

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORYZA SATİVA TÜRLERİNDEN, TROPİK INDİCA
DONÖR BİTKİ TÜRÜNDEN, ILIMAN KOŞULLARA
UYGUN JAPONİCA BİTKİ TÜRÜNE HERBİSİT DİRENÇLİ
ALEL İNTROGRESYONU

Selin UZUNOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Aralık, 2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORYZA SATİVA TÜRLERİNDEN, TROPİK INDİCA DONÖR BİTKİ
TÜRÜNDEN, ILIMAN KOŞULLARA UYGUN JAPONİCA BİTKİ
TÜRÜNE HERBİSİT DİRENÇLİ ALEL İNTROGRESYONU

Selin UZUNOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 18.12.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU, Üye
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Oryza Sativa Türlerinden, Tropik Indica Donör Bitki Türünden, Ilıman Koşullara Uygun Japonica Bitki Türüne Herbisit Dirençli Alel İntrogresyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Selin UZUNOĞLU

İmza

Aileme,



TEŞEKKÜR

Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN'e en içten saygılarımı ve bu tezi yazarken, kendisi ve ekibi ile çalışma fırsatı verdiği için, başarılı olabilmem için takip edebileceğim bir yol yarattığı için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan, her koşulda destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Selin UZUNOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Ekili Pirinç	1
1.3 Pirinç Yetiştiriciliği	2
1.4 Pirinç Genomu Sıralama Projeleri	3
1.5 Kantitatif Özellik Lokusu (QTLs)	5
1.6 Pirinçte Verim İle İlgili QTL	6
1.7 Gelişmiş QTL Çaprazlaması	7
1.8 Pirinçte Verim ile İlgili Genler QTL	7
1.9 Tezin Amacı	8
1.10 Hipotez	8
2 Genel Bilgiler	10
2.1 Pirinç Ekimi ve Gıda Güvenliği	12
2.2 Herbisit, Herbisit Direnci ve Pirinç	14
2.3 Pirinç Yetiştiriciliği	17
2.4 Backcross Yetiştiriciliği	17
2.5 Ekilebilir Pirinç Evrimi Sırasında Genetik İntrogression	17
2.6 Embriyo Kurtarma	20
2.7 Japonica ve Indica Arasındaki Uyumsuzluklar	20
2.8 Embriyo Kurtarma Tekniği	21
2.8.1 İn Vivo Transplantasyon	24

2.8.2	İn Vivo / İn Vitro Kültür	24
2.8.3	İn Vitro Kültür	24
2.8.4	Kültür Gereksinimleri	25
3	Deneysel Çalışma	28
3.1	Bitki Malzemesi ve Büyüme Koşulları	28
3.2	Backcross Yetiştiriciliği	29
3.3	Embriyo Kurtarma İşlemi ve Herbisit Seçimi	31
3.4	DNA Ekstraksiyonu	32
3.5	S5 Allellerinin PCR ile Tespiti	33
4	Sonuçlar ve Tartışma	35
4.1	Backcross Yetiştiriciliği	35
4.2	Embriyo Kurtarma	37
4.3	Herbisit Seçimi	38
4.4	S5 Alellerinin PCR ile Tespiti	39
4.5	Sonuçlar	47
A	Ekler	48
	Kaynakça	49
	Tezden Üretilmiş Yayınlar	52

SİMGE LİSTESİ

Ca	Kalsiyum
Cu	Bakır
EMS	Etil Metansülfonat
Fe	Demir
ha	Hektar
K	Potasyum
kg	Kilogram
Mg	Magnezyum
Mn	Manganez
Na	Sodyum
Zn	Çinko
μ	Mikro
°	Santigrat Derece
%	Yüzde Oranı

KISALTMA LİSTESİ

ACCCase	Asetil-CoA Karboksilazı
ALS	Asetolaktat Sentez
BC	Backcross
c-DNA	Complementary Deoksiriboz Nükleik Asit
CHD	Sikloheksandion
CLDGR	Eş Merkezli Düşük Çeşitlilik Bölgesi
DEN	Fenilpirazolin
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
DP	Donor Parent
FOP	Ariloksifenoksipropiyonat
GMO	Genetically Modified Organism
GS	Glutamin Sintetaz
HRC	Herbicide Resistant Crop
IRGSP	Uluslararası Pirinç Genomu Sıralama Projesi
NERICA	New Rice for Africa
MAS	Markör Destekli Seçim
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Kantitatif Özellik Lokusu
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSR	Basit Ardışık Tekrarlar
RAP-DB	Rice Annotation Project Database
RP	Recurrent Parent
T-DNA	Transfer Deoksiriboz Nükleik Asit

TIGR

Pirinç Genom ve Genomik Araştırma Enstitüsü

TILLING

Genomlarda Hedefleme ile İndüklenen Lokal Lezyonlar



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Oryza Sativa ve Oryza Glaberrima	3
Şekil 2.1	Pirinç Türleri	12
Şekil 2.2	1 Ton Piricin Son 30 Yıl İçerisindeki Emtia Fiyat Grafiği	14
Şekil 2.3	ACCase İzofomları (A) Diğer Bitkiler (B), ACC İzofomları (C). . .	16
Şekil 2.4	Embriyo Kurtarma	23
Şekil 3.1	Yetiştirme Serası	29
Şekil 3.2	Geri Çaprazlama Süreci	30
Şekil 3.3	Emaskülasyon Prosesi	31
Şekil 3.4	Embriyo Kurtama Prosesi	32
Şekil 3.5	DNA Ekstrasyon Prosesi	33
Şekil 4.1	F1 Embriyolarının Herbisite Direnci	35
Şekil 4.2	Emaskülasyon Verimliliği	36
Şekil 4.3	RP01 X LIH F1 Miktarları	36
Şekil 4.4	F1 Embriyolarının Verimliliği	37
Şekil 4.5	3 µM Herbisit Verimliliği	38
Şekil 4.6	RP01xLIH Geri Çaprazlaması	40
Şekil 4.7	Agaroz Jel Görüntüsü 1	41
Şekil 4.8	PCR Örneği	42
Şekil 4.9	Agaroz Jel Görüntüsü 2	43
Şekil 4.10	Agaroz Jel Görüntüsü 3	44
Şekil 4.11	Agaroz Jel Görüntüsü 4	45
Şekil 4.12	Agaroz Jel Görüntüsü 5	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	Tahmini Yıllık Pirinç Üretimi (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü 2018).	12
Tablo 3.1	Kullanılan Primer Çiftlerin Listesi ve Beklenen Boyutlar	34



Oryza Sativa Türlerinden, Tropik Indica Donör Bitki Türünden, Ilıman Koşullara Uygun Japonica Bitki Türüne Herbisit Dirençli Alel İntrogresyonu

Selin UZUNOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Pirinç (*Oryza sativa* L.), farklı çevresel koşullara uyum gösterebilmesi sebebiyle dünya çapında önemli bir temel besin maddesidir. Pirinç sahip olduğu ekonomik ve sosyal öneme sahip olması sebebiyle, farklı biyotik ve abiyotik streslere tolerans, daha yüksek verim, daha iyi organoleptik, yüksek besin değeri ve gelişmiş tarımsal özelliklere sahip yeni pirinç türleri için sürekli bir gereksinim bulunmaktadır. Yabani otlar, ekinlerde büyük bir biyotik strestir ve verimi arttırmak ve üretim maliyetlerini azaltmak için herbisite dayanıklı ürünler geliştirilmiştir. Cycloxydim, filizlenme sonrası yabancı ot kontrolünde kullanılan otlara özgü bir ACCase inhibitörü herbisittir. Calli mutagenesi yoluyla daha önce OsACCase2 geninde bir nokta mutasyonu sunan bir mutant Cycloxydim'e dayanıklı pirinç hattı elde edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, ticari amaçlar için tropikal bir japonika OsACCase2 mutantından geleneksel iki ılıman japonica pirinç çeşidine bir herbisit direnci alelini aktarmaktır.

Embriyo kurtarma tekniği yardımı, tohum olgunlaştırma adımını atlayarak geri çaprazlamayı çalışmada verimi arttırmıştır. Embriyodan kurtarmadan sonra elde edilen embriyolar için herbisit seçimi, dirençsiz embriyoların ayrılmasını kolaylaştırdı. Yapılan introgresyonlar sonucu türler arasında arasında güçlü bir cinsel uyumsuzluk tespit edildi ve fakat bu durumun üstesinden gelindi. Çalışmanın henüz tamamlanmamış olmasına rağmen, erken embriyo kurtarma yöntemi ile provoke edilen S5 japonica x indica uyumsuzluk alellerini belirlemek için multipleks PCR yapılmış ve kısmen yeterli sonuçlar alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Oryza Sativa, Herbisit, İntrogresyon, Pirinç, PCR



YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ABSTRACT

Herbicide Resistance Allele Introgression from a Tropical Indica Rice Donor Plant to Temperate Japonica rice (*Oryza Sativa*) Varieties

Selin UZUNOĞLU

Department of Biongeneering
Master of Science Thesis

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Rice (*Oryza sativa* L.) is an important staple food crop worldwide due to its adaptability to different environmental conditions. Because of its great economic and social importance, there is a constant requirement for new varieties with improved agronomic characteristics, such as tolerance to different biotic and abiotic stresses, higher yield and better organoleptic and nutritional value. Weeds are major biotic stress in crops and herbicide-resistant crops have been developed to improve yields and reduce production costs. Cycloxydim is a grass-specific ACCase inhibitor herbicide used in postemergence weed control. A mutant Cycloxydim-resistant rice line has been previously obtained through calli mutagenesis, presenting a point mutation in OsACCase2 gene.

The main aim of this study is to introgress an herbicide resistance allele from a tropical japonica OsACCase2 mutant into traditional two temperate japonica rice varieties for commercial purposes.

Embryo rescue technique assistance boosted the backcrossing bypassing the seed maturation step. Herbicide selection of embryo rescued plantlets eased discarding non-resistant offspring. A strong sexual incompatibility between one of the recurrent parents and the donor variety has been detected and overcome. Multiplexed PCR has been performed in order to determine the S5 japonica x indica sexual incompatibility alleles that provokes premature embryo sac abortion, although results are not yet finished.

Keywords: Oryza Sativa, Herbicide, Introgression, Rice, PCR



1.1 Literatür Özeti

1960'lı ve 1990'lı yıllar boyunca, yabancı ot yoğunluğunun ve mahsulün ortaya çıkış zamanının mahsulün gelir (ürün başına verim) kaybı üzerindeki etkisinin belirlenmesi konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, herbisit uygulaması için modeller veya karar destek sistemleri geliştirmek için kullanılmıştır. Bir mahsul mevsimine odaklanan ilk yabancı ot ekonomik eşik modelleri, daha uzun zaman dilimleri ve yabancı ot tohum etkileri, yani ekonomik optimum eşikler veya yaralanma seviyeleri dikkate alınarak daha sofistike hale geldi. Bugün, eşik kavramı, hala entomoloji ve patolojide kullanılmasına rağmen, yabancı ot, bilim adamları veya uygulayıcıları tarafından artık önerilmemektedir [1].

Günümüzde çoğu yetiştirici için gerçek, tarlalarındaki yabancı ot tohumları büyük olasılıkla bir ya da daha fazla herbisit etki alanına dirençli olmasıdır. Sıfır tolerans politikası günümüzde savunulmaktadır. Bununla birlikte, tüm yabancı ot türleri ve tüm küresel kurtulma sistemlerinde bu amaca ulaşmak için agronomik ve ekonomik olarak uygun veya gerekli olmayabilir [2].

1.2 Ekili Pirinç

Pirinç (*Oryza sativa* L.) bu denli önemli olmasının sebebi, dünya nüfusunun yüzde ellisinden fazlasının günlük diyetlerinin pirince bağlı olmasıdır. Böylelikle oryza sativa yani bilinen ismiyle pirinç, tüm dünya populasyonunun tükettiği temel gıdalar maddeleri içerisinde en önemlilerinden biri haline gelmiştir. *Oryza* L. cinsi, Poaceae (Gramineae) familyasındaki Oryzoideae alt familyasının alt kırılımı olan Oryzeae ailesinin altında bulunmaktadır. Oryzeae ailesi toplamda 4 tür kompleksine ayrılabilir: (1) *Oryza granulata*, (2) *Oryza officinalis*, (3) *Oryza sativa* ve (4) *Oryza ridelyi* [3].

Oryza sativa yada bildiğimiz ismi ile pirinç ekilebilir (domestike edilmiş) türlere ve yabancı türlere olmak üzere iki başlıkta incelenebilir: *Oryza sativa* ve *Oryza glaberrima*

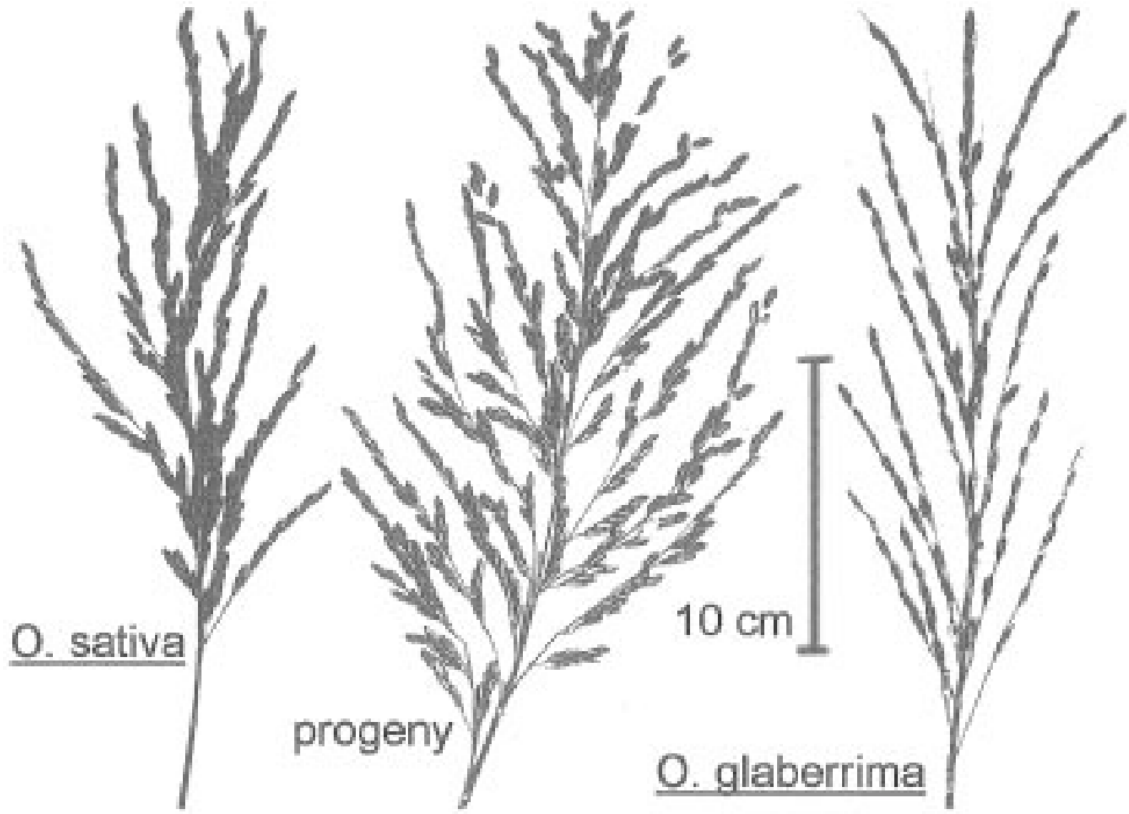
ekililebilir ya da (domestike edilmiş) türler olarak sayabilirken, buna karşılık *Oryza rufipogon*, *Oryza nivara*, *Oryza barthii*, *Oryza longistaminata*, *Oryza meridionalis* ve *Oryza glumaepatula* yabani türler başlığı altında inceleyebiliriz. *Oryza sativa*'nın hem yabani türleri hem de ekili türler diploid kromozoma sahiptirler ve AA genomunu taşırlar ($2n=24$) [2].

Ekilebilen pirinç *Oryza glaberrima* Steud. Batı Afrika ülkelerinde yoğun olarak yetiştirildiği gözlemlenmektedir. Basit dizi tekrarları (SSR) ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) verileri, Afrika pirinci *Oryza glaberrima*'un altında bulunan *Oryza barthii*'yi, izozim çalışmaları sayesinde, ekilebilir bir hale getirdi. Son zamanlarda, NERİKA (Afrika Yeni Pirinci), bir *Oryza sativa* ve *Oryza glaberrima* çaprazlamasından yeni bir çeşitlilik olan, Batı Afrika çiftçileri arasında yaygın kullanılan bir duruma geldi.

Ekili pirinç olarak *Oryza sativa*, yoğun olarak Asya'da yetiştirilmektedir. Günümüze gelinceye kadar, *Oryza sativa* çeşitleri arasında altı tür, grup veya alt popülasyon tanımlanmıştır: (1) *indica*, (2) *japonica*, (3) *aus*, (4) *aromatik*, (5) *rayada* ve (6) *ashina*. Günümüzde, yalnızca *indica* ve *japonica* alt türleri, kısıtlama parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP) çalışmaları ile doğrulandığı gibi ayırt edilmektedir. *Indica* ve *japonica* alt türleri arasındaki genetik farklılıkların yabani tür türlerinden ayrı domestike edilebilir ürünleri olduğu gösterilmiştir [2]

1.3 Pirinç Yetiştiriciliği

Oryza Rufipogon Griff. ve *Oryza nivara*, *Oryza sativa* kompleksi altında iki farklı yabani türdür. *Oryza rufipogon*, fotoperiyoda duyarlı, büyük ölçüde çapraz döllenmiş ve sürekli sulak alan ortamlarına adapte edilmiş çok yıllık bir türdür. Bununla birlikte, *Oryza nivara* yıllık bir türdür, fotoperiyoda duyarsızdır, çoğunlukla kendi kendine döllenir ve mevsimsel kuru yaşam alanlarına adapte olur. *Oryza nivara* tanınmadan önce, *Oryza rufipogon*, *Oryza*'nın yabani atası olarak tanımlandı. *Oryza sativa* ve yabani Asya A genomu taksonomik grubunu barındırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. *Oryza nivara* tanındıktan sonra, *Oryza rufipogon* ile karşılaştırıldığında *Oryza sativa*'nın en yakın ilişkili atağını temsil edebilir. Bunun nedeni, *Oryza nivara* ve *Oryza sativa*'nın yıllık bir tür olmalarına rağmen, *Oryza rufipogon*'un çok yıllık bir tür olmasıdır [3].



Şekil 1.1 Oryza Sativa ve Oryza Glaberrima

Oryza sativa ssp. indica ve Oryza sativa ssp. japonica iki ana tür Asya'da bulunmaktadır. Oryza sativa ssp. indica genellikle tropik Asya'nın ovalarında bulunur; oysa Oryza sativa ssp. japonica tipik olarak güney Çin, Güneydoğu Asya ve Endonezya'nın yayla tepelerinde ve ayrıca Asya'nın dışında bulunur. Pirinç domestike edilmeden 9000 yıl önce Doğu Hindistan, Çinhindi ve Oryza rufipogon'un bu bölgede yetişen güney Çin bölgelerinde başladığı ileri sürülmektedir. Şimdiye kadar, pirinç ekimini açıklamak için iki ana hipotez önerildi, bu da tek veya çok sayıda ekili pirinci kökenini ve yabani atalarından coğrafi olarak bağımsız ya da bağımlı olmayan pirinç ekimini ortaya koydu. Oryza sativanın ekilmesi konusundaki hipotezlerin desteklenmesini sağlayacak bir çalışmaların devamlılığına ihtiyaç vardır [2,3].

1.4 Pirinç Genomu Sıralama Projeleri

Pirinç, bir model monokotiledon bitki olarak seçilmiştir bunun sebebi 389 Mb'deki en küçük tahıl genomuna,engin germplazm toplanmasına, moleküler genetik kaynakların muazzam bir repertuarına ve verimli bir dönüşüm sistemine sahip olmasıdır. Kalite bakımından yüksek denilebilecek Oryza sativa alt türü Japonica Nipponbare ve Oryza sativa'nın diğer alt türü Indica Pekin Genomik Enstitüsü, Syngenta, Uluslararası Pirinç Genomu Sıralama Projesi (IRGSP) ve Monsanto'daki dört bağımsız araştırma ekibi tarafından 93-11 çeşit genom dizilerinin tamamlandığını

gösterir. Pirinç genomu diziliminin tamamlanmasından sonra, Michigan Eyalet Üniversitesi Rice Genom Annotation Project, Rice Information System, Rice Annotation Project Database (RAP-DB) ve Pirinç Genom Genomik Araştırma Enstitüsü'nün (TIGR) Ek Açıklama Projesi, pirinç biyolojisi araştırmalarını destekleyen başlıca pirinç genomu ek açıklama kaynaklarıdır [5].

Oryza sativa ssp. indica ve *japonica* tam pirinç genom dizilimi için seçilmiştir; bunlar büyük Asya ekili çeşitler ancak farklı dizi değişimlerinden fenotipik değişikliklere sapmaktadır. Bu iki alt tür arasındaki karşılaştırmalı genomik, aralarındaki polimorfizmi tespit eden ve menşei, domestike etmeyi, genetik haritayı, işaretleyiciyi ve niceliksel özellik lokusunun anlaşılmasına yardımcı olan Gramene çim veri tabanı üzerinden gerçekleştirilmiştir. *Oryza* cinsindeki karşılaştırmalı genomik analizin yanı sıra, *Oryza*'nın genom sekansları, önemli korunmuş fonksiyonel birimleri ve düzenleyici unsurları tanımlamak amacıyla, sorgum ve mısır dahil diğer yakın ilişkili çim türleriyle karşılaştırmak için kullanılabilir [7].

