



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Arabidopsis thaliana*'dan İZOLE EDİLEN *AtBor4*
GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI
ile AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'ne
AKTARILMASI**

SEDAT KARADENİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

İSTANBUL, 2016



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Arabidopsis thaliana*'dan İZOLE EDİLEN *AtBor4*
GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI
ile AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'ne
AKTARILMASI**

SEDAT KARADENİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

İSTANBUL, 2016

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında, bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Sayın **Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT**'e içtenlikle teşekkür ederim.

Deneylerim yürütülmesi sırasında hep yanımda olan ve yardımlarını hiç esirgemeyen **Doç. Dr. Filiz VARDAR**'a, **Arş. Gör. Salim SÜNER**'e, **Mehmet Emin URAS**'a, **Fatih TABANLI**'ya, **Recep VATANSEVER**'e, **Berk BERKER**'e ve son olarak da, tüm eğitim hayatım boyunca her türlü desteği gösteren annem **Meda KARADENİZ**, babam **Cemil KARADENİZ**'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmadan elde edile veriler aşağıdaki bilimsel aktivitelerde sunulmuştur.

I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, H. Tombuloglu, E. Filiz, Optimization of *Agrobacterium*-mediated gene transfer systems in Turkish sunflower (*Helianthus annuus* L.) varieties, 19th International Sunflower Conference, Edirne, Turkey, 2016, May 29-June 03, 2016, (Sözlü Sunum)

S. Karadeniz, H. Tombuloglu, I. I. Ozyigit, *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis BOR4* gene to develop B-tolerant sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars, IX International Symposium on *in vitro* Culture and Horticultural Breeding, March 13-17, 2016, (Sözlü Sunum)

S.Karadeniz, I. I. Ozyigit, H. Tombuloglu, I. E. Yalcin, *In vitro* Propagation of some Widely Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus* L) Varieties in Turkey, Türkiye'de Yaygın Olarak Ekilen Bazı Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L) Varyetelerinin *in vitro* Çoğaltımı, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık, 2015 (Poster)

Ekim, 2016

Sedat KARADENİZ

İÇERİK

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ayçiçeği Bitkisinin Botanik ve Taksonomik Özellikleri	4
2.2. Bitki Besin Elementi Olarak Bor	7
2.2.1. Genel Özellikler	7
2.2.2. Bor İçeren Moleküller	8
2.2.3. Bor ve Yaşam	8
2.2.4. Bitkilerde Bor Elementinin Alınımı ve Taşınması	10
2.3. Bitki Doku Kültürü Çalışmaları	13
2.3.1. Bitki Doku Kültürlerinin Bitki Islahındaki Uygulama Alanları	14
2.3.2. Bitki Doku Kültürünün Ticari ve Islah Dışı Uygulamaları	16
2.4. Bitkilere Gen Aktarımı	21
2.4.1. DNA'nın Aktarılması	22
2.4.2. Direkt (Doğrudan) Gen Aktarım Metodları	22
2.4.3. İndirekt (Dolaylı) Gen Aktarım Metodları	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Bitki Materyali	34
3.2. Kimyasallar	34
3.3. Besiyerinin Hazırlanması	36
3.3.1. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı	36
3.4. Sterilizasyon Teknikleri	36

3.5. Tohum Çimlendirilmesi ve Kültür Koşulları	37
3.6. Direkt Gövde Rejenerasyonu	38
3.7. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Gen Aktarımı	38
3.8. PCR Koşulları	42
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	60



ÖZET

***Arabidopsis thaliana*'dan İZOLE EDİLEN *AtBor4* GENİNİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞI ile AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'ne AKTARILMASI**

Ülkemiz, Dünya üzerinde en yüksek bor rezervlerine sahiptir ve en büyük bor üreticisi konumundadır. Bor madenleri, tarımsal sulamadan ve yağışın etkisi ile kirlenen tarımsal arazilerde ürün kalitesinde düşüslere neden olmaktadır. Bu çalışma bitkilerin maruz kaldığı toksik düzeydeki bora karşı bitkileri dirençli hale getirmeyi amaçlamaktadır.

Bu çalışmada, *Arabidopsis thaliana*'dan izole edilen *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile ayçiçeğı (*Helianthus annuus* L.) bitkisinin yurdumuzda yaygın ekimi yapılan 3 değerli varyetesine (Trakya 3080, Palancı ve Tarsan) aktarılmış ve bor (B) elementine dirençli bitkilerin elde edilmesi için çalışılmıştır. Çalışmada haberci ve marker gen olarak *GFP* ve *NPTII* genleri kullanılmıştır.

Transgenik bitkilerin rejenerasyon yüzdeleri ve tam bitki *AtBor4* geni eldesi ile transgenik olmayanları karşılaştırıldığında transgenik bireylerin daha düşük yüzdelere sahip olduğu görülmüştür. Trakya 3080; kotiledon nodları %11.65 ve meristematik gövde uçları %8.07, Palancı; kotiledon nodları %7.4 ve meristematik gövde uçları %5.4, Tarsan; kotiledon nodları %8.7 ve meristematik gövde uçları %6 olarak görülmüştür.

Çalışmada transgen başarısı *GFP* geninin ışımaya yapması ve *AtBor4* geninin jel elektroforezi sonucu 3200 baz çifti bölgede bantlar oluşturması ile gözlenmiştir.

ABSTRACT

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of *AtBor4* Gene into Sunflower (*Helianthus annuus* L.)**

Turkey has the highest boron reserves in the world and it has been also the largest boron producer. The contaminations from boron mines, and effects of wrong irrigation methods and rainfalls decrease the product quality in agricultural land. This study thus aims to increase the B-tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants.

In this study, *AtBor4* gene from *Arabidopsis thaliana* was transformed into three widely cultivated sunflower (Trakya 3080, Palancı and Tarsan) varieties in Turkey via *Agrobacterium tumefaciens* in order to obtain B-tolerant plants. *GFP* and *NPTII* genes were used as reporter and marker genes respectively.

The comparison of regeneration percentages in transgenic plants and whole plant *AtBor4* gains along with non-transgenes showed that transgenic individuals had lower percentages. Following regeneration rates have been calculated; Trakya 3080 (cotyledon nodes with 11.65% and meristematic stem ends with 8.07%), Palancı (cotyledon nodes with 7.4% and meristematic stem ends with 5.4%), and Tarsan (cotyledon nodes with 8.7% and meristematic stem ends with 6.0%).

The success of transgenes was verified with emission of GFP protein and formations of 3200bp bands from *AtBor4* gene on electrophoresis.

October, 2016

Sedat KARADENİZ

SEMBOL LİSTESİ

%	:	Yüzde
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikro Molar
B	:	Bor
Ca	:	Kalsiyum
Cd	:	Kadmiyum
CO₂	:	Karbondioksit
Cu	:	Bakır
Fe	:	Demir
gr	:	Gram
K	:	Kelvin
K	:	Potasyum
Kg	:	Kilogram
M	:	Molar
Mg	:	Magnezyum
mg	:	Miligram
Mhz	:	Megahertz
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar

Mn	:	Mangan
Na	:	Sodyum
Ni	:	Nikel
nm	:	Nanometre
°C	:	Santigrad derece
Zn	:	Çinko
µg	:	Mikrogram
Pb	:	Kurşun
Mo	:	Molibden
Hg	:	Civa
Co	:	Kobalt

KISALTMALAR

bp	: Baz çifti (Base pair)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinukleotid trifosfatlar
Kla	: Klorofil a
Klb	: Klorofil b
MS	: Murashige ve Skoog Besiyeri
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
ppm	: Part per million (Milyonda bir)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA)
Taq DNA polimeraz	: <i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Ayçiçeği bitkisi'nde bazı bitki kısımlarının illüstratif çizimi	5
Şekil 2. Pamuk (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) bitkisinde direkt organogenez. (Ozyigit ve Gozukirmizi, 2009).	17
Şekil 3. Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i> L.) bitkisinde indirekt organogenez. (Ozyigit ve ark., 2007).	18
Şekil 4. Solda <i>Digitalis trojana</i> bitkisinde hipokotil eksplantlarından direkt somatik embriyogenez (Verma ve ark., 2012), sağda <i>Coffea arabica</i> L. bitkisinde embriyonik kalluslardan indirekt somatik embriyogenez (Gatica-Arias ve ark., 2008).	19
Şekil 5. Solda elektroporasyon cihazı, sağda akım vermeden önce, akım esnasında ve akım sonrası hücre zarının elektron mikrografi görüntüsü.	23
Şekil 6. Solda partikül bombardımanı (biyolistik) cihazı, sağda biyolistik ile <i>GUS</i> geni aktarılmış <i>Triticum aestivum</i> ve <i>T. durum</i> bitkilerine ait kalluslarının doku kültürü ortamındaki gelişimleri (Patnaik ve Khurana, 2003).	24
Şekil 7. Solda Ti plazmidi, T-DNA, vir bölgesi ve T-DNA'nın bitki hücresine aktarımı, <i>A. tumefaciens</i> ile muamele edilmiş hastalıklı (üst) ve sağlıklı (alt) havuç dilimleri (Ozyigit, 2012).	26
Şekil 8. <i>A. tumefaciens</i> 'in bitki hücresine gen aktarım aşamaları (Ozyigit, 2012)	28
Şekil 9. Octopine tipi Ti plazmidinin genetik haritası	30
Şekil 10. <i>A. rhizogenes</i> R1000 suşuna ait hücrenin ayçiçeği kotiledon nodu hücresine tutunmasının scanning elektron mikroskopu görüntüsü (Ozyigit ve ark., 2013).	33
Şekil 11. Ayçiçeği bitkisinde yüzey siterilizasyonu ve çimlenme aşamaları.....	37
Şekil 12. pEarleyGate 103 (c-GFP-His) vektör sistemi.	39
Şekil 13. pEarleyGate103 vektörü üzerindeki T-DNA bölgesi (Earley K ve ark., 2006).	39
Şekil 14. Gen aktarımı aşamaları.....	41
Şekil 15. Hormon içermeyen MS ortamında 10 günlük çimlenen ayçiçekleri.....	44
Şekil 16. 0,25 mg/L NAA (1-Naphthaleneacetic acid) ve 1 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine) içeren MS besi ortamında direkt organogenez (Üst meristematik uç, alt kotiledon nodu)	45
Şekil 17. 1 mg/L IBA (Indole-3-Butyric acid) içeren MS ortamında köklenen ve daha sonra toprağa aktarılan bitkiler.	47

Şekil 18. Transgenik ayçiçeğinde GFP proteinin ışıma yaptığı yaprak çok hücreli tüyü	48
Şekil 19. Gen aktarımı yapılmamış kontrol bitkisi.	49
Şekil 20. Transgenik ayçiçeğinde GFP proteinin ışıma yaptığı gövde dokusu	50
Şekil 21. Transgenik ayçiçeğinde GFP proteinin ışıma yaptığı parenkima hücreleri	51
Şekil 22. Gen aktarımı yapılmamış kontrol bitkisi gövdesinde ışımanın olmayışı.	51
Şekil 23. <i>AtBor4</i> geni aktarımı yapılmış ayçiçeği bireylerinin agaroz jel görüntüsü	52



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Bor gereksinimlerine göre bitkilerin gruplandırılması (Kacar ve Katkat, 1998)	11
Tablo 2. <i>In vitro</i> bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri	18
Tablo 3. MS Kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962)	34
Tablo 4. <i>A. tumefaciens</i> suşlarının üretiminde kullanılan Luria Broth (LB) sıvı besiyeri	38



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bor minerali, bitkiler tarafından eser miktarda gereksinim duyulan, yetersizlik ve toksisite sınırı birbirine en yakın olan mikro elementtir (Goldberg ve Suarez, 2014). Bor saf olarak ilk kez 1808 yılında Fransız kimyager J.L. Gay-Lussac ve Baron L.J. Thenard ile İngiliz kimyager H. Davy tarafından elde edilmiştir. Bor, periyodik sistemde “B” simgesi ile gösterilen 3 A Grubuna ait, atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81, yoğunluğu 2,34 g/cm³ olan **bitki besleyici elementler** içinde metal olmayan tek elementtir (Gan ve ark., 2012).

B bitki gelişiminde önemi olan, esansiyel elementlerden biridir. B’un az olması bitkide çeşitli dokuların oluşumunu ve gelişmesini yavaşlatırken bitkilerin ozmotik basıncını bozar. Ancak B, bitki bünyesinde aşırı miktarda bulunduğunda son derece olumsuz etkilere de sebep olabilmektedir. Sulama suyundaki B derişiminin yüksek olması durumunda, bitki yaprağında sararma, yanma, yarılma, olgunlaşmamış yapraklarda dökülme ve büyüme hızının yavaşlaması ile ürünlerde verimliliğin azaldığı gözlenmektedir (Maurel ve ark., 2016; Khan ve ark., 2016). Toprakta bitkinin ihtiyaç duyduğu B miktarı ile toksik etkiye sahip olabilecek B miktarı bitkiden bitkiye farklı olmakla birlikte, dar bir aralıkta değişmektedir (Gormus ve Barutcular, 2016).

Yüksek miktarda B elementine maruz kalan bitkilerde genel olarak direncin azalması, gelişmenin durması, yaprak semptomları (yaşlı yapraklarda yaprak uçlarının sararması, nekrozların görülmesi ve kuru ağırlığın azalması) ve meyve semptomları (meyve ağırlığı, büyüklüğü ve sayısının azalması) görülmektedir (Gupta ve ark., 2014; Bar, 2015).

Topraktaki B içeriği ortalama 10-20 mg/kg, deniz suyunda 0,5-9,6 mg/kg, tatlı sularda ise 0,01-1,5 mg/kg aralığında değişmekte olduğu bildirilmiştir. Sulama suyunda bulunması gereken B miktarı, tarımı yapılan bitkinin bor ihtiyacı/toleransına göre 0,3 ile 4 mg/kg arasında değişmektedir (Keren ve Bingham, 1985; Dey ve ark., 2013).

Ülkemiz gibi kurak ve yarı kurak iklimlere sahip ve buharlaşmanın fazla olduğu bölgelerde topraktaki B minerali birikimi artmaktadır. Aynı şekilde B madeni etrafında bulunan tarım arazilerinde B birikimi en yüksek düzeye çıkmaktadır. Toptakta biriken B tarımsal ve ekonomik önemi olan bitkiler için (buğday, arpa, ayçiçeği, nohut gibi) rekolte kaybına

neden olacak şekilde toksik etki oluşturmaktadır (Hamurcu ve ark., 2015; Gormus ve Barutcular, 2016).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda B fazlalığında ürün ve kalite kaybını azaltmada en kabul görmüş çözüm dirençli ya da toleranslı türlerin seçilmesi ve bu türler ile kirliliğin olduğu bölgelerde tarımın yapılmasıdır. Örneğin fazla miktarda varyetesi bulunan buğdayın B kirliliğine karşı dirençli olan varyetelerinin seçilmesi ve bor kirliliği olan topraklara ekilmesi ürünün rekoltesini arttırmıştır (Jefferies ve ark., 2000; Reid, 2013).

Tohumun çimlenmesinden gelişimine, yaprağından meyveye kadar bitkinin değişik kısımlarında bor kirliliği kaynaklı etkiler gözlenebilmektedir. Bu olumsuz etkiler verimliliği düşürerek, üretim kaybına neden olmaktadır (Reid, 2013). Borun özellikle bitkilerde nükleik asit metabolizması, karbonhidrat ve protein metabolizması, hücre duvarı sentezi, hücre duvarı yapısı, membran bütünlüğünü, fonksiyonu ve fenol metabolizması üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015; Mounet-Gilbert ve ark., 2016).

Bitkiler üzerinde toksik etki gösteren B fazlalığının bitkiye olan etkisi türden türe değişiklik göstermektedir. Türler ve hatta tür varyeteleri arasında da bu farklılığın olduğu bilinmektedir. Bu farklılığın neden kaynaklandığı ise özellikle moleküler düzeyde son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Ulusik ve ark., 2011; Capula-Rodriguez ve ark., 2016).

Yaptığımız çalışmada Asteraceae familyasının en önemli temsilcilerinden biri olan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) tercih edilmiştir. Ayçiçeğinin tercih edilmesinin nedenleri arasında önemli bir ticari bitki oluşu ve ülkemizde Akdeniz ikliminin görüldüğü birçok bölgede kolaylıkla yetiştirilebilmesi gelmektedir (Ozyigit ve ark, 2002; Chowdhury, 2015). Ayçiçeği bitkisinin tohumlarından yağ elde edilmesinin yanı sıra tohumlarının büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar için yem olarak kullanılması ve yine tohumlarından elde edilen yağın biodizel ham maddesi kullanılması dolayısıyla ticari olarak oldukça önem taşıyan bir bitki olması birçok araştırmaya konu olmasını sağlamıştır (Ozyigit ve ark, 2006; Liu ve ark., 2014; Chowdhury, 2015). Ayrıca, son yıllarda giderek önemini arttıran gen transferi çalışmalarında, ayçiçeği için etkili metotlar geliştirilmiş ve geliştirilmektedir (Presotto ve ark., 2012).

Dünya genelinde en yüksek B rezervine sahip olan ülkemiz, dünyanın en büyük B üreticisi konumundadır. B madenlerinin çevresinde bulunan geniş tarım arazileri sulama suları ve yağışın etkisi ile bor ile kirlenmekte ve tarımsal ürün verimliliğinde düşüslere neden olmaktadır (Col ve Col, 2003; Bocuk ve Ture, 2014).

Bu çalışmada, ticari ve botanik öneme sahip bitkilerin, toksik miktardaki B'a karşı olan direncinin arttırılması amaçlamaktadır. Bu tez çalışmasında, *Arabidopsis thaliana* bitkisinden izole edilen *AtBor4* geni doğal gen aktarımı tekniği kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile ekonomik değeri yüksek olan ayçiçeği bitkisine aktarılmıştır. Bu sayede rekombinant bitkiler elde edilerek, yüksek miktarda B içeren tarım arazilerinde yetiştirilmek üzere, verimli ve B'a toleranslı olan bitkilerin geliştirilmesi için bir adım atılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ayçiçeği Bitkisinin Botanik ve Taksonomik Özellikleri

Alem	:	Plantae
Bölüm	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Alt sınıf	:	Asteridae
Takım	:	Asterales
Aile	:	Asteraceae
Cins	:	<i>Helianthus</i>
Tür	:	<i>Helianthus annuus</i> L.

Türkiye Florası (Flora of Turkey)'nda Asteraceae (papatyagiller) familyasının tür bakımından en zengin familya olduğu belirtilmiştir. Tek yıllık ve çok yıllık otsular veya çalı şeklinde olan bitkilerdir. Yaprakları alternat veya bazen karşılıklı, stipulsuz, tam kenarlı, değişik şekillerde parçalı olup, nadiren hepsi tabandadır. Çiçek birimleri (kapitula), çok sayıda çiçekten oluşur, nadiren tek çiçeklidir (Kenny ve ark., 2014). Çiçeklerde kaliks ya papus ya halka veya pul biçimindedir ya da yoktur. Ovaryum alt durumlu (inferior), iki karpelden meydana gelmiş tek ovüllü, meyve tipi akendir (Andrade ve ark., 2015; Freitas ve ark., 2015).

Asteraceae familyası, ekonomiye büyük oranda katkıda bulunmaktadır. Bu familya, gıda bitkileri, hammadde kaynakları, tıp ve ilaç bitkileri, körpe ve sulu bitkileri, yabancı zararlı otları ve zehirli bitkileri bünyesinde bulundurmaktadır (Asnaashari ve ark., 2015; Perez-Ortiz ve ark., 2015). Bu familyada endemik türler bulunmaktadır. 126 cinsten 40'ı endemik tür içerir. 1132 türün 430'u endemiktir. Endemizm oranı %38'dir (Kaya ve Aksakal, 2005).



Şekil 1. Ayçiçeği bitkisi'nde bazı bitki kısımlarının illüstratif çizimi

Ayçiçeği bu familyanın önde gelen üyeleri arasındadır. Helianthus, Yunanca'da güneş anlamındaki Helios ve çiçek anlamındaki Anthos'tan gelir. Yabani türlerinin çoğu Kuzey Amerika'ya özgü olmakla birlikte yaklaşık 67 tane bilinen türü bulunmaktadır. İspanyollar tarafından 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiş süs ve bahçe bitkisi olarak kullanılmıştır. Ayçiçeğinin yağ kaynağı olarak ilk kullanımı 18. Yüzyılda Rusya'da gerçekleşmiştir. Ülkemizde ise 1924-1928 yıllarında balkanlardan gelen göçmenler tarafından ekimi yapılmıştır. (Ozyigit ve ark., 2007; Elezovic ve ark., 2012; Boriollo ve ark., 2014).

Ayçiçeği tüm dünyada birçok farklı coğrafyada yetiştirilmektedir. Ancak hiçbir üretici ülke, küresel üretimin %15'inin üzerinde üretim gerçekleştirememektedir. Dünyada ve ülkemizde ayçiçeğinin pazar değeri her geçen gün artış göstermektedir. Bununla birlikte ayçiçeği bitkisinden yağ üretiminin yanı sıra un, yem, biodizel gibi endüstrilerde de hammadde veya katkı maddesi olarak da yararlanılabilmektedir. Dünya ayçiçeği üretimi 23 milyon tona yakındır. Ülkemiz, dünya ayçiçeği üretimi ve ekim alanları sıralamasında ilk on ülke arasındadır (Pereyra-Irujo ve ark., 2009; Hofman ve ark., 2011).

Halkımızın bitkisel yağ olarak ayçiçek yağını tercih etmesi ve özellikle Trakya Bölgesinde ekim nöbetinde buğday ile sıralı ekimi, geniş adaptasyon kabiliyetine sahip olması gibi özelliklerinden dolayı ayçiçeği, ülkemizde yetiştirilen en önemli yağ bitkisi haline gelmiştir (Kaya, 2004, Citak ve ark., 2012).

Yıldan yıla değişmekle beraber ülkemizde ortalama 500-600 bin hektar arasında ayçiçeği ekimi yapılan ayçiçeği, üretim ise 600-850 bin ton civarlarındadır. Ülkemizdeki ayçiçeği ekim alanlarının %47,2'si Trakya-Marmara, %29,2'si İç Anadolu, %12'u Karadeniz, %1,1'ü Ege ve %1,8'i Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde bulunmaktadır (Ozyigit ve ark., 2007; Karabas, 2013; TUIK, 2016).

Ayçiçek yağının besin değeri oldukça yüksektir ve dünya bitkisel ham yağ üretiminde %11'lik bir paya sahiptir. Ülkemizde ise bu oran % 47 civarındadır. (Iqbal ve Bhanger, 2007; TUIK, 2016).

Birçok ayçiçeği varyetesinin, Rusya, Arjantin, Avustralya, Hindistan, Ukrayna, Türkiye ve ABD gibi bazı ülkelerde başarıyla yetiştirildiği bildirilmiştir. Ayrıca, bitkinin pek çok strese karşı toleransının oldukça yüksek; tohum verimi, tohum yağ oranı, yağ asitlerinin kompozisyonu gibi özelliklerinin varyete ve ekim zamanına göre değişebildiği belirtilmiştir (Moreno ve ark., 2013; Henry ve ark., 2014; Filippi ve ark., 2015). Kuraklığa dayanıklı bir bitki olarak bilinmesine rağmen yaz ayları kurak geçen bölgelerde yetiştirilmesi oldukça zahmetlidir. Zengin kireç ve potasyum içeren toprakları seven ayçiçeği bitkisinin çorak ve tuzlu topraklarda yetiştirilmesi olanaksızdır (Ghobadi ve ark., 2013; Barman ve ark., 2014; Jan ve ark., 2015). Allelopatik ilişki bakımından baklagillerden sonra ekildiğinde verim oranı oldukça yükselir (Seyyedi ve ark., 2013).

Ayçiçeği bitkisi insan sağlığı bakımından da önemli bir besin kaynağıdır (Refstie ve ark., 2010; Ozaslan ve ark., 2016). Bu da yağının içerdiği doymamış yağ asitleri oranının yüksek (%69) olmasından kaynaklanır (Roman ve ark., 2013). Ayçiçeği, yağ sanayinin yanı sıra sabun ve boya sanayinde de kullanılmaktadır (Nyakudya ve ark., 2015).

2.2. Bitki Besin Elementi Olarak Bor

2.2.1. Genel Özellikler

B bileşikleri binlerce yıl önce bilinmesine rağmen, element olarak 1824 yılında John Jacob Berzelius tarafından tanımlanmıştır (Thornton ve Burdette, 2013). Etimolojik olarak “Bor” ismi, Arapça kökenli kelime olan “buraq” ve Farsça kökenli kelime olan “burah” kelimelerinden gelmektedir (Maathuis ve Diatloff, 2013).

Bor, doğada borat formunda okyanuslarda, tortul kayalarda ve bazı topraklarda bulunan bir elementtir (Sonon ve ark., 2014). Boratların bu doğal kaynaklarından çevreye salınımı gerçekleşir. Bor, ayrıca az miktarlarda da olsa antropojenik kaynaklardan çevreye salınmaktadır (Howe, 1998; Petelet-Giraud ve ark., 2009).

Ülkemiz, dünyada borat ürünlerinin en büyük üreticisi konumundadır. Dünya bor rezervlerinin 885 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir. Bu rezervlerin %72.2’lik oranı ülkemizde bulunmaktadır. ABD, Çin, Şili, Peru ve Rusya geri kalan oranı paylaşmaktadırlar (BOREN, 2001; Tonbuloglu, 2010; Levent ve ark., 2016).

2.2.2. Bor İçeren Moleküller

Bor içeren moleküllere bitkilerin hücre duvarında bulunan boron B-Rhamnogalacturonan II (RG-II) kompleksi, bir su bakterisi olan *Vibrio harvei* bakterisindeki bakteriyel quorum-sensing sinyal molekülleri AI-2 örnek olarak verilebilir (Chen ve ark., 2002).

