

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

95700

DOKTORA TEZİ

**KETEN (*Linum usitatissimum* L.) BİTKİSİNDE ADVENTİF SÜRGÜN
REJENERASYONU ve *Agrobacterium tumefaciens*
ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI**

Mustafa YILDIZ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2000

Her Hakkı Saklıdır


Ü.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

00720



Prof.Dr. Celâl ER danışmanlığında, Araş.Gör. Mustafa YILDIZ tarafından hazırlanan bu çalışma 19/01/2000 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Orhan ARSLAN

İmza : 

Üye : Prof.Dr. Celâl ER

İmza : 

Üye : Doç.Dr. Sebahattin ÖZCAN

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof.Dr. Esmâ KILIÇ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KETEN (*Linum usitatissimum* L.) BİTKİSİNDE ADVENTİF SÜRGÜN REJENERASYONU ve *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI

Mustafa YILDIZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr. Celâl ER

Ketende gen aktarımına uygun yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyon sistemi ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla etkili bir gen aktarım yönteminin geliştirilmesinin amaçlandığı çalışmada 11 keten çeşidine ait hipokotil, kotiledon, sap ve yaprak eksplantlarının adventif sürgün rejenerasyon kabiliyeti, değişik oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarında test edilmiştir.

Yapılan rejenerasyon çalışmaları sonucunda en yüksek indirek adventif sürgün rejenerasyonu yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil ve sap eksplantlarından gerçekleşmiştir. Bu yüzden, 2260 p35S GUS-INT, 2260 pAoPR1-GUS-INT ve 2260 pAoPR1-NPT-II *Agrobacterium tumefaciens* hatları ile yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil ve sap eksplantları inokule edilmiştir. İnokulasyona alınan üç bakteri hattı da 200 mg/l kanamisin içeren rejenerasyon ortamında hem hipokotil, hem de sap eksplantlarından %90 civarında kanamisine dayanıklı kallus oluşumuna yol açmıştır. Histokimyasal GUS analizi sonucunda da bu kallusların önemli bir bölümünde GUS aktivitesi gözlenmiş ve böylece bu kallusların transgenik oldukları ispatlanmıştır. Ancak, her üç bakteri hattı tarafından üretilen kanamisine dayanıklı kalluslardan tüm çabalara rağmen transgenik sürgünlerin elde edilmesi mümkün olmamıştır. Öte yandan, AoPR1-NPT-II markör genini taşıyan bakteri hattı tarafından yüksek oranlarda kanamisine dayanıklı kallusların üretilmesi ve 2260 pAoPR1-GUS-INT bakteri hattının ürettiği kallusların önemli bir kısmının da GUS pozitif olması, AoPR1 promotörünün *Lineaceae* familyasından olan ketende de aktif olarak işlev yaptığını göstermiştir.

2000, 135 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Gen aktarımı, AoPR1 promotörü, markör gen, *npt-II* geni

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION and *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED GENE TRANSFER IN FLAX (*Linum usitatissimum* L.)

Mustafa YILDIZ

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

Supervisor: Prof.Dr. Celâl ER

In the present study which aimed to establish a high frequency adventitious shoot regeneration system and an efficient gene transfer technique via *Agrobacterium tumefaciens* in flax, adventitious shoot regeneration capacity of 4 different explants (hypocotyl, cotyledon, stem and leaf) from 11 cultivars was tested in MS basal medium containing various growth regulators combinations.

The highest adventitious shoot regeneration was obtained from hypocotyl and stem explants of native and Madaras cultivars. Therefore, hypocotyl and stem explants of native and Madaras cultivars were inoculated with 2260 p35S GUS-INT, 2260 pAoPR1-GUS-INT and 2260 pAoPR1-NPT-II *Agrobacterium* strains. In regeneration medium supplemented with 200 mg/l kanamycin, 90% hypocotyl and stem explants produced kanamycin resistant callus. Majority of calli were found to be GUS positive after histochemical GUS assay. However, transgenic shoots could not be obtained from these transgenic calli after all. Since *A.tumefaciens* strain having AoPR1-NPT-II marker gene produced high frequency of kanamycin resistant calli and calli produced by 2260 pAoPR1-GUS-INT strain were GUS positive, it can be said that AoPR1-NPT-II marker gene works efficiently in flax from *Linaceae* family.

2000, 135 pages

KEY WORDS: Transformation, AoPR1 promoter, marker gene, *npt-II* gene

TEŐEKKÖR

Araştırmalarım boyunca her konuda desteğini gÖrdüğüm tez hocam Prof.Dr. Celâl ER'e, tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi sırasında hiç bir yardımı esirgemeyen sevgili hocam Doç.Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, istatistiki analizlerin yapılması aşamasında yardımlarını gÖrdüğüm Doç.Dr. Cengiz SANCAK'a, göstermiş oldukları sabır, destek ve anlayıştan dolayı sevgili eşim ve oğluma da teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ	1
1.1. Bitki Islahında Kullanılan Doku Kültürü Teknikleri	2
1.1.1. Kallus kültürü	2
1.1.2. Hızlı çoğaltım (mikro üretim)	3
1.1.3. Meristem kültürü	5
1.1.4. Embriyo kültürü	6
1.1.5. Anter kültürü	7
1.1.6. Hücre kültürü	7
1.1.7. Protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon.....	8
1.2. Bitkilere Gen Aktarımında Kullanılan Yöntemler	10
1.2.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı	10
1.2.1.1. T-DNA aktarımının mekanizması	14
1.2.1.2. Bitkilere gen aktarımında Ti plazmidlerinden yararlanma ...	16
1.2.2. Doğrudan gen aktarımı	18
1.2.2.1. Protoplastlara DNA aktarımı	18
1.2.2.2. Mikroenjeksiyonla gen aktarımı	19
1.2.2.3. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı	19
1.3. Genetik Mühendisliğin Bitki Islahında Kullanım Alanları	21
1.3.1. Herbisitlere dayanıklılık	21
1.3.2. Böceklere dayanıklılık	22
1.3.3. Virüslere dayanıklılık	22
1.3.4. Bitki ıslahında antisens RNA tekniğinin kullanımı	23
1.3.5. Genetik erkek kısır bitkilerin elde edilmesi	23
1.4. Bitki Doku Kültürü ve Genetik Mühendisliği ile İlgili Problemler	25
1.4.1. Bitkilerin <i>in vitro</i> rejenerasyonu ile ilgili problemler	25
1.4.1.1. <i>In vitro</i> rejenerasyona etki eden bitkisel faktörler	25
1.4.1.2. <i>In vitro</i> rejenerasyona etki eden fiziksel faktörler	26
1.4.2. Kültür sırasında karşılaşılan problemler	27
1.4.2.1. Somaklonal varyasyon	27
1.4.2.2. Vitrifikasyon (Camsılaşma, Saydamlaşma)	28
1.4.2.3. Eksplantların kararması	29
1.4.3. Bitki genetik mühendisliği yoluyla elde edilen ürünlerin kullanımıyla ilgili problemler	31
1.5. Keten Bitkisinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Gen Aktarımı	32
1.6. Doktora Projesinin Amacı	35

2. MATERYAL ve METOT	36
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.2. Doku Kültürü Metotları	36
2.2.1. Büyüme ortamı ve kültür koşulları	36
2.2.2. Keten bitki materyali	37
2.2.3. Keten tohumlarının <i>iv vitro</i> 'da çimlendirilmesi	37
2.2.4. Kotiledon, yaprak, sap ve hipokotil kısımlarının <i>in vitro</i> 'da elde edilen keten fidelerinden izolasyonu	37
2.2.5. Rejenere olmuş keten sürgünlerinin köklendirilmesi	39
2.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Materyali	39
2.3.1. Bakteri kültürlerinin saflaştırılması ve büyütülmesi	39
2.3.2. Bakterilerin uzun süreli korunması	40
2.3.3. Antibiyotikler	40
2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Ketene Gen Aktarımı	40
2.5. Histokimyasal GUS Analizi	41
2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	41
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	42
3.1. Keten Tohumlarının YüzeY Sterilizasyonu	42
3.1.1. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine etkisi	42
3.1.2. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimi (%) üzerine etkisi	44
3.1.3. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğu (cm) üzerine etkisi	45
3.1.4. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu (cm) üzerine etkisi	47
3.2. Adventif Sürgün Rejenerasyonu	51
3.2.1. Yerel keten çeşidine ait hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	52
3.2.2. Yerel keten çeşidine ait kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	57
3.2.3. Yerel keten çeşidine ait sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	60
3.2.4. Yerel keten çeşidine ait yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	66
3.2.5. Farklı çeşitlere ait hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	72
3.2.6. Farklı çeşitlere ait kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	72

3.2.7. Farklı çeşitlere ait sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	75
3.2.8. Farklı çeşitlere ait yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu	80
3.2.9. Adventif sürgün rejenerasyonunun artırılması için yapılan diğer çalışmalar	87
3.2.9.1. Thidiazuron (TDZ)'un yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi ...	87
3.2.9.2. Hipokotil eksplantında epidermisin soyulması (yaralanan yüzeyin artırılması) işleminin adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	91
3.3. Augmentin ve Kanamisin Antibiyotiklerinin Keten Hipokotil Eksplantlarının Adventif Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi	92
3.4. Ketende Hızlı Çoğaltım	97
3.5. Rejenere Olan Keten Sürgünlerinin Köklendirilmesi	100
3.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Ketene Gen Aktarımı	102
4. SONUÇ	108
5. YARARLANILAN KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ	135

SİMGELER DİZİNİ

AoPR1	<i>Asparagus officinalis</i> PR1 geni
BAP	6-benzylaminopurine
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid
GUS	β -glucuronidase
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
K.O.	Kareler Ortalaması
Km	Kanamycin
MS	Murashige ve Skoog Basal Besin Ortamı
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NPT-II	Neomycin-phosphotransferase-II
npt-II	Neomycin-phosphotransferase-II geni
<i>onc</i>	Oncogenes
PEG	Polyethileneglucol
S.D.	Serbestlik Derecesi
PPO	Polyphenoloxidase
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron
Tn	Transposon
<i>vir</i>	Virulens geni
X-GLUC	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. <i>In vitro</i> bitki rejenerasyonu	4
Şekil 1.2. Yabani (onkogenik) <i>Agrobacterium</i> hattının bitkinin kök boğazında tümör oluşturmaları	12
Şekil 1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in bitki hücresine tutunması ve T-DNA transferi	15
Şekil 1.4. T-DNA aktarımının mekanizması	17
Şekil 1.5. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı	20
Şekil 1.6. Antisens RNA teknolojisi	24
Şekil 1.7. Eksplantta kararırma ve sonucunda meydana gelen ölüm	30
Şekil 2.1. <i>In vitro</i> gelişen keten fidesi	38
Şekil 3.1. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranına etkisi	43
Şekil 3.2. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimine etkisi	45
Şekil 3.3. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğuna etkisi	46
Şekil 3.4. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğuna etkisi	48
Şekil 3.5. Farklı sıcaklıklara sahip %40'lık dezenfektanın keten tohumlarının gelişimi üzerine etkisi	50
Şekil 3.6. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler	55
Şekil 3.7. Yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu	56
Şekil 3.8. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler	57
Şekil 3.9. Yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu, adventif sürgün ve kök rejenerasyonu	61
Şekil 3.10. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin sap eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler	64
Şekil 3.11. Yerel keten çeşidinin sap eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu	65

Şekil 3.12. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler ..	66
Şekil 3.13. Yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu, adventif sürgün ve kök rejenerasyonu ..	70
Şekil 3.14. Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerinin <i>in vitro</i> ve tarla şartlarında yetiştirilen fidelerinden alınan eksplantlarında indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayıları ..	86
Şekil 3.15. Farklı TDZ ve BAP+NAA dozlarının toplam ve indirek sürgün rejenerasyonu ile eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı üzerine etkisi ..	88
Şekil 3.16. Epidermisi soyulmuş hipokotil eksplantlarında kallus oluşumu ve indirek sürgün rejenerasyonu ..	93
Şekil 3.17. Farklı augmentin dozlarının keten hipokotil eksplantlarında eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı üzerine etkisi ..	94
Şekil 3.18. Kanamisin'in keten hipokotil eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi ..	98
Şekil 3.19. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarında keten koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayılarındaki değişimler ..	99
Şekil 3.20. Köklenmiş keten sürgünü ..	101
Şekil 3.21. Ketene gen aktarımı ..	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Gen aktarımının başarılı olduğu bazı önemli kültür bitkileri ve gen aktarma yöntemleri 11
Çizelge 2.1. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları 36
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları 40
Çizelge 3.1. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranı üzerine etkisine ait varyans analizi 43
Çizelge 3.2. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranı üzerine etkisi 43
Çizelge 3.3. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi 44
Çizelge 3.4. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimi üzerine etkisi 44
Çizelge 3.5. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğu üzerine etkisine ait varyans analizi 45
Çizelge 3.6. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğu üzerine etkisi 46
Çizelge 3.7. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu üzerine etkisine ait varyans analizi 47
Çizelge 3.8. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu üzerine etkisi 47
Çizelge 3.9. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi 53
Çizelge 3.10. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi 54
Çizelge 3.11. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi 58
Çizelge 3.12. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi 59
Çizelge 3.13. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi 62

Çizelge 3.14.Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi 63
Çizelge 3.15.Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi 67
Çizelge 3.16.Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi 68
Çizelge 3.17.Yerel keten çeşidinin dört farklı eksplantına ait en yüksek ve en düşük indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı ile bu sonuçların alındığı bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu 71
Çizelge 3.18.Farklı keten çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimine ait varyans analizi 73
Çizelge 3.19.Farklı keten çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi 74
Çizelge 3.20.Farklı keten çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimine ait varyans analizi 76
Çizelge 3.21.Farklı keten çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi 77
Çizelge 3.22.Farklı keten çeşitlerinin sap eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimine ait varyans analizi 78
Çizelge 3.23.Farklı keten çeşitlerinin sap eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi 79
Çizelge 3.24.Farklı keten çeşitlerinin yaprak eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA içeren MS besin ortamında kök gelişimine ait varyans analizi 81
Çizelge 3.25.Farklı keten çeşitlerinin yaprak eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi 82
Çizelge 3.26.10 keten çeşidinin dört farklı eksplantına ait indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı 84

Çizelge 3.27.Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerinin <i>in vitro</i> 'da yetiştirilen fidelerinden alınan hipokotil ve sap eksplantlarına ait indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı 85
Çizelge 3.28.Farklı thidiazuron (TDZ) dozlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi 89
Çizelge 3.29.Farklı TDZ dozlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi 90
Çizelge 3.30.Keten hipokotil eksplantlarında epidermisin soyulması işleminin kallus ağırlığı, indirek sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına indirek sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi 91
Çizelge 3.31.Keten hipokotil eksplantlarında epidermisin soyulması işleminin kallus ağırlığı, indirek sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına indirek sürgün sayısı üzerine etkisi 92
Çizelge 3.32.Farklı augmentin dozlarının 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi 95
Çizelge 3.33.Farklı augmentin dozlarının 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi 96
Çizelge 3.34.Farklı ortam kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayıları üzerine etkisine ait varyans analizi 97
Çizelge 3.35.Farklı ortam kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayıları üzerine etkisi 99
Çizelge 3.36.Farklı IBA dozlarının adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisine ait varyans analizi100
Çizelge 3.37.Farklı IBA dozlarının adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi100
Çizelge 3.38.Farklı <i>Agrobacterium</i> hatlarıyla yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil eksplantlarına gen aktarımı104
Çizelge 3.39.Farklı <i>Agrobacterium</i> hatlarıyla yerel ve Madaras çeşitlerinin sap eksplantlarına gen aktarımı105

1. GİRİŞ

Değişen çevre şartları ve hızla artan dünya nüfusu bitkisel üretimde yeni çeşit geliştirmenin ve dolayısıyla bitki ıslah çalışmalarının önemini daha da artırmıştır. Bitki ıslahının başlangıcı insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanoğlu yerleşik hayata geçip, kendisinin ve ailesinin yiyecek ihtiyacını karşılayabilmek için ekimini yaptığı ürünler arasından yüksek verime sahip olanları seçmekle farkında olmadan bir tür ıslah yapmıştır. Ancak, insan nüfusu arttıkça bitkilerden daha yüksek verim almanın yolları bilimsel olarak araştırılmaya başlanmıştır. Nitekim, son 50 yılda ulaşılan tarımsal verim artışı, modern ıslah yöntemlerinin uygun yetiştirme teknikleri ile birlikte kullanılması sonucu elde edilmiştir. Buna rağmen, bir yandan dünya nüfusunun her geçen gün arttığı, öte yandan tarımda kullanılan alanların son sınırına dayandığı düşünüldüğünde, verim artışlarının gelecekte de devam etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Aslında yapılan araştırmalar, bugünkü verim düzeyinin potansiyel verimin çok altında olduğunu göstermektedir. O halde, potansiyel verim düzeyine ulaşabilmek için bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi gerekmektedir. Ancak, bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesinde klâsik bitki ıslahı yöntemlerinin kullanılarak istenilen tüm özelliklerin bir genotipte toplanması çok güçtür. Bugüne kadar uygulanan ıslah programlarında daha çok ürün kalitesi ve miktarının artırılmasına çalışılmış, kültür bitkilerine hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması her zaman ikinci planda bırakılmıştır. Halbuki, tarımsal üretim artışını sınırlayan en önemli faktörlerden biri de hastalık ve zararlılar nedeniyle ortaya çıkan ürün kayıplarıdır. Kültür bitkileri hastalık ve zararlılara karşı kimyasal ilaçlarla korunmaya çalışılmış, ancak kullanılan bu kimyasal ilaçların kalıntıları gerek üründe, gerekse toprakta uzun süre ayrılmadan kalabildiğinden; insan, hayvan ve çevre sağlığını önemli ölçüde tehdit eder konuma ulaşmıştır. Aynı zamanda, kimyasal ilaç kullanımı büyük parasal kayıplara da neden olmaktadır. Bu nedenle, kültür bitkilerine hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık kazandıracak yeni ıslah yöntemlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Klâsik bitki ıslahının olumsuz olan bir diğer yönü de; oldukça zaman alıcı bir uğraş olmasıdır. Diğer taraftan, bu çeşit ıslahta doğada var olan genetik çeşitlilikten yararlanılmaktadır. Ancak, günümüzde özellikle insan beslenmesinde önemli yeri olan ürünlerde bu genetik çeşitliliğin sınırlarına yaklaşılmıştır. Oysa ki, klâsik bitki ıslahı yöntemlerinden beklenen başarı,

üzerinde çalışılan populasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, populasyonda var olan genetik çeşitliliğin artırılması gerekmektedir. Bu ise, türler arasındaki uyumsuzluğun kaldırılması, bağıllık engelinin aşılması yalnız istenilen genin aktarılması, mutasyonlar, protoplast füzyonu, haploid hücre ve bitkilerle mümkündür. İşte, bitkilerin tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde yukarıda açıklamaya çalıştığımız klâsik bitki ıslahının doğasında var olan zorluklar, bitki doku kültürleri ve bitki genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak kolayca aşılabilmektedir. Dolayısıyla, bu bölümde bitki ıslahında uygulanan doku kültürü teknikleri, bitkilere gen aktarımında kullanılan yöntemler, bitki genetik mühendisliğinin uygulama alanları, bitki genetik mühendisliği ile ilgili problemler, keten bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı, ve doktora projesinin amacı hakkında bilgi verilecektir.

1.1. Bitki Islahında Kullanılan Doku Kültürü Teknikleri

1.1.1. Kallus kültürü

Kallus; düzensiz bölünen, organize olmamış hücreler kümesidir (Gamborg ve Shyluk 1981). Gen aktarımı gibi ileri biyoteknolojik çalışmaların yapılabilmesi için önce kallus kültürlerinin oluşturulması gerekmektedir (Groose ve Bingham 1984, Er ve Canpolat 1992). Kallus kültürü, aynı zamanda hücre ve protoplast kültürlerinin başlangıç materyalini de oluşturmaktadır.

Kallus kültürlerinin oluşturulmasında bitkilerin çiçekleri, olgunlaşmamış endosperm ve embriyoları, yaprakları, gövde parankimasi, hipokotilleri, petiol ve yaprak orta damarı gibi kısımları kullanılmaktadır. Bitki türlerine göre kallusun yapısı, rengi ve büyüme şekli farklılık gösterebilmektedir.

Kallus kültürü sonucu elde edilen bitkilerde görülen kromozom sayı ve yapısındaki farklılık bitki ıslahı için son derece önemlidir. Çünkü, ıslah programlarından beklenen sonucun alınabilmesi için üzerinde çalışılan populasyonun genetik farklılık göstermesi gerekmektedir. Üzerinde çalışılan populasyonda genetik farklılık gösteren bireyler ne kadar fazla ise, ıslahattan beklenen başarı o denli yüksek olmaktadır. Günümüzde, kallus oluşumundan sonra yüksek oranda bitki rejenerasyonu bitkilere gen aktarımının temel

şartı haline gelmiştir. Kallus dokusundan bitki rejenerasyonu iki şekilde gerçekleşir. Bunlar; organogenezis ve somatik embriyogenezis'tir.

Kallustan organogenezis yoluyla bitki rejenerasyonunda, kallus önce yüksek sitokinin içeren ortamlarda kültüre alınarak sürgün oluşturması sağlanır ki, buna indirek organogenezis adı verilmektedir. Daha sonra oluşan sürgünler köklendirilmek amacıyla oksin kapsamı yüksek ortamlara aktarılır. Araştırmalar, organogenezis yoluyla rejenere olan bitkilerin genetik olarak farklılık gösterdiğini ve bu nedenle bu yöntemin vejetatif çoğaltma ya da genetik materyallerin muhafazası amacıyla kullanılmayacağını göstermiştir (Vasil 1987). Direk organogenezis'te sürgünler doğrudan eksplant üzerinden gelişirler.

Somatik embriyogenezis yoluyla bitki rejenerasyonu; somatik hücre ya da dokulardan somatik embriyoların oluşumu ve bu embriyolardan sürgünlerin gelişimi yoluyla gerçekleşir. Somatik embriyogenezisin iki tipi vardır. Direk somatik embriyogeneziste; embriyo kallus oluşumu gerçekleşmeden doğrudan somatik bir hücreden gelişir (Finer 1994, Merkle vd 1990). İndirek somatik embriyogeneziste ise; somatik embriyolar ara bir kallus safhasından sonra gelişir (Ammirato 1983, Ammirato 1987, Pierik 1987, Rashid 1988). Her iki sistemde de embriyolardan gelişen sürgünler köklendirilerek bitkiler elde edilir. Şekil 1.1'de *in vitro* bitki rejenerasyonu şematik olarak gösterilmiştir.

1.1.2. Hızlı çoğaltım (mikro üretim)

Bitkilerin doku kültürü teknikleri kullanılarak çoğaltılmasına hızlı çoğaltım ya da mikro üretim adı verilmektedir. Bu teknik, tüm dünyada özellikle süs bitkilerinin üretiminde olmak üzere yaygın olarak kullanılmaktadır (Chu 1992, Huettezman ve Preece 1993, Mantell vd 1985, Pierik 1987, Er ve Canpolat 1992).

Hızlı çoğaltım sisteminin dört aşaması vardır (Murashige 1974). Birinci aşamada steril edilen eksplantlar kültüre alınır. İkinci aşamada bu eksplantlardan sürgünler elde edilir. Üçüncü aşama, sürgünlerin köklendirilmesi ve yeni bitkilerin elde edilmesini kapsar. Son aşamada bitkiler, iklim odaları ve seralarda kontrollü şartlar altında yetiştirilerek dış ortam şartlarına adaptasyonu sağlanır.

Hızlı çoğaltım tekniğinin faydaları şöylece özetlenebilir;

- ↳ Kısır melezler, somatik melezler, kendine kısır bitkiler ve haploid bitkiler gibi normal yollarla çoğaltılamayan bitkilerin çoğaltılması sağlanır.
- ↳ Bitkilerin çok küçük parçalarından kısa sürede ve fazla sayıda bitki elde edilir.
- ↳ Yabancı döllenmiş bitkilerde genetik yapının muhafazası sağlanır.
- ↳ Yeni ıslah edilen çeşitlerin üreticiye kısa sürede ve fazla miktarda ulaştırılması sağlanır.
- ↳ Tohumla ya da vejetatif yollarla çoğaltılması zor ve çoğalma oranı düşük olan bitkilerin çoğaltılmasında kullanılır.

1.1.3. Meristem kültürü

Meristemler tüm bitkilerde sürgünlerin ucunda bulunan ve bitkilerin büyümesini sağlayan dokulardır (Kantha 1981). Meristem kültüründe, bitkilerden alınan sürgün uçları steril edildikten sonra ışık mikroskobu altında meristem dokusu çıkarılarak kültüre alınır (Arslan 1986, Er ve Canpolat 1992). Elde edilen sürgünler köklendirildikten sonra steril toprağa aktarılarak gelişmeleri sağlanır.

Meristem kültürü, özellikle patates gibi vejetatif çoğalan bitkilerde virüsten arı bitki elde etmek için uygulanır (Slack 1980, Bhojwani ve Razdan 1983, Hartmann ve 1990). Bitkilerde virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadele oldukça zordur. Bitkilerin virüslerden temizlenmesinde başlıca üç yöntem kullanılır. Bunlar; kimyasal madde kullanımı, sıcaklık muamelesi (termoterapi) ve meristem kültürü yöntemleridir.

Kimyasal maddeler kullanılarak virüssüz sağlıklı bitki elde edilebilmesi oldukça zordur. Sıcaklık muamelesi ise; virüslerin yok edilmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Ancak, bitkinin sıcağa karşı çok hassas olması ya da virüsün sıcaktan etkilenmemesi durumunda bu yöntem başarısız olabilmektedir.

Virüssüz bitki elde edilmesinde en sık kullanılan ve en yüksek başarı alınan yöntem; meristem kültürüdür. Limasset ve Corneut, mozaik virüsünün tütütün kökü boyunca

farklı yoğunluktaki dağılımından yola çıkarak, aynı durumun sürgünde de gözlenebileceğini ve meristemin virüssüz olabileceği fikrini ortaya atmışlardır. 1952 yılında Morel ve Martin, dahlia bitkisinin meristemlerini *in vitro* koşullarda kültüre alarak ilk virüssüz bitkileri elde etmişlerdir (Hatipoğlu 1995).

Bitkilerin farklı kısımlarında virüs yoğunluğunun farklı olmasının nedeni henüz tam olarak açıklanamamış değildir. Bu konuda farklı görüşler mevcuttur. Bazı araştırmacılara göre meristem bölgesindeki hücre çoğalması virüslerden daha hızlı olduğundan, buradaki virüs yoğunluğu daha az olmaktadır. Bir kısım araştırmacılar meristemdeki virüs yoğunluğunun düşüklüğünü, meristemde virüslerin çoğalmasını teşvik eden enzimlerin bulunmamasına bağlamaktadırlar. Kimi araştırmacılar ise, meristemde bulunan bazı maddelerin virüslerin çoğalmasını engellediğini savunmaktadırlar (Hatipoğlu 1995).

1.1.4. Embriyo kültürü

Bu teknik; olgunlaşmamış ya da olgun embriyoların steril koşullarda izolasyonu ve uygun ortamlarda kültüre alınmasını kapsamaktadır (Marks 1973, Hu ve Wang 1986).

Embriyo kültürünün, embriyoların olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış olmasına göre iki türü vardır. Olgunlaşmış embriyolar, tohum çimlenmesini önleyen dormansi durumunu ortadan kaldırmak için kültüre alınır. Olgunlaşmamış embriyolar ise, normal şartlarda gelişimini tamamlayamayan embriyolardan bitki elde etmek amacıyla kullanılır.

Embriyo kültürünün pratikte birçok kullanım alanı vardır. Bunlar;

- ↳ Normal şartlarda çimlenmesi mümkün olmayan bitki tohumlarının çimlendirilmesinde,
- ↳ Dormansi gösteren bitkilerde, dormansinin kaldırılıp, bitki tohumlarının hızla çimlendirilmesinde,
- ↳ Türler ve cinsler arası melezlemelerde ortaya çıkan uyumsuzluk nedeniyle embriyoların gelişemediği durumlarda embriyo gelişiminin sağlanması amacıyla,
- ↳ Haploid bitkilerin elde edilmesinde.

1.1.5. Anter kültürü

Anter kültürünün esasını; belli bir gelişme safhasındaki mikrosporları içeren anterlerin steril şartlar altında çiçek tomurcuklarından çıkartılarak uygun ortamlarda kültüre alınması ve haploid bitkilerin elde edilmesi oluşturur. Daha sonra bitkiler saksılara aktarılarak kontrollü şartlar altında gelişmeleri sağlanır. En sonunda gelişen bitkilerin kromozomları katlanarak homozigot diploid fertil bitkiler elde edilir (Barnabas vd 1991, Siebel ve Pauls 1989, Collins 1977, Er ve Canpolat 1992).

İlk defa 1964 yılında Guha ve Maheshwari, anter kültürü tekniğini kullanarak *Datura innoxia*'dan bitkiler elde etmişlerdir. Bugüne kadar 200'den fazla türde haploid bitki elde edildiği bildirilmektedir (Dunwell 1986).

Anter kültürünün pratikteki kullanım alanları aşağıda verilmiştir (Dunwell 1985, Kasha vd 1990);

- ↳ Klâsik ıslah yöntemleriyle yeni bir çeşidin geliştirilmesi yaklaşık 10 yıl alırken, anter kültürünün kullanılmasıyla bu süre 3-4 yıla kadar inebilmektedir.
- ↳ Homozigot diploid bitkiler bir generasyonda elde edilebilmektedir.

1.1.6. Hücre kültürü

Bitki hücreleri, tek bir hücreden bölünme ve farklılaşma yoluyla tüm bitki oluşturma yeteneğine sahiptir ki, buna totipotansi adı verilir (Liu 1981).

Hücre kültürünün esasını; steril şartlar altında tek bir bitki hücresinden tüm bitkinin elde edilmesi oluşturur. Bu kültürler, kallus parçalarının sıvı ortamlarda bireysel hücreler oluşuncaya kadar çalkalanması ile elde edilir. Daha sonra bu hücreler sıvı ya da agarlı besin ortamlarında kültüre alınarak hızlı hücre bölünmesi başlatılır. Bundan da kallus ve somatik embriyogenezis yoluyla rejenerasyon sağlanır (Evans ve Reed 1981, Handro 1981, Rashid 1988, Er ve Canpolat 1992).

- Hücre kültürünün pratikte çeşitli kullanım alanları vardır. Bunlar;
- ↳ Hücre kültürleri mutasyon çalışmalarına materyal sağlarlar. Burada ya eksplant kültür öncesi mutasyona uğrattılır (Carlson ve Polacco 1975) ya da hücre süspansiyonu elde edildikten sonra bunların kültürü sırasında çeşitli kimyasal mutagenler kültür ortamı bileşimine eklenerek mutasyon oluşturulur. Daha sonra hücreler seçici şartlarda kültüre alınarak aranan özelliğe sahip bitkilerin seçilmesine çalışılır. Örneğin, hastalıklara dayanıklılık için yapılacak seçimlerde kültür ortamına hastalık etmeninin toksini eklenerek dayanıklı bitkiler elde edilebilmektedir.
 - ↳ Hücre kültürlerinde görülen kromozom sayı ve yapısındaki değişikliklerden yararlanılarak genlerin kromozomlar üzerindeki yerleri ve kromozom ilişkileri incelenmeye çalışılır.
 - ↳ Hücre kültürleri protoplast kültürlerinin başlangıç materyalini oluşturur.
 - ↳ Hücre kültürü tekniğinde bir test tüpü içerisinde milyonlarca hücreyi kültür etmek ve seleksiyon yapmak mümkündür. Ancak, klâsik bitki ıslahında aynı işi yapmak için binlerce hektar arazi, büyük bir işgücü ve paraya ihtiyaç vardır.
 - ↳ Başta tıp olmak üzere, endüstrinin farklı kollarında kullanılan alkaloidler, glikozitler, eterik yağlar, steroidler, terpenoidler ve fenolikler gibi sekonder bitki metabolitleri üretilir.
 - ↳ Hücre kültürünün en önemli uygulama alanlarından bir diğeri ise, gen aktarımında kullanılmasıdır.

