

**T.C.**  
**AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI FASULYE ÇEŞİTLERİNE (*Phaseolus vulgaris* L.)**  
***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA *bar* GENİNİN**  
**AKTARILMASI**

**Özlem ÜNER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRŞEHİR, 2018**

**T.C.**  
**AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI FASULYE ÇEŞİTLERİNE (*Phaseolus vulgaris* L.)**  
***Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA *bar* GENİNİN**  
**AKTARILMASI**

**Özlem ÜNER**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Sevil SAĞLAM YILMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRŞEHİR, 2018**

## Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Üye Doç. Dr. Sevil SAĞLAM YILMAZ

Üye Dr. Öğr. Üyesi Meltem BAYRAKTAR

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

14/05/2018

Prof. Dr. Yılmaz ALTUN  
Enstitü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğuna, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Özlem ÜNER

**BAZI FASULYE ÇEŞİTLERİNE (*Phaseolus vulgaris* L.) *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA *bar* GENİNİN AKTARILMASI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Özlem ÜNER**

**Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Mayıs 2018**

**ÖZET**

Fasulye, Leguminosae (Fabaceae) familyasından önemli bir yemeklik tane baklagil cinsidir. Fasulye yetiştiriciliğinde kullanılan herbisitler, kırmızı köklü tilki kuyruğu, sirken, yabancı hardal gibi yabancı otların mücadelesinde etkili olmaktadır. Bu herbisitler bitkiler üzerinde kalıntı meydana getirebilmekte, bitkiye zarar verebilmekte, bitki üzerinden beslenen tüm canlıları olumsuz etkilemekte ve ayrıca toprağı da kirletmektedir. Bu tezin amacı, Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerinde bu sorunun çözümüne yönelik olarak sürdürülebilir bir rejenerasyon sistemi geliştirmek ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla herbisitlere dayanıklı transgenik bitkilerin elde edilmesi olmuştur. Farklı oranda BAP, BAP-NAA ve IAA içeren MS ortamlarında her üç fasulye çeşidine ait tohum ve olgunlaşmış embriyo eksplantlarından farklı oranda sürgün rejenerasyonu elde edilirken, apikal meristem eksplantından herhangi rejenerasyon gözlenmemiştir. Ön muamele olarak 10 mg/l IAA içeren MS ortamda 5 gün bekletilen olgunlaşmış embriyo eksplantlarından gelişen sürgünlerin kök rejenerasyonu için 2.0 mg/l IBA kullanılmış olup, kök oluşumu gözlenmiştir. Gen aktarım çalışmalarında, *in vitro* ve *in planta* koşullarda *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404::pRGG *bar* ve GV2260::p 35S Gus INT hatlarıyla inokulasyon yapılmıştır. *In vitro* koşullarda yalnızca Yunus 90 ve Önceler 98 çeşitlerinde ve *in planta* koşullarda ise her üç çeşitte de PCR analizi sonucunda transgenlerin varlığı teyid edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Agrobacterium tumefaciens*, *bar* geni, Fasulye, *in vitro* ve *in planta* transformasyon, rejenerasyon

Sayfa Adedi: 96

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Sevil SAĞLAM YILMAZ

***bar* GENE TRANSFORMATION ON SOME COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*L.) VARIETIES via *Agrobacterium tumefaciens***  
(Master of Science Thesis)

**Özlem ÜNER**

**Ahi Evran University, Institute of Science**

**May 2018**

**ABSTRACT**

Common Beans are important edible grain legumes from the family Leguminosae (Fabaceae). Herbicides used in bean cultures are effective in the weeding of red-rooted fox tail, sirken, wild mustard etc. These herbicides accumulate on plants and can show residual effects on fruits, that can adversely damage the plants and all the organisms feeding from these plants along with polluting of the soil. The aim of this thesis, was to optimize the regeneration system of widely grown bean cultivars in Turkey namely Yunus-90, Göynük-98 and Önceler-98 that could facilitate development of herbicides resistant plants through *Agrobacterium* mediated transformation. Shoot regeneration was noted on MS medium containing BAP, BAP-NAA and IAA treated seeds and mature embryo explants of all three bean cultivars; when, no regeneration was observed on the apical meristem explants when different shoot regeneration systems were evaluated. Rooting was observed using 2.0 mg / l IBA in MS medium on shoots developed from mature embryo explants that were pretreated for 5 days in MS medium containing 10 mg / l IAA. Gene transfer studies were performed both under *in vitro* and *in planta* conditions using LBA4404::pRGG *bar* and GV2260 :: p 35S Gus INT lines of *Agrobacterium tumefaciens*. Genetic transformation was confirmed in Yunus 90 and Önceler 98 cultivars under *in vitro* conditions and for all three cultivars under *in planta* conditions through PCR analysis.

**Key Word:** *Agrobacterium tumefaciens*, *bar* gene, Common bean, *in vitro* and *in planta* transformation, regeneration,

Number of Pages: 96

Advisor of Thesis: Assoc. Prof. Sevil SAĞLAM YILMAZ

## TEŞEKKÜR

Bilimsel bilgi ve görgüsünden sonsuz faydalandığım ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında her türlü destek ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Sevil SAĞLAM YILMAZ (Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir)'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Fasulye tohumlarının temini konusunda katkılarından dolayı Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne teşekkür ederim. Moleküler analizler aşamasında her zaman yanımda olan yardımlarını esirgemeyen sayın Öğr. Gör. Nuri ERCAN (Ahi Evran Üniversitesi, Kaman Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü/ Gıda Teknolojisi Ana Bilim Dalı, Kırşehir)'a hocama teşekkür ediyorum. Fasulye bitkilerini dış ortama alıştırmada her türlü yardım ve katkılarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Bahadır ALTUN (Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kırşehir)'a teşekkür ederim. Yrd. Doç. Dr. Atilla TAŞKIN (Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Kırşehir) ve Veteriner Hekim Demirel ERGÜN (Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kırşehir)'e de yardımlarından dolayı ayrıca teşekkür ediyorum. İstatiksel analizler aşamasında eğitici ve öğretici bilgi ve yardımlarından dolayı sayın hocam Araş. Gör. Aslı AKILLI (Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü/Biyometri ve Genetik Ana Bilim Dalı, Kırşehir)'ya sonsuz teşekkürler. Ziraat Mühendisi Zekeriya DOĞAN, Ziraat Mühendisi Zeliha ŞAHİN, Ziraat Yüksek Mühendisi Kübra SOĞANCI ve isimlerini tek tek yazamadığım emeği geçen bütün arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum. Ayrıca çıktığım bu yolda bana her zaman ışık tutan, en güzel heyecanıma; Burak ÖRNEK'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Son olarak; sevgili aileme, bu yaşıma kadar bana vermiş oldukları maddi ve manevi destekleri için sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>9</b>
2.1. FASULYEDE YAPILMIŞ DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI.....	9
2.2. FASULYEDE YAPILMIŞ GEN AKTARIMI ÇALIŞMALARI .....	18
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>29</b>
3.1. MATERYAL.....	29
3.1.1. Bitki Materyali.....	29
3.1.2. Besin Ortamı, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Kültür Koşulları, Sterilizasyon.....	31
3.1.3. Bakteri Materyali .....	34
3.1.4. Antibiyotikler.....	34
3.2. YÖNTEM.....	35
3.2.1. Tohum Canlılık Testi.....	35
3.2.2. Fasulye Tohumlarının <i>In vitro</i> Koşullarda Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi .....	36
3.2.3. Filtre Kâğıtlarının Fasulye Tohumlarının Çimlenmesine Etkisi .....	36
3.2.4. Fasulyede Rejenerasyon Çalışmaları .....	36
3.2.4.1. Olgunlaşmış embriyo kültürü.....	36
3.2.4.2. Apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonu .....	37
3.2.4.3. Olgunlaşmış embriyo kültürüne ön muamele uygulamasının etkisi .....	37
3.2.4.4. Apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ön muamele uygulamasının etkisi .....	37
3.2.5. <i>In vitro</i> Koşullarda Sürgünlerin Köklendirilmesi .....	37
3.2.6. Köklenmiş Fasulye Bitkiciklerinin Dış Şartlara Ağıştırılması (Aklimatizasyon) .....	37
3.2.7. Bakteri Kültürlerinin Sağıştırılması, Büyütülmesi, Kısa ve Uzun Süreli Korunması.....	38
3.2.8. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in <i>bar</i> Geni Taşıyan LBA 4404 pRGG <i>bar</i> Hattı ile <i>In vitro</i> Koşullarda Fasulyeye Gen Aktarım Çalışmaları .....	38



3.2.8.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in <i>bar</i> geni taşıyan LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ve GV2260 geni ile <i>in vitro</i> koşullarda fasulyenin olgunlaşmış embriyolarına gen aktarım çalışmaları.....	39
3.2.8.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in <i>bar</i> geni taşıyan LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ve GV2260 geni ile <i>in vitro</i> koşullarda apikal meristem eksplantlarına gen aktarım çalışmaları .....	40
3.2.8.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in <i>bar</i> geni taşıyan LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ve GV2260 geni ile <i>In planta</i> koşullarda makroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarım çalışmaları .....	40
3.2.9. Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi.....	41
3.2.9.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	41
3.2.10. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	44
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
4.1. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI .....	45
4.1.1. Fasulye Çeşitlerinin Yüzey Sterilizasyonu .....	45
4.1.1.1. Yunus-90 Fasulye Çeşidinde Yüzey Sterilizasyonu .....	46
4.1.1.2. Göynük-98 Fasulye Çeşidinde Yüzey Sterilizasyonu .....	48
4.1.1.3. Önceler-98 Fasulye Çeşidinde Yüzey Sterilizasyonu.....	49
4.1.2. Filtre Kâğıtlarının Fasulye Tohumlarının Çimlenmesine Etkisi .....	51
4.1.3. Tohum Canlılık Testi Bulguları.....	52
4.1.4. Yunus-90 Fasulye Çeşidinin Olgunlaşmış Embriyolarına Farklı Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	54
4.1.5. Göynük-98 Fasulye Çeşidinin Olgunlaşmış Embriyolarına Farklı Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	57
4.1.6. Önceler-98 Fasulye Çeşidinin Olgunlaşmış Embriyolarına Farklı Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	59
4.1.7. Fasulye Çeşitlerinde Apikal Meristemlere Değişik Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	61
4.1.8. Fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamele Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi .....	63
4.1.8.1. Yunus-90 Fasulye Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	64
4.1.8.2. Göynük-98 Fasulye Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	66

4.1.8.3. Önceler-98 Fasulye Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	67
4.1.9. <i>In Vitro</i> Koşullarda Geliştirilen Bitkiciklerin Dış Şartlara Alıştırılması .....	70
4.2. GEN AKTARIM ÇALIŞMALARI.....	71
4.2.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA 4404 PRGG <i>bar</i> Hattı İle <i>In vitro</i> Koşullarda Fasulyenin Tohum Eksplantlarına Gen Aktarım Çalışması.....	72
4.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in <i>bar</i> Geni Taşıyan GV2260 Geni ile <i>In Vitro</i> Koşullarda Fasulyenin Tohum Eksplantlarına Gen Aktarım Çalışmaları .....	75
4.2.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ile <i>in vitro</i> koşullarda geliştirilen fasulyenin plumula eksplantlarına gen aktarım çalışması.....	77
4.2.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA 4404 pRGG <i>bar</i> Hattı ile <i>In Planta</i> Gen Aktarım Çalışması.....	79
4.2.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in GV2260 Hattı ile <i>In Planta</i> Koşullarda Gen Aktarım Çalışması.....	81
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>83</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>96</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.1.</b> Fasulye tanelerinin besin içeriğinin (kuru ağırlık %) diğer tahıllarla karşılaştırması .....	1
<b>Tablo 3.1.</b> Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonlar .....	32
<b>Tablo 3.2.</b> Denemelerde kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklama koşulları.....	33
<b>Tablo 3.3.</b> <i>Agrobacterium</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları .....	35
<b>Tablo 3.4.</b> Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları .....	35
<b>Tablo 3.5.</b> PCR işleminde kullanılan primer dizileri.....	42
<b>Tablo 4.1.</b> Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Yunus-90 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine etkileşimlerini gösteren varyans analizi sonuçları .....	46
<b>Tablo 4.2.</b> Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri sonucunda Yunus-90 çeşidinin tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine etkileri.....	47
<b>Tablo 4.3.</b> Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Göynük-98 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine Varyans Analizi .....	48
<b>Tablo 4.4.</b> Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri sonucunda Göynük-98 çeşidinin tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine etkileri.....	49
<b>Tablo 4.5.</b> Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Önceler-98 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine Varyans Analizi .....	49
<b>Tablo 4.6.</b> Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri sonucunda Önceler-98 çeşidinin tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine Duncan Analizi.....	50
<b>Tablo 4.7.</b> Yunus-90 fasulye çeşidinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA etkisine ait Varyans Analizi sonuçları .....	55

<b>Tablo 4.8.</b> Yunus-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA'nın Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet) ait Duncan Analizi sonuçları .....	56
<b>Tablo 4.9.</b> Göynük-98 fasulye çeşidinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA etkisine ait Varyans Analizi sonuçları .....	58
<b>Tablo 4.10.</b> Göynük-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA'nın Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet) ait Duncan Analizi sonuçları .....	59
<b>Tablo 4.11.</b> Önceler-98 fasulye çeşidinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA etkisine ait Varyans Analizi sonuçları .....	60
<b>Tablo 4.12.</b> Önceler-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA'nın Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet) ait Duncan analizi sonuçları .....	60
<b>Tablo 4.13.</b> Yunus-90 fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısının (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) Varyans Analizi .....	65
<b>Tablo 4.14.</b> Göynük-98 fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısının (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) Varyans Analizi .....	66
<b>Tablo 4.15.</b> Önceler-98 fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısının (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) Varyans Analizi .....	67
<b>Tablo 4.16.</b> Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasında BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında ksplant başına sürgün sayısı üzerine varyans analizi .....	68
<b>Tablo 4.17.</b> Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasında BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına sürgün sayısı (adet) üzerine Duncan Analizi .....	69

<b>Tablo 4.18.</b> Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasında BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Oluşum Oranı (%) üzerine Varyans Analizi.....	69
<b>Tablo 4.19.</b> Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamele Uygulamasında BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Oluşum Oranı (%) üzerine Duncan Analizi.....	70
<b>Tablo 4.20.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ile <i>in vitro</i> koşullarda tohum eksplantına gen aktarım uygulaması .....	74
<b>Tablo 4.21.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in <i>bar</i> Geni Taşıyan GV2260 Geni ile <i>In vitro</i> Koşullarda Tohum Eksplantlarına Gen Aktarım Uygulaması.....	76
<b>Tablo 4.22.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ile <i>in vitro</i> koşullarda geliştirilen fasulyenin plumula eksplantlarına gen aktarım uygulaması .....	78
<b>Tablo 4.23.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ile <i>in planta</i> koşullarda gen aktarım uygulaması.....	79
<b>Tablo 4.24.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in GV2260 hattı ile <i>in planta</i> koşullarda gen aktarım uygulaması .....	81
<b>Tablo 4.25.</b> Fasulyenin Yunus-90, Göynük-98, Önceler-98 çeşitlerine <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in LBA4404 pRGG <i>bar</i> ve GV2260 hatları ile gen aktarımı sonucunda elde edilen transgenik aday bitki sayısı (adet).....	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 3.1.</b> Yunus-90 fasulye çeşidine ait özelliklikler.....	29
<b>Şekil 3.2.</b> Göynük-98 fasulye çeşidine ait özelliklikler .....	30
<b>Şekil 3.3.</b> Önceler-98 fasulye çeşidine ait özelliklikler .....	31
<b>Şekil 3.4.</b> MS besin ortamında kullanılan kimyasallar .....	32
<b>Şekil 4.1.</b> Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerine ait tohumlarının laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde sterilizasyonu .....	45
<b>Şekil 4.2.</b> Önceler-98 çeşitinin sterilizasyonu ve kontaminasyon oluşumu .....	50
<b>Şekil 4.3.</b> Fasulye tohumlarının <i>in vitro</i> koşullarda çimlenmesi .....	51
<b>Şekil 4.4.</b> MS+filtre kağıdı uygulaması ile fasulye tohumlarının çimlenmesi ve gelişimi.....	52
<b>Şekil 4.5.</b> Fasulye çeşitlerine (a <sub>1</sub> , a <sub>2</sub> .Yunus-90, b. Göynük-98 ve c. Önceler-98) ait tohum canlılık testi uygulaması sonrası boyanan tohumlar .....	53
<b>Şekil 4.6.</b> Laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde steril edilmiş tohumlar ve olgunlaşmış embriyoların çıkartılması.....	54
<b>Şekil 4.7.</b> Fasulye çeşitlerine ait olgunlaşmış embriyoların MS besin ortamına ekilmesi .....	54
<b>Şekil 4.8.</b> MS besin ortamında Yunus-90 fasulye çeşidinin olgunlaşmış embriyoların gelişmesi .....	55
<b>Şekil 4.9.</b> Yunus-90 çeşidinin zigotik embriyolarının yapraklarında görülen kısmi albino oluşumları.....	57
<b>Şekil 4.10.</b> Fasulye Çeşitlerinde Apikal Meristem eksplantları eldesi için çimlendirilmiş 7-10 günlük bitkicikler.....	61
<b>Şekil 4.11.</b> Fasulye çeşitlerinden apikal meristem eksplantının alınması.....	62
<b>Şekil 4.12.</b> Fasulye çeşitlerinde apikal meristemlere değişik oranlarda BAP+NAA muamelesi ve kontaminasyon sunucu magenta kaplarından elde edilen görüntüler .....	63
<b>Şekil 4.13.</b> Fasulye çeşitlerinde olgunlaşmış embriyo eksplantlarına ön muamelesi uygulaması .....	63