Genlerin fonksiyonlarının tanımlanması ve aralarındaki etkileşimlerin anlaşılması, iki büyük Asya kültüründe ekili türün tam genom dizilimini tamamladıktan sonra bir başka büyük zorluk haline gelmiştir. Büyük bir mutant kütüphanesinin oluşturulması ve tam uzunluktaki cDNA'ların izolasyonu, pirinci fonksiyonel genomunun incelenmesi için kullanılan yöntemlerdir [6]. Kimyasal ve fiziksel mutagenез ve bu yöntemlere ek olarak yerleştirme mutasyonu, gen fonksiyonunu incelemek için yapılabilecek büyük çaplı mutasyon analiz teknikleridir. Bu tekniklerin hepsi mutant kütüphanelerin oluşturulması için de kullanılmıştır [7].

Tos17 ve ekleme mutagenезi tekniklerini bozulma sistemi iki ana ekleme mutasyon yöntemi olarak sayabiliriz. Ekleme mutagenезi yönteminde, T-DNA, gen fonksiyonlarının bozulmasını sağlamak için kullanılmaktadır. Yaklaşık 13.804 adet T-DNA sınırlayıcı sekans belirleme dizisi blirlenmiştir. Bu 13.804 dizi bir T-DNA yerleştirme kütüphanelerinden izole edilmiştir. Bunlara ek olarak, T-DNA parçalarının her bir kromozomda rastgele dağılmadığı gözlenmiştir. Ayrıca T-DNA entegrasyon sıklığı, kromozom uzunluk boyutuyla doğru orantılı olarak sınırlandırılmıştır. Bunların yanı sıra, Tos17 bozulma sistemi, 50.000'den fazla Japonica bozulma gen parçalarının tanımlanmasının ardından daha verimli bir yöntem haline gelmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda ise, pirinç genlerinin fonksiyonel analizini arttırmak için pirinç T-DNA mutant kütüphanesinde Tos17 yerleştirme yöntemlerinin birlikte kullanılmaya başlanmıştır [3].

Kimyasal ve fiziksel mutagenез, gen fonksiyonunu incelemek için başka bir mutasyon analiz metoduydu. Genel olarak, metil nitrosoüre, etil metansülfonat (EMS), ve

diepoksibütan gibi kimyasal maddeler yüksek yoğunluklu mutasyonlara sebep olurlar. Bu yüksek yoğunluklu mutasyonlara sebep olarak hızlı nötronlar, gama ışını ve iyon ışını ışınımı gibi fiziksel yöntemlerde sayılabilir. Genomlarda hedefleme ile indüklenen lokal lezyonlar (TILLING) yönteminde, mutasyon geçirmiş popülasyonlarını nokta mutasyonlarla taramak için kullanılırken, büyük silmeleri tespit etmek için polimeraz zincir reaksiyonu gibi tabanlı tarama yöntemleri kullanılmıştır. Toplam 66.891 mutant hattı, M4'ün IR64 mutant kütüphaneleri yardımıyla kimyasal ve fiziksel mutagenез ile üretilmiştir [8]. Pirinçteki her geni etiketlemek için tahmin edilen sekans etiketlerini çevreleyen 180.698 ila 460.000 eklemeye ihtiyaç duyulmuştur. Bununla birlikte, farklı mutasyon analizleri kullanılarak sadece yaklaşık 200.000 eklem kenarı sekans etiketi bildirilmiştir. Bu nedenle, daha fazla eklem kenarlık dizisi etiketi üretmek için daha uygun maliyetli yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır [7].

Spesifik olarak, transkripsiyonel seviyede ve tam uzunlukta cDNA'lar, genlerin kontrol ettikleri fonksiyonlarını anlamak için önemli bilgiler sağlar [10]. Oryza sativada bulunan tam uzunlukta cDNA'ları bulunan 32.000'den fazlası Oryza sativanın alt türü olan japonica özelinde izole edilmiş ve literatürde tanımlanmıştır. Bunun yanında, 20.000'den fazla tam uzunlukta Oryza sativa'nın cDNA ve 40.000 5'lik EST iki farklı Oryza sativanın alt türü olan indica cDNA kütüphanesinden izole edilmiştir. Asya'da yetiştirilen iki çeşit çeşidinin yanı sıra, 1.888 tam boy cDNA yabancı pirinç Oryza rufipogon toplanmıştır. Oryza cinsinin tam uzunlukta cDNA'ları yalnızca pirinç çeşitleri arasında karşılaştırmalı analizler için önemli kaynaklar sağlamıştır. Ek olarak bu iki farklı tür monokotiledon ve dikotiledon türleri, Arabidopsis thaliana ve Oryza sativa arasında karşılaştırma için kullanılmıştır. Oryza sativa ve Arabidopsis thaliana'nın tam uzunlukta cDNA'ları arasındaki karşılaştırmalar, önemli rol oynayan transkripsiyon başlangıç alanlarının moleküler evrimini incelemek için kullanılmıştır [8].

1.5 Kantitatif Özellik Lokusu (QTLs)

Kantitatif özellik lokusu (QTL), verim, kalite ve bazı hastalıklara karşı direnç formları dahil, belirli bir niceliksel özellik ile ilişkili genleri içeren bir genom içindeki bir bölgedir. Kantitatif özellik lokuslarının tanımlanması gerektiğinde konvansiyonel bir fenotipik değerlendirme karmaşıktır. Bu nedenle, 1980'lerde QTL bölgelerini analiz etmek için Kısıtlama Parçası Uzunluğu Polimorfizmleri gibi moleküler markörlerin geliştirilmesi uygulanmıştır [9].

Tarımda DNA belirteçleri de diyebileceğimiz DNA markerları, bağlantı haritalarının oluşturulması önemli roller oynamaktadır. Basit özellikleri ve niceliksel özellikleri kontrol eden genlerin tanımlanmasında ve kromozomal bölgelerin incelenmesi

bağlantı haritalarının oldukça verimli olduğu söylenebilmektedir. Markör destekli seçimin (MAS) gelişimi, bitkilerin ıslah edilmesi ve çalışma alanlarının gelişmesi için moleküler bir araç olarak kullanılmıştır. Bunun sebebi MAS yoluyla, fenotipik seçime yardımcı olmak için her türdeki agronomik açıdan arzu edilen ve istenmeyen lokusları tanımlamak için ve istenen QTL'ler tanımlandıktan sonra, MAS izojenik hatlar geliştirmede kullanılması amaçlanmıştır [10]. Bu, QTL alellerinin her bir tür üzerindeki spesifik etkilerinin açık bir şekilde gözlemlenmesine olanak sağlamıştır. DNA marker teknolojisi, buğday, arpa, mısır, fasulye, kırmızı biber ve soya fasulyesinde mahsulün iyileştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [11].

1.6 Pirinçte Verim İle İlgili QTL

Genel olarak yabani türler daha küçük meyvelere sahiptir, daha az tohum üretir ve çeşitlere kıyasla daha fazla istenmeyen özelliklere sahiptir. Temel olarak yabani türler, türler arası melezleri elde etmek için birçok zorlukla karşı karşıya kalır ve bu nedenle, faydalı özelliklerin birçok ürüne girmesi için daha uzun zaman alabilir. Bununla birlikte, geleneksel verim geliştirme programlarında verimi arttırmak için günümüzde hala donör olarak yabani türler seçilmektedir. Bu seçimin yapılmasının temel sebebi, modern pirinç çeşitlerinde önemli bir sorun olan gen havuzu daralması sorununu gidermek amacıyla, yabani türlerin büyük miktarda genetik varyasyonlara sahip olmasıdır. Bunun yanı sıra, moleküler haritalama çalışmaları yabani türlerin verim arttırıcı QTL bölgelerinde verimi arttırmada genlere katkıda bulunabileceğini göstermiştir [11].

Pirinç verimini incelemek istediğimizde karmaşık bir özellik olduğunu açıkça görmekteyiz ve QTL tarafından yönetilen sürekli bir fenotipik varyasyonlar gösterdiği aşıkardır. Belirli bir toprak alanı başına verim, panicle başına verim, bitki başına verim, bitki başına taneler, bitki başına yeke, bitki başına salkım, bitki başına spikelet, salkım başına tanecikler, salkım başına spikelet ve benzeri gibi özelliklerin birlikte hesaplanmasıyla belirlenmektedir. Günümüzde üç yabani türü bulunan *Oryza*'da verim ile ilgili dokuz özellik tanımlanarak kabul görmüştür [12].

Oryza rufipogon, geleneksel verim geliştirme programlarında verimi arttırmak için sıkça donör olarak kullanılan yabani türlerden biridir. Agronomik olarak fenotipleri yetiştiriciliği tercih edilmemektedir. Fakat bununla birlikte modern pirinç kültürlerinde önemli bir sorun olan, gen havuzlarının daralması sorununa çözüm oluşturabilmesi amacıyla kullanılabilecek *Oryza* cinsi için büyük miktarda genetik varyasyona sahiptir. Günümüzde, *Oryza rufipogon*'da yirmi bir verim arttırıcı QTL ve yirmi dokuz verim QTL tanımlanması ve eşleştirilmesi tamamlanmıştır. Yabani

türlerin, ürün verimi için tek bir alel veya birden fazla alel ile kontrol edildiği öngörülmektedir. Bu nedenle, verim arttırıcı QTL yolu ile ilişkili RM5 lokusu etrafındaki yabani pirinç *Oryza rufipogon*'un 172 kb genomik DNA bölgesinde sekanslanmış ve *Oryza sativa ssp* sekansı ile karşılaştırılmıştır. Tahmini 14 genin 12 tanesi, *Oryza sativa* alt türü olan *Indica* ve *Oryza sativa* alt türü olan *japonica* sekansı ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Her ne kadar *Oryza rufipogon*'un öngörülen genlerinin fonksiyonu henüz belirlenmemiş olsa da, RM5 bölgesinin evrim seçiminde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır, çünkü *Oryza sativa ssp* ile karşılaştırıldığında kodlama, intronik ve intergenik bölgede yüksek oranda korunmaktadır. *japonica* ve *Oryza sativa ssp*. dizileri gösterir [13].

1.7 Gelişmiş QTL Çaprazlaması

İstenmeyen özelliklerin yabani türlerden elit arkaplanlara girmesi probleminin üstesinden gelmek için geri dönüş (AB) QTL stratejisi geliştirilmiştir. Bu strateji, elit yetiştirme materyallerine giriş yapmak için verim ile ilgili QTL'leri haritalamaktadır. Bu stratejinin, özellikle pirinçte, yabani türlerden elit tür çeşitlerine pozitif katkı sağlayan alellere pozitif katkı sağlayan aktarma örnekleriyle ilgili birçok başarılı örneği vardır [13].

1.8 Pirinçte Verim ile İlgili Genler QTL

Verim karmaşık bir özelliktir ve çok sayıda gen tarafından kontrol edilir. Pirinçte, verim bileşenlerini düzenlemekten sorumlu çok sayıda QTL tanımlanmıştır. Fakat buna rağmen, pirinçte verim ile ilgili genlerin sadece birkaçın işlevi günümüzde kadar bilinmektedir. Sekiz lörin bakımından zengin tekrar reseptör benzeri kinaz (LRK) geni, tane verimini %16 arttırdığı tespit edilen Dongxiang yabani pirinci (*Oryza rufipogon* Griff.) QTL qGY2-1'den tanımlanmıştır. LRK1 geni, hücrel proliferasyonu artırarak pirinç dal sayısını düzenleyen sekiz LRK geninden biridir. Bu gen, donör ebeveynde (Dongxiang yabani pirinç) bulunur, ancak tekrarlayan ebeveyn genomunda bulunmamaktadır. *Oryza sativa* alt türlerinden *Indica*'nın altında bulunan LRK1'in aşırı ekspresyonu ile 9311 çeşidinin bitki başına toplam tahıl veriminde %27,09 artışla sonuçlandığını göstermektedir.

Tahıl sayısı 1a (Gn1a) geni klonlanmış ve bir pirinci çeşidi olan Habataki ve bir Japonica çeşidi olan Koshihikari'den tahıl verimine doğrudan katkıda bulunan verim ile ilişkili QTL'den elde edilmiştir. Gn1a geni, fitohormon sitokininini parçalayan ve bununla birlikte hücre bölünmesini destekleyen bir enzim olan sitokinin oksidaz veya dehidrojenaz 2'yi (OsCKX2) kodlaması ile üretilmektedir. Pirinçte tane verimini

artması, OsCKX2'nin azaltılmış ekspresyonu ile doğrudan bağlantılıdır. Bunun sebebi, çiçeklenme döneminde biriken daha fazla sitokinin meristemlerinin sayısının arttırılmasına yardımcı olmasıdır [14].

Tane ağırlığı 2 (GW2) geni klonlanmış ve pirinç tanecik genişliğini ve ağırlığını kontrol eden bir indica pirinç çeşidi, Fengaizhan-1 ve bir japonika çeşidi olan WY3'ten verim ile ilişkili bir QTL'den karakterize edilmiştir. Gen, E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip bir RING tipi proteini kodlar. Bu protein, ubiquitin-proteozom yolunda önemli bir rol oynar ve pirinçte hücre bölünmesinin negatif bir düzenleyicisidir. Tane ağırlığı 2 (GW2) geninin fonksiyonunun kaybı, daha büyük tane verimi ve ağırlığına sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, spikelet gövdesinin daha da genişlemiş olması ve tahıl sütü doldurma hızının artmasıdır. Gelecekteki tahıl mahsulü ıslah programlarındaki tarımsal özelliklerin geliştirilmesi için, tahıl mahsulü veriminde yer alan bu verim ile ilgili genlerin mekanizmalarını anlamak ve bu alandaki araştırmalara devam etmenin gerekliliği oldukça açıktır [15].

1.9 Tezin Amacı

Tezin genel amaç, ticari amaçlar için bir herbisit direnci alelini geleneksel İtalyan pirinç çeşitlerine sokmaktır.

Bununla birlikte:

- F1 ve backcross nesiller elde edilmesi (BC1),
- Embriyo kurtarma tekniğini uygulayarak nesiller arasındaki süreyi kısaltılması,
- Herbisit in vitro seçim olsa da herbisit toleransının doğrulanması,
- İn vitro seçilen bitkilerde ACC2 mutant aleli heterozigotda doğrulanması,
- LIH ve RP01 arasındaki uyumsuzluğunun üstesinden gelmesi

amaçlanmıştır.

1.10 Hipotez

Pirinç çağlar boyunca insanoğlu tarafından ekimi yapılarak yetiştirilmiş ve en önemli besin kaynağı olmuştur. Son yıllarda, tarım alanlarının daralması ve ekime uygun şartların oluşmaması, bilim insanlarını verimi yüksek tarım ürünleri geliştirmesine

yol açmıştır. Ancak verimi yüksek tarım ürünleri sayesinde az işçik ve kısıtlı alan problemlerinin önüne geçilebilecektir.

Pirinç, halen insanoğlunun en çok tüketmiş olduğu ikinci tahıl grubudur. Özellikle Asya'da temel gıda maddesi olarak kabul görmektedir. Araştırma, tüketim, en çok yapılan ve Oryza Sativa'nın iki ayrı türü olan Indica ve Japonica türlerinin çaprazlanarak, herbisit direncini sağlayan gen dizisini gelecek türlere aktarmaktadır. Bu şekilde, Indica türünde var olan herbisit direnci Japonica'ya da aktarılmış olacaktır. Fakat, bu çalışmalar sırasında, Japonica ve Indica arasında farklı bir gen uyumsuzluğu tespit edilmiştir. Çalışma, bu gen uyumsuzluğunun giderilmesi üzerine yapılmıştır ve kısmen pozitif sonuç alınmaktadır.



2 Genel Bilgiler

Pirinç, küresel gıda sisteminde üstün bir öneme sahiptir. Dünya nüfusunun üçte birinden fazlasının, özellikle de Asya'da, birincil gıda kaynağı pirinçtir. Nüfus yoğunluğunun yüksek olduğu bu coğrafyada yaşayan insanlar, gelirlerinin üçte biri veya daha fazlasını pirinç harcamakta, milyonlarca kişi kendi pirincini yetiştirmekte ve pirinç yoluyla gelir elde etmektedir [2].

Üretim miktarı bakımından pirinç miktarını sadece buğday aşmaktadır. Buğday ve pirinç, dünya üzerindeki ekilebilir alanın %25'ini kaplamaktadır. Buna rağmen, bu iki tahılın üretim koşulları birbirlerinden oldukça farklıdır [2].

Buğday, ılıman bölgelerde geniş bir coğrafi alanda, genellikle de büyük ölçekli çiftliklerde yetiştirilmektedir. Ürünün yüzde 24'üne yakını dört büyük ihracatçı ülke ABD, Kanada, Avustralya ve Arjantin tarafından uluslararası ticari ürün olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık, dünya üzerinde üretimi yapılan pirinç toplamının yüzde 90'ı Asya'da üretilmekte ve tüketilmektedir. Sadece Hindistan ve Çin dünya üretiminin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Asya'daki pirinç ekim alanlarının çoğu, batı standartlarına göre küçüktür (3 hektar veya daha az) ve üretim sırasında, mekanizasyon yerine yoğun işgücü kullanılır. Pirincin sadece yarısı ticari ürün olarak işlem görmektedir ve mahsulün yüzde 5'inden azı uluslararası olarak işlem görmektedir [7].

Asya pirinci yetiştirme bölgesi doğuda Japonya, batıda Pakistan ile sınırlıdır. Kuzeyde Çin'deki 50 derece kuzey enleminden, 10 derece güney enleminde uzanan Endonezya bölgelerine uzanır. Pratik olarak bu bölgedeki tüm bölge yağışlar maksimum yaz aylarında ve minimum kış aylarında olacak şekilde karakterize edilir; rüzgar yönü, yaz aylarında okyanustan Asya yaylalarına doğru eserken (yaz musonu) ve kış aylarında bu durumu tersine çevirir. Tropiklerde yağış, iklimsel baskın değişkendir ve sulama suyu mevcut olmadığı sürece pirinç mahsulü normal olarak yağmur mevsimi ile sınırlıdır. Ilıman bölgede, sıcaklık etkisi yüksektir ve bu sebeple pirinç bir yaz aylarında üretimi yapılan bir üründür.

Bölge üç jeopolitik alt bölgeden oluşmaktadır: Doğu Asya, Güneydoğu Asya ve Güney Asya olarak başlıklandırılabilir. (1) Doğu Asya, çoğunlukla Yengeç Dönencesi'nin kuzeyindeki ılıman bölgede yer almaktadır. Çin, Japonya ve Kore'nin bulunduğu üç büyük pirinç üreticisi ülkeyi kapsamaktadır. Çin'in bazı bölgeleri (Tayvan dahil) Yengeç Dönencesi'nin altına düşmekte (yaklaşık %50'si) ve bu bölgede bulunmaktadır. (2) Güneydoğu Asya'da sekiz büyük pirinç yetiştirme ülkesi bulunmaktadır: Burma, Endonezya, Laos, Kampuchea, Malezya, Filipinler, Tayland ve Vietnam. (3) Güney Asya'da beş büyük pirinç yetiştirme ülkesi var; Bangladeş, Sri Lanka, Hindistan, Nepal ve Pakistan.

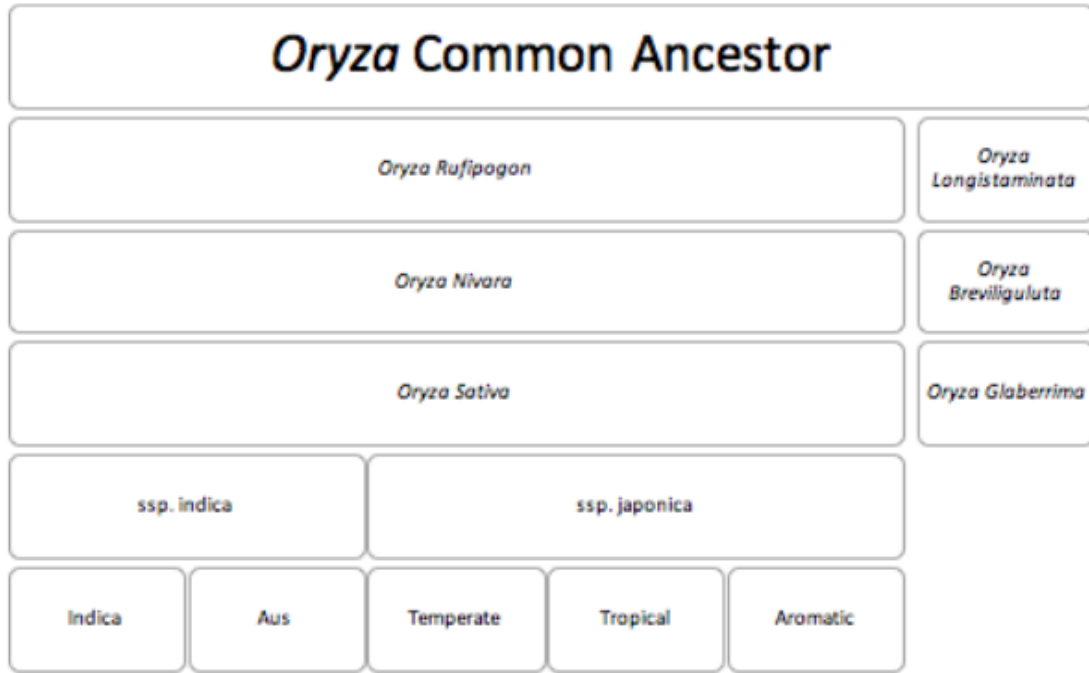
Pirinç (*Oryza sativa* L.), farklı çevresel koşullara uyum gösterebilmesi nedeniyle dünya çapında önemli bir temel besin maddesidir. Büyük ekonomik ve sosyal önemi nedeniyle, farklı biyotik ve abiyotik streslere tolerans, daha yüksek verim ve daha iyi organoleptik ve besin değeri gibi, gelişmiş tarımsal özelliklere sahip yeni çeşitler için sürekli bir gereksinim vardır [12]. Yabani otlar, ekinlerde büyük bir biyotik stresdir ve verimi arttırmak ve üretim maliyetlerini azaltmak için herbisite dayanıklı ürünler geliştirilmiştir. Cycloxydim, filizlenme sonrası yabancı ot kontrolünde kullanılan otlara özgü bir ACCase herbisit inhibitörüdür. Calli mutagenesi yoluyla daha önce OsACCase2 geninde bir nokta mutasyonu sunan bir mutant Cycloxydim'e dayanıklı pirinç hattı elde edilmiştir. [12].