1.1.7. Protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon

Protoplast kültürü, normal eşeyssel yollarla elde edilemeyen türler ve cinsler arası melezlemelerin somatik olarak gerçekleştirilmesi tekniğidir (Cocking 1960, Evans ve Reed 1981, Hess 1975, Mayo 1980).

Protoplast kültüründe yaygın olarak kullanılan eksplant; yaprakların mezofil dokusudur. Dokunun fizyolojik durumu başarıyı etkilediğinden bitkiler kontrollü iklim odaları ya da seralarda yetiştirilir (Vasil 1976). Yaprak yüzeyi steril edildikten sonra epidermisi uzaklaştırılarak mezofil dokusunun ayrılması sağlanır. Küçük parçalara ayrılan yapraklar sıvı ortamlar içerisinde çalkalayıcılar üzerinde sallanır. Tek hücreler elde edildikten sonra, bunlar hücre duvarlarının parçalanması amacıyla özel enzimler içeren ortamlara alınır. Bu ortamlar aynı zamanda protoplastların yapı ve canlılığını koruyacak, osmotik basıncı düzenleyen maddeleri de içerir. Bundan sonra ölü hücre ve diğer artıkları protoplastlardan ayırmak için filtre edilir.

Protoplastlar, sıvı ya da agarlı ortamlarda kültüre alınabilir. Ancak, yine kültür ortamında osmotik basıncı düzenleyen maddelerin bulunması gerekir. Böylece, kültüre alınan ve füzyonu sağlanan protoplastlar, önce yeni bir hücre duvarı oluşturur ve bundan sonra da hücre bölünmesi başlar. 1-3 hafta içerisinde hücre yığınları oluşur. Oluşan bu hücre yığınlarından önce sürgünler, sürgünlerin köklendirilmesi ile yeni bitkiler elde edilir. Bu bitkilerin saksılara aktarılarak yetiştirilmesi son aşamayı oluşturur.

Negatif yüzey yüküne sahip protoplastların biraraya gelmesi mümkün değildir. Protoplastların biraraya gelebilmeleri için ortama pozitif yüklü bir iyonun ilâve edilmesi gereklidir. Bu amaçla en çok Ca^{+2} kullanılır. Ancak, biraraya gelen protoplastlarda füzyon olayının gerçekleşebilmesi için polyethilenglucol (PEG) kullanılır. Bu olay sırasında iki hücrenin muhtevaları birbiri içerisine karışır. Daha sonra çekirdekler arasında çekirdek füzyonları ortaya çıkar. Ancak, çekirdek füzyonları her zaman görülmeyebilir. Böylece birleşen hücreler, hücre duvarlarını oluşturarak birkaç gün içerisinde bölünmeye başlarlar. Sonuçta, hücre yığınları oluşur ve bunların kültürüyle somatik melez bitkiler elde edilir. Bütün protoplast füzyonlarından somatik melez bitki elde edilmesi beklenmemelidir. Nitekim, burada cereyan eden olaylar normal eşeysel melezlemeye göre çok daha karmaşıktır. Hücreler arasındaki uyumsuzluklar, kromozom eşleşmeleri ve bunların bölünme sırasında hücrelere dağılışındaki düzensizlikler gibi nedenlerle protoplast füzyonundan her zaman istenen başarı alınamamaktadır.

1.2. Bitkilere Gen Aktarımında Kullanılan Yöntemler

Bitkilere gen aktarımında kullanılan tekniklerin esasını; istenilen geni taşıyan bir DNA parçasının doku içerisindeki hücrelerin kromozomlarına yerleştirilmesi, daha sonra doku kültürü tekniklerinin kullanılarak bu hücrelerden gen aktarılmış (transgenik) bitkilerin elde edilmesi oluşturur. Genelde, doku içerisinde gen aktarılmış hücrelerin oranı oldukça düşüktür. Bu nedenle, gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek adventif sürgün oluşumuna paralel olarak başarı da önemli derecede artmaktadır.

Bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan araç; *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu özelliğinden dolayı *A.tumefaciens*'e "bitkilerin doğal genetik mühendisi" adı verilmiştir (Özcan ve Özgen 1996). Günümüzde *Agrobacterium tumefaciens* ile buğdaygillere de başarıyla gen aktarımı yapılabilmektedir. *A.tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılamayan tek çenekli bitkilere gen aktarabilmek için elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül bombardımanı gibi doğrudan gen aktarma yöntemleri de geliştirilmiştir. *A.tumefaciens* ya da doğrudan gen aktarma yöntemleri kullanılarak gen aktarımının gerçekleştirildiği bazı kültür bitkileri Çizelge 1.1'de verilmiştir.

1.2.1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı

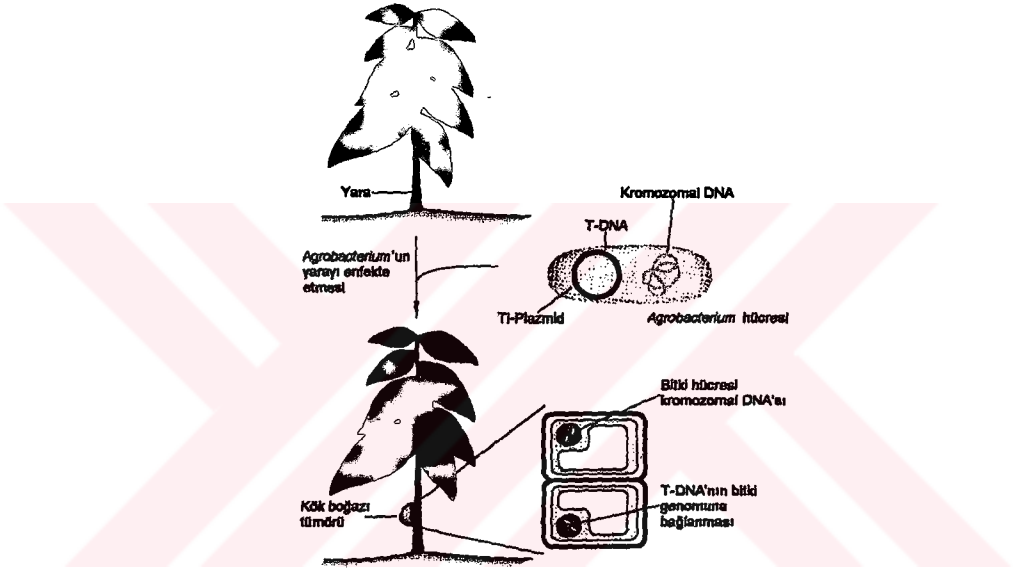
Agrobacterium, *Rhizobiaceae* familyasından, toprakta yaşayan gram (-) bir bakteri olup, çoğu çift çenekli bitkiyi kök boğazında oluşan yaralardan enfekte ederek kök boğazı uruna neden olmaktadır (Şekil 1.2). *Agrobacterium*'un fitopatojenik özellikleri (Smith ve Townsend 1907) uzun yıllar önce belirlenmesine rağmen, enfeksiyonun gerçek doğası son yıllarda ortaya konabilmiştir (Hooykaas ve Schilperoot 1984). Bu hastalık tarımsal açıdan önemli olup, her yıl büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalarda tümör dokusunun normal bitkide bulunmayan ve bakteri tarafından karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılan bazı aminoasitler ve opin'ler olarak bilinen şeker türevlerini sentezlediği görülmüştür (Messens vd 1985, Tempé ve Goldmann 1982, Tempé ve Casse-Delbart 1989, Kado 1991). Tümörlü dokunun sentezlediği opinlerin türleri (oktopin ve napolin gibi) enfekte eden bakteri hatları tarafından belirlenir (Bomhoff vd 1976, Özcan ve Özgen 1996).

Çizelge 1.1. Gen aktarımının başarılı olduğu bazı önemli kültür bitkileri ve gen aktarma yöntemleri

Latince	Türkçe	Yöntem	Kaynak
<i>Beta vulgaris</i>	Şekerpancarı	●	Gasser ve Fraley 1989
<i>Brassica napus</i>	Kolza	●,●	Fry vd 1987
<i>Glycine max</i>	Soya	●,●	Hinchee vd 1988
<i>Gossypium hirsutum</i>	Pamuk	●	Firoozabady vd 1987
<i>Helianthus annuus</i>	Ayçiçeği	●	Everett vd 1987
<i>Linum usitatissimum</i>	Keten	●	Basiran vd 1987
<i>Solanum tuberosum</i>	Patates	●	De Block 1988
<i>Nicotiana sp.</i>	Tütün	●,●	Horsch vd 1985
<i>Lotus corniculatus</i>	Gazal boynuzu	●	Jensen vd 1986
<i>Medicago sativa</i>	Yonca	●	Shahin vd 1986
<i>Trifolium repens</i>	Ak üçgül	●	White ve Greenwood 1987
<i>Oryza sativa</i>	Çeltik	●,●	Chan vd 1992
<i>Triticum sp., Hordeum vulgare</i>	Buğday, Arpa	●,●	Mooney vd 1991
<i>Zea mays</i>	Mısır	●,●	Gould vd 1991
<i>Apium graveolens</i>	Kereviz	●	Catlin vd 1988
<i>Asparagus officinalis</i>	Kuşkonmaz	●	Conner vd 1988
<i>Brassica oleracea</i>	Lahana	●	Shahin ve Yashar 1986
<i>Daucus carota</i>	Havuç	●,●	Scott ve Draper 1987
<i>Cucumis sativus</i>	Hıyar	●	Trulson vd 1986
<i>Lactuca sativa</i>	Marul	●	Michelmores vd 1987
<i>Solanum melongena</i>	Patlıcan	●	Guri ve Sink 1988
<i>Pisum sativum</i>	Bezelye	●	Puonti-Kaerlas vd 1990
<i>Cucumis melo</i>	Kavun	●	Fang ve Grumet 1990
<i>Fragrea fragrans</i>	Çilek	●	Nehra vd 1990
<i>Malus pumila</i>	Elma	●	James vd 1989
<i>Juglans regia</i>	Ceviz	●	McGranahan vd 1988
<i>Petunia hybrida</i>	Petunya	●	Horsch vd 1985
<i>Geranium sp.</i>	İtır	●	Butcher vd 1990

● *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı, ● Doğrudan gen aktarımı

Tümör oluşturan (virulent) *Agrobacterium* hatları ile yapılan çalışmalar, tümör oluşumu ve opin sentezinin, bakteride bulunan 150-250 kb büyüklüğünde, çok küçük ve yuvarlak bir DNA molekülü tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir (Özcan ve Özgen 1996). *A.tumefaciens* bakterisinde bulunan bu DNA molekülü Ti (Tumour inducing/tümör oluşturan) Plazmid olarak adlandırılmaktadır (Zaenen vd 1974, Watson vd 1975). *Agrobacterium* bakterisi, bitki hücrelerine gen aktarımı için gereken üç unsuru



Şekil 1.2. Yabani (onkogenik) *Agrobacterium* hattının bitkinin kök boğazında tümör oluşturması (Watson vd 1996)

taşımaktadır (Zambryski 1988, Özcan ve Özgen 1996). Bunlar;

① Ti plazmidinde bulunan T-DNA (transfer-DNA) bölgesidir (De Greve vd 1981). T-DNA bölgesi, bakteriden bitki hücresine aktararak bitki genomuyla birleşen küçük bir DNA parçasıdır (Chilton vd 1980, Willmitzer vd 1980). Yapılan araştırmalar enfekte olan hücrelerin tümör oluşturma ve opinleri sentezlemelerine T-DNA bölgesinde yer alan bazı genlerin (tms1, tms2 ve tms3) neden olduklarını göstermiştir (Bevan ve Chilton 1982, De Greve vd 1983).

Oktopin ve napolin tipi plazmidlerin T-DNA bölgeleri, sağ ve soldan 25 bp uzunluğundaki düzensiz nükleotid dizileri ile sınırlandırılmış olup, tümör oluşturan genleri taşırlar (Binns ve Thomashow 1988, Melchers ve Hooykaas 1987, Zambryski vd 1989, Caplan vd 1983, Yadav vd 1982). Araştırmalar, bu iki sınır arasına yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolayca bitki hücresine aktarılabilirdiğini göstermiştir. Üstelik, tümör oluşturan genlerin kesici enzimler yardımıyla T-DNA bölgesinden uzaklaştırılmasının da bitki hücresine gen aktarımını hiçbir şekilde etkilemediği belirlenmiştir (Leemans vd 1982, Schell ve Van Montagu 1983, Özcan ve Özgen 1996). Tümör oluşturan genleri taşımayan plazmidler, non-onkogenik Ti-plazmidler olarak adlandırılır. Araştırmalar, T-DNA'nın sağ sınır nükleotid dizisinin gen aktarımında mutlak gerekli olduğunu ortaya koyarken (Jen ve Chilton 1986, Peralta vd 1986, Van Haaren vd 1987, Joos vd 1983, Wang vd 1984), sol sınırdaki parça eksilmelerinin bakteriden bitki hücresine genetik materyal aktarımını etkilemediğini göstermiştir (Joos vd 1983).

② *Agrobacterium*'dan bitki hücresine gen aktarımında önemli rol oynayan ikinci unsur; T-DNA'nın dışında ve sol sınıra yakın olan, yaklaşık 35 kb uzunluğundaki "virulens (*vir*)" bölgesidir. Yapılan çalışmalar *vir* bölgesinin altı ana genden (*VirA*, *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirE* ve *VirG*) oluştuğunu göstermiştir (Stachel ve Nester 1986). *VirA* geni, yaralanmış bitki hücrelerinin salgıladığı fenolik bileşikleri tanıyan ve bunlarla bağlantı kuran bir algılayıcıyı şifreler ki (Stachel ve Zambryski 1986a, Zambryski 1992), bunun sonucunda *VirG* geni uyarılır. Uyarılan *VirG* geni ise kendi ve diğer *vir* genleri için transkripsiyon işlemcisi görevini üstlenir. *VirD* geni, T-DNA iplikliğinin

rejenerasyonunu sağlarken; *VirC*, bu bölgenin sınırlardan kesilmesinde (Toro vd 1989), *VirB* ve *VirE* genleri ise T-DNA'nın bakteriden bitki hücresine hareketinde etkili olmaktadır (Zambryski 1992).

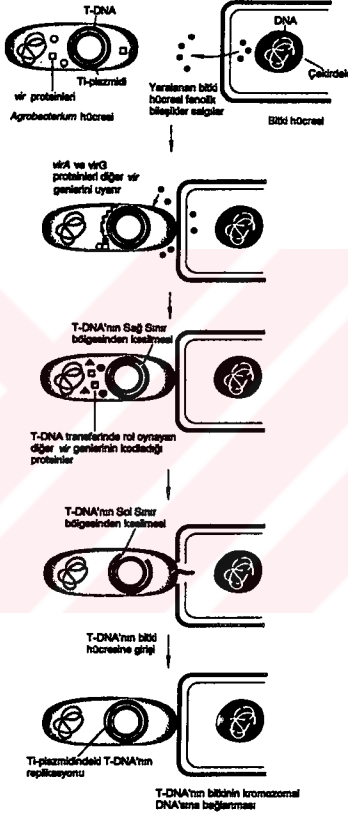
③ Bitki hücrelerine gen aktarımında etkili olan üçüncü unsur, *Agrobacterium* bakterisinin kendi kromozomu üzerinde bulunan üç adet lokus (*chvA*, *chvB* ve *pscA*)'un kodladığı ürünler olup, bunların bakterinin bitki hücresine tutunmasında önemli rol oynadıkları belirlenmiştir (Douglas vd 1985).

1.2.1.1. T-DNA aktarımının mekanizması

Yaralanan bitki fenolik bileşikler salgılar (Şekil 1.3). Fenolik bileşikleri algılayan *Agrobacterium* bakterisi bitkinin yaralanmış hücrelerine tutunur. Bitkinin hücre duvarına tutunan bakteri hücresine fenolik bileşikler girerek *vir* genlerini aktif hale getirir (Stachel vd 1985, Leroux vd 1987, Hooykaas ve Schilperoort 1984). *Vir* bölgesi 7 adet operon içerir. Bunlardan *VirA*, *VirB*, *VirD* ve *VirG* gen aktarımı için mutlak gerekli olup, geri kalan *VirC*, *VirE* ve *VirF* operonları yalnızca bazı türlere gen aktarımında gereklidir (Hooykaas vd 1984, Stachel ve Nester 1986).

Vir genlerinin uyarılmasının ardından, T-DNA'nın alt sarmalı, *VirD1* ve *VirD2* genlerinin ürettiği bir endonükleaz enzimi tarafından alt sınır bölgesinden kesilir (Stachel ve Zambryski 1986b, Zambryski 1992). *VirD2* proteini, sağ sınır bölgesinin 5' ucuna bağlanarak T-iplikliğinin serbest kalmasını sağlar (Hooykaas ve Schilperoort 1992, Zambryski vd 1989, Ward ve Barnes 1988). Serbest kalan tek sarmal T-DNA, *VirE* proteini tarafından kaplanarak ortamda bulunan nükleaz enzimlerinin olumsuz etkilerinden korunur (Christie vd 1988). *VirD2* proteini, T-DNA'nın bitki hücrelerine aktarılmasında rol oynarken (Herrera-Estrella vd 1990), *VirB* proteininin bakterinin hücre zarında T-DNA'nın geçebileceği büyüklükte bir açıklık oluşturduğu düşünülmektedir (Nester ve Gordon 1988, Özcan ve Özgen 1996).

Bitki hücresine giren T-DNA, hücre çekirdeğine *VirD* proteinince taşınmakta (Zambryski 1992, Howard vd 1992), çekirdek içine alınmasında *VirE2* proteininin rol oynadığı tahmin edilmektedir (Zambryski 1992). Böylece bitki hücre çekirdeğine giren



Şekil 1.3. *Agrobacterium tumefaciens*'in bitki hücrelerine tutunması ve T-DNA transferi (Watson vd 1996)

T-DNA, bir veya birkaç kopya halinde rastgele bitki kromozomuyla birleşmektedir (Draper vd 1988, Lemmers vd 1980, Thomashow vd 1980) (Şekil 1.4).

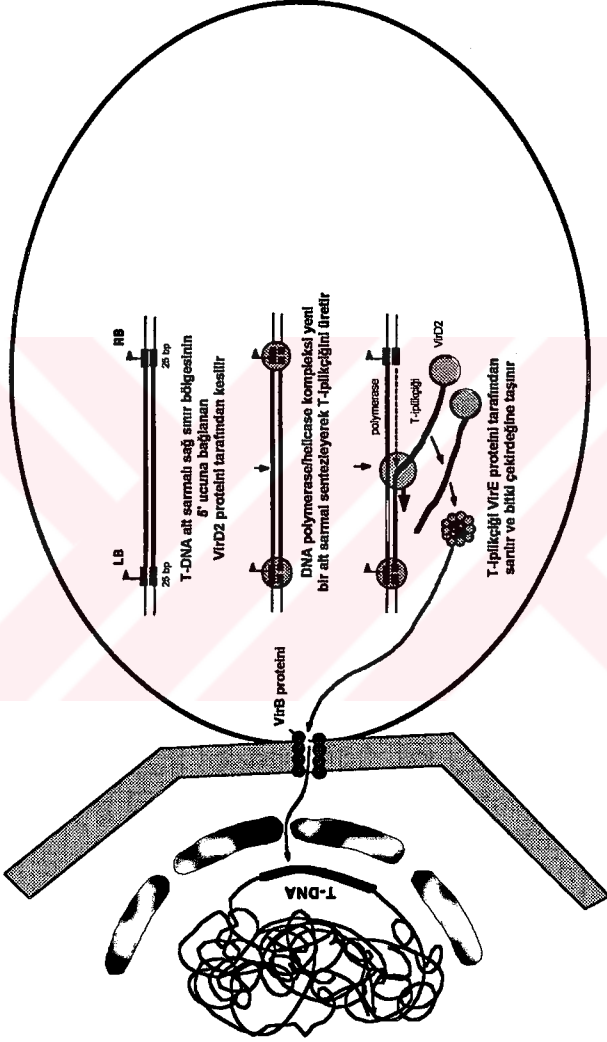
Gen aktarımı yapılmış bitkilerin analizleri sonucunda, T-DNA'ların %70'inde hiçbir değişikliğin olmadığı saptanmıştır (Ream 1989). T-DNA'nın bitki kromozomuyla birleşme işleminin sağ sınırdaki belli bir noktadan başladığı, sol sınırdaki bu işlemin değişik noktalardan olabildiği belirlenmiştir (Slightom vd 1985, Yadav vd 1988). Son aşamada bitki DNA'sının onarımı ve T-iplikliğinin çift sarmal DNA'ya dönüşümü için replikasyon olmaktadır.

1.2.1.2. Bitkilere gen aktarımında Ti plazmidlerinden yararlanma

Non-onkogenik (tümör oluşturmeyen) plazmidler aracılığıyla gen aktarımı yapılmış bitki hücreleri, gen aktarımı yapılmamış hücreler gibi davranmaktadırlar. Yani, gen aktarımı yapılmış hücrelerin ve bu hücrelerden gelişen transgenik bitkilerin normalerinden ayrılması olanaksızdır. Bu sorun, gen aktarılmış hücrelerin ve bunlardan gelişen sürgünlerin seçimi için işaret (markör) genlerinin geliştirilmesiyle çözülmüştür. Bu markör genler, bitki hücre ve dokularına antibiyotik ve herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırmaktadır. Yani, antibiyotik ya da herbisitleri içeren doku kültürü ortamlarında, sadece markör genlerin aktarıldığı bitki hücreleri gelişebilmektedir.

Günümüzde, birçok seçici markör geni taşıyan bitki transformasyon plazmidleri geliştirilmiştir (Özcan ve Özgen 1996). Örneğin, bakteriyel Tn5 transposonundan elde edilen (Bevan vd 1983) ve kanamisine dayanıklılığı sağlayan "neomycin phosphotransferase (NPT-II)"; *E.coli*'den izole edilen (Waldron vd 1985) ve hygromisine dayanıklılığı sağlayan "hygromycin phosphotransferase (HPT)"; farelerden elde edilen (Eichholtz 1987) ve methotrexate dayanıklılığı sağlayan "dihydrofolate reductase (DHFR)"; *Streptomyces hygroscopicus*'dan elde edilen (De Block vd 1987) ve bialaphosa dayanıklılığı sağlayan "bar" geni sayılabilir.

Seçici markör genlerin başında, bitkilere aktarılan yabancı genlerin belirtilerinin kontrol edilmesinde kullanılan raportör markör genleri de vardır ki, bunların en önemlisi " β -glucuronidase (GUS)" genidir. Bitkilere aktarılacak gen ya da genler, T-DNA'da seçici markör genin yanına klonlanır.



Şekil 1.4. T-DNA aktarımının mekanizması (Özcan ve Özgen 1996)

1.2.2. Doğrudan gen aktarımı

Dünya besin ihtiyacının önemli bir kısmını karşılayan buğdaygillere ve bazı iki çenekli bitkilere gen aktarımında *Agrobacterium*'un başarısız olması ya da yeterli başarının alınamaması, doğrudan gen aktarma yöntemlerinin gelişmesine neden olmuştur. Birçok doğrudan gen aktarma yöntemi bulunmasına rağmen, en çok kullanılanları; protoplastlara DNA aktarımı, mikroenjeksiyon ve hızlandırılmış partiküllerdir (Özcan ve Özgen 1996).

1.2.2.1. Protoplastlara DNA aktarımı

Protoplast zarlarının geçirgenliği, belli kimyasal maddeler ya da elektroporasyon yöntemiyle artırılabilir. Bu metotla çift çenekli ve mısır, çeltik, arpa ve domuz ayrığı gibi tek çenekli bitkilere başarıyla gen aktarımı yapılmıştır (Rhodes vd 1988, Zhang vd 1988, Horn vd 1988).

Bugün için protoplastlara gen aktarımında en yaygın kullanılan kimyasal, polyethileneglycol (PEG)'dür (Draper vd 1988, Lörz vd 1985, Krens vd 1982). Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan PEG, solüsyondaki DNA'yı protoplast üzerine çöktürmekte ve hücre zarında oluşturduğu gözeneklerden DNA'nın protoplast içerisine girişini sağlamaktadır (Freeman 1988). DNA alımı gerçekleştikten sonra, protoplastlar normal büyüme ortamına alınarak hücre duvarlarının yenilenmesi ve bölünmenin başlaması sağlanır. Daha sonra gen aktarımı yapılan hücrelerin belirlenebilmesi için seçici ortamlara aktarılır.

Protoplastlara elektroporasyon yöntemiyle DNA aktarımında, yüksek voltajlı elektrik akımı yardımıyla hücre zarında 30 nm çapında ve birkaç dakika açık kalabilen gözenekler oluşturulur (Okada vd 1986, Fromm vd 1986, Ou-Lee vd 1986). Bu yöntemde elektrik akımının verilme süresi ve voltaj miktarı çok önemlidir (Draper vd 1988). DNA aktarımında her bitki türüne özgü bir voltaj değeri olup, bunun üzerine çıkılması hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Lindsey vd 1988). Örneğin, optimal voltajlar soya için 450 V/cm, mısır için 250 V/cm ve tütün için 300-350 V/cm kadardır. Bu yöntemle şeker pancarı (Lindsey ve Jones 1987) ve mısırdaki çok düşük oranda başarı sağlanmıştır.

Protoplastlara gen aktarımında PEG ve elektroporasyon yöntemlerinin birlikte kullanılması başarıyı artırmaktadır (Shillito vd 1985). Elektroporasyon yöntemiyle transgenik domates (Bellini vd 1989), kolza (Guerche vd 1987), marul (Chupeau vd 1989) ve çilek (Shimamoto vd 1989) bitkilerinin elde edildiği bildirilmiştir.

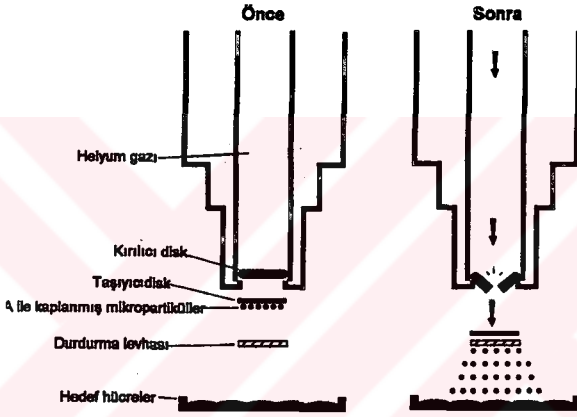
1.2.2.2. Mikroenjeksiyonla gen aktarımı

Mikroenjeksiyon yönteminde esas; DNA'yı 0.5-1 µm çapındaki kılcal iğnelerle doğrudan alıcı hücrenin sitoplazması ya da çekirdeği içerisine yerleştirmektir. Mikroenjeksiyonda önce protoplastlar, ya polylysine üzerine yapıştırılarak ya da agarose içerisine gömülerek sabit hale getirilmektedir (Neuhaus ve Spangenberg 1990). Bu yöntemde ilk başarı; yabani tip Ti plazmidinin yonca (Reich vd 1986) ve tütün (Crossway vd 1986) protoplastlarına enjeksiyonuyla elde edilmiştir. Burada DNA doğrudan çekirdek içerisine ejekte edildiğinden, gen aktarım oranı diğer yöntemlerden daha yüksektir. İşlemin yavaş yürümesi (20-100 hücre/gün) ve pahalı olması bu yöntemin en büyük dezavantajlarıdır.

1.2.2.3. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı

Bu yöntemle hemen tüm doku ve hücelere gen aktarımı mümkündür. Hızlandırılmış partiküllerden yararlanarak tek çenekli bitkilere kolaylıkla gen aktarılabildiği gibi, *Agrobacterium* ya da diğer yöntemlerle gen aktarımının çok zor olduğu bitkilere de uygulanabilmektedir. Bu yöntemin temel ilkesi; DNA taşıyan 1-2 µm çapındaki altın veya tungsten parçacıklarına çok yüksek hız kazandırıp, bitki hücrelerine girmelerinin sağlanmasıdır (Şekil 1.5). Parçacıklar hücre içerisine girdikten sonra DNA'lar bitki genomuyla birleşmektedir (McCabe vd 1988, Klein vd 1987).

Parçacıkların hızlandırılmasında önceleri yüksek elektrik akımı kullanılırken, son yıllarda sıkıştırılmış helyum gazından faydalanılmaktadır. Parçacık hızının sürtünme nedeniyle azalmasını önlenmesi için, işlem vakum altında yapılmaktadır. Bu yöntemde eksplant olarak yaprak, embriyo, sürgün ucu gibi organlar, kültüre alınmış hücreler, polen ve mikrosporlar kullanılmaktadır (Klein vd 1990).



Şekil 1.5. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı (William 1994)

1.3. Genetik Mühendisliğinin Bitki Islahında Kullanım Alanları

1.3.1. Herbisitlere dayanıklılık

Kültür bitkilerine herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılması, yabancı ot kontrolunda kullanılan kimyasal maddelere karşı bu bitkilerin dayanıklı hale getirilmesi anlamına gelmektedir. Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak bitkilere herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılmasında iki yöntem kullanılmaktadır (Özcan ve Özgen 1996). Bunlar; dayanıklılığı sağlayan enzimin duyarlılığı ve düzeyinin değiştirilmesi, ve herbisitın toksik etkisini ortadan kaldıracak bir genin bitkilere aktarılmasıdır. Birinci yöntemle bitkilere herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılması için mutant “acetolactate synthase (ALS)” geni bitkilere aktarılmış, sonuçta ALS sentezini engelleyen “sulfonyllurea” herbisidine karşı dayanıklı transgenik bitkiler üretilmiştir (Haughn vd 1988, Lee vd 1988).

İkinci yöntemde herbisitlerin toksik etkilerini önleyen genler çeşitli bitki ve mikroorganizmalardan izole edilerek birçok kültür bitkisine aktarılmıştır (Mullineaux 1992). *Salmonella typhimurium*’dan izole edilen “aro-A” geni tütüne aktarılarak “glyphosate” herbisidine (Comai vd 1985); *Streptomyces hygroscopicus*’dan izole edilen “bar” geni tütün, patates, domates, yonca ve şeker pancarına aktarılarak “L-phosphinothricin” herbisidine (Murakami vd 1986, De Greef vd 1989, De Halluin vd 1990, De Halluin vd 1992, De Block vd 1987); *Klebsiella ozaenae*’den izole edilen “bxn” geni domates ve kolzaya aktarılarak “bromoxynil” herbisidine (Stalker vd 1988); *Streptomyces virido-chromogenes*’den izole edilen “pat” geni kolzaya aktarılarak “phosphinothricin” herbisidine (Donn vd 1990) dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Ancak, kültür bitkilerine herbisitlere karşı dayanıklılık kazandırılmasının bazı olumsuz tarafları da vardır. Nitekim, herbisitlere dayanıklı bitkilerin elde edilmesi durumunda herbisit kullanımı, artacaktır. Bu ise, insan ve hayvan sağlığı ile çevre üzerindeki olumsuz etkinin artmasına neden olacaktır. Bundan başka, herbisitlerin yaygın olarak kullanımı zamanla yabancı otlara da herbisitlere dayanıklılık özelliği kazandırabilir. Ayrıca, kültür bitkilerine kazandırılan dayanıklılık doğal melezleme yoluyla yabancı

akrabalarına da geçebilir. Bu gibi durumlar göz önüne alındığında, yabancı ot kontrolü tümüyle olanaksız hale gelebilir.

