotiledon, yaprak sap ve yaprak eksplantlar, BAP veya KIN ile NAA veya 2,4-Dnin 0.0, 0.5 veya 1.0 mg/l düzeyindeki kombinasyonların içeren 1 × MS ortamında kültre almışlardır. Her iki oksinin de 0.5 mg/l BAP veya 0.5 mg/l KIN ile kombinasyonlar, bütün eksplant tiplerinde daha fazla miktarda kallus oluşturmu fakat, bütün hatların ortalamalar dikkate alındığında hipokotil ve kotiledon eksplantlar yaprak sap ve yaprak eksplantlarından daha fazla kallus oluturmudur. Genellikle, iki tip kallus elde edilmiştir; büyük hücrelerden beyaz ve gevrek kallus (Tip I) ve küçük hcrelerden oluan yeşil ve yapılı kallus (Tip II) elde etmişlerdir.

Baloğlu, 2005. Kotiledon, hipokotil, yaprak sapı, yaprak ve sürgün ucu dokularının transformasyonu ve indirekt ve direkt organogenesis yolu ile rejenerasyonu incelenmiştir. Şeker pancarı çeşidi ELK 345'in indirekt rejenerasyonu için iki farklı çimlendirme, üç farklı kallus oluşturma ve sürgün oluşturma besiyerleri kullanılmıştır. Kotiledon dışında diğer eksplantlar (hipokotil, yaprak sapı ve yaprak) kallus oluşturmuştur. Fakat bu ekplantların kallışlarından sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Direkt organogenesis için şeker pancarı çeşidi 1195' in sürgün ucu dokusu kullanılmıştır. 0.1 mg/l IBA ve 0.25 mg/l BA kullanılarak direkt organogenesis yolu ile sürgün gelişimi başarılmıştır. Sürgün ucu dokusundan kök gelişimi ve yüksek oranda iklimlendirme başarıyla sonuçlandırılmıştır. Transformantların seçimi için gereken ideal dozu bulmak için tüm yaprak eksplantlarına farklı konsantrasyonda kanamisin ve PPT uygulanmıştır. 150 mg/l kanamisin ve 3 mg/l PPT tüm yapraktan sürgün gelişimini tamamen durdurmuştur. Ayrıca ELK 345 yaprak eksplantları için *Agrobacterium*'a dayalı transformasyon prosedürü, transformasyonu takip eden 3. günde *uidA* geni geçici ifadesi izlenerek optimize edilmiştir. Transformasyon prosedürünü geliştirmek için, farklı parametrelerin (vakum infiltrasyonu, bakteri büyütme besiyerleri, bakteri ile birlikte inokülasyon zamanı, *Agrobacterium* hatları ve ko-kültivasyon besiyeri içine L-sistein uygulanması) etkileri incelenmiştir. Vakum infiltrasyonu ve *Agrobacterium* ile transformasyon prosedürünü önemli bir şekilde geliştirmiştir. Çalışmanın başından itibaren, yaprak üzerindeki GUS ifade eden bölgelerinde üç kat artırış izlenmiştir.

Kishchenko vd. (2005) bu çalışmada vakum infiltrasyon kullanarak şeker pancarı (*Beta vulgaris L.*), bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyonu için bir yöntem geliştirilmiştir. İki diploid O-tipi şeker pancarı soylarının (KS3 ve KS7) aseptik 3-haftalık soluk fidelikler genetik transformasyonu için kullanılmıştır. Muhabir b- glukuronidaz geni taşıyan transgenik şeker pancarı bitkileri glufosinat amonyum herbisite dayanıklılığı nedeniyle seçilmiştir. Şeker pancarı genomu içine transgenlerin entegrasyonu, GUS deneyi ve PCR bar ve gus a genleri için primerler kullanılarak teyit edilmiştir.

Barik vd. (2005), *Lathyrus sativus* bitkisinde *A. tumefaciens* ile gen aktarımını etkileyen faktörleri (eksplant tipi, büyüme devresi, hücre yoğunluğu, inokülasyon zamanı, ko-

kültivasyon zamanı, bakteri hattı ve ön inkübasyon) araştırmışlardır. Bu amaçla p35S *GUS*-INT binary vektörünü içeren LBA4404 ve EHA 105 bakteri hatlarını kullanmışlardır. En yüksek transformasyon frekansını 4 gün ön inkübasyona süresi, 10 dk. 109 hücre/ml bakteri yoğunluğu ile inokülasyon, 4 gün ko-kültivasyon süresinden elde etmişlerdir. Bakteri hatları arasında transformasyon etkinliği bakımından bir farklılık bulamamışlardır. Transgenik bitkilerin seleksiyonu için en uygun kanamisin dozunu 100 mg/l, olarak belirlemişlerdir. T1 bitkilerinde 3:1 Mendel açılımı saptamışlardır.

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

Kumar and Rajam (2005), poliamin varlığının vir genleri ve T-DNA transferi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla diamin putrescine (PUT) ve triamin spermidine (SPD) kullanmışlardır. Bakteriler inokülasyondan iki saat önce SPD ve PUT ile inkübe edilmiştir. Bakteri olarak GV2260 bakteri hattı kullanılmıştır. 100 mg/l kanamisin içeren ortamda 7 gün süreyle kültüre alınan eksplantlarda histokimyasal *GUS* analizi yapılmıştır. Kontrol bitkilerinde *GUS* pozitif bitki oranı %70 bulunurken 1 mM PUT ile muamele edilenlerde %89.5, 1 mM SPD ile muamele edilenlerde ise %94 bulunmuştur. SPD'nin PUT'tan daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Sanyal vd. (2005), nohutta *cryIAc* genini kullanarak *A. tumefaciens* ile böceklere dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Transformasyon frekansını %1.12 olarak belirlemişler. T<sub>0</sub> ve T<sub>1</sub> bitkilerinde *CryIAc* protein miktarı 14.5-23.5 ng/mg olarak belirlemişler. Nohut bitkisinde 10 ng/mg'dan daha yüksek ekspresiyon seviyelerinde *Helicoverpa armigera*'ya karşı yüksek oranda koruma sağlamışlardır.

Zaidi vd. (2005), tütünde ST-LS1 (sap ve yaprak spesifik) promotörünün *cry2Aa2* geninin değişik dokulardaki ekspresyon seviyesi ile *Heliothis virescens* larvalarına karşı



etkisini araştırmışlardır. Toplamda 30 adet kanamisine dayanıklı bitki elde etmişler, bunun 27 tanesinin PCR sonuçları pozitif bulunmuştur. Southern hibridizasyonu sonucunda 2AST(A), 2AST(E), 2AST(F) ve 2AST(G) bitkilerinde sırasıyla *cry2Aa2* geni kopya sayısı 7, 2, 4, ve 1 olarak gözlenmiştir. Protein analizleri sonucunda yaprakta toplam çözünebilir protein içindeki toksin miktarını sırasıyla % 0.16, 0.21, 0.12 ve 0.03 iken, sapta sırasıyla %0.01, 0.012, 0.009 ve 0.004 olarak belirlemişlerdir. Biyoassay sonuçlarında ise, yaprakla beslenen larvalarda ölüm oranı % 100, sapla beslenenlerde sırasıyla %41, 44, 35 ve 22, kökte ise %1-5 olmuştur. Yeşil dokularda belirlenen bu değişik protein oranlarının, bitkiye zarar veren böceklerin devamlı toksine maruz kalma durumunda kazanacakları dayanıklılığa karşı engel oluşturabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Dita vd. (2006), baklagil bitkilerinin birkaç zararlıya karşı hassas olduğunu, verimde büyük kayıplara yol açtıklarını ve bundan dolayı zararlılara dayanıklılığı başarmada,  $\alpha$ -amilaz inhibitör genleri, proteaz inhibitör genleri, *Cry* genleri ve lektin genlerinin baklagillere transfer edilecek genler olduğunu bildirmişlerdir.

Samac (2006), *A. tumefaciens* kullanarak 9 ticari *Medicago sativa* çeşidinde transformasyon çalışması yapmıştır. Araştırıcı *GUS* ve *NPTII* genini taşıyan ikili vektörleri içeren 3 hat ile A208, A348, A281, A136 yabancı bakteri ırklarını kullanmıştır. 2 haftalık kök ve kotiledon eksplantlarını bakteriler ile inoküle etmiştir. Elde ettiği sonuçlara göre doku kültüründe bitki çeşidinin, bitki transformasyonunda bakteri ırkının yüksek oranda etkili olduğunu belirtmiştir.

Dang ve Wei (2007), soya fasulyesinde sürgün uçlarını 1 gün süreyle *KRYT1* (yardımcı plasmidinde *cryIAc*, *pta*, BAR genleri bulunan) *Agrobacterium* hattı ile inoküle ettikten sonra 5 gün süreyle 22 °C'de pH'sı 5.4 olan ko-kültüvasyon ortamında bırakmışlardır. Transformasyon fekansını %4.29 - %18 arasında belirlemişler ve T<sub>1</sub> bitkilerinin bir kısmının *Helicoverpa armigeraya* karşı dayanıklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Türk-şeker (2015) Değişik insektisitlerin pancar güvesi (*Scrobipalpa Ocellatella* Boyd.) üzerine etkililiklerinin araştırılması nematoda dayanıklılık geninin (*hs 1 pro1*)

*Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla şeker pancarına (*Beta vulgaris* L.) aktarılması hastalıklı ve hastaliksız alanlarda *Rhizomania*'ya dayanıklı ve normal şeker pancarı çeşitlerinin kalite düzeyleri, şeker pancarında cercospora yaprak lekesi hastalığının entegre savaşımı alternatif toprak işleme aletlerinin şeker pancarı verim ve kalitesine etkisi ve şeker pancarında ot mücadelesinde herbisit miktarını azaltma imkanları konulu araştırmalara 2006 yılında da devam edilmiştir.

Anonim 2015 “Hububatta Yabancı ot kontrolünde kullanılan bazı sulfonylurea grubu herbisitlerin kalinti seviyeleri ile müteakip şeker pancarına etkileri” ve “nematoda dayanıklılık geninin (*hsIproI*) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla şeker pancarına (*Beta vulgaris* L.) aktarılması” konulu araştırmalara 2009 yılında da devam edilmiştir. “Nematoda Dayanıklılık Geninin (*hsproI*) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla şeker pancarına (*Beta vulgaris* L.) Aktarılması” konularında Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi ile, “Şeker Pancarında cercospora yaprak lekesi hastalığının entegre savaşımı” konusunda A.Ü. ziraat fakültesi, bitki koruma bölümü ile ortaklaşa çalışılmaktadır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Bitki Materyali**

Çalışmada kullanılmış monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatları Ankara Etimesgut'da bulunan Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan tütün Maden 2421 tütün çeşidine ait tohumları Ege tarımsal araştırma merkezi İzmir'den temin edilmiştir.

Diamenta çeşidi Rhizomania (kök sakallanması) ve külleme hastalıklarına karşı dirençlidir. Şeker oranı yüksektir, kök verimi çok yüksek ve makinalı hasat için uygundur, Türkşeker Enstitüsü 2011 yılı resmi deneme sonuçlarına göre ortalama olarak; kök verimi 9,1 Ton/da ve şeker oranı %18,1'dir.

EMU 8 şeker pancarı baba hattı, poligerm/multigerm, Rhizomania hastalığına dayanıklı, kök verimi yüksek ve şeker varlığı normaldir.

SG 3 şeker pancarı anne hattı monogerm, Rhizomania hastalığına dayanıklı, kök verimi yüksek ve şeker varlığı yüksektir.

#### **3.2 Doku Kültürü Metotları**

##### **3.2.1 Besin ortamı ve kültür koşulları**

Denemelerde 1 × MS makro, mikro elementler ve vitaminleri (Murashige and Skoog 1962) ile % 3 sukroz ve % 0.65'lik agar (Duchefa) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında bidistile su kullanılmış olup, 1 × MS besin ortamlarına denemeler ihtiyaçlarına göre farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (Kinetin, TDZ, BAP ve NAA) ilave edilmiştir. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.8±0.1'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de

20 dk. tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı (3000 luks) altında 16 saat ışık fotoperiyodunda  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta tutulmuştur (şekil 3.1).



şekil 3.1 Beyaz floresan ışığı (3000 luks) altında 16 saat ışık fotoperiyodunda  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta kültürlerin alınması

### 3.2.2 Bitki büyüme düzenleyiciler

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  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de altı ay kadar saklanmıştır. Hormon dozları, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama sıcaklığı (°C)
<b>Sitokininler</b>		
BAP	1 N NaOH	+4
Kinetin	1 N NaOH	+4
TDZ	%96 etanol	+4
<b>Oksinler</b>		
NAA	etanol	+4
IBA	etanol	+4

Tüm kültürler beyaz floresans ışığında 16 saat ışık (3000 luks) 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 × 10 mm) ya da kültür kablari kullanılmıştır. Ortamların, kültür kablari ve saf suyun sterilizasyonunda 104 kPa basınç, 121 °C sıcaklıkta 20 dk ayarlı Hirayama markalı Japonya'da üretilmiş otoklavı 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 × 10 mm) da kullanılmıştır.

### 3.2.3 Tohumların *In vitro* koşullarda sterilizasyonu

Şeker pancarı tohumları düzensiz ve tırtıklı biçimine sahip kapalı sert kabuklu, perikarp (şekil 3.2) ve embriyo meyve/tohum kavitesi içinde bulunmaktadır.



Şekil 3.2 Şeker pancarı tohumların şematik görüntüsü (Anonim 2015f. değiştirerek)

Tohumların sert tırtıklı yapı dan dolayı hem çimlendirilmesi hemde yüzey sterilizasyon büyük güçtür. Şeker pancarı'nin EMU 8 poligerm, SG3 monogerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait tohumların yüzey sterilizasyonu için üç deneme yapılmıştır.

**Birinci** denemede, pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına ait tohumları sulfurik asit ile 80 dk muamele edilerek 3 × 3 dk saf su ile durulama yapılmıştır. Daha sonra, steril edilmiş tohumları, agar ile katılaştırılmış 1 × MS ortamına hem bulaşıklığı hemde çimlenmesine etki belirlemek için steril Petri kapları içerisinde 24°C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. Şeker pancarı tohumları kültüre aldıktan bir hafta sonra çimlenme yüzdesi ve bulaşıklığının oranı belirlenmiştir. Şeker pancarı tohumları 1 × MS besi ortamda 6 gün içerisinde hem karanlık hemde ışık altında çimlendirmeye bırakılıp, her gün kaç adet tohumun çimlenmesi gözlenmiştir.

**İkinci** denemede, Şeker pancarı'nin EMU 8 poligerm, SG3 monogermhatları ve Diamenta monogerm çeşidine tohumları ilk önce sulfurik asit ile 80 dk muamele edilip, 3 × 3 dk saf su ile durulama yapılarak, 60 dk %100'konsantrasyonda ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit - %5 NaClO içeren etken madde) ile belirtilmiş çeşitlerin tohumları steril edilmiştir. Steril edilmiş tohumları çamaşır suyunun etkileri uzaklaştırmak amacıyla 3 × 3 dk saf su ile durulanmıştır. Steril edilmiş tohumları çamaşır suyunun etkileri uzaklaştırmak amacıyla 3 × 3 dk saf su ile durulanmıştır ve steril Petri kapları içerisinde 24°Cde 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

**Üçüncü** denemede Şeker pancarı'nın EMU 8 poligerm, SG3 monogerm ve Diamenta monogerm çeşidine tohumları ilk önce sulfurik asit ile 80 dk muamele edilip, 3 × 3 dk saf su ile durulama yapılarak, 60 dk süre ile ticari çamaşır suyunun %100 konsantrasyonla yüzey steril edilmiştir. Steril edilmiş tohumları çamaşır suyunun etkileri uzaklaştırmak amacıyla 3 × 3 dk saf su ile durulanmıştır. Sülfürik asit ve çamaşır suyu ile muamele edilmiş tohumları daha sonra %3 BKK/PPM (Plant Preservation Mixture) içeren su içerisinde 12 saat bekletilmiştir. 12 saat bekletilmiş tohumları %3 sakkaroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılmış 1 × MS ortamına bulaşık oranları ve çimlenme oranı belirlemek için steril Petri kapları içerisinde 24°C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

### **3.2.4 Tohum canlılık testi**

Değişik bitki tohumlarının canlılık tespiti için Anonymous (1999)'un önerdiği 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit (TTC) yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada şeker pancarı tohumların kabuklarını materyel yöntemde yukarıda belirtilmiş gibi sulfuric asit ile muamele yaptıktan sonra bistüri ile keserek çıkartılmış olup, 24 saat 1mg/ml oranda hazırlanmış trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içinde oda sıcaklığında (24±1°C) karanlık ortam sağlayarak tohumların canlılık test edilmiştir.

### **3.2.5 Şeker pancarı tohumlarının *In vitro*'da çimlendirilmesi**

Şeker pancarı'nın EMU 8 poligerm, SG3 monogerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait tohumların yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının alınacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Tohumlar ilk önce sulfurik asit ile 80 dk muamele edilip, 3 × 3 adet safsu ile durulama yapılarak, ticari çamaşır suyunun (%5 NaClO - Sodyum hipoklorit içeren etken madde) %100 lik dozları ile belirtilmiş çeşitlerin tohumları 60 dk süre uygulamasıyla yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra, tohumlar steril saf su ile 3 × 5 dk durulanmıştır. Daha sonra tohumları %3 BKK/PPM (Plant Preservation Mixture) içeren su içerisinde 12 saat bekletilmiştir.

Steril edilen tohumlar yine steril Petri kapları içerisinde %3 sakkaroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılan 1 × MS besin ortamında 24°C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Şeker pancarı tohumları kültüre alındıktan bir hafta sonra çimlenme yüzdesi ve bulaşıklılığının oranı belirlenmiştir (Khawar 2001).

Daha sonra, monogerm Diamenta çeşidi ile EMU 8 poligerm baba hattı ve SG3 monogerm anne şeker pancarı hatına ait 9-10 günlük şeker pancarı fideciklerden elde edilen sap ve kotiledon yaprak eksplantları

- (1) Farklı oranda Kinetin + IBA içeren 1 × MS ortamına (5 adet konsantrasyon),
- (2) Farklı oranda BAP + 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamına (5 adet konsantrasyon)
- (3) Farklı ortamında 0.25 mg/l BAP + farklı oranda IBA içeren 1 × MS ortamına (5 adet konsantrasyon)
- (4) Farklı oranda TDZ içeren 1 × MS ortamına (5 adet konsantrasyon)

sürgün rejenerasyonuna alınmıştır.

### **3.2.6 Köklendirilmesi**

Rejenere olan sürgünler uygun boyu aldıktan sonra kesilerek steril Magenta veya Petri kutuları içinde 0.5 mg/l NAA ve 1.00 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamında köklendirilmiştir.

Köklenen bitkiler daha sonra iklim odasında tırf içeren saksılarda (şekil 3.3) yüksek nemde bir süre dış şartlarına uyum sağlanması için tutulmuştur.





Şekil 3.3 Köklenen bitkilerin iklim odasında tırf içeren saksılara aktarılmasından önce araştırıcı tarafından ön hazırlık yaparak saksıların tırf ile doldurulması

### 3.3 Genetik Transformasyon alışmaları

#### 3.3.1 Bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi

İstenilen *A. tumefaciens* suşlarının bireysel koloniler steril lup ile alındıktan sonra gerekli antibiyotikleri içeren nutrient broth (NB) (Sigma Aldrich Chemical Co, St Lo. Mo) bakteri büyütme ortamında 12 saat 28 C'de 150 devirde/ (rpm)'da inkübatörde. 1 ya da 2 gün süreyle çoğaltılmıştır. Bu kültürler daha sonra gen aktarımında kullanılmıştır. Yeniden bireysel koloniler elde edebilmek için 0.10 ml miktarda bakteri kültürü agarlı besin ortamı üzerine steril bir lupla yayılmış, bu kültürleri içeren Petri kutularını ters çevrilerek 28C'de inkübe edilmiştir.

