

**KOLZA (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) BİTKİSİNDE ADVENTİF  
SÜRGÜN REJENERASYONU ve *Agrobacterium tumefaciens*  
ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI**

**Semra Mirici**

93492

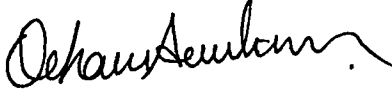
**DOKTORA TEZİ  
(BİYOLOJİ EĞİTİMİ)**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMENTASYON MERKEZİ**

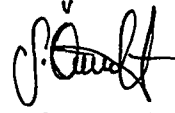
**NİSAN 2000  
ANKARA**

Semra MİRİCİ tarafından hazırlanan, *KOLZA (Brassica napus L. . ssp. oleifera)* BİTKİSİNDE ADVENTİF SÜRGÜN REJENERASYONU ve *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI adlı bu tezin Doktora Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Orhan ARSLAN

Tez Yöneticisi



Doç. Dr. Sebahattin Özcan

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

: Prof. Dr. Celal Er

Üye

: Prof. Dr. Orhan Arslan

Üye

: Doç. Dr. Cengiz Sancar

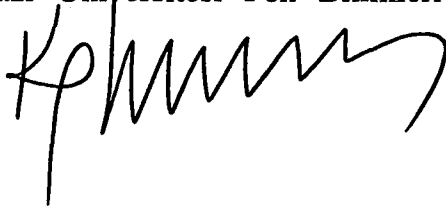
Üye

: Doç. Dr. Fatma Ufuk F. Ünd

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Serap Bal

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



**KOLZA (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) BİTKİSİNDE ADVENTİF  
SÜRGÜN REJENERASYONU ve *Agrobacterium tumefaciens*  
ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI  
(Doktora Tezi)**

**Semra Mirici**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Nisan 2000**

**ÖZET**

Bu araştırmada bazı önemli kolza (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) çeşitlerinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Adventif sürgün rejenerasyonunda eksplant olarak hipokotil, 2/3 kotiledon ve petiollü tam kotiledonlar kullanılmıştır. Değişik bitki büyümesini düzenleyiciler (BAP, kinetin, 2,4-D, TDZ, NAA) ve onların farklı konsantrasyonlarında yapılan denemelerde petiollü tam kotiledonun en yüksek sıklıkta adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan eksplant olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek sıklıkta adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan çeşidin % 43,33 ile Spok ve en uygun ortamın da tek başına 2,00 mg/l veya 4,00 mg/l BAP içeren MSO olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, Spok ve Hansen çeşidinde adventif sürgün rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyo eksplantları BAP ve NAA'nın değişik kombinasyonlarında denemeye alınmıştır. Bu denemelerde sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonuç, hem Hansen (% 55,00) hem de Spok (% 66,67) çeşidinde 0,50 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren MSO ortamından elde edilmiştir. Her iki çeşitte de olgunlaşmamış embriyo eksenleri (% 57,47) olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından (% 25,77) daha fazla adventif sürgün rejenerasyonu vermiştir.

Tütün Samsun çeşidinin yaprak diski eksplantlarında değişik antibiyotik (higromisin ve kanamisin) ve herbisitlerin (metotreksat ve fosfinotrisin) seleksiyon ortamında kullanılabilecek en uygun dozlarının belirlenmesi için denemeler yürütülmüştür. Denemelerde transgenik sürgünlerin seçimi için

gerekli olan en uygun kanamisin dozunun 50 mg/l, higromisinin 40,00 mg/l , metotreksatın 0,05 mg/l ve fosfinotrisinin 5,00 mg/l olduğu belirlenmiştir.

Farklı non-onkogenik *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenesis* hatları ile Samsun çeşidinin yaprak diski eksplantlarına gen aktarımı yapılmıştır. Kanamisin ve higromisin antibiyotiklerine dayanıklı sürgün oluşturan eksplant oranı bakımından, % 100 ile 2260 35S GUS-INT, 15834 pRGG hpt, EHA 101 pRGG hpt ve % 95,00 ile 2260 AoPR1 NEO1 en başarılı hatlar olarak belirlenmiştir.

Kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarının *A. tumefaciens* A281 ve C58 yabancı hatlarına olan hassiyetlerinin araştırıldığı denemelerde, bakterinin tümör oluşturma yeteneği çeşit ve eksplanta göre farklılık göstermiştir. C58 bakteri hattı ile inoküle edilen hipokotil eksplantlarında tümör oluşturan eksplant yüzdesi test edilen çeşitlere göre % 20,00 ile % 60,00 arasında, petiollü tam kotiledon eksplantında da % 20,00 ile % 73,33 arasında değişmiştir. A281 bakteri hattı ile inoküle edilen hipokotil eksplantlarında ise tümör oluşturan eksplant yüzdesi test edilen çeşitlere göre % 16,67 ile % 63,33, petiollü tam kotiledon eksplantında da % 20,00 ile % 73,33 arasında değişmiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında test edilen diğer çeşitlere göre daha başarılı olan Spok, Helios, Darmor, Quinta ve Tarok çeşitleri ile Westar çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantlarına pGV 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Kanamisine dayanıklı sürgün oluşturan eksplant yüzdesi çeşitlere göre % 3,59 ile % 19,20 arasında değişmiştir. Kanamisine dayanıklı sürgünler daha sonra kesilerek kanamisin içeren köklenme ortamında köklendirilmiştir. Köklenen sürgünler son olarak saksılara aktarılarak serada büyütülmüştür. Bu şekilde 174 aday transgenik bitki elde edilmiş olup, bunlardan Westar çeşidine ait sadece 2 bitki GUS pozitif bulunmuştur. Transformasyon sıklığı % 1,15 olarak tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 5001018

Anahtar Kelimeler : *Brassica napus* L., kolza, *Agrobacterium tumefaciens*, adventif sürgün rejenerasyonu, gen transferi.

Sayfa Adedi : 153

Tez Yönetisi : Prof. Dr. Orhan ARSLAN

Doç. Dr. Sebahattin ÖZCAN

**ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION and  
*Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED GENE TRANSFER  
in RAPESEED (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*)**

(Ph.D. Thesis)

Semra MİRİCİ

**GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

April 2000

**ABSTRACT**

In this thesis, the studies related to adventitious shoot regeneration in some important *Brassica napus* L. cultivars and gene transfer via *Agrobacterium tumefaciens* have been carried out. In adventitious shoot regeneration studies hypocotyl, 2/3 cotyledons and whole cotyledons with petiol were used as explants. As a result of the experiments with various growth regulators (BAP, kinetin, 2/4 -D, TDZ, NAA) and their concentrations, it was observed that whole cotyledons with petiol was the explant to have the highest frequency in forming adventitious shoot regeneration. Besides, it was realized that Spok cultivar had the highest frequency in shoot regeneration with 43,33 % and MSO containing 2,00 mg/l or 4,00 mg/l BAP was the most suitable medium. In addition, for adventitious shoot regeneration in Spok and Hansen cultivars, immature embryo explants were treated with different combinations of BAP and NAA. In these treatments, the highest percentage of explant producing adventitious shoots was obtained from MSO medium, supplemented with 0,50 mg/l BAP and 2 mg/l NAA in both Hansen (55,00 %) and Spok (66,67 %) cultivars. In both cultivars, immature embryo axes (55,47 %) developed more adventitious shoot regeneration than immature cotyledon explants (25,77 %).

Some experiments were carried out in leaf disk explants of Samsun tobacco cultivar in order to define the most suitable doses of various antibiotics (hygromycin and kanamycin) and herbicides (methotrexate and phosphinothricin) to use in selection medium. As a result of the experiments, to select the transgenic shoots, the most suitable kanamycin dose was found as

50 mg/l, hygromycin was 40,00 mg/l, methotrexate was 0.05 mg/l and phosphinothricin was 5,00 mg/l.

Gene transfer to leaf disk explants of Samsun cultivar was carried out via various non-onkogenic *A.tumefaciens* and *A.rhizogenesis* strains. In terms of kanamycin and hygromycin resistant shoot developing explant percentages, 2260355 GUS-INT, 15834 pRGHpt, EHA 101 pRGHpt were defined as the most successful strains with 100 %, and so were 2260 AoPR1NEO1 with 95 %.

The tumor production ability of the bacteria differed according to cultivars and explants as a result of the experiments in which the sensibility of whole cotyledon with petiol and hypokotil explants of Rapeseed cultivar to *A.tumefaciens* A281 and C58 wild types.

According to the tested cultivars, in the hypokotil explants that were inoculated with C58 strains, the tumor developing explant percentage varied between 20,00 % and 60,00 %, and so did the whole cotyledon with petiol explants 20,00 % and 73,00 %. In the hypokotil explants that were inoculated with A281 strain, the tumor developing explant percentage varied between 16,67 % and 63,33 % and so did the whole cotyledon with petiol explants 20,00% and 73,33 %.

Gene transfer studies were conducted with pGV2260 35S GUS-INT strain to whole cotyledon with petiol explants of Westar as well as to Spok, Helios, Darmor, Quinta and Tarok cultivars, which were more successful than the other cultivars tested in the adventitious shoot regeneration studies. The percentage of explants producing kanamycin resistant shoots varied between 3,59% and 19,20% according to cultivars. Later on, canamycin resistant shoots were cut and planted in root medium containing kanamycin. Finally, the rooted shoots were grown in pots in the green house. In this way, 174 putative transgenic plants were obtained and among them only two plants that belong to Westar were found GUS positive. Transformation frequency was observed as 1,15 %.

Science Code : 5001018

Key Words : *Brassica napus* L., rapeseed, *Agrobacterium tumefaciens*, adventitious shoot regeneration, gene transfer.

Page Number : 153

Supervisor : Prof. Dr. Orhan ARSLAN

Doç. Dr. Sebahattin ÖZCAN

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada beni engin bilgileriyle yönlendiren ve çalışmamın her safhasında desteklerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Orhan ARSLAN'a ve Doç.Dr. Sebahattin ÖZCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Yine, çalışmalarımı yürüttüğüm A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Celal ER'e, çalışmada kullanılan tohumları sağlayan Prof. Dr. Özer KOLSARICI'ya, araştırma sonuçlarının istatistiki açıdan değerlendirilmesi ve sonuçların fotoğraflanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Cengiz SANCAK'a, laboratuvar çalışmaları ve yazım işleri sırasında yardımlarını gördüğüm Araştırma Görevlisi Dr. Mustafa YILDIZ ile Serkan URANBEY'e ve tüm değerli bölüm öğretim üyeleri ile asistan arkadaşlarıma çalışmamdaki doğrudan veya dolaylı katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, tez çalışmamı finansal yönden destekleyen Gazi Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen değerli eşim İ. Hakkı MİRİCİ'ye ve sevgili kızlarım İlayda ile Ilgın'a bana gösterdikleri anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                              | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarılmış bazı önemli bitki türleri .....                                                       | 10    |
| Çizelge 2.2. <i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla tarımsal öneme sahip genlerin aktarıldığı ve tarla testlerine kadar gelen önemli bitki türleri ..... | 11    |
| Çizelge 2.3. Gen aktarımında yaygın olarak kullanılan bazı markör genler .....                                                                       | 16    |
| Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan kolza çeşitlerine ait bilgiler ...                                                                               | 35    |
| Çizelge 3.2. Bakteri hatları ve özellikleri .....                                                                                                    | 36    |
| Çizelge 3.3. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları .....                                                    | 37    |
| Çizelge 3.4. Kullanılan büyümeyi düzenleyiciler ve çözücülerі .....                                                                                  | 38    |
| Çizelge 3.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücülerі ve saklama koşulları .....             | 42    |

|              |                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.6. | Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları .....                                                                        | 42 |
| Çizelge 4.1. | Farklı BAP ve NAA dozlarının Tarok çeşidinin petiollü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....   | 49 |
| Çizelge 4.2. | Farklı BAP ve NAA dozlarının Tarok çeşidinin petiollü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları ..... | 52 |
| Çizelge 4.3. | Farklı 2,4-D ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi .....           | 56 |
| Çizelge 4.4. | Farklı 2,4-D ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve kotiledon eksplantından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları .....                          | 58 |
| Çizelge 4.5. | Farklı BAP, NAA ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi .....        | 60 |

|               |                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.6.  | Farklı BAP, NAA ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları.....                                   | 61 |
| Çizelge 4.7.  | Farklı BAP ve NAA dozlarının kolzanın değişik çeşitlerine ait hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....                            | 64 |
| Çizelge 4.8.  | Farklı çeşitlerde ve BAP ile NAA'ın değişik dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortam x eksplant arasındaki interaksiyona ait Duncan sonuçları.....                                         | 65 |
| Çizelge 4.9.  | Farklı çeşitlerde ve BAP ile NAA'ın değişik dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x eksplant arasındaki interaksiyona ait Duncan sonuçları.....                                         | 65 |
| Çizelge 4.10. | Farklı BAP ve NAA dozlarının kolzanın değişik çeşitlerine ait hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları üzerinde oluşan sürgün sayısına etkisine ait Duncan sonuçları ve petri başına sürgün sayısı..... | 68 |

|               |                                                                                                                                                                                                                        |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.11. | Farklı TDZ dozlarının Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi.....                                         | 72 |
| Çizelge 4.12. | Farklı TDZ dozlarının Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiollü tam kotiledon ve hipokotillerinden sürgün veren eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan sonuçları.....                                                 | 74 |
| Çizelge 4.13. | Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantlarında TDZ'un eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait Duncan sonuçları.....                                                        | 75 |
| Çizelge 4.14. | Farklı BAP ve NAA dozlarının Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi sonuçları.....                                            | 77 |
| Çizelge 4.15. | Farklı BAP ve NAA dozlarında Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksen ve kotiledon eksplantlarından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x ortam interaksyonuna ait Duncan sonuçları..... | 78 |

|               |                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.16. | Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x eksplant interaksiyonuna ait Duncan sonuçları.....     | 79 |
| Çizelge 4.17. | Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortam x eksplant interaksiyonuna ait Duncan sonuçları.....     | 79 |
| Çizelge 4.18. | Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı bakımından çeşit x ortam x eksplant interaksiyonuna ait Duncan sonuçları ..... | 83 |
| Çizelge 4.19. | Farklı IBA dozlarının Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisine ait varyans analizi .....                                                                | 84 |
| Çizelge 4.20. | Farklı IBA dozlarının Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisine ait Duncan sonuçları .....                                                               | 85 |
| Çizelge 4.21. | Farklı antibiyotik ve herbisitler ile dozlarının tütünde sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi .....                                                             | 90 |

|               |                                                                                                                                                                            |     |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.22. | Farklı antibiyotik ve herbisitler ile dozlarının tütünde eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi .....                                                | 91  |
| Çizelge 4.23. | Farklı antibiyotik ve herbisitler ile dozlarının tütünde eksplant ağırlığına etkisine ait varyans analizi .....                                                            | 92  |
| Çizelge 4.24. | Farklı antibiyotik ve herbisit dozlarının tütün yaprak disklerinden sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları .....                                             | 94  |
| Çizelge 4.25. | Değişik bakteri hatları ile tütüne gen aktarımına ait varyans analizi .....                                                                                                | 98  |
| Çizelge 4.26. | Değişik bakteri hatları ile tütüne gen aktarımına ait Duncan Testi .....                                                                                                   | 101 |
| Çizelge 4.27. | Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon esplantları üzerinde C58 ve A281 bakteri hatları tarafından tümör üretimine ait varyans analizi.....         | 109 |
| Çizelge 4.28. | Farklı kolza çeşitlerinde C58 ve A281 hatlarının hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında tümör ouşturan eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan sonuçları ..... | 110 |

|               |                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.29. | Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarının C58 ve A281 hatları ile inokülasyonu sonucunda oluşan tümör sayısına ait Duncan sonuçları .....                                                 | 111 |
| Çizelge 4.30. | Farklı kolza çeşitlerinde C58 ve A281 hatlarının hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında tümör iriliğine etkisine ait Duncan sonuçları .....                                                                      | 112 |
| Çizelge 4.31. | Farklı kolza çeşitlerinde C58 ve A281 hatlarının hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında petri başına tümör sayısına etkisine ait Duncan sonuçları.....                                                           | 113 |
| Çizelge 4.32. | Westar çeşidine ait petiollü tam kotiledon eksplantının iki farklı yöntem ile 2260 35S GUS-INT bakteri hattı ile inokülasyonu sonucunda kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi .....                                            | 117 |
| Çizelge 4.33. | Spok, Helios, Darmor, Quinta, Tarok ve Westar çeşitlerinin petiollü tam kotiledon eksplantına 2260 35S GUS-INT hattı ile yapılan gen aktarımı sonucunda kanamisine dayanıklı sürgünlerin gelişimine ait varyans analizi ..... | 120 |

- Çizelge 4.34. Spok, Helios, Darmor, Quinta, Tarok ve Westar çeşitlerinin petiollü tam kotiledon eksplantına 2260 35S GUS-INT hattı ile yapılan gen aktarımı sonucunda kanamisine dayanıklı sürgünlerin gelişimine ait Duncan testi..... 121
- Çizelge 4.35. Hansen, Tarok ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksenlerine *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımından elde edilen sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi ..... 123
- Çizelge 4.36. Hansen, Tarok ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarına *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımı sonucunda kanamisine dayanıklı sürgünlerin gelişimine ait Duncan Testi ..... 124

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil      |                                                                                                                                                                 | Sayfa |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1. | <i>Brassica napus</i> L.'un gelişme safhaları .....                                                                                                             | 3     |
| Şekil 1.2. | <i>Brassica</i> türlerinin kromozom sayıları .....                                                                                                              | 3     |
| Şekil 1.3. | Kolza bitkisinin dünya yağlı tohum üretimi içerisindeki yeri .....                                                                                              | 6     |
| Şekil 2.1. | T-DNA aktarımının mekanizması .....                                                                                                                             | 14    |
| Şekil 3.1. | Kolzada adventif sürgün rejenerasyonu için kültüre alınan farklı kotiledon eksplantları .....                                                                   | 39    |
| Şekil 4.1. | Kolza tohumlarının çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonu sonrasında <i>in vitro</i> çimlendirilmesi .....                                                       | 48    |
| Şekil 4.2. | Tarok çeşidinin hipokotil eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu .....                                                                | 50    |
| Şekil 4.3. | 2/3 kotiledon ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından yüksek oranlarda NAA içeren rejenerasyon ortamlarında aşırı adventif kök gelişimi .....                | 55    |
| Şekil 4.4. | Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2 mg/l BAP içeren MSO besin ortamında Spok çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu ... | 67    |

|             |                                                                                                                                      |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.5.  | Hansen çeşidinin olgunlaşmamış embriyo eksen (a) ve olgunlaşmamış kotiledon (b) eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ..... | 80 |
| Şekil 4.6.  | Spok çeşidinin olgunlaşmamış embriyo eksen (a) ve olgunlaşmamış kotiledon (b) eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu .....   | 81 |
| Şekil 4.7.  | Kültür başlangıcından 15 gün sonra Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerin farklı IBA içeren MSO ortamında köklenmesi ..... | 86 |
| Şekil 4.8.  | Farklı IBA dozlarında köklendirilen sürgünlerin iklim odasında 20 gün sonraki gelişmeleri .....                                      | 86 |
| Şekil 4.9.  | Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerden gelişen bitkilerin 2,5 ay sonraki görünüşleri .....                                | 87 |
| Şekil 4.10. | Yaprak disklerinin eldesinde kullanılan 6 haftalık <i>in vitro</i> yetiştirilmiş tütün bitkisi .....                                 | 89 |
| Şekil 4.11. | Farklı fosfinotrisin dozlarının Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi .....                    | 95 |
| Şekil 4.12. | Farklı higromisin dozlarının Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi .....                       | 95 |

|             |                                                                                                                                                                                                      |     |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.13. | Farklı metotreksat dozlarının Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi .....                                                                                      | 96  |
| Şekil 4.14. | Farklı kanamisin dozlarının Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi ... ..                                                                                       | 96  |
| Şekil 4.15. | Farklı <i>A. tumefaciens</i> hatlarıyla inokülasyondan 4 hafta sonra tütün yaprak disklerinden seçici antibiyotik ile herbisitlere dayanıklı kallus ve sürgün gelişimi .....                         | 103 |
| Şekil 4.16. | Farklı <i>A. rhizogenes</i> ve <i>A. tumefaciens</i> hatlarıyla inokülasyondan 4 hafta sonra tütün yaprak disklerinden seçici antibiyotik ile herbisitlere dayanıklı kallus ve sürgün gelişimi ..... | 104 |
| Şekil 4.17. | Saksılara aktarılan aday transgenik tütün bitkilerinin kültür dolabı ve iklim odasında gelişimleri .....                                                                                             | 105 |
| Şekil 4.18. | Gen aktarımı yapılan tütün sürgünlerinde histokimyasal GUS ekspresyonu.....                                                                                                                          | 106 |
| Şekil 4.19. | Gen aktarımı yapılan ve yapılmayan tütün bitkilerinden alınan yaprak disklerindeki histokimyasal GUS ekspresyonu .....                                                                               | 107 |
| Şekil 4.20. | İnokülasyondan 3 hafta sonra Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından C58 <i>A. tumefaciens</i> hattı tarafından tümör üretimi .....                                     | 114 |

- Şekil 4.21. 2260 35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inokülasyondan 6-7 hafta sonra kanamisin içeren besin ortamında kanamisine dayanıklı yeşil sürgünlerin gelişimi..... 118
- Şekil 4.22. 2260 35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inokülasyondan 6-7 hafta sonra kanamisin içeren besin ortamında kanamisine dayanıksız sürgünlerin gelişimi ... 119
- Şekil 4.23. Aday transgenik bitkilerin yapraklarında yapılan GUS analizi sonucunda Westar çeşidine ait iki bitkinin GUS pozitif yaprak örnekleri ..... 122

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler ve Kısaltmalar | Açıklama                              |
|-------------------------|---------------------------------------|
| AoPR1                   | <i>Asparagus officinalis</i> PR1 geni |
| bas                     | Basta                                 |
| BAP                     | 6-benzylaminopurine                   |
| bp                      | Baz çifti                             |
| cb                      | karbenisilin                          |
| 2,4-D                   | 2,4- dichloropophenoxyacetic acid     |
| EDTA                    | Ethylenediaminetetra acetic acid      |
| fos                     | fosfinotrisin                         |
| GUS                     | $\beta$ -glucuronidase                |
| hyg                     | Higromisin                            |
| IAA                     | Indole-3-acetic acid                  |
| IBA                     | Indole-3-butyric acid                 |
| IPA                     | Izopentenil adenosine                 |
| 2 IP                    | 2 izopentenil adenine                 |
| K.O.                    | Kareler Ortalaması                    |
| Kinetin                 | 6- furil aminopurine                  |
| Km                      | Kanamisin                             |
| MS                      | Murashige ve Skoog Basal Besin Ortamı |
| MSO                     | Hormon içermeyen MS ortamı            |
| mt                      | metotreksat                           |
| NA                      | Nutrient Agar                         |
| NAA                     | $\alpha$ Naphthaleneacetic acid       |
| NB                      | Nutrient Broth                        |
| NPT-II                  | Neomycin-phosphotransferase-II        |
| npt-II                  | Neomycin-phosphotransferase-II geni   |
| onc                     | Oncogenes                             |

|            |                                                    |
|------------|----------------------------------------------------|
| PEG        | Polyethilenegluco1                                 |
| Rif        | Rifampisin                                         |
| strep      | Streptomisin                                       |
| S.D.       | Serbestlik Derecesi                                |
| PPO        | Polyphenoloxidase                                  |
| T-DNA      | Transfer DNA                                       |
| TDZ        | Thidazuron                                         |
| Tn         | Transposon                                         |
| <i>vir</i> | Virulens geni                                      |
| X-GLUC     | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide |



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                 | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                      | i     |
| ABSTRACT .....                                                                  | iii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                  | v     |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....                                                      | vi    |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                                        | xiv   |
| KISALTMA VE SİMGELER .....                                                      | xviii |
| <br>                                                                            |       |
| 1. GİRİŞ .....                                                                  | 1     |
| <br>                                                                            |       |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....                                 | 9     |
| <br>                                                                            |       |
| 2.1. Kuramsal Temeller .....                                                    | 9     |
| 2.1.1. Gen aktarımında kullanılan yöntemler .....                               | 9     |
| 2.1.1.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı.....        | 12    |
| 2.1.1.1.1. Bitkilere gen aktarımında markör genlerin kullanılması.....          | 15    |
| 2.1.1.1.2. T-DNA bölgesine istenen genlerin klonlanması .....                   | 17    |
| 2.1.1.1.3. <i>Agrobacterium</i> ile gen aktarımında kullanılan eksplantlar..... | 18    |
| 2.1.1.2. Doğrudan gen aktarımı .....                                            | 18    |
| 2.1.1.2.1. Partikül tabancası ile gen aktarımı.....                             | 19    |
| 2.1.1.2.2. Protoplastlara gen aktarımı.....                                     | 19    |
| 2.1.2. Adventif sürgün rejenerasyonu.....                                       | 20    |
| 2.1.2.1. Organogenezis .....                                                    | 21    |
| 2.1.2.2. Embriyogenezis .....                                                   | 22    |
| 2.2. Kaynak Araştırması .....                                                   | 24    |
| 2.2.1. <i>Brassica</i> türlerinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu .....           | 24    |
| 2.2.2. <i>Brassica</i> türlerine gen aktarımı .....                             | 29    |

|                                                                                                      | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                           | 35    |
| 3.1 Materyal.....                                                                                    | 35    |
| 3.1.1. Bitki materyali .....                                                                         | 35    |
| 3.1.2. Bakteri Materyali .....                                                                       | 35    |
| 3.2 Metot.....                                                                                       | 37    |
| 3.2.1. Bitki doku kültürleri .....                                                                   | 37    |
| 3.2.1.1. Genel doku kültürü şartları .....                                                           | 37    |
| 3.2.1.2. Bitki büyümesini düzenleyiciler .....                                                       | 38    |
| 3.2.1.3. Tohum yüzey- sterilizasyonu ve çimlendirilmesi .....                                        | 39    |
| 3.2.1.4. <i>İn vitro</i> ' da yetiştirilen fidelerden eksplant izolasyonu .....                      | 39    |
| 3.2.1.4.1. Olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarının<br>İzolasyonu .....                    | 40    |
| 3.2.1.5. Rejenere olan kolza sürgünlerinin köklendirilmesi ve serada<br>büyütülmesi.....             | 40    |
| 3.2.2. Bakteri kültürleri .....                                                                      | 41    |
| 3.2.2.1. Bakteri kültürlerinin büyütilmesi.....                                                      | 41    |
| 3.2.2.2. Bakteri kültürlerinin saklanması.....                                                       | 41    |
| 3.2.2.3. Antibiyotiklerin kullanımı .....                                                            | 42    |
| 3.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Gen Aktarımı.....                                          | 43    |
| 3.3.1. Onkogenik <i>A. tumefaciens</i> hatları ile kolzaya gen aktarımı .....                        | 43    |
| 3.3.2. Non-onkogenik <i>A. tumefaciens</i> hatlarının tütün üzerinde test<br>edilmesi.....           | 43    |
| 3.3.3 Non-onkogenik <i>A. tumefaciens</i> hatları aracılığıyla kolza<br>bitkisine gen aktarımı ..... | 44    |
| 3.4. Histokimyasal Gus Analizi .....                                                                 | 45    |
| 3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....                                                  | 46    |

|                                                                                                                                                          | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                                                                                             | 47    |
| 4.1. Kolza Tohumlarının <i>In Vitro</i> Çimlendirilmesi .....                                                                                            | 47    |
| 4.2. Adventif Sürgün Rejenrasyonu ile İlgili Bulgular.....                                                                                               | 47    |
| 4.2.1 Tarok çeşidinde BAP ve NAA' in adventif sürgün<br>rejenerasyonuna etkisi .....                                                                     | 47    |
| 4.2.2. Tarok çeşidinde 2,4-D ve kinetinin adventif sürgün<br>rejenerasyonuna etkisi .....                                                                | 56    |
| 4.2.3. Tarok çeşidinde BAP, NAA ve kinetinin birlikte kullanılmasının<br>adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi .....                                    | 59    |
| 4.2.4. Test edilen farklı çeşitlerde BAP ve NAA'in adventif sürgün .....                                                                                 | 63    |
| 4.2.5. Spok, Quinta ve Star çeşitlerinde TDZ'un adventif sürgün<br>rejenerasyonuna etkisi .....                                                          | 71    |
| 4.2.6. Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo<br>eksplantlarında farklı BAP ve NAA dozlarının adventif<br>sürgün rejenerasyonuna etkisi ..... | 76    |
| 4.3. Rejenere Olan Adventif Sürgünlerinin Köklendirilmesi ve<br>Saksılarda Büyütülmesi .....                                                             | 83    |
| 4.4. Non-Onkogenik <i>A. tumefaciens</i> Hatlarının Tütünde Test<br>Edilmesi .....                                                                       | 88    |
| 4.4.1. Tütün yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna seçici<br>antibiyotik ve herbisitlerin etkisi .....                                     | 88    |
| 4.4.2. Farklı non-onkogenik <i>A. tumefaciens</i> ve <i>A. rhizogenesis</i><br>hatlarının tütünde test edilmesi .....                                    | 97    |
| 4.5. <i>A. tumefaciens</i> Aracılığıyla Kozaya Gen Aktarımı.....                                                                                         | 108   |
| 4.5.1. Onkogenik <i>A. tumefaciens</i> hatlarıyla farklı kolza çeşitlerine gen<br>aktarımı.....                                                          | 108   |

|          |                                                                                                                              |     |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.2.   | Non-onkogenik <i>A. tumefaciens</i> pGV2260 35S GUS-INT hattı aracılığıyla kolzaya gen aktarımı.....                         | 116 |
| 4.5.2.1. | Hansen, Torak ve Spok çeşitlerinin embriyo eksenlerine <i>A. tumefaciens</i> pGV2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımı..... | 123 |
| 5.       | SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                                                      | 126 |
| 5.1.     | Kolzada Adventif Sürgün Rejenerasyonu .....                                                                                  | 126 |
| 5.2.     | Non-onkogenik <i>Agrobacterium</i> Hatlarının Tütünde Test Edilmesi .....                                                    | 130 |
| 5.3.     | Kolzaya Gen Aktarımı.....                                                                                                    | 131 |
| 5.3.1.   | Onkogenik <i>A. tumefaciens</i> hatları ile gen aktarımı.....                                                                | 131 |
| 5.3.2.   | Non-onkogenik pGV 2260 35S GUS-INT <i>A. tumefaciens</i> hattı ile gen aktarımı .....                                        | 133 |
|          | KAYNAKLAR .....                                                                                                              | 136 |
|          | ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                               | 153 |

## 1. GİRİŞ

Hızla ilerleyen endüstrileşme, gelişmiş sağlık tedbirleri ve sosyo-ekonomik düzeyin artması ile birlikte dünya nüfusu da hızla artmaya başlamıştır. Öyle ki, 2000'li yıllarda dünya nüfusunun 8 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Dünyada tarım yapılan alanlar dünya yüzeyinin sadece % 3'ünü oluşturmaktadır. Ayrıca, bu alanlar erozyon, tuzlulaşma, asitleşme, yoğun tarım ve otlatma gibi nedenlerle hızla azalmaktadır (Vasil, 1998). Halbuki, artan nüfusun beslenmesi, ancak tarımsal üretimin kalite ve miktar yönünden artırılması ile mümkündür.

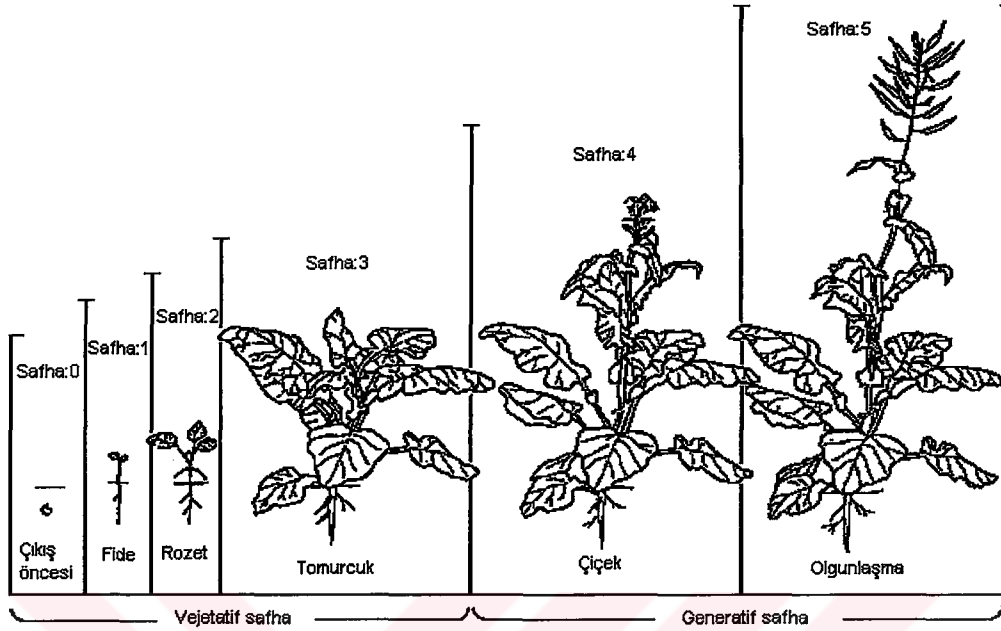
İnsan beslenmesinin temelini oluşturan maddeler yağlar, proteinler ve karbonhidratlardır. Temel enerji kaynağı olan yağların bir kısmı hayvansal, bir kısmı da bitkisel yağlardan karşılanır. Ancak, hayvansal yağların sağlık sorunlarına yol açması ve pahalı olması bitkisel yağların daha fazla tercih edilmesine sebep olmaktadır (Kolsarıcı ve Başalma, 1988). Bitkisel yağlar, zeytin yağı dışında kalan, yağlı tohumlu bitkilerden elde edilen yağlardır. Dünyadaki toplam yağ üretiminin yaklaşık % 86'sını, ülkemizdeki toplam yağ üretiminin ise % 80'ini bitkisel yağlar oluşturmaktadır (Kolsarıcı vd., 2000).

Ülkemiz her yıl yaklaşık bir milyon ton ham yağ ithal etmektedir (Kolsarıcı vd., 2000). Bu yağ açığının kapanması mevcut ayçiçeği ve pamuk üretiminin yanında alternatif yağ bitkilerinin de üretime girmesi ile mümkündür. Alternatif yağ bitkileri içerisinde kolzanın;

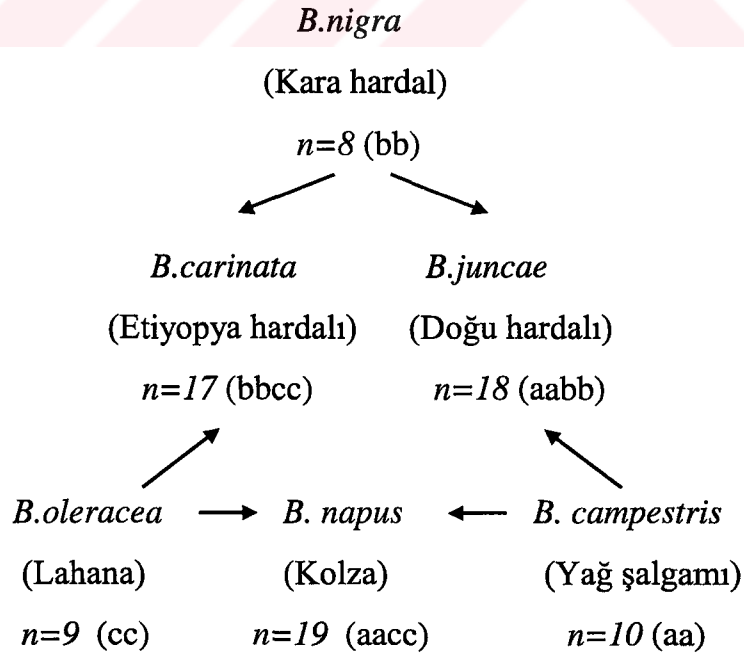
- Kışlık ve yazlık formlarının bulunması,
- Yetiştirme süresinin kısa olması,
- Birim alandan yüksek ürün sağlanması,

- Tohumlarındaki yağ oranının yüksek oluşu (% 42-50)
- Rozet oluşumunu tamamlamış kışlık çeşitlerin - 15 °C hatta - 20 °C'ye kadar dayanıklı olması,
- Vejetasyon süresinin kısa oluşu,
- Bir çok yağ bitkisine göre daha az iş gücü gerektirmesi ve erken dönemde yağ ve yem fabrikalarına ham madde sağlaması bu bitkiyi ön plana çıkarmaktadır (Önder ve Aktümsek, 1995). Ayrıca, kolza bitkisi ilkbaharda çiçek açan ilk kültür bitkisi olduğundan arıcılık için de önemlidir (Kolsarıcı, 1986; Özgüven, 1995).

Kolza (*Brassica napus* L.) *Crucifera* (Haçlı çiçekliler) familyasına bağlı, tek yıllık otsu bir bitki olup; fide, rozet, tomurcuk, çiçek ve olgunlaşma dönemleri geçirir (Şekil 1.1). Kolza, *Brassica campestris* (yağ şalgamı,  $2n=20$ ) ve *Brassica oleraceae* (lahana,  $2n=18$ )'nin amphidiploid melezi olup, kromozom sayısı  $2n=38$ 'dir (Şekil 1.2). *Brassica* türleri arasındaki bu ilişkinin anlaşılması ile sentetik amphidiploidler oluşturulmuş ve türler arası melezlemelerle türden türe agronomik özelliklerin geçişi sağlanmıştır (Weiss, 1983). Örneğin, *B. campestris* ile *B. napus* ve *B. juncea* arasında yapılan türler arası melezlemelerden *B. campestris*'in ilk düşük erusik asit ve glukozinolat içeren çeşitleri elde edilmiştir (Downey et al.,1974). Aynı yolla *B. napus*'a "blacleg" hastalığına dayanıklılık özelliği de aktarılmıştır (Roy and Tarr, 1984). Ayrıca, *B. campestris* ve *B. napus* arasında yapılan türler arası melezlemeler ile erken olgunluk, sitoplazmik erkek kısırlığı, kendine uyumsuzluk ve sarı tohum kabuğu gibi özellikleri *B. campestris*'den *B. napus*'a aktarma çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 1.1. *Brassica napus* L.'un gelişme safhaları ( Weiss, 1983)



Şekil 1.2. *Brassica* türlerinin kromozom sayıları ( Weiss, 1983)

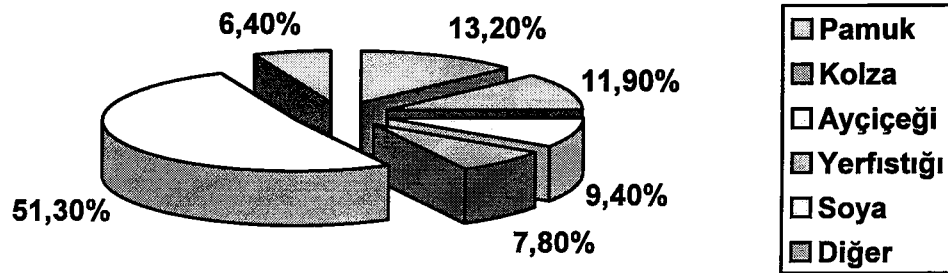
Bir çok Batı ve Orta Avrupa ülkesinde ve özellikle de Kanada'da yaygın olarak üretimi yapılan ve bitkisel yağ kaynağı olarak ilk sırayı alan kolza, Türkiye için de büyük bir potansiyeldir. Türkiye'ye II. Dünya Savaşı sonrasında Balkan göçmenleriyle gelen kolza ile ilgili ilk araştırma A.Ü Ziraat Fakültesinde Kamil İlisulu tarafından 1960'lı yıllarda başlatılmıştır. Diğer üniversite ve araştırma enstitüleri de 1970'li yılların sonunda çalışmalar yapmışlardır. Araştırmalar genellikle kolzanın değişik bölgelere adaptasyonu ve ekim alanı üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan tüm çalışmalar doğru zamanda ekildiği takdirde Türkiye'nin tüm bölgelerinde kolza tarımının yapılabileceği sonucunu ortaya koymuştur. Ancak, Türkiye'de kolza ekim alanı 1979 yılında 28.000 hektara çıkmışken, kolza yağında bulunan yüksek erusik asitin insan sağlığına zarar verdiği haklı gerekçesi ile Sağlık Bakanlığı tarafından ekimi iki yıl yasaklanmıştır (İpkin vd., 1990). Ardından Bakanlık tarafından "00 tipi denilen 0 erusik asit ve 0 glikozinolat içeren ıslah çeşitlerinin getirilmesi ile kolza tarımı yeniden başlamış, ancak, 1996 yılında kolza tarımı yapılan alan 5 hektara kadar gerilemiştir. Halbuki, tahıl üretimi yapılabilen her yerde kolzanın yetiştirilebileceği ve GAP bölgesinde yeni tarıma açılan alanlar değerlendirildiğinde üretim alanının 220 bin hektara çıkabileceği hesaplanmaktadır (Kolsarıcı vd., 2000).

