

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ACI KAVUN (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) MEYVE ÖZSUYUNUN
AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) ADVENTİF SÜRGÜN
REJENERASYONU ve *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN
AKTARIMI ÜZERİNE ETKİSİ**

Samah MAHGOUB HASSAN MOHAMMED SAAD

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

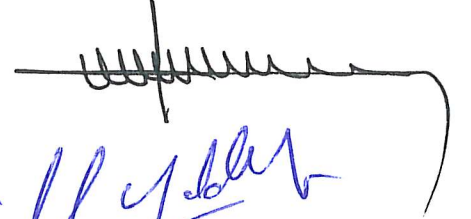
Samah MAHGOUB HASSAN MOHAMMED SAAD tarafından hazırlanan “Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyunun Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması 19/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Özer KOLSARICI
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



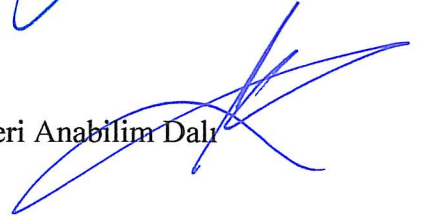
Üye : Prof. Dr. Serkan URANBEY
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Semra MİRİCİ
Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Şebnem KUŞVURAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi Kızılırmak
Meslek Yüksek Okulu Tarım ve Yaşam Bilimleri Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

19/01/2017



Samah MAHGOUB HASSAN MOHAMMED SAAD

ÖZET

Doktora Tezi

ACI KAVUN (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) MEYVE ÖZSUYUNUN
AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) ADVENTİF SÜRGÜN REJENERASYONU
ve *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA GEN AKTARIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Samah MAHGOUB HASSAN MOHAMMED SAAD

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu çalışma, acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuğunun ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım frekansının artırılması üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Bitki materyali olarak, ‘64A14’, ‘64A71’ ve ‘Meriç’ ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipleri kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyonu ve gen aktarım frekansının artırılması için farklı hormon kombinasyonları ve acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuğu kullanılmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyon ortalaması kotiledon boğum eksplantından 64A71 genotipinde (% 76) 1.00 mg / l BAP ve 1.00 mg / l NAA, (% 96) 1.00 mg / l BAP ve 1.00 mg / l NAA ile 400 ul/l acı kavun meyve özsuğu içeren MS ortamlarından elde edilmiştir. Besin ortamına acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuğu ilavesi, sürgün rejenerasyon oranını, eksplant başına sürgün sayısını ve köklenmeyi olumlu şekilde etkilemiştir. Elde edilen sürgünler acı kavun meyve öz suğunun uygun dozlarını içeren MS ortamında köklendirilerek serada dış koşullarda alıştırılıp tohum elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*’in GV2260 hattı kullanarak transgenik bitkiler seleksiyon ortamında seçilmiştir. Transgenik aday sürgünler 400 ve 800 ml/l acı kavun meyve özsuğu, 100mg/l kanamisin ve 500 mg/l Duocid içeren MS ortamında geliştirilmiştir. Transgenik aday sürgünler köklendirilmek için acı kavun özsuğu kullanılmıştır. Köklendirilen bitkiler serada dış şartlarda alıştırılıp tohum elde edilmiştir. PCR analizi ile transgenik bitkiler teyit edilmiştir.

Ocak 2017, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Helianthus annuus* L., ayçiçeği, doku kültürü, sürgün rejenerasyonu, transgenik, hormonlar, acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECT OF SQUIRTING CUCUMBER (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.)
FRUIT JUICE ON ADVENTITIOUS SHOOT REGENERATION AND
Agrobacterium tumefaciens-MEDIATED GENE TRANSFER IN SUNFLOWER
(*Helianthus annuus* L.)

Samah MAHGOUB HASSAN MOHAMMED SAAD

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

This study was carried out to determine the effects of fruit juice of the squirting cucumber (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) in increasing adventive shoot regeneration and the frequency of gene transfer using *Agrobacterium tumefaciens* in sunflower (*Helianthus annuus* L.). '64A14', '64A71' and 'Meriç' genotypes were used as plant material. Different growth regulators combinations and squirting cucumber Fruit juice were used to increase shoot regeneration and gene transfer frequency. The highest shoot regeneration averages %76 and %96 were recorded on MS medium containing 1.00 mg / l BAP plus 1.00 mg / l NAA and 400 µl / l of squirting cucumber fruit juice from cotyledon node of 64A71. The addition of fruit juice of squirting cucumber to the nutrient medium positively affected the rate of shoot regeneration, number of shoots per explant and rooting. The obtained shoots were rooted in MS medium containing appropriate doses of squirting cucumber fruit juice and were placed in green house to obtain seeds. In the second phase of this study, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV2260 carrying the plasmid p35S GUS-INT were used for plant transformation. Positive transgenic shoots regenerated on the best media which were identified in the first stage of this study plus 100mg/l kanamisin ve 500 mg/l Duocid from cotyledon node were rooted on MS medium containing only the best dose of fruit juice of squirting cucumber. Rooted plants were placed in the greenhouse and seeds were obtained. Positive transgenic plants were confirmed by PCR analysis.

January 2017, 69 pages

Key Words: *Helianthus annuus* L., sunflower, *in vitro*, shoot rejeneration, transformation, growth regulators, squirting cucumber (*Ecballium elaterium* (L.)

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve sonsuz faydalandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ 'a (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı), yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Semra MİRİCİ'ye (Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı) saygı ve teşekkürlerimi sunarım, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı hocalarıma ve tarla personeline sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Tüm laboratuvar arkadaşlarıma çalışmalarındaki doğrudan veya dolaylı katkılarından dolayı teşekkür ederim. Sonsuz hoşgörü ve fedakârlıklar ve sabırlıklarından dolayı aileme özellikle doktora çalışmamın her adımında beni sabırla ve emekle takip eden, yetişmemdeki sonsuz desteği ve ilgisinden dolayı ve yardımlarının karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim sevgili Annem ve Babam, değerli eşim Ehab'a ve sevgili oğlum Abubaker Elsedieg ve sevgili oğlum Mohammed'e her zaman yanımda oldukları ve göstermiş oldukları sabır, fedakâr ve anlayıştan dolayı sonsuza kadar teşekkür ederim. Sevgili iki kardeşime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunuyorum.

Doktora çalışmam sırasında bana burs sağlayan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na da teşekkür ederim.

Ankara, Ocak 2017

Samah MAHGOUB HASSAN MOHAMMED SAAD

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i> L.)	5
2.2 Acı Kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.).....	7
2.3 Bitki Doku Kültürü	8
2.4 Gen Aktarımı	10
2.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
2.6 Kaynak Özetleri	11
3. MATERİYAL ve YÖNTEM	23
3.1 Materyal	23
3.1.1 Bitki matertali	23
3.1.2 Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyu materyali	23
3.1.3 Bakteri materyali	23
3.2 Yöntem	24
3.2.1 Besin ortamlarının hazırlanması	24
3.2.2 Acı kavun meyve özsuyu dozları	25
3.2.3 Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu	25
3.2.4 Tohum yüzey sterilizasyonu	25
3.2.5 Ayçiçeği tohumlarının çimlenme ve fide oluşumu	25
3.2.6 Eksplant izolasyonu ve sürgün rejenerasyonu	26
3.2.7 Gen aktarımında kullanılan bakterilerin hazırlanması	27
3.2.8 Sıvı besiyerinde bakterinin çoğaltılması	28
3.2.9 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in GV2260 p35S GUS-INT hattı ile ayçiçeğine gen aktarımı	28
3.2.10 Antibiyotikler	28
3.2.11 Polimeraz zincir reaksiyonu.....	29
3.2.12 Primer dizileri	29
3.2.13 Agaroz jel elektroforezi	30
3.2.14 İstatistiksel değerlendirmeler.....	30
4. BULGULAR	31
4.1 Ayçiçeğinde Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve <i>İn vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu	31
4.1.1 Çeşitli dezenfektan miktar ve uygulama zamanlarının tohum çimlenmesi ve filiz ve kök boyları üzerine etkisi.....	32
4.1.2 Genotip '64A14'	35
4.1.2.1 64A14 genotipi üzerine farklı büyüme düzenleyicilerin <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi.....	35

4.1.2.2 64A14 genotipi üzerine acı kavun meyve özsuyunun <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	38
4.1.3 Genotip ‘64A71’	40
4.1.3.1 64A71 genotipi üzerine farklı büyüme düzenleyicilerin <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	40
4.1.3.2 64A71 genotipi üzerine acı kavun meyve özsuyunun <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	44
4.1.4 Genotip ‘Meriç’	45
4.1.4.1 Meriç genotipi üzerine farklı büyüme düzenleyicilerin <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	45
4.1.4.2 Meriç genotipi üzerine acı kavun meyve özsuyunun <i>in vitro</i> sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	48
4.2 Acı Kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyunun Ayçiçeğinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Gen Aktarımı Üzerine Etkisi.....	50
4.2.1 Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun 64A14 ayçiçeği genotipinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımına etkisi.....	50
4.2.2 Acıkavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun 64A71 ayçiçeği genotipinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımına etkisi.....	52
4.2.3 Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun Meriç ayçiçeği genotipinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımına etkisi.....	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BAP	6- benzilaminopurin
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
Bç	Baz çifti
C3	Chlorofyl C3
C4	Chlorofyl C4
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
GUS	F-glukuronidaz
HCl	Hidroklorik Asit
IBA	Indole-3-butrik asit
MS	Murashige ve Skoog basal besin ortamı
NAA	α -Naftalenasetik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth
NOS	Nopalin sentaz
<i>npt II</i>	Neomisin fosfotransferaz II
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron
<i>vir</i>	Virulens geni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i> L.)	6
Şekil 2.2	Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.)	8
Şekil 3.1	Magenta kaplarına yerleştirilen ayçiçeği tohumları	26
Şekil 3.2	Kullanılan ayçiçeğin eksplantları	27
Şekil 4.1	Ayçiçeği genotipinin <i>in vitro</i> şartlarda çimlenen tohumları	32
Şekil 4.2	<i>Helianthus annuus</i> L. %50'lik çamaşır suyunun ile 15 dakika steril edilen tohumlarından <i>in vitro</i> şartlarda büyüyen fideler	35
Şekil 4.3	2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA + 800µl/l Acı Kavun mayves özsuyu içeren ortamda 64A14 genotipinin kotelidon boğum eksplantından geliştirilen sürgünler ve gelişen sürgünlerden bitki oluşumu	39
Şekil 4.4	Farklı rejenerasyon ortamlarında ayçiçeğinden oluşan kallus.....	43
Şekil 4.5	1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800µl/l Acı Kavun mayves özsuyu içeren ortamda 64A71 genotipinin kotelidon boğum eksplantından geliştirilen sürgünler ve gelişen sürgünlerden bitki oluşumu.....	45
Şekil 4.6	2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA + 800µl/l Acı Kavun mayves özsuyu içeren ortamda Meriç genotipinin kotelidon boğum eksplantından geliştirilen sürgünler ve gelişen sürgünlerden bitki oluşumu.....	49
Şekil 4.7	64A14 ayçiçeği genotipine <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı	51
Şekil 4.8	64A14 ayçiçeği genotipine ait <i>npt II</i> geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu	51
Şekil 4.9	64A14 ayçiçeği genotipine ait <i>chv</i> geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu	52
Şekil 4.10	Meriç ayçiçeği genotipine <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımı	54
Şekil 4.11	Meriç ayçiçeği genotipine ait <i>npt II</i> geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu.....	55
Şekil 4.12	Meriç ayçiçeği genotipine ait <i>chv</i> geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 MS ortamının içerdiği maddeler ve konsantrasyonları.....	24
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.....	29
Çizelge 3.3 PCR döngüleri.....	29
Çizelge 4.1 <i>Helianthus annuus. L</i> tohumuna yüzey sterilizasyonunda kullanılmış çamaşır suyumiktari ve uygulama zamanının de <i>in vitro</i> tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları üzerine etkisi.....	33
Çizelge 4.2 64A14 genotipine ait kotiledon boğum eksplantı rejenerasyon değerleri.....	35
Çizelge 4.3 64A14 genotipine ait meristem eksplantı rejenerasyon değerleri.....	36
Çizelge 4.4 64A14 genotipine ait hipokotil eksplantı rejenerasyon değerleri	37
Çizelge 4.5 64A14 genotipine ait kotiledon eksplantı rejenerasyon değerleri.....	37
Çizelge 4.6 64A14 genotipinde acı kavun meyve özsuyunu rejenerasyona etkisi	38
Çizelge 4.7 64A71 genotipine ait kotiledon boğum eksplantı rejenerasyon değerleri.....	40
Çizelge 4.8 64A71 genotipine ait meristem eksplantı rejenerasyon değerleri.....	41
Çizelge 4.9 64A71 genotipine ait hipokotil eksplantı rejenerasyon değerleri	42
Çizelge 4.10 64A14 genotipine ait kotiledon eksplantı rejenerasyon değerleri	42
Çizelge 4.11 64A71 çeşidinde acı kavun meyve özsuyunu rejenerasyona etkisi	44
Çizelge 4.12 Meriç genotipine ait kotiledon boğum eksplantı rejenerasyon değerleri.....	46
Çizelge 4.13 Meriç genotipine ait meristem eksplantı rejenerasyon değerleri	46
Çizelge 4.14 Meriç genotipine ait hipokotil eksplantı rejenerasyon değerleri	47
Çizelge 4.15 64A14 genotipine ait kotiledon eksplantı rejenerasyon değerleri	48
Çizelge 4.16 Meriç genotipinde acı kavun meyve özsuyunu rejenerasyona etkisi.....	48
Çizelge 4.17 Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun 64A14 ayçiçeği genotipinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımına etkisi	50
Çizelge 4.18 Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun 64A71 ayçiçeği genotipinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımına etkisi	53
Çizelge 4.19 Acı kavun (<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun Meriç ayçiçeği genotipinde <i>Agrobacterium tumefaciens</i> aracılığıyla gen aktarımına etkisi	53

1. GİRİŞ

İnsanlar ihtiyaçlarının büyük bir bölümünü doğrudan doğruya bitkilerden veya yetiştirdikleri bitkilerle beslenen hayvanlardan elde ettikleri ürünlerden karşılamaktadırlar. Bu bakımdan tarım, yeryüzünde canlılığın ve insan hayatının devamı için mutlak gereklidir (Yıldırım 2005). Değişen çevre şartları ve hızla artan dünya nüfusu bitkisel üretimde yeni çeşit geliştirmenin ve dolayısıyla bitki ıslah çalışmalarının önemini daha da artırmıştır (Yıldız 2000). İnsanlığın geleceği açısından doğadaki kirlenmeye bağlı olarak bir takım dengesizlik ve yok oluşların sebep olduğu etki günden güne kendisini daha ağır bir şekilde hissettirmektedir (Ergül 1989). Bunların sonucunda bitki büyümesi, verim ve kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu durumda kirlilik kaynaklarının zararlı etkilerinin gelecekte de artarak devam etmesi beklenmektedir. Günümüzde bitki verimlerinin çeşitli sebeplerden dolayı potansiyel verim değerlerinin çok altında olduğu görülmektedir. Bitkileri verimini potansiyelinin üzerine çıkarabilmek için genetik yapılarını iyileştirmek gerekmektedir (Aycan 2015).

Bitkilerin verimliliklerini artırmaya ilişkin geleneksel metotların yüzlerce yıldır kullanıldığı bilinmektedir. Tohumlar arasından gelişme oranı en yüksek olan güçlü tohumların seçilerek ekilmesi, geleneksel ıslah metotlarından (Betz vd. 2000). Klasik yöntemler kullanılarak çok uzun zaman alan ıslahın başarısını, fenotipik anaçlardan gelen genetik faktörler ile içinde bulundukları ortamın koşulları belirlemektedir (Mohan vd. 1997, Allard 1999). Bitki ıslahında kantitatif karakterleri etkileyen genlerin klasik ıslah metotlarıyla yeni bireylere aktarılmasında özellikle bağlantı (linkage) gibi birçok problemle karşılaşmaktadır. Klasik ıslah yönteminde melezleme ile aktarılan genin/genlerin özelliklerinin bitkiler üzerinde fenotipik karakterler olarak gözlenebilmesi için, çok sayıda bitki popülasyonuna ve bu bitkilerin yetiştirilebileceği çok büyük alanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkilerde istenmeyen özelliklerin ortadan kaldırılması, uzun yıllar geri melezlemeleri zorunlu kılmaktadır. Bunun gibi bazı sorunlar klasik bitki ıslahının önemli olumsuzluklarıdır (Özgen vd. 2005). Biyoteknolojik yöntemlerin kullanıma girdiği zamana kadar yapılan ıslah çalışmalarında daha çok ürün kalitesi ve miktarının artırılmasına çalışılmış, kültür

bitkilerinde hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması her zaman ikinci plana bırakılmıştır (Yıldız 2010).

Bitkilerde verim ve kalitenin artırılmasının yanında bitki verimliliğine olumsuz etkisi bulunan hastalıklar, zararlılar ve stress faktörlerinin engellenmesini, azaltılması ya da ortadan kaldırılması hedeflenen bitki biyoteknolojisi sürecinde moleküler, hücre ve doku kültürüne dayalı teknolojiler kullanılmaktadır. Bitki biyoteknolojisine yönelik ilk çalışmalar 1900'li yılların başlarında gerçekleştirilmesine rağmen, modern biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılması 1980'li yıllara dayanır. Bu yıllarda *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin bitkilerde tümör oluşturma mekanizmasının moleküler düzeyde belirlenmesi sonucunda bitkilere dışarıdan gen aktarılabileceği fikri ortaya atılmıştır. Bitkilere ilk gen aktarımı 1983 yılında tütüne markör gen aktarımlarıyla gerçekleştirilmiştir (Özcan ve Özgen 1996).

Bitkilere gen aktarımı için *A. tumefaciens* dışında partikül tabancası, protoplastlara gen aktarımı ve mikroenjeksiyon gibi çok sayıda gen aktarım yöntemi kullanılmasına karşın, *A. tumefaciens* ile gen aktarımının çok önemli üstünlükleri bulunmaktadır. *A. tumefaciens* ile gen aktarımının en önemli üstünlüğü sadece istenilen genlerin bitkilere düşük kopya sayısı ile aktarılmasıdır. Gen aktarımında amaç, aktarılan genin tek bir kopyasıyla yüksek oranda protein üretiminin gerçekleşmesidir. Ayrıca, *A. tumefaciens* ile bitkilere gen aktarımı oldukça ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bütün bu olumlu yönlerinden dolayı *A. tumefaciens* "bitkilerin doğal genetik mühendisi" olarak adlandırılmaktadır (Özcan ve Özgen 1996).

Diğer gen aktarım yöntemleriyle karşılaştırıldığında *A. tumefaciens* ile bitkilere gen aktarımının önemli üstünlükleri bulunurken, bazı sınırlamalarla da karşılaşmaktadır. Bunlardan en önemlisi ise konukçu sınırlamasıdır. Tütün, patates ve patlıcan gibi *Solanaceae* familyasına ait türlere çok kolaylıkla gen aktarımı yapılırken; buğdaygiller, baklagiller ve ağaç türlerine gen aktarımı oldukça zordur. Bu bitkilere *A. tumefaciens* ile gen aktarımı son derece düşük frekanslarda gerçekleşirken, gen aktarımı yapılan hücrelerden bitki rejenerasyonu da oldukça düşük oranlarda olmaktadır. Bundan dolayı

çok sayıda bitki türünde transgenik bitkilerin elde edilmesi için yoğun emek ve zaman harcanmaktadır. Bu nedenle, bitkilerde gen aktarım frekansını artıracak yeni yöntemlerin bulunması, izole edilen genlerin bitkilere kolaylıkla aktarılacak transgenik bitki elde edilmesini kolaylaştıracaktır (Aycan 2015).