<b>Şekil 4.14.</b> Olgunlaşmış embriyolara ön muamlesi uygulaması yapılmış fasulye ( a. Yunus-90, b. Göynük-98, c. Önceler-98 ) çeşitlerinin gelişimi .....	64
<b>Şekil 4.15.</b> Yunus-90 çeşidinde ön muamelesi uygulaması ile dış ortamlara alıştıırılan olgunlaşmış embriyolarda morfolojik olarak farklılık gösteren 2’li ve 5’li yaprak yapıları.....	65
<b>Şekil 4.16.</b> <i>In vitro</i> koşullarda geliştirilen bitkiciklerin dış şartlara (aklimatizasyon) alıştıırılması.....	71
<b>Şekil 4.17.</b> Gluphosinate ve phosphinotricin kimyasal formülü.....	72
<b>Şekil 4.18.</b> LBA4404 pRGG <i>bar</i> hattı ile inoküle edilmiş fasulye bitkilerinin dış koşullara alıştıırılması .....	73
<b>Şekil 4.19.</b> Fasulyede transgenik adayı bitkilerde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi, 1. (25 °C – 1 gün) ve 2. (25 °C – 2 gün) kulvarlar Yunus 90 PCR+; 3. (28 °C – 2 gün ve 4. (28 °C – 1 gün) kulvarlar Önceler 98 PCR+; M: Markör.....	74
<b>Şekil 4.20.</b> Fasulyede transgenik adayı bitkilerde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi, 1. (28 °C – 2 gün) kulvar Yunus 90 PCR+; 2. (28 °C – 2 gün) kulvar Önceler 98 PCR+; M: Markör. ....	76
<b>Şekil 4.21.</b> Yunus-90 fasulye çeşidinde 4 hafta sonundaki kök oluşumu.....	78
<b>Şekil 4.22.</b> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ’in <i>bar</i> geni taşıyan LBA 4404 pRGG <i>bar</i> hattı ile <i>in planta</i> koşullarda makroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarım çalışmaları .....	79
<b>Şekil 4.23.</b> Fasulyede <i>in planta</i> koşullarda transgenik adayı bitkilerde <i>bar</i> geni varlığının PCR ile teyit edilmesi, 1. (25 °C ) kulvar Yunus 90 PCR+; 2. (25 °C) kulvar Önceler 98 PCR+; M: Markör. ....	80
<b>Şekil 4.24.</b> Fasulyede <i>in planta</i> koşullarda transgenik adayı bitkilerde GV2260 geni varlığının PCR analizi ile teyit edilmesi, 1. (25 °C ) kulvar Yunus-90 PCR+; 2. (25 °C ) kulvar Göynük-98 PCR+; 3. (25 °C) kulvar Önceler 98 PCR+ ; 4. (25 °C ) kulvar Göynük-98 PCR+; M: Markör.....	82

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simge</b>	<b>Açıklama</b>
<b>%</b>	: Yüzde
<b>g</b>	: gram
<b>kPa</b>	: Kilopaskal
<b>L</b>	: Litre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>°C</b>	: Santigratderece
<b>µg</b>	: mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı

<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Aug</b>	: Augmentin
<b>BAP, BA</b>	: 6-Benzilaminopurin
<b>Bp</b>	: Baz çifti
<b>2,4-D</b>	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotit trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
<b>F</b>	: F Testi
<b>GUS</b>	: β-glukuronidaz
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>IBA</b>	: Indol-3-butrik asit
<b>IAA</b>	: Indole-3-asetik asit
<b>ISTA</b>	: Uluslararası Tohum Test Örgütü



<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>
<b>kDA</b>	: Kilodalton
<b>Km</b>	: Kanamisin monosülfat
<b>K.O.</b>	: Kareler Ortalaması
<b>MS</b>	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı
<b>NA</b>	: Nutrient agar
<b>NB</b>	: Nutrient broth
<b>Nos</b>	: Nopalinsentaz
<b>NAA</b>	: $\alpha$ -Naftelenasetik asit
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NPTII</b>	: Neomisin fosfotransferaz II
<b>pat</b>	: Fosfonitricin- N – asetiltransferaz
<b>bar gene</b>	: Herbisit bialaphos geni
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i>
<b>ppt</b>	: Fosfonitrisin
<b>Rif</b>	: Rifampisin
<b>CaMV</b>	: Karnabahar Mozaik Virüsü
<b>S.D.</b>	: Serbestlik derecesi
<b>TBE</b>	: Tris-Borik asit-EDTA
<b>T-DNA</b>	: Transfer DNA
<b>TDZ</b>	: Thidiazuron
<b>V.K.</b>	: Varyasyon kaynakları
<b>Vir gen</b>	: Virulens geni

## 1. GİRİŞ

Fasulye, Leguminosae (Fabaceae) familyasından olup, Türkiye’de çok eski yıllardan beri bilinen, tarımı yapılan, insan ve hayvan beslenmesinde ve toprak ıslahında kullanılan bir yemeklik baklagil bitkisidir. Kültürü yapılan fasulyeler *Phaseolus vulgaris* L. olup, insanların beslenmesinde ve protein açığının giderilmesinde önemli rol oynamaktadır. Baklagiller içerisinde taze, konserve ve kurutulmuş olarak en çok tüketilen bitkilerden birisi olup, tohumdan yetiştirilmektedir. Baklagillerin beslenmedeki öneminin yanı sıra toprağın biyolojik ve fiziksel yapısının iyileştirilmesinde sağladığı katkı da dikkate alındığında fasulye iyi bir ön ekim bitkisidir. Baklagiller arasında üretimi ilk sırada gerçekleştirilen fasulye; ortalama % 18-22 oranında protein içermektedir. Fasulye proteininde 100 g kuru maddede 1340 mg Isoleucine, 1830 mg Leucine, 1520 mg Lysine, 600 mg Methionine, 1230 mg Phenylalanine, 1060 mg Threonine, 1210 mg Valin, 223 mg Tryptophan bulunmaktadır (Petry ve ark., 2015). Fasulye tanelerinin aynı zamanda A, B ve C vitaminlerince zengin olduğu bilinmektedir.

**Tablo 1.1.** Fasulye tanelerinin besin içeriğinin (kuru ağırlık %) diğer tahıllarla karşılaştırması (Anonim,2016)

Bitki	Protein %	Yağ %	Karbonhidrat %	Nem %	Kül %	Enerji Kcal/100g
Fasulye	21,44	1,40	62,49	11,18	3,49	340
K. Mercimek	27,50	1,00	62,12	7,14	2,24	357
Y. Mercimek	26,50	0,73	60,62	9,80	2,35	345
Nohut	20,75	5,50	61,47	9,67	2,61	368
Barbunya	22,19	1,30	61,54	11,23	3,74	338
Bulgur	10,26	1,30	78,65	7,71	2,08	345
A. Buğday	10,32	1,80	73,80	12,66	1,42	354
İç Bakla	27,32	1,20	57,91	10,58	2,99	341

Türkiye, kişi başına düşen yıllık hububat tüketimi yönünden 230 kg ile dünyada birinci sırada yer alırken, 20 kg et tüketimi ile son sıralarda yer almaktadır. ABD’de ise bu oran 95 kg et ve 66 kg tahıl şeklindedir (Petry, 2015). Türkiye’de halkın rahatça satın alabileceği zengin bir protein kaynağı olması yanında fosfor, demir ve B1 vitamini bakımından çok zengin ve üstün beslenme kabiliyetine sahip olan kuru fasulye protein

açığının kapatılmasında ümitvar görünen elzem bir gıda maddesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Petry, 2015). Ancak, içerdikleri bazı anti besinsel maddeler nedeniyle sindirimleri biraz zordur (GTHB, 2014). Türkiye’de nüfusun %10’unda beslenmede protein yetersizliği, % 22,5’inde ise protein yönünden dengesiz beslenme olduğu saptanmıştır. Fasulye, gelişmiş kök sistemleri vasıtasıyla toprağın alt tabakalarında bulunan besin maddelerini toprak yüzeyine çıkarmak suretiyle toprağı besin maddelerince zenginleştirmektedir. Fasulye, köklerinde ortak yaşama özelliğine sahip bakteri türü *Rhizobium phaseoli* aracılığıyla havanın serbest azotundan istifade ederek kendi azot ihtiyacının büyük bir kısmını toprak havasından karşıladığı gibi, yetiştığı toprakları da azotça nispeten zenginleştirmektedir. Bu yolla ortalama olarak yıllık 5 kg/da azot fiske edebilmektedir. Toprağa bağlanan azotun kaybı, azotlu gübrelerden sağlanan azota göre daha az olmakta, içme sularının kirlenmesine yol açmamakta ve suni gübreleme sonucu ortaya çıkan kalite bozukluklarına neden olmamaktadır (Akçin, 1988). Bahsedilen bu özelliklerinden dolayı fasulye bitkisi gerek kullanım alanı gerekse besinsel değeri göz önüne alındığında ıslah çalışmaları için önemli bir baklagil bitkisidir.

*Phaseolus vulgaris* L. kültürü yapılmakta olan fasulyelerin % 90’ını oluşturmakta olup *Phaseolus* cinsinin en önemli üyesidir. Fasulyenin ilk kez günümüzden 7000 yıl önce Orta Amerika yerlileri olan Aztek ve Maya’lar tarafından kültüre alındığı bilinmektedir (Özdemir, 2002). Dünya üzerinde yayılış kökeni Orta Amerika olarak bilinen fasulyenin iki gen havuzu bulunmaktadır. Bunlar Orta Amerika (Mesoamerica) ve Güney Amerika (Andean) bölgeleridir (Gepts, 2008). Kökenini sıcak bölgelerden alan fasulye, zamanla yeni çeşitlerin ortaya çıkmasıyla subtropik ve ılıman kuşaklarda da geniş yetiştirme alanlarına adapte olmuştur. Yemelik tane baklagillerin kültürü yapılan türlerinin ata genlerinin yani progenitörleri ile ilgili çok çeşitli görüşler vardır. *Phaseolus vulgaris* Avrupa’ya 16. yy. içinde, İngiltere’ye 1594 yılında ulaşmıştır. 17. yy. ‘da fasulye tarımı İtalya, Yunanistan, Türkiye ve İran’da yaygın hale gelmiştir. Kuzey Amerika’da fasulye önce Kaliforniya ve Batı Eyaletlerinde yayılmış, Doğu kısımlara ise 19. yy. ’in sonlarında Avrupa’dan gelerek yayılmıştır (Sepetoğlu, 2002).

Dünyada hayvansal kaynaklı proteinlerin bitkisel kökenli proteinlere göre daha pahalı olması sebebi ile ihtiyaç duyulan proteinin bitkisel kaynaklardan ve özellikle baklagillerden sağlandığı bilinmektedir. Türkiye’de bitkisel kaynaklı proteinlerin büyük bölümü fasulye, nohut ve mercimek gibi yemeklik tane baklagillerden sağlanmaktadır (GTHB, 2014). Yemeklik tane baklagiller insan beslenmesinde tahıllardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bitkisel proteinlerin % 66’sını tahıllar, % 18,5’ini baklagiller ve geri kalan % 15,5’lik kısmını ise diğer bitkisel kaynaklar sağlamaktadır (Kahraman, 2008). ABD Tarım Bakanlığı, Tarım Araştırma Servisi’nin Bitki Taksonomisi Bölümü’nün 1971-1974 yılları arasında yaptığı çalışmalar; dünyada ekonomik öneme sahip 1000 bitki türü bulunduğunu, bunlardan 150 tanesinin baklagillere ait tür olduğunu belirtmektedir. Yemeklik tane baklagiller arasında ekonomik öneme sahip 6 tür bulunmaktadır, bunların en başında ise fasulye bitkisi gelmektedir.

Fasulyenin Dünyada ekim alanı 30 139 041 ha, üretimi 25 093 616 ton, verimi ise 83.2 kg/da, Türkiye’de ekim alanı 91 110 ha, üretim 215 000 ton, verimi ise 235 kg/da’dır (FAO, 2017).

Ülkelere göre fasulye üretimine bakıldığında ilk sırada Hindistan 4 110 000 ton, Myanmar 3 737 320 ton, Brezilya 3 294 586 ton ve Çin 1 046 000 ton; ekim alanı yönünden ise Hindistan 10 000 000 ha, Brezilya 3 185 745 ha, Myanmar 2 633 520 ha ve Çin 936 000 ha olduğu görülmektedir (FAO, 2017).

İklim, toprak, topografya özellikleri bakımından birbirine benzer olan, ülkenin idari yapılanmasına uygun, yönetilebilir büyüklükte, tarım ürünlerinin ekolojik ve ekonomik olarak en uygun yetiştirilebildiği bölgeler tarım havzası olarak kabul edilmiş, 2009 yılında ülke genelinde 30 adet tarım havzası belirlenmiştir. Ülkemiz için önemli stratejik ve arz açığı olan tarım ürünlerini öncelikle kendi kaynaklarımızdan karşılamak, desteklemelerin daha sağlıklı ve rasyonel dağılımını sağlamak amacıyla havza bazlı destekleme modeli oluşturulmuş, 2017 yılından itibaren uygulanacak modelde tarımsal faaliyet yapılan her ilçe bir tarım havzası olarak kabul edilerek ve 941 tarım havzası belirlenmiştir. Model kapsamında TÜİK’in 2017 yılı listesinde; Türkiye’de arz açığı

bulunan, stratejik ve bölgesel önemi olan, insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemli ve hayvansal üretimin ana girdisi olan yem ihtiyacını karşılayacak 21 ürün destekleme kapsamına alınarak açıklanmıştır (BÜGEM, 2017).

Bitkilerin genetik yapılarındaki ve doğal yayılışlarındaki varyasyonlardan yararlanılarak kalıtım yoluyla istenilen özelliklere sahip yeni bitkiler elde edilmesine bitki ıslahı denilmektedir. Gelişen dünya nüfusu, işlenebilir tarım arazilerinin azalması ve ekolojik şartlarda meydana gelen olumsuzluklar, seleksiyon ve melezleme işlemlerinde yaşanan sorunlar klasik ıslah yöntemlerinin yetersiz kaldığını göstermektedir. Günümüzde tarımla uğraşan çiftçinin zor ve olumsuz koşullarda daha fazla ürün almasına yardımcı olacak tohumların üretimi konusunda araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Son yıllarda, biyoteknoloji ve genetik mühendisliğindeki tekniklerde önemli gelişmelerin olması, farklı canlılar arasında da gen aktarımına olanak sağlamıştır (Vardar Kanlıtepe ve ark., 2010). Böylece insanoğlu tarımda, gıda teknolojisinde ve ekolojide yaşamı tehdit eden pek çok sorunun çözülmesini sağlayabilecek anahtarlara gelişen biyoteknolojik yöntemlerle bitkilere gen aktarımı yaparak sahip olabileceklerdir. *P. vulgaris*, kendine döllenmesi, basit diploid yapıya ( $2n=22$ ) ve nispeten küçük genoma sahip olması ve iyi geliştirilmiş moleküler haritası bulunması gibi özellikleri nedeniyle genomik çalışmalar için oldukça cazip bir türdür ve genetik transformasyon çalışmalarının hedef bitkisi durumundadır (Ulukapı ve Onus, 2012). Bu yönü sayesinde fasulye; istenilen karakteristik özelliklere sahip biyoteknolojik kökenli ıslah çalışmalarında uygulanabilirliği söz konusu olan önemli bir bitkidir. Klasik ıslahta halledilemeyen tüm sorunların yaratmış olduğu boşluğu günümüzde modern ıslah teknolojileri biyoteknolojik yöntemlerle doldurmaktadır. Fasulye ıslahında kullanılan doku kültürü ve gen transformasyonu yöntemleri ile istenilen özelliklere sahip bitki geliştirmek mümkün olabilmektedir.

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları: eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni

doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Tarımsal biyoteknolojinin kullanılmasıyla dünyada ticari olarak üretilen virüs hastalığına dayanıklı kabak (Freedom II); raf ömrü uzatılmış domates (Flavr Savr); geniş spektrumlu herbisite (Glyphosate) dayanıklı soya fasulyesi, mısır ve pamuk; yüksek oranda laurik asit içeren kanola (*Brassica napus*); besin içeriği (lipid ve protein) geliştirilmiş soya fasulyesi, yerfıstığı ve kakao; yeşil kurda dayanıklı pamuk (BollGard) ve mısır (san/koçan) kurduna dayanıklı mısır (YieldGard) çeşitleri geliştirilmiştir. Ayrıca, son 10 yılda elde edilen tecrübeler ışığında, birden fazla istenen özelliğin (Ör: herbisit ve böceklere karşı dayanıklılık) bir çeşitte kombine edilme çalışmaları başlamıştır (Serçe, 2003).

