

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**TOHUM BÖCEKLERİNE (Bruchidae: Coleoptera) DAYANIKLI TRANSGENİK  
FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİLERİNİN ELDE EDİLMESİNE YÖNELİK  
ARAŞTIRMALAR**

**Sevil SAĞLAM**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2009**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### TOHUM BÖCEKLERİNE (Bruchidae: Coleoptera) DAYANIKLI TRANSGENİK FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİLERİNİN ELDE EDİLMESİNE YÖNELİK ARAŞTIRMALAR

Sevil SAĞLAM

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cemalettin Y. ÇİFTÇİ

Fasulye; protein, vitaminler ve mineral maddelerce zengin önemli bir yemeklik tane baklagil bitkisidir. Tohum böcekleri (Coleoptera: Bruchidae); fasulye tanelerinin gıda kalitesini, çimlenme gücünü ve dolayısıyla ekonomik değerini düşürmektedir. Bu böceklerle mücadelede kullanılan kimyasal maddelerin bitkiler üzerinde bıraktığı kalıntılar bitki üzerinden beslenen tüm canlıları olumsuz etkilemektedir. Transformasyon çalışmalarında kullanılan *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) genlerinin ise insanlar ve diğer canlılar üzerinde olumsuz etkilerine rastlanmadığına ilişkin kaynaklar mevcuttur. Bu çalışmada, fasulye bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla *Bt*  $\delta$ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan *Cry* genlerini aktararak böceklere dayanıklı bitkiler elde etmek amaçlanmıştır. Fasulye bitkisinin olgunlaşmamış kotiledon, plumula ve embriyo ile iki kotiledon eksplantlarından yüksek oranda rejenerasyon sağlanmıştır. Akman-98 çeşidinin apikal meristem eksplantlarından GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattı kullanılarak 3 adet GUS pozitif bitki elde edilmiştir. *A. tumefaciens*'in GNA, OC11, SKTI, *CryIAC*, *CryIC* (p1C PRD ve p1CST PRD), *Cry2A* (p2A PRD ve p2AST PRD), *CryIAb* ve *SN19* (pMH65, pMH66) genlerini taşıyan hatları kullanılmıştır. Yalnızca GNA, *CryIAC*, *CryIAb*, *Cry2A* (p2A PRD ve p2AST PRD), *CryIC* (p1CST PRD), SN19 (pMH65, pMH66) genlerini taşıyan bakteri hatları kullanılarak yapılan gen aktarımı çalışmalarından bitki elde edilmiştir.

**Aralık 2009, 101 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Fasulye, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bruchus* spp., *Cry* genleri

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### RESEARCHES ON DEVELOPMENT OF TRANSGENIC COMMON BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) RESISTANT TO SEED INSECTS (Bruchidae: Coleoptera)

Sevil SAĞLAM

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

Supervisor: Prof. Dr. Cemalettin Y. ÇİFTÇİ

Common bean is an important food legume rich in protein, vitamins and mineral elements. Seed insects (Coleoptera: Bruchidae); harm common bean, food quality, germination power and therefore reduces the economic value. Residues that are left on plants by the insecticides used to combat these insects affect all the creatures which feed on them negatively. There is no report of negative effects of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) upon human beings and other living organisms. The objective of the study was to transfer *cry* genes synthesised by *Bt*  $\delta$ -endotoxin proteins and obtain insect resistant plants. Maximum shoot regeneration in common bean was obtained using immature cotyledon, plumules and embryo with two cotyledons. Three GUS positive plants were obtained from apical meristem eksplants of cv. Akman-98 using GV2260 p35S *GUS-INT* strain of bacteria. *A. tumefaciens* strains containing GNA, OCII, SKTI, *CryIAc*, *CryIC* (p1C PRD and p1CST PRD), *Cry2A* (p2A PRD and p2AST PRD), *CryIAb* and *SN19* (pMH65, pMH66) were used. Transgenic plants were only obtained with GNA, *CryIAc*, *CryIAb*, *Cry2A* (p2A PRD ve p2AST PRD), *CryIC* (p1CST PRD), *SN19* (pMH65, pMH66) genes.

December 2009, 101 pages

**Key Words:** Common bean, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bruchus* spp., *Cry* genes

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Cemalettin Y. ÇİFTÇİ'ye (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), bilimsel bilgi ve görgüsünden sonsuz faydalandığım ve bu çalışmanın ortaya çıkmasındaki her türlü destek ve katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), çalışmanın her aşamasında bilimsel ve manevi desteğinden dolayı sayın Doç. Dr. Mevlüt EMEKÇİ'ye (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü), doktora çalışmamın her adımında beni sabırla ve emekle takip eden, yetişmemdeki sonsuz desteği ve ilgisinden dolayı ve yardımlarının karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim sayın Doç. Dr. Khalid M. KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), Tarla Bitkileri Bölümü hocalarıma ve tarla personeline sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, desteklerinden dolayı arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Satı ÇÖÇÜ ve isimlerini tek tek yazamadığım bütün çalışma arkadaşlarım ve öğrencilerime çok teşekkür ediyorum.

Aileme, sevgili annem ve babama sonsuz sevgi ve Őükranlarımı sunuyorum.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK (Proje No: 106O058) tarafından desteklenmiştir.

Sevil SAğLAM

Ankara, Aralık 2009

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	21
3.1 Bitki Materyali .....	21
3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları .....	21
3.3 Tohumların <i>In vitro</i> Koşullarda Sterilizasyonu .....	22
3.4 Tohum Canlılık Testi .....	23
3.5 Eksplant Seçimi .....	23
3.6 Sürgünlerin Köklendirilmesi .....	23
3.7 Elde Edilen Köklenmiş Bitkilerin Dış Şartlara Ağıştırılması .....	24
3.8 Bakteri Materyali .....	24
3.9 Bakteri Kültürlerinin Safaştırılması ve Büyütülmesi .....	25
3.10 Antibiyotikler .....	26
3.11 Bakteri Kültürlerinin Kısa ve Uzun Süreli Korunması .....	27
3.12 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi .....	27
3.12.1 Histokimyasal GUS analizi .....	27
3.12.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) .....	28
3.13 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi .....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	31
4.1 Fasulyede Yüzey Sterilizasyonu .....	31
4.1.1 Çamaşır suyu pH'sının etkisi .....	33
4.1.2 Su sıcaklığının etkisi .....	34
4.1.3 Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )'in etkisi .....	35
4.1.4 Filtre kâğıtlarının etkisi .....	36
4.2 Fasulyenin <i>in vitro</i> Koşullarda Sürgün Rejenerasyonu .....	37

4.2.1 Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 5 g/l aktif kömür ve farklı dozlarda TDZ'nin etkisi .....	37
4.2.2 Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 0.25 mg/l salisilik asit içeren farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisi .....	39
4.2.3 Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 5 g/l aktif kömür ve 0.25 mg/l salisilik asit içeren farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisi .....	40
4.2.4 Karacaşehir–90 ve Akman–98 fasulye çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisi .....	42
4.2.5 Bir hafta–20 mg/l NAA ön muamelesi sonrasında değişik oranlarda TDZ ve NAA'in sürgün rejenerasyonuna etkisi .....	43
4.2.6 Olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu .....	45
4.2.7 Akman–98 çeşidinde TDZ-NAA'in kotiledon boğum ve apikal meristem eksplantlarının sürgün rejenerasyonu .....	48
4.2.8 Farklı oranlarda TDZ ve IBA'nın apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi .....	50
4.2.9 10 gün–10 mg/l BAP ön muamelesi sonrasında değişik oranlarda BAP'ın sürgün rejenerasyonuna etkisi .....	52
4.2.10 BAP ve NAA'in olgunlaşmış embriyo, radikula, yaprak ve kotiledon boğum eksplantlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi .....	55
4.3 <i>In vitro</i> 'da Geliştirilen Bitkiciklerin Dış Şartlara Alıştırılması .....	57
4.4 Fasulyede Gen Aktarım Çalışmaları .....	58
4.4.1 <i>A.tumefaciens</i> 'in GV2260 p35GUSINT bakteri hattı ile gen aktarımı .....	58
4.4.2 LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı .....	60
4.4.3 <i>Cry IAb</i> geni taşıyan <i>A. tumefaciens</i> bakteri hattı ile gen aktarımı .....	63
4.4.4 <i>A. tumefaciens</i> 'in pMH65:SN19 ( <i>CryIBa/CryIIa</i> ) ve pMH66:SN19 ( <i>CryIBa/CryIIa</i> ) hibrid geni taşıyan Agl0 bakteri hatları ile fasulyeye gen aktarımı .....	65
4.4.5 <i>OCII–7</i> ve GNA Lektin Genlerinin <i>A. tumefaciens</i> Aracılığıyla Aktarımı .....	68
4.4.6 <i>A. tumefaciens</i> 'in böceklere dayanıklılık genleri taşıyan <i>Cry IAc</i> , <i>Cry IC</i> , <i>Cry ICST</i> , <i>Cry 2A</i> , <i>Cry 2AST</i> , <i>Cry IAb</i> , <i>PMH65:SN19</i> ve <i>PMH66:SN19</i> hatları ile fasulyeye gen aktarımı .....	70
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	73
KAYNAKLAR .....	91
ÖZGEÇMİŞ .....	99

## SİMGELER DİZİNİ

AUG	Augmentin
BAP	6-Benzilaminopurin
bp	baz çifti
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
F	F testi
g, mg, µg	gram, miligram, mikrogram
GUS	P-glukuronidaz
HCl	Hidroklorik Asit
ICP	İnsektisidal Cry Protein
IBA	İndol butirik asit
ISTA	International seed testing association (Uluslararası tohum test örgütü)
kDA	Kilodalton
Km	Kanamisinmonosülfat
K.O.	Kareler ortalaması
kPa	Kilopaskal
l, ml, µl	Litre, mililitre, mikrolitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	Naftalenasetik asit
NA	Nutrient agar
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nos	Nopalin sentaz
NB	Nutrient broth
NPTII	Neomisin fosfotransferaz II
<i>NptII</i>	Neomisin fosfotransferaz II geni
OCI	Oryzasistein-I
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
Ppt	Fosfonitricin
Rif	Rifampisin
S.D.	Serbestlik derecesi
SKTI	Soya kunitz trypsin inhibitör
TBE	Tris- Borik asit-EDTA
T-DNA	Transfer DNA
Tn	Transposon
TDZ	Thidiazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
Vir	Virulens geni
V.K.	Varyasyon kaynakları
X-gluc	5 Bromo - 4 kloro - 3 indolil glukoronid

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Fasulye tohum böceği [ <i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say)]'nin yaşam döngüsü .....	2
Şekil 1.2	Fasulye tohum böceği [ <i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say)]'nin fasulye tohumlarına verdiği zarar .....	3
Şekil 4.1	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinde sterilizasyondan kaynaklanan çimlenme problemi a-b) MS ortamında çamaşır suyunun etkisi ile zarar görmüş tohumlarda çimlenmenin azalması c) sterilizasyondan önceki d-e-f) sterilizasyondan sonraki tohumlara uygulanmış tohum canlılık testi ve tespiti .....	33
Şekil 4.2	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin filtre kâğıtları arasında çimlenen tohumları .....	37
Şekil 4.3	Fasulyenin apikal meristem eksplantlarından 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında elde edilen sürgünler.....	45
Şekil 4.4	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin (a) 1 hafta 20 mg/l NAA'li MS besin ortamında bekletilmiş embriyoları (b) embriyolardan meydana gelen sekonder eksplantların meydana getirdiği sürgünler .....	45
Şekil 4.5	Rejenerasyon ortamlarından alınan sürgünlerin köklendirilmesi .....	47
Şekil 4.6	A.Ü. Ziraat Fakültesi deneme tarlasında a)Akman-98 b)Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin gelişimi.....	47
Şekil 4.7	Akman-98 fasulye çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından 1.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA ortamında sürgün rejenerasyonu ile NAA'in etkisiyle köklerde meydana gelen şişkinlik .....	47
Şekil 4.8	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA'li rejenerasyon ortamında oluşan sürgünler .....	48
Şekil 4.9	Akman-98 fasulye çeşidinin 0.30 mg/l TDZ'li rejenerasyon ortamında apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ..	50
Şekil 4.10	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarından 0.30 mg/l TDZ içeren ortamda sürgün rejenerasyonu .....	50
Şekil 4.11	Akman-98 fasulye çeşidinin olgunlaşmış embriyolarının 10 mg/l BAP içeren MS ortamında 1 günlük görüntüsü .....	55
Şekil 4.12	1.00 mg/l BAP ortamında Akman-98 çeşidinin plumula eksplantından elde edilen sürgünler .....	55
Şekil 4.13	Fasulye bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ile elde edilen bitkilerin iklim dolabındaki görüntüsü .....	57
Şekil 4.14	Transgenik fasulye baklaları ve tohumlar .....	57

Şekil 4.15	Akman-98 fasulye çeşidinin apikal meristem eksplantlarının GV2260 p35GUSINT bakteri hattı muamelesi sonucunda edilen sürgünler .....	58
Şekil 4.16	Akman-98 fasulye çeşidinde GV2260 p35GUSINT bakteri hattı kullanılarak yapılmış olan gen aktarım çalışmasında kanamisine dayanıklılık gösteremeyen bitkiciklerde tespit edilen beyazlık.....	59
Şekil 4.17	Akman-98 fasulye çeşidinin apikal meristem eksplantları ile GV2260 p35GUSINT bakteri hattının inokülasyonu sonucunda elde edilen bitkiciklerin bardaklarda dış şartlara alıştıırılması .....	59
Şekil 4.18	Akman-98 fasulye çeşidinin gen aktarımı sonucu elde edilmiş olan bitkiciklerinin iklim odası ve serada dış şartlara alıştıırılması .....	60
Şekil 4.19	Akman-98 fasulye çeşidinde GV2260 p35GUSINT bakteri hattı ile yapılan gen aktarımında GUS testi sonucunda maviye boyanmış yaprak örnekleri .....	60
Şekil 4.20	Akman-98 çeşidinin plumula eksplantında LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımında elde edilen sürgünler ve beyazlaşma .....	62
Şekil 4.21	Akman-98 fasulye çeşidinin plumula eksplantlarından 0,5 mg/l BAP seleksiyon ortamında oluşan sürgünler .....	65
Şekil 4.22	İklim dolabında Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin plumula eksplantından 0.50 mg/l BAP seleksiyon ortamında elde edilen bitkicikler .....	67
Şekil 4.23	Bt genleri içeren bakteri hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde <i>NPT-II</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 1.-5. kulvarlar transgenik fasulye bitkileri-SN19 geni (pMH66), 6. kulvar transgenik adayı negatif fasulye bitkisi-SN19 geni (pMH66) .....	67
Şekil 4.24	Bt genleri içeren bakteri hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisine dayanıklı Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde <i>NPT-II</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 1. ve 2. kulvarlar transgenik adayı negatif fasulye bitkileri-SN19 geni (pMH65), 3.-12. kulvarlar transgenik fasulye bitkileri-SN19 geni (pMH65) .....	68
Şekil 4.25	Akman-98 fasulye çeşidinde <i>OCII-7</i> ve <i>GNA 105</i> genlerini içeren <i>A. tumefaciens</i> hatları ile gen aktarımı .....	69
Şekil 4.26	GNA lektin geninin aktarıldığı Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde <i>NPT-II</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 10. ve 12. kulvarlar transgenik adayı negatif fasulye bitkileri, diğer kulvarlar transgenik fasulye bitkileri .....	70
Şekil 4.27	Serada gelişen Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde <i>NPT-II</i> geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 1.-6. kulvarlar <i>cry2A</i> (p2AST PRD)	

geni negatif fasulye bitkileri, 7.-8. kulvarlar *cry2A* (p2AST PRD) 72  
genini taşıyan transgenik fasulye bitkileri .....

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında bulunan mineral maddeler ve konsantrasyonları .....	21
Çizelge 3.2	Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları ..	22
Çizelge 3.3	<i>Agrobacterium</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları .....	26
Çizelge 3.4	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları .....	26
Çizelge 3.5	PCR işleminde kullanılan primer dizileri .....	29
Çizelge 4.1	Farklı sterilizasyon sürelerinde uygulanan % 20'lik çamaşır suyunun tohumların bulaşıklık ve çimlenmesi üzerine ait varyans analizi sonuçları .....	32
Çizelge 4.2	Farklı sterilizasyon sürelerinde uygulanan % 20'lik çamaşır suyunun tohumların çimlenmesi üzerine etkisine ait Duncan analizi .....	32
Çizelge 4.3	Çamaşır suyunun %5'lik dozunda farklı pH değerlerinin Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	34
Çizelge 4.4	Çamaşır suyunun %5'lik dozunda farklı pH değerlerinin Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumların çimlenmesi üzerine etkisine ait Duncan analizi .....	34
Çizelge 4.5	Çamaşır suyunun farklı dozları ve farklı su sıcaklıklarının Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerine varyans analizi sonuçları .....	35
Çizelge 4.6	Çamaşır suyunun farklı dozları ve sıcaklık değerlerinin Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerine t testi ve Duncan analizi .....	35
Çizelge 4.7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in farklı dozlarının Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	36
Çizelge 4.8	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in farklı dozlarının Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının bulaşıklık ve çimlenme yüzdesi üzerindeki etkisine ait Duncan analizi sonuçları .....	36
Çizelge 4.9	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait varyans analizi sonuçları ..	38
Çizelge 4.10	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait Duncan analizi sonuçları ..	38
Çizelge 4.11	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 0,25 mg/l salisilik asit ve farklı dozlarda TDZ'nin etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	39
Çizelge 4.12	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait Duncan analizi .....	40

Çizelge 4.13	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 5 g/l aktif kömür ve 0.25 mg/l salisilik asit içeren farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	41
Çizelge 4.14	Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonunda TDZ dozları - eksplantların etkisine ait Duncan analizi sonuçları .....	41
Çizelge 4.15	Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	42
Çizelge 4.16	Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinde rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisine ait Duncan analizi .....	43
Çizelge 4.17	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve NAA'ın etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	43
Çizelge 4.18	Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinde kallus ve sürgün oluşum oranı ile eksplant başına sürgün sayısı üzerine NAA ve farklı dozlarda TDZ'nin etkisine ait Duncan analizi .....	44
Çizelge 4.19	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA'ın etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	46
Çizelge 4.20	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA'ın etkisine ait t testi sonuçları .....	46
Çizelge 4.21	Akman-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve NAA'ın etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	49
Çizelge 4.22	Akman-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve NAA'ın etkisine ait Duncan test sonuçları .....	49
Çizelge 4.23	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve IBA dozlarının etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	51
Çizelge 4.24	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve IBA dozlarının etkisine ait Duncan test sonuçları .....	52
Çizelge 4.25	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine BAP ön muamelesi ve farklı BAP dozlarının etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	53
Çizelge 4.26	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda değişen BAP dozları ile çeşitlerin etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları .....	54
Çizelge 4.27	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda farklı BAP dozları ile eksplantların etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları .....	54
Çizelge 4.28	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda çeşit ile eksplantların etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları ...	54

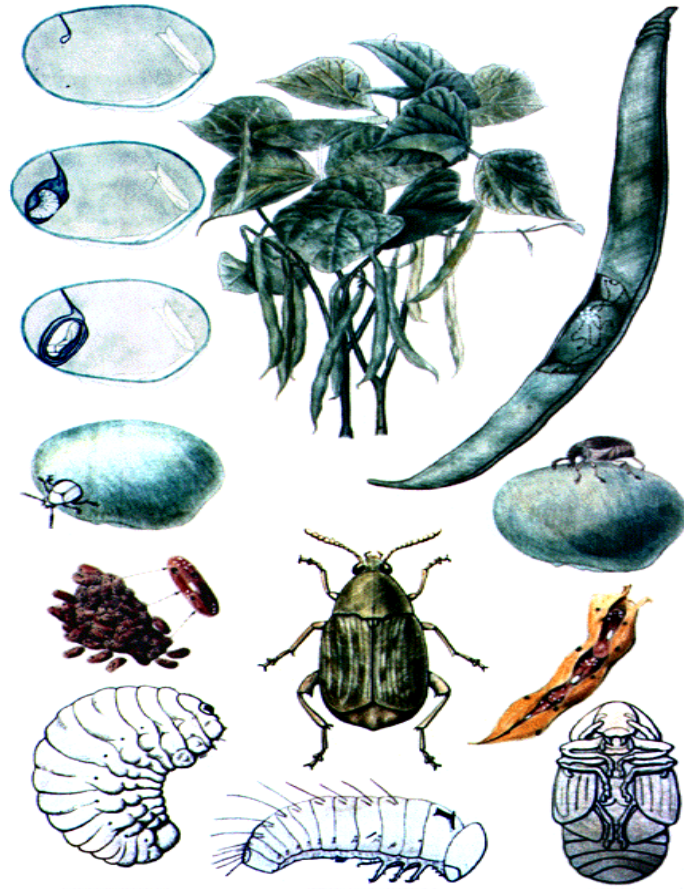
Çizelge 4.29	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine BAP ön muamelesi ve farklı BAP dozlarının etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	56
Çizelge 4.30	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda farklı BAP dozları ile çeşitlerin etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları .....	56
Çizelge 4.31	LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerine gen aktarımına ait varyans analizi sonuçları .....	62
Çizelge 4.32	LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerine gen aktarımına ait t testi sonuçları .....	62
Çizelge 4.33	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ön muamelesi ve sürenin etkisine ait varyans analizi sonuçları .....	64
Çizelge 4.34	Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ön muamelesi ve sürenin etkisine ait Duncan analizi sonuçları .....	64
Çizelge 4.35	Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerine <i>pMH65:SN19</i> ve <i>pMH66:SN19</i> içeren <i>A. tumefaciens</i> hatları ile gen aktarımı sonuçları .....	66
Çizelge 4.36	Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerine <i>OCII-7</i> ve <i>GNA 105 A.tumefaciens</i> hatları ile gen aktarımı .....	69
Çizelge 4.37	Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerine <i>Cry IAc</i> , <i>Cry IC</i> , <i>Cry ICST</i> , <i>Cry 2A</i> , <i>Cry 2AST</i> , <i>Cry IAb</i> , <i>PMH65:SN19</i> ve <i>PMH66:SN19</i> genlerini içeren <i>A. tumefaciens</i> hatları ile gen aktarımı sonuçları .....	71

## 1. GİRİŞ

Yemelik tane baklagiller içinde fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) FAO kaynakları 2007 yılı verilerine göre dünyada 26.918.000 ha ekim alanı ile ilk sırada, Türkiye’de ise 116.000 ha ile 3. sırada yer almaktadır. Dünya genelinde 2006 yılı verilerine göre, 2.830.863 ton ve 1.647.929 000 \$ değerinde bir dışsatım; 2.842.407 ton ve 1.831.764 000 \$ değerinde dışalım söz konusudur. Türkiye’de ise 6.174 ton ve 6.099.000 \$ dışsatım, 31.149 ton ve 19 565 000 \$ değerinde dışalım mevcuttur (Anonymous 2009a). Yemelik tane baklagiller yararlanma ve kullanma şekillerine göre özellikle proteince, A, B ve C vitaminlerince, fosfor, demir, kalsiyum ve potasyumca zengin bitkilerdir. Baklagil köklerinde yaşayan *Rhizobium* türü bakterileri havada serbest halde bulunan ancak canlılar tarafından direkt olarak yararlanılamayan azotu, yaşadıkları ortama bağlarlar. Atmosferden alınarak bitki köklerinde bakteriler tarafından oluşturulan yumrular içerisinde biriktirilen azot, fasulye bitkisinin hasadından sonra mikroorganizmalar tarafından parçalanarak elementer hale dönüştürülür. Bu şekilde fasulye, köklerinin yayıldığı toprak katlarını organik azotça zenginleştirir ve daha sonra ekilen bitkiler de bu azottan faydalanır. Ayrıca ekim nöbetine uygun bitkiler olmaları nedeniyle sürdürülebilir tarımda da oldukça önemli bir yere sahiptirler (Kouas vd. 2009). Bütün bu avantajlarından ötürü, açlık ve yetersiz beslenme sorunu ile karşı karşıya olan dünya için yemelik baklagiller insan beslenmesinde önemli besin maddeleridir (Rehm ve Espig 1991, Guzmán-Maldonado vd. 2004).

Hastalık ve zararlılar fasulyede büyük verim kayıplarına sebep olmaktadır. Tarlada bitki kök, gövde ve yapraklarında, depodaki ürün taneleri içerisinde yaşayan ve zarar veren çok çeşitli böcekler bulunmaktadır. Baklagil tohum böcekleri larvaları, konukçuları olan baklagil taneleri içinde beslenmeleri süresince oyuklar meydana getirerek tanelerin ekonomik ve besin değerini düşürmekte, dışkı ve vücut artıkları ile taneyi kirletmekte, ürünle birlikte tarladan ambara taşınmakta ve ambarda da üremesine devam ederek verdiği zararı büyütmektedir (Rehm ve Espig 1991). Bu şekilde tanelerin gıda kalitesi düşmekte ve aynı zamanda çimlenme kabiliyetlerinde yaklaşık %70 oranında azalmalar söz konusu olmaktadır (Dörtbudak vd. 1999). Fasulye tohum böcekleri (*Acanthoscelides obtectus* Say.), (Col.: Bruchidae) çok döl vererek devamlı üremelerini sürdürmektedirler (Şekil 1.1). Bu şekilde sürekli bir zarar söz konusu olmakta ve delinmiş, içinin büyük kısmı yenilmiş, besin değeri tamamen kaybolmuş fasulye taneleri hayvan yemi ve gübre olarak dahi kullanılamaz hale

gelmekte, aynı zamanda iç ve dış piyasada tanelerin pazar değeri de düşmektedir (Şekil 1.2). Fasulye tohum böcekleri Türkiye ve dünyada fasulye ekimi yapılan tüm bölgelerde yaygın olarak bulunmakta ve ciddi şekilde ürün kalitesi ve verim kaybına neden olmaktadır. Verim ve kalitede meydana gelen zarar, zaman zaman %100'e kadar ulaşabilmektedir. Böcekler ile bulaşmanın seviyesi ne olursa olsun, ürünün dış satımda bazı alıcı ülkeler tarafından, ürünün hiç delikli olmaması ve ölü böcek parçalarının dahi bulunmaması gerekçesi ile tercih edilmemesine sebep olmaktadır. Baklagil tohum böcekleri ülkemizde ve dünyada baklagil ekimi yapılan tüm bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Özer ve Yücel 1989, Abate ve Ampofo 1996, Anonim 2007). Dünyada zararlı böceklerle mücadele yapılmadığında bazı bitkilerde oldukça yüksek sayılabilecek kayıplar oluşabilmektedir. Yemelik tane baklagillerde zararlı böceklerin mücadelesinde kimyasal ilaç, ekimin geç yapılması, ürünün, temizliği önceden yapılmış ambara çuvallar içinde alınması, hasat sonrası tarlada kalan artıkların pullukla derine gömülmesi veya yakılması, temiz tohumluk kullanılması gibi kültürel yöntemler uygulanmaktadır (Şehirli 1988).



Şekil 1.1 Fasulye tohum böceği [*Acanthoscelides obtectus* (Say)]'nin yaşam döngüsü



Şekil 1.2 Fasulye tohum böceği [*Acanthoscelides obtectus* (Say)]'nin fasulye tohumlarına verdiği zarar

Günümüzde tarımsal üretimde önemli ürün kayıplarına neden olan zararlılarla mücadelede genetik mühendisliği teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla insektisidal etki gösteren proteinleri kodlayan bazı genler (çeşitli *Bacillus thuringiensis* endotoksinleri, proteinaz inhibitörleri, lektinler, alfa-amilaz inhibitörleri, kitinaz gibi) bitkilere aktararak değişik böcek gruplarına karşı dayanıklılık sağlanabilmektedir. İnsektisidal protein üretebilen ilk *Bt* geninin 1981 yılında izole edilmesi ve klonlanmasından sonra bu ve benzeri genlerin bitkilere aktarılmasına yönelik araştırmalar yoğunluk kazanmıştır.

Böceklere dayanıklılık transformasyon çalışmalarının esası; böcekler üzerinde toksik etki yapan insektisidal proteinlerin sentezinden sorumlu genlerin bitkilere aktararak transgenik bitkilerin geliştirilmesine dayanmaktadır. Bu teknolojiye en yaygın kullanılan genler doğal ve sentetik *Bt*  $\delta$ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan *Cry* genleridir. *Bt*  $\delta$ -endotoksin genlerine ek olarak böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesinde; proteinaz inhibitörleri,  $\alpha$ -amilaz inhibitörleri, lektinler, kitinaz, kolesterol oksidaz enzimi, avidin ve VIP (vegetative insectisidal proteins) gibi insektisidal etki gösteren proteinler de kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar  $\alpha$ -amilaz inhibitör-1 ( $\alpha$ AI-1) geninin özellikle Bruchidae familyasına ait böceklerle mücadele için transgenik bitkilerin geliştirilmesinde kullanıldığını göstermektedir (Crispeels 1997, Sonia vd. 2007).  $\alpha$ AI-1 genini taşıyan transgenik bitkilerin Bruchuslara dayanıklılık gösterebildiğine dair ilk çalışma 1994 yılında

yapılmıştır (Shade vd. 1994). Bu çalışmada fasulyeden izole edilen  $\alpha$ AI-1 geni tohuma özgü ifade sağlayan bir promotör bölgesinin kontrolü altında bezelyeye aktarılmış ve elde edilen transgenik tohumların *Callasobrucus maculatus* (F.) (Col.: Bruchidae)'a dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde  $\alpha$ AI-1 geni Adzuki fasulyesine aktarılmış ve elde edilen transgenik bitkilerin Adzuki fasulyesinin bir zararlısı olan *Callasobrucus chinensis* (L.) (Col.: Bruchidae)'den etkilenmediği gösterilmiştir (Ishimoto vd. 1996).  $\alpha$ AI-1 geninin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri hakkında yapılan bir çalışma; 300 g/kg'a eşdeğer  $\alpha$ AI-1 proteini ile beslenen farelerde gelişme, metabolizma ve sağlık açısından hiçbir yan etkisinin olmadığını göstermiştir (Pusztai vd. 1999).  $\alpha$ AI-1 kullanılarak bu sonuçlar elde edilmiş de olsa henüz genin kullanımı yaygınlaşmamıştır. Böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin elde edilmesinde 130'un üzerinde Bt endotoksin geni izole edilmiş ve nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bt endotoksin proteinleri yapısal özellikleri ve konukçu profillerine göre Cry-I, II, III, IV olmak üzere dört farklı grupta toplanmaktadır. Bunlardan Cry-I toksinleri Lepidoptera üzerinde etki gösterirken, Cry-III toksinleri Coleoptera, Cry-IV ise Diptera üzerinde etkili olabilmektedir. Cry-II toksinlerinin ise hem Lepidoptera hem de Diptera üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Kristalin proteinler veya protoksinler yüksek pH derecelerinde böcek orta bağırsağında çözündüğü zaman protoksinler parçalanır ve 65-70 kDa büyüklüğündeki aktif toksin formlarına dönüşür (130 kDa büyüklüğündeki protoksininin C-terminalinden yaklaşık 600 amino asit, N-terminalinden 30-50 aminoasit ayrılır böylece 65-70 kDa'luk toksin bölge açığa çıkar). Toksinin etki mekanizması, aktif haldeki toksinlerin bağırsak epitel hücrelerinde bulunan reseptör bölgelerine bağlanmasını takiben hücre zarı üzerinde delikler meydana getirmesi sonucu, bu hücrelerin patlaması ile oluşmaktadır (Özcan vd. 2001).