Kolza bitkisi üzerine yapılan çalışmalar özellikle Kanada'da yoğunlaşmış ve hem erusik asit (% 35'den % 5'e, % 1'e ve hatta 0 düzeyine düşürülmüş) hem de glukozinolat bakımından düşük içerikli çeşitler geliştirilmiştir. Örneğin, Erglu ıslah çeşidi çift sıfır adı altında anılmakta olup, bu çeşitte hem erusik asit hem de glukozinat çok düşük düzeyde bulunmaktadır (Banfield, 1974). *Brassica* türlerinin içerdikleri glukozinatlar yüzünden, ısıtıldığında kötü koku vermeleri onların küspe olarak kullanılmasını engellemektedir. Ancak, yapılan ıslah çalışmaları ile glukozinatlar % 2 düzeylerine indirilmiştir (Downey et al.,

1974a). Canola terimi, tohumlarında % 2'den az erusik asit ve küspesinde 30 µm/g'dan daha az glukozinolat içeren çeşitler için kullanılmaktadır. Canola, *B.napus* ve *B. campestris*'ten geliştirilmiştir. Canola çeşitlerinin küspeleri düşük glukozinolat, yüksek protein içeriği (% 35-38) ve aminoasit profili gibi özellikleriyle soya küspesine alternatif oluşturacak yapıdadır (Leeson, et al., 1987).

Dünyada yaklaşık 22 milyon ha ekim alanı ve 30.5 milyon ton tohum üretimi (Şekil 1.3) olan kolza bitkisinin ıslahında amaçlanan hedefleri şu şekilde sıralamak mümkündür ( Slinger, 1977 );

- Yağ oranının en az % 44'e çıkarılması,
- Küspedeki glukozinat oranının 0,2 mg/g altına düşürülmesi,
- Koyu renkli kabuğa sahip tohumlar fenolik bileşiklerce zengin olduğundan kabuğu sarı renkli çeşitlerin geliştirilmesi,
- Küspede yağ oranının en az % 48'e çıkarılması,
- Tohumda linoleik asit oranının % 40'a çıkarılması, erusik asidin % 1'in altına düşürülmesi,
- Ekolojiye uyum ve yatmaya karşı dayanıklılık sağlanması,
- Kapsülleri çatlamayan çeşitlerin elde edilmesi,
- Hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi,
- Kışlık çeşitlerde soğuğa dayanıklılık, yazlık çeşitlerde erkencilik özelliğinin sağlanması,
- Herbisitlere dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi,
- Erkek kısır hatların elde edilmesi.



Şekil 1.3. Kolza bitkisinin dünya yağlı tohum üretimi içerisindeki yeri

Klasik ıslah yöntemleri kullanılarak kültür bitkilerinin verim ve kalitelerinin artırılmasına çalışılmaktadır. Bu konuda oldukça başarılı sonuçlar alınmasına rağmen bazı sorunlarla karşılaşmıştır. Bunların başında ıslah edilmiş kültür bitkilerinin, mantar, bakteri, virüs hastalıklarına ve zararlılara karşı dayanıksız olmaları gelmektedir. Bunun nedeni ıslahı yapılan bitkinin seleksiyonunda ürünün kalitesinin ve miktarının öncelikli olması, buna karşılık hastalıklara ve zararlılara dayanıklılığın geri planda tutulmasıdır (Özcan ve Özgen, 1996). Bitkileri bu zararlardan korumak için herbisit, insektisit ve pestisit gibi kimyasal ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak, bu ilaçların tümü karbon, hidrojen ve klor içerdiğinden toprakta uzun süre (2-16 yıl) parçalanmadan kalmaktadırlar. Günümüzde, çevre sağlığı açısından oldukça zararlı etkilere sahip bu ilaçlara alternatif yöntemlerin bulunması bir zorunluluk haline gelmiştir.

Klasik ıslah metodlarının karşılaştığı bir başka sorun da kısırılık ve uyumsuzluk nedeniyle, türler arasında melezlemenin sınırlı olması ve istenilen karakterin bir başka bitki türüne aktarılırken, bağlı genler nedeniyle istenmeyen özelliklerin de yeni bitkiye geçişinin önlenememesidir. Ayrıca, klasik bitki ıslah yöntemlerinden melezleme ve seleksiyon ile sonuca ulaşmak yıllarca

sürebilmektedir. Halbuki, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak bu sorunlarla karşılaşmadan, bir çeşidin istenen özellikleri muhafaza edilerek ona yeni özellikler kazandıran bir ya da birkaç gen kolaylıkla aktarılabilmektedir (Özcan ve Özgen, 1996).

Günümüzde bitki genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak herbisitlere, böceklerle ve virüslere karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesi, erkek kısır bitkilerin üretilmesi, "Antisens RNA" tekniği ile bazı genlerin protein üretimlerinin engellenmesi, sıcağa, soğuğa, kurağa ve tuza dayanıklı bitkilerin elde edilmesi, tane baklagillerde aminoasit yapısının değiştirilmesi, buğdaygillerde azot fiksasyonu ve ikincil bitkisel metabolitlerin üretimi gibi konularda yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). Örneğin, *Salmonella typhimurium* dan izole edilen "aro A" ve *Streptomyces hygroscopicus*'dan izole edilen "bar" genlerinin değişik bitki türlerine aktarılmasıyla herbisitlere dayanıklı tütün, patates ve yonca çeşitleri geliştirilmiştir. (Murakkami et al., 1986; De Greef et al., 1989; D'Halluin et al., 1990).

Ayrıca, bazı böceklerin sindirim sistemlerine zarar vererek ölümlerine neden olan toksik proteinleri kodlayan genlerin *Bacillus thuringiensis* (bt)' den izole edilerek bitkilere aktarılmasıyla böceklerle dayanıklı transgenik domates, tütün, pamuk, mısır bitkileri yetiştirilmiştir (Delennay et al., 1989; Kozeil et al., 1993). Yine tütün, patates, domates ve yonca gibi bitkilere virüs kılıf protein genlerinin aktarılmasıyla bu bitkilerde değişik virüs ırklarına dayanıklılık sağlanmıştır (Abel 1986; Reavy and Mayo 1992). Son yıllarda geliştirilen Antisens RNA tekniği ile de hasat edilen domateslerde etilen üretimi engellenerek depolama süreleri uzatılabilmektedir (Hamilton et al., 1990).

Bitki hücre ya da dokularına yukarıda bahsedilen tarımsal öneme sahip genlerin aktarımında bir çok biyoteknolojik yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden *A. tumefaciens* aracılığıyla bitkilere gen aktarımı en yaygın kullanılanıdır. Ancak, bu yöntemde de gen aktarım oranı bitkilerin türlerine göre değişmekle birlikte oldukça düşüktür. Gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek oranda adventif sürgün oluşumu gen aktarım çalışmalarının başarısını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, gen aktarımına başlamadan önce her tür için hatta her çeşit için *A. tumefaciens* ile gen aktarımına uygun bir adventif sürgün rejenerasyon yönteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı da; dünya bitkisel yağ üretiminde soya ve çığitten sonra üçüncü sırada yer alan kolza (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*)'nın yaygın olarak ekimi yapılan çeşitlerinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *A.tumefaciens* aracılığıyla etkili gen aktarım yönteminin geliştirilmesidir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kuramsal Temeller

#### 2.1.1. Gen aktarımında kullanılan yöntemler

Gen aktarımı hangi yöntem kullanılarak yapılırsa yapılsın amaç; totipotent hücrelerin (yeni bir bitki oluşturabilecek yeteneğe sahip hücre) kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesidir (Özcan ve Özgen, 1996). Gen aktarımı yapılan hücreden de mutlaka gen aktarılmış bitki (transgenik) elde edilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde, gen aktarımının hiç bir önemi olmamaktadır. Bitkilere gen aktarımı için *A. tumefaciens* aracılığıyla ve doğrudan gen aktarımı yöntemleri geliştirilmiştir. Yaygın olarak kullanılan *A. tumefaciens* sayesinde bir çok kültür çeşidinden transgenik bitkiler elde edilmiştir (Çizelge 2.1. ve 2.2). Bu özelliğinden dolayı *A. tumefaciens* bakterisine bitkilerin doğal genetik mühendisi adı verilmiştir (Özcan ve Özgen, 1996). Bu teknikle iki çenekli bitkilerde başarıyla gen aktarımı yapılırken, başlangıçta tek çenekli bitkilerde hedeflenen başarıya ulaşılamamıştır (Schell, 1982; Potrykus, 1990). Monokotiledon bitkilere gen aktarımı için elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül tabancası gibi doğrudan gen aktarım yöntemleri geliştirilerek başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Doğrudan gen aktarım teknikleriyle arpa (Tingay et al., 1997), çeltik (Zhang and Wu, 1988) ve mısır (Ishida et al., 1996) gibi ekonomik önemi yüksek olan buğdaygillerde transgenik bitkiler kolaylıkla üretilebilmiştir.

Çizelge 2.1. *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarılmış bazı önemli bitki türleri

| Bitkiler                     | Referans                    |
|------------------------------|-----------------------------|
| <b>Sebzeler</b>              |                             |
| Lahana                       | Shahin and Yashar, 1986     |
| Patates                      | De Block, 1988              |
| Domates                      | McCormick et al., 1986      |
| Salatalık                    | Trulson et al., 1986        |
| Havuç                        | Scott and Draper, 1987      |
| Bezelye                      | Puonti-Kaerlas et al., 1990 |
| Brokoli                      | Christey and Earle, 1989    |
| Karnıbahar                   | De Bloc et al., 1988        |
| Kuşkonmaz                    | Conner et al., 1988         |
| Patlıcan                     | Guri and Sink, 1988         |
| Marul                        | Michelmores et al., 1987    |
| <b>Endüstri Bitkileri</b>    |                             |
| Ayçiçeği                     | Everett et al., 1987        |
| Şeker pancarı                | Gasser and Fraley, 1989     |
| Kolza                        | Fry et al., 1987            |
| Soya                         | Hinchee et al., 1988        |
| Pamuk                        | Firoozabady et al., 1987    |
| Keten                        | Basiran et al., 1987        |
| Hardal                       | Mathews et al., 1990        |
| <b>Süs ve Tıbbi Bitkiler</b> |                             |
| Petunya                      | Horsch et al., 1985         |
| Tütün                        | Horsch et al., 1985         |
| Krisentum                    | Ledger et al., 1991         |
| Geranium                     | Butcher et al., 1990        |
| <b>Meyve ve Ağaçlar</b>      |                             |
| Elma                         | James et al., 1989          |
| Kavak                        | Fillatti et al., 1987       |
| Çilek                        | Nehra et al., 1990          |
| Kavun                        | Fang and Grumet, 1990       |
| <b>Yem Bitkileri</b>         |                             |
| Yonca                        | Shahin et al., 1986         |
| Gazal Boynuzu                | Jensen et al., 1986         |
| Aküçgül                      | White and Greenwood, 1987   |

Çizelge 2.2. *A. tumefaciens* aracılığıyla tarımsal öneme sahip genlerin aktarıldığı ve tarla testlerine kadar gelen önemli bitki türleri (OECD 1998)

| Transgenik Özellikler                         | Bitkiler                                                |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Herbisitlere Dayanıklı</b>                 |                                                         |
| Fosfonitrisin                                 | Tütün, domates, patates, şekerpancarı                   |
| Glifosit                                      | Tütün, domates, kolza, keten, şekerpancarı, pamuk, soya |
| Bromoksinil                                   | Tütün, domates, pamuk                                   |
| Atrazin                                       | Tütün                                                   |
| <b>Böceklerle Dayanıklı</b>                   |                                                         |
| Bt Proteinleri                                | Tütün, domates, patates, pamuk, mısır                   |
| Proteinaz İnhibitörleri                       | Tütün                                                   |
| <b>Virüslere Dayanıklı</b>                    |                                                         |
| Alfalfa Mozaik Virüsü                         | Tütün                                                   |
| Tütün Mozaik Virüsü                           | Domates                                                 |
| Domates Mozaik Virüsü                         | Domates                                                 |
| Patates Virüs X                               | Patates                                                 |
| Patates Virüs Y                               | Patates                                                 |
| Patates Yaprak Virüsü                         | Patates                                                 |
| Rhizomania Virüsü                             | Şekerpancarı                                            |
| Salatalık Mozaik Virüsü                       | Salatalık                                               |
| <b>Diğer Özellikler</b>                       |                                                         |
| Ağır Metallere Dayanıklılık                   | Tütün                                                   |
| Depolama Ömrü Uzatılmış Meyve                 | Domates                                                 |
| Tohum Depo Proteinleri Değiştirilmiş Bitkiler | Kolza                                                   |

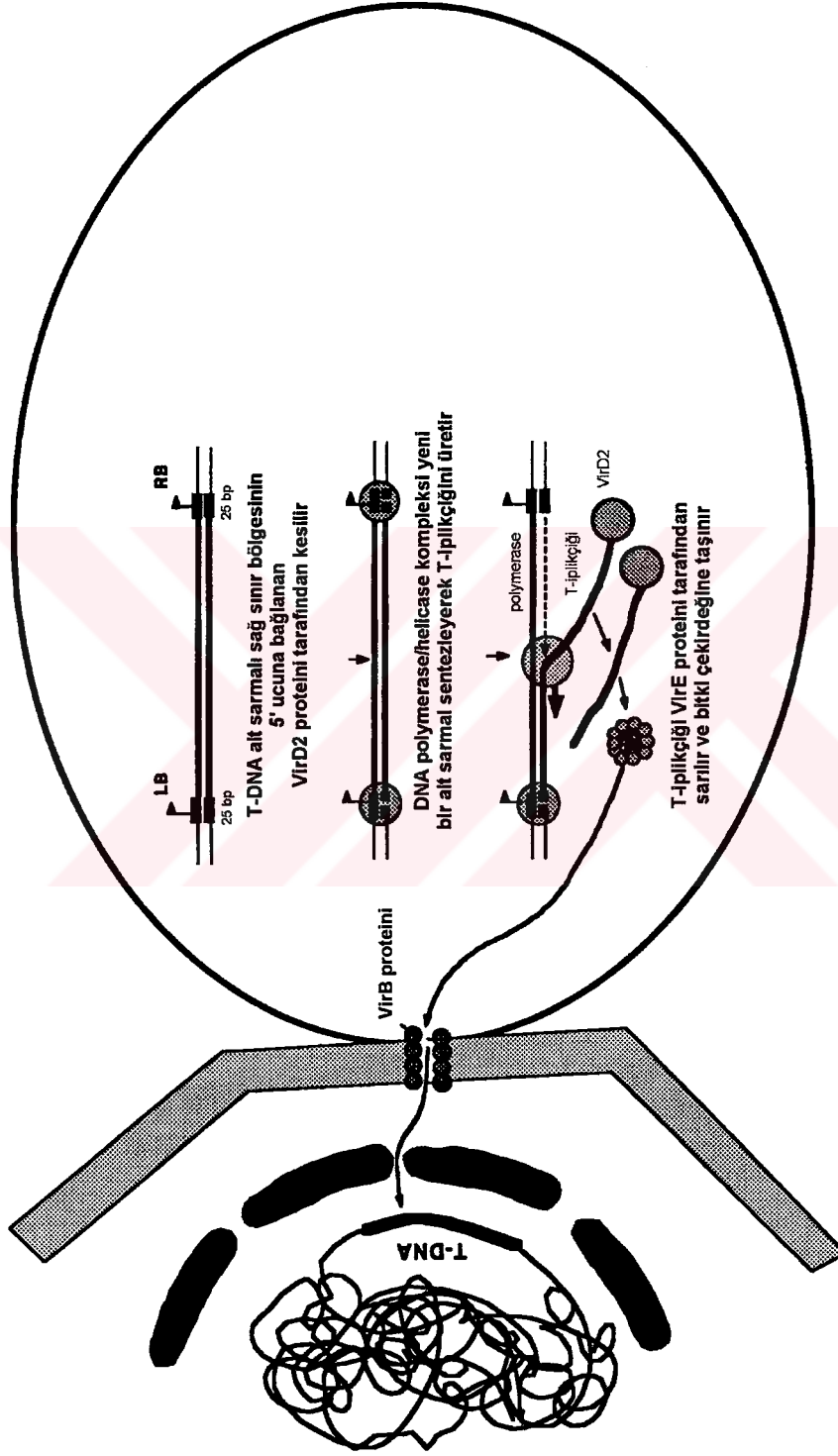
### 2.1.1.1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı

Toprakta yaşayan, gram negatif bir bakteri olan *A. tumefaciens*, *Rhizobiacea* familyasındandır. Aynı familyaya dahil olan *A. rhizogenes*, bitkilerde saçak kök oluşumuna neden olurken, *A. tumefaciens* kök boğazı uruna neden olmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). *A. tumefaciens* bitkiyi kök boğazında oluşan yaralardan enfekte etmektedir. Enfekte olan kök boğazı hücreleri düzensiz bölünmeler geçirerek tümör (ur) oluşturmaktadırlar. *A. tumefaciens* dikotiledon bitkilerin bir çoğunda tümör oluşumuna neden olurken, monokotiledon bitkilerin ancak bazılarında tümör oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle, monokotiledon bitkilerde *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yerine partikül tabancası, elektroporasyon ve mikroenjeksiyon yöntemlerinin kullanımı daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, son yıllarda super virulent vektörleri içeren *A. tumefaciens* hatları monokotiledon bitkilere gen aktarımında da kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalar sonunda bakteriden bitki hücrelerine geçen ve Ti-plazmidi üzerinde bulunan bir DNA parçasının (T-DNA) (tumour-inducing/tümör oluşturan) bitkide tümör oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir (Watson et al., 1975). T-DNA bitki kromozomlarına entegre olduktan sonra taşıdığı genler etkisiyle bitki hücresi içinde yeni enzimler üretilmeye başlanmaktadır. Hormon dengesi bozulan hücreler hızla ve düzensiz bir şekilde bölünmeye başlayarak tümör meydana getirirler (Özcan ve Özgen, 1996). Tümör dokusunun farklı amino asitler ve opinler dışında şeker türevlerini de sentezledikleri belirlenmiştir (Tempe and Goldmann, 1982; Kado, 1991). Sentezlenen bu bileşikler bakterinin ihtiyacı olan karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır (Messens et al., 1985; Özcan, 1993).

*Agrobacterium* hattına göre tümörlü dokunun sentezlediği opinler başlıca oktopin ve nopalin olmak üzere ikiye ayrılır (Bomhoff et al., 1976). Oktopin tipi plazmidler, TL ve TR olarak adlandırılan T-DNA bölgelerine, nopalin tipi plazmidler ise tek bir T-DNA bölgesine sahiptir (Thomashow et al., 1980). Oktopin ve nopalin tipi plazmidlerin her ikisi de 23 kb büyüklüğünde olup her ikisinin de T-DNA'larında 13 adet gen bulunmaktadır (Fraley et al., 1980). T-DNA'nın bitki hücrelerine entegre olabilmesi için T-DNA'yı sağdan sınırlandıran RB (sağ sınır), soldan sınırlandıran LB (sol sınır) bölgelerine sahip olması gerekmektedir (Thomashow et al., 1980; Wang et al., 1984). Yapılan araştırmalarda her iki sınır arasına yerleştirilen bir DNA parçasının kolayca bitki hücrelerine aktarılabildiği görülmüştür (Leemans et al., 1982). Ayrıca, T-DNA bölgesinden tümör oluşturan genler (onkogenler) kesici enzimler kullanılarak çıkarıldığında, gen aktarımının etkilenmediği gözlenmiştir (Schell and Van Montagu, 1983). Böyle onkogenleri çıkarılmış Ti-plazmidlerine nononkogenik Ti-plazmidi adı verilmektedir (Özcan ve Özgen, 1996).

Yapılan araştırmalarda gen aktarımında, T-DNA üzerinde bulunan RB ve LB dışında bir de virulens (*vir*) bölgesinin çok önemli rol oynadığı görülmüştür (De Greve et al., 1981; Holster et al., 1980; Şekil 2.1). Oktopin tipi plazmid üzerinde yapılan araştırmalarda *vir* bölgesinin altı ana operon olan *VirA*, *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirE* ve *VirG* bölgelerini taşıdığı tespit edilmiştir (Stachel and Nester, 1986; Şekil 2.2). *Vir* genleri; yaralanmış hücrelerin salgıladığı fenolik bileşikler tanıma, T-DNA iplikciğinin rejenerasyonu ve T-DNA'nın bakteriden bitki hücrelerine geçişini sağlamaktadırlar (Stachel and Zambryski, 1986; Zambryski, 1992; Toro et al. 1989).



Şekil 2.1. T-DNA aktarımının mekanizması (Özcan ve Özgen 1996)

Gen aktarımında T-DNA üzerinde bulunan RB, LB ve virulens bölgelerinin dışında *Agrobacterium*' un kendi kromozomu üzerinde yer alan önemli bir bölge daha vardır. Bu bölgede üç adet lokus (chvA, chvB, pscA) bulunur. Bu lokuslar bakterinin bitki hücresine tutunmasında önemli rol oynamaktadır (Douglas et al., 1985). *Agrobacterium*, yaralanan bitki hücresinin hücre duvarına bitki tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin sinyalleri sayesinde tutunur (Nester and Gordon, 1988). Tutunma işleminden sonra T-DNA'nın, bitki hücresine aktarılmasında bir dizi moleküler olaylar gerçekleşmektedir. Bitki hücresine giren T-DNA bir veya bir kaç kopya halinde rastgele bitkinin kromozomuyla birleşir (Draper et al., 1988; Özcan, 1993).

#### **2.1.1.1.1. Bitkilere gen aktarımında markör genlerin kullanılması**

Onkogenleri çıkarılmamış T-DNA'yı taşıyan *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı yapıldığında, gen aktarımı yapılan bitki dokularında fitohormonlar sentezlenir. Bu durumda gen aktarılan materyal *in vitro* koşullarda fitohormonlara ihtiyaç duymadan gelişebilir. Böylece, transgenik materyalin tanınması mümkün olur. Ancak, böyle *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı yapıldığında anormal bitkiler geliştiğinden tercih edilmemektedir (Klee and Rogers, 1989). Diğer taraftan onkogenleri çıkarılmış *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarılmış hücreler, diğer hücrelerden farklı davranmadığından seçilmeleri mümkün değildir. Transgenik materyali ayırt etmek için markör (işaret) genler kullanılması bu sorunu ortadan kaldırmıştır. Markör genler aktarıldığı bitki hücre ve dokularının antibiyotik veya herbisite karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Böylece, antibiyotik veya herbisit ilave edilen seçici ortamlarda çoğalan hücrelerden transgenik bitki elde etmek mümkün olmaktadır. Bu markör genlerden bazıları Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Gen aktarımında yaygın olarak kullanılan bazı markör genler (Özcan, 1993)

| Markör Genin Elde Edildiği Organizma      | Dayanıklılığı Sağlanan Antibiyotik veya Herbisit | Markör Genin Adı                           | Referans                                                                                             |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E.coli</i>                             | Kanamisin<br>Neomisin<br>G418                    | Neomisin<br>fosfotransferaz II<br>(NPT II) | Bevan et al., 1983;<br>Herrera-Estrella et al., 1983;<br>Guerche et al., 1987a<br>Okada et al., 1986 |
| <i>E. Coli</i>                            | Higromisin B                                     | Higromisin<br>fosfotransferaz<br>(Hpt)     | Vanden Elzen et al., 1985<br>Waldron et al., 1985                                                    |
| Fare                                      | Metathotreksat                                   | Mouse dihidrafolat<br>reduktaz<br>(DHFR)   | Herrera-Estrella et al., 1983;<br>Eichollz et al., 1987                                              |
| <i>S. hyroscopicus</i><br><i>Bar</i> geni | Bialafus                                         | fosfonitrisin<br>asetiltransferaz<br>(PAT) | Spencer et al., 1990                                                                                 |
| <i>E.coli</i>                             | Bleomisin                                        | Bleomisin                                  | Hille et al., 1986                                                                                   |
| Mutant<br><i>Arabidopsis</i><br>ALS geni  | Sulphonylurea                                    | Asetolaktat sentez<br>(ALS)                | Haughn et al., 1988                                                                                  |

Seçici markör genlerin dışında, gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların belirlenmesinde raportör genler de kullanılmaktadır. Örneğin,  $\beta$ -glucoronidase (GUS) markör genini taşıyan transgenik bitki dokuları X- Gluc içerisinde GUS aktivitesinin histokimyasal lokalizasyonu ile belirlenebilmektedir (Özcan ve Özgen, 1996).

#### 2.1.1.1.2. T-DNA bölgesine istenen genlerin klonlanması

Ti plazmidinde bulunan T-DNA bölgesine markör veya tarımsal öneme sahip genlerin doğrudan aktarılması, Ti plazmidinin büyük hacimli olmasından dolayı pratik olmamaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). Bu yüzden, bitkilere aktarılabilecek genler önce aracı plazmidlere klonlanır. Daha sonra bu plazmidler ko-entegratif vektör içeren *A. tumefaciens*'e aktarılır. Ko-entegratif vektör T-DNA bölgesinin büyük bir bölümü çıkarılmış onun yerine aracı plazmide homolog olan bir DNA parçası yerleştirilmiş vektörlerdir. Böylece, ko-entegratif vektör içeren *Agrobacterium*'a istenen genleri taşıyan plazmidler aktarıldığında homolog rekombinasyon ile Ti plazmidinin T-DNA'sına bağlanmış olur (Özcan ve Özgen, 1996). Ancak, ko-entegratif vektörler kullanıldığında bitkilere istenmeyen DNA parçası da aktarılabilmektedir (Özcan, 1993).

Hoekema et. al., (1983), tarafından geliştirilen binary (çift) vektörler hem replikasyon hem de konjugasyon faktörlerini içeren küçük plazmidlerdir. Bu plazmidlerde T-DNA bölgesi tamamen çıkarılmıştır. Ti plazmidi sadece *vir* bölgesini taşır. Binary vektörler, seçici bitki markör genlerinin, bakteriyel seleksiyon markörlerinin, hacimlerinin ve 25 bp nükleotid dizilerin kökenlerinin farklı olması nedeniyle birbirlerinden farklıdır (Özcan ve Özgen, 1996). Bu plazmidler gen aktarımında oldukça yaygın kullanılmaktadır. Hatta super binary vektörlerin geliştirilmesi ile tek çenekli bitkilere de *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılabilmektedir (Tingay et al., 1997; Ishida et al., 1996; Hiei et al., 1997).

### **2.1.1.1.3. *Agrobacterium* ile gen aktarımında kullanılan eksplantlar**

Başarılı bir gen aktarımı yapılabilmesi, yüksek oranda sürgün rejenerasyonu oluşturan eksplantın belirlenmesine bağlıdır. Transgenik bitki üretebilmek, ancak gen aktarılan hücrelerin sürgün oluşturma kabiliyetinde olması ile mümkündür. Bitkilere gen aktarımı için; bitkinin yaprak, gövde, hipokotil, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo, kök, çiçek dokuları gibi kısımlarının yanında protoplastlar, hücre süspansiyonları ve kallus dokuları da eksplant olarak kullanılmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). Seçilen eksplantların fizyolojik yaşı, büyüklüğü, ana bitkinin kalitesi yüksek oranda sürgün rejenerasyonu (Gönülşen, 1987) ve dolayısı ile gen aktarımının başarısı için son derece önemlidir. Eksplantlar bir gece önce büyütülen *Agrobacterium* kültürü ile inoküle edilirler. Bitkinin yaralı yüzeyine tutunan bakteriler T-DNA larını bitki hücresinin kromozomuna aktarabilmesi için, içerisinde bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu katı ortamda 2-3 gün süreyle bekletilirler (ko-kültivasyon). Ardından eksplantlar, *Agrobacterium*'un daha fazla gelişip eksplantın ölümüne neden olmaması için içerisinde antibiyotik olan bir başka agarlı ortama alınırlar. Bu ortam, aynı zamanda yalnızca gen aktarılmış hücrelerin gelişmesini sağlayan seçici antibiyotik ve bu hücrelerin kallus oluşturmaya veya sürgün oluşturmaya için gerekli hormonları da içerir (Özcan, 1993).

### **2.1.1.2. Doğrudan gen aktarımı**

Transgenik bitki elde edebilmek için bir çok doğrudan gen aktarım yöntemi gelişmiş olmakla birlikte, partikül tabancası ve protoplastlara gen aktarımı en fazla kullanılanlardır.

#### 2.1.1.2.1. Partikül tabancası ile gen aktarımı

Bu yöntemde, DNA ile kaplanmış, 1-2  $\mu\text{m}$  çaplı ağır metal partiküllerinin (altın veya tunsten) bitki hücre ve dokularına nüfuz etmesi sağlanır. Metal parçacıklarının bitki hücresine girebilmesi için hidrojen ya da helyum gazı ile parçacıklara hız kazandırılır. Bu yolla hücre içerisine giren parçacıklardan, DNA'lar ayrılarak bitki genomuyla birleşir (Klein et al., 1987; McCabe et al., 1988). Gen aktarım oranını partiküllerin sayısı ve hızı ile partiküllere DNA'nın yapışmasını sağlayan spermidin ve Ca konsantrasyonları önemli ölçüde etkiler (Özcan, 1993). Partikül tabancasıyla yaprak, embriyo, sürgün ucu, kültüre alınmış hücreler, polen ve mikrosporlar gibi tüm doku ve hücre tiplerine gen aktarılabilmektedir. Ayrıca *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarılamayan önemli monokotiledonlara ve bazı *Agrobacterium* enfeksiyonuna dayanıklı dikotiledonlara da bu teknik ile gen aktarılabilmektedir. Örneğin, pamuk (Finner and Mc Mullan, 1990), soya (Mc Mullen and Finner, 1990; McCabe et al., 1988), mısır (Gordon-Kamm et al., 1990), buğday (Weeks et al., 1993) ve çeltik (Christou et al., 1991) bu yöntemle elde edilmiş transgenik bitkilerden bazılarıdır.

#### 2.1.1.2.2. Protoplastlara gen aktarımı

Bu yöntemde, yabancı genleri taşıyan DNA parçasının elektrik akımı ya da kimyasallar kullanılarak bitki hücre zarından içeriye girmesi sağlanır (Özcan, 1993). Protoplastlara DNA aktarımında, en çok kullanılan kimyasal madde (PEG) polietilen glikol'dür (Draper et al., 1988). DNA içeren solüsyona % 15-25 oranında PEG ilave edildiğinde, hem bitki hücre zarında gözenekler oluşur hem de DNA protoplast üzerine çöker. Böylece DNA'nın bitki hücresine geçişi teşvik edilir (Freeman, 1988). Elektrik akımının kullanılması

kimyasallara göre daha kolay bir tekniktir. Bu teknikte bitki hücre zarında DNA'nın geçebileceği küçük gözenekler (30 nm) oluşturmak için elektrik akımı verilir (Okado et al., 1986). Açılan gözenekler kısa süreli olur ve elektrik akımının verilme süresi ile miktarı çok önemlidir (Draper et al., 1988; Lindsey et al., 1988). Bu yüzden elektroporasyon ile protoplastlara gen aktarımında ya kısa süreli yüksek voltaj (1,5 kV, 10  $\mu$  sec) veya uzun süreli düşük voltaj (350 V, 54 m sec) uygulaması yapılır (Draper et al., 1988; Özcan ve Özgen, 1996). Elektroporasyon yöntemiyle transgenik domates (Bellini et al., 1989), kolza (Guerche et al., 1987b) ve marul (Chupeau et al., 1989) bitkileri elde edilmiştir.

Daha önceki bölümlerde de belirtildiği gibi bitki hücrelerine DNA'nın aktarılması yeterli olmamaktadır. Gen aktarılan hücrelerden etkili bir adventif sürgün rejenerasyon yöntemi ile transgenik bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir (Özcan vd., 1997).

### 2.1.2. Adventif sürgün rejenerasyonu

Bitkiler; izole edilmiş bir sürgün, kök, yaprak, çiçekler ve hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan bütün bir organizmayı rejenerasyon edebilme kapasitesine sahiptirler (Gönülşen, 1987). *İn vitro'* da hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonunu başarabilmek için uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun ortamın belirlenmesi ve fiziksel çevre koşullarının uygun olması gerekmektedir (Murassige, 1974; Evans et al., 1981; Ammirato, 1983a).

Doku kültüründe en çok kullanılan temel ortam Murassige ve Skoog (1962)' un geliştirdiği besin ortamıdır. Bitki rejenerasyonunda kullanılan besin ortamları bitki büyümesi için gerekli olan makro ve mikro elementler ile enerji

kaynağı olan şekeri içerir. Bu ortamlar agar ilave edilerek katılaştırılır. Besin ortamına eklenen bitki büyümesini düzenleyiciler de bitki rejenerasyonunda en önemli faktörlerdir. Genelde, yüksek oranda oksin (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) bulunan ortamlar kallus ve kök gelişimini teşvik ederler (Miller and Skoog, 1953; Paulet, 1965; Nitsch, 1968). Sitokininlerin (BA, 2 IP, Zeatin , Kinetin) bulunduğu ortamlarda ise adventif sürgün rejenerasyonu teşvik edilir.

Bitki hücre ve dokulardan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu organogenezis ve embriyogenezis olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir.

#### 2.1.2.1. Organogenezis

Normalde bir bitkinin tohumunu oluşturan hücreler, büyüme ve farklılaşma dönemi geçirerek bitkinin kök, gövde ve yapraklar gibi farklı organlarını oluştururlar. Farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan bu değişiklikler bitkinin normal hayat döngüsünde yaşamının sonuna kadar aynı şekilde kalır. Ancak, yapılan araştırmalar, tamamen farklılaşan hücrelerin eğer bozulmamış bir hücre membran sistemi ve canlı bir çekirdeği mevcut ise tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitotik bölünme gösterebileceğini ortaya koymuştur. İşte bu bölünmeler sonunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenezis) ya da hücreler yığını olan kallus ve bu kallustan sürgün ya da kök meydana gelir (indirekt organogenezis) (Gürel, 1997). İndirekt organogeneziste eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan hücre yığınlarının (kallus) oluşması için uyandırılır. Daha sonra bu kallus üzerinde meristematik bir merkez ve ardından sürgün ya da kök oluşumu gözlenir. Direkt organogeneziste ise hiç kallus gelişimi olmadan sürgün gelişimi gözlenir.

Organogenezis hücre ve dokulardan yeni bir bitki oluşmasını sağladığı için, generatif yollardan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretilmesini de sağlar. Ayrıca, bitkilere gen aktarımında başarı sağlanması ancak, optimize edilmiş bir rejenerasyon yöntemi ile mümkündür. Bu nedenle bütün bitki türleri hatta her türün çeşitleri için özel bir sistemi optimize etmek ve böylece organogenezisi başarmak gerekir.

Besin ortamına ilave edilen hormonlardan oksin ve sitokin oranına göre kök veya sürgün oluşabilir, ya da kallus gelişmeye devam eder. Bir çok bitkide sitokin adventif sürgün oluşumunu teşvik eder, oksin ise genellikle engeller (Miller and Skoog, 1953; Paulet, 1965; Nitsch, 1968) .

#### **2.1.2.2. Embriyogenezis**

Somatik hücrelerden elde edilen embriyolara somatik embriyo, adventif embriyo veya vejetatif embriyo adı verilir . Somatik embriyoların gelişimi de zigotik embriyoların gelişimine benzer. Somatik embriyogenezis için çok değişik bitki kısımları kullanılır. Özellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolar olmak üzere, çiçek kısımları, anterler, polen ve endosperm dokularının somatik embriyogenezis için iyi bir başlangıç olduğu bildirilmiştir (Pierik, 1987; Sharp et al., 1982; Er ve Canpolat, 1992).

Somatik embriyogenezis'i etkileyen faktörlerin başında bitkinin genotipi gelir. Soya (Parnott et al., 1988), mısır (Green and Phillips, 1975; Beckert and Qing, 1984), arpa (Hanzel et al., 1984), buğday (Sears and Deckard et al., 1982) ve pamuk (Trolinder and Xhixion, 1989) gibi bir çok kültür bitkisinde bireysel genotiplerin somatik embriyo oluşumunu etkilediği belirlenmiştir. Başarılı bir embriyogenezis için besin ortamının optimize edilmesi gereklidir (Gamborg

and Shyluk, 1981). Somatik embriyogenezis, besin ortamına oksin ilave edilerek teşvik edilir (Sharp et al., 1982). En fazla kullanılan oksin 2,4-D'dir (Ammirato, 1983b; Button et al., 1974). Embriyoidler oluşmaya başladıktan sonra eksplantlar ya az oranda büyümeyi düzenleyici içeren ya da büyümeyi düzenleyici içermeyen ortama aktararak embriyoların gelişmesi ve çimlenmesi sağlanır.

Somatik embriyogenezis de direkt ve indirekt olmak üzere iki tipte oluşur (Sharp et al., 1982). Direkt somatik embriyogenezis'de, somatik embriyolar hücre ya da dokudan ara bir kallus oluşmadan gelişirler. Bu şekilde embriyogenezis genellikle bitkilerin gövde ve epidermal hücreleri eksplant olarak kullanıldığında görülür (Pierik, 1987). İndirek somatik embriyogenezis'de ise kültüre alınan protoplast ya da eksplantlardan önce kallus oluşumu gözlenir, ardından kalluslar üzerinde embriyoidler oluşur. Embriyo ve embriyoidler tek hücreden gelişebildiği gibi hücre gruplarından da gelişebilir. Aslında eksplantlar üzerindeki hücrelerin çok az bir kısmı kallus oluşturma eğilimindedirler. Kallus oluşturan hücreler eksplantın yüzeyine yakın ve besin ortamı ile temas halinde olan hücrelerdir (Evans et al., 1981).

İndirekt somatik embriyogenezis yönteminde somatik embriyoların elde edilmesinden önce ara bir kallus safhası olduğundan *A. tumefaciens* ile gen aktarımında kullanılabilir. Gen aktarımı yapılan hücrelerden önce embriyogenik kallus üretilmekte ve bu kallustan önce embriyolar, sonrada transgenik bitkiler elde edilmektedir. *A. tumefaciens* ile gen aktarımı ve somatik embriyogenezis sisteminin beraber kullanılmasıyla transgenik bitkiler elde edilmiştir (D' Halluin et al., 1990; Umbeck et al., 1987; Thomas et al., 1989; Everett et al., 1987).