Biyoteknolojik yöntemler verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarına destek ve aynı zamanda klasik ıslaha alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ile izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılabilmesi, farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme zorluğunu ortadan kaldırmaktadır (Özgen ve Türet 1995). Bitki biyoteknolojisi, bitkilerin verim kalitesini artırmak, bitki verimliliğini sınırlayan hastalık, zararlı ve stres faktörlerini engellemek, azaltmak veya ortadan kaldırmak için moleküler, hücre ve doku kültürü temelli teknolojilerin kullanıldığı bir süreçtir (Onay vd. 2012).

Genetiği değiştirilmiş bitkiler, aktarılmış olan özelliklere göre böceklerden gelecek zararlara karşı bitkilere koruma sağlarlar. Bu ürünler, *Bacillus thuringiensis* (Bt)'nin içerdiği seçilmiş genlere sahiptir. Bu bakteri genomunun, bitkide yer alan genetik bilgiyi kullanarak ürettiği protein bitki zararlılarının larvalarına toksik etkirken, insan sağlığı bakımından zararsızdır. Böylelikle zararlılardan etkilenmeyen bitkilerde pestisit kullanımına gerek kalmadığı gibi verimliliklerinde de artış sağlanmaktadır. Bitki biyoteknolojisinin sağladığı bu metota ilk defa ticari amaçla kullanarak 1989 yılında Calgene adlı firma, Flavr Savr adlı domatesi üretmiştir. Ürünün, bitki biyoteknolojisi kullanılarak raf ömrü uzatılmıştır (Redenbaugh vd. 1994). Bitki biyoteknolojisinin bu uygulamasını pek çok gelişme takip etmiş ve bitkilerde pek çok özellikte iyileştirme yapılmıştır. Günümüzde insektisit, herbisit ve diğer pestisitlerden etkilenmeyen bitkiler ticari olarak raflarda bulunmaktadır. Örneğin; salatalık, kabak, patates ve karpuz gibi pek çok ürün, virus kaynaklı hastalıklara karşı genetik değişim uygulanmış bitkilerdendir. Virüslere karşı dayanıklılık gösteren bu bitkilerin “çapraz koruma” şeklinde ifade edilen ve bağışıklık benzeri bir mekanizmaları bulunmaktadır. Soya, mısır, kanola ve diğer tane bitkileri herbisitlere karşı dayanıklılık gösterecek şekilde genetiği değiştirilmiştir. Bu bitkilerin herbisitlere karşı dayanıklı olması, çiftçilere yabancı ot kontrolünde daha fazla seçenek sunmaktadır. Örneğin; bitkilerin ekilmesinden

önce toprağa herbisit uygulama zorunluluğu ortadan kalkmış olup, istendiği takdirde bitkinin gelişim sürecinde uygulanabilmektedir. Sayılanların yanı sıra bitki biyoteknolojisinde raflara ve günlük yaşama yansıyan pek çok gelişme daha yer almaktadır. Bunları; iyileştirilmiş ürünler, besin değerinin artırılması, tıbbi özelliklerin kazandırılması, pişirme yağlarının daha sağlıklı olması, raf ömürlerinin uzatılması, yenilenebilir kaynaklar, endüstriyel besin maddelerinin geliştirilmesi ve istenilen diğer özelliklerin bitkilere kazandırılması şeklinde sıralamak mümkündür (Davey ve Antony 2010).

Bu tez çalışmasında, acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun kullanılarak, ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) adventif sürgün rejenerasyonunu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım frekansının artırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)

Alem: Plantae

Bölüm: Magnoliphyta

Takım: Asterales

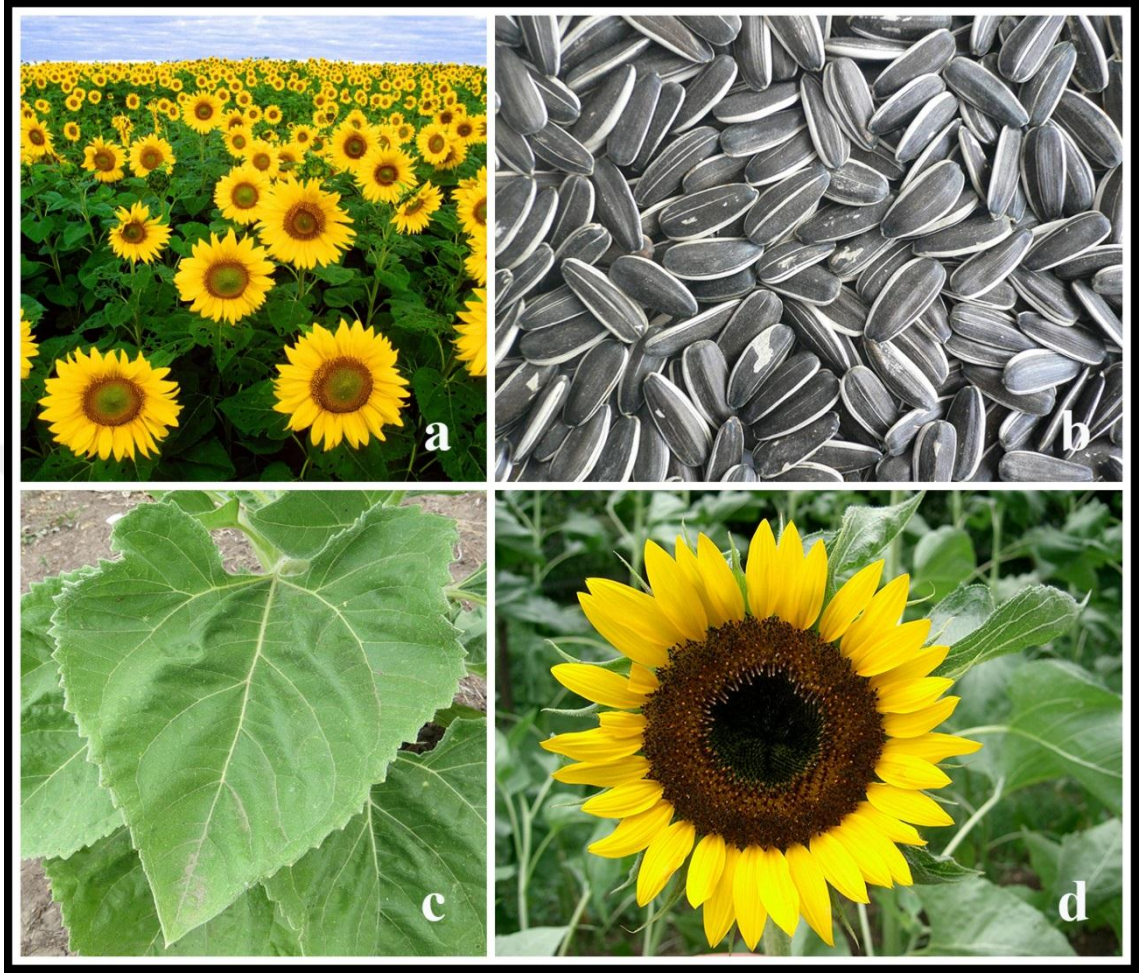
Familiya: Asteraceae

Cins: *Helianthus*

Tür: *Helianthus annuus* L.

Türkiye de günebakan, göngördü ve şemşaner adlarıyla da anılan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), önemli bir yağ bitkisi olmakla birlikte, yem ve süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Uzunluğu iki metreyi bulan ayçiçeğinin nispeten büyük olan çiçekleri sarıdır. Sert gövdeli bitkinin yaprakları parçasız, üçgen formunda, tüylü, yeşil, sert, kısa tüylü ve büyüktür. Ayçiçeği, bir yıllık otsu bitkilerdendir (Eken 2004). C3 bitki grubunun en verimli olup, sulanarak verimliliğinin %100 artması ile C4 grubundaki bitkilerden daha avantajlıdır. Yapılan araştırmalar, ayçiçeğinin yabani türünün Kuzey Amerika menşeli olduğunu ve Kanada'nın ortalarından Kuzey Meksika'ya doğru yayıldığını göstermektedir (Duke 1983). Dünya genelinde yağ bitkileri arasında 3. sırada bulunan ve dolayısı ile büyük öneme sahip olan ayçiçeği, yüksek hacimli ekonomiye sahip yağlı tohumlu bitkilerden birisidir. Bu durumun temel nedenleri Türkiye'deki yağlı tohumlu bitkiler arasında ekim alanları ve üretim miktarları açısından değerlendirildiğinde ilk sırada yer alması gösterilebilir. Ayçiçeğini önemli kılan bir diğer özelliği de %40 ila %50 oranında yağ tutabilme özelliğine sahip olmasıdır. Yüzde kırk ile yüzde kırk beş aralığında küspe elde edilmekte olup, bu küспенin %30 ila %40'ının protein içermesi, ayçiçeğinin değerli bir yem bitkisi olmasını sağlamaktadır. Tohumları çerezlik olarak tüketilen ayçiçeği; yağı sabun ve boya üretiminde çeşitli aşamalarda kullanılırken, sapları ise yakıt olarak da kullanılabilir. Fındık ve benzeri kabuklu meyveli bitkilerle kıyaslandığında daha yüksek proteine sahip olan ayçiçeği ayrıca sağlıklı bir bitkidir. Potasyum ve E vitamini bakımından da zengin olmasının yanında linoneik asit kaynağı olduğu da bilinmektedir

(Duke 1983).



Şekil 2.1 Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) (<http://upload.wikipedia.org> 2016)

a. Ayçiçeğinin tarladaki görünümü, b. Ayçiçeğinin tohumu, c. Ayçiçeğinin yaprağı, d. Ayçiçeğinin tablası

Derin ve kazık kök sistemine sahip olan ayçiçeğinin kuraklığa karşı yüksek dayanımı bulunmakla birlikte kara iklimi ve ılıman iklime sahip yağışlı bölgelerde yetiştirilmesi mümkündür. Tüm toprak türlerinde yetiştirilebilen ayçiçeği, yetişmesi için en uygun koşullara sahip olan toprağın özellikleri şu şekilde olması gerekir; PH değeri nötr olan, derin ve rutubetli, nem tutma yeteneği yüksek olan humuslu ve organik madde bakımından zengindir. Bu koşullardan en önemlisi olan nem, bitkinin çimlenmesi için gereklidir (Eken 2004). Güneşi seven bir bitki olan ayçiçeği, kapalı havalardan olumsuz etkilenmektedir. Araştırmalar, bir aylık zaman diliminde kapalı havada bulunan ayçiçeğinin verimliliğinde %30 azalma olduğunu göstermektedir. En düşük 8-10 °C

aralığındaki toprakta çimlenebilen ayçiçeği soğuk hava koşullarına dayanıklı olmasına karşın -4 °C altında olumsuz etkilenmektedir. Ayçiçeğinin en büyük zararlısı, Orbanş adlı parazittir. Bu parazit, ayçiçeğinin köklerinin gelişimi sırasında, köklere tutunarak beslenmektedir. Orbanşın topraktan yüksek miktarda potasyum kaldırması nedeniyle aynı bölgeye arka arkaya ayçiçeği ekilmemesi gerekir. Orbanşın yanı sıra ayçiçeği mildiyösü ve çürükler gibi hastalıklar da ayçiçeğini olumsuz etkileyen diğer hastalıklardır (Eken 2004).

2.2 Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.)

Alem: Plantae

Bölüm: Magnoliophyta

Takım: Cucurbitales

Familiya: Cucurbitaceae

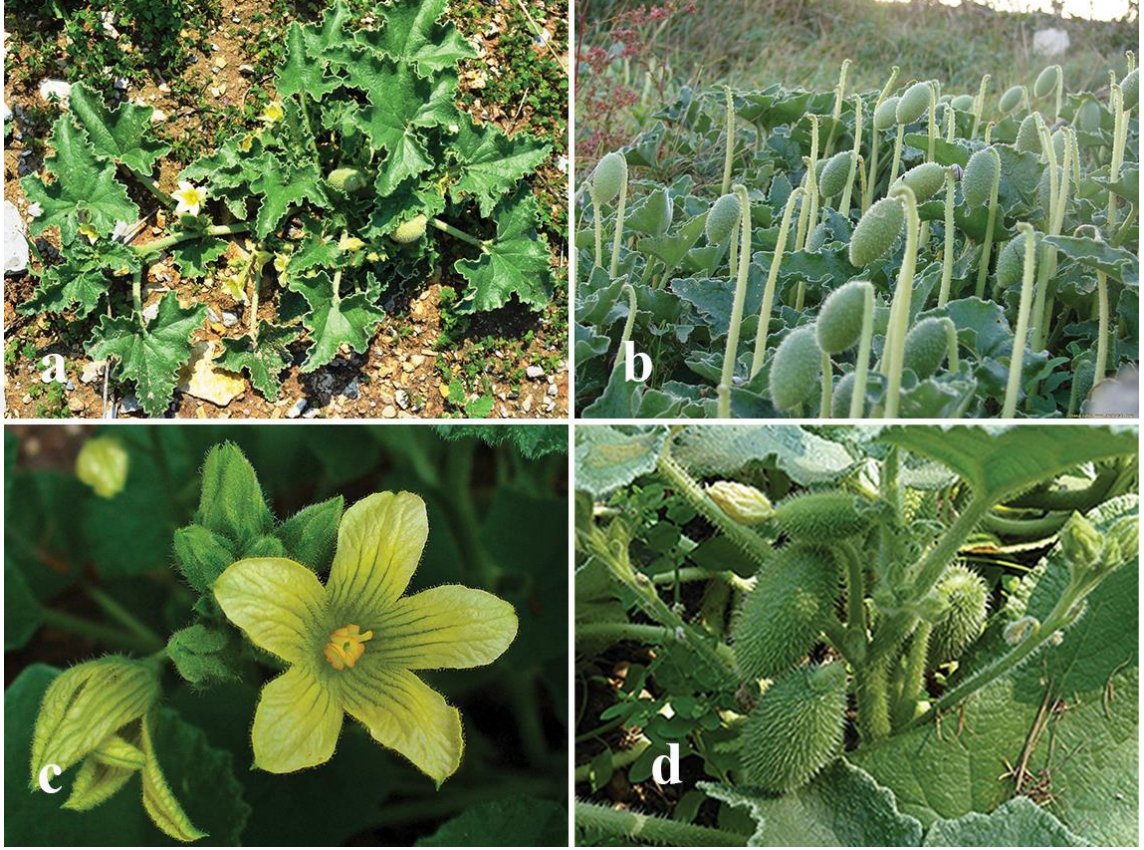
Cins: *Ecballium*

Tür: *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (Seçmen vd. 2008)

Ecballium elaterium (L.) A. Rich., yatık gövdeli, çok yıllık, otsu bir bitki olup, gövde ve yaprakları sert tüylerle kaplıdır ve çiçekleri açık sarı renklidir (Şekil 2.2). Meyveler; oval, saplı ve olgunlaştıkça aşağı sarkık duruşludur (Şekil 2.2). Olgunlukta meyvenin içerisinde meydana gelen basınç nedeni ile meyve sapa bağlı olduğu yerden koparak özsuyu ile birlikte tohumlarını dışarıya doğru kuvvetle bırakmaktadır (Ekici vd. 1998).

Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Cucurbitaceae familyasından olup, otsu ve ruderal bir bitkidir (Şekil 2.2). Yöresel olarak; acı dülek, eşek hıyarı, cırtatan, şeytan keleş, yabani hıyar gibi isimlerle de bilinir. Bitkinin idrar artırıcı ve müshil etkisi bulunmaktadır. Dahilen yüksek miktarda alındığında, özellikle kalın bağırsağı tahriş ederek kanlı ishale neden olur. Halen tedavide, meyve özütünden elde edilen *Ecballium* müshil olarak kullanılmaktadır. Köklerinden hazırlanan lapa ve merhemler, haricen tümörlere ve ekzama gibi kronik cilt yaralarına, romatizma ağrılarına karşı kullanılmaktadır. Meyvelerin sıkılması ile elde edilen taze özütün, buruna çekilmek

suretiyle sinüzite karşı kullanımı Anadolu’da oldukça yaygın görülmektedir (Baytop 1984).



Şekil 2.2 Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) (Aycan 2015)

a. Genel görünümü, b. Meyvesi (uzaktan), c. Çiçeği, d. Meyvesi (yakından)

2.3 Bitki Doku Kültürü

Bitkiler, tek bir hücrenden bütün organları tam tüm bir organizmanın gelişebilmesi anlamına gelen ‘Totipotensi’ (Haberlandt 1902) adı verilen özellikleri nedeniyle petri kapları içerisinde steril şartlar altında herhangi bir kısımlarından yetiştirilebilmektedir. Bitkilerin bu özelliği sayesinde, *in vitro* şartlar altında herbisitlere, ağır metallere, tuza ve düşük sıcaklıklara tolerans veya hastalıklara direnç gibi karakterler bakımından seleksiyon yapmak mümkün olmaktadır. Bir başka ifade ile, binlerce dekarlık alanlarda, büyük bir maliyet ve iş gücü kullanarak yapılabilecek ıslah çalışması laboratuvarında çok daha kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Klasik ıslah, istenen karakterleri

belirleyen genlerin bir genotipte toplanabilmesi için oldukça uzun bir süreye gereksinim duymakta, büyük bir iş gücü ve masrafı da beraberinde getirmektedir. Klasik ıslah yöntemleri ile aralarında melezleme yapılabilen türlerin sayısının az olması, başarıyı kısıtlayan önemli bir etmendir. Halbuki, ıslahtaki başarı popülasyondaki genetik çeşitlilikle doğru orantılıdır.

Genetik mühendisliği ise, doğada var olan genetik kaynakları herhangi bir sınır olmaksızın kullanabilmektedir. Bu tekniklerin kullanılmasıyla, bir organizmaya herhangi bir canlıdan (insan, hayvan, bitki, mikroorganizmalar) klonlanan bir gen kolaylıkla aktarılabilmektedir. Örneğin, bakteriden klonlanan bir gen, böceklere direnç kazandırmak için bitki hücrelerine yerleştirilebilmekte ve bu aktarım genetiği değiştirilmiş veta transgenik olarak ifade edilen organizmaların üretimine imkân sağlamaktadır. Aktarılan bu genler, organizmaya yerleştirildikten sonra doğal bitki genleri ile birlikte replike olmakta ve protein üretmektedirler. Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak bugüne kadar yapılan çalışmalar, ot ilaçları ve böceklere dayanıklılık sağlayan genlerin bitkilere aktarılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak, son yıllarda kuraklık, sıcaklık, soğuk, tuz gibi abiyotik stres faktörlerinden en az etkilenen dayanıklı yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.

Bitki doku kültürü, bitkilerden izole edilen doku parçasını yapay besin ortamında süresiz yaşatma tekniği olarak tanımlanır. Hücreler bölünerek ilgili büyüme düzenleyici hormonlar kullanılarak kök, yaprak, sürgün, embriyo veya tam bitki oluşturabilir. Bazen kültürdeki hücrelerden ve dokulardan istenilen durumlarda kallus olarak tanımlanan farklılaşmamış hücre topluluğu geliştirilebilmektedir. Bu teknikler yardımıyla ekonomik önemi olan veya nesli tükenmekte olan bitkiler klonlanarak çoğaltılmasında başarılı bir şekilde kullanılabilir. Bitki doku kültürü ayrıca bitkilerin yoğun üretimine ilave olarak laboratuvar ortamında sentezlenemeyen sekonder metabolitlerin ve doğal kaynaklardan tıbbi bileşenlerin üretiminde de kullanılabilir (Winkelmann vd. 2006).