Klasik bitki ıslahı ile istenen tüm özelliklerin bir bitkide toplanması oldukça güç ve zaman alıcı bir işlemdir. Baklagillerde bitki rejenerasyonu ve gen aktarımı genotip ve eksplantından etkilenmekte olup, gen aktarım oranı oldukça düşüktür (Sağlam 2005, Somers vd. 2006). Rejenerasyon yeteneğinin düşük olmasına rağmen değişik araştırmacılar gen aktarılmış fasulye bitkileri elde etmişlerdir (De Clarq vd. 2002, Çevirmen ve Akbulut 2003, Liu vd. 2005, Sağlam 2005a,b, Zambre vd. 2005, Estrada-Navarrette vd. 2006). Fasulye üzerinde yapılan birçok *in vitro* ve *in planta* rejenerasyon ve gen aktarımı çalışmalarında başarılı sonuçlar görülmemektedir. Gen aktarımında başarılı sonuçlar elde edilmesinde tekrarlanabilecek sürgün rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir. Günümüzde *A. tumefaciens* ile yemeklik tane baklagillere oldukça düşük oranlarda gen aktarımı yapılabilmektedir. Bu

Çalışmanın amacı; yemeklik tane baklagiller içerisinde dünya ve Türkiye’de önemli bir cins olan fasulye bitkisinde yüksek oranda sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi ve buradan yola çıkarak *A. tumefaciens* aracılığıyla fasulye tohum böceklerine dayanıklı bitkiler elde etmektir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Hastalık ve zararlılar, fasulyede büyük verim kayıplarına neden olmaktadır. Bitki kök, gövde ve yapraklarında, depodaki ürün taneleri içerisinde yaşayan ve zarar veren tohum böcekleri larvaları fasulye tanelerinin kalitesini düşürmekte ve ekonomik olarak büyük kayıplar meydana getirmektedir. Bu zarardan dolayı, iç ve dış piyasada önemli yeri olan fasulyenin pazar değeri düşmektedir. Baklagil tohum böceklerinin sebep olduğu ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün sağlamak için böceklere dirençli bitkilerin ıslah edilmesi gerekmektedir. Fakat, bütün baklagillerde olduğu gibi fasulyede de böceklere dayanıklılık ıslah çalışmaları hemen hemen bulunmamaktadır. Bu çalışma ile fasulye bitkisine *Agrobacterium* aracılığıyla tohum böceklerine karşı gen aktararak, böceklere dayanıklı bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır.

### **Adventif Sürgün Rejenerasyonu**

*In vitro* koşullarda bitkilerden izole edilen sürgün, kök, yaprak, çiçekler ve hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan besin maddeleri, hormonlar ve vitaminler gibi kimyasal; ısı, ışık ve nem gibi fiziksel gereksinimleri karşılandığı takdirde yeni bitkicikler elde edilebilmektedir. Bitki hücre ve dokulardan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu organogenesis ve embriyogenesis olarak iki yolla gerçekleşmektedir. Normal şartlarda, herhangi bir bitki parçası organogenesis çalışmalarında eksplant olarak kullanılabilir. Yaygın olarak kullanılan eksplantlar ise daha çok, gövde, kök, yaprak, çiçek durumu, yumurtalık veya yumurta hücresi, kotiledon ve hipokotil gibi fide organları, tohum embriyosu olup, bu tür eksplantlar direkt olarak veya kallus üzerinden indirekt olarak organ ve embriyo oluşturmaktadırlar. Kallustan organ rejenerasyonunda, kök ve sürgün tamamıyla birbirinden bağımsız meydana gelmektedir. Kallustan kök gelişimi yüksek oksin ve düşük sitokin içeren besi ortamında oluşurken, sürgün oluşumu düşük oksin ve yüksek sitokin içeren besi ortamında gerçekleşmektedir. Kallustan organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonunda, kallus önce adventif sürgün oluşumunu teşvik eden, yani sitokin içeren besi ortamında kültüre alınır. Daha sonra oluşan sürgünler köklendirilmek üzere oksin içeren besi ortamına aktarılır. Somatik hücre veya dokulardan embriyo oluşumu somatik embriyogenesis olarak adlandırılır. Somatik embriyolar; embriyo benzeri yapılar, adventif veya vejetatif embriyo ya da embriyoid olarak da adlandırılır. Somatik embriyogenesisin iki tipi mevcuttur. Direkt somatik embriyogenesis; embriyo kallus oluşumu olmadan direkt olarak somatik bir hücreden oluşur.

Bu tip embriyogenezis için çok genç bitki doku ve hücreleri kullanılır. İndirekt embriyogeneziste; önce kallus daha sonra bu kallustan somatik embriyolar oluşmaktadır (Hatipoğlu 1999) .

### ***Agrobacterium tumefaciens* ile Bitkilere Gen Aktarımı**

Gen aktarımı; tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının yerleştirilmesi ve gen aktarılmış hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesidir. Bitkilere gen aktarımı, doğrudan (en yaygın kullanılanları elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve biyolistik) ve dolaylı (*A. tumefaciens* ile gen aktarımı) olmak üzere iki grup altında toplanabilmektedir (Arı 2001). *A. tumefaciens*, toprakta yaşayan bir bakteri olup, bitkiyi genellikle kök boğazında oluşan yaralardan enfekte etmektedir. Enfeksiyon sonucunda bitkinin kök boğazı hücrelerinde ortaya çıkan düzensiz bölünmeler kanser gibi tümör oluşumuna neden olmaktadır. Yapılan yoğun araştırmalar sonucunda bu tümör oluşumuna bakteriden bitki hücrelerine geçen bazı genlerin neden olduğu ortaya konulmuştur. *A. tumefaciens* kromozom DNA'sına ilave olarak çok küçük yuvarlak bir DNA molekülü (Ti plazmidi) daha içermektedir. *A. tumefaciens* yaralanmış bitki hücrelerine tutunduğu zaman fenolik bileşiklerin uyarıcı etkisi ile Ti plazmidinin T-DNA bölgesi sağ ve sol sınırlarından kesilerek bitki hücrelerine gönderilmekte ve bitki kromozomlarıyla birleşmektedir (Chilton vd. 1980). Bu birleşmeden sonra, T-DNA bölgesinde bulunan tümör genleri aktif hale gelmekte ve üretmiş oldukları oksin ve sitokininler bitki hücrelerinin hormon dengesini bozarak hızlı ve kontrolsüz bölünen tümör doku oluşmaktadır (Bevan vd. 1983). *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens*'in bitkilerde neden olduğu tümör oluşumuna benzer şekilde, saçak kök hastalığı meydana getirmektedir (Huffman vd. 1984). *A. tumefaciens* üzerine yapılan yoğun neticeler sonucunda T-DNA bölgesindeki tümör oluşumuna neden olan genler kesici enzimler aracılığıyla çıkartılarak yerlerine değişik kaynaklardan izole edilen tarımsal öneme sahip genler yerleştirildiğinde ve *in vitro* gelişen bitki doku ve hücreleri bu *Agrobacterium* hatlarıyla enfekte edildiklerinde, istenilen özellikleri taşıyan genler bitki hücrelerine aktarılmış olur. Sonuçta, bu hücrelerden daha önce anlatılan *in vitro* kültürü yöntemleriyle bazı özellikleri iyileştirilmiş transgenik bitkiler rejenera edilebilmektedir (Özcan vd. 2001).

## Böceklerle Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi

Moleküler biyoloji önemli çalışma alanlarından biri de, zararlılarla mücadeledir. Bu mücadele yönteminde, böcekler üzerinde toksik etki yapan proteinlerin sentezinden sorumlu genler bitkilere aktarılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan genler doğal ve sentetik *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)  $\delta$ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan *crystalline* (*cry*) genleridir. Bunun yanında insektisidal etki gösteren proteinler içerisinde çeşitli proteinaz inhibitörleri,  $\alpha$ -amilaz inhibitörleri, lektinler, kitinaz, kolesterol oksidaz enzimi ve avidinleri de saymak mümkündür. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) gram pozitif bir bakteridir ve ilk olarak 1901 yılında Ishiwata tarafından ipek böceği (*Bombyx mori*) larvalarında keşfedilmiş ve *Bacillus sotto* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1911'de bir un güvesi (*Ephetia kuhniella*) popülasyonundan Berlier tarafından yeniden izole edilerek karakterize edilmiştir. Bu bakteriler sporülasyon esnasında insektisidal etki gösteren sınırlı konukçu profiline sahip, delta-endotoksin, Cry toksin veya insektisidal Cry proteinleri (ICP) olarak adlandırılan bazı kristalize yapılar oluşturmaktadır. Cry proteini üretebilen ilk *Bt* geni 1981 yılında Schnepf and Whiteley tarafından klonlandıktan sonra *Bt* geni taşıyan ilk transgenik bitkiler tütün ve domateste 1987 yılında bildirilmiştir. İlk *Bt* geni taşıyan transgenik ürünler 1995 yılında piyasaya çıkmıştır. Bu ürünler, sırasıyla *cry1Ab*, *cry1Ac* ve *cry3A* genlerini içeren mısır, pamuk ve patates bitkileridir. Bugün ticari olarak *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Fa*, *cry3Bb*, *cry34Ab*, *cry35Ab* genlerini içeren mısır, *cry1Ac* ve *cry2Ab* genlerini içeren pamuk ile *cry3Aa* genlerine sahip patates ticari çeşitleri piyasada bulunmaktadır. Proteinaz inhibitörleri (PI), birçok bitki türünde doğal olarak bulunan, protein yapısında olan ve bitkilerin doğal savunma mekanizmalarında yer alan moleküllerdir (Ryan 1990). Böcekler serin, cysteine, aspartik gibi farklı proteinaz enzimleri içermekte olup, bu enzimler gıda olarak alınan proteinlerin sindirilmesinde ve böceklerin normal büyüme ve gelişmesinde hayati rolü olan aminositlerin salınmasında görev almakta ve Coleopterlerde özellikle cystein proteazları dominanttır. Böceklerle dayanıklı transgenik bitkiler elde etmek için farklı orijinlere sahip proteinaz inhibitörlerinin kullanıldığı değişik araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Lektinler çoğu bitkide bulunan ve glikoprotein, glikolipid ve polisakkaritlere bağlanma özelliği gösteren proteinlerdir. Lektinler kardelen, bezelye, buğday, soya, sarımsak, tatlı patates, nohut ve yerfıstığı gibi birçok bitkinin tohum ve depo organlarında bulunmaktadır. Lektinlerin böcekler üzerinde toksik etki yaptığı gözlenmiş ancak bu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, lektinlerin böcek orta bağırsağındaki epitel hücreler üzerinde

bulunan bazı karbonhidrat moleküllerine bağlanarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Değişik organizmalardan izole edilen bazı lektinlerin Homoptera, Coleoptera, ve Lepidoptera familyasına dahil böceklere dayanıklılık sağlamaktadır. Lektin genleri aktarılmış transgenik bitkiler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda en yaygın kullanılan lektinin *Galanthus nivalis*'ten izole edilen GNA olduğu gözlenmektedir. Alfa-amilaz enzimi, böceklerin sindirim sisteminde önemli işlevi olan bir enzimdir. Enzimin sentezlenmemesi durumunda böceklerde bazı sindirim bozuklukları gözlenmekte ve besin yetersizliğinden böcekler ölebilmektedir. Glikoprotein yapısında olan bu inhibitörler ( $\alpha$ AI) bazı baklagil tohumlarında bol miktarda bulunmaktadır. İlk  $\alpha$ AI dizisi Moreno ve Chrispeels (1989) tarafından fasulyeden elde edilmiştir. Elde edilen dizinin fonksiyonel bir  $\alpha$ AI üretebildiği, aynı araştırmacı tarafından genin tütüne aktarılması ile gösterilmiştir. Yürütülen bu araştırmalar,  $\alpha$ AI'nın özellikle Bruchidae familyasına ait böceklerde etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Chrispeels 1997). Fasulyeden izole edilen  $\alpha$ AI geni tohuma özgü ifade sağlayan bir promotor bölgesinin kontrolü altında bezelyeye aktarılmış ve elde edilen transgenik tohumların *Callasobrucus maculatus*'a karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Shade vd. 1994). Genin kullanımının artması özellikle baklagil tohumlarında büyük sorun olan *Bruchus* cinsine bağlı böceklerin mücadelesinde önem arz etmektedir. Doğrusal bir homopolimer olan kitin önemli bir yapısal molekül olmanın yanı sıra, böceklerde peritrofik zarların yapısında da bulunmaktadır. Birçok farklı organizmada yapısal işlevi olan kitin doğada en yaygın rastlanan biyopolimerlerdir. Kitinazlar kitin homopolimerleri üzerinde hidrolitik aktivite gösteren enzimlerdir. Kolesterol oksidaz, farklı mikroorganizmalar tarafından üretilebilen bir enzim olup, hidroksiteroidlerin ketosteroidlere ve hidrojen ve hidrojen peroksida oksitlenmesini katalizlemektedir. Kolesterol oksidazın insektisidal etkisi ilk defa Purcell vd. (1993) tarafından bildirilmiş ve aynı enzimin Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Orthoptera ve Homoptera üzerinde etkin olduğunu göstermişlerdir. Enzimin ölümcül etki mekanizması üzerinde yürütülen araştırmalar ise, ölümcül etkinin böcek orta bağırsağındaki epitel hücrelerinin zarlarında kolesterolün oksidasyonu sonucunda oluşan zarar sonrası epitel hücrelerinin patlamasından kaynaklandığını göstermiştir. Gerçekleştirilen bu araştırmalar sonucunda, enzimin sentezinden sorumlu genin izole edilerek böceklere dayanıklı transgenik bitkilerin eldesin de kullanılabileceği ortaya konmuştur. Avidin, tavuk yumurta beyazında bulunan bir glikoproteindir. Biotin tüm yaşam formları için gerekli olan bir koenzimdir. Böcekler avidin veya streptavidin ile beslendiğinde bu proteinler biyotinle bağlanmakta ve böceklerde biyotin eksikliğinden kaynaklanan büyüme eksikliği ve ölüme neden olmaktadır (Öktem 2001). Bu

genlere ilave olarak, yaygın olmamakla birlikte, böceklerle karşı dayanıklılık kazandırılması yönünde alternatif çalışmalarda yapılmaktadır. Örneğin *Bacillus* suşlarından izole edilen VIP olarak adlandırılan insektisidal proteinler, örümcek ve akrep gibi böceklerden elde edilen genler, alkaloid, terpenoid, saponin gibi sekonder metabolitleri kodlayan genlerin elde edilip gen aktarımında kullanılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Hidler ve Boulter 1999).

Dünya ve Türkiye’de fasulye ve bazı bitkilerde yapılmış olan *in vitro* bitki rejenerasyon, *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı ve böceklerle dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesine yönelik kaynak özetleri aşağıda verilmiştir.

Fontana vd. (1993), nohut apikal meristemlerini LBA4404 (NPT-II ve GUS geni içeren) bakteri hattı ile inoküle etmişlerdir. Ko-kültüvasyondan sonra eksplantları kanamisin içermeyen ortamda 3 hafta tuttuktan sonra 50 mg/l kanamisin içeren ortama alarak transgenik adayı sürgünleri belirlemişlerdir. Kanamisin içeren ortamda köklenme olmadığı için köklendirme işlemini kanamisin içermeyen ortamda gerçekleştirmişlerdir. Transformasyon frekansını %4 olarak belirlemişlerdir.

Barna ve Wakhlu (1994), olgunlaşmamış nohut (*Cicer arietinum* L.) yapraklarından oluşan kalluslardan organogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. En iyi kallus oluşumunu, 10 µM NAA ve 5 µM BAP içeren besin ortamından kaydetmişlerdir. Gövde dokularının en alt kısımlarından alınan eksplantlar için en iyi sürgün rejenerasyonu ortamının ise 10 µM BAP ve 0.1 µM IBA içeren MSO besin ortamı olduğu bildirilmiştir. En iyi kök oluşumunu ise, 1 µM IBA içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Chowrira (1995), nohut, fasulye, mercimek ve börülce boğum meristemlerinin DNA elektroporasyonu sonucu bu bitkilerin doku ve dölllerinde *GUS* markör geninin görünüşünü izlemişler ve transgenik dokular tespit ederek *in vitro* doku kültürü metotları uygulamadan yeni transgenik bitkiler elde etmişlerdir.

Lepel vd. (1995), *Chrysomela tremulae*’a (C.) larvalarında ana sindirim proteazını cysteine proteaz olarak belirlemişler ve oryzacystein-I (OCI)’in *in vitro* da cystein proteazlarının aktivitesini önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. OCI geni akrarılmış transgenik

kavaklarda bu böceğe karşı toksisite elde etmişlerdir.

Stewart vd. (1996), kolza (*Brassica napus*)’da *cryIAc* (35S promotoru tarafından kontrol edilen) geni içeren *A. tumefaciens* ile gen aktarımı yapmışlardır. 57 adet transgenik aday bitkide Southern analizi sonucunda transgen kopya sayısını 1-12 arasında belirlemişlerdir. Toplam çözünebilir protein içerisinde ekspresyon seviyesini % 0-0.4 arasında olduğunu gözlemişler. Bu bitkilerin *Plutella xylostella* ve *Trichoplusia ni*’ye karşı tamamen dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

Kar vd. (1997), nohutta *Heliothis armigera*’ya dayanıklı transgenik bitkiler elde etmek amacıyla CaMV35S promotor ve NOS terminatör dizileri tarafından kontrol edilen *cry IAc* geni ve seleksiyon amacıyla NPT-II genini içeren plasmidler ile bitkilere gen bombardımanı yapmışlardır. Eksplantlar kanamisin içeren ortamda kültüre alınmıştır. 3 hafta 25 mg/l kanamisin içeren ortamda tutulan sürgünlerden yeşil kalanlar daha sonra 50 mg/l kanamisin içeren ortama alınmıştır. Kanamisine dayanıklı sürgünlerde moleküler analizler yapılmış, yapılan analizler sonucunda fonksiyonel *cry IAc* geni içeren bitkiler ortaya konmuştur. *CryIAc* geni ekspre olan nohut bitkisinde *Heliothis armigera* larvalarının gelişiminin engellendiği bildirilmiştir. NPT-II geninin transgenik sürgünlerin seçimi için etkili bir markör olduğu belirtilmiştir.

Gatehouse vd. (1997), GNA lektin genini kullanarak elde ettikleri transgenik patateslerde ekspresyon seviyesini %2 olarak belirlemişlerdir. *Lacanobia oleracea* (L.) yaptıkları deneylerde GNA geni bulunan bitkilerde yapraklardaki zararın %50 azaldığını, böcek popülasyonunun %45–65 oranında azaldığını bildirmişlerdir

Dattla vd. (1998), çeltikte değişik promotorların *cryIAb* geni ekspresyon seviyesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla konstitütif 35SCaMV, Aktin -1 spesifik süngerimsi doku ve PEPC (pepcarboxylse) promotorları kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre 35S promotoru Aktin-1’den daha etkili bulunmuştur. PEPC promotoru kullanılarak elde edilen bitkilerde *cryIAb* proteini seviyesi konstitütif promotorlarla karşılaştırıldığında oldukça etkili bulunmuştur. Fakat süngerimsi doku promotoru ile elde edilen bitkilerde saptaki *cryIAb* proteini seviyesinin düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen 800 bitkiden 81 tanesi *Scirpophaga incertulas* larvalarına karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Christov vd. (1999), tütünde yaptıkları çalışmalarda yeşil doku spesifik (*rbcS*) promotorla kontrol edilen yabancı tip ve sentetik *cryIC* (LBA 4404 bakterisi hattı kullanılmış) genleri ile transgenik bitkiler elde etmiş ve bu bitkilerin *Spodoptera litura*'ya dayanıklılığını belirlemişlerdir. Sentetik *cryIC* geni yabancı tipten daha etkili bulunmuştur. Ayrıca elde edilen 23 tek bitkide 3 gün içerisinde % 80–100 arasında ölüm oranı gözlenmiştir. %100 ölüm oranı elde edilen RSC23 bitkisinde yaprakta toplam çözünebilir protein içerisinde *cryIC* oranı % 0.01 bulunmuştur. Kökte hiç *cryIC* proteinine rastlanmazken saptaki protein miktarı yapraktan daha az bulunmuştur.

Yan vd. (2000), soya fasulyesinde gen aktarımı frekansı üzerine olgunlaşmamış zigotik kotiledon büyüklüğü, *Agrobacterium* yoğunluğu, ko-kültüvasyon süresi ve seleksiyon rejiminin etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla, EHA 105 (ST-LS1 intron içeren GUS geni ve higromisin fosfotransferaz geni) bakteri hattını kullanmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, 5 mm'den küçük zigotik kotiledonlar ko-kültüvasyondan sonra hemen ölmüştür. Bakteri yoğunluğu arasında bir farklılık gözlemlenmemişlerdir. 4 gün ve üzerindeki ko-kültüvasyon süresi kotiledonların canlılık oranını ve embriyogenik potansiyelini azaltmıştır. Direk yüksek dozda (25 mg/l) seleksiyon ortamı yerine öncelikle düşük dozda (10 mg/l) sonra yüksek dozda higromisin uygulaması daha etkili bulmuşlardır. Bu çalışma sonucunda transformasyon frekansı %0.03 olarak belirlemişler ve döllerde 3:1 Mendel açılımını gözlemlenmişlerdir.

Karakaya ve Özcan (2001), değişik doğrudan gen aktarım teknikleri geliştirilmesine rağmen, *Agrobacterium tumefaciens*'in birçok bitki türüne yabancı genlerin aktarımında tercih edildiğini ve *A. tumefaciens*'in en büyük dezavantajının konukçusunun sınırlı olması olarak bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada farklı fasulye çeşitlerinin doğal tip *A. tumefaciens*'in A281 hattına karşı duyarlılıklarını belirlemişlerdir. 4F–2409, Karacaşehir–90, Akman–98 ve Eskişehir- 855 çeşitleri test edilen diğer çeşitlere oranla daha yüksek oranda ur oluşumu, Afyon–3, IVD–10, Göynük–98, Yunus–90 ve Şehirli–90 çeşitlerinde ise hiç ur oluşumu gözlenmediklerini bildirmişlerdir. Bitkilerin hipokotil ve epikotil kısımlarında ur oluşumu tespit etmişlerdir.

Naimov vd. (2001), Cry1 delta endotoksinlerinin genellikle Lepidopterler üzerinde etkilidir. Ancak *cryIBa* ve *cryIIa*'nın düşük düzeylerde de olsa *Leptinotarsa decemlineata* gibi Coleopterler üzerinde etkili olduğunu ve bunların nüfus sahası arasında yapılacak

hibritlemelerle elde edilen yeni genlerde Coleopterlere karşı daha fazla dayanıklılık elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu amaçla yaptıkları hibritlemeler sonucunda elde edilen 3 yeni gen *SN15(Ia/Ia/Ba)*, *SN16 (Ba/Ba/Ia)* ve *SN19 (Ba/Ia/Ba)* *L. decemlineata* karşı *cryIIa* ve *cryIBa*'dan daha toksik bulunmuştur. *SN19* geni *cryIIa*'dan 7 defa, *cryIBa*'dan 21 defa daha toksik bulunmuştur ve bu genin Coleopterlerle mücadelede *cry3A*'ya alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Khawar ve Özcan (2002), MS besin ortamında gelişen Ali Dayı mercimek çeşidine ait 10 günlük sürgünleri keserek, köklendirme için 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamına aktarmışlardır. Dört hafta sonra en yüksek köklendirme oranını (%25), sürgün başına ortalama kök sayısını (7.87 adet) ve ortalama kök uzunluğunu (7.18 cm) 0.25 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamından elde etmişlerdir. Ancak, diğer IBA uygulamalarında kök oluşumunu uyaramamışlardır.

Naimov vd. (2003), hibrid SN19 genini kullanarak patatese gen aktarımı yaparak ve *Leptinotarsa decemlineata* (C.) larva ve erginleri ile *Ostrinia nubilalis* ve *Phthorimaea operculella* (L.) larvalarına karşı dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. *SN19*, *cryIBa* (domain I ve domain III, Coleoptera takımı üzerinde etkili) ve *cryIIa* (domain III, Lepidoptera takımı üzerinde etkili) hibrididir. Hibrid SN19 geni aktarılmış bitkilerde toplam çözünebilir protein çerisinde toksin miktarı %0.025 olarak bulunmuştur. Domain II'de 28 adet tek nükleotide modifikasyon yapıldığı zaman toksin oranı %0.25'e çıkmıştır. *Leptinotarsa decemlineata* (C.) larva ve erginleri ile *Ostrinia nubilalis* ve *Phthorimaea operculella* (L.) larvaları ile yapılan bioasslerde %100 ölüm oranı elde etmişlerdir.

Çevirmen ve Akbulut (2003), bu çalışmada fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) partikül bombardımanı metoduyla transformasyon ve rejenerasyon şartlarını optimize etmeye çalışmışlardır. Rejenerasyon koşullarının optimizasyonu, bitkilerde genetik transformasyonun başarısı için gereklidir. Bununla birlikte tane baklagillerin rejenerasyonu oldukça zordur. Rejenerasyona en iyi cevap veren genotipi tespit etmek amacıyla doku kültürü çalışmalarında dokuz farklı fasulye çeşidi (Eskişehir-855, Şahin-90, Yunus-90, Önceler-98, Aras, Akdağ, Göynük-98, Zülbiye ve Akman-98) ve standart MS-Gamborg ortamı kullanılmıştır. Kazein, glutamin ve STS-AgNO<sub>3</sub>'ün doku kültürü ortamına eklenmesi rejenerasyon koşullarını önemli derecede iyileştirmiştir. Farklı konsantrasyonlarda farklı sitokininler (Benzylaminopurine, thidiazuron, kinetin ve zeatin ribozid) ve onların çeşitli kombinasyonları embriyonik uçlardan

çoklu sürgün uyarımı için kullanılmıştır. Test edilen sitokinler arasında çoklu sürgün rejenerasyonu için (eksplant başına en iyi 12 sürgün) en iyi ortamın 5 mg/l BAP, 0.5 mg/l TDZ, 1.0 mg/l kinetin, 0.5 mg/l zeatin ribosid kombinasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Türkiye’de yaygın tarımı yapılan fasulye çeşitlerinde transformasyon etkinliğini optimize etmek amacıyla üç farklı basınçla atış (30, 35, 40 bar), üç farklı negatif çember basıncı (-720, 760, 800 mmHg), iki farklı mikroprojektil uçuş mesafesi (9 ve 12 cm), iki farklı transfeksiyon ve DNA sarıcı ajan (spermidine ve lipofektamin), iki farklı mikroprojektil (altın, tungsten) ve iki farklı DNA konsantrasyonu (1 ve 2 mg/ml) denenmiştir. Akman-98 çeşidi, rejenerasyona en iyi cevabı vermesi nedeniyle transformasyon çalışmaları boyunca kullanılmıştır. Transformasyonun etkinliği geçici GUS aktivitesine bakılarak belirlenmiştir. GUS ifadesinin odakları her muamele için 10 embriyoda sayılmıştır. Denemeler arasındaki önemlilik farklarını belirlemek için ANOVA metodu uygulanmıştır. Sürgün uçları, 30 g l-1 sukroz, 5.45 g l-1 agar (w/v), BA ve IBA in farklı kombinasyonlarının bulunduğu MS besi ortamında çoğaltılarak ideal kültür ortamı tespit edilmiştir. Çalışmada, olgun tohumlarından *in vitro* ortamda çimlendirilen 3 haftalık fideler, anaç olarak kullanılmış ve anaç kültürü için ideal besi ortamı belirlenmiştir. Aşılama, steril kabin içerisinde keskin bir bisturi yardımı ile anacın tepesi düz bir şekilde kesilmiş ve tam ortasından dikey bir yarık yapılmıştır. Aşı kalemi olarak kullanılan mikro çeliklerin uçları (‘V’) şeklinde sivriltilerek, anaçta açılan yarığın içine dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Aşılama, BA ve IBA in farklı kombinasyonlarının bulunduğu MS besi ortamında kültüre alınarak 25 ± 2 °C ve 12 saat fotoperiyodun sağlandığı büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Kültüre alınan eksplantların büyük çoğunluğunda, yüksek oranda aşı kaynaşması ve yeni sürgün oluşumu elde edilerek sonuçlar rapor edilmiştir. Mikro aşı fideler köklendirilerek toprağa başarılı bir şekilde adaptasyonu sağlanmıştır.

Çöçü vd. (2003), yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 8 ayrı fiğ çeşidinde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerini değişik oranlarda büyüme düzenleyiciler içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden en yüksek sürgün rejenerasyonu %95 ile Kubilay çeşidinden 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamından; eksplant başına en fazla sürgün 9.47 adet ile Sarıelçi çeşidinden 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında ise hiç sürgün rejenerasyonu elde edememişlerdir. Gelişen bu sürgünleri daha sonra, keserek 2.5 mg/l IBA içeren MSO besin ortamında köklendirmişlerdir. Son olarak köklenen sürgünler saksılara aktarmışlardır.