1.3.2. Böceklere dayanıklılık

Bitki genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak kültür bitkilerine böcekler karşı dayanıklılık kazandırılarak kimyasal ilaç kullanımının azaltılması hedeflenmektedir. *Bacillus thuringiensis*, özellikle *Lepidoptera* familyasından böceklerin sindirim sistemlerine zarar vererek ölümlerine neden olan bir protein (Bt) üretmektedir (Peferoen 1992). Bu proteinin üretimine neden olan Bt geninin *B.thuringiensis*'ten izole edilerek domates, tütün, pamuk ve mısır bitkilerine aktarılması sonucunda böcekler karşı mükemmel bir dayanıklılık sağlanmıştır (Delannay vd 1989, Kozeil vd 1993). Aynı şekilde, bürülmeden izole edilen "trypsin inhibitör (CpTi)" geninin aktarıldığı tütün bitkileri, tütün sürgün kurdu (*Heliothis virescens*) larvalarının saldırılarına karşı dayanıklılık göstermiştir (Hilder vd 1987).

1.3.3. Virüslere dayanıklılık

Kültür bitkilerine virüslere karşı dayanıklılık kazandırılmasında virüslerden izole edilen kılıf proteinlerini kodlayan "CP" genleri bitkilere aktarılmaktadır. Bu şekilde tütün mozaik virüsü (TMV) kılıf protein geninin aktarıldığı tütün bitkileri TMV enfeksiyonlarına karşı dayanıklılık göstermişlerdir (Abel vd 1986).

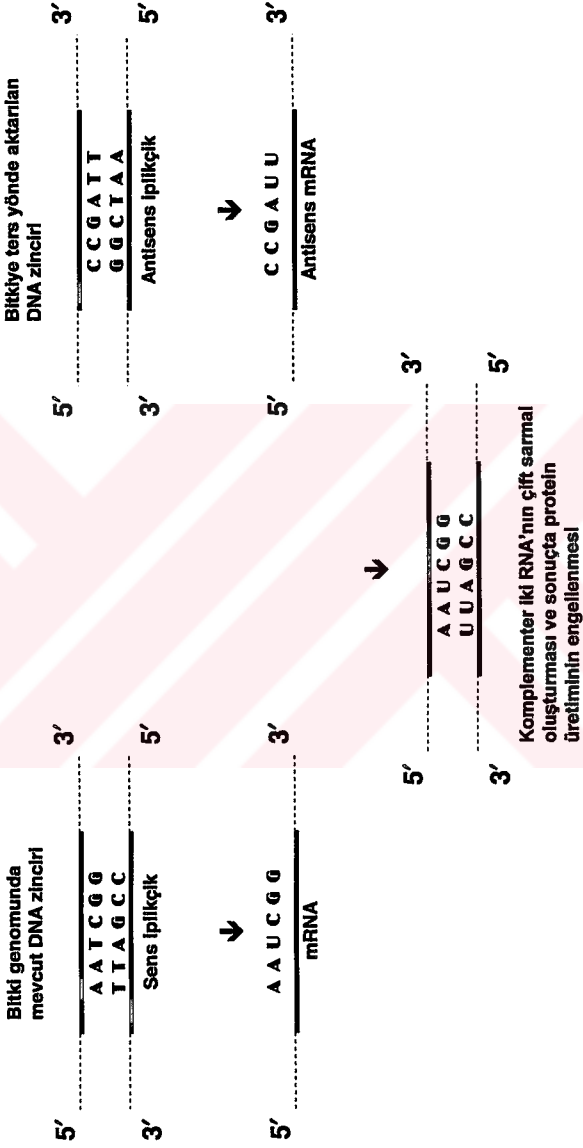
Virüslere dayanıklı bitki elde edilmesinde kullanılan diğer bir yöntem satelit RNA'dır (Özcan ve Özgen 1996). Belirli bir satelit RNA'nın cDNA kopyaları bitkilere aktarıldığında, bu bitkilerin virüslerle enfeksiyonu sonucu satelit RNA replike olmakta ve virüs belirtilerinde azalma görülmektedir. Örneğin, hıyar mozaik virüsü ve tütün halkalı leke virüsü satelit RNA'larından elde edilen cDNA kopyalarının aktarıldığı transgenik bitkiler bu virüslere karşı dayanıklılık göstermişlerdir (Harrison vd 1987, Gerlach vd 1987, Baulcombe vd 1986).

1.3.4. Bitki ıslahında antisens RNA tekniğinin kullanımı

Antisens RNA tekniği kullanılarak belirli protein ya da enzimlerin üretimlerinden sorumlu genlerin etkileri kolayca ortadan kaldırılabilmektedir (Özcan ve Özgen 1996). Çift sarmal DNA üzerinde hücrelerin protein yapımında kullandıkları bilgiyi taşıyan iplikçiğe sens; diğerine antisens iplikçik adı verilir. Bitkilerden izole edilen genler, antisens iplikçik şablon olacak şekilde tekrar bitkilere aktarıldığında, antisens mRNA'lar üretilir. Bu antisens mRNA'lar, aynı genin ürettiği normal mRNA'lar ile birbirini tamamlayıcı olmalarından dolayı birleşerek mini RNA çift sarmalları oluştururlar. Ribozomlar ise böyle RNA'ları kullanamadıklarından, genin protein üretimi engellenmiş olur (Şekil 1.6). Transgenik domateslerde etilen üretiminin antisens tekniği ile engellenmesi sonucu, depolama sırasında bozulmadan uzun süre kalabilen meyveler elde edilmiştir (Hamilton vd 1990).

1.3.5. Genetik erkek kısır bitkilerin elde edilmesi

Bitkisel üretimde melez tohum kullanımı heterosis (melez azmanlığı) nedeniyle ürün artışı sağladığından önemli bir yere sahiptir. Ancak melez tohum üretiminde gerekli erkek kısır hatlar çoğu kültür bitkisinde yoktur. Buna karşın, geliştirilen bir yöntemle erkek kısır bitkiler kolaylıkla üretilmektedir (Mariani vd 1990). Bu yöntemde önce olgunlaşmamış anterlerin tapetum hücrelerinde belirti gösteren "TA29" geni izole edilerek, bu genin promotör bölgesi *Bacillus amyloliquefaciens*'den elde edilen "RNase barnase" genine bağlanarak fütün ve kolza bitkilerine aktarılmıştır. "RNase barnase" geninin etkisiyle tapetum bölgesine özel RNA'nın yapımı ve fonksiyonel olan çiçek tozlarının üretimi tamamen engellenmiştir. Ancak, melez bitkiler tohum ya da meyveleri için yetiştirildiğinden, fertilitenin yeniden sağlanması gerekir. Bunun için "barnase" geninin etkisini engelleyen "barstar" geni tozlayıcı olarak kullanılan bitkilere aktarılmıştır. "Barnase" genini taşıyan erkek kısır bitkilerin, homozigot "barstar" genini taşıyan fertil tozlayıcılarla melezlenmesi sonucu fertil melezler elde edilmiştir.



Şekil 1.6. Antisens RNA teknolojisi (Mol vd 1990)

1.4. Bitki Doku Kültürü ve Genetik Mühendisliği ile İlgili Problemler

Günümüzde bazı tarımsal karakterleri iyileştirilmiş olan transgenik mısır, soya, pamuk ve patates çeşitleri yaygın olarak üretilmeye başlanmıştır. Diğer birçok türde ise, transgenik çeşitler yoğun tarla denemelerine alınmıştır. Bununla beraber, bitki genetik mühendisliğinde henüz çözülmemiş birçok problem vardır. Bu problemleri üç başlık altında özetlemek mümkündür.

- ① Bitkilerin *in vitro* rejenerasyonu ile ilgili problemler,
- ② Kültür sırasında karşılaşılan problemler,
- ③ Bitki genetik mühendisliği yoluyla elde edilen ürünlerin kullanımıyla ilgili problemler.

1.4.1. Bitkilerin *in vitro* rejenerasyonu ile ilgili problemler

Bitkilerin *in vitro* rejenerasyonu sırasında karşılaşılan güçlükler, başarıyı sınırlandıran en önemli faktördür. Rejenerasyon, birçok bitkide başarılı olsa da tahıllar, dane baklagiller ve odunsu bitkilerin çoğunda istenen başarı elde edilememiştir. Bitkilerin *in vitro* rejenerasyonunda etkili faktörler; bitkisel ve fiziksel olarak iki ana grup altında toplanabilir.

1.4.1.1. *In vitro* rejenerasyona etki eden bitkisel faktörler

In vitro rejenerasyonu etkileyen bitkisel faktörlerin başında; kullanılan bitkinin genotipi gelmektedir. Genelde çift çenekli bitkiler tek çenekli bitkilere göre daha iyi rejener olmaktadır. *Solanaceae*, *Begoniaceae*, *Crassulaceae*, *Gesneriaceae* ve *Cruciferae* familyasına giren çift çenekli bitkilerin rejenerasyonları kolaydır. Ancak, rejenerasyon kapasitesi bitkilere göre önemli farklılık göstermektedir. Öyle ki, aynı türe ait bitkiler arasında bile rejenerasyon kapasitesi bakımından büyük farklar vardır. Kimi araştırmacılar, aynı tür içerisindeki bitkilerin farklı rejenerasyon göstermelerinin nedenini; bitkilerin farklı genotipe sahip olmaları ile açıklamaktadırlar. Bu araştırmacılara göre, rejenerasyon kapasitesi genlerin kontrolü altındadır. Bir kısım araştırmacılar ise, aynı türe ait bitkiler arasında rejenerasyon kapasitesi bakımından görülen farklılığın nedenini; bitkilerin farklı yetiştirme koşulları ve besin maddelerine ihtiyaç duymaları ile açıklamaktadırlar.

Nedeni ne olursa olsun, aynı türe ait bitkilerin rejenerasyon kapasitesi bakımından farklılık göstermesi *in vitro* kültür tekniklerinin yaygın olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır.

Rejenerasyon kapasitesini etkileyen diğer bir faktör; kullanılan eksplantın yaşıdır. Genç dokularda hücre bölünmesi daha hızlı olduğundan, rejenerasyon kapasitesi daha yüksektir.

Eksplantın alındığı bitkilerin yetiştirme koşulları ve sağlık durumu da rejenerasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Bu açıdan eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkilerin sıcaklık, ışık ve nemi kontrol altında tutulan iklim odalarında yetiştirilmesi, hastalık ve zararlılardan temiz olması gerekmektedir. Stres altındaki bitkilerden alınan eksplantlardan iyi bir rejenerasyon elde edilememektedir.

Eksplantın alındığı yer de rejenerasyon kapasitesini etkileyen bir faktördür. Nitelik, bitkinin genç ve fizyolojik olarak iyi durumda bulunan kısımlarından alınan eksplantlarda rejenerasyon kapasitesi daha yüksektir. Genç, yumuşak dokular *in vitro* kültür için daha uygundur.

Rejenerasyon kapasitesi eksplant büyüklüğüne göre oldukça değişmektedir. Eksplantlar bünyelerinde besin maddesi ve hormonları içerirler. Bu bakımdan alınacak eksplantın çok küçük olmaması rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek olacağı anlamına gelir.

1.4.1.2. *In vitro* rejenerasyona etki eden fiziksel faktörler

Hiç kuşkusuz rejenerasyon kapasitesini etkileyen fiziksel faktörlerin başında besin ortamı ve içeriği gelir. Farklı cins ve türlere ait bitkilerin hücre, doku ve organlarının gelişmesini sağlayacak tek bir besin ortamı yoktur. Kullanılan bitkiye ait en uygun besin ortamı ancak araştırmalarla belirlenebilir. *In vitro* kültürde kullanılan temel besin ortamı; su, makro ve mikro besin elementleri, şeker ve bitki büyüme düzenleyicilerini (oksin ve sitokinin) içerir. Bunlardan birinin eksikliği durumunda eksplant gelişemez ve bir süre sonra ölür. Bununla birlikte, temel besin ortamında yer alan makro ve mikro besin elementleri, şeker ve bitki büyüme düzenleyicilerinin oranı bitki türlerine göre

farklılık gösterebilir. Bazı bitki türlerinde ise, bunlara ek olarak besin ortamına bazı maddelerin eklenmesi gerekebilir.

Besin ortamının pH değeri de rejenerasyon üzerinde etkili bir unsurdur. *In vitro* kültürde bitkilere göre değişmekle birlikte, 5-6.5 arasında bir pH değeri istenmektedir. pH'nın bu değerlerin altında ya da üstünde olması eksplant gelişimini durdurmaktadır (Hatipoğlu 1995).

Eksplantların kültürden önce steril edilmesi rejenerasyon kabiliyetini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bitki türlerine göre eksplantların sterilizasyonunda kullanılan dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, sterilizasyonda kullanılan dezenfektan ile eksplantın teması, rejenerasyon kapasitesini az ya da çok düşürmektedir. Bu nedenle, kullanılacak eksplantın steril olarak yetiştirilen fidelerden alınması rejenerasyon kapasitesini artıracaktır (Yıldız vd 1997).

Rejenerasyon kapasitesini etkileyen diğer bir faktör de; eksplantın kültürden sonra gelişmeye bırakıldığı ortamın ışık ve sıcaklık değerleridir. Aydınlanma güneş ışığına en yakın ışığı veren floresan lambalarla sağlanır. Bitki türlerinin ihtiyaç duyduğu ışık miktarı ve süresi farklı olabilmektedir. Işık miktarı 1000-10.000 lüks arasında değişirken, ışıklandırma süresi 16 saat olarak uygulanır. Sıcaklık, bitkinin ihtiyaç duyduğu miktardan en fazla $\pm 1^{\circ}\text{C}$ fark edebilir. Sıcaklığın devamlı olarak yükselip düşmesi eksplantları strese soktuğundan, rejenerasyon kapasitesi düşmektedir.

1.4.2. Kültür sırasında karşılaşılan problemler

1.4.2.1. Somaklonal varyasyon

Bitkide somatik hücrelerin tamamı aynı genetik yapıya sahiptir. Dolayısıyla, bu hücrelerden gelişen bitkilerin de aynı genetik yapıda olması beklenir. Ancak *in vitro* kültürde kallustan rejenerasyonda durum farklıdır. Kallustan rejenere olan bitkiler genellikle farklı genetik yapıya sahip olmaktadır. İşte, kallustan rejenere olan bitkilerin genetik yapısında gözlenen bu farklılığa somaklonal varyasyon adı verilir (Larkin ve Scowcroft 1981).

Somaklonal varyasyon nedeniyle polen fertilitesi, çiçeklenme zamanı, yaprak ağırlığı, rengi, boyutu ve şekli ile tomurcuk sayısı, tüylülük ve bitki boyunda farklılıklar görülebilmektedir (Mantell vd 1985, Lindsey ve Jones 1989). Aslında *in vitro* kültürde karşılaşılan somaklonal varyasyonun nedenleri tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bununla birlikte, bazı faktörlerin genetik farklılığa yol açtığı saptanmıştır.

Rejenere olan bitkiler arasında genetik farklılığa neden olan faktörlerin başında; *in vitro* kültür yöntemi gelir. Meristem, sürgün ucu ve tomurculardan herhangi bir kallus safhası olmadan rejenere olan bitkiler genetik olarak farklılık göstermezler. Bu nedenle genetik yapının korunarak çoğaltım yapılması gerektiği durumlarda bu bitki kısımlarının kullanılması önerilir. Kallus oluşumunu takip eden rejenerasyonda genetik farklılık daha çok organogenezis yoluyla rejenere olan bitkilerde görülür (Hatipoğlu 1995).

Somaklonal varyasyonu etkileyen diğer bir faktör; kullanılan eksplanttır. Eksplantın bitkiden alındığı yer sürgün ucundan uzaklaştıkça rejenere olan bitkiler arasında genetik farklılığın arttığı bildirilmiştir (Miyazaki ve Tashiro 1987). Ayrıca, poliploid türler diploid türlere oranla daha fazla genetik farklılık göstermektedirler.

Besin ortamının bileşimi de *in vitro* rejenerasyonda genetik yapı değişikliklerine neden olabilmektedir. Besin ortamının bileşimi, özellikle oksin ve sitokinin içeriği genetik farklılıklara yol açmaktadır. Örneğin, 2,4-D belli türlerde aneuploid hücrelerin oranını artırmaktadır. Besin ortamında bulunan yüksek konsantrasyondaki BAP, tütün bitkisinde somaklonal varyasyonu artırmıştır (Pierik 1987).

1.4.2.2. Vitrifikasyon (Camsılaşma, Saydamlaşma)

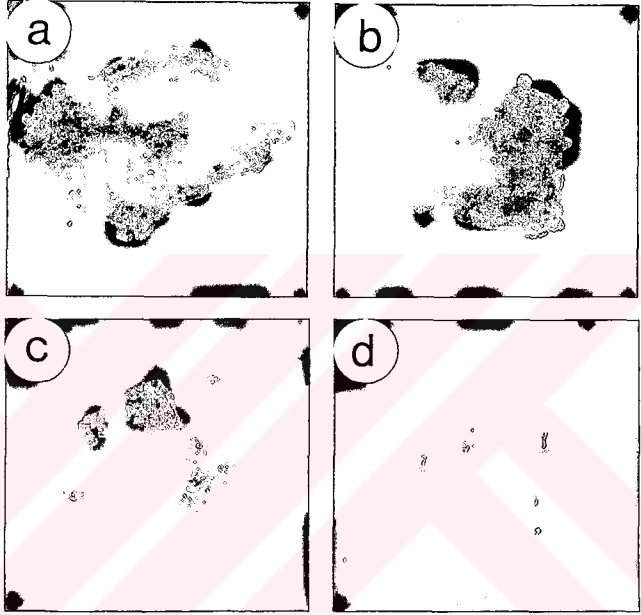
Vitrifikasyon, hücre ve dokuların camsılaşması olayıdır. *In vitro* kültürde vitrifikasyonun önlenmesi için bazı şartların sağlanması gerekir. Bunlar;

- ↳ Besin ortamının agar ve şeker konsantrasyonunun artırılması, ortamın sık sık yenilenmesi,
- ↳ Kültürün yapıldığı kaplarda gaz değişiminin sağlanması,
- ↳ Düşük ışık yoğunluğu ve yüksek sıcaklıklardan kaçınılması.

1.4.2.3. Eksplantların kararması

In vitro kültürde kimi türlerde sıkça rastlanılan eksplantların kararması ya da kahverengileşmesi olayı; bir kısım enzimlerin fenolik bileşikler okside etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Kararan eksplantta rejenerasyon kabiliyeti düşmekte ve bir süre sonra kararma eksplantın tamamını kaplayarak ölümüne neden olmaktadır (Şekil 1.7). Şeker pancarı, gül, fındık ve üzüm gibi bitkilerde eksplantların kararması olayına sıkça rastlanmaktadır. Polyphenoloxidase (PPO), fenolik bileşiklerin oksidasyonuna neden olup, eksplantların kararmasına yol açan temel enzimdir. Eksplantta görülen kararma bu enzimin aktivitesine ve dokunun fenolik bileşikler kapsamına bağlıdır (Kahn 1975). Dokuların kararmasını önlemek için besin ortamına aktif karbon, askorbik asit, sitrik asit ve sodyum klorit gibi maddelerin eklenmesi önerilmektedir (Pizzocaro vd 1993).

Yıldız vd (1997), şeker pancarının *in vitro* rejenerasyon kabiliyetini önemli ölçüde düşüren eksplant kararmasının ortadan kaldırılması için yaptıkları araştırmada; farklı iki şekilde yetiştirilen şeker pancarı fidelerinin kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırmada kullanılan fidelerden bir kısmı serada yetiştirilirken, bir kısmı laboratuvarında tohumların steril edilip, çimlendirilmesi yoluyla elde edilmiştir. Araştırma sonucunda, steril fidelerde alınan kotiledon eksplantlarında kararmanın olmadığı ve rejenerasyon kabiliyetinin çok yüksek olduğu görülmüştür. Ancak, serada yetiştirilen fidelerden alınan eksplantlar kültürden önce steril edildiğinden, bir başka ifadeyle sterilizasyon için sodyum hipoklorit ile temas ettiğinden, kararma sodyum hipokloritin dozundaki artışa paralel olarak artmıştır. Steril edilen eksplantlarda kararma; eksplantın dezenfektanla temas eden kesim yüzeylerinde başlamakta, zamanla yayılarak bütün eksplantı kaplamaktadır (Şekil 1.7). Sonuçlar, sterilizasyonda kullanılan dezenfektan eksplantlarda kararmaya neden olduğunu göstermektedir. Besin ortamının kapsamında bulunup, eksplantın kendisi tarafından üretilen bazı maddeler de kararmaya neden olmaktadır. Yıldız vd (1997), şeker pancarında yaptıkları araştırmalarında; ortamda bulunan şeker konsantrasyonunun düşürülmesinin eksplantlardaki kararmayı azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre, şeker zaten eksplantın kendisi tarafından üretildiğinden, normal şartlarda ortamda şeker fazlalığı oluşmakta, bu da eksplantta kararmaya neden olmaktadır (Nicoli vd 1991).



Şekil 1.7. Eksplantta karama ve sonucunda meydana gelen ölüm

- a. Steril edilen eksplantın dezenfektanla temas eden kesim yüzeyindeki dokularda karamanın başlaması
- b. Karamanın eksplantta yayılışı
- c. İlerleyen aşamada eksplanttaki karamanın artışı
- d. Karamanın neden olduğu eksplant ölümü

1.4.3. Bitki genetik mühendisliği yoluyla elde edilen ürünlerin kullanımıyla ilgili problemler

Genetik mühendisliği yoluyla üretilen bitkiler tüketici tarafından tam anlamıyla benimsenmiş değildir. Gen aktarımı sırasında bitkiye, seleksiyonun yapılabilmesi için istenilen genle birlikte bir de markör gen aktarılır (Flawell vd 1992). Seçici markör genler transgenik bitkilerin hayatları boyunca faaliyetlerini devam ettirirler. Bu genlerin ürettikleri proteinlerin insan ve hayvanlara toksik etkisinin bulunduğu yönünde herhangi bir kanıt olmamasına rağmen, bakteriyel orijinli olmaları ve antibiyotiklere dayanıklılığı sağlamaları, bu markör genlerin güvenilirliğini tartışılır hale getirmiştir (Özcan ve Özgen 1996). Kimi araştırmacılar markör genlerin transgenik bitkilerden uzaklaştırılmasını savunmaktadırlar (Bryant ve Leather 1992). Ancak, markör genlerin transgenik bitkilerde bulunmaması durumunda, aktarılan genlerin varlığını ispatlayacak doğru ve hassas bir yöntem ihtiyacı vardır. Bununla birlikte, aslında markör genlerin ekspresyonlarına ilk safha olan transgenik hücre ve dokuların seçimi aşamasında ihtiyaç duyulmakta, ileri safhalarda markör gen proteinleri gereksiz olmaktadır. Markör genlerin yetişkin bitkilerdeki protein ürünlerini engellemenin tek yolu; sadece gen aktarımının erken döneminde aktif olan, daha sonraki aşamalarda aktivitesini yitiren markör genlerin oluşturulmasıdır. Son yıllarda yaralanma ve patojen saldırıları sonucu aktif hale geçen, ancak tam bitki organlarında çok az ya da hiç belirti göstermeyen patojen ilişkili bir gen kuşkonmaz bitkisinden izole edilmiştir (Warner vd 1993).

AoPR1 promotörünün gen aktarımında hedef seçilen bitki hücrelerinde kuvvetli ekspresyon gösterirken, gelişen transgenik bitkilerin yaprak, gövde ve köklerinde son derece düşük miktarda ya da hiç ekspresyon göstermediği ortaya konulmuştur (Özcan vd 1993). Daha sonra AoPR1 promotörü NPT-II markör geninin önüne klonlanıp, elde edilen bu markör genle çok sayıda transgenik tütün ve patates bitkileri elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda bitkide NPT-II markör geninin proteinlerine rastlanmamış veya çok az miktarda bulunmuştur. Böylece, AoPR1-NPT-II markör geninin gen aktarımında kullanılmasıyla transgenik bitkilerde önemli bir sorun olan markör genlerin protein ürünleri elimine edilmiştir. Ancak, AoPR1-NPT-II markör geni sadece *Solanaceae* familyasından olan tütün ve patates bitkilerinde denenmiş olup, diğer familyalardan olan bitkilerde görev yapıp yapmadığı bilinmemektedir.

1.5. Keten Bitkisinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* ile Gen Aktarımı

In vitro kültürde bitki rejenerasyonu gen aktarımının ilk koşuludur (Jordan ve Mc Hughen 1988b, Dong ve Mc Hughen 1993). Transgenik bitkilerin elde edilmesine bitki rejenerasyonu, rejenerasyon yeteneğine sahip eksplantların seçimi, kültür şartları ve gen aktarım yöntemi gibi birçok faktör etkilidir. Gen aktarımında yüksek başarı sağlanabilmesi için adventif sürgün rejenerasyonunun ve özellikle de eksplant başına rejeneren olan sürgün sayısının yüksek olması gerekmektedir.

Ketende *in vitro* şartlarda hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ve tam bitki elde edilmesi başarılmıştır (Murray vd 1977).

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

Millam vd (1992), ketende boğum arası eksplantlarının rejenerasyonuna maltoz, sukroz ve sellobioz karbonhidratlarının etkisini araştırmışlardır. *In vitro* kültürde sukroz, eksplantların karbonhidrat ihtiyacını karşılamak amacıyla en çok kullanılan karbon kaynağıdır (Hildebrandt ve Riker 1949, Galiba ve Erdei 1986, Vuke ve Mott 1987). Bununla birlikte, maltoz (Strickland vd 1987) ve sellobioz (Galiba ve Erdei 1986) karbonhidratlarının da sürgün gelişmesini teşvik ettiği bildirilmiştir. Araştırma sonucunda, yüksek sukroz oranlarında kök gelişimi en yüksek bulunmuştur. Sellobiozun etkisi ise sukrozdan daha zayıf görülmüştür (Nickell ve Maretzki 1970). 58 mM sukroz kullanıldığında en iyi sürgün gelişimi sağlanmıştır.

Bitki ıslahında arzulanan karakterleri içeren homozigot bitkilerin hızlı bir şekilde elde edilebilmesi için haploid bitkilerin büyük önemi vardır. Ketende, anter kültürü tekniği kullanılarak farklı genotiplerden haploid bitkiler elde edilmiştir (Nichterlein vd 1989, Sun ve Fu 1981). Ancak, anter kültürüne oranla mikrospor kültürü bazı avantajlara sahiptir. Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesinde, haploid hücrelerin izolasyonu ve kültürü daha başarılıdır. Bu yöntemde elde edilen bitkilerin haploid olma olasılığı çok yüksektir. Nichterlein ve Friedt (1993), ketende ebriyogenezis yoluyla bitki rejenerasyonu için mikrospor kültürü yöntemini kullanmışlardır. Sıvı ortamda iki farklı sıcaklıkta kültüre alınan mikrosprolardan bir kısmı kallus oluştururken, bir kısmında direk embriyo oluşumu gözlenmiştir. Kallus oluşturan mikrosporların kallusları 1 mg/l zeatin içeren katı ortamlara aktarılarak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Daha sonra IAA içeren ortamlarda köklendirilen sürgünler, önce vermikulite, oradan da toprağa şaşırtılmıştır. Bitkilerin çoğu serada başarılı şekilde olgunlaşmıştır.

Günümüzde *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak agronomik önemi olan bazı genler çeşitli bitki türlerine aktarılmış durumdadır (Horsch vd 1985, Hinchee vd 1988, Jordan ve Mc Hughen 1988a, Greenplate ve Fischhoff 1990). Ancak, transgenik bitkilerin rejenerasyonu tütün ve patates gibi *Solanaceae* familyasına ait bitkiler dışında oldukça zordur. Bazı türlerde transgenik bitki elde edilebilmesi için eksplantta yaralanan yüzeyin artırılması (Jordan ve Mc Hughen 1988a), eksplantların inokulasyondan önce kültüre alınması (Mc Hughen vd 1989, Thomas vd 1989) ya da ko-kültivasyon süresinin uzatılması (Jia vd 1989) önerilmektedir. Her ne kadar kolza, keten, bezelye ve çilek gibi bazı türlerde etkili rejenerasyon sistemi geliştirilmiş ve eksplantlar *Agrobacterium*'a karşı hassas (De Cleene ve De Ley 1976) olsalar da, transgenik bitki üretimi çok zordur. Transgenik bitki üretiminin artırılması için eksplantta gen aktarılan hücre miktarının ve bu hücrelerden rejenerasyonun artırılması gerekir.

Agrobacterium ile gen aktarımında, bitki hücrelerinin gen aktarımına karşı olan yeteneği inokulasyondan önce eksplantların fiziksel şartlarının ayarlanmasıyla değiştirilebilir. Thomas vd (1989), havuçta transgenik bitki elde edebilmek için hipokotil eksplantlarının bakteri ile inokulasyondan önce iki gün süreyle kültüre alınması gerektiğini bildirmişlerdir. Yine, datura yaprak eksplantlarının inokulasyondan önce

kültüre alınması gen aktarım frekansını artırmıştır (Sangwan vd 1991). Ko-kültivasyon süresinin uzaması kavun kotiledon eksplantlarında gen aktarımını önemli derecede artırmıştır (Dong vd 1991).

Keten, *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı hassas bir bitki olup, hipokotil eksplantları *in vitro* kültürde yüksek oranda sürgün oluşturmaktadır (Gamborg ve Shyluk 1976, Barakat ve Cocking 1983, Mathews ve Narayanaswamy 1976, Murray vd 1977, Rybczyński 1975). Ancak, hipokotiller direk olarak inokule edildiğinde, 2-3 günlük ko-kültivasyondan sonra inokule olan eksplantlar her ne kadar gen aktarılmış hücreleri taşıyan kallus üretseler de, gen aktarılmış sürgün elde edilmesi çok güçtür (Jordan ve Mc Hughen 1988b). Ketende hipokotil eksplantlarında yaralanan yüzeyin artırılması, inokulasyondan önce eksplantların kültüre alınması ve ko-kültivasyon süresinin artırılması transgenik bitki oluşumunu artırmaktadır (Mc Hughen vd 1989, Jordan ve Mc Hughen 1988b, Dong ve Mc Hughen 1991). Hipokotil eksplantlarında rejenerasyon epidermis hücrelerinden olur (Murray vd 1977). Buna karşın, gen aktarılmış hücreler eksplantın kesilen uçlarının etrafında oluşur. Bu nedenle rejeneren olan sürgünlerin çoğu gen aktarılmamış epidermis dokusundan gelişir. Bunun için ketende epidermis hücrelerinin inokulasyondan önce eksplanttan uzaklaştırılması transgenik sürgün oluşumunu artırmaktadır. Ayrıca inokulasyondan önce eksplantların kültüre alınmasıyla hücreler rejenerasyon sürecine girdiklerinden yine transgenik sürgün sayısı artmaktadır.