Klasik bitki ıslahı yöntemlerini içeren seleksiyon, melezleme, poliploidi, suni mutasyonlar ve erkek kısırılığını kapsayan konularda bir hayli yol alınmış olmasına karşın sitoplazma ile taşınan plazmotipler arasında transferler mümkün olmamıştır. Bitki ıslahında kaydedilen ilerlemelerin son halkalarından birisi olan doku kültürü uygulamaları ile bu tip çalışmalar yapılabilmektedir. Fasulye bitkisinin ıslahında klasik ıslaha destek olacak biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması günümüzde kaçınılmazdır. Fasulye ıslahında embriyo kurtarma tekniği, haploidi tekniği, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* germplazm muhafaza, somatik hücre melezlemesi ve gen transferine yönelik doku kültürü teknikleri çalışılmıştır. Bu çalışmalar henüz yeterli düzeyde olmayıp üzerinde daha fazla çalışılması gerekmektedir. Fasulye üretiminde karşılaşılan sorunlara bu yöntemlerin geliştirilmesi katkı sağlayacaktır. Özellikle bitki üretimi için besin ortamlarının belirlenmesinden sonra, doku kültürü uygulamaları büyük bir hız kazanmış ve birçok bitkide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bitki ıslahı programlarında potansiyel kullanım alanına sahip, doku kültürü yöntemleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (Akgün ve ark., 1996).

Gen transformasyonu çalışmaları yapabilmek için iyi bir genetik bilgiye sahip olmak gerekmektedir. Genetik mühendisliği çalışmaları ile bitkilere gen aktarımı,

herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler, böceklere dayanıklı transgenik bitkiler, virüslere dayanıklı transgenik bitkiler, hastalığa dayanıklılığın artırılması, bitkilerde strese dayanıklılık fizyolojisi, erkek kısır bitkilerin üretimi, genetik markörler ve analiz metodları, protein ve protein mühendisliği, antisens RNA teknolojisi ve teknoloji koruma sistemini geliştirebilmektedir.

Doğrudan gen transfer metotlarına göre *Agrobacterium tumefaciens* ile gen transfer yönteminin daha kolay ve ekonomik olması ve başarı şansının daha yüksek olması, bu yöntemi daha popüler kılmıştır. Günümüzde, bitkilere gen transferinde en yaygın olarak kullanılan araç *Agrobacterium tumefaciens* gram (-) bakterisidir. Bu bakteri aracılığıyla tütün, patates, kolza ve domates gibi birçok kültür bitkisine başarıyla ve devamlı gen transferinin yapıldığı bilinmektedir.

Yabancı otlar, tarım alanlarında bulunan ve yarardan çok zarar veren bütün bitkiler tanımlanabilir. Kültür bitkilerinde çeşitli etmenlerin (hastalık, hayvansal zararlar vb.) meydana getirdiği ürün kaybı ele alındığında, özellikle kurak geçen yıllarda yabancı otların etkisinin en yüksek seviyede olduğu gözlenmektedir. Fasulye yetiştiriciliğinde ekimden önce ve çıkıştan sonra uygulanan herbisitler fasulyede verim ve kalite kayıplarına sebep olan kırmızı köklü tilkikuyruğu, sirken, yabancı hardal, semizotu, kuşotu, yabancı turp, fare kulağı, ballıbaba, yavşanotu, yer fesleğeni, domuz pıtrağı, horoz ibiği gibi yabancı otların mücadelesinde etkili olmaktadır. Bu yabancı otlarla mücadelede kullanılan kimyasal maddeler bitkiler üzerinde kalıntı meydana getirebilmekte, nihai hedefi olan bitkiye zarar verebilmekte, bitki üzerinden beslenen tüm canlıları olumsuz etkilemekte ve ayrıca toprağı da kirletmektedir.

Mekanik, fiziksel ve biyolojik savaş yöntemleri gerek uygulama alanının yaygın olmaması, gerekse de geniş alanlarda ekonomik olmamaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle özellikle ikinci dünya savaşı yıllarında yabancı ot öldürücü olarak kullanılacak kimyasalların geliştirilmesi ile birlikte özellikle geniş tarım alanlarında etkin bir yabancı ot mücadelesi yapılabilir duruma gelinmiştir. Günümüzde ise bu yöntem gerek etkinliği gerekse de ekonomik olması nedeni ile en

yaygın kullanılan yabancı ot mücadele yöntemidir (Babaoğlu ve ark., 2002). Fasulye tanelerine besin içeriği yönünden bakıldığında ise protein, yağ ve karbonhidrat bakımından oldukça zengindir.

Fasulye bitkisi çiçeklenme ve meyve bağlama döneminde 18-25 °C arasındaki sıcaklıklar istemekte ve bu sıcaklık optimum meyve tutumuna sebep olmaktadır. Kumlu topraklardan, orta ağır topraklara kadar birçok toprak tipinde yetişebilir. Bununla birlikte derin, geçirgen, su tutma kapasitesi iyi, organik maddece zengin, humusça zengin ve fazla asit olmayan toprakları çok sever. Dünya bazında yabancı ot ve hastalık etmenlerinin oluşturduğu kayıplar her yıl artış göstermektedir. Başlıca amaç bu kayıpları ekonomik açıdan en aza indirmektir. Kültür bitkilerinde hastalık ve zararlılar gibi çeşitli etmenlerin meydana getirdiği ürün kayıpları ele alındığında yabancı otların etkisinin en yüksek seviyede olduğu gözlenmektedir. Kullanılan herbisitlerin yabancı otlara maksimum zararı verirken, kültür bitkisini ise minimum seviyede etkilemesi istenmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde transgenik bitkilerin yaygın olarak yetiştirilmesiyle tarımsal verimlilik ve kalitede belirgin bir artış görülmektedir. Bununla beraber toprak ve suda kontaminasyona yol açabilen herbisit ya da pestisit gibi kimyasal ilaçların kullanımındaki azalma doğal ekolojik çevrenin korunmasında olumlu bir gelişim olarak değerlendirilebilir (Ölçer, 2001). Seçici olarak etki eden herbisitler (Bromoksinil, Sulfonylharnstoffe), belli morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip yabancı otları öldürmektedirler. Bazı seçici herbisitler uzun süre toprakta kalabildiklerinden taban suyuna karışmakta ve dayanıklı yabancı otların ortaya çıkması tehlikesini doğurmaktadır. Total herbisitler ise toprakta çabucak çözünmektedirler. Fakat bunlar hem yabancı otlar hem de kültür bitkileri için aynı derecede toksiktirler (Kempken ve Kempken, 2004). Herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler, herbisitlerdeki etkin maddeyi inaktif hale getiren ve herbisitlerin hücum ettiği alanı herbisit zarar meydana getirmeyecek şekilde değiştiren proteinleri kodlayan dayanıklılık genlerine sahiptirler. Bu özelliğe sahip bitkilerin geliştirilmesi amacıyla ilk önce fasulyede doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesi ve sonra da bunları gen aktarımında kullanarak, herbisitlere karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir. Kullanılan bu yöntemler



sayesinde klasik ıslahta kaybedilen zaman geri kazanılmakta ve istenilen özellikler bitkilere daha kolay aktarılabilmektedir. Bu çalışmanın amacı fasulye bitkisinin 3 çeşidinde *bar* geninin ifade analizi ve herbisitlere dayanıklı transgenik fasulye bitkilerinin elde edilmesidir.

Bu amaçla, bazı fasulye çeşitlerinde *bar* genlerinin kontrolü ve gen aktarımına uygun yüksek oranda bir sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi ve daha sonra *A. tumefaciens* aracılığıyla herbisitlere karşı dirençli transgenik fasulye bitkilerinin elde edilmesi olmuştur.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Fasulye; yemeklik tane baklagiller içerisinde rejenerasyon kabiliyeti en yüksek olan cinstir. Hastalık, zararlılar ve yabancı otlar fasulye yetiştiriciliğinde büyük verim kayıplarına neden olmaktadır. Yabancı otlar; kültür bitkisinin besin ve suyuna ortak olarak, ışığını ve çikardıkları salgılarla gelişmesini engelleyerek zarar vermektedirler. Aynı zamanda kültür bitkisinin uniform gelişmesini ve olgunlaşmasını önleyerek ürünün kalitesini de düşürmekte, ayrıca hastalık ve zararlılara da yataklık etmektedirler. Yabancı otların sebep olduğu ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün sağlamak için herbistlere dirençli bitkilerin ıslah edilmesi gerekmektedir. Ancak fasulyede herbisitlere dayanıklı ıslah çalışmaları hemen hemen bulunmamaktadır. Bu çalışma ile fasulye bitkisine; *Agrobacterium* aracılığıyla *bar* geni aktararak, herbisitlere karşı dayanıklı bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda daha önceden yapılmış doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları özetlenerek aşağıda verilmiştir.

### 2.1. FASULYEDE YAPILMIŞ DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

**Mustafa ve ark. (2017);** gümüş ve bakır nanopartiküllerin *Phaseolus vulgaris* L.'nin *in vitro* ve *in vivo* fizyolojik özelliklerine etkisini incelemiştir. Fasulye tohumları % 90 etanolde 5 dakika tutulduktan sonra tohumlarsteril saf su içerisinde 60 dk bekletilmiştir. Daha sonra 15 ve 30 dk boyunca 25, 50 ve 100 mg/mlkonsantrasyonlarda bakır ve gümüş nanopartiküllere batırarak yüzey sterilizasyonu yapmışlardır. Muamele edilmiş ve muamele edilmemiş embriyolardan oluşan kallusları 2.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamına aktarmışlardır. Yapılan çalışma sonucuna göre; nanoparçacıkların kallus oluşum oranı, kallus yaş ve kuru ağırlıkları üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Etkili konsantrasyonun 30 dakikada 50 mg/ml gümüş nanopartiküller olduğu gözlemlenmiştir.

**Gatica Arias ve ark. (2010);** Fasulye bitkisinin (*Phaseolus vulgaris*) *in vitro* bitki rejenerasyon sistemi: N6-benzilaminopurin ve adenin sülfatın etkisi çalışmalarında; N6-benzilaminopurin (BAP) ve adenin sülfat (AS) kullanılarak ticari açıdan önemli fasulyenin (*Phaseolus vulgaris*) yenilenmesi için bir yöntem oluşturmuşlardır. Kosta

Rika fasulye çeşitlerinden Bribri, Brunca, Guaymí, Huetar ve Telire'nin embriyojenik eksenleri, 100 mg l-1 miyo-inositol, 1 mg l-1 tiamin, 30 gl-1 sukroz, BAP (0, 5 ve 10 mg l-1), AS (0,20 ve 40 mg l-1) ve 8 gl-1 agar. İndüksiyon ortamında BAP ve AS konsantrasyonuna bakılmaksızın, sürgün ve yapraklı sayısı değerlendirilen fasulye çeşitleri arasında önemli derecede farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Sürgünlerin ortalaması Brunca > Telire > Bribri > Guaymí > Huetar için daha yüksek olduğunu analiz etmişlerdir. Dahası, çeşidinden bağımsız olarak, 5 mg l-1 BAP ve 20 veya 40 mg l-1 AS ile takviye edilmiş indüksiyon ortamı, sürgün formasyonunun daha yüksek ortalama ile sonuçlandığını görmüşlerdir. Bu önemli bitki için bu araştırmada geliştirilen rejenerasyon sistemi, mutajenez veya genetik transformasyon yoluyla genetik modifikasyon için yararlı bir araç olabileceği sonucuna varmışlardır.

**Sağlam ve ark. (2009);** *In vitro* koşullarda fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'nin apikal meristem, petiol, kotiledon boğum ve hipokotil eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu çalışmasında; fasulyenin Aras, Eskişehir-855 ve Şehirali-90 çeşitlerini *in vitro* koşullarda 9-10 günlük bitkiciklerden aldıkları apikal meristem, petiol, kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları kinetin ve 2,4-D'nin farklı dozlarını içeren MS rejenerasyon ortamlarında kültüre almışlardır. Sekiz hafta sonunda her üç çeşidin bütün eksplantlarında değişik oranlarda kallus oluşumu gözlemlemişlerdir. Petiol ve hipokotil eksplantlarından sürgün gözlememişler ve apikal meristemlerden 0.18, kotiledon boğumlardan ise 0.23 adet sürgün gözlemlemişlerdir. Elde edilen bitkicikler 2mg/l IBA köklendirme ortamında köklendirilerek, iklim odasında dış şartlara alıştırmışlardır. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen fasulyede yapılacak biyoteknolojik çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmüşlerdir.

**Dang ve Wei (2009);** Fasulye kotiledon boğumlarından yüksek frekanslı bitki rejenerasyonu çalışmalarında; *Phaseolus vulgaris* için verimli bir rejenerasyon sistemi, boyunca thidiazuron veya N6-benzilaminopurin (BA) ile desteklenmiş olduğunu aynı zaman da Murashige ve Skoog (MS) ortamında çimlendirilmiş olgun tohumlardan geliştirmiştir. Kotiledon boğumlarını kullanarak ve 4 haftalık kültüre alma işleminden sonra indüksiyon frekansı % 71.9 ile 5.0 mg dm-3 BA ile takviye edilen MS ortamında

birden fazla sürgün oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Sürgün oluşumu için 1.0 mg dm-3 BA, 0.1 mg dm-3 giberellik asit ve 2.0 mg dm-3 gümüş nitrat içeren sürgün oluşturma ortamı üzerine aktarmışlardır. AgNO<sub>3</sub> ilavesi, sürgün oluşumunu frekansını % 61.3'ten % 87.6'ya arttırmışlardır. Kök indüksiyon ortamı, 0.75 mg dm-3 indol bütirik asit ve 0.02 mg dm-3 BA ile yarı dayanıklı MS ortamı kullanmışlardır. Ortalama kök sıklığı % 84.3'tür. Sağlıklı kökleri olan yenilenen bitkiler, toprağa aktarıldığında başarılı bir şekilde büyüme gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak; bu sistemi kullanarak bir eksplanttan 10 rejenere olmuş bitki elde etmişlerdir.

**Arellano ve ark. (2009);** Dolaylı organogenesis yöntemi ile fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'de rejenerasyon çalışmalarında; *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa için *in vitro* rejenerasyon bir protokol kurmuşlardır. Kullandıkları eksplantlar; apikal meristemler ve çimlenen tohumların embriyonik eksenlerinden kotiledonları ayırmışlardır. Birkaç oksin / sitokinin kombinasyonunu, kallus indüksiyonu için test etmişlerdir. En iyi kallus üretimi, 1.5 1M 2,4-diklorofenoksiasetik asit içeren ortam ile elde etmişlerdir. 2 haftalık büyüme kallusundan sonra, 22.2 l M 6-benzilaminopurin, her kallus başına yaklaşık 0,5 sürgün arzettiği şekilde yeniden oluşturmuşlar ve üzerine bu sürgünlerin köklenme ortamına aktarılması ile % 100 verimlilikle kök üretmişlerdir. Rejenerasyon sürecinin histolojik analizlerinden, dolaylı organogenesis modelini doğrulamışlardır. Serada yetiştirilen yenilenmiş bitkiler normal gelişme gösterdiklerini ve verimli olduğunu gözlemlemişlerdir. Protokol, test edilen diğer dokuz *P. vulgaris* çeşidi için sürdürülebilir; bir genotip bağımsız prosedürü olabileceği sonucuna varmışlardır.

**Geerts ve ark. (2008);** *Phaseolus vulgaris* için protoplast füzyonu teknolojisinin somatik hibridizasyonu ile *Phaseolus vulgaris* donör iki türü üzerinde yapılan bir çalışma yürütmüşler ve sonuç olarak heterokaryon türevi mikrokaluslar oluşumu gözlemlemişlerdir.

**Sağlam ve ark. (2007);** fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinde olgunlaşmış embriyolardan adventif sürgün rejenerasyonu çalışmasında; bitki materyali olarak

kullanılan Karacaşehir 90 ve Akman 98 fasulye çeşitleri Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin etmişlerdir. Fasulye tohumları çamaşır suyunun (Ace) % 20'lik dozu ile 5dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra steril saf su ile 5'er dk. 3 kez durulmuşlardır. Embriyoları çıkarmak için steril tohumlar ilk önce steril saf suda 24 saat bekletmişlerdir. Saf suda beklettikleri tohumlardan elde edilen embriyolar 20 mg/l NAA içeren MS besin ortamında 1 hafta ön muameleye tabi tutmuşlardır. Sonrasında gelişen eksplantlar 0.05 mg/l, 0.10 mg/l, 0.15 mg/l, 0.20 mg/l, 0.25 mg/l, 0.30 mg/l, 0.35 mg/l, 0.45 mg/l, 0.45 mg/l TDZ ile 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamına alınarak adventif sürgün rejenerasyonu gözlemlenmişlerdir. Kullanılan ortamlardan en iyi sonuç ise; 0.10 mg/l, 0.15 mg/l, 0.20 mg/l TDZ'li MS rejenerasyonu ortamlarından elde etmişlerdir. Bitki bünyesinden salgılanan fenolik bileşiklerin etkisiyle kararma gözlemlenmişler ve kararmayı önlemek amacıyla ortamlara 0.2 mg/l askorbik asit eklemişlerdir. Elde edilen sürgünler 5-10 cm uzunluğa geldiklerinde kesilerek steril magenta kutuları içindeki 2 mg/l IBA köklendirmişlerdir. Sonuç olarak elde edilen köklenmiş bitkiler dış şartlara alıştırmak için seraya almışlardır.