Khawar vd. (2004), mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) gen aktarımına uygun hızlı ve etkili bir sürgün rejenerasyon sistemi geliştirmek için yürüttükleri bu çalışmada TDZ'nin en aktif sitokinin benzeri bileşiklerden olduğunu ve birçok bitki türünde sitokininlerden daha yüksek oranlarda sürgün rejenerasyonu sağladığını bildirmektedirler. Yaygın olarak üretimi yapılan mercimek çeşitlerinden Ali Dayı ve Kayı-91 çeşitlerine ait yaprak, gövde, gövde boğumu ve kotiledon boğum eksplantları farklı oranlarda TDZ içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kotiledon ve gövde boğumlarından, başlangıç kallus gelişimini takiben organogenesis aracılığıyla proliflik adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Yaprak ve gövde eksplantlarında ise kallus ve sürgün gelişimi gözlenmemiştir. DMSO, TDZ çözücüsü olarak kullanıldığında bitki dokularına ölümcül etki yapmış ve çalışmalarda TDZ %50 etanolde çözülmüştür. Kotiledon boğumları gövde boğumlarından daha yüksek sürgün rejenerasyon kabiliyetine sahip olmuştur. Her iki çeşitte de en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.25 mg/l TDZ içeren MS besin ortamlarında kotiledon boğumlarından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler (10–20 mm uzunlukta) 0.25 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş ve köklenen sürgünler son olarak kum içeren saksılara aktarılmıştır.

Barik vd. (2005), *Lathyrus sativus* bitkisinde *A. tumefaciens* ile gen aktarımını etkileyen faktörleri (eksplant tipi, büyüme devresi, hücre yoğunluğu, inokulasyon zamanı, ko-kültüvasyon zamanı, bakteri hattı ve ön inkübasyon) araştırmışlardır. Bu amaçla p35S GUS-INT binary vektörünü içeren LBA4404 ve EHA 105 bakteri hatlarını kullanmışlardır. En yüksek transformasyon frekansını 4 gün ön inkübasyona süresi, 10 dakika  $10^9$  hücre/ml bakteri yoğunluğu ile inokülasyon, 4 gün ko-kültüvasyon süresinden elde etmişlerdir. Bakteri hatları arasında transformasyon etkinliği bakımından bir farklılık bulamamışlardır. Transgenik bitkilerin seleksiyonu için en uygun kanamisin dozunu 100 mg/l, bakteri eliminasyonu için ise en uygun antibiyotik dozunu ise 500 mg/l sefotaksim olarak belirlemişlerdir. T1 bitkilerinde 3:1 Mendel açılımı saptamışlardır.

Han vd. (2005), *Artemisia annua*'da *A. tumefaciens* ile gen aktarımını etkileyen faktörleri (*Agrobacterium* hattı, eksplant tipi, önkültür, ko-kültüvasyon yöntemi ve periyodu) incelemişlerdir. *Agrobacterium* hattı olarak LBA4404 ve EHA105'i kullanmışlardır. EHA105'in bakteriyel kromozomları ve *vir* yardımcı plasmidi farklı olduğundan daha etkili bulunmuştur. Yaprak eksplantının *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı sap, hipokotil, kotiledon ve kökten daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Ön kültürün transformasyon

frekansına etkisi olmazken kokültüvasyonun gen transferine etkisi önemli bulunmuştur. 16 saatten düşük kokültüvasyon sürelerinde transgenik bitkiler elde edilememiş, çok uzun süreli kokültüvasyon süreleri ise aşırı bakteri büyümesi olduğundan bitki hücreleri için zararlı olmuştur. *A. annua* için uygun ko-kültüvasyon süresini 3 gün olarak belirlemişlerdir. Asetosringon *vir* genlerinin transkripsiyonunu arttırdığından gen transferinde etkili olduğu belirtilmiş ancak *A. annua*'da böyle bir etki görülmemiştir. 10 mg/l kanamisin konsantrasyonunun transgenik bitkilerin seçiminde etkili olduğu bildirilmiştir. Gen aktarım frekansını %20 olarak belirtmişlerdir.

Uranbey vd. (2005), tütünde gen aktarımı üzerine ko-kültüvasyon sıcaklığının (18–20 °C), periyodunun (24–96 saat) ve ortamının (katı-sıvı) etkisini belirlemek amacıyla yaprak disklerini GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattı ile inoküle etmişlerdir. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra kanamisine dayanıklı sürgünler kesilerek 100 mg/l kanamisin ve 250 mg/l augmentin içeren ortamda köklendirilmiştir. Transgenik aday bitkiler GUS ve PCR analizi ile belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre en yüksek transformasyon frekansının 22–24 °C'de 48 saat sıvı ortamda ko-kültüvasyona bırakılan yaprak disklerinde elde edildiği bildirilmiştir.

Mutasim vd. (2005), *A. tumefaciens* aracılığıyla Adzuki fasulyesine [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi] higromisin fosfotransferaz (*hpt*), yeşil floresan protein (*sgfp*) ve posfonitrisin asetiltransferaz (*bar*) genlerini akatararak transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada *A. tumefaciens*'in *pZHBG* içeren EHA105 hattı ve 210 adet epikotil eksplantı kullanılmıştır. Kokültüvasyon ortamına 100 mM asetosringon ve 10 mg/l of BA ilave edilmiştir. 15 mg/l higromisin içeren ortamdan seçilen sürgünler köklenme ortamına aktarılmıştır. Tespit edilen 31 adet transgenik bitki toplam bitki sayısının %14'dür. Transgenik bitkiler PCR ve southern blot analizleri ile tespit edilmiştir. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) analizi ile de *bar* ve *hpt* genleri tespit edilmiştir. Ayrıca, *sgfp*- pozitif transgenik bitkilerinde de *bar* geni tespit edilmiştir.

Sağlam (2005), fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) Aras, Eskişehir–855 ve Şehirali–90 çeşitlerinin rejenerasyon, köklendirme, *in planta* ve *in vitro* koşullarda *Agrobacterium*'un *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes*'in değişik hatlarını kullanarak gen aktarımı kabiliyetini incelemiştir. Adventif sürgün rejenerasyonu amacıyla apikal meristem, petiol, kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları 2,4-D ve kinetin içeren MS besin ortamlarında kültüre

alınmıştır. Petiol ve hipokotilden hiç sürgün rejenerasyonu gözlenmezken, apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarından az sayıda sürgün gözlenmiştir. Sürgün gelişimini hızlandırmak amacıyla 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ortamına alt kültüre alınmış, ancak bunlardan gelişmeler kaydedilmemiştir. Sürgün rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyolar 0.05–0.15 mg/l TDZ ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Köklenme sağlamak için, rejenere olan sürgünler 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 mg/l IBA içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. IBA oranının artışına paralel olarak köklenmenin arttığı gözlenmiştir. *A. tumefaciens*'in A281 hattı ile çalışma sonucunda incelenen çeşitler gen aktarımına uygun görülmüştür. Ancak onkogenik olmayan hatlarla yapılan çalışmalarda bitkilerin kanamisinmonosülfata dayanıklı olduğu halde *GUS* pozitif olmadığı tespit edilmiştir.

Sağlam vd. (2005a), gen aktarım çalışmalarında *in vitro* gen aktarım yöntemleri kadar *in planta* gen aktarım yöntemlerinin de yaygın olarak kullanıldığını fakat müdahale edilemeyen bir takım çevresel faktörlerin olumsuz etkilerinden dolayı çalışma sonuçlarının her zaman beklenen kadar başarılı olamadığını bildirmektedirler. Fasulyenin Aras, Eskişehir–855, Şehirli–90 çeşitlerinin tohumları tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak ekilmiş ve akşam güneş batmadan yarım saat önce her üç çeşidin açılmamış ve açılmak üzere olan çiçekleri el ile açılıp *A. tumefaciens*'in nononkogenik GV2260, EHA105, LBA4404 bakteri hatları ile aşılansın ve aşılansın her bir çiçek aydıngeer kağıtları ile dışarıdan tozlaşmayı engellemek amacıyla muhafaza altına alınarak etiketlenmiştir. Hasat zamanı olgun baklalar hasat edilerek baklalar içerisindeki tohumlar iklim odasında saksılar içerisine ekilmiş ve gelişen bitkiler ile *GUS* testi yapılmıştır. *GUS* testi sonucunda *in planta* polen yoluyla *Agrobacterium*'un nononkogenik hatlarıyla transformasyon gerçekleştirilemediği görülmüştür. *A. tumefaciens*'in A281 ve *A. rhizogenes*'in 15834 onkogenik hatları seyretilmeden tarladaki bitkilerin üst kısımlarının koltukaltı bölgelerine enjektör yardımıyla enjekte edilmiştir ve bu kısımlarda, üzerine hangi bakteri hattı ile enjekte edildiği yazılmış olan etiketler ile etiketlenmiştir. *A. tumefaciens*'in A281 hattı ile gövdelerin alt kısımlarına yapılan aşılama da hiç transformasyon gözlenmemiş fakat az da olsa tümör oluşumu tespit edilmiştir. Aynı şekilde *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile bitkilerin alt kısımlarına yapılan aşılama da sonuç gözlenmezken üst kısımlarda yaklaşık %20 oranında kök yerine küçük tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir.

Sağlam vd. (2005b), fasulyenin Aras ve Eskişehir-855 çeşitleri laboratuvar koşullarında çimlendirmişler ve dört yapraklı döneme geldiklerinde gövdelerini *A. tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı ve nononkogenik GV2260, EHA105 hatları ile aşılama sonucunda *A. tumefaciens*'in A281 hattı ile muamele edilmiş Aras ve Eskişehir-855 çeşitlerinde tümörler görülmüştür. Kökler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisine rastlanmamış ve köklerin normal gelişimine devam ettiği görülmüştür. Aynı şekilde her iki çeşidin *A. tumefaciens*'in non-onkogenik GV2260 ve EHA105 hatları ile aşılması sonucunda bitkilerin yapraklarında mozaiklik ve sararma görülmüştür. Bunlar *GUS* testine tabi tutulmuş fakat *GUS* pozitif sonuçlar elde edilememiştir. Bitkiler dört yapraklı aşamada iken *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile de aşılama ve bitkilerin gövdelerinde kökler görülmüştür. Bakteri aşılama kontrol bitkilerinde köklenme görülmemiştir. *A. tumefaciens*'in onkogenik hatları ile bitkilerde tümör ve kök oluşumu *in planta* koşullarda gen aktarılabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları fasulye bitkisinde genetik mühendisliği için gerekli alt yapıyı oluşturmaktadır. Onkogenik ve işaret genlerinin aktarılması sırasında kullanılan yöntemlerde tarımsal ilaçlara, soğuğa, hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin fasulye bitkisine aktarılması yolunda da izlenebilecektir.

Chen vd. (2005), çeltiğe *cry2A* genini *Agrobacterium* aracılığıyla aktarmışlardır. Yapılan PCR analizinde 102 adet tek bitkiden 71 tanesinin *cry2A* genini içerdiğini belirlemişler. Transgenik bitkilerde *Cry2A* protein miktarı 9.65 – 12.11 µg/g arasında değişim göstermiştir. Transgenik bitkilerin Lepidoptera takımına ait çeltik zararlılarına karşı önemli ölçüde koruma sağladığını gözlemişlerdir.

Zaidi vd. (2005), tütünde ST-LS1 (sap ve yaprak spesifik) promotörünün *cry2Aa2* geninin değişik dokulardaki ekspresyon seviyesi ile *Heliothis virescens* larvalarına karşı etkisini araştırmışlardır. Toplamda 30 adet kanamisine dayanıklı bitki elde etmişler bunun 27 tanesinin PCR sonuçları pozitif bulunmuştur. Southern hibridizasyonu sonucunda 2AST(A), 2AST(E), 2AST(F), 2AST(G) bitkilerinde sırasıyla *cry2Aa2* geni kopya sayısı 7, 2, 4 ve 1 olarak gözlenmiştir. Protein analizleri sonucunda yaprakta toplam çözünebilir protein içindeki toksin miktarını sırasıyla % 0.16, 0.21, 0.12 ve 0.03 iken saptı sırasıyla %0.01, 0.012, 0.009 ve 0.004 olarak belirlemişlerdir. Bioassay sonuçlarında ise yaprakla beslenen larvalarda ölüm oranı % 100, sapla beslenenlerde sırasıyla %41, 44, 35 ve 22, kökte ise %1–5 olmuştur. Yeşil dokularda belirlenen bu değişik protein oranlarının bitkiye zarar veren böceklerin devamlı

toksine mahzur kalma durumunda kazanacakları dayanıklılığa karşı engel oluşturabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Wang vd. (2005), mısır bitkisinde bir Lepidopter olan *Ostrinia furnacalis*'e dayanıklı bitkiler elde etmek amacıyla GNA lektin geninin kullanmışlardır. Çözünbilir protein içerisinde %0.24 GNA ekspresyonu gösteren bitkilerin *Ostrinia*'ya karşı dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Dita vd. (2006), baklagil bitkilerinin birkaç zararlıya karşı hassas olduğunu, verimde büyük kayıplara yol açtıklarını ve bundan dolayı zararlılara dayanıklılığı başarmada,  $\alpha$ -amilaz inhibitör genleri, proteaz inhibitör genleri, *Cry* genleri ve lektin genlerinin baklagillere transfer edilecek genler olduğunu bildirmişlerdir.

Estrada-Navarrete vd. (2006), fasulye bitkisi ve onun yabancı akrabalarından olan *P. coccineus*, *P. lunatus* ve *P. acutifolius*'da gen aktarımı çalışmaları yapmışlar ve %75–90 arasında transformasyon görmüşlerdir. Marker gen olarak 35S promotor, yeşil floresans protein ve  $\beta$ -glukuronidaz kullanmışlardır. *Rhizobium* ile muamele sonucunda transgenik ve normal bitkilerin köklerinde meydana gelen azot fiksasyon oranında değişiklik görülmediği bildirmişlerdir.

Naimov vd. (2006), patatesten SN19 hibrid geninin ekspresyon seviyelerini ölçmüşler ve bitkilerde SN19 ekspresyon seviyesinin %0.06-%0.15 arasında değişim gösterdiği bulunmuştur. Böylelikle önemli patates zararlıları ile etkin bir mücadele yapılabileceğini belirtmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Bitki Materyali

Bitki materyali olarak kullanılan Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitleri tohumları Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü/Eskişehir'den temin edilmiştir.

#### 3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.1) ile %3 sukroz ve %0.7'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında bidistile su kullanılmış olup, deneme ihtiyacına göre besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, TDZ, NAA, IBA ve Picloram) ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlanmıştır. 118 kPa basınç altında ve 121 °C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonları uygun çözücülerde çözüldükten sonra saf su ile istenen miktarlarda ve oranlarda hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında bulunan mineral maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda bulunan Makro Elementler	Kons. (mg l <sup>-1</sup> )	Ortamda bulunan Mikro Elementler	Kons. (mg l <sup>-1</sup> )	Ortamda bulunan Vitaminler	Kons. (mg l <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	KI	0.83	Myo-Inositol	100.000
KNO <sub>3</sub>	1900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	Nicotinic Acid	0.500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.300	Pyrotinic Acid	0.500
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600	Thiamine-HCl	0.100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	Glycine	2.000
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025		
		CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025		
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.850		
		Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.250		

Çizelge 3.2 Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama Koşulları (°C)
BAP	1 N NaOH	+4
TDZ	Etanol	+4
NAA	1 N NaOH	+4
IBA	1 N NaOH	+4
Picloram	Metanol/DMSO	+4

Tüm kültürler beyaz floresan ışığında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24 °C’de tutulmuştur. Sterilizasyon ve tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Her muamele için, içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü petri kutuları (100 x 10 mm) ya da magentalar (GA7) kullanılmıştır. Ortamların, magenta kaplarının ve saf suyun sterilizasyonunda 118 kPa basınç, 121 °C ve 20 dakikaya ayarlı otoklav kullanılmıştır. Petri kutuları 160 °C’de 2 saat etüvde steril edilmiştir.

### 3.3 Tohumların *In vitro* Koşullarda Sterilizasyonu

Karacaşehir–90 ve Akman–98 fasulye çeşitlerin tohumları yüzey sterilizasyonu amacıyla ticari çamaşır suyunun (Ace) %20’lik dozu, tohumlara oda sıcaklığında her biri 3 farklı sürede (5, 10, 20 dk.) uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5’er dk. 3 kez durulanmıştır. Steril edilen 200’er adet tohum yine steril petri kapları içerisinde %3 sukroz içeren ve %0.7 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında 24±2 °C’de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir. Karacaşehir–90 çeşidinin çimlenmesinde çamaşır suyunun olumsuz etkisi olduğu için bu sorunu aşmak amacıyla farklı denemeler kurulmuştur. Çamaşır suyunun asıl pH’sı yaklaşık 12 değerindedir. Birinci denemede pH’lar 12, 10, 8, 6 olarak ayarlanmış ve tohumlar %5’lik çamaşır suyu (Ace®)’nda 5 dk. bekletildikten sonra 5’er dk. 3 kez durulama yapılarak sterilizyon sağlanmıştır. Su sıcaklığının çimlenme üzerindeki etkisine bakmak amacıyla oda sıcaklığı (25–26 °C) ve 4 °C olmak üzere iki farklı su sıcaklığı test edilmiştir. Çamaşır suyunun dozu %5, 10 ve 20’ye ayarlanmıştır. İkinci denemede hidrojen peroksit ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> )’in %10, 20, 30, 40, 50 ve 60 oranları kullanılarak yine süre 5 dakika tutulmuştur. Üçüncü denemede ise filtre kağıtları kareler halinde kesilerek etüvde 160 °C 2 saat steril edilmiştir. Daha sonra %20 çamaşır suyu 5 dakika steril edilen tohumlar steril saf su ile nemlendirilmiş olan bu kağıtlar arasına sarılarak çimlendirmeye bırakılmıştır. Çamaşır suyu ve hidrojen peroksit ile tohum sterilizasyonunda manyetik karıştırıcı kullanılmamış ancak beher sterilizasyon süresince el ile karıştırılmıştır.

### **3.4 Tohum Canlılık Testi**

Değişik bitki tohumlarının canlılık tespiti için Anonymous (1999)'un önerdiği 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada fasulye tohumları 24 saat su içinde bekletilerek kabukları soyulmuş ve 1 g/l 2, 3, 5 trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içine konularak 24 saat sonra canlılık kontrolü yapılmıştır.

### **3.5 Eksplant Seçimi**

Steril edilen tohumlardan elde edilen 7–10 günlük bitkiciklerin apikal meristem, yaprak, petiol, apikal meristem altı gövde, primer yaprak, kotiledon, kotiledon boğum eksplantları, olgunlaşmış embriyolardan alınan embriyonik eksen, plumula, radikula eksplantları, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolar ve kabukları uzaklaştırılmış olgunlaşmış iki kotiledon ile birlikte embriyo eksplantları kullanılmıştır.

### **3.6 Sürgünlerin Köklendirilmesi**

*In vitro* koşullarda gelişen fasulye sürgünleri 5–10 cm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril Magenta® kutuları içinde 2.00 mg l<sup>-1</sup> IBA içeren MS ortamda köklendirilmiştir (Sağlam, 2005). Transgenik aday bitkilerin köklendirilmesinde ise ortama ilave olarak 50 mg/l kanamisinmonosülfat ve 500 mg/l Augmentin eklenmiştir.

### **3.7 Elde Edilen Köklenmiş Bitkilerin Dış Şartlara Alıştırılması**

Elde edilen köklenmiş bitkilerin dış şartlara alıştırılması amacıyla iklim odasında ve iklim dolaplarında 24 ± 2 °C, 3000 lüks ışık 16 saat ışık fotoperiyodu ve %70 nem sağlanmıştır. Yaklaşık 1 hafta sonra nem seviyesi %40'a düşürülmüştür. Burada gelişen bitkiler normal tarla toprağının bulunduğu saksılara aktararak serada geliştirilmiş ve transgenik aday bitkilerden tohum elde edilmiştir.

### 3.8 Bakteri Materyali

Gen aktarımı denemelerinde bakteri materyali olarak 1 adet markör geni, 1 adet bar geni ve 11 adet farklı böceklere dayanıklılık genleri taşıyan toplam 13 farklı *A. tumefaciens* bakteri hattı kullanılmıştır. Kullanılan bütün bu bakteri hatları bitkisel seleksiyon amaçlı kanamisine dayanıklılığı sağlayan NPT-II genini taşımaktadır.

1 adet markör geni: *A. tumefaciens* GV2260 (p35S GUS-INT): NPT-II geni NOS promotor ve terminatör, GUS intron geni ise 35S promotor ve terminatör dizileri tarafından kontrol edilmektedir.

1 adet bar geni: *A. tumefaciens* LBA 4404 pRGGbar: GUS ve bar geni taşımaktadır.

11 adet farklı böceklere dayanıklılık genleri taşıyan: *A. tumefaciens* LBA 4404 bakteri hattı;

- pAc PRD (pRD400 içerisinde 35S promotor-NOS terminator dizileri tarafından kontrol edilen *cry Ac* geni),
- pC PRD (pRD400 içerisinde 35S promotor-NOS terminator dizileri tarafından kontrol edilen *cryIC* geni),
- pCST PRD (pRD400 içerisinde STLS-1 promotor-NOS terminator dizileri tarafından kontrol edilen *cryIC* geni),
- p2A PRD (pRD400 içerisinde 35S promotor-NOS terminator dizileri tarafından kontrol edilen *cry2Aa2* geni),
- p2AST PRD (pRD400 içerisinde STLS-1 promotor-NOS terminator dizileri tarafından kontrol edilen *cry 2Aa2* geni),
- *cry Lab* geni 35S promotor ve NOS terminator dizileri tarafından kontrol edilmektedir.
- PBIN19:SKTİ
- pROK2: OC1
- pBI121:GNA

*A. tumefaciens* AgLO bakteri hattı;

pMH65: SN19 (*crylBa/crylla* hibrid geni, Naimov vd. 2003 - Naimov vd. 2006, Chrysanthemum rubisco small subunit promotor and terminator, Outchkouruv vd. 2003),

pMH66: SN19 (*crylBa/crylla* hibrid geni, Naimov vd. 2003 - Naimov vd. 2006, kloroplast hedefli peptid içeren chrysanthemum rubisco small subunit promotor and terminator, Outchkouruv vd. 2003).

*CryIAc*, *CryIC*, *Cry2A* genlerini içeren *Agrobacterium* hatları Dr. Illimar Altosaar (Ottawa Üniversitesi, Kanada) tarafından, SN19 ve *CryIAb* genlerini içeren bakteri hatları Dr. Samir Naimov (Plovdiv Üniversitesi, Bulgaristan) tarafından, SKTI, OCI ve GNA genlerini içeren bakteri hatları ise Dr. Martin Edwards (Newcastle Üniversitesi, UK) tarafından sağlanmıştır.

### **3.9 Bakteri Kültürlerinin Saflaştırılması ve Büyütülmesi**

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılmasına, NA besin ortamında büyütülmüş olan bireysel kolonilerden başlanmış, tek koloniler steril lup ile alındıktan sonra gerekli antibiyotikleri içeren NB (Sigma Chemical Co St Lo, Mo) bakteri büyüme ortamına konulmuştur. Daha sonra bakteri kültürleri çalkalamalı inkübatörde 28 °C'lik sıcaklıkta 1 ya da 2 gün süreyle büyütülmüştür. Bu kültürler daha sonra gen aktarımında kullanılmıştır. Yeniden bireysel koloniler elde edebilmek için çok az miktarda bakteri kültürü agarlı besin ortamı üzerine steril bir lupla yayılmış, bu kültürleri içeren petri kutuları ters çevrilerek 28 °C'de inkübe edilmiştir. 2 gün içinde kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir. Herhangi bir bulaşmayı önlemek için bütün bakteriyel çalışmalar laminar flow kabin içerisinde yapılmıştır.

### **3.10 Antibiyotikler**

Bakteri büyüme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler (0.44µ) kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40–45 °C'ye düşmüş olan ortamlara ilave edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. GV2260 p35GUS-INT, proteinaz inhibitör ve GNA lektin genlerini taşıyan LBA4404 bakteri hatları büyütülürken ortama 50 mg/l rifamisin, 50 mg/l kanamisinmonosülfat eklenmiştir. *CryIAc*, *CryIAb*, *CryIC* ve *Cry2A* genlerini içeren LBA4404 bakteri hatları büyütülürken 50 mg/l kanamisinmonosülfat, SN19 genini taşıyan Agl0 bakteri hatları büyütülürken ise ortama 25 mg/l rifamisin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat eklenmiştir. Rifamisin metanol, kanamisinmonosülfat ise su ile çözüldükten ve filtre sterilizasyonundan sonra stok çözeltiler -20 C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3 *Agrobacterium* hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Kullanım oranları (mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücü	Saklama koşulları (°C)
Rifampisin	100	25	metanol	-20
Kanamisinmonosülfat	100	50	su	-20

Çizelge 3.4 Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları

Antibiyotikler	Stok solüsyon (mg/l)	Fasulyede kullanılan konsantrasyon	Çözücü	Saklama koşulları (°C)
Kanamisinmonosülfat	50	50	Su	-20
Augmentin*	100	500	Su	-20

\* Ko kültürasyondan sonra *A. tumefaciens*'in gelişimini engellemek için kullanılmıştır

### 3.11 Bakteri Kültürlerinin Kısa ve Uzun Süreli Korunması

*A. tumefaciens* kültürleri, seçici antibiyotikler içeren 5–10 ml NB (Lab-Lemco Powder 1.0 g/l; Yeast extract 2.0 g/l; Pepton 5.0 g/l; Sodyum klorit 5.0 g/l) ortamında bir gece 28 °C'de 150 devir/d (rpm)'da inkübatörde büyütülmüştür. Kısa süre için kullanılmak amacıyla NA (Nutrient Agar) içeren ortamda çizilerek 28°C'de büyütülmüştür ve daha sonra elde edilen bakteri kültürleri streç film ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4 °C'de 6 hafta korunmuştur.

Daha uzun süreli muhafaza işlemi eşit miktarda bakteri kültürü ve %40 gliserol içeren NB, 2 ml'lik kriyogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı bir şekilde dondurulup, -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür.

### 3.12 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi

Seçici rejenerasyon ortamında gelişen aday transgenik sürgünler, kanamisinmonosülfat içeren besin ortamında köklendirildikten sonra saksılara aktarılmıştır. Bu bitkilerin transgenik olup, olmadıkları aktarılan genlere göre histokimyasal *GUS* ve PCR analizi ile teyit edilmiştir.

### **3.12.1 Histokimyasal GUS analizi**

Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993)'ın tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, %0.1 Triton X – 100 ve 1 mM 5 bromo–4 chloro 3 indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 38 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular %100'lük alkolde yıkanarak mavi bölge belirlenmiştir.

### **3.12.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)**

#### **DNA izolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu, taze yaprak dokuları kullanılarak CTAB DNA ekstraksiyon protokolüne göre yapılmıştır. Transgenik aday bitkilerden alınan yaprak örnekleri -80 °C'de 15–20 dk bekletildikten sonra dondurularak ezilmiştir. Yaprak örneklerinin bulunduğu 1.5 ml'lik her bir tüp içine 50 µl buffer (1M Tris pH=8; 0.5M EDTA; 5M NaCl; ddH<sub>2</sub>O/Easy pure ) eklenerek karıştırılmış ve üzerine 550 µL buffer daha ilave edip yaprak örneklerinin tam olarak ezilmesi sağlanmıştır. 65 °C'de su banyosuna tüpler yerleştirilerek 40–60 dakika inkübe edilmiştir. 13000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine eşit hacimde kloroform eklenmiştir. Herhangi bir katı kısmın alınmamasına dikkat edilmiştir. DNA'lar toplandıktan sonra örnekler 15000 rpm'de 13 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz yeni tüpe alındıktan sonra üzerine 750 µl soğuk isopropanol eklenmiştir. Örnekler 1 saat 20 °C'de bekletildikten sonra 30 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatant döküldükten sonra soğuk %70'lik etil alkolden 200 µl eklenmiş ve 5 dakika 7000 rpm'de yeniden santrifüj edilmiştir. İçindeki alkol dökülerek DNA peleti iyice kurutulmuş ve 50 µl TE eklenerek çözülmüştür. Elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

#### **Primer dizileri**

Transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II, GUS genleri ile 35S promotor ve NOS terminatör dizileri PCR ile çoğaltılmıştır. Çizelge 3.5'de transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II, *GUS* ve SN19 genleri ile 35S promotor ve NOS terminatör bölgelerinin çoğaltımında kullanılan primer dizileri görülmektedir.

Çizelge 3.5 PCR işleminde kullanılan primer dizileri

Hedef	Baz dizilişi	Hedef büyüklüğü
NPT-II geni	F- TGG ATT GCA CGC AGG TTC TC R-CAA GAA GGC GAT AGA AGG CG	750 bp
NPT-II geni	F- TTG CTC CTG CCG AGA AAG R- GAA GGC GAT AGA AGG CGA	459 bp
GUS geni	F- CTC GAC GGC CTG TGG GAC TTC R- CTT TCG GCT TGT TGC CCG C	1400 bp
35S promotor	F-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A R- GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA	195 bp
NOS terminatör	F -GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG R- TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA	180 bp
SN19 geni	F- CCATGGCATCTAATAGGAAGAACG R- GTTATCGTAGTCATATGTGAAGAGATCAG	890 bp

### **PCR reaksiyon koşulları**

3 µl DNA,

2.5 µl 10X PCR tamponu,

3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM),

2 µl dNTP (10mM),

P<sub>1</sub> 2 µl, P<sub>2</sub> 2 µl,

0.2 µl Tag DNA polymerase

10.3 µl dH<sub>2</sub>O kullanılarak 25 µl toplam hacimde yapılmıştır. Reaksiyonlar, Biometra T-personal thermocycler aletinde aşağıdaki döngü koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

### **PCR Programı**

95 °C 10 dk

94 °C 1 dk

58 °C 1 dk

72 °C 2 dk (2- 39)

72 °C 10 dk

4 °C pause

### **Örneklerin agaroz jel elektroforezi**

PCR reaksiyonları %1'lik agaroz gel elektroforezi ile ayrılmıştır. Bunun için 1 g agaroz 100 ml 1XTBE (10.8 g/l Trizma-base, 5.5 g/l Borik asit, 4 ml 0.5 M EDTA pH=8) tamponunda mikrodalga fırında çözdürülmüş ve sıcaklığı 50–60 °C'ye düştüğünde DNA'nın UV'de görüntülenebilmesi için 5 µl etüdyumbromit eklenmiştir. Elektroforez işlemi 70 Voltta 1 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilmiştir.