B-Rhamnogalacturonan (RG-II) kompleksi, ilk kez 1978 yılında Darvil ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Darvill ve ark., 2014). Bu kompleks gelişmiş bitkilerin hücre duvarlarında polisakkarit formunda bulunur ve şeker monomerleri ile çeşitli enzimler içerirler. Bu kompleks bitkileri dış etkilere karşı korumada görevlidir. Bu da Bor elementinin bitki hücre duvarlarında bulunan ana maddelerden biri olduğunu göstermektedir (Tan ve ark., 2013).

2.2.3. Bor ve Yaşam

Bor elementi her canlı için önemli bir elementken bitkilerdeki gereksinimi diğer canlılara göre çok daha fazladır (Bolaños ve ark., 2014). Canlılarda B varlığı ilk defa 1923 yılında Warington tarafından, fasulye bitkisinde bulunmuştur (Abreu ve ark., 2014). Hücre duvarının yapısına katılan bor, genellikle toprakta yeterli miktarlarda bulunmaktadır. Bu nedenle de bor birçok tür için önemli bir mikrobesein elementidir (Ganie ve ark., 2013; González-Fontes ve ark., 2014).

2.2.3.1. Hayvanlar ve Bor

Son araştırmalar göstermiştir ki bor hayvanlarda yaşamın erken safhalarında gerekli olan bir elementtir. Bor eksikliğinin en büyük etkisi, kurbağalar ve zebra balıkları ile yapılan çalışmalarda embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilemesi şeklinde göze çarpmıştır (Chatterjee ve ark., 2014).

2.2.3.2. İnsanlar ve Bor

Bor elementi insanlarda çok önemli bir role sahiptir. Embriyogenez, kemik gelişimi ve sertliği, immün yanıt oluşturulması gibi pek çok önemli görevleri içeren bor yaşamımızı sürdürmemiz için gerekli maddelerden biridir (Ciani ve Ristori, 2012; Nielsen, 2014). Vücut içerisinde pek tutulmayan bor elementinin % 90-95 civarı üre ile dışarı atılmaktadır (Gumusderelioglu ve ark., 2015). Sadece, kemik, tırnak, karaciğer ve dalak gibi organlarda birilmektedir (Rahal ve Shivay, 2016). Bor'un toksik etkisi de düşüktür.

Yapılan bir çalışmada Bor'un kronik etkisinin ise sadece protein metabolizmasını etkilediği ve idrardaki azot miktarını arttırdığı saptanmıştır (Moseman, 1994). Bor'un toksik etkisi yetişkinlerde baş ağrısı, kusma, ishal, depresyon çocuklarda ise daha çok havale, koma ve beyin hasarı şeklinde görülmektedir (Hosagoudar ve ark., 2012). Bunun yanı sıra bor insan vücudu için faydalı etkilere de sahiptir. Bor'un kalsiyum ve D vitamini olmak üzere vücut minerallerinin düzenlenmesinde rol oynadığı, kalsiyum ve magnezyumun azalmasını önleyerek kemik yapısını koruduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2014). Kalsiyum ve magnezyum eksikliğinden kaynaklanan stresi önlemek için günde 1 mg borun insan vücuduna yararlı olduğu saptanmıştır (WHO, 1998). Bor mineralinin kalsiyum ve D vitaminin aktivasyonun yanında, kemik dokusunun korunması ve çözülmüş tuzların uzaklaştırılmasını önlenmesinde, bağışıklık ve hormonal sistemin güçlendirilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca Bor minerali, kalsiyum ve D vitamini eksikliğinden kaynaklanan osteoporoz riskini önlediği, vitamin D ve steroid hormonunun aktif şekline dönüşmesine yardımcı olduğu saptanmıştır (Hunt, 2012; Kurbel, 2013). Bor, beyin kanseri tedavisinde de kanserli hücrelerin etkisiz hale getirilmesinde kullanılmaktadır. Prostat, meme, akciğer kanseri ve lösemi tedavisi için bor bileşikleri kullanılmıştır (Barranco ve ark., 2009). Bor elementinden faydalanarak yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin mitoz bölünme sayısında azalma tespit edilmiştir. Bu azalmalar tümör büyüklüğünde de gerilemeye yol açmıştır (Kawaji ve ark., 2015).

2.2.3.3 Bitkiler ve Bor

Bor elementi bitkilerin yaşamı için gerekli mikro besin elementlerinden biridir (Bhasker ve ark., 2015). Bitkilerde toprak ve iklim faktörlerine bağlı olarak bor noksanlığı ve toksisite belirtileri diğer mikro besin elementlerine göre daha yaygın olarak görülmektedir. Bitkilere bor durumunu etkileyen başlıca toprak faktörleri şunlardır: pH, tuz içeriği, organik madde, kireç, tekstür ve değişebilir katyonlardır (Sarkar ve ark., 2014).

Bor, topraklarda değişik formlarda bulunmakta ve değişik kategorilere ayrılmaktadır. Borun bitkiler tarafından alımını etkileyen en büyük faktör toprak özelliği ve toprak pH'sıdır. Aşırı kireçli topraklar ve toprağın pH'sındaki yükselmeler bitkilerde bor alımını azaltan faktörlerin başında gelmektedir (Turan ve ark., 2013). Bor elementi bitkilerde

noksanlık ve toksitite belirtileri en yaygın görülen mikro elementlerin başını çekmektedir (Sarkar ve ark., 2014; Gormus, 2016).

Bor bitkilerde, hücre duvarının oluşması ve yapısında, şeker sentezinde, karbonhidrat ve RNA metabolizmasında, solunumda, Indol asetik asit (IAA) metabolizmasında, biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel özellikleri üzerinde kilit rol oynar ve önemli özelliklere sahiptir (Rawashdeh ve Salah, 2015; Chormova ve Fry, 2016). Bitki birincil hücre duvarı yapısında yer alan B-Rhamnogalakturan (RG-II) kompleksinin yapısında bulunan apioz şekerinin furanoid halkasına bağlanır (Wimmer ve ark., 2015). Çeşitli bitki türlerindeki bor alımının farklılığı, hücre membranı geçirgenliğindeki farklılıklardan, kök içinde ve kök dışında bor kompleksinin oluşum miktarından kaynaklandığı belirtilmiştir (Gorovoy ve ark., 2013).

2.2.4. Bitkilerde Bor Elementinin Alınımı ve Taşınması

Bitkilerde bor alınımı, borik asit formunda, aktif veya pasif absorpsiyon yoluyla olmakta ve bitkiler tarafından alınan B hücre duvarlarında ve sitoplazma içerisinde çok hızlı bir şekilde bor kompleksi oluşturmaktadır. Aşırı miktardaki bor alımı hücre içinde artarak toksisiteye neden olmaktadır (Moraga ve ark., 2013). Bitkilerde bulunan Bor1 ve Bor4 membran akış proteinleri ile boru dışarı pompalayarak bitki için zararlı konsantrasyonundan kurtulmayı sağlamaktadır (Takada ve ark., 2014). Biyotik ve abiyotik stres koşullarına bağlı olarak bitkilerde ortaya çıkan oksidatif stresi organizmadaki bor miktarı yakından etkilemektedir (Choi ve ark., 2015).

Bitkiler topraktan bor alımlarında bir takım farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılık, hücre duvarı yapılarının farklılığından ileri gelmektedir (Saygıdeğer Demir 2005). Bitkilerin ihtiyaçlarına bağlı olarak aynı topraktan farklı miktarlarda bor aldıklarını, bitkilerin ihtiyaç duydukları ve hasatta kaldırdıkları bor miktarının bitki tür ve çeşitlerine göre değiştiğini ortaya koyulmuştur (Shorrocks 1997, Korkmaz ve Şendemirci 2007).

Tablo 1. Bor gereksinimlerine göre bitkilerin gruplandırılması (Kacar ve Katkat, 1998)

Bor gereksinimi az olan bitkiler	Bor gereksinimi orta olan bitkiler	Bor gereksinimi fazla olan bitkiler
- Ahududu - Arpa - Bezelye - Brom otu - Buğday - Çilek - Kara Buğday - Keten - Lima fasulyesi - Patates - Soya fasulyesi - Yassı salkım otu - Yeşil fasulye - Yulaf	- Ak üçgül - Çayır üçgülü - Domates - Havuç - Kırmızı üçgül - Kiraz - Marul - Mısır - Pamuk - Soğan - Şeftali - Taş yoncası - Tatlı patates - Tütün - Yerfıstığı - Zeytin	- Ayçiçeği - Elma - Haşhaş - Karnabahar - Kereviz - Kırmızı pancar - Kuşkonmaz - Lahana - Şalgam - Şeker pancarı - Turp - Yonca

Borun bitki organlarındaki hareketi oldukça kısıtlıdır (Matoh, 2013). Bitki hücrelerinde bor elementi geçişinin olmayışı çift çenekli 9 tür tarla bitkisinde incelenmiştir. Yapılan çalışmada sadece pamuk ve şalgamda bor yetersizliğine cevaben yüksek miktarda bor hareketinin olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer türlerde bor elementinin hareketsiz olduğu, hatta köklerde belirgin bir şekilde bor eksikliğinin olduğu görülmesine rağmen bu hareketsizliğin devam ettiği belirlenmiştir (McIlrath, 1965). Brokoli bitkisi ihtiyacı olduğu zamanlarda kendi bünyesinde bor dağıtımı yapabilmektedir. B elementinin fazla olduğu durumlarda, bitki bünyesindeki bor hareketlenir ve genç bitki hücrelerine kadar ulaşır (Demirtaş 2004).

Bitkide bor elementinin taşınması ksilem boruları vasıtasıyla bitkinin üst kısımlarına doğru olur ve elementin birikimi bitkinin üst kısımlarında özellikle yapraklarda daha fazla olmaktadır. Yaprakta biriken bor bu kısımlarda toksik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenden dolayı bazı bitkiler borun toksik etkisinden korunmak için yapraklarından gutasyon şeklinde su ile birlikte dışarı bor atmaktadırlar (Oertli ve Roth 1969, Günlü ve Öztürk 2008). Ayrıca bor elementi bitkilerde karbonhidrat metabolizması ile karbonhidratların taşınması üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Bor eksikliği görülen

tüm kültür bitkilerinin yapraklarında şeker ve nişasta konsantrasyonlarında kayda değer bir artış gözlenmiştir. Tüm bunların yanı sıra, borun yağ metabolizması ile pektin sentezinde de önemli görevleri vardır (Scirupture ve Mc Hargue 1943, Günlü ve Öztürk 2008).

Tütün bitkisi ile yapılan bir çalışmada da, bitki gövdesinde borun yukarı doğru taşınmasının temelde ksilem iletim borularında yoluyla olduğu, bitkinin transpirasyon ile buhar halinde su kaybı devam ettiği sürece borun bitkide yukarı doğru taşındığını ve bitkinin üst organlarında biriktiğini tespit edilmiştir (Demirtaş 2004).

Bor elementinin öncelikle terleme-kohezyon mekanizmasında suyla beraber yapraklara taşındığı, sonra bor noksanlığının oldukça yüksek olduğu yaprak uçlarındaki kalbur dokuya gittiği, sonra yaprak ve yaprak sapına kalbur dokudan geçtiği ortaya konulmuştur (Wang ve ark., 2015). Odunsu dokuya geçmiş olan bor tekrar terleme-kohezyon mekanizmasıyla yaprak uçlarına taşınır. Bu olaylar zinciri de bor elementinin aynı bölgede yoğun olarak hareketliliğine sebep olur ve bor elementinin dönüşümlü hareketini sağlar. Ayrıca bor elementinin dışa doğru akışını ve uzun mesafelere gidişini engeller. Bunlara bağlı olarak kökteki bor eksikliği yapraklardan gelen bor ile giderilmez (Demirtaş 2004; Osman, 2013).

Bitki kökleri normal bir gelişim için sürekli olarak bor elementine ihtiyaç duyar. Gelişen köklerde bor eksikliğine karşı aşırı hassasiyet bitki içerisindeki bor elementinin genellikle yerinin sabit olması gerekir. Bu olay, bor elementinin, bol miktarda, bor içeren kök ucundan, bor elementi olmayan aynı kök sisteminde bir başka kök ucuna aktarılmadığını saptayan Albert ve Wilson (1961), tarafından kök sistemlerinde kanıtlanmıştır (Demirtaş, 2004).

Bor bitkiler için gerekli bir mikrobese elementidir ve birçok metabolik prosesin yapısında görevler almaktadır örneğin hücre duvarı porozitesinin ve gerilme direncinin kontrolünde, membran potansiyeli ve geçirgenliğin ayarlanmasında, hücre iskeletinin polimerizasyonunda, azot ve amonyum asimilasyonda, hücre sinyalleşmesinde ve fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak değişmesinde önemli rolleri vardır (Ferrol ve Donaire, 1992; Shen ve ark., 1993; Fleischer ve ark., 1999; Wang ve ark., 1999; Camacho-Cristóbal ve ark., 2002; Ryden ve ark., 2003; Bassil ve ark., 2004; Camacho-

Cristóbal ve González-Fontes, 2007; Camacho-Cristóbal ve ark., 2008; Gonzalez-Fontes ve ark., 2008). Toprak solüsyonunda borat ya da borik asit ($B(OH)_3$) olarak bulunmaktadır fakat bitkiler tarafından genellikle borik asit formu alınmaktadır.

Model organizma *Arabidopsis* bitkisinde NIP5;1 ve BOR1 olmak üzere iki taşıyıcı molekül bor taşınmasında rol almaktadır. NIP5;1 MIP ailesine ait bir borik asit kanalıdır ve kök hücre zarında yerleşir (Takano ark., 2010). Bor eksik köklerde bu genin önemli derecede upregüle olduğu bildirilmiştir (Takano ve ark., 2006). MIP ailesi üyeleri altı transmembran domain ve NPA motif dizisi ile karakterize olmuşlardır (Kruse ve ark., 2006). BOR1 taşıyıcılar ise ilk defa olarak boron eksik *Arabidopsis* köklerinde belirlenmiştir. AtBOR1 geni 704 amino asit uzunluğunda olup 10 tane transmembran domain içermektedir. Ayrıca diğer altı AtBOR genleri de örneğin AtBOR2-7, AtBOR1 e benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Takano ve ark., 2002). Pirinçte boron eksikliğinde NIP3;1 ve BOR1 taşıyıcıları boron alınımından sorumludur ve ayrıca bunlar *Arabidopsis* deki NIP5;1 and BOR1 genlerinede çok benzerlik göstermektedir (Nakagawa ve ark., 2007; Takano ve ark., 2008; Hanaoka ve ark., 2014). Asma bitkisinde VvBOR1 geni – AtBOR1 ortoloğu- 720 amino asit uzunluğunda hücre zarında lokalize olan bir protein kodlamaktadır (Pérez-Castro ve ark., 2012). Ayrıca, fonksiyonel BOR1 homologları bazı diğer türlerinde de karakterize edilmiştir örneğin *Saccharomyces cerevisiae*, *Eucalyptus*, *Brassica napus* gibi (Takano ve ark., 2002; Domingues, ve ark., 2005; Sun, ve ark., 2012).

2.3. Bitki Doku Kültürü Çalışmaları

In vitro üretim diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük bir parçanın (eksplant) steril edildikten sonra, bitki büyümesi için gerekli besin maddelerini içeren steril besin ortamında ve uygun çevre koşullarında (ışık, sıcaklık) kültüre alınması işlemidir. Bu nedenle yöntemin diğer adları “mikro üretim” veya “aseptik kültür”dür (Ozyigit, 2008; Yaacob ve ark., 2014).

Bitkiler *in vitro* koşullarda bitkilerden izole edilen dokulardan (sürgün, kök, yaprak, çiçek) bütün bir bitkiyi oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Bitkilerin değişik kısımlarından besin maddeleri, hormonlar, vitaminler, ısı, ışık ve nem gibi gereksinimleri karşılandığı takdirde yeni bitkicikler elde edilebilmektedir (Ozyigit ve ark., 2007; Sugimoto ve Meyerowitz, 2013).

Bitki doku kültürü olarak adlandırılan bu yöntemler mikroçoğaltım, ari bitki elde etmek, sekonder metabolit üretimi, ıslah çalışmaları ve sentetik tohum elde etmek gibi amaçlar için kullanılmaktadır. Organogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılan eksplantlar daha çok, gövde, kök, yaprak, çiçek durumu, ovaryum veya yumurta hücresi, kotiledon ve hipokotil gibi fide organları, tohum embriyosu olup, bu tür eksplantlar direkt olarak veya kallus üzerinden indirekt olarak organ ve embriyo oluşturmaktadırlar (Smith, 2013; Sugimoto ve Meyerowitz, 2013).

Kallus düzensiz bölünen, farklılaşmamış hücreler topluluğudur. Bitki rejenerasyonunda sırasında kullanılan besin ortamları bitki için gerekli olan mikro ve makro elementler ile enerji kaynağı olarak şeker içerir. Besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri de rejenerasyonun vazgeçilmez unsurlarındandır (Constabel, 2012; Pani ve ark., 2016)

2.3.1. Bitki Doku Kültürü Çalışmalarının Bitki Islahındaki Uygulama Alanları

Türler arası melezlemeleri takiben embriyo kültürü: Zigot oluşumundan hemen sonra ortaya çıkan (post-zigotik) uyuşmazlıklar *in vivo* melezlemelerde embriyo oluşumunu engellemekte ve oluşan embriyoların yaşamalarını sürdürememelerini sağlamaktadır. Bu embriyolar özel besin ortamlarında doku kültürü çalışmaları ile elde edilirse yeni melez bitkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu tekniğe de embriyo kurtarma tekniği adı verilmektedir (Singh ve ark., 2015; Li ve ark., 2015).

Haploid bitki üretiminde kullanılmak üzere anter ve yumurtalık kültürü: Özellikle kendine döllen bitkilerde yapılan standart bitki ıslahı melezlemelerinden sonra, hatların saf yani homozigot bir hale gelmesi çok uzun zamanlarda olmaktadır. Mayoz bölünme geçirmiş haploid sayıda kromozom içeren hücrelerde veya bu hücreleri içeren bitki kısımlarının (anter veya yumurtalık) doku kültürü çalışmalarıyla elde edilen hücrelerinde veya bu hücrelerin rejenerantlarında %100 saf bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe de *in vitro* haploidi tekniği denilmektedir (Thorpe, 2012; Krutovsky ve ark., 2015).

Somaklonal varyasyon: Kallus oluşturabilen ve/veya totipotent yeteneği olup yeni bitkiler oluşturabilen hücreler uzun zamanlı kültürlerde veya kısa zamanlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlarda kompetens yeteneklerini kaybedebilmektedirler. Bu hücrelerden elde edilen bitkilerde gen veya kromozom bozuklukları sebebiyle fenotipik ve kalıtsal çeşitliliklere (somaklonal varyasyon) neden

olmaktadır. Somaklonal varyasyonlar, yeni çeşitler geliştirebilme ve dayanıklılık çalışmalarında ıslahçılar tarafından tercih edilmektedir. Somaklonal varyasyonlar sonucunda gözlenebilen değişiklikler arasında, birtakım pigmentlerin yapısındaki değişiklikler sonucu çiçek renginin, yine çiçek ve yaprak morfolojisinin, tohum veriminin, bitki canlılığının, uçucu yağ içerikleri ve hastalık durumlarına karşı dayanıklılık/toleranslılık durumlarının ortaya konulması sayılabilir (Jain ve ark., 2013; Landey ve ark., 2015).

***In vitro* seleksiyon:** Tek hücre seviyesinde, herbisit ve patojen gibi bazı faktörlere karşı dayanıklılığa göre yapılan seleksiyonlar sonucunda, bu hücrelerden yola çıkılarak elde edilen bitkilerde ilgili faktörlere dayanıklı/toleranslı bitkiler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe *in vitro* seleksiyon adı verilmektedir (Vyver ve ark., 2013).

***In vitro* dölleme:** Birtakım durumlarda ki bu durumlara örnek vermek gerekirse özellikle dış ortamda uygun şartları sağlayamadığı tohum vermeyen bitkilerden tohum almak için doku kültürü ile elde edilen bitkiler *in vitro* koşullarda tozlaştırılmaktadır (Haque ve ark., 2016).

***In vitro* germplazm muhafazası:** Totipotent özelliğe sahip hücrelerin *in vitro* kültürü, kallus veya süspansiyon kültürleri kullanılarak çok uzun sürelerde ve belirli aralıklarla alt kültüre alınarak saklanabilir ve gereksinim duyulduğu zamanlarda bu hücrelerden yeni bitkiler elde edilebilmektedir. Bu doku kültürü teknikleri *in vitro* germplazm muhafazasında önemlidir ve gen-tohum bankalarına benzetilebilmektedir (Reed ve ark., 2013; Lata ve ark., 2014).

Protoplast füzyonu (Somatik hücre melezlemesi): Protoplast füzyonu, eşeysel uyumsuzluklar sebebiyle, klasik melezleme yoluyla elde edilemeyen hibrit bitkilerin elde edilmesinde fiziksel ve kimyasal yöntemlerden yararlanılarak uygulanan bir tekniktir. Elde edilen somatik melez hücrelerden, kallus oluşumu ve daha sonra da bitki rejenerasyonu yoluyla yeni bitkilerin elde edilmesi bu yöntemin en önemli kısmıdır. Bu işlem kabaca genetik kopyalama olarak isimlendirilebilir ve bitkilerde yaklaşık 30 yıldan beri uygulanmaktadır. Tütün bitkisinde bu yöntem çok başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Mishra ve ark., 2015; Aleza ve ark., 2016).

Gen transferi: Bitki doku kültürü sistemlerinin en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından arasında, genlerin bitkilere aktarılması sayılabilir. Organogenez ve somatik embriyogenez sistemleri gen aktarımı çalışmaları için çok önemlidirler (Knie ve ark., 2015).

2.3.2. Bitki Doku Kültürünün Ticari ve Islah Dışı Uygulamaları

Meristem kültürü: Apikal meristemin tamamı veya buradan alınan küçük embriyonik parçalardan kültürler oluşturularak uygulanan yöntem meristem kültürü adı verilmektedir. Oldukça az miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri eklendiğinden uç ve yan meristemlerden pek çok yeni bitki elde edilebilmektedir (Smith ve ark., 2013).

Mikroçoğaltım: Organize meristem hücrelerinden, henüz olgunlaşmasını tamamlamamış veya tamamlamış somatik hücrelerden direkt yani organogenez veya somatik embriyogenez veya indirekt yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi ile devam eden işleme mikroçoğaltım adı verilmektedir. Doku kültürünün ticari uygulaması 1970 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde orkide ve süs bitkilerinde başlamış ve bu şekilde elde edilen ürünlerin pazar değeri günümüzde senede 15 milyar dolar seviyelerindedir. Çalışmalar steril ve kontrollü şartlar altında laminar hava akışlı kabin içinde yapılmaktadır (Ahuja ve ark., 2013; Zlenko ve ark., 2015; Dwiyanı ve ark., 2015).

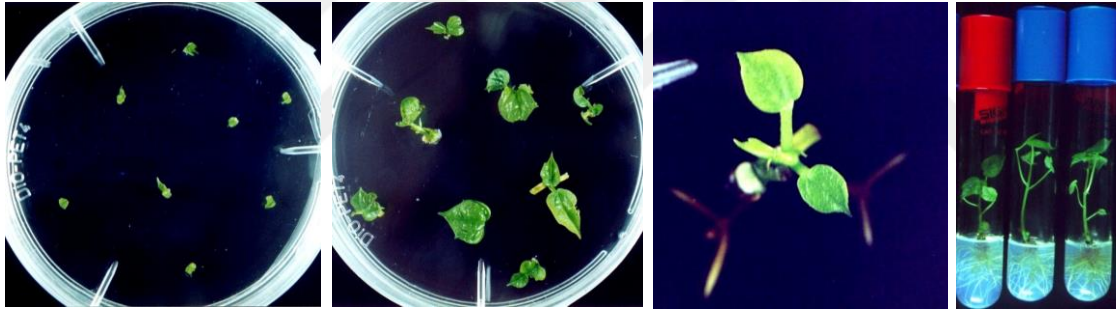
Somatik embriyolar ile sentetik tohum üretimi: Somatik embriyoların çeşitli yöntemlerle (sodyum aljinat gibi) kaplanması sonucu sentetik tohumlar elde edilmektedir. Sentetik tohumların, hibritlerin somatik çoğaltımında, ebeveyn hatların korunmasında ve odunsu bitkilerin genotiplerinin belirlenmesinde kullanımı konusunda çalışmalar yapılmıştır (Kumar ve ark., 2012).

Kallus ve hücre süspansiyonları ile sekonder metabolit eldesi: *In vitro* hücre kültürleri sekonder metabolit üretiminde çok önemlidirler. Bu sekonder metabolitler, bitkinin büyüme ve gelişiminde doğrudan kullanılmayan maddelerdir. Işık mikroskobu yardımıyla gözlenebilen sekonder metabolitlerin (antosiyantinler, tanenler) yanısıra UV ışık altında gözlenebilenleri (alkaloitler) de vardır (Gadzovska ve ark., 2013). Bitki doku kültürü kullanım amaçlarına göre uygulamalar aşağıda verilmektedir.

Organogenez

Bitkinin hücre veya dokularına baskı uygulayıp birtakım değişikliklere yol açılarak sürgün veya kök taslağı olarak adlandırılan tek kutuplu, vasküler sistemi kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının ortaya çıkmasına yol açan bir işlemdir (Babaoglu ve ark., 2001).