Bu çalışmanın amacı, ticari amaçlar için tropikal bir japonika OsACCase2 mutantından geleneksel iki ılıman japonika pirinç çeşidine bir herbisit direnci alelini sokmaktır [13].

Embriyo kurtarma tekniği yardımı, tohum olgunlaştırma adımını atlayarak geri çaprazlamayı arttırdı. Embriyodan kurtarılan bitkiciklerin herbisit seçimi, dirençsiz yavruların atılmasını kolaylaştırdı. Tekrarlayan ebeveynlerden biri ile donör çeşitliliği arasında güçlü bir cinsel uyumsuzluk tespit edildi ve üstesinden gelindi. S5 japonica x'in saptanması için multipleks PCR yapılmıştır, sonuçlar henüz bitmediyse erken embriyo kesesi kurtarma işlemini tetikleyen cinsel uyumsuzluk allellerini gösterir [9].

Pirinç 7.000 yıldan uzun bir süredir insanlar tarafından ekilmekte ve tüketilmekte olup, şu anda dünya nüfusunun %50'sinden fazlası tarafından tüketilen en önemli mahsullerden biri haline gelmiştir. Ekilebilir pirinç iki türden oluşan monokotiledon bir bitkidir - *Oryza sativa* ve *Oryza glaberrima*. Bu iki diploid ($2n = 24$) tür, farklı çevresel koşullar altında ekilmeye başlandı. *Oryza sativa* Güney ve Güneydoğu Asya'da ekilerek ve dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilirken, *Oryza glaberrima* ekilmeye başlandı ve yalnızca Batı Afrika'da artık yetiştirildi. *Oryza sativa* çeşitleri *Oryza sativa* ssp olarak bilinen iki ana alt kategoride sınıflandırılır. Indica (uzun taneli olması ile ayırt edilir) ve *Oryza sativa* ssp. japonica (çoğunlukla kısa taneli).

Her bir alt türden çeşitler farklı gruplarda sınıflandırılabilir. Bir yandan, alt türlerin indica (Güney Doğu Asya'dan) ve aus (Bangladeş'ten) gruplarına ayrılabilceğini belirtir. Öte yandan, japonica ılıman (Çin, Kore, Japonya ve Avrupa'dan), tropikal (Malezya, Endonezya ve Filipinler'den) ve aromatik (Pakistan, Hindistan ve diğer bazı ülkelerden) gruplara ayrılabilir [9].



Şekil 2.1 Pirinç Türleri

2.1 Pirinç Ekimi ve Gıda Güvenliği

Pirinç, dünyanın toplam ekilebilir arazisinin %11'ini kaplayan ve toplam insanlık kalorisi arzının %21'ini temsil eden 2.808 kalori / kişi / gün sağlayan dünyanın en önemli gıda ürünüdür. Ayrıca, dünya genelinde 100 milyondan fazla ev sahibinin gelir kaynağıdır (Ticari Bölüm Madrid 2018). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre, dünya çeltik pirinci 2018'de 769.9 milyon ton idi [10].

Tablo 2.1 Tahmini Yıllık Pirinç Üretimi (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü 2018).

2013-2015 Ort.	2016	2017	2018
743,2*	755,1*	756,6*	769,9*
*Milyon Ton			

Öte yandan, pirinç pazarının Tahmini Yıllık Büyüme Hızı (CAGR) 'nın tahmini dönemde %0,88 (2019-2024) [6] kaydetmesi beklenmektedir.

Yine de, “Yeşil Devrim” olarak adlandırıldığından beri, 1950 ve 1960’ların sonlarında gerçekleşen bir dizi araştırma teknolojisi transfer girişimi, özellikle gelişmekte olan dünyada, 1960’ların sonlarında en belirgin şekilde başlayan tarımsal üretimi arttırdı. Sonuç olarak, buğday ve pirinç üretimi, yeni buğday ve pirinç çeşitlerine ekilen alanın bir fonksiyonu ve arazi birimi başına verim artışı olarak çarpıcı bir şekilde artmıştır. Artan verim, pirinç ve buğdayı çiftçiler için diğer ürünlerden daha karlı hale getirmiştir. Böylece, geleneksel buğday ve pirinç tarlasındaki artışa ek olarak, bu iki ürünün ekimine daha fazla toprak getirildi. Yeşil Devrim, birçok ülkede sulamanın ve çoklu mahsulün önemli ölçüde genişlemesini sağlayarak, bu mahsullerin toplam alanını da arttırdı. Daha kısa büyüme süreleri ve azaltılmış fotoperiyodiklik, çoklu kırpmının artmasını sağlayan yeni çeşitlerin önemli özellikleridir.

Yeşil Devrimden Sonra, Gıda Güvenliği “Gıda güvenliği, tüm insanların, her zaman, diyet ihtiyaçlarını ve aktif beslenme için gıda tercihlerini karşılayan yeterli, güvenli ve besleyici gıdaya fiziksel, sosyal ve ekonomik erişime sahip olmaları durumunda ortaya çıkan bir durumdur. ve sağlıklı yaşam ”[17], tüm dünyada açlığı azaltarak, dünya nüfusunun artmasına rağmen, toprak ve su kaynakları azalmaya başlamasına rağmen, önemli ölçüde iyileştirildi. Araştırmalar sıcaklık artışı, deniz yükselmesi ve Yağış düzenlerindeki değişiklikler ve küresel iklim değişiklikleri altındaki dağılımı, dünyanın farklı bölgelerinde yetişen pirinç bitkilerinin üretkenliğinin yanı sıra, pirinç üretiminde toprak ve su kaynaklarında önemli değişikliklere yol açabilir. Ova çeltik üretiminden metan ve azot oksit gazlarının salınımı ve kesik-ve-yanıcı kayma yetiştiriciliği altındaki yayla pirinç üretiminde ormansızlaşma da küresel iklim değişikliğine katkıda bulunmaktadır [17].

Gıda güvenliğine yönelik pirinç üretiminin sürdürülebilir bir şekilde artması, pirinç üretim sistemlerinin küresel iklim değişikliğine uyum sağlama kapasitesinin artırılması ve pirinç üretiminin küresel ısınma üzerindeki etkilerini hafifletme çabalarını gerektirecektir. Adaptasyon ve azaltma için teknik seçenekler mevcuttur ve daha da geliştirilebilir. Bununla birlikte, uygun ve verimli teknolojilerin geliştirilmesi ve aktarılması için pirinç araştırma ve geliştirmeye yönelik politika desteği, ancak sürdürülebilir pirinç üretimi için bu tür önlemlerin gerçekleştirilmesinde kilit rol oynayacaktır [16].

Pirinç arz ve talep dengesini analiz etmek için, arzın azalması durumunda fiyatın artacağı ekonominin temel kuralını göz önüne alarak dünya pirinç piyasası fiyatlarını kullanabiliriz. ABD Tarım Bakanlığı’na göre son 30 yılda pirinç pazarı fiyatları; Dünya Bankası istatistikleri, pirinç talebinin pirinç üretim artışının ötesinde arttığı açıktır [10].



Şekil 2.2 1 Ton Piricin Son 30 Yıl İçerisindeki Emtia Fiyat Grafiği

2.2 Herbisit, Herbisit Direnci ve Pirinç

Herbisit direnci, tek bir bitkinin aynı türden normal bir popülasyonu öldürecek olan bir herbisit uygulamasında hayatta kalma genetik yeteneğidir. Herbisit direnci her bitki için aynı değildir. Beklentilerin aksine, dirençli yabancı otlar herbisit uygulamasından beklenen orandan çok daha yüksek oranlarda hayatta kalabilir. Burada, herbisit direnci ve herbisit toleransı olarak iki farklı kavram ortaya çıkmıştır. Herbisit direnci, tek bir bitkinin aynı türden normal bir popülasyonu öldürecek olan bir herbisit uygulamasında hayatta kalma genetik yeteneğidir. Bununla birlikte, herbisit toleransı, normal bir kullanım hızında herbisit muamelesinden sonra hayatta kalmak ve üremek için bir türün genetik avantajıdır [12].

Ekin zararını azaltmak için, yabancı ot kontrol spektrumunu genişletmek, herbisit seçiciliğini arttırmak amacıyla herbisite dayanıklı ürünler (HRC'ler) geliştirilmiştir ve hala geliştirilmeye devam edilmektedir. HRC'ler genetik mühendisliği yoluyla GMO teknolojisi kullanılarak geliştirilen transgenik veya mutasyon ıslahı veya geleneksel ıslah teknikleri kullanılarak geliştirilen transgenik olmayan olarak sınıflandırılabilir [15].

En fazla pirinç ekiminin, deltaik tuzlu bölgelerde su koşullarında gerçekleştirildiği ve ürün rotasyonlarını da içermeme şansının olmadığı göz önüne alındığında, bu su koşullarında sorunlu olabilecek yabancı otların biyolojik çeşitlilik aralığının azaltılması zorunludur. Herbisite dayanıklı pirinç çeşitleri, pirinç tarlalarında tekrarlayan zararlı

yabani otları önlemek için mükemmel bir araçtır. Buna rağmen, *Echinochloa*, *Leptochloa*, *Cyperus* veya *Scirpus* gibi bu şartlara iyi adapte edilmiş bitki cinsleri hala pirinç tarlalarında bulunmaktadır. Diğer bir önemli sorun, yabani pirinç veya yabani pirinç olarak bilinen yabani pirinçten kaynaklanan zararlı yabani otlardan kaynaklanmaktadır. Kırmızı pirinç, pilavın ekildiği tüm dünya bölgelerinde pirinç tarlalarında bulunur ve herbisitleri doğru kullanmakla bile baskın olabilir [11]. Çoğunlukla kendi kendine tozlaşmasına rağmen, kırmızı pirinç, temel olarak başlıca pirinç bitkileriyle yüksek hibridizasyon eğilimi nedeniyle, herbisitlere karşı direnç gibi elit çeşitlerde mevcut olan sorunlu özellikleri devralabilecek verimli hibritler üreten çiftçiler için bir yönetim sorunu olmuştur [14].

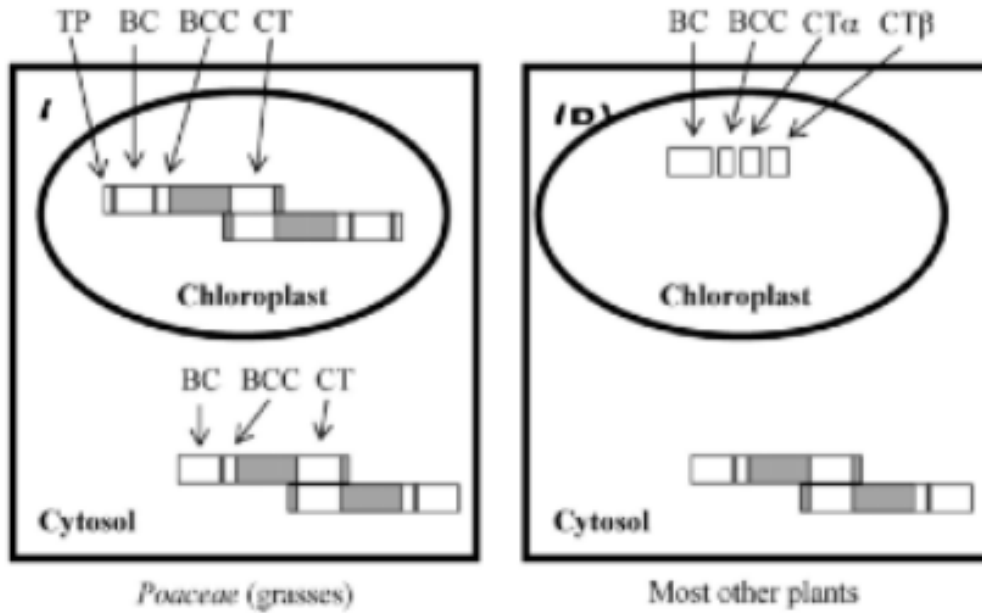
Günümüzde Clearfield pirinci, yeni imidazolinon herbisite dayanıklı çeşitlerin oluşturulmasıyla pirinçte IMI herbisitleri kullanarak bu yabancı otları seçici bir şekilde kontrol etme imkanı sunmaktadır. Amino asit biyosentezi ile ilgili olan asetoilaktat sentaz (ALS) enziminde bulunan spesifik bir mutasyon, IMI herbisitlerine direnç gösterir ve Clearfield pirinci olarak bilinen herbisitlere dayanıklı pirinç çeşitlerinin oluşumuna yol açar [14]. Bununla birlikte, IMI herbisitlerinin haşere kontrolünde birincil yöntem olarak mahsullere kalıcı olarak uygulanması, dirençli yabancı otların olası görünümünü artırabilir. Bu nedenle, imazetapir, imazamoks veya imazapik gibi IMI herbisitleri, geniş bir yabancı ot otu ve geniş yapraklı yabancı ot spektrumunu kontrol etmek için kullanılır [15]. Ne yazık ki, Clearfield teknolojisi IMI herbisitlerine karşı bu yabancı ot direnci nedeniyle önümüzdeki yıllarda kötü bir potansiyel var [15].

Herbisitleri üretmek için başka farklı hedef enzimler kullanılmıştır: Asetoilaktat sentaz (ALS, AHAS), Glutamin sentetaz (GS), fotosentez üretimini engellemek için fotosistem I ve II ve Asetil-CoA karboksilazı (ACCase) [8].

ACCase, bitkilerin gelişmesinde kilit bir enzimdir. ACCase, yağ asidi sentezinin ilk katalitik reaksiyonunda rol oynar. Bitkilerde, yağ asitlerinin biyosentezine iki enzim ACCase ve yağ asidi sentezi (FAS) aracılık eder. İlk enzim, malonil-CoA üretmek için asetil-CoA'nın karboksilasyonunu katalize eder, bu reaksiyon ürünü, çok uzun zincirli yağ asitleri üretmek için işleme müdahale eder. Bu reaksiyon hem plastidlerde hem de sitozolde meydana gelebilir ve iki enzim formu vardır, bunlar genellikle prokaryotlarda bulunan dört alt birimden oluşan heteromerik ACCase ve ökaryotlarda bulunan tek bir büyük polipeptitten oluşan homomerik ACCase bulunur [20]. Çoğu bitki, hem sitosol hem de plastidlerde homomerik forma sahip olan buğday ve pirinç (OsACC2 olarak bilinir) dahil olmak üzere, çim ailesi hariç, plastidlerde heteromerik formda ve sitosolde homomerik formda her iki formda bulunur [18].

Her iki ACCase izoformu 3 katalitik alt üniteyi paylaşır; biyotin karboksil taşıyıcı

(BCC), biyotin karboksilaz (BC) ve karboksil transferaz (CT) alanları. Homomerik izoform, kloroplastlarda, sitozole translokasyonda kısıtlanan ilave bir transit peptid (TP) sunar. Çoğu bitkide, heteromerik izoform, ikinci bir CT alt ünitesinin varlığında ve 4 farklı peptid alt ünitesinin mevcut olması durumunda homomerik formdan farklıdır. Her katalitik alan için, homomerik izoformda, katalitik alanlar aynı polipeptitte bulunur [12].



Şekil 2.3 ACCase İzoformları (A) Diğer Bitkiler (B), ACC İzoformları (C).

Yabani otlarda (A) ve diğer birçok bitkide (B) bulunan Asetil-CoA karboksilaz (ACCase) izoformlarının detayı, hücresel bölmelerdeki her iki ACC izoformu katalitik alanlarını gösterir. C. Délye'ten uyarlanan veriler gösterilmektedir [20].

ACCase, yabani ot seçici herbisitlerin gelişimi için önemli bir hedef enzim haline gelmiştir. ACCase'yi hedef alan herbisitler, geniş bir yabani ot kontrolü spektrumunun, esnek uygulama süresinin ve diğer herbisitler ile iyi uyumluluğun avantajlarına sahiptir. ACCase İnhibitörleri, ariloksifenoksipropiyonat (FOP), sikloheksandion (CHD) ve fenilpirazolin (DEN) kimyasal familyalarına sınıflandırılır. Ticari ACCase inhibitörlerinin çoğu, Cethodim, Sethoxydim veya Cycloxydim gibi herbisitleri içeren CHD familyasındandır. Cycloxydim, öncelikle geniş yapraklı bitkilerde ortaya çıkma sonrası yabani ot kontrolü için kullanılır. Bu herbisit, yeşil bölgelerde emilim gösterir ve floemde ACCase aktivitesini inhibe eden bir büyüme noktasına aktarılır [23].

2.3 Pirinç Yetiştiriciliği

Pirinç, yüksek sıcaklığa ve yüksek neme sahip ortamlarda yetişen yıllık, ılık, kısa günlük bir üründür. Geleneksel olarak, kendiliğinden tozlaşmadan kaynaklanan tohumları kullanılarak bir pirinç çeşidi çoğaltılabilir. Bu, çiftçilerin mevsimden mevsime kadar çeşitli kendi tohumlarını yetiştirmelerini sağlar. Geleneksel pirinç yetiştirme prosedürleri, istenen tarımsal özellikleri birleştirmek ve stabilize etmek için iki ebeveyn çeşidi arasında birkaç geçiş ve geri çaprazlama neslini içerir. İlk geçişten son durağan bitki hatlarına ulaşana kadar tescil edilip ticarileştirilmek için yedi ila sekiz kuşak gereklidir ve uzak hibridizasyon için daha fazla kuşak gereklidir. Bu uzun üreme dönemi, araştırma çeşitliliğini ve yeni çeşitlerin geliştirilmesini büyük ölçüde azaltır [25].

2.4 Backcross Yetiştiriciliği

İlk olarak 1922’de Harlan ve Papa tarafından önerilen geri çaprazlama programları, bir donör çeşidinden elit çeşitlere özelliklerin girilmesine izin verir. Çoğu durumda, ters çaprazlama için kullanılan elit çeşitliliği çok sayıda arzu edilen özneliklere sahiptir, ancak sadece birkaç özelliğe eksiktir. Donör ebeveyn (DP) genellikle elit çeşitliliği üzerinde olmayan bir veya birkaç gen özelliğine sahiptir. Geriye dönük programların temel amacı mümkün olduğunca elit çeşit genom elde etmek, ancak neredeyse sadece DP’nin istenen özelliklere girmesini sağlamaktır. Böylece, DP ve tekrarlayan ebeveyn (RP) arasındaki bir zorunlu hibridizasyon, sırayla tekrar RP ile çapraz çapraz bir F1 hibrid üretir. Daha sonra, donör özelliği varlığının taranması, bir sonraki geri dönüş için bu geri çapraz üretim tesislerini (BC1F1) seçer. İstatistiksel olarak, %96’dan fazla rekürren ebeveyn genomu elde etmek için dört geri çaprazlama gerekir, buna rağmen, girilen özellik seçiminde tekrarlayan ana genom geri kazanımına karşı etki etme eğiliminde olduğundan, 6 geri çaprazlama genellikle yeterince yüksek tekrarlayan ana genom geri kazanımı ve homojenliği elde etmek için gerekli olur [26].

2.5 Ekilebilir Pirinç Evrimi Sırasında Genetik İntrogression

Ekilebilir Asya pirinci (*Oryza sativa* L.), dünyadaki en eski ve en önemli temel mahsullerden biridir. Ekilebilir pirinç progenitörleri olan *Oryza rufipogon* Griff’den gelen *Oryza sativa*’nın, ekilebilirleştirme süreci, tür sayısı ve modern mahsulü ortaya çıkaran evrimsel süreçlerin niteliği halen tartışılmaktadır. Ekoloji, genetik özelliklerine ve mutfak kültürüne dayanarak, *Oryza sativa* beş gruba ayrılabilir: japonica ((1)tropik ve (2) ılıman japonicaya ayrılmış), (3) indica, (4) aus ve (5) aromatik pirinç. Japonicanın alt türlerinde, tipik olarak pişirildikten sonra yapışkan pirinç veren ılıman

ve tropik gruplar, farklı iklim koşullarına uyum sağlamıştır. Indica ve aus pirinci uzun tanelidir, ikincisi kuraklığa dayanıklı, erken olgunlaşan çeşitlerden oluşur. Aromatik pirinç, Pakistan ve kuzey Hindistan (basmati) ve İran'da (sadri) popüler olan belirli özellikleri olan çeşitler içerir [20].