### **3.13 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi**

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuş ve elde edilen veriler "SPSS for Windows 17" bilgisayar programı ile analiz edilmiştir. Uygulama ortalamaları gerektiğinde MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Fasulyede Yüzeysel Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında, kullanılan bitki kısımlarının yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli olan uygun dezenfektan türleri, konsantrasyonları ve kullanım süreleri birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle, bir sterilizasyon çalışmasında amaç en etkili ve en düşük seviyede dezenfektan dozunun belirlenmesidir (Bhatti, 2001). Yüzeysel sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat, antibiyotikler, biositler, sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu) yaygın olarak kullanılmaktadır (Özcan ve Özgen 1996). Bu çalışmada, yüzeysel sterilizasyonunda en uygun eksplant kaynağı olarak tarladan toplanan baklalar ve tohumlar tercih edilmiştir. Tarladan toplanan fasulye baklaları %50'lik çamaşır suyunda 20 dakika yüzeysel sterilizasyonu yapıldıktan sonra baklalar içinden çıkarılan tohumlar kullanılmıştır.

Fasulye bitkisinin Karacaşehir-90 ve Akman-98 çeşitlerinin tohumları yüzeysel sterilizasyonu için herhangi bir kırık, çizik, renk değişimi olmamış üniform tohumları seçilerek steril cam beher içinde sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Tohumlar %20 ticari çamaşır suyunda (Ace<sup>®</sup>, %5 NaOCl) 5, 10, 20 ve 30 dakika yüzeysel sterilizasyonundan sonra 5'er dakika üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Steril edilmiş tohumlar agar ile jelleştirilmiş MS ortamda kültüre alınarak 5 gün sonra bulaşıklık ve çimlenme oranının varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.1). Tüm ortamlarda, bulaşıklık bulunamamıştır ancak çeşitler arasında ve çimlenme oranlarında sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde farklılık saptanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda çeşitler ve sterilizasyon süresi arasında 0.05 düzeyinde etkileşim olduğu tespit edilmiş ve etkileşimin derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi dört sterilizasyon süresinde elde edilen çimlenme oranı Karacaşehir-90 çeşidinde %0.00-20.00 arasında değişmiştir. Tohumlarda çimlenme olmasına rağmen çimlenen bitkilerin belirgin şekilde hasar gördüğü tespit edilmiştir. Hasarın sebebini belirlemek amacıyla sterilizasyondan önce ve sonra tohumlara 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit testi uygulanmıştır. Test sonucuna göre sterilizasyondan önce tohumlar %100 canlı iken, sterilizasyondan sonra tohumlarda belirgin hasar tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Akman-98 çeşidinde ise çimlenme %50.00-96.66 arasında değişmiştir. En fazla (%96.66) çimlenme 5 dakika sterilizasyon süresinde elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Karacaşehir-90 çeşidinde meydana gelen zararı azaltmak ve çimlenmeyi sağlamak için farklı dezenfektan, süre, pH, materyal ve çimlenme suyu sıcaklıkları denenmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı sterilizasyon sürelerinde uygulanan %20'lik çamaşır suyunun tohumların bulaşıklık ve çimlenmesi üzerine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Çimlenme oranı (%)	
		K. O.	F
Çeşit	1	150.00	1.12*
Sterilizasyon süresi	3	2594.44	19.45**
Çeşit x sterilizasyon süresi	3	105.55	0.79*
Hata	16	133.33	
Genel toplam	23		

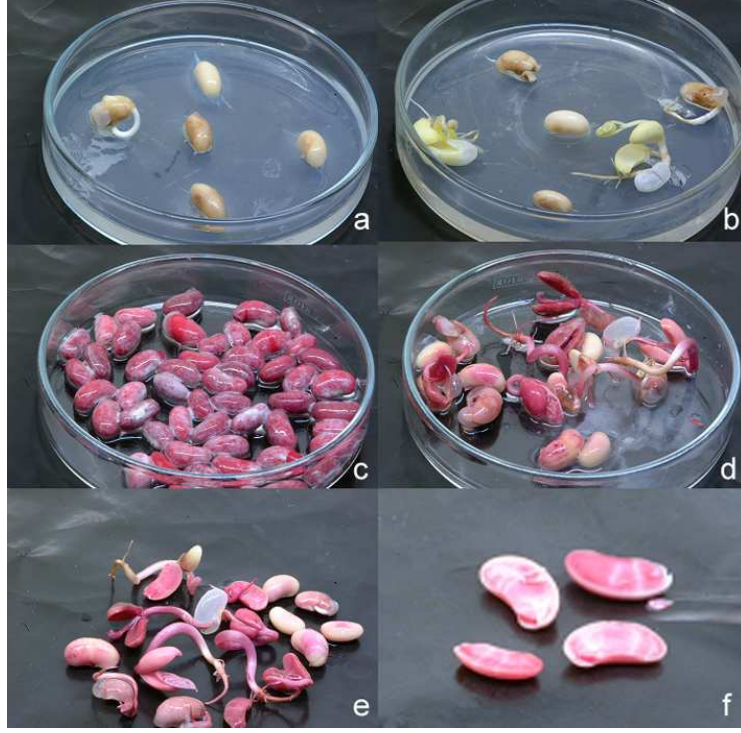
\*\* 0.01 düzeyinde önemlidir

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.2 Farklı sterilizasyon sürelerinde uygulanan %20'lik çamaşır suyunun tohumların çimlenmesi üzerine etkisine ait Duncan analizi

Sterilizasyon süresi (dk.)	Çimlenme oranı (%)	
	Akman-98	Karacaşehir-90
5	96.66a	20.00a
10	73.33b	20.00a
20	56.66c	0.00b
30	50.00c	0.00b

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.1 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinde sterilizasyondan kaynaklanan çimlenme problemi  
a.b. MS ortamında çamaşır suyunun etkisi ile zarar görmüş tohumlarda çimlenmenin azalması, c. sterilizasyondan önceki, d.e.f. sterilizasyondan sonraki tohumlara uygulanmış tohum canlılık testi ve tespiti

#### 4.1.1 Çamaşır suyu pH'sının etkisi

Çamaşır suyunun asıl pH'sı yaklaşık 12 değerinde olup, pH'lar 12, 10, 8, 6 olarak ayarlanmış ve tohumlar %5'lik ticari çamaşır suyunda 5'er dakika tutulmuştur. Daha sonra tohumlar üç kez steril saf su ile durulanmış ve agar ile jelleştirilmiş MS ortamda kültüre alınarak 5 gün sonra bulaşıklık ve çimlenme oranının varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.3). Yapılan varyans analizi sonucunda çamaşır suyunun pH'sının çimlenmeyi 0.05 düzeyinde etkilediği görülmüştür. Yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelgede görüldüğü gibi çamaşır suyunun dört farklı pH düzeyinde elde edilen çimlenme %6.66-66.66 arasında değişmiştir. En fazla çimlenme çamaşır suyunun pH'sının 8 olduğunda ve en az çimlenme ise pH'nın 12 olduğu düzeyde elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 Çamaşır suyunun %5'lik dozunda farklı pH değerlerinin Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	K. O.	F
pH	3	2077.77	4.45*
Hata	8	466.66	
Toplam	11		

\*0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.4 Çamaşır suyunun %5'lik dozunda farklı pH değerlerinin Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumların çimlenmesi üzerine etkisine ait Duncan analizi

Çamaşır suyu pH'sı	Çimlenme oranı (%)
6.00	20.00b
8.00	66.66a
10.00	20.00b
12.00	6.66b

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

#### 4.1.2 Su sıcaklığının etkisi

Yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyu sıcaklığının çimlenme üzerine etkisini belirlemek amacıyla iki sıcaklık derecesi;  $25 \pm 1$  °C (oda sıcaklığı) ve 4 °C kullanılmıştır. Çamaşır suyunun dozu %5, 10 ve 20'ye ayarlanarak 5 dk.'lık muameleden sonra 5 dk'lık üç durulama yapılmıştır. Bir hafta sonunda elde edilen verilerle yapılan varyans analizi sonucunda çamaşır suyu dozu ve çamaşır suyu sıcaklığı arasında 0.05 düzeyinde etkileşim görülmüştür (Çizelge 4.5). Farklılık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılan Duncan ve t testi sonucu Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi çamaşır suyunun %5, 10, 20 dozları kullanıldığında oda sıcaklığında %6.66–46.66 ve 4 °C'de ise %20.00–66.66 arasında çimlenme meydana gelmiştir. Çamaşır suyu sıcaklığı çimlenme üzerinde belirgin farklılıklar meydana getirmiş olup, en iyi sonuçlar %5'lik çamaşır suyunda sıcaklığı 4 °C iken %66.66 olarak gözlenmiştir. Çamaşır suyunun artan dozları, 4 °C çamaşır suyu sıcaklığında çimlenme oranlarında belirgin şekilde azalış meydana getirmiştir. 25 °C'lik çamaşır suyu sıcaklığında ise çamaşır suyunun farklı dozlarında çimlenme oranında belirgin farklılık olmasına rağmen farklılığın düzgün bir şekilde artış ya da azalış göstermediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 Çamaşır suyunun farklı dozları ve farklı su sıcaklıklarının Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerine varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Çimlenme oranı (%)	
		K. O.	F
Çamaşır suyu dozu	2	2466.66	3.17**
Çamaşır suyu sıcaklığı	1	1800.00	2.31**
Çamaşır suyu dozu x çamaşır suyu sıcaklığı	2	466.66	0.60*
Hata	12	777.77	
Genel toplam	17		

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

\*0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.6 Çamaşır suyunun farklı dozları ve sıcaklık değerlerinin Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerine t testi ve Duncan analizi

Çamaşır suyu dozları (%)	Çimlenme oranı (%)	
	25 °C	4 °C
5.00	26.66b <sup>1</sup> B <sup>2</sup>	66.66aA
10.00	46.66aB	53.33bA
20.00	6.66cB	20.00cA

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

<sup>2</sup>Aynı satırdaki farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir

#### 4.1.3 Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)’in etkisi

Tohumlar hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)’in %10, 20, 30, 40, 50 ve 60 oranlarında 5 dk. tutularak 5’er dk. üç durulama yapılmıştır. Deneme sonunda elde edilen verilerle yapılan varyans analizi sonucu Çizelge 4.7’de verilmiştir. Çizelgeye göre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozlarının bulaşıklık ve çimlenme oranı üzerinde 0.01 düzeyinde farklılık meydana getirdiği tespit edilmiştir. Farklılığın düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelgede görüldüğü gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’in kullanılan altı dozunda elde edilen bulaşıklık oranı %0.00–86.66 ve çimlenme oranı ise %6.66–66.66 arasında değişmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ’in düşük dozlarında (%10, 20, 30, 40) oldukça fazla bulaşıklık gözlenmiş olmasına rağmen %50 ve 60 dozlarında hiç bulaşıklığa rastlanmamış olup, en fazla çimlenme %66.66 ile %50 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozunda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in farklı dozlarının Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Bulaşıklık oranı (%)		Çimlenme oranı (%)	
		K. O.	F	K. O.	F
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dozları	5	3506.66	3.43**	1155.55	2.60**
Hata	12	1022.22		444.44	
Toplam	17				

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.8 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in farklı dozlarının Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin tohumlarının bulaşıklık ve çimlenme oranı üzerindeki etkisine ait Duncan analizi sonuçları

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dozları (%)	Bulaşıklık oranı (%)	Çimlenme oranı (%)
10	86.66a	6.66b
20	26.66ab	33.33ab
30	53.33ab	33.33ab
40	53.33ab	46.66ab
50	0.00b	66.66a
60	0.00b	40.00ab

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

#### 4.1.4 Filtre kâğıtlarının etkisi

Filtre kâğıtları yaklaşık 5 tohumun çimlenmesine izin verecek büyüklükte kareler halinde kesilerek etüvde 160 °C 2 saat steril edilmiştir. Tohum sterilizasyonunda manyetik karıştırıcı kullanılmamıştır ve %20'lik çamaşır suyunda 5 dk. steril edilen tohumlar steril saf su ile ıslatılarak filtre kâğıtları içine konularak sarılmıştır. Magentalar içine filtre kâğıtlarına sarılarak konulmuş tohumlar iklim odasında çimlendirilmiştir (Şekil 4.2). Tohumların bu yöntemle çimlendirilmesi sonucunda %100 oranında çimlenme gözlenmiştir.



Şekil 4.2 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin filtre kâğıtları arasında çimlenen tohumları

Yapılan farklı sterilizasyon denemelerinde, %100 ile en fazla çimlenme filtre kâğıtları kullanıldığında elde edilmiştir.

#### 4.2 Fasulyenin *In Vitro* Koşullarda Sürgün Rejenerasyonu

##### 4.2.1 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 5 g/l aktif kömür ve farklı dozlarda TDZ'nin etkisi

Yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro* gelişen bitkiciklerden elde edilen apikal meristem, yaprak ve petiol eksplantları 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında kültüre alınmış, elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Çizelgeye göre ortam ve eksplantlar arasında kallus ve sürgün oluşum oranı bakımından 0.01 düzeyine etkileşim gözlenmiştir. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)	
		K. O.	F	K. O.	F
Ortam	8	16656.79	337.30**	9619.75	45.30**
Eksplant	2	10923.45	221.20**	14938.27	70.34**
Ortam x eksplant	16	2440.12	49.41**	2377.16	11.19**
Hata	54	49.38		212.34	
Genel toplam	80				

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.10 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait Duncan analizi sonuçları

TDZ (mg/l)	Kallus oluşum oranı (%)			Sürgün oluşum oranı (%)		
	apikal meristem	yaprak	petiol	apikal meristem	yaprak	petiol
0.05	100.00a	100.00a	93.33a	100.00a	86.66ab	60.00bc
0.10	100.00a	0.00c	0.00b	100.00a	0.00e	0.00d
0.15	100.00a	0.00c	0.00b	86.66bc	0.00e	0.00d
0.20	100.00a	80.00b	100.00a	80.00bc	20.00d	93.33a
0.25	0.00b	0.00c	0.00b	0.00d	0.00e	0.00d
0.30	0.00b	0.00c	0.00b	0.00d	0.00e	0.00d
0.35	100.00a	0.00c	0.00b	93.33b	0.00e	0.00d
0.40	100.00a	100.00a	100.00a	93.33b	93.33a	53.33c
0.45	100.00a	100.00a	100.00a	86.66bc	73.33c	66.66b

Aynı sütundaki harfler 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelgeye göre en fazla kallus oluşum oranı %100 ile 0.40 ve 0.45 mg/l TDZ içeren MS besin ortamlarından, elde edilmiştir. Apikal meristem eksplantlarının, yaprak ve petiol eksplantlarına oranla daha fazla kallus ve sürgün oluşturduğu gözlenmiştir. Değişik oranlarda sürgün oluşumu gözlenmiş olmasına rağmen 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında %20 bitki oluşumu dışında diğer hiçbir ortamda sürgün oluşumlarından bitki oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen bitkiler dış şartlara alıştırılıp seraya aktarılmıştır.

#### 4.2.2 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 0.25 mg/l salisilik asit içeren farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisi

Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin apikal meristem, yaprak ve petiol eksplantları 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 mg/l TDZ içeren MS besin ortamı ve 0.25 mg/l salisilik asit içeren MS besin ortamlarda kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle

varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir. Çizelge 4.11’e göre ortam ve eksplantlar arasında sürgün oluşum ve bitki elde etme oranı bakımından 0.01 düzeyinde etkileşim gözlenmiştir. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12’de verilmiştir. Çizelgeye göre değişen TDZ dozlarında %100’e kadar sürgün oluşumu ve %73.33’e varan oranlarda da bitki elde edilmiştir. Gözlemlenen her iki parametre bakımından en iyi sonuçlar 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında apikal meristem eksplantlarından elde edilen sürgünler Şekil 4.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.11 Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 0.25 mg/l salisilik asit ve farklı dozlarda TDZ’nin etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Sürgün oluşumu (%)		Bitki elde etme oranı (%)	
		K. O.	F	K. O.	F
Ortam	8	13797.53	71.64**	1011.11	5.11**
Eksplant	2	14167.90	73.56**	6414.81	32.47**
Ortam x eksplant	16	2184.56	11.34**	831.48	4.20**
Hata	54	192.59		197.53	
Genel toplam	80				

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.12 Karacaşehir–90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait Duncan analizi

TDZ (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)			Bitki elde etme oranı (%)		
	apikal meristem	yaprak	petiol	apikal meristem	yaprak	petiol
0.05	100.00a	93.33b	66.66d	33.33d	13.33a	6.66a
0.10	93.33ab	0.00d	0.00e	53.33c	0.00c	0.00b
0.15	100.00a	0.00d	0.00e	60.00b	0.00c	0.00b
0.20	100.00a	100.00a	73.33c	0.00e	0.00c	0.00b
0.25	0.00c	0.00d	0.00e	0.00e	0.00c	0.00b
0.30	0.00c	0.00d	0.00e	0.00e	0.00c	0.00b
0.35	100.00a	0.00d	0.00e	0.00e	0.00c	0.00b
0.40	100.00a	93.33b	100.00a	73.33a	6.66b	0.00b
0.45	100.00a	60.00c	86.66b	33.33d	0.00c	0.00b

Aynı sütundaki harfler 0.01 düzeyinde önemlidir



Şekil 4.3 Fasulyenin apikal meristem eksplantlarından 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında elde edilen sürgünler

#### 4.2.3 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 5 g/l aktif kömür ve 0.25 mg/l salisilik asit içeren farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisi

Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin apikal meristem, yaprak ve petiol eksplantları 5 g/l aktif kömür ile 0.25 mg/l salisilik asit ilave edilmiş; 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 mg/l TDZ içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.13’de verilmiştir. Çizelge 4.13’e göre ortam ve eksplantlar arasında kallus ve sürgün oluşum oranı bakımından 0.01 düzeyine etkileşim gözlenmiştir. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine 5 g/l aktif kömür ve 0.25 mg/l salisilik asit içeren farklı dozlarda TDZ ve eksplantların etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	8	13979.01	101.09**	7622.22	53.22**
Eksplant	2	15204.93	109.96**	19733.33	137.79**
Ortam x eksplant	16	2499.38	18.07**	1944.44	13.57**
Hata	54	138.27		143.21	
Genel toplam	80				

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.14 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonunda TDZ dozları ve eksplantların etkisine ait Duncan analizi sonuçları

TDZ (mg/l)	Kallus oluşum oranı (%)			Sürgün oluşum oranı (%)		
	apikal meristem	yaprak	petiol	apikal meristem	yaprak	petiol
0.05	100.00a	100.00a	100.00a	93.33b	80.00a	40.00c
0.10	100.00a	0.00d	0.00c	33.33b	0.00d	0.00d
0.15	100.00a	0.00d	0.00c	100.00a	0.00d	0.00d
0.20	100.00a	46.66b	86.66b	100.00a	0.00d	73.33a
0.25	0.00c	0.00d	0.00c	0.00e	0.00d	0.00d
0.30	0.00c	0.00d	0.00c	0.00e	0.00d	0.00d
0.35	86.66b	0.00d	0.00c	86.66c	0.00d	0.00d
0.40	100.00a	26.66c	100.00a	100.00a	26.66c	53.33b
0.45	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	66.66b	46.66bc

Aynı sütundaki harfler 0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelgeye göre değişen TDZ dozlarında meydana gelen kallus ve sürgün oluşum oranı %0.00–100.00 arasında değişmiştir.

#### 4.2.4 Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisi

Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin kotiledon eksplantları 2, 4, 6, 8, 10 mg/l picloram içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir. Çizelge 4.15’e göre çeşit ve ortam arasında kallus oranı bakımından 0.05 ve sürgün oluşumu oluşum oranı bakımından ise 0.01 düzeyinde etkileşim gözlenmiştir. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16’da verilmiştir. Çizelgeye göre değişen picloram dozlarında meydana gelen kallus ve sürgün oluşumu oluşum oranı çeşitlere göre değişmekle beraber sırasıyla %26.66–100.00 ve %20.00–100.00 arasında değişmiştir. Embriyo gelişimini teşvik ettiği bilinen picloramın etkisiyle kotiledonlardan embriyo oluşumu olmasına rağmen yine kararmanın olumsuz etkisi ile embriyoların öldüğü gözlenmiştir.

Çizelge 4.15 Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)	
		K. O.	F	K. O.	F
Çeşit	1	19253.33	49.79**	6453.33	17.92**
Ortam	4	33.33	0.08	1546.66	4.29**
Çeşit x ortam	4	486.66	1.25*	986.66	2.74**
Hata	20	386.66		360.00	
Genel toplam	29				

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.16 Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin sürgün rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisine ait Duncan analizi

Picloram (mg/l)	Kallus oluşum oranı (%)*		Sürgün oluşum oranı (%)**	
	Karacaşehir-90	Akman-98	Karacaşehir-90	Akman-98
2	46.66b	86.66b	46.66a	80.00b
4	26.66c	100.00a	26.66b	33.33d
6	40.00b	93.33a	20.00b	66.66c
8	40.00b	100.00a	40.00a	100.00a
10	53.33a	80.00b	46.66a	46.66c

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

#### 4.2.5 Bir hafta-20 mg/l NAA ön muamelesinden sonra değişik oranlarda TDZ ve NAA'in sürgün rejenerasyonuna etkisi

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları steril edildikten sonra 24 saat saf suda bekletilerek embriyoları çıkartılmıştır. 20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında 1 hafta bekletilen eksplantlar 0.05-0.45 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren MS rejenerasyon ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 4.4.a). Toksik maddelerin meydana getirdiği kararmayı önlemek ve rejenerasyonu artırmak amacıyla ortama 0.2 mg/l askorbik asit ilave edilmiştir. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.17'de verilmiştir. Çizelge 4.17'ye göre ortam x çeşit x eksplant etkileşimi kallus oluşum oranı bakımından 0.01; sürgün oranı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise 0.05 düzeyinde etkileşim görülmektedir.

Çizelge 4.17 Akman–98 ve Karacaşehir–90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve NAA’ın etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	8	1859.08	3.96**	768.22	1.77*	0.73	2.10*
Çesit	1	54450.23	116.16**	1481.48	3.41*	0.01	0.23
Eksplant	1	41811.34	89.19**	55578.70	128.05**	24.03	69.15**
Ortam x çesit	8	609.08	1.29*	687.21	1.58*	0.45	1.30**
Ortam x eksplant	8	1251.44	2.67*	565.68	1.30*	0.23	0.66
Çesit x eksplant	1	18802.08	40.11**	1481.48	3.41*	0.003	0.11
Ortam x çesit x eksplant	8	2929.68	6.25**	947.62	2.18*	0.82	2.36*
Hata	72	468.75		434.02	827.54	0.34	
Genel toplam	107						

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

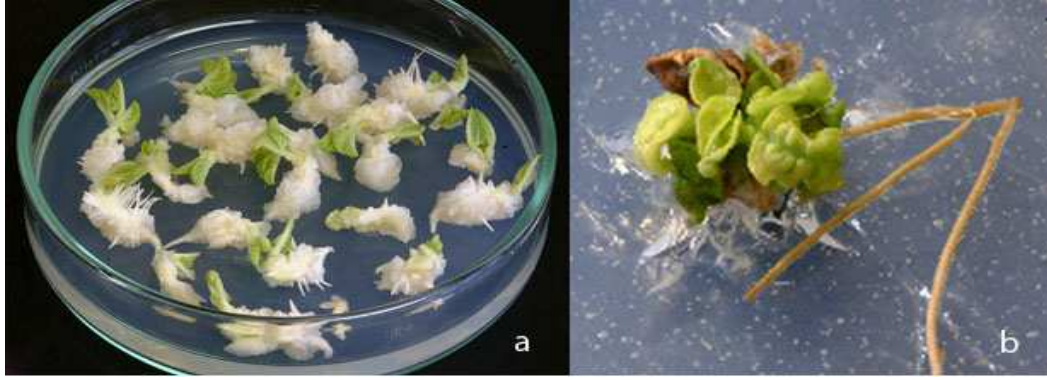
Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18’de verilmiştir. Çizelgeye göre değişen TDZ ve NAA dozlarında meydana gelen kallus oluşum, sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı çeşitler ve eksplantlara göre değişmiştir. Kallus oluşum oranı bakımından Akman–98 çeşidinin kallus eksplantında %0.00–100 arasında değişirken sekonder eksplantta %0.00–66.66 arasında; Karacaşehir–90 çeşidinde ise kallus eksplantında %83.33–100.00 arasında, sekonder eksplantta ise %50.00–100.00 arasında değişmiştir. Sürgün oluşum oranı bakımından Akman–98 çeşidinin kallus eksplantında %0.00–16.66 arasında değişirken sekonder eksplantta %41.66–83.33 arasında; Karacaşehir–90 çeşidinde ise kallus eksplantında %0.00–16.66 arasında, sekonder eksplantta ise %8.33–91.66 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından Akman–98 çeşidinin kallus eksplantında 0.00–1.00 adet arasında değişirken sekonder eksplantta 0.50–1.66 adet arasında; Karacaşehir–90 çeşidinde ise kallus eksplantında 0.00–0.41 adet, sekonder eksplantta ise 0.00–2.25 adet arasında değişmiştir (Şekil 4.4.b). Ede edilen sürgünler 2 mg/l IBA içeren ortamda köklendirilmiştir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.18 Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinde kallus ve sürgün oluşum oranı ile eksplant başına sürgün sayısı üzerine NAA ve farklı dozlarda TDZ'nin etkisine ait Duncan analizi

Ortamlar (mg/l)		Kallus oluşum oranı (%)				Sürgün oluşum oranı (%)				Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
TDZ	NAA	Akman-98		Karacaşehir-90		Akman-98		Karacaşehir-90		Akman-98		Karacaşehir-90	
		kallus	Sekonder eksplant	kallus	Sekonder eksplant	kallus	Sekonder eksplant	kallus	Sekonder eksplant	kallus	Sekonder eksplant	kallus	Sekonder eksplant
0.05	0.2	100.0a	0.00d	100.0a	100.0a	0.00b	50.00bc	0.00b	91.66a	0.00c	0.50c	0.00c	1.58b
0.10	0.2	83.33b	33.33b	100.0a	83.33b	0.00b	58.33b	0.00b	8.33e	0.00c	1.48a	0.00c	0.00d
0.15	0.2	33.33c	66.66a	100.0a	83.33b	16.66a	41.66c	0.00b	66.66b	1.00a	1.33ab	0.00c	2.25a
0.20	0.2	100.0a	0.00d	83.33b	75.00bc	0.00b	58.33b	16.66a	16.66e	0.00c	0.91b	0.41a	0.75c
0.25	0.2	100.0a	0.00d	100.0a	100.0a	0.00b	66.66b	0.00b	33.33d	0.00c	1.66a	0.00c	1.00b
0.30	0.2	100.0a	0.00d	100.0a	100.0a	16.66a	83.33a	0.00b	50.00bc	0.41b	0.91b	0.00c	1.16b
0.35	0.2	100.0a	0.00d	100.0a	91.66a	0.00b	58.33b	16.66a	50.00bc	0.00c	0.83bc	0.16b	1.58b
0.40	0.2	100.0a	25.00bc	100.0a	83.33b	0.00b	41.66c	0.00b	16.66e	0.00c	0.75bc	0.00c	0.33c
0.45	0.2	0.00d	0.00d	100.0a	50.00c	0.00b	50.00bc	0.00b	41.66c	0.00c	1.16b	0.00c	0.66c

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.4 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin: a. 1 hafta 20 mg/l NAA'li MS besin ortamında bekletilmiş embriyoları, b. embriyolardan meydana gelen sekonder eksplantların meydana getirdiği sürgünler



Şekil 4.5 Rejenerasyon ortamlarından alınan sürgünlerin köklendirilmesi

#### 4.2.6 Olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme tarlasında yapılmış olan ekimden (Şekil 4.6.a.b) elde edilen Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantları kullanılarak rejenerasyon elde edilmeye çalışılmıştır. Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantları 1.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.19’da verilmiştir. Çizelge 4.19’a göre çeşit x eksplant etkileşimi önemli bulunmazken, sürgün ve kök oluşum oranı bakımından eksplantlar arasında 0.01; eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise 0.05 düzeyinde farklılık gözlenmiştir.