Dong ve Mc Hughen (1993), ketende transgenik bitki üretimini artırmak için yaptıkları araştırmada, eksplantlarda epidermal hücrelerin uzaklaştırılması ve ko-kültivasyon süresinin uzatılmasıyla gen aktarılan hücre yoğunluğunun önemli derecede arttığını bulmuşlardır. Araştırmada 5 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantları inokulasyondan önce 6 gün boyunca kültüre alınmış, epidermisleri uzaklaştırılan eksplantlar 3 gün daha kültürde tutulduktan sonra *Agrobacterium* ile inokule edilmiştir. 7 gün ko-kültivasyon döneminden sonra hipokotiller seleksiyon için 200 mg/l kanamisin içeren sürgün gelişim ortamına aktarılmış, eksplantlar 3 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Rejeneren olan sürgünler, köklendirildikten sonra toprağa şaşırtılmıştır. Sonuçta inokule edilen hipokotillerin %10'dan fazlası transgenik sürgün oluşturmuştur. Rejeneren olan sürgünlerin %20'sinin transgenik olduğu teyit edilmiştir.

1.6. Doktora Projesinin Amacı

Keten, hem yağlık ve hem de liflik olarak iki yönlü değerlendirilebilen bir bitkidir. Gerek yağ ve gerekse tekstil sanayimizin hammadde açığı dikkate alındığında, keten tanımına ayrı bir önem verilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Klâsik bitki ıslahı ile istenen tüm özelliklerin bir bitkide toplanması oldukça güç ve zaman alıcı bir işlemdir. Ayrıca, kültüre alınan bitkilerinde var olan genetik çeşitliliğin son derece azalması klâsik bitki ıslahının başarı şansını daha da azaltmaktadır. İslah sürecinin kısaltılması ve başarı şansının artırılması, dünya nüfusunun hızla arttığı günümüzde kaçınılmazdır. Bu yüzden insanoğlu yeni ıslah yöntemlerinin arayışına girmiş ve 20.yy'ın son çeyreğinde yoğun olarak kullanılan Bitki Doku Kùltürleri ve Genetik Mühendisliği tekniklerini geliştirmiştir. Gerçekten bu yeni tekniklerin kullanılmasıyla ıslah süreci kısaltılmış ve klâsik bitki ıslahının olumsuz yönleri ortadan kaldırılmıştır. Ancak, bu tekniklerde aktarılan markör genlerin bakteriyel orijinli olup, antibiyotiklere dayanıklılığı sağlamaları ve bitkinin tüm hayatı boyunca faaliyet göstermeleri transgenik bitkilerin yaygın olarak kullanımını sınırlandırmıştır. Son yıllarda, gelişmiş bitkilerde markör genlerin protein ürünlerini elimine eden, sadece ilk safha olan gen aktarılmış bitkilerin seçimi aşamasında faaliyet gösteren AoPR1 promotörünün markör genlerin önüne klonlanması sonucunda tütün ve patates gibi *Solanaceae* familyasından olan türlerde çok sayıda transgenik bitki üretilmiştir. Ancak, bu promotörün diğer familyalarda çalışıp çalışmayacağı bilinmemektedir.

Projenin temel amaçlarını aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür;

- ① Ketende en yüksek sürgün veren eksplantı belirleyerek gen aktarımına uygun yüksek oranda bir sürgün rejenerasyon sistemi geliştirmek,
- ② Ketene *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yüksek oranda bir gen aktarma sistemini belirlemek,
- ③ AoPR1-NPT-II markör geninin *Linaceae* familyasından ketende çalışıp çalışmayacağını kontrol etmek,
- ④ Transgenik keten bitkilerini elde etmektir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma Chemical Co. ya da Merck'den temin edilmiştir.

2.2. Doku Kültürü Metotları

2.2.1. Büyüme ortamı ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 2.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS0) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilâve edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 23°C'de tutulmuşlardır. Her muamele, içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur.

Çizelge 2.1. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

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

2.2.2. Keten bitki materyali

Kontrol olarak Türkiye’de en fazla üretim alanına sahip olan yağlık keten ekotipi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer 10 keten çeşidinin tamamı A.B.D.’nin Kuzey Dakota eyaletinde bulunan “Northern Crop Science Laboratory”den temin edilmiştir. Denemelerde kullanılan kontrol dışındaki 10 çeşitten 5 tanesi liflik (Fakel, 1886 Sel., Ariane, Viking ve Madaras) ve geri kalan 5 tanesi de yağlık (Omega, McDuff, Clark, McGregor ve Verne) çeşitlerdir.

2.2.3. Keten tohumlarının *in vitro*’da çimlendirilmesi

Tohumlarda yüzey sterilizasyonu için süre 20’ olarak sabit tutulmuş, en yüksek başarının alınacağı en düşük dezenfektan dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun (Axion) %40, %60 ve %80’lik dozları tohuma 4 farklı sıcaklıkta (0°C, 10°C, 20°C ve 30°C) uygulanmış; tohumda çimlenme, fide gelişimi, hipokotil ve kök uzunluğuna bakılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Durulama suyu sıcaklığı kullanılan dezenfektan sıcaklığı ile aynı alınmıştır. Steril edilen tohumlar yine steril petri kapları içerisinde, %3 sukroz içeren ve %0.7’lik agar ile katılaştırılan MS0 besin ortamında, 23°C’de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilmiştir.

Keten tohumlarında çimlenme % olarak ifade edilmiş, bu değer petride çimlenen tohumların toplam tohum sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur. Çimlenme oranları kültür başlangıcından 3 gün sonra kaydedilmiştir. Fide gelişimi, yine % olarak belirtilmiş, bu değer fide oluşturan tohumların toplam çimlenmiş tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Fidelerde hipokotil ve kök uzunlukları ise kültür başlangıcından 7 gün sonra cm cinsinden tespit edilmiştir.

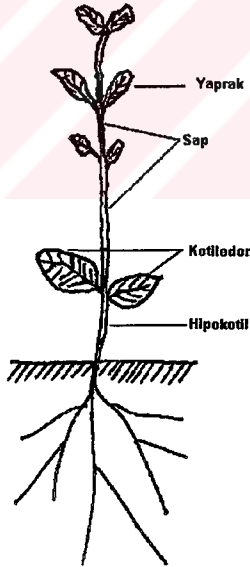
2.2.4. Kotiledon, yaprak, sap ve hipokotil kısımlarının *in vitro*’da elde edilen keten fidelerinden izolasyonu

Kotiledon ve hipokotil kısımları 5-6 günlük fidelerden izole edilirken, yapraklar ve sap kısımları 8-10 günlük fidelerden elde edilmiştir. Kotiledon ve yaprak eksplantlarının petiolü (yaprak sapı) de içeren 2 mm’lik taban kısmı atılarak, kalan kısmı rejenerasyon

ortamına yerleştirilmiştir. Aynı şekilde hipokotil ve sap kısımları da 5 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına konulmuştur. Şekil 2.1’de keten fidesi ve kullanılan eksplantların yerleri gösterilmiştir.

Yerli çeşide ait eksplantlar *in vitro*’da yetiştirilen steril fidelerden alınırken, 10 farklı çeşide ait eksplantlar tarla şartlarında yetiştirilen steril olmayan fidelerden alınmış, yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Daha sonra 10 farklı çeşit arasından en yüksek rejenerasyon gösteren üç çeşit seçilerek bunların fideleri *in vitro*’da steril olarak yetiştirilmiş ve bunlardan alınan hipokotil ve sap eksplantları rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Böylece, steril ve steril olmayan fidelerden alınan eksplantların rejenerasyon kapasiteleri kıyaslanmıştır.

Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmıştır. Sürgün rejenerasyon 1.00-2.00 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), 0.02-0.20 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) ve 0.02-0.20 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) içeren MS0 ortamından oluşmuştur.



Şekil 2.1. *In vitro* gelişen keten fidesi

2.2.5. Rejenere olmuş keten sürgünlerinin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril “baby-jar”lar içinde farklı konsantrasyonlarda oksin içeren köklendirme ortamına yerleştirilmiştir. Burada köklenen sürgünler daha sonra iklim odasında küçük saksılar içerisinde yüksek nemde bir süre tutularak yeni bitkiciğin hem ortam şartlarına uyum sağlaması, hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır.

2.3. *Agrobacterium tumefaciens* Materyali

2260 p35S GUS-INT, 2260 pAoPR1 GUS-INT ve 2260 AoPR1 NPT-II *Agrobacterium tumefaciens* hatları İngiltere'nin Leicester Üniversitesi Botanik Bölümü'nden Doç.Dr. Sebahattin ÖZCAN'ın doktora çalışma materyali olarak Türkiye'ye getirilmiş ve ketene gen aktarımında kullanılmıştır. p35S GUS-INT binary plazmidinde NPT-II geni NOS promotörü ve GUS geni CaMV 35S promotörü tarafından kontrol edilirken, pAoPR1-GUS-INT plazmidinde NPT-II geni yine NOS, ancak GUS geni AoPR1 promotörü tarafından kontrol edilmektedir. AoPR1-NPT-II plazmidinde ise NPT-II genini AoPR1 promotörü kontrol etmektedir. Bu plazmid GUS-INT geni içermemektedir. GUS-INT geni, kodlama bölgesinde bitkisel intron taşıdığından dolayı bakteri içerisinde GUS geninin ekspresyonu engellenmektedir.

2.3.1. Bakteri kültürlerinin saflaştırılması ve büyütülmesi

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılmasına, NA besin ortamında büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanmış, tek koloniler steril lup ile alındıktan sonra gerekli antibiyotikleri içeren NB bakteri büyüme ortamına konulmuştur. Daha sonra bakteri kültürleri çalkalayıcı inkübatörde 28°C'lik sıcaklıkta 1 ya da 2 gün süreyle büyütülmüştür. Bu kültürler daha sonra gen aktarımında kullanılmıştır. Yeniden bireysel koloniler elde etmek için çok az bir miktar bakteri kültürü agarlı besin ortamı üzerine steril bir lupla yayılmış, bu kültürleri içeren petri kutuları ters çevrilerek 28°C'de inkube edilmiştir. 2 gün içinde kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir. Herhangi bir bulaşmayı önlemek için bütün bakteriyel çalışmalar steril kabinde yapılmıştır.

2.3.2. Bakterilerin uzun süreli korunması

Bakteri kültürleri “Nescofilm” ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4°C’de 6 hafta korunmuştur. Daha uzun süreli muhafaza işlemi için eşit miktarda bakteri kültürü ve %40 glycerol içeren NB, 2 ml’lik cryogenic tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı nitrojende hızlı bir şekilde dondurulup, -80°C’de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür.

2.3.3. Antibiyotikler

Büyüme ortamlarına ilâve edilmeden önce her antibiyotiğin mikro filtreler kullanılarak steril edilmiş stok solüsyonları hazırlanmıştır. Antibiyotikler, otoklavdan (sterilizasyondan) çıkmış katı ortamlara, ortam sıcaklığı 45°C’ye düştüğü zaman ilâve edilmiştir. Çizelge 2.2’de kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotikler	Konsantrasyonları (mg/l)	
	Bakteri Kültürü	Bitki Doku Kültürü
Augmentin (Aug)	---	500
Kanamisin (Km)	50	200
Rifampicin (Rif)	100	---

2.4. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Ketene Gen Aktarımı

Ketende denemeye alınan eksplantlardan en iyi rejenerasyon oranını gösteren hipokotil ve sap eksplantları gen aktarma işleminde kullanılmıştır. Değişik gen aktarma vektörlerini içeren *A.tumefaciens* hatları ile bu eksplantlar inokule edilmiştir.

Değişik plazmidleri içeren *A.tumefaciens* hatları, 28°C’de 50 mg/l km ve 100 mg/l rif içeren NB ortamında 1-2 gün süreyle büyütülmüş, daha sonra eksplantlar sıvı rejenerasyon ortamı ile 1/50 oranında seyreltilen bu bakteri kültürleri içerisinde 15 dakika süreyle tutularak inokulasyon sağlanmıştır. Burada eksplantlar iki farklı şekilde kullanılmıştır. Bunlardan ilkinde eksplanta herhangi bir işlem uygulanmamış ve eksplant kesildiği şekliyle inokulasyona konmuştur. İkincisi kullanımda ise, inokulasyondan önce eksplantta epidermis tabakası soyularak uzaklaştırılmıştır.

İnokulasyondan sonra eksplantlar 2 ve 5 günlük sürelerle rejenerasyon ortamında tutularak ko-kültivasyona alınmıştır. Eksplantların etrafında aşırı bakteri gelişimi olduğu durumlarda 1000 mg/l augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Bundan sonra, eksplantlar *Agrobacterium* gelişimini önlemek amacıyla augmentin (500 mg/l), sadece gen aktarılmış sürgünlerin gelişimini sağlamak için de kanamisin (200 mg/l) içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda gelişen kalluslar sürekli olarak kontrol altında tutularak aktarılan genlerin belirtileri gözlenmiştir. Eksplantlar 3 haftada bir alt kültüre alınmıştır.

2.5. Histokimyasal GUS Analizi

Histokimyasal GUS Analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993)'ın tarif ettiği gibi yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 37°C'de 4 saat ya da gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular %70'lik alkolde yıkanarak mavi bölgeler belirlenmiştir.

2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her muamele içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce "arcsin" değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

3.1. Keten Tohumlarının Yüze Sterilizasyonu

Tohumda yüze sterilizasyonu bitki doku kültürü çalışmalarının ilk adımını oluşturmaktadır. Zira, doku kültürü çalışmalarında kullanılacak olan eksplantlar genellikle tohumdan gelişen fidelerden elde edilir. Alınacak başarı kullanılan eksplantın durumuna sıkı sıkıya bağlıdır. Genç ve fizyolojik olarak iyi durumda bulunan eksplantın rejenerasyon kapasitesi daha yüksektir. Yapılan araştırmalar tohumların steril edilmesi yoluyla elde edilen steril fidelerden alınan eksplantlarda rejenerasyon kapasitesinin çok yüksek olduğunu göstermiştir (Yıldız vd 1997). Bununla birlikte, tohum yüze sterilizasyonunda kullanılan dezenfektan konsantrasyonu ve sterilizasyon süresi, tohumdan gelişen fidelerin ve dolayısıyla eksplantın canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini önemli derecede etkilemektedir (Allan 1991). Bu nedenle doku kültürü çalışmalarında en düşük dezenfektan dozunun, en kısa süre uygulanmasıyla en iyi sterilizasyonun sağlanması hedeflenmektedir Tohum yüze sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilirse de, sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu) en yaygın kullanıma sahiptir (Özcan vd 1996). Her bitki tohumunun bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Bu nedenle öncelikle doku kültürü çalışmasına konu olan bitkiye ait en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi gereklidir.

3.1.1. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine etkisi

Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarında çimlenme oranı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuş ve varyans analizi sonuçları Çizelge 3.1'de, Duncan gruplandırması Çizelge 3.2'de verilmiştir. Ancak, dezenfektan doz ve sıcaklıkları arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.

%40'lık dezenfektan (Axion) dozunda ortalama çimlenme oranı %86.25 olarak gerçekleşirken, dozun %80'e çıkarılmasıyla bu oran %47.50'ye düşmüştür. Dezenfektan sıcaklığında ise, en yüksek çimlenme oranı %82.50 ile 10°C'lik sıcaklık

uygulanmasından alınmıştır. Sıcaklık 30°C'ye çıkarıldığında, çimlenme oranı %38.33'e gerilemiştir. Çimlenme oranı bakımından en yüksek değerler %40'lık dezenfektan dozunun 10°C sıcaklıkta kullanıldığı uygulamalardan elde edilmiştir (Çizelge 3.2, Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıkların keten tohumlarının çimlenme oranı üzerine etkisine ait varyans analizi

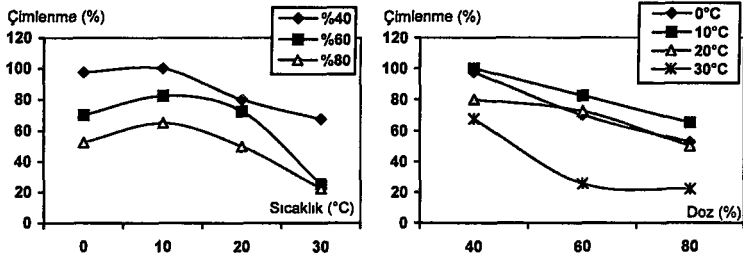
Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F
Doz	2	3816.169	54.445**
Sıcaklık	3	2422.184	34.557**
Doz x Sıcaklık	6	146.852	2.095
Hata	36	70.092	
Toplam	47		

** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.2. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranı üzerine etkisi

Dezenfektan Dozu (%)	Dezenfektan Sıcaklığı (°C)				
	0	10	20	30	
40	97.50	100.00	80.00	67.50	86.25 a
60	70.00	82.50	72.50	25.50	62.50 b
80	52.50	65.00	50.00	22.50	47.50 c
	73.33 b ¹	82.50 a	67.50 b	38.33 c	

¹Aynı sütun ve satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 3.1. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten tohumlarının çimlenme oranına etkisi

3.1.2. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimi (%) üzerine etkisi

Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının fide gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 3.3'te verilmiştir. Fide gelişiminde farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Doz ve sıcaklık etkisi 0.01 düzeyinde önemli çıktığından, her bir faktörün doğrudan etkisinin incelenmesi yerine, interaksiyonun incelenmesi yoluna gidilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F
Doz	2	3687.771	83.121**
Sıcaklık	3	2823.788	63.647**
Doz x Sıcaklık	6	219.388	4.944**
Hata	36	44.366	
Toplam	47		

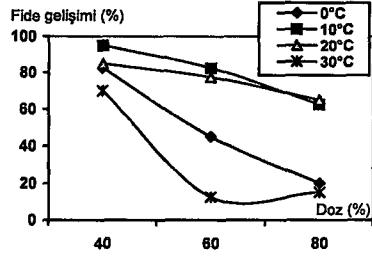
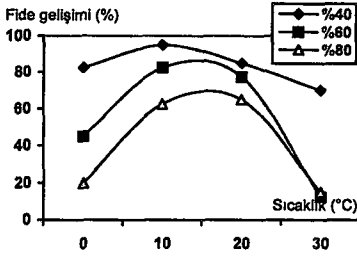
** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.4. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimi üzerine etkisi

Dezenfektan Dozu (%)	Dezenfektan Sıcaklığı (°C)			
	0	10	20	30
40	82.50 bc ¹	95.00 a	85.00 b	70.00 c
60	45.00 b	82.50 a	77.50 a	12.50 c
80	20.00 b	62.50 a	65.00 a	15.00 b

¹Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Ketende en yüksek fide gelişimi dezenfektan dozu %40 ve sıcaklığı 10°C olarak kullanıldığında alınırken, en düşük değer %80'lik dezenfektan dozunun 30°C sıcaklıkta kullanıldığı uygulamadan elde edilmiştir. Bütün dezenfektan dozlarında en yüksek fide gelişimi dezenfektan sıcaklığının 10°C olarak kullanıldığı uygulamalardan alınmıştır. Sıcaklıklar bazında ise, en yüksek değerler %40'lık dezenfektan dozunun kullanıldığı uygulamalardan elde edilmiştir. (Çizelge 3.4, Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin gelişimine etkisi

Tohum yüzey sterilizasyonu amacıyla 3 farklı sıcaklıkta (10°C, 20°C ve 30°C) kullanılan %40'lık dezenfektan dozunun ketende fide gelişimi üzerine etkisi Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Şekilden açıkça görüldüğü gibi, artan dezenfektan sıcaklığı fide gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir. 10°C'lik dezenfektan sıcaklığında oldukça sağlıklı görünen fideler, dezenfektan sıcaklığı 30°C'ye çıkarıldığında; gelişmemiş, yeterince boylanmamış ve kotiledonlar dumura uğramıştır.

3.1.3. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğu (cm) üzerine etkisi

Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinde hipokotil uzunluğu üzerine etkisine ait varyans analizi Çizelge 3.5'te verilmiştir. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğuna etkisi 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Aynı zamanda dezenfektan doz ve sıcaklıkları arasında 0.01 düzeyinde önemli bir ilişkiye rastlandığından, Çizelge 3.6'da yapılan Duncan gruplandırmasında doz ve sıcaklık etkileşimini incelenmiştir.

Çizelge 3.5. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğu üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F
Doz	2	4.858	71.805**
Sıcaklık	3	5.337	78.885**
Doz x Sıcaklık	6	0.437	6.445**
Hata	36	0.068	
Toplam	47		

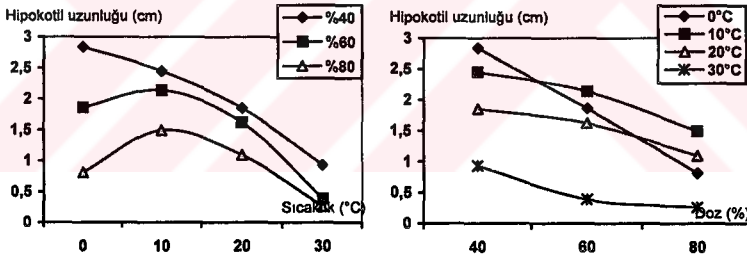
** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.6. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğu üzerine etkisi

Dezenfektan Dozu (%)	Dezenfektan Sıcaklığı (°C)			
	0	10	20	30
40	2.84 a ¹	2.45 b	1.85 c	0.93 d
60	1.86 ab	2.14 a	1.62 b	0.39 c
80	0.81 b	1.49 a	1.09 b	0.26 c

¹Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Ketende en yüksek hipokotil uzunluğu 2.84 cm ile %40'lık dezenfektan dozunun 0°C sıcaklıkta kullanıldığı uygulamadan alınmıştır. En düşük hipokotil uzunluğu ise 0.26 cm ile 30°C'lik sıcaklığa sahip %80'lik dezenfektan dozunun kullanıldığı uygulamadan elde edilmiştir. %40'lık dezenfektan dozu hariç diğer dozlarda en yüksek değerler dezenfektan sıcaklığının 10°C olarak kullanıldığı uygulamalardan alınmıştır. Aynı şekilde bütün sıcaklık uygulamalarında en yüksek değerler dezenfektan dozunun %40 olarak kullanıldığı durumlarda elde edilmiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin hipokotil uzunluğuna etkisi

3 farklı sıcaklıkta (10°C, 20°C ve 30°C) kullanılan %40'lık dezenfektan dozunun keten fidelerinin hipokotil uzunluğu üzerine etkisi Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Artan dezenfektan sıcaklığı hipokotil uzunluğunu önemli derecede düşürmüştür. 10°C'lik dezenfektan sıcaklığında fide uzunluğu normal görünürken, dezenfektan sıcaklığı 30°C'ye çıkarıldığında; fidelerin hipokotil uzunluğunda büyük düşüş görülmüştür.

3.1.4. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu (cm) üzerine etkisi

Farklı dezenfektan dozu ve dezenfektan sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Dezenfektan dozu ve dezenfektan sıcaklığı arasında 0.05 düzeyinde önemli bir ilişkiye rastlanmıştır (Çizelge 3.7). Yapılan varyans analizine ait Duncan gruplandırması Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F
Doz	2	21.480	13.931**
Sıcaklık	3	29.387	19.059**
Doz x Sıcaklık	6	4.346	2.818*
Hata	36	1.542	
Toplam	47		

** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

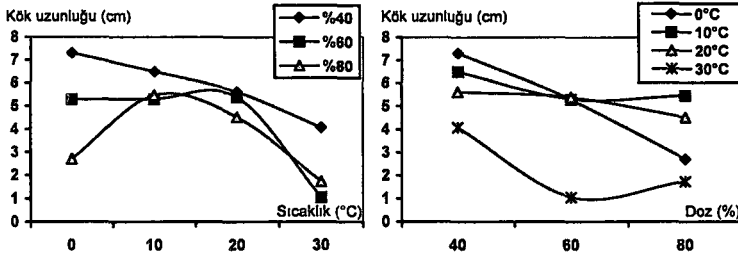
Çizelge 3.8. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğu üzerine etkisi

Dezenfektan Dozu (%)	Dezenfektan Sıcaklığı (°C)			
	0	10	20	30
40	7.30 a ¹	6.49 a	5.61 ab	4.07 b
60	5.28 a	5.30 a	5.39 a	1.05 b
80	2.70 b	5.46 a	4.52 a	1.73 b

¹Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Keten fidelerinde en yüksek kök uzunluğu 7.30 cm ile %40'lık dezenfektan dozunun 0°C sıcaklıkta kullanıldığı uygulamadan alınmıştır. Ancak, yapılan Duncan gruplandırmasına göre, %40'lık dezenfektan dozunun 0°C, 10°C ve 20°C sıcaklıkta kullanıldığı uygulamalardan elde edilen kök uzunlukları aynı gruba girmiştir. Keten fidelerinde en düşük kök uzunluğu ise 1.05 cm ile %60'lık dezenfektan dozunun 30°C olarak kullanıldığı uygulamadan elde edilmiştir. %40'lık dezenfektan dozu hariç diğer dozlarda kök uzunluğuna ait en iyi değerler 10°C'lik dezenfektan sıcaklığından

alanmıştır. Aynı şekilde bütün sıcaklıklarda en iyi sonuçlar dezenfektanın %40'lık dozundan sağlanmıştır (Çizelge 3.8, Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Farklı dezenfektan doz ve sıcaklıklarının keten fidelerinin kök uzunluğuna etkisi

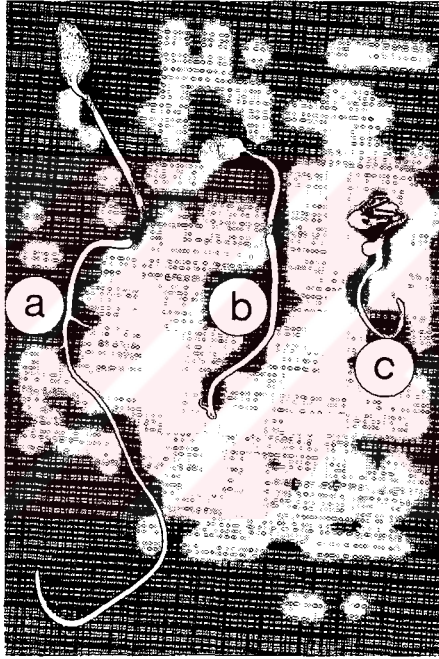
Yüze sterilizasyonu amacıyla 3 farklı sıcaklıkta (10°C, 20°C ve 30°C) kullanılan %40'lık dezenfektan dozunun keten fidelerinin kök uzunluğu üzerine etkisi Şekil 3.5'te verilmiştir. Kök uzunluğu artan dezenfektan sıcaklığında önemli düşüş göstermiştir. 10°C'lik dezenfektan sıcaklığında fidelerin kök uzunluğu normal görünürken, dezenfektan sıcaklığı 30°C'ye çıkarıldığında; kökler yüksek sıcaklıktan fazlaca etkilenmiş ve uzunlukları önemli derecede düşmüştür.

Yüze sterilizasyonunda kullanılan dezenfektan dozu arttıkça, tüm bitkilerde eksplantın olumsuz yönde etkilendiği önceden beri bilinmektedir (Allan 1991, Pierik 1987). İlk yapılan çalışmalarda ketende tohumların yüze sterilizasyonunda kullandığımız en düşük doz olan %40'ta, incelenen bütün karakterlerde en yüksek değerler elde edilmiştir. Ancak, araştırmanın ilerleyen safhalarında tohumların çimlenme oranı aniden %10'un altına düşmüştür. %100'e yakın çimlenme oranına sahip tohumların 4-5 ay gibi kısa bir sürede çimlenme yeteneğini bu denli kaybetmesi çok ekstrem şartlar dışında mümkün olmadığından, bunun nedenleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu amaçla tohum yüze sterilizasyonu yapılırken her adım itina ile kontrol edilmiş, ancak tohum çimlenme oranı yine düşük çıkmıştır. Bundan sonra sorunun araştırıcı hatasından kaynaklanmadığına hükmedilmiş, yüze sterilizasyonu sırasındaki çevresel faktörler incelenmiştir. Sonuçta, yüze sterilizasyonu sırasında tohumların çimlenme oranını etkileyebilecek çevresel faktörün sıcaklık olduğu saptanmıştır. Gerçekten tohumların

çimlenme oranında gözlenen büyük farklılığın nedeni; sterilizasyonda kullanılan dezenfektan sıcaklığının kış ve yaz mevsimlerinde farklı olmasıdır.

Yapılan varyans analizlerinde çimlenme hariç diğer tüm karakterlerde dezenfektan dozu ve sıcaklığı arasında bir interaksiyona rastlanmıştır. Bunun anlamı şudur; tohum yüzey sterilizasyonunda kullanılan dezenfektan dozu kadar, sıcaklığı da tohumdan gelecek fidelerin canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini önemli derecede etkilemektedir. Dezenfektan sıcaklığı yükseldikçe, incelenen karakterlerde meydana gelen düşüşün nedeni; tohum kabuğu geçirgenliğinin artması nedeniyle dezenfektanın tohum içine daha kolay işlemesi ve embriyoya zarar vermesi olarak tahmin edilmektedir. Schull (1920) da yaptığı çalışmada bizim bulgularımızı destekler nitelikte sıcaklık artışının tohum kabuğu geçirgenliğini artırdığını bildirmiştir.

Yürütülen bu çalışmada; %40'lık dezenfektan dozunun 10°C'lik sıcaklıkta kullanılmasıyla yüzey sterilizasyonu başarıyla sağlanmış; aynı zamanda tohum çimlenmesi, fide gelişimi, fidelerin hipokotil ve kök uzunluğu bakımından en yüksek değerler elde edilmiştir.



Şekil 3.5. Farklı sıcaklıklara sahip %40'lık dezenfektanın keten tohumlarının gelişimi üzerine etkisi

- 10°C'lik sıcaklığa sahip dezenfektan tohumda yüzey sterilizasyonunu başarıyla sağlamış, fideler oldukça sağlıklı gelişmiştir.
- Dezenfektan sıcaklığı 20°C'ye çıkarıldığında, fide gelişimi sekete uğramakta, hipokotil ve kök uzunluğu kısalmaktadır.
- Dezenfektan sıcaklığı 30°C olduğunda, fidelerdeki olumsuz etki daha bariz ortaya çıkmaktadır. Fidelerde hipokotil ve kök uzunluğu son derece azaldığı gibi, kotiledonlar da yüksek sıcaklıktaki dezenfektandan olumsuz etkilendiğinden gelişmemiştir.

3.2. Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Tüm gen aktarım tekniklerinin başarısını en fazla etkileyen faktör, gen aktarılacak olan hücre veya dokuların adventif sürgün rejenerasyon kabiliyetidir. Ancak, sürgün rejenerasyon kabiliyeti kullanılan bitkinin genotipi, eksplantın fizyolojik durumu, besin ortamının içeriği, kültür ortamının ışık ve sıcaklık gibi fiziki şartlarından son derece etkilenmektedir. Örneğin, *Solanaceae*, *Begoniaceae*, *Crassulaceae*, *Gesneriaceae* ve *Cruciferae* familyalarına giren çift çenekli bitkiler daha kolay rejenerere olmaktadır. Herhangi bir bitkide gen aktarımından önce o bitki için en uygun adventif sürgün rejenerasyon sisteminin tespit edilmesi gerekir. *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan gen aktarımında, gen aktarımına konu olan sürgünler yaralanan doku üzerinde oluşan kallustan gelişen indirek sürgünlerdir. Bu nedenle toplam sürgün rejenerasyonu içerisinde indirek sürgün rejenerasyonunun artırılması ayrı bir önem taşımaktadır. Bitki elde edilemeden yapılan gen aktarımının hiçbir önemi yoktur. Bu nedenle, gen aktarımı çalışmalarına başlamadan önce yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahip çeşit ve bitki dokularının belirlenmesi gereklidir. Bundan sonra kullanılan dokulardan yüksek adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekir.

Ketende gen aktarımına uygun adventif sürgün rejenerasyonu elde edilebilmesi için eksplant olarak, *in vitro* koşullarda gelişen bitkiciklerden elde edilen hipokotil ve kotiledon kısımları ile sap ve yaprak organları kullanılmıştır.