Normal şartlarda bir bitkinin tohumunu oluşturan hücreler, büyüme ve farklılaşma dönemi geçirerek bitkinin kök, gövde ve yapraklar gibi farklı organlarını meydana getirirler. Farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına neden olan bu değişiklikler bitkinin hayat döngüsünde normal durumlarda yaşamının sonuna kadar sabit kalır (Sluis ve ark., 2015). Fakat yapılan çalışmalar; tamamen farklılaşan hücrelerin eğer bozulma olmamış bir hücre zar sistemi ve canlı bir çekirdek içeriyor ise tekrar meristematik bir özellik kazanarak mitotik bölünme özelliğini gösterebileceğini ortaya koymuştur.



Şekil 2. Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkisinde direkt organogenez. (Ozyigit ve Gozukirmizi, 2009).

Bu bölünmelerden sonra doğrudan sürgün veya kök oluşuyorsa buna direkt organogenez adı verilir (Castillo ve ark., 2015). Bu durumda bitkiden izole edilip kültüre alınan eksplanttan kallus oluşumu gibi herhangi bir ara faz olmadan direkt olarak yeni bitkicikler gelişir. Eksplant olarak da sıklıkla meristematik dokular, kotiledon nodları, hipokotil, gövde ve kotiledonlar kullanılır (Gurel, 1997).

İndirekt organogenez yönteminde ise eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan kallus oluşumu için uyarılır. Kallus üzerinden de daha sonra meristematik bir merkez ve bunu takiben de ortamdaki bitki büyüme düzenleyicileri miktarına göre kök veya sürgün oluşum gözlenir. (Ozyigit ve ark., 2007).



Şekil 3. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde indirekt organogenez. (Ozyigit ve ark., 2007).

Organogenesis çeşitleri

Tablo 2. *In vitro* bitki rejenerasyonunda görülen organogenesis çeşitleri

Direkt organogenesis	İndirekt organogenesis
Eksplant ↓ Sürgün veya kök ↓ Bitki	Eksplant ↓ Kallus ↓ Bitki Sürgün veya kök ↓ Bitki

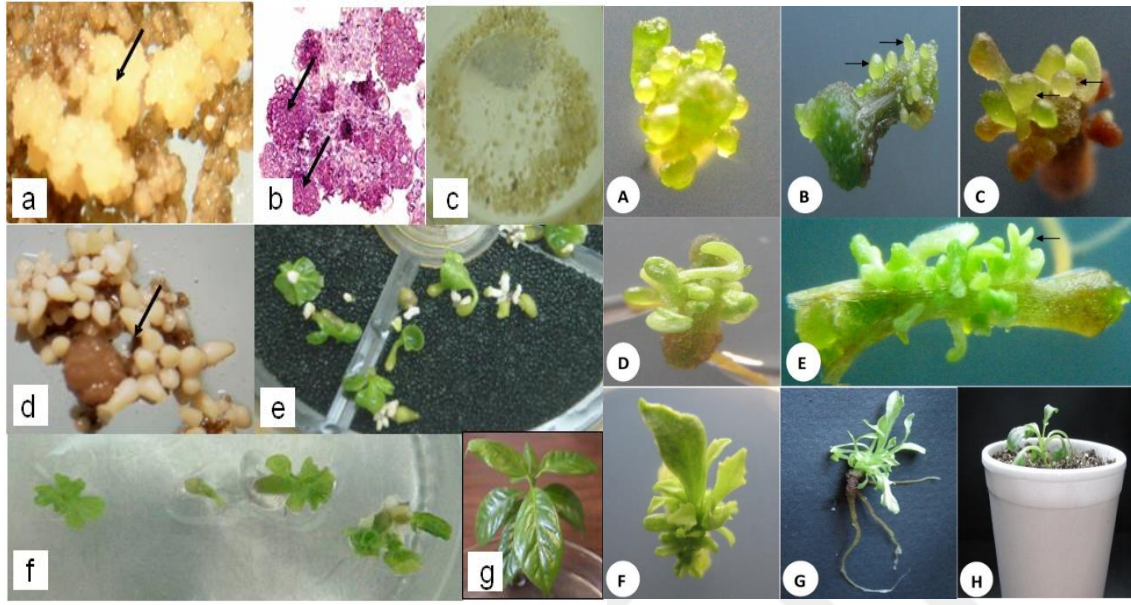
Somatik Embriyogenez

Somatik embriyogenez de tıpkı organogenezde olduğu gibi direkt ve indirekt olarak elde edilebilmektedir. Bu tip bitki gelişiminde direkt olarak eksplanttan ya da indirekt olarak kallustan somatik embriyo olarak adlandırılan ve her biri yeni bir bitkiyi verme yeteneğinde olan yapılar oluşur. Oluşan embriyolar yumurta hücresinin döllenmesi ile oluşan zigotik embriyolara benzer. Literatürde embriyo benzeri yapılar, adventif ya da vejetatif embriyo veya embrioid olarak adlandırılırlar. Döllenme sonucu oluşan zigotik

embriyoda olduğu gibi, somatik embriyolar globular, kalp, torpedo ve kotiledon oluşum evrelerinin geçirirler (Jain ve ark., 2013; Martinelli ve ark., 2015).

Besin Ortamları

Kallus kültürü, süspansiyon kültürü, protoplast kültürleri ve bitki rejenerasyonu gibi doku



Şekil 4. Solda *Digitalis trojana* bitkisinde hipokotil eksplantlarından direkt somatik embriyogenez (Verma ve ark., 2012), sağda *Coffea arabica* L. bitkisinde embriyonik kalluslardan indirekt somatik embriyogenez (Gatica-Arias ve ark., 2008).

kültürü işlemlerinde kullanılacak besi ortamının tercihi oldukça önemlidir. Çok sayıda besi ortamı bulunmakla birlikte en sık kullanılanlar WH, MS, LS, B5, NN SH besi ortamlarıdır. MS (Murashige ve Skoog, 1962), tütün için geliştirilmiş olup, yüksek tuz içerikli olan bir besi ortamıdır. Düşük yoğunluklarda köklendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. WH (White, 1963), düşük tuz içeriği ile domates kök kültürü için geliştirilmiş bir besi ortamıdır. LS (Linsmaier ve Skoog, 1965), MS ortamına benzemekle birlikte organik bileşikler bakımından farklı bir besi ortamıdır. B5 (Gamborg et al. 1968), soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir besi ortamıdır. NN (Nitsch ve Nitsch, 1969), anter kültürü için geliştirilmiş bir ortam olup, tuz içeriği MS ve WH arasındadır. SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972), hem monokotiledonlar hem de dikotiledonlar için uygun bir ortamdır. Bitki besi ortamlarında bulunan bileşenler şunlardır: su, makro ve mikro elementler, vitaminler, şekerler, yarı katılaştırıcılar, bitki

büyüme düzenleyicileri, tamponlar, amino asitler ve kimyasal olarak tanımlanamayanlardır (Franklin ve Dixon, 1994, Gamborg ve Philips, 1995). Sıvı ortamlar için makro ve mikro elementler, bazı vitaminler ve karbon kaynağı, yarı-katı ortamlar için ek olarak agar veya agaroz içeren ortamlara temel besin ortamları denir. Temel besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri ekleyerek tam bir bitki, bitki parçası, dokusu veya hücresi için farklı ve özel besin ortamları hazırlanabilmektedir (Babaoglu ve ark., 2001).

Makro ve Mikro Elementler

Temel besin ortamlarında kullanılan makro elementler azot başta olmak üzere fosfor, kalsiyum, kükürt, magnezyum ve sodyumdur. Bunların yanısıra bor, çinko, demir, iyot, kobalt, manganez ve molibden de besin ortamlarında tercih edilen mikro elementlerdir (Zoltan, ve ark., 2015).

Şekerler ve Vitaminler

Kültürdeki bitki hücre ve dokuları gerekli olan karbohidrat sentezi yapamazlar. Bu yüzden besin ortamlarında enerji kaynağı olarak çeşitli şekerler kullanılır. En çok tercih edileni sukroz olup glikoz, maltoz, rafinoz ve fruktoz da kullanılabilir. Enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahip olan nikotinik asit, pridoksin, tiamin de bitki kültürleri için en gerekli vitaminlerdir (Preiss, 2014; Miret ve ark., 2014).

Yarı Katılaştırıcı Maddeler

Besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek için kullanılan bileşenler polisakkarit bileşimleridir. En çok tercih edilenleri agar, agaroz, aljinat, jelatin, nişasta ve silika jeldir (Yalpani, 2013).

Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Oksinler, doku kültüründe tek başına kullanıldığında kallus oluşumunu, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini, somatik embriyo oluşumu sağlar. Sitokininlerle birlikte kullanıldığında kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu, somatik embriyo oluşumunun uyarılmasına neden olur (Davies, 2013). Sitokininler; hücre bölünmesi,

yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımını sağlar. Sürgünlerde köklenmeyi, embriyogenezisi engeller (Schaller ve ark., 2015).

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus oluşumunu, organogenezisi, adventif kök oluşumunu engeller (Hedden, 2012). Absisik Asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda bulunur. Somatik embriyoların olgunlaştırılmasına fayda sağlar. Yaprak ve meyve dökümünde, dormanside, stomaların kapanmasının düzenlenmesinde etkili olup, ışığa karşı hassas bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Miyakawa ve ark., 2013).

2.4. Bitkilere Gen Aktarımı

Transgenik bitkiler 1980'li yıllarda başarılı bir şekilde üretilmeye başlanmıştır. Bu tarihlerden önce bitkileri dirençli/toleranslı hale getirmek gibi, geliştirme çalışmaları genellikle eşeyli çaprazlama veya mutasyonlarla yapılan klasik bitki ıslahı metoduna dayanmaktaydı (Clark ve ark., 2013). Bitki ıslahı, bitkilerin geliştirilmesinin temeli olmasına rağmen, tipik bir eşeyli çaprazlama on binlerce genin karışmasıyla sonuçlanır ve istenen karakterdeki bir bireyin bulunması için bütün yavruların sınıflandırılması gerekir. Dolayısıyla istenilen karakterdeki bireyin elde edilmesi oldukça zor olmaktadır (Cobb ve ark., 2013).

Transgenik bitki üretiminin ortaya çıkmasıyla bu zorluk ortadan kalkmış ve istenilen tek bir gen bir bitkiye aktararak istenilen özellikteki bitkiler elde edilerek ıslah çalışmalarında yeni bir dönem başlamıştır (Pérez-Massot ve ark., 2013). Transgenik bitki üretimi yoluyla, tek bir gen bir bitkiye aktarılabilir böylece üretken bir bitki tek bir gen, önceden belirlenmiş gen veya istenilen karakter yönünden değiştirilebilir. Bu temel kavram, tek bir hücreye bir genin aktarılması ve bu karakteri ifade eden hücreden tam bitkinin elde edilmesine dayanır. Bitkiye başarılı bir şekilde genin aktarılmasıyla beraber, oluşan bitki mutlaka ana bitkiyle aynı olmalı bunun yanısıra aktarılan gen bitkiye geliştirilmiş bir özellik sağlamalıdır (Potrykus ve ark., 2013).

2.4.1. DNA'nın Aktarılması

Transgenik bitkilerin üretilmesi amacıyla DNA'nın bitki hücresine aktarılması aşamasında, hücre duvarı, hücre zarı ve çekirdek zarı işlemi zorlaştıran önemli engellerdir. Hücre duvarının yüzeyi oldukça özel bir yapıya sahiptir (Albersheim ve ark., 2010). Özellikle genç hücre duvarı, hücrenin gelişmesine ve hareketine izin verebilmek için esnekliğe sahiptir, bu nedenle diğer çapraz bağlantı materyalleriyle sıkı bir ilişki içerisinde. Hücre duvarı birtakım delikler (porlar) içerir ve bu delikler komşu hücrelerin protoplazmalarını birbirine bağlar. DNA'nın sitoplazma zarından geçişi de bu delikler aracılığıyla olur (Pauly ve ark., 2016). DNA molekülünün hücreye alınabilmesi için mutlaka belli bir seviyeye kadar yaralama yapılması gerekmektedir. Genellikle hipertonic olan bitki hücresinin ozmotik basıncı, dokuyu kurutma yöntemiyle ya da onu şeker içeren besiyerine koyarak geçici olarak azaltılabilir ve hücre duvarındaki deliklerden sitoplazmanın akışı azaltılarak DNA aktarımının işlemi gerçekleştirilebilir (Vain ve ark., 1993; de Dios Barajas-López ve ark., 2013).

DNA'nın aktarılmasında, çıplak DNA çekirdek dışında uzun süreler yaşayamayacağı için DNA'nın çekirdeğe yakın bir yere veya çekirdeğe ulaştırılır. DNA aktarılmasında, DNA doğal olarak proteinlerle kaplanır ve bu proteinler DNA'yı parçalanmaktan koruyarak çekirdeğe kadar ona eşlik ederler. Daha sonra bitki hücresine ait olan doğal mekanizmanın, yabancı DNA'yı hedef hücrenin genomik yapısına kattığı görülür. (Potrykus ve ark., 2013). Doğal DNA'nın bölgeleri sürekli olarak proteinlerden ayrılır ve yeniden bir araya getirilir. Fakat fonksiyonel olabilmesi için kromozomal DNA'ya ulaşması gerekir. Bu işlemler sırasında aktarılan yabancı DNA mutlaka tam olarak düzenlenmemiş ve aktarılmış olmalıdır. Bunların yanısıra yok olmamak için gerekli fonksiyonlara sahip olmalı ve doğal bitki DNA'sı gibi davranmalıdır (Chandra, 2012).

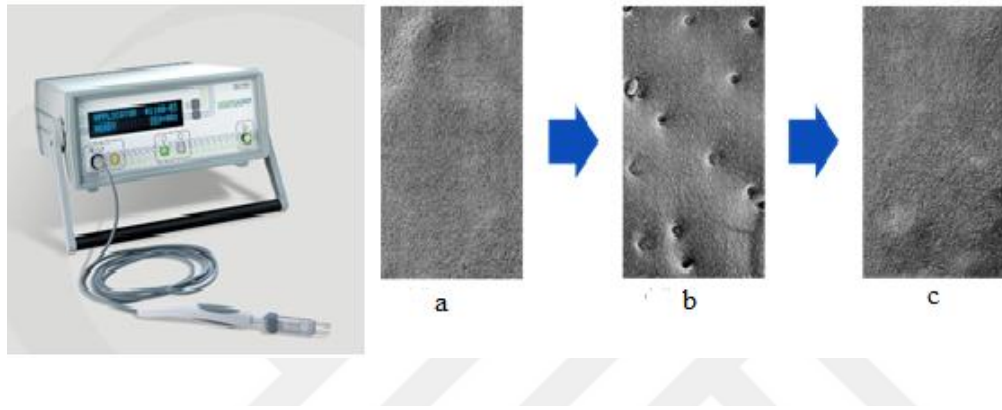
2.4.2. Direkt (Doğrudan) Gen Aktarım Metodları

Kültüre alınması pek mümkün olmayan bitki türleri için direkt gen aktarım metodları geliştirilmiş ve uygulanmaya başlanmıştır. Bu yöntemler: doku, hücre, tohum veya embriyoların serbest DNA solüsyonu içerisinde inkübasyonu, kimyasal maddeler aracılığıyla protoplastlara plazmid aktarımı, DNA'nın bitki hücrelerine mikroyenjeksiyon şeklinde aktarımı, hızlandırılmış partiküllerden, partikül tabancası kullanılarak hücre ve

dokulara DNA aktarım teknikleridir. Bu tekniklerden en yaygın olarak kullanılanları elektroporasyon ve partikül bombardımanı'dır (Gao ve ark., 2013; Ueki ve ark., 2013).

2.4.3.1. Elektroporasyon Yöntemi

Bitki hücre duvarı enzimatik olarak parçalanırsa, sitoplazmik membranla çevrili protoplastlar açıkta kalır. Bu protoplastlar, içinde DNA segmentleri bulunan solüsyon içerisine alınırlar ve kısa sürede yüksek voltaja (550V/cm) tabi tutulurlar (Ochatt, 2013).



Şekil 5. Solda elektroporasyon cihazı, **a**; akım vermeden önce, **b**; akım esnasında ve **c**; akım sonrası hücre zarının elektron mikrofrafı görüntüsü.

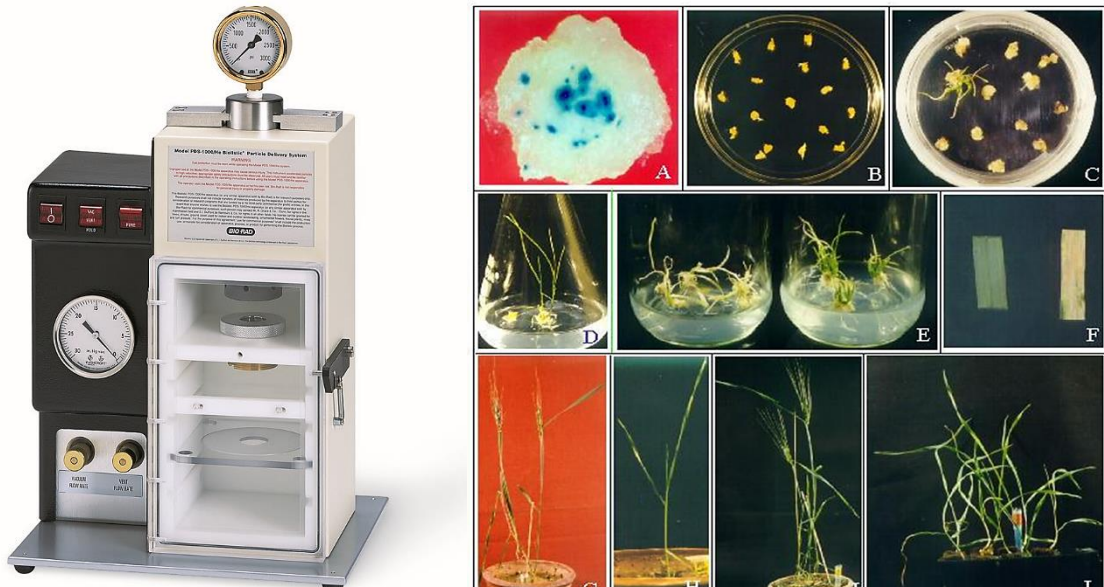
Elektrik akımı hücre zarında küçük delikler açar ve onu geçirgen hale getirir. Bu sebeple DNA segmentleri buralardan içeri girerler. DNA segmentinin içeri girmesinin ardından çok uzun süreler açık kalamayan bu porlar daha sonra kapanırlar (Gelvin, 2012).

Elektrik akımının şiddeti ve süresi bu gen transferi yönteminde dikkat edilmesi gereken en önemli iki husustur. Başarılı bir DNA aktarımı için her bitki türü kendine özel bir voltaj sınır değerine sahiptir. Bu sınır aşılsa, elektrik akımı hücre zarına zarar vererek hücrelerin ölümüne neden olur. Diğer yandan voltaj sınır değerinin altında kalırsa, hücre zarının DNA'ya geçirgenliği azalmaktadır. Başarılı bir aktarımdan sonra protoplastlar solüsyondan çıkarılarak rejenerasyon besi yerlerine alınır ve transgenik bitki oluşumu sağlanır. Elektroporasyon yöntemiyle özellikle polenlere gen aktarımında önemli adımlar atılmıştır (Lynch ve Davey, 2012; Jordan ve ark., 2013).

2.4.3.2. Partikül Bombardmanı (Biyolistik) ile Gen Aktarımı

Partikül bombardmanı ile gen aktarımı 1987 yılında uygulamaya konmuştur. Bu teknikte, yoğunluğu fazla olan elementler olan altın, tungsten gibi metal partiküllerine polietilen glikol (PEG) aracılığıyla entegre edilmiş DNA segmentleri kullanılır. Bu teknikte CaCl_2 yardımı ile yapılan çöktürme sonrasında metal partiküle bağlanan DNA segmenti, bitki hücrelerine yüksek bir hız (500m/sn) ile aktarılır (Jackson ve ark., 2013).

Aktarılan metal ve bununla birlikte DNA'dan oluşan kompleks, hücre çekirdeğine kadar ulaşır. Çekirdekte hedef gen beraberindeki partikülden ayrılarak ve hücre genomu içindeki yerini alır. Bu teknikte ilk önceleri, parçacıkların hızlandırılması amacıyla yüksek elektrik akımı kullanılmış, ancak son zamanlarda, kontrolü daha kolay olduğundan sıkıştırılmış CO_2 ya da He gazından faydalanılmıştır (Finer ve ark., 2016). Hızlandırılmış partiküllerden (partikül tabancası) yararlanarak bitkilere yapılan gen aktarımı ile tüm doku ve hücre şekillerine gen aktarımı yapılabilir. Ek olarak bu yöntem ile *Agrobacterium* veya protoplast aktarımı teknikleriyle gen aktarımının çok zor monokotil bitkilere gen aktarımı kolaylaşmıştır (Bhattacharyya ve ark., 2015).



Şekil 6. Solda partikül bombardmanı (biyolistik) cihazı, sağda biyolistik ile *GUS* geni aktarılmış *Triticum aestivum* bitkilerine ait kalluslarının doku kültürü ortamındaki gelişimi (Patnaik ve Khurana, 2003).

Bu teknikte hücre çekirdeği, mitokondri ve plastid DNA'ları gen aktarımı için hedef alınmaktadır. Transfer edilen genin ekspresyonu değişebilmektedir. Bu değişiklikler, aktarılan genin yapısına, kopya sayısına, genoma yerleşme konumuna ve metilasyona bağlıdır. Genç embriyonik hücrelerde bu aktarım tekniğinden doğan metilasyon problemi daha fazla olmamaktadır (Tassy ve ark., 2014)

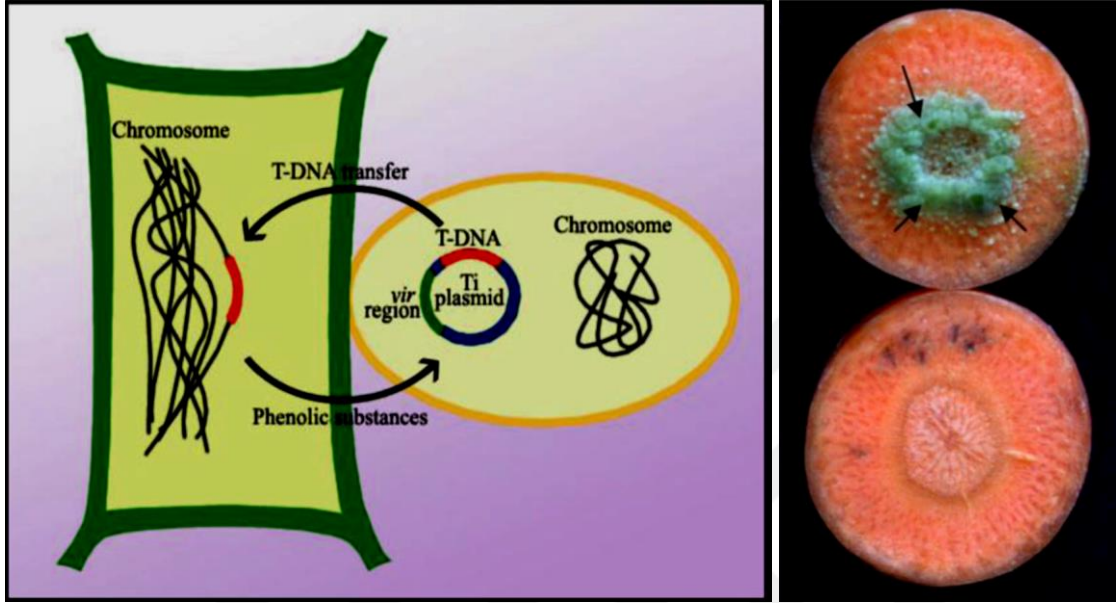
2.4.3. İndirekt (Dolaylı) Gen Aktarım Metodları

2.4.3.1. *Agrobacterium tumefaciens*

***Agrobacterium*'un Tarihi ve Genel Bilgiler**

Rhizobiaceae familyasına mensup olan *A. tumefaciens*, toprakta yaşayan gram negatif bir bakteri olup, çeşitli bitkilerde, ‘‘Crown gall’’ yani ‘‘taç tümör’’ olarak isimlendirilen, kanser şeklinde tümöral bozukluklara neden olan parazit bir bakteridir (Platt ve ark., 2014). Bu bakterinin neden olduğu hastalık, tarımsal açıdan çok önemli hasarlara yol açıp genellikle iki çenekli (dikotil) bitkileri üzerinde, yılda çok büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Ayrıca bu taç tümör oluşumu, bazı tek çenekli (monokotil) bitkilerde gözlemlenmiştir (Kerr ve Tate, 2016).

Taç tümör hastalığı birçok bitkide özellikle güller, üzümler ve iğ ağacı gibi bitkilerde önemli sorunlar teşkil etmektedir. Bu hastalığın başlıca belirtisi bitkinin gövdesinde kesilen yerlerinde veya bitkinin taç kısmında oluşan tümör veya urdur. (Kahl ve Schell, 2014).