Çizelge 4.19 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA’in etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kök oluşum oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Çeşit	1	33.33	0.05	0.00	0.14	1200.00	4.00*
Eksplant	1	9633.33	15.21**	1.14	4.16*	13333.33	44.44**
Çeşit x eksplant	1	33.33	0.05	0.00	0.02	133.33	0.44
Hata	8	633.33		0.27		300.00	
Toplam	11						

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Farklılık düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.20’de verilmiştir. Çizelgeye göre sürgün oluşum oranı olgunlaşmamış embriyo eksplantında %66.66, olgunlaşmamış kotiledon eksplantında ise %10.00 olarak tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise olgunlaşmamış embriyo eksplantında 1.03 adet, olgunlaşmamış kotiledon eksplantında 0.41 adet ve kök oluşum oranı ise olgunlaşmamış embriyo eksplantında ise %86.66, olgunlaşmamış kotiledon eksplantında ise %20.00 olarak gözlenmiştir. 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren ortamda NAA’nın etkisi ile köklerde şişme (Şekil 4.7) ve Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından aynı ortamda sürgünler gözlenmiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.20 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA'nin etkisine ait t testi sonuçları

Eksplant	Sürgün oluşum oranı (%)**	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*	Kök oluşum oranı (%)**
Olgunlaşmamış embriyo	66.66a	1.03a	86.66a
Olgunlaşmamış kotiledon	10.00b	0.41b	20.00b

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.6 A.Ü. Ziraat Fakültesi Deneme tarlasında: a. Akman-98, b. Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin gelişimi



Şekil 4.7 Akman-98 fasulye çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından 1.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamında sürgün rejenerasyonu ile NAA'nin etkisiyle köklerde meydana gelen şişkinlik



Şekil 4.8 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından 1.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren rejenerasyon ortamında oluşan sürgünler

#### 4.2.7 Akman-98 çeşidinde TDZ-NAA'in kotiledon boğum ve apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Akman-98 fasulye çeşidinin tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirildikten sonra elde edilen 7-10 günlük bitkiciklerden apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantları 0.10-0.30 mg/l TDZ ve 0.00-0.05 mg/l NAA içeren besin ortamlarında kültüre alınarak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Eksplantlarda fenolik bileşiklerin sebep olduğu kararmayı önlemek amacıyla ortama 5 mg/l aktif kömür eklenmiştir. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21'e göre sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortam x eksplant interaksiyonu 0.05 düzeyinde önemli bulunurken, kallus oluşum oranı bakımından ise 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.22'de verilmiştir. Çizelgeye göre sürgün oluşum oranı apikal meristem eksplantında %66.66-100.00 arasında, kotiledon boğum eksplantında ise %20.00-93.33 arasında değişmiştir. Eksplant başına apikal meristem eksplantından en fazla 4.70 adet (Şekil 4.9 - 4.10), kotiledon boğum eksplantından ise 1.86 adet sürgün elde edilmiştir. Kallus oluşum oranı ise apikal meristem eksplantında %0.00-66.66 arasında değişirken kotiledon boğum eksplantında ise %0.00-20.00 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.21 Akman-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve NAA'ın etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	735.64	2.28**	1817.75	3.49**	1.03	1.02*
Eksplant	1	6269.38	19.45**	12768.02	24.51**	29.81	29.39**
Ortam x eksplant	5	1166.41	3.62**	741.85	1.42*	0.95	0.94*
Hata	24	322.22		520.83		1.01	
Toplam	35						

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

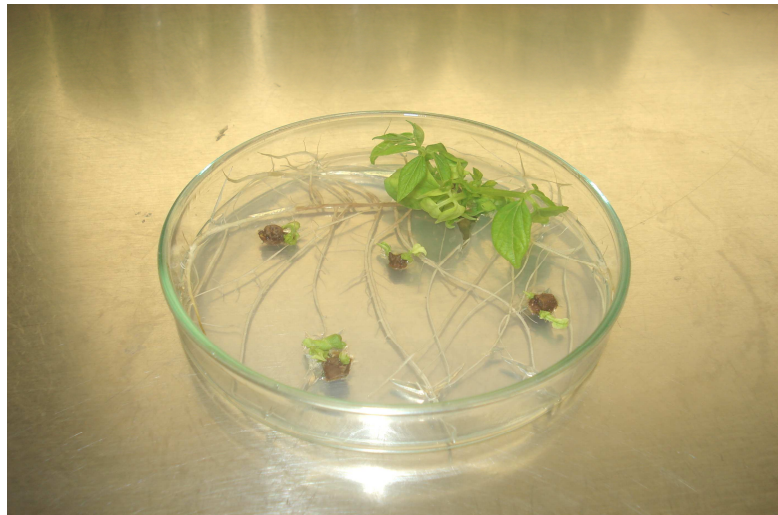
\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.22 Akman-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve NAA'ın etkisine ait Duncan test sonuçları

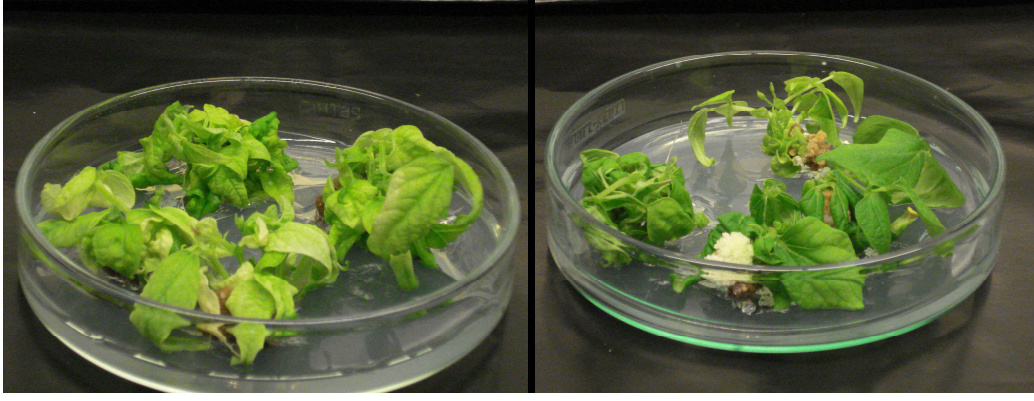
Ortamlar (mg/l)		Kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)		Sürgün sayısı (adet)	
TDZ	NAA	Apikal meristem	Kotiledon boğum	Apikal meristem	Kotiledon boğum	Apikal meristem	Kotiledon boğum
0.10	0.00	0.00e	0.00b	100.00a	93.33a	3.06bc	1.80b
0.10	0.05	26.66c	0.00b	73.33bc	20.00c	3.70b	1.66c
0.20	0.00	26.66c	0.00b	66.66c	46.66bc	2.93c	1.86b
0.20	0.05	66.66a	0.00b	80.00bc	33.33c	2.93c	1.83b
0.30	0.00	46.66b	0.00b	100.00a	30.00c	4.26ab	1.25c
0.30	0.05	13.33d	20.00a	86.66b	55.00b	4.70a	2.15a

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.9 Akman-98 fasulye çeşidinin 0.30 mg/l TDZ'li rejenerasyon ortamında apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.10 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarından 0.30 mg/l TDZ içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

#### 4.2.8 Farklı oranlarda TDZ ve IBA'nın apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirildikten sonra elde edilen 7-10 günlük bitkiciklerden apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantları 0.10-0.30 mg/l TDZ ve 0.00-0.05 mg/l IBA içeren MS ortamlarda kültüre alınarak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.23'de verilmiştir.

Çizelge 4.23'e göre sürgün oluşum oranı bakımından ortam x çeşit arasında 0.01 düzeyinde, eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise ortam x çeşit x eksplant arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.23 Akman–98 ve Karacaşehir–90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve IBA dozlarının etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	5	293.33	0.44	1.18	1.32*
Çesit	1	1800.00	2.72*	1.30	1.46*
Eksplant	1	21355.55	32.30**	19.53	21.83**
Ortam x çesit	5	3960.00	5.99**	2.76	3.08**
Ortam x eksplant	5	795.55	1.20*	1.34	1.49*
Çesit x eksplant	1	88.88	0.13	9.31	10.41**
Ortam x çesit x eksplant	5	275.55	0.41	1.53	1.71*
Hata	48	661.11		0.89	
Toplam	71				

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Sürgün oluşum oranı Akman–98 çeşidinin apikal meristem eksplantında %66.66–100.00, kotiledon boğum eksplantında ise %26.66–73.33 arasında değişmiştir. Karacaşehir–90 çeşidinin apikal meristem eksplantında ise %40.00–100.00 arasında, kotiledon boğum eksplantında ise %20.00–80.00 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı Akman–98 çeşidinin apikal meristem eksplantında 3.06–4.20 adet arasında değişirken, kotiledon boğum eksplantında 0.50–3.40 adet arasında; Karacaşehir–90 çeşidinin apikal meristem eksplantında 1.90–3.50 adet arasında, kotiledon boğum eksplantında ise 1.16 – 3.50 adet arasında değişmiştir.

Çizelge 4.24 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı TDZ ve IBA dozlarının etkisine ait Duncan test sonuçları

Ortam (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)			
	Akman-98		Karacaşehir-90	
	Apikal meristem	Kotiledon boğum	Apikal meristem	Kotiledon boğum
0.10 TDZ	66.66c	26.66c	100.00a	80.00a
0.10 TDZ+0.05 IBA	80.00b	66.66b	40.00d	40.00c
0.20 TDZ	100.00a	73.33a	73.33b	26.66d
0.20 TDZ+0.05 IBA	100.00a	33.33c	73.33b	26.66d
0.30 TDZ	73.33bc	26.66c	93.33ab	60.00b
0.30 TDZ+0.05 IBA	100.00a	73.33a	66.66c	20.00d
Ortam (mg/l)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
	Akman-98		Karacaşehir-90	
	Apikal meristem	Kotiledon boğum	Apikal meristem	Kotiledon boğum
0.10 TDZ	3.23ab	1.10c	2.13d	2.50b
0.10 TDZ+0.05 IBA	3.06ab	2.33b	2.50c	2.33b
0.20 TDZ	4.20a	3.40a	1.90d	2.33b
0.20 TDZ+0.05 IBA	3.66ab	1.16c	2.33c	1.16c
0.30 TDZ	3.43ab	0.50c	2.90ab	3.50a
0.30 TDZ+0.05 IBA	3.60ab	2.13b	3.50a	1.50c

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

#### 4.2.9 10 gün-10 mg/l BAP ön muamelesinden sonra değişik oranlarda BAP'ın sürgün rejenerasyonuna etkisi

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları steril edildikten sonra embriyoları çıkartılarak 10 mg/l BAP içeren MS besin ortamında 10 gün bekletilmiştir (Şekil 4.11). Embriyolardan alınan embriyonik eksen ve plumula eksplantları 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.00 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarına alınmıştır. Dört hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.25'de verilmiştir. Çizelge 4.25'e göre sürgün oluşum oranı bakımından BAP dozları x çeşit, BAP dozları x eksplant arasında 0.01 düzeyinde; çeşit x eksplant arasında ise 0.05 düzeyinde etkileşim görülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise BAP dozları x çeşit ve BAP dozları x eksplant arasında sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.26- 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4.25 Akman–98 ve Karacaşehir–90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine BAP ön muamelesi ve farklı BAP dozlarının etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F
BAP dozları	4	882.91	1.29*	0.73	0.95*
Çesit	1	2870.41	4.20**	5.40	7.02**
Eksplant	1	14570.41	21.33**	6.40	8.32**
BAP dozları x çesit	4	2526.66	3.70**	1.20	1.57*
BAP dozları x eksplant	4	2382.91	3.48**	1.92	2.50**
Çesit x eksplant	1	2870.41	4.20*	0.15	0.19
BAP dozları x çesit x eksplant	4	255.83	0.37	0.59	0.76
Hata	40	682.91		0.76	
Genel toplam	59				

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.26'ya göre, sürgün oluşum oranı bakımından değişen BAP dozlarında Karacaşehir–90 çeşidinde %29.16–50.00 oranında, Akman–98 çeşidinde ise %19.16–70.83 oranında farklılık gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise Karacaşehir–90 çeşidinde 0.63–1.40 adet ve Akman–98 çeşidinde ise 1.28–2.35 adet (Şekil 4.12) arasında değişmiştir.

Çizelge 4.27'ye göre, sürgün oluşum oranı bakımından değişen BAP dozlarında plumula eksplantında %25.00–79.16 oranında, embriyonik eksen eksplantında ise %12.50–37.50 oranında farklılık gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise plumula eksplantında 0.96–2.13 adet ve embriyonik eksen eksplantında ise 0.66–1.66 adet arasında değişmiştir.

Çizelge 4.28'e göre, sürgün oluşum oranı bakımından Karacaşehir–90 ve Akman–98 çeşitlerinin plumula eksplantlarında %58.33 oranında, Karacaşehir–90 çeşidinin embriyonik eksen eksplantında %13.33 ve Akman–98 çeşidinde ise %41.00 oranında farklılık gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise Karacaşehir–90 çeşidinin plumula eksplantında 1.44 adet, Akman–98 çeşidinde ise 1.94 adet; Karacaşehir–90 çeşidinin embriyonik eksen eksplantında 0.68 adet ve Akman–98 çeşidinde ise 1.38 adet gözlenmiştir.

Çizelge 4.26 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda değişen BAP dozları ile çeşitlerin etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları

BAP (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
	Karacaşehir-90	Akman-98	Karacaşehir-90	Akman-98
0.25	29.16c	70.83a	0.63b	1.80b
0.50	29.16c	70.83a	1.21a	2.35a
0.75	29.16c	45.83b	0.71b	1.58b
1.00	41.66b	19.16c	1.35a	1.28b
1.25	50.00a	41.66b	1.40a	1.30bc

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

Çizelge 4.27 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda farklı BAP dozları ile eksplantların etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları

BAP (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen
0.25	70.83b	29.16ab	1.76b	0.66b
0.50	62.50c	37.50a	2.13a	1.43a
0.75	54.16cd	20.83c	1.55b	0.75b
1.00	25.00d	35.83a	0.96c	1.66a
1.25	79.16a	12.50c	2.03a	0.66b

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

Çizelge 4.28 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda çeşit ile eksplantların etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları

Çesitler	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen
Karacaşehir-90	58.33a	13.33b	1.44b	0.68b
Akman-98	58.33a	41.00a	1.94a	1.38a

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.11 Akman-98 fasulye çeşidinin olgunlaşmış embriyolarının 10 mg/l BAP içeren MS ortamında 1 günlük görüntüsü



Şekil 4.12 1.00 mg/l BAP ortamında Akman-98 çeşidinin plumula eksplantından elde edilen sürgünler

#### 4.2.10 BAP ve NAA'in olgunlaşmış embriyo, radikula, yaprak ve kotiledon boğum eksplantlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinin tohumları sterilizasyondan sonra 24 saat saf suda bekletilmiştir. Olgunlaşmış embriyo, radikula, bir-iki günlük yaprak ve kotiledon boğum eksplantları 0.25–1.00 mg/l BAP ve 1.00–4.00 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonunda elde edilen verilerle varyans analizi yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.29'a göre sürgün oluşum oranı bakımından ortam x çeşit x eksplant arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise her iki çeşitte de sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Ancak gelişen sürgünler kısa süre sonra ölmüşlerdir. Bundan dolayı istatistiksel analiz yapılmamıştır. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.29 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine BAP ön muamelesi ve farklı BAP dozlarının etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)	
		K.O.	F
Ortam	8	195.31	2.93**
Çesit	1	26.04	0.39
Eksplant	3	326.96	4.91**
Ortam x çeşit	8	234.37	3.52**
Ortam x eksplant	24	235.82	3.54**
Çesit x eksplant	3	867.09	13.02**
Ortam x çeşit x eksplant	24	207.36	3.11**
Hata	144	66.55	
Toplam	216		

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.30'a göre, sürgün oluşum oranı bakımından Akman-98 çeşidinin embriyo, radikula, plumula ve kotiledon boğum eksplantlarında %0.00-41.66 arasında, Karacaşehir-90 çeşidinde ise %0.00-25.00 arasında değişim gözlenmiştir.

Çizelge 4.30 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonunda farklı BAP dozları ile çeşitlerin etkileşimine ait Duncan analizi sonuçları

BAP+NAA (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)							
	Akman-98				Karacaşehir-90			
	Embriyo	Radikula	Plumula	K.boğum	Embriyo	Radikula	Plumula	K.boğum
0.25+1.00	0.00b	0.00	41.66a	0.00	0.00c	0.00	0.00	0.00c
0.25+2.00	0.00b	0.00	41.66a	0.00	0.00c	0.00	0.00	25.00a
0.25+4.00	0.00b	0.00	0.00c	0.00	0.00c	0.00	0.00	16.66b
0.50+1.00	0.00b	0.00	0.00c	0.00	0.00c	0.00	0.00	0.00c
0.50+2.00	0.00b	0.00	0.00c	0.00	0.00c	0.00	0.00	0.00c
0.50+4.00	0.00b	0.00	0.00c	0.00	8.33b	0.00	0.00	0.00c
1.00+1.00	0.00b	0.00	8.33b	0.00	0.00c	0.00	0.00	0.00c
1.00+2.00	0.00b	0.00	0.00c	0.00	0.00c	0.00	0.00	0.00c
1.00+4.00	8.33	0.00	0.00c	0.00	16.66a	0.00	0.00	0.00c

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

#### 4.3 *In vitro*'da Geliştirilen Bitkiciklerin Dış Şartlara Alıştırılması

*In vitro*'da elde edilen köklenmiş bitkiciklerin dış şartlara alıştırılması amacıyla iklim odasında ve iklim dolaplarında  $24 \pm 2$  °C, 3000 lüks ışık 16 saat ışık fotoperiyodu ve %70 nem sağlanmıştır (Şekil 4.13). Yaklaşık 1 hafta sonra nem seviyesi %40'a düşürülmüştür. Burada gelişen bitkiler normal tarla toprağının bulunduğu saksılara aktarılarak serada geliştirilmiş ve bu bitkilerden tohum elde edilmiştir (Şekil 4.14). Laboratuvar denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur.



Şekil 4.13 Fasulye bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ile elde edilen bitkilerin iklim dolabındaki görüntüsü



Şekil 4.14 Transjenik fasulye baklaları ve tohumlar

#### 4.4 Fasulyede Gen Aktarım Çalışmaları

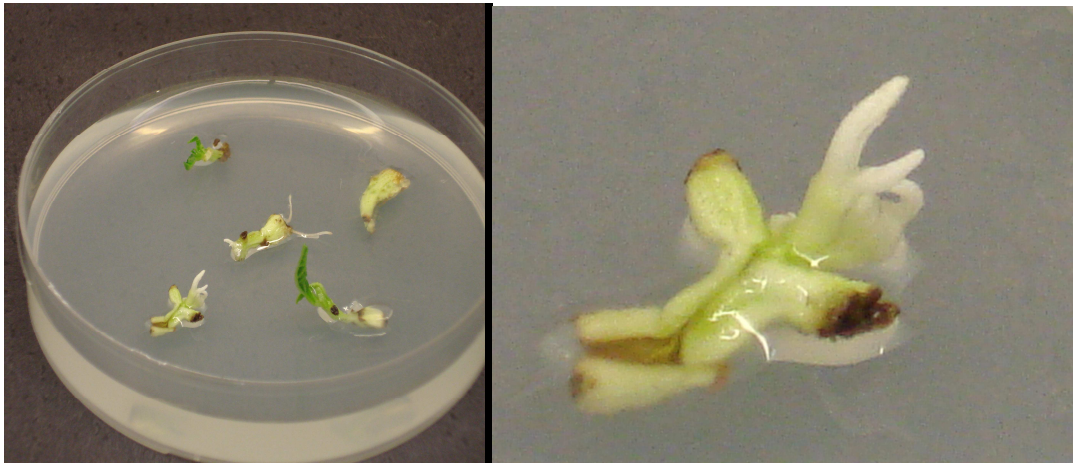
##### 4.4.1 *A. tumefaciens* GV2260 p35GUSINT bakteri hattı ile gen aktarımı

Her iki çeşidin apikal meristem eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 :: p35GUSINT hattı ile muamele edildikten sonra 0.20 ve 0.30 mg/l TDZ ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Fakat Akman-98 çeşidinde 0.30 mg/l TDZ ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamından, Karacaşehir-90 çeşidinde her iki ortamdan da sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Akman-98 çeşidinde 0.20 mg/l TDZ ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat ile

500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamdaki 48 adet apikal meristem eksplanttan 8 tanesinde 3'er adet sürgün elde edilmiştir (Şekil 4.15). Ancak bu sürgünlerin çoğu kanamisinmonosülfata dayanıklı olmadığı için beyazlaştıkları gözlenmiştir (Şekil 4.16). Beyazlaşmayan 3 adet transgenik adayı sürgün 2 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirdikten sonra ilk olarak plastik bardaklara aktarılmıştır (Şekil 4.17). Daha sonra bu bitkicikler saksılara alınarak seraya çıkartılmış ve bu bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır (Şekil 4.18). Yapılan *GUS* analizi sonucunda yaprak örneklerinde mavi bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.15 Akman-98 fasulye çeşidinin apikal meristem eksplantlarının GV2260 p35GUSINT bakteri hattının inokülasyonu sonucunda edilen sürgünler



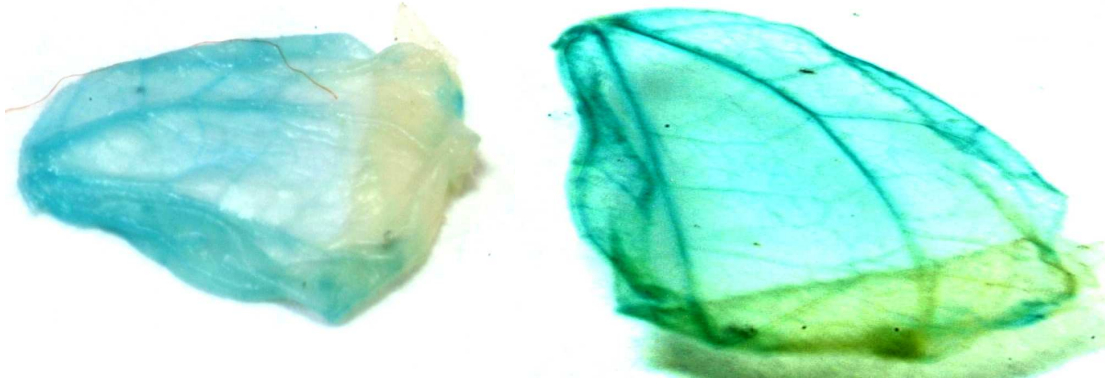
Şekil 4.16 Akman-98 fasulye çeşidinde GV2260 p35GUSINT bakteri hattı kullanılarak yapılmış olan gen aktarım çalışmasında kanamisine dayanıklılık gösteremeyen bitkiciklerde tespit edilen beyazlık



Şekil 4.17 Akman-98 fasulye çeşidinin apikal meristem eksplantları ile GV2260 p35GUSINT bakteri hattının inokülasyonu sonucunda elde edilen bitkiciklerin bardaklarda dış şartlara alıştırılması



Şekil 4.18 Akman-98 fasulye çeşidinin gen aktarımı sonucu elde edilmiş olan bitkiciklerinin iklim odası ve serada dış şartlara alıştırılması



Şekil 4.19 Akman-98 fasulye çeşidinde GV2260 p35GUSINT bakteri hattı ile yapılan gen aktarımında GUS testi sonucunda maviye boyanmış yaprak örnekleri

#### 4.4.2 LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımı

Karacaşehir-90 ve Akman-98 çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları steril edilmiş tohumlardan izole edilerek 5 mg/l TDZ ile 5 gün ön muamele yapıldıktan sonra LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile plumula eksplantları kullanılarak gen aktarımı yapılmış ve eksplantlar TDZ'nin 0.10, 0.20, 0.30 ve 0.40 mg/l dozları içeren MS besin ortamlarına alınmıştır. Dört hafta sonunda yapılan gözlemlere göre varyans analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.31'de verilmiştir. Çizelgeye göre sürgün oluşum oranı bakımından ortam x çeşit arasında 0.01, eksplant başına sürgün sayısı ve kararma oranı bakımından ise 0.05 düzeyinde etkileşim gözlenmiştir. Etkileşim düzeyinin belirlenmesi amacıyla Duncan analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.32'de gösterilmiştir. Çizelgeye göre, sürgün oluşum oranı Karacaşehir-90 çeşidinde %0.00-6.66, Akman-98 çeşidinde ise %13.33-66.66 arasında değişmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise Karacaşehir-90 çeşidinde 0.00-0.66 adet ve Akman-98 çeşidinde ise 1.36-3.10 adet sürgün elde edilmiştir (Şekil 4.20). Kararma oranı ise Karacaşehir-90 çeşidinde %93.33-100.00 arasında değişirken, Akman-98 çeşidinde ise %13.33-60.00 arasında değişmiştir. Fazla miktarda kararma ve bakteri kontaminasyonu sebebiyle elde edilen sürgünler gelişmemiş ve bu sürgünlerden bitki elde edilememiştir.

Çizelge 4.31 LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerine gen aktarımına ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kararma oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortam	3	772.22	2.72**	0.32	0.19	505.55	1.08*
Çeşit	1	12150.00	42.88**	25.21	14.99**	22816.66	48.89**
Ortam x çeşit	3	994.44	3.51**	1.76	1.05*	816.66	1.75*
Hata	16	283.33		1.68		466.66	
Toplam	23						

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.32 LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerine gen aktarımına ait t test sonuçları

TDZ (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Kararma oranı (%)	
	Karacaşehir-90	Akman-98	Karacaşehir-90	Akman-98	Karacaşehir-90	Akman-98
0.10	0.00b	53.33ab	0.00c	3.10a	100.00a	26.66c
0.20	6.66a	66.66a	0.66a	1.36d	100.00a	46.66b
0.30	0.00b	60.00a	0.01c	2.73b	100.00a	13.33d
0.40	6.66a	13.33c	0.33ab	2.00c	93.33b	60.00a

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.20 Akman-98 çeşidinin plumula eksplantında LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı ile gen aktarımında elde edilen sürgünler ve beyazlaşma

#### 4.4.3 *Cry IAb* geni taşıyan *A. tumefaciens* bakterisi hattı ile gen aktarımı

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları *A. tumefaciens*'in 35S promotör ve NOS terminatör dizileri tarafından kontrol edilen *Cry IAb* geni taşıyan hattı ile ½ saat muamele edilmiş ve 24 °C'de bir gün kokültüvasyon yapılmıştır. Muamele edilmiş eksplantlardan bakteriyi uzaklaştırmak amacıyla eksplantlar, 600 mg/l Augmentin içeren sıvı Nutrient broth'da yıkanmıştır. Daha sonra 5, 10, 15 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamında eksplantlar 4, 8 gün bekletilerek ön muamele edilmiştir. Ön muamele edilmiş embriyolardan alınan embriyonik eksen ve plumula eksplantları 0,5 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren ikinci bir seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Altı hafta sonunda elde edilen sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı ile ilgili verilerin varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.33'de verilmiştir. Çizelge 4.33'e göre sürgün oluşum oranı bakımından ortam x çeşit x süre x eksplant arasında 0.01 ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise 0.05 düzeyinde etkileşim görülmüştür. Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.34'de verilmiştir.

Çizelge 4.34'e göre, sürgün oluşum oranı bakımından Karacaşehir-90 çeşidinin embriyonik eksen eksplantında dört günlük ön muamelede ve plumula eksplantında ise sekiz günlük ön muamele uygulaması sonucunda hiç sürgün gözlenmemiştir. Akman-98 çeşidinin ise plumula eksplantında da sekiz günlük ön muamelede aynı şekilde hiç sürgün gözlenmemiştir. Karacaşehir-90 çeşidinde %0.00-66.66 oranında, Akman-98 çeşidinde ise %0.00-40.00 oranında sürgün elde edilmiştir (Şekil 4.21). En fazla sürgün Karacaşehir-90 çeşidinin plumula eksplantında dört gün ön muamelede 1.40 adet elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı Karacaşehir-90 çeşidinde 0.00-1.40 arasında ve Akman-98 çeşidinde ise 0.00-1.13 adet arasında değişmiştir. Akman-98 çeşidinde ise en fazla sürgün 1.13 adet ile sekiz gün ön muamelede embriyonik eksen eksplantından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 2 mg/l IBA içeren MS ortamda köklendirildikten sonra saksılara alınarak önce iklim dolabında dış şartlara alıştırmış, daha sonra seraya aktarılarak gelişen bitkilerden tohum elde edilmiştir.

Çizelge 4.33 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ön muamelesi ve sürenin etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortam	2	1172.22	2.70**	0.63	2.62**
Çesit	1	22.22	0.05	0.17	0.70*
Süre	1	1800.00	4.15**	0.31	1.27*
Eksplant	1	800.00	1.84*	0.01	0.02
Ortam x çesit	2	405.55	0.93*	0.01	0.01
Ortam x süre	2	1116.66	2.57**	0.20	0.86*
Çesit x süre	1	800.00	1.84*	0.25	1.06*
Ortam x çesit x süre	2	216.66	0.05	0.47	1.98*
Ortam x eksplant	2	616.66	1.42*	0.25	1.07*
Çesit x eksplant	1	1800.00	4.15**	0.95	3.96**
Ortam x çesit x eksplant	2	316.66	0.73*	0.46	1.91*
Süre x eksplant	1	8022.22	18.51**	4.75	19.70**
Ortam x süre x eksplant	2	938.88	2.16*	0.50	2.09*
Çesit x süre x eksplant	1	88.88	0.20	0.01	0.01
Ortam x çesit x süre x eksplant	2	1172.22	2.70**	0.25	1.05*
Hata	48	433.33		0.24	
Toplam	71				

\* 0.05 düzeyinde önemlidir

\*\*0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4.34 Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ön muamelesi ve sürenin etkisine ait Duncan analizi sonuçları

BAP (mg/l)	Sürgün oluşum oranı (%)**							
	Karacaşehir-90				Akman-98			
	4 gün		8 gün		4 gün		8 gün	
	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula
5	0.00	0.00c	6.66b	0.00	0.00b	6.66c	20.00b	0.00
10	0.00	53.33b	0.00c	0.00	0.00b	40.0a	40.00a	0.00
15	0.00	66.66a	13.33a	0.00	20.00a	20.00b	6.66c	0.00
BAP (mg/l)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*							
	Karacaşehir-90				Akman-98			
	4 gün		8 gün		4 gün		8 gün	
	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula	Embriyonik eksen	Plumula
5	0.00	0.00c	0.33b	0.00	0.00b	0.33c	0.66b	0.00
10	0.00	1.40a	0.00c	0.00	0.00b	0.76a	1.13a	0.00
15	0.00	0.93b	0.50a	0.00	0.66a	0.43b	0.66b	0.00

\* Harfler 0.05 düzeyinde farklı grupları göstermektedir

\*\* Harfler 0.01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir



Şekil 4.21 Akman-98 fasulye çeşidinin plumula eksplantlarından 0.5 mg/l BAP seleksiyon ortamında oluşan sürgünler

Sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçların elde edildiği dört gün - 10 mg/l BAP ön muamelesinin tekrarlanması sonucunda kanamisinmonosülfata dayanıklı 500 bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerden ancak 17 tanesi dış şartlara uyum sağlamıştır. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılarak bar geni primerleri ile aktarılan genleri taşıyan transgenik aday bitkiler teyit edilmiştir.

#### **4.4.4 *A.tumefaciens*'in pMH65:SN19 (*Cry1Ba/CryIIa*) ve pMH66:SN19 (*Cry1Ba/CryIIa*) hibrid geni taşıyan Agl0 bakteri hatları ile fasulyeye gen aktarımı**

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları 10 mg/l BAP içeren MS besin ortamında dört gün bekletilmiştir. Bu ortamdaki embriyolardan alınan 100'er adet plumula eksplantı ile *A. tumefaciens*'in kloroplast hedefli peptid içeren *Chrysanthemum rubisco* small subunit promotor ve terminator dizileri tarafından kontrol edilen pMH65:SN19 ve pMH66:SN19 hibrid geni taşıyan Agl0 hatları kullanılarak gen aktarımı yapılmıştır.