### *Kısa Süreli Korunması*

Kısa süre için kullanılmak amacıyla istenilen *A. tumefaciens* suşlarının bireysel koloniler seçici antibiyotikler içeren 5-10 ml NB (Sigma Aldrich Chemical Co, St Lo. Mo) ortamında 12 saat 28 °C'de 150 devirde/ (rpm)'da inkübatörde çoğaltılmıştır. ve daha sonra, herhangi bir bulaşmayı önlemek için çoğaltılmış kültürleri streç film ile sarılmış, ters çevrilen Petri kutularında 4 °C'de 6 hafta korunmuştur. Bütün bakteriyel çalışmalar steril kabin içerisinde yapılmıştır.

### *Uzun Süreli Korunması*

Daha uzun süreli muhafaza işleminin yapılabilmesi için yukarıda belirtilmiş ve çoğaltılmış bakteri kolonilerden 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 canlılığı en az 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür (Draper vd. 1988).

### **3.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla şeker pancarına gen aktarım**

Denemeye alınan eksplantlardan en iyi rejenerasyon yüzdesini gösteren eksplant gen aktarma işleminde kullanılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens*'ın A281 pTiBo 542 non onkogenik GV2260::p35 GUS INT, 15834 PRGGbar, LBA 4404::pRGGbar, AoPR1 promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar hatları ile gen aktarımı işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Gen aktarımı denemelerinde bakteri materyali olarak kullanılan AoPR1 promotörün kontrolü altında cry1Ac genini içeren pTF101AoPR1AcBar hem böceklere hemde herbisitlere karşı dirençli geni taşımış olup, seleksiyon amaçlı kanamisine dayanıklılığı sağlayan *NPT-II* geni ve herbisitlere karşı dirençli bar geni taşımaktadır.

Bu ortamda gelişen kalluslar veya rejenre olan sürgünleri sürekli olarak kontrol altında tutularak aktarılan genlerin ekspresyonu (belirtileri) gözlenmiştir. Daha sonra gerekirse bitkilerin transgenik olup olmadığını belirtmek amacıyla Grant et al. (1995)'nin tarif ettiği gibi gus testi ve pcr testi yapılmıştır.

### 3.3.3 Antibiyotikler

Bakteri büyüme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler (0.22 $\mu$ ) kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40-45 °C'ye düşmüş olan ortamlara ilave edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 3.2 ve 3.3'de verilmiştir. GV2260 p35GUS-INT bakteri hatlı büyütülürken ortama 50 mg/l rifampisin, 50 mg/l kanamisin monosülfat eklenmiştir. Cry/Ac büyütülürken ise ortama 50 mg/l rifamisin ve 300 mg/l streptomycin ve 100 mg/l spectinomycin eklenmiştir.

Rifampisin metanol, kanamisin monosülfat 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, çözücüler ve saklama sıcaklıkları

Antibiyotikler/kimyasal maddeleri	Kullanım oranları (mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama sıcaklıkları (°C)
Rifampisin	50	25	Metanol/DMSO	-20
Kanamisin monosülfat	50	50	su	-20
Fosfinotrisin	2, 2.5	1	su	-20

Çizelge 3.3 Ko kültürasyondan sonra *A. tumefaciens*'in gelişimini engellemek için kullanılan geniş spectrumlu antibiyotiği, kullanım oranı, stok miktarı ve saklama sıcaklıkları

Bakteriostatik antibiyotik	Kullanım oranı (mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücü	Saklama sıcaklıkları (°C)
Doucid Pfizer*	500	100	Su	-20

### 3.3.4 Gen aktarılmış bitkilerin belirlenmesi

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

### 3.3.5 Histokimyasal GUS analizi

Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987)'in tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton × -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 %96lık etanolda yıkanarak mavi bölge/leri belirlenmiştir.

## 3.4 Polimeraze Zincir Resaksiyonu (PCR)

### 3.4.1 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. 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

banyosuna tüpler yerleştirilerek 40-60 dk. inkübe edilmiştir. 13000 rpm'de 7 dk. 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 dk. santrifüj edilmiş ve üst faz yeni tüpe alındıktan sonra üzerine 750 µl soğuk isopropanol eklenmiştir. Örnekler 1 saat 20 °C'de bekletildikten sonra 30 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant döküldükten sonra soğuk %70'lik etil alkolden 200 µl eklenmiş ve 5 dk. 7000 rpm'de yeniden santrifüj edilmiştir. İçindeki etanol dökülerek DNA peleti iyice kurutulmuş ve 50 µl TE eklenerek çözülmüştür. Elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır (şekil 3.4).



Şekil 3.4 Şeker pancarı'nin EMU 8, SG3 poligerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait Transgenik Aday bitkilerin transformasyon tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonun yürütülmesi

(a) Şeker pancarı bitkisinin DNA ekstraksiyon için vortex den önce EMU 8, (b) SG3 poligerm hatları ve (c) Diamenta monogerm çeşidine ait çeşitlerinin (d) disk örnekleri ezme amacıyla her ependorf tüp içerisinde 1'er demir bileynin eklenmesi (e) ezilmiş örnekler üzerinde DNA ekstraksiyon çözeltilerin eklenmesi ekstraksiyondan çözeltiler ve ezilmiş örneklerinin çalkalanması (f) santrifüj yapılması (g) Mikro santrifüj tüpler içerisinde izole edilmiş DNA (h) Aktarılmış geni ile ilgili primer eklenerek trans DNA amplifikasyonu (çoğaltılması)

### 3.4.2 Primer dizileri

Transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II, GUS genleri ile 35S promotor ve NOS terminatör dizileri PCR ile çoğaltılmıştır. Çizelge 3.4'de transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II, bar *GUS* genleri bölgelerinin çoğaltımında kullanılan primer dizileri görülmektedir.

Çizelge 3.4 PCR işleminde kullanılan primer dizileri

Hedef	Baz Dizilişi	Hedef Büyüklüğü
NPT-II geni	F- TGG ATT GCA CGC AGG TTC TC R-CAA GAA GGC GAT AGA AGG CG	750 bp
NPT-II geni	F- TTG CTC CTG CCG AGA AAG R- GAA GGC GAT AGA AGG CGA	459 bp
GUS geni	F- CTC GAC GGC CTG TGG GAC TTC R- CTT TCG GCT TGT TGC CCG C	1400 bp
bar	F: 5'-TGCACCATCGTCAACCACTA -3' R: 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGAA -3'	310 bp

### 3.4.3 PCR reaksiyon koşulları

3 µl DNA,

2.5 µl 10X PCR tamponu,

3 ul MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl dNTP (10mM),

P1 2 µl, P2 2 µl,

0.2 µl Tag DNA polymerase

10.3 µl dH<sub>2</sub>O kullanılarak 25 µl toplam hacimde yapılmıştır. Reaksiyonlar, Biometra T-personal thermocycler aletinde aşağıdaki döngü koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

### **PCR Programı**

#### **A. Cry genler için**

95 °C 5dk

94 °C 30 sec

58 °C 30 sec

72 °C 30 sec

72 °C 7 dk

4 °C pause

#### **B. BAR genler için**

95 °C 5dk

94 °C 30 sec

60 °C 30 sec

72 °C 30 sec

72 °C 7 dk

4°C pause

### **3.4.4 Örneklerin agaroz jel elektroforezi**

PCR reaksiyonları %1'lik agaroz gel 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 etidyum bromit eklenmiştir. Elektroforez işlemi 70 Voltta 1 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilmiştir.



### 3. 5 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Deneme kapsamada, hormon konsantrasyonların ve eksplantların sürgün oluşum oranı (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu, kök oluşum oranı (%), eksplant başına kök sayısı, kök uzunluğu vb gibi parametreleri vb ölçülmüştür ve değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler “IBM SPSS 20 for Windows”veya uygun programı yardımıyla One Way Anova veya Univariate Analizine tabi tutulmuştur. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967). Muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla post hoc testleri için t testi, LSD testi, Duncan veya Tukeys b testi yapılmıştır. Denemelerinin her muamele, içerisinde en az üç tekerrür ve her tekerrürde en az 5 adet veya petri içerisinde belirtilmiş sayısıyla tekerrürlerin bulunduğu Petri kutuları, cam kavanozları, Magenta kutuları kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

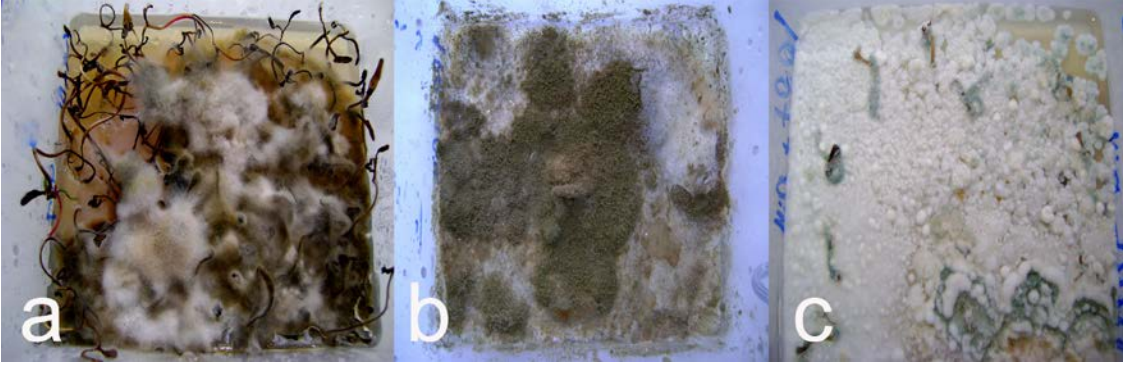
### 4.1 Tohumların Canlılığı Testi

Şeker pancarı'nın monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ait şeker pancarı tohumların tetrazolium testi ile canlılık testi sonucu tohumlarda %100 canlılığı tespit edilmiştir.

### 4.2 Yüzey Sterilizasyon

Şeker pancarı'nın monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ait şeker pancarı tohumların yüzey sterilizasyonu için üç deneme yapılmıştır.

**Birinci denemede,** şeker pancarı'nın monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı ve monogerm SG3 anne hattına ait tohumları sulfurik asit ile 80 dk muamele edilerek 3 × 3 dk saf su ile durulama yapılmıştır. Daha sonra, steril edilmiş tohumları, agar ile katılaştırılmış 1 × MS ortamına hem bulaşıklığı hemde çimlenmesine etki belirlemek için steril Petri kapları içerisinde 24°Cde 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. Şeker pancarı tohumları kültüre alındıktan bir hafta sonra çimlenme yüzdesi ve bulaşıklığının oranları belirlenmiştir. Şeker pancarı tohumları 1 × MS besi ortamda 6 gün içerisinde hem karanlık hemde ışık altında çimlendirmeye bırakılıp, her gün kaç adet tohumun çimlenmesi gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre yüzey sterilizasyonu sağlanamamıştır ve bu yöntem ile steril edilmiş tohumları içeren kültür kablarında yaygın olarak fungal (*Fusarium oxysporum* ile diğerleri) ve farklı tip bakterileri içeren bulaşıklığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Dolayısıyla, bu yöntemin şeker pancarı tohumların sterilizasyon için uygun olmadığını karar verilmiştir.



Şekil 4.1 Şeker pancarı bitkisinde bulşıklılığı

Şeker pancarı'nın monogerm (a) Diamenta çeşidi ile (b) poligerm EMU 8 (baba hattı), (c) SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatların ait tohumları sulfurik asit ile 80 dk muamele edilerek 3 × 3 dk saf su ile durulama yaptıktan sonra 6 gün sonra agar ile katılaştırılmış 1 × MS ortamda fungal (*Fusarium oxysporum* ile diğerleri) ve farklı tip bakterileri içeren bulaşıklılığın görüntüleri

**İkinci denemede**, şeker pancarı'nın monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, ve monogerm SG3 anne hattının tohumları ilk önce sulfurik asit ile çalkalamalı cihazı yardımıyla duran şişeleri içerisinde 80 dk muamele edilip, (şekil 4.2), 3 × 3 dk saf su ile durulama yapılarak, 60 dk %100'konsantrasyonda ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit-%5 NaClO içeren etken madde) ile yukarıda belirtilmiş çeşitlerin tohumları steril edilmiştir. Steril edilmiş tohumlarından çamaşır suyunun etkileri uzaklaştırmak amacıyla 3 × 3 dk saf su ile durulanmıştır ve steril kültür kapları içerisinde 24°Cde 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.



Şekil 4.2 Şeker pancarı hatların/çeşidin tohumların sulfurik asit ile 80 dk muamele edilmesi

Şeker pancarı tohumları kültüre alındıktan bir hafta sonra çimlenme yüzdesi ve bulaşıklılığının oranı belirlenmiştir. Şeker pancarı tohumları  $1 \times MS$  besi ortamda 6 gün içerisinde hem karanlık hemde ışık altında çimlendirmeye bırakılıp, her gün kaç adet tohumun çimlenmesi gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre yüzey sterilizasyonu sağlanamamıştır ve ortamda farklı tip fungal ve bakteriyel bulaşıklılığı göze çarpan şekilde görülmüştür. Dolayısıyla, çimlenme oranı belirlenmeden deneme kapatılmıştır. Ayrıca, denemenin, şeker pancarı tohumların sterilizasyon için hiç uygun görülmemiştir.

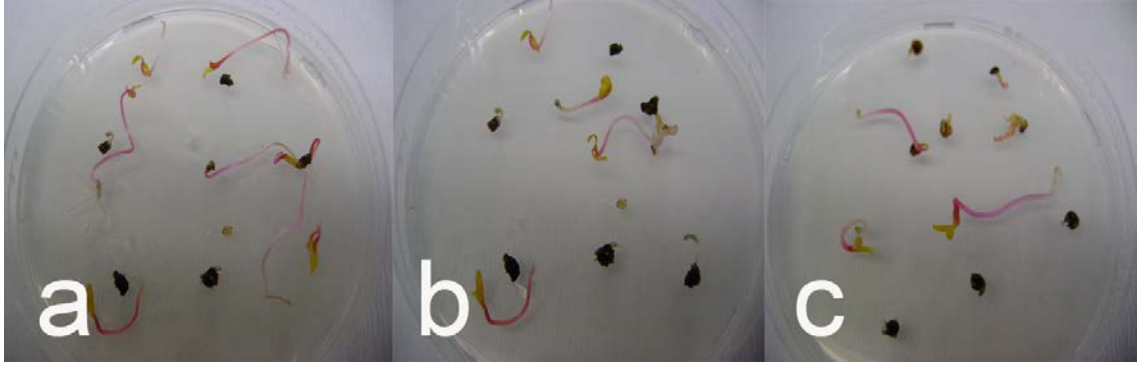
**Üçüncü denemede** şeker pancarı'nin monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, ve monogerm SG3 anne hattına ait tohumları ilk önce sulfurik asit ile 80 dk muamele edilip,  $3 \times 3$  dk saf su ile durulama yapılarak, 60 dk süre ile ticari çamaşır suyunun %100 konsantrasyonla yüzey steril edilmiştir. Steril edilmiş tohumları çamaşır suyunun etkileri uzaklaştırmak amacıyla  $3 \times 3$  dk saf su ile durulanmıştır. Sülfürik asit ve çamaşır suyu ile muamele edilmiş tohumları daha sonra %3 BKK/PPM™ (Bitki Koruyucu Karışımı /Plant Preservative Mixture - Caisson Labs ABD) içeren su

içerisinde 12 saat bekletilmiştir (şekil 4.3). 12 saat bekletilmiş tohumları %3 sakkaroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılmış  $1 \times MS$  ortamına bulaşık oranları ve çimlenme oranı belirlemek için steril Petri kapları içerisinde  $24^{\circ}C$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.



Şekil 4.3 BKK/PPM - Bitki Koruyucu Karışımı /Plant Preservative Mixture (Caisson Labs ABD)

Elde edilen verileri One way varyans analizine tabii tutulmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre ışık ve karanlık ortamda yüzey steril edilmiş her çeşidine ait tohumlar arasında çimlenme oranında 0.01 düzeyinde önemli farklılığı görülmüş olup (Çizelge 4.1), farklılığı belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır ve sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre, şeker pancarı'nın monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, ve monogerm SG3 anne hattında ışıklı ortamda sırasıyla %68.33, %33.33 ile %40.00 ve karanlık ortamda ise %61.67, %50.00, %45, çimlenme elde edilmiştir. Ayrıca, her 3 çeşit/hattına ait çimlenmiş tohumların hipoktil bölgelerinde aşırı uzaması ve kırmızılaşması de izlenmiştir (şekil 4.4 a, b, c). Elde edilen sonuçlarına göre kültürlerinde her hangi fungal ve bakteiryel bulaşıklığı rastlanmamıştır. Bir hafta sonra deneme kapsamında kullanılmış çeşidi ve hatlarından 2-3 cm'lik, bitkicikler elde edilmiştir.



Şekil 4.4 Şeker pancarı tohumların bir haftadan sonra çimlenmesi a. EMU 8 poligerm baba hattına b. SG3 poligerm anne hattına ve c. Diamanta mono germ çeşidine ait tohumlarının karanlıkta çimlendirilmesi ve bir hafta sonra çimlenmiş tohumların hipokotil bölgelerinde kırmızılaşması ve aşırı uzaması ile ilgili görünümü

Çizelge 4.1: Şeker pancarının monogerm Diamanta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ayrı ayrı 16 saat ışık fotoperiyodunda ve karanlıkta bir hafta sürece çimlendirilmesi ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları

VK	sd	16 saat ışık ortamda yüzey steril edilmiş tohumlarda çimlenme oranı (%)		Karanlık ortamda yüzey steril edilmiş tohumlarda çimlenme oranı (%)	
Çeşitleri	2	1036,03	1036,03**	216,34	192,10**
Hata	6	1,00		1,12	
Genel Toplam	8				

\*\* $P < 0.01$

Çizelge 4.2 Şeker pancarı'nın poligerm EMU 8, monogerm SG3 hattında ve Diamenta mono germ çeşidinde 16 saat ışık fotoperiyodunda ve karanlıkta bir hafta sonra çimlenme oranları ile ilgili sonuçları

Şeker pancarı çeşit/hatları	16 saat Işık ortamda yüzey steril edilmiş tohumlarda çimlenme oranı (%)	Karanlık ortamda yüzey steril edilmiş tohumlarda çimlenme oranı (%)
Monogerm SG3 anne hattı	68.33a	61.67a
Poligerm EMU 8 baba hattı	33.33c	50.00b
Monogerm Diamenta çeşidi	40.00b	45.00c

\*\*Aynı sütün de farklı harflerle göstirilen ortalmalar arasında 0.01 düzeyinde farklılığı görülmüştür

Tez kapsamında ilk önce şeker pancarı'nın poligerm EMU 8, monogerm SG3 hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait tohumların yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının alınacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmek amacıyla yapılan ilk 3 denemeden 2sinden elde edilen sonuçlarına göre şeker pancarı tohumlarında hem içsel hemde yüzeysel enfeksiyon/bulaşıklılığı bulunmuştur. Ayrıca, tohumları çok sert olup, kabuk etkisi ile çimlenemekte zorlanmışlardır. Şeker pancarı tohumları, şekil olarak yuvarlak ve mozaik/pürüzlü girintili çıkıntılı yapıya sahip olduğu için fungus ve bakteriyel sporların saklanmasına çok müsaittir. Dolayısıyla, şeker pancarı tohumların sterilizasyon için daha etkili dezenfektan ve yöntemin kullanılmasının ihtiyaç duyulmuştur.Elde edilen sonuçlarına göre sulfurik asit ve çamaşır suyu muamelesi, tohum kabuklarını parçalayarak yumşatır. Ancak, kabuk içerisinde bulunan tohumunu steril etmemektedir. Bu sebepten dolayı 2. Denemede de olumsuz sonuçları rastlanmıştır. Üçüncü denemede çamaşır suyu ve sülfük asit ile beraber doku kültüründe yaygın olarak kullanılan BKK/PPM etkili bir biyosit kullanılma sonucu içsel bulaşıklarını (mikroorganizmalarını) yok edilmesi ve canlı tohumların özelliklerini bozmadan tohumlarını steril edilmesini rastlanmıştır. Elde edilen

sonuçları Kneifel ve Leonhardt (1992), Lata vd. (2009); Greer ve, Rinehart (2010), , Miyazaki ve Tan . (2010); Çölgeçen vd. (2011), Miyazaki vd. (2011), ve Botsheleng vd. (2014)'un yaptığı çalışmalarına onaylarak elde ettiği sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Joshee vd . (2007) tohumlarının %2 BKK/PPM çözeltisinin içinde 60 dk batırarak ve daha sonra 2ml/l BKK/PPM kültür ortamına ekleyerek *C. asiatica* bitkisinin tohumlarına fungal ve bakteriyel bulaşıklığından arındırılmıştır. Bunun yanı sıra bitki türlerine bağlı farklı miktarda BKK/PPM kullanılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarında %10 BKK/PPM'nin bile bitki büyümelerine herhangi olumsuz etki rastlanmamıştır. Bazı araştırmacı BKK/PPM ile tohum sterilizasyon bile önermektedirler (Jain et al. 2005, Nail ve Roberts 2005, Jiménez et al. 2006). Buna karşı Paul et al. (2001). ve Rowntree (2006). ise BKK/PPM'nin tek başına değil diğer sterilizasyon yöntemleri ile birleştirilerek kullanmışlardır.