**Mohamed ve ark. (2006);** *Phaseolus angularis* L'nin Organogenezini: N6-benzylaminopurine ve thidiazuron varlığında etiyole tabi tutulan fidelerden gelen adventif sürgün yenilenmesinin yüksek etkinliği çalışmalarında; *Phaseolus angularis* L.'nin organogenez yoluyla fertil bitkilerin yenilenmesi için aşamalı bir prosedür ve ekonomik açıdan önemli olan kültürel çeşitleri: KS-6, KS-7 ve KS-8 etiyülü fideler kullanılarak kurmuşlardır. 5 günlük fidan eksplantlarının MS (Murashige ve Skoog (1962) *Physiol Plant* 15: 473-493) + B5 vitaminleri içerisinde karanlık koşullar altında 5.0 LM TDZ veya 5.0 LM BAP içeren sıvı ortamının ön kültür uygulamasının organogenez için önemli olduğunu belirtmişlerdir. Sürgün büyümesi ve sürgün çoğalması, BAP konsantrasyonlarının, 3 hafta sonra 5.0 ila 2.5 lt/M'ye düşürerek uyarılmışlardır. Çek indüksiyonunun maksimum frekansı, çeşit KS-8'de % 65.2 (33.8 ± 2.54 sürgün / eksplant), bunu takiben KS-7 % 34.6 (23.4 ± 1.91 sürgün / eksplant) ve KS-6 ise % 30.6 (21.2 ± 2.28 sürgün / eksplant ) olduğu sonucuna varmışlardır. Katı MS ve B5 ortamına aktarıldıktan sonra çoğaltılan tomurcuklar uzatılmış 4.0 IM GA3, 12.5

1M AgNO<sub>3</sub> ve 0.4 M IBA eklemiştir. Sürgünler, 4.5 lt/M içeren sıvı ortam ile muamele edildiğinde, % 98'e kadar köklenme etkinliği elde etmişlerdir. Etkili sürgün indüksiyon kabiliyetine, çeşitin bağımlı olduğu bulunmuştur. Test edilen üç çeşidin hepsi birden fazla sürgün oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu verimli ve hızlı rejenerasyon yönteminin, önemli baklagil bitkisi için *Agrobacterium* aracılığıyla partikül tabancası transformasyonu için de yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

**Sanchez ve ark. (2006);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) için organojenik bitki rejenerasyon sistemi çalışmasında; (*Phaseolus vulgaris* L.) fasulye ticari çeşitlerinden Flor de Junio Marcela (FJM) ve Flor de Mayo Anita (FMA) tohumlarından elde edilen embriyo-eksenleri kullanarak bir organojenik rejenerasyon protokolü bulmuşlardır. Embriyonik eksen yüzeyi sterilize edilmiş tohumlar çıkarmışlar ve farklı benzilaminopurin (BAP) ve adenin (A) konsantrasyonları içeren MS ortamı içine aktarmışlardır. Ortamlara 5 ve 10 mg/l'lik BAP ilavesi yapmışlar ve farklılaşmış hücre topluluklarının oluştuğunu gözlemlemişlerdir. FJM için embriyonun internodal segmentte ve FMA'nın ise embriyonik eksenlerinin apikal kısımlarında bu duruma rastlamışlardır. Sonuç olarak; FMA'nın tomurcuk küme oluşumu % 18 oranında göstermelerine karşın, FJM yüksek tomurcuk küme oluşumunun % 90 ve tam bitki rejenerasyonu oluşumunun ise % 83 gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca güçlendirilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) ile genetik varyans analizi rejenere bitkiler arasında değişim gösterdiğini de belirtmişlerdir.

**Veltcheva ve ark. (2005);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'de gen transformasyonu ile *in vitro* rejenerasyonundaki sorunlar ve gelişmeler derlemesinde; potansiyel ve mevcut literatür verilerine dayalı *Phaseolus vulgaris* L. *in vitro* yetiştirme sınırlamaları ayrıca somatik rejenerasyon gibi farklı doku kültürü yöntemleri ve gen transferi ile *in vitro* fasulye modifikasyonu değerlendirmişlerdir.

**Baudoin ve ark. (2004);***Phaseolus vulgaris*'de türlerarası melezlemelerde embriyo gelişimi ve genetik isimli çalışmada ise *P. vulgaris* ve 2 donör tür olan *P. coccineus* ile *P. polyanthus* arası melezlemede *Phaseolus vulgaris* dişi ebeveyn olarak kullanılmış ve yararlı tarımsal özellikleri diğer türlere aktarmak için uygulanmıştır.

**Fischer ve ark. (2004);** Biyofarmasötiklerle bitki bazlı üretim çalışmalarında; rekombinant proteinlerin büyük ölçekli üretimi için günümüzde yaygın olarak bitkilerin kabul gördüğü bir platform olduğunu belirtmişlerdir. İlk bitki türevinin rekombinant farmasötik protein hattında olduğunu, klinik değerlendirmenin ise son aşamasına ulaşan ve daha pek çok şey geliştirmenin mümkün olduğunu vurgulamışlardır. Son iki yılda bu konuda bazı önemli teknolojik ilerlemelerin gerçekleştiğini bildirmişlerdir. İfade platformlarında gösterilen biyoteknolojinin gelişen alanı, yeni bitki temelli ticari gelişimin devam ettirilmesine de olanak sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca bitki biyoreaktörlerinin bazı sınırlamalarına karşı mücadele etmek, örneğin düşük verimlilik ve tutarsız ürün kalitesi, bitki kökenli farmasötiklerin onaylanması konularında önemli başarılar elde edildiğini vurgulamışlardır.

**Sağlam (2004);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) de doku kültürü ve *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı çalışmasında; Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Aras, Eskişehir-855 ve Şehirli-90 çeşitlerinin jenerasyon, köklendirme, *in planta* ve *in vitro* koşullarda *Agrobacterium*' un *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenesis*' in değişik suşlarını kullanarak gen aktarımı kabiliyetini incelemek amacı ile yürütmüştür. Adventif sürgün rejenerasyonu amacıyla söz konusu üç fasulye çeşidinden alınan apikal meristem, petiol, kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları 2,4-D ve kinetin içeren MS besin ortamlarında kültüre almış fakat petiol ve hipokotilden hiç sürgün rejenerasyonu gözlenmemişken, apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarından az sayıda sürgün gözlemlenmiştir. Sürgün gelişimini hızlandırmak amacıyla 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ortamına alt kültüre almış fakat gelişme kaydedememiştir. Sürgün rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyolar 0.05-0.15 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınırken, köklenmeyi sağlamak için rejenere olan sürgünleri 0.00, 0.25,

0.50, 1.00 2.00 mg/l IBA içeren MS besi ortamına almış ve IBA oranının artışıyla paralel olarak köklenmenin de arttığını gözlemlemiştir.

**Ahmed ve ark. (2002);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidesi eksplantlarından bitki rejenerasyonu çalışmalarında; fasulyede sürgün indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu için MS ortamına ek olarak BA ve NAA eklemiştir. *P.vulgaris* cv'sinde multiple sürgün indüksiyonu Fônix ve Maxidor'daelde etmişlerdir. Sağlam çekirdek (IS) ve kotiledon boğumlarında (CN) eksplantlarından rejenerasyonun etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Çoklu sürgün oluşumunun indüksiyonu için en uygun yöntemin, çekirdek kültüründe (IS) MS tabanlı ortama BA ve NAA ilavesi ile olduğunu bulmuşlardır. Tam MS ortamı + 1mg / l BA ve 0.1mg / l NAA üzerinde kültürlenmiş kuru fasulyede kotiledon boğumlarında (CN) çok sayıda sürgün indüksiyonu yapılabileceği sonucuna varmışlardır. Köklenme kabiliyeti ve kök gelişimi için 2 cm uzunluğunda veya daha uzun süren ve 2 yapraklı yaprak sürgünler elde edilebileceğini ve yöntemin transformasyon deneylerinde uygulanabilir olduğu sonucuna varmışlardır.

**Zambre ve ark. (2003);** *Phaseolus acutifolius* A. Gray için optimize edilmiş bir *Agrobacterium* aracılıklı transformasyon prosedürü geliştirme çalışmalarında; *Phaseolus acutifolius*'un *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyonunu iyileştirmek için intron içeren bir  $\beta$ -glukuronidaz geninin geçici ekspresyon düzeylerini ölçerek farklı faktörlerin T-DNA transferi üzerindeki etkisini incelemiştir. Geliştirilmiş transformasyon frekansları sayesinde, nopaline tipi virülans genleri taşıyan bir *A. tumefaciens* suşuyla ve başlangıçtaki büyüme evresinde hücreye *Agrobacterium* hücreleri enfekte ederek elde etmişlerdir. Optimize edilmiş ko-kültivasyon, 200 uM asetosiringon varlığında, asidik bir ortamda (pH 5.5) 16 ° C / 8 saat (gün / gece) ışık periyodu altında, 22 ° C'de gerçekleştirmişlerdir. En iyi uygulama yöntemlerini birleştirerek *P. acutifolius* genotipi NI576 için etkin ve tekrarlanabilir bir dönüştürme prosedürü oluşturmuşlardır. Southern ve immünoblot analizleri, birincil transgenik bitkilerde ve yavrularında transgenlerin kararlı bir şekilde oluşmasını ve ekspresyonunu doğrulamış olduğu sonucuna varmışlardır.



**Encina ve ark. (2001);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) hücre duvarı karakterizasyonunun kallus kültüründe dichlobenil toleransı çalışmalarında; fasulyede kallus kültürlerinin kültürü sırasında kuru ağırlıktaki artış, herbisit dichlobenil (2,6-diklororobenzonitril) ile 0.5 mM'lik bir I50 ile engellemişlerdir. Bununla birlikte, fasulye, her alt-kültürde de inhibitör konsantrasyonunda kademeli bir artış ile 12 mM'lik bir konsantrasyona toleranslı hale getirmişlerdir. Devamında ise fasulye çalılarındaki çıkıntılarda hücre grupları, düzensiz hücre duvarları, pullu bir yapıya sahip ve ayırt edilmemiş orta lameller olmaksızın daha kalın bir hücre duvarı ile çevrelemişlerdir. Toleranslı hücre duvarlarının FTIR spektrumlarında esterleştirilmiş ve esterleşmemiş pektinler ile hücre duvarı fraksiyonasyonuna, toleranslı hücre duvarlarında, toleransız hücre duvarlarının ksiloglukan-selüloz ağının kısmen, büyük oranda homogalakturonan içeren çapraz bağlı poliüoridlerden oluşan bir pektin açısından zengin bir ağ ile değiştirildiğini göstermişlerdir. Bu değişiklikler, her iki herbisit için de toleransa ilişkin ilgili bir mekanizma olduğuna işaret ederek isoksabene toleranslı fasulye hattı için tarif edilenlerle karşılaştırılabilir olacağı sonucuna varmışlardır.

**Brown ve ark. (1996);** Fasulye tohumlarında embriyo kurtarma tekniği ile % 10 altında çimlenme düzeyine sahip tohumluk fasulye türlerini temsil eden bitki popülasyonun çimlenme düzeyini arttırmak için embriyo kurtarma protokolü geliştirilmiştir. Bu çalışmada asıl amaç bitki genetiğinin bozulmasını engellemek ve depolama süresinin arttırmaktır. Bu çalışma ile uygun teknikler geliştirilmiş ve embriyo kurtarma yöntemi ile 4 rejenerasyonun verimliliği ispatlanmıştır.

**Sonnante ve ark. (1994);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) ıslahında genetik çeşitliliğin evrimi çalışması ile *Phaseolus vulgaris* ABD çeşitlerinin de meydana gelen evrimsel değişimleri belirlemek için M13 DNA parmak izi evcilleştirme sırasında kullanmışlar ve gelişmiş çeşitler arasındaki evrimi yayılan soy markerların tek tipleri ile ilk ürün olduğu belirtmişlerdir.

**Mohamed ve ark. (1993);** Fasulyenin pedisel eksplantından kallus kültürü yoluyla sürgün organogenesisi yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem ile bitki

rejenerasyonlarının birbirini izlediği alt kültürlerin eksplanttan ayrılmış ve muhafaza edilmiş çiçek sapsarı oluşmuş ve 2'li fasulye hatları elde edilmiştir. Bu materyaller % 2 sukroz 0.5 thidiazuron 1.0 mg indolasetik asit ve 0.07-0.14 g askorbik asit ile zenginleştirilerek MS ortamına aktarılmıştır. 4 haftalık kültürlerde yapılan gözlemler sonucu filiz tablalarında 0.1 mg BA / litre ortam üzerinde iki ila beş kat sürgün (> 0.5 cm) gelişimi gözlemlenmiştir.

**Malik ve Saxena (1992);** *Phaseolus vulgaris* L. Rejenerasyonu: N-6 benzilaminopürin ve thidiazuron ile fidelerde direkt sürgün oluşumunun yüksek frekanslı indüksiyonun etkisi çalışmalarında; *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'deki verimli fide oluşumunun indüksiyonu ile olgun tohumları çimlendirerek ve büyüyen fideleri, 10 ppm thidiazuron (TDZ), ilave edilmiş bir fenilüre veya 80 µM N-6 benzilaminopürin (BAP) ile desteklenmiş bir ortamdan elde etmişlerdir. 10 ppm TDZ varlığında 7 gün boyunca kültür ortamında bekletmişler ve sürgün gelişimi için sürekli bir BAP varlığı gerektiği sonucuna varmışlardır. Yabancı tomurcukların farklılaşması tohum kültürünün dördüncü haftasında, kotiledon boğum üzerinde aksiller tomurcuk bölgelerindeki dokulardan ve aynı zamanda bozulmamış fide dikenlerini çevreleyen alanlarda meydana geldiğini sonucuna varmışlardır. Sağlam fidelerden rejenere olan sürgünlerin sayısı eksplantlarla elde edilenlerden önemli derecede yüksek olduğunu aynı zamanda yenilenmiş sürgünler çiçekli bitkilerde geliştiğini gözlemlenmiştir. Diğer fasulye çeşitlerinde de benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

**Toubart ve ark. (1992);** *P. vulgaris* DNA'sı ile PGIP kodlayan genin klonlanması ve karakterizasyonunda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerlerinin gereksiz oligonükleotidleri dizaynetmek için kullanmışlardır. PCR ile üretilen DNA kullanılarak klonlanmış yapraklar, hipokotiller ve çiçek, süspansiyon kültür hücreleri içinde tespit etmişlerdir.

**Leon ve ark. (1991);** *Phaseolus vulgaris*'in Geçici Gen ekspresyonunun Protoplast içinde Hücre Süspansiyon kültürü ile iki farklı özelliği araştırmışlar ve tütün mozaik virüsüne karşı yaklaşık 10 kat güçlendirilen türler geliştirilmişlerdir.

**Andradf-Aguilar ve ark. (1988);** *Phaseolus vulgaris* L. ve *P. acutifolius* A. Gray arasında Melezleme girişimleri için embriyo kurtarma çalışmalarında;*Phaseolus vulgaris* ve *P. acutifolius* arasında yapılmış bir melezleme çalışması yapmışlardır. *P. vulgaris* dişi ebeveyn olarak kullanılması durumunda yüksek hibridizasyon etkinliği elde edilmiş ve büyümede erken aşamada öldüğünü belirtmişlerdir. Bu kısa süreli büyüme esnasında dişi ebeveyn, *P. vulgaris* belirleyici ama yaprak morfolojisinde erkek ebeveyn, *P. acutifolius* belirleyici olduğu sonucuna varmışlardır.

**Parker ve ark. (1986);** *Phaseolus vulgaris* L. ve *P. acutifolius* Arasında Basit Çaprazlama İle Türler Arası Melezleme Bitki Gelişimi ve Genetik Kontrolü çalışmalarında 2 tür arasında *in vitro* embriyo kurtarma teknikleri ile türler arası melezlemeler yapmışlardır. Çalışmada türler arası uyumsuzluğun *S. vulgaris* alleline bağlı olduğu ortaya çıkarmışlardır.