## 2.2. Kaynak Araştırması

### 2.2.1. *Brassica* türlerinde adventif sürgün rejenerasyonu

Dunwell (1981), *B. oleraceae*, *B. napus*, *B. campestris* türlerinde yaprak disklerini, BAP ve NAA'nın değişik kombinasyonlarını içeren besin ortamında kültüre aldıklarında her tür için gerekli olan optimum büyümeyi düzenleyici oranını farklı bulmuşlardır. Bunlar; *B. oleracea* için 10 mg/l BAP ve 1mg/l NAA, *B. napus* için 10 mg/l BAP ve 10 mg/l NAA, *B.campestris* için ise 1 mg/l BAP ve 10 mg/l NAA'dır.

Lazzeri and Dunwell (1984), *B. oleracea italica* cv. Green Comet çeşidinin kök segmentlerinin sürgün rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. Sürgün rejenerasyonunun fidenin yaşına bağlı olarak hipokotille bağlantılı kök parçalarında yüksek, kök uçları ile bağlantılı parçalarında ise düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Nitrojen kaynağının düşürüldüğü ortamda ve sıvı ortama göre agarlı ortamda rejenerasyonun arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, kinetin'in en iyi sitokinin, IAA ile picloram'ın ise sürgün rejenerasyonu için en iyi oksinler olduğunu tesbit etmişlerdir. Optimize ettikleri ortamda *B. napus* ve *B. campestris*'in bazı çeşitlerinin kök parçalarını denemeye almışlardır. *B.napus* ve *B. oleracea* çeşitlerinde sürgün elde edebildiklerini ancak, *B. campestris*'in çeşitlerinde sürgün elde edemediklerini bildirmişlerdir.

Klimaszewska and Keller (1985), Kolzanın Westar çeşidinde ince hücre katmanlarını (epidermis ve 4-9 kat subepidermal hücreler) eksplant olarak kullanmıştır. Sürgün rejenerasyonu ortamına (0,5 mg/l NAA ve 5 mg/l BAP içeren) demir kaynağı olarak 40 mg/l Fe-330 eklenmiştir. Ortamı optimize etmek için BAP (5 mg/l) sabit tutularak NAA, 2-4 D, IAA, IBA, 2,44,5-T ve

picloram gibi oksinler 0,5-2 mg/l oranında besin ortamına ilave edilmiştir. Sürgün oluşumunun sadece NAA içeren ortamda gözlemlendiği, diğer oksinlerin bulunduğu ortamlarda ise eksplantlar üzerinde yalnızca kallus oluşumunun gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, NAA (0,5 mg/l) sabit tutularak BAP, BA-riboside, kinetin, N6 ve zeatin gibi sitokininlerin 1-5 mg/l oranında kullanıldığı besin ortamlarında bütün sitokininlerin sürgün oluşumunda etkili olduğu, ancak BAP'ın (10-15 mg/l) en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir. Oksinler ya da sitokininler tek başına kullanıldığında ise sürgün rejenerasyonunun gözlenmediği bildirilmiştir. Besin ortamında bulunan nitrojen içeriğinin Organogenezisi etkilediği belirtilmiş ve en iyi nitrojen kaynağının  $\text{NO}_3^-$  olduğu tespit edilmiştir.

Narasimhulu and Chopra (1987), *Brassica*'nın üç temel diploid türü olan *B. campestris*, *B. nigra*, *B. oleracea* ve bunların amfidiploidleri olan *B. juncea* ile *B. napus*'un bazı çeşitlerinde kotiledon eksplantı kullanarak etkili bir adventif sürgün rejenerasyon yöntemi bulmaya çalışmışlardır. Sürgün rejenerasyonuna olan tepkiyi değişik büyümeyi düzenleyicilerin kombinasyonlarında karşılaştırdıklarında; *B. campestris*'in en düşük (ortalama % 6,6), *B. nigra* (ortalama % 17,3) ile *B. juncea* (ortalama % 26,8)'nın da en yüksek sürgün rejenerasyon kabiliyetine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, sürgün rejenerasyon frekansının *B. oleracea*'da ortalama % 14,8 ve *B. napus*'da ortalama % 10,0 olduğunu tespit etmişlerdir.

O'Neill et al., (1996), Westar ve Cobra çeşitlerinde gövde boğum arası eksplantını kullanarak rejenerasyon ortamına prolin, tyo-prolin ve MGBG (methylglyoxal-bis-guanylhyazone) ilave edilmesinin sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Uygulamada, 10-20 mM prolin ve 0,5-1 mM tyo-prolin dozları kullanarak bir hafta sonra kallus oluşumu, üç hafta sonrada

sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Hem prolin hem de tyo-prolin'in sürgün rejenerasyonunu 2-5 kat azalttığını gözlemişlerdir. Bu beklenmeyen engelleyici etkiden literatürlerde hiç bahsedilmediği, aksine diğer türlerin rejenerasyon ve embriyo kültürlerinde prolin'in olumlu etkisinden bahsedildiğini belirtmişlerdir. MGBG'nin sürgün rejenerasyonuna etkisinin ise genotipe bağlı olduğunu; kışlık Cobra çeşidinde rejenerasyonu azaltıcı bir etki göstermesine rağmen, yazlık Westar çeşidinde rejenere olan eksplant sayısını % 50 oranında artırarak, % 92' ye çıkardığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, daha önce literatürlerde belirtilen gövde eksplantlarında % 80-100 oranında sürgün rejenerasyonunu elde edemediklerini, ancak % 50-60 düzeylerinde sürgün rejenerasyonu elde edebildiklerini belirtmişlerdir.

Yang et al., (1991), *B. carinata*'nın hipokotil eksplantlarının 2,00 mg/l BAP ve 0,01 mg/l NAA veya 4,00 mg/l kinetin ve 0,01 mg/l 2,4-D kombinasyonlarında % 100 adventif sürgün rejenerasyonu verdiğini belirlemişlerdir. Yüksek sürgün rejenerasyonunun 6-7 günlük eksplantlardan elde edildiğini ve distal olanların proksimal olanlardan, ayrıca üst hipokotiller segmentlerinin alttakilerden daha fazla rejeneratif olduğunu tesbit etmişlerdir.

Khehra and Mathias (1992), kolzanın Westar, Ariana, Cobra, Libravo çeşitlerinde kotiledon, hipokotil ve gövde segmentlerini üç farklı BAP ve NAA kombinasyonu içeren ortamlarda kültüre aldıkları araştırmalarında adventif sürgün rejenerasyonu sıklığının belirlenmesinde eksplant tipi, genotip ve büyüme düzenleyicilerinin önemini değerlendirmişlerdir. Sonuçta, sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi ve genotip olduğunu belirtmişlerdir. Gövde eksplantının kotiledon ve hipokotil eksplantına göre 2-3 kat daha fazla sürgün rejenerasyonu oluşturduğu belirtilmiştir.

Turgut vd., (1994a), kolzanın Topaz çeşidinde 2/3 kotiledon ve petiolü de içeren tam kotiledon eksplantlarını kullanarak çeşitli büyümeyi düzenleyicilerinin morfogenezis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada, 2/3 kotiledon eksplantı kullanıldığında en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu (% 80) 2,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren besin ortamından, petiolü de içeren tam kotiledon eksplantı kullanıldığında ise (% 90) 4,00 mg/l BAP; 2,00 mg/l kinetin ve 0,10 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, olgunlaşmamış embriyo eksplantında BAP ve NAA'nın değişik konsantrasyonlarının morfogenezis üzerinde etkisi araştırılmıştır. En yüksek adventif sürgün rejenerasyonunun ve somatik embriyogenezisin 10,00 mg/l NAA ve 0,25 mg/l BAP içeren besin ortamından elde edildiği belirtilmiştir.

Burnett et al., (1994), *Brassica campestris*'in Horizon çeşidinde tohum çimlenme ortamında NAA veya BAP'in bulunmasının sürgün rejenerasyonunu belirgin şekilde etkilediğini tespit etmişlerdir. Eksplant (kotiledon) yaşının sürgün rejenerasyon oranını etkilediğini, en iyi sonucun 3-4 günlük fidelerden alınan eksplantlardan elde edildiğini belirtmişlerdir. Rejenerasyon ortamına etilen inhibitörü olan AVG (aminoethoxyvinylglycine)'in 1,0  $\mu$ M ilave edilmesiyle sürgün rejenerasyonunun 3 kat arttığını tesbit etmişlerdir. AVG'nin kullanılan diğer etilen inhibitörlerinden de ( $\text{AgNO}_3$  ve MGBG: methylglyoxal-bis-guanylhyazone) daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Ancak, tohum çimlenme ortamına etilen inhibitörlerinin ilave edilmesinin, kotiledon eksplantlarının rejenerasyon başarısını artırmadığını tespit etmişlerdir. Çimlenme ortamına BAP ilave edilmediğinde, çimlenen fidelerden alınan eksplantlardan % 19,2 oranında sürgün rejenerasyonu elde edilirken, çimlenme ortamına 4,44  $\mu$ M BAP ilave edildiğinde bu oranın % 33,2 olduğu belirtilmiştir. *B. napus*'da sürgün rejenerasyonu için etilen inhibitörüne ihtiyaç

duyulmamasına (Fry et al,1987; Radke et al, 1988; Moloney et al, 1989) rağmen, diğer *Brassica* türlerinden elde edilen sürgün rejenerasyonlarında etilen inhibitörlerinin önemli roller oynadığı (Facciotti et al,1990; Chi et al., 1990; Sethi et al, 1990) belirtilmiştir.

Ono et al., (1994), 100 kolza çeşidinde, kotiledon eksplantının ve eksplant yaşının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyonu 4 günlük fidelerden elde edilen kotiledonların 4,00 mg/l BAP içeren besin ortamında kültüre alındığında elde edilmiştir. Ayrıca, sürgün rejenerasyon oranına yazlık ve kışlık kolza çeşitlerinin bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Rejenere edilen bitkiler 2,00 mg/l IBA içeren ortamda köklendirilmiştir.

Zhao et al., (1996), kolzanın Topaz çeşidinde kolkisin muamelesi yapılan mikrosporlardan mikrospor embriyogenezi ile yüksek oranda genom dublikasyonu elde etmişlerdir. Elde edilen bitkilerin çoğunun (% 90) normal büyüme ve gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir.

Eapen and George (1997), *B. jucea*, *B. campestris*, *B. napus*, *B. craniata* ve *B.nigra* türlerinde çiçek sapı eksplantını kullanarak gümüş nitrat ve gümüş tiyosülfatın sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Sürgün rejenerasyon ortamı olarak 10  $\mu$ M BAP, 0,5  $\mu$ M NAA ve % 0,9 agar içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortama 30  $\mu$ M gümüş nitrat veya gümüş tiyosülfat eklediklerinde elde ettikleri sürgün tomurcuk sayısının genotipe bağlı olarak arttığını tespit etmişlerdir. Gümüş iyonlarının etilenin fizyolojik aktivitesinin inhibitörü olarak görev yaptığını, bu nedenle rejenerasyon potansiyelini artırdığını bildirmişlerdir.

### 2.2.2. *Brassica* türlerine gen aktarımı

Ooms et al., (1985), kolzanın Rafal, Willi, Jet Neuf, Brutor çeşitlerinin *A. tumefaciens* T37 ve *A. rhizogenes* LBA 9402 hatlarına karşı enfeksiyon tepkisini ve genetik olarak transforme olan kolza bitkisinin rejenere olma ihtimalini incelemiştir. *Agrobacterium*'un sebep olduğu tümör veya saçak kök sıklığını çeşitlere bağlı olarak % 10-70 arasında bulmuşlardır. Tütünde, T37 hattının sebep olduğu tümörlerin güçlü sürgünler oluşturduğu bilinirken, kolzada çok sayıda kökler oluşturduğu nadiren sürgün meydana geldiğini bildirmişlerdir. Oluşan az sayıdaki sürgünlerden bazılarının da nopalin tümör hücreleri ürettiğini tesbit etmişlerdir. Bu durumu, farklı olmayan tümör dokularından farklı transforme edilmiş sürgünler elde edilebileceği şeklinde izah etmişlerdir. T37 kullanarak transforme edilmiş bitkiler elde edemediklerini, ancak Ri T-DNA aktarılmış bitkileri rejenere edebildiklerini bildirmişlerdir.

Fry et al., (1987), *Westar* çeşidinin gövde segmentlerini pMON200 ve pMON120 plazmidlerini taşıyan *A. tumefaciens* hatları ile 5 d inoküle ederek, ko-kültivasyondan sonra 100 mg/l km içeren seleksiyon ortamına almışlardır. Transformasyon için pMON200 kullanıldığında 50 mg/l kanamisinli ortamda % 19,4 ve 100 mg/l kanamisinli ortamda ise % 12,7 oranında sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Transformasyon için pMON120 (Kanamisine dayanıklılık geni içermeyen) hattı kullanıldığında ise hiç sürgün elde edememişlerdir. Seleksiyon ortamında 100 mg/l km bulunduğunda transformasyon sıklığını %7 olarak bulmuşlardır. Seleksiyon ortamında 100-200 mg/l km bulunmasının sürgün sayısını düşürdüğünü, 50 mg/l km bulunduğunda ise sürgün sayısının yükseldiğini ancak, kaçak sayısının

arttığını bildirmişlerdir. Transformasyonu opin üretimi, km-direnci ve ilk transgenik bitkilerde DNA blot hybridizasyonu doğrulamıştır.

Radke et al., (1988), kolzanın Westar çeşidinde hipokotil eksplantından % 26 oranında sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Sürgün rejenerasyonu ortamı olarak B<sub>5</sub> tuzları, 1,00 mg/l 2,4-D, 1,00 mg/l kinetin, % 6 agar kullanmışlardır. *A.tumefaciens* pTiBo542 onkogenik plazmidini içeren A 281 ve pCGN767 binary vektörünü içeren EHA 101 hatlarını bir gece büyüttükten sonra hipokotil eksplantlarını 1x10<sup>8</sup> bakteri/ml seyreltilmiş bakteri kültüründe inoküle ettiklerini ve 24, 48, 72 saat ko-kültivasyon işlemi yaptıklarını bildirmişlerdir. Transformasyon sıklığının ko-kültivasyon süresinin uzamasıyla azaldığını, ancak çok sayıda kanamisine dirençli kallus ve NPT II pozitif sürgünlerin 48 saatlik uygulamadan elde edildiğini bildirmişlerdir. Üç farklı dozda uygulanan km dozlarından (10, 25, 50) en fazla transgenik sürgünün (% 2,5 oranında) 25 mg/l km'in ilave edildiği ortamdan alındığı belirtilmiştir.

Neuhaus et al., (1987), kolza mikrosporlarından gelişen embriyoidlere mikroenjeksiyon yöntemi kullanarak gen aktarımı metodu geliştirmeye çalışmışlardır. Embriyoidlere NPT-II genini mikroenjekte ederek, 8 hafta içerisinde embriyogenezis yoluyla çok sayıda haploid bitki rejenerasyonu elde etmişlerdir. Transformasyon oranının % 27-51 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Transgenik bitkilerin tesbitini primer rejenerantlarda DNA dot blot analizi ile belirlemişlerdir. Yine, bu bitkilerde NPT-II aktivitesini enzim analizi ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada kolza embriyoidlerinin daha ileriki gelişme safhalarında da (kalp şeklindeki embriyolara kadar) başarılı bir şekilde enjekte edilebileceğini ve aynı tekniğin zigotik embriyoların transformasyonları için de başarılı olacağını bildirmişlerdir.

Charest et al., (1988), Westar çeşidinde *A.tumefaciens* hatları kullanarak ince hücre katmanlarına gen aktarımı yapmışlardır. pGV3850 pLGV1103neo ile inoküle edilen 600 eksplanttan elde edilen sürgünlerin 12 tanesinin nopalın sentezi gösterdiğini bildirmişlerdir. *Nicotiana tabaccum* üzerinde kanamisinin yüksek dozlarına dayanıklılığı sağlayan seçici marker genlerinin *B. napus*'un transgenik sürgünlerinin seleksiyonunu sağlamadıklarını tespit etmişlerdir.

De Block et al., (1989), kolzanın Westar ve R8494 çeşidi ile *B. oleracea*'nın Walcheria ve Andersen çeşitlerinde *A. tumefaciens* C58C1Rif (pMP90) pGSFR780A hattı kullanarak kanamisin veya *bar* seçici markör genlerine dayalı bir metod geliştirmişlerdir. Hipokotil eksplantından başarılı sürgün rejenerasyonu için gümüş nitrat kullanılmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, vitrifikasyonu önlemek için ortamdaki su potansiyelini ve sitokinin konsantrasyonunu azaltmışlardır. Transforme edilmiş sürgünlerin 9-12 hafta arasında elde edildiğini ve oranının % 30 olduğunu bildirmişlerdir. Transformantları Southern blott analizi ile belirleyerek 1-3 arasında kimerik gen kopyaları içerdiklerini bildirmişlerdir. Transforme edilen bitkilerin % 25' inde fosfinotrisin asetiltransferaz veya NPT-II aktivitesinin görülmediğini halbuki, Southern blott analizi ile bu bitkilerin transgenik olduklarının doğrulandığını bildirmişlerdir.

Moloney et al., (1989), kolzanın Westar çeşidinde petiollü kotiledon eksplantlarını, pCGN783 binary vektörünü içeren EHA101 *A. tumefaciens* hattı ile üç gün inoküle ettiklerini, daha sonra sürgün rejenerasyon ortamına (MS, 20 µM BA, % 7 agar, 500 mg/l karbenisilin ve 15 mg/l kanamisin) aldıklarını bildirmişlerdir. Bu seçici ortamda rejenerasyon sıklığını % 60 dan fazla bulmuşlardır. Transformasyon çalışmalarında seçici ortamda az sayıda

kaçak bitkilere de rastlandığını, bu bitkileri alt yapraklarında görülen antosiyan renklenmesiyle teşhis ettiklerini bildirmişlerdir.

Mısra (1990), *Westar* çeşidinin gövde epidermal eksplantını kullanarak, *A. tumefaciens* (oktopin tipi tümör oluşturan pTi B653-SE plazmidi içeren) aracılığıyla fertil transgenik bitkiler elde etmiştir. Bir ile üç günlük kültüre alınmış eksplantları (kallus oluşumu başladığında) 1/10 oranında seyreltilmiş bakteri kültürü ile 5 d inoküle etmiştir. Ko-kültivasyonda 48 saat beklettiği eksplantları 10,00 mg/l BAP ve 0,50 m/l NAA , 500 mg/l karbenisilin ve 100 mg/l kanamisin içeren seleksiyon ortamına aktarmıştır. Transformasyon başarısının % 2 olduğunu belirtmiştir.

Damgaard and Rasmussen (1991), kolzanın line ve 1046 çeşitlerine 7 günlük hipokotil eksplantlarının *A. rhizogenes* hatları ile inokülasyonu sonucunda saçak kök oluşum yeteneğine sahip transgenik bitkiler elde etmişlerdir. İnokülasyondan sonra eksplantları ya ışıktaki ya da karanlıkta bekletmişlerdir. Saçak kök oluşum yeteneğinin hipokotildeki enfekte olan bölgenin yerine çok bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Transforme edilmiş kök ve sürgün klonlarına opin analizi yapmışlar ve % 7-31 arasında pozitif sürgün belirlemişlerdir. Daha sonraki seleksiyonun ise km bulunan ortamda yapıldığını ve opin-pozitif olan kök klonlarının NPT II aktivitesi gösterdiğini gözlemişlerdir.

Radke et al., (1992), *B. campestris ssp. oleifera* Tobin ve Emma çeşitlerinde hipokotil eksplantları kullanarak rejenerasyon ve transformasyon denemeleri yapmışlar ve AgNO<sub>3</sub> ve 2,4-D'nin sürgün rejenerasyonunu artırdığını tespit etmişlerdir. *A. tumefaciens*'in NPTII ve GUS genlerini taşıyan binary plazmidlerini içeren EHA 101 hattını transformasyonda kullanarak üç haftada transgenik sürgün elde etmişlerdir. Tobin ve Emma çeşitlerinde

transformasyon frekansını % 1-9 olarak tespit etmişlerdir. En yüksek transformasyon frekansını (% 9) düşük kanamycin içeren (10 mg/l) ortamdan elde etmişlerdir. Transformasyonu NPT-II dot blot, GUS, Southern blot ve kanamycin'e dayanıklılık testleri ile tespit etmişlerdir.

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

Berthomieu et al., (1994), hem non-onkogenik hem de yabancı tip *A. tumefaciens* hatları kullanılarak *B. oleracea var. capitata*' da transformasyon yöntemi geliştirmeye çalışmışlardır. Metodu, Yabancı tip *A. tumefaciens* hattının bu bitkide sürgün tümörü oluşturması temeline dayandırmışlardır. Transformantları, GUS aktivitesinin histokimyasal analizi ile belirlemişlerdir. GUS pozitif olan bitkileri Southern analizi yaparak bu bitkilerin, T-DNA taşıdığını belirlemişlerdir. İnoküle ettikleri eksplantlardan oluşan 25 sürgünden bir tane transgenik bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Hong et al., (1997), kolza Westar çeşidinin polen spesifik "polygalacturonase" klonlarından Sta44G'ye ait A647-bp 5'-flanking fragmentini, GUS marker

geninin önüne klonlamışlardır. Daha sonra, A647-GUS genini *A. tumefaciens* aracılığıyla kolza bitkisine aktarmışlardır. Kotiledon eksplantlarını bir gece büyütülen *Agrobacterium* kültürüne değdirip, ko-kültivasyon ortamında üç gün, daha sonra 500 mg/l karbenisilin ilave edilen ortamda yedi gün bekletmişlerdir. Ardından eksplantlar 20 mg/l kanamisin ilave edilen ortama aktarılmıştır. Sta44/GUS ile kolzaya transformasyon başarısını % 12 olarak bulmuşlardır. Transgenik aday bitkilerinin anterlerini farklı gelişim devrelerinde iken histokimyasal GUS analizine tabi tutmuşlardır. GUS aktivitesinin sporogenezis safhasında görülmediğini, ilk olarak, tomurcuk 2 mm iken gözlemlendiğini ve anter gelişmesiyle arttığını bildirmişlerdir.

### 3. MATERİYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki materyali

Araştırmada 11 kolza çeşidi kullanılmıştır. Kullanılan çeşitlerin adları, orijinleri ve gelişme formu ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan kolza çeşitlerine ait bilgiler

| <i><b>Kolza çeşitleri</b></i> | <i><b>Orijini</b></i> | <i><b>Formu</b></i> |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Spok                          | Danimarka             | Yazlık              |
| Star                          | Danimarka             | Yazlık              |
| Helious                       | Danimarka             | Yazlık              |
| Kosa                          | Almanya               | Yazlık              |
| Westar*                       | Kanada                | Yazlık              |
| Tarok                         | Danimarka             | Kışlık              |
| Honk                          | Danimarka             | Kışlık              |
| Darmor                        | Fransız               | Kışlık              |
| Bienventi                     | Fransız               | Kışlık              |
| Quinta                        | Almanya               | Kışlık              |
| Cobra                         | Almanya               | Kışlık              |

\* Bu çeşit yalnızca gen aktarım çalışmalarında kullanılmıştır.

Çimlendirme ve sürgün rejenerasyonu ortamlarını optimize etmek için başlangıçta Tarok çeşidi kullanılmıştır. Daha sonra tüm çeşitler denenmiş ve en iyi sonuç veren çeşitler ile gen aktarımı denemelerine devam edilmiştir.

##### 3.1.2. Bakteri materyali

Çalışmada, onkogenik A 281 pTiBo 542 (Hood et al., 1986) ve C58 pTiC58 (Depicker et al., 1982) *A. tumefaciens* hatları ile Çizelge 3.2'de verilen non-onkogenik bakteri hatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Bakteri hatları ve özellikleri (Becker et al., 1992; Özcan, 1993)

| Bakteri Hattı<br>(Seçici Antibiyotik) | Yardımcı Plazmid<br>(Seçici Antibiyotik) | Vektör                    | Bitki Seleksiyonu     |
|---------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 2260 (100 mg/l rif)                   | pGV 2260 (50 mg/l cb)                    | p35S GUS-INT(50 mg/l km)  | km (50-100 mg/l)      |
| C58C1(100 mg/l rif)                   | pGV 2260 (50 mg/l cb)                    | pRGG neo5 (25 mg/l km)    | km (50-200 mg/l)      |
| C58C1(100 mg/l rif)                   | pGV 2260 (50 mg/l cb)                    | pRGG hpt (25 mg/l km)     | hyg (20-50 mg/l)      |
| C58C1(100 mg/l rif)                   | pGV 2260 (50 mg/l cb)                    | pRGG dhfr (25 mg/l km)    | mt (0,02-0,5 mg/l)    |
| C58C1(100 mg/l rif)                   | pGV 2260 (50 mg/l cb)                    | pRGG bar (25 mg/l km)     | bas/fos (0,5-10 mg/l) |
| LBA4404 (100 mg/l rif)                | pAL 4404                                 | pRGG htp (25 mg/l km)     | hyg (20-50 mg/l)      |
| LBA4404 (100 mg/l rif)                | pAL 4404                                 | pRGG bar (25 mg/l km)     | bas/fos (0,5-10 mg/l) |
| A 281                                 | pTiBo542                                 | pRGG hpt (25 mg/l km)     | hyg (20-50 mg/l)      |
| A 281                                 | pTiBo542                                 | pRGG bar (25 mg/l km)     | bas/fos (0,5-10 mg/l) |
| EHA 101                               | pEHA 101                                 | pRGG hpt (25 mg/l km)     | hyg (20-50 mg/l)      |
| EHA 101                               | pEHA 101                                 | pRGG bar (25 mg/l km)     | bas/fos (0,5-10 mg/l) |
| 15834 (100 mg/l rif)                  | pRI 15834                                | pRGG bar#2 (25 mg/l km)   | bas/fos (0,5-10 mg/l) |
| 15834 (100 mg/l rif)                  | pRI 15834                                | pRGG htp (25 mg/l km)     | hyg (20-50 mg/l)      |
| DisC58pB1 121-23                      | p C58                                    | pB1 121-23(25 mg/l km)    | km (50-200 mg/l)      |
| EHA pMOG 131                          | p EHA 101                                | pMOG 131 (strep 100 mg/l) | km (100 mg/l)         |
| EHA 101 pBI 121                       | p EHA 101                                | pB1 121 ( 25 mg/l km)     | km (100 mg/l)         |

rif: rifampisin, cb: karbenisilin, km: kanamisin, hyg: higromisin, mt: metotreksat, fos: fosfinotrisin, strep: streptomisin , bas: basta

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Bitki doku kültürleri

##### 3.2.1.1. Genel doku kültürü şartları

Tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmış olup, kullanılan alet ve ekipman önceden steril edilmiştir. % 3 sukroz içeren ve % 7'lik agar (Sigma Tip A) ile katılaştırılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı temel besin ortamı olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Ortamların hazırlığında saf su kullanılmıştır. Ayrıca, gerekli durumlarda besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyümesini düzenleyiciler ilave edilmiştir. Ortamın

Çizelge 3.3. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları

| ORTAMDA BULUNAN MADDELER                            | KONSANTRASYONU (mg/l) |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>Makro Elementler</b>                             |                       |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650,000              |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900,000              |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 440,000               |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 370,000               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170,000               |
| <b>Mikro Elementler</b>                             |                       |
| KI                                                  | 0,830                 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,200                 |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 22,300                |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 8,600                 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,250                 |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0,025                 |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0,025                 |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 27,850                |
| Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O              | 37,250                |
| <b>Vitaminler</b>                                   |                       |
| Myo-Inositol                                        | 100,000               |
| Nicotinic Acid                                      | 0,500                 |
| Pyrotinic Acid                                      | 0,500                 |
| Thiamine-HCl                                        | 0,100                 |
| Glicine                                             | 2,000                 |

pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanarak 5,8'e ayarlanmıştır. Besin ortamının sterilizasyonu 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C de 20 dakika otoklavda yapılmıştır. Her deneme, 3 ya da 4 tekerrürlü kurulmuş ve her petriye (100 x 10 mm'lik) 10 eksplant yerleştirilmiştir. Tüm kültürler 25 °C de 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta  $35\mu \text{ Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  florasana ışığında, kültür odasında büyütülmüştür.

### 3.2.1.2. Bitki büyümesini düzenleyiciler

Araştırmada kullanılan tüm büyümeyi düzenleyiciler Sigma Chemical Co. ya da Merck'den temin edilmiştir. Büyümeyi düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra saf su ile istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Büyümeyi düzenleyiciler, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Hazırlanan büyümeyi düzenleyicilerin stok solüsyonları +4 °C'de bir-iki ay saklanmıştır.

Çizelge 3.4. Kullanılan büyümeyi düzenleyiciler ve çözücüleri

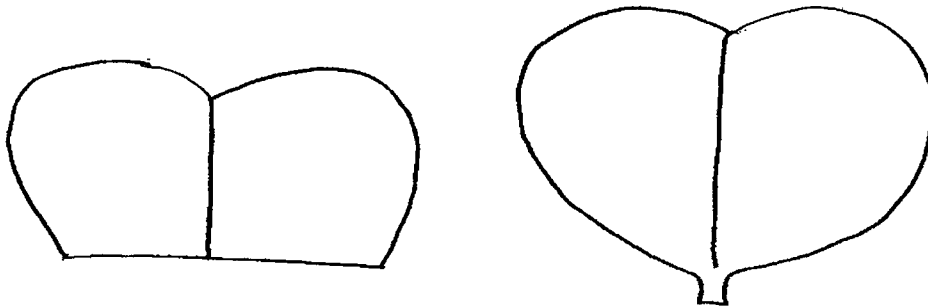
| Büyümeyi<br>Düzenleyiciler | Çözücü                        | Saklama<br>Koşulları °C |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <b>Oksinler</b>            |                               |                         |
| 2,4-D                      | 1N NaOH veya % 100'lük etanol | +4                      |
| NAA                        | 1N NaOH                       | +4                      |
| IBA                        | 1N NaOH veya su               | +4                      |
| <b>Sitokininler</b>        |                               |                         |
| TDZ                        | DMSO                          | +4                      |
| Kinetin                    | 1 N NaOH                      | +4                      |
| BAP                        | 1 N NaOH                      | +4                      |

### 3.2.1.3. Tohumların yüzey-sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Kolzanın üzerinde çalışılan çeşitlerine ait tohumları % 20'lik ticari çamaşır suyunda (Axion) 20 dakika manyetik karıştırıcıda çevrilerek yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra, 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır. Bu şekilde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan tohumlar MSO besin ortamı içeren magenta ya da küçük cam kavanozlarda çimlendirmeye alınmışlardır. Her magenta kabına 25 adet tohum konmuştur. Kolza tohumlarında çimlenme % olarak ifade edilmiş, bu değer magentada çimlenen tohumların toplam tohum sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur.

### 3.2.1.4. *İn vitro*'da yetiştirilen fidelerden eksplant izolasyonu

Kolzaya ait tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantları 5-6 günlük fidelerden izole edilmiştir. 2/3 distal kotiledon eksplantında kotiledonun petiole bağlandığı 1/3'lik kısım kesilip atılarak kalan 2/3'lik kısım rejenerasyon ortamına yerleştirilmiştir. Tam kotiledon eksplantı ise 2-3 mm petiol ile birlikte kesilip rejenerasyon ortamına yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Hipokotil eksplantı da 5 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına konmuştur.



a) 2/3 kotiledon

b) Petiollü tam kotiledon eksplantı

Şekil 3.1. Kolzada adventif sürgün rejenerasyonu için kültüre alınan farklı kotiledon eksplantları

#### **3.2.1.4.1. Olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarının izolasyonu**

Tarlada yetiştirilen kolza çeşitlerinden, koyu yeşil renkte ve orta irilikte tohumları içeren harnuplar (tozlaşmadan 18-20 gün sonra) hasat edilmiştir. Harnuplar % 80'lik ticari çamaşır suyunda (axion) 20 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır. Harnuptan çıkarılan tohumlar pens ve bistüri yardımıyla olgunlaşmamış embriyo eksenini (1,5-2 mm) ve kotiledon (yaklaşık 2 mm) eksplantlarına ayrılmıştır. Değişik oranlarda büyümeyi düzenleyiciler, % 3 sukroz ve % 8 agar içeren MS besin ortamının (pH; 5,8) bulunduğu petrilerde 10'ar eksplant kültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış embriyo ekseninin kotiledondan koparıldığı kısım besin ortamına temas edecek şekilde eksplantlar kültüre alınmıştır.

#### **3.2.1.5. Rejenere olan kolza sürgünlerinin köklendirilmesi ve serada büyütülmesi**

Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiğinde kesilerek farklı konsantrasyonlarda oksin (IBA) içeren MSO besin ortamının bulunduğu magenta kaplarında köklendirmeye alınmıştır. Her magentaya 5 adet sürgün yerleştirilmiştir. Burada köklenen sürgünler daha sonra iklim odasında kompost içeren küçük saksılara alınmıştır. Birkaç gün yüksek nemde (% 90) tutularak fidenin hem dış şartlara uyumu hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır. Daha sonra, nem oranı kademeli olarak azaltılmış ve gün aşırı sulanmıştır. 3-4 hafta sonra yaklaşık 20-25 cm olan fideler seraya alınarak, fidelerin çiçeklenmesi ve tohum oluşturmaları sağlanmıştır.

### **3.2.2. Bakteri kültürleri**

#### **3.2.2.1. Bakteri kültürlerinin büyütülmesi**

Sıvı bakteri kültürlerinin büyütülmesine, -80 °C'de depolanmış olan gliserol stoktan steril bir lup yardımıyla bir parça alınarak veya +4 °C'de NA (Nutrient Agar; Lab-Lemco' Powder 1,0 g/l; Yeast extract 2,0 g/l; Peptona 5,0 g/l; Sodium chloride 5,0 g/l; Agar 15,0 g/l) ve seçici antibiyotikler içeren (Çizelge 3.5) 9 cm'lik petrilerde saklanan bakterilerden tek koloni alınarak başlanmıştır. Bakteri kültürleri 10 ml NB (Lab-Lemco' Powder 1,0 g/l; Yeast extract 2,0 g/l; Peptona 5,0 g/l; Sodium chloride 5,0 g/l) ve seçici antibiyotikler içeren (Çizelge 3.5 ) 50 ml'lik steril tüplerle kültüre alınmışlardır. Bakteriler bir gece ya da istenilen büyüme elde edilinceye kadar 28 °C, 150 devir/d'da inkübatörde büyütülmüştür.

Yeniden bireysel koloniler elde etmek için; büyüyen sıvı bakteri kültüründen, steril bir lup yardımıyla alınan bakteriler NA ve gerekli antibiyotikler içeren (Çizelge 3.5) agarlı besin ortamı üzerine yayılmıştır. Bu bakteri kültürlerini içeren petri kutuları ters çevrilerek 28 °C'de inkübe edilmiştir. İki gün içerisinde kolonilerin oluşumu gözlenmiştir. Tüm çalışmalar kontaminasyonu önlemek için steril kabin içerisinde yapılmıştır.

#### **3.2.2.2. Bakteri kültürlerinin saklanması**

Sıvı bakteri kültürü ve % 40 gliserol içeren NB ortamı eşit miktarlarda alınarak 2 ml'lik kryogenic tüplerde karıştırıldıktan sonra -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu şekilde bakterileri 10 yıl muhafaza etmek mümkün olmaktadır. Kısa süreli muhafaza için katı besin ortamında, büyütülen bakteri kültürleri ters çevrilmiş halde +4°C'de buzdolabında 4-6 hafta saklanabilmektedir.

### 3.2.2.3. Antibiyotiklerin kullanımı

Antibiyotiklerin stok solüsyonları hazırlandıktan sonra sterilizasyon için mikrofiltrelerden (0,22 µm) geçirilmiştir. Sıvı ortamlara antibiyotikler direk olarak eklenmiş, agarlı ortamlara ise otoklavdan sonra ortam ısısı 45°C'ye düştükten sonra ilave edilmiştir. Ayrıca, tütün bitkisinde bitki seleksiyon ortamına değişik oranlarda antibiyotikler ilave edilerek en uygun antibiyotik dozu belirlenmiştir. Kullanılan antibiyotikler, kullanım oranları, çözücüler ve saklama koşulları Çizelge 3.5 ve 3.6 'da verilmiştir.

Çizelge 3.5. *Agrobacterium tumefaciens* hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler çözücüler ve saklama koşulları

| Antibiyotikler | Kullanım Oranları | Stok ( mg/ml ) | Çözücüler | Saklama Koşulları °C |
|----------------|-------------------|----------------|-----------|----------------------|
| Kanamisin      | 25, 50,100 mg/l   | 50             | Su        | + 4                  |
| Streptomisin   | 100 mg/l          | 50             | Su        | - 20                 |
| Rifampisin     | 100 mg/l          | 25             | Methanol  | - 20                 |

Çizelge 3.6. Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

| Antibiyotikler | Stok (mg/l) | Seleksiyon için Kullanılan Konsantrasyon |       | Çözündüğü Sıvılar | Saklama Koşulları °C |
|----------------|-------------|------------------------------------------|-------|-------------------|----------------------|
|                |             | Tütün                                    | Kolza |                   |                      |
| Kanamisin      | 50          | 100                                      | 25    | su                | +4                   |
| Higromisin     | 12,5        | 40                                       | -     | su                | +4                   |
| Fosfinotrisin  | 2,5         | 2,5                                      | -     | su                | -20                  |
| Metotreksat    |             | 0,05                                     | -     | DMSO              | -20                  |
| Augmentin *    | 100         | 500                                      | 500   | su                | -20                  |

\*Ko-kültivasyondan sonra *A.tumefaciens*'in gelişmesini engellemek için kullanılmıştır.

### 3.3. *A. tumefaciens* ile gen aktarımı

#### 3.3.1. Onkogenik *A. tumefaciens* hatları ile kolzaya gen aktarımı

Kullanılan kolza çeşitlerinin *A. tumefaciens*'e karşı duyarlılıklarını belirlemek için onkogenik bakteri hatları kullanılmıştır. Bunlar; A 281 (pTi Bo 542) ve C 58 (pTi C58)'dir. Bu bakteri hatları NB ortamında bir gece büyütülmüştür. Petiollü tam kotelidon, hipokotil ve 2/3 kotiledon eksplantları 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri kültürlerinde 30 d inoküle edilmiştir. İnoküle edilen eksplantlar ko-kültivasyon için 2 gün süreyle MSO ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlar 500 mg/l augmentin ilave edilen MSO ortamına aktarılmışlardır. Yaklaşık 3 hafta sonra tümör oluşturan eksplant sayısı, eksplant başına tümör sayısı ve tümör büyüklüğü incelenmiştir. Tümör oluşturan eksplant yüzdesi; her petrideki eksplantlardan tümör oluşturanlar "adet" olarak sayılmış ve % değerlere çevrilmiştir. Tümör büyüklüğü; oluşan tümörler kumpas ile ölçülerek her tekerrürün ortalaması bulunmuştur. Eksplant başına tümör sayısı; tütün yaprak disklerinde oluşan tümörler adet olarak sayılmış ve tekerrür başına ortalamalar bulunmuştur.