### **4.3 Rejenerasyon Çalışmaları**

#### **4.3.1 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına ait sap ve kotiledon yaprak eksplantlarından farklı oranda kinetin + IBA içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu**

Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ait sap eksplantından sürgün rejenerasyonu için 1.00, 1.5, 2.00, 2.50 3.00 mg/l Kinetin, 1.00, 1.5, 2.00, 2.50 3.00 mg/l Kinetin + 0.2 mg/l IBA içeren 1 × MS ortamı kullanılmıştır.

Ayrıca, şeker pancarı'nın monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ait kotiledon yaprak eksplanttan sürgün rejenerasyonu için 1.00, 1.5, 2.00, 2.50 3.00 mg/l Kinetin +0.5 mg/l IBA içeren 1 × MS ortamı da kullanılmıştır.



Elde edilen sonuçlarına göre her iki eksplantdan ve denemeden sürgün rejenerasyonunda olumlu gelişmeleri kayıd edilememiştir. Ancak, eksplantlarda büyüme şişme ve karama izlenmiştir. Buna karşı Gurel (1996) bir çalışmada 10 adet ticari pancar (*B. vulgaris*) çeşidine ait yaprak eksplantların kök oluşumunu kapistesei bakımından karşılaştırdığında göze çarpan farklılıklar ortaya çıkmıştır. Grieve vd. (1997) yaptığı bir çalışmada 6 elit pancar çeşitlerin petiol eksplantından rejenerasyon elde edip bitki elde edilmiştir. Bu çalışma ve daha önceden rapor edilmiş sonuçlar arasındaki farklılığı kullandığı hormonlar ve çeşitlerden kaynaklanmış olabilir düşünülmektedir.

#### **4.3.2 Şeker Pancarının monogerm Diamenta Çeşidi ile Poligerm EMU 8 baba hattı, SG3 anne hattına Ait yaprak sapı Ve yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP + 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu**

Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için 1.00, 1.5, 2.00, 2.50 3.00 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamı kullanılmıştır. Sap eksplanttan farklı oranda rejenerasyon izlenmişken, yaprak eksplanttan rejenerasyon izlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre sap eksplantından sürgün oluşum oranı (%) ve yaprak oluşum oranı (%) bakımından çeşitler arasında istatistiksel olarak 0.05 düzeyinde önemli farklılığı ispat edilmiştir. Eksplant başına yaprak sayısı bakımından çeşitler arasında her hangi farklılığı izlenmemiştir (Çizelge 4.3).

Sürgün oluşum oranı (%), yaprak oluşum oranı (%) ve eksplant başına yaprak sayısı (adet) bakımından hormonlar arasında istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli farklılığı izlenmiştir.

Sürgün oluşum oranı (%) bakımından 0.05 düzeyinde ve yaprak oluşum oranı (%) ile eksplant başına yaprak sayısı (adet) bakımından 0.01 düzeyinde çeşitler ve hormonlar

arasında bir etkileşim izlenmiştir. Etkileşim seviyeleri belirlemek amacıyla ortalamaların Ortalamalar arasında farklılığı belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır ve sonuçları çizelge 4.4 de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, SG3 anne hattı şeker pancarı hatlarına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)		Yaprak oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Çeşitler	2	82,22	1,60*	0,30	1,24*
Hormonlar	4	1436,67	28,10**	2,19	8,86**
Çeşitler × Hormonlar	8	60,00	1,17*	1,32	5,33**
Hata	30	51,11		0,24	
Genel toplam	44				
V.K.	S.D.	Eksplant başına yaprak sayısı (adet)			
Çeşitler	2	0,69	0,40		
Hormonlar	4	95,22	55,94**		
Çeşitler × Hormonlar	8	18,65	10,95**		
Hata	30	1,702			
Genel toplam	44				

\*\* $P < 0.01$

Elde edilen sonuçlarına göre şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattında sürgün oluşum yüzdesi (%) sırasıyla %26,67 – 50.00, %16.67-50.00 ve %23.33- 56.67, arasında değişmiştir. Her genotipte en fazla sürgün oluşumu 1 mg/l BAP+ 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamından elde edilmiştir.

Ancak, Diamenta çeşidinde 2 ve 2.50 mg/l BAP+ 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamdan (2 kombinasyon) , poligerm EMU 8 baba hattından en düşük sürgün oluşum 2.50 mg/l BAP+0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda ve monogerm SG3 poligerm hattında 2.50 mg/l BAP+ 0.10 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP+0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre Diamenta monogerm, poligerm EMU8 ve monogerm SG3 hattında yaprak oluşum yüzdesi (%) sırasıyla 10.50-22.55 adet, 12.99 – 16.66 adet ve 10.41 – 21.55 adet arasında değişmiştir. Diamenta monogerm çeşidinde ve SG3 poligerm hattında en fazla yaprak oluşum yüzdesi (%) 3 mg/l BAP + 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda ve EMU8 poligerm hattında en fazla yaprak oluşum yüzdesi (%) 2 mg/l BAP+ 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir. Ancak, Diamenta çeşidinde 1.50 mg/l BAP + 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda, EMU 8 poligerm hattında 1.50 ve 2 mg/l BAP+ 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda ve SG3 poligerm hattında 1.50 mg/l BAP+ 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda en düşük Yaprak oluşum yüzdesi (%) izlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre Diamenta monogerm çeşidinde, EMU8 ve SG3 hatlarında eksplant başına yaprak sayısı sırasıyla 0.55-3.03 adet, 1.66 – 2.68 adet ve 1.22 – 3.06 adet arasında değişmiştir.

EMU8 poligerm hattında en fazla Yaprak sayısı 3 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda, SG3 poligerm ve Diamenta monogerm hattında en fazla yaprak sayısı 1 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir.

Ancak, Diamenta çeşidinde en düşük Yaprak oluşum oranı 3 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda, EMU 8 poligerm hattında en düşük yaprak oluşum oranı (%) 2 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda ve SG3 poligerm hattında 2.50 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamda 1 × MS izlenmiştir.

Çizelge 4.4 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, SG3 anne hattı şeker pancarı hatlarına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait ortalamaların Duncan testi sonuçları

Muameleleri		Sürgün oluşum oranı (%)*			Yaprak oluşum oranı (%)**		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Diamenta	EMU 8	SG3	Diamenta	EMU 8	SG3
1.00	0.10	50,00a	50,00a	56,67a	11,96d	14,82b	13,34c
1.50	0.10	50,00a	43,33b	40,00b	10,50d	12,99c	10,41e
2.00	0.10	26,67c	26,67c	33,33c	12,59c	13,82c	12,77d
2.50	0.10	26,67c	16,67d	23,33d	17,13b	16,66a	15,95b
3.00	0.10	33,33b	26,67c	23,33d	22,55a	14,33b	21,55a
aMuameleleri		Eksplant başına yaprak sayısı (adet) (%)**					
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Diamenta	EMU 8	SG3			
1.00	0.10	3,03a	2,50b	3,06a			
1.50	0.10	2,06c	2,00c	1,80c			
2.00	0.10	2,75b	1,66d	2,15b			
2.50	0.10	1,66d	2,33d	1,22c			
3.00	0.10	0,55e	2,68a	1,61c			

\* Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.05 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

\*\* Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.01 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

Yalnız 1.00 mg/l BAP - 0.10 mg/l NAA (sürgün rejenerasyon ortamı - SRO 1) ve 1.50 mg/l BAP +0.10 mg/l NAA (SRO 2) içeren MS ortam daki sürgünlerinde kök oluşum gözlenmiştir. Gerikalan hormon muamelerinden rejenerasyon olmuş sürgünlerinden kök oluşum gözlenmemiştir. Dolayısıyla aşağıda yalnız SRO1 ve SRO2 ile ilgili sürgünlerin köklendirilmesi ile ilgili sonuçları anlatılmıştır (çizelge 4.5).

Her iki rejenerasyon ortamı (SRO1 ve SRO2) arasında kıyaslama yapılır ise 0.5 mg/l NAA içeren ortamda (SRO 2) kök oluşum oranı, bitki başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından daha olumlu sonuçları izlenmiştir. .

Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı ve monogerm SG3 anne hattına ait sürgünleri 0.5 mg/l NAA içeren ortamda

köklendirilmiş olup, bitkileri saksılara aktarılmıştır ve dış koşullarına aktararak alıştırılmıştır (şekil 4.5). Benzer bir şekilde, Gürel (1996) bir çalışmada pancar (*B. vulgaris*) 10 adet ticari pancar çeşidine ait yaprak eksplantların kök oluşumunu kapistesei bakımından karşılaştırdığında göze çarpan farklılıklar görmüşlerdir. Benzer şekilde, Grieve vd. (1997) yaptığı bir çalışmada 6 elit pancar (*B. vulgaris*) çeşitlerin petiol eksplantından rejenerasyon elde edilmiştir. Gürel (1995) şeker pancar bitkisinin Primo çeşidinde 30 mg/l NAA içeren ortamda lamina ve petiol nodu eksplantından kök oluşumu scanning elektron mikroskopi ve ışık mikroskopi ile incelenmiştir. Primordilerin orijini iletişim borularına yakın yerde meristematik hücre çoğaltılan intrafascicular cambium bölgelerinde izlenmiştir. Primordial oluşum kültürü alındıktan 4 gün ve kök oluşum 6 gün sonra izlenmiştir. Kök oluşum için en az 24 saat NAA muamelesini uygun görülmüştür. Köklendirme ortamda 4 günlük bekletmede olumlu ve 5 - 10 gün bekletmesinde olumsuz etkileri bırakmışlardır.



Şekil 4.5 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı ve monogerm SG3 (anne hattına ait sürgünleri 0.5 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi (a) araştırmacı tarafından alıştırılacak bitkilerin incelemesi ve verilerin alınması (b) bitkilerin saksılara aktarılması ve dış koşullarına aktararak alıştırılması

Gürel Vd. (2001) yaptığı bir çalışmada kallus üretimi için, farklı şeker pancar (*B. vulgaris*) ıslah hatlarının fidelerinden alınan hipokotil, kotiledon, yaprak sapı ve yaprak eksplantları, BAP veya KIN ile NAA veya 0.0 (kontrol), 0.5 veya 1.0 mg/l 2,4-D içeren  $1 \times MS$  ortamına kültüre almışlardır. Her iki oksininde 0.5 mg/l BAP veya 0.5 mg/l

KIN içeren kombinasyonları ile kullanılmış her tip eksplantta daha fazla miktarda kallus oluşumu gözlenmiştir.

2, 2.5 ve 3.00 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA uygulamaları şeker pancarının her 3 çeşit ve hattına ait rejenerantlarına inhibe edici bir etkiye sahip olmuştur ve sonuçları Werbrouck vb (1995) tarafından *Spathiphyllum floribundum* bitkisinden elde edilmiş sonuçlarına benzerliliği göstermektedirler.

Çizelge 4.5 1.00 mg/l BAP- 0.10 mg/l NAA (SRO 1) ve 1.50 mg/l BAP +0.10 mg/l NAA (SRO 2) içeren MS ortam daki sürgünlerinde kök oluşumu ile ilgili verilerin ortlaması

Açıklama	Diamenta				EMU 8			
	Sürgün rejenerasyon ortamı 1 (1.00 mg/l BAP +0.10 mg/l NAA içeren MS ortamı) SRO1		Sürgün rejenerasyon ortamı 2 (1.5 mg/l BAP +0.01 mg/l NAA içeren MS ortamı) SRO2		Sürgün rejenerasyon ortamı 1 (1.00 mg/l BAP +0.10 mg/l NAA içeren MS ortamı) SRO1		Sürgün rejenerasyon ortamı 2 (1.5 mg/l BAP +0.01 mg/l NAA içeren MS ortamı) SRO2	
	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA
Kök oluşum oranı	20.00	10.00	40.00	20.00	18.31	2.26	39.40	16.12
Bitki başına kök sayısı (adet)	3.00	1.00	28.50	1.00	3.17	2.47	14.27	3.57
Kök uzunluğu (cm)	3.30	1,67	3.25	2.00	3.52	2.33	14.79	5.39
Açıklama	SG3							
	Sürgün rejenerasyon ortamı 1 (1.00 mg/l BAP +0.10 mg/l NAA içeren MS ortamı) SRO1		Sürgün rejenerasyon ortamı 2 (1.5 mg/l BAP +0.01 mg/l NAA içeren MS ortamı) SRO2					
	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA				
Kök oluşum oranı	13.42	1.39	56.27	14.57				
Bitki başına kök sayısı (adet)	23.39	1.27	1.29	0.91				
Kök uzunluğu (cm)	23.91	3.95	1.95	0.39				

### 4.3.3 Şeker pancarının yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından farklı oranda BAP + IBA içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu

Bu çalışmada şeker pancarının SG3 poligerm anne hattına ait yaprak sapı ve yaprak eksplant 0.25 mg/l BAP + 1.00, 1.5, 2.00, 2.50 3.00 mg/l IBA içeren 1 × MS ortamına kültüre alınarak çalışma başlatılmıştır. Yaprak eksplantında sararma (kloresis) ve kararma (klorosis) ile beraber, sürgün oluşum gözlenmemiş ken, yaprak sapından farklı oranda sürgün oluşum izlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre yaprak sapı eksplantında sürgün oluşum oranı (%) – bakımından hormon muameleleri arasında istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli farklılığı izlenmiştir (Çizelge 4.6). Eksplant başına yaprak sayısı (adet) bakımından hormonların etkileri arasında hiç farklılığı görülmemiştir. Her 3 parameterelere ait sonuçların önem seviyesi belirlemek için Duncan testi yapılmıştır ve sonuçları çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

Muamele	sd	Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Sürgün başına yaprak sayısı *		Sürgün uzunluğu (cm) <sup>ös</sup>	
Hormon muameleleri	4	1161,61	3,85**	7,06	9,05*	0,44	0,50 <sup>ös</sup>
Hata	10	301,60		0,78		0,86	
Toplam	14						

\* $P < 0.05$ , <sup>ös</sup>önemsiz

Elde edilen sonuçlarına göre Sürgün oluşum oranı %40.00 - 86.67 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum 0.25 mg/l BAP-2.5 ile 3.0 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu 1.18 ile 2.09 cm arasında değişmiştir.

Çizelge 4.7 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları

BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	Rejenerasyon Yüzdesi (%)**	Sürgün başına yaprak sayısı *	Sürgün uzunluğu (cm) <sup>ös</sup>
0.25	1.0	60,00ab	10,43a	2,09
0.25	1.5	65,99ab	10,46a	1,55
0.25	2.0	40,00b	10,22a	1,18
0.25	2.5	86,67a	7,72b	2,07
0.25	3.0	86,67a	7,43b	1,65

\*\* Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.05 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

ös önemsiz

#### Köklendirilmesi

Bu çalışmada rejenerasyon göstermiş her ortamına bağlı olarak elde edilen sürgünleri 15 mg/l sucrose içeren 1 × MS ortamında 10 gün bkletilmiştir. Daha sonra, elde edilen sürgünleri 0.5 ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir.

Elde edilen verilerin varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre sürgün rejenerant muamelelerin kök oluşum üzerinde 0.05 ve kök sayısı (adet) ile kök uzunluğu (cm) üzerinde 0.01 düzeyinde önemli farklı etkileri izlenmiştir (çizelge 4.8).

Köklendirme hormon oranlarının kök oluşum üzerinde 0.05 ve kök sayısı (adet) ile kök uzunluğu (cm) üzerinde 0.01 düzeyinde önemli farklı etkileri izlenmiştir.

kök oluşum oranı (%), kök sayısı (adet) ile kök uzunluğu (cm) bakımından Sürgün Rejenerant muameleleri × Köklendirme hormon oranları arasında 0.01 düzeyinde önemli etkileşim izlenmiştir.



Çizelge 4.8 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı kombinasyonda BAP-IBA içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili verilerinin varyans analizi sonuçları

VK	sd	Kök oluşum oranı		Kök sayısı (adet)	
Sürgün Rejenerant muameleleri	1	120,00	1,33*	34,15	26,91**
Köklendirme hormon oranları	4	120,00	1,33*	26,21	20,66**
Sürgün Rejenerant muameleleri × Köklendirme hormon oranları	4	720,00	8,00**	10,36	8,16**
Hata	20	90,00		1,26	
Genel Toplam	29				
VK	sd	Kök uzunluğu (cm)			
Sürgün Rejenerant muameleleri	1	7,77	60,87**		
Köklendirme hormon oranları	4	1,95	15,32**		
Sürgün Rejenerant muameleleri × Köklendirme hormon oranları	4	3,58	28,08**		
Hata	20	0,12			
Genel Toplam	29				

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Yukarıda belirtilmiş etkileşimlerinin önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.9' De verilmiştir Elde edilen sonuçlarına göre 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamda tüm rejenerantlarda gelişen sürgünleri farklı etkileri göstermiş olup, sırasıyla %60 - 100 ve %60 -80 oranında köklenmişlerdir.

Bitki başına kök sayısı bakımından 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamda tüm rejenerantlarda gelişen sürgünleri farklı etkileri göstermiş olup, sırasıyla 8.33 -11.50 adet ve 4.25 – 12.00 adet kök oluşturmuşlardır.

Bitki başına kök uzunluğu bakımından 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında tüm rejenerantlarda gelişen sürgünleri, sırasıyla 6.16 -7.50 cm ve 4.12 – 7.42 cm uzun kök oluşturmuşlardır.

Bu çalışma da yukarıda belirtilmiş iki çalışmasına destek vermektedir. Bu çalışmada BAP oranı 0.25 mg/l e kadar indirilmiştir. Rejenerasyon çalışmalarında düşük miktarda kullanılmış BAP + değişen miktarda IBA sürgünlerin köklendirilmesine inhibe edici etkileri bırakmamışlardır ve her rejenerant ile oluşmuş sürgünlerinde kök oluşum gözlenmiştir.

Rejenerasyon ortamda 0.25 mg/l BAP ile her artan IBA konsantrasyonunda kök sayısında azalma ve kök uzunluğunda artış izlenmiştir.

SG3 poligerm hatına ait sürgünleri köklendirilmiş olup, şeker pancarı bitkileri saksılara aktarılarak dış koşullarına alıştırmıştır. Aksine Gurel (1996) yaptığı çalışmalarında farklı pancar çeşitlerinin yaprak eksplantlarından bitki oluşumu elde edilmiştir. Benzer şekilde Grieve vd. (1997) petiol eksplantından rejenerasyon elde edilmiş bitki elde edilmiştir. Gürel Vd. (2001) yaptığı bir çalışmada kallus üretimi için, farklı şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) ıslah hatlarının fidelerinden alınan hipokotil, kotiledon, yaprak sap ve yaprak eksplantları, BAP veya KIN ile NAA veya 2,4-Dnin 0.0, 0.5 veya 1.0 mg/l düzeyindeki kombinasyonların içeren 1 × MS ortamında kültre almışlar olup, tüm eksplant tiplerden kallus oluşumu gözlenmişlerdir.