İndica ve japonica kültür bitkileri arasında çeşitli üreme bariyerleri tanımlanmıştır, ancak hibritlerin verimliliği bir çaprazlamadan diğerine farklılık gösterir. Düşük hibrid verimliliği ayrıca aus ve aromatik pirinci ile indica veya japonica çaprazlamalarında da rapor edilmiştir. Ekilebilir ve yabani pirinç grupları arasındaki verimlilik ayrımı, *Oryza sativa*'dan *Oryza rufipogon*'ya olacak şekilde dökümante edilen interopülasyon gen akışına izin verir [25].

Geleneksel olarak, ekilebilir pirinç çalışmaları, modern zamanlarda yetiştirilen en büyük iki grup olan indica ve japonica'nın ortak veya bağımsız kökenlere sahip olup olmadığını sormuştur. İndica ve japonica genomlarının evrimsel farklılığının, domestikeleşmeleri, tek bir domestikeden kaynaklanan iki türe karşı çıkan 200.000–400.000 yıl ile önceden tarihlendirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, indica, japonica ve aus popülasyonlarını farklılaştıran genetik yapı, mikrosatellitler, gen haplotipleri ve genom çapında tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) analizi ile tespit edilmiştir. Bununla birlikte, ekili grupların bağımsız kökenlere sahip olduğu iddiası, *Oryza sativa*'da allelik uniformlarının önemli olduğunu ortaya çıkaran pirinç domestike edilebilme özelliklerini kontrol eden genlerin birçoğunun analizi ile çelişmektedir. Bu tür gözlemler, pirinç gruplarının kökeni hakkında yeni hipotezleri ortaya çıkarmış, bazı önemli domestike genlerinin, *Oryza sativa*'da sadece bir kez ortaya çıktığını ve daha sonra introgressif hibridizasyon yoluyla diğer önceden evcilleştirilmiş popülasyonlara aktarıldığını öne sürülmüştür. Nükleotid varyasyon paternlerinin modellenmesi benzer şekilde, ya pirinç akışı için gen akışı ya da güçlü yapay seçilimin önemli demografik akış olduğu sonucuna yol açmıştır [20].

Ayrı japonica ve indica kökenlerini ve ardından gruplar arası gen akışını destekleyen domestike modelleri ayrıca, genom ve japonica genomlarının ana fraksiyonlarının belirgin yabani bölgelere benzer olmasına rağmen, iki genom çapında yapılan çalışmalarla desteklenmiştir ve genotipler, düşük bir çeşitlilik ve düşük genomik fraksiyon grupları birlikte indica ve japonica türlerinde gözlemlenmiştir. Domestikasyon süreci tarafından açıkça hedeflenen pirinç genlerinin daha sonraki analizleri, alel tekdüzeliğini, gen akışı hipotezi için bir başka kanıt olarak yorumlanmıştır. Yakın zamanda, aynı domestike edilme modeli (çoklu kökenler artı gen akışı), birkaç *Oryza* bireyinden genom genelinde verilerin birleştirici modellenmesi ile aus'a genişletilmiştir. Bununla birlikte, önceki çalışmaların hiçbirisi, gen akışına dahil olduğu varsayılan genomik segmentlerin, *oryza sativa* atalarının

yabani popülasyonlarından dikey olarak düşemediğini göstermemiştir. Bunun nedeni, incelenen yabani örneklerin progenitörlerin ayakta değişimini hesaba katmak için çok küçük olmasından kaynaklanmaktadır veya indica ve aus'un atalarının yabani gen havuzları literatürce kabul edilebilir bir şekilde tanımlanmamıştır [22].

Önceki bir çalışmada, üç grubun her birinde seçilmekte olan genomik bölgelerin incelenmesine dayanarak, indica, japonica ve aus pirincinin bağımsız domestike edildikleri kanıtlanmıştır. Bu eş merkezli düşük çeşitlilik bölgelerinin (CLDGR'ler) büyük çoğunluğunda farklı dizi türlerinin seçildiğini bulunmuştur. Indica, japonica ve aus gruplarının ortak bir domestike geçmişine sahip olmaları durumunda beklenebilecek olanın tam tersidir, çünkü ikincisi monofetik görünmekte olan çoğu CLDGR ile sonuçlanmalıdır. Ayrıca introgressif hibridizasyon yoluyla oryza sativa gruplarına yayıldığı düşünülen bazı önemli evcilleştirme alellerinin, oryza rufipogon'da yaygın olarak yaygın olduğu ve bu alellerin olmadığı gösterilmiştir. Bu tür gözlemler, aynı ekilebilirliği sağlayan allellerinin, bağımsız domestike olaylarındaki durmadan yapılan değişikliklerden defalarca seçilebilme ihtimalini arttırır. Böyle bir durumda, gruplar arası gen akışının, farklı pirinç türlerinde aynı domestike alellerinin varlığı için bir açıklama gerekmez [23].

Dolayısıyla, indica, japonica ve aus'un evrimsel tarihi boyunca gen akışının kapsamını ve yönünü anlamak, ekili pirinci kökeni ve domestike tarihini anlamının anahtarlarından biridir. Gen akışının doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için geniş çapta yabani çeşitlilik örneklemeli bir popülasyon yaklaşımının gerekli olduğuna ve böyle bir analizin pirinç için eksik olduğu görüşü vardır. Progenitör gen havuzları hakkında önceden bilgi sahibi olmak da gereklidir, çünkü ekili gruplar arasında herhangi bir genomik bölgenin paylaşılması, yalnızca o genomik bölgenin en az bir progenitör popülasyonundan yokluğunda gen akışı anlamına gelir. Bu nokta, domestikenin yakınsak etkilere sahip olduğu bilinen (örneğin, bütün tahıl bitkilerinin tohum uyum eksikliği ve çekirdeğin ağırlığının artmasıyla karakterize edilir) ve ekim için faydalı ve aynı çeşitlilikte olan varyantların araştırılmasında özellikle önemlidir [24]. Yabani türlerde birden fazla kez seçilmesi muhtemeldir. Bu nedenle gen akışının daha önce yayınlanmış genom çapında ve popülasyon ölçekli polimorfizm verilerinin analiziyle rolünü değerlendirilmiştir. Paylaşılmamış atalara ait varyantların analizi ile indica, japonica ve aus'un progenitör gen havuzlarını tespit eder ve sonuçları filocoğrafik bir yaklaşım kullanarak doğrulanmıştır. Daha sonra, ekili gruplar arasında paylaşılan, ancak en az bir progenitör popülasyonundan yoksun olan varyasyonu özetlenmektedir ve sonra sonuçlarımızı, Oryza sativa grupları arasında gen akışıyla aktarılması muhtemel genomik blokları tanımlayan kapsamlı bir genetik soy şeması planına dahil edilebilir [25].

2.6 Embriyo Kurtarma

Embriyo kurtarma, ilk olarak 18. yüzyılda *Phaseolus* ve *Fagopyrum*'da Charles Bonnet tarafından geliştirilen ve aseptik koşullarda bitki embriyolarının ilk başarılı sistematik kültürü 19. yüzyılın başlarında yapılmıştır. 1904 yılında Hannig, iki çaprazlama kullanarak, *raphanus* ve *koklearia* [25] üzerinde embriyo kurtarma işlemini başarı ile gerçekleştirmiştir. Bu teknik başlangıçta melezin uygun olduğu ancak çimlenemediği ilgili türler arasında intra-spesifik melezlerin üretilmesine yardımcı olmak için kullanılmıştır. Daha sonra, bu teknik zarar görmüş veya uzun süre depolanmış tohumları geri kazanmak için kullanılmıştır [26].

Daha yakın zamanlarda, bu teknik, tohum olgunlaşma aşamasını geçerek olgunlaşmamış embriyoları çimlemek ve böylece bitkilerin döngüsünü azaltmak için hızlı ıslahta kullanıldı. Ayrıntılı olarak, bu teknik olgunlaşmamış tohumların toplanmasından ve embriyoların erken çimlenmesini zorlamak için daha sonra *in vitro* olarak besleyici ortama ekilmesi için endospermden ayırmasından oluşur. Bu protokoller nesiller arasındaki süreyi kısaltmak ve dolayısıyla çaprazlamalar arasındaki süreyi azaltmak ve böylece yılda daha fazla döngü elde etmek için kullanılabilir [27].

2.7 Japonica ve Indica Arasındaki Uyumsuzluklar

Hibridizasyon-farklılaşma-seçim döngülerini içeren *Oryza sativa*'daki ekolojik çeşitlilik, kültenin atalarının biçimleri çiftçiler ve tüccarlar tarafından daha yüksek enlemlere, daha yüksek kotlara, kuraklık alanlarına, mevsimsel derin su alanlarına ve gelgit bataklıklarına taşındığında artmıştır. Geniş coğrafi bölgelerde, iki ana ekocoğrafik stres, izolasyon ve seçim sonucunda farklılaştırılmıştır: (1) tropiklere uyarlanan *indica*; ve (2) ılıman bölgelere ve tropik yaylalara adapte olmuş *japonica* [28].

S5 lokusunda üç allel vardır: bir *indica* alel (S5-i), *japonica* alel (S5-j) ve ayrıca geniş uyumluluk geni olarak adlandırılan nötr bir alel (S5-n). T ile bir çeşitlilik ve o nötr gen, geniş uyumluluk çeşitliliği olarak adlandırılır [29]. S5 lokusunun klonlanması *indica* (S5-i) ve *japonica* (S5-j) alellerinin iki nükleotit farklılık gösterdiğini ortaya koyulmuştur. S5-n geni, S5 lokusunda 136 bp DNA sekansı silinmesine sahiptir. Belirli bir dizinin silinmesi, proteinin hücre altı miscalizasyonuna neden olur ve böylece geni işlevsiz hale getirir. Bu yüzden, S5-n / S5-n içeren genotip, *indica* (S5-i / S5-i) veya *japonica* (S5-j / S5-j) ile çaprazlanırsa, hibrit verimli olur [30]. Moleküler belirteçler vasıtasıyla birçok yeni germplazmanın S5-n genini barındırdığı bulunmuştur [31].

2.8 Embriyo Kurtarma Tekniği

Bitkilerin çimlenmesi durumunda, embriyo; yeni bir bitki kurma potansiyeli ile donatılmış çok hücreli bir yapıdır. Yeni bir sporofitik neslin başlangıcını temsil eder. Embriyo, özel bir hücreden, yani zigottan veya somatik bir hücreden ortaya çıkabilir. İlki bir zigotik embriyo olarak bilinir, ikincisi ise somatik, aseksüel bir embriyo olarak adlandırılır. Bir embriyo esasen kök ve sürgün primordial yapıları ile bir bipolar yapıdır. Normalde embriyolar, minyatür yapıları olmasına rağmen, bütün organizmalarda gelişir, yabancı otların boyutları kadar küçün olacağı gibi sequoia türü kadar büyüklükte oldukları da gözlenmektedir. Bir embriyonun bu büyük potansiyeli onu çok özel bir yapı yapar. Her ne kadar normal ve doğuştan şartlar altında, genç embriyolar olgunluğa ulaşır ve ortaya çıkar [33].

Potansiyelleri, sonraki gelişimlerinin erken bir aşamada tutuklandığı belirli durumlar vardır. Embriyolar arzu edilen genotiplerde olduğunda, bu bir düşünce noktası haline gelir. Bu gibi durumlarda, embriyolar (veya olabileceği gibi proembryos) uygun koşullar altında kültürlenerek iptal edilmeleri kurtarılabilir [33].

Muhtemelen embriyo kültürünün en eski kayıtları, Phaseolus ve Fagopyrum'un embriyolarını eksize eden ve onları toprağa yerleştiren 18. yüzyılda Charles Bonnet'in çalışmalarına dayanmaktadır. Bu embriyolar cüce bitkilerin oluşumuyla sonuçlandı. Yetiştirme embriyoları için besin çözeltileri 1890'larda Brown Morris tarafından kullanılmıştır. Bununla birlikte, embriyo kültüründe daha sistematik adımlar, Hannig'in (1904) Raphanus spp. ve aseptik koşullar altında mineral tuzlar ve şeker içeren bir ortamda Chochlearia damica ve bitki elde etmede başarılı oldu. Bu çalışma embriyolojide temel araştırmalar için bir alan açmıştır. Ana vurgu, büyüme maddelerinin fizyolojik ve gelişimsel yönlerini ve etkilerini anlama üzerine yapıldı. Brown, çeşitli organik azot bileşiklerinin, mineral tuzlar ve şeker içeren bir ortamda kültürlenmiş ekstrüzyona tabi tutulmuş arpa embriyolarının büyümesi ve gelişimi üzerindeki göreceli etkinliğini araştırmıştır. Bu çalışmalar, daha sonraki gelişmeleri için temel olarak farklı embriyonal kısımların rolü ile ilgili ileri araştırmalar için bir dosya oluşturdu. Bu şekilde toplanan bilgin, simbiyotik mantar yokluğunda besinsel agar ortamı üzerinde bütün bitkilere orkide embriyoları yetiştirmeyi başardı. Şeker yokluğunda, embriyoların protokol aşamasının ötesinde gelişemediği görülmüştür. Şekerin bu özel rolünün tanımlanması, simbiyotik mantarların nişastayı şekere dönüştürdüğü varsayımına yol açtı. Bugünün ticari orkidelerin yayılmasının başarısı, bu esnada, temelde çok temel araştırmaların doğrudan uygulanmasının mükemmel bir örneğini oluşturan bu çalışmaya atfedilebilir [34].

Dieterich, çalışmasından itibaren embriyoların in vitro çimlenmeye dinlenmeden

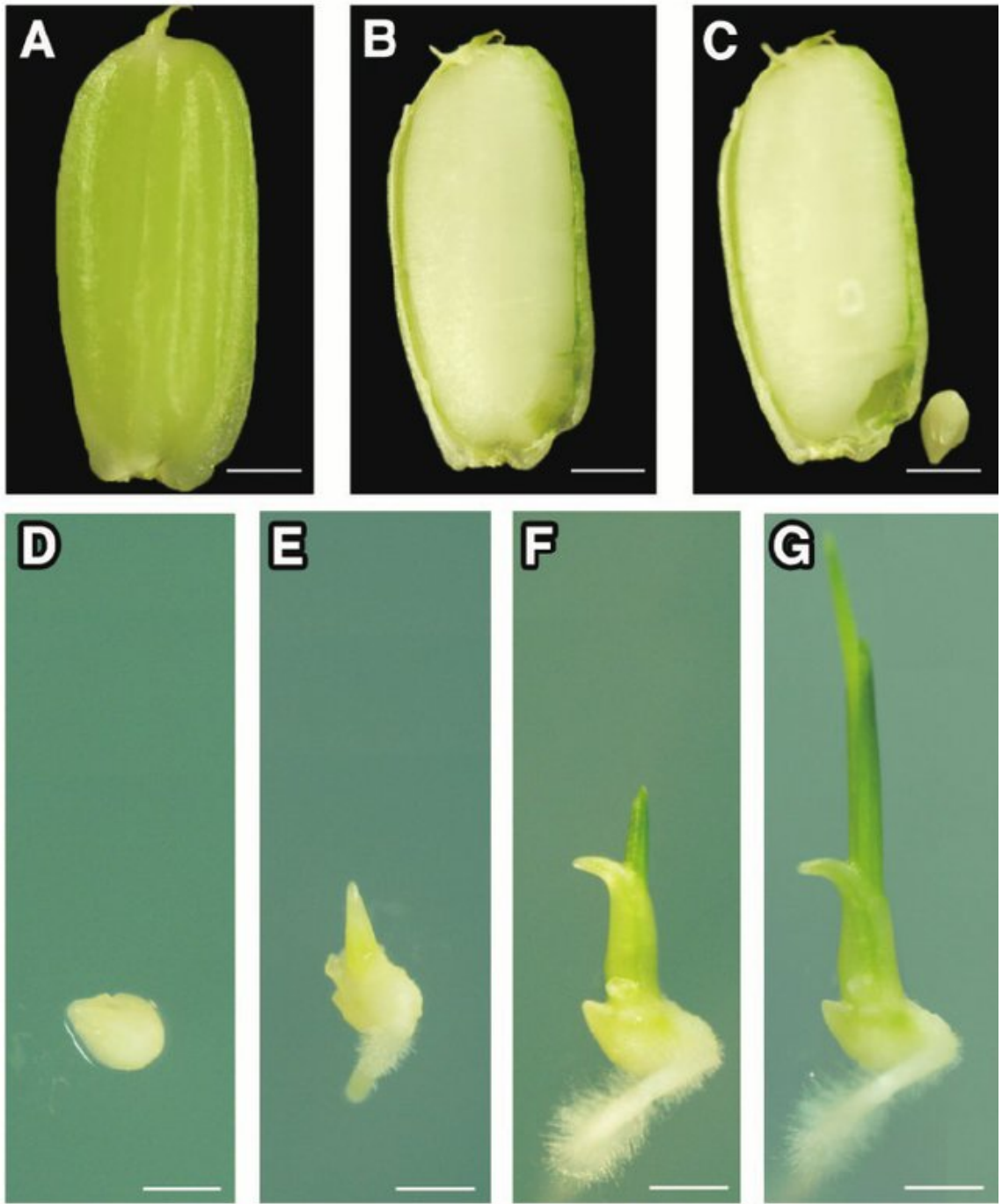
kolayca çimlenebileceğini ve olgun ve olgunlaşmamış embriyoların beslenme gereksinimlerinin, gezegenlerin oluşumu için daha zengin bir ortam gerektirecek şekilde farklı olduğu sonucuna varmıştır. Olgunlaşmamış embriyoların olgun büyüklüğünün üçte birinden daha azının normal bitkiler oluşturmadığını belirtirken, ortada 0,5 mm'nin altında bir gelişim gösteremedi, aksi halde birkaç bitki ailesinin olgun embriyolarının büyümesini desteklemek için yeterliydi [35].

Raghavan, embriyo kültürü üzerine yaptığı incelemelerde, embriyo gelişiminde heterotrofik ve ototrofik aşamaların olduğunu belirtmektedir. Gelişimin heterotrofik aşamasında embriyo, ototrofik aşamada olduğundan daha küçüktür (proembryo olarak adlandırılır) ve genellikle gelişimine izin vermek için büyüme düzenleyicilerinin varlığını gerektirir. Ototrofik aşamada, bir embriyonun gelişimi eksojen büyüme düzenleyici kaynaklarına bağlı değildir [36].

Embriyolar genellikle doğal beslenme yetersizliği gösterdiklerinde veya uzak hibridizasyonun bir sonucu olduklarında, iptal edilmek zorunda kalırlar. İçinde Bu gibi durumlar embriyolar genellikle çimlenme olmadan iptal eder, ancak çoğu durumda uygun bir in vitro prosedür izlenerek kurtarılabilir [36].

Laibach, belirli melezlerin embriyolarının kurtarılmasının önemini vurguladı. Embriyolar genellikle kurtarılmalıdır, aksi halde embriyo kurtarma ve / veya endosperm dejenerasyonu nedeniyle başarısız olurlar. Bu gözlemler daha sonra birkaç işçi tarafından iyi bir şekilde doğrulanmıştır. Tukey'nin kiraz embriyo kültürü üzerine yapılan deneyleri, meyve bitkilerinin embriyo kültüründe bir dönüm noktası olmuştur. Ortamı ve prosedürü, kabakgiller gibi diğer mahsullere yaygın olarak kabul edilir ve başarıyla uygulanır. Tukey'in prosedürünü şeftali yetiştiriciliğinde ilk kullanan kişi oldu [37].

Bitki embriyoları, yumurtalıklardan veya yumurtalıklardan çıkarılarak uzaklaştırılmadan kurtarılır. Bununla birlikte, bazı durumlarda, embriyoların ovüllerden çıkarılması teknik olarak mümkün değildir. Bu embriyoları kurtarmak için bütün ovüller ve hatta onları içeren yumurtalıklar kültürlenir. Böyle bir durum tütünde embriyo kurtarma ile örneklenmiştir. Impatiens, Brassica spp., Brassica x Raphanus, Lilium'da yumurtalık dilimi kültürü, çekirdeksiz sofralık üzümler. Raphanus, Pelargonium, Ornithogalum, Lilium'da kültür ortamında anterlerin varlığında yumurtalık kültürü ve Helianthus'taki ovule kültürü ve Cuphea paucipetala ssp. greenwood x C.laminuligera.En dölllenmiş ovüllerin hibritik sektörleri, katı fazda aktif kömür içeren katı / sıvı çift katmanlı bir kültür ortamı üzerinde in vitro olarak yetiştirilmiştir. Hibrit bitkiler, gelişmekte olan embriyoların katı ortama aktarılmasından sonra elde edilir. Bu teknik diğer taksalar için de geçerli olabilir.



Şekil 2.4 Embriyo Kurtarma

Son zamanlarda, ovül perforasyonu ve vermikülit destek sistemlerinin erken olgunlaşan şeftali çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyolarının (<10 mm uzunluğunda) olgunlaşmamış embriyolarının (<10 mm uzunluğunda) in vitro büyümesini teşvik etmede medya formülasyonlarından daha etkili olduğu bulunmuştur [38].

Genellikle, başka türlü iptal edebilecek olan embriyoların kurtarılması için aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır:

2.8.1 İn Vivo Transplantasyon

Birçok Poaceae türünün embriyolarının, birbirlerinin endospermine nakledildiklerinde başarılı bir şekilde büyütülebildiğini gözlemledi. Araştırmacılar oldukça genç (1 haftalık) Hordeum embriyolarının kulakta çimlenmeye ve polenleşmeden sadece 15 gün sonra normal bitkilerde gelişmeye başladığını göstermiştir. Böylece olgunlaşmamış bir endosperm, yeterli besin sağlayabilir ve ani embriyo çimlenmesine neden olabilir. Ancak, bu teknik fazla bir uygulama bulunamamıştır [39].