## 2.2. FASULYEDE YAPILMIŞ GEN AKTARIMI ÇALIŞMALARI

**Erdinç ve ark. (2017);** Türkiye’de farklı bölgelerden toplanan 123 fasulye çeşidi ile yabancı kökenli 7 fasulye genotipinin antraknoza dirençliliğini araştırmışlardır. Fungal patojen *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Ve Magn.) Lambs'ın sebep olduğu antraknoz hastalığına dirençleri açısından değerlendirmişlerdir. Analiz yapay aşılama ve direnç bağlantılı moleküler belirteçler kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Race 55 yapay aşılama yöntemini kullanılarak büyüme odasında tutmuşlardır. Moleküler belirteçler, SCAR ve dirençli genlerle ilişkili RAPD yöntemiyle primerler kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Suni aşılama sonuçları, 7 yabancı çeşidin yanı sıra, 21 Türk fasulye genotipine antraknoza dirençli olduğunu gözlemlerken, geriye kalan 102 Türk genotipi çeşitininise dayanıklı olmadığı sonucuna varmışlardır.

**Rossi ve ark. (2017);** dört farklı brezilyalı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinin tane proteom profillerinin karşılaştırılması çalışmalarında Brezilya’da Embrapa, çiftçilere yüksek verim ve tüketicilere mükemmel kaliteyi sunmak için "BRS Sublime", "BRS Vereda", "BRS Esteio" ve "BRS Estilo" çeşitlerini geliştirmişlerdir. Yaygın fasulye çeşitlerinin tane proteomları iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve

tandem kütle spektrometresi (MS / MS) temel alınarak karşılaştırmışlardır. Otuz iki farklı şekilde biriken proteinleri MS ile tanımlamışlardır. Fazolinler, leguminler ve lektinler gibi saklama proteinleri en bol proteinlerin olduğu ve yeni proteinler de tespit edildiğini bildirmişler. Çalışma sonucunda; diğer fasulye çeşitlerini ve fasulye genotiplerini analiz etmek için kullanılabilecek yararlı bir platform oluşturmuşlardır.

**Hız (2015);** Tuz stresi altında taze fasulye bitkisinin transkriptom analizi ve tuza cevap veren genlerin işlevsel analizleri çalışmasında; Tuza dayanıklılık açısından zıt özellikler taşıyan iki taze fasulye çeşidinin su kültürü ortamında ve tuz stresi altında, yaprak ve kök dokularından kapsamlı yüksek-çıkıtlı transkriptom analizi yapmışlardır. Transkriptom analizinden önce fizyolojik ölçümler yapılarak dayanıklı Ispir ve duyarlı TR43477 genotiplerinin strese giriş zamanı 125 mM tuz uygulamasının 3. gününden sonrası olarak belirlemişlerdir. Transkriptom analizi sonucunda elde edilen 255 milyon yüksek kalite okuma, ortalama uzunlukları 930 baz çifti uzunluğunda 73762 transkriptte birleştirmişlerdir. Bu transkriptlerin % 75'i (55433) Nr protein veri bankasındaki proteinler ile eşleştirmişler ve toplamda, anlatımı değişen 12001 gen tespit etmişlerdir. Transkriptomdan elde edilen gen anlatım düzeyleri, qRT-PZR analizi ile doğrulamışlardır. Sonuç olarak bulguları; DREB2A ve MYB2 transkripsiyon faktörlerinin ve regüle ettikleri P5CS1 ve RD29B genlerinin ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız anlatımlarınının tuza dayanıklılıkta düzenleyici roller olabileceğini işaret etmekte olduğunu kanısına varmışlardır.

**Mukeshimana ark. (2013);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) rejenerasyonu etkileyen faktörler ve yaygın dönüşümü çalışmasında 4 (*Phaseolus vulgaris* L.) fasulye çeşidinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılı ile Red Hawk, Matterhorn, Merlot ve Zorro, üzerinde sistematik yenilenmesi ve transformasyon çalışılmıştır. Ayrıca sistematik transformant eksplantların embriyo ekseni üzerinde kısmen GUS boyaması yapmışlardır.

**Nguyen ve ark. (2012);** Gus Renk İşaretleyici ve *bar* Herbisit Direnci ile Arpa (*Hordeum vulgare*) HVA1 Kuraklık Tolerans Genlerinin (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fasulye'de genetik Transformasyonu çalışmalarında; "Condor", "Matterhorn", "Sedona", "Kansas," ve "Montcalm" olmak üzere beş fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinin genetik olarak apikal sürgün meristem primordium'un biyolistik bombardımanı yoluyla gen aktarımı yapılmıştır. Transgenler GUS renk işaretleyicisini görsel transjenik olayları teyit markörü olarak, Liberty *herbisid* dirençli bitkiler, *in vitro* teyit transjenik kültür seçimi ve kullanılan çubuk herbisit direnci seçilebilir marker ve düşük kuraklık arpa (*Hordeum vulgare*) geç embriyonez bol miktarda protein (HVA1 dahil) transjenik bitkilerin kök uzunluğu karşılık gelen bir artışla tolerans sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmada daha iyi germplazmında üretiminde *P. vulgaris* yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

**Amugune ve ark. (2011);** Fasulyenin *Agrobacterium* Aracılığı ile Transformasyonu çalışmalarında; iki fasulye çeşidinin *Mwitemania* ve *Rose coco*'nun *in vitro* *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyon potansiyelini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Nemli filtre kağıdında 1-2 gün çimlendirilen olgun tohum embriyoları,  $\beta$ -glukuronidaz (GUS) barındıran *A. tumefaciens* suşları olan LBA 4404 (pBI 121), EHA 105 (pCAMBIA 1201) ve EHA 105 (pCAMBIA 1301) ile inoküle etmişlerdir. Intron plazmidleri enfekte olmuş embriyolar 3-4 gün boyunca bazal Murashige ve Skoog'da ortamında yetiştirmişler, B5 vitaminleri (MSB5) veya 10  $\mu$ M BAP ve 50 mg L-1 kanamisin ile higromisinden oluşan rejenerasyon ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. GUS aktivitesi için histokimyasal boyama ile teyit edilen transforme sürgünler ve kökler, *A. tumefaciens* LBA 4404 (pBI 121) ile enfekte edilmiş eksplantlardan alınan 40 haftalık *Mwitemania* bitkileri elde etmişlerdir. EHA 105 (pCAMBIA 1201) veya EHA 105 (pCAMBIA 1301) ile enfekte edilmiş eksplantlardaki *Rose coco* ve *Mwitemania* sürgünlerinde hiçbir GUS ifadesi gözlemlenememişlerdir.

**Sağlam (2009);** Tohum böceklerine (bruchidae: coleoptera) dayanıklı transjenik fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkilerinin elde edilmesine yönelik yapmış olduğu araştırmada; fasulye tanelerinin gıda kalitesini, çimlenme gücünü ve dolayısıyla ekonomik değerini düşüren böceklerle mücadelede kullanılan kimyasal maddelerin bitkiler üzerinde bıraktığı kalıntıların, bitki üzerinden beslenen tüm canlıları olumsuz

etkilediğini belirtmiştir. Transformasyon çalışmalarında kullanılan *Bacillus thuringiensis* (Bt) genlerinin ise insanlar ve diğer canlılar üzerinde olumsuz etkilerine rastlanmadığına ilişkin kaynakların mevcut olduğunu vurgulamıştır. Çalışmalarında, fasulye bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla LBA 4404 ve GV2260 p35S GUS-INT genlerini aktararak herbisitlere dayanıklı bitkiler elde etmek amaçlanmıştır. Fasulye bitkisinin tohum, olgunlaşmış embriyo ve plumula eksplantlarından yüksek oranda rejenerasyon sağlamıştır. Akman-98 çeşidinin apikal meristem eksplantlarından GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattını kullanılarak 3 adet GUS pozitif bitkisi elde etmiş ve *A. tumefaciens*'in GNA, genlerini taşıyan bakteri hatları kullanılarak yapılan gen aktarımı çalışmalarından bitki elde etmiştir.

**Sağlam ve ark. (2009);** *In vitro* koşullarda Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisine yüksek BAP ön muamelesi ve sonikasyon metodu ile gen aktarımı çalışmasında; Karacaşehir-90 ve Akman-98 fasulye çeşitlerinin tohumları *in vitro* koşullarda steril edildikten sonra embriyoları çıkartılmış ve 10 mg/l BAP içeren MS besin ortamında 10 gün bekletmişlerdir. Embriyolardan gelişen plumula eksplantaları 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.00 mg/l BAP içeren besin ortamlarına aktararak 1 ay sonra sürgün rejenerasyonu gözlemlenmişlerdir. Sürgün yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçlar 1mg/l BAP ortamında Karacaşehir-90 çeşidinden elde etmişlerdir. Eksplantlar 40, 60, 80, 100, 120 sn süre ve 6000 rpm hız ile sonikasyona tabi tutmuşlardır. Optimizasyonu sağlanmış eksplantlar *Agrobacterium tumefaciens*'in Pmh66: SN 19 (cryIBa/cryIIa) hibrid geni taşıyan g10 bakteri hattı ile muamele etmişler ve 50 mg/l kanamisin ile 1,0 mg/l BAP seleksiyon ortamına almışlardır. Sonuç olarak; elde edilen bitkicikler 2mg/l IBA köklendirme ortamında köklendirilerek, transgenik aday bitkiler iklim dolabında dış şartlara alıştıırılarak tam olgunluğa gelenlerden tohum elde etmişlerdir.

**Çevrim (2007);** Fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) partikül bombardımanı (Biyolistik) yöntemiyle gen aktarımının optimizasyonu çalışmasında; rejenerasyon şartlarının optimizasyonu bitkilerde genetik transformasyonun başarısı için gerekli olduğunu vurgulamışlardır. Baklagillerde bitki rejenerasyonu zor olması ve

özellikle dane baklagillerin inatçı olduğu düşünmektedirler. Rejenerasyona en iyi cevap veren genotipi tespit etmek amacıyla doku kültürü çalışmalarında, 9 farklı Türk fasulye çeşidi kullanmışlardır. Doku kültürü çalışmalarında standart MS-Gamborg ortamı kullanmışlardır. Kazein, glutamin ve STS-AgNO<sub>3</sub>'ün doku kültürü ortamına eklenmesi rejenerasyon şartlarını önemli derecede iyileştirmişlerdir. Çeşitli sitokninlerin farklı konsantrasyonlarını ve onların çeşitli kombinasyonları embriyonik uçlardan çoklu sürgün uyarımı için kullanmışlardır. Test edilen sitokninler arasında 5mg/L BAP, 0.5mg/L TDZ, 1 mg/L Kinetin, 0.5 mg/L zeatin ribosid kombinasyonu çoklu sürgün uyarımı için ideal miktar olarak bulmuşlardır. Partikül bombardımanı fasulyede gen aktarımı metotları arasında yegâne başarı sağlamış yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Türkiye'de yaygın tarımı yapılan fasulyede; transformasyon etkinliğini optimize etmek için üç farklı basınç atışı, üç farklı negatif çember basıncı, iki farklı mikroprojektil uçuş mesafesi, iki farklı transfeksiyon ve DNA sarıcı ajan, iki farklı mikroprojektil ve iki farklı DNA konsantrasyonu denemişlerdir. Akman kültüvarı rejenerasyona en iyi cevabı verdiği için dolayı transformasyon çalışmaları boyunca kullanmışlardır. Denemeler arasındaki önemli farkları belirlemek için ANOVA uygulamışlardır.

**Estrada-Navarrete ve ark. (2006);** Fonksiyonel Genomik için bir Aracı olan: *Phaseolus* spp.'nin *Agrobacterium rhizogenes* Dönüşümü çalışmalarında; *Agrobacterium rhizogenes*'i kullanan hızlı, tekrarlanabilir ve etkili bir dönüştürme prosedürü *Phaseolus vulgaris* L. yabani katılımları, yerel çeşitleri ve çeşitler için geliştirilen, cins *Phaseolus* ait diğer üç türler için: *P. coccineus*, *P. lunatus* ve *P. acutifolius*. Normal belirli nodüller *Rhizobium tropici* ile inoküle olduğu zaman transgenik kökleri azot verimli olarak aşılınmış ve standart kökleri düzeltmesine neden olduğunu bulmuşlardır. İşlevsel genomik programlar için *Phaseolus* cinsi *A. rhizogenes* kaynaklı saçak kök transformasyonu, kök fizyolojisi ve kök metabolizması etkileşimleri üzerinde durmuşlardır.

**Faria ve ark. (2006);** Transgenik fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) hattının mutasyona uğramış bir rep geni ifadesinin fasulye altın mozaik virüsüne kısmi direnci çalışmasında; fasulye altın mozaik virüsü (BGMV) rep geni virüs replikasyonu için

gerekli olduğunu ve nükleosit trifosfat amino asit kodon değişikliği olan bir mutasyon geçirmiş, rep geni (NTP) bağlanma motifi D262R oluşturmuşlardır. *Phaseolus vulgaris* mutasyona uğramış ve *bar* genleri içeren bir vektör elde etmişlerdir. Sekiz kuşak genomik DNA ile Southern blot analizi aynı şekilde entegre temsilcisi geninin iki kopyasını bulduğunu gözlemlemişlerdir. RT-PCR analizi ile *bar* ve temsilcisi genleri transkript varlığını ortaya çıkarmışlardır. Mutasyona uğramış Rep proteini, transgenik bitkilerde Western blot analizi ile tespit edilebilir miktarlarda mevcut olduğu sonucuna varmışlardır.

**Gürlek (2006);** *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Nohut Geveni(*Astragalus cicer* L.)'ne Gen Aktarımı çalışmalarında; nohut gevenine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile dayanıklılık sağlamayı amaçlamışlardır. Öncelikle adventif sürgün rejenerasyon oranını yükseltmek için *in vitro*'da hipokotil ve kotiledon eksplantları değişik oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, Kinetin, TDZ ve IBA) içeren MS besin ortamlarında kültüre almıştır. Çalışma sonucunda; en yüksek indirek adventif sürgün rejenerasyonu oranı (% 53,3) ve eksplant başına düşen sürgün sayısının (3.3) , 1.0-2.0 mg/l IBA içeren MS besin ortamında ve hipokotil eksplantlarından elde etmiştir. Gen aktarım çalışması kısmında; pAoPR GUS-INT, pPR1a GUS ve p35S GUS-INT vektörlerini içeren GV2260 *A. tumefaciens* hatları ile hipokotil eksplantları değişik inokulasyon ve ko-kültivasyon metodları ile inoküle ve ko-kültive etmiştir. Araştırma sonuçlarına göre; tüm bakteri hatları için en uygun inokulasyon süresinin 30 dk, ko- kültivasyon süresinin ise 48 saat ve en uygun ko-kültivasyon ortam fazının ise sıvı rejenerasyon ortamı olduğunu belirtmiştir. Seçici ortamlarda gelişen kalluslardan elde edilen sürgünler seçici köklendirme ortamında (1/2 MS +0.2 mg/l IAA) köklendirmiştir. Yapılan histokimyasal GUS analizi sonucunda köklenen bitkiciklerin tamamının GUS negatif olduğunu gözlemlemiştir.

**Mrabet ve ark. (2006);** Fasulyede *Agrobacterium* suşları tarafından kök nodülleri izole edilerek özellikle *Rhizobium gallicum* yumrulanmasını azaltma çalışmalarında; daha önceki çalışmalarında Non-nodüllerin *Agrobacterium* suşları fasulye kök nodüllerinin kolonizelerinin mümkün olduğunu göstermişlerdir. Hem azot



tutucu bakteriler ve hmede enfekte nodülleri *Agrobacterium* ile birarada olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında Tunus'ta farklı coğrafi ve agronomik bölgelerden menşeli toprak örneği fasulye kök nodülleri ile daha önce izole edilmiş *Agrobacterium* suşların karışımı ile aşılamaştır. Fasulye nodülleri ve bitkisel büyüme üzerinde önemli bir etki gözlemlememişlerdir.

**Liu ve ark. (2005);** Barbunya fasulyesinin (*Phaseolus vulgaris* L.) *Agrobacterium* aracılığıyla lea geni ile transformasyonunda sonikasyon ve vakum infiltrasyonu kombinasyonunun kullanılması çalışmalarında; barbunyada doku kültürü yöntemleri olmadan etkili bir gen aktarım sistemi yapabilmek için sonikasyon ve vakum infiltrasyonunu kullanarak, *Agrobacterium*-aracılı transformasyonu geliştirmişlerdir. Bu yaklaşımla *Brassica napus*'tan bir grup 3 lea (geç embriyogenesis) protein geni içeren transgenik barbunya fasulyesi üretmişlerdir. Transformasyon yöntemleri sonucunda 18 kombinasyonun arasından *Agrobacterium* aracılıklı 5 dakikalık sonikasyon ve 5 dakikalık vakum infiltrasyonu ile kombinasyonda en uygun protokol olmuştur. Transgenik barbunya fasulyesi bitkileri, tuz ve su eksikliği stres koşulları altında büyüme yeteneği sergilediğini gözlemlemişlerdir. Artan tolerans ile birlikte kuraklık stresinin neden olduğu hasar belirtilerinin gecikmeli olarak gelişimini görmüşlerdir. Yüksek lea gen ekspresyon seviyesine sahip transgenik çizgiler, düşük ekspresyon seviyesine sahip olanlardan daha yüksek stres toleransı gösterdiğini görmüşlerdir. Transgenik barbunya fasulyesinin stres toleransı lea gen ekspresyon seviyeleri ile gen entegrasyon sonuçlarına göre daha iyi korele olduğunu bildirmişlerdir. Hem ultrasonik hem de vakum infiltrasyon yardımcı, *Agrobacterium* aracılı transformasyon kullanılarak transgenik barbunya fasulyesi üretimi hakkında daha önce yapılmış herhangi bir sonucun bulunamadığını belirtmişlerdir.