Eksplantlar 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. İki ay sonunda elde edilen sürgünler 2 mg/l IBA içeren köklendirme ortamına alınarak köklendirilmiş ve sonra iklim

dolabında dış şartlara alıştırmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.35’de verilmiştir. Çizelgeye göre pMH65:SN19 ve pMH66:SN19 hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında Akman–98 çeşidinde sırasıyla kanamisinmonosülfata dayanıklı olduğu tespit edilen 24 ve 11 adet sürgünden hepsi köklenmiştir. Karacaşehir–90 çeşidinde ise pMH65:SN19 hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 19 adet sürgünden 15 tanesi, pMH66:SN19 hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında ise kanamisinmonosülfata dayanıklı 35 adet sürgünden hepsi köklenmiş ve iklim dolabında dış koşullara alıştırmıştır (Şekil 4.22).

Akman–98 çeşidinde kanamisinmonosülfata dayanıklı toplam 35 adet bitkiden 25 tanesi, Karacaşehir–90 çeşidinde ise 54 adet bitkiden 24 tanesi dış şartlara uyum sağlamıştır.

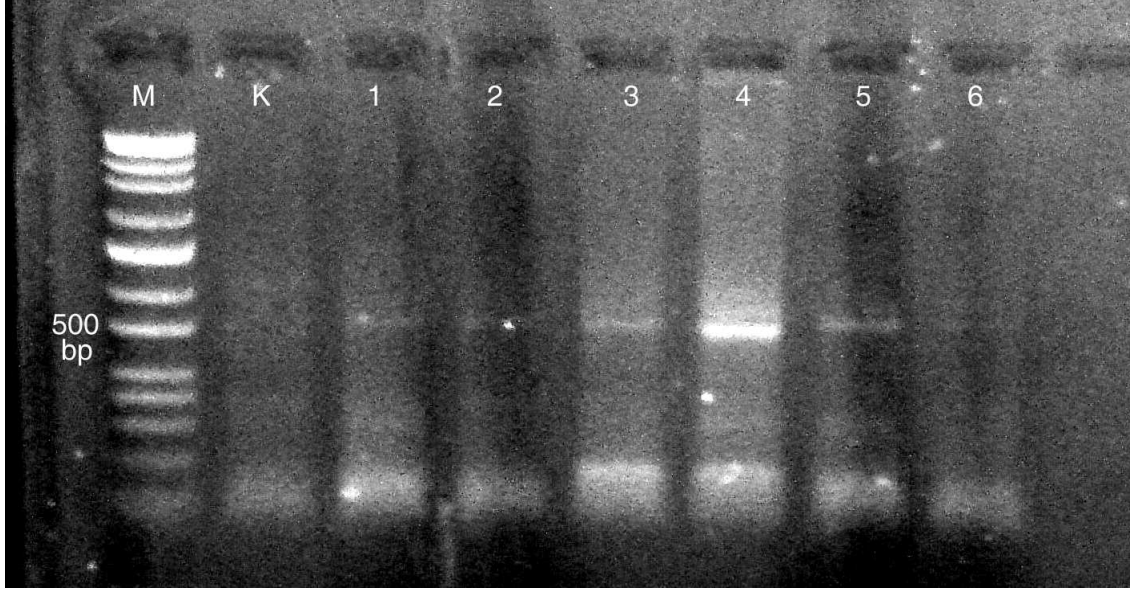
Çizelge 4.35 Fasulyenin Akman–98 ve Karacaşehir–90 çeşitlerine pMH65:SN19 ve pMH66:SN19 içeren *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı sonuçları

Böceklere Dayanıklılık geni	Kültüre alınan eksplant sayısı (Adet)	Akman–98		Karacaşehir–90	
		Kanamisine dayanıklı sürgün sayısı (Adet)	Köklenen sürgün sayısı (Adet)	Kanamisine dayanıklı sürgün sayısı (Adet)	Köklenen sürgün sayısı (Adet)
pMH65:SN19	100	24	24	19	15
pMH66:SN19	100	11	11	35	35
Dış şartlara uyum sağlayan bitki sayısı (adet)		25		24	

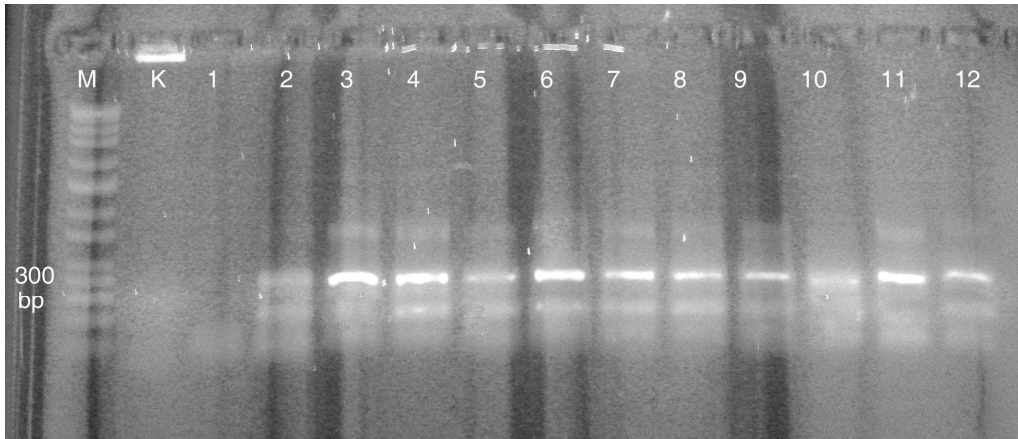


Şekil 4.22 İklim dolabında Akman–98 ve Karacaşehir–90 fasulye çeşitlerinin plumula eksplantından 0.50 mg/l BAP seleksiyon ortamında elde edilen bitkicikler

PCR analizi sonucunda NPT-II ve SN19 genine ait spesifik primerler (SO1, 2, 3 ve 4) kullanılmış ve aktarılan genleri taşıyan transgenik bitkiler teyit edilmiştir. Akman-98 çeşidine ait PCR analiz sonuçları Şekil 4.23 ve 4.24’de gösterilmiştir.



Şekil 4.23 Bt genleri içeren bakteri hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisinmonosülfata dayanıklı Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde SO1 ve 2 primerleri kullanılarak *NPT-II* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi  
M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 3.,4. ve 5. kulvarlar transgenik fasulye bitkileri-SN19 geni (pMH66), 1., 2. ve 6. kulvarlar transgenik adayı negatif fasulye bitkisi-SN19 geni (pMH66)



Şekil 4.24 Bt genleri içeren bakteri hattı ile gen aktarımından elde edilen kanamisinmonosülfata dayanıklı Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde SO3 ve 4 primerleri kullanılarak *NPT-II* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi  
M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 1. ve 2. kulvarlar transgenik adayı negatif fasulye bitkileri-SN19 geni (pMH65), 3.-12. kulvarlar transgenik fasulye bitkileri-SN19 geni (pMH65)

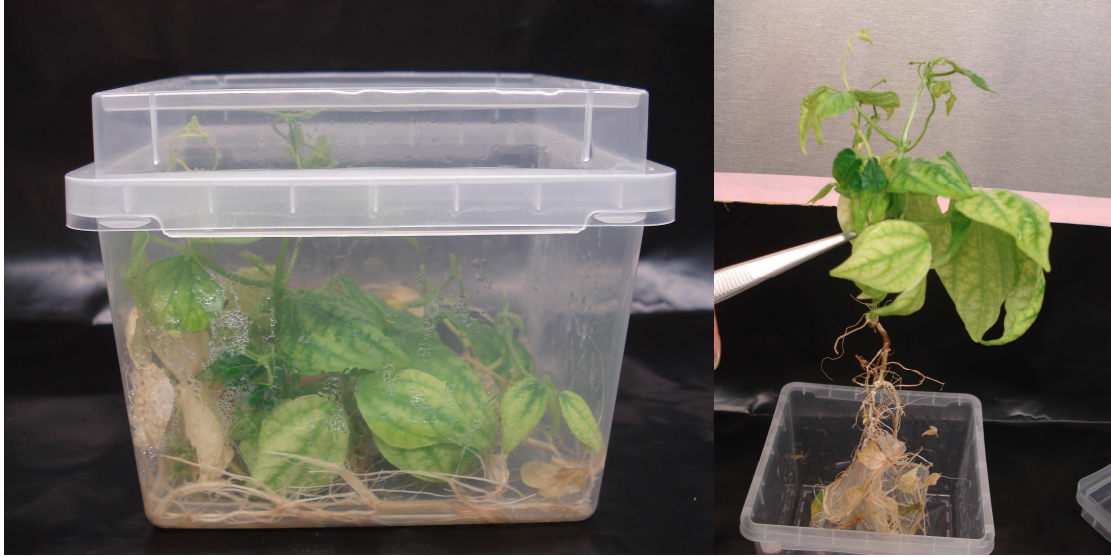
#### 4.4.5 *OCII-7* ve *GNA* Lektin Genlerinin *A. tumefaciens* Aracılığıyla Aktarımı

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları 10 mg/l BAP içeren MS besin ortamında 20 gün bekletilmiştir. Bu embriyolardan alınan 100'er adet plumula eksplantı ile *A. tumefaciens*'in böceklere dayanıklılık amaçlı çeltik bitkisinden izole edilen oryzocystein I (*OCII-7*) ve kardelen bitkisinden izole edilen lektin (*GNA 105*) genlerini taşıyan LBA 4404 bakteri hatları kullanılarak gen aktarımı yapılmıştır. *OCII-7* ve *GNA 105* genlerini taşıyan bakteri hatları bitkisel seleksiyon amaçlı kanamisinmonosülfata dayanıklılığı sağlayan *NPT-II* genini taşımaktadır.

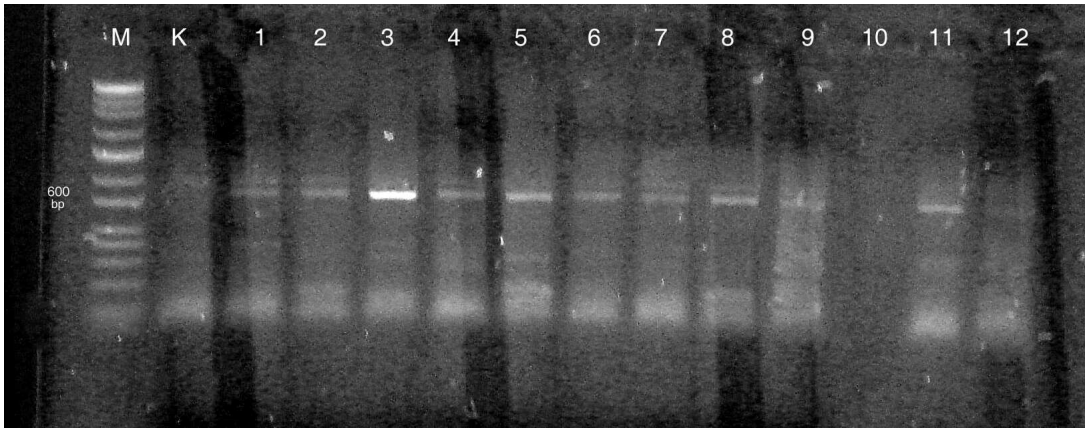
Eksplantlar 1.00 mg/l BAP, 500 mg/l Agumentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. İki ay sonunda elde edilen sürgünler 2 mg/l IBA içeren köklendirme ortamına alınarak köklendirilmiş ve sonra iklim dolabında dış şartlara alıştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.36'da verilmiştir. Çizelgeye göre *OCII-7* ve *GNA 105* hatları kullanılarak yapılan gen aktarımında Akman-98 çeşidinde sırasıyla kanamisinmonosülfata dayanıklı olduğu tespit edilen 54 ve 34 adet sürgünden 25 ve 21 adet bitki köklenmiştir (Şekil 4.25). Karacaşehir-90 çeşidinde ise *OCII-7* hattı ile yapılan gen aktarımından kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgün elde edilememiştir. *GNA 105* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında ise kanamisinmonosülfata dayanıklı 10 adet sürgünden yalnızca 3 tanesi köklenmiş ve dış şartlara uyum sağlamıştır. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu yapılmış ve PCR analizi ile transgenik bitkiler teyit edilmiştir. PCR analiz sonuçları Şekil 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.36 Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitleri *OCII-7* ve *GNA 105* *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı

Akman-98			
Böceklere dayanıklılık geni	Kültüre alınan eksplant sayısı (Adet)	Kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgün sayısı (Adet)	Köklenen sürgün sayısı (Adet)
<i>OCII-7</i>	100	54	25
<i>GNA 105</i>	100	34	21
Karacaşehir-90			
Böceklere dayanıklılık geni	Kültüre alınan eksplant sayısı (Adet)	Kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgün sayısı (Adet)	Köklenen sürgün sayısı (Adet)
<i>OCII-7</i>	100	0	0
<i>GNA 105</i>	100	10	3



Şekil 4.25 Akman-98 fasulye çeşidinde *OCII-7* ve *GNA 105* genlerini içeren *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı



Şekil 4.26 GNA lektin geninin aktarıldığı Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde *NPT-II* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi  
M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 10. ve 12. kulvarlar transgenik adayı negatif fasulye bitkileri, diğer kulvarlar transgenik fasulye bitkileri

#### 4.4.6 *A. tumefaciens*'in böceklere dayanıklılık genleri taşıyan *Cry 1Ac*, *Cry 1C*, *Cry 1CST*, *Cry 2A*, *Cry 2AST*, *Cry 1Ab*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* hatları ile fasulyeye gen aktarımı

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları sterilizasyondan sonra 24 saat süresince 4 °C'de bekletilmiş ve tohum kabukları çıkarılarak tohumlar MS besin ortamında 1 gün bekletilmiştir. Bu tohumlar *A. tumefaciens*'in *Cry 1Ac*, *Cry 1C*, *Cry 1CST* genleri içeren

hatları ile 4000 µl/30 ml NB içinde ½ saat inoküle edildikten sonra ko-kültüvasyon ortamına alınmış ve bu ortamda iki gün bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Agumentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Seleksiyon ortamında tohumlarda kararma, çimlenme ve sürgün vermeksizin köklenmeler gözlenmiştir. İki gün süren kokültüvasyon süresinin ve 4000 µl/30 ml NB bakteri konsantrasyonunun fazlalığı tohumların gelişimini engellemiştir.

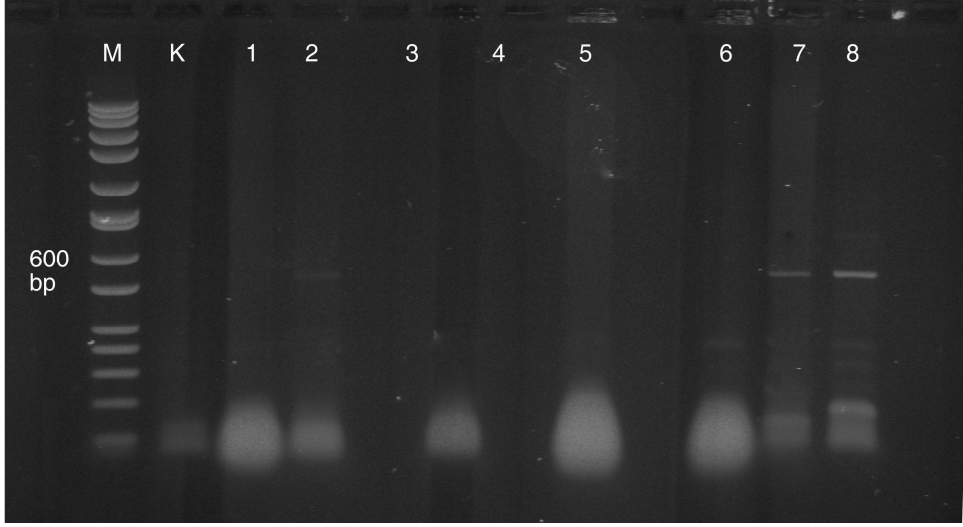
Benzer şekilde Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları sterilizasyondan sonra 24 saat süresince 4 °C'de bekletilmiş ve tohum kabukları çıkarılarak tohumlar MS besin ortamında 1 gün bekletilmiştir. Bu tohumlar *A. tumefaciens*'in *Cry 2A*, *Cry 2AST*, *Cry 1Ab*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* genlerini içeren hatları ile 2000 µl/30 ml NB içinde ½ saat inoküle edildikten sonra ko-kültüvasyon ortamına alınmış ve bu ortamda iki gün bekletilmiştir. Tohumlar 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Agumentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Gelişen sürgünler 2 mg/l IBA köklendirme ortamında köklendirildikten sonra iklim odasında ve serada dış şartlara alıştırmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.37'de verilmiştir.

Çizelge 4.37 Fasulyenin Akman–98 ve Karacaşehir–90 çeşitlerine *Cry 1Ac*, *Cry 1C*, *Cry 1CST*, *Cry 2A*, *Cry 2AST*, *Cry 1Ab*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* genlerini içeren *A. tumefaciens* hatları ile gen aktarımı sonuçları

Böceklere Dayanıklılık geni	Karacaşehir–90		
	Kültüre alınan eksplant sayısı (Adet)	Kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgün sayısı (Adet)	Köklenen sürgün sayısı (Adet)
<i>Cry 1Ac</i>	100	0	0
<i>Cry 1C</i>	50	3	0
<i>Cry 1CST</i>	50	1	1
<i>Cry 2A</i>	100	12	2
<i>Cry 2AST</i>	100	0	0
<i>Cry 1Ab</i>	100	3	1
<i>PMH65:SN19</i>	100	59	0
<i>PMH66:SN19</i>	100	81	0
Toplam	700	159	4
Böceklere Dayanıklılık geni	Akman–98		
	Kültüre alınan eksplant sayısı (Adet)	Kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgün sayısı (Adet)	Köklenen sürgün sayısı (Adet)
<i>Cry 1Ac</i>	100	0	1
<i>Cry 1C</i>	50	3	1
<i>Cry 1CST</i>	50	3	1
<i>Cry 2A</i>	100	6	1
<i>Cry 2AST</i>	100	53	53
<i>Cry 1Ab</i>	100	2	2
<i>PMH65:SN19</i>	100	86	0
<i>PMH66:SN19</i>	100	39	0
Toplam	700	192	59

Çizelgeye göre *Cry 2A*, *Cry 2AST*, *Cry 1Ab*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* hatları kullanılarak yapılan gen aktarımında Karacaşehir–90 çeşidinde 3 adet bitki, Akman–98 çeşidinde ise 56 adet bitki köklendirilmiştir. Karacaşehir–90 çeşidinde *Cry 1Ac*, *Cry 1C*, *Cry 2AST*, *PMH65:SN19*, *PMH66:SN19* bakteri hatları ile yapılan gen aktarımında; Akman–98 çeşidinde ise *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* bakteri hatları ile yapılan gen aktarımında hiç bitki elde edilememiştir. Karacaşehir–90 çeşidinde ise *Cry 1CST* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 1 adet bitki aynı zamanda köklenmiştir. *Cry 2A* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 12 adet sürgünden 2 tanesi, *Cry 1Ab* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında ise kanamisinmonosülfata dayanıklı 3 adet sürgünden yalnızca 1 tanesi köklenmiştir. Akman–98 çeşidinde kanamisinmonosülfata dayanıklı toplam 192 adet sürgünden 59 tanesi köklenmiş ve dış şartlara uyum sağlamıştır. Karacaşehir–90 çeşidinde ise kanamisinmonosülfata dayanıklı

159 adet sürgünden ancak 4 tanesi köklendirilerek dış şartlara adaptasyonu sağlanabilmiştir. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılmıştır. NPT-II primerleri ile aktarılan genleri taşıyan transgenik aday bitkiler teyit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 Serada gelişen Akman-98 fasulye çeşidine ait bitkilerde *NPT-II* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi  
M) markör, K) Akman-98 fasulye çeşidi - negatif kontrol, 1.-6. kulvarlar *cry2A* (p2AST PRD) geni negatif fasulye bitkileri, 7.-8. kulvarlar *cry2A* (p2AST PRD) genini taşıyan transgenik fasulye bitkileri

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fasulye bitkisi proteince ve mineral maddelerce oldukça zengin bir bitkidir ve Türkiye'nin her köşesinde sevilerek değişik şekillerde beslenmede kullanılmaktadır. Bu bitkinin gelişimi süresince fungus, bakteri ve böcekler gibi hastalık ve zararlılar yüzünden hem tarlada hem de depoda oldukça fazla miktarda ürün kaybı meydana gelmektedir. Ürün kaybını azaltabilmek için Türkiye'de değişik tarımsal araştırma enstitülerinde ve üniversitelerde geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak hem bakteri, fungus ve hem de böceklere karşı dayanıklı çeşitler elde etmek için çalışmalar devam etmektedir. Ancak geleneksel ıslah çalışmalarıyla istenilen özelliklere sahip yeni bitkiler elde edilmesi çok uzun zaman almakta ve aynı zamanda istenilen nihai hedefe ulaşmak mümkün olamayabilmektedir. Bitkilere istenilen özelliklerin kısa zamanda kazandırılabilmesi için kullanılan biyoteknolojik yöntemler oldukça önemlidir.

Baklagil bitkilerinden özellikle fasulyede genel olarak fazla sayıda *in vitro* rejenerasyon ve gen aktarımı çalışmaları bulunmamaktadır. Bitkilerin fenolik bileşikleri ve eksplantların rekalsitrant özelliklerinden dolayı çalışmalar oldukça güçtür. Rejenerasyon sisteminin ve dolayısıyla teknolojik sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma kapsamında fasulyenin önemli bir sorunu olan tohum böcekleri zararının önlenmesine yönelik, *A. tumefaciens* ile gen aktararak böceklere dayanıklılık sistemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Yerel olarak böceklere dayanıklı bitki eldesi dünya ve özellikle Türkiye ekonomisi için çok büyük bir önem arz etmektedir. Bu çalışmada ilk önce fasulye bitkisinin değişik eksplantları kullanılarak *in vitro* şartlarda rejenerasyon sistemi optimize edilmiş, bitkinin hızlı bir şekilde çoğaltımı sağlanmış ve daha sonra buradan yola çıkarak böceklere dayanıklılık genleri taşıyan *A. tumefaciens*'in farklı hatları ile gen aktarımı yapılmıştır.

*In vitro* çalışmalarda bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenmiş, steril bitki ve daha sonra eksplant elde etmek amacıyla gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi oldukça önemlidir. En uygun dezenfektan çeşidi, dozu ve süresi daha sonra yapılacak çalışmaları olumlu şekilde etkilemektedir. Bitki doku kültürü çalışmalarında NaOCl, CaOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HgCl, AgNO<sub>3</sub>, PPM ve değişik antibiyotikler ile benzeri maddeler kullanılabiliriyorsa da en yaygın olarak kullanılanı NaOCl (ticari çamaşır suyu)'dür (Sağlam 2005).

Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon çimlenmeyi doğrudan etkilemektedir ve oldukça önemlidir. NaOCl sterilizasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda NaOCl'ün tohumlara zarar verdiği ve tohumların çimlenmesini engellediği görülmüştür. Özellikle Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin çimlenmesini tamamen durdurduğu tespit edilmiştir. B sebeple pH, su sıcaklığı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi farklı yöntemler denenmiş ve bu yöntemlerin çimlenme oranlarını belli bir miktarda etkilediği ve artırdığı gözlenmiştir. Çimlenmeyi %100 artırdığı belirlenen en iyi yöntem, tohumların MS besi ortamından temasının kesilmesi şeklindeki uygulama olan filtre kağıtları olmuştur. Bu yöntemin *in vitro* şartlarda çimlenme problemi yaşanan diğer fasulye çeşitlerinde de kullanılabileceği düşünülmekte ve önerilmektedir.

Bu çalışmada Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin tohumlarının yüzey sterilizasyonu için en uygun dezenfektan dozu ve süresi belirlenmeye çalışılmış ve bu amaçla çamaşır suyunun %20'lik dozu ile 5, 10, 20 ve 30 dakika süreleri uygulanmıştır. Akman-98 çeşidinde bulaşksız en fazla çimlenme %20'lik çamaşır suyunda 5 dakika sürede elde edilmiştir. Karacaşehir-90 çeşidinde ise aynı doz ve sürelerin tohumların gelişimini olumsuz yönde etkilediği ve tohumların bir kısmının hiç çimlenmediği bir kısmının ise çimlendiği fakat gelişimlerini tamamlayamadıkları gözlenmiştir. Bunun üzerine belirgin şekilde meydana gelen bu zararı azaltmak ve yeterli miktarda çimlenmeyi sağlamak için farklı dezenfektan, süre, pH, filtre kâğıdı ve çamaşır suyu sıcaklıkları denenmiştir.

NaOCl, su ile karıştırıldığı zaman kolayca bozulmakta ve bozulma esnasında Na<sup>+</sup> ve OCl<sup>-</sup> iyonlarına, bu iyonlar ise daha sonra NaOH ve HOCl'e dönüşmektedir. NaOCl, eksplantlarla muamele edildiğinde organoklorin oluşturmakta ve organoklorin bitki sterilizasyonunda etkili olmasına rağmen aynı zamanda bitki ve klorofil hücrelerine zarar da vermektedir. Bitki hücrelerinin klorofil pigmentleri kromofor hücreler taşımaktadır. NaOCl ile reaksiyon sonucunda kromofor hücrelerdeki kimyasal bağlar kaybolmaktadır. Bunun sonucunda hücrelerde bir değişim meydana gelmekte ve hücreler fotosenteze devam etmemektedir. Bu sebeple bu çalışma kapsamında kullanılan çeşitlerin tohumları da çamaşır suyu ile steril edildikten sonra bu tohumlardan gelişen bitkiciklerin ölmesine sebep olmuştur.

Yüzey sterilizasyonunda kullanılan NaOCl'ün bakteri öldürücü etkisi, bakteri hücre duvarından geçebilmesi ve dolayısıyla bakterinin ölümüne sebep olmasından

kaynaklanmaktadır.  $\text{ClO}_2$ 'deki klorin iyonu bakteri hücrelerinden geçtikten sonra sekiz kat daha fazla oksidasyona maruz kalmaktadır. Benzer şekilde  $\text{ClO}_2$  klorofil hücrelerine girip hücrelerin yıkımına sebep olmakta bu da protoplazmadaki suyun kaybolmasından ileri gelmektedir. Klorofilin yıkımı sonucunda hücrelerde beyazlaşma meydana gelmekte ve eksplantlar fotosentez yapamadığı için ölmektedir. Bunun dışında başka stabil olmayan klorin maddeler veya  $\text{ClO}_2$  hücredeki enzimleri inaktif hale getirebilmekte ve sonucunda oksidasyon ile hücre ölümü gerçekleşebilmektedir.

Yukarda belirtildiği gibi  $\text{NaOCl}$ 'ün su ile reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan  $\text{NaOH}$ 'in etkisinden dolayı pH genelde 12 ve üzerinde bir değerdedir.  $\text{HOCl}$  çok etkili bir madde olup, sterilizasyonda önemli rol oynamaktadır.  $\text{NaOCl}$ 'ün pH'sı, içerisinde bulunan  $\text{HOCl}$  ve  $\text{OCl}$  iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır.  $\text{NaOCl}$  bakteri, virüs ve fungusa karşı çok etkili bir dezenfektan olup, yüksek sıcaklık  $\text{NaOCl}$  içinde klorat iyonu oluşturmaktadır.  $44\text{ }^\circ\text{C}$ 'den az sıcaklıkta az miktarda klorat oluşmaktadır.

Düşük pH'da  $\text{NaOCl}$ 'de bulunan  $\text{HOCl}$  oranının yükselmesiyle beraber oksidasyon ve redaksiyonun potansiyeli de yükselmektedir. Bunun yanı sıra  $\text{HOCl}$ 'nin stabilitesi de düşmektedir.  $\text{NaOCl}$ 'deki etkili antimikrobiyal özelliğin sebebi yüksek pH ( $\text{OH}$  iyonlarının fazlalığı)'dır. Sonuçta kimyasal sitoplazma membranı etkilenmektedir ve yeniden dönüştürülemez enzim aktivitesi ile hücrelerin metabolizmalarında biyosentetik değişim ve fosfolipit bozulması meydana gelmektedir. Bu yüzden  $\text{NaOCl}$  bakteri ve mikroorganizmalara karşı etkili olmaktadır.

$\text{NaOCl}$ 'nin stabilitesinde kimyasalın konsantrasyonu, sıcaklık, alkalinite, pH, ışık önemli faktörlerdendir. Konsantrasyonu yüksek olan  $\text{NaOCl}$  stabil olamamakta ve konsantrasyon düştükçe daha fazla stabil olabilmektedir.  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'den fazla sıcaklıkta depolanmış kimyasalda klorat oranı sıcaklıkla beraber oransal olarak yükselmektedir. Bu sterilizasyon çalışmasında düşük su sıcaklığı ve pH bitki hücrelerine oldukça az zarar vermiş olup, aynı zamanda bakteri ve fungusların ölümüne sebep olarak bitki sterilizasyonuna olumlu etki yapmıştır. Çamaşır suyu sıcaklığının çimlenme üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla iki farklı sıcaklık değeri;  $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  (oda sıcaklığı) ve  $4\text{ }^\circ\text{C}$  kullanılmıştır. Çamaşır suyunun %5, 10, 20 dozları ile 5 dk. yapılan sterilizasyon sonucunda en fazla çimlenme %5'lik çamaşır suyu dozu ve  $4\text{ }^\circ\text{C}$  çamaşır suyu sıcaklığında %66.66 olarak tespit edilmiştir.  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'den fazla sıcaklıkta depolanmış

kimyasalda klorat oranı sıcaklıkla beraber oransal olarak yükselmektedir (Ponzano vd. 2007). Klorat yüksekliği tehlike oluşturmakta ve bitki hücrelerine zarar vermektedir. Oda sıcaklığında çamaşır suyunda klorat oranı fazla olduğundan tohum hücreleri daha fazla zarar görmektedir. 4 °C'de kimyasaldaki klorat oranı sıcaklığa bağlı olarak düşmekte olup, tohum hücrelerine daha az zarar verip tohumların çimlenmesine olumlu etki sağladığı düşünülmektedir.