2.4 Gen Aktarımı

Geçtiğimiz son 20 yılda gelişen teknolojiler arasında en çok tartışılan konulardan biri de genetik mühendisliği ve genetiği değiştirilmiş organizmalardır (Zülal 2000). Bitkilerin insan ve hayvan beslenmesinde kullanımı amacıyla iyileştirilmesi çalışmalarında iki önemli dönem bulunmaktadır. Bunların ilki son 60 yılda gerçekleştirilen ve ‘Yeşil Devrim’ olarak adlandırılan, geleneksel bitki ıslahı ve ticari gübreler ile diğer argonomik yöntemlerin etkili olduğu dönemdir. İkinci dönem ise ‘Biyoteknoloji Devrimi’dir. Biyoteknoloji devriminde geliştirilen çok etkili ve yeni teknikler sayesinde verimi ve kalitesi yüksek bitki çeşitlerine bir ya da birkaç gen, yeni özellikler kazandırmak amacıyla aktarılabilmektedir (Özcan 2009). Bin dokuzyüzlü yılların ortalarında DNA molekül yapısının tanımlanması, gen teknolojisinin milâdı olmuştur. Bulunduğu organizmanın tüm özelliklerini aminoasitler ile şifreleyen DNA’nın keşfedilmesi tür içi ve türler arası gen aktarımını mümkün kılmıştır (Çırakoğlu 2005). Gen aktarımı yöntemiyle, çeşitli çevresel stres faktörlerine, bakteri virüs ve mantar kökenli hastalıklara, herbisitler (Ot öldürücü) gibi çeşitli kimyasal bileşiklere direnç özelliği kazandırılması sağlanabilmektedir (Bajrović 2002).

Bitkilere gen aktarımında kullanılan tekniklerin temelini; istenilen geni taşıyan bir DNA parçasının doku içerisindeki hücrelerin kromozomlarına yerleştirilmesi, daha sonra doku kültürü tekniklerini kullanarak bu hücrelerden gen aktarılmış (transgenik) bitkilerin elde edilmesi oluşturur. Genel olarak doku içerisinde gen aktarılmış hücrelerin oranı oldukça düşüktür. Bu nedenle, gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek adventif sürgün oluşumuna paralel olarak başarı da önemli derecede artmaktadır (Yıldız 2000).

Gen aktarım başarısını en fazla etkileyen faktörlerden birisi de gen aktarımı yapılan hücrenin rejenerasyon kabiliyetidir. Rejenerasyon kabiliyeti olmayan hücrelere yapılan gen aktarımı hiçbir anlam ifade etmemekte ve ayrıca gen aktarılan hücrelerden yeni bitkilerin oluşması gerekmektedir. Bu sebepten dolayı tarımsal öneme sahip genleri

bitkilere aktarabilmek için bitki doku ve hücrelerinden etkili bir rejenerasyon sağlanması oldukça önemlidir (Özcan ve Özgen 1996).

2.5 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens, Rhizobiaceae familyasına ait gram (-) bir bakteridir. Genellikle çift çenekli bitkilerin kök boğazında oluşan yaralanmalardan bitkiyi enfekte ederek kök boğazı uru hastalığına yol açmaktadır (Smith ve Townsend 1907). Tümör meydana getiren *Agrobacterium* hatları ile yapılan çalışmalar, tümör oluşumu ve opin sentezinin, bakteride bulunan 150-250 kb büyüklüğünde bir DNA molekülü tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir (Özcan ve Özgen 1996). *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinde bulunan bu DNA molekülü Ti (Tumor including/Tümör oluşturan) Plazmidi olarak tanımlanmaktadır (Zaenen vd. 1974, Watson vd. 1975). Leesman ve arkadaşları Ti Plazmidinin içrisine yerleştirilen herhangi bir genin kolaylıkla bitki hücresine aktarılabildiğini keşfetmiştir (Leesmans vd. 1990).

2.6 Kaynak Özetleri

Arda (2004), Türkiye Trakya bölgesinde çeşitli hibrit ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nin in vitro koşullarında gelişimi ve kallus verimi üzerine yapılan çalışmada, Trakya'da yetiştirilen 16 farklı hibrit ayçiçeği kullanılarak Üç farklı yöntem uygulanmıştır. Birinci metodta testa ayrılmadan, ikinci metodta ise testa bırakarak yüzey sterilizasyonu yapılmış ve çimlenme yürütülmüştür. Üçüncü yöntem çimlenme, testa çıkarılmadan nemli pamuk medyumunda gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmaları, farklı hormon konsantrasyonlarındaki farklı medyumlarda mevcut örneklerden elde edilen eksplantlar kullanılarak yapılmıştır. İstenilen sonuçlar kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılarak yapılan kültürlerden elde edilmiştir. Bu eksplantlardaki bölümlerden rejenerasyon ve kallus üretiminin yerli ve melez tiplerde incelendiğinde farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Charriere ve Hahne (1998), ayçiçeğinin in vitro kültürde olgunlaşmamış zigotik

embriyolarının kallus oluşumuna karşı embriyogenez oluşturmalarını, bununla birlikte BBD'lerin etkisinin incelenmesini konu alan araştırmalarında, embriyolardan in vitro koşullarda somatik embriyolar ile sürgünlerin oluşmasının besiyerindeki sukroz konsantrasyonuyla ilgili olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmada iki çeşit sukroz konsantrasyonunun öneminden bahsedilmiştir. Besiyerinin %3 sukroz içermesi durumunda sürgünlerin oluştuğu fakat embriyo oluşumu gerçekleşmediği gözlemlenirken, %12 sukroz içermesi durumunda somatik embriyonun oluşumu gözlemlenmiştir. Araştırmada, farklılıkların BBD'lerin konsantrasyonuyla ilgisinin bulunmadığı, besiyerine eklenen hormonların türlerinden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bu araştırmada gerçekleştirilen denemelerde farklı oranlarda BAP ve NAA ilave edilmiş olan MS medyumunu kullanılarak Ayçiçek bitkisi türlerinden alınan kotiledon boğum eksplantı kültürlenmiştir. Denemelerde elde edilen sonuçlar bağlamında besiyerinin kültürdeki etkileri ve önemi üzerinde durulmuştur.

Charriere vd. (1999), ayçiçeğinin zigotik embriyolarına ilişkin diğer bir çalışmada bu embriyoların in vitro koşullarda sürgün ve somatik embriyo oluşumu denenmiştir. Araştırmacılar, olgunlaşmamış zigotik embriyolardaki aynı tip hücrelerden sürgün oluşumları ve somatik embriyoların gelişimlerinin, medyuma ilave edilen şekerin konsantrasyonuyla ilgili olduğunu görmüşlerdir.

Freyssinet ve Freyssinet (1988), ayçiçek bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarından yeni fertil bitkiler oluşturulması için çalışılan diğer bir araştırmada, olgunlaşmamış embriyolardan alınan hipokotillerinden fertil bitki oluşturulmuştur. Bitkiden alınan eksplantların uygun medyumda kültüre alındığı araştırmada sürgün ve kök oluşumuna ilişkin veriler değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda gelişen bitkicikler dış ortama aktarılmıştır.

Gustavo vd. (1998), denemeye alınan üç tür bitkilerde gen transferinde farklı sonuçların ortaya çıkmasının nedenlerinden birisinin de genotipe bağlı farklılıklar olduğu düşünülmektedir. Bitki genotiplerinin *Agrobacterium* hattıyla etkileşim içinde olduğu düşünüldüğünde bakteri enfeksiyonunun farklı genotiplerde etkilerinin farklı olması normaldir. Transgenik bitki elde edilmesi amacıyla yapılan çalışmanın ilk aşamasında

bakteri enfeksiyonunun ardından plazmidin bitki genomuna entegrasyonu önem taşımaktadır. Ayrıca gen ekspresyonunda entegre genin yeri de önemlidir. Bakteri kolonizasyonu, bakteri virölans sistemin gelişmesi, T-DNA transfer kompleksinin generasyonu, T-DNA aktarım ve T-DNA'nın bitki genomu ile entegrasyonu transgenik bitki elde edilmesinde önem taşıyan işlem basamaklarıdır. *Agrobacterium* hattı ya da plazmid konstrakt, Ti-plazmidin bitki genomuna entegrasyon kabiliyeti transformasyon sonuçlarında etkili olmaktadır. Yüksek oranda değişmekte olan hücreler içeren bitki parçalarında yüksek transformasyon kabiliyeti olduğu düşünülmektedir.

Mirzai vd. (2015), ayçiçeğinde (*Helianthus annuus L.*) etkili ve güvenilir bir organogenez protokoluna ulaşmak için, etilen inhibitörleri olarak AgNO₃ ve CoCl₂'nin etkisi araştırılmıştır. CMS19 ve Progress çeşitlerinden elde edilen kotiledon eksplantları 2.0 mg/L BAP ve 1.0 mg/L IAA içeren MS ortamına farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ (0, 1.5 ve 3 mg/L) ve CoCl₂ (3 ve 6 mg/L) ilave edilerek kültüre alınmıştır. Yapılan istatistik analizine göre; eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün rejenerasyonunu içeren organogenez parametrelerinde etilen inhibitörlerinin konsantrasyonu ve çeşitler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Kültür ortamına etilen inhibitörlerinin eklenmesi, eksplant başına sürgün sayısını ve rejenerasyon frekansını artırmıştır. Sürgün rejenerasyonu CoCl₂ konsantrasyonun artışıyla artmış, ancak AgNO₃ konsantrasyonunun artışıyla azalmıştır. Düşük konsantrasyonda (1.5 mg/L) AgNO₃ uygulaması ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) organogenez artırmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu ortama 6 mg/l CoCl₂ (R/E=% 63 ve S/RE= 3) ve 1.5 mg/L AgNO₃ (R/E=% 73 ve S/RE= 2) eklendiğinde elde edilmiştir. Bu çalışmada etilen inhibitörlerinin, özellikle CoCl₂'nin ayçiçeğinde bitki transformasyon protokoluna ve in vitro sürgün rejenerasyon etkinliğinin iyileştirilmesinde kullanılabileceği önerilmiştir.

Arda vd. (2012) çalışmada, *Helianthus annuus L.* (ayçiçeği) bitkisinden embriyo kültürü yöntemi kullanılarak elde edilmiş olan bitkilerin soğukta muhafaza edilerek korunmasına ve bu bitkilerde oluşan anatomik ve karyolojik değişimlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Kontrol grubu bitkileri kum ortamında çimlendirilerek elde edilmiştir. Deney grubu ise, 0,5 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA içeren MS besi ortamında

embriyo kültürü yöntemiyle yetiştirilmiştir. Bu bitkilerin yarısı 25 °C de 16/8 saat fotoperiyotta bekletilirken diğer yarısı 4 °C’de karanlıkta bekletilmiştir. Yapılan anatomik değerlendirmede, deney grubu bitkilerinin epiderma, korteks parankiması, öz parankiması, iletim demetleri gibi yapılarının kontrol grubuna göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Mitotik indeks değerleri kontrol grubunda %22.9, deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde %60, soğukta muhafaza edilmiş bitkilerde ise %10.1 olarak belirlenmiştir. Tüm bu anomaliler normal kültür şartlarında ortadan kalkmış ve bitkiler sağlıklı gelişim göstermiştir. Sonuç olarak ayçiçeğinin soğukta muhafazası yararlanılabilir bir yöntem olarak önerilmektedir.

Natalini ve Cavallini (1987), bezelyeler üzerinde gerçekleştirilen bir diğer araştırmada sürgün rejenerasyonunda en fazla etkisi bulunan faktörlerin bitki parçası, genotip ve ortamın içerdiği hormonlar olduğu belirlenmiştir.

Goldy vd. (1989), *V. vinifera* kalitesinde meyva ve *V. rotundifolia* seviyesinde hastalıklara ve zararlılara dayanıklı bitkilerin elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen melezleme çalışmalarında, embriyo aborsiyonuna bağlı olarak yetersiz gelişen üretimin artırılmasında embriyo kültürünün mümkün olduğunu tespit edilmiştir.

Gu vd. (1990) tarafından yapılan bir araştırmada, arpadaki olgunlaşmamış embriyoyu etkileyen etkenler incelenmiş ve MS (Murashige ve Skoog) besin ortamında en verimli sonucun alındığını tespit etmişlerdir.

Özgen vd. (1997), BAP (6- benzylaminopurine) ve NAA (Naftalen asetik asit) içeren medyumlardan yonca bitkisiyle ilgili olarak yapılmış olan araştırmada en yüksek miktarda sürgünün elde edildiği gözlemlenmiştir.

Çağlayan vd. (1998), Doğu Akdenizde sık görülen salep orkidesi türlerinden *Ocrhis anatolica* Boiss, *Orchis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophrys phrygia* Fleischm, et Borm, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum affine*’de embriyoları kültüre alınmış ve *in vitro* çalışılmıştır. Embriyolarının kültüründe 14 değişik besiyortamı

kullanılırken, ortalama çimlenmede ve protokormdan bitki oluşumunda en iyi değerlerin %2,39 ve %1,86 şeklinde Vaes Debergh + Domates Ekstratı 4 Aktif Karbon medyumından elde edildiği görülmüştür. Araştırmada, salep orkidelerinin *in vitro* çoğaltılması ve yumru oluşumu için gerekli değerlerin tespit edilerek, doğal ortamda çoğalmasında sınırlılıklar olan bu türün üretilmesinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır.

Tangolar vd. (1998), Çekirdeksiz üzümün ıslahını sağlamak için embriyo kültürünü kullanan diğer bir araştırmada, bu yöntemin çekirdeksiz x çekirdeksiz üzüm melezinden bitki rejenerasyonu denenmiştir. Çeşitli çekirdeksiz üzüm türlerinin kullanıldığı çalışmanın 1. yılında türlerin çiçek tozu ve kaliteleri ile üretim miktarlarının belirlenmesi, 2. yılında melezlerden bitki rejenerasyonu çalışılmıştır. Üzerinde çalışılmış olan türlerin tozlayıcı olması gerektiği gibi çiçek tozu canlılık ve çimlenme yeteneğine de sahiptir. Araştırmada sonucunda, melezlerden embriyo kültürüyle bitki elde etmiş olup çimlenme süresi 2,5 ila 9 gün arası ve çimlenme oranı %77,1'den yüksek tespit edilmiştir. Çimlenmiş embriyoların bitkiye dönüşme oranı ise %78,9 olarak belirlenmiştir.

Sancak (1999), korunga (*Onobrychis viciifolia Scop.*) bitkisinin *in vitro* hızlı çoğaltımına yönelik bir yöntem geliştirilmesini konu alan araştırmada, BBD'nin optimizasyonu ile, farklı oranlardaki (BAP), IBA ve NAA içeren MS medyumunda, tek embriyodan, sekiz haftalık sürede çok yüksek oranda sürgün oluşumu sağlanmıştır. Sürgün miktarında en yüksek değerlerin 2mg/L BAP ve IBA'nın 0,05 ve 0,1mg/L'lık besiyerinden ve 2mg/L BAP ve NAA'nın 0,05, 0,1 ve 0,5mg/L'lık besiyerinden ya da 8mg/L BAP ve 0,05mg/L NAA besiyerinden elde edildiği belirtilmiştir. Sürgün boyunda ise sadece 2mg/L BAP içeren medyumda en yüksek değere ulaşılabilmektedir. Oluşan sürgünlerin 1mg/L IBA içeren MS medyumunda dört haftalık sürede %60'ının köklendirildiği belirtilmektedir.

Erdağ ve Yürekli (2000), *Thymus sipyleus*'un *in vitro* çoğaltılmasını konu alan araştırmada sterilize tohumların modifiye edilmiş MS ve Heller besiyerinde

çimlendirilmeleri gerçekleştirilmiştir. Çimlenmede en iyi sonuçların MS ortamında elde edilmesine karşın bitki gelişiminin sonraki aşamalarında Heller medyumundan daha iyi sonuç alınmıştır. Thymus sipleus'un sekonder metabolit içermesinden ve büyümesi sırasında ortama salgılamasından dolayı toksik etkiye neden olması, Heller besi yeri kullanımı ise önlenmeye çalışılmıştır. NAA ve BA eklenmiş MS besi yerine alınan bitkiciğin medyumla temas ettiği bölgelerde kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Aynı medyumda rejenerasyonu gerçekleşen bitkicikler 14 gün sonra çoklu sürgün haline gelmiş, 4. alt kültürün bitiminde ise köklenmiştir.

Birsin vd. (2001) yaptıkları araştırmada, olgun arpa embriyolarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu araştırılmış, kallusun oluşturulmasında bitkinin olgun embriyoları kullanılmıştır. Yulafta, embriyoların kültüre alınmasından 72 saat sonra kallus oluşmaya başlamış olup, genotipin kallus oluşumunu belirlediği anlaşılmıştır.

Üçler ve Mollamehmetoğlu (2001), *Tilia platyphyllos*'un (büyük yapraklı ıhlamur) *in vitro* embriyo kültürü yöntemi ile bitki rejenerasyonunu konu alan çalışmada *Tilia platyphyllos*'tan alınan olgun tohumlardan izole edilmiş embriyolar kullanılmıştır. Embriyoların şeker, BAP ve Kinetinin farklı oranlarda eklenmiş olduğu MS medyumunda kültürlenmiş ve bunların *in vitro* embriyo büyümesiyle bitkicik ve tomurcuk oluşumlarına etkileri gözlemlenmiştir. Yapılan denemelere bağlı olarak, bitki hormonları bulunmazken şeker içeren besin ortamlarında embriyoların epikotil ve kök farklılaşmasıyla fide oluşturdukları belirtilmiştir. Araştırmada, en iyi sonuç alınan şeker dozunun 30 g/L olduğu tespit edilmiş olup, epikotil eksplantlarında tomurcuk oluşumunun ise 1.0 mg/L BAP dozda etkili olduğu anlaşılmıştır. BAP dozlarının tamamı, denemelerde kinetin dozlarına oranla daha etkili sonuç vermişlerdir. Embriyolara 30g/L şeker eklenerek kültürlendiğinde hipokotil ve kök uzunluğunun en iyi ölçümlerine tohumların toplanmasından bir ay sonra rastlanmıştır. Çalışmada, şekerli ortamlarda çimlendirilen embriyolardan bitki oluşumunun ve gerçekleşen bitki epikotillerinin kültürlenmesiyle tomurcukların çoğaltılmasının mümkün olduğu anlaşılmıştır.

Zaman vd. (2001), patatesten meristem kültürü metoduyla virüssüz bitki elde edilmesi hedeflenen araştırmada farklı oranlarda NAA (Naftalen asetik asit), IAA (İndol asetik asit) ve IBA (İndol bütirik asit) oksinlerinden yararlanılmıştır. Bitki yüksekliğinin maksimum değeri olan 8,3cm ve yaprak miktarının maksimum değeri olan 8,9'a 0,5mg NAA ve 1mg IBA kullanımında ulaşılmıştır. Kök uzunluğunun en yüksek değeri olan 4,2cm ise 1mg IAA kullanımında elde edilmiştir. Araştırmada elde edilen bulgular, üretilen tüm bitkilerde PVX virüsünün dışında hiçbir virüs türüne rastlanmadığını ortaya koymuştur.

Bürün ve Poyrazoğlu (2002), embriyo kültürünü konu alan başka bir araştırma, kültürde besiyeri bileşimiyle sterilizasyon yönetiminin olgun arpa embriyolarına etkisini incelenmiştir. Embriyo kültürünü konu alan başka bir araştırma, kültürde besi yeri bileşimiyle sterilizasyon yönetiminin olgun arpa embriyolarına etkisini incelenmiştir. Embriyodan bitkiciğin gelişiminde en yüksek değerlere ulaşılan besin ortamının olduğu, MS, ½MS, B5 besi ortamlarının ise Randolph-Cox'u takip ettikleri anlaşılmıştır. Üzerinde çalışılan sterilizasyon yöntemlerinde sodyum hipoklorit, antibiyotik solüyonu uygulama ve HgCl₂ sterilizasyonunun daha etkili oldukları anlaşılmıştır. Alanda gerçekleştirilen diğer araştırmalarda ise embriyo gelişiminde farklı konsantrasyonların etkisi çalıştırılmış, sonuç olarak MS ve B5 besin ortamlarının arpa embriyo kültürüne sıklıkla uygulandığı gösterilmiştir.

Haliloğlu (2002), buğday embriyolarının kültürlenerek embriyonik kallus üretiminin incelendiği araştırmada olgunlaşmamış embriyolar kullanılmıştır. Embriyo gelişiminin 3 aşamasındaki 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit) konsantrasyonunun buğday embriyosu kültürünün morfogenezini üzerindeki etkileri incelenmiştir. Morfogenezde en uygun oranın 2mg/L 2,4-D olduğu görülmüş ve kallusun birinci ve ikinci gelişim aşamalarının bu konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir. MS+B5 besi ortamında ise yüksek embriyogenik kallus üretimini sağlayan araştırmacı, buğday bitkisinde embriyogenik kallus üretiminin ilk iki gelişim aşamasında 2mg/L 2,4-D konsantrasyonunun optimum oran olduğunu belirtmiştir.