2.8.2 İn Vivo / İn Vitro Kültür

İn vivo teknik daha sonra modifiye edildi ve hibrit embriyolar, bir in vivo / in vitro transplantasyon tekniği kullanılarak yetiştirildi. Bu tekniğe Kruse öncülük etmiştir [29]. Hordeum x Triticum, Hordeum x Secale ve Hordeum x Agropyron gibi çeşitli uzak çaprazlamalardan melez bitkiler elde etmeyi başardı. Hibrit embriyolar, in vitro koşullar altında arpa endospermünde büyütüldü. Endosperm, endospermli sıklık ve ekli embriyoları atmak suretiyle 14-18 günlük arpa kararyoplarından elde edildi. Bu endosperm, orijinal embriyoların yerine kendilerine ekilen orta ve hibrit embriyolarda kültürlenmiştir. Genel olarak, hibrit embriyolar polenlemeden 9-12 gün sonra çıkarılmıştır. Bununla birlikte, olgun endosperm üzerine çok genç embriyolar ekilirse, tek bir endosperm üzerine en fazla 10 embriyo yerleştirilebilir. Kruse, birden fazla embriyo yerleştirmenin hibrit bitkilerin geri kazanılması için tek tek embriyoların nakledilmesinden daha iyi olduğunu göstermiştir. Kullanılan ortam basit ve bileşimi, hibrit bitki elde etmenin başarısı için kritik olmadığı tespit edilmiştir. Bu teknik yapay ortamda yetişemeyen çok genç embriyoların kurtarılmasını sağlar [39].

2.8.3 İn Vitro Kültür

Mikroteknikte, en yaygın olarak olgunlaşmamış veya endosperm olmasa bile embriyoları kurtarmak için güçlü bir araç olarak kullanılır. Zayıf ve olgunlaşmamış embriyolardan bitki yetiştirme başarısı, büyük ölçüde olgunluk evrelerine ve

besiyerinin kompozisyonuna bağlıdır. Gelişim aşaması söz konusu olduğunda, olgunlaşmamış embriyolar bile karmaşık serum veya besiyeri kullanılarak başarılı bir şekilde kurtarıldığı gözlemlenmiştir. Büyüyen embriyo, büyümesi ve gelişimi sırasında değişen talepleri gösteren dinamik bir sistemdir. Embriyo ne kadar küçükse, gereken ortam o kadar karmaşıktır [40].

White, *Portulaca Oleaceae*'nin kalp şeklinde genç embriyolarını, mineral tuzlar, glukoz ve fibrin içeren bir besiyerinde kök primordia ve kotiledonlarla olgunluğa yakın onlarda büyümekte ve büyümektedir. La Rue, birkaç anjiyopermin ve cimnastik bitkilerinin izole edilmiş genç embriyolarından bitki elde etmeyi başardı ve transplantable fideleri aldı. Bununla birlikte, 200-300 um arasındaki kalp şeklindeki embriyolar, karmaşık ortamlarda bile kültürlenememiştir. Maheshwari ve Baldev, *Cuscuta*'nın genç embriyolarının, IAA ve kazein hidrolizatını içeren bir ortama yansımaları sağlamışlardır [40].

Embriyolar birçok embriyo oluşturmak için çoğaldı ve taze ortama transfer edildiklerinde, her embriyo normal sürgünler oluşturdu. *Dendrophthoe falcata*'nın kültürlü proembriyoları ile benzer gözlemler yapılmıştır [40].

2.8.4 Kültür Gereksinimleri

2.8.4.1 Kültür Ortamı

Temel bileşenler olan mineral tuzların yanı sıra, kültür ortamında birkaç büyümeyi teşvik eden maddeye ihtiyaç vardır. Bazıları aşağıdaki gibidir:

2.8.4.2 Sükroz

Literatürden sükrozun bir karbon kaynağı ve ozmotik stabilizatör olarak hizmet etmek için en yaygın kullanılan şeker olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmaların çoğunda, sükroz diğer şekerlerden daha iyi sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, birkaç karşılaştırmalı çalışmada, diğer şekerler de iyi sonuçlar vermiştir. Örneğin, *Datura stramonium* embriyoları yüzde 4 sukrozda iyi bir şekilde büyüdü, fakat D. metaloidler sakarozun yanı sıra glikoz, mannoz veya gliserolde de büyüdüğü gözlemlenmiştir [41]. Genel olarak, olgunlaşmamış embriyoların kültürlenmesi için daha yüksek sükroz konsantrasyonu kullanılmaktadır. Bu konsantrasyon, besiyerinin ozmolaritesi için beslenme sağlamaktan daha önemlidir; Raghavan ve Torrey'in gözlemlerinden de anlaşıldığı gibi, yüzde 12 sukroz gerektiren *Capsella* embriyolarının, yüzde 2 sukroz artı birkaç büyüme düzenleyicisi içeren bir ortamda eşit derecede iyi yetişebildiği görülmüştür. Embriyo kültürü için kullanılan sukroz konsantrasyonu, yüzde 0,5 ila yüzde 18 gibi yüksek bir oranda geniş bir aralık göstermektedir. Saflaştırılmış

sukrozun fiyatı göz önüne alındığında, diğer büyümeyi teşvik edici maddeler ile birlikte daha düşük konsantrasyon tercih edilmeli veya nispeten daha az saf sukroz markaları denenmelidir [41].

Olgunlaşmamış embriyoların, nispeten olgun olanlara kıyasla, ortamın daha yüksek ozmotik kuvveti gerektirdiği bilinmektedir. Bu gerçek birkaç araştırmacının çalışmasıyla kanıtlanmış gibi görünmektedir. Bu, genç embriyoların beslendiği amorf sıvı endospermin yüksek molariteye sahip olması beklenir [41].

Ortamın yüksek ozmotik konsantrasyonu genç embriyoların erken dönemde çimlenmesini önler ve normal embriyonik büyümeyi destekler. Bu etki sukroz, kazein hidrolizat, mannitol veya gliserol, vb. tarafından üretilebilir. Yapılan çalışmalar besiyeri, klorofil birikimini destekledi ve kotiledonların embriyoların çok erken gelişim evresinde kotiledonların genişlemesini destekledi. Öte yandan, bu glikoz konsantrasyonu daha gelişmiş embriyoların büyümesini inhibe etti. Bununla birlikte, çeşitli gelişim aşamalarındaki embriyolar için glukozun yüzde 0,5'i idealdi. Genç embriyoların kültür süresi ilerledikçe, osmotik gereksinimlerinin azaldığı belirtilmelidir [41].

2.8.4.3 Doğal Adjuvanlar

Embriyoların in vitro kültüründe in vitro kültürü endosperm faktörlerinin embriyo büyümesini destekleyici olduğunu göstermiştir, uzun zaman önce datura'nın olgun embriyolarının glikoz ile desteklenmiş basit bir besiyerinde yetiştirilebildiği, ancak torpido ve kalp şeklindeki embriyoların güçlendirilmiş besiyerinde hayatta kaldığı gösterilmiştir. Glisin, tiamin, piridoksin, askorbik asit, adenin, nikotinik asit, süksinik asit ve pantotenik asit ile birlikte. Yine de daha küçük embriyolar bu karmaşık ortamda bile çimlenmeye başlamamış ancak otoklavlanmamış hindistancevizi suyunun kullanımı ile başarılabılır. Bu durum kabul gördüğünden beri, hindistancevizi suyu her zaman olumlu etkilere sahip olmasa da, embriyo kültüründe yaygın olarak kullanılmıştır. Örneğin, Uttaman, kültürlenmiş mısır embriyolarında hindistan cevizi suyu ile büyüme inhibisyonunu gözlemlemiştir [42].

Sıvı endosperm olan hindistan cevizi suyu gibi, embriyo kültür ortamındaki adjuvanların çoğu endosperm kökenlidir. Endosperm özütlerinin, çeşitli türlerin kültürlenmiş embriyoları üzerindeki yararlı etkileri bildirilmiştir. Farklı bitki türlerinin endospermelerinin kimyasal bileşimi değişmekle birlikte, genellikle miyoinositol, sorbitol, oksinler, sitokininler, azotlu bileşikler, vs. içerirler [42].

Hindistan cevizi suyunun yanı sıra, embriyo kültür ortamlarında kazein hidrolizat ve

malt özü de yaygın olarak kullanılmaktadır. Soğuk sterilize malt özütünün zeatin ve zeatin ribosid fraksiyonları içerdiği bilinmektedir. Kazein hidrolizatı, amino asit sağlarken, maya ekstraktının olduğu bulunmuştur [42].

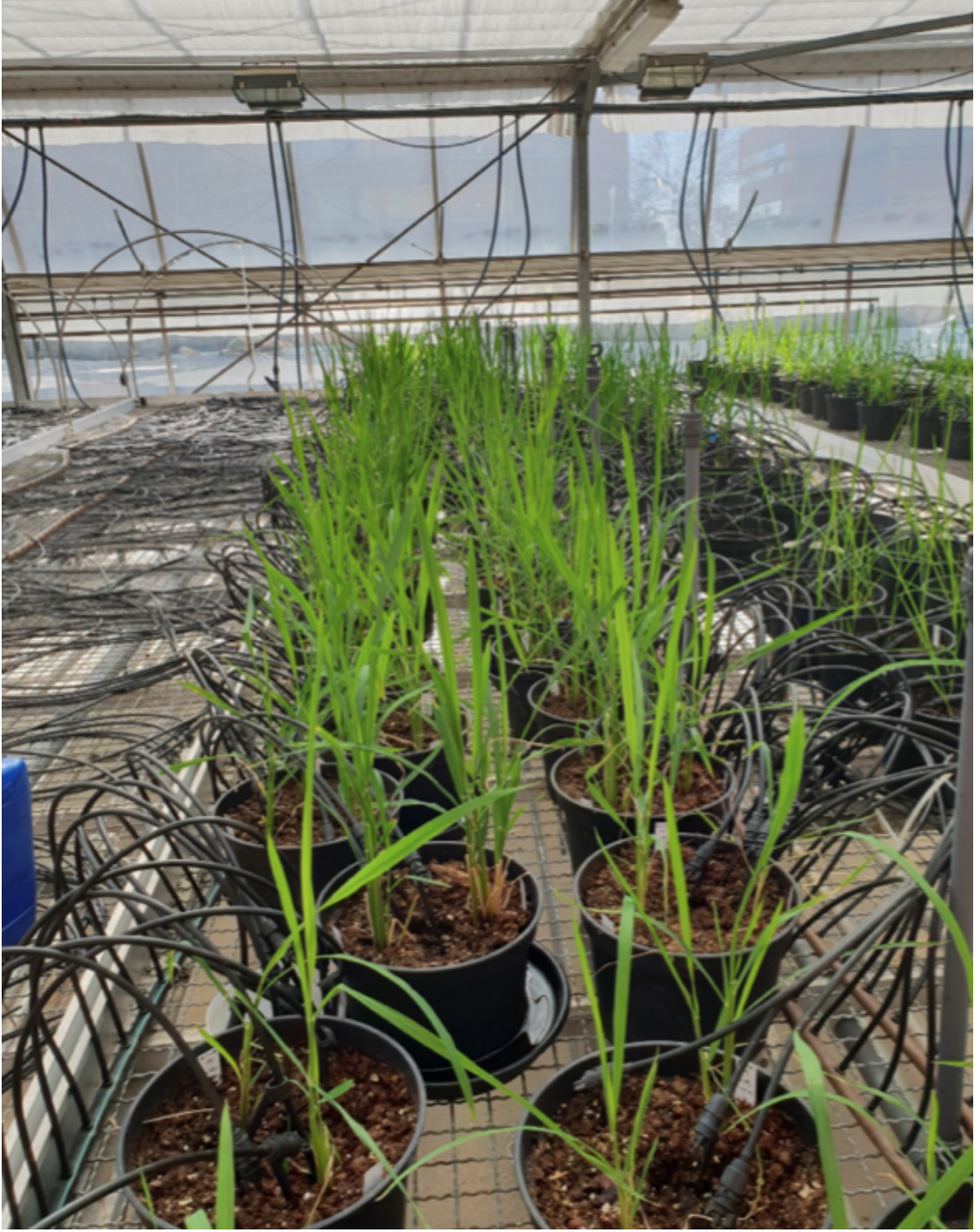
Vitaminlerdeki zenginliğinden dolayı faydalıdır. GA3, oksinler, sitokininler, vb. gibi büyüme düzenleyicilerinin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, etkilerinin oldukça değişkenlik gösteren ve zaman zaman çelişkili olduğu bulunmuştur. Etkilerinden biri bu maddeler besleyici değildir, ozmotik konsantrasyonun ve bu maddelerin etkisinin bir şekilde hücre geçirgenliği ve iyon alımı ile bağlantılı olması muhtemeldir. Genel olarak, düşük oksin konsantrasyonları normal büyümeyi desteklerken, yüksek konsantrasyonları da kültürlenmiş embriyolardan inhibe edici veya organize olmayan kallus büyümesini kanıtladı. GA3'ün etkileri embriyoların genişlemesinde az çok tutarlıdır, oysa sitokininler genellikle büyüme inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. Tobart ise kültür embriyo kurtarma sonrasında kinetin tarafından büyüme uyarımı elde etmiştir [43].

Zdrujkovskaja-Richter tarafından yapılan çalışmalar, kültür ortamına eklenen büyümeyi teşvik edici maddeler ve bitki özleri ile vişne kültürlerinde embriyo kalitesinin artırılmasının fizibilitesine dikkat çekti. 0,5 mg / l kinetin kotiledonların büyümesini uyardı ve 0,1 mg / l'de kiraz embriyolarından kök ve sürgün oluşumunu uyardı. Bu maddelerin etkisi daha düşük sıcaklıklarda (8 ila 10°C) daha belirgindi. 2 mg / l GA3 ile benzer koşullar altında kotiledonların ve filizlerin büyümesi uyarıldı. Zdrujkovskaja, 2 hafta içinde, 400 mg / l kazein hidrolizat, 200 mg / l maya özütü ve 2 mg / l GA3 veya 0,1 içeren MS ortamında kalp şeklinde aşamada kültürlenmiş erken olgunlaşma kirazlarının melez embriyolarının on kata kadar verimli şekilde kültürlenmesini sağlamıştır [43].

3.1 Bitki Malzemesi ve Büyüme Koşulları

Ribe (RP01), Balilla (L03) ve bir herbisite dayanıklı mutant tropik indica pirinç türü (LIH) LIH03283, herbisite toleranslı introgresyon hizmeti talep eden özel şirket tarafından tedarik edildi. RP01, tropik indica pirinç türleri çeşitleri ile bilinen cinsel uyumsuzluğa sahip eski bir japonica pirinci çeşidi olarak bilinmektedir. L03 ise spesifik bir cinsel uyumsuzluğu olmayan bir japonica pirinci çeşididir.

Bitkiler, kontrollü koşullarda, Barcelona Üniversitesi'ndeki (UB) Servei de Camps Experimentals'ın serasında yetiştirildi. Bitkiler, turba yosunu (Floratorf Vertriebs, Oldenburg, Deutschland): vermikülit (2:1 v/v), Osmocote Exact Standard (1 g•substrate L⁻¹)'den oluşan pirinç substratı ile doldurulmuş 4 litre saksı ekilmiştir. 15-9-12 (N-P-K) + 2MgO + micronutrients (Scotts Company, Washington, ABD) ve kalsiyum karbonat (1 g•turba yosunu L⁻¹) içerir. Bu yüksek miktarda kalsiyum karbonat, substrat pH'sini 6 civarında ayarlamak için kullanılır. Ek olarak, büyüme sulama gübresi (Tablo Ek 1), otomatik sulama sistemi ile haftada bir kez kullanılmış olup, sıcaklık, 18-45°C arasında kontrollü bir aralıkta tutulmuştur.

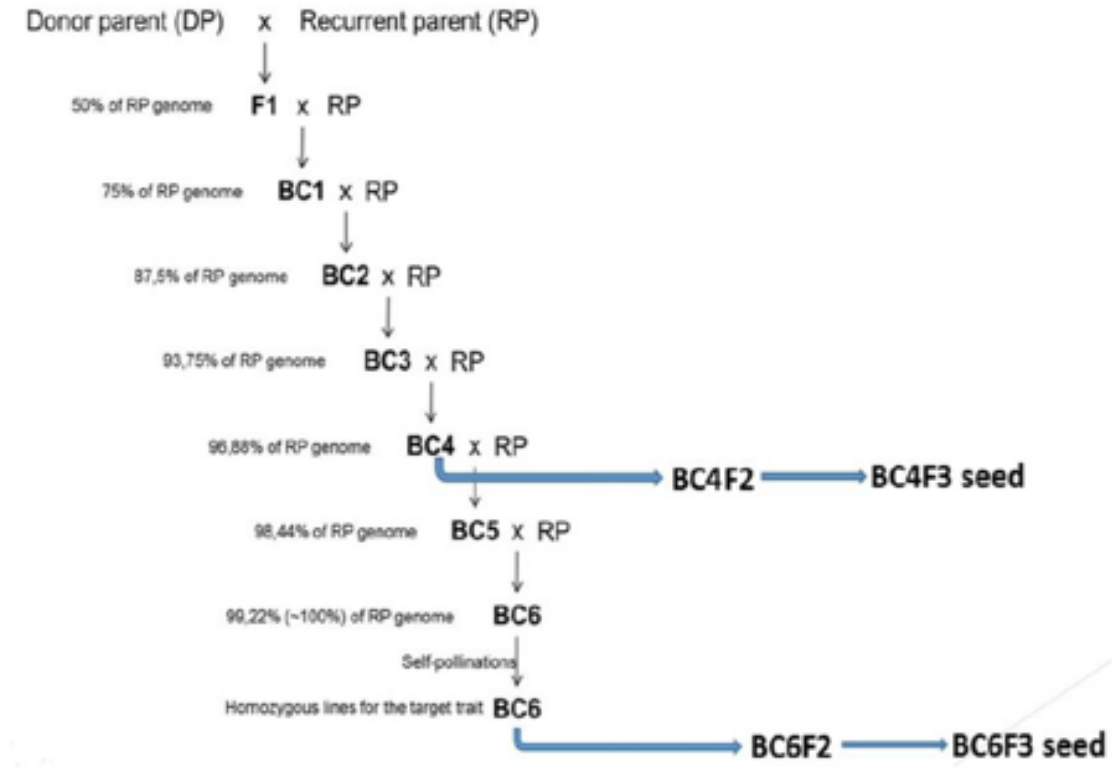


Şekil 3.1 Yetiştirme Serası

3.2 Backcross Yetiştiriciliği

Tekrarlayan geri çaprazlama (introgesyon), bir veya daha fazla lokustaki alelleri bir donörden alınıp diğer bir çeşide aktarmak için yaygın olarak kullanılan geleneksel bir üreme yöntemidir. Beklenen tekrarlayan ana genom geri kazanımı, altı geri çaprazlama ile %99.2 olması beklenmektedir. Bu nedenle, ortaya çıkan introgesyonun

tekrarlanarak oluşan hatların ebeveynlere çok benzer olması beklenmektedir.



Şekil 3.2 Geri Çaprazlama Süreci

Polen reseptörü panikülleri günlük olarak seçildi, antezi sadece üst kısımda kalan (apikal) çiçeklerin bir kaçında meydana gözlenmiş olup, başağın kalan kısımda (A) gözlenmemiştir. Başakların antez oluşturan üst kısımları kesilerek ve mikro vakumlama ile bitkiden ayrılmıştır. Bunun sebebi, otopolinizasyonu önüne geçmektir. Başakların olgunlaşmamış çiçeklerinde bulunan bu anterleri çıkarma işlemi sabah 08:00 ile 10:00 gerçekleştirilmiştir. Otopolinizasyon genellikle 12:00 ile 15:00 arasında gerçekleştiği için erken saatlerde bu çıkarma işlemi (emasculatıon) gerçekleştirilmiştir.

Glumler, cerrahi makas kullanılarak anterlerin olduğu yere kadar kesilerek açılmıştır. Bu şekilde anterlerin ve yumurtalıkların olduğu hazne açıkta bırakılmıştır. Daha sonra, her bir çiçeğin anterleri, polen donörü alacak olan poseillere zarar vermeyecek şekilde, bir mikro-pipet ucuna (B) bağlanmış bir vakum pompası yardımı ile dikkatlice vakumlanmıştır.

Yanlışlıkla kontrolsüz tozlaşmayı önlemek için salkımları bir kağıt zarfla örtmeden önce, artık anter kalmadığından emin olmak için çiçekler tekrar kontrol edilmiştir. Donör bitkiler antezi başlattıklarında (yaklaşık öğlen), farklı tozlaşmayı önlemek amacıyla kapatılan zarflar kesilerek, donör bitkisi polenlerinin hedef bitkinin

çiçeklerinin ovaryumlarına ulaşması sağlandı ve döllenmenin verimini arttırabilmek için zarf nazik bir şekilde sallandı. Son olarak, polen reseptörü paniküllerin bulunduğu zarf tekrar kapatılarak ve çapraz ve tozlaşma günü kaydedildi. Sonraki günlerde, uygulanan polen tohum üretecek embriyojenik süreci başlatan yumurtalıkları fecunda edecektir.