Hidrojen peroksit renksiz kokusuz bir kimyasal madde olup genel olarak dezenfeksiyon (mikrop öldürücü- oksijenli su) amaçlı olarak %3 oranında kullanılmaktadır. Tohumlar hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'in %10, 20, 30, 40, 50 ve 60 oranlarında 5 dk. sterilizasyona tabi tutulmuştur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in %10, 20, 30, 40 dozlarında oldukça fazla bulaşıklık gözlenmiş olmasına rağmen, %50 ve 60 dozlarında hiç bulaşıklığa rastlanmamış ve %66.66 ile en fazla çimlenme %50 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozunda tespit edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su ile karıştırıldığı zaman yüksek oranda H<sup>+</sup> ve <sup>-</sup>OH iyon taşımaktadır. H<sup>+</sup> ve <sup>-</sup>OH iyonlarının oranı sterilizasyonda önemli rol oynamaktadır. Su ile karıştırıldığında her ikisinin konsantrasyonu düşmektedir. Ancak bitki hücreleri ile reaksiyon sonucunda herhangi zehirli bir madde oluşturmamaktadır. Düşük oranda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içinde fazla miktarda su bulunduğu için <sup>-</sup>OH iyonlarının miktarı az ve kimyasalın sterilizasyonda az etkili olduğu düşünülmektedir. %60 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de ise <sup>-</sup>OH iyonlarının miktarı daha fazla olup, tohum hücrelerine zarar verdiği düşünülmektedir. NaOCl'ün pH'sı, içerisinde bulunan HOCl ve OCl iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. HOCl çok etkili bir madde olup, sterilizasyonda önemli rol oynamaktadır. NaOCl'nin stabilitesinde kimyasalın konsantrasyonu, sıcaklık, alkalinite, pH, ışık önemli faktörlerdendir. Konsantrasyonu yüksek olan NaOCl stabil olamamakta ve konsantrasyon düştükçe daha fazla stabil olabilmektedir. Düşük pH'da NaOCl'de bulunan HOCl oranı yükselmektedir. Dolayısıyla oksidasyon ve redaksiyonun potansiyeli yükselmektedir. Bunun yanısıra HOCl'nin stabilitesi de düşmektedir. NaOCl'deki etkili antimikrobiyal özelliğin sebebi yüksek pH (OH iyonlarının fazlalığı)'dır. Simon ve Helliwel (1998), saf su ile klorofil a'nın oluşturduğu düzeyde pH:8 den düşük olduğunda klorofil a'nın hızlı bir şekilde fiofitin a'ya dönüştüğü buna karşın pH:8 den büyük olduğu durumda ise hidrolize uğrayarak fitol grubundan ayrıldığı saptanmıştır. Araştırmacılar bitkilerdeki klorofilin bozulmasının fioforbitten sonrada devam ederek renksiz ürünlere kadar sürdürdüğünü göstermektedir. Sonuçta kimyasal sitoplazma membranı etkilenmektedir ve yeniden dönüştürülemez enzim aktivitesi ile hücrelerin metabolizmalarında biyosentetik değişim ve fosfolipit bozulması meydana gelmektedir. Bu yüzden NaOCl bakteri ve mikroorganizmalara karşı etkili olmaktadır. Çamaşır suyunun pH

değerleri 12 (oda sıcaklığında), 10, 8, 6 olarak ayarlanarak tohumlar %5'lik ticari çamaşır suyunda (Ace<sup>®</sup>, %5-6 NaOCl) 5 dk. tutulmuştur. Çalışma sonucunda en iyi çimlenme %70 ile çamaşır suyunun pH'sı 8 iken alınmıştır. Bu tez kapsamındaki çalışmanın sonucu yukarıda belirtilmiş araştırma ile uyum göstermektedir.

Filtre kâğıtları ile yapılan sterilizasyon çalışması sonuçlarında herhangi bir kontaminasyon gözlenmemiştir. Yapılan çoklu denemeler sonucunda tohumlardan %100 oranında sağlıklı, çimlenmiş bitkicikler elde edilmiştir. Steril edilmiş tohumların hücre zarları NaOCl ile muamele sonucunda az da olsa belli oranda zarar görmektedir. Ortamda sukroz ve MS makro ve mikro elementlerin bulunması hücrelerin dışında yüksek basınçlı bir gradient oluşturmaktadır. Osmozisde kimyasal maddeler çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçiş yaparak her iki taraf bir denge sağlamaya çalışmaktadır. Yukarıda belirtilmiş olan sterilizasyon çalışmalarında steril edilmiş tohumlar sukroz içeren MS ortamda çimlenmesi için kültüre alınmıştır. Osmozis sonucunda tohum hücrelerinin sitoplazma ve dışarıdaki sukroz ile MS ortamdaki makro ve mikro elementler arasında bir denge sağlanması sonucunda hücrelerin yapısı bozulmaktadır. Dolayısıyla çimlenmesinde olumsuz sonuç görülmektedir. Fakat en son yapılan çalışmada filtre kâğıtları kullanıldığı için yukarıda belirtildiği gibi osmozis önemli şekilde etkilemediği için hücreler hidrolize olmamakta ve Karacaşehir-90 çeşidinin tohumlarının çimlenmesindeki olumsuz etki kaldırılmış olmaktadır.

Fasulye bitkisinin rejenerasyon çalışmalarında bitkiden salgılanan fenolik bileşiklerin etkisi ile eksplantlarda oldukça yüksek oranda kararma gözlenmiştir. Kararmanın rejenerasyon kabiliyetini azalttığı görülmüştür. Sürgün rejenerasyonuna NAA'nın fazla miktarı olumsuz etki meydana getirmektedir. Olgunlaşmamış kotiledon, plumula ve embriyo ile iki kotiledon eksplantlarının rejenerasyon kabiliyetinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Fasulye bitkisi ile yapılacak diğer rejenerasyon çalışmalarında öncelikli olarak bu eksplantların tercih edilebilir olduğu düşünülmektedir.

Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda picloramın etkisine bakılmıştır. Sürgün oluşum oranı Karacaşehir-90 çeşidinin kotiledon eksplantlarında ve en fazla %46.00 ile 2 ve 10 mg/l picloram içeren ortamlarda, Akman-98 çeşidinde ise %100.00 ile 8 mg/l picloram içeren ortamda tespit edilmiştir. Ancak kararmanın olumsuz etkisi ile embriyoların gelişemeyerek öldüğü gözlenmiştir. Vidoz vd. (2006), yabancı

yerfistığının rejenerasyon çalışmalarında 1.41 µM picloram ile 0.044 µM BAP kullanmışlar ve sürgün oluşumundan %24 oranında bitki elde etmişlerdir. Araştırmacılar eksplant kaynaklarının ve eksplant yaşının somatik embriyogenesis üzerinde belirgin etkiye sahip olduğunu görmüşlerdir.

Bitkilerde nekrozu ve fenolik bileşikler önlemek amacıyla rejenerasyon ortamlarına aktif kömür ve salisilik asit tek başına veya beraber ilave edilmiştir. Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve 5 g/l aktif kömürün etkisine bakılmış %100.00 ile en fazla sürgün oluşum oranı 0.05 mg/l ve 0.10 mg/l TDZ içeren MS besin ortamlarında, apikal meristem eksplantından elde edilmiştir. Ancak, 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında %20 bitki oluşumu dışında diğer hiçbir ortamda sürgün oluşumundan bitki elde edilememiştir. Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve 0.25 mg/l salisilik asitin etkisine bakılmıştır. Apikal meristem, yaprak ve petiol eksplantlarında kallus, sürgün oluşumu ve bitki oluşum oranı bakımından en iyi sonuçlar %73.33 ile apikal meristem eksplantlarından 0.40 mg/l TDZ içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda TDZ ve 5 g/l aktif kömür ile 0.25 mg/l salisilik asitin etkisi bakılmıştır. Apikal meristem, yaprak ve petiol eksplantlarında sürgün oluşumu oranı %100 ile en fazla apikal meristem eksplantında 0.15, 0.20, 0.40 ve 0.45 mg/l TDZ dozlarında gözlenmiştir. 0.20 ve 0.45 mg/l (%20) TDZ içeren MS besin ortamları dışında hiçbir ortamda bitki oluşumu gözlenmemiştir. Doku kültürü çalışmalarında fenolik oksidasyon sonucunda kahverengileşmeyi önlemek için aktif kömür yaygın olarak kullanılmaktadır (Carlberg vd. 1983, Teixeira vd. 1994). Horner vd. (1977) ile Ebert ve Taylor (1990), aktif kömür içeren MS besin ortamında yüksek rejenerasyonun değişik sebeplerinden biri olarak aktif kömürün fenolik bileşikler emmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bayraç (2004), mercimeğin *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında 200 µM salisilik asidin kotiledon yaprak sapından embriyo oluşum oranını %25 artırdığını ve nekrozu ise %24 azalttığını görmüştür. Bu tez kapsamında yapılmış olan çalışmalar yukarıda belirtilmiş çalışmalarla uyum sağlamaktadır.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin embriyolarında, bir hafta-20 mg/l NAA ön muamelesinin ve farklı dozlarda TDZ'nin sürgün rejenerasyonuna etkisine bakılmıştır. Embriyolar 20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında 1 hafta bekletilen eksplantlar 0.05-0.45 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA ile 0.2 mg/l askorbik asit içeren MS rejenerasyon ortamlarında

kültüre alınmıştır. Değişen TDZ dozlarında en fazla %91.66 oranında sürgün ve eksplant başına 2.75 adet sürgün belirlenmiştir. Akman-98 çeşidinde en fazla sürgün sekonder eksplantta %83.33 iken, Karacaşehir-90 çeşidinde ise %91.66 olarak gözlenmiştir. Akman-98 çeşidinin sekonder eksplantında eksplant başına en fazla 1.66 adet sürgün, Karacaşehir-90 çeşidinde ise 2.25 adet sürgün gözlenmiştir. Das vd. (1999), *Litchi chinensis* bitkisinin tohumlarını 20 mg/l BAP içeren MS ortamda kâğıt köprüler üzerinde çimlendirmişlerdir. Kotiledon boğumdan 4 hafta içinde 28 adet sürgün elde etmişlerdir. Ayrıca bitkinin koltuk altı meristemlerinin her iki günde bir, 100 µgram BAP ile muamele ederek her koltuk altı meristeminden 8 hafta içinde 8 sürgün elde etmişlerdir. Andersone ve Levinish (2004), sitokinin etkisini artırmak için ilk önce *Pinus sylvestris* bitkisinin tomurcuk eksplantlarında soğuk muamelesinden sonra yüksek oranda BAP muamelesinin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Madhulatha vd. (2004), *in vitro* muz çoğaltımını 50 mg/l BAP ve 50 mg/l kinetin içeren ortamda 60 dk bekleterek elde etmişlerdir. Andrade vd. (2006), *Eucalyptus grandis* bitkisinde *in vitro* çoğaltım için yüksek oranda bitki büyüme düzenleyicisi uygulamasını denemişlerdir. BAP'ın 0, 200, 400 ve 600 mg/l oranlarını 1, 2 ve 3 saat süreyle uygulamışlardır. 21 günlük kültürden sonra en etkili sonuçları BAP'ın 200 mg/l oranının 1 ve 2 saat muamelesinden elde etmişlerdir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantları 1.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmış eksplant başına 1.03 adet sürgün gözlenmiştir. Daha önce yapılmış olan sürgün rejenerasyonu çalışmalarında 0.05, 0.10, 0.15 mg/l TDZ ile 0.25 mg/l NAA ve 0.50, 1.00 ve 1.50 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA ortamları ile fasulyenin olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantları kullanılmıştır. İki çalışmanın neticesinde TDZ ile NAA etkileşimine göre BAP ile NAA etkileşiminden daha iyi sonuçlar ortaya çıktığı ve kullanılan ortamlardan en uygun ortamın da 1.00 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA olduğu belirlenmiştir. Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinin her ikisinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından %67 sürgün elde edilmiştir. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından Akman-98 çeşidinde %7, Karacaşehir-90 çeşidinde ise %13 oranında sürgün elde edilmiştir. Fiziksel olarak yapılan gözlemlerden ve elde edilen sayısal verilerden NAA'in kullanılan oranının köklenmeyi teşvik ettiği ve sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Fasulye ile yapılacak rejenerasyon çalışmalarında NAA oranının ilk kültüre alma aşamasında 0.25 mg/l oranından daha düşük miktarlarda tutulmasının sürgün sayısını ve kalitesini artırabileceği düşünülmektedir.

Akman-98 çeşidinin kotiledon boğum ve apikal meristem eksplantları üzerine 0.10-0.30 mg/l TDZ ile 0.00-0.05 mg/l NAA'nın etkisine bakılmıştır. Kararmayı önlemek amaçlı ortamlara 5 mg/l aktif kömür eklenmiştir. 0.10 ve 0.30 mg/l TDZ içeren ortamlarda apikal meristem eksplantlarının hepsi sürgün meydana getirmiş olup, eksplant başına en fazla 4.70 adet sürgün gözlenmiştir. Kotiledon boğum eksplantında ise %93.33 ile en fazla sürgün 0.10 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında elde edilirken, eksplant başına en fazla sürgün 1.86 adet ile 0.20 mg/l TDZ içeren ortamdaki elde edilmiştir. Sürgün gelişimi ve sayısına NAA'nın herhangi bir etkisi olmamıştır. Çevirmen ve Akbulut (2003), sürgün rejenerasyonu için kullandıkları değişik BAP dozlarından 5 mg/l BAP ve 0.5 mg/l TDZ içeren MS ortamda yüksek oranda sürgün elde etmişlerdir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin kotiledon boğum ve apikal meristem eksplantları üzerine 0.10-0.30 mg/l TDZ ile 0.00-0.05 mg/l IBA'nın etkisine bakılmıştır. Akman-98 çeşidinde, 0.20 TDZ ile 0.05 IBA ve 0.30 TDZ ile 0.05 IBA içeren ortamlarda apikal meristem eksplantlarının hepsi sürgün meydana getirmiş olup, eksplant başına en fazla 4.20 adet sürgün gözlenmiştir. Kotiledon boğum eksplantında ise %73.33 ile en fazla sürgün 0.20 TDZ ve 0.30 TDZ+0.05 IBA içeren MS besin ortamlarından elde edilirken, eksplant başına en fazla sürgün 3.40 adet ile apikal meristem eksplantına benzer şekilde 0.20 mg/l TDZ içeren ortamdaki elde edilmiştir. Karacaşehir-90 çeşidinde ise, 0.10 mg/l TDZ içeren ortamda apikal meristem eksplantlarının hepsi sürgün meydana getirmiş olup, eksplant başına en fazla 3.50 adet sürgün gözlenmiştir. Kotiledon boğum eksplantında ise apikal meristem eksplantına benzer şekilde %80.00 ile en fazla sürgün 0.10 mg/l TDZ içeren ortamda elde edilirken, eksplant başına en fazla sürgün ise yine 3.50 adet olarak 0.30 mg/l TDZ içeren ortamdaki elde edilmiştir. Hossain vd. (2007), *Chrysanthemum morifolium* bitkisinde 5 mg/l TDZ ile 0.25 mg/l NAA ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> kullanarak kallus eksplantlarının sürgün rejenerasyonu için uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Anthony vd. (2004), *Leucopocon verticillatus* bitkisinin somatik embriyogenesis çalışmasında en iyi sonucu 10 µM TDZ, 5 µM IAA, %4 maltoz ve %0.7 agar içeren GamborgB5 ortamından elde etmişlerdir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin embriyoları, 10 mg/l BAP içeren MS ortamında 10 gün bekletildikten sonra embriyonik eksen ve plumula kısımları alınarak BAP'ın değişik oranlarında kültüre alınmıştır. Sürgün oranı ve eksplant başına sürgün sayısı Karacaşehir-90 çeşidinde sırasıyla en fazla %50.00 ve 1.40 adet olarak 1.25 mg/l BAP içeren

MS ortamda gözlenmiştir. Akman-98 çeşidinde ise yine sırasıyla %70.83 ve 2.35 adet olarak 0.50 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarında gözlenmiştir. Plumula eksplantında %79.16 ile en fazla sürgün 1.25 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilirken, embriyonik eksen eksplantında ise %37.50 ile 0.50 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiştir. Plumula eksplantında eksplant başına en fazla sürgün 2.13 adet ile 0.50 mg/l BAP ortamından elde edilirken, embriyonik eksen eksplantında ise 1.66 adet olarak gözlenmiştir. Sürgün oranı plumula eksplantında %58.33 ile her iki çeşitte de aynı çıkmış olmasına rağmen, embriyonik eksen eksplantında Karacaşehir-90 çeşidinde %1.33, Akman-98 çeşidinde %41.00 olarak gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı plumula eksplantında her iki çeşit için embriyonik eksen eksplantına oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Senthil vd. (2004) nohut bitkisinin embriyonik eksen eksplantını TDZ içeren besin ortamlarında kullanmışlar ve yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Daha önce Malik ve Saxena (1992) ile Jayanand vd. (2003), baklagillerin sürgün rejenerasyonunda TDZ'nin BAP ile kinetine göre daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Surekha vd. (2007) *cajanus cajan* (güvencin fasulyesi) bitkisinin plumula, embriyonik eksen, kotiledon ve 10-12 günlük tohumlarından elde edilen koltuk altı meristem eksplantlarını GUS geni içeren *A. tumefaciens*'in LBA 4404 hattı ile muamele etmişler ve çalışma sonucunda yüksek oranda sürgün elde etmişlerdir. Embriyonik eksen ve plumula eksplantları doğrudan sürgün oluşturmuştur. 10-12 günlük bitkiciklerden alınan embriyonik eksen eksplantları bölünmüş hücrelerden daha fazla farklılaşmış hücrelere sahiplerdir. Kotiledonların bağlanma kısımlarındaki koltuk altı meristemleri ve embriyo gen entegrasyonunda kullanışlı olabilmektedir. Elde edilen sonuçlar Potrykus (1991)'un çalışması ile dokuların *Agrobacterium* ile farklı aşamalarda hücreler tarafından şekillendiriliyor olması bakımından benzerdir. 10-12 günlük tohumdan elde edilen koltuk altı meristem eksplantları ve kotiledonlar transformasyon frekansı bakımından nerdeyse benzer sonuçlar vermektedirler. Özellikle farklılaşmış hücrelerdeki kromatin aşamasında bu eksplantlardaki farklılık düzeyi buna sebep olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak cajanus varyeteleri arasında Ti plazmidlerin kaynaşmasında genotipik varyasyon mevcuttur.

Fasulyenin Akman-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinin olgunlaşmış embriyo, radikula, yaprak ve kotiledon boğum eksplantları BAP ve NAA'li ortamlarda kültüre alınmıştır. Akman-98 çeşidinin kotiledon boğum eksplantlarından ve Karacaşehir-90 çeşidinin ise plumula eksplantlarından ve her iki çeşidin radikula eksplantlarından hiç sürgün gözlenmemiştir. Akman-98 çeşidinin embriyo eksplantında yalnızca 1.00 mg/l BAP- 4.00 mg/l NAA içeren ortamda %8.33 oranında sürgün oranı gözlenmiştir. Plumula eksplantında ise %41.66 ile en

fazla 0.25 mg/l BAP ile 1.00 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 2.00 mg/l NAA içeren ortamlarda sürgün gözlenmiştir. Karacaşehir-90 çeşidinde ise embriyonik eksen eksplantında en fazla sürgün %16.66 ile 1.00 mg/l BAP ve 4.00 mg/l NAA içeren ortamda elde edilmiştir. Karacaşehir-90 çeşidinin kotiledon boğum eksplantlarında ise 0.25 mg/l BAP ve 2.00 mg/l NAA içeren ortamda %25 olarak gözlenmiştir.

Çalışmada elde edilen bütün sonuçlar incelendiği zaman eksplantlar ve rejenerasyon ortamının bitki rejenerasyonu ve adaptasyonu üzerinde önemli etki yaptığı görülmüştür. Bu çalışmalardan yola çıkarak daha sonra yapılan gen aktarım çalışmaları için yol haritası çizilmiştir. Benzer şekilde Çevirmen ve Akbulut (2003) kültüre aldıkları eksplantların büyük çoğunluğunda, yüksek oranda aşı kaynaşması ve yeni sürgün oluşumu elde etmişler ve mikro aşıli fideleri köklendirilerek başarılı bir şekilde toprağa aktararak adaptasyon sağlamışlardır. Khawar vd. (2004), mercimekte 0.25 mg/l TDZ içeren MS besin ortamlarında kotiledon boğumlarından sürgün rejenerasyonu elde etmiş ve elde edilen sürgünleri 0.25 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirerek kum içeren saksılara aktarmışlardır.

Bütün rejenerasyon ve gen aktarımı çalışmalarında elde edilmiş olan sürgünler 2 mg/l IBA köklendirme ortamında köklendirildikten sonra  $24 \pm 2$  °C, 3000 lüks ve 16 saat ışık fotoperiyodunda ve %70 neme ayarlı iklim odası ve iklim dolaplarında dış şartlara alıştırılmaya çalışılmıştır. Ancak dış şartlara alıştırılmaya çalışılan bitkilerden bazıları hastalıklar gibi bazen içsel ve bazen de dışsal sebeplerle yaşamamıştır. Dış şartlara alışmış olan bitkilerin zaman içinde saksıları değiştirilmiş su ihtiyaçları giderilmiş ve başlangıçtaki yüksek nem değeri kademeli olarak %40'lara düşürülmüştür. Bu şekilde büyüme ve gelişimini tamamlamış bitkilerden tohum elde edilmiştir.

*A. tumefaciens*'in GV2260 p35GUSINT hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında Karacaşehir-90 çeşidinde bitki elde edilememiştir. Akman-98 çeşidinde ise 0.20 mg/l TDZ'li ortamda apikal meristem eksplantlarından elde edilen bitkiciklerden dış şartlara aktarılan 8 tanesinden ancak 3 tanesi yaşamış ve bu bitkilerle yapılan *GUS* testi sonucunda kanamisinmonosülfata dayanıklılık geni olan *NPT-II* ve *GUS* geninin bitkilere aktarıldığı tespit edilmiştir.

Karacaşehir-90 ve Akman-98 çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarının TDZ ile ön muamelesinden elde edilen plumula eksplantları ile LBA 4404 pRGGbar bakteri hattı kullanılarak gen aktarımı yapılmış ancak aşırı derecede kararma sonucunda eksplantlar gelişmemiş ve bitki elde edilememiştir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları ön muameleye tabi tutulmuştur. Buradan elde edilmiş olan embriyonik eksen ve plumula eksplantları *A. tumefaciens*'in *Cry IAb* geni taşıyan hattı ile muamele edilmiş ve sonra 0.5 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Karacaşehir-90 çeşidinde en fazla sürgün dört gün ön muamelesinde plumula eksplantında elde edilirken, Akman-98 çeşidinde ise en fazla sürgün hem dört gün ön muamelesinde plumula eksplantında hem de sekiz gün ön muamelesinde embriyonik eksen eksplantında elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı Karacaşehir-90 çeşidinde en fazla 1.40 adet, Akman-98 çeşidinde ise 1.13 adet olarak ölçülmüştür. En fazla sürgün elde edilen 10 mg/l BAP ön muamelesinde 4 gün uygulamasının tekrarlanması sonucunda kanamisinmonosülfata dayanıklı 500 bitkiden ancak 17 tanesi yaşamıştır. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılarak NPT-II primerlerinin varlığı teyit edilmiştir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları 10 mg/l BAP'da dört gün bekletilmiş ve bu embriyolardan alınan 100'er adet plumula eksplantı ile *A. tumefaciens*'in pMH65:SN19 ve pMH66:SN19 hibrid geni taşıyan Agl0 hatları ile gen aktarımı yapılmıştır. Eksplantlar 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Akman-98 çeşidinde pMH65:SN19 hattı ile yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgünlerden 24 tanesi, pMH66:SN19 hattı ile yapılan gen aktarımında ise 11 tanesi köklenmiştir. Karacaşehir-90 çeşidinde ise pMH65:SN19 hattı ile yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 19 adet sürgünden 24 tanesi, pMH66:SN19 hattı ile yapılan gen aktarımında ise 35 adet sürgünden hepsi köklenmiş ve dış şartlara alışmıştır. Benzer şekilde bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılarak NPT-II primerlerinin varlığı teyit edilmiştir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları 10 mg/l BAP içeren MS besin ortamında 20 gün bekletilmiş ve bu embriyolardan alınan 100'er adet plumula eksplantları ile *A. tumefaciens*'in *OCII-7* ve *GNA 105* genlerini taşıyan LBA 4404 bakteri hatları kullanılarak gen aktarımı yapılmıştır. Eksplantlar 1.00 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Akman-98 çeşidinde *OCII-7* bakteri hattı ile yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 54 adet sürgünden 25 tanesi köklenmiştir. *GNA 105* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 10 adet sürgünden yalnızca 3 tanesi köklenmiş ve dış şartlara uyum sağlamıştır. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılarak transgenik bitkiler teyit edilmiştir.

Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları *A. tumefaciens*'in *Cry IAc*, *Cry IC*, *Cry ICST* hatları ile 4000 µl / 30 ml NB içinde ½ yarım saat inokule edilmiş ve 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınmıştır. Seleksiyon ortamında tohumlarda kararma çimlenme ve sürgün vermeksizin köklenmeler gözlenmiştir. Ko-kültüvasyon süresinin ve bakteri konsantrasyonunun fazlalığı tohumların gelişimini engellemiştir. Benzer şekilde Akman-98 ve Karacaşehir-90 fasulye çeşitlerinin tohumları *A. tumefaciens*'in *Cry 2A*, *Cry 2AST*, *Cry IAb*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* hatları 2000 µl / 30 ml NB içinde ½ saat inokule edilmiştir. Tohumlar 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Akman-98 çeşidinde toplam 4 adet bitki, Karacaşehir-90 çeşidinde ise 59 adet bitki köklendirilmiştir. *Cry IAc*, *Cry IC*, *Cry 2AST*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* bakteri hatları ile yapılan gen aktarımında Karacaşehir-90 çeşidinde hiç bitki elde edilememiştir. Akman-98 çeşidinde ise *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19* bakteri hatları ile yapılan gen aktarımında hiç bitki elde edilememiştir. Karacaşehir-90 çeşidinde ise *Cry ICST* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı yalnızca 1 adet bitki aynı zamanda köklenmiştir. *Cry 2A* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında kanamisinmonosülfata dayanıklı 12 adet sürgünden 2 tanesi, *Cry IAb* hattı kullanılarak yapılan gen aktarımında ise kanamisinmonosülfata dayanıklı 3 adet sürgünden yalnızca 1 tanesi köklenmiştir. Akman-98 çeşidinde kanamisinmonosülfata dayanıklı toplam 67 adet sürgünden 59 tanesi köklenmiş ve dış şartlara uyum sağlamıştır. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılarak transgenik bitkiler tespit edilmiştir.

Fasulye önemli bir yemeklik tane baklagil bitkisi olduğundan dolayı bu bitkinin sorunlarını gidermek amacıyla ıslah çalışmalarının yapılması çok önemlidir. Ancak geleneksel ıslah çalışmaları çok uzun zaman aldığı için bu bitkide biyoteknolojik yollarla bitki ıslah ve iyileştirme çalışmaları çok önem taşımaktadır. Biyoteknolojik yollarla kısa sürede bir strese dayanıklı bitki elde etmek için başarılı *in vitro* rejenerasyon çalışmalarının yapılması önemli olmaktadır. Fasulyede çok sayıda *in vitro* rejenerasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Benzer şekilde yemeklik tane baklagillerde transgenik bitki elde etmek amacıyla yapılan çalışmalar da sınırlı kalmaktadır. Bunların birçoğunda transgenik bitki elde edilmesine rağmen bitkiler dış koşullara alıştırılamamıştır. Genotip, *Agrobacterium* hatları, eksplantlar, bakteri inokulasyon yöntemleri, sıcaklık, pH vb. bitki transformasyonuna direkt etki yapan faktörlerdir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda fasulyenin her iki çeşidinde *Agrobacterium*'un değişik hatları ve eksplantlardan değişik oranda transgenik bitki elde edilmiştir. Araştırmacılar başarılı sonuçlar elde etmek amacıyla farklı eksplantlar, bitki büyüme düzenleyici maddeleri, değişik plazmid içeren *Agrobacterium* hatları ve yöntemleri kullanmışlardır. Surekha vd. (2007), eksplant tipinin bitki transformasyon çalışmalarında etkili rol oynadığı bildirmiştir. Genel anlamda Karacaşehir-90 ve Akman-98 çeşitleri kıyaslandığında Akman-98 çeşidinin gere rejenerasyona, gerekse transformasyona daha pozitif tepki verdiği gözlenmiştir. Eksplantlardan ise plumula ve embriyo ile iki kotiledon eksplantlarından en fazla sonuç elde edilmiştir. Bunun sebebinin ise bu eksplantlardaki meristem hücrelerinin yoğunluğu, hücrelerin totipotensi özelliği, dokuların bakteriye karşı hassasiyetleri ve bu hücrelerdeki organellerin metabolizma özellikleri ve hücrelerin yaşı olduğu düşünülmektedir. Plumula ve embriyo ile iki kotiledon eksplantları kallus oluşturmadan sürgün rejenerasyonu yapmakta ve gelişmekte olan eksplantlar çok sayıda değişmekte olan hücre içermektedir. Ancak kullanılan diğer eksplantlarda değişmekte olan hücrelerin oranı daha az olmasından dolayı rejenerasyon ve transformasyonun olumsuz şekilde etkilendiği görülmüştür. Sonuçlar Surekha vd. (2007)'nin güvercin fasulyesinde elde ettikleri sonuçlarla uyum sağlamaktadır. Transformasyona maruz kalacak dokulardaki hücrelerin transformasyon kabiliyeti birbirinden farklıdır (Potrykus 1991). Gen aktarımında kullanılan eksplantların tipi, fizyolojik yaşı ve kullanılan yöntemlerin belirgin şekilde öncelikle adaptasyona ve dolayısıyla elde edilen sonuçlara etkisi gözlenmiştir. Aynı şekilde *in vitro* şartlarda elde edilen bitkiciklerin oldukça narin ve hassas olmalarından dolayı bu bitkiciklerin gerek rejenerasyon gerekse gen aktarımı sonucunda dış şartlara alıştırılmasında zaman zaman sıkıntılar yaşanmıştır. Pek çok sayıda bitkicik bu sebeple gelişip büyüyememiştir. Diğer bir sıkıntı ise elde edilen bitkiciklerin dış şartlara alıştırılmasında

düzenli kontrollerin yapılamamış olmasıdır. Bundan dolayı kimi zaman iklim odası ve seranın nem düzeyi ve sıcaklık şartlarından vb. sebeplerden kaynaklanan sıkıntılar bitkilerin ölümüne sebep olmuştur.