**Sağlam ve ark. (2005);** Fasulye bitkisine *In planta* koşullarda gen aktarımı çalışmasında in planta gen aktarımı yönteminde *in vitro* gen aktarımı yöntemi kadar yaygın kullanılmakta fakat müdahale edilemediği bazı çevresel faktörlerin olumsuz etkilerinden dolayı çalışma sonuçlarının beklenen kadar başarılı olmadığını belirtmişlerdir. Fasulyenin Aras, Eskişehir-855, Şehirli-90 çeşitlerinin tohumları

tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak ekmişler ve akşam güneş batmadan yarım saat önce her üç çeşidin açılmamış ve açılmak üzere olan çiçeklerini el ile açıp *Agrobacterium tumefaciens*'in nononkogenik GV2260, EHA105, LBA4404, WIP(AOPR1) bakteri hatları ile aşılama ve aşılama her bir çiçek Aydınger kağıtları ile dışarıdan tozlaşmayı engellemek amacı ile muhafaza altına almışlar ve etiketlemişlerdir. Bakla oluşumuna kadar bitkiye gerekli bakımı yapmışlar ve hasat zamanı olgun baklaları hasat ederek baklalar içerisindeki tohumlar iklim odasında saksılara ekmişler ve gelişen bitkiler ile GUS testi yapmışlar ve GUS testi sonucunda in planta polen yoluyla *Agrobacterium*'un nononkogenik hatlarıyla transformasyon gerçekleştiremediğini görmüşlerdir. *A. Tumefaciens*'in A281 ve *A. rhizogenesis*'in 15834 onkogenik hatları seyreltilmeden tarladaki bitkilerin üst kısımlarının koltukaltı bölgelerine enjektör yardımıyla enjekte etmişler ve bu kısımlarda üzerine hangi bakteri hattı ile enjekte edildiği yazılmış olan etiketler ile etiketlemişlerdir. *A. Tumefaciens*'in A281 hattı ile gövdelerin alt kısmına yaptıkları aşılama hiç transformasyon gözlenmemiş fakat azda olsa tümör oluşumu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde *A. rhizogenesis*'in 15834 hattı ile yapılan aşılama sonuç gözlenmezken üst kısımlarda yaklaşık % 20 oranında kök yerine tümör oluşumu gözlemlemişlerdir.

**Sağlam ve ark. (2005);** *In vitro* koşullarda fasulye bitkisine dört yapraklı aşamada transformasyon çalışmalarında; Fasulyenin Aras ve Eskişehir-855 çeşitleri laboratuvar koşullarında çimlendirilmiş ve dört yapraklı döneme geldiklerinde gövdeleri *Agrobacterium tumefaciens*'in onkogenik A281 hattı ve non-onkogenik GV2260, EHA105 hatları ile aşılama sonucunda A281 ile muamele edilmiş Aras ve Eskişehir-855 çeşitlerinde tümörler oluşumu görmüşlerdir. Kökler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisine rastlamamışlar ve köklerin normal gelişimine devam ettiğini görmüşlerdir. Aynı şekilde her iki çeşidin *A. tumefaciens*'in non-onkogenik GV2260 ve EHA105 hatları ile aşılama sonucunda bitkilerin yapraklarında mozaiklik ve sararma görülmüş ve bunları GUS testine tabi tutmuşlar fakat GUS pozitif sonuçlar elde edilememiştir. Bitkiler dört yapraklı aşamada iken *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile de aşılama ve bitkilerin gövdelerinde kökler gözlemlemişlerdir. Bakteri aşılama

kontrol bitkilerinde köklenme görmemişlerdir. *A. tumefaciens*'in onkogenik hatları ile bitkilerde tümör ve kök oluşumu *in planta* koşullarda gen aktarılabileceğini göstermektedirler. Bu çalışmanın sonucunda; fasulye bitkisinde genetik mühendisliği için gerekli alt yapıyı oluşturmakta olduğunu, onkogenik ve işaret genlerinin aktarılması sırasında kullanılan yöntem ilerde tarımsal ilaçlara, soğuğa, hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin fasulye bitkisine aktarılması yolunda da izlenebilir bir yöntem oluşturacağı sonucuna varmışlardır.

**Sağlam (2004);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) de doku kültürü ve *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı çalışmasında; Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Aras, Eskişehir-855 ve Şehirali-90 çeşitlerinin jenerasyon, köklendirme, *in planta* ve *in vitro* koşullarda *Agrobacterium*' un *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenesis*' in değişik suşlarını kullanarak gen aktarımı kabiliyetini incelemek amacı ile yürütmüştür. Adventif sürgün rejenerasyonu amacıyla söz konusu üç fasulye çeşidinden alınan apikal meristem, petiol, kotiledon boğum ve hipokotil eksplantları 2,4-D ve kinetin içeren MS besin ortamlarında kültüre almış fakat petiol ve hipokotilden hiç sürgün rejenerasyonu gözlenmemişken, apikal meristem ve kotiledon boğum eksplantlarından az sayıda sürgün gözlemlenmiştir. Sürgün gelişimini hızlandırmak amacıyla 0.1 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ortamına alt kültüre almış fakat gelişme kaydedememiştir. Sürgün rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyolar 0.05-0.15 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alırken, köklenmeyi sağlamak için rejenere olan sürgünleri 0.00, 0.25, 0.50, 1.00 2.00 mg/l IBA içeren MS besin ortamına almış ve IBA oranının artışıyla paralel olarak köklenmenin de arttığını gözlemlenmiştir.

**Aragao ve ark. (2002);** Herbisit Glufosinat Amonyuma Toleranslı Transgenik Fasulye çalışmalarında; herbisit glufosinat amonyum karşı tolerans sağlayan *Streptomyces hygroscopicus*'dan (Jansen) Labeda & Lyons kodlu fosfinotrisin asetiltransferaz (PAT), gelen *bar* geni ile Brezilya'da, *Phaseolus vulgaris* L. (kuru fasulye) verimliliğinde bazı bölgelerde düşüş olduğunu belirtmişlerdir. En sınırlayıcı faktörlerden birisinin yabancı ot ile mücadele olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma, yaz sezonu boyunca yabancı ot kontrolü kolaylaştıracak glufosinat amonyum dirençli

transgenik fasulye bitkileri, elde etme olasılığını değerlendirmek amacıyla yapmışlardır. Biyolistik işlemi, kuru fasulye içine bu genin eklenmesi için kullanmışlar ve entegrasyon southern blot analizi ile teyit edilmiştir. İki transgenik olaylar, PHV119 ve PHV122 bitkiler tolere olduğunu göstermişlerdir.

**De Carvalho ve ark. (2000);** İnce Hücre Katmanı Testi ve Gümüş Nitrat Kullanılarak Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Tam Verimli Bitki Rejenerasyonu çalışmalarında; *Phaseolus vulgaris* L. enine ince hücre tabakası (tTCL) yöntemini kullanarak, ticari öneme sahip fasulye (ara kallus olmadan) bitkisinde hızlı ve yüksek frekanslı bir yöntem olan doğrudan sürgün rejenerasyonu optimize etmek için tasarlanmıştır. Sürgün gelişimi % 100 iyi gelişmiş sürgünler giden 10 µM BAP ve 10 µM AgNO<sub>3</sub> tarafından geliştirilmiştir. Rejenere bitkiler adeta fertil tipi bitkiler haline geldiğini bildirmişlerdir.

**Aragão ve ark. (1996);** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ko-transgenik yabancı genlerin kalıtım parçacık bombardımanı ile değiştirilmesi çalışmasını gerçekleştirmişler ve bu çalışmada partikül bombardımanının yanı sıra PCR ve Southern Blot hibridizasyonu entegrasyonu sağlamışlardır.

**Brasileiro ve ark. (1996);** Fasulye ve Tepary Fasulye suşlarının *Agrobacterium* spp. Aracılığı ile Duyarlılık ve İyileştirilmesinde Mikroprojektil bombardımanı ile *Agrobacterium* transformasyonu çalışmalarında; *Agrobacterium* aracılığı ile fasulye ve tepary fasulye transformasyonu için etkili bir protokol geliştirmek amacıyla, sekiz *Agrobacterium tumefaciens*, altı *A. rhizogenes* suşları genotipleri duyarlılığını test etmişlerdir. *Agrobacterium* ırklarının hastalık oluşturma etkisi genotipe bağlı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, fasulye çeşidinde görülen tümörler tepary fasulye çeşitlerinin gözlenenden daha büyük olduğunu bildirmişlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi, *A. tumefaciens* ile aşılama kaynağından kaynaklanan tümör T-DNA'nın varlığını üç fasulyede doğrulamışlardır. *P. vulgaris* cv. apikal meristemler Jalo tungsten mikroprojektiler ile bombardımanı ve *A. tumefaciens* (Ach5) doğal tip suşu ile daha sonra aşılama yapmışlardır. Bir ay sonra, eksplantlar tümör oluşumu (% 70, % 50) yüksek

sıklıkta olduğunu göstermişlerdir. Benzer bir şekilde, bombardıman meristemler, bir *A. tumefaciens* (LBA4404 / p35SGUSINT) ile aşılandığında partikülsüz suşu, bunların % 44'ü, katılan genin ekspresyonunu gösterdiğini ve GUS aktivitesinin önemli kesimleri göstermekte olduğunu belirtmiştir. Kullanılan yöntemin *Agrobacterium* sistemini stabil doğrudan dönüştürülmüş apikal meristem bitkilerinin rejenerasyonu ile fasulyeye gen aktarımı için umut verici bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

**Ishimoto ve ark. (1996);** Fasulyede  $\alpha$ -amilaz inhibitörünün Bruchidae dirençli transgenik azuki fasulyesi tohumu üretimi hedeflemiştir. Bu çalışma ile *Callosobruchus chinensis*, *C. maculatus* ve azuki fasulye tohumlarında hasat sonrası önemli hasar oluşturan Bruchidae böceklerinin fasulye tohumları içinde mevcut  $\alpha$ -amilaz inhibitörü ( $\alpha$ AI) kullanılarak yeni çeşitler geliştirmek *in vitro* kültürü oluşturmak, gen transformasyonu, gen haritalama ve genom analizi çalışmaları hedeflemiştir.

**Dillen ve ark. (1995);** *Phaseolus vulgaris* tohum dokuları elektroporasyon aracılığı ile DNA analizi çalışmalarında; DNA elektroporasyon ile fasulyenin bozulmamış embriyonik eksenlerini analiz etmişlerdir. SS-glukuronidaz raportör geninin sentezlenmesi spot benzeri bir şekilde hipokotil ve epikotil dokusunda gözlemlenmiştir. Plazmid DNA doğrusallaştırılması büyük geçici ekspresyon seviyelerini arttırmış olduğu sonucuna varmışlardır. Tüm *P. vulgaris* dokuları için de olduğu gibi çok sayıda büyük tohumlu baklagil türünün içindeki eksplantlar için, kültür bitkileri *S.vulgaris* test prosedürü embriyonik akslarında başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

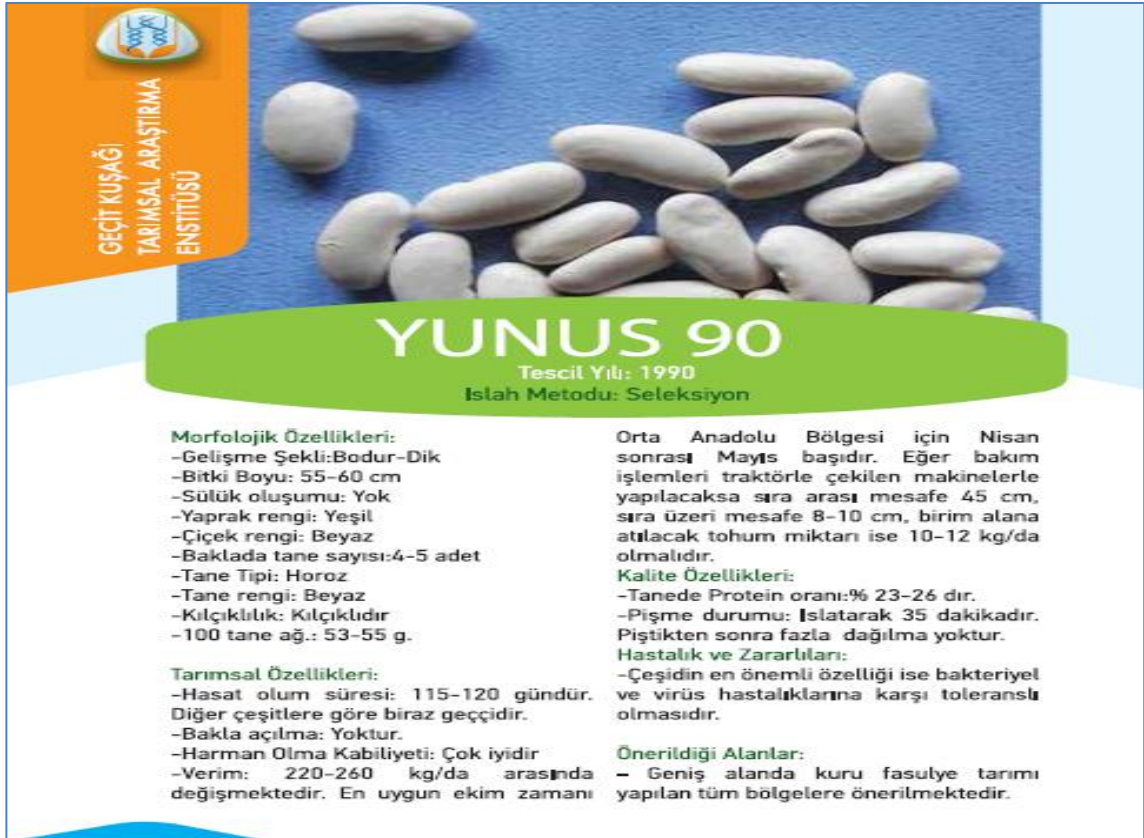
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak kullanılan Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerine ait tohumlar Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü/Eskişehir'den temin edilmiştir.

Yunus-90; Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1990 yılında seleksiyon yöntemi kullanılarak ıslah edilmiş bir fasulye çeşididir. Gelişme şekli bodurdik, bitki boyu 55-60 cm, yaprak rengi yeşil, çiçek rengi beyaz, baklada tane sayısı 4-5 adet, tane tipi horoz, tane rengi beyaz, kılçıklı, sülük oluşumu yok, tanede protein oranı % 23-26 ve 100 tane ağırlığı 53-55 gr'dır.



**GEÇİT KUŞAĞI**  
**TARIMSAL ARAŞTIRMA**  
**ENSTİTÜSÜ**

**YUNUS 90**  
Tescil Yılı: 1990  
Islah Metodu: Seleksiyon

**Morfolojik Özellikleri:**  
-Gelişme Şekli: Bodur-Dik  
-Bitki Boyu: 55-60 cm  
-Sülük oluşumu: Yok  
-Yaprak rengi: Yeşil  
-Çiçek rengi: Beyaz  
-Baklada tane sayısı: 4-5 adet  
-Tane Tipi: Horoz  
-Tane rengi: Beyaz  
-Kılçıklılık: Kılçıklıdır  
-100 tane ağırlığı: 53-55 g.

**Tarımsal Özellikleri:**  
-Hasat olum süresi: 115-120 gündür.  
Diğer çeşitlere göre biraz geççidir.  
-Bakla açılma: Yoktur.  
-Harman Olma Kabiliyeti: Çok iyidir  
-Verim: 220-260 kg/da arasında değişmektedir. En uygun ekim zamanı

**Orta Anadolu Bölgesi için Nisan sonrası Mayıs başıdır.** Eğer bakım işlemleri traktörle çekilen makinelerle yapılacaksa sıra arası mesafe 45 cm, sıra üzeri mesafe 8-10 cm, birim alana atılacak tohum miktarı ise 10-12 kg/da olmalıdır.


**Kalite Özellikleri:**  
-Tanede Protein oranı: % 23-26 dir.  
-Pişme durumu: Islatarak 35 dakikadır.  
Piştikten sonra fazla dağılma yoktur.

**Hastalık ve Zararlıları:**  
-Çeşidin en önemli özelliği ise bakteriyel ve virüs hastalıklarına karşı toleranslı olmasıdır.