#### 3.3.2. Non-onkogenik *A. tumefaciens* hatlarının tütün üzerinde test edilmesi

Non-onkogenik *A. tumefaciens* hatlarının test edilmesinde *in vitro* büyütülen tütün bitkilerinden elde edilen yaprak diskleri kullanılmıştır. Yaklaşık 4-6 haftalık fidelerden elde edilen yapraklar 0.5 cm çapında parçalara ayrılarak 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri kültürü içeren sıvı MSD4X2 (MS + 0,1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 30 g/l sukroz) ortamında 30 d inoküle edilmiştir. Eksplantlar steril kurutma kağıtlarına değdirilerek fazla bakteri kültüründen kurtarılmış ve katı tütün rejenerasyon ortamında (MSD4X2) ko-kültivasyon için 2 gün bekletilmiştir. Daha sonra eksplantlar, MSD4X2 + 500 mg/l

augmentin ve bakteri hattına göre (Çizelge 3.2) gerekli antibiyotikler ilave edilen ortama aktarılmıştır. Meydana gelen sürgünler 1-2 cm olunca kesilerek köklendirme ortamına (MSO + 500 mg/l agumentin + gerekli antibiyotik) aktarılmıştır. Köklenen bitkilerin sayımı yapılarak iklim odasında saksılara aktarılmıştır. Daha sonra bu bitkilere gen aktarılıp aktarılmadığı histokimyasal GUS analizi yöntemiyle belirlenmiştir.

### 3.3.3. Non-onkogenik *A.tumefaciens* aracılığıyla kolzaya gen aktarımı

Rejenerasyon çalışmaları sonucunda 2-3 mm petiolü de içeren tam kotiledon eksplantının rejenerasyon kabiliyeti en yüksek bulunmuştur. Bu nedenle petiollü tam kotiledon eksplantı ile çok sayıda gen aktarımı denemesi yapılmıştır. Ayrıca, olgunlaşmamış embriyo ve olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarıyla da gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Denemelerde tütün üzerinde en iyi sonucu veren GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattı kullanılmıştır. Yapılan denemelerde sürgün oluşturan eksplant sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı tespit edilmiştir.

Gerekli antibiyotikleri içeren NB ortamında bir gece büyütülen GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattı ile kotiledon eksplantı iki şekilde inoküle edilmiştir. Birinci yöntemde; petiollü tam kotiledonlar 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri kültüründe 15 d inoküle edilmiştir. Daha sonra da eksplantlar steril kurutma kağıdına değdirilerek ya da silkelenerek fazla bakteri kültürü uzaklaştırılmış ve kolza sürgün rejenerasyon ortamında 2 gün ko-kültivasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda eksplantların etrafında aşırı bakteri gelişimi gözlenmiş ise, eksplantlar 1000 mg/l augmentin ilave edilen sıvı rejenerasyon ortamında 10 d yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Ardından eksplantlar *Agrobacterium*'un gelişimini önlemek için 500 mg/l augmentin

içeren ve sadece gen aktarımı yapılmış sürgünlerin gelişmesini sağlamak için 25 mg/l kanamisin içeren sürgün rejenerasyonu ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda eksplantlar 3 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Burada gelişen sürgünler daha sonra köklendirme ortamına alınmıştır. Olgunlaşmamış embriyo eksenleri ve kotiledonlara da aynı şekilde gen aktarımı yapılmıştır.

İkinci yöntemde; kotiledonun kesik ucu olan petiol, birkaç saniye seyreltilmeyen bakteri kültürüne değdirilerek inoküle edilmiş ve sürgün rejenerasyonu ortamında 3 gün süreyle ko-kültivasyon için bekletilmiştir. Daha sonra eksplantlar 7 gün için 500 mg/l augmentin içeren sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda kallus oluşumunun başlaması teşvik edilmiştir. 7 gün sonra eksplantlar, 500 mg/l augmentin ve 25 mg/l kanamisin içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Gelişen sürgünler 1-2 cm olunca kesilerek köklendirme ortamına (MSO + 0,1 mg/l NAA + 500 mg/l augmentin + 50 mg/l kanamicin) alınmıştır. Daha sonra köklenen bitkilerin sayımı yapılmış ve iklim odasında saksılara aktarılmıştır. Bitkilere gen aktarılıp aktarılmadığı histokimyasal GUS analizi yöntemiyle belirlenmiştir.

### 3.4. Histokimyasal GUS Analizi

Bazı değişikliklerle birlikte Histokimyasal Gus Analizi Jefferson, (1987) ve Scott, (1988)'un tarif ettiği gibi yapılmıştır. Gen aktarılmış bitki dokuları 37 °C'de 4-12 saat süre ile 100 mM Sodyum fosfat (pH 7,0), 10 mM EDTA, %0,1 Triton X-100 ve 1 mM 5-Broma 4-Chloro-3-Indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda inkübe edildikten sonra, % 70'lik etanolde bekletilmiştir. Dokular içerisindeki mavi renge göre GUS aktivitesi belirlenmiştir.

### 3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmalar tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her uygulama içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 3 ya da 4 tekerrürlü petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen verilerin “SPSS for Windows” bilgisayar programıyla varyans analizi yapılmıştır. Ortalama değerler yine bilgisayarda MSTAT-C programı kullanılarak “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri normal dağılıma çevirmek için istatistik analizinden önce “arcsin” dönüştürme işlemi yapılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Kolza Tohumlarının *İn vitro* Çimlendirilmesi

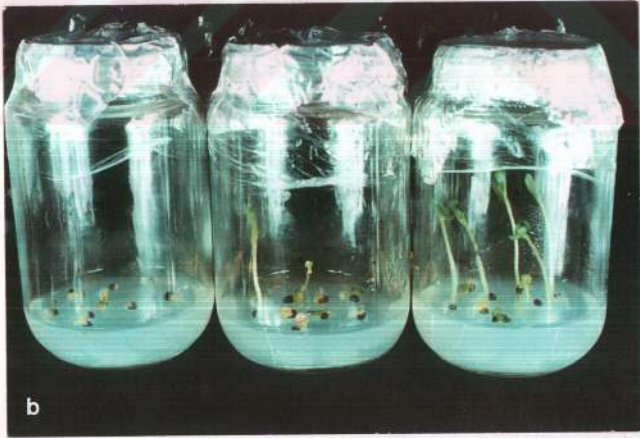
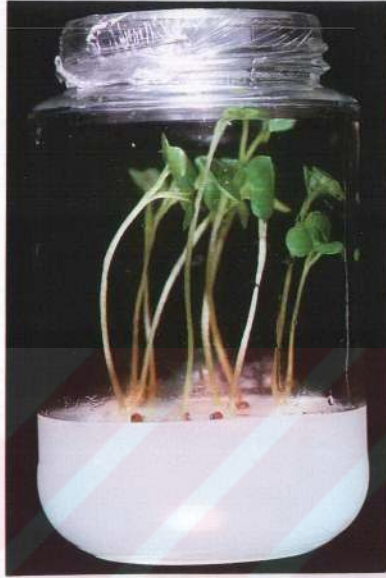
Kolza tohumlarının yüzey sterilizasyonu için, tohumlar dört farklı dozda (% 20, % 60, % 80 ve % 100) ticari çamaşır suyu (Axion) ile 20 dakika muamele edilmiştir. Çimlendirmeye konan tohumlardan 6-7 gün sonra 7-8 cm uzunluğunda fideler gelişmiştir. En iyi çimlenme sonucu (% 100) % 20'lik dozdan elde edilirken, bu dozda % 100 oranında sterilizasyon da sağlanmıştır (Şekil 4.1a). Yüzde 80 ve % 100'lük Axion dozlarında tohumların hiçbirisi çimlenememiştir (Şekil 4.1b). Bu oranlarda kullanılan ticari çamaşır suyunun embriyoya zarar verdiği açıkça gözlenmiştir. Yüzde 60'lık dozda ise tohumların yarısının çimlenerek fide oluşturduğu belirlenmiştir. En iyi tohum çimlenmesi % 20'lik Axion dozundan elde edildiğinden dolayı bütün çalışmalarda bu doz kullanılmıştır.

Değişik araştırmacılar tarafından ticari çamaşır suyunun (sodyum hipoklorit) yüzey sterilizasyonu için en uygun dezenfektan olduğu, ancak yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı zaman bitkisel materyalin canlılığını etkilediği belirtilmiştir (Allan, 1991). Bu nedenle doku kültürü çalışmalarında en düşük dezenfektan dozunun, en kısa süre uygulamasıyla en iyi sterilizasyonun sağlanması hedeflenmektedir.

### 4.2. Adventif Sürgün Rejenerasyonu ile İlgili Bulgular

#### 4.2.1. Tarok çeşidinde BAP ve NAA'nın adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Kolzanın Tarok çeşidi ile yapılan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyon çalışmalarında hipokotil, 2/3 kotiledon ve petiolü de taşıyan tam kotiledon eksplantları *in vitro* gelişen bitkiciklerden izole edilerek değişik oranlarda



Şekil 4.1. Kolza tohumlarının % 20 (a), % 100 (b), % 80 (c) ve % 60'lık çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonu sonrasında *in vitro* çimlendirilmesi

BAP (0,50-2,00 mg/l) ve NAA (0,25-2,00 mg/l) içeren MSO ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 3 hafta sonra eksplantlar üzerinde kallus oluşumu başlamış, 4 hafta sonra da gelişen bu kalluslar üzerinde adventif sürgün uçları gözlenmiştir. Oluşan sürgün uçlarından 6 hafta sonra gelişmiş sürgünler elde edilmiştir (Şekil 4.2). Kültür başlangıcından 6 hafta sonra BAP ve NAA'ın farklı dozlarının Tarok çeşidinde sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

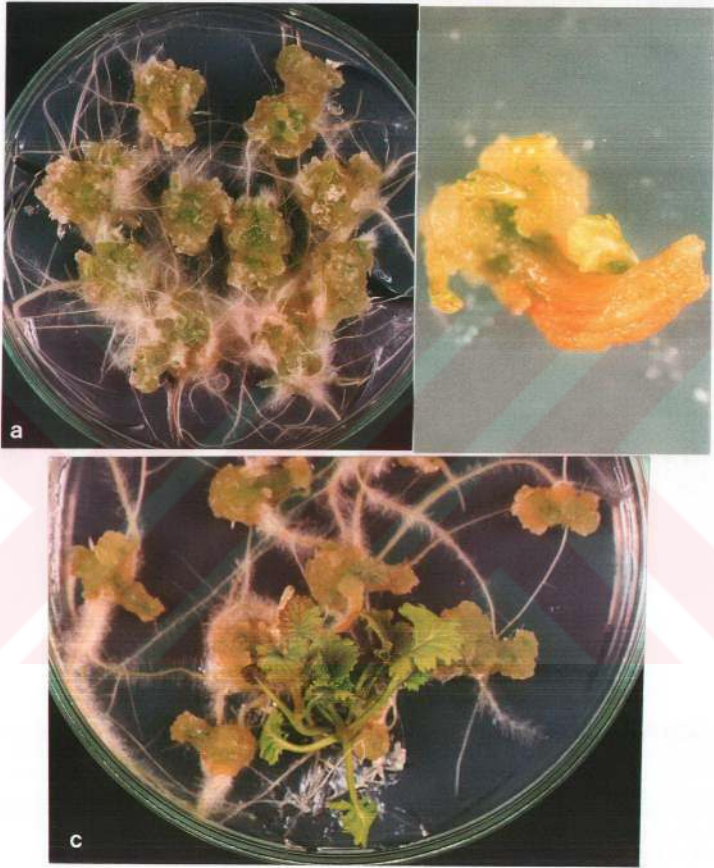
Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından farklı oranlarda kullanılan BAP ve NAA ile eksplant tipi arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli görüldüğü gibi; eksplant  $\times$  ortam interaksyonunda da 0,01 düzeyinde farklılık oluşmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise kullanılan eksplantlar arasında fark bulunmazken, ortamlar arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemli olmuştur. Ayrıca, eksplant  $\times$  ortam interaksyonu 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı BAP ve NAA dozlarının Tarok çeşidinin petiollü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |         | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |         |
|----------------------|------|---------------------------------------|---------|--------------------------------------|---------|
|                      |      | K.O.                                  | F       | K.O.                                 | F       |
| Eksplant             | 2    | 417,185                               | 5,110** | 1,187                                | 2,261   |
| Ortam                | 14   | 730,541                               | 8,949** | 2,339                                | 4,457*  |
| Eksplant x Ortam     | 28   | 434,573                               | 5,323** | 2,518                                | 4,800** |
| Hata                 | 90   | 81,637                                |         | 0,525                                |         |
| Toplam               | 135  |                                       |         |                                      |         |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.



Şekil 4.2. Tarok çeşidinin hipokotil eksplantlarından kallus oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonu. (a) Kültür başlangıcından 3 hafta sonra kallus oluşumu. (b) 4 hafta sonra sürgün uçlarının gelişimi. (c) 6 hafta sonra gelişmiş sürgünlerin görünüşü

Çizelge 4.2'den de görüldüğü gibi, petiollü tam kotiledon eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek değer % 37,14 ile 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Ancak, bu ortam ile 0,50 mg/l BAP'in 0,25 ve 1,00 mg/l NAA ile birlikte kullanıldığı ve 1 mg/l BAP'in 0,25 ve 0,50 NAA ile birlikte kullanıldığı ortamlardan elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir. 2/3 kotiledon eksplantı, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından incelendiğinde, en iyi sonucun % 30,29 ile 1,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA içeren besin ortamından alındığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Kullanılan diğer ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Hipokotil eksplantı ele alındığında ise, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi yönünden en yüksek değer % 43,08 ile 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Öte yandan, bu ortam ile sadece 2,00 mg/l BAP veya 0,50 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA içeren ortamlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Petiollü tam kotiledon eksplantı, eksplant başına sürgün sayısı yönünden incelendiğinde, en fazla sürgün sayısı (3,42 adet) 0,50 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca, 1,00 mg /l BAP ve 0,25 mg/l NAA bulunan besin ortamından elde edilen eksplant başına sürgün sayısı (2,80 adet) da istatistiki olarak aynı gruba girmiştir (Çizelge 4.2). 2/3 kotiledon eksplantında ise eksplant başına en fazla sürgün sayısı 2,11 adet ile 2,00 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bununla birlikte, 1,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA veya 1,00 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA veya 1,00 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA veya 2,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilen eksplant başına sürgün sayısı da istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır (Çizelge 4.2). Hipokotil eksplantından,

Çizelge 4.2. Farklı BAP ve NAA dozlarının Tarok çeşidinin petiolülü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları

| Bitki Büyümesini Düzleyenler (mg/l) |      | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |               |           |                         | Eksplant Başına Sürgün Sayısı <sup>1</sup> (Adet) |           |                         |               | Petri Kutusu Başına Toplam Sürgün Sayısı (Adet) |                         |           |
|-------------------------------------|------|---------------------------------------|---------------|-----------|-------------------------|---------------------------------------------------|-----------|-------------------------|---------------|-------------------------------------------------|-------------------------|-----------|
| BAP                                 | NAA  | Petiolülü Tam Kotiledon               | 2/3 Kotiledon | Hipokotil | Petiolülü Tam Kotiledon | 2/3 Kotiledon                                     | Hipokotil | Petiolülü Tam Kotiledon | 2/3 Kotiledon | Hipokotil                                       | Petiolülü Tam Kotiledon | Hipokotil |
| 0,50                                | 0,00 | 0,00 b <sup>2</sup>                   | 0,00 b        | 0,00 c    | 0,00 e                  | 0,00 c                                            | 0,00 c    | 0,00 c                  | 0,00          | 0,00                                            | 0,00                    | 0,00      |
| 0,50                                | 0,25 | 30,29 a                               | 6,15 b        | 17,71 b   | 3,42 a                  | 0,33 bc                                           | 1,17 bc   | 10,36                   | 0,20          | 2,07                                            | 10,36                   | 0,20      |
| 0,50                                | 0,50 | 37,14 a                               | 12,29 b       | 43,08 a   | 1,95 bc                 | 0,67 bc                                           | 1,94 ab   | 7,24                    | 0,82          | 8,36                                            | 7,24                    | 0,82      |
| 0,50                                | 1,00 | 36,93 a                               | 11,07 b       | 32,71 a   | 1,07 cde                | 0,43 bc                                           | 1,13 bc   | 3,95                    | 0,48          | 3,70                                            | 3,95                    | 0,48      |
| 0,50                                | 2,00 | 6,15 b                                | 0,00 b        | 6,15 bc   | 0,33 e                  | 0,00 c                                            | 0,33 c    | 0,23                    | 0,00          | 2,03                                            | 0,23                    | 0,00      |
| 1,00                                | 0,00 | 6,15 b                                | 0,00 b        | 6,15 bc   | 0,67 de                 | 0,00 c                                            | 0,33 c    | 0,41                    | 0,00          | 0,20                                            | 0,41                    | 0,00      |
| 1,00                                | 0,25 | 27,29 a                               | 12,29 b       | 0,00 c    | 2,80 ab                 | 1,00 abc                                          | 0,00 c    | 7,64                    | 1,23          | 0,00                                            | 7,64                    | 1,23      |
| 1,00                                | 0,50 | 33,21 a                               | 0,00 c        | 0,00 c    | 1,65 bcd                | 0,00 c                                            | 0,00 c    | 5,48                    | 0,00          | 0,00                                            | 5,48                    | 0,00      |
| 1,00                                | 1,00 | 12,29 b                               | 30,29 a       | 0,00 c    | 0,67 cde                | 2,08 a                                            | 0,00 c    | 0,82                    | 6,30          | 0,00                                            | 0,82                    | 0,00      |
| 1,00                                | 2,00 | 6,15 b                                | 15,00 b       | 0,00 c    | 0,33 de                 | 1,50 ab                                           | 0,00 c    | 2,03                    | 2,25          | 0,00                                            | 2,03                    | 0,00      |
| 2,00                                | 0,00 | 0,00 b                                | 0,00 b        | 40,78 a   | 0,00 e                  | 0,00 c                                            | 2,67 a    | 0,00                    | 0,00          | 10,88                                           | 0,00                    | 0,00      |
| 2,00                                | 0,25 | 6,15 b                                | 17,22 b       | 0,00 c    | 0,33 de                 | 2,11 a                                            | 0,00 c    | 0,20                    | 3,63          | 0,00                                            | 0,20                    | 0,00      |
| 2,00                                | 0,50 | 0,00 b                                | 0,00 b        | 12,29 bc  | 0,00 e                  | 0,00 c                                            | 0,67 bc   | 0,00                    | 0,00          | 0,82                                            | 0,00                    | 0,00      |
| 2,00                                | 1,00 | 6,15 b                                | 12,29 b       | 6,15 bc   | 0,33 de                 | 1,00 abc                                          | 1,33 bc   | 0,20                    | 1,23          | 0,82                                            | 0,20                    | 0,00      |
| 2,00                                | 2,00 | 0,00 b                                | 0,00 b        | 0,00 c    | 0,00 e                  | 0,00 c                                            | 0,00 c    | 0,00                    | 0,00          | 0,00                                            | 0,00                    | 0,00      |

<sup>1</sup> Sürgün veren eksplant başına sürgün sayısı

<sup>2</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

LSD 14,66

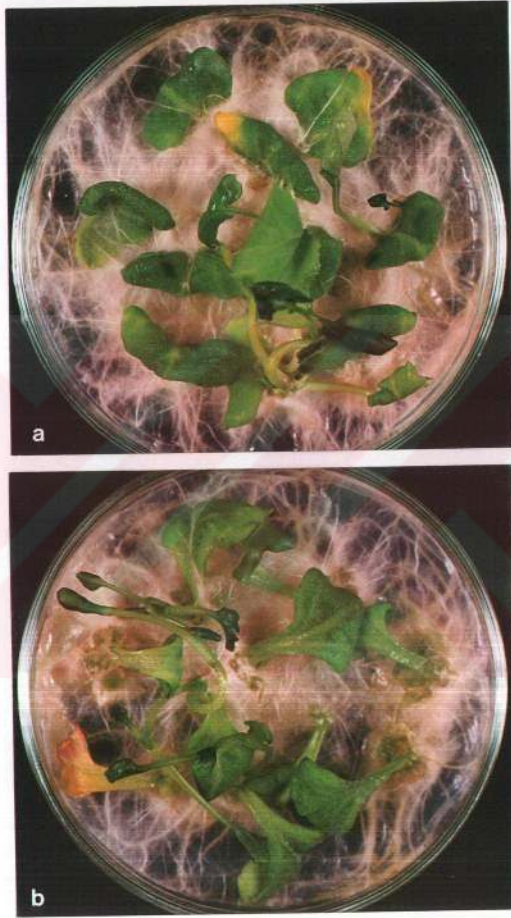
eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 2.67 adet ile sadece 2,00 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Ancak, bu ortam ile içerisinde 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA bulunan ortamdan elde edilen eksplant başına sürgün sayısı arasındaki fark istatistikî açıdan önemli olmayıp, aynı gruba girmiştir (Çizelge 4.2).

Adventif sürgün rejenerasyonunun başarısını belirlemede sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunun için, petri başına sürgün sayısı değerleri hesaplanarak Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi en fazla petri kutusu başına toplam sürgün sayısı 10,36 adet ile petiollü tam kotiledonlardan 0,50 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA, 2/3 kotiledon eksplantlarından 6,30 adet ile 1,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA ve hipokotil eksplantlarından ise 10,88 adet ile sadece 2,00 mg/l BAP içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Eksplantlar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantlarının 2/3 kotiledon eksplantlarından daha yüksek rejenerasyon verdiği gözlenmiştir.

*İn vitro* çalışmalarda bitki büyümesini düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonunun başarısını en fazla etkileyen etmenlerin başında geldiği ve besin ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması neticesinde *in vitro* rejenerasyon kabiliyeti son derece düşük olan bitkilerden de yüksek oranlarda adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Dunwel, 1981; Lazzeri and Dunwel, 1984; Narasimhulu and Chopra, 1987; Khehra and Mathias, 1992; Özcan vd., 1993; Özcan vd., 1996). Aynı araştırmacılar, en uygun oksin-sitokinin dengesinin eksplantın yapısına göre de değiştiğini belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar bu çalışmada da elde edilmiştir. Besin ortamına ilave edilen BAP ve NAA miktarlarına göre sürgün rejenerasyonunda önemli değişiklikler gözlenmiştir.

Ayrıca, sürgün rejenerasyonu için en uygun BAP ve NAA miktarları da petiollü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantlarına göre farklılık göstermiştir. Khehra and Mathias'da (1992) kolzada BAP ve NAA kombinasyonları ile yaptıkları çalışmada adventif sürgün rejenerasyonu sıklığını eksplant tipinin ve genotipin etkilediğini bildirmişlerdir. Klimaszewska and Keller (1985) kolzada en iyi organogenezis oluşumunun oksinlerden NAA'den, sitokininlerden de BAP'den elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada sürgün rejenerasyonu ortamında yüksek oranda (0,50 mg/l, 1,00 mg/l, 2,00 mg/l) NAA'in kullanılması kültürde aşırı köklenmeye neden olmuştur (Şekil 4.3).

Bu denemede sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı birlikte göz önüne alındığında petiollü tam kotiledon eksplantlarında en yüksek adventif sürgün rejenerasyonu 0,50 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilirken, 2/3 kotiledon eksplantında ise BAP ve NAA'in her birinden 1,00 mg/l oranında içeren besin ortamından elde edilmiştir. Öte yandan, hipokotil eksplantında ise en iyi sonuç sadece 2,00 mg/l BAP'in ilave edildiği ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca, kullanılan eksplantlar birbirleriyle karşılaştırıldığında petiollü tam kotiledonlar ve hipokotil eksplantlarının 2/3 kotiledon eksplantlarından daha yüksek oranlarda rejenerasyon kabiliyetine sahip oldukları açık olarak gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Narasimhulu and Chopra (1987) ve Turgut (1993)'un kolza üzerine yapmış olduğu araştırmalardan da elde edilmiştir. Araştırmacılar, petiollü tam kotiledon eksplantlarından daha yüksek oranlarda adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir.



Şekil 4.3. 2/3 kotiledon (a) ve petiollü tam kotiledon (b) eksplantlarından yüksek oranlarda NAA içeren rejenerasyon ortamlarında aşırı adventif kök gelişimi

#### 4.2.2. Tarok çeşidinde 2,4-D ve kinetin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Değişik oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda en yüksek sonuçlar hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından elde edildiğinden dolayı bu denemede sadece bu eksplantlar kullanılmıştır. Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları değişik oranlarda 2,4-D (0,01-0,10 mg/l) ve kinetin (1,00-8,00 mg/l) içeren MSO ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan eksplantlar 6 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı yönünden incelenmiştir. 2,4-D ve kinetin farklı dozlarının Tarok çeşidinde sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı 2,4-D ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |          | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          |
|----------------------|------|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
|                      |      | K.O.                                  | F        | K.O.                                 | F        |
| Eksplant             | 1    | 152,381                               | 4,876**  | 1,358                                | 3,780**  |
| Ortam                | 7    | 833,333                               | 26,667** | 3,741                                | 10,409** |
| Eksplant x Ortam     | 7    | 100,000                               | 3,200*   | 0,558                                | 1,554    |
| Hata                 | 32   | 31,250                                |          | 0,359                                |          |
| Toplam               | 48   |                                       |          |                                      |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.3’den de görüldüğü gibi, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından farklı oranlarda kullanılan 2,4-D ve kinetin ile eksplant tipleri arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Aynı zamanda, eksplant x ortam interaksiyonunda da 0,05 düzeyinde farklılık tespit edilmiştir. Yine, Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi, eksplant başına sürgün sayısı üzerine eksplant

tipinin ve ortamların etkisi 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Eksplant x ortam grubunda ise istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Ele alınan özelliklerde görülen farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4’den de görüldüğü gibi, hipokotil eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek değer % 20,00 ile 0,01 mg/l 2,4 D ve 4,00 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca, 0,01 mg/l 2,4 D’nin 1,00, 2,00 ve 8 mg/l kinetin ile birlikte kullanıldığı ortamlardan elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir. 2,4-D’nin 10 kat artırıldığı ortamlarda ise hiç adventif sürgün rejenerasyonu oluşmamıştır. Petiollü tam kotiledon eksplantı, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından incelendiğinde, % 3,30 ile 0,00 arasında değerler elde edilmiştir. Bu değerlerin elde edildiği ortamlar arasında istatistiksel bir fark olmadığından hepsi aynı gruba girmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısında eksplant x ortam interaksiyonu önemsiz çıktığından dolayı her iki eksplant birlikte değerlendirilmiştir. Ancak, hipokotil eksplantı için en iyi ortam 1,60 adet ile 0,01 mg/l 2,4 D ve 4,00 mg/l kinetin, petiollü tam kotiledon eksplantı için ise en iyi ortam 1,00 adet ile 0,01 mg/l 2,4 D ve 8,00 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Her iki eksplant için en iyi ortam eksplant başına 1,18 adet sürgün elde edilen 0,01 mg/l 2,4 D ve 8,00 mg/l kinetin içeren ortam olarak belirlenirken, 0,01 mg/l 2,4-D’nin 1,00 mg/l, 2,00 mg/l ve 4,00 mg/l kinetin ile birlikte kullanıldığı ortamlardan elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4’de de görüldüğü gibi, petri başına sürgün sayısı incelendiğinde, hipokotil eksplantı için 3,20 adet ile 0,01 mg/l 2,4 D ve 4,00 mg/l kinetin

Çizelge 4.4. Farklı 2,4-D ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve kotiledon eksplantından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları

| Bitki Büyümesini Düzenleyiciler (mg/l) |         | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |                        |                          |           | Eksplant Başına Sürgün Sayısı <sup>1</sup> (Adet) |                          |           |                        | Petride Toplam Sürgün Sayısı (Adet) |                        |
|----------------------------------------|---------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------|-----------|---------------------------------------------------|--------------------------|-----------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 2,4-D                                  | Kinetin | Hipokotil                             | Petiollü Tam Kotiledon | Ortalama ait Ortalamalar | Hipokotil | Petiollü Tam Kotiledon                            | Ortalama ait Ortalamalar | Hipokotil | Petiollü Tam Kotiledon | Hipokotil                           | Petiollü Tam Kotiledon |
| 0,01                                   | 1,00    | 16,70 a <sup>2</sup>                  | 0,00 a                 | 8,30                     | 1,00      | 0,00                                              | 0,50 ab                  | 1,67      | 0,00                   | 1,67                                | 0,00                   |
| 0,01                                   | 2,00    | 16,70 a                               | 0,00 a                 | 8,30                     | 1,50      | 0,00                                              | 0,75 ab                  | 2,50      | 0,00                   | 2,50                                | 0,00                   |
| 0,01                                   | 4,00    | 20,00 a                               | 3,30 a                 | 11,70                    | 1,60      | 0,33                                              | 0,97 a                   | 3,20      | 0,11                   | 3,20                                | 0,11                   |
| 0,01                                   | 8,00    | 16,70 a                               | 3,30 a                 | 10,00                    | 1,37      | 1,00                                              | 1,18 a                   | 2,29      | 0,33                   | 2,29                                | 0,33                   |
| 0,10                                   | 1,00    | 0,00 b                                | 0,00 a                 | 0,00                     | 0,00      | 0,00                                              | 0,00 b                   | 0,00      | 0,00                   | 0,00                                | 0,00                   |
| 0,10                                   | 2,00    | 0,00 b                                | 0,00 a                 | 0,00                     | 0,00      | 0,00                                              | 0,00 b                   | 0,00      | 0,00                   | 0,00                                | 0,00                   |
| 0,10                                   | 4,00    | 0,00 b                                | 0,00 a                 | 0,00                     | 0,00      | 0,00                                              | 0,00 b                   | 0,00      | 0,00                   | 0,00                                | 0,00                   |
| 0,10                                   | 8,00    | 0,00 b                                | 0,00 a                 | 0,00                     | 0,33      | 0,00                                              | 0,00 b                   | 0,00      | 0,00                   | 0,00                                | 0,00                   |
| Eksplant Ortalamaları                  |         | 9,20                                  | 0,80                   | 1,70                     | 0,72      | 0,17                                              | 0,44                     | 3,62      | 0,15                   | 3,62                                | 0,15                   |

<sup>1</sup> Sürgün veren eksplant başına sürgün sayısı

<sup>2</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

LSD 9,297 (Sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait)

içeren ortamın, petiollü tam kotiledon eksplantı için ise 0,33 adet ile 0,01 mg/l 2,4 D ve 8,00 mg/l kinetin içeren ortamın en iyi ortam olduğu görülmüştür. Tarok çeşidinde, denemeye alınan ortamlarda eksplantlar, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve petri kutusu başına toplam sürgün sayısı bakımından karşılaştırıldığında, hipokotil eksplantının petiollü tam kotiledon eksplantından daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Tarok çeşidinde BAP ve NAA ile yapılan adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında % 43,08 oranında rejenerasyon elde edilirken, kinetin ve 2,4-D kullanılan ortamlarda daha düşük (% 20) rejenerasyon elde edilmiştir. Klimaszewska and Keller, (1985), kolza Westar çeşidinde ince hücre katmanları eksplantlarını BAP ile birlikte 2,4-D içeren rejenerasyon ortamında kültüre aldıklarında sadece kallus elde etmişlerdir. Ancak, Yang et al., (1991) *B. craniata*'nın hipokotil eksplantlarında 4,00 mg/l kinetin ve 0,01 mg/l 2,4-D kombinasyonlarında % 100 adventif sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu durum, türler arasında *in vitro* koşullarda kullanılan bitki büyümesini düzenleyicileri ve dozlarının sürgün rejenerasyonu kapasitesini farklı etkilemesinden kaynaklanmaktadır.

#### **4.2.3. Tarok çeşidinde BAP, NAA ve kinetinin birlikte kullanılmasının adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi**

Tarok çeşidinde en iyi eksplant olarak belirlenen hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu oranını arttırmak için BAP, NAA ve kinetin'in birlikte kullanıldığı farklı ortamlar denenmiştir. Bu ortamların sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine ortamların ve eksplant tipinin etkisi 0,01 seviyesinde önemli çıkmıştır. Ayrıca, eksplant x ortam interaksiyonunda da 0,01 düzeyinde farklılık belirlenmiştir. Gözlenen farklılığın önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı BAP, NAA ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |          | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          |
|----------------------|------|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
|                      |      | K.O.                                  | F        | K.O.                                 | F        |
| Eksplant             | 1    | 656,829                               | 20,159** | 5,631                                | 13,581** |
| Ortam                | 17   | 110,540                               | 3,393**  | 0,941                                | 2,270**  |
| Eksplant x Ortam     | 17   | 149,295                               | 4,582**  | 1,122                                | 2,706**  |
| Hata                 | 72   | 32,583                                |          | 0,415                                |          |
| Toplam               | 108  |                                       |          |                                      |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.6’dan da görüldüğü gibi, hipokotil eksplantı ele alındığında, sürgün veren eksplant yüzdesi en fazla % 6,67 ile 0,50 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 6,00 mg/l kinetin birlikte kullanıldığı ortamdan elde edilmiştir. Öte yandan, 2,00 mg/l BAP, 0,50 mg/l NAA ve 2,00 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilen % 3,33 sürgün veren eksplant yüzdesi de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantı, sürgün veren eksplant yüzdesi bakımından incelendiğinde ise, en iyi ortamın % 20,00 ile 2,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 4,00 mg/l kinetin birlikte kullanıldığı ortamdan elde edilmiştir. Ancak, bu ortam ile 4,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 2,00 mg/l kinetin ile 2,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 2,00 mg/l kinetin kullanıldığı ortamlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olup, aynı gruba girmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı BAP, NAA ve kinetin dozlarının Tarok çeşidinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları

| Ortamlar (mg/l)       |      |       | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |                        |                 | Eksplant Başına Sürgün Sayısı <sup>1</sup> (adet) |                        |                 |
|-----------------------|------|-------|---------------------------------------|------------------------|-----------------|---------------------------------------------------|------------------------|-----------------|
| BAP                   | NAA  | Kin   | Hipokotil                             | Petiollü Tam Kotiledon | Ortamların Ort. | Hipokotil                                         | Petiollü Tam Kotiledon | Ortamların Ort. |
| 2,00                  | 0,10 | 1,00  | 0,00 b <sup>2</sup>                   | 3,33 cd                | 1,66            | 0,00 a                                            | 0,67 cde               | 0,33            |
| 2,00                  | 0,10 | 2,00  | 0,00 b                                | 13,33 ab               | 6,67            | 0,00 a                                            | 1,33 bcd               | 0,67            |
| 2,00                  | 0,10 | 4,00  | 0,00 b                                | 20,00 a                | 10,00           | 0,00 a                                            | 2,17 ab                | 1,08            |
| 4,00                  | 0,10 | 1,00  | 0,00 b                                | 3,33 cd                | 1,67            | 0,00 a                                            | 0,33 de                | 0,17            |
| 4,00                  | 0,10 | 2,00  | 0,00 b                                | 16,67 ab               | 8,33            | 0,00 a                                            | 1,55 abc               | 0,77            |
| 4,00                  | 0,10 | 4,00  | 0,00 b                                | 10,00 bc               | 5,00            | 0,00 a                                            | 2,50 a                 | 1,25            |
| 2,00                  | 0,50 | 1,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 2,00                  | 0,50 | 2,00  | 3,33 ab                               | 0,00 d                 | 1,67            | 0,33 a                                            | 0,00 e                 | 0,17            |
| 2,00                  | 0,50 | 4,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 4,00                  | 0,50 | 1,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 4,00                  | 0,50 | 2,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 4,00                  | 0,50 | 4,00  | 0,00 b                                | 3,33 cd                | 1,67            | 0,00 a                                            | 0,33 de                | 0,17            |
| 0,50                  | 0,10 | 2,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 0,50                  | 0,10 | 4,00  | 0,00 b                                | 3,33 cd                | 1,67            | 0,00 a                                            | 0,33 de                | 0,17            |
| 1,00                  | 0,10 | 2,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 1,00                  | 0,10 | 4,00  | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| 0,50                  | 0,10 | 6,00  | 6,67 a                                | 0,00 d                 | 3,33            | 0,67 a                                            | 0,00 e                 | 0,33            |
| 0,50                  | 0,10 | 12,00 | 0,00 b                                | 0,00 d                 | 0,00            | 0,00 a                                            | 0,00 e                 | 0,00            |
| Eksplantlara Ait Ort. |      |       | 0,56                                  | 4,07                   |                 | 0,05                                              | 0,51                   |                 |

<sup>1</sup> Sürgün veren eksplant başına sürgün sayısı

<sup>2</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

LSD 9,291 (Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi)

LSD 1,049 (Eksplant Başına Sürgün Sayısı)

Hipokotil eksplantında, eksplant başına sürgün sayısı ya 0,00 ya da onunla aynı gruba girecek kadar az olduğundan, ortamlar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Çizelge 4.6). Petiollü tam kotiledon eksplantı, eksplant başına sürgün sayısı bakımından değerlendirildiğinde ise en fazla sürgün 2,50 adet ile 4,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 4,00 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamdan elde edilen sonuç ile 2,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 4,00 mg/l kinetin ile 4,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 2,00 mg/l kinetin içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.6).

Sürgün veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı yönünden eksplantlara ait ortalamalar karşılaştırıldığında, petiollü tam kotiledon eksplantının hipokotil eksplantından daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Bu denemede kullanılan ortamlarda sürgün veren eksplant yüzdesi çok düşük olduğundan, petride toplam sürgün sayısı hesaplanmamıştır.

Yapılan bu araştırmada kinetinin kolzanın hipokotil ve kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonunu arttırmadığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Lazzeri and Dunwell, (1984) ile Klimaszewska and Keller, (1985) tarafından yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir. Bunun yanında, Turgut vd., (1994a), BAP, kinetin ve NAA içeren ortamda petiollü tam kotiledon eksplantında % 90 rejenerasyon elde ettiğini bildirmiştir. Bu durum aynı türe ait çeşitlerin farklı büyüme düzenleyicilerine ve onların dozlarına farklı tepki göstermeleri ile açıklanabilir.