Rejenerasyon ortamda belli eşiği geçtikten sonra sitokininler zeatin, kinetin ve benzilaminopurin (BAP) bazı bitkilerde gelişmelerinde olumsuz etkileri bırakmaktadırlar (Kulka 2006, Werbrouck vb 1995). Bu çalışmada BAP oranı düşük ve sabit tutulmuştur. Buna karşı IBA oranı aşama aşama yükseltilmiştir. BAP uygulamaları bir dereceye kadar bitkilerin köklendirilmesine inhibe edici bir etkiye sahip olmaktadır (Cary vd. 1995, Bertell vd.1999). Sonuçta düşük miktarda çalışmalarında kullanılmış BAPla fazladan etilin üretim yapan hücrelerin, uzamasına engellenme olmaktadır ve IBA faaliyetleri olumlu şekilde değiştirmektedir (Ruiz vd. 2007, 2009). Bu çalışmada düşük miktarda BAP kullanıldığı için kök oluşumuna olumlu etkileri izlenmiştir.

Rejenerasyon ortamında az miktarda BAP +ve fazla miktarda IBA'nın kullanılması kök oluşumuna olumlu etkileri bırakmaktadır.

Çizelge 4.9 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı kombinasyonda BAP-IBA içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili verilerinin Duncan testi sonuçları

Sürgün Rejenerant muameleleri		Kök oluşum oranı		Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)	
BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA
0.25	1.0	80.00b	80.00a	10,25b	12,00a	6,50	4,12
0.25	1.5	80.00b	80.00a	11,50a	9,50b	6,16	7,42
0.25	2.0	80.00b	80.00a	9,59c	8,20b	6,45	6,65
0.25	2.5	60.00c	80.00a	8,19d	4,25d	7,12	6,10
0.25	3.0	100.00a	60.00b	9,75c	4,66d	7,50	5,00

Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.01 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

#### 4.3.4 Şeker pancarının yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından farklı oranda TDZ içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonu

Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, monogerm SG3 anne hattına ait yaprak sapı ve yaprak eksplantları, sürgün rejenerasyonu için 0.05, 0.15, 0,25, 0.35 mg/l TDZ içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantından klorosis ve nekrosisten sonra dokuların ölümünden dolayı her hangi sürgün rejenerasyonu izlenmemiştir. Yaprak sapı eksplantından farklı oranda sürgün oluşum izlenmiştir.

Elde edilen verilerinin varyans analizi yapılmıştır. Sonuçlarına göre sürgün oluşum oranı (%), eksplant başına yaprak sayısı (adet) ve sürgün uzunluğu (cm) bakımından çeşitler arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılığı izlenmiştir (çizelge 4.10).

Elde edilen sonuçlarına göre sürgün oluşum oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm) bakımından TDZ oranları arasında 0.01 düzeyinde ve eksplant başına yaprak sayısı bakımından TDZ oranları arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılığı izlenmiştir. Sürgün oluşum oranı (%) bakımından çeşitler × TDZ oranları arasında 0.05 önemli etkileşim izlenmiştir.

Çizelge 4.10 Şeker pancarının EMU8, SG3 poligerm hattında ve Diamenta monogerm hattında sap eksplantlarından TDZ içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

VK	sd	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına yaprak sayısı (adet)	
		KO	F	KO	F
Çeşitler	2	1206,67	10,86**	552,49	84,18**
TDZ oranları	3	2283,33	20,55**	26,71	4,07*
Çeşitler × TDZ oranları	6	565,00	5,08**	26,02	3,96*
Hata	30	111,11		6,56	
Genel toplam	44				
VK	sd	Sürgün uzunluğu (cm)			
		KO	F		
Çeşitler	2	179,11	217,04**		
TDZ oranları	3	21,91	26,55**		
Çeşitler × TDZ oranları	6	2,40	2,91*		
Hata	30	0,82			
Genel toplam	44				

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

Her parametresine ait ortalmaların önem seviyesi belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır ve sonuçları çizelge 4.11’ de verilmiştir.

Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 baba hattı, ve SG3 anne hattında sürgün rejenerasyon sırasıyla 16.67 -56.67, %33.33 – 76.66 ve %36.67 – 70.00 arasında değişmiştir. Diamenta çeşidinde en fazla sürgün oluşumu 0.05 ile 0, 15 mg/l TDZ içeren 1 × MS ortamda, EMU8 poligerm ve SG3 monogerm hatında en fazla sürgün rejenerasyon 0.25 mg/l TDZ içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir. Diamenta monogerm çeşidinde 0,25 ve 0.35 mg/l TDZ içeren ortamda ve EMU8 poligerm ile SG3 monogerm hatlarında 0.35 mg/l TDZ içeren 1 × MS ortamda dikkate değer sürgün oluşum oranında düşüş izlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre Diamenta monogerm çeşidinde 0.66 – 2.33 adet ve EMU8 poligerm ile SG3 monogerm hatlarında eksplant başına yaprak sayısı 1.06 – 2.36, 1.24 – 1.70 (adet) arasında değişmiştir. Monogerm Diamenta çeşidinde en fazla eksplant başına yaprak sayısı 0.35 mg/ l TDZ içeren 1 × MS ortamdan ve EMU8 poligerm ile SG3 monogerm hatlarında en fazla eksplant başına yaprak sayısı 0.05 mg/l içeren TDZ içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir.

Elde edilen sürgün uzunluğu ile ilgili sonuçlarına göre Diamenta monogerm çeşidinde 1.16 – 2.03 cm ve EMU8 poligerm ile SG3 monogerm hatlarında eksplant başına yaprak sayısı 6.90 – 11.14 cm ve 4.33 – 9.00 cm arasında değişmiştir. Monogerm Diamenta çeşidinde en uzun sürgünler 0.25 mg/ l TDZ içeren 1 × MS ortamdan ve EMU8 poligerm ile SG3 monogerm hatlarında sırasıyla en uzun sürgünler 0.05 mg/l içeren TDZ içeren 1 × MS ortamdan elde edilmiştir. Ancak, her 3 arasında kıyaslama sonucunda belirgin farklılığı izlenmiştir ve en uzun sürgünler EMU8 poligerm baba hattından elde edilmiştir.

Çizelge 4.11 Şeker pancarının Diamenta monogerm çeşidinin, EMU8 ve SG3 poligerm hattında sap eksplantlarından TDZ içeren 1 × MS ortamda sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları

TDZ (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%) **			Eksplant başına yaprak sayısı (adet)*		
	Diamenta	EMU8	SG3	Diamenta	EMU8	SG3
0.05	56,67a	63,33b	50,00c	1,33b	2,36a	1,70a
0.15	56,67a	66,67b	63,33b	0,66c	1,85b	1,34b
0,25	20,00c	76,67a	70,00a	0,66c	1,06c	1,24c
0.35	16,67c	33,33c	36,67d	2,33a	2,02ab	1,25c
TDZ (mg/l)	Sürgün uzunluğu (cm)*					
	Diamenta	EMU8	SG3			
0.05	2,03b	11,14a	9,00a			
0.15	1,70c	9,15b	7,00b			
0,25	2,65a	8,40c	7,00b			
0.35	1,16d	6,90d	4,33c			

\*\* Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.01 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

\* Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.05 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

## Köklendirilmesi

Bu çalışmada rejenerasyon göstermiş her ortamına bağlı olarak elde edilen sürgünleri 15 mg/l sucrose içeren 1 × MS ortamında 10 gün bkletilmiştir. Daha sonra, elde edilen sürgünleri 0.5 ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.12' de gösterilmiştir.

Elde edilen verilerin varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre sürgün rejenerant muamelelerin kök oluşum ve kök sayısı üzerinde her hangi etki bulunmazken kök uzunluğu bakımından 0.05 düzeyinde önemli farklılığı izlenmiştir (çizelge 4.13).

Köklendirme hormon oranlarının kök oluşum, kök sayısı (adet) ile kök uzunluğu (cm) üzerinde 0.01 düzeyinde önemli farklı etkileri izlenmiştir.

kök oluşum (%), kök sayısı (adet) bakımından sürgün rejenerant muameleleri × köklendirme hormon oranları arasında her hangi etkileşim izlenmemiştir. Ancak, kök uzunluğu bakımından aralarında 0.01 düzeyinde önemli etkileşim bulunmuştur.

Çizelge 4.12 Şeker pancarın SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı oranda TDZ içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili verilerinin varyansa analizi sonuçları

VK	sd	Kök oluşum oranı (%)		Kök sayısı (adet)	
Sürgün Rejenerant muameleleri	1	150,00	0,75	0,37	0,59
Köklendirme hormon oranları	3	1750,00	8,75**	5,73	9,11**
Sürgün Rejenerant muameleleri × Köklendirme hormon oranları	3	950,00	4,75	0,37	0,59
Hata	16	200,000		,629	
Genel Toplam	23				
VK	sd	Kök uzunluğu (cm)			
Sürgün Rejenerant muameleleri	1	3,51	4,46*		
Köklendirme hormon oranları	3	4,62	5,88**		
Sürgün Rejenerant muameleleri × Köklendirme hormon oranları	3	7,23	9,19**		
Hata	16	0,78			
Genel Toplam	23				

\* $P < 0.05$ \*\* $p < 0.01$

Etkileşim düzeyi belirlemek amacıyla yapılan sonuçları çizelge 4.15'te verilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında tüm rejenerantlarda gelişen sürgünleri farklı etkileri göstermiş olup, sırasıyla %60 - 100 ve %60 -80 oranında köklenmişlerdir.

Bitki başına kök sayısı bakımından 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında tüm rejenerantlarda gelişen sürgünleri farklı etkileri göstermiş olup, sırasıyla 6.60-14.20 adet ve 3.10 – 5.10 adet kök oluşturmuşlardır.

Bitki başına kök uzunluğu bakımından 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında tüm rejenerantlarda gelişen sürgünleri farklı etkileri göstermiş olup, sırasıyla 3.05 -7.50 cm ve 4.00-5.50 cm uzun kök oluşturmuşlardır.

Debnath (2006) bir çalışmada çalışmada Zeatin uygulaması ile sürgün uzamasının tidiazuron kaynaklı engellenmesini ortadan kaldırmaktadır ve *in vitro* çilek kültürü köklenmesine teşvik etmektedir. Bu çalışmada rejenere olan bitkilerinin köklendirilmesinde her hangi olumsuz inhibe edici görülmemektedir. Ancak 0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren köklendirme MS ortamı düşünülür ise, aralarında etkilerini kıyaslanırsa 1.0 mg/l NAA içeren ortamı, diğer köklendirme ortamına göre köklenmeside inhibasyon sağlanmıştır.

Çizelge 4.13 Şeker pancarının SG3 poligerm hattına ait sap eksplantlarından farklı oranda TDZ içeren MS ortam üzerinde rejenerasyon gösteren sürgünlerinin 0.5 ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmesi ile ilgili Duncan testi sonuçları

Sürgün Rejenerant TDZ (mg/l)	Kök oluşum oranı (%) <sup>ös</sup>		Bitki başına kök sayısı (adet) <sup>ös</sup>	
	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA
0.05	100,00	60,00	9,75	4,66
0.15	100,00	100,00	14,20	4,06
0,25	80,00	100,00	13,25	5,10
0.35	60,00	60,00	6,60	3,10
Sürgün Rejenerant TDZ (mg/l)	Kök uzunluğu (cm)**			
	0.5 mg/l NAA	1 mg/l NAA		
0.05	7,50a	5,00a		
0.15	6,33ab	4,72b		
0,25	5,40b	4,00b		
0.35	3,05c	5,50a		

\*\* Aynı sütünde farklı haflerle gösterilen harfler ortalamalar arasında Duncan testin 0.01 düzeyinde önemli farklılık göstermektedir

ös önemsiz

## 4.6 Transgenik Çalışmaları

### 4.6.1 Onkogenik *A. tumefaciens* A281 pTiBo 542 ile Samsun Maden 2421 tütün çeşidine tümör oluşturmak amacıyla gen aktarımı ile ilgili bilgilerin araştırılması

Bu çalışmada ilk önce Samsun Maden 2421 tütün çeşidine ait tohumları çimlendirerek bitkiler geliştirilmiştir. Çalışmada kullanmak amacıyla 28 günlük gelişen bitkilerin yapraklarından 5 mm<sup>2</sup> yaprak diski eksplantları hazırlanmış olup, steril Petri kutuları içerisinde saklanan 35 ml steril saf suda bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen diskleri



*A. tumefaciens*'nin onkogenik A281 hattın süspansiyon ile 30 dk inokülasyona tabii tutularak 24 saat kokütüvasyonuna bırakılmıştır. Kokütüvasyonu için karanlık ortamı ve iklim odanın sıcaklığı 24 °C olarak ayarlanmıştır. Daha sonra, eksplantları 500 mg/l Duocid içeren 1 × MS ortamına aktararak tümör oluşumuna bırakılmıştır. Eksplantlar üzerinde tümör oluşumu bakteri inokülasyondan 11-13 gün sonra başlamıştır. Tümör oluşumu başlangıcından 8 hafta sonra *Agrobacterium tumefaciens*'nin A281 hattının tümör oluşturma yüzdesi, tümör çapı ve eksplant başına tümör ağırlığına ait sonuçları Çizelge 4.14 de verilmiştir.

Çizelge 4.14 *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattının tütün Samsun Maden 2421 çeşidinin yaprak diski eksplantında tümör oluşumu üzerine etkisine ait sonuçları

<b>İncelenmiş faktörleri</b>	<b>Ölçümleri</b>
Tümör oluşturma yüzdesi (%)	91.50
Tümör çapı (mm)	02.20
Tümör ağırlığı (mg)	13.00

Çizelge 4.14 'de görüldüğü gibi, ortalama tümör oluşturma oranı (91.50%), tümör çapı ( 02.20 mm, ve tümör ağırlığı 13.00 mg olarak hesaplanmıştır. Her yaprak diski kenarlarında 1 den fazla minicik tümör oluşumu rastlanmıştır. Kontrol bitkilerinde her hangi tümör oluşumu gözlenmemiştir.

Daha önce yapılmış çalışmalarına göre bazen konakçı bitkinin kabul etmemesi gibi problemlerle de karşılaşmaktadır (Khawar 2001). Bu çalışmada Samsun Maden 2421 çeşitinde onkogenik *A. tumefaciens* A281 pTiBo 542 hattı ile, gelecekte transgenik bitki elde edebilmek için bu hattın tümör oluşturma kabiliyeti araştırılmıştır.

Nourouzi vd (2005)'nin yaptığı çalışmalarına göre şeker pancarı bitkisinde tekralanabilir transforasyon protokol yoktur. Araştırmacılar farklı eksplantlarıyla transformasyon yapmaya çalışmışlardır. Araştırma sonucunda yaprağın ana damara yakın hücrelerinde en fazla transformasyon izlenmiştir.

Elde edilen sonuçları mısır bitkisi (Grimsley et al.1987), nohut (Husnain vd 1997) ve mercimek (Warkentin ve McHughen 1991;

Karakaya ve Özcan 1998, Khawar 2001)'ten elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar *A. tumefaciens*'in Samsun Maden 2421 çeşidin yaprak eksplant üzerinde olumlu şekilde etkileşim yapıp, tümöroluştırulması ile ilgili kabileyetini göstermektedir. Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler gelecekte yaprak ve gövde eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ile transgenik tütün bitkisi ve başka bitkilere gen aktarımında yol gösterici olacaktır.

#### **4.6.2 *Agrobacterium tumefaciens*'nin Non onkogenik GV2260::p35 GUS INT hattının bakteriyel süspansiyon kullanarak Samsun Maden 2421 tütün çeşidine gen aktarımı**

Bu çalışmada ilk önce Samsun Maden 2421 tütün çeşidine ait tohumları çimlendirerek bitkiler geliştirilmiştir. Çalışmada kullanmak amacıyla 28 günlük gelişen bitkilerin yapraklarından 5 mm<sup>2</sup> yaprak diski eksplantları hazırlanmış olup, steril Petri kutuları içerisinde saklanan 35 ml steril saf suda bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen diskleri *A. tumefaciens*'nin non onkogenik GV2260::35 GUS INT'hattın bakteriyel süspansiyon ile 30 dk inokülasyona tabi tutularak 24 saat kokültivasyonuna bırakılmıştır.

Kokültivasyon yapılmış yaprak diskleri 50, 100, 150 ve 200 mg/l kanamisin ve 500 mg/l Duocid içeren 1 × MSD4×2 ortamına (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA içeren 1 × MS ortamı) aktararak transgenik aday bitkilerde gus pozitif örneklerin tespiti ve farklı kanamisin konsantrasyonların etkilerini belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre (çizelge 4.15) 50.00 – 200 mg/l kanamisin içeren seleksiyon ortamında sürgün oluşum %100.00 olarak not edilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından her artan kanamisin konsantrasyonuyla sürgün oluşumunda belirgin düşüş gözlenmiştir. Sırasıyla explant başına en fazla ve az sürgün 50.00 mg/l ve 200 mg/l kanamisin içeren ortamdan elde edilmiştir.

**Çizelge 4.15** *Agrobacterium tumefaciens*'nin Non Onkogenik GV2260::p35 GUS INT Hattının Bakteriyel Süspansiyon Kullanarak Samsun Maden 2421 Tütün çeşidine gen aktarımına ait ortalamaları

<b>Kanamisin konsantrasyonları (mg/l)</b>	<b>Antibiyotiğe dayanıklı sürgün oluşturan eksplantların oranı (%)</b>	<b>Eksplant başına sürgün sayısı (adet)</b>
50.00	100.00	22.34
100.00	100.00	16.56
150.00	100.00	9.84
200.00	100.00	3.72
<b>Kanamisin konsantrasyonları (mg/l)</b>	<b>Köklenen sürgünlerin oranı (%)</b>	<b>GUS pozitif bitkilerin oranı (%)</b>
50.00	47.25	62.35
100.00	21.95	59.47
150.00	6.73	60.33
200.00	3.43	58.73

Her eksplantta değişen sayıla kök oluşum gözlenmiştir. Kök oluşum oranı %3.43 -47.25 arasında değişmiştir. Kök oluşumunda da her artan kanamisin konsantrasyonunun durdurucu etki olduğunu gözlenmiş olup, her artan kanamisin oranla explant başına sürgün sayısı bakımından dikkat çekici azalma izlenmiştir.

Gelişen bitkilerin yaprak örnekleri alınıp, histokimyasal gus analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre gus pozitif bitki oranı %58.73 – 62.35 arasında değişmiş olup (Şekil 4.6), oransal olarak kanamisin konsantrasyonları arasında istatistiki olarak göze çarpan farklılığı izlenmemiştir.



Şekil 4.6 Samsun maden tütün çeşidine ait bitki yapraklarında histokimyasal gus ekspresyonu

#### **4.6.3 Şeker pancarının monogerm Diamenta Çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda Kanamacin içeren ortamda yaşayan bitkilerinin oranın gözlenerek LD<sub>100</sub> (öldürücü dozu<sub>100</sub> /Letal Dozu<sub>100</sub>) dozunu belirlenmesi**

Bitkilerde genetik mühendisliği çalışmalarının en önemli gerekliliklerinden bir diğeri ise, istenilen özelliğe ait karakterleri şifreleyen genlerin bitki genomuna aktarılması ve gen aktarılmış hücrelerden yeni transgenik bitkilerin rejenerasyonudur. Bitkilerde ilk gen transferi 1983 yılında *Agrobacterium tumefaciens* vektörü ile gerçekleştirilmiştir. (Caplan vd 1983, Zambryski vd 1983). Bitki genetik mühendisliği çalışmalarında, gen aktarım yöntemlerinin yanısıra gen aktarılmış hücrelerden yeni transgenik bitkilerin rejenerasyonu da önemli bir etkidir. Özellikle, şeker pancarı bitkisinde gen aktarılmış hücre ve dokulardan yeni bitkilerin elde edilmesi önemli bir sorun oluşturmaktadır. Dünya çapında gen aktarılan bitkilerin sayısı sürekli olarak artmaktadır; ancak, Türkiye’de şeker pancarı bitkisinde gen aktarımı konuda çok az sayıda çalışmaları bulunmaktadır (Türk-şeker 2015, Anonim 2015).