Goleniowski vd. (2003), nanegillerden keklik otu *Oregano (Origanum vulgare × applii)* bitkisinin meristem uçlarının mikroçoğaltılmasını konu alan araştırmada sterilizasyon süreci bouynca sürgün uçlarının göreceği zararın azaltılmasını sağlayan bir metot geliştirilmiştir. Basit sürgün kısımlarının nispeten hassas bulunduğu bitkilerin meristemleri kültürde olduğu sürece yaptıkları oksidasyonun dış ortamda yetismekte olan bitkilere göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. BA ve NAA bitki besin düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının bitkinin mikroçoğaltılması üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Li vd. (2002), çimlendirilen mısır (*Zea mays* L.) tohumunun sürgün apikal meristemlerinden bitki üretimini etkileyen etmenleri konu alan araştırmada bitkinin tohumunun apikal eksplantının çoklu sürgün kültüre alınması metodu uygulanmıştır. Bitkinin rejenerasyonunda kültür ortamı, çevresel faktörler ve genotipe bağlı faktörlerin etkileri incelenmiş olup, sürgün gelişimlerinin en yüksek aralığı 4 ila 5 cm olarak tespit edilmiştir.

Mondal vd (2002), proliferasyon filiz tomurcuklarının 4 °C’de saklanan aksiller çay (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) çalışması ‘mikroreperasyon ve yapay tohum teknolojisi germplazma ile, üretilecek amaçlanmıştır de etkili değişiklikler yapılabilir ve özellikle başarılı olduğu gösterilmiştir ülkelerde uygulanan koruma yöntemleri çay yetiştirilen. Çay embriyolar düşük depolama kapasitesine sahiptir. Bir sonar hormonsuz MS ortamına transfer edilmiştir MS1 düşük sıcaklıkta (4 °C) 15, 30, 45 ve 60 gün de laboratuvar koşullarında kültürlenmiş düğüm eksplantlar. 4 ° C’de depolanan rağmen tomurcukları oluşumunu etkiler gözlenmiştir. konut düşük sıcaklık 15 gün geliştirme süresini azaltmak için endikedir. 4°C, bu kısa bir süre içinde (15 gün) ile karşılaştırıldığında 254 °C tomurcuklara muhafaza geliştirmek için gözlenmiştir. Sürgün oluşumu için diğer alt kültürler görüldüğünü bildirmiştir.

Yıldız ve Er (2002), keten (*Linum usitatissimum* L.) bitkisinin hipokotilinden alınan eksplantlarda yaralanan yüzeylerin artırılması, kallusdan gelişen sürgün miktarını artırmıştır. Hipokotilden alınan eksplantlarda epidermin soyulması suretiyle yaralanan yüzeyin genişletilmesini konu alan çalışmada, böylece *Agrobacterium* inokülasyonunun

ardından gen aktarımına uygun sürgün miktarının artırılması hedeflenmektedir. Soyulmamış hipokotil eksplantlarında kallus ağırlığı, sürgün oluşturan hipokotil oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve petrideki sürgün sayısı sırasıyla 0,8 g, %40, 4,24 adet ve 16,96 adet şeklinde tespit edilmiştir. Eepidermisin soyulması ile aynı değerler sırasıyla 1,35 g, %58,75, 8,15 adet ve 47,88 adet olarak gözlemlenmiştir.

Gomes vd. (2003), yok olma tehlikesi altında olan maclura otu (*Maclura tinctoria*) bitkisinden kallus kültürüyle bitki rejenerasyonunu konu alan araştırmada, bazı doğal türlerinden dormansi döneminde düşük frekanslı çimlenme özelliğine sahip tohumların üretildiği belirtilmiştir. Bu çimlenme özelliği, bitkide seksüel çoğaltmaya bağlı yeni fenotiplerin oluşumunda engelleyici etki göstermiştir. Odunlarının yaygın kullanımına ve çimlenmesindeki düşük frekansa bağlı olarak bu bitki türü tehlike altındaki türler arasına girmiştir. Araştırmada nod segmentlerinden kallusun oluşturulmasında kullanılan odunsu bitki medyumu 10,74µM NAA + 4,43µM BA içermektedir. Yüksek frekanslı sürgünlerin oluşumuna olanak sağlayan besiyerinin 4,03µM NAA + 4,43 BA içerdiği tespit edilirken, kök oluşumunun IBA ve aktif kömürden etkilendiği anlaşılmıştır.

Nagip vd. (2003), virüssüz patates elde etmeye yönelik bir başka araştırma ise Tropikal Asya'da gerçekleştirilmiş olup, yumru köklü patates üzerinde meristem kültürü metoduyla çalışılmıştır. İn vitro bitki rejenerasyonu için apikal meristem kullanılmış olup farklı tür ve yoğunluklarda hormonlar eklenmiş olan MS ve MS₀ besi ortamlarında kültürlenmiştir. Çeşitli BBD'ler denenmiş olup, meristemin ilk aşamasında en iyi sonucu veren BBD'nin 0,5 mg/L GA₃ + 0.04 mg/L KIN olduğu tespit edilmiştir. Meristemlerden ilk gelişen MS₀ ve BA ile IBA içeren MS besin ortamlarında alt kültüre alınmıştır. IBA besiyerinin sürgün ve kök gelişimini olumlu etkilediği görülürken, sürgün oluşumunda en etkili besiyerinin GA₃ olduğu görülmüştür. Araştırmada, kök oluşumunun arkasından bitkiler dış ortama aktarılmış ve virüssüz olarak gelişimleri sağlanmıştır.

Prasertsongsun (2003), buğdaygillerden vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash) bitkisinin konu alındığı araştırmada kallus kültürüyle bitki üretimi çalışılmış olup, germ-plazmadan hücre süspansiyon kültürünün ve kallus kültürlerinden etkin bitki rejenerasyonunun sağlanması amaçlanmaktadır. Hücre çoğalmasında en uygun besiyerinin 10µM 2,4-D ve 10µM prolin barındıran N6 olduğu tespit edilmiştir. Süspansiyonun katı MS medyumuna aktarılması sonrasında koloni oluşumu görülmüştür. Besiyerinde bitki oluşum oranı ise %65 olarak gözlemlenmiştir.

Pirinç vd. (2003), diploid Diyarbakır karpuzu (*Citrullus lanatus* cv. 'Sürme')'nın kotiledonlarından adventif sürgün organogenezi ve bitki rejenerasyonunun incelendiği çalışmada Diploid Diyarbakır karpuzu bitkisinin kotiledonlarından üç haftalık kültürlenme süreci sonunda adventif sürgünler elde edilmiştir. İki tür sitokinin BA'nın ve kinetin sürgün organogenezi üzerindeki etkileri ele alınmıştır. Sürgün oluşumunda en iyi değerlerin elde edildiği medyum 0,5mg/l BA içermekte olup, kinetinle kıyaslandığında %50 oranda daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Oluşan sürgünlerin *in vitro* köklenmesinde NAA destekli MS besiyeri kullanılmıştır. Rejenerasyon uygulanan bitkilerin %50'sinden fazlasının başarılı olarak dış ortama aktarılmasının gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonucunda, yüksek kaliteli diploid Diyarbakır karpuzu bitkisinin *in vitro* çoğaltılmasının mümkün olduğu ve geliştirilen yöntemle, karpuz türlerinin ıslahının sağlanabileceği kanıtlanmıştır.

Vookova ve Kormutak (2003), toros göknarı (*Abies cilicica* Carr.) ve hibrid *Abies cilicica* × *Abies nordmanniana*'nın somatik embriyogenez metoduyla bitki rejenerasyonunu inceleyen araştırmada, somatik embriyogenez *Abies cilicica* Carr ve *A. cilicica* × *A. nordmanniana* hibritinin olgunlaşmamış zigotik embriyolarında 5µM benzilaminopürin kullanılıp, hazırlanmış olan Schenk ve Hilderbrandt (SH) besi ortamında oluşturulmuştur. Somatik embriyonun olgunlaşması amacıyla MS ve SH besi ortamına %4 maltoz ile %10 polietilen glikol-4000 kullanılmıştır. 80 µM absisik asit, embriyonun olgunlaşmasını sağlamıştır. Olgunlaşması için 3 hafta geçen embriyolar %1 sükröz ile %1 aktif kömür barındıran SH besi ortamında çimlenmiş, bitkicikle birlikte kotiledon, hipokotil ve radikulalar oluşmaya başlamıştır. Araştırma sonucunda *A.*

cilicica ve hibritlerinin somatik embriyogenez metoduyla somatik embriyolarının olgunlaşması ve bitki rejenerasyonu incelenmiştir.

Rahman vd. (2004), *Kaempferia galanga* L. bitkisine yönelik yapılan araştırmada yaprak tabanı eksplantlarının kallus kültürüyle somatik embriyogenez ve bitki rejenerasyonunun gerçekleştirilmesinde yaprak kınının parçalanarak agar-gel ortamına alınması ve MS medyumunda kültürlenmesi yöntemi benimsenmiştir. MS medyumunda kallus üretiminde yüksek miktar elde edilmiş olup, en iyi seviyenin 7 haftanın sonunda görüldüğü belirtilmiştir. Aynı ortamda alt kültürlerle gelişen bitkiler toprağa aktarılmıştır.

Mamun vd. (2004), bangladeş'te gerçekleştirilen başka bir araştırmada, bölge için önem taşıyan şeker kamışı türlerinden bazılarının *in vitro* çoğaltılması incelenmiştir. Besi ortamına alınan BBD'lerin kallus üretimini, sürgünlerin farklılaşmasını ve kök oluşumunu etkilediği gözlemlenmiştir. Araştırma, kök oluşumlarında modifiye MS medyumuna oksin eklenmesi ile en etkili sonucun alındığını ortaya koymuştur.

Myers (2004), baklagillerden Ateş ağacı (*Delonix regia*) bitkisinde somatik embriyo üretimini konu alan araştırmada olgunlaşmamış tohumlar kültüre alınarak somatik embriyogenez gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan iki medyum 2,4-D ile 6- BA içermekte olup, olgunlaşmamış zigotik embriyolarla tüm tohumlar ve yarısı kesilmiş olgunlaşmamış tohumlar şeklinde üç eksplant türü üzerinde çalışılmıştır. Embriyo kültürünün başarılı sonuçlandığı belirtilirken kullanılan medyumun içeriğine ve eksplantın türüne göre farklı oluşum süreçleri gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Vargas vd. (2004), antoryum (*Anthurium andreanum*)'un rejenerasyonunu konu alan araştırmada, tohumların çimlendirilmesi amacıyla 2,2µM BA içeren medyumun kullanıldığı belirtilmiştir. İki haftalık çimlenme süreci sonrasında çimlenme oranı %74 olarak belirlenmiştir. Dört haftanın sonunda bitkicikten küçük parçaların alınarak 4,4µM BA ve 0,05µM NAA barındıran besiyerinde alınması ile eksplantlarda sürgün oluşumları görülmüştür. *In vitro* oluşturulan bitkiyle birlikte küçük parçalardan

meydana gelen bitkiciklerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Oluşan dokular 8,9µM BA ve 2,7µM NAA içeren medyumda kültürlenmiştir. Altı haftalık sürenin ardından kallus gelişimi gözlemlenmiş ve gelişen kalluslardan dış ortama aktarılanların %80 oranında gelişme gösterdiği kaydedilmiştir.

Barbara (2005), doku kültürü ve bitkisel madde dağılımı ve çok sayıda üretim, depolama ve doku kültürü içinde tutulan tohum genetik materyalinin etkisi incelendi, depolama ve yaymak için etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir. kazanç sağladı bitki büyümesi veya yayılması, zaman, mekan ve laboratuvar gereksinimleri açısından bitkilerin çimlenme benzersiz tohum genetik materyalini, korurken. *in vitro* bitki örtüsü altında tutulan yıllarca, aylarca tutulur. Bitkiler, yeni bir ortama transfer edilmeden ay, 44 °C kalabilir. Daha az soğuk toleranslı bitkiler, oda sıcaklığında saklandı az. Bu germplazm depolama nitro konut kullanılan ve bitki genotipini artırma kabiliyetini içeren edildi. Apikal meristem *in vitro* çoğalması, bu sağlıklı germplazm stokları için virüssüz bitkiler elde etmek için önemli olduğunu belirtilmiştir.

Erdoğan vd. (2005), burçaktan alınan olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonunun ve hızlı çoğaltılmasının hedeflendiği araştırmada, 6 farklı burçak 6 farklı burçak hattına ait olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenleri, yine farklı oranlarda Thidiazuron (TDZ) ilaveli MS besiyerinde kültürlenmiştir. TDZ konsantrasyonları, hatlar ve kullanılan bitki parçalarının %90 oranında olduğu, bitki parçası başına en yüksek sürgün adetinin ise 22 adet olduğu görülmüştür. Bitki parçası başına en yüksek sürgün adetinin benzilaminopurin (BAP) ve naftalenasetik asit (NAA) içeren MS medyumlarından elde edildiği belirlenmiştir. Elde edilen sürgünler, indol-3-bütirik asit (IBA) ilaveli MS medyumunda köklendirilmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Çalışmada bitki materyali olarak, ‘Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü’ ve ‘Pioneer Tohumculuk’ dan temin edilen ‘Meriç’, ‘64A71’ ve ‘64A14’ Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipleri kullanılmıştır.

3.1.2 Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyu Materyali

Araştırmada kullanılan acı kavun meyveleri Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü’nün arkasında yer alan doğal yetiştirme bölgesinden elde edilmiştir. Eylül ayının son haftasında olgunlaşan meyvelerden özsuyu bir beher içerisine alınmış, sonrasında tülbentten süzülerek tohum ve iri meyve kısımlarından ayrılan özsuyu iki defa 0.45 µm çapında steril filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Steril edilen özsuyu kullanılabildiği kadar -20 °C’de korunmuştur.

3.1.3 Bakteri Materyali

Çalışmada bakteri materyali olarak, p35S GUS-INT plazmitini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*’in GV2260 hattı kullanılmıştır. Plazmidin T-DNA bölgesinde karnabahar mozaik virüsüne ait 35S promotörüne kontrol edilen ve gen transferi yapılan bitki hücrelerinin kanamisin içeren besin ortamında seçilebilmesini sağlayan neomisin fosfotransferaz II (*nptII*) geni vardır. β-glukuronidaz (GUS) geni, plazmitte 35S promotörü tarafından kontrol edilmektedir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Besin ortamlarının hazırlanması

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog, 1962) (Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında distile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120 °C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Steril edilen ortamlar 40°C'ye soğutulurak içerişine gerekli büyüme düzenleyici hormon ve antibiyotikler eklenerek steril perti veya steril magenta kaplarına dökülerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 MS ortamının içerdiği maddeler ve konsantrasyonları

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

3.2.2 Acı kavun meyve özsuğu dozları

Acı kavun meyve özsuğu dozları (0 (kontrol), 200, 400, 800 ve 1600 µl/l) rejenerasyon çalışmalarında doğrudan rejenrasyon ortamına. *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarım çalışmalarında ise bakteri büyütme ve inokulasyon ortamlarına eklenmiştir. Acı kavun meyve özsuğu materyali kullanılmadan önce 0.45 µm çaplı porları bulunan steril filtrelerden iki kez geçirilerek steril edilmiştir.

3.2.3 Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında, çalışılan laboratuvarın ve kullanılan bütün malzemelerin steril olması kontaminasyona uğramadan başarılı neticeler elde etme açısından son derece önemlidir. Dolayısıyla araştırmanın her aşamasında gerçekleştirilecek çalışmalarda öncelikle ekipmanların uygun şekilde steril edilmeleri gereklidir. Araştırma sürecinde çeşitli amaçlarla kullanılmış olan kavanozların ve Petri kaplarının steril edilmeleri için yüksek ısıda kullanılabilen kağıtlara sarılmış ve 200°C’de 2 saat bekletilmişlerdir. Steril kapların içinde kullanılacak olan pens ve bistüri benzeri metal aletlerin sterilizasyonu için %70’lik (v/v) etil alkol ve doğal gaz alevi kullanılmıştır. Bitki parçalarının kesilmesinde kullanılacak olan bistüri uçları ise gerekli görüldüğünde muhafazası içerisindeki yeni steril uçların takılması suretiyle yenilenmiştir.

3.2.4 Tohum yüzey sterilizasyonu

Tohumla yüzey sterilizasyonu için steril şartlar altında manyetik karıştırıcı üzerinde %5 sodyum hipoklorid (NaClO) içeren %50’lik ticari çamaşır suyu içerisinde 15 dakika çalkalandıktan sonra, steril saf su ile 3 – 4 kez durulanmak suretiyle steril edilmiştir.

3.2.5 Ayçiçeği tohumlarının çimlenme ve fide oluşumu

Ayçiçeği tohumlarının çimlendirilmesinde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7’lik agar (Type A, Sigma) ile

katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında distile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir.

Steril edilen ortamlar steril magentalara dökülerek dondurulmuştur. Steril edilmiş ayçiçek tohumları aşağıdaki şekildeki gibi bir magentaya 15 adet tohum olacak Şekil 3.1 deki gibi '5 x 3' ekim düzeninde her magenta kabına 24±1°C'de, %45-46 oranında nemde ve 16 saat ışık - 8 saat karanlık fotoperiyotunda çimlendirilmiştir

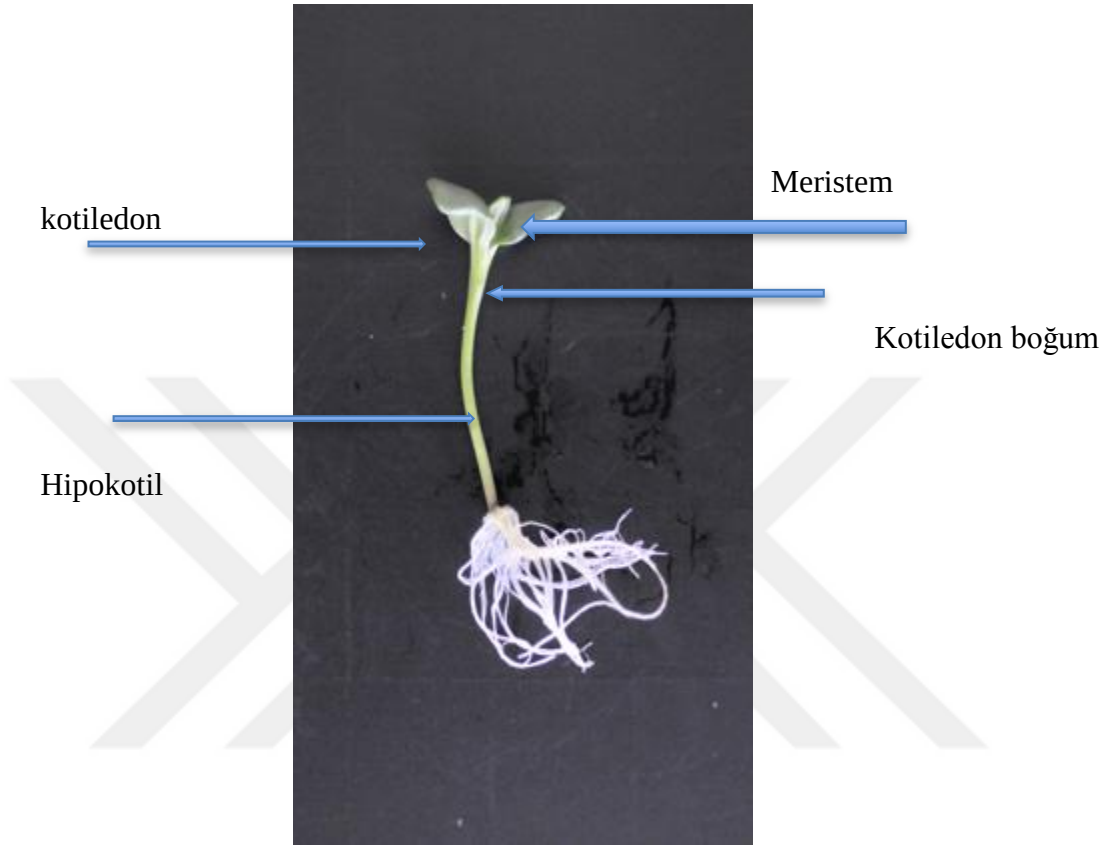


Şekil 3.1 Magenta kaplarına yerleştirilen ayçiçeği tohumları

3.2.6 Eksplant izolasyonu ve sürgün rejenerasyonu

Araştırmada 8 ila 12 günlük steril fidelerden alınan kotiledon boğumlar, meristemler, hipokotiller ve kotiledon eksplantlarının izole edilerek, MS besiyerine alınan dokular 24°C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 4 hafta süreyle kültürlenmiştir (Şekil 3.2). Kültürde kullanılan MS besiyerinde yer alan BAP kontrol amaçlı 0 mg/l, 0,50 mg/l, 1,0 mg/l ve 2,0 mg/l dozlarında, NAA ise kontrol amaçlı 0 mg/l, 0,50 mg/l, 1,0 mg/l ve 2,0 mg/l dozlarında kullanılmıştır. Denemelerde 3 genotiplerden alınan

eksplantlara uygulanan BBD (bitki bütüme düzenleyici)'lerin sürgün rejenerasyonuna en iyi etkileyen dozları belinerek uygulanmıştır.