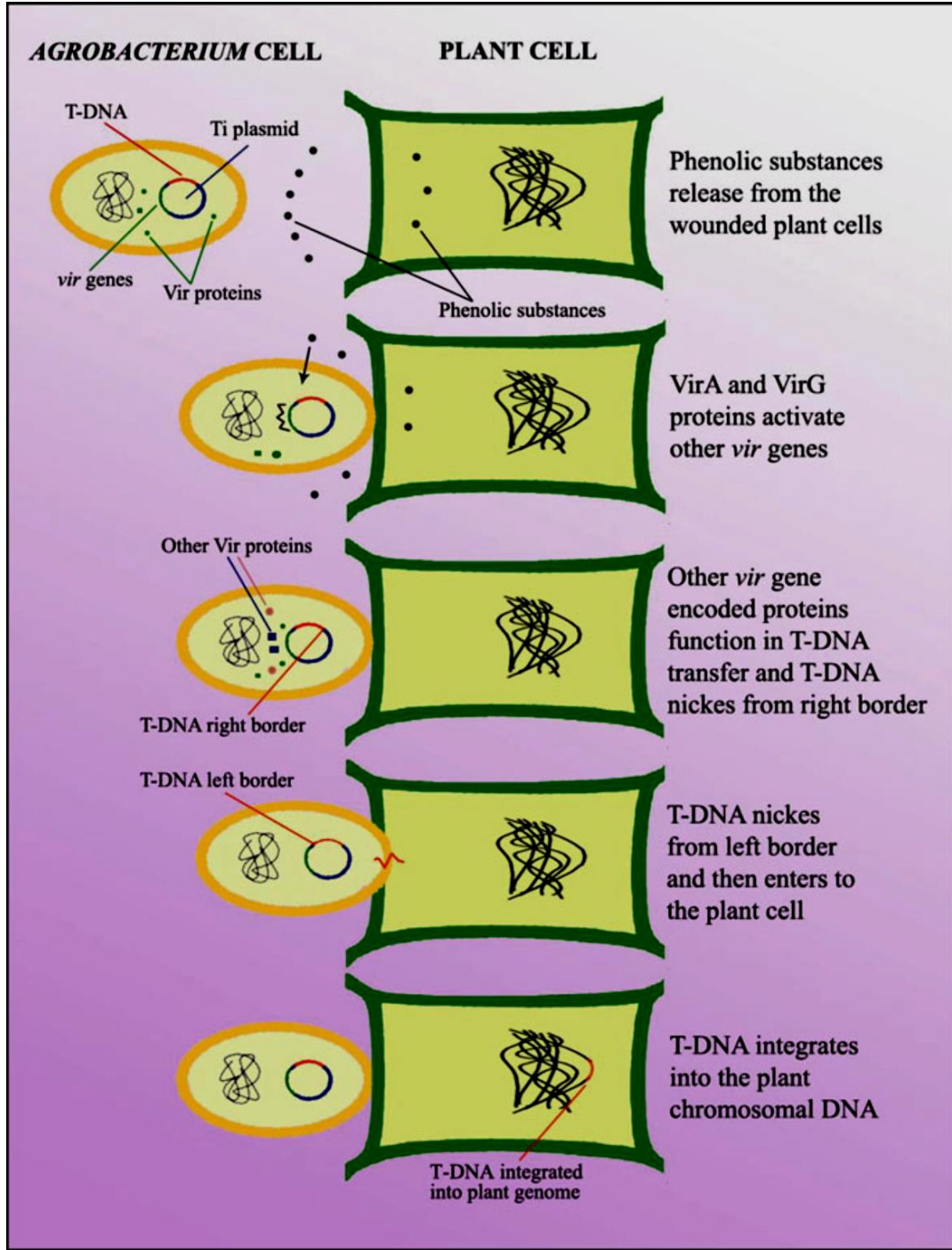
Şekil 7. Solda Ti plasmidi, T-DNA, vir bölgesi ve T-DNA'nın bitki hücreğine aktarımı, *A. tumefaciens* ile muamele edilmiş hastalıklı (üst) ve sağlıklı (alt) havuç dilimleri (Ozyigit, 2012)

Bitki üzerinde oluşan tümör herhangi bir mikroorganizma olmadan büyümeye devam ettiği için bu hastalık uzun yıllar boyunca bitki patolojisi çalışan bilim adamları için önemli bir sır olmuştur. Daha sonraları bu hastalığın sırrı ortadan kaldırılmış ve hastalığa neden olan bakterilerin genetik mühendisliği araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Singh ve ark., 2014). Bu hastalıkta, yabani tür olan *Agrobacterium* bitkilerin yaralanmış dokularına girmektedir. Yaralanmış dokularda gövde bölünmüş olduğundan dolayı taç en uygun giriş bölgesidir. Bakteriler ya ölü veya ölmek üzere olan bu hücrelerde koloni oluştururlar veya kendilerini yaralanmış yaşayan hücrelere entegre ederler. Bitki hücresinden bakteriye gönderilen kimyasal sinyaller yoluyla bakterideki virülens genleri aktif hale getirilir ve bu sayede bakterinin virülens moda geçer. Son olarak da T-DNA bakteriden kesilerek bitki hücresine ulaştırılır (Matveeva ve ark., 2012; Chandra, 2012).

Yabani çeşit bakterilerde T-DNA bölgesi az sayıda gene sahiptir. Bunlar bitki hormonlarının ve azotça zengin, bakteri için besin kaynağı (aminoasit-şeker kompleksi) olan opinlerin üretilmesine sebep olan enzimleri kodlarlar. Opinler normal bitkilerin dokularından sentezlenmemektedir fakat *Agrobacterium* tarafından katabolize edilir ve enerji, karbon ayrıca nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır. Tümörlü hücreler tarafından sentezlenen opinler, kendilerini oluşturan bakteri türüne bağlı olarak farklı türlerde adlandırılırlar. Bunlar oktopin, nopalin, agropin gibi türlerdir. Bitkilerdeki kuru ağırlığın yaklaşık %7'si opin ürünleridir (Nester, 2015; Wahyuni ve ark., 2015).

Bitki hücrelerinde hormon salınımının sonucu olarak tümör oluşur. Tümör içinde üretilen opinler tümör üzerindeki bakteriler tarafından veya doğal yollarla (yağmur vs.) tümörden arınarak toprağa karışan bakteriler tarafından kullanılır. Bakteriler yaşayan, bölünen tümör hücrelerinde koloni oluşturmazlar ve bu tümör hücreleri doku kültüründe hormonlar eklenmeden büyütülebilir. Eğer hormonları sentezleyen genlerden bazıları bozulursa ve bitkiye bulaştırılırsa, tümör çok sayıda şekilsiz kökler oluşturmaktadır. Eğer diğer hormonları sentezleyen genler bozulursa ve bitkiye bulaştırılırsa tümör oluşacaktır. Eğer her iki gen de bozulursa tümör oluşmayacaktır. Bu hormon etkisi, doku kültüründeki kallusundan elde edilen sonuçlarla aynıdır ve bu farklı tümör fenotiplerin dokudaki değişen hormon dengesinden kaynaklandığı doğru bir şekilde belirlenmiştir (Hirth, 2012; Kado, 2015).

Bu bakteri, bitki hücrelerine kendi DNA'sını aktarmasını sağlayan kendine özel bir yeteneğe sahiptir. Aktarılan bu DNA, T-DNA olarak adlandırılmakta ve bu DNA Ti yani tümör oluşumunu uyaran plazmid olarak isimlendirilmektedir ve ekstrakromozomal plazmid üzerinde taşınmaktadır. *Agrobacterium* ile bitkilere gen aktarımı sistematik bakımdan direkt gen aktarım metodlarına göre daha karmaşıktır. Buna rağmen en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Biyolojik vektör kullanılmadan DNA aktarımını kullanan direkt gen aktarımı metodlarında DNA'nın hedef hücrenin çekirdeğine ulaştırılması zorunludur. Ancak *Agrobacterium*'da T-DNA, çekirdeğe ulaştırılması için gerekli sinyallere sahip olduğundan dolayı gen aktarımında büyük avantajlar sağlamaktadır (Murai, 2013; Gao ve ark., 2013).



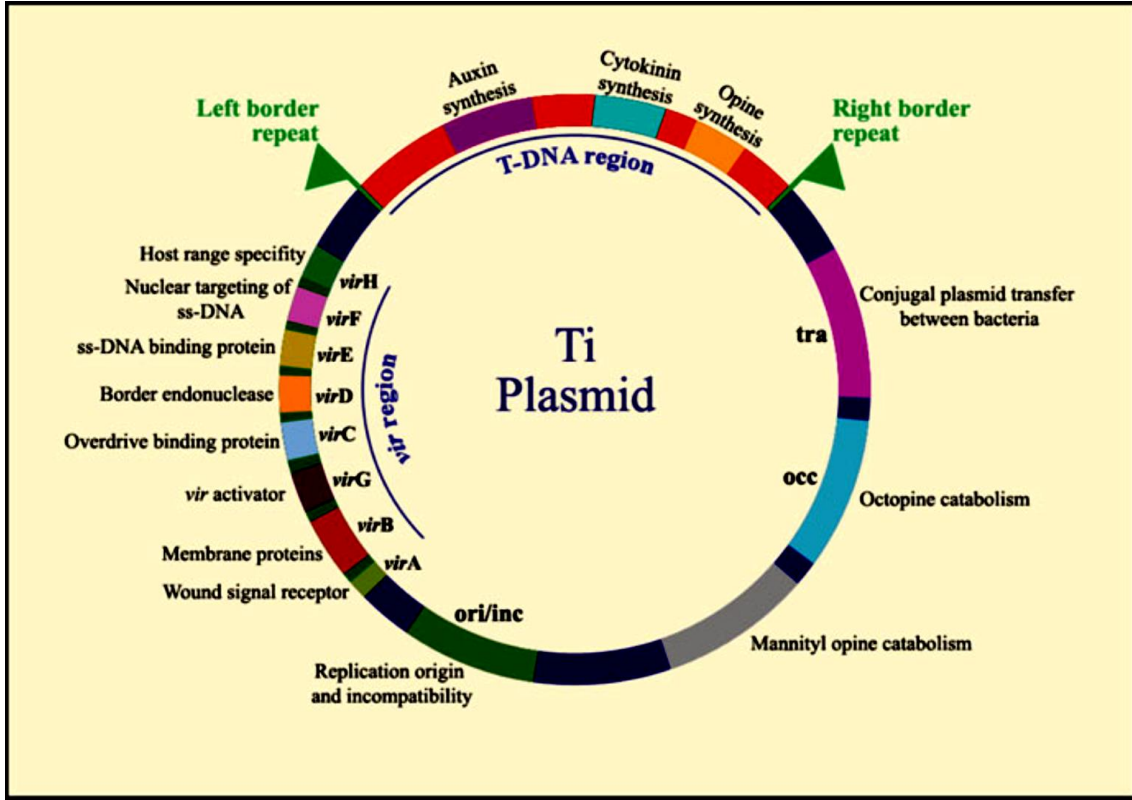
Şekil 8. *A. tumefaciens*'in bitki hücresine gen aktarım aşamaları (Ozyigit, 2012)

Agrobacterium ile Etkin Bir Gen Aktarımı

Bitki hücrelerine *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımında, metodun etkinliğinin geliştirmek için, bakterinin iletimini arttırmak, *vir* genlerini teşvik etmek ve hedef

dokunun savunma mekanizmasına karşı cevapları en az seviyeye indirmek en önemli noktalardır (Ron ve ark., 2014).

Hedef bitki dokusuna bakterinin iletimini arttırmak amacıyla farklı metodlar geliştirilmiştir. Bakteriler yaralanmış dokulara bulaşırlar ve bu sebeple bu metodların çoğu ya yaralanmayı arttırmak ya da hassas yaralanma için çalışırlar. Hedef dokunun yaralanması için en çok kullanılan araç bitki dokularını kesmek için kullanılan bisturi aletidir. Bitki dokusu kesildiği zaman bakteri için uygun bir giriş noktası sağlar. Hedef dokuyu birçok defa bisturi bıçağıyla çizerek yaralanma arttırılabilir. Fakat bu şekilde ağır yaralanma bitki dokusunun yeniden canlanma kabiliyetini kaybetmesi ile de sonuçlanabilir. Sonikasyon ya da partikül bombardımanı kullanarak yaralama ile bitki dokusunda daha küçük yaralar oluşmaktadır. En etkin ve oldukça hassas bir işlem olan mikro yaralanma uygun bir şekilde yapılırsa, doku yapısına çok fazla şekilde zarar vermez ve bakteri için giriş noktaları ve tutunma bölgelerinin sayısını oldukça artırır (Dutta ve ark., 2013; Matthyse, 2015; Lee ve ark., 2015).



Şekil 9. Octopine tipi Ti plazmidinin genetik haritası

Agrobacterium bakterisi, bitki hücrelerine etkin bir gen aktarımı için gereken üç özelliği bünyesinde taşımakta olup, bunlardan ikisi, çift sarmallı Ti-plazmidi üzerinde bulunan T-DNA (transferred DNA) ve virülens (*vir*) bölgeleridir (García-Cano ve ark., 2015).

T-DNA bölgesi, bakteriden bitki hücrelerine aktarılır ve bitkinin genomuyla birleşir. 23 kb büyüklüğünde küçük bir DNA parçasıdır. T-DNA'nın bitki hücrelerine aktarımı bakteriler arası konjugasyondaki plazmid aktarımına teorik olarak oldukça benzemektedir. T-DNA'nın üzerindeki genler bitki hücrelerine girdikleri zaman fonksiyonel hale gelmekte, bunların ürünleri bitki hücrelerinin hormonal dengesini bozar ve bunun sonucunda da fenotipik olarak bir tümör meydana gelmektedir (Park ve ark., 2015). İnfekte olan hücrelerin tümör oluşturma ve opinleri sentezlemelerine T-DNA bölgesinde yer alan bazı genler sebep olmaktadır. Ayrıca T-DNA bölgesinde, bitkilerde normal oksin ve sitokinin üretimini hızlandıran bazı genler de yer almaktadır. Bu genlerin bitki hücrelerine aktarılmasıyla onkogenik (tümör oluşturan) fenotipler meydana getirilmekte ve bu genlere onkogenler denilmektedir (Kodahl ve ark., 2016). Bu onkogenlerin transferaz

(ipt) geninden sitokinin, indolasetik asit (iaa) genindense indolasetik asit sentezlenir ve sonuçta bitkinin belli bir bölgesinde anormal bir büyüme göze çarpar. vir bölgesinin kodladığı proteinler, yaralanmış bitki bölgesinden salınan fenolik bileşikler ile aktive edilmektedir. Aktive edilen vir ürünü proteinler T-DNA'nın transferinde görevlidirler. *virA*, *virG* ve diğer *vir* genlerinin aktivasyonunu sağlamaktadırlar (Denkovskienė ve ark., 2015). Aktive edilen bu genler (*B*, *C*, *D*, *E*) T-DNA'nın bitki hücresine transferini gerçekleştiren ürünleri sentezlerler. *virA* geninin ürünü olan transmembran reseptör kinaz proteini, bakterinin sitoplazmik membranı üzerinde bulunmaktadır. Bu protein periplazmadaki fenolik bileşiklerin etkisi ile fosforlanmakta ve bunun sonucunda bu protein aktive edilerek sitoplazmik transkripsiyon faktörü vir G proteini de fosforlanır. Aktive olan VirG proteini *virB*, *C*, *D* ve *E* genlerinin promotor bölgelerine bağlanır ve onların transkripsiyonunu tetikler (Czarnecka-Verner ve ark., 2016). Bunlardan özellikle *virD* ürünü endonukleaz aktivitesine sahiptir ve T-DNA'nın sağ ve sol uç noktalarından kesilmesini ve plazmitten ayrılmasını sağlar. Çift iplikli Ti-plazmidinin T-DNA bölgesinden tek bir iplik ayrılır ve bitki hücresine transfer olur. Daha sonra önce replikasyon ile çift iplik haline geçerek bitki genomuna yerleşir (Marton ve ark., 2013).

Bitki hücrelerine gen aktarımında gerekli bir diğer temel özellik, *Agrobacterium* bakterisinin kendi kromozomunun üzerinde üç adet lokus bulundurmasıdır. *chvA* (transfer faktörünü sentezleyen), *chvB* (beta-glukan sentezinde görev alan protein) ve *pscA* (nötr veya asidik özellikte olup hücre dışı polisakkarit sentezi için gerekli protein) kodladığı ürünler olup, bunların *Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunmasında önemli görevler aldıkları saptanmıştır (Ziemienowicz, 2014). Bu proteinler, bakteri üzerinde polisakkarit üretiminden sorumludurlar ve bakteri hücresinin bitki hücresine yapışmasını kolaylaştırırlar. Bitkinin yaralanmış dokusundaki hücrelerin sentezlediği küçük molekül ağırlıklı fenolik bileşikler de virülens genleri aktive etmektedirler (Yang ve ark., 2013).

Agrobacterium aracılığıyla gen aktarımının etkinliğinde gelecekteki artışlar için belki de en önemli yöntem, bakteri infekte edilen bitki hücrelerinin bakteriye karşı olan cevabını değiştirmektir. *Agrobacterium* ve bitki hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşim sırasında, peroksidaz aktivitesi artar ve bunu izleyen oksidasyon meydana gelir. Bununla birlikte doku kahverengileşmesi ve hücre ölümüne sebep olabilir (Shkryl ve ark., 2013). Bakteri bulaşmış bitki dokularınca üretilen oksitleyici ajanların etkilerini en düşük seviyeye

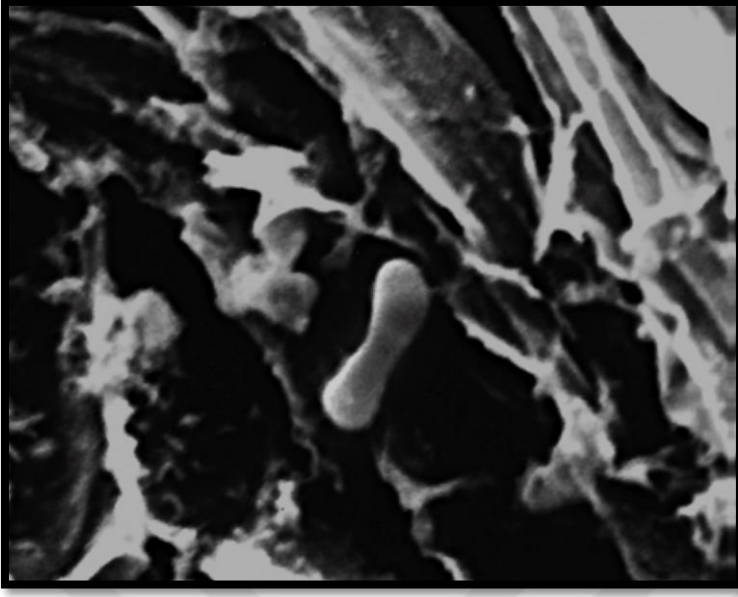
düşüren indirgeyici ajanların işleme dâhil edilmesi sayesinde aktarımda önemli gelişmeler sağlanmıştır. En yaygın kullanılan ajanlar askorbik asit, gümüş nitrat ve sisteindir (Kumar ve ark., 2013). Bu ajanların yanısıra, aktarılması hedeflenen dokularda programlanmış hücre ölümünü azaltan, çok düşük seviyelere indiren ve yok eden ajanlar ve genler de yüksek verimliliğe sahiptir. Bitkilerde bakteri bulaşmasını ve yayılmasını engellemeye de yarayan en önemli savunma mekanizmalarından biri olan programlanmış hücre ölümünün inaktive edilmesi etkin aktarım oranına yol açar (Sood ve ark., 2014).

***Agrobacterium* ile Gen Aktarımının Avantajları**

Direkt DNA aktarım sistemlerinin çoğu pahalı cihazlar kullanmaktadır. *Agrobacterium* ise basitçe uygun besi yerinde büyütülerek hazırlanmakta ve bitki dokusuyla buluşturulmaktadır. Basit bir şekilde yabancı DNA aktarımı ve *Agrobacterium* ile gen aktarımı yapılan bitkilerde transgen fonksiyonunun daha istikrarlı olduğu gibi varsayımlar geçerli olabilir de, olmayabilir de. Bu durumun kullanılan sistemin doğasından kaynaklı bir problemten çok, direkt DNA aktarım sistemlerinde DNA'nın nasıl aktarıldığına bağlı olduğu görülmektedir. Tam anlamıyla transformasyon başarısını göz önüne aldığımızda, 1980'li yılların ortalarından bu yana *Agrobacterium* aracılığıyla DNA aktarım sürecine ait anlayışımızdaki gelişmeler, verimlilikte ve bu transformasyon vektörlerinin kullanımında büyük bir artışa neden olmuştur (Kubota ve ark., 2013; Bakhsh ve ark., 2014).

Gen Aktarımında Yararlanılan Bitki Kısımları ve Aktarım İşlemleri

Agrobacterium bakterisi aracılığıyla gen aktarımında farklı bitki kısımlarından (kök, gövde, yaprak, embriyo, kallus dokuları vb.) eksplant olarak yararlanılmaktadır (Avivi ve ark., 2014). Eksplantlar taze *Agrobacterium* kültürü ile inoküle edildikten gen aktarımının gerçekleştirilebilmesi için bitki büyümesini düzenleyici maddeleri içeren, yarı-katılaştırıcı madde olan agarlı besi yeri ortamına konulurlar (Alvarez, 2014). Birkaç gün sonra, bakterinin gelişimini durdurmak ve transgenik kallus ya da sürgünlerin alımı için eksplantlar aktarım işleminin amacına göre özel madde içeren besi yeri ortamına aktarılırlar. Bu besi yeri ortamına kallus ya da sürgün gelişimini artırmak amacıyla bitki hormonları da eklenmektedir (Moscatiello ve ark., 2013).



Şekil 10. *A. rhizogenes* R1000 suşuna ait hücrenin ayçiçeği kotiledon nodu hücresine tutunuşunun scanning elektron mikroskopu görüntüsü (Ozyigit ve ark., 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) tohumları ülkemizde yaygın bir şekilde tarımı yapılan **Trakya 3080**, **Palancı** ve **Tarsan** varyeteleri seçilerek, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

3.2. Kimyasallar

Tohumların yüzey sterilizasyonu için %20'lik ticari çamaşır suyu (ACE® marka) kullanıldı. Doku kültürü ile tohumdan bitki üretimleri sırasında temel besiyeri olarak Murashige ve Skoog (1962) (MS) [Sigma M5524] kullanılırken, bitkilerden kallus oluşumu, direkt ve indirekt gövde rejenerasyonu, köklenme, büyüme ile ilgili değişik miktar ve oranlarda fitohormonlar (bitkisel hormonlar) kullanıldı. MS besi ortamının içerdiği kimyasalların miktarları Tablo 3.'de gösterilmiştir. Çalışmada bitki besi ortamına jel yapıcı olarak agar [Sigma A7921] kullanıldı.

Tablo 3. MS Kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962)

Kullanılan Kimyasallar	Miktar (mg/l)
İNORGANİKLER	
MAKRO ELEMENTLER	
NH ₄ NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170

MİKRO ELEMENTLER	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
ORGANİKLER	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotonic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

3.3. Besiyerinin Hazırlanması

1 litrelik otoklavlanabilir şişe içine 250 ml distile su konulmuştur. 4.43 gram tartılan MS tuzu şişe içine ilave edilmiştir. Şişe içine manyetik balık atılmış ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile MS tuzları eriyene kadar karıştırılması sağlanmıştır. MS tuzları eridiğinde 30 gram tartılan sukroz şişe içine ilave edilmiştir. Sukroz eridikten sonra 8 gram tartılan agar şişeye eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı da homojen hale getirilen besiyerinden manyetik balık çıkartılmış ve 1 litre çizgisine kadar distile su ile tamamlanmıştır. Son olarak besiyeri 0,5 N NaOH ya da 0,5 N HCl solüsyonları kullanılarak pH=5.80'e ayarlanmıştır.

3.3.1. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70'lik alkolün hazırlanışı: %96'lık saf alkolden 730 ml alındı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

%20'lik ticari çamaşır suyunun hazırlanışı: %5 oranında Sodyum Hipoklorit (NaClO) içeren çamaşır suyundan 20 ml alındı ve 100 ml'ye tamamlandı.

3.4. Sterilizasyon Teknikleri

Besiyerinin sterilizasyonu

Hazırlanan besiyeri sterilizasyon için otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutularak sterilize edildi.

Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılacak yüzeyler (laminar flow içi) kullanımdan 10-15 dakika önce %70'lik alkolle silinerek UV lambası açıldı. Kullanılan aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil alkol içine batırıldıktan sonra bek alevine tutulup alevle yüzey sterilizasyonu yapıldı. Tohumların çimlendirilecekleri 200 ml'lik cam magenta kapları 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de otoklav edildi.

Tohumların yüzey sterilizasyonu

Ayçiçeği tohumları dış kabuklarından soyulduktan sonra ilk olarak %20'lik ticari çamaşır suyunda 10 dakika çalkalayıcıda karıştırıldı ve daha sonra %70'lik etil alkolde 4 dakika bekletildikten sonra steril kabin içerisinde karıştırılarak 3 defa 5'er dakika steril distile suyla yıkandı. Etil alkolden arındırılan ayçiçeği tohumları steril kurutma kağıdı bulunan petrilerde kurutularak ekime hazır hale getirildiler.

3.5. Tohum Çimlendirilmesi ve Kültür Koşulları

Yüzey sterilasyonu yapılan **Trakya 3080**, **Palancı** ve **Tarsan** varyetelerine ait olan tohumlardan yaklaşık 200'er adet alınarak laminar flow kabin içerisinde hormonsuz MS besiyeri bulunan magentalara 5'er adet tohum ekimi yapıldı. Gerçekleştirilen ekim sonrasında, yaklaşık 11 gün boyunca fotoperiyodu 16/8 olan, sıcaklığı $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ 'li ortamda tutularak çimlendirildi.



Şekil 11. Ayçiçeği bitkisinde yüzey sterilizasyonu ve çimlenme aşamaları

3.6. Direkt Gövde Rejenerasyonu

Besiyeri ortamında geliştirilen bitki parçacıklarından direkt rejenerasyon için, bitkinin kotiledon nodu ve meristematik uç kısımları kullanıldı. imlenmeyi takip eden 12. günü, steril ortamda genç bitkiciklerden alınan eksplantlar, önceden hazırlanmış bitki büyüme düzenleyicilerini [0.25 mg/L NAA (1-Naphthaleneacetic acid) and 1 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine)] içeren besiyerlerine 4'er adet aktarıldı. Rejenerasyon eldesi için yaklaşık 16 gün hormonlu besiyerlerinde bekletilen eksplantlarda genç bitkiciklerin oluşumu gözlendi ve gen aktarımına hazır hale getirildi.