Çalışmada Diamenta çeşidi monogerm ile EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) poligerm şeker pancarı hatları kullanılmıştır. Çalışmada genetik transformasyon çalışmaları için *A. tumefaciens*’nin GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT, LBA 4404::pRGG bar ve LBA 4404 cry 1 AC hatları kullanılmıştır. GV2260

(pGV2260)::p35SGUS-INT yalnız kanamisine karşı LBA 4404 cry 1 AC hem kanamisin hemde fosfotrisine karşı ve LBA 4404:: pRGGbar ise fosfotrisine karşı direnç taşımaktadırlar. Çalışmada gen aktarım için kullanılan hatların seleksiyon yapabilmesi için şeker pancarının her 3 çeşit ve anne baba hatlarına ait eksplantlarından rejenerasyon yaparak ayrı ayrı kanamisine karşı letal dozu belirlenerek transformasyon çalışmalarında kolaylık sağlanmıştır.

Farklı oranda kanamisin içeren ve fosfotrisin içeren 1 × MS ortamında Diamenta çeşidi monogerm ile EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) poligerm şeker pancarı hatlarına ait şeker pancarı tohumları seleksiyon için çimlendirilmiş olup, 15 gün sonra yaşayan bitkilerin sayısı belirlenmiştir. Her kültür kab (tekerrür)'de 50'şer adet tohum kullanarak 4'er kültür kab ile ve 400 adet tohumu ile çalışma devam edilmiştir. Elde edilen sonuçları çizelge 4.16' da verilmiştir. Çalışmada kullanılmış olan Diamenta çeşidi monogerm ile EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) poligerm şeker pancarı hatları Sonuçlarına göre 350 mg/l kanamisin içeren ortamda çimlenmiş tohumlarda %100 kararına ile kısa sürede (5-7 gün içerisinde) ölüm görülmüştür. Daha sonra -*A. tumefaciens*'nin- GV2260 (pGV2260)::p35SGUS-INT ile yapılan tüm çalışmalarında 350 mg/l kanamisin, seleksiyon ortamlarında bulundurulmuştur.

Çizelge 4.16 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda kanamisin içeren ortamda yaşayan bitkilerinin oranının gözlenerek LD<sub>100</sub> dozunu belirlenmesi

Şeker pancarı çeşidi/hattı	Farklı konsantrasyonda kanamisin içeren 1 × MS ortamda yaşayan bitkilerinin oranının gözlenerek LD <sub>100</sub> dozunu belirlenmesi					
	50 (mg/l)	100 (mg/l)	150 (mg/l)	250 (mg/l)	300 (mg/l)	350 (mg/l)
<b>Diamenta</b>	100.00	95.63	63.41	35.26	10.37	0.00
<b>EMU8</b>	100.00	90.73	60.51	30.28	9.11	0.00
<b>SG3</b>	100.00	82.68	51.46	49.34	5.67	0.00

#### 4.6.4 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda fosfotrisin içeren ortamda yaşayan bitkilerinin oranının gözlenerek LD<sub>100</sub> dozunu belirlenmesi

Bu tez kapsamında yapılmış çalışmada kullanılmış şeker pancarı genotiplerinin fosfotrisin (PPT)e karşı direnç seviyesini belirlemek amacıyla tohumları 0.50, 1, 1.50, 2.00 ve 2.50 mg/l ppt içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmıştır. Çalışmanın amacı bu genotiplerine ait tohumlardan gelişen bitkilerin gen aktarım çalışmalarında seleksiyon için başarının alınacağı en düşük LD<sub>100</sub> ppt dozunu belirlenmesi olmuştur.

Dolayısıyla etkili bir bitki seleksiyon yöntemi geliştirmek için ilk önce çalışmada şeker pancarının EMU 8, SG3 poligerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait tohumları . farklı oranda PPT içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmıştır. PPT'e karşı LD<sub>100</sub> dozu 20 gün sonra canlı kalan bitkileri sayarak çimlenmemiş bitkilerle kıyaslanarak hesaplanmıştır (çizelge 4.17). Çalışmanın amacı araştırmada kullanılmış hatlar ve çeşidine ait tohumlardan gelişen bitkilerin gen aktarım çalışmalarında seleksiyon için başarının alınacağı en düşük LD<sub>100</sub> PPT dozunu belirlenmesi olmuştur .

Çizelge 4.17 Şeker pancarının monogerm Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı), SG3 (anne hattı) için farklı dozda fosfotrisin içeren ortamda ölen bitkilerinin oranının (%) gözlenerek LD<sub>100</sub> dozunu belirlenmesi

Genotipler	PPT (0.5 mg/l)	PPT (1.00 mg/l)	PPT (1.50 mg/l)
Diamenta monogerm çeşidi	1.00	4.00	28.00
EMU 8 poligerm hatı	5.00	9.00	20.00
SG3 poligerm hatı	2.00	7.00	21.00
Genotipler	PPT (2.00 mg/l)	PPT (2.50 mg/l)	PPT (3.00 mg/l)
Diamenta monogerm çeşidi	85.00	100.00	100.00
EMU 8 poligerm hatı	63.00	100.00	100.00
SG3 poligerm hatı	79.00	100.00	100.00

Elde edilen sonuçlarına göre 0.50, 1.00, 1.50 ve 2.00 mg/l fosphonitrisin içeren ortamda bitkilerin ölüm yüzdesi oranı sırasıyla %1.00-5.00 arası, 4.00 -9.00 arası, 20-28 arası, %63 – 85.00 arası, değişir ken 2.50 ve 3.00 mg/l fosphonitrisin içeren ortamda bitki ölüm %100.00 olarak belirlenmiştir (şekil 4.7).

Bu sonuçlara bağlı olarak dah sonra yapılan çalışmalarında seleksiyon için hem 2 hemde 2.5 mg/l fosfinotrisin kullanılmıştır.



Şekil 4.7 Şeker pancarının EMU 8, SG3poligerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait bitkilerin 2.50 mg/l fosphonitrisin içeren ortamda LD<sub>100</sub> belirlenmesi

#### 4.6.5 *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla şekerpancarına gen aktarım

Denemede yarı katı 1 × MS ortamda hidropriminga maruz kalmış olan şekerpancarı tohumlarından gelişen gelişen 2-3 günlük fidecikleri gen aktarım için eksplant olarak kullanılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens*'nin non onkogenik GV2260:: p35Gus INT, hattı ile gen aktarımı işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Seleksiyon ortamda gelişen kalluslar veya rejenre olan sürgünleri sürekli olarak kontrol altında tutularak canlı kalan bitkilerinde kullanılan genlerin ekspresiyonu (belirtileri) için gus ve pcr testi yapılmıştır (Bechtold et al. 1993, Clough and Bent A 1998, Chung et al. 2000, Desfeux et al. 2000).

#### 4.6.6 *Agrobacterium tumefaciens*'nin A281 pTiBo 542 hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı

*Monogerm Diamenta çeşidi*: Tohumlar çimlendikten 5 gün sonra **A281 pTiBo 542** olan bakteri ile muamele edildikten sonra 2 gün ko kultuvasyon için 1 × MS ortamda bekletilmiştir, daha sonra tümör oluşturmak amacıyla 400 mg/l Duocid içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmış olup 15 gün sonra yaprak disk örnekleri üzerinde hem tümör oluşumu hem de histo kimyasal gus analizi yaparak incelemeler yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 4.18'da verilmiştir.

Daha sonra Duocid içeren ortamdaki yaşayan örnekleri numaralandırılmıştır ve onlardan parçaları alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Altı (6) adet bitkide tümör oluşumu gözlenmiştir (şekil 4.8 a, d). Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif örnekleri taranmıştır.

Bu denemede 80 adet bitkiden 35 adet örnek canlı kalmış olup, %43.75 örnek yaşamışlar. Elde edilen örneklerden 6 adet örnek üzerinde (%7.5) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir

Çizelge 4.18 *Agrobacterium tumefaciens*'nin **A281 pTiBo 542** hattıyla monogerm Diamenta şeker pancarı çeşidine ait gus ekspresiyon ve tümör oluşumu ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	80.00	
15 gün sonra seleksiyon ortamda yaşayan bitki sayısı(adet)	35.00	43.75
Toplam Gus pozitif bitki sayısı (adet)	6.00	7.5
Tümör oluşturan eksplant sayısı	6.00	6.00



*EMU8 poligerm şeker pancarı hattı*: Tohumlar çimlendikten 5 gün sonra **A281 pTiBo 542** olan bakteri ile muamele edildikten sonra 2 gün ko kultivasyon için 1 × MS ortamda bekletilmiştir, daha sonra tümör oluşturmak amacıyla 400 mg/l Duocid içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmış olup 15 gün sonra yaprak disk örnekleri üzerinde hem tümör oluşumu hem de gus analizi yaparak incelemeler yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 4.19’de verilmiştir.

Daha sonra Duocid içeren ortamdaki yaşayan örnekleri numaralandırılmıştır ve onlardan parçaları alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C’de bekletilmiştir. Yetmiş bir (71) adet bitkide tümör oluşumu gözlenmiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif örnekleri taranmıştır.

Çizelge 4.19 *Agrobacterium tumefaciens*’nın **A281 pTiBo 542** hattıyla EMU8 poligerm şeker pancarı hattına ait gus ekspresiyon ve tümör oluşumu ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	300	
15 gün sonra seleksiyon ortamda yaşayan bitki sayısı(adet)	94.00	31.33
Gus pozitif bitki sayısı (adet)	71.00	23.66
Tümör oluşum yüzdesi	71.00	23.66

Daha sonra Duocid içeren ortamdaki yaşayan örnekleri numaralandırılmıştır ve onlardan parçaları alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C’de bekletilmiştir. Bu denemede 300 adet bitkiden 94 adet örnek canlı kalmış olup, %31.33 örnek yaşamışlar. Elde edilen örneklerden 71 adet (%23.66) örnek üzerinde hem tümör oluşumu hemde yapraklarda gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir (şekil 4.8b,e).

*SG3 poligerm şeker pancarı anne hattı*: Bu denemede 200 adet bitkiden 107 adet örnek canlı kalmış olup, %53.5 örnek yaşamışlar. Elde edilen örneklerden 45 adet üzerinde (%2.7) gus pozitif ekspresiyon ile tümör oluşumu (Şekil 4.8c, f) gözlenmiştir.

Çizelge 4.20 *Agrobacterium tumefaciens*'nin A281 PTIBO 542 hattıyla *SG3 poligerm şeker pancarı* hattına ait gus ekspresiyon ve tümör oluşumu ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/ kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	200	-
15 gün sonra Duocid içeren ortamda yaşayan eksplant sayısı(adet)	107	53.5
Toplam gus pozitif örnek sayısı (adet)	45	2.7
Toplam tümör oluşturan örnek sayısı (adet)	45	2.7



Şekil 4.8 *Agrobacterium tumefaciens*'nin A281 hattıyla gen aktarımı

(a, d) mono germ Diamenta çeşidi ile (b,e) poligerm EMU 8 (baba hattı) ve(c, f) SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına tümör oluşturma ve gus pozitif yaprak örneklerin görüntüleri

#### **4.6.7 *Agrobacterium rhizogenes*'nın 15834 PRGGbar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı**

*Diamenta monogerm çeşidi*: Şeker pancarı *Diamenta monogerm* çeşidine ait 400 adet tohum çimlendirdikten 5 gün sonra *A. rhizogenes*'nin 15834 PRGGbar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantları 2 gün boyunca 1 × MS ortamına ko kultuvasyon için bırakılmıştır. Ko kultuvasyon yapılmış eksplantlarda kök oluşum gözlenmek için tüm eksplantları 400 mg/l Duocid içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınmıştır.

Daha sonra Duocid içeren ortamdaki yaşayan bitkileri numaralandırılmıştır ve onlardan yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 4'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Her hangi örnek üzerinde kök oluşum gözlenmemiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır.

Bu denemede 400 adet bitkiden 136 adet bitki canlı kalmış olup, %34 bitki yaşamışlar. Elde edilen bitkilerden sadece 1 adet bitkisinde (%2.5) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 1 adet (%0.25) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin orta kısımda gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21 *Agrobacterium rhizogenes*'nın 15834::pRGGbar hattıyla *Dianta monogerm* şeker pancarı çeşidine ait gus ekspresiyon ve kök oluşum ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	400	
15 gün sonra Duocid içeren ortamda yaşıyan bitki sayısı(adet)	136	34
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	1	0.25
Expresyon Gus pozitif (Mavi noktanın) ekspresiyon/ ifade yeri	Baş	0
	orta	1
	Sap	0
	tamam	0

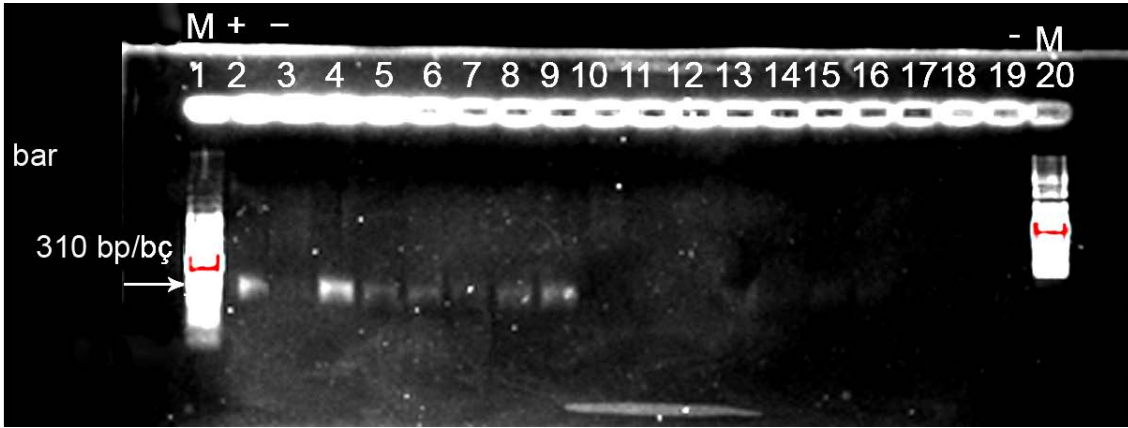
*PCR testi:* Elde edilen transgenik aday bitkilerinden rastgele 20 adet bitki seçilmiş olup, bar ve *npt II* genin varlığın tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonu yürütülmüştür. PCR sonucu örneklerinde bar genin varlığını teyid edilememiştir. Ancak, 2 adet örnekte *nptii* genin varlığın tespit edilmiştir (şekil 4.9)

*EMU8 poligerm baba hattı:* Şeker pancarı EMU8 poligerm anne hattına ait 800 adet tohum çimlendirdikten 5 gün sonra *A. rhizogenes*'nın 15834 PRGGbar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantları 2 gün boyunca 1 × MS ortamına ko kultivasyon için bırakılmıştır. Ko kultivasyon yapılmış eksplantlarda kök oluşum gözlenmek için tüm eksplantları 400 mg/l Duocid içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol fotons/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınmıştır.

Daha sonra Duocid içeren ortamdaki yaşayan bitkileri numaralandırılmıştır ve onlardan yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 4'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Her hangi örnek üzerinde kök oluşum gözlenmemiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol

içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır.

Bu denemede 800 adet bitkiden 326 adet bitki canlı kalmış olup, %40.75 bitki yaşamışlar. Elde edilen bitkilerden sadece 175 adet bitkisinde (%21.87) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 16 adet (%2) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprak ucunda, 75 adet (%9.37) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısmında, 50 adet (%6.25) bitkide yaprak sapında ve 34 adet (% 4.25) yaprakında tamamen gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (çizelge 4.22).



Şekil 4.9 Gus pozitif bitkilerin teyidi, 1.ve 20. veya M kulvar markör 1000 bp, + veya 2. Kulvar transgenik samsun – maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi, - veya 19. Kulvar transgenik olmayan samsun – maden 22/41 tütün çeşidi, 4., 5., 6., 7., 8., 9. kulvar EMU8 poligerm baba hattına ait bitkilerinde *bar* genin varlığının pcr ile teyidi

Çizelge 4.22 *Agrobacterium rhizogenes*'nin 15834::pRGGbar hattıyla EMU8 poligerm şeker pancarı hattına gus ekspresiyon ve kök oluşum ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)	
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidelik/eksplant sayısı	800		
15 gün sonra Duocid içeren ortamda yaşayan bitki sayısı(adet)	326	40.75	
Kök oluşturan eksplant sayısı			
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	175	21.87	
Expresyon Gus pozitif (Mavi noktanın) ekspresiyon/ifade yeri	Baş	16	2
	orta	75	9.37
	Sap	50	6.25
	tamam	34	4.25

*PCR testi:* Elde edilen transgenik aday bitkilerinden rastgele 20 adet bitki seçilmiş olup, bar ve *npt II* genin varlığın tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonu yürütülmüştür. PCR sonucu 6 adet örnekte bar geni ile transformasyon teyid edilmiştir. Ancak, 4 adet örnekte *nptii* genin varlığın tespit edilmiştir (şekil 4.10)

*SG3 poligerm ana hattı:* Şeker pancarı SG poligerm anahattına ait 900 adet tohum çimlendirdikten 5 gün sonra *A. rhizogenes*'nin 15834 PRGGbar hattına ait süspansiyonuyla 45 dk muamele edilmiştir. Daha sonra eksplantları 2 gün boyunca 1 × MS ortamına ko kultivasyon için bırakılmıştır. Ko kultivasyon yapılmış eksplantlarda kök oluşum gözlenmek için tüm eksplantları 400 mg/l Duocid içeren 1 × MS ortamına kültüre alınmış olup, 15 gün 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de kültüre alınmıştır.

Daha sonra seleksiyon ortamdaki yaşayan bitkileri numaralandırılmıştır ve onlardan yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 4'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Her hangi örnek üzerinde kök oluşum gözlenmemiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol

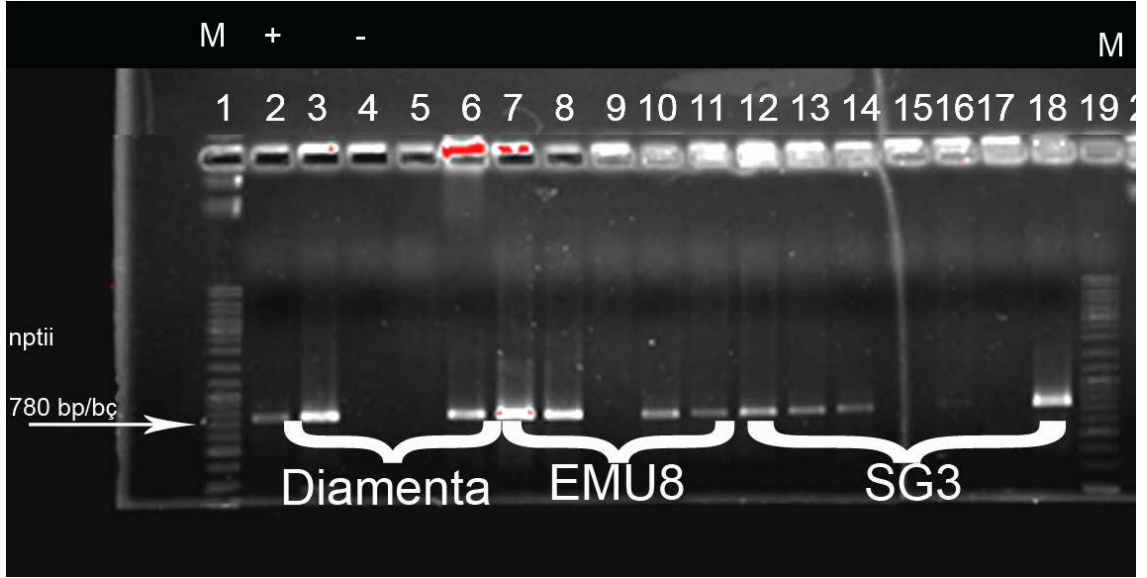
içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır.