**Önerildiği Alanlar:**  
- Geniş alanda kuru fasulye tarımı yapılan tüm bölgelere önerilmektedir.

Şekil 3.1. Yunus-90 fasulye çeşidine ait özellikler

Göynük-98; Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1998 yılında seleksiyon yöntemi kullanılarak ıslah edilmiştir. Gelişme şekli bodur-dik, bitki boyu 45-55 cm, yaprak rengi yeşil, çiçek rengi beyaz, baklada tane sayısı 3-5 adet, tane tipi horoz, tane rengi beyaz, kılçıklı, sülük oluşumu yok, tanede protein oranı % 23-26 ve 100 tane ağırlığı 53,5-55 gr'dır.



**GEÇİT KUŞAĞI**  
**TARIMSAL ARAŞTIRMA**  
**ENSTİTÜSÜ**

## GÖYNÜK-98

Tescil Yılı: 1998  
Islah Metodu: Seleksiyon

**Morfolojik Özellikleri:**  
-Gelişme Şekli: Bodur-Dik  
-Bitki Boyu: 45-55 cm  
-Sülük oluşumu: Yoktur.  
-Çiçek rengi: Beyaz  
-Yaprak rengi: Yeşil  
-Baklada tane sayısı: 3-5 adet.  
-Tane Tipi: Horoz  
-Tane rengi: Beyaz  
-100 tane ağırlığı: 53.5-55.0 g.

**Tarımsal Özellikleri:**  
-Hasat olum süresi: 110-120 gün olup, biraz geççidir.  
-Tane Dökme: Yoktur.  
-Harman Olma Kabiliyeti: İyidir.  
-Verim: 220-250 kg/da arasında değişmektedir. En uygun ekim zamanı Orta Anadolu Bölgesi için Nisan sonrası Mayıs başıdır. Eğer bakım işlemleri traktörle çekilen makinelerle yapılacaksa sıra arası mesafe 45 cm, sıra üzeri mesafe 8-10 cm, birim alana atılacak

tohum miktarı ise 10-12 kg/da olmalıdır. Çıkış ve çiçeklenme dönemlerinde 1-2 sulama, çiçeklenme döneminden sonra ise 10-15 gün arayla kök bölgesi ıslatılacak kadar fazla su verilmelidir. Yapılan denemeler sonunda en yüksek tane verimi drenajı iyi tarlalarda yapılan karık usulü sulamadan elde edilmiştir.

**Kalite Özellikleri:**  
-Tanede Protein oranı: % 23-26 dir.  
-Pişirme durumu: ıslatarak 34-37 dakikadır.

**Hastalık ve Zararlıları:**  
-Virüs ve bakteri hastalıklarına toleranslıdır.

**Önerildiği Alanlar:**  
-Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup, geniş alanlarda tarla tarımı şeklinde kuru fasulye üretimi yapılan tüm bölgelere önerilmektedir.

**Şekil 3.2.** Göynük-98 fasulye çeşidine ait özellikler

Önceler-98; Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1998 yılında seleksiyon yöntemi kullanılarak ıslah edilmiştir. Gelişme şekli bodur-dik, bitki boyu 40-50 cm, yaprak rengi yeşil, çiçek rengi açık leylak, baklada tane sayısı 3-5 adet, tane tipi barbunya, tane rengi bej zemin üzeri alacalı, bakla şekli düz ucu kıvrık, sülük oluşumu yok ve tanede protein oranı % 23-26 ve 100 tane ağırlığı 40,5- 41 gr'dır.



Şekil 3.3. Önceler-98 fasulye çeşidine ait özelliklikler

### 3.1.2. Besin Ortamı, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Kültür Koşulları, Sterilizasyon

Denemelerde 30 gr/l sukroz (Duchefa), 5 gr/lt agar (Duchefa) ile katılaştırılmış MS (Murashige and Skoog, 1962 / Duchefa) besin ortamı kullanılmıştır (Tablo 3.4., Şekil 3.4.). Ortamlar distile saf su ile hazırlanmıştır.



**Tablo 3.1.** Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları (Sağlam, 2009)

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
KNO <sub>3</sub>	1900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	Nicotinic Acid	0.5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	Pyrotinic Acid	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	Thiamine-HCl	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	Glycine	2
		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	27.85		
		Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.25		

Denemelerde MS ortamına farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, NAA, IAA) ilave edilmiştir. Tüm denemelerde besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlanmıştır. Otoklavda 104 kPa basınç altında 121 °C'de 20 dk tutularak besin ortamlarının sterilizasyonu sağlanmıştır. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonları üretici firmanın tarif ettiği gibi gerekli çözücülerle çözüldükten sonra saf su ile istenilen miktarda ve oranda hazırlanarak 4 °C'de 3 ay saklanmıştır.



**Şekil 3.4.** MS besin ortamında kullanılan kimyasallar

Tüm kültürler beyaz floresan ışığında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24±1 °C’de iklim odasında tutulmuştur. İklim odası şartları ise; % 50 nem de ve 18 000 watt ışık şiddetindedir.

Sterilizasyon aşamaları ve bütün doku kültürü işlemleri laminar flow biyogüvenlik kabini içinde gerçekleştirilmiştir. Her muamele için içinde 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü magenta kapları (GA-7) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cam petri kutuları 160 °C’de 1.5 saat etüv içerisinde steril edilmiştir. Kullanılan plastik magenta kapları ve beherler, ağızları kapatılarak otoklav içerisine yerleştirilip 121 °C’de 20 dk steril edilmiştir (Şekil 3.5.).

**Tablo 3.2.** Denemelerde kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklama koşulları (Khawar vd, 2004)

BBD	Çözücü	Seyreltme sıvısı	Stok miktarları	Toz halde saklama sıcaklığı (°C)	Stok solüsyon saklama sıcaklığı (°C)	Otoklav (O)- Filtre (F) ile sterilizasyon	Kaynak
<b>Oksinler</b>							
NAA	1N NaOH	Su	1 mg/ml	OS	+4	O	Duchefa
IAA	1N NaOH	Su	1 mg/ml	-0		O/F	Duchefa
<b>Sitokininler</b>							
BAP	1N NaOH	Su	1 mg/ml	OS	+4	O	Duchefa

Denemelerde kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonu olarak hazırlandıktan sonra, yukarıda bahsedilen saklama koşullarında 3-5 ay muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.5.** Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemelerin görüntüleri (a: cam petri kabı, b: otoklav, c: magenta kabı, d: etüv, e: laminar flow biyogüvenlik kabini)

### 3.1.3. Bakteri Materyali

Gen aktarımı denemelerinde bakteri materyali olarak 1 adet markör geni, 1 adet *bar* geni ve 11 adet farklı herbisitlere dayanıklılık genleri taşıyan toplam 13 farklı *A. tumefaciens* bakteri hattı kullanılmıştır. Kullanılan bütün bu bakteri hatları bitkisel seleksiyon amaçlı kanamisine dayanıklılığı sağlayan NPT-II ve GNA lektin genini taşıyan LBA 4404'ü 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 (Sağlam, 2009).

### 3.1.4. Antibiyotikler

Bakteri büyütme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler (0.44  $\mu$ ) kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40–45 °C'ye düşmüş olan ortamlara ilave edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'de verilmiştir.

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

Antibiyotikler	Kullanım Oranları(mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama Kosulları (°C)
Rifampisin	100	25	metanol	-20
Kanamisin monosülfat	100	50	Su	-20

LBA4404 bakteri hatları büyütülürken ortama 50 mg/l Rifampisin, 50 mg/l Kanamisin monosülfat ve GUS genini taşıyan GV2260 hatları büyütülürken ise ortama 25 mg/l Rifampisin ve 50 mg/l Kanamisin monosülfat eklenmiştir. Rifampisin metanol, Kanamisin monosülfat ise su ile çözüldükten ve filtre sterilizasyonundan sonra stok çözeltiler -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

**Tablo 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)
Kanamisin monosülfat	50	50	Su	-20
Augmentin*	100	500	Su	-20

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

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Tohum Canlılık Testi

Bitki tohumlarının canlılık tespiti için 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit (TTC) yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada fasulyenin Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 çeşidinde tohumlar 24 saat su içinde ve oda sıcaklığında (24±1 °C) bekletilmiştir. Tohumlar % 10 NaOCl konsantrasyonunda 10 dk steril ettikten sonra 3x5 dk durulanmış; tohum kabukları çıkarılarak, 1µg/µl oranda hazırlanmış trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içine daldırılarak 24 saat sonra tohumların canlılıkları kontrol edilmiştir.

### 3.2.2. Fasulye Tohumlarının *In vitro* Koşullarda Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

Yunus-90, Göynük-98, Önceler-98 fasulye çeşitlerine ait tohumlar, sterilizasyon aşamasından önce itina ile seçilerek sağlıklı tohumlar kullanılmıştır. Çalışmada hiçbir şekilde zedelenmiş, çürük veya hasta olan tohumlara yer verilmemiştir. Her üç fasulye çeşidinin tohumlarına, yüzey sterilizasyonu amacı ile ticari çamaşır suyunun (Aktif klor içeriği % 5'lik Ace®) farklı dozları (% 5, % 10, % 25, % 50) ve farklı süreler (5, 10, 20 dk.) kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 3'er kez 5 dk durulanmıştır. Steril edilen tohumlar steril magenta kapları içerisinde % 3 sukroz içeren ve % 0.5 agar ile katılaştırılan MS besin ortamında  $24\pm 1$  °C'de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyodunda iklim dolabında çimlendirilmiştir.

### 3.2.3. Filtre Kâğıtlarının Fasulye Tohumlarının Çimlenmesine Etkisi

Fasulye tohumlarının çimlenmesine filtre kağıdının etkisi 2 şekilde incelenmiştir. İlki filtre kağıtlarının MS besin ortamı üzerine yerleştirilmesi, diğeri ise filtre kağıtlarının MS besin ortamı olmaksızın magenta kabı içerisine yerleştirilmesi şeklinde olmuştur. Filtre kâğıtları yaklaşık 5 tohumun çimlenmesine izin verecek büyüklükte kareler halinde kesilerek etüvde 160 °C 2 saat steril edilmiştir. Uygulama basamaklarına göre laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde fasulyenin üç çeşidine ait tohumlar steril edilerek, ekimleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4. Fasulyede Rejenerasyon Çalışmaları

#### 3.2.4.1. Olgunlaşmış embriyo kültürü

Steril edilen tohumlar stereril saf su içinde 24 saat bekletildikten sonra tohumlardan embriyolar izole edilmiştir. Elde edilecek olan olgunlaşmış embriyoların BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) ve NAA (0.00 ve 0.25 mg/l)'in farklı dozlarında sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir.

#### 3.2.4.2. Apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Steril edilen tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş ve 7-10 günlük bitkiciklerin apikal meristemleri izole edilmiştir. Elde edilen apikal meristem eksplantlarının BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) ve NAA (0.00 ve 0.25 mg/l)'in farklı dozlarında sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir.

#### 3.2.4.3. Olgunlaşmış embriyo kültürüne ön muamele uygulamasının etkisi

Steril edilen tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletildikten sonra tohumlardan olgunlaşmış embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar yüksek dozda (10 mg/l IAA) oksin içeren bir ortamda 5 gün bekletilmiş ve elde edilen plumula eksplantlarının BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir.

#### 3.2.4.4. Apikal meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ön muamele uygulamasının etkisi

Steril edilen tohumlardan elde edilen 7-10 günlük bitkiciklerin apikal meristemleri yüksek dozda (10 mg/l IAA) oksin içeren bir ortamda 5 gün bekletilmiş ve elde edilen plumula eksplantlarının BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir.

#### 3.2.5. *In vitro* Koşullarda Sürgünlerin Köklendirilmesi

*In vitro* koşullarda gelişen fasulye sürgünleri 2-3 cm uzunluğa geldiğinde dip kısımlarından kesilerek steril magenta kutuları içinde 2.0 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirmeye alınmıştır (Sağlam, 2005). *Bar* geni taşıyan transgenik adayı bitkilerin köklendirilme ortamına ilave olarak 500 mg/l Agumentin ve 50 mg/l kanamisin monosülfat eklenmiştir.

#### 3.2.6. Köklenmiş Fasulye Bitkiciklerinin Dış Şartlara Alıştırılması (Aklimatizasyon)

Doku kültürü ile elde edilen köklenmiş bitkiler, dış ortama alıştırmak amacıyla steril torf içeren 15 cm'lik saksılara aktarılmış ve üzerleri yaklaşık 1 hafta şeffaf poşet ile kapatılarak, iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İklim odasında  $24 \pm 1$  °C, 3000 lüks ışık, 16 saat ışık fotoperiyodu ve % 50 nem sağlanmıştır. Burada gelişen bitkilerden tohum elde edilmiştir.

### 3.2.7. Bakteri Kültürlerinin Saflaştırılması, Büyütülmesi, Kısa ve Uzun Süreli Korunması

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 büyütme 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. *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 büyütülmüş 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.

### 3.2.8. *Agrobacterium tumefaciens*'in bar Geni Taşıyan LBA 4404 pRGG bar Hattı ile *In vitro* Koşullarda Fasulyeye Gen Aktarım Çalışmaları

Bu çalışmada gen aktarımı amacıyla fasulyenin 3 çeşidine ait tohumlar ve *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı kullanılmıştır. Steril edilen tohumlar içinde 1 mg/30 ml bakteri olan sıvı MS ortamında 30 dk. bakteri ile inokülasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon işleminden sonra ko-kültivasyon amacıyla içinde eksplantlar olan petri kapları 72 saat boyunca iklim dolabında 24 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra bakteri gelişimini önlemek için eksplantlar, steril saf su ile yıkanmış ve ardından 500 mg/l Augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında birkaç dk bekletilmiştir. Sadece gen aktarımı gerçekleşmiş olan eksplantlarda sürgün ve kök gelişimini sağlamak için seleksiyon ortamına 500 mg/l Augmentin ile birlikte 50 mg/l kanamisin monosülfat ilave edilmiştir. Elde dılecek olan transgenik aday bitkicikler dış koşullara alıştırıldıktan sonra, *bar* geninin bitki genomuna aktarılıp aktarılmadığını anlaşılabilmesi için; PCR Analizi değerlendirilmiştir.

3.2.8.1. *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ve GV2260 geni ile *in vitro* koşullarda fasulyenin olgunlaşmış embriyolarına gen aktarım çalışmaları

Bu çalışmada gen aktarımı amacıyla fasulyenin 3 çeşidi ve *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ve GV2260 geni kullanılmıştır. Steril edilen tohumlar 24 saat steril safsu içerisinde bekletilmiş daha sonra laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde olgunlaşmış embriyoları alınarak 1 ml bakteri içeren sıvı MS ortamında seyreltilmiş çözelti içerisinde 30 dk. bakteri ile inokülasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon işleminden sonra ko-kültivasyon amacıyla içinde eksplantlar olan petri kapları 72 saat boyunca iklim dolabında 24 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra varsa bakteri gelişimini önlemek için eksplantlar, steril saf su ile yıkanmış ve ardından 500 mg/l Augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında birkaç dakika bekletilmiştir. Sadece gen aktarımı gerçekleşmiş olan eksplantlarda sürgün ve kök gelişimini sağlamak için seleksiyon ortamına 500 mg/l Augmentin ile birlikte 50 mg/l kanamisin monosülfat ilave edilmiştir. Elde edilen transgenik aday bitkicikler dış



koşullara alıştırıldıktan sonra, *bar* geninin bitki genomuna aktarılıp aktarılmadığını anlayabilmek için; PCR analizi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.8.2. *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ve GV2260 geni ile *in vitro* koşullarda apikal meristem eksplantlarına gen aktarım çalışmaları

Bu çalışmada gen aktarımı amacıyla fasulyenin 3 çeşidi ve *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ve GV2260 geni kullanılmıştır. Steril edilmiş tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş ve 7-10 günlük bitkiciklerden elde edilen apikal meristem eksplantları içinde 1 mg/30 ml bakteri olan sıvı MS ortamında 30 dk. bakteri ile inokülasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon işleminden sonra ko-kültivasyon amacıyla içinde eksplantlar olan petri kapları 72 saat boyunca iklim dolabında 24 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra bakteri gelişimini önlemek için eksplantlar, steril saf su ile yıkanmış ve ardından 500 mg/l Augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında birkaç dk bekletilmiştir. Sadece gen aktarımı gerçekleşmiş olan eksplantlarda sürgün ve kök gelişimini sağlamak için seleksiyon ortamına 500 mg/l Augmentin ile birlikte 50 mg/l kanamisin monosülfat ilave edilmiştir. Elde edilen transgenik aday bitkicikler dış koşullara alıştırıldıktan sonra, *bar* geninin bitki genomuna aktarılıp aktarılmadığını anlayabilmek için; PCR analizleri yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.8.3. *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ve GV2260 geni ile *In planta* koşullarda makroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarım çalışmaları

Bu çalışmada gen aktarımı amacıyla fasulyenin 3 çeşidine ait tohumlar iklim odasında % 50'si torf, % 20'si toprak ve % 30'u perlitten oluşan karışım içeren saksılara alınarak ekilmiştir. Her saksıda 5'er tohum olacak şekilde denemeler 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Ayrıca her bir çeşit için kontrol olacak mok saksılarda da ekim yapılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* ve GV2260 gen hattı kullanılmıştır. Her birisi ayrı kaplar içerisine alınan fasulye bitkiciklerinin gen

aktarım çalışmasında 1 ml bakteri: 30 ml sıvı MS ortamında seyreltilmiş bakteri süspansiyon ortamı steril bir pamuk yardımı ile 7-10 günlük bitkilerin apikal meristemlerine uygulanmıştır. Uygulama işlemi sonrasında ise bitkilere yüksek bir nemli ortam sağlamak için şeffaf poşetler içerisinde saksı kaplarının üzerine geçirilerek gen aktarımı işlemi tamamlanmıştır. İklim odasında 24 °C'de 2 hafta sonrasında etiketlenmiş bölgelerin üstünde gelişen bitkilerden yaprak örnekleri alınmış ve *bar* geninin bitki genomuna aktarılıp aktarılmadığını anlayabilmek için DNA izolasyonu yapılarak; sonuçlar PCR analizi yardımı ile teyid edilmiştir.