Şekil 3.3 Emaskülasyon Prosesi

(A) Emaskülasyon için seçilen olgunlaşmamış panikül görüntüsü, (B) Bir vakum pompası kullanarak kesilmiş panikülde emaskülasyon işlemi (C) Zorunlu yanma işlemi nedeniyle elde edilen olgunlaşmamış tohum

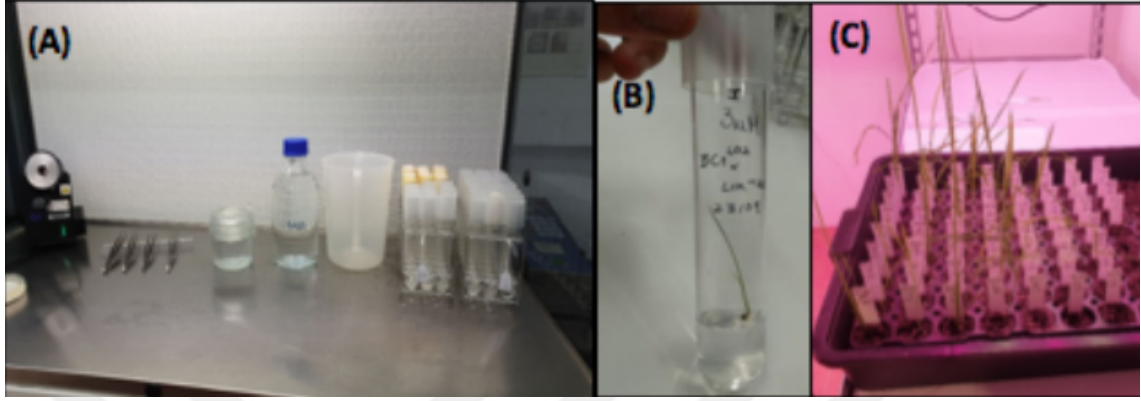
3.3 Embriyo Kurtarma İşlemi ve Herbisit Seçimi

Olgunlaşmamış tohumlar polenlemeden 10-12 gün sonra toplanmıştır. Blumların embriyoya zarar vermemek için forseps kullanılarak dikkatlice çıkarılmıştır. Tohumlar, 1 dakika boyunca % 70 etanolde tutularak sterilize edilmiştir. Akabinde manyetik karıştırıcı sayesinde, sürekli çalkalama altında 8 damla L^{-1} Tween 20 içeren bir % 2.5 sodyum hipoklorit çözeltisine maruz bırakılmıştır. Laminer akış kabini ve kesinlikle aseptik koşullar altında, tohumlar, her durulama için üçer dakika boyunca steril distile su ile 5 kez durulandı.

Tohumlar steril bir filtre kağıdına alınarak ve perikarp, neşter yardımıyla ve cımbızla tutularak keseden temizlenmiştir. Kalan parçada bulunan ve renk bakımından farklılık gösteren sarımsı embriyo daha sonra endospermden ayrılarak ve 9 ml MS yarı kuvvetli bir embriyo kurtarma ortamıyla doldurulmuş in vitro cam tüplere kondu (Tablo Ek 2). Embriyolar, büyüme odasında üç ila dört hafta boyunca kültürlenmiştir. Geliştirilen bitkiler örneklendi ve özel olarak tasarlanmış turba vermikülit substratı

(Tablo Ek 3) ile doldurulmuş 96 oyuklu 35 cm³ çoklu içinde sera koşullarına alışıldı.

BC1F1 üreme adımında, donör özellik seçimini optimize etmek için ek bir vitro seçim protokolü geliştirilmiştir. Herbisit direncinin analizi için MS besleyici besiyerinde 3 μ M sikloksidim herbisit ilave edilmiştir.



Şekil 3.4 Embriyo Kurtama Prosesi

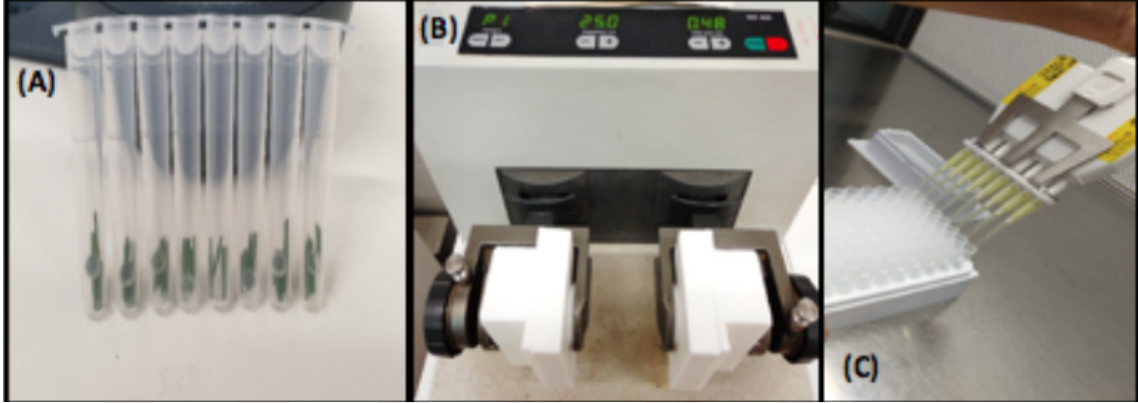
(A) Laminer akış kabinde malzeme hazırlığı, in vitro embriyo kurtarma işlemi. (B) İn vitro tüplerdeki yetiştirilen bitkilerinin görüntüsü. (C) Seracılıkta seramaya hazır bitkiler.

3.4 DNA Ekstraksiyonu

RP01xLIH F1 hibritleri, LIH ebeveynleri ve RP01 ebeveynleri, genç yapraklar toplanarak örnekledi. Pirinç için uyarlanmış bir CTAB protokolü [32] aşağıdaki gibi kullanılmıştır: örnekler, her birinde bir cam top bulunan mikro kaplara konulmuştur. Akabinde, tüm mikro kaplar plastik tıpalarla kaplanmış ve ekstraksiyon kutularında düzenlenen -80°C'de bir dondurucuda bekletilmiştir. Numune ekstraksiyon kutuları, -196°C'de sıvı azot içeren bir kaba konulmuş ve 48 saniye boyunca 25 Hz'de 400 MM'lik bir TissueLyser'da (Retsch, Mettman, Almanya) öğütülmüştür (Şekil 7B). Her bir mikropota, 300 μ l MATAB ekstraksiyon Tamponu (Tablo Ek 4) eklenmiş ve elde edilen süspansiyon birkaç kez dikkatlice yukarı ve aşağı pipetlenerek homojenleştirilmiştir (Şekil 7C). Ekstraksiyon kutuları, her 10 'da elle çalkalama ile 72 °C'de 30 dakika boyunca kuluçkada bırakılmıştır. Daha sonra, bir duman başlığı altında her numuneye 300 μ l kloroform ve izoamil alkol 24: 1 çözeltisi ilave edilmiş ve daha sonra numuneler, 10°C 3.500 rpm ve 10°C bir Digicen 21 R Orto Alresa santrifüj kullanılarak santrifüjlendi. Daha sonra, her numunenin 200 μ l süpernatanı pipetlendi ve yeni bir mikro kap kutusuna aktarılmış ve toprak atılmıştır. Bu yeni kutuda her bir mikro pota 160 l izopropanol eklenmiştir. Örnekler vorteks kullanılarak karıştırılmış ve 1 saat 4°C'de bırakılmıştır. Numuneler daha sonra 3.500 rpm'de ve 4°C'de 30°C'de

santrifüje edilmiştir. Tüm süpernatantlar atılmıştır.

DNA'yı temizlemek için, her bir numuneye 200 μ l % 70 etanol pipetlendi ve 4.000 rpm'de ve 15°C'de 4°C'de santrifüjleme yapılmıştır. Son olarak, tüpler gece boyunca emici kağıt üzerine yerleştirilmiştir. 50 μ l MiliQ su ilave edilerek DNA yeniden süspanse edilerek ve 2 saat boyunca bir orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır.



Şekil 3.5 DNA Ekstrasyon Prosesi

(A) Seradan toplanan bitki örneklerinin üzerinde bir ekstraksiyon topu bulunan mikro kaplar (B) Örnekleri ezmek için kullanılan TissueLyser (Retsch, Mettman, Almanya) resmi (C) Çok kanallı bir pipet kullanarak ekstraksiyon kutusuna MATAB ekstraksiyon tamponunun eklenmesi

3.5 S5 Allellerinin PCR ile Tespiti

S5 alelleri, aşağıdaki primer ve PCR koşulları kullanılarak önerildiği gibi RP01, LIH ve RP01XLIH F1 hibritlerinde analiz edilmiştir [33].

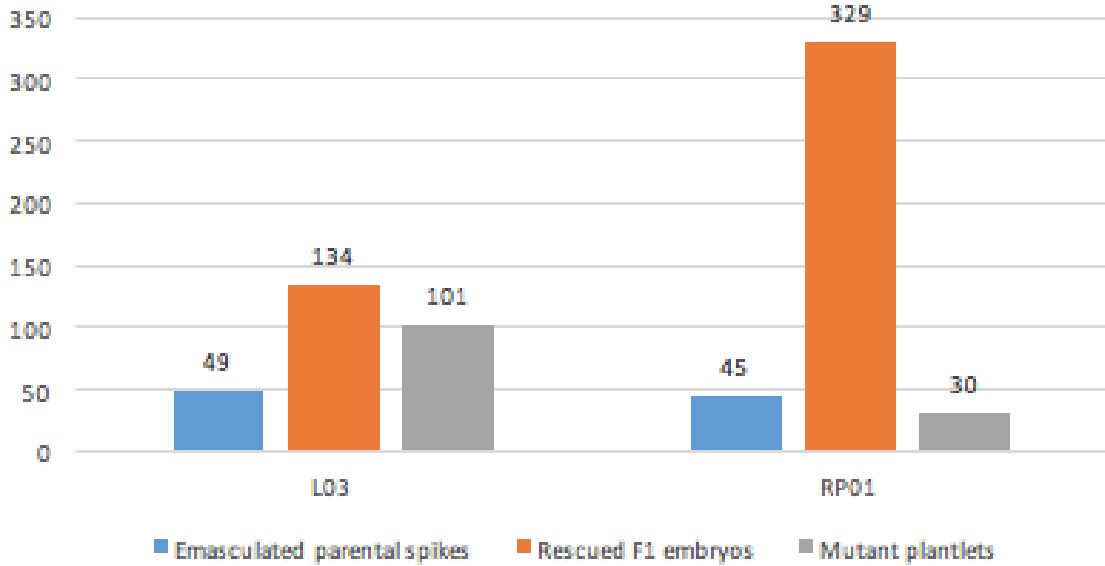
Aşağıdaki bileşenler, her PCR reaksiyonu için 10 μ l bir hacme dahil edildi. Her primer 0,25 μ M, 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM dNTP, 1 μ l Taq DNA polimeraz (DreamTaq) ve yaklaşık 25–30 ng şablon DNA içeren 10x PCR tamponu. PCR profili başlangıç denatürasyon profiliydi, başlangıç denatürasyonu, 5 dakika boyunca 95°C idi, ardından 95°C'de 30 saniye boyunca 10 denatürasyon döngüsü, 66-57°C'de tavlama 30 saniye, (döngü başına 1°C düşüş), 1 dakika 72°C'de uzatma ve 25°C'de 30 saniyelik denatürasyon döngüsü, 57°C'de 30 saniye tavlama, 72°C'de 1 dakika uzatma, son uzatma 72°C'de 7 dakika. Amplifiye edilmiş PCR ürünleri % 1,5'lik agaroz jeli üzerinde ayrılmış, RedSafe ile lekelenmiş ve bir UV transillüminatör altında görselleştirilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan Primer Çiftlerin Listesi ve Beklenen Boyutlar

Primer Adı	Hedef	Sequence (5' - 3')	Erime Sıcaklığı	Beklenen Uzunluk (bp)		
				Indica	Japonica	Neutral
S5-InDel F	Neutral alel-spesifik delesyonu	CCTACGTTTGACTGCCTGCCTG	61	417	417	281
S5-InDel R		CTACACGCGGCTTCGGGAAAGC	63,4			
S5-ELSP F	Indica-spesifik SNP	GACAGCAGCATCAACGACTTCC	59,1	527	Amp. yok	527
S5-IASP 2		TCGTCAGTGGGCAAGCAGTAGCTG	63,3			
S5-JASP 1	Japonica-spesifik SNP	ACCCTGATATTCTGAGTTACAAGGCATTA	57,4	Amp. yok	325	Amp. yok
S5-ELSP R		GCTCTTGATGTCCGGTGATACC	58,1			

4.1 Backcross Yetiştiriciliği

F1 melezleri üretim aşamasında 49 L03 ve 45 RP01 hattı sırasıyla 101 ve 30 herbisite toleranslı heterozigot ACC2 bitkileri veren 134 ve 329 embriyo üretti.

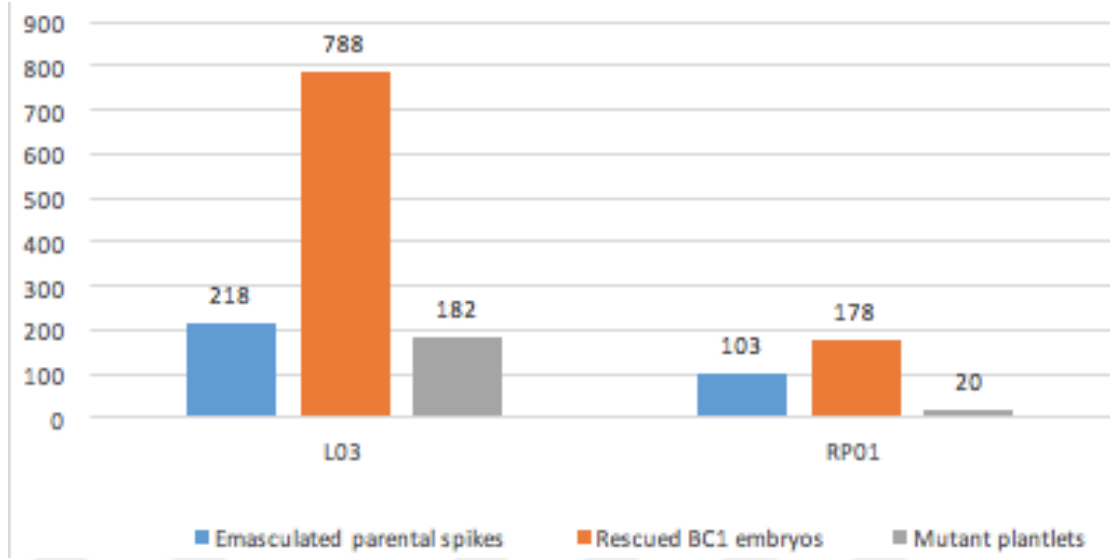


Şekil 4.1 F1 Embriyolarının Herbisite Direnci

Birinci L03 x LIH03283 ve RP01 x LIH03283 F1 üremesine atıfta bulunulan salgılanmış ebeveyn bitkilerin (mavi çubuklar), kurtarılmış F1 embriyolarının (turuncu çubuklar) ve herbisite toleranslı ACC2 mutant heterozigot bitkilerin (gri çubuklar) özeti

RP01, L03'e kıyasla yüksek derecede bir kendi kendine tozlaşma veya LIH ile bir çeşit cinsel uyumsuzluk göstermiştir. Bu, heterozigot mutant bitkilerin zayıf bir verimiyle sonuçlandı. İlginç şekilde, L03 x LIH F1 melezleri tamamen verimli iken RP01 x LIH F1 melezleri oldukça steril sonuçlandı. Bu F1 melezleri ilk geri çaprazlamada polen vericisi olarak davrandı, ancak geri dönüş L03 ve RP01'i geçtiğinde doğurganlık farklılıkları ortaya çıktı. Daha sonra, 218 L03 ve 103 RP01 hatları elemine edildi ve ilgili F1 hibritleri ile tozlandı, sırasıyla 788 ve 178 BC1 embriyoları elde edildi.

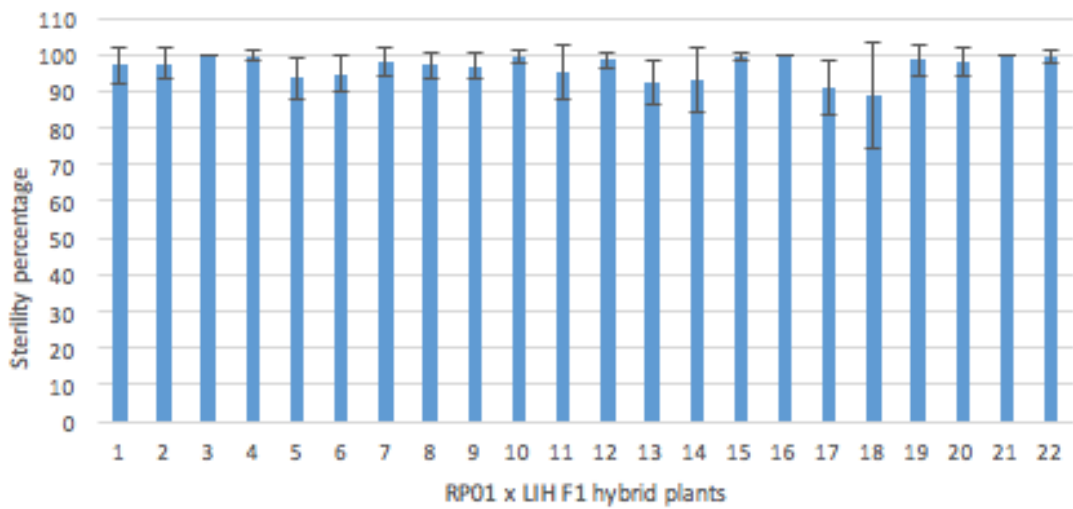
Kurtarılan embriyolar 182 L03 ve 20 RP01 BC1 bitkisi vermiştir.



Şekil 4.2 Emaskülasyon Verimliliği

Emaskülasyona maruz bırakılmış ebeveyn bitkiler (mavi çubuklar), kurtarılmış BC1 embriyoları L03 ve RP01'in (turuncu çubuklar) ve mutant bitkilerin (gri çubuklar) özeti

Yine, polen donörleri olarak RP01 x LIH F1 hibritleri kullanıldığında yüksek derecede bir sterilitate gözlenmiştir. Ek olarak, RP01 x LIH F1 melezleri, kendiliğinden kendi kendine döllenmiş olgun sivri uçları gözlemlerken yüksek derecede steril sonuç verdi. Böylece, yayılmış başakla elde edilen ortalama olgunlaşmamış tohum sayısı 30 RP01 x LIH F1 hibritlerinin 22'sinde tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 RP01 X LIH F1 Miktarları

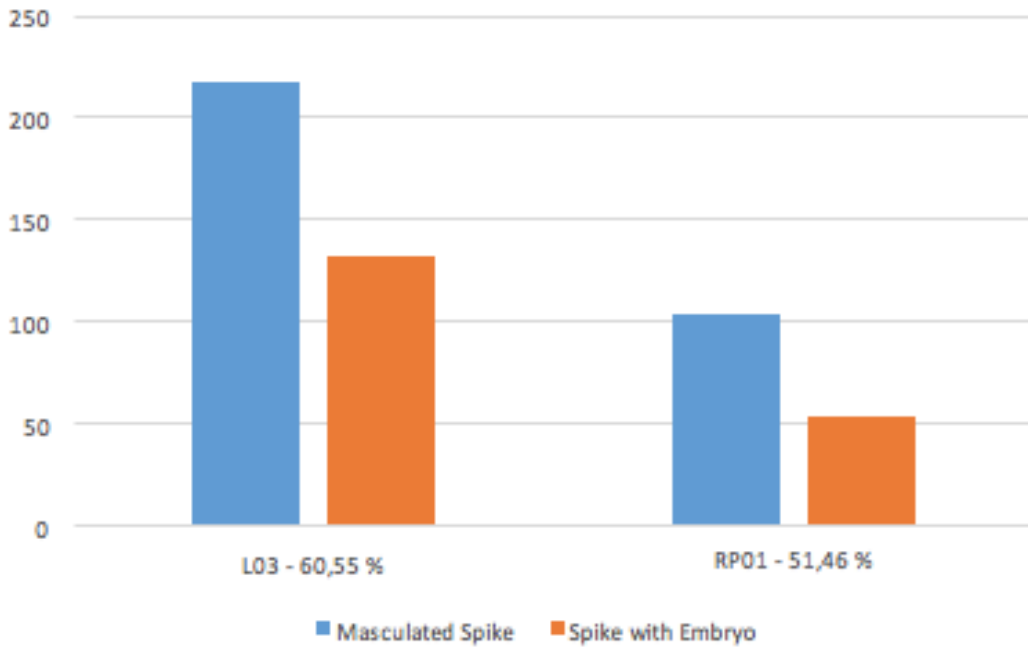
RP01 X LIH F1 bitkilerinde başak başına standart sapma başına elde edilen toplam

tohum sayısının ortalaması

Üç bitki hattı (3, 16 ve 21) hiçbir başakta hiç tohum vermedi, diğer 19 satırda en az bir adet öz tohumlama görüldü.