Bu denemede 900 adet bitkiden 315 adet bitki canlı kalmış olup, %35 bitki yaşamışlar. Elde edilen bitkilerde sadece 44 adet bitkisinde (%4.89) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 12 adet (%1.33) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprak ucunda, 8 adet (%0.88) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısmında, 11 adet (%1.22) bitkide yaprak sapında ve 13 adet (%1.44) yaprakında tamamen gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23 *Agrobacterium rhizogenes*'nin 15834::pRGGbar hattıyla SG3 poligerm şeker pancarı hattına gus ekspresiyon ve kök oluşum ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)	
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	900		
15 gün sonra seleksiyon ortamda yaşayan bitki sayısı(adet)	315	35	
Kök oluşturan eksplant sayısı	0.00	0.00	
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	44	4.89	
Yaprak üzerinde Gus pozitif ekspresiyon /ifade yeri	Yaprak ucu	12	1.33
	orta	8	0.88
	Sap	11	1.22
	tamam	13	1.44

*PCR testi:* Elde edilen transgenik aday bitkilerinden rastgele 20 adet bitki seçilmiş olup, bar ve *npt II* genin varlığın tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonu yürütülmüştür. PCR sonucu örneklerde bar geni ile transformasyon teyid edilememiştir. Ancak, 4 adet örnekte *npt ii* genin varlığın tespit edilmiştir (şekil 4.10).



Şekil 4.10 1. 19. veya M kulvar markör 1000 bp, + veya 2. Kulvar transgenik samsun – maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi, - veya 4. Kulvar transgenik olmayan samsun – maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi, 3., 6, Diamenta mono germ çeşidi, 7., 8., 10. ve 11. kulvar transgenik EMU 8 şeker pancarı poligerm baba hattı, 12., 13., 14., 18. Kulvar SG<sub>3</sub> şeker pancarı poligerm anne hattına ait transgenik bitkilerinde *npt II* genin varlığının pcr ile teyidi

#### 4.6.8 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 4404::pRGGbar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı

*Diamenta monogerm çeşidi ne ait transgenik aday bitkilerin 2 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon:* Bu denemede 2-3 günlük 1000 adet şeker pancarı Diamenta monogerm çeşidine ait bitkicik eksplant olarak LBA 444::pRGGbar *A. tumefaciens* hattının süspansiyonuyla 45 dk muamele ettikten sonra, eksplantları 30 g sukroz içeren 1 × MS ortamına 48 saat boyunca ko kültüvasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra, explantları numaralandırarak 15 gün boyunca 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/l GA<sub>3</sub>, 30 g sakaroz, 2.0 mg/l fosfinotrisin (seleksiyon amacıyla), 200 mg/l Duocid (geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiği) içeren ve 6.5 g agar (katılaştırmak için), pH 5.8 içeren 1 × MS ortamına aktarılmış olup, seleksiyon amacıyla bekletilmiştir. Kokültüvasyon ve seleksiyon 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de yapılmıştır.

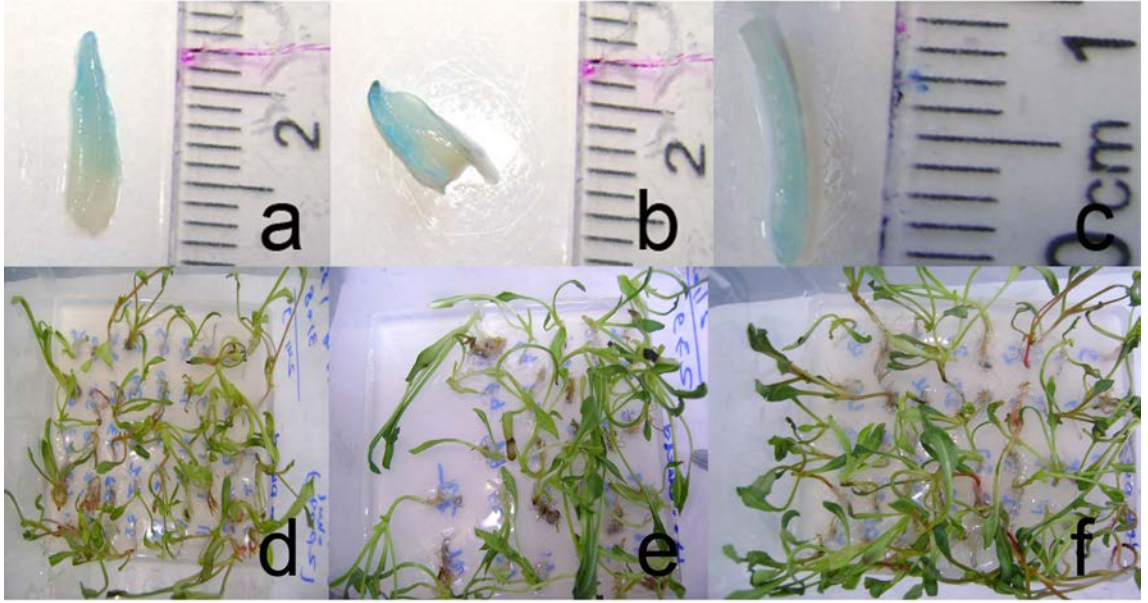


Bu denemede 15 gün sonra, Diamenta şeker pancarı hattına ait 1000 adet bitkiden 130 bitki canlı kalmış olup, %13.00 bitki 2.0 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Daha önceden numaralandırılmış yaşayan bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır. Elde edilen bitkilerde sadece 20 bitkisinde (%2.00) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir (şekil 4.11 a,d). Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 1 adet (%0.01) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprak ucunda, 5 adet (%0.05) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısmında, 5 adet (%0.05) bitkide yaprak tamamen ve 9 adet (%0.09) yaprak sapında gus pozitif ekspresiyongözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.24).

*PCR testi:* Elde edilen transgenik aday bitkilerinden rastgele 20 adet bitki seçilmiş olup, bar ve *npt II* genin varlığın tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonu yürütülmüştür. PCR sonucu4 adet örnekte bar geni ile transformasyon teyid edilmiştir (şekil 4.12).

Çizelge 4.24 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla Diamenta monogerm şeker pancarı çeşidine 2.0 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları

Açıklamalar		Elde edilen/ kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidelik/eksplant sayısı		1000	
15 gün sonra seleksiyon ortamda yaşayan bitki sayısı(adet)		130	13.00
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)		20	2.00
Yaprak üzerinde Gus pozitif ekspresiyon /ifade yeri	Yaprak ucu	1	0.01
	orta	5	0.05
	tamam	5	0.05
	Sap	9	0.09



Şekil 4.11 *Agrobacterium tumefaciens*'ın LBA 444::pRGGbar hattıyla; a, d., mono germ Diamenta çeşidi ile, b. e. poligerm EMU 8 (baba hattı) ve c.f. SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına ait bitkilerinde gus pozitif ekspresyonları

*Diamenta monogerm çeşidi ne ait transgenik aday bitkilerin 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon* : Bu denemede 2-3 günlük 900 adet şeker pancarı Diamenta monogerm çeşidine ait bitkicik eksplant olarak LBA 444::pRGGbar *A. tumefaciens* hattının süspansiyonuyla 45 dk muamele ettikten sonra, eksplantları 30 g sukroz içeren  $1 \times MS$  ortamına 48 saat boyunca ko kültürasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra, explantları numaralandırarak 15 gün boyunca 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/l  $GA_3$ , 30 g sakaroz, 2.5 mg/l fosfinotrisin (seleksiyon amacıyla), 200 mg/l Duocid (geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiği) içeren ve 6.5 g agar (katılaştırmak için), pH 5.8 olan  $1 \times MS$  ortamına aktarılmış olup, seleksiyon amacıyla bekletilmiştir. Kokültürasyon ve seleksiyon 16 saat ışık fotoperiyotta  $35 \mu mol \text{ foton}/m^2/s$  ışık altında  $24 \pm 1^\circ C$ 'de yapılmıştır.

Bu denemede 15 gün sonra, Diamenta şeker pancarı hattına ait 900 adet bitkiden 164 bitki canlı kalmış olup, %18.22 bitki 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Daha önceden numaralandırılmış yaşayan bitkilerinden 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. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır. Elde edilen bitkilerde Diamenta şeker pancarı hattına ait 900 adet bitkiden 164 bitki canlı kalmış olup, %18.22 bitki 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Elde edilen bitkilerde sadece 69 bitkisinde (%7.66) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 1 adet (%0.11) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprak ucunda, 17 adet (%1.89) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısmında, 40 adet (%4.44) bitkide yaprak sapında ve 9 adet (% 1.00) yaprakında tamamen gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.25 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla Diamenta monogerm şeker pancarı çeşidine 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçlar

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)	
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	900		
15 gün sonra seleksiyon ortamda yaşayan bitki sayısı(adet) Diamenta çeşidinin LBA 4404 bakteride 2.5mg/L	164	18.22	
Bitki üzerinde Gus pozitif sayısı	69	7.66	
Expresyon Gus pozitif (Mavi noktanın) ekspresiyon /ifade yeri	Baş	1	0.11
	orta	17	1.89
	Sap	40	4.44
	tamam	9	1

*EMU8 poligerm ana hattına ait transgenik aday bitkilerin 2 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon:* Bu denemede 2-3 günlük 1000 adet şeker pancarı EMU8 poligerm hattına ait bitkicik eksplant olarak LBA 444::pRGGbar *A. tumefaciens* hattının süspansiyonuyla 45 dk muamele ettikten sonra, eksplantları 30 g sukroz içeren 1 × MS ortamına 48 saat boyunca kökültüvasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra,

explantları numaralandırarak 15 gün boyunca 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/l GA<sub>3</sub>, 30 g sakaroz, 2.0 mg/l fosfinotrisin (seleksiyon amacıyla), 200 mg/l Duocid (geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiği) içeren ve 6.5 g agar (katılaştırmak için), pH 5.8 içeren 1 × MS ortamına aktarılmış olup, seleksiyon amacıyla bekletilmiştir. Kokültüvasyon ve seleksiyon 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de yapılmıştır.

Bu deneme kapsamında 15 gün sonra, EMU8 şeker pancarı hattına ait 1800 adet bitkiden 415 bitki canlı kalmış olup, %4.27 bitki 2.0 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Daha önceden numaralandırılmış yaşayan bitkilerinden 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. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır.

Bu denemede 15 gün sonra, EMU8 şeker pancarı hattına ait 1800 bitkiden 415 bitki canlı kalmış olup, %23.05 bitki 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Elde edilen bitkilerde sadece 77 bitkisinde (%4.27) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir (şekil 4.11 b,f).. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 3 adet (%0.17) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprak ucunda, 29 adet (%1.61) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısımda, 29 adet (%1.61) bitkide yaprak petiollarda ve 15 adet (%0.83) yaprakın tamamında gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.26).

*PCR testi:* Elde edilen transgenik aday bitkilerinden rastgele 20 adet bitki seçilmiş olup, bar ve *npt II* genin varlığın tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonu yürütülmüştür. PCR sonucu 5 adet örnekte bar geni ile transformasyon teyid edilmiştir (şekil 4.12).

Çizelge 4.26 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla EMU8 (baba hattı) şeker pancarı hatına 2.0 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları

Açıklamalar	Elde edilen/kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	1800	
15 gün 2 mg/l fosfinotrisin içeren seleksiyon ortamda EMU8 poligerm hatına ait bitkilerin sayısı (adet)	415	23,05
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	77	4.27
Yaprak üzerinde Gus pozitif ekspresiyon /ifade yeri	Yaprak ucu	3
	orta	29
	Sap	29
	tamam	15
		0.17
		1.61
		1.61
		0.83

*EMU8 poligerm ana hattına ait transgenik aday bitkilerin 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon:* Bu denemede 2-3 günlük 1200 şeker pancarı EMU8 poligerm ana hatına ait bitkicik eksplant olarak LBA 444::pRGGbar *A. tumefaciens* hattının süspansiyonuyla 45 dk muamele ettikten sonra, eksplantları 30 g sukroz içeren 1 × MS ortamına 48 saat boyunca ko kültürasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra, explantları numaralandırarak 15 gün boyunca 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/l GA<sub>3</sub>, 30 g sakaroz, 2.5 mg/l fosfinotrisin (seleksiyon amacıyla), 200 mg/l Duocid (geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotığı) içeren ve 6.5 g agar (katılaştırmak için), pH 5.8 olan 1 × MS ortamına aktarılmış olup, seleksiyon amacıyla bekletilmiştir. Kokültürasyon ve seleksiyon 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de yapılmıştır.

Emu8 şeker pancarı hattına ait 1200 bitkiden 77 bitki canlı kalmış olup, %6.41 bitki 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Seleksiyon ortamdaki daha önceden numaralandırılmış yaşayan bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözültüsü eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde

48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır. Elde edilen bitkilerde sadece 8 adet bitkisinde (%0.66) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 1 adet (%0.08) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısmında ve 7 adet (%0.58) bitkide yaprak petiollarda gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 4404::pRGGbar hattıyla EMU8 (baba hattı) şeker pancarı hatına 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları

Açıklamalar	Elde edilen/ kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	1200	100
15 gün sonra 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren seleksiyon ortamında EMU8 poligerm hatına ait bitkilerin sayısı (adet)	77	6.41
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	8	0.66
Expresyon Gus pozitif (Mavi noktanın) ekspresiyon/ifade yeri	Baş	0
	orta	1
	Sap	7
	tamam	0

*SG3 poligerm ana hattına ait transgenik aday bitkilerin 2 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon:* Bu denemede 2-3 günlük 1200 şeker pancarı SG3 poligerm ana hatına ait bitkicik eksplant olarak LBA 444::pRGGbar *A. tumefaciens* hattının süspansiyonuyla 45 dk muamele ettikten sonra eksplantları 30 g sukroz içeren 1 × MS ortamına 48 saat boyunca ko kültürasyonuna alınmıştır. Daha sonra, explantları numaralandırarak 15 gün boyunca 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/l GA<sub>3</sub>, 30 g sakaroz, 2.5 mg/l fosfinotrisin (seleksiyon amacıyla), 200 mg/l Duocid (geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiği) içeren ve 6.5 g agar (katılaştırmak için), pH 5.8 olan 1 × MS ortamına aktarılmış olup, seleksiyon amacıyla bekletilmiştir. Ko kültürasyon ve seleksiyon 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de yapılmıştır.

Daha önceden numaralandırılmış SG3 şeker pancarı hattına ait 1200 bitkiden 72 bitki canlı kalmış olup, %6 bitki 2 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Bunlardan yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltilisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Yaprak örneklerin klorofil çöktürerek gus geni ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır. Elde edilen bitkilerde sadece 2 bitkisinde gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir (şekil 4.11 c,e).. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince birinde yaprak ucunda ve ikincisinde ise yalnız petiole üzerinde gus pozitif ekspresiyonu gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.28)

*PCR testi:*Elde edilen transgenik aday bitkilerinden rastgele 20 adet bitki seçilmiş olup, *bar* ve *npt II* genin varlığın tespit etmek amacıyla PCR reaksiyonu yürütülmüştür. PCR sonucu 5 adet örnekte *bar* geni ile transformasyon teyid edilmiştir (şekil 4.12).

Çizelge 4.28 *Agrobacterium tumefaciens*'nın LBA 444::pRGGbar hattıyla SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatına hatına 2 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları

Açıklamalar	Elde edilen/ kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidelik/eksplant sayısı	1200	100
15 gün sonra 2 mg/l fosfinotrisin içeren seleksiyon ortamda 15 gün sonra yaşayan bitki sayısı(adet)	72	6
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	2.00	0.17
Yaprak üzerinde Gus pozitif ekspresiyon /ifade yeri	Yaprak ucu	1.00
	Orta	0.00
	Petiole	1.00
	Tamam	0.00

*SG3 poligerm ana hattına ait transgenik aday bitkilerin 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon:* Bu denemede 2-3 günlük 1200 şeker pancarı SG3 poligerm ana hattına ait bitkicik eksplant olarak LBA 444::pRGGbar *A. tumefaciens* hattının

süspansiyonuyla 45 dk muamele etikten sonra eksplantları 30 g sukroz içeren 1 × MS ortamına 48 saat boyunca ko kültüvasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra, explantları numaralandırarak 15 gün boyunca 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/l GA<sub>3</sub>, 30 g sakaroz, 2.5 mg/l fosfinotrisin (seleksiyon amacıyla), 200 mg/l Duocid (geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiği) içeren ve 6.5 g agar (katılaştırmak için), pH 5.8 olan 1 × MS ortamına aktarılmış olup, seleksiyon amacıyla bekletilmiştir. Kokültüvasyon ve seleksiyon 16 saat ışık fotoperiyotta 35 µ mol foton/m<sup>2</sup>/s ışık altında 24 ±1°C'de yapılmıştır.

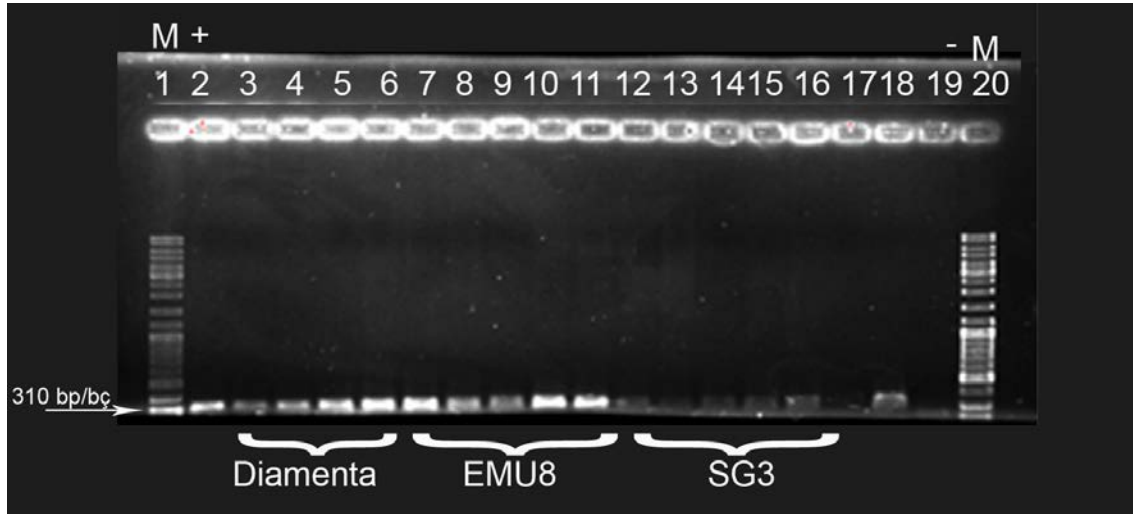
Daha sonra seleksiyon ortamdaki yaşayan bitkileri numaralandırılmıştır ve onlardan yaprak örnekleri alınarak etiketlenmiş ependorf tüpler içerisinde 1'er adet yaprak örneği üzerinde gus histokimyasal analizi için gereken çözeltisi eklenerek 24 saat 38°C'de bekletilmiştir. Yaprak örneklerin klorofil parçalanmak ve gus genin ekspresiyon için örnekleri %96 etanol içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra, alınan örneklerinde maviye boyanması ile GUS pozitif bitkileri aranmıştır. Gus pozitif bitkilerinden daha sonra PCR testi ile transformasyonunun pozitive olduğunu ispatlanmıştır.

Bu denemede 15 gün sonra, SG3 şeker pancarı hattına ait 1200 bitkiden 23 bitki canlı kalmış olup, %1.91 bitki 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda yaşamışlar. Elde edilen bitkilerde sadece 17 bitkisinde (%1.41) gus pozitif ekspresiyon gözlenmiştir. Test edilmiş transgenik aday bitkilerinin yaprak örnekleri inceleyince 2 adet (%0.16) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprak ucunda, 5 adet (%0.041) bitkisinden alınan yaprak örneklerinin yaprakların orta kısımda, 4 adet (%0.33) bitkide yaprak petiollarda ve 6 adet (%0.5) yaprakın tamamında gus pozitif ekspresiyon gözlenerek mavilik izlenmiştir (Çizelge 4.29).



Çizelge 4.29 *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA 444::pRGGbar hattıyla SG3 (anne hattı) şeker pancarı hattına 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren ortamda seleksiyon ile ilgili sonuçları

Açıklamalar	Elde edilen/ kullanılan Bitki sayısı (adet)	Elde edilen bitki oranı (%)
Denemede kullanılan bakteri ile muamele edilmiş fidecik/eksplant sayısı	1200	
15 gün sonra 2.5 mg/l fosfinotrisin içeren seleksiyon ortamda 15 gün sonra yaşayan bitki sayısı (adet)	23	1.91
Toplam gus pozitif Bitki/örnek sayısı (adet)	17	1.41
Yaprak üzerinde Gus pozitif ekspresiyon /ifade yeri	Yaprak ucu	0.16
	orta	0.41
	tamam	0.5
	Sap	0.33



Şekil 4.12 1. veya M kulvar = markör 1000 bp, 2. Kulvar pozitif kontrol (transgenik Samsun – Maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi), - veya 19. kulvar - negatif kontrol. (transgenik olmayan Samsun – Maden 22/41 tütün çeşidine ait bitkisi), 3., 4., 5., 6., monogerm Diamenta çeşidi, 7., 8., 9., 10., 11., şeker pancarı EMU8 poligerm baba hattına ait ve 12., 13., 14., 15., 16. ve 18. kulvar SG3 poligerm anne hattına ait transgenik bitkilerinde *bar genin* varlığının pcr ile teyidi.