3.7. *Agrobacterium tumefaciens* ile Gen Aktarımı

Doku kültürü kurulan ayçiçeği varyetelerinin rejenerasyon yanıtları karşılaştırıldı ve gen aktarımı için **Trakya 3080**, **Palancı** ve **Tarsan** varyetelerinin kotiledon nodu ve meristematik uç kısımları kullanıldı.

Bakteri Materyali

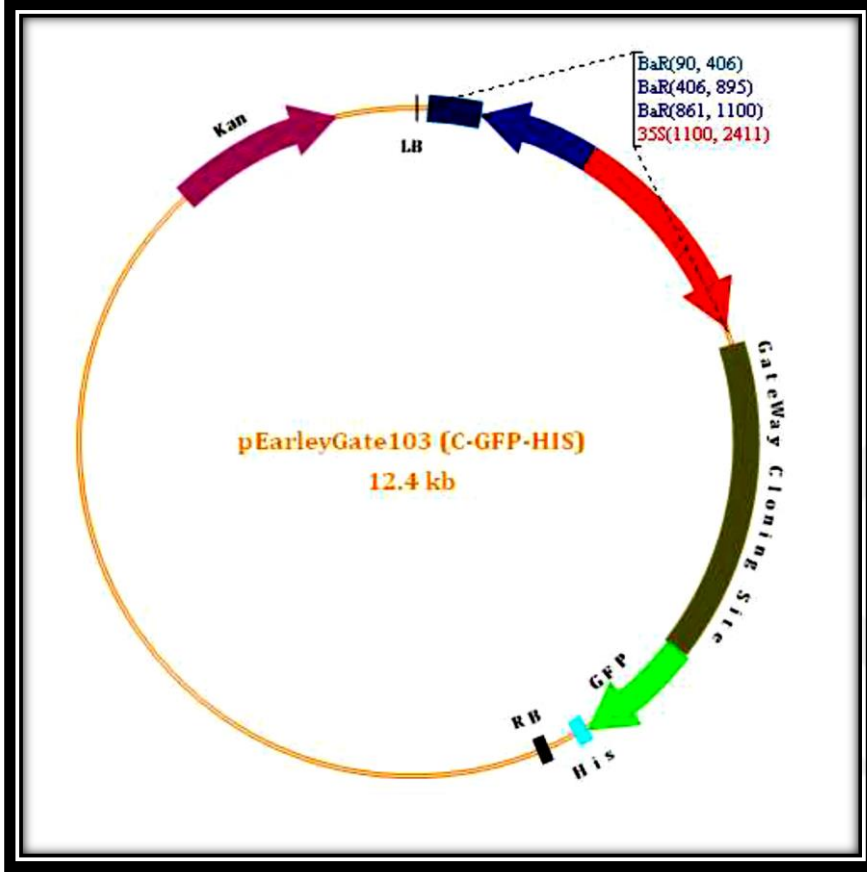
pEarleyGate plazmidlerini içeren *A. tumefaciens*'in suşu 50 mg/l kanamisin içeren LB sıvı besiyerinde, pH'ı 7.0'a ayarlanarak, 37° C'de 180 devir/dakika'daki inkübatör içerisinde 12 saat bekletilerek taze kültür elde edildi.

Tablo 4. *A. tumefaciens* suşlarının üretiminde kullanılan Luria Broth (LB) sıvı besiyeri

Maddeler	Miktarlar (g/l)
Bactotrytop	10
Yeast Extract	5
NaCl	10

Besi yerinde üretilmiş ve steril bisturi ile yaralanmış ayçiçeği eksplantları yoğunluğu O.D 600= (0,5–0,6) olarak ayarlanmış taze *Agrobacterium tumefaciens* sıvı kültürlerinde 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre sonunda fazla bakteriler filtre kâğıdı yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra eksplantlar MS besi ortamına alınarak 2 gün boyunca karanlıkta tutuldu. 2. günün sonunda eksplantlardan fazla üremiş bakterinin

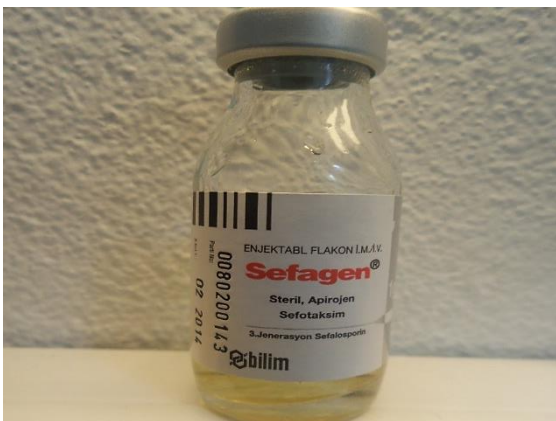
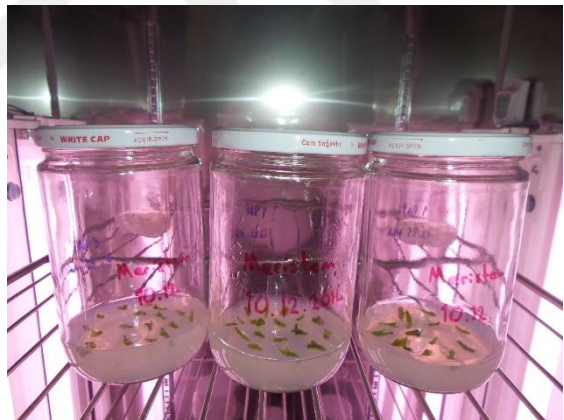
uzaklaştırılması için sıvı ½ MS + 250 mg/l sefotaksim besiyerinde 30 dakika yıkanarak ve MS besiyerine aktarılıp büyüme kabinde transforme kök gelişimleri izlendi.



Şekil 12. pEarleyGate 103 (c-GFP-His) vektör sistemi.



Şekil 13. pEarleyGate103 vektörü üzerindeki T-DNA bölgesi (Earley ve ark., 2006).





Şekil 14. Gen aktarımı aşamaları

Transgenik kallustan elde edilecek olan transgenik bitkilerden alınan köklerde *AtBOR4* genini taşıyıp taşımadıkları moleküler yöntem ile kontrol edildi. Vektör aracılığıyla gen aktarımı yapılmış *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinde bulunan *AtBOR4* geninin, inokulasyonu ile bitkiye bora dirençlilik genini aktarılıp aktarılmadığının belirlenmesi için polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR) kullanıldı. Elde edilen transgenik ve kontrol grubu bitkilerin köklerinden DNA izolasyonları gerçekleştirildi ve *AtBOR4* geni için tasarlanmış PCR primerleri aracılığı ile PCR yapıldıktan sonra Elektroforez yöntemiyle transgenik DNA ile normal köklerden elde edilen DNA bantları karşılaştırıldı. Ayrıca, GFP proteininin görüntülenmesi için florasans mikroskobu kullanılmıştır.

Primerler

B4 CLONE F: TGTAACGACGGCCAGT

B4 CLONE R: GGAAACAGCTATGACCATG

Forward ve Reverse primerlerin T_m (erime sıcaklığı) değerleri sırasıyla 61.51 and 62.89 dir. Nükleotid kompozisyonu (%GC) forward için 40.74 ve reverse için 50' dir. Oligonükleotidler Alpha DNA (Montreal-Canada) tarafından sentezlenmiştir. 100 μ M stok solüsyon elde etmek için stok primer solüsyonlarına sırasıyla 950 μ l ve 352 μ l dH₂O su eklendi ve daha sonraki kullanımlar için -20 °C'de inkübe edildi. Kullanmadan önce, 1 μ l de 10 pmol primer elde etmek için stok primerler steril su ile 5 kez seyreltilti. Seyreltilmiş stoklar PCR reaksiyon karışımını hazırlamak için -20 °C de muhafaza edildi.

3.8. PCR KOŞULLARI

PCR analizi "Esco AERIAS Thermal Cycler G96" cihazı ile gerçekleştirildi. PCR döngüleri aşağıda belirtildiği gibi ayarlanmıştır:

- 94°C de 2 dakika başlangıç denatürasyonu
- 94°C de 30 saniye denatürasyon
- 64°C de 30 saniye primerlerin bağlanması (30 döngü)
- 72°C de 3 dakika DNA zincir uzaması
- 72°C de 10 dakika son uzama

Reaksiyon karışımı, Mg⁺⁺ içeren 5 μ l 10x Ex Taq HS DNA polimeraz tampon, 0,2 mM dNTP, 1,5 μ l revers and forward primerler, 0,2 μ l Ex Taq HS DNA polimeraz ve 13,8 μ l ddH₂O su ile hazırlandı ve son olarak da 1 μ l DNA örneği eklendi. 25 μ l reaksiyon karışımı sentrifüj (Hettick, Almanya) edildi ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerini görüntülemek için %1 lik agaroz jel hazırlandı. 0.4 g toz agaroz mikrodalga fırın kullanılarak 40 ml 0.5 x TBE tampon içerisinde iyice çözüldü. Daha sonra, agaroz soğumaya bırakıldı ve yaklaşık 55 °C ye ulaştığında 2 μ l etidyum bromür eklendi. Solüsyon el ile homojen bir şekilde çalkalandı. Jel 13 x 14 x 0.5 cm boyutlarındaki yatay agaroz jel platformuna döküldü ve 8-dişli tarak yerleştirildi. Sonrada, 1 μ l 6x DNA yükleme boyası içeren 10 μ l kadar PCR ürünü ve 2 μ l yükleme

boyası ve 6 µl ddH₂O içeren 1 µl DNA marker polimerize olmuş jele yüklendi. Elektroforez tankına jel yüzeyini kaplayana kadar 0,5 x TBE tamponu eklendi. Güç kaynağı 90 Volt da 30 dakikaya ayarlandı.



4. BULGULAR

Doku kültürü aşaması

Bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak tarımı yapılan ayçiçeği varyetelerinden **Trakya 3080**, **Palancı** ve **Tarsan** varyeteleri kullanılmıştır. Tohum gömleklerinden ayrılmış bireyler hiçbir hormon içermeyen MS besisi ortamında çimlenmeye tabi tutuldular. Çimlenme yüzdesi her üç varyete için %90'ın üzerinde olarak bulundu.



Şekil 15. Hormon içermeyen MS ortamında 10 günlük çimlenen ayçiçekleri

Çimlenmeye ardından 12. günde bitkilerin meristematik uç kısımlarından ve kotiledon nodlarından eksplantlar alındı ve 0,25 mg/L NAA (1-Naphthaleneacetic acid) and 1 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine) içeren MS besisi ortamında kültüre alındılar.



Şekil 16. 0,25 mg/L NAA (1-Naphthaleneacetic acid) ve 1 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine) içeren MS besi ortamında direkt organogenez (Üst meristematik uç, alt kotiledon nodu)

Kültüre alınan eksplantlardan yaklaşık 12 gün sonra direkt rejenerasyon elde edildi. Rejenerasyon yüzdeleri aşağıdaki gibidir. Trakya 3080; kotiledon nodları 69% ve meristematik gövde uçları 72%, Palanci; kotiledon nodları 62.5% ve meristematik gövde uçları 63.6%, Tarsan; kotiledon nodları 36.3% ve meristematik gövde uçları 56.2% olarak belirlendi.

Direkt organogenez ile elde edilen genç bitkicikler 1 mg/L IBA (Indole-3-Butyric acid) içeren MS ortamında köklendirildiler. Köklenme 15 gün sonunda toprağa aktarılıp sera ortamında yetiştirilecek hale geldiler.

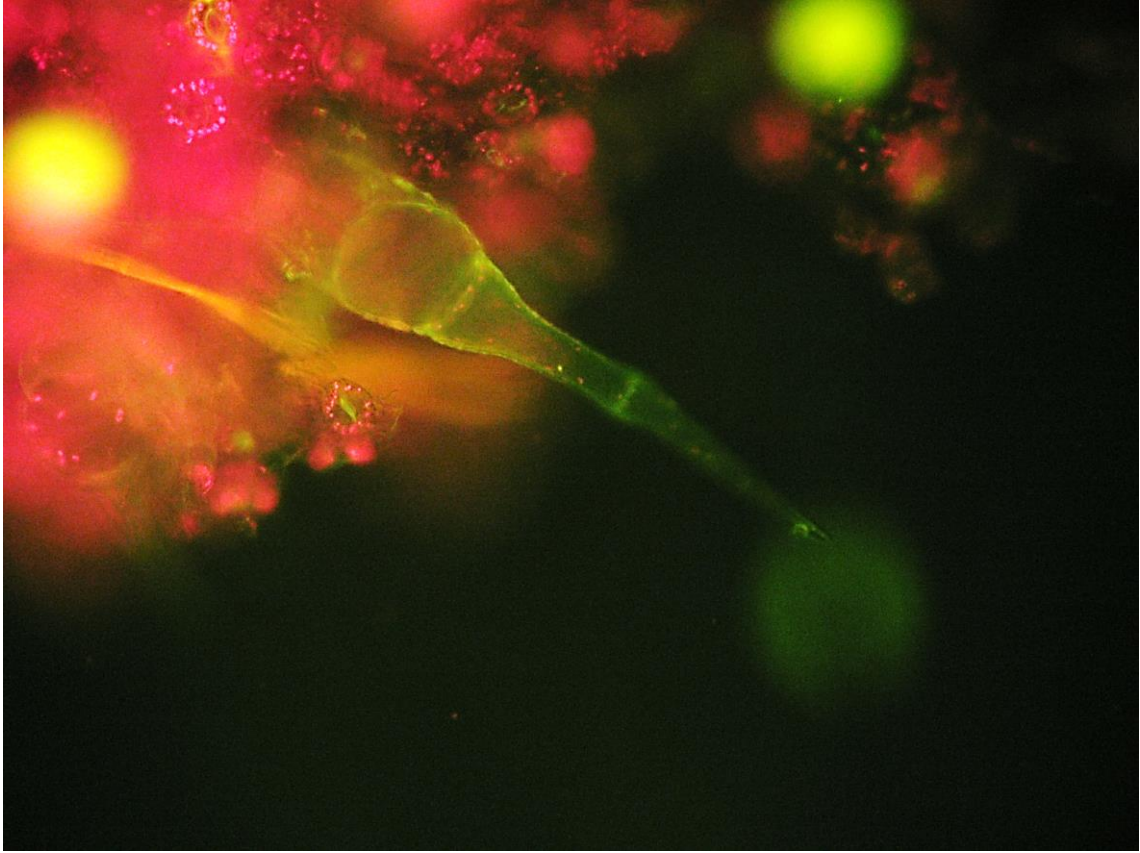




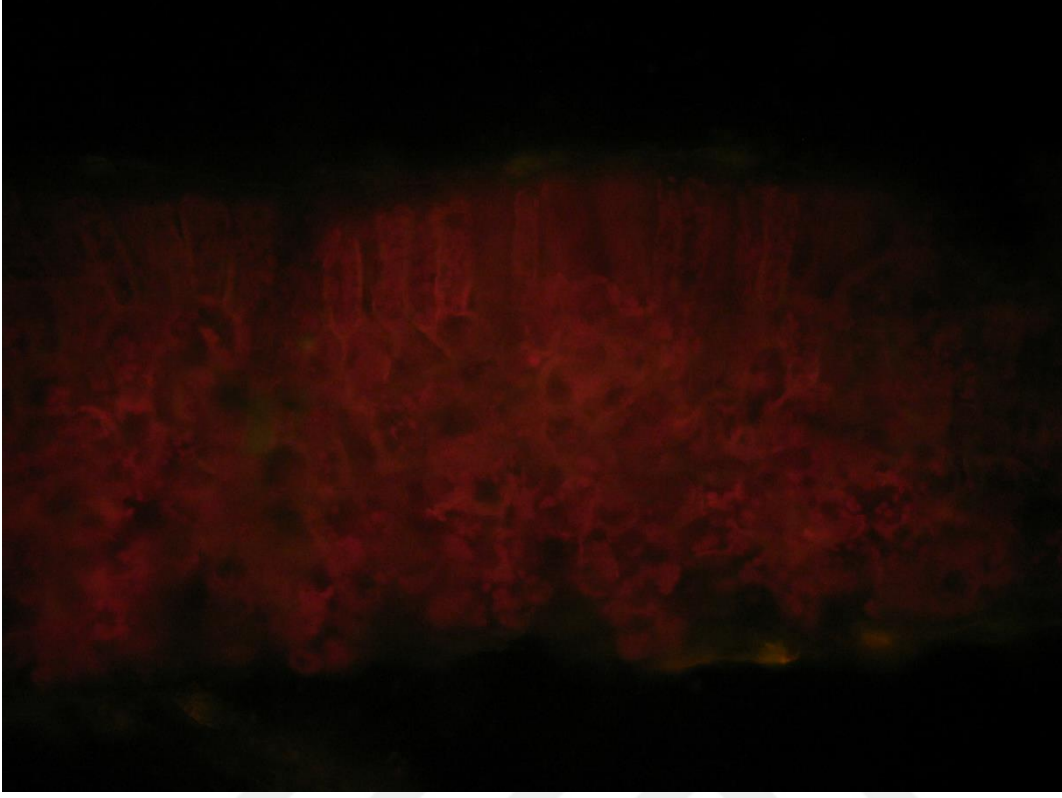
Şekil 17. 1 mg/L IBA (Indole-3-Butyric acid) içeren MS ortamında köklenen ve daha sonra toprağa aktarılan bitkiler.

Gen aktarımı

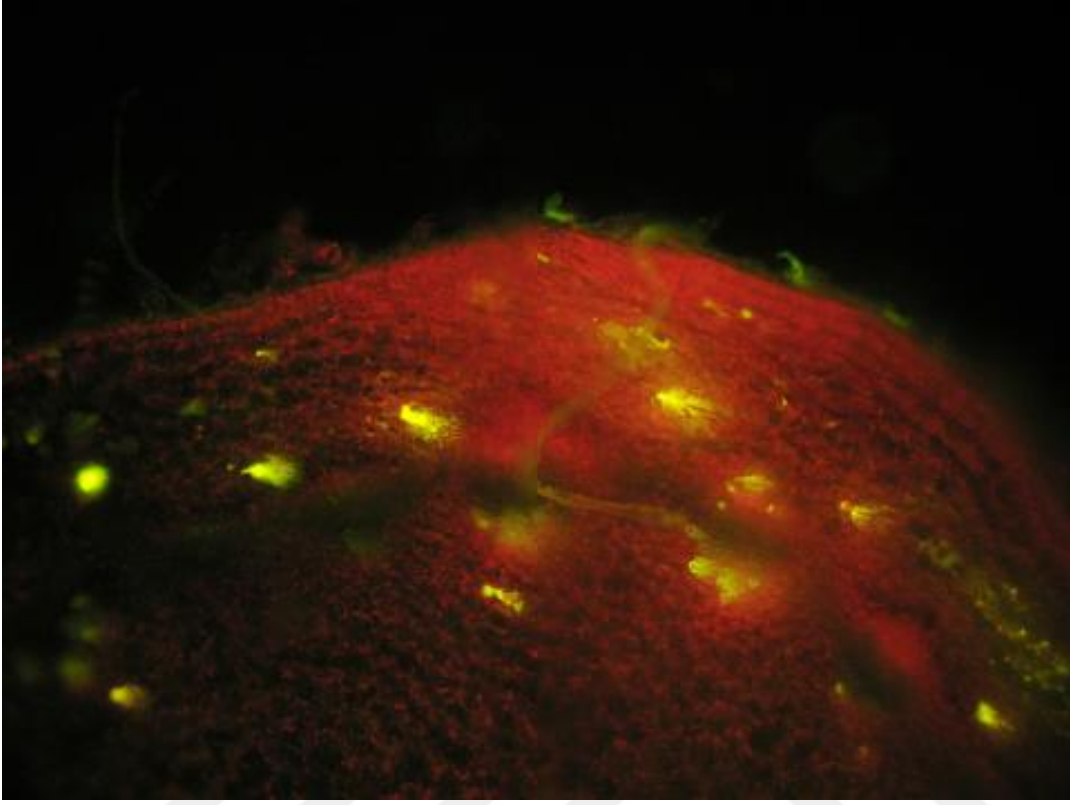
Doku kültürü sisteminin optimizasyonundan sonra direkt organogenez ile elde edilen bitki kısımlarına *A. tumefaciens* aracılığı ile *ATBOR4* geni aktarıldı. Mevcut gen ile bitlikte *NPTII* ve *GFP* geni aktarıldı. *NPTII*, kanamisin ve genitisin antibiyotiklerine karşı direnç geni olarak iş görürken *GFP* geninin ürünü olan GFP proteini 509 nm dalga boylu ışıpta yeşil renkte ışıma yapar. Gen aktarılan bitkilerin sefotaksim ile yıkanılmasına ardından kanamisin içeren MS besi ortamında kültüre alınması bu geni almayan ya da alsa da anlatım yapmayan bireylerin ölmesi ile sonuçlanan bir seleksyona sebebiyet verir. Kanamisin içeren seçici besiyerinde rejenerasyon gösteren bireylerin gövde ve yapraklarından kesitler alındı ve 509 dalga boyu ışık veren flouresans mikroskobunda kesitler incelendi. *GFP* geninin anlatım yapığı transgenik bireyler yeşil renkte görünerek gen transferinin başarılı olduğunu gösterildi. Ancak gen aktarımı yapılmayan kontrol grubu bitkilerde herhangi bir ışıma görülmedi.



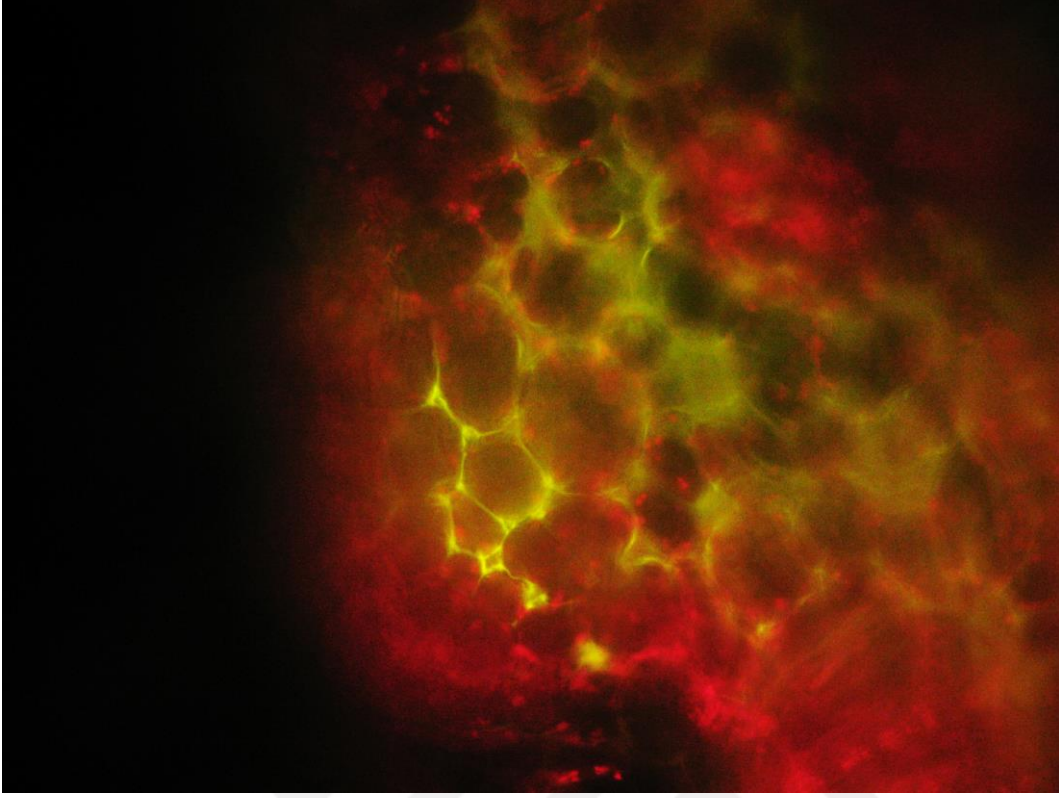
Şekil 18. Transgenik ayçiçeğinde GFP proteinin ışıma yaptığı yaprak çok hücreli tüyü



Şekil 19. Gen aktarımı yapılmamış kontrol bitkisi.



Şekil 20. Transgenik ayçiçeğinde GFP proteinin ışıma yaptığı gövde dokusu

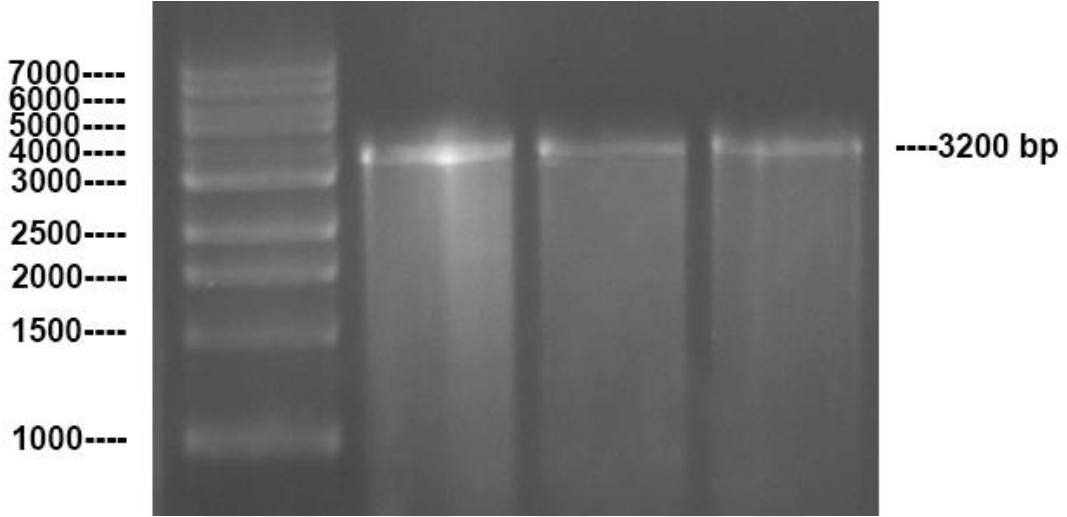


Şekil 21. Transgenik ayçiçeğinde GFP proteinin ışıma yaptığı parenkima hücreleri



Şekil 22. Gen aktarımı yapılmamış kontrol bitkisi gövdesinde ışımanın olmayışı.