#### 4.2.4. Test edilen farklı çeşitlerde BAP ve NAA'nın adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Tarok çeşidinde adventif sürgün rejenerasyonunu artırmak için değişik eksplantların ve farklı büyümeyi düzenleyicilerin kullanılması sonucunda; en yüksek adventif sürgün rejenerasyonu hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından BAP ve NAA'nın birlikte kullanıldığı ortamlardan elde edilmiştir ( Çizelge 4.2). Araştırma materyali olarak seçilen diğer 9 çeşide ait hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları Tarok çeşidinde iyi sonuç veren 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA ile yalnızca 2 mg/l BAP'in kullanıldığı ortamlarda denemeye alınmıştır. Ayrıca, daha önce denenmeyen yalnızca 4,00 mg/l BAP içeren ortamda da adventif sürgün rejenerasyonunun etkisi araştırılmıştır. Bu ortamlarda çeşitlerin sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7'de de görüldüğü gibi kullanılan ortamların, çeşitlerin ve eksplantların sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına etkisi 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortam x çeşit grubunda interaksyon gözlenmezken, ortam x eksplant ve çeşit x eksplant gruplarında interaksyon 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Ortam x çeşit x eksplant grubunda ise istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Çizelge 4.7 eksplant başına sürgün sayısı bakımından incelendiğinde, yine ortam x çeşit grubunda interaksyon gözlenmezken ortam x eksplant ve çeşit x eksplant gruplarında interaksyon 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Ayrıca, ortam x çeşit x eksplant

grubunda interaksiyon 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları ise Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı BAP ve NAA dozlarının kolzanın değişik çeşitlerine ait hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |          | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          |
|----------------------|------|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
|                      |      | K.O.                                  | F        | K.O.                                 | F        |
| Ortam                | 2    | 532,275                               | 4,984**  | 52,780                               | 10,045** |
| Çeşit                | 8    | 987,215                               | 9,243**  | 54,676                               | 10,406** |
| Eksplant             | 1    | 8407,715                              | 78,719** | 329,988                              | 62,805** |
| Ortam×Çeşit          | 16   | 71,276                                | 0,667    | 8,984                                | 1,710    |
| Ortam×Eksplant       | 2    | 531,927                               | 4,980**  | 34,792                               | 6,622**  |
| Çeşit×Eksplant       | 8    | 515,263                               | 4,824**  | 37,043                               | 7,050**  |
| Ortam×Çeşit×Eksplant | 16   | 166,575                               | 1,560    | 11,094                               | 2,111*   |
| Hata                 | 108  | 106,806                               |          | 5,254                                |          |
| Toplam               | 162  |                                       |          |                                      |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.8 incelendiğinde sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hipokotil eksplantı test edilen tüm çeşitlerin ortalaması alındığında en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu % 4,44 ile sadece 2,00 mg/l BAP içeren ortamda vermiştir. Bununla birlikte, 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilen sonuç (% 2,59) ile 2,00 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilen sonuç arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantından ise en yüksek adventif sürgün rejenerasyonu % 23,70 ile 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir ancak, kültür ortamlarında aşırı köklenme görülmüştür. Eksplant ortalamalarına

Çizelge 4.8. Farklı çeşitlerde ve BAP ve NAA'nın değişik dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortam x eksplant arasındaki interaksiyona ait Duncan sonuçları

| Ortamlar (mg/l)       |      | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |                        |
|-----------------------|------|---------------------------------------|------------------------|
| BAP                   | NAA  | Hipokotil                             | Petiollü Tam Kotiledon |
| 0,50                  | 0,50 | 2,59 ab <sup>1</sup>                  | 23,70 a                |
| 2,00                  | 0,00 | 4,44 a                                | 12,59 b                |
| 4,00                  | 0,00 | 0,37 b                                | 14,07 b                |
| Eksplant Ortalamaları |      | 2,47                                  | 16,76                  |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir  
LSD 5,575

Çizelge 4.9. Farklı çeşitlerde ve BAP ile NAA'nın değişik dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x eksplant arasındaki interaksiyona ait Duncan sonuçları

| Çeşitler              | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi % |                        |
|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|
|                       | Hipokotil                           | Petiollü Tam Kotiledon |
| Hansen                | 0,00 a <sup>1</sup> A <sup>2</sup>  | 0,00 a E               |
| Spok                  | 5,56 b A                            | 43,33 a A              |
| Quinta                | 5,56 b A                            | 20,00 a BC             |
| Kosa                  | 5,56 b A                            | 15,56 a BC             |
| Honk                  | 1,11 a A                            | 5,56 a DE              |
| Helios                | 1,11 b A                            | 26,67 a B              |
| Star                  | 2,22 a A                            | 4,44 a DE              |
| Darmor                | 0,00 b A                            | 21,11 a BC             |
| Bienvenü              | 1,11 b A                            | 14,44 a CD             |
| Eksplant Ortalamaları | 2,47                                | 16,76                  |

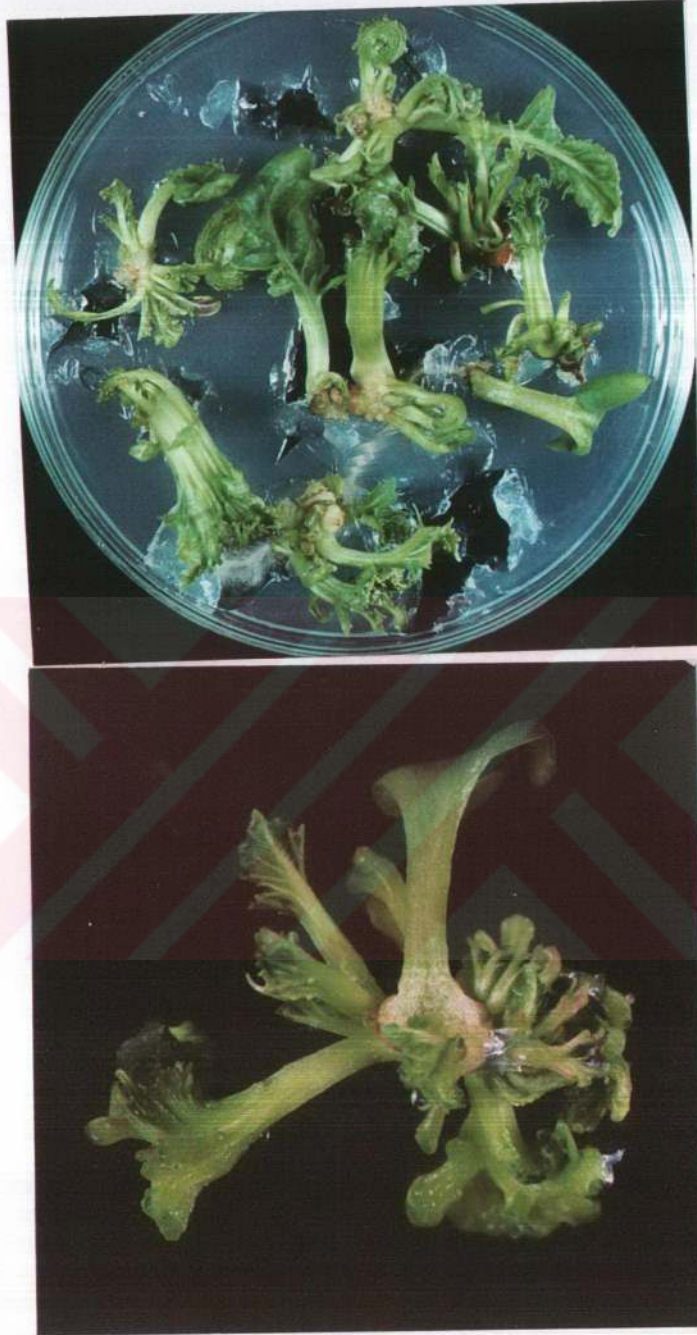
<sup>1</sup> Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

<sup>2</sup> Aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.  
LSD 3,708

bakıldığında, petiollü tam kotiledon eksplantının (% 16,76) hipokotil eksplantından (% 2,47) çok daha iyi sonuç verdiği görülmektedir.

Çizelge 4.9’da da görüldüğü gibi, tüm çeşitler hipokotil eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından istatistiksel bir fark göstermediğinden aynı gruba girmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantında ise en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu % 43,33 ile Spok çeşidi vermiştir (Şekil 4.4). Ayrıca, çeşitler kendi içinde eksplant tipine göre değerlendirildiğinde, bütün çeşitlerde petiollü kotiledon eksplantı hipokotil eksplantından daha yüksek oranda sürgün oluşturan eksplant yüzdesine sahip olmuştur. Bununla birlikte Hansen, Honk ve Star çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları arasında istatistiksel bir fark gözlenmediğinden aynı gruba girmişlerdir.

Çizelge 4.10 incelendiğinde, eksplant başına sürgün sayısı bakımından Hansen çeşidinde üç ortamda da adventif sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Spok çeşidinin hipokotil eksplantlarında kullanılan ortamlar istatistiksel bir farka neden olmamıştır. Petiollü tam kotiledon eksplantında ise yalnızca 2,00 mg/l BAP içeren ve 4,00 mg/l BAP içeren ortamlar 14,78 adet ve 14,33 adet ile en fazla eksplant başına sürgün veren ortamlar olmuştur. Quinta çeşidinin hipokotil eksplantında, en fazla sürgün 5,00 adet ile 2,00 mg/l BAP içeren ortamdan sağlanmıştır. Bu çeşitte petiollü tam kotiledon eksplantında 2,27 adet ile 3,31 adet arasında eksplant başına sürgün sayısı elde edilmiş ve bunların istatistiksel olarak farklı olmadığı gözlenmiştir. Kosa çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı bakımından hipokotil eksplantında ortamların etkisi farklı çıkmıştır. Bu eksplantta en fazla eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla 1,67 adet ve 1,50 adet ile 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA ile yalnızca 2,00 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantında ise



Şekil 4.4. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2 mg/l BAP içeren MSO besin ortamında Spok çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.10. Farklı BAP ve NAA dozlarının kolzanın değişik çeşitlerine ait hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları üzerinde oluşan sürgün sayısına etkisine ait Duncan sonuçları ve petri başına sürgün sayısı

| Ortamlar (mg/l) |      | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |                    |       |        |        |       |       |        |       |       |        |       |       |       |        |        |          |        |           |      |
|-----------------|------|--------------------------------------|--------------------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|----------|--------|-----------|------|
|                 |      | Hansen                               |                    | Spok  |        | Quinta |       | Kosa  |        | Honk  |       | Helios |       | Star  |       | Dormor |        | Bienvenü |        | Ort. Ort. |      |
|                 |      |                                      |                    |       |        |        |       |       |        |       |       |        |       |       |       |        |        |          |        |           |      |
| BAP             | NAA  | Hip.                                 | Kot.               | Hip.  | Kot.   | Hip.   | Kot.  | Hip.  | Kot.   | Hip.  | Kot.  | Hip.   | Kot.  | Hip.  | Kot.  | Hip.   | Kot.   | Hip.     | Kot.   | Hip.      | Kot. |
| 0,50            | 0,50 | 0,00a                                | 0,00a <sup>1</sup> | 1,00a | 3,33b  | 0,67b  | 2,27a | 1,67a | 1,33b  | 0,00a | 0,77a | 1,00a  | 2,80a | 0,33a | 0,33a | 0,00a  | 2,15ab | 0,00a    | 0,87b  | 0,52      | 1,54 |
| 2,00            | 0,00 | 0,00a                                | 0,00a              | 2,33a | 14,78a | 5,00a  | 3,00a | 1,50a | 8,00a  | 0,33a | 3,00a | 0,00a  | 4,33a | 0,33a | 1,00a | 0,00a  | 5,50a  | 1,67a    | 3,30ab | 1,24      | 4,77 |
| 4,00            | 0,00 | 0,00a                                | 0,00a              | 5,33a | 14,33a | 0,00b  | 3,31a | 0,00b | 4,65ab | 0,00a | 0,00a | 0,00a  | 3,97a | 0,00a | 2,33a | 0,00a  | 0,83b  | 0,00a    | 6,67a  | 0,00      | 4,01 |
| Çeşitlerin ort. |      | 0,00                                 | 0,00               | 1,11  | 10,81  | 1,89   | 2,86  | 1,06  | 4,66   | 0,11  | 1,26  | 0,33   | 3,70  | 0,22  | 1,22  | 0,00   | 2,83   | 0,56     | 3,62   |           |      |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

LSD 9,657

Çizelge 4.10 (Devamı). Farklı çeşitlerde BAP ve NAA'nın değişik dozlarının eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait Duncan sonuçları ve petri başına sürgün sayısı

| Petri Başına Sürgün sayısı |      |        |      |      |       |        |      |      |       |      |      |        |       |      |      |        |       |          |       |
|----------------------------|------|--------|------|------|-------|--------|------|------|-------|------|------|--------|-------|------|------|--------|-------|----------|-------|
| Ortamlar<br>(mg/l)         |      | Hansen |      | Spok |       | Quinta |      | Kosa |       | Honk |      | Helios |       | Star |      | Dormor |       | Bienvenü |       |
|                            |      |        |      |      |       |        |      |      |       |      |      |        |       |      |      |        |       |          |       |
| BAP                        | NAA  | Hip.   | Kot. | Hip. | Kot.  | Hip.   | Kot. | Hip. | Kot.  | Hip. | Kot. | Hip.   | Kot.  | Hip. | Kot. | Hip.   | Kot.  | Hip.     | Kot.  |
| 0,50                       | 0,50 | 0,00   | 0,00 | 0,33 | 18,87 | 0,45   | 6,81 | 1,11 | 2,22  | 0,00 | 1,03 | 0,33   | 11,20 | 0,11 | 0,11 | 0,00   | 7,16  | 0,00     | 1,74  |
| 2,00                       | 0,00 | 0,00   | 0,00 | 2,33 | 49,26 | 5,00   | 2,00 | 1,50 | 5,34  | 0,11 | 0,99 | 0,00   | 12,99 | 0,11 | 0,33 | 0,00   | 14,67 | 0,56     | 1,09  |
| 4,00                       | 0,00 | 0,00   | 0,00 | 1,77 | 57,32 | 0,00   | 7,72 | 0,00 | 10,85 | 0,00 | 0,00 | 0,00   | 3,10  | 0,00 | 1,55 | 0,00   | 0,28  | 0,00     | 13,34 |

en fazla sürgün sayısı 8,00 adet ile 2,00 mg/l BAP ve 4,65 adet ile 4,00 mg/l BAP içeren ortamlarda bulunmuştur. Honk, Helios ve Star çeşitlerinde kullanılan ortamların, eksplantlardaki eksplant başına sürgün sayısına etkisi istatistiksel bir fark göstermediğinden ortamların hepsi aynı gruba girmiştir. Darmor çeşidinde ise hipokotil eksplantı kullanılan ortamların tümünde sürgün oluşturmamıştır. Petiollü tam kotiledon eksplantında ise en fazla eksplant başına sürgün sayısı 2,00 mg/l BAP (5,50 adet) ile 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA (2,15 adet) içeren ortamdan elde edilmiştir. Bienvenü çeşidinde hipokotil eksplantı kullanılan tüm ortamlarda 0 - 1,67 adet arasında sürgün vermiştir. Bu sonuçlar arasında istatistiksel bir fark olmadığından hepsi aynı gruba girmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantı en fazla sürgün sayısını 6,67 adet ile 4,00 mg/l BAP ve 3,30 adet ile 2,00 mg/l BAP içeren ortamlarda vermiştir. Çeşitlerin ortalamalarına bakıldığında, en fazla eksplant başına sürgün sayısını petiollü tam kotiledon eksplantından Spok çeşidi vermiştir. Ortamların ortalamalarına bakıldığında ise en iyi ortamın 4,77 adet ile 2,00 mg/l BAP ya da 4,01 adet ile 4,00 mg/l BAP içeren ortam olduğu gözlenmiştir.

Aynı türe ait çeşitler arasında adventif sürgün rejenerasyonu bakımından büyük farklar olduğu bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Hughes, 1981; Tomes and Smith, 1985; Yıldız, 2000). Çeşitler arasındaki bu farklılık genotip ve çevrenin birlikte etkisi ile açıklanmaktadır. Doku kültürü çalışmalarında birebir her adımın kontrollü şartlar altında tekrarlanması, çeşitler arasında adventif sürgün rejenerasyonu kabiliyetinde görülen farklılığın daha çok genotipten kaynaklandığı fikrini desteklemektedir. Buna rağmen, aynı çeşitte aynı petri içerisinde aynı tip eksplantların göstermiş oldukları adventif sürgün rejenerasyonu kabiliyetleri dahi çok farklı olabilmektedir. Bu durum, eksplant hassasiyeti ile açıklanabilir. Öyleki, Yang et al., (1991), *B. carinata*'nın

hipokotil eksplantlarıyla yaptıkları çalışmada hipokotillerin üstteki segmentlerinin alttaki segmentlerden daha rejeneratif olduğunu bildirmişlerdir.

Ono et al., (1994), kolzanın 100 farklı çeşidinde aynı ortam ve aynı eksplant tipi kullandıklarında adventif sürgün rejenerasyonunun sıfır ile % 97 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Khehra and Mathias (1992), sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi ve genotip olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmada da denemeye alınan kolza çeşitlerinin aynı ortam koşullarında farklı adventif sürgün rejenerasyon kabiliyeti gösterdikleri ve çeşitlerin farklı dozlarda büyümeyi düzenleyici içeren besin ortamlarında da farklı davrandıkları gözlenmiştir.

#### **4.2.5. Spok, Quinta ve Star çeşitlerinde TDZ'un adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi**

Test edilen bütün çeşitlerde BAP ve NAA ile yapılan adventif sürgün rejenerasyonu denemesinde istatistiksel gruplandırmada en iyi çeşit olarak belirlenen Spok, orta seviyede bulunan Quinta ve en son grupta yer alan Star çeşidinde Thidiazuronun (TDZ) değişik dozlarının adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. TDZ'nun, *in vitro* kültürlerde sitokinin kaynağı olarak kullanılan ve sürgün rejenerasyonunu teşvik eden bir büyümeyi düzenleyici olduğu değişik araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Thomas and Katterman, 1986; Hosokow et al., 1996; Zhou et al., 1994; Malik and Saxena, 1992).

TDZ'un 0,01 mg/l ile 0,80 mg/l arasındaki dozları Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantlarından sürgün veren eksplant yüzdesine ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11’de de görüldüğü gibi, ortamların tek başına sürgün veren eksplant yüzdesine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Çeşitlerin tek başına etkisi 0,05 düzeyinde önemli, eksplantların tek başına etkisi ise 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Ayrıca, ortam x çeşit ve çeşit x eksplant etkisi 0,05 düzeyinde önemli çıkarken, ortam x eksplant grubu istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortam x çeşit x eksplant etkisi 0,01 düzeyinde farklılık bulunmuştur. Tespit edilen farklılıkların önem düzeyi Duncan Testi ile araştırılmış ve sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Çizelge 4.11 eksplant başına sürgün sayısı bakımından incelendiğinde, çeşitler ve eksplantlar arasındaki fark 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Yine, çeşit x eksplant grubu arasındaki etkileşim 0.05 düzeyinde önemli bulunurken, ortam x çeşit, ortam x eksplant ve ortam x çeşit x eksplant gruplarının etkileşimi istatistiksel olarak

Çizelge 4.11. Farklı TDZ dozlarının Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiolleli tam kotiledon ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |          | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          |
|----------------------|------|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
|                      |      | K.O.                                  | F        | K.O.                                 | F        |
| Ortam                | 4    | 132,539                               | 1,895    | 7,565                                | 1,604    |
| Çeşit                | 2    | 249,954                               | 3,573*   | 24,145                               | 5,120**  |
| Eksplant             | 1    | 2734,939                              | 39,095** | 95,481                               | 20,247** |
| Ortam×Çeşit          | 8    | 156,263                               | 2,234*   | 4,683                                | 0,993    |
| Ortam×Eksplant       | 4    | 156,805                               | 2,241    | 7,418                                | 1,573    |
| Çeşit×Eksplant       | 2    | 244,339                               | 3,493*   | 22,612                               | 4,795*   |
| Ortam×Çeşit×Eksplant | 8    | 280,816                               | 4,014**  | 7,933                                | 1,682    |
| Hata                 | 60   | 69,957                                |          | 4,716                                |          |
| Toplam               | 90   |                                       |          |                                      |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.

önemsiz bulunmuştur. Çeşit x eksplant arasındaki interaksiyona ait Duncan Testi Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi, Spok çeşidinde en yüksek sürgün veren eksplant yüzdesi petiollü tam kotiledon eksplantında % 43,30 ile 0,20 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Hipokotil eksplantında ise sürgün veren eksplant yüzdesi ya oldukça düşük ya da hiç sürgün oluşmadığından, ortamlar arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiş ve hepsi aynı gruba girmiştir. Quinta çeşidinin, petiollü kotiledon eksplantında en fazla sürgün veren eksplant yüzdesi % 10,00 ile 0,05, 0,40 ve 0,80 mg/l ayrıca, % 6,70 ile 0,20 mg/l TDZ içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Hipokotil eksplantın da, kullanılan ortamlarda sürgün yüzdesi bakımından 0,80 mg/l doz hariç diğerlerinde sürgün oluşmadığından fark önemsiz çıkmış olup, tüm ortamlar aynı gruba girmiştir. Star çeşidinde ise, petiollü kotiledon eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi sonuç % 20,00 ile 0,05 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Ayrıca, 0,40 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilen eksplant yüzdesi (% 10,00) de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Hipokotil eksplantı ise, hiçbir ortamda sürgün oluşturmamıştır.

Spok çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantından BAP ve NAA’ın kullanıldığı besin ortamında en fazla sürgün veren eksplant yüzdesi % 43,33 olarak bulunmuş olup, TDZ’un 0,20 mg/l kullanıldığı besin ortamında da bu değere çok yakın (% 43,30) sürgün veren eksplant yüzdesi elde edilmiştir. Quinta çeşidinde, daha önce BAP ve NAA içeren ortamdan elde edilen % 20,00 sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bu denemede % 10,00 düzeyine inmiştir. BAP ve NAA içeren ortamda sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en fazla % 4,44 olan Star çeşidinde ise, 0,05 mg/l TDZ ilave edilen ortamda % 20,00 düzeyine çıkmıştır. Denemeye alınan üç çeşide ait hipokotil eksplantı

Çizelge 4.12. Farklı TDZ dozlarının Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiollü tam kotiledon ve hipokotillerinden sürgün veren eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan sonuçları

| Çeşitler              | TDZ (mg/l) | Sürgün Veren Eksplant Yüzdesi (%) |           |                           | Petri Başına Sürgün Sayısı (Adet) |           |
|-----------------------|------------|-----------------------------------|-----------|---------------------------|-----------------------------------|-----------|
|                       |            | Petiollü Tam Kotiledon            | Hipokotil | Ortamlara Ait Ortalamalar | Petiollü Tam Kotiledon            | Hipokotil |
| Spok                  | 0,01       | 6,70 bc                           | 0,00 a    | 3,30                      | 1,79                              | 0,00      |
|                       | 0,05       | 0,00 c                            | 3,30 a    | 1,70                      | 0,00                              | 0,44      |
|                       | 0,20       | <b>43,30</b> a                    | 0,00 a    | <b>21,70</b>              | <b>30,87</b>                      | 0,00      |
|                       | 0,40       | 10,00 b                           | 0,00 a    | 5,00                      | 4,50                              | 0,00      |
|                       | 0,80       | 16,70 b                           | 0,00 a    | 8,30                      | 11,69                             | 0,00      |
| Eksplant Ortalamaları |            | 15,30                             | 0,67      |                           |                                   |           |
| Quinta                | 0,01       | 0,00 b                            | 0,00 a    | 0,00                      | 0,00                              | 0,00      |
|                       | 0,05       | <b>10,00</b> a                    | 0,00 a    | <b>5,00</b>               | 1,00                              | 0,00      |
|                       | 0,20       | <b>6,70</b> a                     | 0,00 a    | 3,30                      | 0,56                              | 0,00      |
|                       | 0,40       | <b>10,00</b> a                    | 0,00 a    | <b>5,00</b>               | 1,17                              | 0,00      |
|                       | 0,80       | <b>10,00</b> a                    | 6,70 a    | 3,30                      | 1,83                              | 1,12      |
| Eksplant Ortalamaları |            | 5,30                              | 1,30      |                           |                                   |           |
| Star                  | 0,01       | 0,00 c                            | 0,00 a    | 0,00                      | 0,00                              | 0,00      |
|                       | 0,05       | <b>20,00</b> a                    | 0,00 a    | 10,00                     | <b>35,40</b>                      | 0,00      |
|                       | 0,20       | 3,30 bc                           | 0,00 a    | 1,70                      | 1,09                              | 0,00      |
|                       | 0,40       | <b>10,00</b> ab                   | 0,00 a    | 5,00                      | 4,33                              | 0,00      |
|                       | 0,80       | 3,30 bc                           | 0,00 a    | 1,70                      | 0,44                              | 0,00      |
| Eksplant Ortalamaları |            | 7,30                              | 0,00      |                           |                                   |           |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir  
LSD 13,66

sürgün veren eksplant yüzdesi bakımından incelendiğinde ise kullanılan tüm TDZ dozlarında oldukça düşük sonuçların (% 3,30, % 6,70) elde edildiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir.

Bütün bu sonuçlar açıkça göstermektedir ki, diğer büyümeyi düzenleyicilerde olduğu gibi TDZ’da bitkinin genotipine bağlı olarak çok farklı sonuçlar verebilmektedir.

Kullanılan tüm TDZ dozları dikkate alındığında, Spok çeşidinde petiollü kotiledon eksplantı hipokotil eksplantından daha fazla eksplant başına sürgün sayısı (4,26 adet) üretmiştir (Çizelge 4.13). Quinta ve Star çeşitlerinde ise hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Ayrıca, çeşit ortalamalarına bakıldığında, ortalama 2,26 ile en iyi çeşit Spok olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Spok, Quinta ve Star çeşitlerinin petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantlarında TDZ’un eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait Duncan sonuçları

| Çeşitler      | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |           | Çeşitlere Ait Ortalamalar |
|---------------|--------------------------------------|-----------|---------------------------|
|               | Petiollü Tam Kotiledon               | Hipokotil |                           |
| Spok          | 4,26 a                               | 0,27 b    | 2,26                      |
| Quinta        | 0,97 a                               | 0,33 a    | 0,65                      |
| Star          | 1,55 a                               | 0,00 a    | 0,77                      |
| Eksplant Ort. | 2,26                                 | 0,20      |                           |

<sup>1</sup> Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir. LSD 1,586

Bu araştırmada, çeşitlerin ve eksplant tiplerinin TDZ’a karşı adventif sürgün rejenerasyon tepkilerinin farklı olduğu görülmektedir. Örneğin, Spok çeşidinde BAP ve NAA içeren ortamdan elde edilen rejenerasyona çok yakın sürgün yüzdesi elde edilirken, Quinta çeşidinde % 50 azalma, Star çeşidinde ise 4-5 katı artış gözlenmiştir. Kolzada TDZ sitokinini ile ilgili daha önce yapılmış bir araştırmaya rastlanmadığından kolza bitkisinde TDZ’nin etkisi karşılaştırılamamıştır. Ancak, başka bitkilerde yapılan araştırmalarda farklı

sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin, Böhmer et al., (1995) bezelyede TDZ'un sürgün rejenerasyonunu 8-10 kat arttırdığını Feijoo and Iglesias (1998), ise TDZ'un BAP sitokinini kadar yüksek adventif sürgün rejenerasyonu göstermediğini ve Bretagne et al., (1994), TDZ'un yüksek dozlarının toksik etki yaptığını bildirmişlerdir.

#### **4.2.6. Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarında farklı BAP ve NAA dozlarının adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi**

Farklı çeşitlerde BAP ve NAA ile yapılan adventif sürgün rejenerasyonu denemesinde, denemeye alınan tüm ortamlarda ve eksplant tiplerinde hiç sürgün vermeyen Hansen çeşidi ile sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi çeşit olarak tesbit edilen Spok çeşidinin olgunlaşmamış embriyo eksenleri ve kotiledon eksplantları BAP (0,50 mg/l – 4,00 mg/l) ve NAA (0,50 mg/l – 4,00 mg/l)'in değişik oranlarını içeren MSO ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürler 6 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı yönünden incelenmiştir. Her iki özelliğe ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.14 incelendiğinde çeşitler arasındaki fark önemli olmazken, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortamlar arasında 0,05 ve eksplantlar arasında 0,01 düzeyinde farklılık görüldüğü gibi; çeşit x ortam, çeşit x eksplant ve ortam x eksplant arasında 0,01 düzeyinde fark oluşmuştur. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.15, 4.16, ve 4.17'de verilmiştir. Çeşit x ortam x eksplant grubunda ise istatistiksel olarak önemli bir fark çıkmamıştır. Çizelge 4.14 eksplant başına

sürgün sayısı bakımından incelendiğinde, çeşitler arasında 0,05 ve eksplantlar arasında 0,01 düzeyinde farklılık olduğu gibi; çeşit x ortam ve ortam x eksplant grubunda 0,05 düzeyinde , ayrıca çeşit x ortam x eksplant grubunda da 0,01 düzeyinde farklılık oluşmuştur. Bu farklılığın önem düzeyi Duncan testi ile belirlenmiş ve sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı BAP ve NAA dozlarının Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi sonuçları

| Varyasyon Kaynakları    | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |           | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          |
|-------------------------|------|---------------------------------------|-----------|--------------------------------------|----------|
|                         |      | K.O.                                  | F         | K.O.                                 | F        |
| Çeşit                   | 1    | 14,881                                | 0,098     | 4,811                                | 5,483*   |
| Ortam                   | 7    | 344,882                               | 2,261*    | 1,141                                | 1,300    |
| Eksplant                | 1    | 24118,759                             | 158,116** | 30,657                               | 34,940** |
| Çeşit x Ortam           | 7    | 520,624                               | 3,413**   | 2,087                                | 2,378*   |
| ÇeşitxEksplant          | 1    | 1356,956                              | 8,896**   | 3,319                                | 3,783    |
| Ortam x Eksplant        | 7    | 882,315                               | 5,784**   | 1,908                                | 2,175*   |
| Çeşitx Ortam x Eksplant | 7    | 224,515                               | 1,472     | 2,819                                | 3,213**  |
| Hata                    | 64   | 152,539                               |           | 0,877                                |          |
| Toplam                  | 96   |                                       |           |                                      |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.15’de görüldüğü gibi, çeşit x ortam interaksyonunda, Hansen çeşidinde sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, kullanılan 2,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA içeren ortam hariç diğer ortamlarda istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiş olup, en yüksek sürgün veren eksplant yüzdesi (% 55,00) 0,50 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Spok çeşidinde ise en yüksek değerler yine % 66,67 ile 0,50 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmesine rağmen, % 55,00 ile 2,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA, % 53,33 ile 2,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA ve % 55,00 ile 0,50

mg/l BAP ve 4,00 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel bir fark gözlenmediğinden aynı gruba girmişlerdir.

Çizelge 4.15. Farklı BAP ve NAA dozlarında Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksen ve kotiledon eksplantlarından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x ortam interaksyonuna ait Duncan sonuçları

| Ortamlar (mg/l) |      | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |                |
|-----------------|------|---------------------------------------|----------------|
| BAP             | NAA  | Hansen                                | Spok           |
| 1,00            | 0,50 | 43,33 a <sup>1</sup>                  | 31,67 b        |
| 1,00            | 1,00 | 51,67 a                               | 29,17 b        |
| 2,00            | 0,50 | 53,33 a                               | 53,33 ab       |
| 2,00            | 1,00 | 21,67 b                               | 55,00 ab       |
| 4,00            | 0,50 | 48,33 a                               | 43,33 b        |
| 4,00            | 1,00 | 50,00 a                               | 38,33 b        |
| 0,50            | 2,00 | <b>55,00</b> a                        | <b>66,67</b> a |
| 0,50            | 4,00 | 40,00 ab                              | 55,00 ab       |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

LSD 14,25

Çizelge 4.16'da çeşit x eksplant interaksyonu sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından incelendiğinde; Hansen çeşidinde % 60,84 ile olgunlaşmamış embriyo eksenlerinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantından istatistiksel olarak daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Spok çeşidinde de benzer sonuçlar alınmış olup, % 54,10 ile olgunlaşmamış embriyo ekseninin olgunlaşmamış kotiledon eksplantından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.6). Sonuç olarak, olgunlaşmamış embriyo eksplantı olgunlaşmamış kotiledon eksplantından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından eksplant ortalamalarında da daha başarılı bulunmuştur (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x eksplant interaksyonuna ait Duncan sonuçları

| Çeşitler      | Sürgün Oluşturan Eksplant (%) |                              | Çeşitlere Ait Ortalamalar |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|
|               | Olgunlaşmamış Kotiledon       | Olgunlaşmamış Embriyo Ekseni |                           |
| Hansen        | 21,62 b <sup>1</sup>          | 60,84 a                      | 41,23                     |
| Spok          | 29,92 b                       | 54,10 a                      | 42,01                     |
| Eksplant Ort. | 25,77                         | 57,47                        |                           |

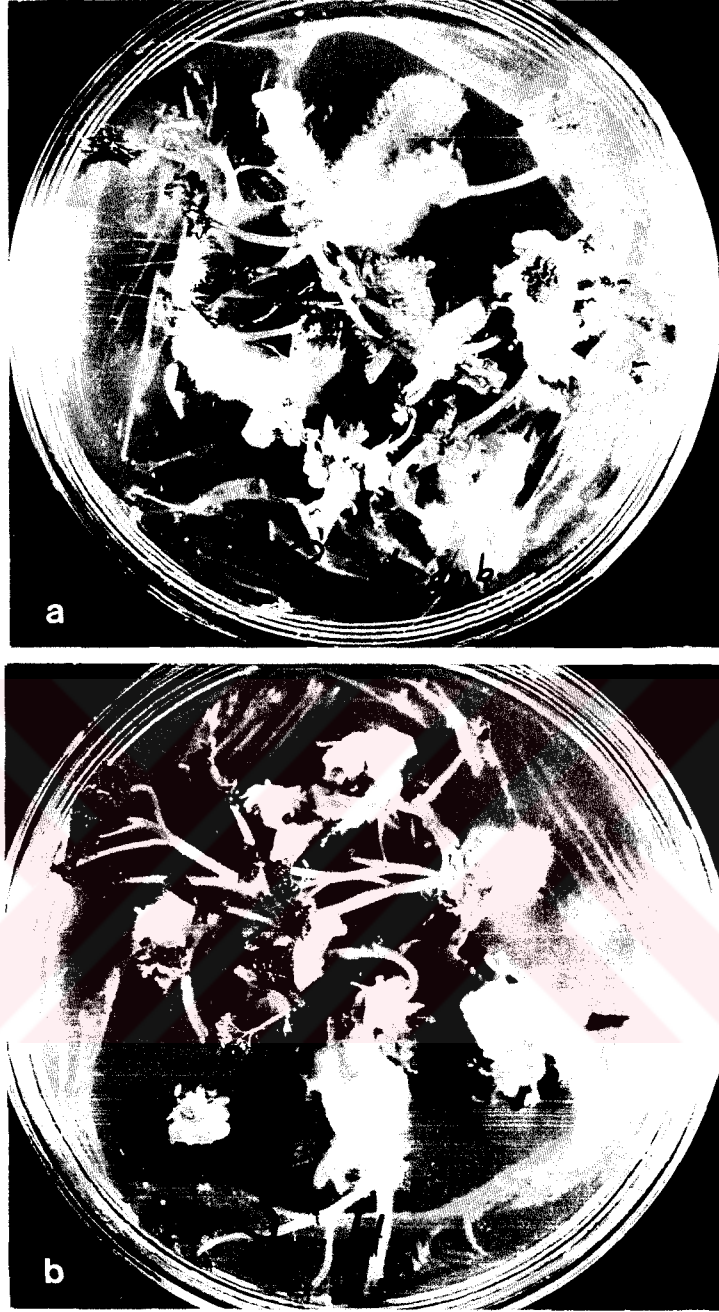
<sup>1</sup> Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir. LSD 14,25

Çizelge 4.17 incelendiğinde ortam x eksplant interaksyonunda olgunlaşmamış kotiledon eksplantında % 41,58 ile 0,50 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren besin ortamında en fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi elde edilmiş olup,

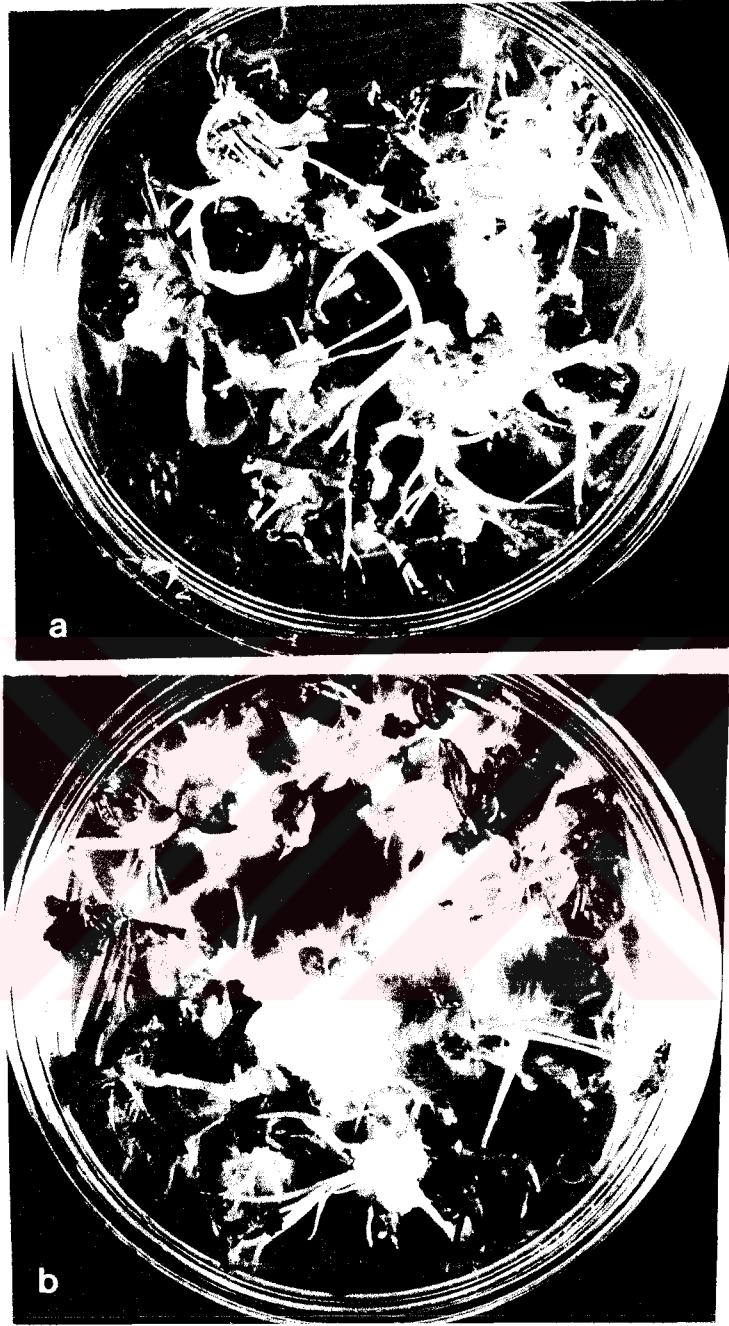
Çizelge 4.17. Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde ortam x eksplant interaksyonuna ait Duncan sonuçları

| Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |      |                         |                       |
|---------------------------------------|------|-------------------------|-----------------------|
| Ortamlar (mg/l)                       |      | Eksplantlar             |                       |
| BAP                                   | NAA  | Olgunlaşmamış Kotiledon | Olgunlaşmamış Embriyo |
| 1,00                                  | 0,50 | 33,00 ab <sup>1</sup>   | 41,93 c               |
| 1,00                                  | 1,00 | 22,61 bc                | 55,92 bc              |
| 2,00                                  | 0,50 | 20,68 bc                | 73,64 a               |
| 2,00                                  | 1,00 | 24,96 bc                | 45,57 c               |
| 4,00                                  | 0,50 | 12,29 c                 | 67,50 ab              |
| 4,00                                  | 1,00 | 18,57 bc                | 61,53 ab              |
| 0,50                                  | 2,00 | 41,58 a                 | 61,82 ab              |
| 0,50                                  | 4,00 | 32,46 ab                | 51,86 bc              |
| Eksplant Ortalamaları                 |      | 23,85                   | 68,12                 |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir. LSD 14,25



Şekil 4.5 Hansen çeşidinin olgunlaşmamış embriyo ekseni (a) ve olgunlaşmamış kotiledon (b) eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.6. Spok çeşidinin olgunlaşmamış embriyo ekseni (a) ve olgunlaşmamış kotiledon (b) eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu

bununla birlikte 0,50 mg/l BAP ve 4,00 mg/l NAA ile 1,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren besin ortamlarından elde edilen sürgün oluşturan eksplant yüzdesi de istatistiksel olarak önemli bir fark göstermediğinden aynı gruba girmiştir. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde ise en fazla sürgün oluşturan ortamın % 73,64 ile 2,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren besin ortamı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 4,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA, 4,00 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA ile 0,50 BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren besin ortamlarından elde edilen sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir.