**4.6.9 *Agrobacterium tumefaciens*'nın pTF101 AoPR1 AcBar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı**

*Agrobacterium tumefaciens*'nin PTF101AoPR1AcBar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı çalışmalarında tohumlar çimlendikten 2 gün sonra gus ve cry 1 geni taşıyan PTF101AoPR1AcBar'nın süspansiyon ile muamele edildikten sonra 2 gün 1 × MS ortamına ko kültüvasyonuna alınmıştır. Daha sonra bitkileri 200 mg/l Duocid + 350 mg/l kanamisin içeren ortama seleksiyon için aktarılmıştır. SG3 Poligerm ana hattı, EMU8 poligerm baba hattı ve Diamenta monogerm çeşidi'nin sırasıyla 600, 600 ve 400 adet tohum kullanılmış olup 15 gün sonra seleksiyon ortamda 21, 22 ve 16 adet bitki elde edilmiştir (çizelge 4.30). Seleksiyon ortamda yaşayan bitkilerden örnek alınarak GUS testine tabi tutulmuştur ve çalışmada her hangi örnekten gus pozitif sonuç alınmamıştır.

Çizelge 4.30 *Agrobacterium tumefaciens*'nin PTF101AoPR1AcBar hattıyla mono germ Diamenta çeşidi ile poligerm EMU 8 (baba hattı) ve SG3 (anne hattı) şeker pancarı hatlarına gen aktarımı ile ilgili sonuçları

Şekerpancarı çeşidi/hattı	Diamenta	SG3	EMU8
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'nin PTF101AoPR1AcBar hattıyla muamele edilmiş bitkilerin sayısı (adet)	400	600	600
15 gün sonra yaşıyan bitkilerin sayısı (adet)	16	21	22

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1 Değerlendirme

- i. Türkiye’de şeker pancarı tarımında hem monogerm hemde poligerm eşitleri kullanılmaktadır. Genel anlamda yetiştirilen şeker pancarı tohumları tırtıklı ve diken köşeli olduğu için sterilizasyon işlemler çok zordur. Yüzey sterilizasyonunda pancarı’nin EMU 8, SG3 poligerm hatları ve Diamanta monogerm çeşitine ait tohumları kullanılmıştır.
- ii. Birinci denemede, her 3 çeşitine ait tohumları sulfurik asit ile 80 dk muamele edilerek  $3 \times 3$  dk saf su ile durulama yapılmış olup,  $1 \times MS$  ortamına kültüre alınmıştır. İkinci denemede, her 3 genotipine ait tohumları ilk önce sulfurik asit ile 80 dk muamele edilip,  $3 \times 3$  dk saf su ile durulama yapılarak, 60 dk %100’konsantrasyonda ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit-%5 NaClO içeren etken madde) ile belirtilmiş çeşitlerin tohumları steril edilmiştir. Üçüncü denemede her 3 genotipine ait tohumlarına yukarda belirtilmiş muameler yaptıktan sonra %3 BKK/PPM (Plant Preservation Mixture) içeren su içerisinde 12 saat bekletilmiştir. 12 saat bekletilmiş tohumları %3 sakkaroz içeren ve %0.65 agar ile katılaştırılmış  $1 \times MS$  ortamına bulaşık oranları ve çimlenme oranı belirlemek için steril Petri kapları içerisinde 24°C’de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. Üçüncü denemede %100 sterilizasyon elde etmesine rağmen her hangi genotipte %100 çimlenme görülmemiştir.
- iii. Bu tez kapsamında kullanılan SG3 poligerm çeşitinde ışıklı ortamda ve EMU8 poligerm hat ve Diamenth mongerm çeşitinde karanlık ortamda en fazla çimlenme rastlanmıştır. Kullanılan 16 saat ışık ve karanlık ortamın farklı frekansda çimlenmeye etkilediği görülmüş olup, SG3 için 16 saat ışık ortamı ve EMU8 ve Diamantha için karanlık ortamında imlendirilmesi daha uygun görülmüştür.

- iv. Şeker pancarının yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyon elde etmek amacıyla çalışılmıştır. Ancak, yaprak sapı (petiol)'dan sürgün rejenerasyon elde ederken yaprak eksplantından sürgün rejenerasyon görülmemiştir ve elde edilen sonuçlar yetersiz kalmıştır.
- v. Bu çalışmada rejenerasyon için farklı oranda BAP-NAA (0.10 mg/l NAA oranları ayrıca sabit tutarak), ve farklı oranda TDZ içeren 1 × MS ortamları kullanılmıştır. Yapılan tüm çalışmalarında sürgün rejenerasyon açısından ortamlar arasında belirgin farklılığı görülmüştür. Benzer şekilde, elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde de farklılığı gözlenmiştir. TDZ içeren ortamlarda gelişen bitkilerde kök oluşüm gözlenmiştir.
- vi. LD<sub>100</sub> Kanamisin dozunu belirlenmiştir.
- vii. Kanamisine karşı LD<sub>100</sub> dozu 20 gün sonra canlı kalan bitkileri sayarak çimlenmemiş bitkilerle kıyaslayarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre şeker pancarının EMU 8, SG3 poligerm hatları ve Diamenta monogerm çeşidine ait tohumları 350 mg/l kanamisin ve 2 -2.5 mg/l fosfinotrisin seleksiyon için uygun görülmüştür.
- viii. Seleksiyon ortamda gelişen gus pozitif bitkilerin PCR analizi sonucunda GV2260:: p35Gus INT, LBA4404 hatlarıyla yapılan çalışmalarında transgenik bitkiler elde edilirken pTF101AoPR1AcBar ile yapılan çalışmalarında her hangi transgenik bitki elde edilmemiştir.

## 5.2 Öneriler

- i. Yapılan bu tez çalışması sonucunda 3 adet şeker pancarı genotiplerinde, tohum eksplantı kullanarak transgenik bitki elde etmişlerdir. Bundan Türkiye'de yapılan şeker pancarı ile ilgili transgenik çalışmalarında farklı biyotik ve

abiyotik streslerine karşı dirençliliğinin kazandırılması büyük bir önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abe, J., Nakashima, H., Mitsui, K., Mikami, T. and Shimamoto, Y. 1991. Tissue culture response of Beta germplasm: callus induction and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 27: 123–127.
- Acquaah, G. 2012. Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests, in *Principles of Plant Genetics and Breeding*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002,9781118313718.ch14
- Akpınar, G. 2006. Embriyonik kültür yöntemiyle yetiştirilen ve soğukta muhafaza edilen ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkilerinde karyolojik ve anatomik incelemeler. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı. 77. Edirne.
- Aktürk, Z. 2009. Kırazı (*Prunus avium* L.) *In vitro* mikroçoğaltımı. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Biyoloji Anabilim Dalı, 190 Diyarbakır.
- Alkuş, A. 2007. Bazı Türk Arpa Çeşitlerinin Alüminyuma Karşı Olan Toleranslarının Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 56. Kahramanmaraş.
- Altunok, A. 2002. Bazı şeker pancarı hatlarında *In vitro* adventif sürgün rejenerasyonu. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. 54. Ankara
- Altunok, A, ve Er, C. 2013. Bazı Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) Hatlarında *In vitro* Adventif Sürgün Rejenerasyonu *Anadolu Journal of AARI*, 23 (2) 2013, 27 - 35
- Anonim, 2015a. Dünyada beyaz şeker ve nişasta bazlı şekerin durumu. ([http://www.sekerkurumu.gov.tr/upload/special/ayin\\_konusu/2015\\_unya\\_seker\\_durumu.pdf](http://www.sekerkurumu.gov.tr/upload/special/ayin_konusu/2015_unya_seker_durumu.pdf)) Erişim: 26.10.2015.
- Anonim, 2015b. Doğal şeker nedir? Nasıl üretilir? Şeker Pancarının Ülke Ekonomisindeki Yeri ve Genel özellikleri. ([http://www.pankobirlik.com.tr/AnaSayfa/Dogal\\_Seker\\_Nedir\\_Nasil\\_Uretilir](http://www.pankobirlik.com.tr/AnaSayfa/Dogal_Seker_Nedir_Nasil_Uretilir)) Erişim: 26.10.2015.
- Anonim, 2015c. ([http://gallery.nen.gov.uk/asset59069\\_164-.html](http://gallery.nen.gov.uk/asset59069_164-.html)) Erişim: 26.10.2015.
- Anonim, 2015d. (<http://www.bilgizenginleri.org/her-telden/12527-seker-pancari-hangi-illerde-yetisir.html>). Erişim: 18.04.2015.

- Anonim, 2015d. (<http://www.turkseker.gov.tr/illereGorePancarEkimUretim.aspx>). Erişim 26.10.2015.
- Anonim, 2015e. [https://www.google.com.tr/search?q=t%C3%BCrkiye&espv=2&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0CAYQ\\_AUoAWoVChMIkvOd4ODfyAIVCo0sCh3vnQ1M#tbn=isch&q=turkey+map&imgc=nRGZE34bZ18cRM%3A](https://www.google.com.tr/search?q=t%C3%BCrkiye&espv=2&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIkvOd4ODfyAIVCo0sCh3vnQ1M#tbn=isch&q=turkey+map&imgc=nRGZE34bZ18cRM%3A)). Erişim: 7.12.2015.
- Anonim, 2015f. ([https://www.google.com.tr/search?q=%C5%9Feker+pancar%C4%B1+tohumu&espv=2&biw=911&bih=445&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0CAYQ\\_AUoAWoVChMIrJPkgJfhyAIVRPRyCh2xSgkp&dpr=1.5#tbn=isch&q=sugar+beet+seed&imgdii=UvjUjMdh\\_6K\\_tM%3A%3BUvjUjMdh\\_6K\\_tM%3A%3B9RBvH14jHO7ZwM%3A&imgc=UvjUjMdh\\_6K\\_tM%3A](https://www.google.com.tr/search?q=%C5%9Feker+pancar%C4%B1+tohumu&espv=2&biw=911&bih=445&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMIrJPkgJfhyAIVRPRyCh2xSgkp&dpr=1.5#tbn=isch&q=sugar+beet+seed&imgdii=UvjUjMdh_6K_tM%3A%3BUvjUjMdh_6K_tM%3A%3B9RBvH14jHO7ZwM%3A&imgc=UvjUjMdh_6K_tM%3A)) Erişim: Tarihi:07.12.2015.
- Ascard, J. 1988. Thermal Weed Control. Flaming for weed control and crop defoliation (OT: Termisk ogräsbekämpning. Flamning för ogräsbekämpning och blastdödning). Department of Agricultural Engineering, Swedish University of Agricultural Sciences . Alnarp, Sweden. Report 130 [In Swedish with English summary].
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Doležal, K. and van Staden, J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (Musa spp. AAA). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 95: 373–379.
- Baktemur, G. 2009. Kavunda (*Cucumis melo* var. inodorus) ışınlanmış polenle uyarılmış haploid embriyoların ayrılmasında kullanılabilir farklı yöntemler. Çukurova Üniversitesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 75. Adana
- Baloglu, M.C. 2005. Şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) rejenerasyon ve agrobakteriye dayalı transformasyonun optimizasyonu. Yüksek lisans tezi. Fenbilimleri Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 149. Ankara.
- Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. Plant Cell Reports, 2; 510-513.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. 1993. In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. vol. 82. Methods in Molecular Biology™ Springer The Netherlands. 259-266.
- Benbrook, C.M. 1996. Pest management at the crossroads. Consumers Union, Yonkers, NY, USA.50-60

- Benvenuti, S. 2004. Weed dynamics in the mediterranean urban ecosystem: ecology, biodiversity and management. *Weeds Research*, 44;341-354.
- Bertell, G., Eliasson, L. 1992. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum*, 84; 255– 261.
- Botsheleng, B., Mathowa, T., Mojeremane, W. 2014. Effects of pre-treatments methods on the germination of pod mahogany (*Azelia Quanzensis*) and mukusu (*Baikiaea plurijuga*) seeds. 2007. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 3, (1); 8108-8113.
- Burke, J.I., Sullivan, C.F., Finch, I. and Dix, P.J. 1992. Studies of *In vitro* propagation systems for sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports*, 32, 27-35.
- Burke, J.I. 1993. 'In Vitro Propagation systems for sugar beet'. *Irish Journal Of Agricultural And Food Research*, 32 .87-90.
- Bürün, B. and Poyrazoğlu, E. 2002. “Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.)” *Turkish Journal of Biological*, 26;175-180.
- Caliandro, A., Zuffrano, M. and Mastro, M.M. 1997. L'irrigazione della barbabietola da zucchero a semina autunnale in ambiente meridionale. *Bieticoltura Associata*, 24–30.
- Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inze, D., Van Haute, E., Von Montagu, M., Schell, J. and Ayski, P. 1983. Introduction of genetic material into plant cells, *Science*, 222; 815-821.
- Cary, A.J., Liu, W.N. and Howell, S.H. 1995 Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology*, 107; 1075–1082.
- Celal, E.R. Şeker ve şeker pancarının dünü ve, bugünü ve geleceği. 1. Uluslararası Anadolu Şeker Pancarı Sempozyumu. 20-22 Eylül Kayseri. S 1-12.
- Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H., and Altosaar I. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* transformed rice plants expressing synthetic cryIAb and cryIAC genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 95, 2767–2772.
- Cho, H.J., Farrand, S.K., Noel, G.R. and Widholm, J.M. 2000. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta* 210; 195-204.



- Cho, H.J., Widholm, J.M., Tanaka, N., Nakanishi, Y., Murooka, Y. 1998. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milvetch). *Plant Science*. 138; 53-65.
- Chung, M.H., Chen, M.K., Pan, S.M. 2000. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Research*. 9;471–476.
- Chun-Lai, Z., Dong-Fang, C., Malcolm, C. E. and Adrian, S. 2004. Efficient procedures for callus induction and adventitious shoot organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. . *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 40; 475- 481.
- Clough, S.J. and Bent, A. 1998. Floral dip; A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16;735–743.
- Cook ,D.A., Decker, D.M. and Gallagher, J.L. 1989. Regeneration of *Kosteletzkya virginica* from callus cultures. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 17; 111-19.
- 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
- Çolak, G. and Toker, S. 1999. *Beta vulgaris* l. (şeker pancarı) hipokotil eksplantlarının sürgün rejenerasyonu üzerine bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri . BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.. 1 (1);1-14.
- Çölgeçen, H., Koca, U. and Toker, G. 2011. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 35 513-520.
- Damte, T. and Dawd, M., 2003. Chickpea, lentil and grass pea insect pest research in Ethiopia: A review. In *Food and Forage Legumes of Ethiopia: Progress and Prospects*, Proceedings of a Workshop on Food and Forage Legumes, Addis Ababa, Ethiopia, 22–26 September 2003; Ali, K., Keneni, G., Ahmed, S., Malhotra, R., Beniwal, S., Makkouk, K., Halila, M.H., Eds.; ICARDA: Aleppo, Syria, 2006; pp. 260-273.
- Datta, K., A. Vasquez, J., Tu, L., Torrizo, M. F., Alam, N., Oliva, E., Abrigo, G. S., Khush, and Datta, S. K. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the cry1Ab gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theoretical Applied Genetics*. 97; 20-30.
- De Greef, W. and Jacobs, M. 1979. *In vitro* culture of the sugarbeet: Description of a cell line with high regeneration capacity. *Plant Science Letters*, 17(1); 55-61

- 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.
- Debnath, C.S. 2006. Zeatin overcomes thidiazuron-induced inhibition of shoot elongation and promotes rooting in strawberry culture *In vitro*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(3): 349-354
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. and Burçak, A. 2005. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Duyarlılık Azalışı Sorunları Türkiye Ziraat Mühendisliği 6 ıncı Teknik Kongresi, 3 – 7 Ocak 2005, 629-648.
- Desfeux, C., Clough, S.J. and Bent, A.F. 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology*, 123:895–904.
- Doley, W. P. And Saunders, J. W. 1989. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole plant leaf explants in some sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) populations. *Plant Cell Reports*, 8:222-225.
- Durmusoglu, E. 2007. Kontrolsüz ve bilinçsiz pestisit kullanımının neden olduğu sorunlar ve çözüm önerileri. *Hasad*, 32 (270); 32-36.
- Ehlers, U., Commandeur, U., Frank, R., Landsmann, J., Koenig, R. and Burgermeister, W. 1991. Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots. *Theoretical Applied Genetics*, 81:777-782.
- Er, C. 2012. Şeker ve şeker pancarının dünü, bugünü, ve geçeceği. 1.Uluslararası ŞekerPancarı, Sempozyumu, Kitabı, 0-22, Eylül 2012, Kayseri ve Boğazlıyan, Yozgat. 1-12 .
- Erdağ, B. And Yürekli, K. 2000. “Thymus sipyleus Boiss. (Lamiaceae)’un İn Vitro Çoğaltılması” *Turkish Journal of Biologicy*, 24; 81-86.
- FAO. 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim 26.10.2015).
- Finch-Savage, W.E., Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination, 2006;171(3);501-23.

- Fischhoff, D.A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.M., Niedermeyerm, J.G., Dean, D.A., KusanoKretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology*, 5;807-813.
- Fontana, G.S., Santini, L., Caretto, S., Frugis, G. and Mariotti, D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (Chickpea). *Plant Cell Reports*, 12; 194-198.
- Fowler, S.V., Syrett, P. and Hill, R.L. 2000. Success and safety in the biological control of environmental weeds in New Zealand. *Australian Ecology*, 25;553-562.
- Franck-Oberspach, S.L. and Keller, B. 1996. Produktesicherheit von krankheits- und schädlingsresistenten Nutzpflanzen: Toxikologie, allergenes Potential, Sekundäreffekte und Markergene. In *Genetisch veränderte krankheits und schädlingsresistente Nutzpflanzen: Eine Option für die Landwirtschaft?* E. Schulte and O. Käppeli, eds. *Schwerpunktprogramm Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds: Bern*. pp. 15-96.
- Freytag, A. H., Anand, S. C., Rao-Arelli, A.P., and Owens, L. D. 1988. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *In vitro Plant Cell Reports*, 7;30-34
- Gamborg, O.L., Constabel, F. and Shyluk, J.P. 1974. Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum* L. *Physiologia Plantarum*, 30; 125-128.
- Gatehouse, A.M.R., Davidson, 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. *Mol. Breed.* 3; 49-63.
- Akbulut M. 2003. Regeneration and Transformation Studies in Chickpea . doktora tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji ABD, 158. Ankara.
- Gebhard, F., Smalla, K. 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 28; 261-272.
- Gencer, O. 1988. Genel Tarla Bitkileri (Endüstri Bitkileri). Çukurova Üniv. Ziraat Fak., Ders Kitabı, No;42, Adana.
- Genga, A., Ceriotti, A., Bollini, R. and Allavena, A. 1990. Preliminary approaches for genetic transformation of bean. *Annual Report of Bean Importers Cooperatives*. 33;75.