Hipokotil ve kotiledon kısımları 5 günlük bitkiciklerden izole edilirken, sap ve yaprak organları 10 günlük bitkiciklerden elde edilmiştir. Kotiledon ve yaprak organlarının yaprak sapını (petiol'ü) içeren 1/3'lük taban kısmı atılarak, kalan kısmı rejenerasyon ortamına yerleştirilmiştir. Aynı şekilde, hipokotil ve sap kısımları da 0.50 cm uzunluğunda segmentlere ayrılarak rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır.

Besin ortamındaki büyümeyi düzenleyicilerin en uygun kombinasyonu belirlenirken yerel çeşit kullanılmıştır. Uygun kombinasyonlar belirlendikten sonra da farklı çeşitlerin rejenerasyon kabiliyetleri, belirlenen bu ortamlarda test edilmiştir.

3.2.1. Yerel keten çeşidine ait hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Kültür başlangıcından yaklaşık 10 gün sonra, hipokotil eksplantlarının tamamı kullanılan bütün ortamlarda sıkı yapıda ve yeşil renkte kallus üretmiştir. Yaklaşık 14 gün sonra kalluslar üzerinde indirek ve hipokotil kısımları üzerinde direk adventif sürgün uçları gözlenmiştir. Bu sürgün uçlarından daha sonra adventif sürgünler gelişmiştir.

Yapılan varyans analizi sonucunda bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının toplam sürgün rejenerasyon oranı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde ve indirek sürgün rejenerasyon oranı üzerine etkisi de 0.05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu etki; eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısında 0.01 düzeyinde önemlilik göstermiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli olmuştur (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.10 incelendiğinde, en yüksek toplam sürgün rejenerasyon oranı (%100.00) 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA, 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA, 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IBA ve 2.00 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA; en düşük toplam sürgün rejenerasyon oranı (%55.00) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamından alınmıştır. Eksplant başına en yüksek toplam sürgün sayısı 12.87 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA; en düşük toplam sürgün sayısı ise, 3.28 adet ile 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA ve 3.27 adet ile 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değer (128.70 adet) 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA; en düşük değer (18.04 adet) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren uygulamalardan sağlanmıştır.

İndirek sürgün rejenerasyon oranında en yüksek değer (%67.50) 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA; en düşük değer (%20.00) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren besin ortamından alınmıştır. Eksplant başına en yüksek indirek sürgün sayısı 7.68 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA ve 7.01 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA; en düşük indirek sürgün sayısı ise, 1.83 adet ile 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek

Çizelge 3-9. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Rejenerasyon Oranı (%)						Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)						Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		Toplam		İndirek		Toplam		İndirek		Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)		K.O.	F	K.O.	F
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F						
Ortamlar	11	616.933	4.677**	352.292	2.222*	28.878	4.065**	13.230	4.083**	2322.334	20.314**	46.289	12.744**				
Hata	36	131.904		158.559		7.103		3.240		114.322		3.632					
Toplam	47																

** 0.01 düzeyinde önemli

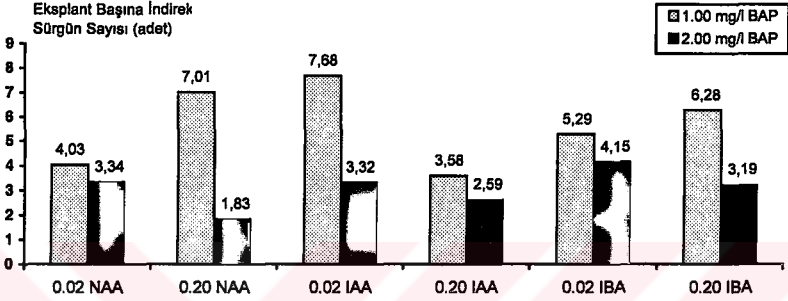
* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 3.10. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi

BAP	BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİ		Kalınlaşma (%)	Toplam Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (adet)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)						
	NAA	IAA		IBA	Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)					
1,00	0,02		100,00	85,00	b ¹	7,37	bed	62,65	32,50	bc	4,03	bed	13,10	0,00	b	0,00	b
1,00	0,20		100,00	100,00	a	8,45	bc	84,50	67,50	a	7,01	a	47,32	0,00	b	0,00	b
1,00		0,02	100,00	100,00	a	12,87	a	128,70	55,00	ab	7,68	a	42,24	0,00	b	0,00	b
1,00		0,20	100,00	87,50	ab	7,50	bed	65,63	47,50	abc	5,58	bed	17,01	0,00	b	0,00	b
1,00		0,02	100,00	95,00	ab	10,24	ab	97,28	37,50	abc	5,29	abc	19,84	0,00	b	0,00	b
1,00		0,20	100,00	100,00	a	6,90	bed	69,00	62,50	ab	6,28	ab	39,25	0,00	b	0,00	b
2,00	0,02		100,00	100,00	a	6,83	bed	68,30	60,00	ab	3,34	cd	20,04	60,00	a	6,03	a
2,00	0,20		100,00	55,00	c	3,28	d	18,04	20,00	c	1,83	d	3,66	62,50	a	7,78	a
2,00		0,02	100,00	92,50	ab	6,63	bed	61,33	65,00	ab	3,32	cd	21,58	47,50	a	7,33	a
2,00		0,20	100,00	80,00	b	3,27	d	26,16	55,00	ab	2,59	cd	14,25	42,50	a	2,90	b
2,00			100,00	92,50	ab	5,76	cd	53,28	65,00	ab	4,15	bed	26,98	52,50	a	6,05	a
2,00		0,20	100,00	95,00	ab	5,41	cd	51,40	55,00	ab	3,19	cd	17,55	40,00	a	6,64	a

¹ Aynı sitede farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

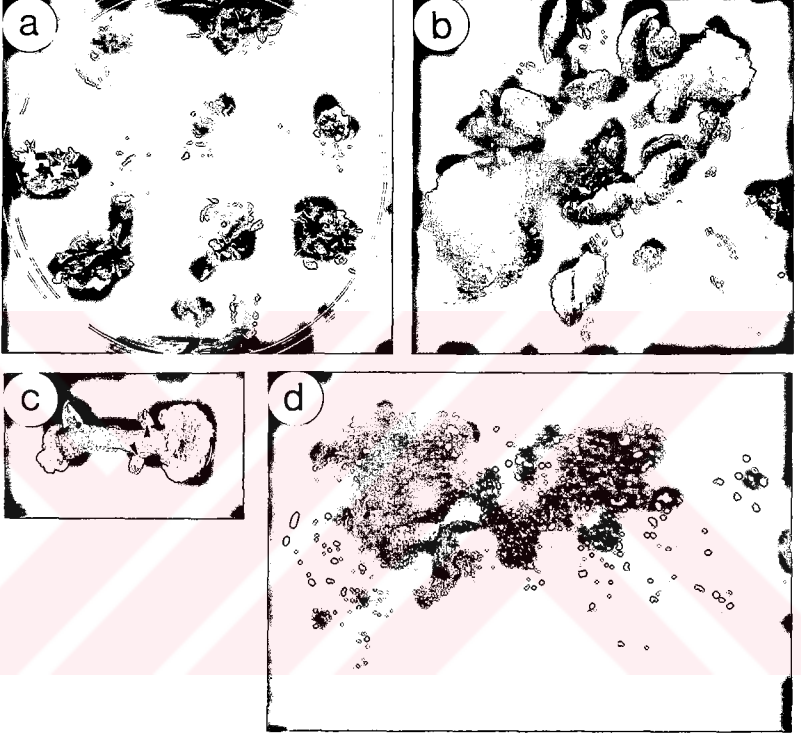
değer (47.32 adet) 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA; en düşük değer (3.66 adet) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA kullanılan uygulamadan sağlanmıştır (Çizelge 3.10). Şekil 3.6'da BAP dozundaki değişime bağlı olarak indirek sürgün sayısında oluşan değişimler gösterilmiştir.



Şekil 3.6. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler

Agrobacterium, yaralanmış dokulardan gelişen hücreleri enfekte ettiğinden, gen aktarımında önemli olan indirek sürgün rejenerasyon oranıdır. Bu açıdan bakıldığında, hipokotil eksplantında indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır (Şekil 3.7). Halbuki, NAA konsantrasyonu aynı kaldığı halde, BAP konsantrasyonu 2.00 mg/l'ye çıkarıldığında, incelenen karakterler bakımından en düşük değerler elde edilmiştir.

BAP dozu 1.00 mg/l'den 2.00 mg/l'ye çıkarıldığında bütün uygulamalarda gerek kök veren eksplant yüzdesi ve gerekse eksplant başına kök sayısı bakımından en yüksek değerler elde edilmiştir.



Şekil 3.7. Yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu

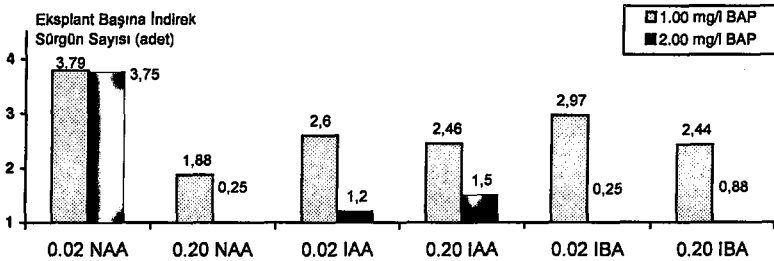
- Petride rejenere olan hipokotil eksplantları
- Hipokotilde direk sürgün rejenerasyonu
- Hipokotil üzerinde direk gelişen sürgünlerin erken safhası ve hipokotilin kesilen uçlarında kallus gelişimi
- Yaralanan yüzeyi artırılmış (epidermisi uzaklaştırılmış) hipokotilde kallus gelişimi ve bu kallus üzerinde indirek sürgün oluşumu

3.2.2. Yerel keten çeşidine ait kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Kotiledon eksplantlarının büyük kısmı kültür başlangıcından 10 gün sonra yeşil renkte kallus oluşturmaya başlamış, 14-16 gün sonra da bu kalluslar üzerinde ileride gelişmiş sürgünleri oluşturacak sürgün uçları gözlenmiştir. Kotiledondan oluşan rejenerasyonun tamamı kallustan gelişmiştir.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve eksplant başına kök sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bununla birlikte, farklı kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin kök veren eksplant yüzdesi üzerine etkisi önemsiz çıkmıştır (Çizelge 3.11).

En yüksek indirek sürgün rejenerasyon oranı (%52.50) 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA; en düşük indirek sürgün rejenerasyon oranı (%2.50) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA ve 2.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Eksplant başına en yüksek indirek sürgün sayısı 3.79 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA ve 3.75 adet ile 2.00 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA içeren besin ortamından alınmıştır. Petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek değer (15.59 adet) 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA; en düşük değer (0.06 adet) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA ve 2.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA kullanılan besin ortamından sağlanmıştır (Çizelge 3.12, Şekil 3.8).



Şekil 3.8. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler

Çizelge 3.1.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)		Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Ortamlar	11	835.399	5.438**	5.911	5.965**	340.452	1.206	115.575	11.185**
Hata	36	153.628		0.911		282.184		10.333	
Toplam	47								

** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.12. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicileri				Kollus (%)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu			Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)		
BAP	NAA	IAA	IBA		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oranı (%)					
1.00	0.02			95.00	32.50	abc	3.79	a ¹	12.32	77.50	6.46	b
1.00	0.20			100.00	17.50	cde	1.88	bcd	3.29	65.00	3.76	b
1.00		0.02		100.00	45.00	ab	2.60	abc	11.70	77.50	6.28	b
1.00		0.20		97.50	25.00	abcd	2.46	abcd	6.15	65.00	6.50	b
1.00			0.02	97.50	52.50	a	2.97	ab	15.59	67.50	4.28	b
1.00			0.20	100.00	22.50	bcd	2.44	abcd	5.49	70.00	6.33	b
2.00	0.02			100.00	5.00	de	3.75	a	1.87	82.50	6.72	b
2.00	0.20			100.00	2.50	e	0.25	e	0.06	95.00	22.65	a
2.00		0.02		100.00	7.50	de	1.20	cde	0.9	87.50	2.95	b
2.00		0.20		100.00	5.00	de	1.50	bcd	0.75	87.50	6.27	b
2.00			0.02	100.00	2.50	e	0.25	e	0.06	80.00	2.51	b
2.00			0.20	100.00	7.50	de	0.88	de	0.66	75.00	2.51	b

¹ Aynı sftunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren besin ortamı, indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı (2.97 adet ile ab grubuna girmiştir) ve petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek değerleri vermiştir (Şekil 3.9).

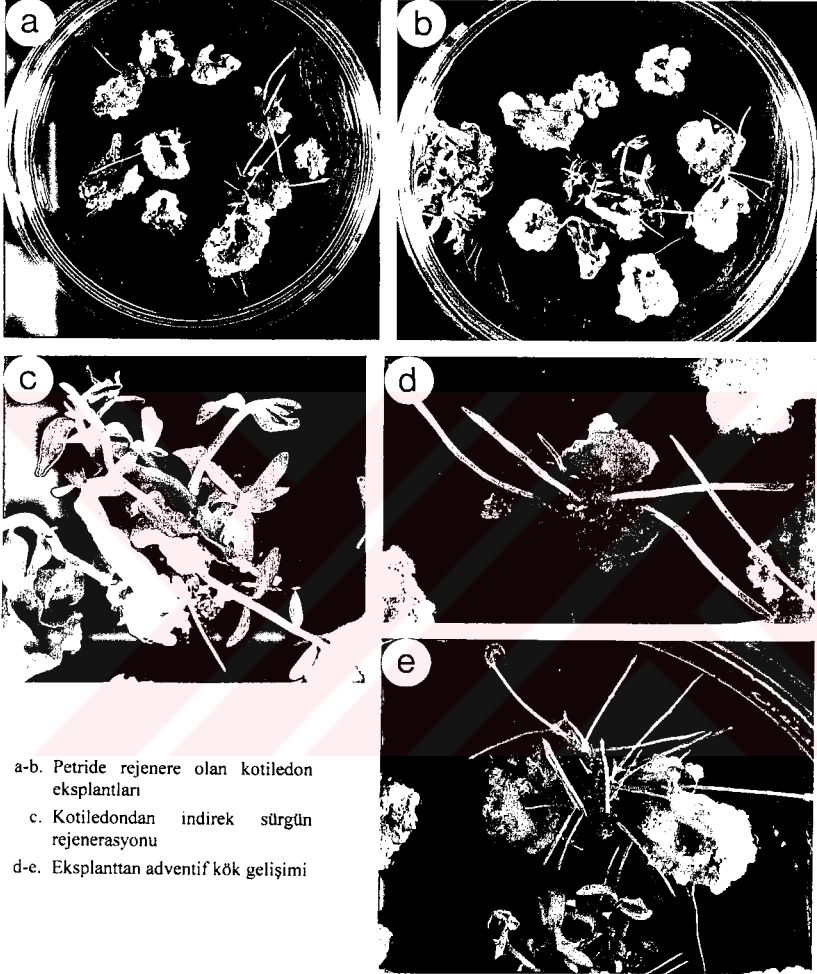
Kotiledon eksplantlarında kök gelişimine bakıldığında, en yüksek değerlerin 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren ortamdan alındığı görülmektedir. Bu ortam, aynı zamanda indirek sürgün rejenerasyon oranı bakımından en düşük değerlerin elde edildiği ortamdır. Hipokotil eksplantları gibi kotiledon eksplantlarında da, kök gelişimi BAP dozunun 2.00 mg/l olduğu uygulamalarda daha yüksek çıkmıştır. Ancak, hipokotil eksplantlarının tersine BAP dozu 1.00 mg/l olarak kullanıldığı uygulamalarda da oldukça yüksek bir kök gelişimi sağlanmıştır. Bir başka deyişle, kotiledon eksplantları adventif kök oluşturma bakımından yüksek bir potansiyele sahiptir (Çizelge 3.12).

3.2.3. Yerel keten çeşidine ait sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Eksplantların kültüre alınmasından 7 gün sonra açık yeşil renkte kallus oluşumu başlamıştır. Kullanılan bütün rejenerasyon ortamlarında sap eksplantlarının tamamında kallus oluşumu gözlenmiştir.

Yapılan varyans analizine göre; bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin sap eksplantlarında toplam ve indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı ile kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 3.13).

Toplam sürgün rejenerasyon oranında en yüksek değer (%92.50) 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA; en düşük değer (%0.00) ise, 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren besin ortamından alınmıştır. Eksplant başına toplam sürgün sayısında en yüksek değer 9.54 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA ve 9.30 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IBA; en düşük değer 0.00 adet ile 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA kullanılan ortamdan elde edilmiştir. Petride toplam sürgün sayısı en yüksek 81.40 adet ile en yüksek rejenerasyon oranının alındığı ortam olan 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA; en düşük 0.00 adet ile yine en düşük rejenerasyon oranına sahip 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA uygulamasından sağlanmıştır (Çizelge 3.14).



a-b. Petride rejenere olan kotiledon eksplantları

c. Kotiledondan indirek sürgün rejenerasyonu

d-e. Eksplanttan adventif kök gelişimi

Şekil 3.9. Yerel keten çeşidinin kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu, adventif sürgün ve kök rejenerasyonu

Çizelge 3.13. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)				Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		Toplam		İndirek		Toplam		İndirek		K.O.	F	K.O.	F
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	11	1430.860	12.350**	362.803	2.934**	36.467	7.394**	24.001	6.397**	1812.598	16.926**	158.634	4.605**
Hata	36	115.863		123.672		4.932	3.752			107.091		34.452	
Toplam	47												

** 0.01 düzeyinde önemli

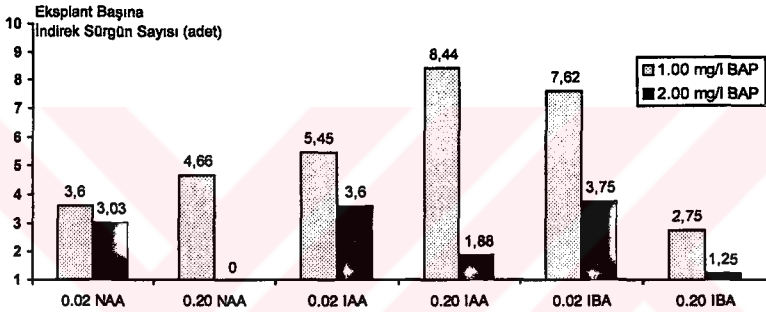
Çizelge 3.14. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicileri			Kallus (%)		Toplam Sürgün Rejenerasyonu		Peçirde Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (adet)		İndirekt Sürgün Rejenerasyonu		Peçirde Gelişen İndirekt Sürgün Sayısı (adet)		Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
BAP	NAA	IAA	IBA	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)
1.00	0.02			45.00	9.54	d ¹	a	17.50	3.60	ab	6.30	5.00	de	1.00	c	
1.00	0.20			70.00	7.59	bed	abc	25.00	4.66	cd	11.65	0.00	e	0.00	c	
1.00		0.02		92.50	8.80	a	ab	20.00	5.45	bc	10.90	15.00	cd	2.90	bc	
1.00		0.20		70.00	7.85	bed	abc	25.00	8.44	a	21.10	2.50	e	0.25	c	
1.00			0.02	72.50	7.71	bed	abc	32.50	7.62	ab	24.76	7.50	de	1.00	c	
1.00			0.20	70.00	9.30	bc	a	7.50	2.75	cd	2.06	7.50	de	0.50	c	
2.00	0.02			50.00	4.31	cd	cde	22.50	3.03	cd	6.81	67.50	a	11.13	b	
2.00	0.20			0.00	0.00	e	f	0.00	0.00	c	0.00	82.50	a	21.72	a	
2.00		0.02		70.00	5.41	bed	bed	25.00	3.60	cd	9.00	30.00	bc	4.59	bc	
2.00		0.20		55.00	2.13	bed	ef	12.50	1.88	def	2.35	32.50	bc	1.73	bc	
2.00			0.02	80.00	6.26	ab	abcd	17.50	3.75	cd	6.56	40.00	b	7.11	bc	
2.00			0.20	60.00	3.56	bed	de	12.50	1.25	ef	1.56	40.00	b	5.48	bc	

¹ Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

İndirek sürgün rejenerasyon oranı en yüksek (%32.50) 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA; en düşük (%0.00) 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren ortamdan alınmıştır.

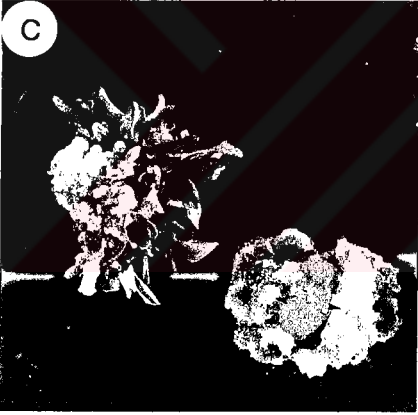
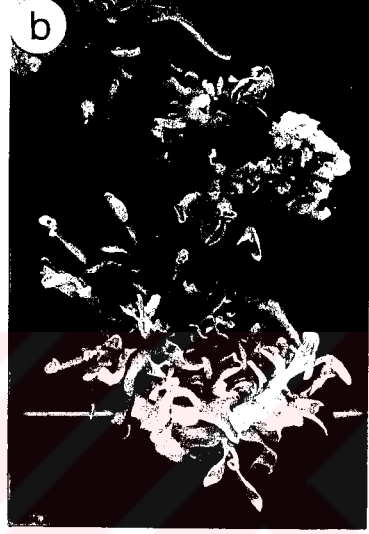
Eksplant başına en yüksek indirek sürgün sayısı 8.44 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA; en düşük indirek sürgün sayısı ise, 0.00 adet ile 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 3.10). Petride gelişen indirek sürgün sayısı en yüksek (24.76 adet) 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA; en düşük (0.00 adet) 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren ortamdan sağlanmıştır (Çizelge 3.14).



Şekil 3.10. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin sap eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler

1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren besin ortamında gen aktarımında önem taşıyan indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı (7.62 adet ile ab grubuna girmiştir) ve petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler alınmıştır (Şekil 3.11). En düşük değerler 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA kullanılan uygulamadan elde edilmiştir (Çizelge 3.14).

Sap eksplantlarından kök gelişimine bakıldığında, kök veren eksplant oranı ve eksplant başına kök sayısı bakımından en yüksek değerlerin tüm uygulamalarda 2.00 mg/l BAP içeren ortamlardan alındığı görülmektedir. BAP dozu 1.00 mg/l olarak kullanıldığı uygulamalarda kök gelişimi son derece azalmıştır. Bir başka deyişle, sap eksplantları aynı hipokotil eksplantları gibi düşük oranda adventif kök oluşturmaktadır.



- a. Petride rejenere olan sap eksplantları
- b. Saptan gelişen sürgünler
- c. Eksplantın kesim yüzeyinde kallus oluşumu ve sürgün gelişimi

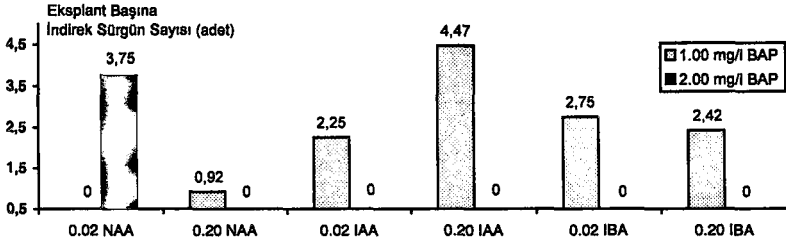
Şekil 3.11. Yerel keten çeşidinin sap eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu

3.2.4. Yerel keten çeşidine ait yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Yaprak eksplantlarında kallus oluşumu kültürden 7 gün sonra başlamış olup, bundan 13 gün sonra da kalluslar üzerinden indirek adventif sürgün uçları belirlemiştir. Yaprak eksplantlarından oluşan rejenerasyonun tamamı kotiledon eksplantındada olduğu gibi kallustan gelişmiştir.

Çizelge 3.15'te bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı, kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

En yüksek indirek sürgün rejenerasyon oranı (%37.50) ve eksplant başına indirek sürgün sayısı 4.27 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA; en düşük sürgün rejenerasyon oranı (%0.00) ve eksplant başına sürgün sayısı 0.00 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA; 0.20 mg/l NAA, 0.02 mg/l ve 0.20 mg/l IAA, 0.02 mg/l ve 0.20 mg/l IBA'nın 2.00 mg/l BAP ile birlikte kullanıldığı ortamlardan alınmıştır. Petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek değer (16.01 adet) yine 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. BAP dozu 2.00 mg/l'ye çıkarıldığında tüm uygulamalarda eksplant başına indirek sürgün sayısında büyük düşüşler olmuştur (Şekil 3.12, Çizelge 3.16).



Şekil 3.12. BAP dozu artışına karşın yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarında indirek sürgün sayısında oluşan değişimler

Çizelge 3.15. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)		Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	11	661.262	5.718**	10.661	12.282**	2386.283	8.353**	80.080	6.350**
Hata	36	115.640		0.868		285.674		12.610	
Toplam	47								

** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.16. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicileri				İndirek Sürgün Rejenerasyonu			Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oran (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)				
BAP	NAA	IAA	IBA	Kallus (%)	Rejenerasyon Oran (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)							
1.00	0.02			100.00	0.00	d ¹	0.00	c	0.00	47.50	bed	2.69	c
1.00	0.20			100.00	10.00	bed	0.92	de	0.92	17.50	d	2.69	c
1.00		0.02		100.00	27.50	ab	2.25	cd	6.18	25.00	d	3.56	bc
1.00		0.20		100.00	37.50	a	4.27	a	16.01	45.00	bed	3.33	c
1.00			0.02	100.00	10.00	bed	2.75	bc	2.75	37.50	cd	4.54	bc
1.00			0.20	100.00	17.50	abc	2.42	bc	4.23	27.50	d	2.12	c
2.00	0.02			100.00	5.00	cd	3.75	ab	1.87	100.00	a	9.18	b
2.00	0.20			100.00	0.00	d	0.00	c	0.00	100.00	a	17.7	a
2.00		0.02		100.00	0.00	d	0.00	c	0.00	35.00	cd	2.38	c
2.00		0.20		100.00	0.00	d	0.00	c	0.00	70.00	bc	4.40	bc
2.00			0.02	100.00	0.00	d	0.00	c	0.00	22.50	d	1.90	c
2.00			0.20	100.00	0.00	d	0.00	c	0.00	80.00	ab	6.21	bc

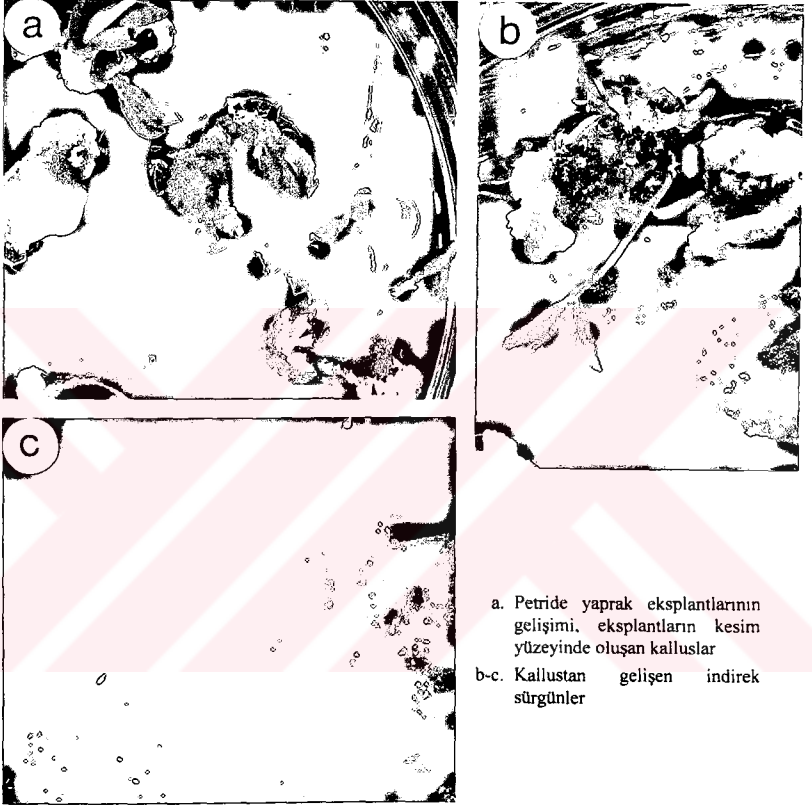
¹ Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Yaprak eksplantlarında kök gelişimine bakıldığında, kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısında en yüksek değerler BAP dozunun 2.00 mg/l olarak kullanıldığı uygulamalardan elde edilmiştir (Şekil 3.13). Yaprak eksplantlarında kotiledon eksplantlarında olduğu gibi, BAP dozu 1.00 mg/l olarak kullanıldığı zaman oldukça yüksek bir kök gelişimi sağlanmıştır. Yani, yaprak eksplantları da aynı kotiledon eksplantları gibi adventif kök oluşturma bakımından yüksek bir potansiyele sahiptir (Çizelge 3.16).

Ketende gen aktarımına uygun en iyi sürgün rejenerasyonu veren eksplantın ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçların özeti Çizelge 3.17'de verilmiştir.

Çizelge incelendiğinde, gen aktarımında önem taşıyan indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçların hipokotil eksplantında ve 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren besin ortamının kullanılmasıyla alındığı görülmektedir. Çalışmamızda bulduğumuz bu sonuçlar ketende daha önce yapılmış araştırma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Jordan ve Mc Hughen 1988a, Jordan ve Mc Hughen 1988b, Mc Hughen vd 1989, Dong ve Mc Hughen 1991, Dong ve Mc Hughen 1993, Millam vd 1992). Xiang-can vd (1989)'nin bildirdiğine göre, ketende kallus gelişimi ve adventif sürgün oluşumu 1.00 mg/l'lik BAP dozunda artmakta, daha yüksek dozlarda ise olumsuz etkilenmektedir. Ketende yaptığımız çalışmada da bu yönde sonuçlar alınmıştır. Millam vd (1992), keten hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine karbonhidratların etkisini araştırdıkları çalışmalarında eksplant başına en yüksek toplam sürgün sayısını 2.4 adet olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, eksplant başına toplam sürgün sayısı 12.87 adet bulunmuş olup, önceki çalışmalardan alınan sonuçların çok üzerinde olmuştur.

İndirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısında en düşük değerler kullanılan eksplantların tümünde 2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu ortamda



a. Petride yaprak eksplantlarının gelişimi, eksplantların kesim yüzeyinde oluşan kalluslar
b-c. Kallustan gelişen indirek sürgünler

Şekil 3.13. Yerel keten çeşidinin yaprak eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu, adventif sürgün ve kök rejenerasyonu

eksplantlar karşılaştırıldığında, yine en yüksek değerlerin hipokotilden alındığı görülmektedir. Bu durum ketende gen aktarımında kullanılabilir en uygun eksplantın hipokotil olduğunu doğrulamaktadır. Bu sonuç Dong ve Mc Hughen 1993, Jordan ve Mc Hughen 1988a, Jordan ve Mc Hughen 1988b, Mc Hughen vd 1989 ve Bretagne vd 1994 tarafından da teyit edilmektedir (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. Yerel keten çeşidinin dört farklı eksplantına ait en yüksek ve en düşük indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı ile bu sonuçların alındığı bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonu

Eksplant	Bitki Büyüme Düzenleyicileri Kombinasyonu	İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)
Hipokotil	1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA	67.50	7.01	47.32
	2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA	20.00	1.83	3.66
Kotiledon	1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA	52.50	2.97	15.59
	2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA	2.50	0.25	0.06
Sap	1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA	32.50	7.62	24.76
	2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA	0.00	0.00	0.00
Yaprak	1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA	37.50	4.27	16.01
	2.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA	0.00	0.00	0.00

Gen aktarımında önem taşımayan adventif kök gelişimi, 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren besin ortamında ve hipokotil eksplantında en düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Ancak, NAA dozu aynı olduğu halde, BAP dozunun 2.00 mg/l'ye çıkarılması tüm eksplantlarda en yüksek adventif kök gelişimine neden olmuş, ancak yine de en düşük kök gelişimi hipokotil eksplantından alınmıştır. Adventif kök oluşumu en fazla kotiledon ve yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir. Ketende bu eksplantların adventif kök oluşturma bakımından yüksek bir potansiyele sahip olduğu Bretagne vd (1994)'nin yapmış oldukları araştırmada da belirtilmiştir. Yine Xiang-can vd (1989) ketende sürgün rejenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, kök gelişimini kotiledonlardan elde etmişlerdir. Aynı şekilde Yıldız vd (1997), şeker pancarında yaptıkları çalışmalarında kotiledon eksplantlarının yüksek oranda kök oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Yerel keten çeşidinin dört farklı eksplantında en yüksek adventif sürgün gelişimini sağlayan bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonu belirlendikten sonra farklı çeşitlere ait dört eksplantın bu ortamlardaki tepkileri belirlenmiştir.

3.2.5. Farklı çeşitlere ait hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Hipokotil eksplantından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında toplam ve indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı, kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı bakımından çeşitler arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 3.18).

En yüksek toplam sürgün rejenerasyon oranı Omega (%97.50) ve Madaras (%95.00); en düşük toplam sürgün rejenerasyon oranı ise, Viking (%10.00) çeşidinden elde edilmiştir. Eksplant başına toplam sürgün sayısı en yüksek 10.24 adet ile Madaras çeşidinden alınmış, bunu 4.91 adet ile Omega çeşidi izlemiştir. En düşük toplam sürgün sayısını 1.63 adet ile yine Viking çeşidi vermiştir. Petride gelişen toplam sürgün sayısında, Madaras (97.28 adet) birinci sırayı almış, bunu Omega (47.87 adet) çeşidi izlemiştir. Petride gelişen en düşük toplam sürgün sayısı (1.63 adet) Viking çeşidinden alınmıştır (Çizelge 3.19).

İndirek sürgün rejenerasyon oranında en yüksek değerleri Omega (%40.00) ve Madaras (%37.50) çeşitleri vermiştir. En düşük indirek sürgün rejenerasyon oranı (%0.00) McGregor çeşidinden alınmıştır. Eksplant başına indirek sürgün sayısında Madaras çeşidi 5.29 adet ile birinci sırayı almıştır. En düşük değer 0.00 adet ile yine McGregor çeşidinden elde edilmiştir. Petride gelişen indirek sürgün sayısına bakıldığında, en yüksek değer (19.83 adet) Madaras çeşidinden elde edilmiş, daha sonra Omega (7.96 adet) çeşidi gelmiştir (Çizelge 3.19).

3.2.6. Farklı çeşitlere ait kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Yapılan varyans analizi sonucunda 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı, kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı bakımından çeşitler arasında 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.18. Farklı keten çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından 1 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)				Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		Toplam		İndirek		Toplam		İndirek		K.O.	F	K.O.	F
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Çeşitler	9	2572.405	10.837**	598.100	3.851**	26.305	8.808**	8.813	8.362**	357.734	5.256**	1.819	12.180**
Hata	30	237.376		155.305		2.986		1.054		68.059		0.149	
Toplam	39												

** 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 3.19. Farklı keten çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi

Çeşitler	Kalites (%)	Toplam Sürgün Rejenerasyonu		Peptide Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (adet)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Peptide Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oran (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)
		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
Fakel	100.00	27.50 cd	3.38 bc	9.29	10.00 bc	1.17 bed	1.17	27.50 a	2.13 a
1886 Sel.	100.00	37.50 cd	1.79 c	6.71	22.50 ab	1.31 bed	2.94	5.00 b	1.00 b
Ariane	100.00	25.00 cd	2.10 bc	5.25	5.00 bc	0.50 cd	0.25	2.50 b	0.25 cd
Viking	100.00	10.00 d	1.63 c	1.63	5.00 bc	0.75 bed	0.37	7.50 b	0.50 bed
Madras	100.00	95.00 a	10.24 a	97.28	37.50 a	5.29 a	19.83	0.00 b	0.00 d
Omega	100.00	97.50 a	4.91 b	47.87	40.00 a	1.99 bc	7.96	0.00 b	0.00 d
McDuff	100.00	22.50 cd	2.58 bc	5.80	17.50 ab	2.25 b	3.93	5.00 b	0.75 bc
Clarec	100.00	85.00 ab	2.84 bc	24.14	17.50 ab	1.12 bed	1.96	0.00 b	0.00 d
McGregor	100.00	57.50 bc	2.35 bc	13.51	0.00 d	0.00 d	0.00	0.00 b	0.00 d
Vene	100.00	22.50 cd	2.60 bc	5.85	12.50 bc	0.75 bed	0.93	2.50 b	0.25 cd

¹ Aynı sitede farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Kullanılan 10 çeşit arasından yalnızca Omega çeşidinde sürgün gelişimi olmuştur. Bu çeşitte indirek sürgün rejenerasyon oranı %7.50, eksplant başına indirek sürgün sayısı 0.63 adet ve petride gelişen indirek sürgün sayısı 0.47 adet olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 3.21).

Kotiledon eksplantlarında kök gelişim potansiyelinin yüksek olduğu farklı çeşitler bazında bir kez daha doğrulanmıştır. Nitekim, kotiledon ve hipokotil eksplantları kök gelişimi bakımından karşılaştırıldığında, hipokotile oranla kotiledon eksplantlarındaki kök gelişiminin çok yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 3.21).

3.2.7. Farklı çeşitlere ait sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında toplam ve indirek sürgün rejenerasyon oranı, kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı bakımından çeşitler arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısında ise, çeşitler arasında önemli bir farka rastlanmamıştır (Çizelge 3.22).

En yüksek toplam sürgün rejenerasyon oranı Madaras (%95.00) ve 1886 Sel. (%92.50); en düşük toplam sürgün rejenerasyon oranı ise, Viking (%25.00) çeşidinden elde edilmiştir. Eksplant başına toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler 9.50 adet ile 1886 Sel., 8.60 adet ile Omega ve 8.00 adet ile Madaras; en düşük değer 4.42 adet ile Viking çeşidinden alınmıştır. Petride gelişen toplam sürgün sayısı en yüksek 1886 Sel. (87.87 adet) çeşidinde gerçekleşmiş, bunu Madaras (76.00 adet) ve Omega (75.25 adet) çeşitleri izlemiştir. Petrideki en düşük toplam sürgün sayısı Viking (11.05 adet) çeşidinden sağlanmıştır (Çizelge 3.23).

İndirek sürgün rejenerasyon oranı en yüksek Madaras (%85.00) ve McGregor (%82.50); en düşük Viking (%7.50) çeşidinden elde edilmiştir. Eksplant başına indirek sürgün sayısında Madaras çeşidi 8.05 adet ile en iyi sonucu vermiş, Viking çeşidi 3.42 adet ile sonuncu olmuştur. Petride gelişen indirek sürgün sayısına bakıldığında, en iyi sonuç (68.42 adet) yine Madaras çeşidinden alınmıştır (Çizelge 3.23).

Çizelge 3.20. Farklı keten çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)		Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Çeşitler	9	76.466	9.000**	0.159	7.280**	2456.351	16.604**	150.140	18.844**
Hata	30	8.496		0.021		147.939		7.968	
Toplam	39								

** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.21. Farklı keten çeşitlerinin kotiledon eksiplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi

Çeşitler	Kalış (%)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Pezide Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksiplant Oranı (%)	Eksiplant Başına Kök Sayısı (adet)
		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksiplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
Fakel	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	25.00 ef	3.83 bcd
1886 Sel.	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	97.50 a	5.47 bc
Ariane	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	10.00 f	0.57 d
Viking	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	20.00 ef	0.81 d
Madaras	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	45.00 de	4.16 bcd
Omega	100.00	7.50 a	0.63 a	0.47	87.50 ab	7.27 b
McDuff	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	22.50 ef	1.66 cd
Clarek	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	77.50 bc	21.40 a
McGregor	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	67.50 cd	3.26 bcd
Vene	100.00	0.00 b	0.00 b	0.00	12.50 f	1.83 cd

¹ Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 3.22. Farklı keten çeşitlerinin sap eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)				Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		Toplam		İndirek		Toplam		İndirek		K.O.	F	K.O.	F
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Çeşitler	9	989.292	4.618**	1178.045	7.185**	7.878	1.478	9.066	1.367	839.634	4.609**	10.783	4.980**
Hata	30	214.219		163.957		5.331		6.633		182.192		2.165	
Toplam	39												

** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.23. Farklı keten çeşitlerinin sap eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi

Çeşitler	Kallus (%)	Toplam Sürgün Rejenerasyonu		Farklı Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Farklı Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)
		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
Fakel	100.00	85.00 ab	7.09	60.26	65.00 ab	7.05	45.82	10.00 cd	3.00 bc
1886 Sel.	100.00	92.50 ab	9.50	87.87	67.50 ab	6.48	43.74	20.00 bc	1.83 cd
Ariane	100.00	65.00 b	6.58	42.77	47.50 b	6.50	30.87	0.00 e	0.00 d
Viking	100.00	25.00 c	4.42	11.05	7.50 c	3.42	2.56	5.00 cd	2.33 bc
Midasas	100.00	95.00 a	8.00	76.00	85.00 a	8.05	68.42	25.00 abc	2.04 cd
Omega	100.00	87.50 ab	8.60	75.25	65.00 ab	5.74	37.31	52.50 ab	6.06 a
McDuff	100.00	82.50 ab	6.52	53.79	70.00 ab	4.69	32.83	12.50 cd	4.58 ab
Clarek	100.00	90.00 ab	7.31	65.79	67.50 ab	6.06	40.90	55.00 a	3.43 bc
McGregor	100.00	92.50 ab	6.29	58.18	82.50 a	3.86	31.84	22.50 abc	2.13 cd
Veme	100.00	67.50 ab	6.45	43.53	47.50 b	7.29	34.62	15.00 cd	2.75 bc

¹ Aynı sitede farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

3.2.8. Farklı çeşitlere ait yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

Keten yaprak eksplantında 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA içeren MS besin ortamında kök veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına kök sayısı bakımından çeşitler arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 3.24).

Kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu bakımından 10 farklı çeşidin karşılaştırıldığı çalışmada, çeşitlerden herhangi bir adventif sürgün gelişimi olmamıştır (Çizelge 3.25).

Çeşitlerin tamamında yüksek oranda adventif kök gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 3.25).

Doku kültürü çalışmalarının en büyük zorluklarından biri; eksplantların alındığı bitkiler arasındaki rejenerasyon kapasitesinin çok değişken olmasıdır. *In vitro* kültürde aynı türe giren çeşitler arasında bile rejenerasyon kapasitesi bakımından büyük farklar ortaya çıkmaktadır. Nitekim, adventif sürgün rejenerasyonu bakımından dört farklı eksplantta 10 keten çeşidinin karşılaştırıldığı çalışmamızda da çeşitler arasında büyük varyasyona rastlanmıştır. Aynı türe giren çeşitler arasında gözlenen bu varyasyonun nedeni araştırmacılar tarafından iki şekilde açıklanmaktadır. Bir kısım araştırmacılar bitkiler arasında rejenerasyon kapasitesi bakımından gözlenen farklılığı bitkilerin farklı genotipte olmaları ile açıklarken, bazı araştırmacılar bu varyasyonu bitkilerin farklı yetiştirme koşulları ve besin maddesine ihtiyaç duymaları ile açıklamaktadırlar. Aslında bireyin fenotipinin oluşmasında genotip ve çevrenin rolü birbirinden bağımsız düşünülemez. Bir başka deyişle, bireyin karakteri genotip-çevre interaksyonu sonucu şekillenir. Dolayısıyla, bitkiler aynı türe dahil olsalar da, farklı genotipte olmalarından dolayı rejenerasyon kapasitesi bakımından aralarında fark olabilmektedir. Ancak, aynı genotipe sahip olan bitkiler arasında da rejenerasyon kapasitesi bakımından fark görülebilmektedir. Burada bitkilerin aynı genotipte olmalarından dolayı rejenerasyon kapasitesini etkileyebilecek tek unsur çevresel faktörlerdir. Aslında doku kültürü çalışmaları laboratuvarında ve son derece kontrollü şartlar altında yapılmaktadır. Fakat *in vitro* kültürde kullanılan eksplant hassasiyeti arttıkça, çevre şartlarından etkilenmesi de o denli artmaktadır. Bir başka deyişle, eksplant hassasiyeti arttıkça, çevre şartlarının kontrollü güçleşmekte, eksplant en ufak çevresel değişimlerden bile aşırı derecede

Çizelge 3.24. Farklı keten çeşitlerinin yaprak eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA içeren MS besin ortamında kök gelişimine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kök Veren Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F
Çeşitler	9	2041.489	8.051**	27.972	6.428**
Hata	30	253.581		4.352	
Toplam	39				

** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 3.25. Farklı keten çeşitlerinin yaprak eksplantlarından 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi

Çeşitler	Kallus (%)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Peptide Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)
		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
Fakel	100.00	0.00	0.00	0.00	87.50 a	6.83 abc
1886 Sel.	100.00	0.00	0.00	0.00	90.00 a	6.65 abc
Ariane	100.00	0.00	0.00	0.00	22.50 b	3.96 cde
Viking	100.00	0.00	0.00	0.00	82.50 a	9.75 a
Madaras	100.00	0.00	0.00	0.00	92.50 a	7.03 abc
Omega	100.00	0.00	0.00	0.00	80.00 a	8.86 ab
McDuff	100.00	0.00	0.00	0.00	75.00 a	5.86 bcd
Clarek	100.00	0.00	0.00	0.00	95.00 a	5.88 bcd
McGregor	100.00	0.00	0.00	0.00	40.00 b	2.92 de
Verne	100.00	0.00	0.00	0.00	15.00 b	1.00 e

¹ Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

etkilenmektedir. Örneğin, çevre şartlarına duyarlılık bakımından tohum ile hipokotil ve polen gibi eksplantlar arasında büyük farklılık vardır. Sıcaklık, ışık vb çevresel faktörlerdeki dalgalanmalardan eksplant olarak kullanılan tohum fazla etkilenmezken, hipokotil ve polen son derece duyarlı olabilmektedir.

Farklı keten çeşitlerinde gen aktarımına uygun en yüksek sürgün rejenerasyonunu veren eksplantın belirlenmesi amacıyla yapılan araştırmada elde edilen sonuçların özeti Çizelge 3.26'da verilmiştir.

Çizelge incelendiğinde, tüm çeşitlerde indirek sürgün rejenerasyonu, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı bakımından en yüksek değerlerin sap eksplantlarından elde edildiği görülmektedir. Ancak, daha önce sürgün rejenerasyonu açısından en iyi eksplantın belirlenmesi amacıyla yerli çeşit ile yapılan denemelerde en yüksek değerler hipokotil eksplantından alınmıştır. Burada bir çelişki ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, gerçekte en iyi rejenere olan eksplant hangisidir? Aslında, doku kültürü çalışmalarında çeşitler arasında büyük varyasyon görülmesi sıklıkla rastlanan ve oldukça normal olan bir durumdur (Hughes 1981, Tomes ve Smith 1985). Fakat, 10 farklı çeşidin tamamında en iyi sonuçların saptan alınması bir rastlantı olamaz. Bu durumda yerel çeşit ile 10 farklı çeşit arasında ortaya çıkan bu varyasyonun nedenini yapılan uygulamada aramak gerekir. Sürgün rejenerasyonu sırasında farklı olarak uygulanan tek şey; yerel çeşit fidelerinin *in vitro*'da çimlendirilen tohumlardan elde edilmesine karşın, 10 farklı çeşide ait fidelerin tarla şartlarında yetiştirilmesidir. Bir başka deyişle, yerel çeşitte kullanılan hipokotil ve sap eksplantları steril fidelerden alınmış ve direk sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Buna rağmen, 10 farklı çeşitte kullanılan hipokotil ve sap eksplantları tarla şartlarında yetiştirilen fidelerin yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması sonucu elde edilmiştir. Öyle ise, 10 farklı çeşitte sürgün rejenerasyonu bakımından en iyi sonuçların sap eksplantından alınmasının nedeni; bu fidelerin steril edilmesi sırasında hipokotil kısımlarının sterilizasyondan olumsuz yönde etkilenmesi ve rejenerasyon kabiliyetini kaybetmesi olarak açıklanabilir. Eğer bu tez doğru ise, çeşitlerin *in vitro*'da yetiştirilen fidelerinden elde edilen hipokotil ve sap eksplantlarının kültüre alınması sonucu incelenen karakterler bakımından en yüksek değerlerin hipokotilden alınması beklenir. Bu tezin doğrulanması amacıyla en

Çizelge 3.26. 10 keten çeşidinin dört farklı eksplantına ait indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı

Çeşitler	İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)				Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)			
	Hipokodfil	Kofitedon	Sap	Yaprak	Hipokodfil	Kofitedon	Sap	Yaprak	Hipokodfil	Kofitedon	Sap	Yaprak
Fakel	10,00	0,00	65,00	0,00	1,17	0,00	7,05	0,00	1,17	0,00	45,82	0,00
1886 Sel.	22,50	0,00	67,50	0,00	1,31	0,00	6,48	0,00	2,94	0,00	43,74	0,00
Ariane	5,00	0,00	47,50	0,00	0,50	0,00	6,50	0,00	0,25	0,00	30,87	0,00
Viking	5,00	0,00	7,50	0,00	0,75	0,00	3,42	0,00	0,37	0,00	2,56	0,00
Madaras	37,50	0,00	85,00	0,00	5,29	0,00	8,05	0,00	19,83	0,00	68,42	0,00
Omega	40,00	7,50	65,00	0,00	1,99	0,63	5,74	0,00	7,96	0,47	37,31	0,00
McDuff	17,50	0,00	70,00	0,00	2,25	0,00	4,69	0,00	3,93	0,00	32,83	0,00
Clarck	17,50	0,00	67,50	0,00	1,12	0,00	6,06	0,00	1,96	0,00	40,90	0,00
McGregor	0,00	0,00	82,50	0,00	0,00	0,00	3,86	0,00	0,00	0,00	31,84	0,00
Verne	12,50	0,00	47,50	0,00	0,75	0,00	7,29	0,00	0,93	0,00	34,62	0,00

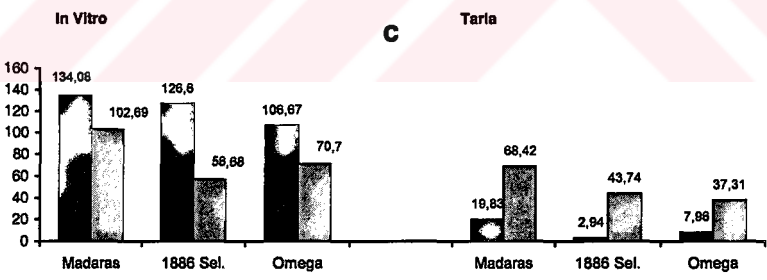
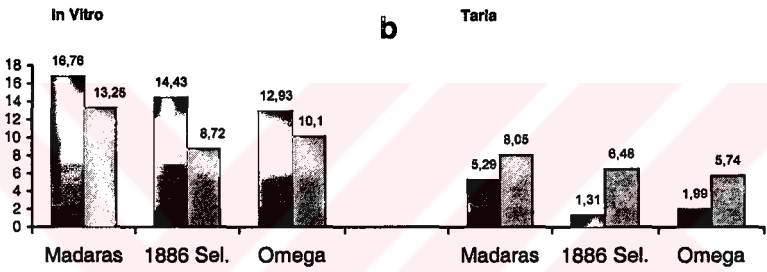
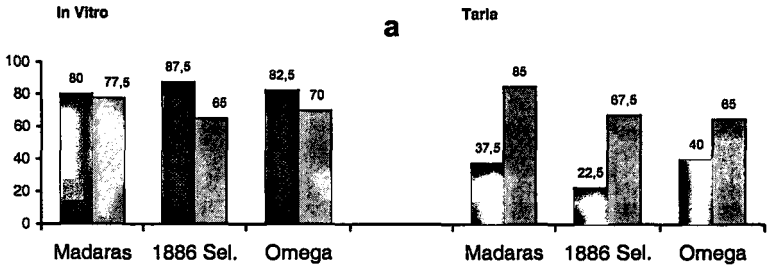
yüksek indirek sürgün rejenerasyon oranına sahip Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerinin *in vitro*'da yetiştirilen fidelerinden alınan hipokotil ve sap eksplantları rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Denemeden alınan sonuçlar Çizelge 3.27'de verilmiştir.

Çizelge 3.27.Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerinin *in vitro*'da yetiştirilen fidelerinden alınan hipokotil ve sap eksplantlarına ait indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayısı

Çeşitler	İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)		Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	
	Hipokotil	Sap	Hipokotil	Sap	Hipokotil	Sap
Madaras	80.00	77.50	16.76	13.25	134.08	102.69
1886 Sel.	87.50	65.00	14.43	8.72	126.26	56.68
Omega	82.50	70.00	12.93	10.10	106.67	70.70

Çizelge incelendiğinde, denemeye alınan üç çeşitte de hipokotil eksplantlarının sap eksplantlarından daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan şöyle bir yorum çıkarmak mümkündür; herhangi bir eksplantın rejenerasyon kabiliyeti, eksplantın alındığı fidenin yetiştirilme şekline göre önemli derecede fark göstermektedir. Steril fidelerden alınan eksplantların rejenerasyon kabiliyeti her zaman steril olmayan fidelerden alınan eksplantlardan daha yüksektir. Şekil 3.14'te Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerinin *in vitro* ve tarla şartlarında yetiştirilen fidelerinden alınan eksplantlarında indirek sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına indirek sürgün sayısı ve petride gelişen indirek sürgün sayıları karşılaştırılmıştır.

Şekil 3.14 incelendiğinde, her üç çeşitte de *in vitro*'da yetiştirilen fidelerden alınan hipokotil ve sap eksplantları, tarlada yetiştirilen fidelerden alınan eksplantlara göre daha yüksek sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar ketende gerçekten en iyi rejenere olan eksplantın hipokotil olduğunu göstermektedir. Tarladan alınan eksplantlarda hipokotilin sapa göre daha düşük sonuçlar vermesinin tek sebebi; sterilizasyondan daha çok etkilenmesidir. Nitekim, Yıldız vd (1997) de şeker pancarında yaptıkları çalışmalarında en iyi sonuçları *in vitro*'da yetiştirilen fidelerden alınan eksplantlardan elde etmişlerdir.



■ Hipokotil ▨ Sap

Şekil 3.14. Madaras, 1886 Sel. ve Omega çeşitlerinin *in vitro* ve tarla şartlarında yetiştirilen fidelerinden alınan eksplantlarında indirek sürgün rejenerasyon oranı (a), eksplant başına indirek sürgün sayısı (b) ve petride gelişen indirek sürgün sayıları (c)

3.2.9. Adventif sürgün rejenerasyonunun artırılması için yapılan diğer çalışmalar

Başarılı bir gen aktarımının ilk şartı; çalışmaya konu olan bitkide gen aktarımına uygun adventif sürgün rejenerasyonu sisteminin optimize edilmesidir (Jordan ve Mc Hughen 1988a, Dong ve Mc Hughen 1993). *In vitro* kültürde kullanılan eksplantlar temelde iki tür sürgün oluşturmaktadır. Bunlardan birisi kullanılan eksplantın yaralanan kısımları hariç diğer dokularından gelişen doğrudan sürgünlerdir. Bir diğer sürgün çeşidi ise, eksplantta yaralanan bölgeden gelişen kallus kümesi üzerinde oluşan indirek sürgünlerdir (Şekil 3.13c). *Agrobacterium*, doğası gereği yaralanan dokuları enfekte edebildiğinden, gen aktarımına konu olan sürgünler; kallus üzerinden gelişen indirek sürgünlerdir. Başarılı bir gen aktarımı için eksplantta gelişen indirek sürgün sayısının artırılması gerekir. Ancak, bu durumda gen aktarılmış sürgünlerin elde edilme olasılığı yükselir. Nitekim, gen aktarım olayında henüz tam anlamıyla açıklanamamış birçok mekanizma rol oynamaktadır. Teoride beklenen gen aktarım başarısı öngörülen bütün şartlar (eksplant başına yüksek indirek sürgün sayısı, uygun bakteri hattının kullanımı vb) sağlansa bile, pratikte alınan sonuçlara uymamaktadır. Bir başka deyişle, gen aktarımını etkileyen mekanizmalar tam anlamıyla açıklanamadığından alınacak sonuçta şans faktörünün büyük rolü vardır.

In vitro şartlarda keten hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ve tam bitki elde edilmesi başarılıdır (Murray vd 1977). Adventif sürgün rejenerasyonunun artırılmasında thidiazuron gibi farklı büyüme düzenleyicileri kullanılmakta ve eksplantların fiziksel şartlarında (yaralanan yüzeyin artırılması gibi) bazı değişiklikler yapılmaktadır. Ketende yaptığımız çalışmada da adventif sürgün ve özellikle de indirek sürgün oluşumunun artırılması amacıyla thidiazuron sitokinini kullanılmış ve eksplantlarda yaralanan yüzey artırılmıştır.

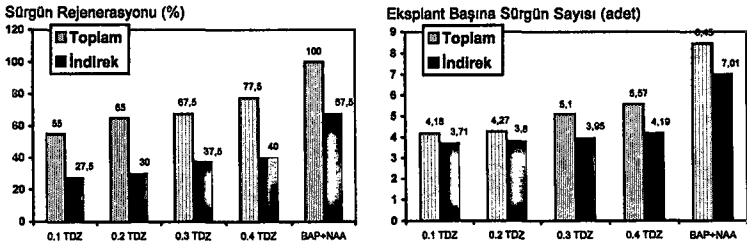
3.2.9.1. Thidiazuron (TDZ)'un yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Thidiazuron (TDZ), *in vitro* kültürde sitokin kaynağı olarak kullanılan bir kimyasal maddedir (Thomas ve Katterman 1986, Hosokawa vd 1996). TDZ, genellikle pamukta yaprak dökücü ilaç olarak kullanılmakla birlikte, bazı bitki türlerinde organogenezis

(Malik ve Saxena 1992) ya da somatik embriyogenezis (Zhou vd 1994) yoluyla hızlı bitki rejenerasyonu sağlamaktadır.

Ketende özellikle gen aktarımına uygun adventif sürgün oluşumunu artırmak için thidiazuron 4 farklı dozda yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarına uygulanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda farklı TDZ dozlarının keten hipokotil eksplantlarında toplam ve indirek sürgün rejenerasyonu ile eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı üzerine etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 3.28).

0.10 mg/l'lik TDZ dozunda gerek toplam ve gerekse indirek sürgün rejenerasyon oranında en düşük değerler alınmıştır. TDZ dozundaki artışa paralel olarak incelenen karakterlerin tamamından elde edilen değerler de artmış ve en yüksek sonuçlar TDZ dozunun en yüksek olduğu 0.40 mg/l'den elde edilmiştir (Şekil 3.15, Çizelge 3.29). Bununla birlikte, en yüksek TDZ dozundan alınan sonuçlar ile daha önce hipokotil eksplantı için tespit edilen bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonundan alınan sonuçlar kıyaslandığında, thidiazuron sitokininin adventif sürgün rejenerasyonunu artırmada yetersiz kaldığı görülmektedir (Şekil 3.15). Bu nedenle ketende adventif sürgün rejenerasyonunun artırılmasında TDZ'dan faydalanmak mümkün olmamıştır. Feijoo ve Iglesias (1998), TDZ'ü BAP ile kıyasladıkları çalışmalarında en iyi sonuçların BAP içeren ortamlardan alındığını bildirmişlerdir. TDZ dozundaki artış adventif sürgün rejenerasyonunu belli bir sınıra kadar artırmakta, bundan sonraki artışlar toksik etki yapmaktadır (Bretagne vd 1994).



Şekil 3.15. Farklı TDZ ve BAP+NAA dozlarının toplam ve indirek sürgün rejenerasyonu ile eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı üzerine etkisi

Çizelge 3.28. Farklı thidiazuron (TDZ) dozlarının yerel çeşidinin hipokotil eksplantiarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
		Toplam		İndirek		Toplam		İndirek	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
TDZ Dozları	3	138.218	0.616	36.771	0.324	1.799	0.758	0.983	0.376
Hata	12	224.307		113.382		2.374		2.616	
Toplam	15								

Çizelge 3.29. Farklı TDZ dozlarının yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve kök gelişimi üzerine etkisi

TDZ Dozları (mg/l)	Kallus (%)	Toplam Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (adet)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)	Kök Veren Eksplant Oranı (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı (adet)
		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
0.10	100.00	55.00	4.18	22.99	27.50	3.71	10.20	0.00	0.00
0.20	100.00	65.00	4.27	27.75	30.00	3.80	11.40	0.00	0.00
0.30	100.00	67.50	5.10	34.42	37.50	3.95	14.81	0.00	0.00
0.40	100.00	77.50	5.57	43.16	40.00	4.19	16.76	0.00	0.00

3.2.9.2. Hipokotil eksplantında epidermisin soyulması (yaralanan yüzeyin artırılması) işleminin adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Hipokotil eksplantlarında rejenerasyon epidermis hücrelerinden gerçekleşmektedir (Murray vd 1977). Ancak, gen aktarımına uygun hücreler eksplantın kesilen uçlarının etrafında oluşmaktadır. Bu nedenle rejenerasyon olan sürgünlerin çoğu gen aktarımına uygun olmayan hücrelerin bulunduğu epidermis dokusundan gelişir. Bu yüzden ketende epidermis hücrelerinin eksplanttan uzaklaştırılmasının yani, eksplantta yaralanan yüzeyin artırılmasının gen aktarımına uygun sürgün rejenerasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Mc Hughen vd 1989, Jordan ve Mc Hughen 1988a, Dong ve Mc Hughen 1991).

Yapılan varyans analizi sonucunda yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarında yaralanan yüzeyin artırılması indirek sürgün rejenerasyonunu önemli derecede artırmıştır. Eksplantta epidermisin soyulması işleminin kallus ağırlığı, indirek sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına indirek sürgün sayısı üzerine etkisi 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 3.30).

Çizelge 3.30. Yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarında epidermisin soyulması işleminin kallus ağırlığı, indirek sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına indirek sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kallus Ağırlığı (g)		İndirek Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)		Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Uygulamalar	1	0.578	6.551*	243.041	6.630*	30.537	11.138*
Hata	6	8.820		36.658		2.742	
Toplam	7						

* 0.05 düzeyinde önemli

Epidermisi soyulmamış eksplantlarda kallus yalnızca yaralanan yüzeyin etrafında geliştiğinden, kallus ağırlığı 0.81 g olarak gerçekleşmiştir. Buna karşın, hipokotilde epidermis uzaklaştırıldığında, eksplantın tamamından kallus gelişmiş ve kallus ağırlığı 1.35 g'a yükselmiştir. İndirek sürgün rejenerasyonu, eksplant başına indirek sürgün

sayısı ve petride gelişen indirek sürgün bakımından en yüksek sonuçlar yine epidermisi soyulmuş eksplantların kullanıldığı uygulamadan alınmıştır. Nitekim, epidermis soyulmadığı zaman 4.24 adet olarak gerçekleşen eksplant başına indirek sürgün sayısı, epidermis soyulduğunda 8.15 adete yükselmiştir (Çizelge 3.31, Şekil 3.16).