Çizelge 4.18’de görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı Hansen çeşidinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantında en fazla 3 adet ile 4,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca, 1,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA ile 0,50 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren besin ortamlarından elde edilen eksplant başına sürgün sayısı da istatistiksel olarak bir fark göstermediğinden aynı gruba girmiştir. Olgunlaşmamış embriyo ekseninde ise en fazla eksplant başına sürgün sayısı 3,83 adet ile 2,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA, 3,66 adet ile 1,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

Spok çeşidinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantında kullanılan ortamlar arasında istatistiksel bir fark çıkmadığından hepsi aynı gruba girmiştir. Ancak, aynı çeşidin olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde en fazla eksplant başına sürgün sayısı 0,50 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren ortam dışında denemeye alınan tüm ortamlarda 2,30 ile 3,93 adet arasında sürgün elde edilmiş ve bunlar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 4.18. Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısı bakımından çeşit x ortam x eksplant interaksyonuna ait Duncan sonuçları

| Ortamlar (mg/l)       |      | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |                                 |                            |                                 |
|-----------------------|------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| BAP                   | NAA  | Hansen                               |                                 | Spok                       |                                 |
|                       |      | Olgunlaşmamış<br>Kotiledon           | Olgunlaşmamış<br>Embriyo Ekseni | Olgunlaşmamış<br>Kotiledon | Olgunlaşmamış<br>Embriyo Ekseni |
| 1,00                  | 0,50 | <b>1,99</b> ab                       | <b>3,66</b> a                   | 1,25 a                     | 3,58 a                          |
| 1,00                  | 1,00 | 1,17 b                               | 1,83 b                          | 1,33 a                     | 2,50 ab                         |
| 2,00                  | 0,50 | 0,75 b                               | <b>3,83</b> a                   | 1,23 a                     | 2,85 ab                         |
| 2,00                  | 1,00 | 0,43 b                               | 1,73 b                          | <b>2,23</b> a              | 3,87 a                          |
| 4,00                  | 0,50 | <b>3,00</b> a                        | 1,63 b                          | 0,67 a                     | <b>3,93</b> a                   |
| 4,00                  | 1,00 | 1,33 b                               | 1,08 b                          | 1,43 a                     | 3,57 a                          |
| 0,50                  | 2,00 | <b>1,90</b> ab                       | 2,07 b                          | 2,10 a                     | 1,60 b                          |
| 0,50                  | 4,00 | 1,00 b                               | 1,80 b                          | 1,93 a                     | 2,30 ab                         |
| Eksplant Ortalamaları |      | 1,45                                 | 2,20                            | 1,52                       | 3,02                            |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

LSD 1,528

Farklı bitki türlerinin olgunlaşmamış embriyo eksenleri ve kotiledonlarının yüksek adventif sürgün rejenerasyon kabiliyetine sahip oldukları değişik araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Ozias- Akins, 1989; Natali and Cavallini, 1987; Özcan vd., 1993; Özcan vd., 1996). Bu araştırmada da kolzanın Hansen ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantları yüksek oranda adventif sürgün üretmişlerdir.

#### 4.3. Rejenere olan Adventif Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Saksılarda Büyütülmesi

Spok çeşidinde, rejenere olan sürgünler 1-2 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek IBA içermeyen MSO ile 0,50, 1,00, 2,00 ve 4,00 mg/l IBA içeren MSO ortamlarında köklendirmeye alınmıştır. Farklı dozlarda kullanılan

IBA'in 2 hafta sonra köklenen sürgün oranı, sürgün başına kök sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Farklı IBA dozlarının Spok çeşidinden elde edilen 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          | 4   | 362,993                   | 0,780 | 1,270                           | 0,655 | 1,697             | 12,435** |
| Hata                 | 10  | 465,206                   |       |                                 |       |                   |          |
| Toplam               | 14  |                           |       |                                 |       |                   |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.19 incelendiğinde, köklenen sürgün oranı ve sürgün başına kök sayısında kullanılan ortamlar arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Ancak, kök uzunluğuna ortamların etkisi 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu etkinin önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20'de de görüldüğü gibi kullanılan IBA dozlarının köklenen sürgün oranına ve sürgün başına kök sayısına etkisi istatistiksel olarak önemsiz çıkmakla birlikte en yüksek köklenme oranı (% 93,33) ile ve en fazla sürgün başına kök sayısı (5,50) adet 0,50 mg/l IBA içeren ortamdan elde edilmiştir. En uzun kök oluşumu da IBA içermeyen veya 0,50 mg/l IBA içeren MSO ortamından elde edilmiştir. IBA dozu arttıkça kök uzunluğunda belirgin bir azalma kaydedilmiştir (Şekil 4.7). Köklenen sürgünler daha sonra saksılara aktarılıp iklim odasında yüksek nem altında (% 80-90) büyütülmüşlerdir (Şekil 4.8). iklim odasında 20 gün tutulan bitkiler son olarak seraya aktarıldıklarında çiçeklenerek tohum bağlamışlardır (Şekil 4.9). Adventif

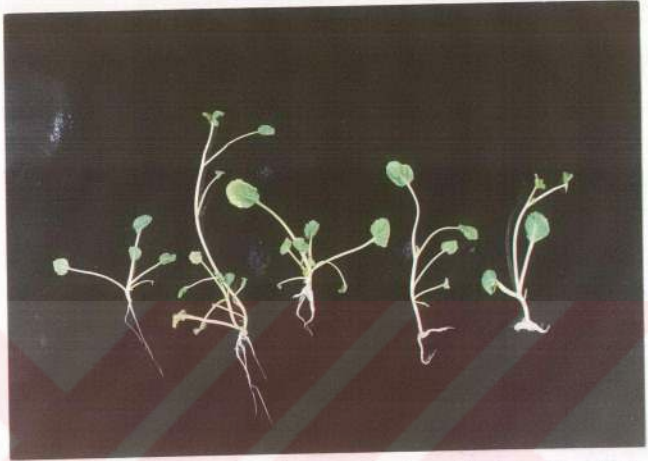
sürgün rejenerasyonu sonrasında elde edilen bu bitkilerin morfolojik olarak normal oldukları gözlenmiştir. Diğer çeşitlere ait adventif sürgünlerde 0,50 mg/l IBA içeren ortamda aynı başarıyla köklendirilerek serada büyütülebilmişlerdir.

Çizelge 4.20. Farklı IBA dozlarının Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerin köklenmesi üzerine etkisine ait Duncan sonuçları

| IBA Dozları<br>(mg/l) | Köklenen Sürgün<br>Oranı (%) | Sürgün Başına Kök<br>Sayısı (Adet) | Kök Uzunluğu (cm) |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| 0,00                  | 80,00                        | 4,53                               | 2,42 a            |
| 0,50                  | 93,33                        | 5,50                               | 1,83 ab           |
| 1,00                  | 86,67                        | 4,53                               | 1,41 bc           |
| 2,00                  | 64,44                        | 3,73                               | 0,78 cd           |
| 4,00                  | 86,67                        | 5,00                               | 0,59 d            |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Değişik araştırmacılar tarafından *Brassica napus* ve diğer *Brassica* türlerinde yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda elde edilen sürgünler, herhangi bir büyümeyi düzenleyici içermeyen MSO ortamında da köklendirilebilmiştir (Klimaszewska and Keller, 1985; Yang et al., 1991; Burnett et al., 1994; Khehra et al., 1992). Bazı araştırmacılar da yaptıkları çalışmalarda sürgünleri 2,00 mg/l IBA dozunda köklendirmişlerdir (Radke et al., 1988; Ono et al., 1994). Bu çalışmada ise en iyi köklenme büyüme düzenleyici içermeyen veya 0,50 mg/l IBA içeren ortamdan elde edilmiştir.



Şekil 4.7. Kültür başlangıcından 15 gün sonra Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerin farklı IBA içeren MSO ortamında köklendirilmesi. Sürgünler, soldan sağa sırasıyla 0; 0,50; 1,00; 2,00 ve 4,00 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirilmiştir



Şekil 4.8. Farklı IBA dozlarında (sırasıyla 0; 0,50; 1,00; 2,00 ve 4,00 mg/l) köklendirilen sürgünlerin iklim odasında 20 gün sonraki gelişmeleri



Şekil 4.9. Spok çeşidinden elde edilen adventif sürgünlerden gelişen bitkilerin 2,5 ay sonraki görünüşleri

#### 4.4. Non-Onkogenik *A. tumefaciens* Hatlarının Tütünde Test Edilmesi

##### 4.4.1. Tütün yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna seçici antibiyotik ve herbisitlerin etkisi

Gen aktarımı çalışmalarında yalnızca gen aktarılmış hücrelerin yaşamasını sağlamak ve dolayısıyla bu hücrelerden gelişecek sürgünlerin transgenik sürgünler olması ihtimalini kuvvetlendirmek için; seleksiyon ortamlarının kullanılması gerekmektedir. Transgenik materyali ayırt etmek için kullanılan seleksiyon ortamına ilave edilecek antibiyotik veya herbisit dozunu belirlemek için fosfinotrisin ve metotreksat herbisitleri ile hygromisin ve kanamisin antibiyotikleri çeşitli oranlarda rejenerasyon ortamına ilave edilmiştir. Amaç, transgenik olmayan sürgün rejenerasyonunu engelleyecek, aynı zamanda gen aktarılmış eksplantların kallus oluşumunu ve sürgün rejenerasyonuna izin verecek en uygun dozu belirlemektir. *İn vitro* yetiştirilen 4-6 haftalık tütünün Samsun çeşidine (Şekil 4.10) ait yaprak diskleri antibiyotik ve herbisitlerin en uygun dozunu belirlemek için kullanılmıştır.

Farklı oranlarda fosfinotrisin, higromisin, metotreksat ve kanamisin içeren MSD4x2 ortamında Samsun çeşidinin yaprak disklerinin kesik uçlarında oluşan kalluslar üzerinde gelişen sürgünler 4 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant ağırlığı bakımından incelenmiştir. Bu özelliklere ait varyans analizi Çizelge 4.21, 4.22 ve 4. 23'de verilmiştir.

Çizelge 4.21, 4.22 ve 4.23 incelendiğinde, tütün yaprak diski eksplantlarına uygulanan tüm antibiyotik ve herbisit çeşitleri ile onların farklı dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve



Şekil 4.10. Yaprak disklerinin eldesinde kullanılan 6 haftalık *in vitro* yetiştirilmiş tütün bitkisi

Çizelge 4.21. Farklı antibiyotik ve herbisitler ile dozlarının tüünde sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |         |            |        |             |        |           |        |
|----------------------|------|---------------------------------------|---------|------------|--------|-------------|--------|-----------|--------|
|                      |      | Fosfinotrisin                         |         | Higromisin |        | Metotreksat |        | Kanamisin |        |
|                      |      | K.O.                                  | F       | K.O.       | F      | K.O.        | F      | K.O.      | F      |
| Antibiyotik Dozları  | 4    | 5400,00                               | 10,00** | 72,90,00   | 0,00** | 4860,00     | 0,00** | 2545,98   | 6,39** |
| Hata                 | 10   | 540,00                                |         | 0,00       |        | 0,00        |        | 398,49    |        |
| Toplam               | 4    |                                       |         |            |        |             |        |           |        |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.22. Farklı antibiyotik ve herbisitler ile dozlarının tütünde eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |          |            |          |             |          |           |          |
|----------------------|------|--------------------------------------|----------|------------|----------|-------------|----------|-----------|----------|
|                      |      | Fosfinotrisin                        |          | Higromisin |          | Metotreksat |          | Kanamisin |          |
|                      |      | K.O.                                 | F        | K.O.       | F        | K.O.        | F        | K.O.      | F        |
| Antibiyotik Dozları  | 4    | 161,426                              | 52,385** | 377,534    | 21,470** | 160,067     | 64,215** | 150,412   | 30,756** |
| Hata                 | 10   | 3,081                                |          | 17,584     |          | 2,493       |          | 4,891     |          |
| Toplam               | 4    |                                      |          |            |          |             |          |           |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.23. Farklı antibiyotik ve herbisitler ile dozların tütünde eksplant ağırlığına ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D. | Eksplant Ağırlığı (gr) |          |            |         |             |          |           |          |
|----------------------|------|------------------------|----------|------------|---------|-------------|----------|-----------|----------|
|                      |      | Fosfotrisin            |          | Higromisin |         | Metotreksat |          | Kanamisin |          |
|                      |      | K.O.                   | F        | K.O.       | F       | K.O.        | F        | K.O.      | F        |
| Antibiyotik Dozları  | 4    | 43,367                 | 52,997** | 39,19      | 29,80** | 46,381      | 57,196** | 42,927    | 52,208** |
| Hata                 | 10   | 0,875                  |          | 1,31       |         | 0,811       |          | 0,822     |          |
| Toplam               | 4    |                        |          |            |         |             |          |           |          |

\* 0.01 düzeyinde önemli.

eksplantların ağırlıkları bakımından 0,01 düzeyinde farklılık oluşmuştur. Bu farklılığın önem düzeyi Duncan testi ile belirlenerek Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24'de de görüldüğü gibi, fosfinotrisin herbisitinde 0,00, 0,50, 5,00, 10,00 ve 20,00 mg/l dozları denenmiştir. 0,00 ve 0,50 mg/l dozlarda sürgün rejenerasyonu elde edilirken, 5,00, 10,00 ve 20,00 mg/l dozlarda hiçbir şekilde sürgün elde edilmemiştir (Şekil 4.11). Sürgün gelişimini engelleyen en düşük doz 5,00 mg/l olarak tespit edilmiştir. Ancak, eksplant ağırlığının çok düşük olması ve eksplantların ölmesi nedeniyle 2,5 mg/l doz uygulamasının uygun olduğuna karar verilmiştir.

Hygromisin antibiyotiğinin 0,00, 10,00, 20,00, 40,00 ve 80,00 mg/l dozları kullanılmıştır. Bunlardan 0,00, 10,00 ve 20,00 mg/l dozlarda sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Hygromisinin 40,00 ve 80,00 mg/l dozlarında ise sürgün rejenerasyonu engellenmiştir (Şekil 4.12). Sürgün rejenerasyonunun oluşmadığı en düşük doz 40,00 mg/l olarak belirlenmiştir.

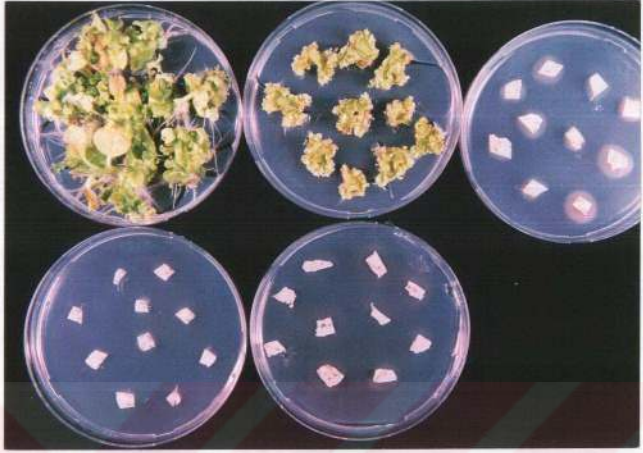
Metotreksat herbisitinde ise 0,00, 0,10, 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/l dozları denemeye alınmıştır. Bu dozlardan sadece 0,00 mg/l olanda bir başka değişle, herbisit eklenmeyen ortamda sürgün rejenerasyonu oluşmuştur (Şekil 4.13). Kullanılan tüm dozlar eksplantları öldürmüştür. Bu nedenle denemelerde 0,05 mg/l metotreksat dozu kullanılmıştır.

Kanamisin antibiyotiğinde de 0,00, 25,00, 50,00, 100,00 ve 200,00 mg/l dozlar kullanılmıştır. Bunlardan 0,00 ve 25,00 mg/l dozlarda sürgün rejenerasyonu görülmüştür (Şekil 14.14). 50,00, 100,00 ve 200,00 mg/l dozlarda sürgün

rejenerasyonuna rastlanmamıştır. Bu dozlardan en düşük olan 50,00 mg/l ve kaçak bitkileri önlemek için 100,00 mg/l dozları tercih edilmiştir.

Çizelge 4.24. Farklı antibiyotik ve herbisit dozlarının tütün yaprak disklerinden sürgün rejenerasyonuna etkisine ait Duncan sonuçları

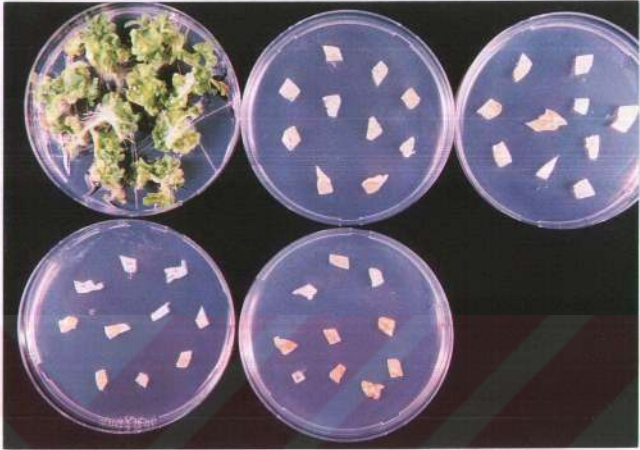
| Antibiyotikler | Dozlar (mg/l) | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) | Eksplant Ağırlığı (g) |
|----------------|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Fosfinotrisin  |               |                                       |                                      |                       |
|                | 0,00          | 100 a                                 | 16,30 a                              | 8,99 a                |
|                | 0,50          | 66,70 a                               | 8,40 b                               | 4,26 b                |
|                | 5,00          | 0,00 b                                | 0,00 c                               | 0,15 c                |
|                | 10,00         | 0,00 b                                | 0,00 c                               | 0,12 c                |
|                | 20,00         | 0,00 b                                | 0,00 c                               | 0,12 c                |
| Higromisin     |               |                                       |                                      |                       |
|                | 0,00          | 100,00 a                              | 25,77 a                              | 8,99 a                |
|                | 10,00         | 100,00 a                              | 16,30 a                              | 4,32 b                |
|                | 20,00         | 100,00 a                              | 14,97 b                              | 2,02 c                |
|                | 40,00         | 0,00 b                                | 0,00 c                               | 0,54 c                |
|                | 80,00         | 0,00 b                                | 0,00 c                               | 0,20 c                |
| Metotreksat    |               |                                       |                                      |                       |
|                | 0,00          | 100,00 a                              | 16,30 a                              | 8,99 a                |
|                | 0,10          | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,21 b                |
|                | 0,20          | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,19 b                |
|                | 0,40          | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,15 b                |
|                | 0,80          | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,26 b                |
| Kanamisin      |               |                                       |                                      |                       |
|                | 0,00          | 68,30 a                               | 16,30 a                              | 8,99 a                |
|                | 25,00         | 33,33 ab                              | 3,32 b                               | 0,75 b                |
|                | 50,00         | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,60 b                |
|                | 100,00        | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,66 b                |
|                | 200,00        | 0,00 b                                | 0,00 b                               | 0,18 b                |



Şekil 4.11. Farklı fosfinitrisin dozlarının (sırasıyla 0,00; 0,50; 5,00; 10,00 ve 20,00 mg/l) Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi



Şekil 4.12. Farklı higromisin dozlarının (sırasıyla 0,00; 10,00; 20,00 ve 40,00 mg/l) Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi



Şekil 4.13. Farklı metotreksat dozlarının (sırasıyla 0,00; 0,10; 0,20; 0,40 ve 0,80 mg/l) Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi



Şekil 4.14. Farklı kanamisin dozlarının (sırasıyla 0,00; 25,00; 50,00; 100,00 ve 200,00 mg/l) Samsun çeşidinin yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Bu araştırma sonucunda, fosfinotrisinin seleksiyon ortamı için belirlenen en uygun dozunun 5,00 mg/l olduğu belirlenirken, hygromisin antibiyotiği için belirlenen en uygun doz 40,00 mg/l olmuştur. Metotreksat herbisiti kullanılan dozların tamamında eksplantları öldürdüğünden dolayı 0,10 mg/l'den daha düşük dozların kullanılması gerektiği belirlenmiştir. Kanamisin antibiyotiğinde ise en uygun doz 50,00 - 100,00 mg/l olarak tespit edilmiştir.

Transgenik doku ve sürgünlerin elde edilmesinde kullanılan fosfinotrisin, hygromisin, metotreksat ve kanamisinin en uygun dozlarının belirlenmesi üzerine farklı araştırmacılar tarafından çalışmalar yürütülmüş olup, bu araştırmadan elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Fry, et al., 1987; Özcan, 1993; Becker et al., 1992).

#### **4.4.2. Farklı non-onkogenik *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenesis* hatlarının tütünde test edilmesi**

Samsun çeşidinin yaprak diskleri farklı bakteri hatları ile inoküle edildikten ve sürgün rejenerasyonu ortamına (MSD4x2) alındıktan 3 hafta sonra kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına kallus sayısı tespit edilmiştir. Eksplantlar rejenerasyon ortamına alındıktan 5 hafta sonra da sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı belirlenmiştir. İncelenen konuların varyans analizi Çizelge 4.25'de verilmiştir.

Çizelge 4.25 incelendiğinde, farklı bakteri hatlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına kallus sayısı, sürgün veren eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve köklenen sürgünlerin yüzdesinde görülen farklılıklar 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır. Bu farklılığın önem düzeyi Duncan Testi ile belirlenmiş olup, sonuçları Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.25. Değişik bakteri hatları ile tütüne gen aktarımına ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D | Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |          | Eksplant Başına Kallus Sayısı (Adet) |         | Sürgün Veren Eksplant Yüzdesi (%) |          | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |          | Köklenen Sürgün Yüzdesi (%) |         |
|----------------------|-----|---------------------------------------|----------|--------------------------------------|---------|-----------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|-----------------------------|---------|
|                      |     | K.O                                   | F        | K.O                                  | F       | K.O                               | F        | K.O                                  | F        | K.O                         | F       |
| Bakteri Çeşitleri    | 10  | 726,982                               | 11,350** | 22,729                               | 6,063** | 1168,819                          | 10,559** | 80,198                               | 15,050** | 419,584                     | 5,447** |
| Hata                 | 33  | 64,052                                |          | 3,749                                |         | 110695                            |          | 5,329                                |          | 77,027                      |         |
| Toplam               | 43  |                                       |          |                                      |         |                                   |          |                                      |          |                             |         |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.26'da da görüldüğü gibi herbisitlere ve antibiyotiklere dayanıklı kallus oluşturan eksplant yüzdesi en fazla % 100 ile 2260 35S GUS-INT, LBA 4404 pRGG bar, 15834 pRGG hpt, C58C1 2260 pRGG hpt, 2260 AoPRI NEO1, EHA101 PMOG 131 ve EHA101 PRGG hpt # 23 hatlarından elde edilmiştir. En az kallus oluşturan eksplant yüzdesi ise Dis C58 pB1121-23 hattından elde edilmiştir. Eksplant başına kallus sayısı incelendiğinde en fazla kallus sayısı 13,32 adet ile 2260 35S GUS-INT hattından elde edilirken, eksplant başına en az kallus sayısı ise 4,45 adet ile Dis C58 pB1121-23 hattından elde edilmiştir.

Sürgün veren eksplant yüzdesi ele alındığında en fazla sürgün veren eksplant % 100 ile 2260 35S GUS-INT, 15834 pRGG hpt, EHA101 pRGG hpt # 23 ve % 95 ile 2260 AoPRI NEO1 hatlarından elde edilirken en düşük sürgün veren eksplant yüzdesi ise % 42,50 ile 2260 AoPRI NEO2 hattından gözlenmiştir. Bununla beraber % 60 ile LBA 4404 pRGG bar ve % 62,50 ile C58 C1 2260 pRGG hpt hatları da 2260 AoPRI NEO2 hattı ile istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı değerlendirildiğinde, 18,57 adet ile 2260 AoPRI NEO2 hattı en fazla eksplant başına sürgün veren hat olarak belirlenmiş olup, 15,45 adet ile 15834 PRGG hpt ve 15,30 adet ile 2260 35S GUS-INT hatları da istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. En az eksplant başına sürgün sayısı ise 4,31 adet ile C58C1 2260 pRGG hpt ve bu hat ile istatistiksel olarak aynı gruba giren LBA 4404 pRGG bar ile EHA101 pMOG131 hatlarından elde edilmiştir. Petri başına sürgün sayısı incelendiğinde, 154,50 adet ile 15834 pRGG hpt, 153,00 adet ile 2260 35S GUS-INT ve 126,62 adet ile EHA 101 pRGG hpt #23 hatlarının en fazla sürgün veren hatlar olduğu tespt edilmiştir. Tütün yaprak diskleriyle

Çizelge 4.26. Değişik bakteri hatları ile tütüne gen aktarımına ait Duncan Testi

| Bakteri Hatları         | Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Kallus Sayısı (adet) | Sürgün Veren Eksplant Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Petri Başına Sürgün Sayısı (Adet) | Köklenen Sürgün Yüzdesi (%) | GUS Pozitif Bitkilerin Yüzdesi (%) |
|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 2260 AoPR1 NEO2*        | 85,00 b                               | 6,37 de                              | 42,50 e                           | 18,57 a                              | 78,92                             | 65,00 a                     | ---                                |
| 2260 AoPR1 GUS-INT      | 85,00 b                               | 10,12 bc                             | 82,50 bc                          | 8,61 de                              | 71,00                             | 45,00 ab                    | 10,00                              |
| 2260 35S GUS-INT        | 100,00 a                              | 13,32 a                              | 100,00 a                          | 15,30 ab                             | 153,00                            | 57,50 ab                    | 70,14                              |
| 2260 pR1a GUS           | 85,00 b                               | 10,37 b                              | 80,00 cd                          | 9,95 cd                              | 79,60                             | 45,00 ab                    | 20,00                              |
| LBA 4404 pRGG bar       | 100,00 a                              | 6,80 de                              | 60,00 de                          | 5,23 ef                              | 31,38                             | 45,00 ab                    | 18,75                              |
| Dis C58 pB1 121-23      | 60,00 c                               | 4,45 e                               | 82,50 bc                          | 10,03 cd                             | 82,75                             | 39,55 b                     | 90,00                              |
| 15834 pRGG hpt          | 100,00 a                              | 9,15 bcd                             | 100,00 a                          | 15,45 ab                             | 154,50                            | 54,37 ab                    | 83,33                              |
| C58C1 2260 pRGG hpt     | 100,00 a                              | 8,50 bcd                             | 62,50 cde                         | 4,31 f                               | 26,94                             | 57,50 ab                    | 100,00                             |
| 2260 AoPR1 NEO1*        | 100,00 a                              | 7,16 cde                             | 95,00 ab                          | 12,50 bc                             | 118,75                            | 47,50 ab                    | ---                                |
| EHA 101 pMOG 131**      | 100,00 a                              | 7,37 bcde                            | 75,00 cd                          | 7,20 def                             | 54,00                             | 8,75 c                      | ---                                |
| EHA 101 pRGG hpt # 23** | 100,00 a                              | 8,92 bcd                             | 100,00 a                          | 12,62 ab                             | 126,62                            | 41,25 ab                    | ---                                |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

\* GUS geni içermemektedir.

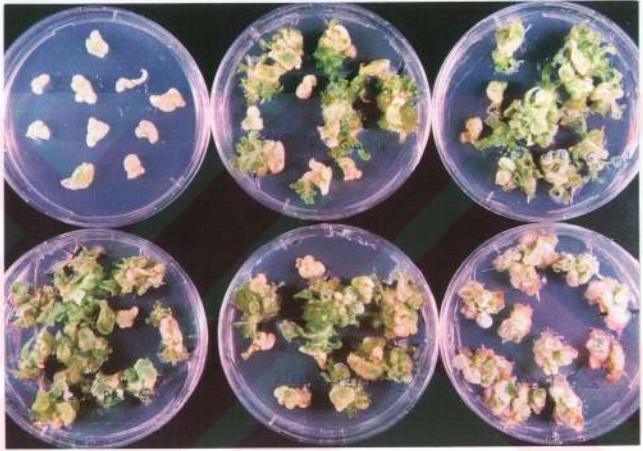
\*\* Sürgünlere GUS analizi yapılamamıştır.

inokülasyondan 4 hafta sonra test edilen tüm bakteri hatlarının seçici ortamlarda üretmiş oldukları dayanıklı kallus ve sürgünlerin gelişimi Şekil 4.15 ve 4.16’da görüntülenmiştir.

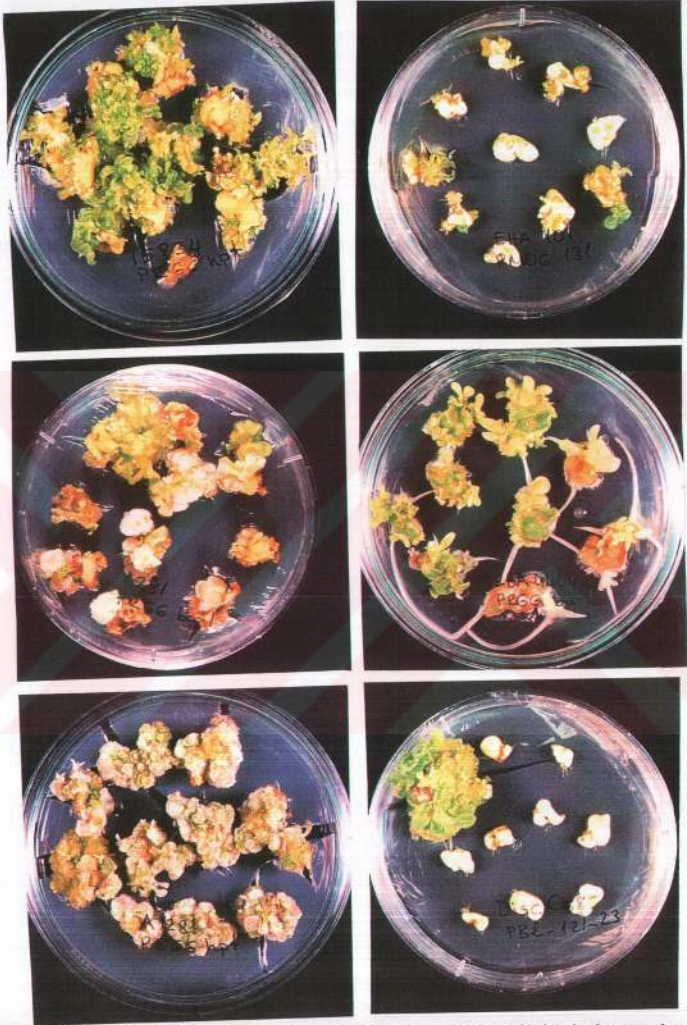
Elde edilen sürgünlerin köklenme yüzdesine bakıldığında en fazla köklenen sürgün % 65 ile 2260 AoPRI NEO2 ve istatistiksel olarak onunla aynı gruba giren 2260 35S GUS-INT, C58C1 2260 pRGG hpt, 15834 pRGG hpt, 2260 AoPRI NEO1, 2260 pR1a GUS, LBA 4404 pRGG bar ve EHA101 pRGG hpt #23 hatlarından elde edilmiştir. En az köklenen sürgün yüzdesi EHA101 pMOG 131 hattından elde edilmiştir. Köklenen aday transgenik bitkicikler saksılara aktararak iklim dolaplarında ve iklim odasında dış şartlara alıştırılarak büyütülmüşlerdir (Şekil 4.17).

Elde edilen aday transgenik tütün bitkilerinin histokimyasal GUS analizine tabi tutulması sonucunda bitkilerin önemli bir kısmında GUS aktivitesi gözlenmiştir. En fazla GUS pozitif bitkilerin oranı C58C1 2260 pRGG hpt, 15834 pRGG hpt, DisC58 pBl 121-23 ve 2260 35S GUS-INT bakteri hatlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.26; Şekil 4. 18; Şekil 4.19).

Bitkilere gen aktarımında *A. rhizogenesis* kullanıldığında gen aktarılan bitkilerde genetik sapmalar görüldüğünden, *Agrobacterium tumefaciens*’e göre daha az kullanıma sahiptir. Bu çalışmada kullanılan 15834 pRGG hpt *A. rhizogenesis* türüne ait bir hat olup, *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT ve EHA101 pRGG hpt #23 hatları kadar yüksek oranda gen aktarım başarıları göstermiştir. Ancak, kolza bitkisi için gen aktarımında kullanılacak bakteri hattının yukarıda açıklanan sebepten dolayı *A. tumefaciens* kökenli hat



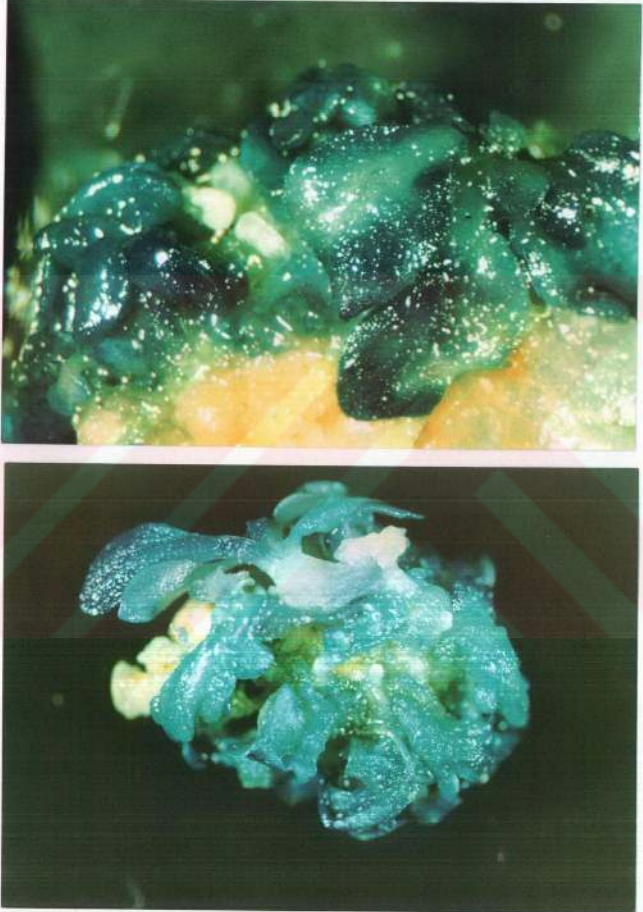
Şekil 4.15. Farklı *A. tumefaciens* hatlarıyla inokülasyondan 4 hafta sonra tütün yaprak disklerinden seçici antibiyotik ile herbisitlere dayanıklı kallus ve sürgün gelişimi. a: Kontrol, b: 2260 35S GUS-INT, c: 2260 AoPR1 GUS-INT, d: 2260 pR1a GUS, e: 2260 AoPR1 NEO2, f: A281 GUS



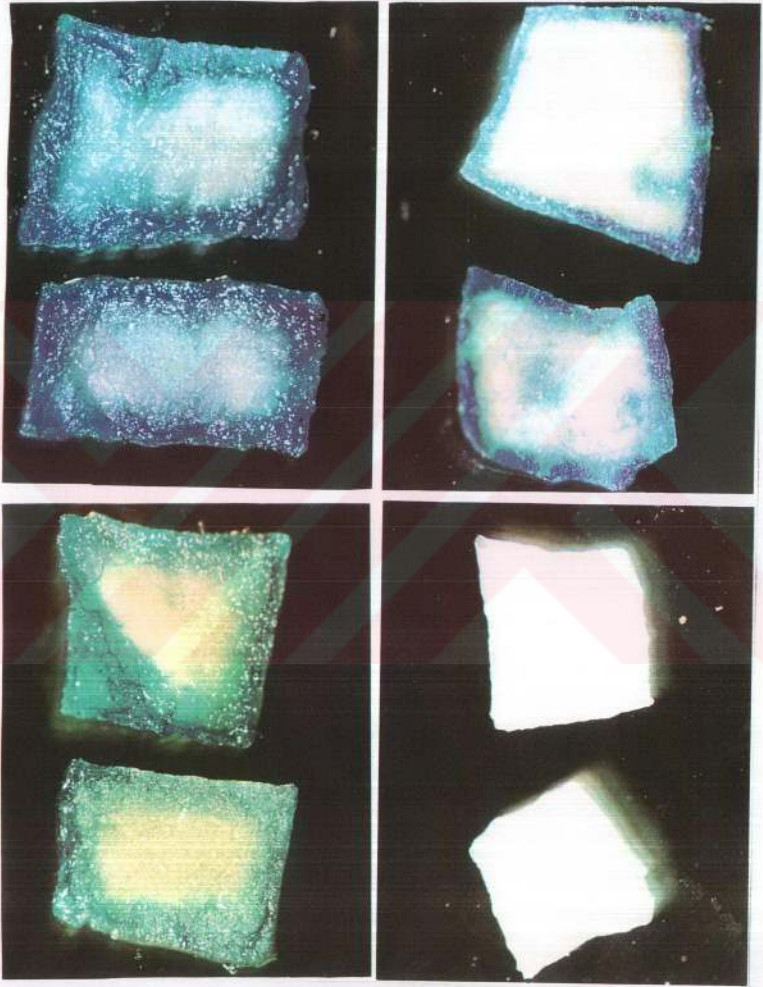
Şekil 4.16. Farklı *A. rhizogenes* ve *A. tumefaciens* hatlarıyla inokülasyondan 4 hafta sonra tütün yaprak disklerinden seçici antibiyotik ile herbisitlere dayanıklı kallus ve sürgün gelişimi a: 15834 pRGG hpt, b: EHA101 pMOG 131, c: A281 pRGG bar1, d: LBA 4404 pRGG bar, e: A281 pRGG hpt, f: DiscC58 pBl 121-23



Şekil 4.17. Saksılara aktarılan aday transgenik tütün bitkilerinin kültür dolabı ve iklim odasında gelişimleri



Şekil 4.18. Gen aktarımı yapılan tütün sürgünlerinde histokimyasal GUS ekspresyonu



Şekil 4. 19. Gen aktarımı yapılan (ilk üç resim) ve yapılmayan (son resim) tütün bitkilerinden alınan yaprak disklerindeki histokimyasal GUS ekspresyonu

olması tercih edilmiştir. Bu nedenle, kolzaya gen aktarımında en uygun *A. tumefaciens* hattının 2260 35S GUS-INT olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, bir çok araştırmacı kolzaya gen aktarımında *A. tumefaciens*'i tercih etmiştir (Fry et al., 1987; Radke et al., 1988; Charest et al., 1988; Mısra, 1990; Turgut, 1994; Hong et al., 1997). Ayrıca, 2260 35S GUS-INT bakteri hattının taşıdığı GUS geninin kodlama bölgesinde bitkisel intron bulunduğundan dolayı GUS geni bakteri hücrelerinde inaktif haldedir (Wilmitzer, 1980). Bu ise gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların histokimyasal lokalizasyonunda önemli bir avantaj olarak ortaya çıkmaktadır.