- Ghanem, S.A. 1995. *In vitro* embryo genesis of lentil under saline conditions. Bul letin of Faculty of Agriculture. University of Cairo, 46; (1); 113-125.
- Goleniowski, M. E., Flamarique, C., and Bima, P. 2003. "Micropropagation of regano (*Origanum vulgare* × *applii*) from meristem tips," *In vitro* Cellular and Developmental Biology, vol. 39, no. 2, pp. 125–128.
- Goska, M. and Szota, M. 1992. Micropropagation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) trisomics in *In vitro* culture. *Genetica Polonica*. 33(2); 115-118.
- Gould, F. 1997. Integrating Pesticidal Engineered Crops into Mesoamerican Agriculture. In *Transgenic Plants: Bacillus thuringiensis in Mesoamerican Agriculture* (Hruska, A.J. and M. L. Pavon, eds.). Zamorano: Honduras, pp. 6-36.
- Grant, J.E., Pauline, A. C., McAra, A.E., and Frew, T.J. 1995. Transformation of peas (*Pisum sativum* L) using immature cotyledons. *Plant Cell Reports*, 15; 254-258.
- Greer, S.P. and Rinehart, T.A. 2010. Dormancy and Germination *In vitro* Response of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* Seed to Light, Cold-Treatment and Gibberellic Acid. *J. Environmental Horticulture*. 28(1):41–47.
- Grimsley, N., Hohn, T., Davies, J. W. and Hohn, B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature*, 325 177–179.
- Gurel, E. and Wren, M.J. 1995. Measuring Polyphenol Oxidase Activity in Small Leaf Discs of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Turkish ournal of Botany*. 19; 497-502.
- Gurel, E. 1996. Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L) variability at variety, plant and organ level. *Turkish ournal of Botany*. 21; 131- 136.
- Gurel, E. and Wren, M.J. 1995. *In vitro* development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L). rhizogenesis and the effect of sequential exposure to auxin and cytokinin. *Annual Botany*. 75 (1);31-38.
- Güngör, T., Urkun, T. ve Er E. 2002. Gıdalarda katkı kalıntı ve bulaşanların izlenmesi. Bursa Gıda Kontrol Araştırma Enstitüsü Yayını, Bursa.
- Güngör, T., Urkun, T. ve Er, E. 2002. Gıdalarda katkı kalıntı ve bulaşanların izlenmesi. Bursa Gıda Kontrol Araştırma Enstitüsü Yayını, Bursa.

- Gürel, E. ve Gürel, S. 1998. Plant Regeneration from Unfertilized Ovaries of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured *In vitro*. Turkish ournal of Botany, 22; 233-238.
- Gürel, E. and Kazan, K. 1999. Evaluation of Various Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Genotypes for *Agrobacterium tumefaciens* -mediated Gene Transfer. Turkish Journal of Botany, 23; 171-177.
- Gürel, E. and Gürel, S. 1998. Plant Regeneration from Unfertilized Ovaries of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured *In vitro*. Turkish ournal of Botany, 22; 233-238.
- Gürel, E. and Kazan, K. 1999. Evaluation of Various Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Genotypes for *Agrobacterium tumefaciens* -mediated Gene Transfer. Turkish ournal of Botany, 23; 171-177.
- Gürel, S.; Gürel, E. and Kaya, Z. 2001. Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta bulgaris* L. SSp.) cultured *in vitro*. *Turkish Journal of Botany*, 25; 25-33.
- Gürsoy, O.V. 1982. Yabancı ot kontrolünün temel esasları ve Şeker pancarı tarımında tatbiki. Türkiye Şeker Fabrikaları A. Ş., Şeker Enstitüsü Yayını, Etimesgut-Ankara.
- Gürsoy, O.V. 1991. Şeker Enstitüsünce Denenip Ruhsatlandırılan Şeker Pancarı Herbisitlerinin Kullanımları ile İlgili Genel Bilgiler. Türkiye Şeker Fabrikaları Anonim Şirketi, Ankara.
- Gürsoy, O.V. 2002. Orta Anadolu Şekerpancari Ekim Alanlarında Sorun Olan Yabancı Otlar ve Bunlara Karşı Uygun Savaş Yöntemlerinin Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. GOÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 170. Tokat.
- Hall, R.D., Riksen-Bruinsma, T., Weyens, G., Rosquin, I.I, Denys, P.N., Evans, I.J., Lathouwers, J.E., Lefebvre, M.P., Dunwell, J.M., van Tunen, A., Krens, F.A. 1996. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotechnology* 14, 1133-8
- Haque, M. I. and Khanom, R. 1993. *In vitro* plant regeneration from different Eksplants of lentil (*Lens culinaris* Medik). *In vitro*, Plant Tissue Culture, 29 13(2) ; 155-163.
- Harms, C.T., Baktır, I. and Oerthl, J.J. 1983. Clonal propagation *In vitro* of red beet (*Beta vulgaris* L.) by multiple adventitious shoot formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2(2); 93-102.

- Hashimoto, R. and Shimamoto, Y. 1999. Growth of transgenic sugarbeet plants with sucrose-phosphate synthase (SPS) gene. Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists. 41; 85-89.
- Hashimoto, R., and Shimamoto, Y. 2001. Transgenic sugarbeet plants harboring a pumpkin chitinase gene demonstrating improved resistance to *Rhizoctonia solani*. Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists 43; 24-28.
- Holub, J., Hanus, J., Hanke, D.E. and Strnad, M. 1998. Biological activity of cytokinins derived from ortho- and meta-hydroxybenzyladenine. Plant Growth Regulations, 26; 109–115. 11.
- Hubbard, K. 2012. The Context of USDA's GE Sugar Beet Decision. Seed broadcast blog. The Context of USDA's GE Sugar Beet Decision. <http://blog.seedalliance.org/2012/08/07/the-context-culture-of-usdas-ge-sugar-beet-decision/> (Erisim 26.10.2015)
- Husnain, T, Tahira, M., Riazuddin, S. and Milton, P. G. 1997. Studies on the expression of marker genes in chickpea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49 (1); 7-16
- Hussey, G., Johnson, R.D. and Warren, S. 1989. Transformation of meristematic cells in the shoot apex cultured pea shoots by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogens*. Protoplasma, 14; 101-105.
- Ivić, S. and Smigocki, A. 2001. Evaluation of the biolistic transformation method for commercially important sugarbeet lines. Proceedings of American Society of Sugar Beet Technologists, 207-213.
- İşler, N. 2015. Şekerpancarı Ders notları [www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1007](http://www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1007) (25.04.2015)
- Jacq, B., Tetu, T., Sangwan, R.S., Laat, A.D. and SangwanNorrel, B.S. 1992. Plant regeneration from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *In vitro* and cytometric nuclear DNA analysis of regenerants. Plant Cell Reports, 11(7);329-33.
- Jain, M., Chengalrayan, K., Gallo-Meagher, M. and Mislevy P. 2005. Embryogenic callus induction and regeneration in a pentaploid hybrid bermudagrass cv. Tift on 85. Crop Science, 45; 1069-1072.
- James, C. 1996. Agricultural Research and Development: The Need for Public-Private Sector Partnerships. Issues in Agriculture No 9. CGIAR: Washington D.C.
- James, C., and A.F. Krattiger. 1996. Global Review of Field Testing and

Commercialization of Transgenic Plants, 1986- 1995; The first decade of crop biotechnology. ISAAA Briefs No. 1. ISAAA; Ithaca, NY. pp. 31.

- Jassem, M. 2000. Genetically modified sugar beets - survey of benefits, prospects and risks. Electronic journal of Polish Agricultural Universities, 2000 3(2) series agronomy. Available Online <http://www.ejpau.media.pl/series/volume3/issue2/agronomy/art-01.html>.
- Jimenez, V.M., Castillo, J., Tavares, E. Guevara E. and Montiel M. 2006. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86; 389-395.
- Joshee, N., Biswas, B.K. and Yadav, A.K. 2007. Somatic embryogenesis and plant development in *C. asiatica* L., a highly prized medicinal plant of the tropics. HortScience, 42, 633-637.
- Kar, S., Tony, M.J., Pritilata, N. and Sen, S.K. 1996. Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium* – mediated transformation of chick pea (*Cicer arietinum* L) Plant Cell Reports, 16; 32-37.
- Karakaya, A. and Özcan, S. 1998. Susceptibility of different lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars to *Agrobacterium ortstumeifaciens* (Smith and Townsend) Conn. Turkish Journal of Botany, 22; 313-316.
- Karbuş, F., Öztürk, İ. ve Savaş, D.O. 2008. Türkiye’de üretilen tarım ürünleri ve ekonomideki yeri İstanbul Ticaret Odası Ekonomik Ve Sosyal Araştırmalar Şubesi, İstanbul (<http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-99.pdf> )- Erişim; 26.10.2015.
- Khawar, K.M. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik)’te doku kültürü çalışmaları VE *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
- Khawar, K.M., Sancak, C., Uranbey, S. and Özcan, S. 2004. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* M.) via organogenesis. Turkish Journal of Botany, 28; 421-426.
- Kıllı, F. ve Altunbay, G.S., 2012. Şekerpancarı Ekiminde Çeşit ve Hasat Zamanlarının Gövde Verimi ve Şeker Oranına Etkisi” 1.Uluslararası Şeker Pancarı, Sempozyumu, Kitabı, 0-22, Eylül 2012, Kayseri ve Boğazlıyan, Yozgat.
- Kimoto, Y. ve Shimamoto, Y. 2001. Differences in toxicity to larvae of cabbage armyworm between transgenic sugarbeet lines with cry I A(b) and cry I C. Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists 43; 20-23

- Kishchenko, E.M., Komarnitskii, I.K. and Kuchuk, N.V. 2005. Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin . Cell Biology International, 29; 15-19.
- Kneifel, W. and Leonhardt, W. Testing of different antibiotics against gram positive and gram negative bacteria isolated from plant tissue cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29; 139-144, 1992.
- Köksoy, N.F. 1995. Tahıllarda doku kültürü çalışmaları üzerine araştırmalar. Seminer notları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yayınları, Ankara.
- Krens, FA., Trifonova, A., Keizer, L.C.P. and Hall, R.D. 1996. The effect of exogenously applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Science 116; 97–106.
- Krishnamurthy, K.V., Suhasani, K., Sagare, A.P., Meixner, M., Kathen de, A., Pickardt, T. and Schieder, O. 2000. Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Reports, 19; 235-240.
- Kulka, R.G. 2006. Cytokinins inhibit epiphyllous plantlet development on leaves of *Bryophyllum* (*Kalanchoe*) *marnierianum*. Journal of Experimental Botany, 57(15); 4089–4098.
- Kumar, s.v. and Rajam, M.V. Polyamine ethylene nexus; A potential target for post harvest biotechnology. Indian Journal of Biotechnology, 2004, 3; 299-304.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A. and ElSohly, M.A. 2009. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. an important medicinal plant. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15(1);79-86.
- Leuba, V. and LeTourneau, D. 1990. Auxin activity of Phenylaceticacid in Tissue culture. Journal of Plant Growth Regulations, 9 (2); 71-76.
- Lotfi, M. and Salahi, S. 2008. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, ), May 21-24th, 2008. Avignon /France.
- Lulsdorf, M.M., Hans, R., Jennie, A.J. David, S. B. and Shaun, L.A.H. 1991. Optimizing the production of transformed pea *Pisum sativum* L callus using disarmed *A. tumefaciens* stains. Plant Cell Reports, 9; 479-483.



- Merrington, G, Nfa, L.W, Parkinson, R., Redman, M. and Winder, L. 2002. Agricultural Pollution : Environmental problems and practical solutions . Spon Pres,London.pp 239.
- Metcalf, R.L., 1975. Insecticides in Insect Pest Management. In “Introduction to Insect Pest Management” (Ed.R.L.Metcalf; W.Luckman), Wiley Inter-Science, New York, 235-273. Öncüer, C.;Kısmalı, Ş.; Erkin, E.,1986. Yumuşak ve taş çekirdekli meyve ağaçlarındaki zararlılara karşı kullanılan “Önemli insektisitlerin Aphididae familyası türlerinin bazı parazit ve predatörlerine etkisi üzerinde araştırmalar. TUBITAK, Tarım ve Ormancılık Arş. Grubu, Proje No:TOAG-503.
- Miyazaki, J., Tan, B.H. and Errington, S.G. 2010. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM). PCTOC.; 102(3);365-372.
- Miyazaki, J., Tan, B.H., Errington, S.G. and Kuo, J.S. 2011. Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from *In vitro* cultured basal-stem callus. Australian Journal of Botany, 59(4);363-368.
- Mok, M.C., Martin, R.C., Dobrev, P.I., Van’kova’, R., Ho, P.S. and David, WS..M.. 2005. Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin Oglucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. Plant Physiology, 137; 1057–1066
- Morillo-Velarde, R. 1993. International Institute for Beet Research. 56. Winter Congres, Belgium.
- Mroginski, L.A. and Kartha , K.K. 1981. Regeneration of pea *Pisum sativum* L cv.Century) plants by *In vitro* culture of immature leaflets. Plant Cell Reports, 1;64-66.
- Nail, M.C. and Roberts, S.C. 2005. Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations. Biotechnology Letters 27; 1725-1730, 2005.
- Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukijandjiev, 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.
- Natalini, L. And Cavallini, A., 1987, “Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plantles by *In vitro* culture of immature embryos” Plant Breeding, 99; 172-176.

- Norouzi, P., Malboobi, A.B., Zamani, M.A., Yazdi, K. and Samadi, B. 2005. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant. 41(1); 11-16.
- Önen, H., 1995. Tokat Kazova'da Yetiştirilen Şekerpancarında Sorun Olan Yabancı Otlar ile Uygulanan Farklı Savaş Yöntemlerinin Verime Olan Etkileri Üzerine Araştırmalar. GOÜ. Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, 79.Tokat.
- Özcan, S., ve Özgen, M. 1996. Bitki genetic mühendisliği. Kükem dergisi,1; 69-95.
- Pancholi, N. 1995. Aspects of tissue culture in relation to banana improvement and germplasm conservation. The University of Reading, Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences, 301 pp.
- Paul, A., Semer, C., Kucharek, T. and Ferl, R. 2001. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic arabidopsis plants for a Space Shuttle flight experiment. Applied Microbiology and Biotechnology, 55; 480-485, 2001. 16.
- Polanco, M.C., Pelaez, M.I. and Ruiz, M. L. 1988. Factors affecting callus and shoot formation in *in vitro* cultures of *Lens culinaris* Medik. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 15;175-182.
- Polanco, M. C. and Ruiz, M. L. 1997. Effect of Benzylaminopurine on *In vitro* and *in vivo* root development in lentil *Lens culinaris* Medik. Plant Cell Reports, 17; 22-26.
- Puonti-Kaerlas, J., Eriksson, T. and Engstrom, P. 1990. Production of transgenic pea (*Pisum sativum*) plants by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Theor. & Appl. Genetics, 80; 246-252.
- Ritchie, G.A., Short, K.C. and Davey, M.R. 1989. *In vitro* shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of Experimental Botany, 40. 277-283
- Roussy, I., Dubois, F., Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S. 1996. In planta 2,3,5 triiodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine *In vitro* regeneration of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants. Plant Cell Reports, 16 (3); 142-146.
- Rowntree, J.K. 2006. Development of novel methods for the initiation of *In vitro* bryophyte cultures for conservation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 87; 191-201.

- 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. *Journal of Plant Physiology*, 117; 119-130.
- Ruizicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska´ , R., Beeckman, T., Friml J. and Benkova E. 2007. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 7; 2197–2212. 18.
- Ruizicka, K., Simaskova´ , M., Duclercq, J., Petrasek, J., Zazımalova, E., Simon, S., Friml, J., and Benkova E. 2009. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 106; 4284–4289.
- Samac, D.A., and Austin-Phillips, S. 2006. Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In K. Wang (ed.) *Methods in molecular biology*. Vol. 343. *Agrobacterium Protocols*. 2nd ed. Humana Press, Totowa, NJ. 301-312.
- Schroeder, H.E., Schotz, A.H., Wardley Richardson, T., Spencer, D. and Higgins, T.J.V. 1993. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L). *Plant Physiology*, 101; 751-757.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. *Statistical Methods*. (6th ed.) Ames, Iowa; The Iowa State University Press, Iowa USA 1967.
- Snezana, D. and Ivic-Haymes, · A.C. 2005. Biolistic transformation of highly regenerative sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves *Plant Cell Reports*, (2005) 23;699–704
- Spichal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad M. and Schmulling T. 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiology*, 45; 1299–1305. 13.
- Straub, P. F., Decker, D. M. and Gallagher, J.L. 1989. Tissue culture and Rejeneration of *Distichlis spicata* (Gramineae). *American Journal of Botany*, 76 (10); 1448-1451.
- Şiray, A. 1990. Şeker pancarı Tarımı, Pankobirlik Yayınları. No; 2, Ankara.
- Tan, A.N. ve Ökten, E. 2008. Adapazarı İli ve Çevresi Şekerpancarı Ekiliş Alanlarında Heterodera Schachtı Schmidt, 1871 (*Tylenchida: Heteroderidae*)’in Yayılışı Üzerine Araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 22, (1); 1-8.

- Toldi, O., Gyulai, G., Kiss, J., Tamas, I.A. and Belazs, E., 1996. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicoty originated thin- layer explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. Plant Cell Reports, 15; 851-854
- Toldi, O., Gyulai, G.b, Kiss, J.b., Tamás, I.A.C. and Balázs, E. 1996. Antiauxin enhanced microshoot initiation and Plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Reports. 15(11); 851-854.
- Tuik. 2013. <http://www.tuik.gov.tr>
- Ulukan, H. 2007. Klasik Bitki Islahı ve Genetik Mühendisliği ile Oluşturulan Değişimlere Genel Bakış. Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 2007, 21(2); 27-40.
- Valero-Aracama, C., Kane, M.E., Wilson, S.B. and Philman, N.L. 2010. Substitution of benzyladenine with meta-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. Plant Growth Regulations, 60; 43–49
- Warkentin, T.D. and McHugen, A. 1991. Crown gall transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik) with virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 10; 489-493.
- Warkentin, T.D. and McHughen, A. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* mediated glucoronidase (GUS) gene expression in lentils (*Lens culinaris* Medik) tissues. Plant Cell Reports, 11(5-6); 274-278.
- Werbrouck, S.P.O., Strnad, M., van Onckelen, H.A. and Debergh, P.C. 1996. Metatopolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? Physiol Plantarum 98; 291–297.
- Werbrouck, S.P.O., Van der Jeugt, B., Dewitte, W., Prinsen, E., van Onckelen, H.A. 1995. The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* ‘Schott Petite’ in relation to acclimatisation problems. Plant Cell Reports 14; 662–665.
- Yıldız, M., Avcı, M. and Özgen, M., 1997. Studies of sterilization and medium preparation techniques in sugarbeet regeneration. 5th. Turk-German Agricultural Research Symposium. 29 Sep.- 4 Oct. Akdeniz Üniversitesi, Antalya/Türkiye.
- Yılmazlar, B., 1999. Korunga, Çayır Üçgülü ve İskenderiye Üçgülünün *Agrobacterium tumefaciens*’e Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 49. Ankara.

Zambryski, P.C., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Von Montagu, M. and Schell. J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO Journal., 2; 2143-2150.4

Zhong, Z., Smith, H. G. and Thomas. T. H. 1993. *In vitro* culture of petioles and intact leaves of Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Growth Regulations, 12; 59- 66.

## ÖZGEÇMİŞ

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

### Eğitim bilgileri

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

1. Kahriz Pourali M, **Kahriz, Pourali P.** Khawar KM. 2016. Efficient shoot regeneration from plumule explant of wheat. Sains Malaysiana (baskıda)
2. Pourali Kahriz, M; **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).
3. Kahriz PP, **Kahriz MP,** Khawar KM. 2015. Efficient shoot regeneration on immature plumule based callus induced roots. Bangladesh Journal of Botany (baskıda)
4. Özdemir FA, Yildirim MU, **Pourali Kahriz P,** 2015. Micropropagation of Endemic *Scutellaria orientalis* L. subsp. Bicolor (HOCHST.) EDMONDSON

skullcaps under the influence of Thidiazuron. Emirates Journal of Food Science and Agriculture.

### **Ulusal Kongre yayınlar/sunumlar**

- 1. Kahriz Pourali P,** Kahriz Pourali M, Özdemir FA, Yildirim MU, Khawar KM. 2015. Türkiye'nin önemli şeker pancarı Diamenta monogerm çeşidine çeşidinde sülfürik asit, NaOCl ve PPM kullanarak tohum sterilizasyonu. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Çanakkale, Türkiye.
- Kahriz Pourali M, **Kahriz Pourali P,** Yildirim MU, Özdemir FA, 2015. Türkiye'nin iki önemli çeltik çeşidinde NaOCl'nin in vitro koşullarda tohum sterilizasyonu ve çimlenme üzerindeki etkileri. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Çanakkale, Türkiye.