Çizelge 3.31. Yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarında epidermisin soyulması işleminin kallus ağırlığı, indirek sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına indirek sürgün sayısı üzerine etkisi

Uygulama	Kallus (%)	Kallus Ağırlığı (g)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)
			Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına İndirek Sürgün Sayısı (adet)	
Epidermisi Soyulmuş	100.00	1.35 a ¹	58.75 a	8.15 a	47.88
Epidermisi Soyulmamış	100.00	0.81 b	40.00 b	4.24 b	16.96

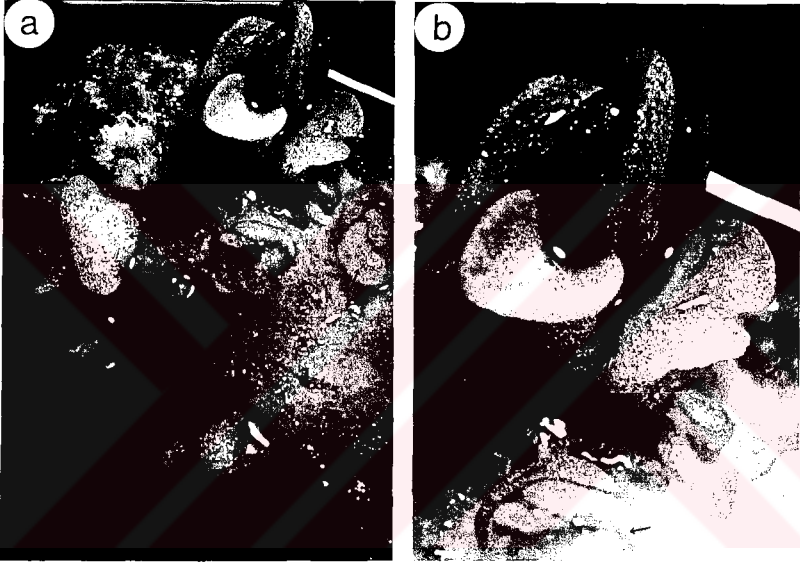
¹ Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Bundan sonraki çalışmalarda keten hipokotil eksplantlarında gen aktarımına uygun sürgün rejenerasyonunun artırılmasında 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonu kullanılmış ve eksplantta epidermis tabakası soyularak yaralanan yüzey ve dolayısıyla kallus miktarı artırılmıştır.

3.3. Augmentin ve Kanamisin Antibiyotiklerinin Keten Hipokotil Eksplantlarının Adventif Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

Augmentin gen aktarımından sonra kültürdeki bakteri gelişimini durdurmak için kullanılan bir antibiyotiktir. Ancak kullanılan antibiyotiklerin eksplantın rejenerasyon kapasitesini nasıl etkilediğinin bilinmesi başarılı bir gen aktarımı için çok önemlidir.

Farklı dozlarda kullanılan augmentin'in yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi Çizelge 3.32'de verilmiştir. Farklı dozlardaki augmentin'in eksplant başına toplam sürgün sayısı üzerine etkisi 0.05 düzeyinde önemli bulunurken, toplam ve indirek sürgün rejenerasyonu ile eksplant başına indirek sürgün sayısı üzerine etkisi önemsiz çıkmıştır.

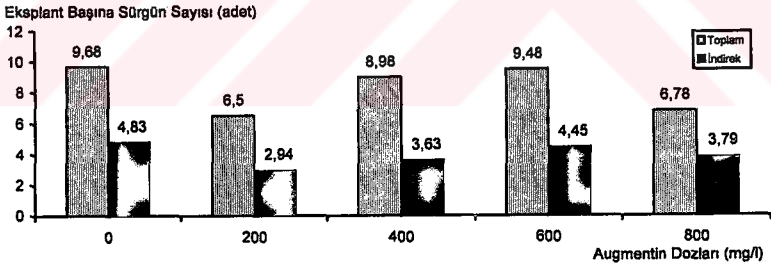


Şekil 3.16. Epidermisi soyulmuş hipokotil eksplantlarında kallus oluşumu ve indirek sürgün rejenerasyonu

Çizelge 3.33 incelendiğinde, eksplant başına toplam sürgün sayısına etki bakımından augmentin'in 0.00 mg/l ve 600.00 mg/l'lik dozları arasında istatistiki olarak bir olmadığı görülmektedir. Aynı durum eksplant başına indirek sürgün rejenerasyonunda da gözlenmektedir. Burada en yüksek değerler augmentin'in kullanılmadığı ortamdan elde edilmiştir. Bir başka deyişle, sürgün rejenerasyonu üzerine augmentin dozlarının herhangi bir olumsuz etkisi olmamış, hatta 600.00 mg/l'lik augmentin dozunda toplam ve indirek sürgün sayısında ikinci en yüksek değerler alınmıştır (Şekil 3.17).

Kanamisin ise gen aktarım çalışmalarında seçici antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Gen aktarılmış hücreler kanamisin antibiyotiğine karşı dayanıklı olmakta ve bu antibiyotiği içeren ortamlarda yalnızca bu hücreler gelişebilmektedir. Bunun dışındaki hücreler yani, gen aktarılmadığı için kanamisine dayanıklı olmayan hücreler bu antibiyotiği içeren ortamlarda ölmektedir. Böylece yaşayabilen hücrelerin %100.00'e yakın bir oranda gen aktarılmış olduğu söylenebilir.

Ketende hipokotil eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine kanamisinin farklı dozlarının (100, 200, 300 ve 400 mg/l) etkisini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada tüm dozlarda eksplantlardan herhangi bir sürgün gelişimi olmamıştır.



Şekil 3.17. Farklı augmentin dozlarının keten hipokotil eksplantlarında eksplant başına toplam ve indirek sürgün sayısı üzerine etkisi

Çizelge 3.32. Farklı augmentin dozlarının 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında yerel keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Rejenerasyon Oranı (%)				Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)			
		Toplam		İndirek		Toplam		İndirek	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Augmentin Dozları	4	127.389	1.433	39.948	0.495	9.107	3.715*	2.183	0.919
Hata	15	88.899		80.670		2.452		2.377	
Toplam	19								

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 3.33. Farklı augmentin dozlarının 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında yerel keten çesidimin hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Augmentin Dozları (mg/l)	Kallus (%)	Toplam Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen Toplam Sürgün Sayısı (adet)	İndirek Sürgün Rejenerasyonu		Petride Gelişen İndirek Sürgün Sayısı (adet)
		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
0.00	100.00	100.00	9.68 a ¹	96.80	40.00	4.83	19.32
200.00	100.00	92.50	6.50 b	60.12	37.50	2.94	11.02
400.00	100.00	100.00	8.98 ab	89.80	47.50	3.63	17.24
600.00	100.00	92.50	9.48 a	87.69	50.00	4.45	22.25
800.00	100.00	97.50	6.78 b	66.10	42.50	3.79	16.10

¹ Aynı sütünde farklı barflerde gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Eksplant üzerinde sürgün uçları belirginleşmişse de, kanamisinin toksik etkisinden dolayı bu sürgünler gelişmemiş, beyazlaşmış ve ölmüşlerdir (Şekil 3.18b, Şekil 3.21b). Bu etki kanamisinin dozundaki artışa paralel olarak şiddetlenmiştir. Bu sonuç Dong ve Mc Hughen (1993) tarafından da doğrulanmaktadır. Hassan vd (1993), kanamisinin bazı bitki türlerini oldukça fazla etkilediğini, hatta transgenik sürgün rejenerasyonunu düşürdüğünü bildirmektedirler.

3.4. Ketende Hızlı Çoğaltım

In vitro teknikleri birçok bitki türünde hızlı çoğaltıma imkân sağlamaktadır (Oblesby 1978). Bütün bitki çoğaltım tekniklerinin amacı; istenen sağlıklı genotiplerin kısa sürede fazla miktarda üretilmesidir. *In vitro*'da kallustan rejenerasyonda somaklonal varyasyon söz konusu olduğu için pratikte bitki çoğaltımında apikal meristemler ve yan tomurcuklar kullanılır (George ve Sherrington 1984, Lindsey ve Jones 1989). Hızlı çoğaltım teknikleri değerli süs bitkilerinin üretiminde ve ticarete konu olan bitkilerin genetik safiyetinin korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Chu 1992, Huetteman ve Preece 1993, Mantell vd 1985, Pierik 1987).

Yapılan varyans analizi sonucu keten yerel çeşidinin koltuk altı meristemlerinden gelişen sürgün sayıları üzerine farklı ortam kombinasyonlarının etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 3.34).

Çizelge 3.34. Farklı ortam kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayıları üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F
Ortamlar	11	5.415	4.261**
Hata	36	1.271	
Toplam	47		

** 0.01 düzeyinde önemli

Ketende koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayıları bakımından en yüksek değerler bütün BAP dozlarında 0.05 mg/l olarak kullanılan NAA uygulamalarından alınmıştır. Bununla birlikte, büyüme düzenleyicileri kombinasyonu dikkate alındığında, en yüksek sürgün sayısının 4.75 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.05 mg/l NAA içeren MS



Şekil 3.18. Kanamisinin keten hipokotil eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

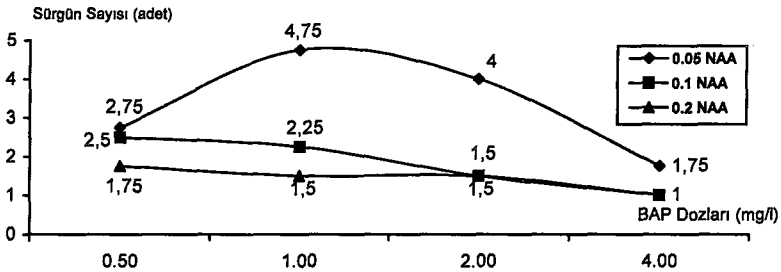
- a. Kanamisin bulunmayan ortamda hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu
- b. Kanamisin nedeniyle gelişemeyen, beyazlaşıp ölen sürgün uçları

ortamından alındığı görülmektedir. BAP dozu 2.00 mg/l'ye çıkarıldığında, 0.05 mg/l'lik NAA dozunda ikinci en yüksek sürgün sayısı (4 adet) elde edilmiştir. Ancak 1.00 mg/l'lik BAP dozunda NAA dozu 0.10 mg/l'ye çıkarıldığında sürgün sayısı hızlı bir düşüş (2.25 adet) göstermiştir. Bu durum ketende hızlı çoğaltımda belirleyici faktörün NAA dozu olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.35, Şekil 3.19).

Çizelge 3.35. Farklı büyüme düzenleyici kombinasyonlarının yerel keten çeşidinin koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayıları üzerine etkisi

Büyüme Düzenleyicileri		Sürgün Sayısı (adet)
BAP	NAA	
0.50	0.05	2.75 bc
0.50	0.10	2.50 bc
0.50	0.20	1.75 c
1.00	0.05	4.75 a
1.00	0.10	2.25 bc
1.00	0.20	1.50 c
2.00	0.05	4.00 ab
2.00	0.10	1.50 c
2.00	0.20	1.50 c
4.00	0.05	1.75 c
4.00	0.10	1.00 c
4.00	0.20	1.00 c

¹ Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir



Şekil 3.19. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarında keten koltukaltı meristemlerinden gelişen sürgün sayılarındaki değişimler

3.5. Rejenere Olan Keten Sürgünlerinin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğunda kesilerek 2.00, 3.00, 4.00 ve 5.00 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmeye alınmıştır. Farklı dozlarda kullanılan IBA'nın sürgün başına kök sayısı ve kök uzunluğu üzerine etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, köklenen sürgün yüzdesi üzerine etkisi önemsiz çıkmıştır (Çizelge 3.36).

Çizelge 3.36. Farklı IBA dozlarının adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Köklenen Sürgün Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
IBA Dozları	3	129.169	0.690	66.290	73.128**	162.469	17.075**
Hata	8	187,068		0.906		9.515	
Toplam	11						

** 0.01 düzeyinde önemli

3.00 mg/l'lik IBA dozunda sürgün başına kök sayısı (14.45 adet) ve kök uzunluğu (22.11 cm) bakımından en yüksek değerler elde edilmiştir (Şekil 3.20). Ancak, IBA dozu 5.00 mg/l'ye çıkarıldığında, gerek sürgün başına kök sayısında ve gerekse kök uzunluğunda en düşük değerler alınmıştır (Çizelge 3.37). Yüksek IBA dozlarında köklerde kalınlaşma ve şekil bozukluğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.37. Farklı IBA dozlarının adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisi

IBA Dozları (mg/l)	Köklenen Sürgün Oranı (%)	Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)	Kök Uzunluğu (cm)
2.00	100.00	13.00 a ¹	19.22 ab
3.00	93.33	14.45 a	22.11 a
4.00	86.67	8.33 b	14.10 b
5.00	100.00	4.11 c	5.33 c

¹ Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

Farklı bitki türlerinin en iyi köklendiği büyüme düzenleyicisi farklı olabilmektedir. Ancak, IBA gelişen sürgünlerin köklendirilmesinde en yaygın kullanılan oksindir (Raghava Swamy vd 1992).



Şekil 3.20. Köklenmiş keten sürgünü

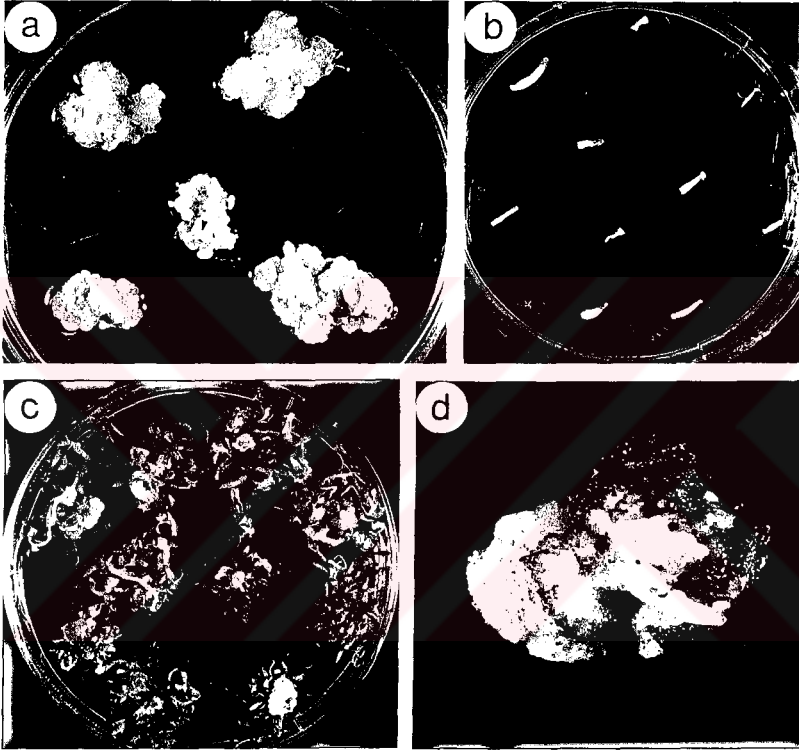
3.6. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Ketene Gen Aktarımı

Ketende 11 farklı çeşidin kullanılmasıyla yapılan çalışmada en yüksek adventif sürgün rejenerasyonu yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil eksplantlarında 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA ve sap eksplantlarında 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir.

Keten bitkisine gen aktarımı için, 2260 p35S GUS-INT, 2260 pAoPR1-GUS-INT ve 2260 AoPR1-NPT-II *Agrobacterium tumefaciens* hatları, yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil ve sap eksplantları ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra eksplantlar ko-kültivasyona alınmış, ko-kültivasyon işlemi tamamlanınca 200.00 mg/l kanamisin ve 500.00 mg/l augmentin içeren ortamda kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonuna bırakılmıştır.

İnokulasyondan yaklaşık 15-20 gün sonra kullanılan her üç bakteri hattında da hem hipokotil, hem de sap eksplantlarında kanamisine dayanıklı yeşil kallus yumaklarının gelişimi başlamış olup, ilerleyen haftalarda gelişen bu kalluslar daha da irileşmiştir (Şekil 3.21a). Öte yandan, bakterilerle inokule edilmeyen kontrol eksplantları kanamisin içeren rejenerasyon ortamında kallus üretememiştir (Şekil 3.21b). İnokule edilmeyen ve kanamisin içermeyen ortamda kültüre alınan eksplantlar üzerinde ise, yüksek oranda kallus ve sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.21c). Kanamisine dayanıklı kalluslar iki haftada bir alt kültüre alınmıştır. 2260 p35S GUS-INT ve 2260 pAoPR1-GUS-INT bakteri hatlarıyla gen aktarımı yapılan eksplantların ürettikleri kalluslar üzerinde histokimyasal GUS analizi yapılmış, analiz sonucunda kallusların büyük bir kısmı GUS pozitif çıkmıştır (Şekil 3.21d). Kullanılan GUS geni bitkisel intron geni içerdiğinden, pozitif sonuçların kallus dokusu içerisinde bulunan bakterilerden gelme ihtimali bulunmamakta ve bu sonuç gerçekten gen aktarıldığını doğrulamaktadır. Bir başka deyişle, gelişen kallusların tamamı transgeniktir. Ancak, transgenik oldukları kanıtlanan bu kalluslardan transgenik sürgünler elde edilememiştir. Transgenik kalluslar henüz tam olarak bilinmeyen bir nedenle rejenere olmamıştır.

Çizelge 3.38'de 2260 p35S GUS-INT, 2260 pAoPR1-GUS-INT ve 2260 AoPR1-NPT-II *Agrobacterium* hatlarıyla inokule edilen yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil



Şekil 3.21. Ketene gen aktarımı

- a. Kanamisine dayanıklı yeşil kallus kümeleri
- b. İnokule edilmeyen eksplantların kanamisin içeren ortamda toksik etki nedeniyle gelişmemesi
- c. Kanamisin içermeyen ortamda inokule edilmeyen eksplantlarda kallus ve sürgün gelişimi
- d. GUS pozitif kalluslar

eksplantlarına ait gen aktarım sonuçları verilmiştir. Kanamisine dayanıklı en yüksek oranda kallus oluşumu yerel çeşitte (%97.50) 2260 AoPR1-NPT-II hattı ile inokule edilen eksplantlardan alınırken, Madaras çeşidinde (%94.90) 2260 p35S GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlardan elde edilmiştir. GUS pozitif kallus üretimi bakımından en yüksek değerler yerel çeşitte (%92.00) 2260 pAoPR1-GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlardan alınırken, Madaras çeşidinde GUS genini içeren her iki bakteri hattı da aynı oranda (%80.00) GUS pozitif kallus üretimine neden olmuştur.

Her iki çeşitte de hipokotil eksplantlarından yüksek oranda kanamisine dayanıklı kallus elde edildiği halde, bu kalluslardan kanamisine dayanıklı sürgünler gelişmemiştir. Kültür başlangıcında sürgün gelişimi olmuşsa da, bunlar transgenik olmadıklarından ilerleyen safhalarda kanamisinin toksik etkisi nedeniyle beyazlaşmış ve ölmüşlerdir.

Çizelge 3.38. Farklı *Agrobacterium* hatlarıyla yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil eksplantlarına gen aktarımı

Çeşitler	Bakteri Hatları	Kanamisine Dayanıklı Kallus Oluşumu (%)	GUS Pozitif Kallus (%)	Sürgün Rejenerasyonu Oranı (%)
Yerel Çeşit	2260 p35S GUS-INT	95.40	88.00	---
	2260 pAoPR1-GUS-INT	94.50	92.00	---
	2260 AoPR1-NPT-II	97.50	---	---
Madaras	2260 p35S GUS-INT	94.90	80.00	---
	2260 pAoPR1-GUS-INT	92.60	80.00	---
	2260 AoPR1-NPT-II	93.40	---	---

Yerel ve Madaras çeşitlerinin sap eksplantlarından elde edilen gen aktarım sonuçları Çizelge 3.39'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, kanamisine dayanıklı kallus oluşumu bakımından en yüksek değerler yerel çeşitte %95.00 ile 2260 pAoPR1-GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlardan, Madaras çeşidinde ise %90.40 ile yine aynı bakteri hattı ile inokule edilen eksplantlardan alınmıştır.

En yüksek GUS pozitif kallus üretimi yerel (%80.00) ve Madaras (%90.00) çeşitlerinin her ikisinde de 2260 pAoPR1-GUS-INT bakteri hattından elde edilmiştir. İki çeşitte de hipokotil eksplantlarında olduğu gibi, sap eksplantlarında da yüksek oranda kanamisine dayanıklı kallus üretilmesine rağmen, transgenik sürgün elde edilememiştir.

Çizelge 3.39. Farklı *Agrobacterium* hatlarıyla yerel ve Madaras çeşitlerinin sap eksplantlarına gen aktarımı

Çeşitler	Bakteri Hatları	Kanamisine Dayanıklı Kallus Oluşumu (%)	GUS Pozitif Kallus (%)	Sürgün Rejenerasyonu Oranı (%)
Yerel Çeşit	2260 p35S GUS-INT	93.70	70.00	---
	2260 pAoPR1-GUS-INT	95.00	80.00	---
	2260 AoPR1-NPT-II	90.00	---	---
Madaras	2260 p35S GUS-INT	90.00	80.00	---
	2260 pAoPR1-GUS-INT	90.40	90.00	---
	2260 AoPR1-NPT-II	81.30	---	---

Günümüzde tarımsal açıdan önem taşıyan bazı genler *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak çeşitli bitki türlerine aktarılmıştır (Horsch vd 1985, Hinchee vd 1988, Jordan ve Mc Hughen 1988a, Greenplate ve Fischhoff 1990). Ancak, transgenik bitkilerin rejenerasyonu tütün ve patates gibi *Solanaceae* familyasına ait bitkiler dışında oldukça zordur. Bu nedenle diğer bitki türlerinde inokulasyon öncesi eksplantların fiziksel şartlarının ayarlanmasıyla hücrelerin gen aktarımına karşı olan yeteneğinin artırılmasına çalışılır. Bu amaçla gen aktarılmış bitki elde edebilmek için eksplantta yaralanan yüzeyin artırılması (Jordan ve Mc Hughen 1988a), eksplantların inokulasyondan önce kültüre alınması (Mc Hughen vd 1989, Thomas vd 1989) ya da ko-kültivasyon süresinin uzatılması (Jia vd 1989) önerilmektedir.

Her ne kadar kolza, keten, bezelye ve çilek gibi bazı türlerde etkili rejenerasyon yöntemi geliştirilmiş ve eksplantlar *Agrobacterium*'a karşı hassas olsalar da, transgenik bitki üretimi çok zordur. Transgenik bitki üretiminin artırılması için eksplantta gen aktarılan hücre miktarının ve bu hücrelerden bitki rejenerasyon oranının artırılması gerekmektedir.

Araştırmamızda yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil ve sap eksplantları üç farklı bakteri hattı ile inoküle edilmiş, inokulasyondan 5 hafta sonra eksplantlardan yüksek oranlarda kanamisine dayanıklı transgenik kallus üretimi gerçekleşmiştir. Ancak, yapılan yoğun çalışmalara rağmen, bu transgenik kalluslardan transgenik bitkilerin elde edilmesi mümkün olmamıştır. Benzer şekilde, Jordan ve Mc Hughen (1988b) keten

hipokotil eksplantlarından her ne kadar transgenik kallus üretilse de, bu kallustan transgenik sürgünlerin elde edilmesinin çok zor olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, Dong ve Mc Hughen (1993), p35S GUS-INT plazmidini taşıyan GV2260 *A.tumefaciens* hattını kullanarak 37 adet transgenik keten bitkisi elde etmeyi başarmışlardır. Bu bitkilerin histokimyasal GUS analizleri sonucunda, gövde ve yapraklarında yüksek oranlarda GUS aktivitesi gözlenmiştir. Ayrıca, bu araştırmacılar hipokotil eksplantlarında yaralanan yüzeyin artırılması, inokulasyondan önce eksplantların kültüre alınması ve ko-kültivasyon süresinin uzatılmasının transgenik bitki oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Thomas vd (1989), havuçta transgenik bitki elde edebilmek için hipokotil eksplantlarının bakteri ile inokulasyondan önce iki gün süreyle kültüre alınması gerektiğini bildirmişlerdir. Yine, ko-kültivasyon süresinin uzaması kavun kotiledon eksplantlarında gen aktarımını önemli derecede artırmıştır (Dong vd 1991).

Çalışmamızda, kanamisine dayanıklı kallus dokularından neden sürgün elde edilemediğinin açıklaması oldukça zor olmasına karşın, genotip farklılığı, kullanılan kanamisin ve augmentin antibiyotiklerinin sürgün gelişimini engellemiş olabileceği tahmin edilmektedir. Değişik araştırmacılar tarafından önerilen eksplantta yaralanan yüzeyin artırılması, inokulasyondan önce eksplantların kültüre alınması ve ko-kültivasyon süresinin uzatılması gibi işlemler araştırmamızda da uygulanmış, sonuçta transgenik kallus üretimi ve bu kalluslardan gelişen sürgün sayısı önemli derecede arttığı halde, bu sürgünler bir süre sonra beyazlaşarak ölmüş ve transgenik bitki elde edilememiştir.

Özcan vd (1993) ve Firek vd (1993) AoPR1 promotörünün, bitkilere gen aktarımında kullanılan seçici markör genleri etkili bir şekilde kontrol edebildiğini göstermişlerdir. AoPR1 promotörü ilk önce raportör GUS geninin önüne klonlanarak tütün bitkilerine aktarılmıştır. Bu çalışmada, AoPR1 promotörünün gen aktarımında hedef seçilen bitki hücrelerinde kuvvetli aktivite gösterirken, gelişen transgenik bitkilerin yaprak, gövde ve köklerinde son derece düşük miktarlarda veya hiç aktivite göstermediği ortaya konmuştur. Daha sonra AoPR1 promotörü NPT-II markör geninin önüne klonlanıp, elde edilen bu markör genle çok sayıda transgenik tütün ve patates bitkileri üretilmiştir. Ancak, bizim çalışmamızda AoPR1-NPT-II markör geni ile ketende yüksek oranda

kanamisine dayanıklı kallus elde edilirken, bu kalluslardan sürgün gelişimi sağlanamamıştır. Aynı sonuçlar NOS-NPT-II markör geni kullanıldığında da alınmıştır. Yine, AoPR1-GUS ve 35S-GUS genini taşıyan kalluslarda da yüksek oranlarda GUS aktivitesi gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize AoPR1 promotörünün *Lineceae* familyasından olan keten bitkisinde NOS ve CaMV 35S promötörleri kadar aktif olduğunu ve çalışmalarımıza devam ettiğimiz taktirde AoPR1-NPT-II markör geni kullanılarak transgenik keten bitkileri üretebileceğimizi göstermektedir.

4. SONUÇ

Eksplantta yüzey sterilizasyonu doku kültürü çalışmalarının ilk adımını oluşturur. Sterilizasyonda amaç; eksplantın rejenerasyon kapasitesini düşürmeden yüzeyinde bulunan mikroorganizmaların yok edilmesidir. Bunun için başarılı sonucun alındığı en düşük dezenfektan dozunun tespit edilmesi gerekmektedir. Yüksek dozlarda kullanılan dezenfektan eksplantın rejenerasyon kapasitesini önemli derecede düşürmektedir. Bu da, ileriki çalışmalarda başarının düşmesi anlamına gelmektedir. Keten tohumlarının yüzey sterilizasyonu aşamasında %40'lık dezenfektan dozunun 10°C sıcaklıkta kullanıldığı durumlarda eksplantın rejenerasyon kapasitesinde herhangi bir azalma olmamıştır.

Gen aktarımının başarısını belirleyen en önemli faktör; gen aktarılabilecek dokuların adventif sürgün rejenerasyon kabiliyetidir. Projede, *A.tumefaciens* ile gen aktarımına geçmeden önce değişik eksplantlar ve çok sayıda çeşit kullanılarak gen aktarımına uygun yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesine çalışılmıştır. Çalışmalarda hipokotil, kotiledon, sap ve yaprak olmak üzere 4 farklı eksplant ile 5 tanesi liflik (Fakel, 1886 Sel., Ariane, Viking ve Madaras) ve 6 tanesi yağlık (Yerel çeşit, Omega, McDuff, Clark, McGregor ve Verne) olmak üzere toplam 11 keten çeşidine ait adventif sürgün rejenerasyon kabiliyeti, değişik oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarında test edilmiştir.

Ketende *in vitro*'da yetiştirilen fidelerden alınan eksplantlar arasında en yüksek sürgün rejenerasyonunu hipokotil vermiştir. Ancak, tarladan alınan ve yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra kullanılan eksplantlar arasında en iyi sonuç saptan alınmıştır. Bu durumda eksplantın rejenerasyon kabiliyetinin, eksplantın alındığı fidenin yetiştirilme şekline göre önemli derecede fark gösterebildiği ortaya çıkmaktadır. Steril fidelerden alınan eksplantların rejenerasyon kabiliyeti her zaman steril olmayan fidelerden alınan eksplantlardan daha yüksektir.

Yerel çeşidin hipokotil eksplantlarında en yüksek indirek sürgün rejenerasyonu (%67.50) ve eksplant başına indirek sürgün sayısı (7.01 adet) 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Aynı ortamda test edilen 10 çeşidin hipokotilleri

kültüre alındığında ise en yüksek adventif sürgün rejenerasyon kabiliyetine sahip olan çeşitler Madaras, Omega ve 1886 Sel. olarak tespit edilmiştir.

Yerel çeşide ait kotiledon eksplantlarından gelişen sürgünlerin tamamı indirek yolla kallustan gelişmiş olup, en yüksek rejenerasyon oranı %52.50 ve eksplant başına sürgün sayısı 2.97 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren besin ortamında gerçekleşmiştir. Ayrıca, kotiledon eksplantlarından oldukça fazla miktarda istenmeyen kök teşekkülü de gözlenmiştir. Çeşitler dikkate alındığında, sadece Omega'nın kotiledonlarından sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir.

Sap eksplantlarında aynı hipokotil eksplantlarında olduğu gibi kullanılan besin ortamlarında yüksek oranlarda direk ve indirek sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. İndirek sürgün rejenerasyon değerleri dikkate alındığında, yerel keten çeşidinde en iyi sonuçlar 1.00 mg/l BAP+0.02 mg/l IBA içeren ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamda indirek sürgün rejenerasyon oranı %32.50, eksplant başına indirek sürgün sayısı da 7.62 adet olmuştur. Sap eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu bakımından Madaras, Omega ve 1886 Sel. çeşitleri diğer çeşitlerden daha üstün bulunmuştur.

Yaprak eksplantları da kotiledon eksplantlarına benzer şekilde yalnız indirek sürgün oluşturmuşlardır. Yerel çeşitte en yüksek adventif sürgün rejenerasyon oranı %37.50 ve eksplant başına sürgün sayısı 4.27 adet ile 1.00 mg/l BAP+0.20 mg/l IAA içeren ortamdan alınmıştır. Diğer çeşitlerin yaprak eksplantlarından herhangi bir sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir.