4.2 Embriyo Kurtarma

F1 embriyo kurtarma başarısı L03'te %60,55 ve RP01'de %51,6'dır. Kurtarmadaki başarısızlık çok fazla olgunlaşmamış veya çok fazla olgun tohum kullanılmasına bağlanabilir. Çok olgunlaşmamış tohumlar sütlü aşamadır ve embriyoyu bulmak zorlaşır, olgunlaşmış tohumlar ise sert hamur aşamasında embriyoyu endospermden ayırmak zor olur [44]. Tohum manipülasyonunda insan hataları da meydana gelebilir ve bu da toplam uygulanabilir tohumları azaltır. Farklı geri dönüş aşamaları arasında karşılaştırma yaparken, BC1'de gerçekleştirilen embriyo kurtarma başarısı yüzdesi L03 daha yüksekken, RP01'de daha düşük olmuştur.



Şekil 4.4 F1 Embriyolarının Verimliliği

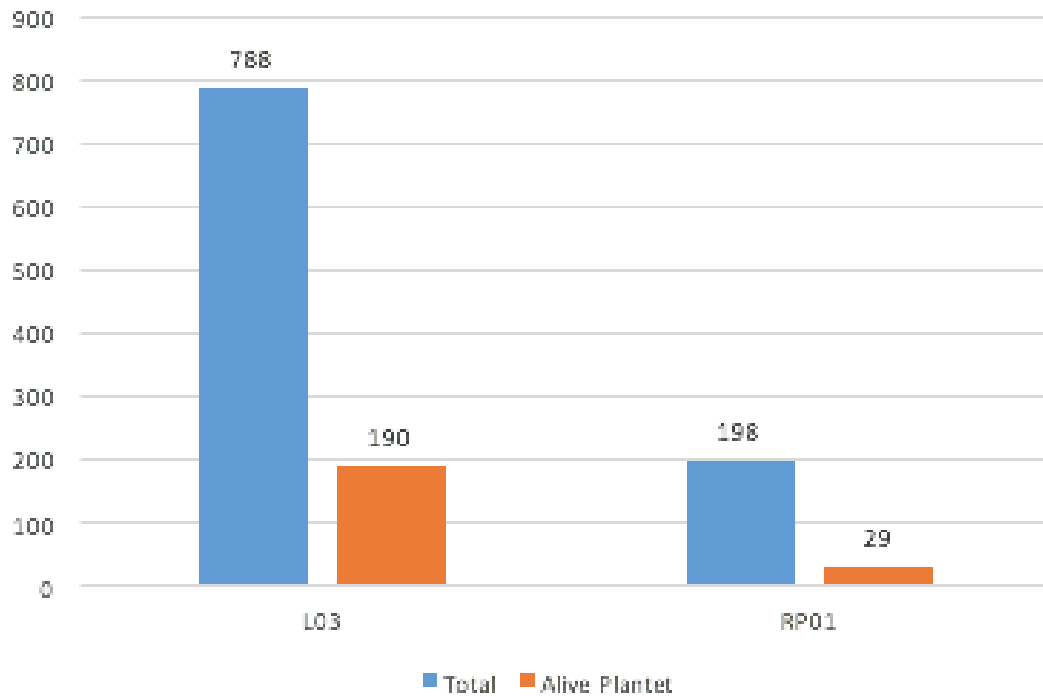
F1 embriyoları (turuncu çubuklar) elde edilen emasküle edilmiş ebeveyn bitkiler (mavi çubuklar), başak miktarının özeti

BC1 tohumu kullanılırken daha yüksek BC1 embriyo kurtarma başarı oranları gözlemlendi. Bu daha iyi sonuçlar embriyo kurtarma yönteminin geliştirilmesine ve olgunlaşmamış tohumların kaybedilmesini büyük ölçüde kurtarabilecek tohum manipülasyonunda daha fazla deneyime atfedilebilir. Ayrıca, farklı çeşitler genotipler

arasında farklılık gösteren optimal sütlü hamur aşamasına daha hızlı veya daha yavaş ulaşır [27]. Ayrıca, düşük sıcaklıklar ve bulutlu günler olgunlaşma sürecini geciktirir. Böylece, F1 ıslahı sırasında, ilk olgunlaşmamış tohumlar bazen çok hamurlu veya çok sütlü toplanmış, kurtarılabilecek embriyoların potansiyel olarak kaybedilmesine neden olmuştur. Ek olarak, olgunlaşmamış RP01 x LIH F1 hibrit tohumlarının bazıları, daha fazla zaman beklemekte olsa bile malformasyonlar ve az gelişmişlik göstermiştir. Bu gerçek, toplanan tohumlarda endospermden embriyoların bulunmasını zorlaştırdı ve toplam kurtarılan embriyo sayısı daha düşüktü. Böylece, bir sonraki BC1 aşamasında, önceki deneyimlerimiz sayesinde tohum toplama geliştirildi.

4.3 Herbisit Seçimi

Herbisite desteklenmiş tüplerde toplam 190 RP01 X LIH F1 embriyoları başarıyla kurtarıldı ve kurtarılan embriyoların %15'ini temsil eden 29 herbisite dayanıklı bitki elde edildi. Aksine, 788 kurtarılmış L03 X LIH F1 melezinden, %25'i temsil eden 190 herbisite dayanıklı bitki toprağı elde edildi.



Şekil 4.5 3 μ M Herbisit Verimliliği

3 μ M herbisit işleminden sonra toplam embriyoların ve canlı bitkilerin özeti

RP01 x LIH çaprazında spesifikler arası melez kısırlığın varlığı, kurtarılan embriyoların herbisit içermeyen besleyici ortam tüplerine ekildiğinde yüksek ölüm oranı gösterdiğinde ortaya çıkarıldı. Bazı yazarlar interspesifik hibritlerde anormal bir

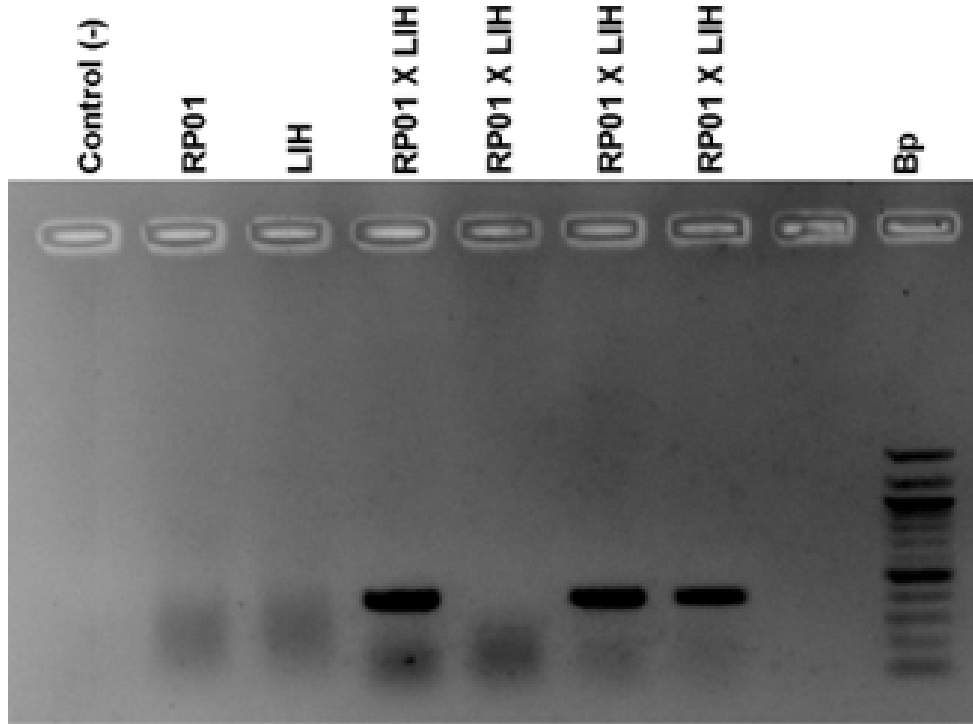
embriyo gelişimi gösterirler ve embriyo kesesi oluşumu sürecinde dejenerasyon veya gecikmeden dolayı normal koşullarda çimlenme kabiliyetine neden olmazlar. Pirinçte hibrit doğurganlık ile ilgili birçok lokasyon, özellikle F1 'in kendine özgü hibritlerinde dişi kısırlıkla ilişkili olan S5 majör lokumu keşfedilmiştir [45]. Diğer yazarlar, kendi RP01 çeşitlerimizi kullanan bir araştırma çalışmasında, S5 lokusunun embriyo kesesi oluşumunu düzenleyen 3 ORF geninde bulunduğunu gösteren bu S5 lokusunun indica-japonica hibritleri arasındaki kısırlıktaki rolünü ortaya çıkardı. Bu genlerden birinde, özellikle ORF3 geninde, allel uyumsuzluğu, dişi sporogenezi, embriyonun düşmesine neden olabilecek anormal bir embriyo-kese gelişimi ile sonuçlanan hücre stresi seviyelerinde bir artışa yol açmaktadır [46].

İki farklı alt tür çeşitleri arasındaki allel etkileşiminin neden olduğu embriyogenez sürecinde bir sorun RP01 x LIH sonuçlarında gösterilen düşük embriyo çimlenme oranını açıklayabilir. F1'de bitki sağkalımı ile ilgili elde edilen sonuçlarda, uyumsuzluğu tartışılan RP01 çeşidi hariç, tüm çeşitlerde sağkalımın %80'inin üzerinde değerler elde edilen büyük bir ölüm gözlenmedi. Aksine, RP01'de, sonuçlar %20'nin altında ortalama sağkalım değerleri elde eden tüm çeşitlerde önemli ölüm göstermiştir. Kirlenmeler birkaç embriyonun çimlenmesini engellemeye katkıda bulunabilmiştir, ancak ölümlerin çoğu besleyici ortamda herbisit varlığından dolayı gerçekleşmiştir.

Öte yandan, bazı yazarlar Indica X Japonica çaprazlamalarının verimliliği ile doğrudan ilişkili S5 alelleri olduğunu savunulmaktadır. Bu modele göre, S5 lokusunda üç allel vardır: nötr bir allel (geniş uyumlu allel), S5n; bir indica aleli, S5i; ve bir japonica aleli, S5j. S5n / S5i ve S5n / S5j genotipleri doğurgan olurken, S5i / S5j S5j aleli taşıyan gametin kısmi embriyo kurtarması nedeniyle yarı steril olacaktır [47].

4.4 S5 Alellerinin PCR ile Tespiti

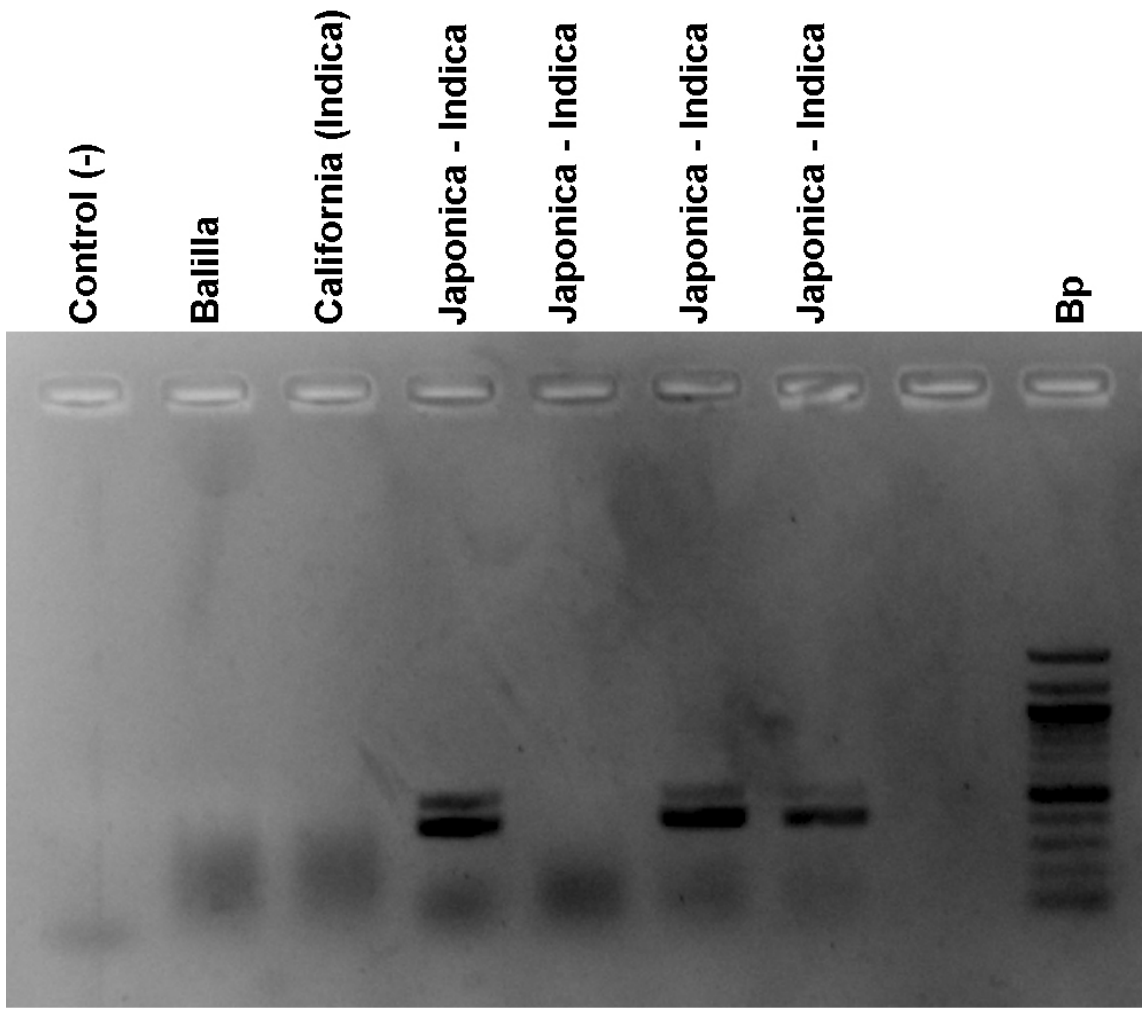
Bu tür subspesifik melezlerin geliştirilmesindeki ana zorluklardan biri, çoğu indica ve japonica çaprazmalarının çoğunlukla izlenen kısmi melez kısırlıktır. Japonica x indica hibrit sterilitésinin aşılmasında geniş uyumlu çeşitlerin öneminin farkına varılarak, pirinçte bu geniş uyumluluğun genetik temelini ortaya çıkarmak için çalışmalar yürütülmüştür. Hibrid sterilitéyi kontrol ettiği için 28'den fazla genin rapor edildiği ve S5 lokusunun, onu kontrol eden majör lokus olduğu kabul edildi. Bu modele göre, S5 lokusunda üç allel vardır: nötr bir allel (geniş uyumlu allel), S5n; bir indica aleli, S5i; ve bir japonicas alleli, S5j. Bu çalışmada S5n / S5i ve S5n / S5j genotipleri doğurgan olurken, S5i / S5j S5j aleli taşıyan gametin kısmi embriyo kurmarması nedeniyle yarı steril olacaktır [48]. Ebeveyn hatlarında ve hibrid RP01 x LIH ters çaprazlama hatları bulunan S5 lokusu alellerini belirlemek için dört PCR yapılmıştır



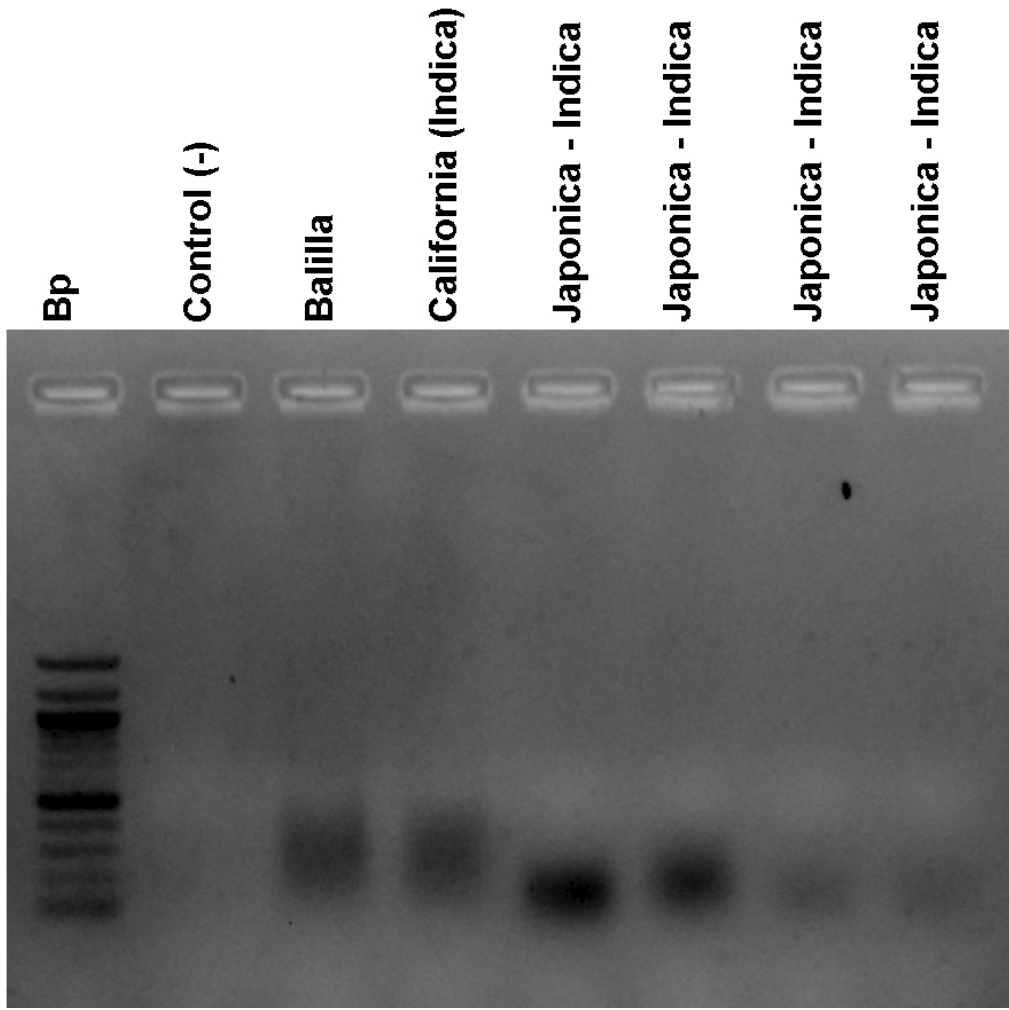
Şekil 4.6 RP01xLIH Geri Çaprazlaması

Çoklu bir PCR sonucunun bir örneği, sadece bir alelin hibrid RP01xLIH geri çaprazlama hatlarının üçünde başarıyla çoğaltıldığı durum

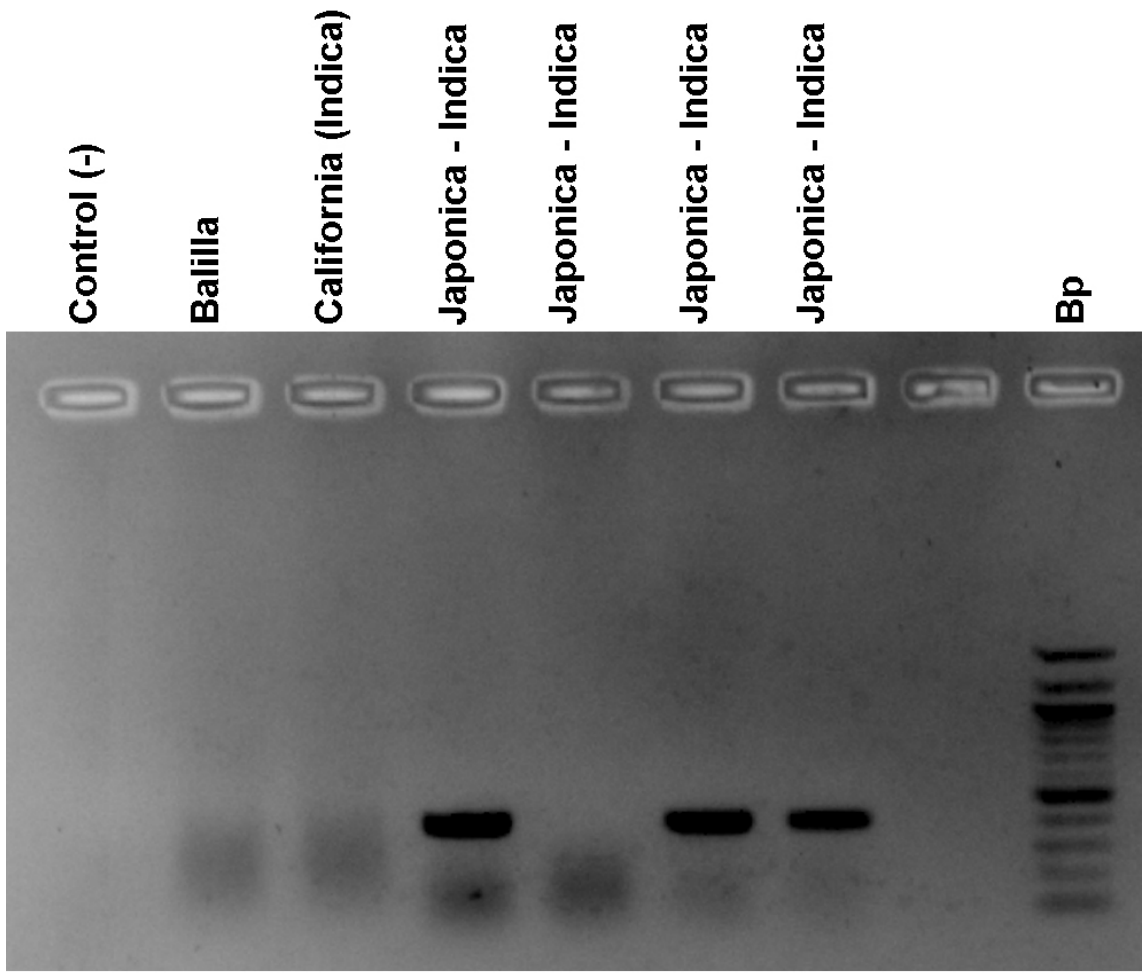
Ne yazık ki, multipleksleştirilmiş PCR'nin, hiçbir geçerli sonuç alınmadığı için daha da geliştirilmesi gerekmektedir. Sadece yükseltilmiş bant, nötr olmayan alellerin 417bp yükseltilmesine karşılık gelir. Bu alel, indica x japonica melezlerinin erken embriyo kurtarma sorunlarından biridir. Ebeveynlerin herhangi bir bandı büyütmediğine dikkat edin, bu nedenle çoğullaştırılmış PCR koşullarını daha da ayarlamak için yeni ebeveyn DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilir, beklenen alel bantları büyütülür.