Transgenik bitkilerin *ATBOR4* genlerini içerip içermediğini görmek amacıyla yapraklardan DNA izole edildi ve PCR ile çoğaltılıp agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. *ATBOR4* geni jelde 3200 baz çiftlik kısımda bantlar olarak gözlendi (Şekil 23).



Şekil 23. *AtBor4* geni aktarımı yapılmış ayçiçeği (TR 3080) bireylerinin agaroz jel görüntüsü

Transgenik bitkilerin rejenerasyon yüzdeleri ve tam bitki eldesi ile transgenik olmayanları karşılaştırıldığında transgenik bireylerin daha düşük yüzdelere sahip olduğu görülmüştür. Bu değerler aşağıdaki gibidir. Trakya 3080; kotiledon nodları 11.65% ve meristematik gövde uçları 8.07%, Palanci; kotiledon nodları 7.4% ve meristematik gövde uçları 5.4%, Tarsan; kotiledon nodları 8.7% ve meristematik gövde uçları 6% olarak görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak ekimi yapılan 3 farklı ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipinin (Trakya 3080, Palancı ve Tarsan) doku kültürü sistemleri kurularak, bu varyetelere *A. tumefaciens* aracılığı ile *AtBor4* geni aktarıldı. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen tohumların MS besiyerindeki çimlenmeleri incelendiğinde, çimlenmenin bütün genotiplerde % 90 üzerinde olduğu gözlemlendi. Ülkemiz kökenli başka varyeteler ile yapılan çalışmalarda hormon içermeyen MS ortamında çimlenmenin %86-96 arasında olduğu bildirilmiştir (Ozyigit ve ark., 2002).

Günümüze kadarki yapılan ayçiçeği doku kültürü çalışmalarında araştırmacılar çoğunlukla hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanmışlardır (Ozyigit ve ark., 2002; Oshin, 2015). Gen aktarımı çalışmalarında bazılarında kallus kültürlerinden yararlanılmıştır (Shafi ve ark., 2015). Ancak çalışmamızda özellikle *Agrobacterium tumefaciens*'in bitki hücrelerine daha iyi nüfuz edebilmesi için eksplantların alt kısımlarında yara bölgeleri oluşturmak ve özelleşmemiş hücreleri transgenik hale getirmek amacıyla meristematik uç kısımlar ve kotiledon nodları kullanıldı (Dogan ve ark., 2012; Ozyigit ve ark., 2006).

Önceki çalışmalara bakıldığında, araştırmacılar ayçiçeği doku kültürlerindeki başarının ilk çalışmalarda düşük, 90'lardan ve özellikle 2000'lerden sonra daha yüksek olduğunu belirtmiş, başarının genotipe bağımlı olduğunu, aynı kültür ve ortam şartları sağlandığı halde farklı varyetelerde farklı başarıların elde edildiğini söylemişlerdir. Ayrıca, direkt organogenez ile elde ettikleri genç bitkilerin daha düşük ölçüde somaklonal varyasyon oluşturdıklarını göstermişlerdir (Ozyigit ve ark., 2002).

1990'lardan günümüze gelindiğinde yapılan çalışmalara ve elde edilen başarılarla baktığımızda; 8 farklı genotipin 4-10 günlük kotiledonlarını kullanan ve bizim çalışmamızda olduğu gibi BAP ve NAA'nın 17 farklı kombinasyonunu deneyen Knittel ve arkadaşları (1991), en iyi rejenerasyonun 4-6 günlük kotiledonlarda olduğunu görmüşlerdir. Bu araştırmacılar, bizim çalışmamıza benzer şekilde 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l

NAA içeren MS ortamı kullanmışlar ve en iyi rejenerasyonu 2 haftalık bir süre sonunda % 80 lik bir değer ile HA 300B genotipinden elde etmişlerdir. Ceriani ve arkadaşları (1992) çalışmalarında 20 farklı genotip kullanmışlar, 9 genotipte rejenerasyon elde edemezken, 1 mg/l BAP ve 0.75 mg/l NAA içeren MS ortamında en iyi rejenerasyonu %90 ile sağlamışlardır. Çalışmamızda kullandığımız hormonları sıvı besiyerinde ve farklı konsantrasyonlarda kullanan Khalid ve arkadaşları (1992), çalışmalarında 3 farklı genotipin 1-4 günlük kotiledonlarını, 4.4 µM BAP ve 5.4 µM NAA içeren sıvı besiyerinde kültüre almış, en iyi rejenerasyonu (%59) 4. hafta sonunda 2 günlük kotiledonlardan R 897 genotipinden elde etmişlerdir. Gürel (1994) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, 5 farklı genotip ve 7 ile 15 günlük hipokotil parçaları kullanılmış, 7 değişik besiyerinde hipokotilden rejenerasyon araştırılarak farklı besiyerlerinde rejenerasyon ve kallus oluşumu gözlenmiştir.

Belloni (1992), ayçiçeği hipokotillerini sitolojik olarak incelemiş ve mitoz bölünmenin en fazla 7. ve 15. günlerde olduğunu tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda da 12 günlük eksplantlar kullanılmış ve Trakya 3080; kotiledon nodları 69% ve meristematik gövde ucu 72% Palanci; kotiledon nodları 62.5% ve meristematik gövde ucu 63.6% Tarsan; kotiledon nodları 36.3% ve meristematik gövde ucu 56.2% olacak şekilde başarılı bir rejenerasyon yüzdesi ve tam bitki eldesi sağlanmıştır. Yukarıdaki benzer çalışmalarda elde edilen farklı sonuçlar, kullanılan bitki hormonlarının, genotiplerin, ve eksplant yaşının farklı olması ile izah edilebilmektedir.

2000 ve sonrası çalışmalara baktığımızda daha başarılı doku kültürleri ve genetik olarak bitkinin ıslahı konusunda daha emin adımlar atıldığı görülmektedir.

Encheva ve ark., (2004) rejenere bitkilerde tohum-yağ içeriği ve bitki yüksekliğinde genetik değişikliklerin olduğunu bildirmiştir. Böyle değişikliklerin -melezleme programlarında- belirli çevre koşullarına adapte olabilen ve yüksek ürün verebilen bitkilerin üretilmesi için çok önemli olduğu belirtilmiştir Barotti ve ark. (2006). Doku kültüründen türetilmiş bitkileri kendileştirdi ve döllerdeki kalitatif özellikleri değerlendirmişlerdir. Onlar birçok fenotipik varyasyonun olduğunu bazılarının ise mutajenlerin neden olduklarına benzer olduğu rapor ettiler. Bizim çalışmamıza benzer

olarak, Huang ve ark. (2007) *H. annuus* PAC-2 and RHA-266 çaprazlamasından elde edilen rekombinant hatların epidermal kısımlarından (epidermal layers) sürgünler üretti. Bizim çalışmamızda kullandığımız hormonları farklı konsantrasyonlarda uygulayan Abdoli ve ark., (2007) de kültürlerin etkisine ve 4.4 µM BAP ve 5.4 µM NAA ile desteklenmiş MS-bazlı ortamda inkübe olan kotiledonlardan sürgün üretmede ortamdaki agar konsantrasyonlarına dikkat çekmiştir. Ayçiçeğinde bitki rejenerasyonları hakkında bazı çalışmalar olduğu halde, Pearson ve ark. (2007) bu bitkinin kültür ortamında bir şekilde rejenerasyona dirençli olduğuna vurgu yapmıştır. Ayrıca, rejenere sürgünlerin köklendirilmesi zordur bu durum araştırmacıları kökün uyarılmasında agar ile sıvı ortamın karşılaştırılmasına sevk etmiştir. İkinci durumda, sürgünler Jiffy-7 turba topraklara sokularak her biri 40 ml sıvı kök uyarıcı ortam içeren havalandırılmalı magenta kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Bu durumda, turba topraklar içindeki rejenere sürgünler daha güçlü bir kök sistemi geliştirmişler ve yarı-katı ortamda köklenen sürgünlerden daha az saydamlaşmışlardır. Turba topraklarda köklenen sürgünleri toprağa aktarmak agardan toprağa aktarmaktan daha az zararlı olduğu belirtilmiştir.

Ayrıca, belirli laboratuvar koşullarında kültür hücrelerinin verimli bitkilere dönüşme potansiyelleri gen introgresiyon çalışmaları için bir temel oluşturmaktadır. Örneğin, protoplast füzyonu ile somatik hibridizasyonu ve *Agrobacterium* aracılığı ile çekirdek veya plastidlere gen aktarımı gibi örnekler gösterilmektedir. Son 20 yıl içerisinde gen transfer teknolojilerindeki ilerlemeler göz önüne alındığında, ayçiçeği bitkisinin transformasyon çalışmalarında kullanılmamış olması mümkün değildir. Önceki çalışmalar, izole edilmiş ayçiçeği protoplastlarına plasmidlerin alınmasına yönelik idi (Moyne ve ark., 1989). pCAMVNEO'nun polietilen glikol (PEG) etkisi ile ayçiçeği fide hipokotillerinden izole edilmiş protoplastlara alınmasının ardından, kanamisine dirençli hücreler seçilir ve moleküler analize tabi tutulurdu. Bu yöntemde protoplastların izole edilmesi ve kültürü zahmetli olduğundan, araştırmacılar farklı transformasyon yöntemleri geliştirmek üzerine yoğunlaştılar. Örneğin, Knittel ve ark. (1994) yarım sürgün uçlarında mikroprojektil bombardımanın ardından neomisin fosfotransferaz (*nptII*; kanamisine direnç sağlar) ve β-glukuronidaz (*GUS*; reporter) genlerini kullanarak beş melez hattan transgenik sürgünler elde etmek için *A. tumefaciens* ile birlikte kültürünü yaptı. Genç fidelerden kotiledonlar ayrıldıktan sonra, eksplantlar cam boncuklarla sallanarak

yaralandı ve sonrada pCNL56 vektörü taşıyan *A. tumefaciens* ile birlikte kültürü yapıldı. Transgenik T2 nesillerinde *GUS* aktivitesi belirlendi. Sürgün uçları Burrus ve ark. (1996) tarafından da kullanıldı, embriyonik eksenlerin apikal segmentleri *gus* reporter geni içeren bir plazmid taşıyan *A. tumefaciens* ile birlikte kültürü yapıldı. Bir ayçiçeği transformasyon çalışmasında *in vitro* rejenerasyon komponentlerini azaltmak yada ortadan kaldırmak için, Sankara Rao ve ark., (1999) *GUS* ve *NPTII* genlerini içeren pKIWI105 plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* LBA4404 ü iki günlük fidelere (1 kodiledon ayrılmış) enfekte etti. Beş günlük bir büyümeden sonra, fideler *GUS* aktivitesi için tarandı ve sonrada varsayılan transforme olmuş sürgünler çoğaltılarak moleküler analizleri yapıldı. Bu sağde protokol transgenleri ifade eden aynı zamanda da fenotipik olarak normal bitkiler üretmeyi başardı. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, meristematik uç kısımları kullanarak Gurel ve Kazan (1999) transforme olmuş bitkilerdeki *GUS* aktivitesinin belirlenmesine dayalı *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı yapılmış 10 fenotipde değerlendirme de bulunmuştur. Bazı genotiplerde eksplantların %82.7 kadarı *GUS*-pozitif olarak bulundu. *Agrobacterium* suşu *AGL-1* gen transferinde LBA4404 suşun'dan daha efektif olduğu, buna karşılık hibrit genotiplerinde melez hatlardan daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. *Agrobacterium* ile aşılama öncesi eksplantları partikül bombardımanı ile yaralamak transformasyon etkinliğini artırmamıştır.

Bizim çalışmamızda, *Agrobacterium* ile enfekte etmeden önce hedef dokuları yaralama yöntemi ayçiçeği transformasyonunu kolaylaştırdığını göstermiştir.

Bunun yanında, Weber ve ark. (2003) hedef eksplant hücrelerini yaralamak için hücre duvarı parçalayıcı enzimler “Cellulase Onozuka R-10 (0.1% w/v)” ve “Pectinase Boerzyme M5 (0.05% w/v)” kullanarak alternatif bir yöntem göstermişlerdir. *Agrobacterium* ile aşılama öncesi eksplantların sonikasyonu (50 MHz, 2, 4, 6 saniye) *GUS* veya *GFP* transgenlerinin geçici anlatımının bu uygulama ile daha da arttığını gösterilmiştir. Tek başına enzimle müdahale ise stabil olarak transform olmuş bitkilerin veriminide artırmıştır. Hedef materyelinin seçimi *in vitro* olarak ayçiçeği hatlarında önceki rejenerasyon bilgileri ile ilişkilidir (Weber ve ark., 2000). Mohamed ve ark., (2006) da *GUS* genin kuşaklara stabil bir şekilde aktarımını göstermiş ve yüksek oleik ayçiçeği genotiplerinin tekrarlanabilir transformasyonunu doğrulamışlardır. Araştırmacılar bu

çalışmadaki gibi, *GFP* aktivitesini gelişimin erken evrelerindeki transgenik rejenerantları seçmek için bir reportör olarak kullanmışlardır. Transgenik bitkilerin etkin seçimi transformasyon çalışmalarında çok önemli bir yere sahiptir. Kaçan transgenik bitkilerin en aza indirilmesi için geliştirilen bir yöntemde, Radonic ve ark. (2008) iki yarım embryo (herbiri bir kodiledonlu) vermesi için tohumları kesmeden önce ayçiçeği genotipi HA89'un tohumlarını 24 saat boyunca yarı-kuvvetli bir MS-bazlı ortamda çimlendirmiştir. Eksplantlar *NPTII* ve *GUS* genleri içeren bir vektörü taşıyan *A. tumefaciens* EHA105 ile enfekte edilmişlerdir. Gösterilmiştir ki, rejenere sürgünlerdeki kökleri uyarmak için ortama ilave edilen kanamisin transforme olmuş ve olmamış sürgünleri kaçış olmaksızın ayırt etmede daha etkilidir. Dagustu ve ark. (2008) yağ kalitesini artırma potansiyeline sahip *erwinia uredovora* phytoene desaturase (*crtl*) ve hydroxymethylglutaryl-CoA (*Hmgr-CoA*) genlerini ayçiçeğine aktarmışlardır. Radonic ve ark. (2008) da bazı antifungal genlerini ayçiçeğine aktarmışlardır, örneğin *gln2* (glucanase) ve osmotin (*ap24*) (*Nicotiana tabacum*), chitinase (*ch5B*) (*Phaseolus vulgaris*), ribosome inhibitor protein (*rip*). Manavella ve Chan (2009) *Agrobacterium*-aracılığı ile ayçiçeği yaprak disklerine gen aktararak geçici bir gen anlatım protokolünü bildirmiştir. Bu yöntem gen anlatım ve susturma çalışmaları için faydalı olacaktır. Bununla birlikte, tarımsal anlamda birçok faydalı genin herhangi bir ayçiçeği genotipine aktarılabilmesini mümkün kılan sağlam transformasyon yöntemlerine de ihtiyaç vardır. Tishchenko ve ark. (2014), bizim çalışmamıza benzer olarak, ayçiçeği bitkisinin susuzluk ve tuzluluk toleransını artırmak amacıyla prolin dehidrogenaz genin baskılanması etkinliği hesaplamışlardır. Bunun için *Arabidopsis ProDH1* geninden üretilmiş çift-zincirli RNA-baskılayıcı geni içeren pBi2E plazmitini taşıyan bir LBA4404 suşu kullandılar. Ayçiçeği döllenmesi sırasında -in vitro ve bitkilelere- *Agrobacterium*-aracılığı ile transforasyon teknikleri ileri sürülmüştür. PCR analizleri *ProDH1* geninin transforme olmuş inbred hatların genomlarında ve de T1 ve T2 nesillerinde var olduğunu göstermiştir. Stres vericilerin öldürücü dozlarının (0.4 M mannitol ve %2.0 deniz tuzu) uygulanması transgenik rejenerantlarda L-prolin seviyesinin artmasına iyileşme periyodunda seviyesinin azalmasına sebep olmuştur. Bu çalışma, osmotoleransı artırmada ayçiçeği *ProDH1* geninin bastırılması etkinliği göstermiştir. Benzer bir çalışmada Sujatha ve ark. (2012) tarafından yapılmıştır.

Çalışmada pCAMBIA 2301 plazmidini taşıyan LBA 4404 *Agrobacterium* suşu kullanılmıştır. Plazmit, UidA raportör genini ve kanamisin üzerinde transformantların seçilebilirliğini sağlayan nptII genini içermektedir. Bizim çalışmamız gibi çevreyi ilgilendiren bir transgenik çalışmada Jung ve ark. (2014) tarafından yapılmıştır. Biyoyakıt uygulamaları için, *Acidothermus cellulolyticus*'dan elde edilmiş sentetik endoglükanaz E1 ve ksilanaz (Xyn10A) genleri geçici olarak vakum infiltrasyon kullanılarak ayrı tam ayçiçeği yapraklarında ifade olmuştur. Benzle ve ark. (2015) ortabatı Amerikadan topladıkları galls ve rizosferik topraklardan yeni *Agrobacterium* suşları izole etmişlerdir. Suşlar yarı geçirgen bir ortam üzerine gall ve toprak ekstratlarının ekimi yapılarak ve PCR vasıtasıyla ile izolatlarda *virG* varlığını tarayarak izole edilmiştir. Yeni yabani tip *virG* positive suşlar ve daha önce izole edilmiş yabani tip ve zararsız suşların transforasyon etkinliği ayçiçeği hipokotil ve kotiledon dokularında, soya fidanlarında ve soya proliferatif embriyogenik dokularında değerlendirildi.

Bu çalışmada *A. tumefaciens* aracılığı ile 3 farklı ayçiçeği varyetesine *AtBOR4* geni aktarılmıştır. *AtBOR4* geni *Arabidopsis BOR1* homologudur ve hücre zarında lokalize olan bir eflux-tipi Bor taşıyıcıyı kodlar. *BOR4* geninin aşırı anlatımı da *Arabidopsis* bitkilerine yüksek bor toleransı kazandırdığı bildirilmiştir (Miwa ve ark. 2007). Ayrıca *HvBOR2* ve *TaBor2* genleri tarafından kodlanan amino asit sekanslarında *Arabidopsis AtBOR1* den ziyade *AtBOR4* genine daha çok benzediği ortaya çıkmıştır (Nakagawa ve ark. 2007), bu da endojen *BOR4* ün yüksek bor toleransındaki fonksiyonunu desteklemektedir (Miwa ve ark., 2014). Bu gen ve fonksiyonu ile ilgili çalışmalar oldukça yeni olduğundan genin transformasyon çalışmaları da oldukça sınırlıdır. Benzer bir çalışmada Tombuloglu ve ark. (2009) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *AtBOR4* geni *A. thaliana* bitkisinden klonlanmış ve Fabacea üyelerinden *Medicago sativa* L. bitkisine aktarmıştır. Benzer bir diğer çalışmada Kajikawa ve ark. (2011) tarafından rapor edilmiştir. Çalışmada karnıbahar mozaik virüs (CaMV) 35S RNA promotorun kontrolü altında transgenik pirinç bitkilerinde *AtBOR4-GFP* füzyon genini anlatımı bildirilmiştir. Anlatım vektörü olarak *Pro35S-AtBOR4-GFP* kullanılmıştır. Pirinç kültürü (Nipponbare) ve *A. tumefaciens* (EHA101) transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Küresel olarak, ayçiçeği en önemli yağlı tohum bitkilerinden bir tanesidir ve muhtemeldir ki ayçiçek ekimi gelecek on yılda daha da artacaktır. Geleneksel ıslah yöntemleri verimi yüksek ve hastalıklara karşı dirençli ayçiçeği kùltivarlarını üretmiştir. Buna rağmen, sadece *Helianthus* cinsi içinde değil daha fazla ekilebilecek türlerin genetik tabanını genişletmeye de ihtiyaç duyulmaktadır. Ne yazık ki, hücre ve doku-bitki sistemleri *Helianthus* cinsi için serbestçe erişilebilir değildir ve belirli kùltivar ve türlerle sınırlı kalır, bu nedenle bu temel teknolojilerin yerleştirilmesi için daha fazla çabaya ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, somatik hibridlerin, transgenik bitkilerin ve somaklonal varyant bitkilerin iyileştirilmesinde bugüne kadar yapılan ilerlemeler ayçiçeği bitkisinin daha uzun vadeli genetik manipölasyonları için bu teknolojilerin potansiyeline şahitlik etmektedir.

KAYNAKLAR

Abdoli, M., Moieni, A., Dehghani, H. (2007). Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Pakistan Journal of Botany, 39(1): 31.

Abreu, I., Poza, L., Bonilla, I., Bolaños, L. (2014). Boron deficiency results in early repression of a cytokinin receptor gene and abnormal cell differentiation in the apical root meristem of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry, 77: 117-121.

Ahuja, M. R. (Ed.). (2013). Micropropagation of woody plants (Vol. 41). Springer Science & Business Media.

Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A. (2010). Plant cell walls. Garland Science.

Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A. (2010). Plant cell walls. Garland Science.

Albert, L. S., Wilson, C. M. (1961). Effect of boron on elongation of tomato root tips. Plant physiology, 36(2): 244.

Aleza, P., Garcia-Lor, A., Juárez, J., Navarro, L. (2016). Recovery of citrus cybrid plants with diverse mitochondrial and chloroplastic genome combinations by protoplast fusion followed by *in vitro* shoot, root, or embryo micrografting. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 1-13.

Alvarez, M. A. (2014). *In vitro* plant cultures as biofactories Chapter 4. In Plant Biotechnology for Health (pp. 33-59). Springer International Publishing.

Andrade, A., Riera, N., Lindstrom, L., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G., & Vigliocco, A. (2015). Pericarp anatomy and hormone profiles of cypsels in dormant and non-dormant inbred sunflower lines. Plant Biology, 17(2): 351-360.

Anonim. (2004), USDA-FAS, FAS online, Oilseed: World Market and Trade, (www.fas.usda.gov).

Asnaashari, M., Tajik, R., Khodaparast, M. H. H. (2015). Antioxidant activity of raspberry (*Rubus fruticosus*) leaves extract and its effect on oxidative stability of sunflower oil. Journal of Food Science and Technology, 52(8): 5180-5187.

Avivi, S., Dietzgen, R. G., Higgins, C. M. (2014). The Efficiency of *GFP* Gene Transformation on Peanut Embryo somatic Using *Agrobacterium* and Particle Bombardment. UNEJ e-Proceeding.

Babaoglu, M., Gurel, E., Ozcan, S. (2001). Bitki Biyoteknolojisi. Doku kültürü ve uygulamaları. Konya, Turkey: Selçuk University Press.

Bakhsh, A., Anayol, E., Ozcan, S. F. (2014). Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. Emirates Journal of Food and Agriculture, 26(3): 259.

Balazs, Z., Voica, C., Dehelean, A., Magdas, D. A., Ristoiu, D. (2015). Comparative study on macro-and micro-elements concentration in *Nicotiana tabacum* and *Faba siliquis* plants by ICP-MS. In 10TH International Conference Processes In Isotopes and Molecules (PIM 2015) (Vol. 1700, p. 030002).

Bar, C. (2015). Elucidation of boron hyperaccumulation and tolerance mechanisms in *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. using proteomics approach.

Barman, M., Shukla, L. M., Datta, S. P., Rattan, R. K. (2014). Effect of applied lime and boron on the availability of nutrients in an acid soil. Journal of Plant Nutrition, 37(3): 357-373.

Barotti, S., Fambrinii M., Pugliesi, C., Lenzi, A. (2006). Genetic variability in plants regenerated from *in vitro* culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). PlantBreed, 114: 275–276.

Barranco, W. T., Kim, D. H., Stella Jr, S. L., Eckhert, C. D. (2009). Boric acid inhibits stored Ca^{2+} release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, 25(4): 309-320.

Bassil E, Hu H, Brown PH (2004) Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiol* 136:3383–3395.

Belloni, P. N., Carney, D. H., Nicolson, G. L. (1992). Organ-derived microvessel endothelial cells exhibit differential responsiveness to thrombin and other growth factors. *Microvascular Research*, 43(1): 20-45.

Benzle, K. A., Finer, K. R., Marty, D., McHale, L. K., Goodner, B. W., Taylor, C. G., Finer, J. J. (2015). Isolation and characterization of novel *Agrobacterium* strains for soybean and sunflower transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(1): 71-81.

Bhasker, T. V., Gowda, N. K. S., Pal, D. T., Bhat, S. K., Pattanaik, A. K. (2015). Boron profile in common feedstuffs used in tropical livestock systems. *Animal Feed Science and Technology*, 209: 280-285.

Bhattacharyya, J., Chakraborty, A., Roy, S., Pradhan, S., Mitra, J., Chakraborty, M., ... Sen, S. K. (2015). Genetic transformation of cultivated jute (*Corchorus capsularis* L.) by particle bombardment using apical meristem tissue and development of stable transgenic plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(2): 311-324.

Bidhendi, A. J., Geitmann, A. (2015). Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 535.