Şekil 3.2 Kullanılan ayçiçeğin eksplantları

3.2.7 Gen aktarımında kullanılan bakterilerin hazırlanması

Gen aktarım çalışmalarında kullanılan p35S GUS-INT plazmitini taşıyan *Agrobacterium tumefaciens*'in (GV2260) hattı -80°C'de muhafaza edilen gliserol stoklardan alınarak 50 ml'lik steril tüplerde Kanamisin sülfat monohidrat ve rifampisin seçici antibiyotikleri içeren sıvı LB (Lorent broth) besin ortamında 28°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültürlerinden örnekler lup ile alınarak petri kapları içerisinde seçici antibiyotikleri içeren katı LA (Lorent agar) besin ortamına yayılmış, 2 gün süreyle 28°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Katı besin ortamlarında gelişen bakteri kültürleri 1 ay boyunca +4°C'de muhafaza altına alınarak, ihtiyaç durumunda kullanılmıştır.

3.2.8 Sıvı besiyerinde bakterinin çoğaltılması

Steril falkon tüp içerisine daha önceden hazırlanmış olan steril LB (Lourent broth) dan 10 ml konulmuştur. Steril Lourent broth sıvı besiyerinin üzerine 10 µl Kanamisin ve 10 µl Rifampisin eklenilmiştir. İçerisine +4°C’de muahfaza edilen LA (Lourent agar) besiyerinden alınan *Agrobacterium tumefaciens* tek kolonisi, bakteri sıvı ortamın içerisinde koyularak 180 rpm, 28°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.9 *Agrobacterium tumefaciens*’in GV2260 p35S GUS-INT hattı ile ayçiçeğine gen aktarımı

Gen transferinde kullanılan katı besiyerinde büyüyen bakteri kültürlerinden alınmış olan örneklerin gen aktarımında kullanılmaları için 50ml steril tüplerde NB besiyerine konulmuşlardır. Seçici antibiyotikleri içeren NB besiyerinde aynı zamanda 0 µl/l, 200 µl/l, 400 µl/l, 800 µl/l ve 1600µl/l miktarlarında acı kavun meyve özsuğu bulunmaktadır. Tüpler, çalkalamalı inkubatorde 28°C sıcaklıkta 24 saatlik süreyle inkübe edilmiştir. Otoklavla sterilizasyon işleminin ardından bakteri büyüme ortamına ortama sterilize acı kavun meyve özsuğu ile seçici antibiyotikler eklenmiştir. Stoklanan steril solüsyonlardan alınan seçici antibiyotiklerin içerisine 50 mg/l kanamisinle ve 50mg/l rifampisin ilave edilmiştir. Kotiledon boğum eksplantı %2’lik seyreltilmiş bakteri barındıran likit rejenerasyon ortamında 20 dakikalık süre ile inokulasyonu gerçekleştirilerek 48 saat boyunca ko-kültivasyona alınmıştır. Ko-kültivasyonun ardından içerisine 500 mg/l duocid ve 100 mg/l kanamisin eklenen seçici rejenerasyon medyumuna alınan eksplantlardan oluşturulan dayanıklı sürgünler, oksin, duocid ve kanamisin barındıran MS ortamında köklendirilmiş v sonrasında dış ortama alınmıştır.

3.2.10 Antibiyotikler

Büyüme ortamına ilavesinden önce antibiyotiklerin her birinin, mikrofiltrelerle sterilizasyonu gerçekleştirilmiş olan stok solüsyonları hazırlanmıştır. Antibiyotikler, otoklavla sterilize edilen katı ortamlara, sıcaklığın 45°C’ye düşmesinden sonra

eklenmişlerdir. Çizelge 3.2’de, çalışmada kullanılmış olan antibiyotiklere ilişkin bilgiler verilmektedir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik	Çözücü	Stok konsantrasyonu (mg/l)	Saklama koşulları (°C)
Duocid	dSu	500/l	- 20
Kanamisin	dSu	100/l	- 20
Rifampisin	Metanol	100/l	- 20

3.2.11 Polimeraz zincir reaksiyonu

DNA kit protokolüne uygun olarak örneklerden doğrudan bitki dokusu alınmış ve reaksiyona dâhil edilmiştir. Reaksiyonların pozitif kontrolü amacıyla *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinden yararlanılmıştır. 10µl 2x Phire Plant PCR Buffer, her primerden 1µl, 0,4µl Phire Hot Start II DNA polymerase ve 7,6 dH₂O kullanılmış ve toplam reaksiyon 20µl hazırlanmıştır. Kullanılan PCR döngüleri çizelge 3.3’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3 PCR döngüleri

Sıcaklık	Süre	Döngü
98 °C	5 dakika	-
98 °C	1 dakika	40
58 °C	45 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	5 dakika	-

3.2.12 Primer dizileri

Transgenik bitkilerin belirlenmesi için npt-II geninin PCR cihazında çoğaltılması işleminde şu primer dizileri kullanılmıştır:

npt II R: 5' GAA GGC GAT AGA AGG 3'

npt II F: 5' TTG CTC CTG CCG AGA AAG 3'

Bu primer yardımı ile üretilen amplifikasyon ürününün büyüklüğü yaklaşık 458 bp olmalıdır. *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla kromozomal viruans geninden (*chv*) tasarlanan primer yardımıyla kontrol PCR'ı yapılmıştır.

chv F: 5' CGA ACC GCT GTT CGG CCT GTG G 3'

chv R: 5' GTT CAG CAG GCC GGC ATC CTG G 3'

Bu primer yardımı ile üretilen amplifikasyon ürününün büyüklüğü yaklaşık 850 bp olmalıdır.

3.2.13 Agaroz jel elektroforezi

%1'lik agaroz jel elektroforezi hazırlanmıştır. DNA'nın UV'de görüntülenmesi amacıyla etidyum bromit (5µl) ilave edilmiştir. 120 Volt gerilimde 45 dakikada tamamlanan elektroforez işleminin ardından, PCR reaksiyonları neticesinde elde edilen ürünler jel UV lambasında kontrol edilerek fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.14 İstatistiksel değerlendirmeler

Tesadüf parselleri deneme desenini temel alan denemelerde, muamelelerin içinde 25'er adet eksplant bulunan 5 tekrarlamalı 100x10mm'lik Petri kaplarından oluşmaktadır. Güvenirlilik düzeyinin artırılması için kurulan deneme sayısı yüksek tutulmuştur. Toplanan verilere SPSS yazılımında varyans analizi uygulanmış, muamele ortalamaları Duncan testi kullanılarak kıyaslanmıştır. Elde edilen yüzdelik değerler, istatistik analizi öncesinde arcsin ($\sqrt{X}$) transformasyonuna tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

4. BULGULAR

4.1 Ayçiçeğinde Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve *In Vitro* Sürgün Rejenerasyonu

Araştırmaya konu olan doku kültürü uygulamalarında, bitki kısımlarındaki bakteri ve mantar gibi organizmaların yüzeyden temizlenmesi amacıyla birtakım dezenfektanlar kullanılmaktadır. Bunlar, konsantrasyon, etkinlik süreleri ve benzeri özellikleri ile farklılaşmaktadırlar. Dolayısı ile sterilizasyon uygulamalarında öncelikle, kullanılabilecek dezenfektan türü için en düşük miktarda ve en etkili dozun belirlenmesi gerekmektedir (Bhatti 2001). Yüzeysel sterilizasyonda sıklıkla kullanılan dezenfektanlar arasında biositler, civa, gümüş nitrat, hidrojen peroksit, antibiyotikler, sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu) bulunmaktadır (Özcan ve Özgen 1996). Bu araştırmada, ayçiçeği bitkisi tohumlarının sterilizasyonu için 15 dakikalık süreyle %50'lik çamaşır suyu uygulanmıştır.

Tohumlarda yüzey sterilizasyonu, *in vitro* bitki çalışmalarında ilk aşamayı teşkil etmektedir. Bu bağlamda, *in vitro* rejenerasyon araştırmalarına konu olan bitki parçaları çoğunlukla tohumdan büyüyen steril bitkiciklerden elde edilir. Yapılan çalışmalarda tohumların steril edilmesi yoluyla elde edilen steril filizlerden alınan eksplantlarda rejenerasyon kapasitesinin çok fazla olduğunu bildirilmiştir (Yıldız vd. 2002). Bununla birlikte, tohum yüzey sterilizasyonunda kullanılan dezenfektan miktarı ve sterilizasyon süresi, tohumdan büyüyen filizlerin ve yüzünden bitki parçası canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini önemli derecede etkilemektedir (Allan 1991, Yıldız ve Er 2002b). Bu yüzden *in vitro* araştırmalarında en az dezenfektan miktarının, en kısa süre uygulanmasıyla en iyi sterilizasyonun sağlanması amaçlanmaktadır.

Ayçiçeğinin 'MERİÇ', '64A71' ve '64A14' genotipleri tohumlarının yüzey sterilizasyonu amacıyla kırık, çizik ya da renk değişimine uğramamış olan üniform tohumlardan seçilmiş ve steril edilmiş cam beher içerisinde sterilizasyona tabi tutulmuştur. Dezenfektan olarak kullanılan çamaşır suyunun miktarı ile uygulama süresi (10, 15, ve 20 dk) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemiş olup, bu nedenle miktar ve uygulama süresi faktörlerinin tohum çimlenme ve fide büyüme yüzdeleri, filiz ve kök

uzunlukları gösterilmektedir.

Tohumlar, 1/4, 2/4, 3/4 miktarlarındaki ticari çamaşır suyunda 10 dk, 15 dk ve 20 dk sürelerle sterilize edilmelerinin ardından, her biri 5 dakika olmak koşulu ile 3 defa steril saf suyla yıkanmıştır. Sterilize edilmiş tohumlar, yine steril Magenta kaplarında, %3 sukrozlu ve %0,7'lik agarla katılaştırılan MS medyumunda, $24\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık altında, %45-46 nemde ve 16 saat ışık / 8 saat karanlık fotoperiyodunda çimlendirilmiş ve böylelikle steril bitkicikler oluşturulmuştur. Magenta kaplarının her birisine 15'er adet tohum konulmuş ve kültüre alınarak 8 ila 12 gün sonra bulaşıklık ve çimlenme oranları kontrol edilmiştir (Şekil 4.1). Kontrol edilen hiçbir ortamda bulaşıklığa rastlanmamıştır.



Şekil 4.1 Ayçiçeği çeşidinin *in vitro* şartlarda çimlenen tohumları

4.1.1 Çeşitli dezenfektan miktar ve uygulama zamanlarının tohum çimlenmesi ve filiz ve kök boyları üzerine etkisi

Yüzey sterilizasyonu için kullanılmış olan dezenfektanların miktarları ile uygulanma sürelerinin, *in vitro* tohum çimlenmesine ve bitkicik büyümesine etkisinin bulunduğu ilişkin ilk bulgular, Yıldız ve Er (2002)'in gerçekleştirdiği araştırmada ortaya

konmuştur. Dolayısı ile bu çalışmada öncelikle kullanılan dezenfektan miktarları ve uygulama sürelerinin çimlenmede ve filizlerin gelişimindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, çamaşır suyu kullanılmıştır. 1/4, 2/4 ve 3/4 oranlarında ve 10dk, 15dk ve 20dk sürelerle kullanılan çamaşır suyunun bu iki faktörü arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Ayçiçeği bitkisi tohumlarının dezenfektasyonu için kullanılan çamaşır suyu dozları ile uygulama sürelerinin, tohumların çimlenme oranları ile gelişen fidelerin ve köklerin boylarını belirgin şekilde etkilediği görülmüştür.

Tohumların sterilize edilmesinde dezenfektan olarak kullanılmış olan çamaşır suyunun %25 oranındaki dozunda çimlenme oranının ortalama en yüksek değerine ve fide boyuna 15 dakikalık uygulama süresinde ulaşılmıştır. Kök boyunun en yüksek değerine ise aynı orandaki çamaşır suyunun 10 dakikalık süreyle kullanımında ulaşılmıştır. %25'lik çamaşır suyu kullanımında uygulama sürelerinin çimlenme oranı, fide boyu ve kök boyuna etkisi, çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 *Helianthus annuus*.L. tohumuna yüzey sterilizasyonunda kullanılmış çamaşır suyu miktarı ve uygulama süresinin *in vitro* tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları üzerine etkisi

Doz %	Magenta sayısı	Süre (dakika)	Çimlenme (%) Ortalaması	Fide Boyu (Cm) Ortalaması	Kök Boyu (Cm) Ortalaması
25	16	10	50.81	3.93	3.92
	16	15	65.06	3.99	3.73
	16	20	50.88	3.19	3.27
50	16	10	51.25	3.34	3.61
	16	15	74.31	3.95	3.80
	16	20	40.94	2.69	3.46
75	16	10	58.88	3.17	3.18
	16	15	44.19	3.17	2.86
	16	20	38.00	2.23	2.81

Çamaşır suyunun %50 oranında kullanıldığı denemelerde en yüksek tohum çimlenmesi oranına 15 dakikalık uygulama süresinde ulaşılmıştır. Benzer şekilde fide boyu ile kök boyunun ortalama en yüksek değerlerine de dezenfektanın 15 dakikalık süreyle uygulanmasında ulaşılmıştır. Çizelge 4.1 incelendiğinde %50 dozda uygulanan çamaşır suyunda en yüksek ortalama değerlere 15 dakikalık uygulama süresinde ulaşıldığı görülmektedir.

Dezenfektan olarak kullanılan çamaşır suyu miktarının %75 olarak alındığı denemelerde tohumların çimlenme oranının en yüksek tespit edildiği uygulama süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. Fide boyunun ortalama en yüksek değeri 10 dakika ve 15 dakikalık uygulama sürelerinde görülürken, kök boyunun ortalama en yüksek değerine yine 10 dakikalık uygulama süresinde ulaşıldığı tespit edilmiştir. %75 dozda uygulanan çamaşır suyunda en yüksek ortalama değerlere 10 dakikalık uygulama süresinde ulaşıldığı görülmektedir. Bunun yanında sterilizasyon süresinin 20 dakikaya uzatılması durumunda ise tüm faktörleri en kötü değerleri verdiği görülmektedir. Dolayısı ile %75 oranındaki çamaşır suyu kullanımında, denenmiş olan sürelerin elde edilen değerlerin yüksekliği ile ters orantılı olduğu kabul edilebilir.

Yapılan denemelerin tamamı genel olarak incelendiğinde, fide gelişiminin ortalama en yüksek değerine dezenfektanın %50 oranında ve 15 dakika süreyle uygulanmasında ulaşıldığı görülmektedir. Diğer bir ifade ile bu değerlerle gerçekleştirilen dezenfektasyona tabi tutulan tohumların fide gelişimlerinin diğer uygulama sürelerine oranla daha hızlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).

Araştırmada, tohumların yüzey sterilizasyonunda dezenfektan olarak kullanılan çamaşır suyunun miktarı ile uygulama süresinin, bu tohumlardan gelişen fidelerde ve dolayısı ile eksplantlarda canlılık ile rejenerasyon kapasiteleri belirgin etkileri olduğu görülmüştür (Allan 1991, Yıldız ve Er 2002). Dolayısı ile *in vitro* araştırmalarında dezenfektan miktarının en düşük ve uygulama süresinin en az olduğu değerlerle sterilizasyon işleminin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 4.2 *Helianthus annuus* L. %50'lik çamaşır suyu ile 15 dakika steril edilen tohumlarından *in vitro* şartlarda büyüyen fideler

4.1.2 Çeşit '64A14'

4.1.2.1 64A14 genotipi üzerine farklı büyüme düzenleyicilerin *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla 12 gün süreyle gelişen bitkiciklerden izole edilen kotiledon boğum, meristem, hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanılmıştır. Büyüme düzenleyiciler NAA kontrol için 0 mg/l, 0.50 mg/l, 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l) ve BAP (kontrol için 0 mg/l, 0.50 mg/l, 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l) içeren MS besiyerinde büyütülmüşlerdir. Sonuçlar çizelge 4.2-4.5'de görülmektedir.

Çizelge 4.2 64A14 genotipine ait kotiledon boğum eksplantı rejenerasyon değerleri

64A14	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
KOTİLEDON BOĞUM	0 BAP + 0 NAA	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 c	0 ± 0 b
	1 BAP + 0.5 NAA	20 ± 9.09 b	0.20 ± 0.08 b	0.7 ± 0.28 b	1 ± 0.44 b
	1 BAP + 1 NAA	32 ± 25.91 b	0.32 ± 0.29 b	0.5 ± 0.44 bc	1.6 ± 1.45 b
	1 BAP + 2 NAA	20 ± 12.56 b	0.20 ± 0.12 b	0.4 ± 0.26 bc	1 ± 0.63 b
	2 BAP + 1 NAA	72 ± 19.98 a	0.72 ± 0.24 a	1.38 ± 0.24 a	3.6 ± 1.23 a
	2 BAP + 2 NAA	12 ± 9.20 b	0.12 ± 0.06 b	0.5 ± 0.31 bc	0.6 ± 0.34 b

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

64A14 genotipinde kullanılan kotiledon boğum eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi çizelge 4.2’de görülmektedir. Genotipde kullanılan kotiledon boğum eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuçlar 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. Sırasıyla diğer yüksek sonuçlar 1mg/l BAP + 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA vermiştir. Kontrol olarak kullanılan 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA ortamında ise hiçbir sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan diğer bir eksplant olan meristem farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.3 64A14 genotipine ait meristem eksplantı rejenerasyon değerleri

64A14	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
MERİSTEM	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 1 NAA	4	0.04	0.1	0.2
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

64A14 genotipinde kullanılan meristem eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi çizelge 4.3’de görülmektedir. Genotipde kullanılan meristem eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuçlar 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, 1 BAP + 2 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA hormon kombinasyonlarından hiçbir sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan hipokotil eksplantı farklı BAP ve

NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.4’de görülmektedir.

Çizelge 4.4 64A14 genotipine ait hipokotil eksplantı rejenerasyon değerleri

64A14	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
HİPOKOTİL	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi hipokotil eksplantının kullanılarak, farklı hormon kombinasyonu deneneyen ayçiçeği 64A14 çeşidinden hiçbir sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan kotiledon eksplantı farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.5’te verilmiştir.

Çizelge 4.5 64A14 genotipine ait kotiledon eksplantı rejenerasyon değerleri

64A14	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
KOTİLEDON	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

64A14 genotipinde kullanılan kotiledon eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi çizelge 4.5’de görülmektedir. Çeşitte kullanılan kotiledon eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından, kullanılan tüm (1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA, 1 BAP + 2 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA) hormon kombinasyonlarından hiçbir sonuç alınamamıştır.