Her iki çeşitte gen aktarım çalışmalarında farklı sonuçlar elde edilmesinin diğer bir sebebi olarak da genotipik farklılıklar olduğu düşünülmektedir. Sonuçta bitki genotipleri ve *Agrobacterium* hatları arasında bir etkileşim olduğu düşünülürse bakteri enfeksiyonunun farklı genotiplerde farklı etki göstermesi normal gözükmemektedir. Transgenik bitki elde etmek için ilk aşamada bakteri enfeksiyonundan sonra plazmidin bitki genomuna entegrasyonu önemlidir. Bunun yanı sıra gen ekspresyonu için entegre olmuş genin yeri de önem taşımaktadır. Bakteri kolonizasyonu, bakteri virülans sisteminin gelişmesi, T-DNA transfer kompleksinin generasyonu, T-DNA aktarım ve T-DNA'nın bitki genomu ile entegrasyonu transgenik bitki elde etmek için önemli aşamalardır (Gustavo vd. 1998). Yemelik baklagillerden olan güvercin fasulyesi (Surekha vd. 2007), fasulye (Sağlam 2005a,b), nohut (Islam vd. 1994), bezelye (Hobbs vd. 1989), yerfıstığı (Lacorte vd. 1991), soya fasulyesi (Byrne vd. 1987, Delzer vd. 1990) ve mercimek (Khawar vd. 2004) bitkilerinin gen aktarım çalışmalarında bakteri hatlarına göre değişen oranlarda transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bu farklılığın sebebinin bitkinin genomik DNA'sı ve bakteri DNA'sı arasında mikrohomojideki değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir ( Surekha vd. 2007). *Agrobacterium* hattı veya plazmid konstrakt, Ti-plazmidin bitki genomuna entegrasyon kabiliyeti transformasyon sonuçlarını etkilemektedir. Yüksek oranda değişmekte olan hücreler içeren eksplantlarda yüksek transformasyon kabiliyeti olduğu düşünülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen PCR sonuçları yukarıda belirtilmiş olan sonuçlara destek vermektedir. Bu tez kapsamında kullanılmış Karacaşehir-90 ve Akman-98 çeşitleri kıyaslandığında Akman-98 çeşidinin gen aktarımına daha uyumlu olduğunu söylemek mümkündür.

Farklı genleri taşıyan *Agrobacterium* hatları kullanılmış ve bunlardan transgenik bitkiler elde edilmiştir. Etkin bir gen aktarımı yöntemi belirlemek amacıyla GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattı kullanılarak Akman-98 çeşidinin apikal meristem eksplantında 3 adet GUS pozitif bitki elde edilmiştir. Bu çalışmada transgenik aday bitkiler dış koşullara alıştırmıştır. GNA lektin, OC1, SKTİ, *CryIAc*, *CryIC* (p1C PRD ve p1CST PRD), *Cry2A* (p2A PRD ve p2AST PRD), *CryIAb* ve *SN19* (pMH65, pMH66) genlerini taşıyan bakteri hatları kullanılmıştır. PCR analizi sonucunda 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren ortamda

köklendirilmiş bitkilerden OCI, SKTİ ve *CryIC* geni içeren bakteri hatları kullanılarak yapılan gen aktarımından hiç bitki elde edilememiştir. GNA lektin geni içeren bakteri hattından 7, *CryIac* geni içeren bakteri ile inokule edilen eksplantlardan 2, *CryIAb*'den 2, *Cry2A*'dan 3, *Cry2A* (p2AST PRD)'dan 53, *CryIC* (p1CST PRD)'den 2, SN19 (pMH65)'dan 14 ve SN19 (pMH66)'dan 6 adet transgenik bitki elde edilmiştir.

Proteinaz inhibitör (OCII-7) ve GNA lektin genleri taşıyan *Agrobacterium* hatları ile fasulyeye gen aktarımı sonucunda kanamisinmonosülfata dayanıklı sürgün oranı GNA105'de Akman-98 çeşidinde %34, Karacaşehir-90 çeşidinde %10; OCII-7'de ise Akman-98 çeşidinde %54 iken Karacaşehir-90 çeşidinde 0'dır. Köklenen bitkicikler dış koşullara alıştırılmış ve bu bitkilerden tohum elde edilerek PCR analizi yapılmıştır.

*CryIac*, *CryIC* (p1C PRD ve p1CST PRD), *Cry2A* (p2A PRD ve p2AST PRD), *CryIAb* ve SN19 (pMH65, pMH66) genlerini taşıyan bakteri hatları ile yapılan gen aktarımı çalışmalarında iki farklı yöntem uygulanmıştır. Birinci yöntemde, eksplantlar MS besin ortamında 1 gün bekletilmiştir. 4000 µl / 30 ml NB içinde 5 farklı bakteri hattı (*Cry 2A*, *Cry 2AST*, *Cry IAb*, *PMH65:SN19* ve *PMH66:SN19*) ile ½ yarım saat inokule edildikten sonra ko-kültüvasyon ortamına alınmış ve bu ortamda iki gün bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar 0.50 mg/l BAP, 500 mg/l Augmentin ve 50 mg/l kanamisinmonosülfat içeren seleksiyon ortamına alınarak sürgün gelişimi sağlanmıştır. Seleksiyon ortamında tohumlarda kararma çimlenme ve sürgün vermeksizin köklenmeler gözlenmiştir. Ko-kültüvasyon süresinin ve bakteri konsantrasyonunun fazlalığı tohumların gelişimini engellediği düşünülmüştür. İkinci yöntemde eksplantlar aynı şekilde MS besin ortamında 1 gün bekletilmiş fakat daha sonra *A. tumefaciens*'in aynı 5 hattı ile 2000 µl / 30 ml NB içinde %100 seyreltilerek ½ saat inokule edildikten sonra ko-kültüvasyon ortamına alınmış ve bu ortamda iki gün bekletilmiştir. Köklenen bitkiler iklim dolaplarında büyütülerek transgenik aday bitkiler PCR ile teyit edilmiştir. NPT-II primerleri ile yapılan PCR işlemi sonucunda 69 adet, SN19 hibrid geni ile yapılan PCR analizinde ise hem NPT-II hem de SN19 genine ait spesifik primerler kullanılmıştır. pMH65 plazmidini içeren bakteri hattına ait 14, pMH66 plazmidini içeren bakteri hattından ise 6 adet bitkide istenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Sonuç olarak, farklı *Cry* genlerinin aktarılmasıyla 89 adet transgenik fasulye bitkisi elde edilmiştir.

Elde edilen transgenik bitkiler, diğer fasulye bitkilerine gen kaçışını engellemek amacıyla sera şartlarında kontrollü ortamda dış şartlara alıştırmıştır. Ancak serada değişik zamanlarda özellikle yaz aylarında sıcaklık ve nem kontrol sisteminin bozulması sebepleri ile bitkilerin dış şartlara alışmasında zaman zaman sorunlar yaşanmıştır. Farklı zamanlarda ve farklı yöntemler kullanılarak elde edilen 89 adet transgenik bitkinin 44 tanesinden T<sub>1</sub> tohum elde edilmiştir. Diğer bitkilerden ise yaz aylarına denk gelen çalışmalarda seradaki sıcaklığın 35 °C'den fazla olması ve bu yüksek sıcaklığın kontrol edilememiş olmasından dolayı tohum alınamamış. Bu yüksek sıcaklık fasulye bitkisinin tozlanıp dölllenmesini engelleyerek tohum bağlayamamasına sebep olmuştur. Bu çalışmanın devamında kesin bir yargıya varabilmek için, elde edilen T<sub>1</sub> tohumlarının sera şartlarında yeniden ekilerek çoğaltılması ve T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> ve sonraki tohumların elde edilmesi ve istenilen genlerin aktarılmış olduğu teyit edilmelidir. T<sub>2</sub> ve sonraki jenerasyonlarda Mendel açılımının olup olmadığının da aynı zamanda belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçlarla çalışmaya devam edilmesi daha kapsamlı ve kararlı sonuçların ortaya konulmasına yardımcı olacaktır. Aynı zamanda elde edilen T<sub>1</sub> bitkileri ve tohumlarının tohum böcekleri ile muamele edilerek böcekler üzerinde ne derecede etkili olacağının da gözlenmesi gerekmektedir.

Dünyada transgenik bitkilerin ekim alanı 2008 yılı itibariyle 125 milyon hektardır (Anonymous 2009b). Fasulyede yapılan bu çalışma transgenik bitki teknolojisinin tohum böcekleri (*bruchus*) ile mücadelede kullanılabilirliğine yönelik ilk çalışma olup, ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalara hem materyal hem de temel sağlayabilecektir. Bu nedenle Türkiye'nin gelecekte transgenik bitkilerden minimum risk ve maksimum fayda ile yararlanabilmesi için gen aktarımına ve gen aktarılmış bitkilerin izlenmesine yönelik araştırmaların disiplinlerarası yardımlaşma ile gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında dünya ve ülkemiz için ekonomik öneme sahip olan fasulye bitkisinde doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Özellikle gen aktarım çalışmaları için kısa sürede çok sayıda transgenik bitki elde etmeye yönelik uygun eksplantlar belirlenmiştir. Fasulye bitkisi ile ilgili bu çalışmaların devam etmesi büyük önem taşımakta ve bu alanda önemli bir açığın kapatılacağı düşünülmektedir. Bu şekilde yakın gelecekte Türkiye'de yasaların izin vermesi koşulu ile böceklerle dayanıklılık genleri aktarılarak istenilen özelliklerin kazandırılmış olduğu bu bitkilerin ticari boyutlarda üretimi de söz konusu olabilecektir. Aynı zamanda bu tez kapsamında elde edilmiş sonuçlara dayanarak

transgenik fasulye bitkilerinin hızlı ve yoğun üretimine ve bu konu ile ilgili ilerde yapılacak çalışmalara yardımcı olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abate, T. and Ampofo, J. K. O. 1996. Insect pests of beans in Africa. Annual Review of Entomology, 41, 45–73.
- Andersone, U. and Levinish, G. 2004. Regulation of cytokinin response-competence by cold treatment of mature *Pinus sylvestris* tissues *in vitro*. Acta Universitatis Latviensis, Biology, 676, 143–148.
- Andrade, W. F., Almeida, M. and Gonçalves, A. N. 2006. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* under BAP pulse. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41:12, 153–158.
- Anonim. 2007. Zirai Mcadele Teknik Talimatı. T. C. Tarım ve Kyışleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Mdrlğ, Yemeklik Baklagil Hastalık ve Zararlıları.
- Anonymous. 1999. Seed Science and Technology rules. International rules for seed testing. Vol. 27 supp. Rules 1999. International Seed Testing Association (ISTA) Zurich. Switzerland.
- Anonymous. 2009a. The Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org.tr>
- Anonymous. 2009b. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) , <http://www.isaaa.org.tr>
- Anthony, J. M., Senaratna, T., Dixon, K. W. and Sivasithamparam, K. 2004. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae – a case study with *Leucopogon verticillatus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 76, 137–146.
- Arı, 2001. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri. zcan S., Grel E., Babaoğlu M. (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mhendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 160-169, Konya
- Barik, D.P., Mohapatra, U. and Chand, P.K. 2005. Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing *Agrobacterium-mediated* transformation and regeneration, Plant cell report, 24:523-531.
- Barna, K. S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant rejuveneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. Plant Cell Rep., 13:510-513.
- Bayraç, A. T. 2004. Mercimek kotiledon petiollerinde rejenerasyon ve transformasyon sistemlerinin optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Bölümü, ODTÜ.
- Bevan, M., Flavell, R.B. and Chilton, M.D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation, Nature, 304:185-187.
- Bhatti, K. M. K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik.)’te Doku Kültürü alışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen

Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, YÖK Tez No: 120164, Ankara.

- Byrne, M.C., McDonnell R.E., Wright M.S and Carnes G.M. 1987. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium-soybean* interaction. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 8: 3-15.
- Carlberg, I., Glimelius, K. and Eriksson, T. 1983. Improved culture ability of potato protoplasts by use of activated charcoal. *Plant Cell Rep*, 2, 223–225.
- Chilton, M.D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P. and Qetier, F. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:4060-4064.
- Chen, H., Tang, W., Xu, C, Li, X., Lin, Y. and Zhang, Q. 2005. transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A* gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against Lepidopteran rice pests. *Theor App Gen*, 111:7 1432-2242.
- Chowrira, G.M. 1995. Elektroporation mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta: Generating Transgenic plants without *in vitro* tissue culture. *Mol Biotechnol.*, 3, 17–23.
- Christov, N. K., Imaishi, H. and Ohkawa, H. 1999. Green-tissue-specific expression of a reconstructed *cryIC* gene encoding the active fragment of *Bacillus thuringiensis* 8-endotoxin in haploid tobacco plants conferring resistance to *Spodoptera litura*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(8): 1433-1444.
- Crispeels, M.J. 1997. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other strachy grain legumes by genetic engineering with the alfa-amylase inhibitor gene, In: Carozzi N., Koziel M. (Eds.), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Tylor & Francis, Bristol, 139–156.
- Çevirmen, M. ve Akbulut, M. 2003. *Phaseolus vulgaris* L. Bitkisinde Partikül Bombardımanı (biyolistik) Yöntemiyle Gen Aktarımının Optimizasyonu. Erciyes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri.
- Çöçü, S., Uranbey, S. ve Sancak, C. 2003. Bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi* 9 (4): 445-449.
- Das, D. K., Prakash, N. S. and Sarin, B. N. 1999. Multiple shoot induction and plant regeneration in litch (*Litchi chinensis* Sonn.). *Plant Cell Reports*, 18; 691–695.
- Dattla, K., Vasquez, A., Torizzo, L., Alam, M.F., Oliva, N., Abrigo, E., Khush, G.S. and Datta S.K. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet*, 97:20-30.
- De Clarq, J., Zambre, M., Van Montagu, M., Dillen, W. and Angenon, G. 2002. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius*. A. Gray., *Plant Cell Rep.*, 21, 333-40.

- Delzer, B.W., Somers D.A. and Orf J.H. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to 11. *Crop Sci.*, 30: 320-322.
- Dita, M. A., Rispaill, N., Prats, E., Rubiales, D. and Singh, K. B. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, 147, 1–24.
- Dörtbudak, N., Erdoğan, P. ve Aydemir, M. 1999. Orta Anadolu Bölgesi'nde depolanan mercimek ve fasulyede zararlı olan baklagil tohum böceklerinin yayılışı, bulaşma oranı, yoğunlukları ve meydana getirdikleri ürün kayıpları üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 39, Sayı 1–2.
- Ebert A. and Taylor H.F. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 20, 165–172.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M. and Sánchez, F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the phaseolus spp.: A tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (12):1385–93.
- Fontana, G., Santini L., Caretto S., Frugis, G. and Mariotti, D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). *Plant cell report*, 12:194-198.
- Gatehouse, A.M.R., Davidson, G.M., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Burgess, E.P.J. Gilbert, R.J.C. and Gatehouse, J.A. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol. Breed.* 3: 49-63.
- Gustavo, A., Gonzalez, C.J., Vazquez P.R. and Ayra, P.C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Plant Biotechnol*, 1: 0717-3458.
- Guzman-Maldonado, S.H., Acosta-Gallegos J., Paredes-Lopez, O. 2004. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric*, 80:1874–1881.
- Han, J., Wang, H., Ye, H., Liu, Y., Li, Z., Zhang, Y., Zhang, Y.S., Yan, F. and Li, G. 2005. High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisa annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure. *Plant Sci.* 168. 73-80.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Genel Yayın No: 190, Ders Kitabı: A–58. Adana.
- Hidler, V.A. and Boulter, D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. *Crop Protection*, 18: 177-191.
- Hobbs, S.L. A., Jackson, J.A. and Mahon, J.D. 1989. Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 8: 274-277.

- Horner M, McComb, J.A., McComb A.J. and Street, H.E. 1977. Ethylene production and plantlet formation by *Nicotiana* anthers cultured in the presence and absence of charcoal. *J Exp Bot* 28, 1363–1372.
- Hossain, Z., Mandal, A. K. A., Datta, S. K. and Biswas, A. K. 2007. Development of NaCl tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *Biotechnol.* 1, 17408797 (P,S,E,B,D)
- Huffman, G.A., White, F.F., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1984. Hairy root inducing plasmid physical map and homology to tumour-inducing plasmids, *J. Bact.*, 157:269-276.
- Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M. J. and Kitamura, K. 1996. Bruchid resistance of transgenic Azuki bean expressing seed alpha amylase inhibitor of Common bean. *Entomol Exp Appl.*, 79, 309–315.
- Islam, R., Malik T. and Husnain T. 1994. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium-chickpea* interaction. *Plant Cell Reports*, 13: 561-563.
- Jayanand, B. and Sharma, K.K. 2003. An efficient protocol for the regeneration of whole plants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by using axillary meristem explants derived from *in vitro* germinated seedlings. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 39: 171-179.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387-405.
- Kar, S., Basu, D., Das, S., Ramkrishnan, N.A., Mukherjee, P., Nayak, P. and Sen, S.K. 1997. Expression of *cryIA(c)* gene of *Bacillus thuringiensis* in transgenic chickpea plants inhibits development of pod-borer (*Heliothis armigera*) larvae. *Transgenic Research*, 6: 177-185.
- Karakaya, A. and Özcan, S. 2001. Susseptibility of different bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Turkish Journal Biology*, 25 (4), 447–452.
- Khawar, M.B. and Özcan, S. 2002. Effect of Indole-3-Butyric Acid on *In Vitro* Root Development in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Turk J. Bot.* 26,109-111.
- Khawar, K. M., Sancak, C., Uranbey, S. and Özcan, S. 2004. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. *Turkish Journal of Botany*, 28, 421–426.
- [Kouas, S.](#), [Louche, J.](#), [Debez, A.](#), [Plassard, C.](#), [Drevon, J. J.](#) and [Abdelly, C.](#) 2009. Effect of phosphorus deficiency on acid phosphatase and phytase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under symbiotic nitrogen fixation. *Symbiosis*, 47:3, 141–149.
- Lacorte, C., Mansur E., Timmerman B. and Cordeiro A.R. 1991. Gene transfer into peanut (*Arachis hypogaea* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 10: 354-357.
- Lepel, J.C., Bonade-Bottino, M. and Augustin, S. 1995. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed.* 1: 319–328.

- Liu, Z. C., Park, B. J., Kano, A. and Kameya, T. 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium* mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. *Mol Breed*, 16, 189–97.
- Madhulatha, P., Anbalagan, M., Jayachandran, S. and Sakthivel, N. 2004. Influence of Liquid Pulse Treatment with Growth Regulators on *in vitro* Propagation of Banana (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76:2, 189–192.
- Malik, K.A. and Saxena P.K. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgare* L., high frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6- benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, 186: 384–389.
- Moreno, J. and Chrispeels, M.J. 1989. A lectin gene encodes the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7885-7889.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Mutasim, M., Khalafalla, H. A., El-Shemy, Rahman, S. M., Masayoshi, T., Masayoshi, T. and Masao, I. 2005. Recovery of herbicide-resistant Azuki Bean [*Vigna angularis* (Wild.), Ohwi & Ohashi] plants via *Agrobacterium-mediated* transformation. *African Journal of Biotechnology*, 4, 61–67.
- Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukijandjiev, S. and Maagd, R.A. 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin *CryI* hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5328-5330.
- Naimov, S., Dukijandjiev, S., and De Maagd, R. 2003. A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a Coleopteran and a Lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotechnology Journal*, 1:51-57.
- Naimov, S., Zahmanova, G., Boncheva, R., Kostova, M., Minkov, I., Dukijandjiev, S. and De Maagd, R. 2006. Expression of synthetic SN19 hybrid delta-Endotoxin encoding gene in transgenic potato. *Biotechnol. & Biotechnol Eq.* 20: 38-41.
- Outchkourov, N.S., Peters, J., Jong, J., Rademakers, W. and Jongsma, M. A. 2003. The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants. *Planta*, 216: 1003-1012.
- Öktem, H. A. 2001. Böceklere dayanlı transgenik bitkilerin geliştirilmesi. Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M. (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamalar, Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 208-238, Konya.
- Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation. Doktora Tezi, Leicester Üniversitesi, İngiltere.
- Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E. ve Babaoğlu, M. 2001. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi. Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M. (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, 112-159, Konya.

- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. Kükem Dergisi, 1, 69–95.
- Özer, M. ve Yücel, A. 1989. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde baklagillerde zararlı baklagil tohum böcekleri, yayılışları, en önemli türün biyo-ekolojisi ve savaş yöntemleri. DOA Türk. Tarım Ormancılık Dergisi, 13, 361–381.
- Ponzano, G.P., Ronco, C. and Mishkin, G.J. (eds) 2007. Disinfection by sodium hypochlorite: dialysis applications. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 154, 7–23.
- Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol 42:205–225.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T. and Jennings, M.G. 1993. Cholesterol oxydase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae, Biochem. Biophys. Res. Commun.196: 1406-1413.
- Pusztai, A., Bardocz, G.G., Alonso, R., Chrispeels, M.J., Schroeder, L.M., Tabe, T.J. and Higgins, T. J. 1999. Expression of the insecticidal bean alpha-amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. Journal of Nutrition, 129, 1597–1603.
- Rehm, S. and Espig, G. 1991. The cultivated plants of the tropics and subtropics. Wikersheim: Verlag Josef Marlag, [SB 111.R4313 On reserve in the Library].
- Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defense against insects and pathogens. Ann. Rev. Pyhtopatol., 28:425-449.
- Sağlam, S. 2005. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)’de doku kültürü ve *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Sağlam, S., Çiftçi, C.Y., Khawar, K.M., Atak, M. ve Özcan, S. 2005a. Fasulye bitkisinde *in planta* koşullarda gen aktarımı. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir.
- Sağlam, S., Çiftçi, C. Y., Khawar, K. M., Atak, M. ve Özcan, S. 2005b. *In vitro* koşullarda fasulye bitkisine dört yapraklı aşamada transformasyon çalışmaları. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 18:2, 291 – 294, Antalya.
- Senthil G., Williamson B., Dinkins R. D. and Ramsay G. 2004. An efficient transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Cell Biology and Morphogenesis, 23:297–303.
- Shade, R. E., Schroeder, H. E., Pueyo, J. J., Tabe, L. M., Murdock, L. L. and Higgins, M. J. 1994. Transgenic pea seeds expressing the alfa-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Bio:Technology, 12, 793–796.
- Simon, D. and Helliwell, S. 1998. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae, Wat. Res., 32, 2220-2223.
- Snedecor, G. W. and Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods, The Iowa State University Press, Iowa, USA.

- Somers, D. A., Somac, D. A. and Olhoft, P. M. 2006. Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol*, 131, 892–9.
- Sonia, R. S., Rana, P. S. and Pawan, K. J. 2007. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of Phaseolus vulgaris  $\alpha$ -amylase inhibitor-1 gene into mugbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using bar as selectable marker. *Plant Cell Rep.*, 26, 187–198
- Stewart, N.C., Adang, M.J., All, J.N., Raymer, P.L., Ramachandran, S. and Parrott, W. 1996. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. *Plant Physiol.*, 112:115-120
- Surekha, Ch., Arundhati, A. and Seshagiri-Rao, G. 2007. Differential Response of *Cajanus cajan* Varieties to Transformation with Different Strains of *Agrobacterium*. *Journal of Biological Sciences* 7 (1): 176-181.
- Şehirali, S. 1988. Yemeklik Dane Baklagiller. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 1089, Ankara.
- Teixeira, J. B, Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Rep*, 13, 247–250.
- Uranbey, S., Sevimay, C.S., Kaya, M.D., İpek, A., Sancak, C., Başalma, D., Er, C. and Özcan, S. 2005. Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfer. *Biologia Plantarum*, 49 (1): 53-57.
- Vidoz, M. L., Klusacek, P., Rey, H. Y. and Mroginski L. A. 2006. In vitro plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ*, 86:1, 111-115.
- Wang, Z.Y., Sun, X.F., Wang, F., Tang, K.X. and Zhang, J.R. 2005. Enhanced Resistance of Snowdrop Lectin (*Galanthus nivalis* L. Agglutinin)-Expressing Maize to Asian Corn Borer (*Ostrinia furnacalis* Guenee). *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(7): 873-880.
- Yan, B., Reddy, M.S., Collins, G.B. and Dinkins, R.D. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant cell rep*, 19:1090-1097.
- Zaidi, M. A., Mohammadi, M., Postel, S., Mason, L. and Altosaar, I. 2005. The *Bt* gene *cry2Aa2* driven by a tissue specific ST-LS1 promoter from potato effectively controls *Heliothis virescens*. *Transgenic Research*, 14:289-298.
- Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Van Montagu, M., Terry, N. and Angenon, G. A. 2005. Reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (Tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theor Appl Genet*, 110, 914–24.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sevil SAĞLAM  
Doğum Yeri: Kırıkkale  
Doğum Tarihi: 28.10.1977  
Medeni Hali: Bekar  
Yabancı Dili: İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Delice Lisesi (1994)  
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü (1999)  
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri A.B.D.  
(2001)

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- 2000–2003 Milli Eğitim Bakanlığı-Öğretmenlik
- 2004 Sorumlu Yöneticilik
- 2005 Ankara Adliyesi-Bilirkişilik
- 2006–2007 Tarım Kredi Kooperatifleri-Mühendis
- 2007-...Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü  
Arş. Gör.

### Yayımları (SCI ve diğer)

#### SSCI, SCI\_Expanded ve AHCI indekslerde yer alan dergilerde yapılan yayımlar

1. Kızıl S., Toncer Ö., Ipek A., Arslan N., **Saglam S.**, Khawar K. M. 2008. Blooming stages of Turkish hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) affect essential oil composition. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science, Volume 58, Issue 3 September 2008 , pages 273 – 279
2. Atak M., Kaya M., Khawar K. M., **Saglam S.**, Özcan S. and Ciftci C. Y. 2008. Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticale genotypes, African Journal of Biotechnology Vol. 7 (11), pp. 1765-1768, 3 June, 2008

3. Kaya M., Kaya G., Kaya M. D., Atak M., **Sağlam S.**, Khawar K. M. and Ciftci C. Y., 2008. Interaction between seed size and NaCl on germination and early seedling growth of some Turkish cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Zhejiang University - Science B, Volume 9, Number 5 / May, 2008, pages 371-377

#### **Ulusal veya Uluslar arası hakemli dergilerde yapılan diğer yayınlar**

1. **Sağlam S.** 2008. Türkiye’de Mercimek Tarımının Sorunları ve Çözüm Önerileri. Agroskop Tarım-Gıda-Hayvancılık Dergisi. Ağustos-Eylül 2008 Yıl:1 Sayı:5 Sayfa:25
2. **Sağlam S.**, Çiftçi C. Y., Khawar K. M., Atak M., Özcan S. In Vitro Koşullarda Fasulye Bitkisine Dört Yapraklı Aşamada Transformasyon Çalışmaları. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi (2005), 18 (2) 291 – 294

#### **Ulusal/Uluslar arası kongre, sempozyum, çalıştay ve panel gibi bilimsel toplantılara ait bildiri kitaplarında yer alan yayınlar**

1. **Sağlam S.**, Khawar K. M., Çiftçi C. Y., Özcan S. *In vitro* Koşullarda Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisine Yüksek BAP Ön Muamelesi ve Sonikasyon Metodu ile Gen Aktarımı. XVI. Biyoteknoloji Kongresi 13–16 Aralık 2009, Antalya
2. **Sağlam S.**, Khawar K. M., Çiftçi C. Y., Özcan S. *In vitro* Koşullarda Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)’nin Apikal Meristem, Petiol, Kotiledon Boğum ve Hipokotil Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu. XVI. Biyoteknoloji Kongresi 13–16 Aralık 2009, Antalya
3. Çetin G., **Sağlam S.**, Khawar K. M., Özcan S., Bakla (*Vicia faba* L.)’nın Plumula Eksplantlarından *In-vitro* Koşullarda Adventif Sürgün Rejenerasyonu, Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim 2009, Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Hatay
4. Çiftçi C.Y., **Sağlam S.**, Khawar K. M., Türkiye’de Yemelik Tane Baklagiller Konusunda Yapılan Araştırmalara Genel Bir Bakış, Tarladan Sofraya Kuru Fasulye Çalıştayı, 30–31 Temmuz 2009, Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Eskişehir
5. Çiftçi C.Y., Khawar K. M. **Sağlam S.**, Türk Tarımının ve Fasulye Tarımının Temel Sorunları ve Çözüm Önerileri, Tarladan Sofraya Kuru Fasulye Çalıştayı, 30–31 Temmuz 2009, Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Eskişehir
6. **Sağlam S.**, Ciftci C. Y., Khawar K. M., Ozcan S. 2008 The effects of NaOCl pH, different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and rinsing water temperatures on *in vitro* seedling growth and germination of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) cv. Karacaşehir 90. International symposium on biotechnology.May 04-08, 2008 Sfax, Tunisia

7. **Sağlam S.**, Aasim M, Khawar K. M, Özcan S. Çiftçi C. Y., 2007. *Isatis tinctoria* L. subsp. tinctoria L. (Çivitotu) Bitkisinde Değişik Jelleştirici Maddelerin In Vitro Adventif Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 28–31 Ekim 2007, Antalya Poster No: P-BHB22 Sayfa No:17
8. **Sağlam S.**, Khawar K.M., Çiftçi C. Y., Özcan S.. 2007. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinde Olgunlaşmış Embriyolardan Adventif Sürgün Rejenerasyonu. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 28–31 Ekim 2007, Antalya. Bildiri Kitabı, Sözlü Bildiri No: S-BHB29 Sayfa No:135
9. **Sağlam S.**, Aasim M., Khawar K. M., Özcan S., Çiftçi C. Y. 2007. Comparison of Adventitious Shoot Regeneration from Hypocotyl Explants of *Isatis tinctoria* L. subsp. Tinctoria on Agar and Isubgol Gelled Media. Fifth International Congress Propagation of Ornamental Plants. 5-8 September 2007, Sofia, Bulgaria. Poster No: 85 Sayfa No: 170
10. Khawar K.M., **Sağlam S.**, Özel Ç.A., Öztürk M., Şumlu Ş., Sevimay C. S. and Özcan S. 2006. In Vitro Somatic Embryogenesis in Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) under Different Light Intensities. Agro Environ 2006. Fifth International Symposium on the Agricultural Environment, 4–7 September 2006 Ghent University, Ghent, Belgium
11. **Sağlam, S.**, Çiftçi C. Y., Khawar K. M, Atak M., Özcan S.. 2005 Fasulye Bitkisinde In Planta Koşullarda Gen Aktarımı. Biyoteknoloji 2005. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos – 2 Eylül 2005. 258. Eskişehir