Bocuk, H., Ture, C. (2014). Phytoremediation Possibilities of Boron-Contaminated Environments by Wild Plants Growing on Boron Reserve Areas in Turkey. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(13): 1784-1798.

BOREN, 2001. <http://www.boren.gov.tr/en/hhealth.htm>.

Boriollo, M. F. G., Souza, L. S., Resende, M. R., da Silva, T. A., Oliveira, N. D. M. S., Resck, M. C. C., ..., Fiorini, J. E. (2014). Nongenotoxic effects and a reduction of the DXR-induced genotoxic effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) seeds revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow. BMC complementary and alternative medicine, 14(1): 1.

Brown, P. H., Bellaloui, N., Wimmer, M. A., Bassil, E. S., Ruiz, J., Hu, H., ..., Römheld, V. (2002). Boron in plant biology. Plant Biology, 4(2): 205-223.

Burrus, M., Molinier, J., Himber, C., Hunold, R., Bronner, R., Rousselin, P., & Hahne, G. (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: transformation patterns. Molecular Breeding, 2(4): 329-338.

Camacho-Cristóbal JJ, Anzelotti D, González-Fontes A (2002) Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. Plant Physiol Biochem 40:997–1002.

Camacho-Cristóbal JJ, González-Fontes A (2007) Boron deficiency decreases plasmalemma H⁺-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. Planta 226:443–451.

Camacho-Cristóbal JJ, Rexach J, González-Fontes A (2008) Boron in plants: deficiency and toxicity. J Integr Plant Biol 50:1247–255.

Capula-Rodríguez, R., Valdez-Aguilar, L. A., Cartmill, D. L., Cartmill, A. D., Alia-Tejacal, I. (2016). Supplementary Calcium and Potassium Improve the Response of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to Simultaneous Alkalinity, Salinity, and Boron Stress. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 47(4): 505-511.

Castillo, B. M., Gallardo, J. O. M., Iturriaga, G. (2015). *In vitro* Plants of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Obtained by Direct Organogenesis. Journal of Agricultural Science, 7(11): 169.

- Ceriani, M. F., Hopp, H. E., Hahne, G. N., Escand, A. S. (1992). Cotyledons: an explant for routine regeneration of sunflower plants. *Plant and Cell Physiology*, 33(2): 157-164.
- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34(3): 407-415.
- Chatterjee, M., Tabi, Z., Galli, M., Malcomber, S., Buck, A., Muszynski, M., Gallavotti, A. (2014). The boron efflux transporter rotten ear is required for maize inflorescence development and fertility. *The Plant Cell*, 26(7): 2962-2977.
- Chen, M., Mishra, S., Heckathorn, S. A., Frantz, J. M., Krause, C. (2014). Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to acute boron deficiency and toxicity reveals effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and protein synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 171(3): 235-242.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron'. *Nature*, 415: 545–549.
- Choi, E. Y., Park, H. I., Ju, J. H., Yoon, Y. H. (2015). Boron availability alters its distribution in plant parts of tomato. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(2): 145-151.
- Chormova, D., Fry, S. C. (2016). Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted in vitro by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. *New Phytologist*, 209(1): 241-251.
- Chowdhury, M. M. (2015). *In vitro* culture establishment from Cotyledon and Embryonic Axis Explants of two Bangladeshi Sunflower (*Helianthus annus* L.) varieties.
- Ciani, L., Ristori, S. (2012). Boron as a platform for new drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(11): 1017-1027.

Citak, D., Silici, S., Tuzen, M., Soylak, M. (2012). Determination of toxic and essential elements in sunflower honey from Thrace Region, Turkey. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1): 107-113.

Clark, M. S. (Ed.). (2013). *Plant molecular biology—a laboratory manual*. Springer Science & Business Media.

Cobb, J. N., DeClerck, G., Greenberg, A., Clark, R., McCouch, S. (2013). Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(4), 867-887.

Col, M., Col, C. (2003). Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kutahya Province of Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10): 1417-1420.

Constabel, F. (2012). Callus culture: induction and maintenance. *Laboratory Procedures and Their Applications*, 27.

Czarnecka-Verner, E., Salem, T. A., Gurley, W. B. (2016). Adaptation of the *Agrobacterium tumefaciens* VirG response regulator to activate transcription in plants. *Plant Molecular Biology*, 90(3): 217-231.

Dagustu, N. (2008). Genetic analysis of grain yield per spike and some agronomic traits in diallel crosses of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(4): 249-258.

Dannel F, Pfeffer H, Römheld V (2002) Update on boron in higher plant-uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biol* 4:193–204.

Darvill, A. G., Albersheim, P., Bucheli, P., Doares, S., Doubrava, N., Eberhard, S., ..., Mohnen, D. (2014). cell-surface antigens and the receptors for hormones, toxins, bacteria, and viruses have created considerable interest in complex carbohydrates. *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*, 36: 41.

Davies, P. (Ed.). (2013). Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Springer Science & Business Media.

de Dios Barajas-López, J., Blanco, N. E., Strand, Å. (2013). Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833, (2): 425-437.

Denkovskienė, E., Paškevičius, Š., Werner, S., Gleba, Y., Ražanskienė, A. (2015). Inducible Expression of *Agrobacterium* Virulence Gene VirE2 for Stringent Regulation of T-DNA Transfer in Plant Transient Expression Systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(11): 1247-1255.

Dey, A., Dwivedi, B. S., Meena, M. C., Datta, S. P. (2013). Adsorption-desorption of boron in major soils of India. *J Indian Soc Soil Sci*: 61, 179-187.

Dogan, I., Kekec, G., Ozyigit, I. I., Sakcali, M. S. (2012). Salinity induced changes in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Pak J Bot*, 44, 21-25.

Domingues, D.S., Maximino Leite, S.M. and Cazerta Farro, A.P. (2005) Boron transport in Eucalyptus. 2. Identification in silico of a putative boron transporter for xylem loading in eucalypt. *Gen. Mol. Biol.* 28: 625-629.

Dutta, I., Kottackal, M., Tumimbang, E., Tajima, H., Zaid, A., Blumwald, E. (2013). Sonication-assisted efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the multipurpose woody desert shrub *Leptadenia pyrotechnica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112(3), 289-301.

Dwiyani, R., Purwantoro, A., Indrianto, A., Semiarti, E. (2015). Micropropagation of Orchid Carrying Knotted1-Like from *Arabidopsis thaliana* (Knat1) Gene. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 25(1): 13-20.

Elezovic, I., Datta, A., Vrbnicanin, S., Glamoclija, D., Simic, M., Malidza, G., Knezevic, S. Z. (2012). Yield and yield components of imidazolinone-resistant sunflower

(*Helianthus annuus* L.) are influenced by pre-emergence herbicide and time of post-emergence weed removal. *Field Crops Research*, 128: 137-146.

Encheva, J., Tsvetkova F., Ivanov P. (2004). Heritable tissue culture induced genetic variation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a tool for crop improvement. *Helia*, 27: 163–172.

Ferrol N, Donaire JP (1992) Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Sci* 86:41–47.

Filippi, C. V., Aguirre, N., Rivas, J. G., Zubrzycki, J., Puebla, A., Cordes, D., ..., Hopp, H. E. (2015). Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1.

Finer, J., Dhillon, T. (2016). Transgenic plant production. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*, 245-274.

Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R (1999) The pore size of nongraminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol* 121:829–838.

Franklin, C. I., Dixon, R. A. (1994). Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. *Plant Cell Cultures—a Practical Approach*, 2nd edn. IRL Press, Oxford, 1-25.

Freitas, F. S., De-Paula, O. C., Nakajima, J. N., Marzinek, J. (2015). Fruits of *Heterocoma* (Vernonieae-Lychnophorinae): taxonomic significance and a new pattern of phytomelanin deposition in Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 179(2): 255-265.

Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagège, D., Courtois, D., Joseph, C. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell

suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): 113(1): 25-39.

Gamborg, O. L., Phillips, G. C. (1995). Media preparation and handling. In Plant cell, tissue and organ culture (pp. 21-34). Springer Berlin Heidelberg.

Gan, Y., Lim, Y. S., Qiao, L. (2012). Combustion of Nanofluid Fuels with the Addition of Boron and Iron Particles at Dilute and Dense Concentrations. Combustion and Flame, 159(4): 1732-1740.

Ganie, M. A., Akhter, F., Bhat, M. A., Malik, A. R., Junaid, J. M., Shah, M. A., ... & Bhat, T. A. (2013). Boron- a critical nutrient element for plant growth and productivity with reference to temperate fruits. Current Science (Bangalore), 104(1): 76-85.

Gao, C., Nielsen, K. K. (2013). Comparison between *Agrobacterium*-mediated and direct gene transfer using the gene gun. Biolistic DNA Delivery: Methods and Protocols, 3-16.

García-Cano, E., Magori, S., Sun, Q., Ding, Z., Lazarowitz, S. G., Citovsky, V. (2015).

Interaction of *Arabidopsis* Trihelix-Domain Transcription Factors VFP3 and VFP5 with *Agrobacterium* Virulence Protein VirF. PloS one, 10(11): e0142128.

Gatica-Arias, A. M., Arrieta-Espinoza, G., Espinoza Esquivel, A. M. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. Electronic Journal of Biotechnology, 11(1): 101-112.

Gelvin, S. B. (2012). Plant molecular biology manual. Springer Science & Business Media.

Ghobadi, M., Taherabadi, S., Ghobadi, M. E., Mohammadi, G. R., & Jalali-Honarmand, S. (2013). Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of

sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, 50: 29-38.

Goldberg, S., Suarez, D. L. (2014). A New Soil Test for Quantitative Measurement of Available and Adsorbed Boron. *Soil Science Society of America Journal*, 78(2): 480-485.

Gonzalez-Fontes A, Rexach J, Navarro-Gochicoa MT, Herrera-Rodriguez MB, Beato VM, Maldonado JM, Camacho-Cristóbal JJ (2008) Is boron involved solely in structural roles in vascular plants? *Plant Signal Behav* 3:24–26.

González-Fontes, A., Navarro-Gochicoa, M. T., Camacho-Cristóbal, J. J., Herrera-Rodríguez, M. B., Quiles-Pando, C., Rexach, J. (2014). Is Ca²⁺ involved in the signal transduction pathway of boron deficiency? New hypotheses for sensing boron deprivation. *Plant Science*, 217, 135-139.

Gormus, O. (2016). Boron Nutrition Studies With Cotton and Sunflower in Southern Turkey. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, (just-accepted).

Gormus, O., Barutcular, C. (2016). Boron Nutrition Studies with Cotton and Sunflower in Southern Turkey. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(7), 915-929.

Gormus, O., Barutcular, C. (2016). Boron Nutrition Studies with Cotton and Sunflower in Southern Turkey. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*.

Gorovoy, A. S., Gozhina, O. V., Svendsen, J. S., Domorad, A. A., Tetz, G. V., Tetz, V. V., Lejon, T. (2013). Boron-Containing Peptidomimetics—A Novel Class of Selective Anti-tubercular Drugs. *Chemical Biology & Drug Design*, 81(3): 408-413.

Gumusderelioglu, M., Tuncay, E. O., Kaynak, G., Demirtas, T. T., Aydin, S. T., Hakki, S. S. (2015). Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31: 120-128.

Gupta, U., Verma, P., Solanki, H. (2014). Impact of high boron concentration on plants.

Gurel A (1994). Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)’de somatik dokuların *in vitro* kültürleri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 31(1): 41-48.

Gurel, E. (1997). Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Variability at variety, plant and organ level. Turkish Journal of Botany, 21(3): 131-136.

Gurel, E., Kazan, K. (1999). Evaluation of various sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. Turkish Journal of Botany, 23(3): 171-178.

Hajiboland, R., Bahrami-Rad, S., Bastani, S., Tolrà, R., Poschenrieder, C. (2013). Boron re-translocation in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) plants. Acta Physiologiae Plantarum, 35(8): 2373-2381.

Hamurcu, M., Demiral, T., Gezin, S., Hakki, E. E. (2015). Effect of Zinc on Boron Toxicity Tolerance of Common Bean. In of abstracts p. 104.

Hanaoka H, Uraguchi S, Takano J, Tanaka M, Fujiwara T (2014) OsNIP3; 1, a rice boric acid channel, regulates boron distribution and is essential for growth under boron-deficient conditions. Plant J. 78:890–902.

Haque, S. M., Paul, S., Ghosh, B. (2016). High-frequency *in vitro* flowering, hand-pollination and fruit setting in ten different cultivars of *Capsicum* spp. (*C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens*): an initial step towards *in vitro* hybrid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 127(1): 161-173.

Hedden, P. (2012). Gibberellin biosynthesis. eLS.

Henry, L. P., Watson, R. H., Blackman, B. K. (2014). Transitions in photoperiodic flowering are common and involve few loci in wild sunflowers (*Helianthus*; Asteraceae). American Journal of Botany, 101(10): 1748-1758.

Hirth, L. (2012). Comparative properties of plant tumors. *Viruses, Evolution and Cancer Basic Considerations*, 427.

Hofman, V., Dinusson, W. E., Zimmerman, D., Helgeson, D. L., Fanning, C. (2011). Sunflower oil as a fuel alternative.

Hosagoudar, P., Jaganath, A., Raju, J. N., Srinivasan, K. V. (2012). Successful Treatment of Acute Boron Poisoning Induced Neurotoxicity by Haemodialysis: A Case Report. In *Indian Anaesthetists' Forum*.

Howe, P. D. (1998). A review of boron effects in the environment. *Biological trace element research*, 66(1-3), 153-166.

Huang, X.Q., Nabipour, A., Gentzbittel, L., Sarrafi, A. (2007). Somatic embryogenesis.

Hunt, C. D. (2012). Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2): 157-160.

Iqbal, S., Bhanger, M. I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100(1): 246-254.

Jackson, M. A., Anderson, D. J., Birch, R. G. (2013). Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. *Transgenic Research*, 22(1): 143-151.

Jackson, M. A., Anderson, D. J., Birch, R. G. (2013). Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. *Transgenic Research*, 22(1): 143-151.

Jain, S. M., Brar, D. S., Ahloowalia, B. S. (2013). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement (Vol. 32). Springer Science & Business Media.

Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. (Eds.). (2013). Somatic embryogenesis in woody plants (Vol. 6). Springer Science & Business Media.

Jan, A. U., Hadi, F. (2015). Potassium, Zinc and Gibberellic Acid Foliar Application Enhanced Salinity Stress Tolerance, Proline and Total Phenolic Contents in Sunflower (*Helianthus annuus* L.).

Jefferies, S. P., Pallotta, M. A., Paull, J. G., Karakousis, A., Kretschmer, J. M., Manning, S., ..., Chalmers, K. J. (2000). Mapping and validation of chromosome regions conferring boron toxicity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). Theoretical and Applied Genetics, 101(5-6), 767-777.

Jordan, C. A., Neumann, E., Sowers, A. E. (Eds.). (2013). Electroporation and electrofusion in cell biology. Springer Science & Business Media.

Jung, S. K., Lindenmuth, B. E., McDonald, K. A., Hwang, M. S., Bui, M. Q. N., Falk, B. W., Dandekar, A. M. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient expression of plant cell wall-degrading enzymes in detached sunflower leaves. Biotechnology progress, 30(4): 905-915.

Kacar, B., Katkat, A. V. (1998). Bitki besleme. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı. Kado, C. I. (2015). Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* biology and its application to transgenic plant production, 7.

Kahl, G., Schell, J. S. (Eds.). (2014). Molecular biology of plant tumors. Academic press. Kajikawa, M., Fujibe, T., Uraguchi, S., Miwa, K., Fujiwara, T. (2011). Expression of the *Arabidopsis* borate efflux transporter gene, *AtBOR4*, in rice affects the xylem loading of boron and tolerance to excess boron. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 75(12): 2421-2423.

Karabas, H. (2013). Ayçiçek yağı biyodizelin ester dönüşüm oranı üzerine etkili olan parametrelerin optimizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(1):1-5.

Kawaji, H., Miyatake, S. I., Shinmura, K., Kawabata, S., Tokuyama, T., Namba, H. (2015). Effect of boron neutron capture therapy for recurrent anaplastic meningioma: an autopsy case report. *Brain Tumor Pathology*, 32(1): 61-65.

Kaya, Y. (2004). Confectionery sunflower production in Turkey. In *Proceeding of 16th International Sunflower Conference*. August, pp. 817-822.

Kaya, Y. Aksakal, O. (2005). Endemik bitkilerin dünya ve Türkiye'deki dağılımı. *Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi*, 7(1): 85-99.

Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., Brunton, N. P. (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food chemistry*, 161: 79-86.

Keren, R., Bingham, F. T., Rhoades, J. D. (1985). Plant uptake of boron as affected by boron distribution between liquid and solid phases in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 49(2): 297-302.

Kerr, A., Tate, M. (2016). Further studies on crown gall of stone fruit. *Australasian Plant Pathology*, 45(5): 443-445.

Khalid M, Chrabi B, Castelle JC, Latche A, Roustan JP, Fallot, J (1992). Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Plant Cell Rep*, 10: 617-620.

Khan, A., Ali, L., Chaudhary, H. J., Munis, M. F. H., Bano, A., Masood, S. (2016). *Bacillus pumilus* alleviates boron toxicity in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) due to enhanced antioxidant enzymatic activity. *Scientia Horticulturae*, 200: 178-185.

Knie, N., Polsakiewicz, M., Knoop, V. (2015). Horizontal gene transfer of chlamydial-like tRNA genes into early vascular plant mitochondria. *Molecular Biology and Evolution*, 32(3): 629-634.

Knittel N, Escandn A.S., Hahne G. (1991). Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons, *Plant Sci.* 73: 219-226.

Knittel, N., Gruber, V., Hahne, G., & Lénée, P. (1994). Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol. *Plant Cell Reports*, 14(2-3): 81-86.

Kodahl, N., Müller, R., Lütken, H. (2016). The *Agrobacterium rhizogenes* oncogenes *rolB* and *ORF13* increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Science*, 252: 22-29.

Kötschau, A., Büchel, G., Einax, J. W., Merten, D. (2013). A time-series phytoremediation experiment with sunflowers (*Helianthus annuus*) on a former uranium mining site. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 1). EDP Sciences.

Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R (2006) The aquaporins. *Genome Biol* 7:206.

Krutovsky, K. V., Tretyakova, I. N., Oreshkova, N. V., Pak, M. E., Kvitko, O. V., Vaganov, E. A. (2014). Somaclonal variation of haploid *in vitro* tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome de novo sequencing. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(5): 655-664.

Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., & Kohchi, T. (2013). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(1): 167-172.

Kumar, G. K., Thomas, T. D. (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 110(1), 141-151.

Kumar, N., Gulati, A., Bhattacharya, A. (2013). L-Glutamine and l-glutamic acid facilitate successful *Agrobacterium* infection of recalcitrant tea cultivars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(7): 1649-1664.

Kurbel, S. (2013). Model of tumor-associated epigenetic changes of HER2, ER, and PgR expression in invasive breast cancer phenotypes. *Tumor Biology*, 34(4): 2011-2017.

Landey, R. B., Cenci, A., Guyot, R., Bertrand, B., Georget, F., Dechamp, E., ..., Etienne, H. (2015). Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3): 517-531.

Lata, H., Chandra, S., Wang, Y. H., ElSohly, M. A., Khan, I. A. (2014). *In vitro* germplasm conservation of elite *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Acta horticulturae*.

Lee, J. H., Kim, Y. G., Baek, K. H., Cho, M. H., Lee, J. (2015). The multifaceted roles of the interspecies signalling molecule indole in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Microbiology*, 17(4): 1234-1244.

Levent, S., Budak, A., Pamukoglu, M. Y., Gonen, M. (2016). Extraction of boric acid from tincal mineral by supercritical ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, 109: 67-73.

Li, J., Wang, X., Wang, X., Wang, Y. (2015). Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(3): 861-880.

Linsmaier, E. M., Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(1): 100-127.

Liu, G., Dong, X., Liu, L., Wu, L., Peng, S. A., Jiang, C. (2015). Metabolic profiling reveals altered pattern of central metabolism in navel orange plants as a result of boron deficiency. *Physiologia Plantarum*, 153(4), 513-524.

Liu, H., Liu, Y., Wang, H., Zhang, X., Wang, J., Cong, F. (2014). Adventitious bud regeneration from cotyledonary node, hypocotyl, cotyledon and euphylla of various genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Research on Crops*, 15(3): 676-682.

Lynch, P., Davey, M. R. (2012). Electrical manipulation of cells. Springer Science & Business Media.

Maathuis, F. J., Diatloff, E. (2013). Roles and functions of plant mineral nutrients. *Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols*, 1-21.

Manavella, P. A., Chan, R. L. (2009). Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. *Nature Protocols*, 4(11): 1699-1707.

Martinelli, L., Gribaudo, I., Bertoldi, D., Candioli, E., Poletti, V. (2015). High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivars Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 40(3): 111.

Marton, I., Honig, A., Omid, A., De Costa, N., Marhevka, E., Cohen, B., ... Vainstein, A. (2013). From *Agrobacterium* to viral vectors: genome modification of plant cells by rare cutting restriction enzymes. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8): 639-650.

Matoh, T. (2013). Boron in Plant Nutrition and Cell Wall. *Plant Nutrient Acquisition: New Perspectives*, 227.

Matthysse, A. G. (2015). Attachment of *Agrobacterium* to plant surfaces. *Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production*, 94.

Matveeva, T. V., Bogomaz, D. I., Pavlova, O. A., Nester, E. W., Lutova, L. A. (2012). Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant linaria in nature. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12): 1542-1551.

Maurel, C., Verdoucq, L., Rodrigues, O. (2016). Aquaporins and Plant Transpiration. *Plant, Cell & Environment*.

McIlrath, W. J. (1965). Mobility of boron in several dicotyledonous species. *Botanical Gazette*, 27-30.

Miret, J. A., Munné-Bosch, S. (2014). Plant amino acid-derived vitamins: biosynthesis and function. *Amino Acids*, 46(4): 809-824.

Mishra, T., Goyal, A. K., Bhattacharya, M., Kar, P., Sen, A. (2015). Polyethylene glycol mediated protoplast fusion of medicinally important *Canna*. *Research in Plant Biology*, 5(1).

Miwa, K, Takano, J, Omori, H, Seki, M, Shinozaki, K, Fujiwara, T. (2007). Plants tolerant of high boron levels. *Science*, 318: 1417.

Miwa, K., Aibara, I., Fujiwara, T. (2014). *Arabidopsis thaliana* BOR4 is upregulated under high boron conditions and confers tolerance to high boron. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(3): 349-355.

Miwa, K., Fujiwara, T. (2011). Role of overexpressed BOR4, a boron exporter, in tolerance to high level of boron in shoots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 57: 558–565.

Miwa, K., Ishikawa, K., Terada, K., Yamada, H., Suzuki, T., Yamashino, T., Mizuno, T. (2007). Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant and Cell Physiology*, 48(12): 1809-1814.

Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tanokura, M. (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science*, 18(5): 259-266.

Mohamed, S. H., Boehm, R., Schnabl, H. (2006). Stable genetic transformation of high oleic *Helianthus annuus* L. genotypes with high efficiency. *Plant Science*, 171(5): 546-554.

Moraga, N. B., Amoroso, M. J., Rajal, V. B. (2013). Streptomyces from Soils Contaminated with Boron Compounds. Actinobacteria: Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes, 136.

Moreno, M. V., Nishinakamasu, V., Loray, M. A., Alvarez, D., Gieco, J., Vicario, A., ..., Lia, V. V. (2013). Genetic characterization of sunflower breeding resources from Argentina: assessing diversity in key open-pollinated and composite populations. Plant Genetic Resources, 11(03): 238-249.

Moscatiello, R., Baldan, B., Navazio, L. (2013). Plant cell suspension cultures. Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols, 77-93.

Moseman, R. F. (1994). Chemical disposition of boron in animals and humans. Environmental Health Perspectives, 102(7): 113.

Mounet-Gilbert, L., Dumont, M., Ferrand, C., Bournonville, C., Monier, A., Jorly, J., ..., Stevens, R. (2016). Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. Journal of Experimental Botany, 67(15): 4767-4777.

Moyne, A. L., Tagu, D., Thor, V., Bergounioux, C., Freyssinet, G., Gadal, P. (1989). Transformed calli obtained by direct gene transfer into sunflower protoplasts. Plant Cell Reports, 8(2): 97-100.

Murai, N. (2013). Review: plant binary vectors of Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa or pVS1.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

Nakagawa Y, Hanaoka H, Kobayashi M, Miyoshi K, Miwa K, Fujiwara T (2007) Cell-type specificity of the expression of OsBOR1, a rice efflux boron transporter gene, is

regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. *Plant Cell* 19:2624–2635.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., ..., Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1): 34-41.

Nester, E. W. (2015). *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Frontiers in Plant Science*, 5, 730.

Nielsen, F. H. (2014). Should bioactive trace elements not recognized as essential, but with beneficial health effects, have intake recommendations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4): 406-408.

Nitsch, J. P., Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(3862): 85-87.

Nyakudya, T. T., Nosenga, N., Chivandi, E., Erlwanger, K. H., Gundidza, M., Gundidza, E., Muredzi, P. (2015). *Grewia bicolor* seed oil: Putative pharmaceutical, cosmetic and industrial uses. *South African Journal of Botany*, 97: 154-158.

Ochatt, S. (2013). Plant cell electrophysiology: Applications in growth enhancement, somatic hybridisation and gene transfer. *Biotechnology Advances*, 31(8): 1237-1246.

Onurlubas H., Kizilaslan H. (2007). Türkiye’de bitkisel yağ sanayindeki gelişmeler ve geleceğe yönelik beklentiler. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü*.

Oshin, A. T. (2015). *In vitro* culture establishment from hypocotyl and cotyledon explants of two Bangladeshi sunflower (*Helianthus annuus* L.) varieties.