4.1.2.2 64A14 genotipi üzerine acı kavun meyve özsuyunun *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Acı kavun meyve özsuyunun farklı dozlarının (0 (kontrol), 200, 400, 800 ve 1600 µl/L) ayçiçeği 64A14 genotipinde kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları çizelge 4.6’de verilmiştir.

Çizelge 4.6 64A14 genotipinde acı kavun meyve özsuyunu rejenerasyona etkisi

64A14	ORTAM (µl/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
ACI KAVUN 2 BAP + 1 NAA	0	72 ± 19.98 a	0.72 ± 0.24 a	1.38 ± 0.24 bc	3.6 ± 1.23 a
	200	24 ± 14.50 b	0.24 ± 0.16 b	0.8 ± 0.47 c	1.2 ± 0.82 b
	400	52 ± 8.79 ab	0.52 ± 0.14 ab	1.5 ± 0.31 bc	2.6 ± 0.72 ab
	800	84 ± 7.51 a	0.84 ± 0.05 a	3 ± 0.38 a	4.2 ± 0.28 a
	1600	64 ± 14.60 a	0.64 ± 0.18 a	2.1 ± 0.34 b	3.2 ± 0.93 a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Ayçiçeği 64A14 genotipi *in vitro* kültüründe rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler sırasıyla %84, 0.84 adet, 3 cm ve 4 adet ile 800 µl/L acı kavun meyve özsuyunun kullanıldığı uygulamadan alınmıştır (Şekil 4.3). Acı kavun meyve özsuyunun kullanılmadığı kontrol uygulamasında ise rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı sırasıyla değerler sırasıyla %72, 0.72 adet, 1.38 cm ve 3.6 adettir.

Bitki büyütme hormonlarıyla eklenen acı kavun meyve özsuyu dozları arttıkça tüm karakterlerde değerler artmaktadır. En yüksek değer 800 µl/L acı kavun meyve özsuyunda görülmekte iken, kontrol ve 1600 µl/L acı kavun meyve özsuyu eklenen ortam 800 µl/L'den daha düşük bir sonuç göstermiştir.

Ayçiçeğinde 64A14 genotipinde denen tüm eksplant türü, kormon kombinasyonu ve acı kavun meyve özsuyu dozlarına bakılacak olursa en iyi sonucun kotiledon boğum eksplantının kullanıldığı, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuyu içeren ortamdan alındığı görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA + 800µl/l Acı Kavun mayves özsuyu içeren ortamda 64A14 genotipinin kotiledon boğum eksplantından geliştirilen sürgünler ve gelişen sürgünlerden bitki oluşumu

4.1.3 Genotip ‘64A71’

4.1.3.1 64A71 genotipi üzerine farklı büyüme düzenleyicilerin *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla 12 gün süreyle gelişen bitkiciklerden izole edilen kotiledon eksplantları kullanılmıştır. Büyüme düzenleyiciler NAA (kontrol için 0 mg/l, 0.50 mg/l, 1,0 mg/l ve 2,0 mg/l) ve BAP (kontrol için 0 mg/l, 0,50 mg/l, 1,0 mg/l ve 2,0 mg/l) içeren MS besiyerinde büyütülmüşlerdir. Sonuçlar çizelge 4.7-4.10’de görülmektedir.

Çizelge 4.7 64A71 çeşidine ait kotiledon boğum eksplantı rejenerasyon değerleri

64A71	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
KOTİLEDON BOĞUM	0 BAP + 0 NAA	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 c	0 ± 0 b
	1 BAP + 0.5 NAA	56 ± 16.63 ab	0.56 ± 0.20 ab	2.2 ± 0.82 a	2.8 ± 1.03 ab
	1 BAP + 1 NAA	76 ± 14.50 a	0.76 ± 0.16 a	2.1 ± 0.34 a	3.8 ± 0.82 a
	1 BAP + 2 NAA	60 ± 10.95 ab	0.60 ± 0.17 ab	1.6 ± 0.34 ab	3 ± 0.89 ab
	2 BAP + 1 NAA	56 ± 10.08 ab	0.56 ± 0.16 ab	1.3 ± 0.36 ab	2.8 ± 0.82 ab
	2 BAP + 2 NAA	32 ± 12.27 b	0.32 ± 0.14 bc	0.8 ± 0.36 bc	1.6 ± 0.72 bc

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir

64A71 genotipinde kullanılan kotiledon boğum eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi çizelge 4.7’de görülmektedir. Genotipde kullanılan kotiledon boğum eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuçlar 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. Sırasıyla diğer yüksek sonuçlar 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA vermiştir. Kontrol olarak kullanılan 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA ortamında ise hiçbir sonuç alınamamıştır (Şekil 4.4).

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan diğer bir eksplant olan meristem farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar

çizelge 4.8’de görülmektedir.

Çizelge 4.8 64A71 genotipine ait meristem eksplantı rejenerasyon değerleri

64A71	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
MERİSTEM	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	8	0.08	0.4	0.4
	1 BAP + 1 NAA	4	0.04	0.1	0.2
	1 BAP + 2 NAA	4	0.04	0.1	0.2
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

64A71 genotipinde kullanılan meristem eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi çizelge 4.8’de görülmektedir. Genotipde kullanılan meristem eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuçlar 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA hormon kombinasyonlarında aynı sonuçlar gözlenmekteyken, 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA hormon kombinasyonlarından sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan hipokotil eksplantı farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.9’de görülmektedir.

Çizelge 4.9 64A71 genotipine ait hipokotil eksplantı rejenerasyon değerleri

64A71	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
HIPOKOTİL	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.9’de görüldüğü gibi hipokotil eksplantının kullanılarak, farklı hormon kombinasyonu denenene ayçiçeği 64A71 genotipinden hiçbir sonuç alınamamıştır. Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan kotiledon eksplantı farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.10’da görülmektedir.

Çizelge 4.10 64A71 genotipine ait kotiledon eksplantı rejenerasyon değerleri

64A14	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
KOTİLEDON	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

64A71 genotipinde kullanılan kotiledon eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi Çizelge 4.9’de görülmektedir. Genotipde kullanılan kotiledon eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından, kullanılan tüm hormon kombinasyonlarından hiçbir sonuç alınamamıştır.



Şekil 4.4 Farklı rejenerasyon ortamlarında ayçiçeğinden oluşan kallus

4.1.3.2 64A71 genotipi üzerine acı kavun meyve özsuyunun *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Acı kavun meyve özsuyunun farklı dozlarının (0 (kontrol), 200, 400, 800 ve 1600 µl/L) ayçiçeği 64A71 genotipinde kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11 64A71 genotipinde acı kavun meyve özsuyunu rejenerasyona etkisi

64A71	ORTAM (µl/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
ACI KAVUN 1 BAP + 1 NAA	0	76 ± 14.50 a	0.76 ± 0.16 a	2.1 ± 0.34 a	3.8 ± 0.82 a
	200	96 ± 7.51a	0.96 ± 0.05 a	2.5 ± 0.22 a	4.8 ± 0.28 a
	400	96 ± 7.51a	0.96 ± 0.05 a	2.7 ± 2.7 a	4.8 ± 0.28 a
	800	36 ± 6.44b	0.36 ± 0.10 b	1.9 ± 0.26 b	1.8 ± 0.52 b
	1600	52 ± 8.79b	0.52 ± 0.14 b	2.5 ± 0.22 a	2.6 ± 0.72 b

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Ayçiçeği 64A71 genotipi *in vitro* kültüründe kurulan farklı acı kavun meyve özsuyu denemelerinde en yüksek sonucun 200 µl/L ve 400 µl/L’den elde edildiği çizelge 4.11’de görülmektedir. Acı kavun meyve özsuyunun kullanılmadığı kontrol uygulamasında ise rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı 200 ve 400 µl/L acı kavun meyve özsuyuiçeren ortamlardan düşük gözlemlenmiştir.

Ayçiçeğinde 64A71 genotipinde denen tüm eksplant türü, hormon kombinasyonu ve acı kavun meyve özsuyu dozlarına bakılacak olursa en iyi sonucun kotiledon boğum eksplantının kullanıldığı, 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 200 µl/L ve 400 µl/L acı kavun meyve özsuyu içeren ortamlardan alındığı görülmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800µl/l Acı Kavun mayves özsuğu içeren ortamda 64A71 genotipinin kotiledon boğum eksplantından geliştirilen sürgünler ve gelişen sürgünlerden bitki oluşumu

4.1.4 Genotip ‘Meriç’

4.1.4.1 Meriç genotipi üzerine farklı büyüme düzenleyicilerin *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla 12 gün süreyle gelişen bitkiciklerden izole edilen kotiledon boğum, meristem, hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanılmıştır. Büyüme düzenleyiciler NAA (kontrol için 0 mg/l, 0,50 mg/l, 1,0 mg/l ve 2,0 mg/l) ve BAP (kontrol için 0 mg/l, 0,50 mg/l, 1,0 mg/l ve 2,0 mg/l) içeren MS besiyerinde büyütölmüşlerdir. Sonuçlar çizelge 4.12-4.15’de görölmektedir.

Çizelge 4.12 Meriç genotipine ait kotiledon boğum eksplantı rejenerasyon değerleri

MERİÇ	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
KOTİLEDON BOĞUM	0 BAP + 0 NAA	0 ± 0 d	0 ± 0 c	0 ± 0 c	0 ± 0 c
	1 BAP + 0.5 NAA	28 ± 17.11 bc	0.28 ± 0.21 bc	0.8 ± 0.47 ab	1.4 ± 1.05 bc
	1 BAP + 1 NAA	4 ± 7.51 cd	0.04 ± 0.05 c	0.3 ± 0.42 bc	0.2 ± 0.28 c
	1 BAP + 2 NAA	48 ± 15.42 ab	0.48 ± 0.19 ab	1 ± 0.38 ab	2.4 ± 0.95 ab
	2 BAP + 1 NAA	68 ± 4.38 a	0.68 ± 0.06 a	1.4 ± 0.26 a	3.4 ± 0.34 a
	2 BAP + 2 NAA	36 ± 6.44 ab	0.36 ± 0.10 b	1 ± 0.22 ab	1.8 ± 0.52 b

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Meriç genotipinde kullanılan kotiledon boğum eksplantı ve farklı büyüme düzenleyicilerin etkisi çizelge 4.12’de görülmektedir. Genotipde kullanılan kotiledon boğum eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuçlar 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. Sırasıyla diğer yüksek sonuçları 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA hormon kombinasyonları vermiştir. Kontrol olarak kullanılan 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA ortamında ise hiçbir sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan diğer bir eksplant olan meristem farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.13’de görülmektedir.

Çizelge 4.13 Meriç genotipine ait meristem eksplantı rejenerasyon değerleri

MERİÇ	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
MERİSTEM	0 BAP + 0 NAA	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b
	1 BAP + 0.5 NAA	24 ± 11.35 a	0.24 ± 0.13 a	1 ± 0.38 a	1.2 ± 0.69 a
	1 BAP + 1 NAA	12 ± 11.74 ab	0.12 ± 0.11ab	0.50 ± 0.44 ab	0.6 ± 0.56 ab
	1 BAP + 2 NAA	8 ± 9.20 ab	0.08 ± 0.06ab	0.50 ± 0.44 ab	0.4 ± 0.34 ab
	2 BAP + 1 NAA	8 ± 9.20 ab	0.08 ± 0.06ab	0.50 ± 0.44 ab	0.4 ± 0.34 ab
	2 BAP + 2 NAA	8 ± 9.20 ab	0.08 ± 0.06ab	0.28 ± 0.27 ab	0.4 ± 0.34 ab

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Genotipde kullanılan meritem eksplantının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, en uzun sürgün uzunluğu ve petride gelişen sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuçlar sırasıyla 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA hormon kombinasyonlarında aynı sonuçlar gözlenmekteyken, 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA hormon kombinasyonundan hiçbir sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan hipokotil eksplantı farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.14’de görülmektedir.

Çizelge 4.14 Meriç genotipine ait hipokotil eksplantı rejenerasyon değerleri

MERİÇ	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
HİPOKOTİL	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	4	0.04	0.2	0.2
	1 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	4	0.04	0.2	0.2
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi hipokotil eksplantının kullanılarak, farklı hormon kombinasyonu deneneyen ayçiçeği Meriç genotipinden en yüksek sonuçlar 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren ortamlardan alınmıştır. 0 mg/l BAP + 0 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA hormon kombinasyonları içeren ortamlardan hiçbir sonuç alınamamıştır.

Sürgün rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan kotiledon eksplantı farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS besiyerinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar çizelge 4.15’de görülmektedir.

Çizelge 4.15 Meriç genotipine ait kotiledon eksplantı rejenerasyon değerleri

64A14	ORTAM (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
KOTİLEDON	0 BAP + 0 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 0.5 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	1 BAP + 2 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 1 NAA	0	0	0	0
	2 BAP + 2 NAA	0	0	0	0

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.15’de görüldüğü gibi kotiledon eksplantının kullanılarak, farklı hormon kombinasyonu denen en ayçiçeği Meriç çeşidinden hiçbir sonuç alınamamıştır.

4.1.4.2 Meriç genotipi üzerine acı kavun meyve özsuyunun *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Acı kavun meyve özsuyunun farklı dozlarının (0 (kontrol), 200, 400, 800 ve 1600 µl/L) ayçiçeği Meriç genotipinde kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16 Meriç genotipinde acı kavun meyve özsuyunu rejenerasyona etkisi

MERİÇ	ORTAM (µl/l)	Rejenerasyon (%)	Eksplant başına sürgün sayısı	En uzun sürgün uzunluğu (cm)	Petride gelişen toplam sürgün sayısı
ACI KAVUN 2 BAP + 1 NAA	0	68 ± 4.38 a	0.68 ± 0.06 a	1.40 ± 0.26 b	3.4 ± 0.34 a
	200	72 ± 15.21 a	0.72 ± 0.16 a	2.15 ± 0.30 a	3.6 ± 0.84 a
	400	72 ± 15.21 a	0.72 ± 0.16 a	2.20 ± 0.17 a	3.6 ± 0.84 a
	800	84 ± 14.44 a	0.84 ± 0.16 a	2.25 ± 0.35 a	4.2 ± 0.82 a
	1600	76 ± 17.58 a	0.76 ± 0.20 a	2.30 ± 0.17 a	3.8 ± 1.03 a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Ayçiçeği Meriç genotipi *in vitro* kültüründe kurulan farklı acı kavun meyve özsuyu denemelerinde en yüksek sonucun 800 µl/L’den elde edildiği görülmektedir. Acı kavun meyve özsuyunun kullanılmadığı kontrol uygulamasında ise rejenerasyon yüzdesi,

eksplant başına sürgün sayısı, eksplantta en uzun sürgün boyu ve petride gelişen toplam sürgün sayısı tüm acı kavun meyve özsuyu dozlarından düşük ölçülmüştür (Şekil 4.6).

Ayçiçeğinde Meriç genotipinde denen tüm eksplant türü, hormon kombinasyonu ve acı kavun meyve özsuyu dozlarına bakılacak olursa en iyi sonucun kotiledon boğum eksplantının kullanıldığı, 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuyu içeren ortamlardan alındığı görülmektedir.



Şekil 4.6 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA + 800µl/l Acı Kavun mayves özsuyu içeren ortamda Meriç genotipinin kotiledon boğum eksplantından geliştirilen sürgünler ve gelişen sürgünlerden bitki oluşumu

4.2 Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuynunun Ayçiçeğinde *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı Üzerine Etkisi

4.2.1 Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuynunun 64A14 ayçiçeği genotipinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi

64A14 ayçiçeği genotipinde kotiledon boğum eksplantı kullanılarak p35GUS-INT içeren *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 hattı 20 dakika süreyle inokülasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon sonrasında genotip için en iyi rejenerasyonu sağlayan 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 800 µl/l acı kavun meyve özsuynunu içeren ortamda 2 gün süreyle ko-kültüvasyona tabi tutulmuştur. Devamında 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 100 mg/l kanamisin mono sülfat, 500 mg/l Duocid ve 800 µl/l acı kavun meyve özsuynunu içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür sonrası transgenik sürgünler köklendirilerek toprağa aktarılmış olup, aday transgenik sürgünler PCR ile analiz edilerek transgenik bitkiler teyit edilmiştir. Sonuçlar çizelge 4.17’de görülmektedir.

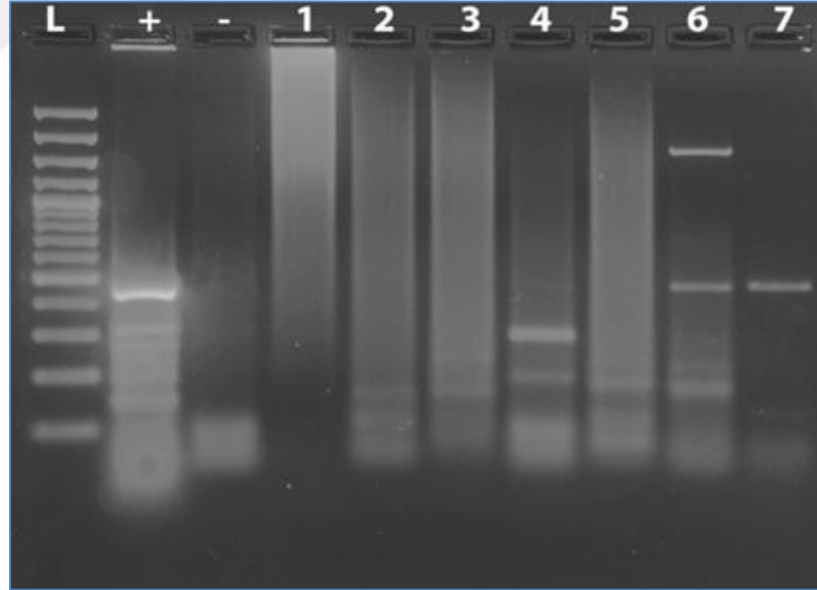
Çizelge 4.17 Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuynunun 64A14 ayçiçeği genotipinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi

İnoküle Edilen Eksplant Sayısı	Transgenik Sürgün Veren Eksplant Sayısı	Toplam Gelişen Sürgün Sayısı	Toprağa Aktarılan Bitki Sayısı	Toprakta Yaşayan Bitki Sayısı	PCR Pozitif Bitki Sayısı	CHV Negatif Bitki Sayısı	Transgenik Sürgün Sayısı ve Yüzdesi
100	65	7	7	7	2	2	2 - %2

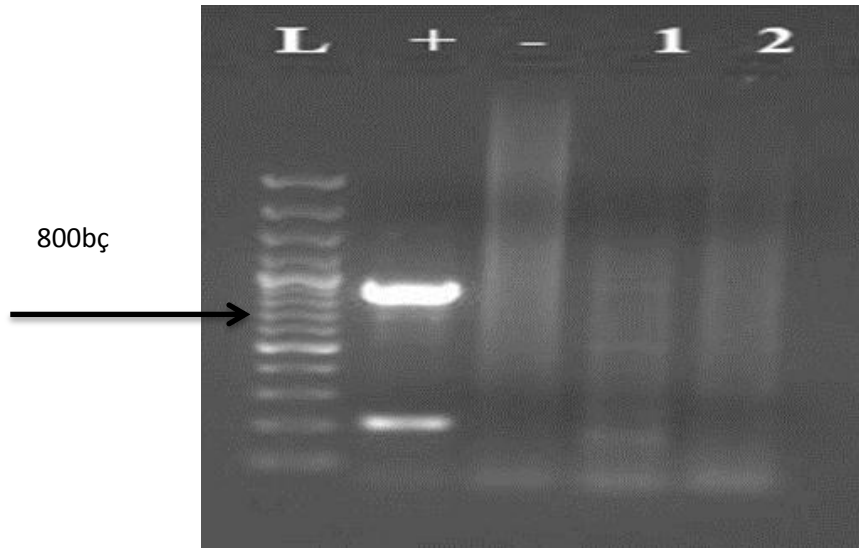
64A14 ayçiçeği genotipinde 100 adet kotiledon boğum eksplantı inokülasyona tabi tutulmuş, 65 tanesinde transgenik sürgün elde edilmiştir. Transgenik sürgün veren 65 eksplanttan 7 adet transgenik sürgün elde edilmiş, gelişen sürgünler toprağa aktarılmıştır. Toprakta gelişen 7 adet bitkiden 2 tanesi aday transgenik olarak tespit edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun tespitine yönelik yapılan *chv* PCR’ı sonucu 2 adet transgenik bitki elde edilmiştir (Şekil 4.7- 4.9)



Şekil 4.7 64A14 ayçiçeği genotipine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı



Şekil 4.8 64A14 ayçiçeği genotipine ait *npt II* geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu



Şekil 4.9 64A14 ayçiçeği genotipine ait *chv* geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu

4.2.2 Acıkavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun 64A71 ayçiçeği genotipinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi

64A71 ayçiçeği genotipinde kotiledon boğum eksplantı kullanılarak p35GUS-INT içeren *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 hattı 20 dakika süreyle inokülasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon sonrasında genotip için en iyi rejenerasyonu sağlayan 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 400 µl/l acı kavun meyve özsuyu içeren ortamda 2 gün süreyle ko-kültüvasyona tabi tutulmuştur. Devamında 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 100 mg/l kanamisin mono sülfat, 500 mg/l Duocid ve 400 µl/l acı kavun meyve özsuyu içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. İnoküle edilen eksplnatlardan gelişen sürgünler klorofil kaybı gözlenmiş ve transgenik bitki elde edilememiştir. Sonuçlar çizelge 4.18’de görülmektedir.