#### 4.5. *A. tumefaciens* Aracılığıyla Kolzaya Gen Aktarımı

##### 4.5.1. Onkogenik *A. tumefaciens* hatlarıyla farklı kolza çeşitlerine gen aktarımı

Bitki türlerinin *A. tumefaciens* enfeksiyonlarına karşı gösterdikleri dayanıklılık oldukça farklılık göstermektedir. Ayrıca, bu dayanıklılığın derecesi eksplant tipine göre de değişmektedir (Delzer et al., 1990; Özcan, 1995). Bu nedenle gen aktarımına geçmeden önce eksplantların *A. tumefaciens* enfeksiyonlarına duyarlılıklarının belirlenmesi büyük önem kazanmaktadır. Tümör oluşturma yeteneğine sahip yabani *A. tumefaciens* hatları kullanılarak bu duyarlılık belirlenebilmektedir (Charest et al., 1989; Turgut, 1993; Yılmazlar, 1999). Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları *A. tumefaciens* A281 ve C58 yabani hatları ile inoküle edilmiş olup, inokülasyondan 3 hafta sonra tümör oluşturan eksplant yüzdesini, eksplant başına tümör sayısını ve tümör büyüklüğünü belirlemek için ölçümler yapılmıştır. Bu konulara ait varyans analizi Çizelge 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.27’de de görüldüğü gibi, denemeye alınan 10 çeşitte *A. tumefaciens* C58 ve A 281 hatlarına duyarlılıkları tümör oluşturan eksplant yüzdesi bakımından çeşit x eksplant x bakteri interaksiyonunda 0,01 düzeyinde farklılık tespit edilmiştir. Eksplant başına tümör sayısı bakımından incelendiğinde eksplant tiplerinin oluşan tümör sayısını 0,01 düzeyinde etkilediği belirlenmiştir. Tümör iriliğinde ise çeşit x eksplant x bakteri interaksiyonu 0,05 düzeyinde önemlilik göstermiştir. Ortaya çıkan farklılıkların önem düzeyi Duncan Testi ile araştırılmış ve sonuçları Çizelge 4.28, 4.29, 4.30 ve 4.31’de verilmiştir.

Çizelge 4.27. Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantları üzerinde C58 ve A281 bakteri hatları tarafından tümör üretimine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları       | S.D | Tümör Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |         | Eksplant Başına Tümör Sayısı (Adet) |          | Tümör İriliği (mm) |          |
|----------------------------|-----|--------------------------------------|---------|-------------------------------------|----------|--------------------|----------|
|                            |     | K.O.                                 | F       | K.O.                                | F        | K.O.               | F        |
| Çeşit                      | 9   | 225,851                              | 2,617*  | 0,027                               | 0,577    | 5,941              | 3,614**  |
| Eksplant                   | 1   | 436,526                              | 5,059*  | 0,768                               | 16,042** | 28,470             | 17,321** |
| Bakteri                    | 1   | 158,778                              | 1,840   | 0,007                               | 0,016    | 63,992             | 38,932** |
| Çeşit x Eksplant           | 9   | 208,394                              | 2,415*  | 0,051                               | 1,076    | 2,780              | 1,691    |
| Çeşit x Bakteri            | 9   | 213,470                              | 2,474*  | 0,063                               | 1,321    | 4,804              | 2,923**  |
| Eksplant x Bakteri         | 1   | 70,358                               | 0,815   | 0,030                               | 0,628    | 6,362              | 3,870**  |
| Çeşit x Eksplant x Bakteri | 9   | 450,971                              | 5,226** | 0,046                               | 0,959    | 3,551              | 2,161*   |
| Hata                       | 80  | 86,294                               |         | 0,048                               |          | 1,644              |          |
| Toplam                     | 120 |                                      |         |                                     |          |                    |          |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.28’de hipokotil eksplantının C58 hattı ile inölülasyonu sonucu elde edilen tümör oluşturan eksplant yüzdesi incelendiğinde, en yüksek % 60,00 ile

Tarok çeşidi bulunmakla birlikte Quinta, Helios, Star, Bienvenü, Spok, Darmor ve Hansen çeşitlerinden elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak bir fark göstermemiştir. En düşük tümör oluşturan çeşitler ise % 20,00 ile Cobra ve % 30,00 ile Honk çeşitleri olmuştur. Hipokotil eksplantı A281 hattı ile inoküle edildiğinde, en fazla tümör oluşturan eksplant yüzdesi % 63,33 ile Star çeşidinden elde edilmiştir. Ayrıca, Tarok, Helios, Spok, Darmor ve Honk çeşitlerinden elde edilen tümör oluşturan eksplant yüzdeleri de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir.

Çizelge 4.28. Farklı kolza çeşitlerinde C58 ve A281 hatlarının hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında tümör oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait Duncan sonuçları

| Çeşitler     | Tümör Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |                |                        |                |
|--------------|--------------------------------------|----------------|------------------------|----------------|
|              | Hipokotil                            |                | Petiollü Tam Kotiledon |                |
|              | C58                                  | A281           | C58                    | A281           |
| Hansen       | 36,67 a <sup>1</sup>                 | 16,67 c        | 20,00 d                | 50,00 abcd     |
| Helios       | 46,67 a                              | 40,00 ab       | 40,00 bcd              | 43,33 bcde     |
| Darmor       | 40,00 a                              | 43,33 ab       | 63,33 ab               | 20,00 e        |
| Quinta       | 50,00 a                              | 26,67 bc       | 36,67 bcd              | 56,67 ab       |
| <b>Tarok</b> | <b>60,00</b> a                       | 43,33 ab       | <b>73,33</b> a         | 40,00 bcde     |
| Spok         | 40,00 a                              | 36,67 ab       | 43,33 bcd              | 23,33 de       |
| <b>Star</b>  | 43,33 a                              | <b>63,33</b> a | 53,33 abc              | 26,67 cde      |
| Cobra        | 20,00 b                              | 23,33 bc       | 33,33 cd               | <b>73,33</b> a |
| Honk         | 30,00 b                              | 36,67 ab       | 56,67 abc              | 43,33 bcde     |
| Bienvenü     | 43,33 a                              | 20,00 bc       | 23,33 d                | 53,33 abc      |

<sup>1</sup> Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.  
LSD 15.09

Petiollü tam kotiledon eksplantı C58 hattı ile inoküle edildiğinde en fazla tümör oluşturan eksplant yüzdesi % 73,33 ile Tarok çeşidinden elde edilmiştir. Bununla birlikte, Darmor, Star ve Honk çeşitlerinden elde edilen tümör oluşturan eksplant yüzdeleri ile Tarok çeşidinden elde edilen değerler arasında

istatistiksel bir fark bulunmadığından bu çeşitlerde Tarok çeşidi ile aynı gruba girmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantı A281 bakteri hattı ile inoküle edildiğinde ise en fazla tümör oluşturan eksplant yüzdesini % 73,33 ile Cobra çeşidi vermiştir. Ayrıca, Quinta, Bienvenü ve Hansen çeşitleri Cobra çeşidi ile tümör oluşturan eksplant yüzdesi bakımından istatistiksel olarak bir fark göstermediğinden aynı gruba girmiştir. En düşük tümör oluşturan eksplant yüzdesi % 20,00 ile Darmor çeşidinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.29'da eksplant başına tümör sayısı incelendiğinde 1,16 adet ile petiollü tam kotiledon eksplantının hipokotil eksplantından daha fazla sayıda tümör oluşturduğu görülmektedir.

Çizelge 4.29. Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarının C58 ve A281 hatları ile inokülasyonu sonucunda oluşan tümör sayısına ait Duncan sonuçları

| Eksplantlar            | Eksplant Başına Tümör Sayısı (Adet) |
|------------------------|-------------------------------------|
| Hipokotil              | 1,00 b <sup>1</sup>                 |
| Petiollü Tam Kotiledon | 1,16 a                              |

<sup>1</sup> Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Hipokotil eksplantının C58 hattı ile inokülasyonu sonucunda oluşan tümörlerin iriliği Çizelge 4.30'da da görüldüğü gibi çeşitler arasında istatistiksel bir fark göstermemiştir. Oluşan tümörlerin iriliği 1,35 mm ile 2,78 mm arasında değişmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantının C58 hattı ile inokülasyonunda da oluşan tümörlerin iriliği 2,17 mm ile 3,36 mm arasında olup, yine çeşitler arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir.

Hipokotil eksplantının A281 hattı ile inokülasyonu sonucunda oluşan tümörlerin iriliği ise çeşitler arasında fark göstermiştir. En iri tümör oluşumu 5,27 mm ile Cobra çeşidinden elde edilmiştir. Ayrıca, Tarok, Quinta, Helios ve

Darmor çeşitlerinde oluşan tümörlerin irilikleri de Cobra çeşidinden elde edilen tümör iriliği ile istatistiksel bir fark göstermemiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantının A281 hattı ile inokülasyonunda yine çeşitler arasında farklılık gözlenmiştir. Hansen çeşidi 7,73 mm ile en iri tümör oluşturan çeşit olarak belirlenmekle birlikte Quinta, Cobra ve Bienvenü çeşitlerinden elde edilen tümör iriliği de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir.

Çizelge 4.30. Farklı kolza çeşitlerinde C58 ve A281 hatlarının hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında tümör iriliğine etkisine ait Duncan sonuçları

| Çeşitler      | Tümör İriliği (mm)  |                  |                        |                |
|---------------|---------------------|------------------|------------------------|----------------|
|               | Hipokotil           |                  | Petiollü Tam Kotiledon |                |
|               | C58                 | A281             | C58                    | A281           |
| <b>Hansen</b> | 2,57 a <sup>1</sup> | 2,53 bcd         | 3,00 a                 | <b>7,73 a</b>  |
| Helios        | 1,35 a              | <b>3,77</b> abc  | 2,47 a                 | 3,58 bcd       |
| Darmor        | 2,22 a              | <b>3,17</b> abcd | 3,12 a                 | 3,43 bcd       |
| Quinta        | 2,78 a              | <b>3,83</b> abc  | 2,75 a                 | <b>7,22 a</b>  |
| Tarok         | 2,23 a              | <b>4,70</b> ab   | 3,12 a                 | 3,50 bcd       |
| Spok          | 1,77 a              | 1,00 d           | 2,75 a                 | 2,83 cd        |
| Star          | 2,48 a              | 2,05 cd          | 1,75 a                 | 2,00 d         |
| <b>Cobra</b>  | 1,58 a              | <b>5,27</b> a    | 2,17 a                 | <b>5,70</b> ab |
| Honk          | 2,10 a              | 2,33 bcd         | 3,36 a                 | 4,37 bc        |
| Bienvenü      | 2,47 a              | 2,90 bcd         | 2,20 a                 | <b>5,53</b> ab |

<sup>1</sup> Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.  
LSD 2,083

Bu araştırmada kullanılan kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarının *A. tumefaciens* C58 hattı ile inokülasyonu sonucunda tümör iriliği bakımından eksplantlar kendi içlerinde istatistiksel bir fark göstermemiştir. Halbuki, *A. tumefaciens* A281 hattı ile aynı eksplantlar inoküle edildiğinde çeşitler arasında tümör iriliği bakımından istatistiksel olarak oldukça önemli farklar ortaya çıkmıştır.

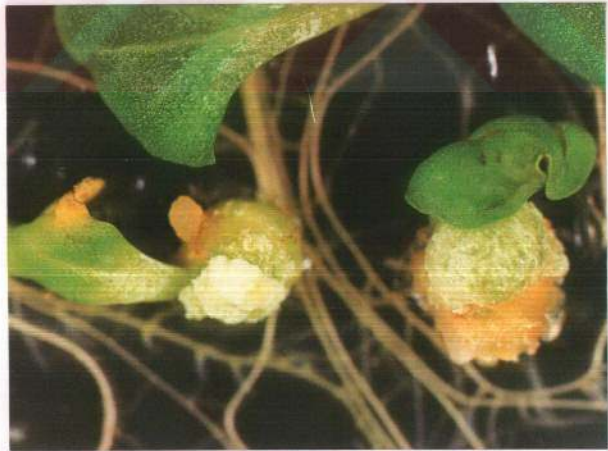
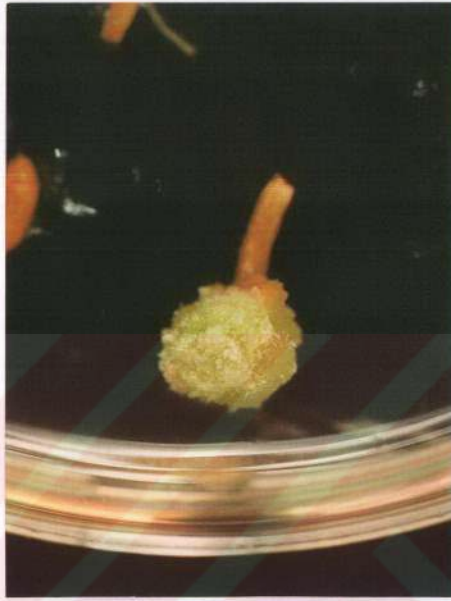
Çizelge 4.31'de görüldüğü gibi, petri başına tümör sayısı bakımından hipokotil eksplantı C58 hattı ile inoküle edildiğinde en fazla tümör 6,42 adet ile Tarok

çeşidinden elde edilmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantı C58 hattı ile inoküle edildiğinde ise en fazla tümör 7,84 adet ile yine Tarok çeşidinden elde edilmiştir. Petri başına tümör sayısı hipokotil eksplantı A281 hattı ile inoküle edildiğinde en fazla tümör sayısı 6,33 adet ile Star çeşidinden elde edilmiştir. İnokülasyon işlemi A281 hattı ile petiolü tam kotiledon eksplantı ile yapıldığında ise en fazla tümör sayısı 7,00 adet ile Hansen çeşidinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.31. Farklı kolza çeşitlerinde C58 ve A281 hatlarının hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarında petri başına tümör sayısına etkisine ait Duncan sonuçları

| Çeşitler | Petri Başına Tümör Sayısı (Adet) |      |                        |      |
|----------|----------------------------------|------|------------------------|------|
|          | Hipokotil                        |      | Petiollü Tam Kotiledon |      |
|          | C58                              | A281 | C58                    | A281 |
| Hansen   | 3,67                             | 1,38 | 2,00                   | 7,00 |
| Helios   | 4,67                             | 4,68 | 4,00                   | 4,89 |
| Darmor   | 4,00                             | 4,33 | 7,79                   | 2,00 |
| Quinta   | 5,00                             | 2,67 | 4,29                   | 6,69 |
| Tarok    | 6,42                             | 4,76 | 7,84                   | 4,00 |
| Spok     | 4,00                             | 3,67 | 5,07                   | 2,33 |
| Star     | 4,33                             | 6,33 | 7,73                   | 2,93 |
| Cobra    | 1,34                             | 2,33 | 3,33                   | 6,61 |
| Honk     | 3,00                             | 3,67 | 6,52                   | 4,77 |
| Bienvenü | 4,33                             | 2,00 | 3,31                   | 6,40 |

Sonuç olarak, C58 hattı ile inokülasyondan sonra tümör oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hipokotil eksplantı kullanıldığında çeşitlerin çoğu arasında fark olmamasına rağmen petri başına en fazla tümör sayısı Tarok çeşidinden elde edilmiştir (Çizelge 4.31; Şekil 4.20). Petiollü tam kotiledon eksplantı C58 ile inoküle edildiğinde ise petri başına en fazla tümör sayısı yine Tarok, Darmor, Star ve Honk çeşitlerinden elde edilmiştir.



Şekil 4.20. İnokülasyondan 3 hafta sonra Tarok çeşidinin hipokotil (üstte) ve petiollü tam kotiledon (altta) eksplantları üzerinde C58 *A. tumefaciens* hattı tarafından tümör üretimi

A281 hattı ile hipokotil eksplantı inoküle edildiğinde Star, Tarok, Spok, Darmor, Helios ve Honk çeşitleri en fazla tümör oluşturan çeşitler olmuştur. Tümör iriliği bakımından Cobra, Tarok, Quinta, Darmor, Helios çeşitleri en iri tümörleri vermiştir. Petri başına tümör sayısı bakımından ise Star çeşidi en fazla tümör sayısını veren çeşit olarak tespit edilmiştir. A281 hattı, tümör oluşturan eksplant yüzdesi bakımından petiollü tam kotiledon eksplantı kullanıldığında Cobra, Bienvenü, Quinta, Hansen çeşitleri ve tümör iriliği bakımından Hansen, Quinta, Cobra ve Bienvenü çeşitleri en iyi sonuç veren çeşitler olarak tespit edilmiştir. Petri başına tümör sayısı ise Hansen, Quinta ve Bienvenü çeşitlerinde en fazla çıkmıştır.

Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında en fazla sürgün veren çeşit olarak belirlenen Spok çeşidi en yüksek tümör oluşturan eksplant yüzdesini C58 hattından ve petiollü tam kotiledon eksplantında (% 43,33) vermiştir.

Farklı bitki türlerinde onkogenik bakteri hatlarıyla yapılan gen aktarım çalışmalarında da tümör oluşumunun bitki türüne, çeşidine, kullanılan eksplanta ve bakteri hattına göre önemli değişiklikler gösterdiği bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir. Örneğin, Özcan, (1995) bezelye bitkisinde A281 hattının C58 hattından daha virulent olduğunu ve çeşitlere göre % 44-90 arasında tümör elde edildiğini bildirmiştir. Delzer et al., (1990), soyanın *A. tumefaciens*'e duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan bakteri hatları ile bitki çeşitleri arasında sıkı bir bağlantı olduğunu tesbit etmişlerdir. Yılmazlar, (1999), korunga, çayır ve iskenderiye üçgüllü bitkilerinde A281 hattının A136 NC'den daha virulent olduğunu tesbit etmiştir. Kolza ve kırmızı hardal bitkilerinde de *A. tumefaciens* hatlarından nopalin tipi suşların octopin tipi suşlara göre daha etkili olduğu belirtilmiştir (Charest et al., 1988). Yine,

bitkilerinde de *A. tumefaciens* hatlarından nopalin tipi suşların octopin tipi suşlara göre daha etkili olduğu belirtilmiştir (Charest et al., 1988). Yine, kolzada petiollü tam kotiledon eksplantı C58, T37, A281, ACH5, A6, A136NC yabancı hatları ile inoküle edildiğinde yalnızca C58 hattının yüksek oranda (% 20) tümör oluşturduğunu bildirilmiştir (Turgut, 1993). Bu tez çalışmasında da, çeşit, bakteri ve eksplantlar arasında interaksiyon çıktığından konular birlikte incelenmiştir. Dolayısıyla C58 ve A281 hatları farklı çeşitlerde ve eksplantlarda farklı sonuçlar göstermiştir. Yapılan diğer araştırmalarda genellikle tek eksplantta çalışıldığından üçlü interaksiyon sonuçlarını karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Ancak, Turgut, (1993) kolzanın Cobra ve Topaz çeşitlerinin petiollü tam kotiledon eksplantı ile yaptığı çalışmada, C58 bakteri hattının en virulent hat olduğunu belirlemiş olup, bu tez çalışmasından elde edilen sonuç da araştırmacının sonuçlarına benzerlik göstermiştir. Ayrıca, Turgut'un (1993) araştırmasında tümör oluşum oranı % 20,00 olarak bildirilirken, bu çalışmada C58 ve A281 hatları ile Tarok çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantında % 73,33 oranında tümör oluşumu gözlenmiştir.

#### **4.5.2. Non-onkogenik *A. tumefaciens* pGV2260 35S GUS-INT hattı aracılığıyla kolzaya gen aktarımı**

Yapılan literatür araştırmasında gen aktarımında üzerinde en çok çalışılan ve başarıya ulaşılan Westar çeşidi temin edilerek metot kısmında belirtilen iki farklı gen aktarım yöntemi ilk olarak bu çeşitte denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 32'de verilmiştir.

Çizelge 4. 32 incelendiğinde, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından I. yöntemden elde edilen veriler II. yöntemden daha yüksek olmuştur. Ancak, I. yöntemde yeşil sürgün oranı (%)

sürgünlerin seçici antibiyotiğe dayanıklılık göstererek yeşil olacağı, beyaz sürgünlerin ise gen aktarılmadığı halde gelişebilen ancak, ortamdaki seçici antibiyotikğin etkisiyle beyazlaşan kaçak sürgünler olduğu bilinmektedir (Şekil 4.22). Bu nedenle bundan sonraki gen aktarım çalışmalarında II. yöntem kullanılmıştır.

Çizelge 4. 32. Westar çeşidine ait petiollü tam kotiledon eksplantının iki farklı yöntem ile 2260 35S GUS-INT bakteri hattı ile inokülasyonu sonucunda kanamisine dayanıklı sürgün gelişimi

| Yöntemler  | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) | Yeşil Sürgün Yüzdesi (%) | Beyaz Sürgün Yüzdesi (%) |
|------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| I. Yöntem  | 15,00                                 | 5,63                                 | 10,00                    | 90,00                    |
| II. Yöntem | 12,00                                 | 3,88                                 | 91,43                    | 8,57                     |

Diğer çeşitlere göre adventif sürgün rejenerasyonu bakımından daha başarılı bulunan Spok, Helios, Darmor, Quinta ve Tarok çeşitleri ile Westar çeşidine non- onkogenik *A. tumefaciens* hatlarından tütün bitkisine en fazla gen aktarım kabiliyetine sahip olduğu belirlenen 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Sürgün veren eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ayrıca, oluşan yeşil ve beyaz sürgünlerin yüzdelere ait varyans analizi Çizelge 4. 33’de verilmiştir.

Çizelge 4.33’deki varyans analizi sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından incelendiğinde, çeşitler arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Oluşan yeşil sürgün yüzdesi 0,05, beyaz sürgün yüzdesi ise 0,01 düzeyinde çeşitler arasında farklılık çıkmıştır. Duncan testi ile bu farklılığın önem düzeyi Çizelge 4.34’de verilmiştir.



Şekil 4.21. 2260 35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inokülasyondan 6-7 hafta sonra kanamisin içeren besin ortamında kanamisine dayanıklı yeşil sürgünlerin gelişimi



Şekil 4.22. 2260 35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inokülasyondan 6-7 hafta sonra kanamisin içeren besin ortamında kanamisine dayanıksız beyaz sürgünlerin gelişimi

Çizelge 4.33. Spok, Helios, Darmor, Quinta, Tarok ve Westar çeşitlerinin petiollü tam kotiledon eksplantına 2260 35S GUS-INT hattı ile yapılan gen aktarımı sonucunda kanamisine dayanıklı sürgünlerin gelişimine ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) |        | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |        | Yeşil Sürgün Yüzdesi (%) |        | Beyaz Sürgün Yüzdesi (%) |         |
|----------------------|-----|---------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|--------------------------|--------|--------------------------|---------|
|                      |     | K.O                                   | F      | K.O                                  | F      | K.O                      | F      | K.O                      | F       |
| Çeşitler             | 5   | 156,146                               | 3,460* | 4,250                                | 1,028* | 4276,744                 | 3,485* | 4735,745                 | 6,094** |
| Hata                 | 18  | 45,126                                |        | 4,136                                |        | 1227,108                 |        | 777,070                  |         |
| Toplam               | 23  |                                       |        |                                      |        |                          |        |                          |         |

\*\* 0.01 düzeyinde önemli.

\* 0.05 düzeyinde önemli.

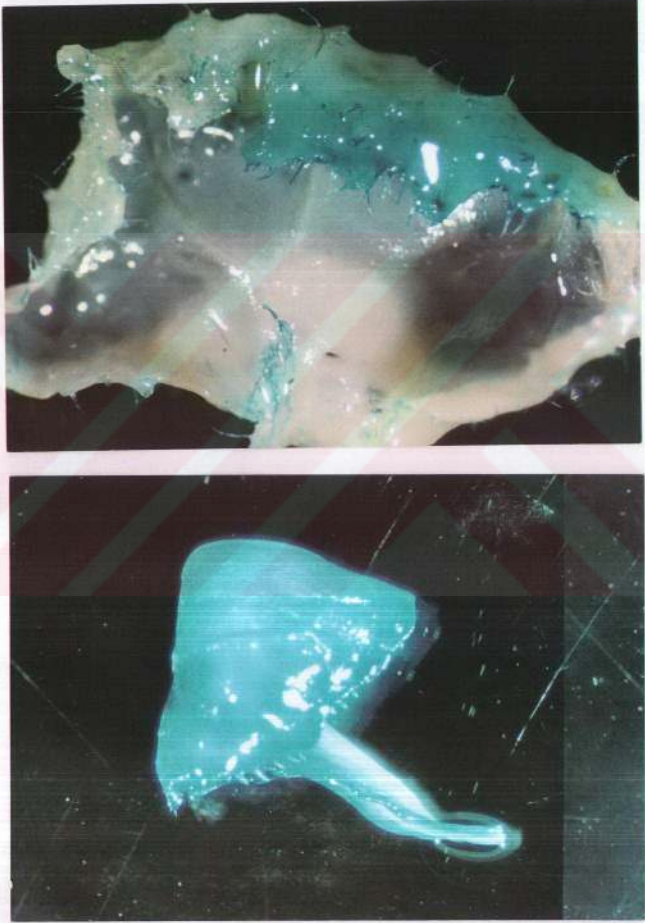
Çizelge 34'de de görüldüğü gibi, en fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %19,20 ile Westar çeşidinden elde edilmiştir. Bununla birlikte Spok, Helios ve Darmor çeşitleri de istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde yine 5,63 adet ile Westar çeşidinden elde edilmiştir. Ayrıca, Spok, Helios, Tarok ve Darmor çeşitlerinden elde edilen eksplant başına sürgün sayısı da istatistiksel olarak Westar çeşidi ile aynı gruba girmiştir. Yeşil sürgün yüzdesi incelendiğinde ise en fazla yeşil sürgün veren % 100 ile Helios çeşidi ve % 78,57 ile Westar, %50,00 ile Quinta, % 46,67 ile Spok çeşidi istatistiksel olarak aynı gruba girmiştir. Darmor çeşidinden oluşan sürgünlerin hepsi belirli bir süre sonra beyazlaştığından hiç yeşil sürgün elde edilememiştir.

Çizelge 4.34. Spok, Helios, Quinta, Darmor, Tarok ve Westar çeşitlerinin petiollü tam kotiledon eksplantına 2260 35S GUS-INT hattı ile yapılan gen aktarımı sonucunda kanamisine dayanıklı sürgünlerin gelişimine ait Duncan testi

| Çeşitler | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) | Oluşan Yeşil Sürgün Yüzdesi (%) | Oluşan Beyaz Sürgün Yüzdesi (%) |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Spok     | 12,94 a <sup>1</sup>                  | 3,63 ab                              | 46,67 abc                       | 53,33 b                         |
| Helios   | 10,25 ab                              | 3,50 ab                              | 100,00 a                        | 0,00 c                          |
| Quinta   | 3,59 b                                | 1,00 b                               | 50,00 abc                       | 0,00 c                          |
| Tarok    | 4,56 b                                | 3,00 ab                              | 25,00 bc                        | 25,00 bc                        |
| Darmor   | 10,00 ab                              | 2,25 ab                              | 0,00 c                          | 100,00 a                        |
| Westar   | 19,20 a                               | 5,63 a                               | 78,57 ab                        | 21,43 bc                        |

<sup>1</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

2260 35S GUS-INT bakteri hattı ile inokülasyondan sonra kanamisin içeren besin ortamında gelişen ve kültür süresi boyunca yeşil kalan sürgünler daha sonra kanamisin içeren köklendirme ortamına aktarılmışlardır. Köklendirme ortamında bu sürgünlerin büyük çoğunluğu köklenme göstermiştir. Köklenen bu sürgünler son olarak saksılara aktarılarak iklim odasında ve serada büyütülmüştür. Bu şekilde gen aktarımında kullanılan çeşitlerden çok sayıda aday transgenik bitki elde edilmiştir. Bu bitkilerden elde edilen yaprak örnekleri üzerinde X-GLUC histokimyasal GUS analizleri yapılmıştır. GUS analizine tabi tutulan değişik çeşitlere ait 174 bitkiden yalnızca Westar çeşidine ait 2 tanesinin ( % 1,15) GUS pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Aday transgenik bitkilerin yapraklarında yapılan GUS analizi sonucunda Westar çeşidine ait iki bitkinin GUS pozitif yaprak örnekleri

#### 4.5.2.1. Hansen, Tarok ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksenlerine *A. tumefaciens* pGV 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımı

Adventif sürgün rejenerasyonunda en başarılı çeşit olan Spok ve en az rejenerasyon kabiliyetine sahip Hansen ile onkogenik *A. tumefaciens* hatlarına en duyarlı çeşit olarak belirlenen Tarok çeşidinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarına pGV 2260 35S GUS-INT ile gen aktarımı yapılmıştır. Kanamisine dayanıklı sürgün veren eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi çizelge 4.35’de verilmiştir.

Ele alınan konulara ait varyans analizi çizelgesi incelendiğinde, sürgün veren eksplant yüzdesi bakımından çeşitler arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemli çıkmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise çeşitler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Elde edilen verilere ait Duncan testi Çizelge 4.36’da verilmiştir.

Çizelge 4.35. Hansen, Tarok ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksenlerine *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımından elde edilen sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

| Varyasyon Kaynakları | S.D | Sürgün Veren Eksplant Yüzdesi (%) |        | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) |       |
|----------------------|-----|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|-------|
|                      |     | K.O                               | F      | K.O                                  | F     |
| Çeşitler             | 2   | 411,026                           | 5,110* | 0,111                                | 0,200 |
| Hata                 | 6   | 80,429                            |        | 0,556                                |       |
| Toplam               | 7   |                                   |        |                                      |       |

\* 0.05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.36. Hansen, Tarok ve Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarına *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarımı sonucunda kanamisine dayanıklı sürgünlerin gelişimine ait Duncan Testi

| Çeşitler | Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet) | Yeşil Sürgün Yüzdesi (%) | Beyaz Sürgün Yüzdesi (%) |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Hansen   | 3,33 b <sup>1</sup>                   | 0,66                                 | 50,00                    | 50,00                    |
| Tarok    | 23,33 a                               | 1,00                                 | 100,00                   | 0,00                     |
| Spok     | 6,66 ab                               | 1,00                                 | 100,00                   | 0,00                     |

<sup>1</sup> Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.  
LSD 17,92

Çizelge 4. 36 incelendiğinde, en fazla kanamisine dayanıklı sürgün oluşturan eksplant oranı % 23,33 ile Tarok ve % 6,66 ile Spok çeşitlerinden elde edilmiştir. Aynı çizelgede oluşan sürgünlerin yeşil ve beyaz sürgün yüzdeleri de verilmiştir. Hansen çeşidinde % 50,00 beyaz sürgün oluşurken Tarok ve Spok çeşitlerinde % 100 yeşil sürgün elde edilmiştir.

Elde edilen sürgünlerden köklenenler saksılara aktarılmıştır. Bu şekilde saksılarda gelişen 65 bitki üzerinde yapılan GUS analizi sonucunda GUS pozitif bitkiye rastlanmamıştır.

Fry et al., (1987), Westar çeşidinde gövde segmentlerini kullanarak *A. tumefaciens* pMON200 ve pMON120 plazmidlerini taşıyan hatları ile inokülasyon sonunda transformasyon sıklığının seleksiyon ortamında bulunan km dozuna bağlı olarak değiştiğini ve 100 mg/l km bulunduğunda % 7 olduğunu bildirmişlerdir. Radke et al., (1988), kolza Westar çeşidinde hipokotil eksplantında *A. tumefaciens* pTiBo542 EHA 101 hattı ile inokülasyon sonunda transformasyon sıklığının ko-kültivasyon süresine ve km

dozuna bağılı olarak değıştığını en uygun ko-kültivasyon süresinin 48 saatlik ve 25 mg/l km içeren seleksiyon ortamından (% 2,5) elde edildiğini bildirmişlerdir. Charest et al., (1988), yine Westar çeşidinde *A. tumefaciens* pGV3850 pLGV1103neo hattı ile ince hücre katmanları eksplantına % 2 oranında gen aktarılmış sürgün elde etmişlerdir. Moloney et al., (1989), Westar çeşidinde petiollü tam kotiledon eksplantlarını EHA101 pCGN783 hattı ile inoküle ettiklerinde % 55'den fazla rejenerasyon elde etmişlerdir. Ayrıca az sayıda kaçak sürgün gözlemişlerdir. Mısra, (1990), Westar çeşidinin gövde epidermal eksplantını *A. tumefaciens* pTiB653-SE hattı ile inoküle ettiğinde transformasyon başarısının % 2 olduğunu bildirmiştir. Hong et al., (1997), Westar çeşidinin transformasyon başarısını % 12 bulmuştur. Turgut 1993, Cobra ve Topaz çeşitlerinin petiollü tam kotiledon eksplantını kullanarak C58C1 pGV3850 pBI 121 hattı ile gen aktarımı denemelerinde başarıya ulaşamadığını bildirmiştir. Bütün bu çalışmalardan kolzada çok çeşitli eksplant tipleri ve *A. tumefaciens* hatları kullanarak gen aktarım denemeleri yapılmış olduğu aynı zamanda gen aktarım frekansının oldukça düşük olduğu sonucu çıkmaktadır. Ayrıca, gen aktarım frekansının % 20'nin üzerinde bildirildiğı bir iki raporun başka araştırmacılar tarafından rutin olarak tekrarlanamadığı bildirilmiştir (Khehra and Mathias, 1992; Turgut, 1993).

Bu araştırmada da, kolza bitkisine gen aktarım oranı % 1,15 olarak elde edilmiştir. Bu oranın düşüklüğü muhtemelen gen aktarımında kullanılan *A. tumefaciens* hattından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, seleksiyon ortamında kullanılan km antibiyotiğinin oranını düşürerek (kaçak bitki oranının artması ihtimalini göze alarak) ve değışik ko-kültivasyon sürelerinin denenmesi ile gen aktarım frekansının artırılabilceğı düşünülebilir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 5.1. Kolzada Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Doku kültürü çalışmalarında ilk aşama eksplantın sterilizasyonudur. *İn vitro* 'da kolza fidelerinin steril olarak yetiştirilebilmesi için tohumların % 20'lik oranında çamaşır suyu ile 20 d süreyle muameleye tabi tutulması tohumların hem sterilizasyonunu sağlamış, hem de canlılıklarını etkilememiştir.

Kolzada etkili gen aktarım sisteminin geliştirilebilmesi için öncelikle adventif sürgün rejenerasyonu kapasitesinin artırılması yönünde çalışmalar yapılmıştır. Besin ortamında çeşitli bitki büyümesini düzenleyiciler ve onların değişik kombinasyonları, önce Tarok çeşidinde denenmiştir.

Tarok çeşidinde BAP ve NAA'ın değişik kombinasyonları ile yapılan adventif sürgün rejenerasyonu denemesinde eksplant olarak petiollü tam kotiledon, 2/3 kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Bu deneme sonucunda, en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu petiollü tam kotiledon ve hipokotil eksplantları vermiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantından en yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı % 37,14 ile 0,50 mg/l ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiş olmakla birlikte, 0,50 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA, 0,50 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA, 1,00 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA, 1,00 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamlar arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Hipokotil eksplantında ise en yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı % 43,08 ile 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiş ancak, 0,50 mg/l BAP ve 1,00 mg/l NAA ile 2,00 mg/l BAP içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına

sürgün sayısı birlikte (petri başına sürgün sayısı) incelendiğinde petiollü tam kotiledon eksplantı en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu 10,36 adet ile 0,50 mg/l BAP ve 0,25 mg/l NAA içeren besin ortamında üretmiştir. Hipokotil eksplantı ise 10,88 adet ile yalnızca 2 mg/l BAP içeren besin ortamında en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu vermiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonu oranını yükseltmek için farklı sitokinin (kinetin) ve oksinler (2,4-D) denenmiştir. Bu denemede 0,01 mg/l 2,4-D ve 4,00 mg/l kinetin içeren ortamda hipokotil eksplantından en yüksek adventif sürgün yüzdesi (% 20) elde edilmiş olup, petiollü tam kotiledon eksplantında ise ya hiç veya onunla istatistiksel olarak aynı gruba giren oranlarda adventif sürgün elde edilmiştir. Hipokotil eksplantından elde edilen % 20,00 oranındaki adventif sürgün rejenerasyonu BAP ve NAA kombinasyonundan elde edilen (% 43,08) adventif sürgün rejenerasyonu oranından oldukça düşük bulunmuştur.

Adventif sürgün rejenerasyonunu artırmak için yapılan denemelerden bir başkası da BAP, NAA ve kinetinin birlikte kullanıldığı çalışmalardır. Bu ortamlarda da en yüksek adventif sürgün rejenerasyonu % 20,00 ile 2,00 mg/l BAP, 0,10 mg/l NAA ve 4,00 mg/l kinetin içeren besin ortamından elde edilmiştir ki, bu oran da BAP ve NAA ile yapılan deneme sonuçlarının altında kalmıştır.

Hansen, Spok, Quinta, Kosa, Honk, Helios, Star, Darmor, Bienvenü çeşitlerinin daha önce Tarok çeşidinde en yüksek adventif sürgün rejenerasyonunu veren 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA ve yalnızca 2,00 mg/l ile 4,00 mg/l BAP içeren besin ortamlarında adventif sürgün rejenerasyon yetenekleri araştırılmıştır. Bütün çeşitlerde petiollü tam kotiledon eksplantı

hipokotil eksplantından daha başarılı bulunmuştur. En yüksek adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan çeşit % 43,33 ile Spok, orta seviyede Helios, Darmor, Quinta, Kosa ve Bienvenü, en az adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan çeşitler ise Honk, Star ve Hansen olarak tespit edilmiştir. Kullanılan üç ortamın da çeşitlere göre sürgün oluşturan eksplant ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından bir fark göstermediği, ancak eksplanta göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından petiollü tam kotiledon eksplantında tüm çeşitlerin ortalaması % 23,70 olarak 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise en fazla tek başına 2,00 mg/l (14,78 adet) veya 4,00 mg/l BAP (14,33 adet) içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca, 0,50 mg/l BAP ve 0,50 mg/l NAA içeren ortamda görülen aşırı köklenme tek başına 2,00 veya 4,00 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmemiştir. Genel olarak bütün çeşitler ele alındığında eksplant başına sürgün sayısı, dolayısıyla petri başına sürgün sayısı tek başına 2,00 veya 4,00 mg/l BAP içeren besin ortamlarında en fazla olmuştur. Bu nedenle, çalışılan kolza çeşitlerinde adventif sürgün rejenerasyonu için en uygun eksplantın petiollü tam kotiledon eksplantı ve en uygun ortamın da 2,00 mg/l veya 4,00 mg/l BAP içeren besin ortamının olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Adventif sürgün rejenerasyonu denemesinde istatistiksel gruplandırmada en iyi çeşit olarak belirlenen Spok, orta seviyede bulunan Quinta ve son grupta yer alan Star çeşidinde TDZ sitokininin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Çeşitlerin ve eksplant tiplerinin TDZ'na karşı adventif sürgün rejenerasyonu bakımından verdikleri tepkilerin farklı olduğu görülmüştür. Örneğin, Spok çeşidinde daha önce elde edilen en yüksek adventif sürgün rejenerasyonuna çok yakın sürgün yüzdesi elde edilirken, Quinta çeşidinde % 50 azalma Star çeşidinde ise 4-5 kat artış gözlenmiştir.

Daha önceki adventif sürgün rejenerasyonu denemelerinde hiç sürgün vermeyen Hansen çeşidi ve petiollü tam kotiledon eksplantında % 43,33 adventif sürgün veren Spok çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo eksplantları değişik kombinasyonlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda denemeye alınmışlardır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonuç hem Hansen (% 55,00) hem de Spok (% 66,67) çeşidinde 0,50 mg/l BAP ve 2,00 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Her iki çeşitte de olgunlaşmamış embriyo ekseni (% 57,47) olgunlaşmamış kotiledon eksplantından (% 25,77) daha yüksek adventif sürgün rejenerasyonu vermiştir. Olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının diğer eksplantların aksine sitokininin az oksinin daha fazla kullanıldığı ortamlarda yüksek rejenerasyon gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, hipokotil, petiollü tam kotiledon ve 2/3 kotiledon eksplantlarında sonuç alınamayan Hansen çeşidinde olgunlaşmamış embriyo eksplantları kullanıldığında oldukça yüksek sonuçlar (% 60,84) elde edilmiştir.