Yapılan rejenerasyon çalışmaları neticesinde en yüksek indirek adventif sürgün rejenerasyonu yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil (1.00 mg/l BAP+0.20 NAA mg/l içeren ortamda) ve sap eksplantlarından (1.00 mg/l BAP+0.02 IBA içeren ortamda) gerçekleşmiştir. Bu yüzden, 2260 p35S GUS-INT, 2260 pAoPR1-GUS-INT ve 2260 AoPR1-NPT-II *Agrobacterium tumefaciens* hatları ile yerel ve Madaras çeşitlerinin hipokotil ve sap eksplantları inokule edilmiştir. İnokulasyona alınan üç bakteri hattı da 200.00 mg/l kanamisin içeren rejenerasyon ortamında hem hipokotil, hem de sap eksplantlarından %90.00 civarında kanamisine dayanıklı kallus oluşumuna yol açmıştır. Histokimyasal GUS analizi sonucunda da bu kallusların önemli bir bölümünde GUS

aktivitesi gözlenmiş ve böylece bu kallusların transgenik oldukları ispatlanmıştır. Ancak, her üç bakteri hattı tarafından üretilen kanamisine dayanıklı kalluslardan tüm çabalara rağmen transgenik sürgünlerin elde edilmesi mümkün olmamıştır. Öte yandan, AoPR1-NPT-II markör genini taşıyan bakteri hattı tarafından yüksek oranlarda kanamisine dayanıklı kallusların üretilmesi ve 2260 pAoPR1-GUS-INT bakteri hattının üretmiş olduğu kallusların önemli bir kısmının da GUS pozitif olması, AoPR1 promotörünün *Lineaceae* familyasından olan ketende de aktif olarak işlev yaptığını göstermiştir. AoPR1-NPT-II markör geni kullanılarak transgenik keten bitkilerinin üretilmesi için ise daha detaylı çalışmalara ve zamana ihtiyaç duyulmaktadır.

5. YARARLANILAN KAYNAKLAR

- Abel, P.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Allan, A. 1991. Plant Cell Culture In: "Plant Cell and Tissue Culture". Stafford, A. and Warren, G. (eds.), Open University Press, UK.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. Handbook of Plant Cell Culture, Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (eds.), Vol.1, Macmillan, New York, 82-123.
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. Plant Tissue and Cell Culture, Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. and Biesboer, D.D. (eds.), Alan R Liss, New York, 57-81.
- Arslan, N. 1986. Patates tohumluğunda ve çeşitlerin muhafazasında doku kültüründen yararlanma imkanları. Türkiye'de Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Simpozyumu, TÜBİTAK, Yayın No:612, 563-573, Ankara.
- Barakat, M.N. and Cocking , E.C. 1983. Plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Linum usitatissimum* L. (flax). *Plant Cell Rep.* 2: 314-317.
- Barnabas, B., Pfahler, P.L. and Kovacs, G. 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.* 81: 675-678.
- Basiran, N., Armitage, P., Scott, R.J. and Draper, J. 1987. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*): regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Reports* 6: 396-399.
- Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A. and Harrison, B.D. 1986. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* 321: 446-449.

- Bellini, C., Chupeau, M.C., Guerche, P., Vastra, G. and Chupeau, Y. 1989. Transformation of *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum* mesophyll protoplasts by electroporation. *Plant Sci.* 65: 63-75.
- Bevan, M. and Chilton, M.-D. 1982. Multiple transcripts of T-DNA detected in nopaline crown gall tumors. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 539.
- Bevan, M., Flavell, R.B. and Chilton, M.-D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 185-187.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam, 287-312.
- Binns, A.N. and Thomashow, M.F. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 575-606.
- Bomhoff, G., Klapwijk, P.M., Kester, H.C.M., Schilperoort, R.A., Hernalsteens, J.P. and Schell, J. 1976. Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 145: 177-181.
- Bretagne, B., Chupeau, M.C., Chupeau, Y. and Fouilloux, G. 1994. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Rep.* 14: 120-124.
- Bryant, J. and Leather, S. 1992. Removal of selectable marker genes from transgenic plants: needless sophistication or social necessity? *Trends Biotechnol.* 10: 274-275.
- Butcher, S.M., Deroles, S.C. and Ledger, S.E. 1990. Transformation of *Geranium*. *New Zealand Genetical Society, 36th Annual Meeting, Abstract 95.*
- Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inze, D., Van Haute, E., Van Montagu, M., Schell, J. and Zambryski, P. 1983. Introduction of genetic material into plant cells, *Science* 222: 815-821.

- Carlson, P.S. and Polacco, J.C. 1975. Plant cell cultures. *Genetic Aspects of Crop Improvement Sci.* 188: 622-625.
- Catlin, D., Ochoa, O., McCormick, S. and Quiros, C.F. 1988. Celery transformation by *Agrobacterium tumefaciens*: cytological and genetic analysis of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 7: 100-103.
- Chan, M.T., Lee, T.M. and Chang, H.H. 1992. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol.* 33: 577-583.
- Chilton, M.-D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P. and Quetier, F. 1980. *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 4060-4064.
- Christie, P.J., Ward, J.E., Winans, S.C. and Nester, E.W. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* VirE product is a single stranded DNA binding protein that associates with T-strands. *J. Bact.* 170: 2659-2667.
- Chu, I.Y.E. 1992. Perspectives of micropropagation industry. *Transplant Production Systems*, Kurata, K. and Kozai, T. (eds.), Kluwer Academic, Amsterdam, 137-150.
- Chupeau, M.-C., Bellini, C., Guerche, P., Maisonneuve, B., Vastra, G. and Chupeau, Y. 1989. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. *Bio/Technology* 7: 503-508.
- Cocking, E.C. 1960. A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-963.
- Collins, G.C. 1977. Production and utilization of anther-derived haploids in crop plants. *Crop Sci.* 17: 583-586.
- Conner, A.J., Williams, M.K., Deroles, S.C. and Gardner, R.C. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of asparagus. In: McWhirter, K.S., Downes, R.W. and

- Reid, B.J. (eds.), Ninth Australian Plant Breeding Conference, Proceedings. Agricultural Research Institute, Wagna Wagna, 131-132.
- Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W.R., Thompson, G., Rose, R.E. and Stalker, D.M. 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurinum* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
- Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C. and Shewmaker, C.K. 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics* 202: 179-185.
- De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N.R., Thompson, C., Van Montagu, M. and Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518.
- De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disk transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 767-774.
- De Cleene, M. and De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review* 42: 389-466.
- De Greef, W., Delon, R., De Block, M., Leemans, J. and Botterman, J. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Bio/Technology* 7: 61-64.
- De Greve, H., Decraemer, H., Seurinck, J., Van Montagu, M. and Schell, J. 1981. The functional organization of the octopine *A.tumefaciens* plasmid pTiB6S3. *Plasmid* 6: 235-248.
- De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M. Van Montagu, M. and Schell, J. 1983. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octapine synthase gene. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499.

- De Halluin, K., Botterman, J. and De Greef, W. 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop. Sci.* 30: 866-871.
- De Halluin, K., Bossut, M., Bonne, E., Mazur, B., Leemans, J. and Botterman, J. 1992. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/Tech.* 10: 309-314.
- Delannay, X., Lavallee, B.J., Proksch, R.K., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Dodson, R.B., Augustine, J.J., Layton, J.G. and Fischhoff, D.A. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology* 7: 1265-1269.
- Dong, J.Z. and Mc Hughen, A. 1991. Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 10: 555-560.
- Dong, J.Z. and Mc Hughen, A. 1993. An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 88: 61-71.
- Dong, J.Z., Yang, M.Z., Jia, S.R. and Chua, N.H. 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio/Technology* 9: 858-863.
- Donn, G., Dirks, R., Eckes, P. and Uijtewall, B. 1990. Transfer and expression of a modified ppt-acetyltransferase gene from *S.viridochromogenes* in tomato, melon, carrot, lettuce and strawberry. 7th IAPIC Congress, Amsterdam, Netherlands.
- Douglas C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A. and Nester, E.W. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bact.* 161: 850-860.

- Draper, J., Scott, R. and Hamil, J. 1988. Transformation of Dicotyledonous Plant Cells Using the Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri Plasmid of *A. rhizogenes*. In: Plant Genetic Transformation and Gene Expression; A Laboratory Manual, 71-160, Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. (eds.), Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Draper, J., Scott, R., Kumar, A. and Dury, G. 1988. Transformation of Plant Cells by DNA-mediated Gene Transfer, In: Plant Genetic Transformation and Gene Expression; A Laboratory manual, 161-198, Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dunwell, J.M. 1985. Embryogenesis from pollen *in vitro*. Biotechnology in Plant Science, Zaitlin, M., Day, P. and Hollaender, A. (eds.), Academic Press, Orlando FL, 49-76.
- Dunwell, J.M. 1986. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications, Withers, L.A. and Alderson, P.G. (eds.), Butterworths, New York, 375-404.
- Eichholtz, D.A., Rogers, S.G., Horsh, R.B., Klee, H.J. and Hayford, M. 1987. Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. *Somat. Cell. Mol. Genet* 13: 67-76.
- Er, C. ve Canpolat, N. 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara.
- Evans, D.A. and Reed, S.M. 1981. Cytogenetic techniques. Plant Tissue Culture, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York.
- Everett, N.P., Robinson, K.E.P. and Mascarenhas, D. 1987. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus*). *Bio/Technology* 5: 1201-1204.
- Fang, G. and Grumet, R. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of musk melon plants. *Plant Cell Reports* 9: 160-164.

- Feijoo, M.C. and Iglesias, I. 1998. Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. Subsp. *Aurantiaca* Lainz, Using *In Vitro* Culture. *Plant Tiss. Cult. And Biotech.* 4: 87-94.
- Finer, J.J. 1994. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Culture-A Practical Approach*, Dixon, R.A. and Gonzales, R.A. (eds.), Oxford University Press, Oxford, 67-102.
- Firek, S., Özcan, S., Warner, S. A. J., Draper, J. 1993. A wound-induced promoter driving npt-II expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic plants, *Plant Mol. Biol.*, 22, 129-142.
- Firoozabady, E., DeBoer, D.L., Merlo, D.J., Halk, E.L., Amerson, L.N., Rashka, K.E. and Murray, E.E. 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneratin of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 10: 105-116.
- Flavell, R.B., Dart, E., Funchs, R.L. and Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology* 10: 141-142.
- Freeman, J. 1988. An evaluation of procedures and markers for plant transformation, Doktora, University of Nottingham.
- Fromm, M.E., Taylor, L.P. and Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793.
- Fry, J., Barnason, A. and Horsch, R.B. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Reports* 6: 321-325.
- Galiba, G. and Erdei, L.S. 1986. Dependence of wheat callus growth differentiation and mineral content on carbohydrate supply. *Plant Sci.* 45: 65-70.
- Gamborg, O.L. and Shyluk, J.P. 1976. Tissue culture, protoplasts, and morphogenesis in flax. *Botanical Gazette* 137: 301-306.

- Gamborg, O.L. and Shyluk, J.P. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue cultures. *Plant Tissue Culture*, Thorpe, T.A. (ed.), Acad.Pres, New York.
- Gasser, C.S. and Fraley, R.T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 224: 1293-1299.
- George, E.F. and Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Basingstoke, Exegetics Ltd., Westbury.
- Gerlach, W.L., Llewellyn, D. and Hasloff, J. 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* 328: 802-805.
- Gould, J., Devery, M., Hasegawa, O., Ulian, E.C., Peterson, G. and Smith, R.H. 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.* 95: 426-434.
- Greenplate, J.T. and Fischhoff, D.A. 1990. Insect resistance cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.
- Groose, R.W. and Bingham, E.T. 1984. Variation in plants regenerated from tissue culture of tetraploid alfalfa heterozygous for several traits. *Crop Sci.* 24: 655-658.
- Guerche, P., Charbonnier, M., Jouanin, L., Tourneur, C., Paszkowski, J. and Pelletier, G. 1987. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. *Plant Sci.* 52: 11-116.
- Guri, A. and Sink, K.C. 1988. *Agrobacterium* transformation of eggplant. *Journal of Plant Physiology* 133: 52-55.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W. and Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.

- Handro, W. 1981. Mutagenesis and *in vitro* selection. Plant Tissue Culture, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York, 155-180.
- Harrison, B.D., Mayo, M.A. and Baulcombe, D.C. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. Nature 328: 799-802.
- Hassan, M.A., Swartz, H.J., Inamine, G. and Mullineaux, P. 1993. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several Rubus genotypes and recovery of transformed plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 9-17.
- Hartmann, H.T., Kester, T.T. and Davies, T.T. 1990. Plant Propagation, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Hatipoğlu, R. 1995. Biyoteknolojiye Giriş. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı No:129, Adana.
- Haughn, G.W., Smith, J., Mazur, B. and Somerville, C. 1988. Transformation with a mutant Arobidopsis acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurca herbicides. Mol. Gen. Genet. 211: 266-271.
- Herrera-Estrella, A., Van Montagu, M. and Wang, K. 1990. A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* VirD2 protein directs a β -galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 9534-9537.
- Hess, D. 1975. Genetic manipulation of higher plants. Plant Research and Development 2: 56-66.
- Hildebrandt, A.C. and Riker, A.. 1949. The influence of various carbon components on the growth of marigold, paris daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue *in vitro*. Amer. J. Bot. 36: 74-85.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. and Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 330: 160-163.

- Hinchee, M.A., Conner-Ward, D.V., Newell, C.A., McDonnell, R.E., Sato, S.J., Grasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B., Fraley, R.T. and Horsch, R.B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6: 915-922.
- Hooykaas, P.J.J., Hofker, M., Den Dulk-Ras, H. And Schilperoort, R.A. 1984. A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a napoline Ti plasmid, and an Ri plasmid by complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* mutants. *Plasmid* 11: 195-205.
- Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1984. The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. In: *Advances in Genetics 22. Molecular Genetics of Plants*, 209-283, Scandalios, J.G. and Caspari, E.W. (eds.).
- Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38.
- Horn, M.E., Shillito, R.D., Conger, B.V. and Harms, C.T. 1988. Transgenic plants of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7: 469-472.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Hosokawa, K., Nakano, M., Oikawa, Y. and Yamamura, S. 1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. *Plant Cell Rep.* 15: 578-581.
- Howard, A.E., Zupan, J.R. and Zambryski, P. 1992. The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* 68: 109-118.

- Hu, C.Y. and Wang, P.J. 1986. Embryo culture: technique and application. Handbook of Plant Cell Cultures, Evans, D.A., Sharp, W.R. and Ammirato, P.B. (eds.), Vol.4, Macmillan, New York, 43-94.
- Huetteman, C.A. and Preece, J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 33: 105-119.
- Hughes, K.W. 1981. Ornamental Species, pp 5-50. In: Cloning Agricultural Plants Via *In Vitro* Techniques, Conger, B.V. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- James, D.J., Passay, A.J., Barbara, D.J. and Bevan, M. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* 7: 658-661.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Jen, G.C. and Chilton, M.-D. 1986. The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border in promoting T-DNA transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3895-3899.
- Jensen, J.S., Marcker, K.A., Otten, L. and Schell, J. 1986. Nodule specific expression of a chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321: 669-674.
- Jia, S.R., Yang, M.Z., Ott, R. and Chua, N.H. 1989. High frequency transformation of *Kalanchoe laciniata*. *Plant Cell Rep.* 8: 336-340.
- Joos, H., Inze, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M. and Schell, J. 1983. Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline grown galls. *Cell* 32: 1057-1067.
- Jordan, M.C. and Mc Hughen, A. 1988a. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 7: 281-284.

- Jordan, M.C. and Mc Hughen, A. 1988b. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Rep.* 7: 285-287.
- Kado, C.I. 1991. Molecular mechanism of crown gall tumorigenesis, *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 1-32.
- Kahn, V. 1975. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *J. Sci. Food Agric.* 26: 1319-1324.
- Kartha, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation-methods and applications. *Plant Tissue Culture*, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York.
- Kasha, K.J., Ziauddin, A. and Cho, U.H. 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. *Gene Manipulation in Plant Improvement II*, Gustafson, J.P. (ed.), Plenum Press, New York, 213-235.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. And Sanford, J.C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
- Klein, T.M., Goff, S.A., Roth, B.A. and From, M.E. 1990. Applications of Particle Gun in Plant Biotechnology, *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Nijkamp, H.J.J., Van Der Plas, L.H.W., Van Aartrijk, J. (eds.), Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M. and Evola, S. V. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-199.
- Krens, F.H., Melondijk, L., Wullems, G.J. and Schilperoot, R.A. 1982. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti plasmid. *Nature* 296: 72-74.

- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Lee, K.Y., Townsend, J., Block, M., Churi, C.F., Majur, B., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J. 1988. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. *EMBO J.* 7: 1241-1248.
- Leemans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu, M. And Schell, J. 1982. Broad host range cloning vectors derived from the W-plasmid *Sa. Gene* 19: 361-364.
- Lemmers, M., DeBeuckeleer, M., Holster, M., Zambryski, P. and Depickers, A. 1980. Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in napoline crown gall tumors. *J.Mol.Biol.* 144: 353-376.
- Leroux, B., Yanofsky, M.F., Winans, S.C., Ward, J.E., Ziegler, S.F. and Nester, E.W. 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J.* 6: 849-856.
- Lindsey, K. and Jones, M.G.K. 1987. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cell of sugar beet. *Plant Molecular Biology* 10: 43-52.
- Lindsey, K., Jones, M.G.K. and Fish, N. 1988. Direct gene transfer into plant protoplasts, *New Nucleic Acid Techniques*, 519-536, Walker, J.M. (ed.), Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Lindsey, K. and Jones, G.K. 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*. Chapter 4, Current Applications of Plant Cell and Tissue Culture, Open University Press, 57-78.
- Lindsey, K. and Jones, G.K. 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*. Chapter 5, Consequences of Tissue Culture-Variability and Instability, Open University Press, 94-127.

- Liu, C.M. 1981. *In vitro* methods applied to sugar cane improvement. Plant Tissue Culture, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York, 299-324.
- Lörz, H., Baker, B. and Schell, J. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. Molecular and General Genetics 199: 178-182.
- Malik, K.A. and Saxena, P.K. 1992. Thidiazuron induces high-frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea, chickpea, and lentil. Aust. J. Plant Physiol. 19: 731-740.
- Mantell, S.H., Matthews, J.A. and McKee, R.A. 1985. Principles of Plant Biotechnology. Blackwell Scientific Pub., Boston, 130-157.
- Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B. 1990. Introduction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature 347: 737-741.
- Marks, G.E. 1973. Selecting *Asparagus* plants as sources of haploids. Euphytica 22: 310-316.
- Mathews, V.H. and Narayanaswamy, S. 1976. Phytohormone control of regeneration in cultured tissues of flax. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 80: 436-442.
- Mayo, O. 1980. The Theory of Plant Breeding. Science Publications, Oxford, 190-196.
- McGranahan, G.H., Leslie, C.A., Uratsu, S.L., Martin, L.A. and Dandekar, A.M. 1988. *Agrobacterium* mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. Bio/Technology 6: 800-804.
- Mc Hughen, A., Jordan, M. and Feist, G. 1989. A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. J. Plant Physiol. 135: 245-248.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J. and Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology 6: 923-926.

- Melchers, L.S. and Hooykaas, P.J.J. 1987. Virulence of *Agrobacterium*. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Mifflin, B.J. (ed.). Oxford University Press 4: 167-220.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A. and Williams, E.G. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations, Bhojwani, S.S. (ed.), Elsevier, Amsterdam, 67-102.
- Messens, E., Lenaerts, A., Van Montagu, M. and Hedges, R.W. 1985. Genetic basis for opine secretion from crown gall tumour cells, Mol. Gen. Genet. 199: 344-348.
- Michelmore, R., Marsh, E., Seeley, S. and Landry, B. 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 6: 439-442.
- Millam, S., Davidson, D. And Powell, W. 1992. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 163-166.
- Miyazaki, S. and Tashiro, Y. 1987. Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium* Ramet III: Variation in chromosome number and flower color of plants regenerated from different parts of shoots *in vitro*. Agric. Bull. Saga. Univ. 44: 13-31.
- Mol, J.N.M., Van Der Krol, A.R., Van Tunen, A.J., Van Blokland, R., De Lange, P. and Stuitje, A.R. 1990. Regulation of plant gene expression by antisense RNA. FBS Lett. 268: 427-430.
- Mooney, P.A., Goodwin, P.B., Dennis, E.S. and Llewellyn, D.J. 1991. *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 25: 209-218.
- Mullineaux, P. M. 1992. Genetically Engineered Plants for Herbicide Resistance. Plant Genetic Manipulation for Crop Protection, 75-108, Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. and Boulter, D. (eds.), C.A.B International, Oxon, UK.

- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K. and Thompson, C. J. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 205: 42-50.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murray, B.E., Handyside, R.J. and Keller, W.A. 1977. *In vitro* regeneration of shoots on stem explants of haploid and diploid flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 177-186.
- Nehra, N.S., Chibbar, R.N., Kartha, K.K., Datla, R.S., Crosby, W.L. and Stushnoff, C. 1990. *Agrobacterium* mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 9: 10-13.
- Nester, E.W. and Gordon, M. 1988. Early events in the transformation of higher plants by *Agrobacterium*. *Physiology and Biochemistry of Plant-Microbial Interactions*, 1-10, Keen, N.T., Kosuge, T. and Walling, L.L. (eds.), The American Society of Plant Physiologists.
- Neuhaus, G. and Spangenberg, G. 1990. Plant transformation by microinjection techniques. *Physi. Plan.* 79: 213-217.
- Nichterlein, K. and Friedt, W. 1993. Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Rep.* 12: 426-430.
- Nichterlein, K., Umbach, H. and Friedt, W. 1989. Investigation on androgenesis in breeding of linseed (*Linum usitatissimum* L.). XII. Eucarpia Congress, 13-25.
- Nickell, L.G. and Marezki, A. 1970. The utilization of sugar and starch as carbon sources by sugarcane cell suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* 11: 183-185.

- Nicoli, M.C., Elizalde, B.E., Pitotti, A. and Lericci, C.R. 1991. Effect of sugars and Millard reaction products on polyphenoloxidase and peroxidase activity in food. *Food & Nutrition Press*. 15(3): 169-184.
- Oblesby, R.P. 1978. Tissue Culture of Ornamentals and Flowers: Problems and Perspectives. In: *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*, Hughes, K.W.S., Henke, R. and Constantin, M. (eds.), U.S. Dept. Energy, Washington, D.C.
- Okada, K., Takebe, I. and Nagata, T. 1986. Expression and integration of genes introduced into highly synchronised plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 205: 398-403.
- Ou-Lee, T.M., Turgeon, R. and Wu, R. 1986. Expression of a foreign gene linked to either a plant virus or a *Drosophila* promoter after electroporation of protoplasts of rice, wheat and sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 83: 6815-6819.
- Özcan, S. 1993. Tissue Culture in Pea and Engineering a Marker Gene for Specific Expression in Target Cells for Plant Transformation (Doktora Tezi), Leicester Üniversitesi, UK.
- Özcan, S., Firek, S. and Draper, J. 1993. Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation. *Bio/Technology*, 11: 218-221.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi*, 1: 69-95.
- Özcan, S., Sevimay, C.S., Yıldız, M., Sancak, C. and Özgen, M. 1996. Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Plant Cell Rep.* 16: 200-203.
- Peferoen, M. 1992. Engineering of Insect-resistant Plants with *Bacillus thuringiensis*. *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, 135-153, Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. and Boulter, D. (eds.), C.A.B International, Oxon, UK.

- Peralta, E.G., Hellmiss, R. and Ream, W. 1986. Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A.tumefaciens* tumour-inducing plasmid. EMBO J. 5: 1137-1142.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 183-230.
- Pizzocaro, F., Torreggiani, D. And Gilardi, G. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. Food and Nutrition Press 17(1): 21-30.
- Potrykus, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment, Bio/Technology 8: 535-542.
- Puonti-Kaerlas, J., Eriksson, T. and Engstrom, P. 1990. Production of transgenic pea (*Pisum sativum*) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. Theoretical and Applied Genetics 80: 246-252.
- Raghava Swamy, B.V., Himabindu, K. and Lakshmi Sita, G. 1992. *In vitro* micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). Plant Cell Rep. 11: 126-131
- Rashid, A. 1988. Cell Physiology and Genetics of Higher Plants. Vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1-38, 67-103.
- Ream, W. 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 583-618.
- Reich, T.J., Iyer, V.N. and Miki, B.L. 1986. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti-plasmids. Bio/Technology 4: 1001-1004.
- Rhodes, C.A., Pierce, D.A., Mettler, I.J., Mascarenhas, D. and Detmer, J.J. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. Science 240: 204-207.

- Rybczyński, J.J. 1975. Callus formation and organogenesis of mature cotyledons of *Linum usitatissimum* L. var. Szokijiskij *in vitro* culture. *Genetica Polonica* 16: 161-165.
- Sangwan, R.S., Docrocq, C. and Sangwan-Norreel, B.S. 1991. Effect of culture conditions on *Agrobacterium*-mediated transformation in *Datura*. *Plant Cell Rep.* 10: 90-93.
- Schell, J. and Van Montagu, M. 1983. The plasmids as natural and as practical gene vectors for plants. *Bio/Technology* 1: 75.
- Schull, W. 1920. Temperature and rate of moisture intake in seeds. *Botan. Gaz.* 69: 361.
- Scott, R.J. and Draper, J. 1987. Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells: a useful model system for gene expression studies in plants. *Plant Molecular Biology* 8: 265-274.
- Shahin, E.A. and Yashar, M. 1986. Transformation of cabbage by a binary vector in *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Crucifer Genetics Workshop III Proceedings*. University of Guelph, Canada.
- Shahin, E.A., Spielmann, A., Sukhapinda, K., Simpson, R.B. and Yashar, M. 1986. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Science* 26: 1235-1239.
- Shillito, R.D., Saul, M.W., Paskowski, J., Müller, M. and Potrykus, I. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3: 1099-1033.
- Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. and Fujimoto, H. 1989. Fertile transgenic plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Siebel, J. and Pauls, K.P. 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 473-479.
- Slack, S.A. 1980. Pathogen-free plants by meristem-tip culture. *Plant Dis.* 64: 15-17.

- Slightom, J.L., Jouanin, L., Leach, F., Drong, R.F. and Tepfer, D. 1985. Isolation and identification of T₁-DNA/plant junctions in *Convolvulus arvensis* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. EMBO J. 4: 3069-3077.
- Smith, E.F. and Townsend, C.O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. Science 25: 671-673.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Stachel, S.E. and Nester, E. 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 5: 1445-1454.
- Stachel, S. E. and Zambryski, P. 1986a. VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A.tumefaciens*. Cell 46: 325-333.
- Stachel, S.E. and Zambryski, P. 1986b. *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. Cell 47: 155-157.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318: 624-629.
- Stalker, D.M., McBride, K.E. and Malyj, L.D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. Science 242: 419-422.
- Strickland, S.G., Nichol, J.W., McCall, C.M. and Stuart, D.A. 1987. Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. Plant Sci. 48: 113-121.
- Sun, H. and Fu, W. 1981. Investigation of pollen plants in flax (*Linum usitatissimum* L.) and preliminary observation on performance of their progenies. Acta Genet. Sinica 8: 369-374.

- Tempé, J. and Goldmann, A. 1982. Occurrence and Biosynthesis of Opines, Molecular Biology of Plant Tumors, Kahl, G. and Schell, J. (eds.), Academic Press, New York.
- Tempé, J. and Casse-Delbart, F. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, 25-49, Academic Press, London.
- Thomashow, M.F., Nutter, R., Montoya, A.C., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1980. Integration and organization of the Ti plasmid sequences in crown gall tumors. Cell 19: 729-739.
- Thomas, J.C. and Katterman, F.R. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. Plant Physiol. 81: 681-683.
- Thomas, J.C., Gultinan, M.J., Bustos, S., Thomas, T. and Nessler, C. 1989. Carrot (*Daucus carota*) hypocotyls transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 8: 354-357.
- Tomes, D.T. and Smith, O.S. 1985. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. Theoretical and Applied Genetics 70: 505-509.
- Toro, N., Datta, A., Carmi, O.A., Young, C., Prusti, R.K. and Nester, E.W. 1989. The *Agrobacterium tumefaciens* VirC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. J. Bacteriol. 171: 6845-6849.
- Trulson, A., Simpson, R. and Shahin, E. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. Theoretical and Applied Genetics 73: 11-15.
- Van Haaren, M.J.J., Sedee, N.J.A., Schilperoort, R.A. and Hooykaas, P.J.J. 1987. Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. Nucl. Acids Res. 15: 8983-8997.

- Vasil, I.K. 1976. The progress, problems and prospects of plant protoplast research. *Advances in Agronomy* 28: 119-160.
- Vasil, I.K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereals and grass crops. *J.Plant Physiol.* 128: 193-218.
- Vuke, T.M. and Mott, R.L. 1987. Growth of loblolly pine callus on a variety of carbohydrate sources. *Plant Cell Rep.* 6: 153-156.
- Waldron, C., Murphy, E.B., Roberts, J.L., Gustafson, G.D., Armour, S. and Malcolm, S.K. 1985. Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 5: 103-108.
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M. and Zambryski, P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
- Ward, E.R. and Barnes, W.M. 1988. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of the T-strand DNA. *Science* 242: 927-930.
- Warner, S.A.J., Scott, R. and Draper, J. 1993. Isolation of Asparagus AoPR1 wound-responsive promoter by the inverse polymerase chain reaction and its characterisation in transgenic tobacco. *Plant J.* 3: 191-201.
- Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D. and Nester, E.W. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123: 255-264.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. 1996. *Recombinant DNA*. Second Edition, Scientific American Books, New York.
- White, D.W.R. and Greenwood, D. 1987. Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. *Plant Molecular Biology* 8: 461-469.

- William, H. 1994. Optimization of biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He system. BioRad US/EG Bulletin, 1688.
- Willmitzer, L., De Beukeleer, M., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. 1980. DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plants. Nature 287: 359-361.
- Xiang-can, Z., Jones, D.A. and Kerr, A. 1989. Regeneration of shoots on root explants of flax. Annals of Botany 63: 297-299.
- Yadav, N.S., Postle, K., Saiki, R.K., Thomashow, M.F. and Chilton, M.-D. 1988. T-DNA of a crown gall tumor is covalently joined to host plant DNA. Nature 287: 458-461.
- Yadav, N.S., Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Bamers, W.M. and Chilton, M.-D. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on nopaline Ti Plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 6322-6326.
- Yıldız, M., Avcı, M. ve Özgen, M. 1997. Studies on sterilization and medium preparation techniques in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) regeneration. Türk-Alman Tarımsal Araştırma 5. Sempozyumu, 29 Eylül-4 Ekim 1997, Akdeniz Üniversitesi, Antalya. 125-130.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N. , Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol. 86: 109-127.
- Zambryski, P. 1988. Basic process underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. Annu. Rev. Genet. 22: 1-30.
- Zambryski, P., Tempé, J. and Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. Cell 56: 193-201.
- Zambryski, P. 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 465-490.

Zhang, H.M., Yang, H., Rech, E.L., Golds, T.J., Davis, A.S., Mulligan, B.J., Cocking, E.C. and Davey, M.R. 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7: 379-384.

Zhou, J., Ma, H., Guo, F. and Luo, X. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36: 73-79.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa YILDIZ, 3 Ocak 1969 tarihinde Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da tamamladıktan sonra 1985 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nü kazanarak üniversite öğrenimine başladı. Bir yıl sonra yatay geçiş yaparak geldiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ni 1989 yılında derece ile bitirdi. 9 Mart 1990 yılında aynı fakültenin Tarla Bitkileri Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak akademik hayata atıldı. 1994 yılında yüksek lisansını tamamladı ve aynı yıl doktora başladı. 1991 yılında bir ay süreyle İspanya'nın Sevilla şehrinde düzenlenen "Cotton Fibre Technology", 1998 yılında 4.5 ay süreyle Japonya'nın Osaka şehrinde düzenlenen "Introductory Gene Manipulation for Agriculture" isimli kurslara katıldı. Mustafa YILDIZ, evli ve bir çocuk babası olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.