Osman, K. T. (2013). Chemical Properties of Soil. In *Soils* pp. 97-111.

Ozaslan, C., Onen, H., Farooq, S., Gunal, H., Akyol, N. (2016). Common ragweed: An emerging threat for sunflower production and human health in Turkey. *Weed Biology and Management*.

Ozyigit, I. I. (2008). Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 1145.

Ozyigit, I. I. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* and its use in plant biotechnology. In *Crop Production for Agricultural Improvement* pp. 317-361.

Ozyigit, I. I., & Gozukirmizi, N. (2009). Efficient shoot and root formation from cotton shoot apices. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(4): 527-531.

Ozyigit, I. I., Bajrovic, K., Gozukirmizi, N., Semiz, B. D. (2002). Direct plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of five different sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) from Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16(1): 8-11.

Ozyigit, I. I., Dogan, I., Tarhan, E. A. (2013). *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops. In *Crop Improvement* (pp. 1-48). Springer US.

Ozyigit, I. I., Gozukirmizi, N., Semiz, B. D. (2006). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(4): 556-559.

Ozyigit, I. I., Gozukirmizi, N., Semiz, B. D. (2007). Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 6(13).

Ozyigit, I. I., Kahraman, M. V., Ercan, O. (2007). Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 6(1): 3.

Ozyigit, I.I., Bajrovic, K., Gozukirmizi, N., Semiz, B. D. (2002). Direct plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of five different sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) from Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16(1): 8-11.

Pani, D., Rath, S. K., Ray, D. K., Sahoo, S. L. (2016). Proton induced X-ray emission-based analysis of trace element composition of cotyledon derived *in vitro* callus culture of *Abrus precatorius* L.: a multimedical wild legume. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 308(1): 113-122.

Park, S. Y., Vaghchhipawala, Z., Vasudevan, B., Lee, L. Y., Shen, Y., Singer, K., ... Gelvin, S. B. (2015). Agrobacterium T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins. *The Plant Journal*: 81(6), 934-946.

Patnaik, D., Khurana, P. (2003). Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli. *BMC plant biology*, 3(1), 1.

Pauly, M., Keegstra, K. (2016). Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan*. *Annual Review of Plant Biology*, 67: 235-259.

Pearson, C. H., Cornish, K., McMahan, C. M., Whalen, M., Rath, D. J., Dong, N., Wong, S. (2007). Using peat pellets in liquid media to root sunflower tissue culture plants. *Issues in New Crops and New Uses*, 78-81.

Pereyra-Irujo, G. A., Izquierdo, N. G., Covi, M., Nolasco, S. M., Quiroz, F., Aguirrezábal, L. A. (2009). Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: a simulation study. *Biomass and Bioenergy*, 33(3): 459-468.

Pérez-Castro R, Kasai K, Gainza-Cortés F, Ruiz-Lara S, Casaretto JA, Peña-Cortés H, González E (2012) VvBOR1, the grapevine ortholog of AtBOR1, encodes an efflux boron transporter that is differentially expressed throughout reproductive development of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Physiol* 53:485–494.

Pérez-Massot, E., Banakar, R., Gómez-Galera, S., Zorrilla-López, U., Sanahuja, G., Arjó, G., ... Dashevskaya, S. (2013). The contribution of transgenic plants to better health through improved nutrition: opportunities and constraints. *Genes & Nutrition*, 8(1): 29-41.

Pérez-Ortiz, M., Peña, J. M., Gutiérrez, P. A., Torres-Sánchez, J., Hervás-Martínez, C., López-Granados, F. (2015). A semi-supervised system for weed mapping in sunflower crops using unmanned aerial vehicles and a crop row detection method. *Applied Soft Computing*, 37: 533-544.

Petelet-Giraud, E., Klaver, G., Negrel, P. (2009). Natural versus anthropogenic sources in the surface-and groundwater dissolved load of the Dommel river (Meuse basin): Constraints by boron and strontium isotopes and gadolinium anomaly. *Journal of Hydrology*, 369(3): 336-349.

Platt, T. G., Morton, E. R., Barton, I. S., Bever, J. D., Fuqua, C. (2014). Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids. *Frontiers in Plant Science*, 5: 635.

Potrykus, I., Spangenberg, G. (Eds.). (2013). *Gene transfer to plants*. Springer Science & Business Media.

Preiss, J. (Ed.). (2014). *Carbohydrates: Structure and Function: The Biochemistry of Plants*. Elsevier.

Presotto, A., Ureta, M. S., Cantamutto, M., Poverene, M. (2012). Effects of gene flow from IMI resistant sunflower crop to wild *Helianthus annuus* populations. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 146(1): 153-161.

Radonic, L.M., Zimmermann, J.M., Zavallo, D., López, N., López-Bilbao, M.. (2008). Introduction of antifungal genes in sunflower via *Agrobacterium*. *Elect. J. Biotech.* 11(5): 1-13.

Rahal, A., Shivay, Y. S. (2016). Micronutrient Deficiencies in Humans and Animals: Strategies for Their Improvement. In Biofortification of Food Crops, pp. 217-228.

Rawashdeh, H. M., Sala, F. (2015). Effect of some micronutrients on growth and yield of wheat and its leaves and grain content of iron and boron. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture, 72(2): 503-508.

Reed, B. M., Wada, S., DeNoma, J., Niedz, R. P. (2013). Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(3): 343-355.

Refstie, S., Baeverfjord, G., Seim, R. R., Elvebø, O. (2010). Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture*, 305(1): 109-116.

Reid, R. J. (2013). Boron toxicity and tolerance in crop plants. In Crop Improvement Under Adverse Conditions pp. 333-346.

Roman, O., Heyd, B., Broyart, B., Castillo, R., Maillard, M. N. (2013). Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 52(1), 49-59.

Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K., ... Federici, F. (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiology*, 166(2), 455-469.

Ryden P, Sugimoto-Shirasu K, Smith AC, Findlay K, Reiter WD, McCann MC (2003) Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked

microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol* 132:1033–1040.

Sankara Rao, K., Rohini V.K. (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A simple protocol. *Ann. Bot.* 83: 347–354.

Sarkar, D., De, D. K., Das, R., Mandal, B. (2014). Removal of organic matter and oxides of iron and manganese from soil influences boron adsorption in soil. *Geoderma*, 214: 213-216.

Schaller, G. E., Bishopp, A., Kieber, J. J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27(1): 44-63.

Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1): 199-204.

Seyyedi, M., Moghaddam, P. R., Shahriari, R., Azad, M., Rezaei, E. E. (2013). Allelopathic potential of sunflower and castor bean on germination properties of dodder (*Cuscuta compestris*). *African Journal of Agricultural Research*, 8(7): 601-607.

Shafi, A., Gill, T., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Ahuja, P. S., Singh, A. K. (2015). Improved callus induction, shoot regeneration, and salt stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing superoxide dismutase from *Potentilla atrosanguinea*. *Protoplasma*, 252(1): 41-51.

Shen ZG, Liang YC, Shen K (1993) Effect of boron on the nitrate reductase-activity in oilseed rape plants. *J Plant Nutr* 16:1229–1239.

Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Avramenko, T. V., Günter, E. A., Ovodov, Y. S., ... Zhuravlev, Y. N. (2013). The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Biotechnology*, 168(1): 64-70.

Shorrocks, V. M. (1997). The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant and Soil*, 193(1-2): 121-148.

Singh, K. G., Nair, V., D'souza, M. R. (2014). Biochemical studies on Crown Gall Disease in *Cantharanthus roseus* induced by *Agrobacterium tumefaciens*.

Singh, N. V., Singh, S. K., Singh, A. K. (2015). Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 50(3): 115.

Sluis, A., Hake, S. (2015). Organogenesis in plants: initiation and elaboration of leaves. *Trends in Genetics*, 31(6): 300-306.

Smith, R. H. (2013). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press.

Sonon, L., Kissel, D. E., Sikora, F. J. (2014). Hot-Water Extractable Boron. *Soil Test Methods From the Southeastern United States*, 131.

Sood, P., Bhattacharya, A., Joshi, R., Gulati, A., Chanda, S., Sood, A. (2014). A method to overcome the waxy surface, cell wall thickening and polyphenol induced necrosis at wound sites-the major deterrents to *Agrobacterium* mediated transformation of bamboo, a woody monocot. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(1): 69-80.

Sugimoto, K., Meyerowitz, E. M. (2013). Regeneration in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Organogenesis: Methods and Protocols*, 265-275.

Sujatha, D., Hebbar, P. B., Pai, A. (2012). Prevalence and correlation of oral lesions among tobacco smokers, tobacco chewers, areca nut and alcohol users. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(4): 1633-1637.

Sun, J., Shi, L., Zhang, C., and Xu, F. (2012) Cloning and characterization of boron transporters in *Brassica napus*. *Mol. Biol. Rep.* 39:1963-73.

Takada, S., Miwa, K., Omori, H., Fujiwara, T., Naito, S., Takano, J. (2014). Improved tolerance to boron deficiency by enhanced expression of the boron transporter BOR2. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(3): 341-348.

Takano J, Miwa K, Fujiwara T (2008) Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci* 13:451–457.

Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Fujiwara T (2002) *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* 420:337–340.

Takano J, Tanaka M, Toyoda A, Miwa K, Kasai K, Fuji K, Fujiwara T (2010) Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc Natl Acad Sci* 107:5220–5225.

Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18:1498–1509.

Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., ..., Baldwin, D. (2013). An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *The Plant Cell*, 25(1): 270-287.

Tanaka M, Fujiwara T (2008) Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Eur J Physiol* 456:671–677.

Tassy, C., Partier, A., Beckert, M., Feuillet, C., Barret, P. (2014). Biolistic transformation of wheat: increased production of plants with simple insertions and heritable transgene expression. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(1): 171-181.

Tassy, C., Partier, A., Beckert, M., Feuillet, C., Barret, P. (2014). Biolistic transformation of wheat: increased production of plants with simple insertions and heritable transgene expression. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(1): 171-181.

Thornton, B. F., Burdette, S. C. (2013). The ends of elements. *Nature Chemistry*, 5(5): 350-352.

Thorpe, T. A. (2012). *In vitro* embryogenesis in plants (Vol. 20). Springer Science & Business Media.

Tishchenko, O. M., Komisarenko, A. G., Mykhalska, S. I., Sergeeva, L. E., Adamenko, N. I., Morgun, B. V., Kochetov, A. V. (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro and in planta using Lba4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*, 48(4): 218-226.

Tombuloglu, H., Kekec, G., Sakcali, M. S., Akbas, F. (2009). Cloning of *AtBOR4* gene to generate boron tolerant *Medicago sativa* L.(Leguminosae-Fabacea) cultivars. *New Biotechnology*, 25: 299.

Turan, H. S., Aydogdu, E., Pekcan, T., Colakoglu, H. (2013). Microelement status and soil and plant relationships of olive groves in west Anatolia region of Turkey. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44(1-4): 80-88.

Ueki, S., Magori, S., Lacroix, B., Citovsky, V. (2013). Transient gene expression in epidermal cells of plant leaves by biolistic DNA delivery. *Biolistic DNA Delivery: Methods and Protocols*, 17-26.

Ulusik, I., Kaya, A., Fomenko, D. E., Karakaya, H. C., Carlson, B. A., Gladyshev, V. N., Koc, A. (2011). Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis. *PLoS One*, 6(11), 27772.

Van Der Vyver, C., Conradie, T., Kossmann, J., Lloyd, J. (2013). *In vitro* selection of transgenic sugarcane callus utilizing a plant gene encoding a mutant form of acetolactate synthase. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(2): 198-206.

Verma, S. K., Sahin, G., Yucesan, B., Eker, I., Sahbaz, N., Gurel, S., Gurel, E. (2012). Direct somatic embryogenesis from hypocotyl segments of *Digitalis trojana* Ivan and subsequent plant regeneration. *Industrial Crops and Products*, 40: 76-80.

Wahyuni, D. K., Vidiанти, F., Purnobasuki, H., Ermayanti, T. M., Prajoga, B., Utami, E. S. W. (2015). *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Hairy Root Induction in *Justicia gendarussa* Burm. f. J. Appl. Environ. Biol. Sci, 5(4): 87-93.

Wang ZY, Tang YL, Zhang FS, Wang H (1999) Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. J Plant Nutr 22:543–550.

Wang, N., Yang, C., Pan, Z., Liu, Y., Peng, S. A. (2015). Boron deficiency in woody plants: various responses and tolerance mechanisms. Frontiers in Plant Science, 6.

Wang, W., Xiao, K., Zheng, X., Zhu, D., Yang, Z., Tang, J., ..., Peng, K. (2014). Effects of supplemental boron on growth performance and meat quality in African ostrich chicks. Journal of agricultural and food chemistry, 62(46): 11024-11029.

Weber, S., Friedt, W., Landes, N., Molinier, J., Himber, C., Rousselin, P., ..., Horn, R. (2003). Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. Plant Cell Reports, 21(5): 475-482.

Weber, S., Horn, R., Friedt, W. (2000). High regeneration potential in vitro of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization..Euphytica, 116(3): 271-280.

White, W. H. (1963). Interest rate differences, forward exchange mechanism, and scope for short-term capital movements. Staff Papers, 10(3): 485-503.

Wimmer, M. A., Goldberg, S., Gupta, U. C. (2015). 8 Boron. Handbook of Plant Nutrition, 305.

Yaacob, J. S., Saleh, A., Elias, H., Abdullah, S., Mahmad, N., Mohamed, N. (2014). *In vitro* regeneration and acclimatization protocols of selected ornamental plants (*Agapanthus praecox*, *Justicia betonica* and *Celosia cristata*). Sains Malaysiana, 43(5): 715-722.

Yalpani, M. (2013). Polysaccharides: syntheses, modifications and structure/property relations (Vol. 36). Elsevier.

Yang, L., Wang, C., Wang, L., Xu, C., Chen, K. (2013). An efficient multiplex PCR assay for early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic plant materials. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37(2): 157-162.

Ziemienowicz, A. (2014). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(4): 95-102.

Zlenko, V. A., Troshin, L. P., Kotikov, I. V. (2015). An optimized medium for clonal micropropagation of grapevine. VITIS-Journal of Grapevine Research, 34(2): 125.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sedat KARADENİZ

Doğum Yeri ve Tarihi : EYÜP 31.01.1989

Yabancı Dili : İngilizce

E-Posta : sedatkaradeniz.ktu@gmail.com

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen-Matematik	Akşemsettin Y.D.A Lisesi	2007
Lisans	Biyoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2012
2. Lisans	İşletme	Anadolu Üniversitesi	2013

AKADEMİK ÇALIŞMALAR

Yayınları

I. I. Ozyigit, I. Dogan, S. Igdelioglu, E. Filiz, S. Karadeniz, Z. Uzunova, (2016), Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.)—a genetic and physiological approach, *Biotechnol Biotec Eq*, 30(3), 489-496, (Link)

Uluslararası Kongreler

I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, H. Tombuloglu, E. Filiz, Optimization of *Agrobacterium*-mediated gene transfer systems in Turkish sunflower (*Helianthus annuus* L.) varieties, 19th International Sunflower Conference, Edirne, Turkey, 2016, May 29-June 03, 2016, (Oral Presentation)

I. I. Ozyigit, M. E. Uras, U. Sen, I. E. Yalcin, R. Vatansever, S. Karadeniz, F. Tabanli, E. Filiz, G. Demir, Utilization of a well-known biomonitor plant *Robinia pseudoacacia* L. to evaluate heavy metal pollution levels in Istanbul/Turkey, International Conference on Environment and Natural Science (ICENS) Singapore April 2, 2016, (Oral Presentation)

A. Yilmaz, I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, M. Keskin, A. Hocaoglu, A. Kaval, F. Tabanli, I. E. Yalcin, G. Demir, Determination of Some Heavy Metals and Mineral Nutrients in *Silybum marianum* (L.) Gaertner, Grown in the Industrial Area of Dilovasi-Kocaeli-Turkey, International Conference on Environment and Natural Science (ICENS) Singapore April 2, 2016, (Oral Presentation)

S. Karadeniz, H. Tombuloglu, I. I. Ozyigit, *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis BOR4* gene to develop B-tolerant sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars, IX International Symposium on in vitro Culture and Horticultural Breeding, March 13-17, 2016, (Oral Presentation)

I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, F. Tabanli, R. Vatansever, M. E. Uras, I. E. Yalcin, N. C. Sesal, G. Demir, Determination of Mineral Nutrient and Heavy Metal Accumulation Status of *Colchicum bivonae* Guss from Abant/Bolu-Turkey, International VI. Balkan Botanical Congress, Rijeka, Croatia, Sept 14-18, 2015, (Poster Presentation)

I. I. Ozyigit, B. Eskin, M. E. Uras, S. Karadeniz, R. Vatansever, F. Tabanli, M. Keskin, G. Demir, I. E. Yalcin, Mineral Nutrient Status of *Cirsium byzantinum* Steud., a Narrow Endemic Species from Istanbul/Turkey, International VI. Balkan Botanical Congress, Rijeka, Croatia, Sept 14-18, 2015, (Poster Presentation)

M. E. Uras, I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, M. Keskin, G. Demir, I. E. Yalcin, F. Tabanli, Analysis of Heavy Metal and Mineral Nutrient Levels in *Sinapis arvensis* L. Plant, Grown in an Industrial Area, Kocaeli/Turkey, International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences (ICCBES), Kyoto, Japan, May 7-9, 2015, (Oral Presentation)

I. I. Ozyigit, B. Yalcin, S. Turan, S. Karadeniz, G. Demir, I. E. Yalcin, Determination of Heavy Metals and Mineral Nutrients in Leaves of Some Widely Used Medicinal Plants

In Turkey, International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences (ICCBES), Kyoto, Japan, May 7-9, 2015, (Oral Presentation)

I. I. Ozyigit, C. Colak, S. Karadeniz, G. Demir, I. E. Yalcin, Determination of Heavy Metal and Mineral Elements in Root/Rhizome Samples of Some Medicinal Plants Widely Used in Turkey, International Food Congress, Novel Approaches in Food Industry, NAFI 2014, Kusadası, Turkey, May 26-29 2014, (Oral Presentation)

I. I. Ozyigit, N.Semizoglu, H. Tombuloglu, S. Karadeniz, I. Dogan, G. Demir, Molecular Screening of Some Hsp Genes and Determination of Mineral Nutrient Status in Cadmium Exposed Tomato (*Solanum lycopersicum* L.), The 5. International Symposium on Sustainable Development (ISSD2014), "Biotechnology for Sustainable Development", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, May 15-18, 2014, (Oral Presentation)

Z. Uzunova, I. I. Ozyigit, E. Filiz, I. Dogan, S. Karadeniz, S. Igdelioglu, G. Demir, I. E. Yalcin, Monitoring Genotoxic, Physiological and Nutritional Damages in Oat (*Avena sativa* L.) Induced by Lead, The 5. International Symposium on Sustainable Development (ISSD2014), "Biotechnology for Sustainable Development", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, May 15-18, 2014, (Oral Presentation)

S. Igdelioglu, I. Dogan, I. I. Ozyigit, E. Filiz, S. Karadeniz Z. Uzunova, S. Kulac, G. Demir, Evaluation of Molecular, Physiological and Nutritional Alterations Caused by Lead in Rye (*Secale cereale* L.), The 5. International Symposium on Sustainable Development (ISSD2014), "Biotechnology for Sustainable Development", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, May 15-18, 2014, (Oral Presentation)

I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, N.Semizoglu, H. Tombuloglu, G. M. Aygun, E. Filiz, F. Tabanli, M. E. Genc, O. Yildirimer, Quantitative Analysis of Three Functional Genes (Mapk, Hsp70 and Mt) in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) after in vitro Lead Application, The 5. International Symposium on Sustainable Development (ISSD2014), "Biotechnology for Sustainable Development", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, May 15-18, 2014, (Poster Presentation)

I. I. Ozyigit, I. Dogan, Z. Severoglu, M. Keskin, S. Karadeniz, G. Demir, S. Igdelioglu, I. E. Yalcin, Mineral Nutrient Uptake Statuses of Selected Weed and Maize (*Zea mays*

L.) Samples in a Newly Planted Cornfield, 4. International Weed Science Congress, Agricultural University Peshawar, Pakistan, September 06-08, 2012, (Oral Presentation)

Ulusal Kongreler

A. Yilmaz, I. I. Ozyigit, Z. Severoglu, M. Keskin, A. Ozturk, F. Tabanlı, S. Karadeniz, G. Demir, Kaz Dağı Dar Endemiklerinden Olan *Armeria trojana* Bokhari & Quesel, *Digitalis trojana* Ivan ve *Sideritis trojana* Bornm'nın Yayılışları Üzerine Toprak Mineral Element Seviyelerinin Etkileri, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Sözlü Sunum)

A. Kaval, I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, F. Tabanlı, R. Vatansever, I. E. Yalcin, Kaz Dağı Milli Parkı'ndan Toplanan *Carduus nutans* L. Bitkilerinin Mineral Beslenme Özelliklerinin Belirlenmesi, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Poster)

A. Hocaoglu, I. I. Ozyigit, A. Ozturk, O. Yildirimer, S. Karadeniz, R. Vatansever, N. Hamzaoglu, I. E. Yalcin, Endemik Bir Bitki Olan *Allium kurtzianum* [Ascherson & Sint. ex] Kollmann Bitkisinin Kaz Dağı Milli Parkı Örneklerinin Bazı Ekolojik Özellikleri ve Mineral Beslenme Durumları, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Poster)

B. Batmaci, I. I. Ozyigit, A. Hocaoglu, A. Ozturk, F. Tabanlı, M. Keskin, S. Karadeniz, A. Yilmaz, G. Demir. Endemik *Dianthus arpadianus* Ade & Bornm. var. *trojanus* Bornm. & Sint. Bitkisinin Kaz Dağı Milli Parkı Örneklerinin Mineral Beslenme Özelliklerinin İncelenmesi, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Poster)

N. Caglayan, I. I. Ozyigit, A. Ozturk, N. Ozturk, S. Karadeniz, R. Vatansever, I. E. Yalcin, K. Cilgin, G. Demir, Endemik Bir Bitki Olan *Astragalus mitchelianus* BOISS.'in Kaz Dağları Populasyonlarının Mineral Besin Dağılım Özellikleri, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Gaziantep, 5-9 Eylül, 2016, (Poster)

I. I. Ozyigit, R. Vatansever, E. Filiz, U. Sen, S. Karadeniz, Genome-wide Characterization of Boron Transporter Genes in Plants; Bioinformatics Approach, Bitkilerde Bor Taşıyıcı

Genlerin Genom-çaplı Karakterizasyonu; Biyoinformatik Yaklaşım, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık,2015 (Poster)

S.Karadeniz, I. I. Ozyigit, H. Tombuloglu, I. E. Yalcin, In vitro Propagation of some Widely Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus* L) Varieties in Turkey, Türkiye’de Yaygın Olarak Ekilen Bazı Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L) Varyetelerinin in vitro Çoğaltımı, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık, 2015 (Poster)

I. I. Ozyigit, B. Yalcin, S. Karadeniz, F. Tabanlı, R. Vatansever, M. E. Uras, I. E. Yalcin, G. Demir, Heavy Metal Accumulation and Mineral Nutrient Status of an Aquatic Plant *Ceratophyllum demersum* L. from Kandıra/Kocaeli-Turkey, Kocaeli/Kandıra Bölgesinde Yetişen Su Bitkisi *Ceratophyllum demersum* L.’de Ağır Metal ve Mineral Besin Alım Durumu, Ulusal Botanik Kongresi, Afyon, 25-28 Ağustos, 2015 (Sözlü Sunum)

I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, F. Tabanlı, R. Vatansever, M. E. Uras, I. E. Yalcin, N. C. Sesal, G. Demir, Investigation of Some Ecological Features and Heavy Metal Distribution in *Otanthus maritimus* L. from Kandıra/Kocaeli, Turkey Kocaeli/Kandıra Bölgesinde Yetişen *Otanthus maritimus* L. Bitkisinin Bazı Ekolojik Özelliklerinin ve Ağır metal Dağılımının Araştırılması, Ulusal Botanik Kongresi, Afyon, 25-28 Ağustos, 2015(Poster)

I. I. Ozyigit, I. Dogan, S. Karadeniz, F. Tabanlı, M. E. Uras, R. Vatansever, I. E. Yalcin, G. Demir, Analysis of Some Ecological Features and Heavy Metal Accumulation Status of *Crithmum maritimum* L. from Kandıra Coast, Kocaeli-Turkey, Kandıra Sahillerinden toplanan *Crithmum maritimum* L. Bitkisinin Bazı Ekolojik Özellikleri ve Ağır Metal Akümülyasyon Kapasitesinin Analizi, Ulusal Botanik Kongresi, Afyon, 25-28 Ağustos, 2015 (Poster)

M. E. Uras, I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, F. Tabanlı, R. Vatansever, I. E. Yalcin, M. Keskin, G. Demir, Investigation of Mineral Nutrient and Heavy Metal Concentrations of *Lactuca tatarica* L. from Kandıra/Kocaeli-Turkey Kocaeli/Kandıra Bölgesinde Yetişen *Lactuca tatarica* L. Bitkisinde Mineral Besin Elementi ve Ağır Metal Miktarlarının Araştırılması, Ulusal Botanik Kongresi, Afyon, 25-28 Ağustos, 2015(Poster)

R. Vatansever, I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, F. Tabanlı, M. E. Uras, I. E. Yalcin, N. C. Sesal, G. Demir, Mineral nutrient and heavy metal accumulation status of *Sparganium*

erectum L. from Abant-Bolu, Turkey, Bolu-Abant Bölgesinde Yetişen *Sparganium*
erectum L. Bitkisinin Mineral Besin Elementi ve Ağır Metal Alım Durumu, Ulusal
Botanik Kongresi, Afyon, 25-28 Ağustos, 2015 (Poster)