Rejenere olan adventif sürgünlerin köklendirilmesi için IBA'in değişik dozları (0,50-4,00 mg/l) kullanılmıştır. Kontrol ve tüm dozlarda köklenen sürgün oranı ve sürgün başına kök sayısında istatistiksel bir fark olmamasına rağmen en yüksek köklenme oranı % 93,33 ve en fazla sürgün başına kök sayısı 5,50 adet ile 0,50 mg/l IBA içeren ortamdan elde edilmiştir. Kök uzunluğu bakımından en iyi ortam IBA içermeyen ya da 0,50 mg/l IBA içeren ortam bulunmuştur.

## 5.2. Non-Onkogenik *Agrobacterium* Hatlarının Tütünde Test Edilmesi

Transgenik materyali ayırt etmek için kullanılan seleksiyon ortamına ilave edilecek antibiyotik veya herbisit dozunu belirlemek için fosfinotrisin ve metotreksat herbisitleri ile higromisin ve kanamisin antibiyotikleri çeşitli oranlarda rejenerasyon ortamına ilave edilmiştir.

Bu deneme tütünün Samsun çeşidinin yaprak diski eksplantında yapılmıştır. Fosfinotrisinin seleksiyon ortamı için en uygun dozunun 5,00 mg/l olduğu belirlenirken, higromisin antibiyotiği için belirlenen en uygun doz 40,00 mg/l olmuştur. Metotreksat herbisitinin 0,10 mg/l'den daha düşük dozlarda kullanılması gerektiği ve kanamisin antibiyotiğinin 50,00 mg/l –100 mg/l dozlarda kullanılmasının uygun olacağı tespit edilmiştir.

Farklı non-onkogenik *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenesis* hatlarının tütünün Samsun çeşidi yaprak diski eksplantlarında gen aktarım başarıları karşılaştırılmıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi % 100 ile 2260 35S GUS-INT, 15834 pRGG hpt ve EHA 101 pRGG hpt # 23, % 95,00 ile 2260 AoPR1 NEO1, en başarılı hatlar olarak belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 18,57 adet ile 2260 AoPR1 NEO2, 15,45 adet ile 15834 pRGG hpt, 12,62 adet ile EHA101 pRGG hpt # 23 hatları en fazla sürgün oluşturan hatlar olarak tespit edilmiştir. Petri başına sürgün sayısı karşılaştırıldığında ise 153,00 adet ile 2260 35S GUS-INT ve 154,50 adet ile 15834 pRGG hpt hatlarının en fazla sürgün veren hatlar olduğu belirlenmiştir. Bunlardan 2260 35S GUS-INT hattı *A. tumefaciens* türüne 15834 pRGG hpt ise *A. rhizogenesis* türüne aittir. *A. rhizogenesis* kullanıldığında gen aktarılan bitkilerde genetik sapmalar görüldüğünden ayrıca *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT hattının

taşıdığı GUS geninin kodlama bölgesinde bitkisel intron bulunduğundan gen aktarımında sağlayacağı avantaj düşünülerek kolzaya gen aktarımında 2260 35S GUS-INT bakteri hattı tercih edilmiştir.

### 5. 3. Kolzaya Gen Aktarımı

#### 5.3.1. Onkogenik *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı

Farklı kolza çeşitlerinin hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarının *A. tumefaciens* A281 ve C58 yabani hatlarına karşı hassasiyetleri belirlenmiştir. Hansen, Helios, Darmor, Quinta, Tarok, Spok, Star, Cobra, Honk ve Bienvenü çeşitlerinin C58 ve A281 hatlarına duyarlılıkları tümör oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına tümör sayısı bakımından çeşit x eksplant x bakteri interaksyonu gözlenmiştir.

C58 hattının tümör oluşturan eksplant yüzdesi hipokotil eksplantında çeşitlere göre % 20,00 ile % 60,00 arasında petiollü tam kotiledon eksplantında da % 20,00 ile % 73,33 arasında bulunmuştur. Hipokotil eksplantında en yüksek tümör oluşturan eksplant oranı Tarok (% 60,00), Quinta , Helios, Star, Bienvenü, Hansen, Spok ve Hansen çeşitleri vermiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantında ise en yüksek tümör oluşturan eksplant oranı Tarok (73,33), Bienvenü, Darmor, Star ve Honk çeşitlerinden elde edilmiştir.

A281 hattının tümör oluşturan eksplant oranı hipokotil eksplantında çeşitlere göre % 16,67 ile % 63,33 , petiollü tam kotiledon eksplantında ise % 20,00 ile % 73,33 arasında değişmiştir. Hipokotil eksplantında en yüksek tümör oluşturan eksplant oranını Star (% 63,33), Tarok, Darmor, Helios, Spok ve Honk çeşitleri vermiştir. Petiollü tam kotiledonda ise en yüksek tümör

oluşturan eksplant oranı Cobra (% 73,33), Quinta, Bienvenü ve Hansen çeşitlerinden elde edilmiştir. Ayrıca, tüm çeşitlerde petiollü tam kotiledon eksplantı hipokotil eksplantından daha yüksek eksplant başına tümör sayısı vermiştir.

Hipokotil ve petiollü tam kotiledon eksplantlarının *A. tumefaciens* C58 hattı ile inokülasyonu sonucunda tümör iriliği bakımından eksplantlar istatistiksel olarak bir fark göstermemiş olup, hipokotil eksplantında 1,35 mm ile 2,78 mm arasında petiollü tam kotiledon eksplantında ise 1,75 mm ile 3,36 mm arasında değişmiştir. Ancak, *A. tumefaciens* A281 hattı ile aynı eksplantlar inoküle edildiğinde çeşitler arasında tümör iriliği bakımından istatistiksel olarak oldukça önemli farklar ortaya çıkmıştır. Tümör iriliği hipokotil eksplantında 1,00 mm ile 5,27 mm arasında değişmiştir. En iri tümörler Cobra (5,27 mm), Tarok, Quinta, Helios ve Darmor çeşitlerinden elde edilmiştir. Petiollü tam kotiledon eksplantında da tümör iriliği 2,83 mm ile 7,73 mm arasında değişmiştir. En iri tümörler Hansen (7,73 mm), Quinta, Cobra ve Bienvenü çeşitlerinden elde edilmiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında en fazla sürgün veren çeşit olarak belirlenen Spok çeşidinde en yüksek tümör oluşturan eksplant oranı petiollü tam kotiledon eksplantının (% 43,33) ve C58 hattı ile inokülasyonundan elde edilmiştir (Çizelge 4.28).

### 5.3.2.Non-onkogenik pGV 2260 35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile gen aktarımı

Kolzaya gen aktarımında, üzerinde en çok çalışılan çeşit olan Westar çeşidine farklı iki gen aktarım yöntemi denenmiştir. I. Yöntemde petiollü tam kotiledon eksplantları 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri kültüründe 15 d inoküle edilmiştir. II. yöntemde ise petiolün ucu seyreltilmemiş bakteri kültürüne bir kaç saniye değdirilerek inoküle edilmiştir. II. yöntemde ayrıca, eksplantlar ko-kültivasyondan sonra seçici antibiyotik içermeyen ortamda 7 gün bekletilmiştir.

I. yöntemde sürgün veren eksplant yüzdesi % 15,00 eksplant başına sürgün sayısı 5,63 adet, yeşil sürgün yüzdesi % 10,00 ve beyaz sürgün yüzdesi % 90,00 olarak tespit edilmiştir. II. yöntemde ise sürgün oluşturan eksplant yüzdesi % 12,00, eksplant başına sürgün sayısı 3,88 adet, yeşil sürgün yüzdesi % 91,43 ve beyaz sürgün yüzdesi % 8,57 olarak bulunmuştur. I. yöntemin sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı daha fazla olmasına rağmen II. yöntemden elde edilen sürgünlerin % 91,43'ünün yeşil olması gen aktarım çalışmalarında II. yöntemin tercih edilmesini sağlamıştır.

Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında diğer çeşitlere göre daha başarılı olan Spok, Helios, Darmor, Quinta ve Tarok çeşitleri ile Westar çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantlarına 2260 35S GUS-INT hattı ile gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi çeşitlere göre % 3,59 ile % 19,20 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi Westar (% 19,20), Spok (% 12,94), Helios (10,25) ve Darmor (% 10,00) çeşitlerinden elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı da çeşitlere bağlı olarak 1,00 adet ile 5,63 adet arasında değişmiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı Westar (5,63 adet), Spok (3,63 adet), Helios (3,50 adet),

Tarok (3,00 adet) ve Darmor (2,25 adet) çeşitlerinden elde edilirken, yeşil sürgün oranı ise en fazla % 100 ile Helios, % 78,57 ile Westar, % 50,00 ile Quinta ve % 46,67 ile Spok çeşitlerinden alınmıştır. Darmor çeşidinden ise hiç yeşil sürgün elde edilememiştir. Elde edilen yeşil sürgünler km içeren köklendirme ortamına alındıklarında büyük çoğunluğunun köklendiği ancak, bu bitkilerin yaprak örnekleri üzerinde X-GLUC histokimyasal GUS analizi yapıldığında 174 aday transgenik bitkiden yalnızca Westar çeşidine ait iki bitkinin GUS pozitif olduğu belirlenmiştir. Yani, Westar çeşidinin petiollü tam kotiledon eksplantının *A. tumefaciens* 2260 35S GUS-INT hattı ile transformasyon sıklığı % 1,15 olarak tespit edilmiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonunda en başarılı çeşit olan Spok ve en az rejenerasyon kabiliyetine sahip Hansen ile onkogenik *A. tumefaciens* hatlarına en duyarlı çeşit olarak belirlenen Tarok çeşidinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarına pGV 2260 35S GUS-INT ile gen aktarımı yapılmıştır. En fazla sürgün oluşturan eksplant yüzdesi % 23,33 ile Tarok, % 6,66 ile Spok çeşidinden elde edilmiştir. Ayrıca, elde edilen sürgünlerin tamamının yeşil sürgün olduğu gözlenmiştir. Ancak, bu sürgünlerden gelişen 65 bitki üzerinde yapılan GUS analizleri sonucunda GUS pozitif bitkiye rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması neticesinde kolzanın farklı çeşitlerinde adventif sürgün rejenerasyonu önemli ölçüde artırılırken, *Agrobacterium* enfeksiyonlarına karşı en duyarlı olan çeşitler de belirlenmiştir. Ancak, Spok, Helios, Dormor, Quinta, Tarok, Westar ve Hansen çeşitlerine yapılan gen aktarım çalışmaları neticesinde sadece Westar çeşidinde düşük oranlarda da olsa transgenik bitkiler elde edilebilmiştir. Değişik araştırmacılar da Westar çeşidinde transgenik bitkilerin üretilmesinin diğer çeşitlere göre çok daha kolay olduğunu belirtmişlerdir. Yine, önceki çalışmaların bazılarında kolzaya yüksek oranda

gen aktarımı yapılmasına rağmen, bu başarılı sonuçlar daha sonra tekrarlanamamıştır. Elde edilen bu farklı sonuçlar kullanılan çeşide, *Agrobacterium* hattına, ortamdaki kanamisin oranına, gen aktarımını yapan araştırmacıya ve laboratuvar şartlarına bağlanabilir. Dolayısıyla, yüksek oranda transgenik kolza bitkilerinin üretilmesi için farklı bitki genotiplerinin ve değişik markör genleri taşıyan *Agrobacterium* hatlarının kullanılması gen aktarım sıklığını artırabilir. Yine, yüksek oranda transgenik kolza bitkilerinin üretilmesi için farklı inokülasyon ve ko-kültivasyon süreleri ile değişik bakteri yoğunlukları denenmelidir. Ayrıca, besin ortamına ilave edilen antibiyotik ve herbisitlerin oranlarının da iyi ayarlanması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abel, P.P., Nelson, R.S., De Grew, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986, Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene, **Science**, 232, 738-743.
- Ammirato, P.V., 1983a, The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspension culture techniques and hormone requirements, **Bio/Technology** 1, 68-74.
- Ammirato, P.V., 1983b, Embryogenesis. In: **Handbook of Plant Cell Culture**, Vol.1. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamato (e.d.s), Macmillan, Newyork, pp. 82-123.
- Banfield, J.J., 1974, Place of rapeseed in world market, **4. Internationaler Rapskongress, Proceedings, Giesen Bundesrepublik, Deutschland**, 4-8 Juni pp. 343-346.
- 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 Rep.**, 6, 396-9.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R., 1992, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border, **Plant Mol. Biol.**, 20: 1195-1197.
- Beckert, M., and Qing, C.M., 1984, Results of a diallel trial and a breeding experiment for in vitro aptitude in maize, **Theor. Appl. Genet.**, 68, 247-251.
- Bellini, C., Chupeau, M.C., Guerche, P., Vastra, G., Chupeau, Y. 1989, Transformation of *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum* mesophyll protoplasts by electroporation, **Plant Sci.** 65, 63-75.
- Berthomieu, P., Beclin, C., Charlot, F., Dore, C., and Jouanin, L., 1994, Routine transformation of rapid cycling cabbage (*Brassica oleraceae*)-molecular evidence for regeneration of chimeras, **Plant Sci.**, 223-235.

- Bevan, G., Flavell, R.B., and Chilton, M., 1983, A chimeric antibiotic resistance gene as selectable marker for plant cell transformation, **Nature**, 304, 7-184.
- Böhmer, P., Meyer, B., and Jacobsen, H.J., 1995, Thidiazuron-Induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus, **Plant Cell Rep.**, 15: 26-29.
- Bomhoff, G. Klapwijk, P.M., Kester, H.C.M., Schilproort, R.A., Hernalsteens, J.P., 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.
- Burnett, L., Arnoldo, M., Yarrow, S., and Huang, B., 1994, Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors, **Plant Cell, Tiss.Org. Cult.**, 37: 253-256.
- Butcher, S. M., Deroles, S. C. and Ledger, S. E., 1990, Transformation of *Geranium*, **New Zealand Genetical Society, 36<sup>th</sup> Annual Meeting**, Abstract 95.
- Button, J., Kochba, J. and Bornman, C.H., 1974, Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.), **J. Exp. Bot.**, 25, 446-57.
- Charest, P.J., Holbrook, L.A., Gabard, J., Iyer, V.N., and Miki, B.L., 1988, *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L., **Theor. Appl. Genet.** 75: 438-445.
- Charest, P., Iyer, V. and Brian, L. 1989, Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains with *Brassica napus* and *Brassica juncea*. **Plant Cell Rep.**, 8; 303-306.
- Chi, G.L., Barfield, D.G., Sim, G-E., and Pua E-C., 1990, Effect of  $A_g NO_3$  and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes, **Plant Cell Rep.**, 9, 195-198.

- Christey, M.C., and Earle, E.D., 1989, Genetic manipulation of *Brassica oleracea* var. *Italica* (Broccoli) via protoplast fusion and transformation, **Aust. Soc. Plant Physil.**, 29 th Annual Meeting, Abstract 40.
- Christou, P., Ford, T.L., Kofron, M., 1991, Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos, **Bio/Technology**, 9, 957-962.
- Chupeau, M.C., Bellini, C., Guerche, P., Maisonneuve, B., Vastra, G., Chupeau, Y., 1989, Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplast, **Bio/Technology**, 7, 503-508.
- 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 Wagga Wagga**, pp. 131-2.
- D' Halluin, K., Botterman, J., De Greef, E., 1990, Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions, **Crop, Sci.** 30, 866-871.
- Damgaard, O., and Rasmusen, O., 1991, Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyl infections with *Agrobacterium rhizogenes*, **Plant Mol. Biol.**, 17: 1-8.
- De Block, M., 1988, Genotype- Independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*, **Teor. Appl. Genet.**, 76, 767-774.
- De Block, M., De Brouwer, D., and Tenning, P., 1989, Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants, **Plant Physiol.**, 91, 694-701.
- De Greef, W., Delon, R., De Block, M., Leemans, J., Botterman, J., 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions, **Bio/Technology**, 7, 61-64.

- De Greve, H., Decrdemer, H., Sevrinck, J. Van Montagu, M., Schell, J., 1981, The functional organization of the octopine *A. tumefaciens* plasmid, Pti B653, **Plasmid**, 6, 235-248.
- Delennay, 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., Fischhoff, D.A., 1989, Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus trungiensis* var. kustaki insect control protein, **Bio/ Tecnology** 7, 1265-1269.
- Delzer, B., Somers D.A., Orf, J.H. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. *Crop Sci.* 30; 320-322.
- Depicher, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambriski, P., and Goodman, H. M., 1982, Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence, **J. Mol. Appl. Genet.**, 1: 561-573.
- 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.
- Downey, R.K., Klassen, A.J. and Pawlowski, S.H., 1974, Breeding quality improvements in Canadian Brassica Oilseeded Crops, **4. Internationaler Rapskongress, Proceedings, Giessen Bundesrepublik Deutschland 4-8 Juni 1974**, pp 57-61.
- Downey, R.K., Klassen, A.J. and J. McAnsh, 1974, Rapeseed-Canada's Cinderella, **Crop, Pub.**, No. 33, Rapeseed Assn of Canada.
- Draper, J., Scott, R., Hamil, J., 1988, Transformation of Dicotyledonous Plant Cells Using the Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri Plasmid of *A. rhizogenes*, *Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory manual*, 71-160, Draper J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R., **Blackwell Scientific Publishers**, Oxford.
- Dunwell, J.M., *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species, 1981, **J. Exp. Bot.**, 129, 789-799.
- Eapen, S., George, L., 1997, Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: Influence of silver thiosulfate, **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, 51, 229-232.

- Eicholtz, D. A., Rogers, S. G., Horch, R. B., Klee, H. J., Hayford, M., Hoffmann, N. L., Bradford, S. B., Fink, C., Flick, J., O'Connell, K. M. and Fraley, R. T., 1987, Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants, **Som. Cell and Mol. Genet.**, 13, 67-76.
- Er, C., ve Canpolat, N., 1992, Bitki Islahında Doku Kùltürleri, **Tarım ve köyişleri Bakanlığı**, Ankara.
- Evans, D.A., Sharp W.R and Flik C.E., 1981, Growth and behavior of cell cultures , In: Plant Tissue Culture- Methods and Applications in Agriculture, Thorpe T.A. (ed.), **Academic Press**, New York, pp. 45-113.
- Everett, N.P., Robinson, K.E.P. and Mascarenhas, D., 1987, Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.) **Bio/ Technology**, 5, 1201-1204.
- Facciotti, D., Turner, J., Justica, R., Radke, S., 1989, Somatik regeneration and recovery of transgenic plants from *Brassica campestris*, In: **Proceeding of the Fifth Cricufer Genetics Workshop**, Univ. Of California, Oakland, California, 48.
- Fang, G. and Grumet, R., 1990, *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of musk melon plants, **Plant Cell Rep.**, 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.
- Fillatti, J.J., Sellmer, J., Mc Cown, J.B., Haissig, B. and Comai, L., 1987, *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*, **Mol. Gen. Genet.**, 206, 192-201.
- Finer, J., McMullen, M.D., 1990, Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment, **Plant Cell Rep.**, 8, 586-589.
- 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 regeneration of transgenic plants, **Plant Mol. Biol.**, 10, 105-116.

- Freeman, J., 1988, An Evaluation of Procedures and Markers for Plant Transformation, **Doktora**, Universty of Natingham.
- Fry, J., Barnason, A and Horsch, R.B., 1987, Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors, **Plant Cell Rep.**, 6, 321-325.
- Gamborg, O.L. and Shyluk J.P., 1981, In: Plant Tissue Culture Methods and Applications in agriculture, Thorpe, T.A. (ed), **Academic Press**, New York.
- Gasser, C. S. and Fraley, R.T., 1989, Genetically engineering plants for crop improvement, **Science**, 244, 1293-1299.
- Gönülşen, N., 1987, Bitki Doku Kùltürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları, Menemen-İzmir.
- Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'brien, J.V., Chambers, S.A., Adams, W.R., Willetts, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., 1990, Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, **Plant Cell**, 2, 603-618.
- Green, C.E. and Phillips, R.L., 1975, Plant regeneration from tissue cultures of maize, **Crop Sci.**, 15, 417-421.
- Guerche, P., Bellini, C., Le Moullec J. and Herrera-Estrella, L., 1987 a, Use of transient expression assay for the optimisation of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplast by electroporation, **Biochimie**, 69, 621-628.
- Guerche, P., Charbonnier, M., Jouanin, L., Tourneur, C., Paszkowski, J., Pelletier, G., 1987 b, Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*, **Plant Sci.**, 52, 11-116.
- Gürel, E., 1997, Plant tissue culture techniques and types of in vitro devoleopment occurring in cultures, **I. Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi**, Kırıkkale Üniversitesi, 14-16 Mayıs 1997, 25-36 Kırıkkale.
- Guri, A. and Sink, K. C., 1988, *Agrobacterium* transformation of eggplant, **J. Plant Physiol.**, 133, 52-55.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W., Grierson, D., 1990, Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone etylene in transgenic plants, **Nature**, 328, 799-802.

- Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkman, M.A., Endos, E., 1984, Genotype and media effects of callus formation and regeneration in barley, **Crop Sci.**, 25, 27-31.
- Haughn, G.W., Smith, J., Mazur, B. and Somerville, C., 1988, Transformation with a mutant *Arabidopsis acetolactate* synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides, **Mol. Gen. Genet.**, 211, 266-71.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., van Montagu, M. and Schell, J., 1983, Expression of chimeric genes transferred into cells using Ti-plasmid-derived vector, **Nature**, 303, 13-209.
- Hiei, Y., Komari, T., Kubo, T., 1997, Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, **Plant. Mol. Biol.** 35, 205-218.
- Hille, J., Vergehen, F., Roelvink, P., Franssen, H., Van Kammen, A. and Zabel, P., 1986, Bleomycin resistance; a new dominant selectable marker for plant cell transformation, **Plant Mol. Biol.**, 7, 171-6.
- Hinchee, M. A. W., Connor-Ward, D. V., Newell, C. A., McDonnell, R. E., Sato, S. J., Gasser, 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, 915-22.
- Hoekama, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schulperoort, R.A., 1983, A binary vector strategy based on separation of vir and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid, **Nature**, 303, 179-180.
- Holster, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C. De Block, M. et al., 1980, The functional organization of the napoline *A. tumefaciens* plasmid PTiC58, **Plasmid**, 3, 212-30.
- Hong, H.P., Gerster, J.L., Datla, R.S.S., 1997, The promoter of a Brassica napus polygalacturonase gene directs pollen expression of  $\beta$ -glucuronidase in transgenic *Brassica* plants, **Plant Cell Rep.**, 16, 373-378.
- Hood, E., Fraley, R., and Chilton, M., 1986, Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes, **Plant Physiol.**, 83: 529-534.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rodgers, S. G. and Fraley, R. T., 1985, A simple and general method for transferring genes into plants, **Science**, 227, 1229-31.

- 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.
- 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.
- İpkin, B., Koç, E., ve Üras, A., 1990, Kışlık Koza Araştırmaları Projesi-Enstitü Raporu, **Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü**, Antalya.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohto, S., Hiei, Y., Komari, T., Kumashiro, T., 1996, high efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, **Nature Biotechnology**, 14, 745-750.
- 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 Rep.**, 7, 658-61.
- Jefferson, R.A., 1987, Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system, **Plant Mol. Biol. Rep.** 5: 387-405.
- 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, 669-74.
- Kado, C.I., 1991, Molecular mechanism of crown gall tumorigenesis, **Crit. Rew. Plant Sci.**, 10, 1-32.
- Khehra, G.S., and Mathias, R.J., 1992, The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L., **J. Exp. Bot.**, Vol. 43, No. 256, pp. 1413-1418.
- Klee, H.J., Rogers, S.G., 1989, Plant gene vectors and genetic transformation: Plant transformation systems based on the use of *A. tumefaciens*, **Cell Cult. Somatic Cell Genet. Plant**, 6, 1-23.
- Klein, T.M., Wolf, E.d., W.U., R., Sanford, J.C., 1987, High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells, **Nature**, 327, 70-73.
- Klimaszewska, K., and Keller, W.A., 1985, high frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*, **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 4: 183-197.

- Kolsarıcı, Ö., 1986, Türkiye’de bitkisel yemeklik yağ açığı ve çözüm yolları, **Zir. Mühendisliği Dergisi**, 179, 41-44.
- Kolsarıcı, Ö., Başalma, D., 1988, Ülkemizde kolza tarımı ve gelişmesinde karşılaşılan sorunlar, **Zir. Müh. Derg.**, 208, 15-18.
- Kolsarıcı, Ö., Başalma, D., İşler, N., Arıoğlu, H., Gür, A., Olhan, E., ve Sağlam, C., 2000, Yağ bitkileri üretimi, **Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi**, Ankara.
- Kozeil, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carrozzi, 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., Evola, S. V., 1993, Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*, **Bio/Tecnology**, 11, 194-199.
- Lazzeri, P.A., and Dunwell, J. M., 1984, *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleraceae* and *Brassica napus* cultivars, **J. Exp. Bot.**, 54, 341-350.
- Ledger, S. E., Deroles, S. C. and Given, N. K., 1991, Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Chrysanthemum*, **Plant Cell Rep.**
- Leemans, J., Longenakens, J. De Greve, H. Deblaere, R. Van Montagu, M. Schell, J. Broad., 1982, Host range cloning vectors derived from the W-plasmid sa, **Gene**, 19, 361-364.
- Leeson, S., Atteh, J.O., and Summers, J.D., 1987, Effect of Increasing Dietary Levels of Full-Fatt Canola on Performance Nutrient Retention and Bone Mineralization, **Poultry Sci.**, 66, 875-880.
- Lindsey, K., Jones, G.K., Fish, N. 1988, Direct gene transfer into plant protoplast, New nucleic acid techniques, 519-536, Wolker, J.M., **Humana Press**, Clifton, New Jersey.
- 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.

- Mathews, H., Bharathan, N., Litz, R. E., Narayanan, K. R., Rao, P. S. and Bhatia, C. R., 1990, Transgenic plants of mustard *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss., **Plant Sci.**, 72, 245-52.
- Mc Cormik, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R. and Fraley, R., 1986, Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*, **Plant Cell Rep.**, 5, 81-84.
- Mc Mullen, M.D. and Finer, J.J., 1990, Stable transformation of cotton and soybean embryogenic cultures via microprojectile bombardment, **J. Cell. Biochem.**, Supplement 14E.
- Mc Cabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P., 1988, Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration, **Bio/Technology**, 6, 923-926.
- Messens, E., Lenaerts, A., Van Montagu, M., Hedges, R.W., 1985, Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor 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 Rep.**, 6, 439-42.
- Miller, T., and Skoog, F., 1953, Pierik, R.L.M., 1987, *In vitro* Culture of Higher Plants, **Am. J. Bot.**, 40: 768-773.
- Misra, S., 1990, Transformation of *Brassica napus* L. with a disarmed octopine plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*: Molecular analysis and inheritance of the transformed phenotype, **J. Exp. Bot.**, Vol. 41, No. 224, pp. 269-275.
- Moloney, M.M., Walker, J.M., and Sharma, K.K., 1989, High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors, **Plant Cell Rep.**, 8, 238-242.
- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka K., Thompson, C.J., 1986, The biophosphoryl biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster, **Mol. Gen. Genet.**, 205, 42-50.
- Murashige, T., and Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiol. Plant.**, 15, 473-497.

- Murassige, T., 1974, Plant propagation through tissue culture, **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 25, 135-166.
- Narasimhulu, S.B., and Chopra V.L., 1987, Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of *Brassicas*, **Plant Cell Rep.**, 7: 104-106.
- Natali, L., and Cavallini, A., 1987, Regeneration of pea (*Pisum sativum*L.) plantlets by *in vitro* culture of immature embryos, **Plant Breed.**, 99, 172-176.
- Nehra, N.S., Chibbar, R.N., Kartha, K.K., Datla, R.S., Crosby, W.L. and Stushnoff, C., 1990, *Agrobacterium* mediated transformation of Strawberry callus and recovery of transgenic plants, **Plants Cell Rep.**, 9, 10-13.
- Nester, E.W., Gordan, M., 1988, Early events in transformation of higher plants by *Agrobacterium*, physiology and Biochemistry of Plant-Microbiol Interactions, 1-10, Keen, N.T., Kosuge, T., Walling, L., **The American Society of Plant Physiologists.**
- Neuhaus, G., Sopanzenberg, G., (1990), Plant transformation by microinjection techniques, **Physi. Plan.**, 79, 213-217.
- Neuhaus, G., Spangenberg, G., Scheid, O.M., and Schweiger, H.G., 1987, Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids, **Theor. Appl. Genet.**, 75: 30-36.
- Nitsch, 1968, Pierik, R.L.M., 1987, In vitro culture of higher plants, **Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.** 9, 1-92.
- OECD, 1998, Database File: Field releases of genetically modified organism Organization for economic co-operation and development, environmental directorate, David R. Murray 1993, **Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology**, Paris.
- Okado, K., Takebe, I., Nagata T., 1986, Expression and integration of genes introduced into highly synchronised plant protoplasts, **Mol. Gen. Genet.**, 205, 398-403.
- O'Neill, C.M., Arthur, A.E. and Mathias, R.J., 1996, The effects of proline, thioproline and methylglyoxal-bis-(guanyldrazone) on shoot regeneration frequencies from stem explants of *B. napus*, **Plant Cell Rep.**, 15, 695-698.

- Önder, M., Aktümsek, A., 1995, Yazlık kolza (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera* Metzg) çeşitlerinin yağ asitleri dağılımı üzerine araştırmalar, **S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 8 (10): 26-38.
- Ono, Y., Takahata, Y., and Kaizuma, N., 1994, Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.), **Plant Cell Rep.**, 14: 13-17.
- Ooms, G., Bains, A., Burrell, M., Karp, A., Twell, D., and Wicox, E., 1985, Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium*, **Theor. Appl. Genet.**, 71: 325-329.
- Ozias-Akins, P., 1989, Plant regeneration from immature embryos of peanut, **Plant Cell Rep.**, 11, 44-47.
- Özcan, S., 1993, Tissue Culture in Pea and Engineering a Marker Gene for Specific Expression in Target Cells for Plant Transformation (**Doktora Tezi**), Leicester University, 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., 1995, Assessment of the susceptibility of different pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens*, **Turkish Journal of Botany**, 19: 417-422.
- Özcan, S., Özgen, M., 1996, Bitki genetik mühendisliği, **Kükem Dergisi**, Sayı 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.
- Özcan, S., 1997, Effect of marker gene location in T-DNA on gene transfer from *Agrobacterium* to plant cells. **Turkish Journal of Botany**, 21: 189-195.
- Özcan, S., Sancak, C., ve Yıldız, M., 1998, Bitki genetik mühendisliği uygulamaları, Tarımda yeni ufuklar sempozyumu, Ankara, 159-165.
- Özgüven, M., 1995, Yağ Bitkileri, Cilt II (Kolza, Ayçiçeği, Hintyağı), **Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı**, No: 47, 1-26.

- Parnott, W.A., Williams, E.G., Hildebrand, D.F., and Collins G.B. and Williams, E.G., 1988, Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean, **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.**, 16, 15-21.
- Paulet, 1965, Pierik, R.L.M., 1987, *In vitro* culture of higher plants, **Rev. Gen. Bot.**, 72, 697-792.
- Pierik, R.L.M., 1987, *In vitro* Culture of Higher Plants, Kluwer Academic Publishers, **MTP Press Limited**, Hingham USA.
- Potrykus, T., 1990, Gene Transfer to Cereals: An Assessment, **Bio/Technology**, 8, 535-542.
- Puonti- Kaerlas, J., Ericson, T., and Engstrom, P., 1990, Production of transgenic pea (*Pisum sativum*) plants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated gene transfer, **Theor. App. Genet.**, 80, 249-252.
- Radke, S.E., Andrews, B.M., Moloney, M.M., Crouch, M.L., Kridl, J.C., and Knauf, V.C., 1988, Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene, **Theor. Appl. Genetic**, 75. 685-694.
- Radke, S.E., Turner, J.C., and Facciotti D., 1992, Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*, **Plant Cell Rep.**, 11, 499-505.
- Reavy, B., and Mayo, M.A., 1992, Genetic engineering of virus resistance, In: Plant genetic manipulation for Crop Protection, A.M.R. Gatehouse, V.A. Hilder and D. Boulter (Eds) pp. 183-214, C.A.B. **International**, Oxon, U.K.
- Roy, N.N., ve Tarr, A.W., 1984, IXLIN- an interspecific source for high linoleic and linoleic acid content in rapeseed (*Brassica napus* L.), **Z. Pflanzenzüchtg**, 95. 201-209.
- Sethi, U., Basu, A., and Guha-Mukherjee, 1990, Control of cell proliferation and differentiation by modulators of ethylene biosynthesis and action in *Brassica* hypokotyl explants, **Plant Sci.**, 69, 225-229.
- Schell, J., 1982, Plant Cell Transformations and Genetic Engineering, **Plant Improvement and Somatic Cell Genetics**, Academic Press, Inc. Orlando, Florida, pp. 255-276.

- Schell, J., Van Montagu, M., 1983, The plasmids as natural and as practical gene vectors for plants, **Bio/Technology**, 1, 75.
- 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 Mol. Biol.**, 8, 265-74.
- Scott, R.J., 1988, DNA restriction and analysis by Southern hybridisation, In: “Plant Genetic Transformation and Gene Expression; A laboratory manual” J. Draper, R. Scott, P. Armitage and R. Walden (eds), 237-261, **Blacwell Scientific Publications**, Oxford.
- Sears, R.G., and Deckard, E.L., 1982, Tissue culture variability in wheat, callus induction and plant regeneration, **Crop Science**, 22, 546-550
- Shahin, E.A. and Yashar, M., 1986 a, Transformation of cabbage by a binary vector in *Agrobacterium tumefaciens*. In: Crucifer Genetics Workshop III Proceedings. **University of Guelph**, Guelph Canada, pp. 41.
- Shahin, E. A., Spielmann, A., Sukhapinda, K., Simpson, R. B. and Yasher, M. 1986b, Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*, **Crop Sci.**, 26, 1235-9.
- Sharp, W., Evans, D.A. and Sondahl, M.R., 1982, Application of somatic embryogenesis to crop improvement, In: Fujiwara, A. (ed), Plant Tissue Culture, 1983, Proceedings of the fifth International Congress of Plant Tissue Culture, **Japanese Association for Plant Tissue Culture**, Tokyo, pp.759-62.
- Slinger, S.J., 1977, Improving the nutritional properties of rapeseed, **J. Am Oil Chem Soc.**, 54: 2, 94-99 A.
- Snedecor, G.W., and Cochran, W.G., 1967, **Statistical Methods**, The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Spencer, T., M., Gordon\_Kamn, W.J., Danies, R.J., Start, W.G. and Lemaux, P.G., 1990, Bialopus selection of stable transformants from maize cell culture, **Theor. App. Genet.**, 79, 625-31.
- Stachel, S., Zambryski, P.G., 1986, *VirA* and *VirG* control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*, **Cell**, 46, 325-333.

- Tempe, J., Goldmann, A., 1982, Occurrence and biosynthesis of opines, **Mol. Biol. Plant Tumors**, 427-449, Academic Press, New York .
- Thomas, J.C., Guiltinan, M. J., Bustos, S., Thomas, T. and Nessler, C., 1989, Corrot (*Dacus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*, **Plant Cell Rep.**, 8, 354-357.
- Thomas, J.C. and Katterman, F.R. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiol.* 81: 681-683.
- Thomashow, M.F., Nutter, R. Montoya, A.L. Gordon, M.P., Nester, E.W., 1980, Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors, **Cell**, 19, 729-739.
- Tingay, S., Mc Elroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettel, R., 1997, *Agrobacterium tumefaciens*- mediated barley transformation, **Plant J.**, 11, 1369-1376.
- 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. , Carmu, O.A., Young, C., Prusti, R.K., Nester, E.W., 1989, The *Agrobacterium tumefaciens* Vir C1 gene product binds to over drive, a T-DNA transfer enhancer, **J. Bacteriol.**, 171, 6845-6849.
- Trolinder, N.L. and Xhixian, C., 1989, Genotype specificity of the somatic embriyogenesis response in cotton, **Plant Cell Rep.**, 8, 133-6.
- Trulson, A., Simpson, R and Shahin, E., 1986, Transformation of cucember (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*, **Theor. and App. Genet.**, 73, 11-15.
- Turgut, K., 1993, A study of anther gene function in Brassica napus using an antisense RNA approcach, **Doktora Tezi**.
- Turgut, K., Barghchi, M., Scott, R., 1994, High frequency of shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica napus* L., **Tr. J. of Botany**, 18, 465-468.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K and Swain, W., 1987, Genetically transformed cotton (*Gossypium Hirsutum* L.), **Bio/Technology**, 5, 263-266.

- Van den Elzen, P. J., Townsed, J., Lee, K.Y., and Bedbrook, J.R., 1985, A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells, **Plant Mol. Biol.**, 5, p.299-302.
- Vasil, I.K., 1998, Biotechnology and food security for 21<sup>st</sup> century: A real-world perspective, **Nature Biotech.**, 16: 399-400.
- Waldron, C., Murphy, E.B., Roberts, J.L., Gustafson, G.D., Armour, S.L. and Malcolm, S., 1985, Resistance to hygromycin B; a new marker for plant transformation studies, **Plant Mol. Biol.**, 5, 103-8.
- Wang, K, Herrera-Estrella, Van Montagu, M.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.
- Watson, B. Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D., Nester, E.W., 1975, plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*, **J. Bacteriol.**, 123, 255-264.
- Weeks, J.T., Anderson, O.D., Blechu, A.E., 1993, Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*), **Plant Physi**, 102, 1077-1084.
- Weiss, E. A., 1983, Rapeseed, **Oilseed Crops**, Chapter 5, pp. 161-214, The United States of America by Longman Inc., New York.
- White, D. W. R. and Greenwood, D., 1987, Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors, **Plant Mol. Biol.**, 8, 461-9.
- 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.
- Yang, M., Jia, S., and Pua E., 1991, High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br., **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 24: 79-82.
- Yıldız, M., 2000, Keten (*Linum usitatissimum* L.) Bitkisinde Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı, (**Doktora Tezi**), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Yılmazlar, B., 1999, Korunga, Çayır Üçgülü ve İskenderiye Üçgülünün *Agrobacterium tumefaciens*'e Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi, (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zambryski, P.C., 1992, Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story, Annu. Rev. Plant Physiol., **Plant Mol.Biol.**, 43, 465-490.
- Zhang, W. and Wu, R., 1988, Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants, **Theor. App. Genet.**, 76, 835-840.
- Zhao, J., Simmonds, D.H., and Newcomb, W., 1996, High frequency production of doubled haploid plants of *Brassica napus* cv. Topas derived from colchicine-induced microspore embryogenesis without heat shock, **Plant Cell Rep.**, 15: 668-671.
- 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

1966 yılında Almanya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara’da, lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. Gazi üniversitesi Gazi eğitim fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü’nden 1990 yılında mezun oldu. Ekim 1991 tarihinde G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans programına girdi. Şubat 1992 tarihinde G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. “*Bellevalia*’nın Bazı Endemik Türleri Üzerine Karyotipik ve Morfolojik Araştırmalar” konulu Yüksek Lisans tezini Mart 1994 tarihinde bitirdi. Eylül 1994 tarihinde aynı enstitünün Doktora programına girdi. Nisan 2000 tarihinde “Kolza’da (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) Sürgün Rejenerasyonu Aracılığıyla Gen Aktarımı” konulu Doktora tezini tamamladı. Evli ve iki çocuk annesi olan Semra Mirici İngilizce bilmektedir.