Çizelge 4.18 Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun 64A71 ayçiçeği genotipinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi

İnoküle Edilen Eksplant Sayısı	Transgenik Sürgün Veren Eksplant Sayısı	Toplam Gelişen Sürgün Sayısı	Toprağa Aktarılan Bitki Sayısı	Toprakta Yaşayan Bitki Sayısı	PCR Pozitif Bitki Sayısı	CHV Negatif Bitki Sayısı	Transgenik Sürgün Sayısı ve Yüzdesi
100	83	0	0	0	0	0	0-%0

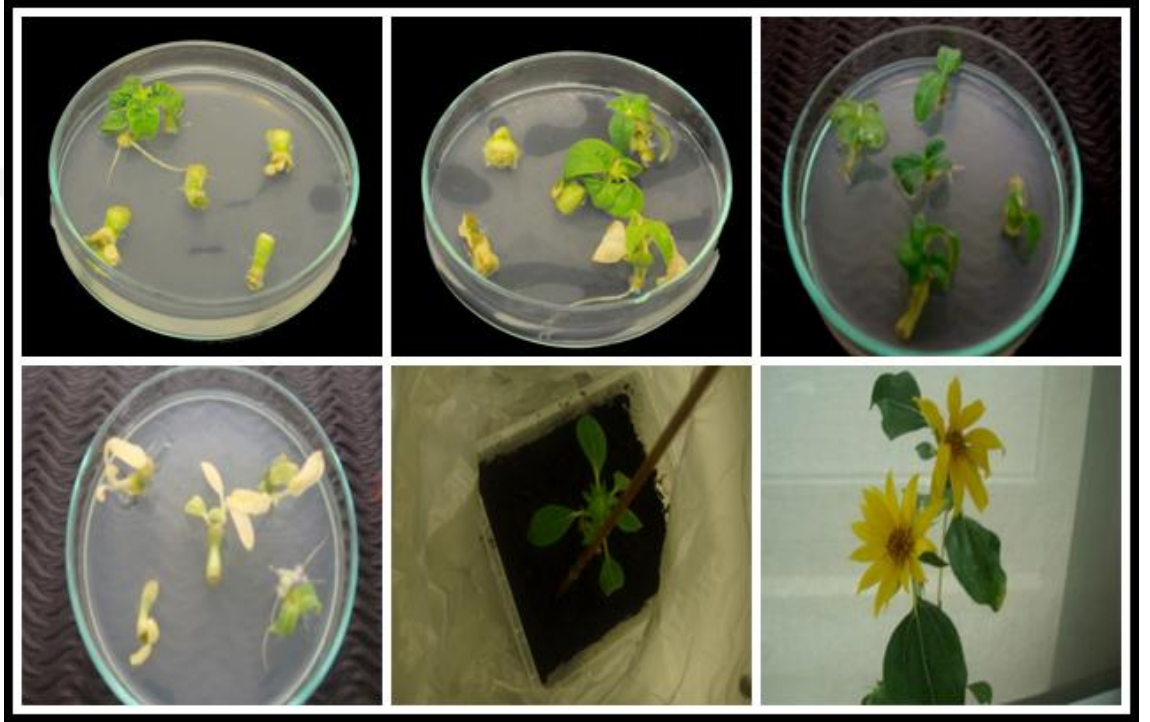
4.2.3 Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun Meriç ayçiçeği genotipinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi

Meriç ayçiçeği genotipinde kotiledon boğum eksplantı kullanılarak p35GUS-INT içeren *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 hattı 20 dakika süreyle inokülasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon sonrasında genotip için en iyi rejenerasyonu sağlayan 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/l acı kavun meyve özsuyu içeren ortamda 2 gün süreyle ko-kültüvasyona tabi tutulmuştur. Devamında 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, 100 mg/l kanamisin mono sülfat, 500 mg/l Duocid ve 800 µl/l acı kavun meyve özsuyu içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür sonrası transgenik sürgünler köklendirilerek toprağa aktarılmış olup, aday transgenik sürgünler PCR ile analiz edilerek transgenik bitkiler teyit edilmiştir. Sonuçlar çizelge 4.19’da görülmektedir.

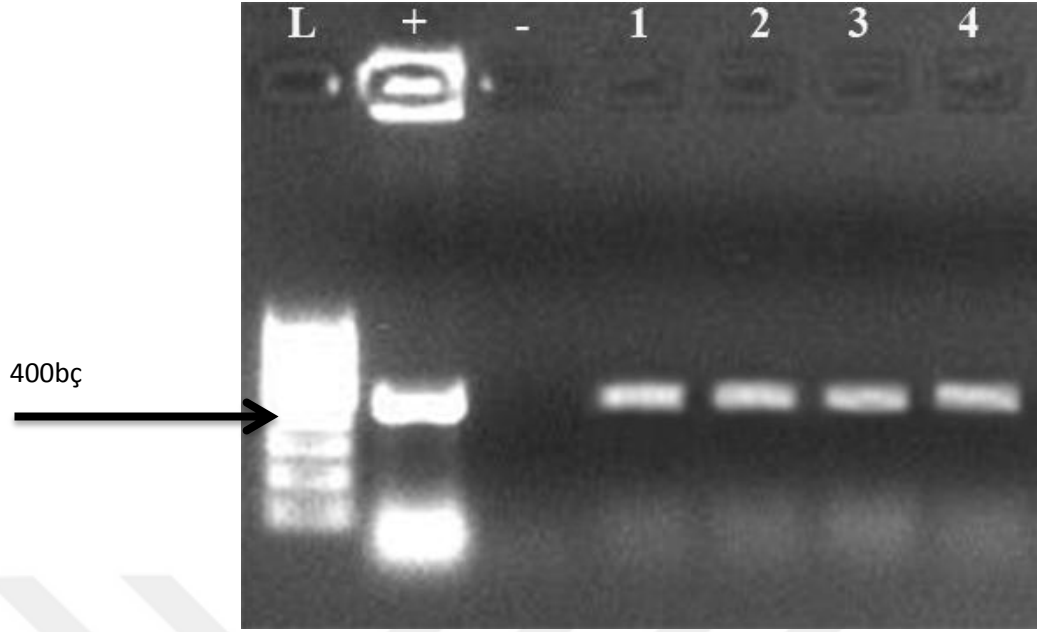
Çizelge 4.19 Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun Meriç ayçiçeği genotipinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi

İnoküle Edilen Eksplant Sayısı	Transgenik Sürgün Veren Eksplant Sayısı	Toplam Gelişen Sürgün Sayısı	Toprağa Aktarılan Bitki Sayısı	Toprakta Yaşayan Bitki Sayısı	PCR Pozitif Bitki Sayısı	CHV Negatif Bitki Sayısı	Transgenik Sürgün Sayısı ve Yüzdesi
100	76	16	16	5	4	4	4 - %4

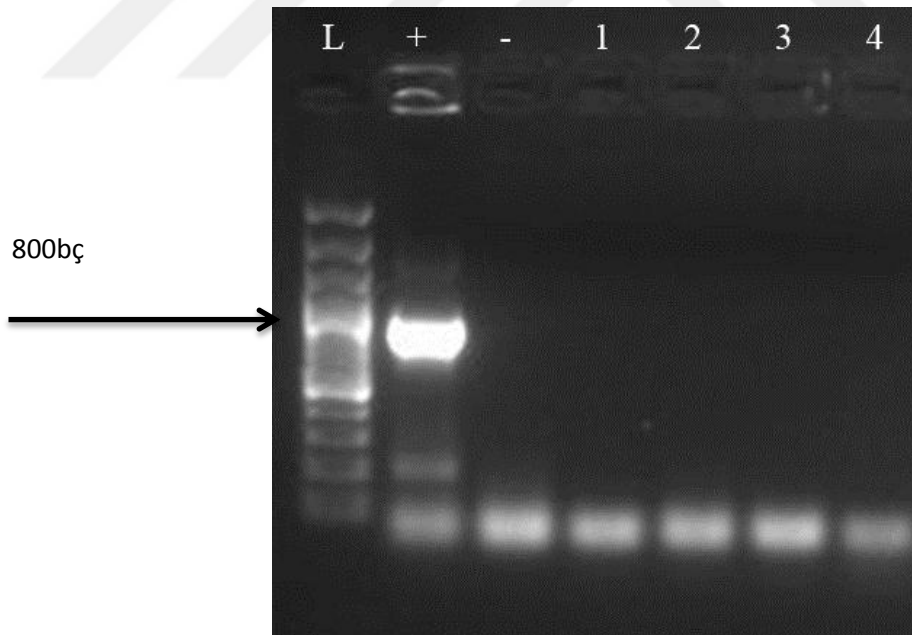
Meriç ayçiçeği genotipinde 100 adet kotiledon boğum eksplantı inokülasyona tabi tutulmuş, 76 tanesinde transgenik sürgün elde edilmiştir. Transgenik sürgün veren 76 eksplanttan 16 adet transgenik sürgün elde edilmiş, gelişen sürgünler toprağa aktarılmıştır. Toprakta gelişen 5 adet bitkiden 4 tanesi aday transgenik olarak tespit edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* kontaminasyonunun tespitine yönelik yapılan *chv* PCR'ı sonucu 4 adet transgenik bitki elde edilmiştir (Şekil 4.10-4.12)



Şekil 4.10 Meriç ayçiçeği genotipine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı



Şekil 4.11 Meriç ayçiçeği genotipine ait *npt II* geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu



Şekil 4.12 Meriç ayçiçeği genotipine ait *chv* geninin varlığına yönelik olan PCR sonucu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki doku kültürü çalışmalarında hem yeşil materyal hem de tohum sterilizasyonu *in vitro* rejenerasyonun sağlanması için çok önemlidir. Kullanılan dezenfektanların yoğunluğu, uygulama süresi ve kimyasalın sıcaklığı gibi etkenler, materyalin sterilizasyonun sağlanması için ölçülmesi gerekli olan parametrelerdir. Dolayısı ile sterilizasyon uygulamalarında öncelikle, kullanılabilecek dezenfektan türü için en düşük miktarda ve en etkili dozun belirlenmesi gerekmektedir (Bhatti 2001). Yüzeysel sterilizasyonda sıklıkla kullanılan dezenfektanlar arasında biositler, civa, gümüş nitrat, hidrojen peroksit, antibiyotikler, sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu) bulunmaktadır (Özcan ve Özgen 1996). Kullanılan ayçiçeği tohumlarının sterilizasyonu için öncelikle kullanılacak olan ticari çamaşır suyunun yüzdesini belirlemek amacıyla denemeler kurulmuş sonuç olarak %50 ticari çamaşır suyunun 15 dakika süreyle uygulandığında en yüksek canlılık değerlerinin alındığı tespit edilmiştir. Araştırmada, tohumların yüzey sterilizasyonunda dezenfektan olarak kullanılan çamaşır suyunun miktarı ile uygulama süresinin, tohumlardan gelişen fidelerde ve dolayısı ile eksplantlarda canlılık ile rejenerasyon kapasiteleri belirgin etkileri olduğu görülmüştür (Allan 1991, Yıldız ve Er 2002).

Çalışmada kullanılan ‘64A14’, ‘64A71’ ve ‘Meriç’ genotiplerinin farklı hormon kombinasyonlarında ve farklı eksplant türlerinde, en yüksek *in vitro* sürgün rejenerasyon değerleri alınmaya çalışılmıştır. ‘64A14’ ayçiçeği genotipinde denenen tüm hormon kombinasyonları içerisinde 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuğu içeren rejenerasyon ortamında kullanılan kotiledon boğum eksplantının, %84’lük bir rejenerasyon yüzdesi ile en yüksek sonucu verdiği tespit edilmiştir. Gen aktarım çalışmalarında ‘64A14’ ayçiçeği genotipi için 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuğu içeren rejenerasyon ortamı ve kotiledon boğum eksplantının kullanılmasına karar verilmiştir.

‘64A71’ ayçiçeği genotipinde denenen tüm hormon kombinasyonları içerisinde 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuğu içeren rejenerasyon ortmında kullanılan kotiledon boğum eksplantının, %96’lık bir rejenerasyon yüzdesi ile en yüksek sonucu verdiği tespit edilmiştir. Gen aktarım çalışmalarında ‘64A71’ ayçiçeği genotipi için 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 400 µl/L acı kavun meyve özsuğu içeren rejenerasyon ortamı ve kotiledon boğum eksplantının kullanılmasına karar verilmiştir.

‘Meriç’ ayçiçeği genotipinde denenen tüm hormon kombinasyonları içerisinde 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuğu içeren rejenerasyon ortmında kullanılan kotiledon boğum eksplantının, %84’lük bir rejenerasyon yüzdesi ile en yüksek sonucu verdiği tespit edilmiştir. Gen aktarım çalışmalarında ‘Meriç’ ayçiçeği genotipi için 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA ve 800 µl/L acı kavun meyve özsuğu içeren rejenerasyon ortamı ve kotiledon boğum eksplantının kullanılmasına karar verilmiştir.

Ayçiçeği bitkisinin *in vitro* rejenerasyonunu sağlamak amacıyla yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Gürel ve Kazan (1998), ayçiçeğinde (*Helianthus annuus L.*) etkin bir bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesini amaçlamışlardır. Ayçiçeği hücre veya dokularından etkin bir bitki rejenerasyon sistemi geliştirmek amacıyla, farklı eksplant tipleri ve hormon kombinasyonlarının kullanıldığı değişik rejenerasyon protokollerini karşılaştırmışlardır. Özellikle alt (bazal) kısımlardan olmak üzere, kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenesis elde etmişler, fakat genotipik varyasyonun hem somatik embriyo hem de kök üretimi için en kritik faktör olduğu gözlemlemişlerdir. Sürgün-ucu eksplantlarından sürgün üretimi bakımından 10 farklı ayçiçeği çeşidini karşılaştırdıklarında, söz konusu varyasyonun çok daha belirgin olarak ortaya çıktığını görmüşlerdir. Somatik embriyo üretimini arttırmak amacıyla kültür şartlarının geliştirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada, bitki gelişimi *in vitro* kültür şartlarında daha çabuk gerçekleştirilmiş olup, embriyo kültür yöntemiyle kök, gövde ve yaprak oluşumu sağlanmıştır.

Chraibi vd. (1992), Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)' nin kotiledon eksplantlarından rejenerasyonu ve hızlı çoğaltım araştırılmıştır. Yüksek frekansta sürgün organogenesisini içeren rejenerasyon, ayçiçeğinin 30 genotipinde olgun kotiledon dokularından belirlenmiştir. 3 gün sıvı MS ortamında kotiledon eksplantları inkübasyon bırakılmış sonra, aynı besiyerinde alt kültüre alınmıştır. 28 gün sonra sürgünler kök oluşumu için ortama aktarılmıştır. Köklenen bitkilerin dış koşulların da başarıyla aktarılmasıyla fertil bitki oluşumunun görüldüğü ve sürgün gelişiminin etilenle arttığı tanımlanmıştır.

Nestares vd. (2002), Ayçiçek bitkisi türlerinden alınan kotiledon boğum eksplantlarının *in vitro* koşullarda kültüre alınması denemelerinde, kullanılan MS medyumunun bitki gelişimini etkilediği ortaya konmuştur. Ayçiçeğinin *in vitro* koşullarda bitki oluşturma kabiliyetini konu alan bir araştırmada, 20 değişik bölgeden alınan kotiledonun MS medyumunda kültüre alınması denenmiştir. 4 haftalık kültürleme sonunda bitki oluşumları gözlenmiş olup, MS medyumunun araştırmada denenilen her türde etkili olduğu belirtilmiştir. MS medyumunun aynı zamanda rejenerasyon kapasitesinde etkili olduğu da araştırmada ortaya konmuştur. Bulmuş olduğumuz sonuçlar daha önce yapılmış olan bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Greco vd. (1985) Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) kallus gerçekleştiği ve sürgün rejenerasyonunun çalışmalarda, ayçiçeği yaprağı ve kotiledon parçaları, meristem ve hipokotil kesimleri çeşitli dozlarda oksin 2,4-D veya sitokin 6- BAP içine alan MS ortamında geliştirilmiştir. Hormonal davranışı gösterilmiştir.6-BAP nin bağlı olarak farklılıkların olabildiği gösterilmiştir. Eksplant tipi ve eksplantlardan kallus oluşumunda etkili olduğu ve 2,4 D de 'yavaş ilerleme belirtilmektedir.6 -BAP sağlayarak çok kallus gelişimi ile, *in vitro* olarak sürgün meydana gösterilmiştir. Araştırmamız ayçiçeğin sürgün rejenerasyonunda acı kavun meyve öz suyu ve BAP ile NAA daha etkili olduğunu göstermektedir.