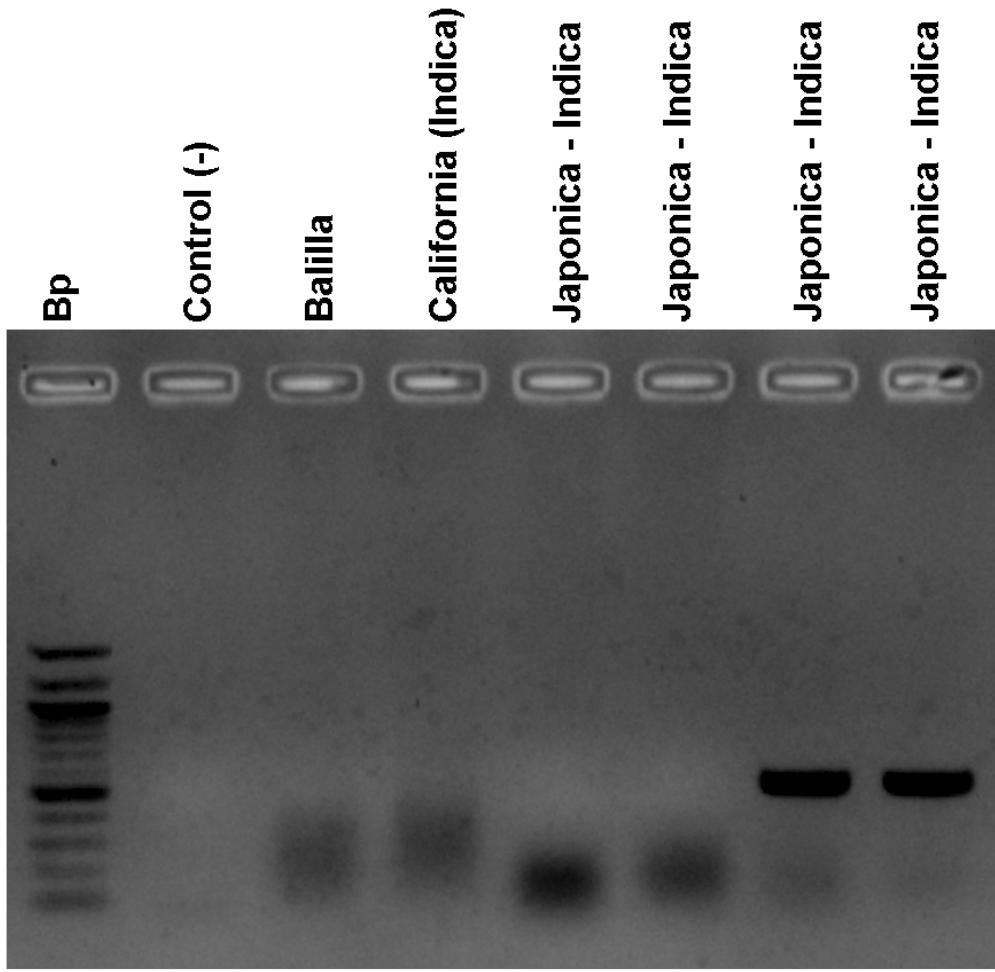
Şekil 4.7 AgaroZ Jel Görüntüsü 1



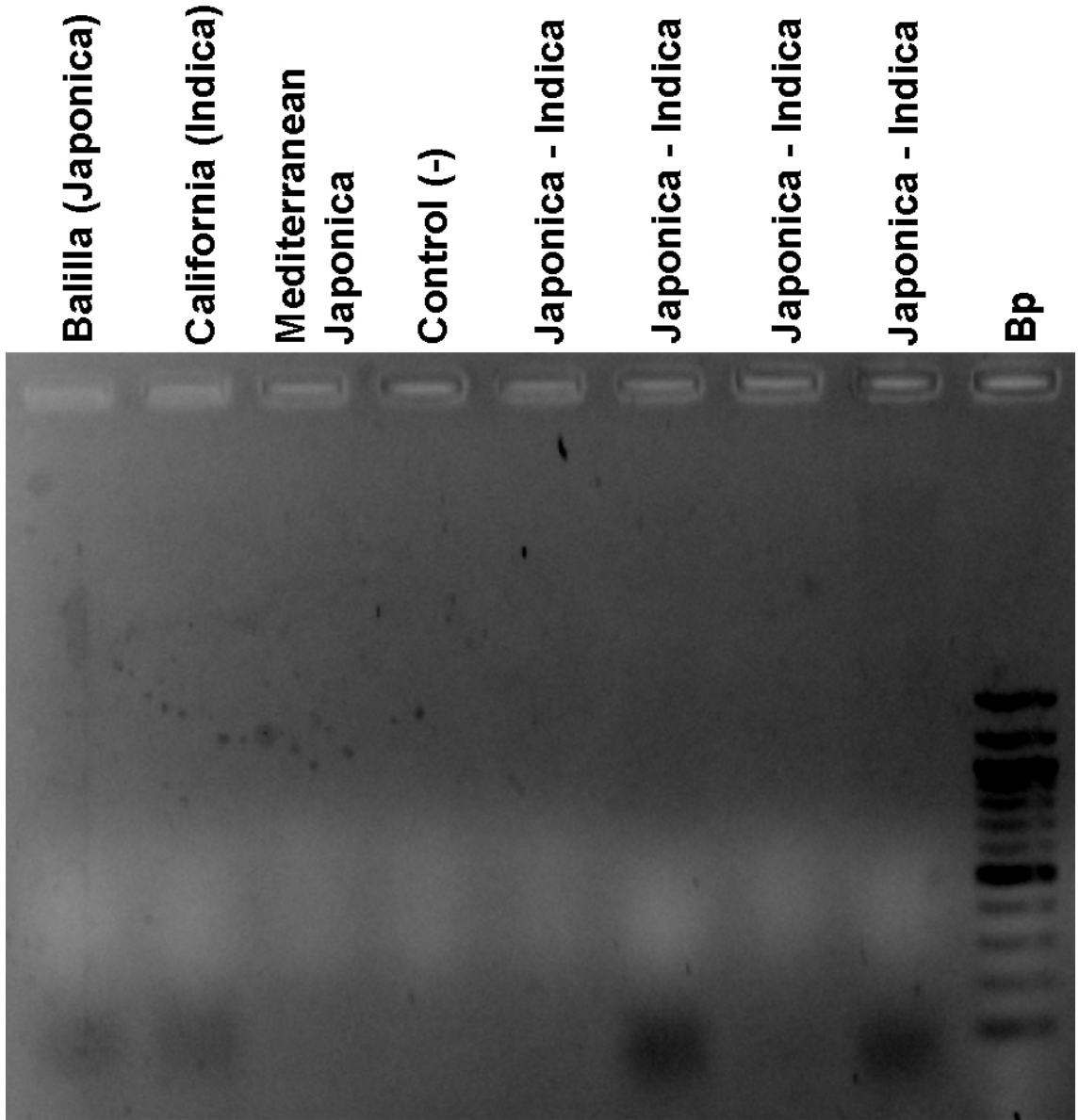
Şekil 4.8 PCR Örneği



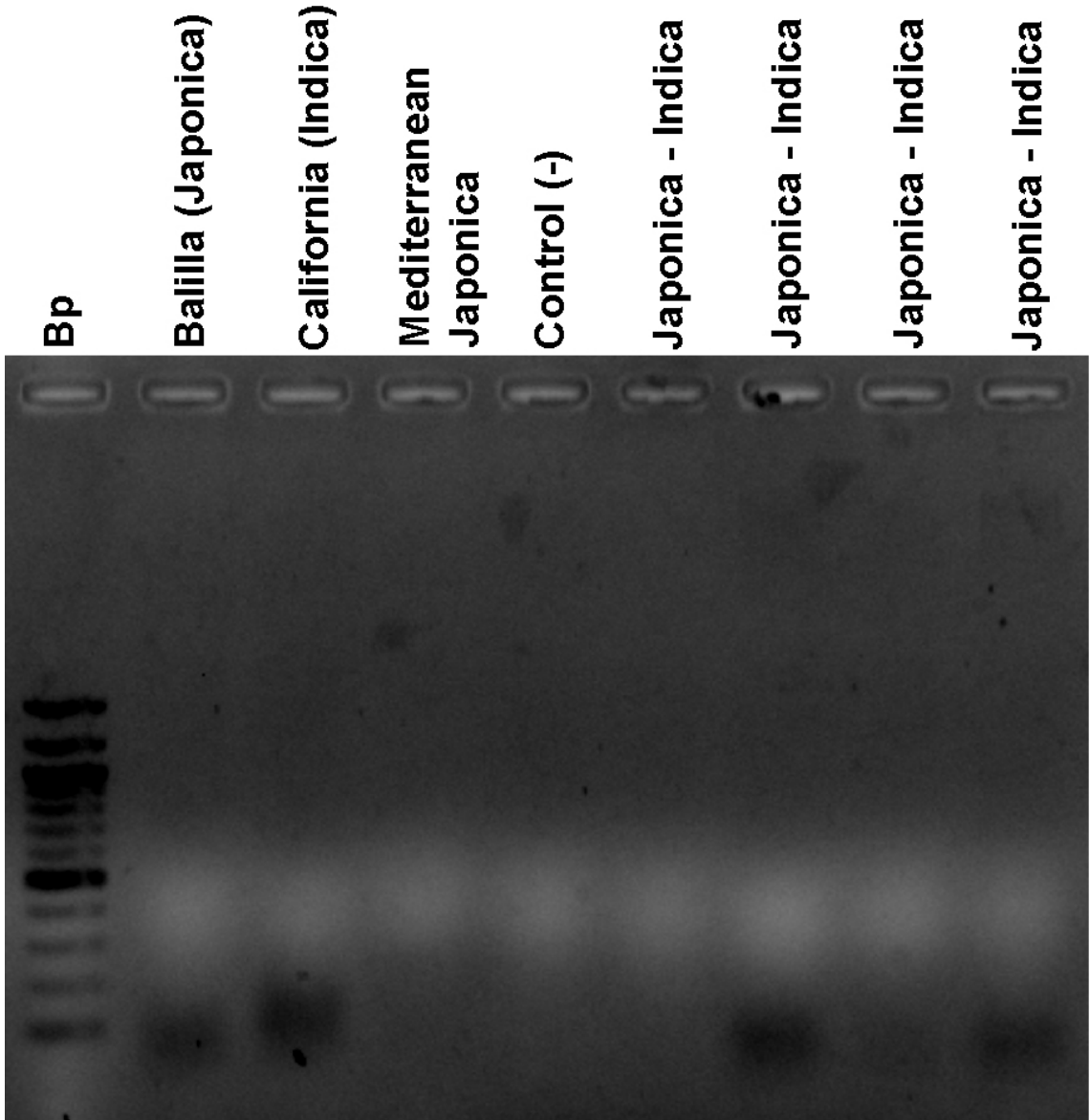
Şekil 4.9 Agaroze Jel Görüntüsü 2



Şekil 4.10 AgaroZ Jel Görüntüsü 3



Şekil 4.11 Agaroze Jel Görüntüsü 4



Şekil 4.12 Agaroze Jel Görüntüsü 5

Yapılan PCR performanslarında, ne yazık ki primerlerden kaynaklı net sonuçların alınamadığı, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12’de görülmektedir. Bununla birlikte Şekil 4.6’da elde edilen pozitif sonuçlar, deneylerin devam etmesi gerektiğini açıkça göstermektedir.

4.5 Sonuçlar

- L03 x LIH F1 hibritlerine kıyasla daha yüksek RP01 X LIH F1 hibrit embriyo miktarları elde etmesine rağmen, bir indica-japonica uyumsuzluğu olduğunu ortaya koyan düşük miktarda herbisite dayanıklı RP01 X LIH F1 hibrid bitki elde edilmiştir.
- RP01 X LIH F1 hibritleri, %89 ile %100 arasında değişen yüksek bir sterilitte gösterir, bu da güçlü bir türler arası sterilitenin varlığını göstermiştir.
- RP01 X LIH biri apraz (BC1) güçlü bir cinsel uyumsuzluk nedeniyle L03 x LIH ters çaprazlardan önemli ölçüde daha az bitki vermiştir.
- Eski yabani japonica eřidi RP01’de S5 olarak adlandırılmış bir indica x japonica türler arası uyumsuzluk merkezi tanımlanmıştır.
- Önerilen multipleks S5 allelleri PCR ayarlama problemlerinin daha iyi allel kombinasyonları gösteren backcross hatlarını seçmek için daha fazla multiplex polimeraz zincir reaksiyonunun yapılması gerekmektedir.

Tablo 1

NH ₄ H ₂ PO ₄	15,5 gr
K ₂ SO ₄	12,5 gr
NO ₃ NH ₄	2,8 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	108,4 gr
Urea	4,2 gr
EDTA-Fe	3,1 gr
Microelements	3 gr
Distile Su	5 lt

Tablo 2

MS Salts ve Vitamin	2,2 gr
Sükroz	20 gr
MES	250 mg
Gelrite	2,5 gr
Distile Su	1000 ml
pH	5,8

Tablo 3

Floratorf peat moss, (Floragard Vertriebs, Oldenburg)	225 l
1 vermiculite sack (3 mm)	100 l
CaCO ₃ (1 g / L peat)	225 gr
Osmocote Exact [15-9-12 + 2MgO +micronutrients]	325 gr

- [1] K. Shimamoto, R. Terada, T. Izawa, and H. Fujimoto, "Fertile Transgenic Rice From Protoplast.Pdf," *Nature*, vol. 338, pp. 274–276, 1989.
- [2] M. J. Carena, *Cereals*. 2009.
- [3] A. J. Garris, T. H. Tai, J. Coburn, S. Kresovich, and S. McCouch, "Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L.," *Genetics*, vol. 169, no. 3, pp. 1631–1638, 2005.
- [4] Commercial Section Madrid, "Product Report Rice Spain," 2018.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations, "Rice Market Monitor," 2018.
- [6] Mordor Intelligence, "CAGR of Rice", 15.08.2019, <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/europe-rice-market>.
- [7] P. Pinstруп-Andersen and P. B. R. Hazell, "The impact of the green revolution and prospects for the future," *Food Rev. Int.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–25, 1985.
- [8] Trade Reforms and Food Security. Rome, 2003.
- [9] N. V. Nguyen, "Global climate changes and rice food security," *Delta*, pp. 24–30, 2004.
- [10] World Bank, "US Department of Agriculture," 01.08.2019. <https://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=rice&months=360>.
- [11] K. N. Reddy and V. K. Nandula, "Herbicide resistant crops: History, development and current technologies," *Indian J. Agron.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [12] E. Sudianto, S. Beng-Kah, N. Ting-Xiang, N. E. Saldain, R. C. Scott, and N. R. Burgos, "Clearfield® rice: Its development, success, and key challenges on a global perspective," *Crop Prot.*, vol. 49, pp. 40–51, 2013.
- [13] R. Naylor, "Herbicide use in Asian rice production," *World Dev.*, vol. 22, no. 1, pp. 55–70, 1994.
- [14] T. P. Croughan, Clearfield rice: It's not a GMO, vol. 46. 2003.
- [15] H. Kraehmer, K. Jabran, H. Mennan, and B. S. Chauhan, "Global distribution of rice weeds - A review," *Crop Prot.*, vol. 80, pp. 73–86, 2016.
- [16] Weed Science Society of America, "Summary of Herbicide Mechanism of Action According to the Weed Science Society of America (WSSA)," no. 23, pp. 1–6, 2000.
- [17] Y. Sasaki and Y. Nagano, "Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 68, no. 6, pp. 1175–1184, 2004.
- [18] T. Konishi, K. Shinohara, K. Yamada, and Y. Sasaki, "Acetyl-CoA

- carboxylase in higher plants: Most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 37, no. 2, pp. 117–122, 1996.
- [19] B. J. Nikolau, J. B. Ohlrogge, and E. S. Wurtele, “Plant biotin-containing carboxylases,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 414, no. 2, pp. 211–222, 2003.
 - [20] C. Délye, “Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update,” *Weed Sci.*, vol. 53, no. 5, pp. 728–746, 2005.
 - [21] M. J. Kovach, M. T. Sweeney, and S. R. McCouch, “New insights into the history of rice domestication,” *Trends Genet.*, vol. 23, no. 11, pp. 578–587, 2007.
 - [22] H. Harlan and M. Pope, “The Use and Value of Back-Crosses in Small-Grain Breeding,” *J. Hered.*, vol. 13, no. 7, pp. 319–322, Jul. 1922.
 - [23] M. M. Hasan et al., “Marker-assisted backcrossing: A useful method for rice improvement,” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, no. 2, pp. 237–254, 2015.
 - [24] D. R. Sharmal, R. Kaur, and K. Kumar, “Embryo rescue in plants - a review,” *Euphytica*, no. 1906, pp. 2–3, 1996.
 - [25] S. Narayanaswami and K. Norstog, “Plant Embryo Culture,” pp. 587–628.
 - [26] R. Chatbanyong and L. Torregrosa, “A highly efficient embryo rescue protocol to recover a progeny from the microvine,” *Vitis - J. Grapevine Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 41–46, 2015.
 - [27] T. Ohnishi, M. Yoshino, H. Yamakawa, and T. Kinoshita, “The biotron breeding system: A rapid and reliable procedure for genetic studies and breeding in rice,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 52, no. 7, pp. 1249–1257, 2011.
 - [28] J. L. Maclean, D. C. Dawe, B. Hardy, and G. P. Hettel, *Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth*. 2002.
 - [29] H. Ikehashi, H. Araki, and O. Branch, “STERILITY IN REMOTE,” pp. 119–130.
 - [30] J. Chen et al., “A triallelic system of S5 is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of indica-japonica hybrids in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America_ Jiongiong Chen.pdf,” vol. 105, no. 32, 2008.
 - [31] Y. You-Xin et al., “Wide-compatibility gene S5exploited by functional molecular markers and its effect on fertility of intersubspecific rice hybrids,” *Crop Sci.*, vol. 52, no. 2, pp. 669–675, 2012.
 - [32] J. Doyle, JJ; Doyle, “Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue,” *Focus*, vol. 12, no. 1. pp. 13–15, 1990.
 - [33] S. P. Singh, R. M. Sundaram, S. K. Biradar, M. I. Ahmed, B. C. Viraktamath, and E. A. Siddiq, “Identification of simple sequence repeat markers for utilizing wide-compatibility genes in inter-subspecific hybrids in rice (*Oryza sativa* L.),” *Theor. Appl. Genet.*, vol. 113, no. 3, pp. 509–517, 2006.
 - [44] K. Moldenhauer and N. Slaton, “Rice Growth and Development,” in *Rice Production Handbook*, pp. 7–20, 2011.

- [45] SEDE, “Indicadores Economicos Trimestre II,” vol. 129, p. 30, 2010.
- [46] G. Zhang and Y. Lu, “Genetics of F1 pollen sterility in *Oryza sativa*,” in *Rice Genetics III*, vol. Volume 3, World Scientific Publishing Company, pp. 418–422, 2008.
- [47] J. Yang et al., “A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice,” *Science (80-.)*, vol. 337, no. 6100, pp. 1336–1340, 2012.
- [48] R. M. Sundaram et al., “Development and validation of a PCR-based functional marker system for the major wide-compatible gene locus S5 in rice,” *Mol. Breed.*, vol. 26, no. 4, pp. 719–727, 2010.



İletişim Bilgisi: selinuzunoglu@yahoo.com

Konferans Bildirileri

1. Selin UZUNOĞLU, Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Herbicide resistance allele introgression from a tropical indica rice donor plant to temperate japonica rice (*Oryza sativa*) varieties, I. Uluslararası Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Kongresi (TURJAF)



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Selin Uzunoğlu
Doğum Tarihi / Yeri	06.02.1991 / İstanbul
Yabancı Dil	İngilizce, İspanyolca
İletişim	selinuzunoglu@yahoo.com

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans	Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yıldız Teknik Üniversitesi (2016-2019)
Lisans	Endüstri Mühendisliği, Makine Fakültesi, Yıldız Teknik Üniversitesi (2009-2014)
Lise	Maltepe Anadolu Lisesi (2005 – 2009)

Yayınlar

Konferans Bildirisi	Selin UZUNOĞLU, Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Herbicide resistance allele introgression from a tropical indica rice donor plant to temperate japonica rice (<i>Oryza sativa</i>) varieties, I. Uluslararası Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Kongresi (TURJAF)
---------------------	---