Tüm genotiplerde normal hormon kombinasyonlarının yanında kullanılan farklı dozlarda acı kavun meyve özsuyunun ayçiçeği genotiplerinin sürgün rejenerasyonlarını önemli derecede artırdığı görülmektedir. Gen aktarımında acı kavun meyve özsuyunun transgenik sürgün sayısını artırmak amacıyla yapılmış olan bu çalışmada ayçiçek bitkisinin rejenerasyon ve gen aktarımı üzerinde etkisini araştırmak amacıyla acı kavun meyve özsuyu bitki besin, bakteri büyütme ve inokülasyon ortamlarına konulmuştur. Adwan vd. (2011), Oskay ve Sarı (2007), ve Koca vd. (2010), yapmış oldukları çalışmalarda acı kavun bitkisinden etanol ekstraksiyonu ile elde edilmiş özütün bazı bakterilerinin gelişimleri üzerine etkilerini araştırmışlar, acı kavun ekstraktının bakteri gelişimini önemli oranda engellediği ve antimikrobiyal etkisinin olduğu bildirilmişlerdir. Fakat, Amil ve Pala (2009) yapmış oldukları bir çalışmada bakteri besin ortamlarına farklı oranlarda acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) olgun meyve özsuyu katarak bakteri gelişimini incelemişlerdir. Bu çalışmada bakteri besin ortamında acı kavun meyve özsuyunun artışıyla birlikte *Klebsiella sp*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakteri türlerinin üremesinde de önemli artış oluşumu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda bizim kullanmış olduğumuz 0 (kontrol), 200, 400, 800 ve 1600 µl/L acı kavun meyve özsuyu dozları bitki besin ortamlarına koyularak denenmiştir. Oramlara koyulan acı kavun meyve özsuyunun ölçülen tüm karakterlerde önemli derecede artış sağladığı tesbit edilmiştir. Özcan vd. (2015) yapmış olduğu araştırmada farklı dozlarda acı kavun meyve özsuyunun bütün bitkisinde rejenerasyon yüzdesini artırdığını bildirmiştir. Bulmuş olduğumuz sonuçlar daha önce yapılmış olan bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

‘64A14’, ‘64A71’ ve ‘Meriç’ ayçiçeği genotiplerine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarım çalışmalarında ‘64A14’ ve ‘Meriç’ genotiplerine başarılı bir şekilde gen aktarımı yapılmıştır. ‘64A71’ ayçiçeği genotipine yapılan gen aktarımı çalışmasından sonuç alınamamıştır. Yapmış olduğumuz çalışmalarda *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımının önemli ölçüde gen aktarımı yapılacak olan bitki genotipine bağlı olduğunu göstermektedir. Gürel ve Kazan (1998) yapmış oldukları çalışmada 10 ayçiçek genotipinin, raportör bir gen olan GUS’un ekspresyonuna dayanan *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi aracılığıyla gen aktarımına uygunluğu incelenmiştir. Sürgün-ucu eksplantı, bakteri suşu/binary ikili

vektör kombinasyonu bölünmemiş sürgün ucu eksplantının partikül bombardımanı ile yaralanması ve etkenler göz önüne alındığında, genotipler, % GUS pozitif bitki parça oranının ortalama değeri %0.0 ile % 82.7 arasında bulunmuş, önemli farklılıklar olduğu görülmüştür. Inbred hatlarına göre hibrid genotipleri, *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı çok duyarlı olduğu bulunmuştur. Bölünmemiş (intact) eksplantlara göre ayrılmış sürgün ucu bitki parçalarının kullanımı AGL-1 / pKIWI suş/vektör kombinasyon sağlamışlar transformasyon veriminde bir artış, bir arada daha LBA4404 / ptok233 daha etkili olduğu bulunmuşlardır. Kullanılan eksplantların, önce *Agrobacterium* bakterilerle aşılama dan yaralanması partikül bombardımanı transformasyonu pozitif bir etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucu elde edilen bu çalışma ile çalışmamız temelde benzer görünmesine rağmen, önemli derecede farklılıklar göstermektedir. Çalışmalar kıyaslandığında çalışmamız sonucu elde edilen transgenik bitkiler, yapmış olduğumuz çalışmanın başarılı olduğunu göstermektedir.

Özcan vd. (2012) yapmış oldukları araştırmada, acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun tütün bitkisinde gen aktarım frekansını önemli derecede artırdığını bildirmiştir. Çalışmamızda yapmış olduğumuz, gen aktarımı sonucunda *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımının ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde başarılı olduğu ve acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun hem rejenerasyon hemde gen aktarım frekansını artırdığı benzer şekilde görülmektedir.

Sonuç olarak aşağıdaki öneriler uygun görülmüştür;

1. Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon çimlenmeyi doğrudan etkilemekte ve oldukça önemli olmaktadır. Ticari çamaşır suyu sterilizasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda Ay çiçeği genotipleri için 15 dk % 50 çamaşır suyu ile sterilizasyon sağlanmıştır.
2. Başlangıç. denemelerinde sürgün rejenerasyonu için kullanılan eksplantlar dan: hipokotil ve kotiledon tüm ortamlarda çok yüksek oranda kallus sağlanmıştır.
3. Tez kapsamında kullanılan eksplantlardan kotiledon boğum. meristem. hipokotil ve kotiledon eksplantlarından yüksek oranda sürgün rejenerasyonu kotiledon boğum dan

elde edilmiştir. Sadece kotiledon boğum plasmid içeren *A. grobakteruim tumefaciens* hatıyla gen aktarım çalışmalarında transgenik bitki elde etmek için uygun bulunmuştur.

4. Çalışma sonucunda optimize edilen sürgün rejenerasyonu ve gen aktarım sisteminin sonuç olarak, ayçiçeğinde klasik ıslah metotlarında, biyoteknolojinin tüm yöntemlerini tam anlamıyla kullanmak bugün için henüz erken olmasına rağmen, gelecekteki ıslah çalışmalarında biyoteknolojinin en önemli araç olacağı açıkça görülmektedir.

5. Aynı zamanda bu tez kapsamında elde edilmiş, sonuçlara dayanarak transgenik ay çiçek bitkilerinin hızlı ve yoğun üretimine ve bu konu ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara yardımcı olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. Elde edilen transgenik ve transgenik olmayan sürgünler kolayca 400 veya 800 µl/l Acı kavun (genotipe göre) içeren ortamda köklendirilmiştir. Köklendirilmiş, bitkilerin iklim odasında veya serada adaptasyonu sağlanmıştır. İklim odasında GUS gen taşıyan transgenik aday bitkiler başarıyla 3 aya kadar geliştirilmiş, ve çiçeklenerek tohum bağlamışlardır.

KAYNAKLAR

- Adwan G., Salameh Y. and Adwan K. 2011. Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 456-460.
- Amil R. ve Pala M. 2009. *Ecballium elaterium* (Acı Kavun)'un özsuyunun insan lenfosit hücreleri ve bakteri gelişimi üzerine etkisi. Tübitak Liselerarası Proje Yarışması.
- Anonymous. 2016. <http://upload.wikipedia.org> Erişim Tarihi: 12.09.2016 .
- Allard, R. W. 1999. History of plant production genetics. Annu. Rev. Genetic. 33:1-27
- Allan, A. 1991. In: *Plant Cell Culture*; Stafford, A.; Warren, G., Eds.; Open University Press, Milton Keynes, 1-24.
- Arda, H. 2004. "In vitro Regeneration and Callus Formation of Different Hybrid of the (Sunflower) *Helianthus annuus* L. Yielding in Turkish Trakya Region" Asian Journal of Plant Sciences, 3(6):747-751.
- Arda, H., Dayan, S. and Akpınar, G. 2012. Düşük Sicaklıkta Muhafaza Edilmiş in vitro Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Bitkilerinde Anatomik ve Karyolojik İncelemeler. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 1(2).
- Aycan, M. 2015. Acı kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) meyve özsuyunun ketende (*Linum usitatissimum* L.) sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımına etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 74, Ankara.
- Barbara, R. 2005, "Tissue culture for germplasm conservation and distribution" Hortscience, 40:981.
- Bajrović, K. 2002. Bitkilere gen aktarımı. Bilim ve Teknik Dergisi, Mayıs;14
- Baytop, T. 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi yayını no: 3255, İstanbul
- Betz, F. Hammond, B. and Fuchs, R. 2000 . Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 156-173.
- Bhatti, K.M.K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris Medik.*)'te Doku Kültürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, YÖK Tez No: 120164, 147. Ankara.
- Birsin, M., Önde, S. and Özgen, M. 2001, "Callus Induction and Regeneration from Mature Embryos of Oat (*Avena sativa* L.)" Turkish Journal of Biological, 25:427-434.

- Bürün, B. and Poyrazoğlu, E. 2002, "Embryo Culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.)" Turkish Journal of Biological, 26:175-180
- Charriere, F. and Hahne, G. 1998, "Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators" Plant Science, 137:63-71.
- Charriere, F., Sotta, B., Miginiac, E. and Hahne, G. 1999, "Induction of adventitious shoots or somatic embryos on in vitro cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels" Plant Physiol. Biochem., 37(10):751-757.
- Chraïbi, K.M.B. Castelle, J-C. Latche, A. Roustan, J-P. and Fallot, J. 1992b. Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Rep., 10:617-620.
- Çağlayan, K., Özavci, A. ve Eskalen, A. 1998, "Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak İn Vitro Koşullarda Çoğaltılmaları" Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22:187-191.
- Çırakoğlu, B. 2005. Gen Teknolojisi: Bugün ve Yarın. I. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi 04-07 Ocak 2005 İstanbul
- Davey, M. and Anthony, P. 2010. Plant Cell Culture Essential Methods, 319-324. Wiley-Blackwell.
- Duke, J.A. 1983, "*Helianthus annuus* L." Handbook of Energy Crops.
- Eken, H. 2004, "Ayçiçeği" Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, T.E.A.E.– Bakış, Nüsha:11, Sayı:5.
- Erdağ, B. and Yürekli, K. 2000, "Thymus sipyleus Boiss. (Lamiaceae)'un İn Vitro Çoğaltılması" Turkish Journal of Biological, 24:Ek sayı81-86.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksiz, C., Sancak, C. ve Arslan, O. 2005, "Burçak (*Vicia ervilia* L.) Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltım" Tarım Bilimleri Dergisi, 11(1) 60-64.
- Ergül, M. 1989. "Hayvansal Üretim ve Çevre Kirliliği", Çiftçi ve Köy Dünyası Dergisi, Cilt:5, Sayı: 57, Eylül.
- Ekici, M., Satılmış, A., Ay, Y. D., Dülger, B. and Malyer, H. 1998. Ecballium elaterium (L.) meyvelerinin sinüzite karşı kullanımı. Ekoloji çevre dergisi. Cilt 7 sayı 27 sf 24-25
- FreyssiNet, M. and Freyssinet, G. 1988, "Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos, France. 177-181.

- Goldy, R.G., Ramming, D.W., Emershad, R. L., and Chaparro, J.X. 1989, "Increasing production of *V. vinifera* × *V. rotundifolia* hybrids through embryo rescue" *Hortscience*, 24 (5):820-822.
- Goleniowski, M.E., Flamarique, C. and Bima, P. 2003, "Micropropagation of Oregano (*Origanum vulgare* × *Applii*) from Meristem Tips" *In vitro Cellular and Development Biology- Plant*, Cabi Publishing, 39(2):125-128.
- Gomes, G.A.C., Paiva, R., Duarte De Oliverira Paiva, P., Jose Artiaga de Santiago, E. and 2003. "Plant Regeneration from Callus Cultures of *Maclura tinctoria*, an Endangered Woody Species" *In vitro Cellular and Development Biology- Plant*, Cabi Publishing, 39(3):293-295.
- Greco, B., Tanzarella, O.A., Carrozzo, G. and Blanco, A. 1985, "Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Breeding Institute, Italy. 36:73-77.
- Gu, D.F., Wu, X.K. and Zhang, W.Q. 1990, "Factors effecting callus induction and plantlet regeneration in *in vitro* culture of immature barley embryos" *Journal of Jilin Agricultural University*, 12 (2):1-6.
- Gustavo, A., Gonzalez, C.J., Vazquez P.R. and Ayra, P.C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: Antural tool for plant transformation. *Plant Biotechnol*, 1:0717-3458.
- Gürel, E. and Kazan, K. 1998, "Development of an Efficient Plant Regeneration System in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Turkish Journal of Botany*, 22:381-387.
- Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungber. Maht. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien*, 111:69-92
- Haliloğlu, K. 2002, "Wheat Immature Embryo Culture for Embryogenic Callus Induction" *Online Journal of Biological Sciences*, 2(8):520-521.
- Koca, U., Özçelik, B. and Özgen, S. 2010. Comparative *in vitro* activity of medicinal plants *Arnebia densiflora* and *Ecballium elaterium* against isolated strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Turkish J. Pharm. Sci.* 7, 197-204.
- Leesmans, J., Langenakkens, J., De Greve, H., Deblaere, R. and Vanloy, J.B. 1990. Hull-less seeded pumpkins: a new edible snackseed crop, In:JanickAnd J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Pres, Portland, OR:403-407.
- Li, W., Masilamany, P., Kasha, K.J. and Pauls, K. 2002, "Factors Affecting Plant Regeneration from Shoot Apical Meristems of Germinated *Zea mays* L. Seedlings" *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*, Cabi Publishing, 38(3):285-292.
- Mamun, M.A., Sikdar, M.B.H., Paul, D.K., Rahman, M.M. and Islam, M.R. 2004, "*In vitro* Micropropagation of Some Important Sugarcane Varieties of Bangladesh" *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(6):666-669.

- Mirzai, F., Uliaie, E.D. and Hagh, A.B. (2015). Ayçiçeği (*Helianthus annuus L.*)'nin in vitro Organogenezi Üzerine Etilen İnhibitörleri Olarak AgNO₃ ve CoCl₂'nin Uyarıcı Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(2), 113-118.
- Mohan, M., Nair, S. Bhagwat, A. Krishna, T.G. Yano, M. Bhatia, C.R. and Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-103.
- Mondal, T.K., Bhattacharya, A., Sood, A. and Ahuja, P.S. 2002, "Propagation of tea (*Camellia sinensis (L.) O. Kuntze*) by shoot proliferation of alginate-encapsulated axillary buds stored at 4°C" *Current Science*, 83(8):941-944.
- Myers, A., 2004, "Somatic Embryogenesis Induction in *Delonix regia* (Boger.) Raf (Royal Poinciana)" *Journal of Undergraduate Research*, 5-6 .
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagip, A., Hossain, S.A., Alam, M.F., Hossain, M.M., Islam, R. and Sultane, R.S. 2003, "Virus Free Potato Tuber Sees Production Trough Meristem Culture In Tropical Asia" *Asian Journal of Plant Sciences*, 2(8): 616-622.
- Natalini, L. and Cavallini, A. 1987, "Regeneration of pea (*Pisum sativum L.*) plantlets by *in vitro* culture of immature embryos" *Plant Breed*, 99: 172-176.
- Nestares ,G., Zorzoli, R., Mroginski, L. and Picardi, L. 2002, "Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower" *Plant Breeding*, 121:366-368.
- Oskay, M. ve Sarı, D. 2007. Antimicrobial screenig of some Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 45, 176-181
- Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Özden, Y., Akdemir, H., Süzer, V., Çalar, N., binici, M., Akdemir, Ö.F. ve Kılınç, F.M. 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi. Cilt 1 Sayı 2. 11-28
- Özcan, S.ve Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi*, 1, 69–95.
- Özcan, S. 2009. Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: Genetiği değiştirilmiş (trasngenik) mısırın tarımsal üretime katkısı. *Derleme dergisi* 2(2):01-34.
- Özcan F. 2012. Tıbbi bitki acı kavun (*Ecballium elaterium (L.) A. Rich.*) Özütünün *Agrobacterium tumefaciens* ile farklı bitki türlerine gen aktarımı üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Özcan, S.F., Yıldız M. ,Ahmed, H.A. and Aasım, M. (2015). Effects of squirting cucumber (*Ecballium elaterium*) fruit juice on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of plants. *Turkish Journal of Biology*, 39: 790-799 .

- Özgen, M., Altınok, S., Özcan, S., Sevimay, C.S. and Cafer, S. 1997, “*In vitro* micropropagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars Turkish Journal Of Botany, 21: 275–278.
- Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı, G., Yıldız M., Birsin, M., Ulukan, H., Emiroğlu, H., Koyuncu, N. ve Sancak, C. 2005. Tarım Teknolojilerinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar: Bitki Biyoteknolojisi, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Ankara; 315-346.
- Özgen, M. ve Türet, M. 1995. Bitki Islahı ve Gen Aktarma Teknolojisi. Workshop “Biyoteknoloji ve Bitki Islahı”. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, Bildiriler, 227-236
- Pirinç, V., Onay, A., Yildirim, H., Adiyaman, F., Işıkan, Ç. and Başaran, D. 2003, “Aventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid Diyarbakır Watermelon (*Citrullus lanatus* cv. *Sürme*)” Turkish Journal of Biology, 27:101-105.
- Prasertsongsun, S. 2003, “Plant regeneration from callus cultured of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash)” Songklanakarin Journal of Science Technology, 25(5):637-642.
- Rahman, M. M., Amin, M.N., Ahamed, T., Ali, M. R. and HabiB, A. 2004, “Efficient Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis from Leaf Base-derived Callus of *Kaempferia galanga* L.” Asian Journal of Plant Sciences, 3 (6):675-678.
- Redenbaugh K, Hiatt W., Martineau B. and Emlay D. 1994. Regulatory assessment of the FLAVRSAVR tomato, Trends in Food Science & Technology, 5 (4), 105–110
- Sancak, C. 1999, “*In vitro* Micropropagation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Turkish Journal of Botany, 23: 133–136.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Gök, G., Bekât, L. ve Leblebici, E. 2008. Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 116, 286. İzmir.
- Snedecor G.W. and Cochran W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA. 158-160.
- Smith, E.F. and Townsend, C.O. 1907. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Tangolar, S., Gök, S., Ergenoğlu, F. ve Çetiner, S. 1998, “Bazı Çekirdeksiz Üzüm Çeşitlerinin Embriyo Kültüründen Yararlanılarak Çoğaltılması” Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22:87-92.
- Üçler, Ö. and Mollamehmetoğlu, N. 2001, “*In vitro* Plantlet Regeneration from Mature Embryos of Linden (*Tilia platyphyllos* Scop.) and Multiplication of its Buds” Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 25:181-186.

- Vargas, T.E., Mejias, A., Oropeza, M. and Garcia, E. 2004, "Plant regeneration of *Anthurium andreanum* cv *Rubrun*" Electronic Journal of Biotechnology, 7(3):282- 286.
- Vookova, B. and Kormutak, A. 2003, "Plantlet Regeneration in *Abies cilicica* Carr. and *Abies cilicica* × *Abies nordmanniana* Hybrid via Somatic Embryogenesis" Turkish Journal of Botany, 27: 71–76.
- Watson, J.D., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D. and Nester, E.W. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 123: 255-264.
- Winkelmann T., Geier T. and Preil, W. 2006. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86:319–327.
- Yıldırım, A. 2005. Molecular marker facilitated pyramiding of resistance genes for fungal diseases of wheat. Workshop on Genomics and Marker Assisted Selection (MAS) in Plant Breeding. 3-7 Ekim 2005 (Sunulu Bildiri), _İzmir.
- Yıldız, M. 2000. Keten (*Linum usitatissimum* L.) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı,135, Ankara.
- Yıldız, M. and Er, C. 2002b. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). Naturwissenschaften Vol. 89: 259-261.
- Yıldız, M. 2010. Evaluation of the effect of *in vitro* stress and competition on tissue culture response of flax (*Linum usitatissimum* L.). Biologia Plantarum 55(3): 541-544.
- Yildiz, M. and Er, C. 2002a, "Increasing the Injured Area on Hypocotyl Explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Leads to High Frequency Callus-Based Shoot Regeneration" Turkish Journal of Biology, 26:95-98.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains. J. Mol. Biol. 86: 109-127.
- Zaman, M.S., Quraishi, A. and Hassan, G. 2001, "Meristem Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.) for Production of Virus-Free Plantlets" OnLine Journal of Biological Scientific Information, 1(10):898-899.
- Zülal, A. 2000. Gen Aktarımlı Bitkilerin Geleceği, Bilim ve Teknik, 388, 92-94.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Samah SAAD

Doğum Yeri : ŞANDİ -SUDAN

Doğum Tarihi : 21.8.1978

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : Türkçe İngilizce (IELTS 6.0)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Omdurman High Model School –Sudan. (1998)

Lisans : Bachelor of Science (Honours) First Class . (2003)
Khartoum Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Biyoteknolojisi

Yüksek Lisans : Khartoum Üniversitesi Endemik Disease Enstitüsü Molekular
Biyolojisi (2007)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

National Research Center-SUDAN-KHARTOUM 2006

Ödüller

Alzubair's Prize For Innovation and Scientific Excellence In The Field of Agricultural science

Ulusal Kongreler

1-Training Course Theoretical and Practical in the Field of Bacterial Root Ganglia and Uses 2002 Sudan- Khartoum

Uluslararası Kongreler

1-“DNA MOLECULAR MARKER TECHNIQUES FOR CROP IMPROVEMENT”Kursu 2003 at (ICARDA) Aleppo , Syria

2- European Biotechnology Congress 2011 İstanbul, Turkey,

Yayınları :

1- Saad, S., Mukhtar, M., Warag, E., Elamin, H. and Yıldız, M. 2011. Molecular characterization of Sudanese gum arabic tree (*Acacia senegal* var. *senegal*) using random amplification of polymorphic DNA (RAPD). European Biotechnology Congress, Current Opinion in Biotechnology 22: 139, İstanbul, Turkey

2- Saad, S., Mukhtar, M., Warag, E., Elamin, H. and Yıldız, M. 2016 Characterization of Phenotypic Variability of Sudanese Gum Arabic Tree *Acacia Senegal* var. *senegal* Using Multiprimer Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) International Journal of Genetics and Genomics Volume 4, Issue 3, June 2016, Pages: 20-23