### 3.2.9. Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi

Seçici rejenerasyon ortamında geliştirilerek köklendirilen transgenik adayı bitkilerin transgenik olup, olmadıkları aktarılan genlere göre PCR analizleri ile teyit edilmiştir.

#### 3.2.9.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

**a) DNA İzolasyonu:** İzolasyon için GeneAll marka DNA izolasyon kiti seti kullanılmıştır. DNA izolasyonu markanın belirttiği ekstraksiyon protokolüne göre yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu, taze yaprak dokuları 1.5 µl'lik kriyogenik tüplerde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. -20 °C'den alınan bitki örnekleri sıvı azotla muamele edilerek, steril çubuk yardımı ile hızlı bir şekilde ezilerek toz haline getirilmiştir. Daha sonra 350 µl Liziz Buffer A'dan her bir örneğe ilave edilerek 10-20 sn elle çalkalanmıştır. 50 µl Liziz Buffer B'den ve 20 µl RNase A ilave edilerek 1 dk vortekslenmiştir. Her bir örnek standı yerleştirilerek 10 dk boyunca 65 °C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. 130 µl Precipitasyon solüsyonu eklendikten sonra 5 dk toz haline getirilen buz içerisinde bekletilmiştir. Ardından 15.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan ependorf tüpündeki örnekler eğimli bir şekilde sallamadan çıkartılarak 500 µl'lik örnekleri mikropipet yardımı ile bitki partikülleri alınmadan sadece sıvı solüsyon kısmı alınarak yeni ependorf tüplerine alınmıştır. Daha sonra 400 µl Plant gDNA Binding solüsyon ve 400 µl'lik % 96'lık Ethanol eklenerek hafifçe çalkalanmıştır. Daha sonra ependorflardan alınan 600 µl'lik solüsyon spin column

tüplere aktarılarak 8.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Aynı işlem tekrarlanarak ependorflarda kalan son solüsyonda alınarak santrifüjlenmiştir. Wash Buffer-I 500 µl ilave edilip, 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Wash Buffer-II’den de 500 µl eklenerek 15.000 rpm’de 3 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra tüplerin alt kısımları boşaltılmış ve 100 µl Elution Buffer ilave edilerek, 10.000 rpm’de 1dk santrifüjlenmiştir. Süre sonunda tüpler çıkartılmış ve aynı işlem tekrarlanmıştır. Bu işlem basamağından sonra DNA saf bir şekilde elde edilmiştir. DNA örnekleri ana ve ara olarak ayırdıktan sonra -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

**b) Primer dizileri:** Gen dizilimleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tarımsal Biyoteknoloji biriminden; Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR tarafından temin edilmiştir. Transgenik bitkileri belirlemek amacıyla NPT-II, GUS genleri ile 35S promotor ve NOS terminatör dizileri PCR ile çoğaltılmıştır. Tablo 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. Bunun nedeni sürekli çözündürme ve dondurma esnasında oluşabilecek deformasyonu önlemek içindir. Primerler çalışmaya başlamadan önce 15.000 rpm’de 1.30 dk santrifüjlenmiştir. Ara stok hazırlanırken primerlerin ana stoklarına bakılarak solüsyonlar hazırlanmıştır. Primerlerin seyreltme oranı 1’e – 9 oranında ( 1 µl primer ve 9 µl distile su ) yapılmıştır.

**Tablo 3.5.** PCR işleminde kullanılan primer dizileri

Hedef	Baz dizilisi	Hedef büyüklüğü
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
<i>Bar</i> geni	F- CCA TCG TCA ACC ACT ACA TC R- AGA AAC CCA CGT CAT GC	380 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	180 bp

*c) PCR reaksiyon koşulları:*

**PCR reaksiyon koşulları**

10 µl mix,

1 µl *bar-F*,

1 µl *bar-R*,

2 µl DNA,

6 µl dH<sub>2</sub>O kullanılarak 20 µl toplam hacimde yapılmıştır. Reaksiyonlar, Multigene-GTC96S cihazında 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 10 µl etüdyumbromit eklenmiştir. Elektroforez işlemi 110 voltta 1,5-2 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilmiştir.

### **Tek bir örnek için mix oranı**

MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl

10x 2,5 µl

dNTP 0,5 µl

Taq 0,125 µl

Primer F 0,5 µl

Primer R 0,5 µl

DNA 8 0,5 µl

dH<sub>2</sub>O 11,2 0,5 µl olmak üzere 25 µl olarak hazırlanmıştır.

### 3.2.10. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Deneme kapsamında, hormon konsantrasyonları ve eksplantların sürgün oluşum oranı (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), kök oluşum oranı (%), eksplant başına kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) vb. gibi parametreler ölçülmüş ve değerlendirilmiştir. Bu parametrelerden sürgün oluşum oranı (%) ve eksplant başına sürgün sayısı (adet) analizlere tabi tutulmuştur.

*Rejenerasyon denemeleri:* Her muamele içerisinde en az üç tekerrür içerecek şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Her tekerür içinde 5 ile 10 adet eksplantı bulunduğu Petri kutuları ve Magenta kutularından oluşmuştur. Deneme sonuçlarının analizi için IBM SPSS 18 for Windows Oneway Anova veya Univariate analiz programı yardımı ile yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılığı belirlemek amacı ile Duncan Analizi yapılmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

#### 4.1.1. Fasulye Çeşitlerinin Yüzey Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında, kullanılan bitki kısımlarının yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan tamamen arındırılması gerekmektedir. Bitki eksplantlarının sterilizasyonu esnasında optimum dezenfektan çeşitlerinin farklı konsantrasyonları ve uygulama süreleri denenmiştir. Sterilizasyon çalışmasındaki amaç en etkili sürenin ve dezenfektan dozunun belirlenmesidir. Yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat, antibiyotikler, biositler, sodyum hipoklorit (% 5'lik ticari çamaşır suyu) yaygın olarak kullanılmaktadır (Sağlam, 2005). Bu çalışmada, eksplant kaynağı olarak tohum ve apikal meristem kullanılmıştır. Fasulye bitkisinin Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 çeşitlerinin tohum sterilizasyonunda herhangi bir kırık, çizik, renk değişimi olmamış üniform tohumlar seçilerek steril edilmiş cam beherler içinde sterilizasyona tabi tutulmuştur (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 fasulye çeşitlerine ait tohumlarının laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde sterilizasyonu

Tohumlar ticari çamaşır suyunun (Aktif klor içeriği % 5'lik Ace®) % 5, 10, 25 ve 50'lik dozları ile 5,10 ve 20 dk.'lık sürelerde sterilizasyona tabi tutulduktan sonra 5'er dk üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan süre ve dozların hiç birinde bulaşıklık gözlenmediği için bulaşıklık ile ilgili varyans analizi

yapılmamıştır. Çimlenme oranı (%) ve kontaminasyon oranının (%) ile ilgili verilerin varyans analizi ile Duncan Analizi sonuçları her bir çeşit için ayrı ayrı olmak üzere Tablo 4.1., Tablo 4.2., Tablo 4.3., Tablo 4.4., Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir.

#### 4.1.1.1. Yunus-90 Fasulye Çeşidinde Yüzey Sterilizasyonu

Yunus-90 fasulye çeşidine ait tohumlar ticari çamaşır suyunun (Aktif karbon içeriği % 5'lik Ace®) % 5, 10, 25 ve 50'lik dozları ile 5,10 ve 20 dk.'lık sürelerde sterilizasyona tabi tutulduktan sonra 5'er dk üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra MS besin ortamlarına ekimi yapıldıktan sonra bir aylık gelişmelerinin rakamsal verileri alınmıştır. Çimlenme oranı (%) ve kontaminasyon oranının (%) Varyans Analizi ile Duncan Analizi sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir ( Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.).

**Tablo 4.1.** Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Yunus-90 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine etkileşimlerini gösteren varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	Tohum Çimlenme Oranı (%)	
		K.O.	F
<b>Çamaşır Suyunun Dozları</b>	3	4,26	4,04**
<b>Süre</b>	2	1,22	1,17*
<b>Çamaşır Suyunu Dozları×Süre</b>	6	2,19	2,07**
<b>Hata</b>	24	1,05	
<b>Genel Toplam</b>	35		

\* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Tablo 4.1'de çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Yunus-90 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine varyans analizi sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçları, doz faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0.05$ ) bir farklılık olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, süre faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında ( $p < 0.05$ ) ve Doz×Süre interaksyonunda istatistiksel açıdan önemli ( $p > 0.01$ ) bir farklılık olduğu sonucuna varılmıştır. Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, doz faktörünün bir ve ikinci seviyelerinin aynı grupta yer aldığı, benzer şekilde üç ve dördüncü seviyelerinin de aynı grupta yer aldığı görülmektedir. Bir ve ikinci seviyenin yer aldığı grup ile üç ve dördüncü seviyenin yer aldığı grup ortalamaları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık tespit

edilmiştir ( $p<0.05$ ). Doz seviyesinin % 5 olduğu ve % 10 olduğu durumda ortalamaların diğer gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yunus-90 çeşidinin çimlenme oranında çamaşır suyunun tek başına doz uygulaması etkili olurken; süre ve Doz×Süre uygulaması etkili olmuştur.

**Tablo 4.2.** Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri sonucunda Yunus-90 çeşidinin tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine etkileri

Çamaşır suyunun Dozları (%)	Tohum Çimlenme Oranı (%)		
	Sterilizasyon süreleri		
	5 (dk.)**	10 (dk.)*	20 (dk.)**
5	93,33a	93,33a	73,33a
10	93,33a	100,00a	56,66b
25	73,33b	60,00b	26,66c
50	13,33c	33,33c	53,33b

\*İstatistiksel açıdan aynı sütunda yer alan farklı harfleri olan ortalamalar arasında Duncan yestine göre 0.05 düzeyinde farklılık önemlidir.

\*\* İstatistiksel açıdan aynı sütunda yer alan farklı harfleri olan ortalamalar arasında Duncan yestine göre 0.01 düzeyinde farklılık önemlidir.

Sterilizasyon süresi 5(dk) olduğu durumda, 93.33 bulunurken % 50 çamaşır suyu muamelesiyle 13.33 bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Ortalamalar arasında ölçülen farklı bir büyüklük görülmüştür. Bu farklılığın görülme nedeni; tohumların yüksek doz ve uzun sürede sterilizasyondan kaynaklı morfolojik yapılarında bozulmalar yaşanmasıdır. Yapısal deformasyon kayıpları; tohumda zigotik embiyonun gelişimini engelleyerek ya da doku ölümlerine neden olarak gelişimi önlemekte ve olası kontaminasyonlara sebep olmaktadır. Fakat çeşit bazında bakıldığında ise Yunus-90 çeşidinde hem kullanılan tohum sayısı hem de kimyasal malzeme miktarından oluşan kayıplar minimum düzeyde olmuştur. Çimlenme ve gelişen kontaminasyon oranlarına bakıldığında ise % 10 çamaşır suyu muamelesi ve 10 dk sterilizasyonunda % 100 başarı elde edilerek herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır.



#### 4.1.1.2. Göynük-98 Fasulye Çeşidinde Yüzey Sterilizasyonu

Göynük-98 fasulye çeşidine ait tohumlar ticari çamaşır suyunun (Aktif karbon içeriği % 5'lik Ace®) % 5, 10, 25 ve 50'lik dozları ile 5,10 ve 20 dk.'lık sürelerde sterilizasyona tabi tutulduktan sonra 5'er dk üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra MS besin ortamlarında kültüreye alındıktan sonra bir aylık gelişimlerinin rakamsal verileri alınmıştır. Tohum çimlenme oranı (%) ve kontaminasyon oranının (%) varyans analizi ile her muamelenin ortalamaları arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi analizi sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir ( Tablo 4.3. ve Tablo 4.4. ).

**Tablo 4.3.** Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Göynük-98 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine Varyans Analizi

V.K.	S.D.	Tohum Çimlenme Oranı (%)	
		K.O.	F
<b>Çamaşır Suyunun Dozları</b>	3	6,09	0,64
<b>Süre</b>	2	6,78	1,07*
<b>Çamaşır Suyunun Dozları × Süre</b>	6	7,83	0,41
<b>Hata</b>	24	75,93	
<b>Genel Toplam</b>	35	96,64	

\* $p < 0.05$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri ile ilgili verilerinin varyans analiz sonuçları incelendiğinde Göynük-98 çeşidinin tohum çimlenme oranı üzerinde çamaşır suyunun dozları ve Doz×Süre interaksiyonun istatistiksel açıdan önemli olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca muamele süreleri arasında önemli ( $p < 0.05$ ) düzeyinde önemli farklılık görülmüştür.

**Tablo 4.4.** Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri sonucunda Göynük-98 çeşidinin tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine etkileri

Çamaşır suyu Dozları (%)	Tohum Çimlenme Oranı (%)		
	Sterilizasyon süreleri (dk.)		
	5 (dk.)	10 (dk.)	20 (dk.)
5	13,33	26,66	33,33
10	40,00	46,66	33,33
25	13,33	20,00	33,33
50	46,66	40,00	40,00

Farklı çamaşır suyu dozları (%) sterilizasyon süresi 5, 10 ve 20 ( dk ) olduğu durumda, çimlenme oranı sırasıyla % 13.3-46.66, % 20-46.66 ve % 33,33-40 arasında değişmiştir.

#### 4.1.1.3. Önceler-98 Fasulye Çeşidinde Yüzey Sterilizasyonu

Önceler-98 fasulye çeşidine ait tohumlar ticari çamaşır suyunun (Aktif karbon içeriği % 5'lik Ace®) % 5, 10, 25 ve 50'lik dozları ile 5,10 ve 20 dk.'lık sürelerde sterilizasyona tabi tutulduktan sonra 5'er dk üç kez steril saf su ile durulanmıştır ( Şekil 4.2.). Daha sonra MS besin ortamlarında kültüre alındıktan sonra bir aylık gelişimlerinin rakamsal verileri alınmıştır. Tohum çimlenme oranı (%) ve kontaminasyon oranının (%) ile ilgili varyans analizi ile elde edilen ortalamaları arasındaki farklılığı kıyaslamak için Duncan testi analiz sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir ( Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.).

**Tablo 4.5.** Çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Önceler-98 çeşidinin çimlenme oranı (%) üzerine Varyans Analizi

V.K.	S.D.	Tohum Çimlenme Oranı (%)	
		K.O.	F
Çamaşır Suyunun Dozları	3	0,82	0,24
Süre	2	5,92	1,75*
Çamaşır Suyunun Dozları×Süre	6	2,26	0,67
Hata	24	3,37	
Genel Toplam	35		

\* $p < 0.05$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Tablo 4.5’de çamaşır suyunun farklı dozları ve uygulama sürelerinin Önceler-98 eşidinin çimlenme oranı (%) üzerine varyans analizi sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçları, amaşır Suyunun Dozları faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığını göstermektedir. Buna karşılık, Süre faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında  $p<0.05$  düzeyinde ve amaşır Suyunun Dozları×Süre interaksiyonunda istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır.

Farklı amaşır suyu dozları (%) ile sterilizasyon süresi 5, 10, 20 dk olduğu durumlarda, tohum çimlenme oranı sırasıyla % 26.66-46.66, % 20.00- 53.33 ve % 3.33-66.66 arasında değişmiştir.



**Şekil 4.2.** Önceler-98 çeşitinin sterilizasyonu ve kontaminasyon oluşumu

**Tablo 4.6.** amaşır suyunun farklı dozları ve uygulama süreleri sonucunda Önceler-98 eşidinin tohumlarının çimlenme oranı (%) üzerine Duncan Analizi

Çamaşır suyu Dozları (%)	Tohum imlenme Oranı (%)		
	Sterilizasyon süreleri		
	5 (dk.)	10 (dk.)	20 (dk.)
5	46,66	26,66	66,66
10	26,66	20,00	53,33
25	40,00	46,66	33,33
50	46,66	53,33	40,00

Farklı amaşır suyu dozları (%) sterilizasyon süresi 5, 10 ve 20 ( dk ) olduğu durumda, çimlenme oranı sırasıyla % 26.66-46.66, % 20-53.33 ve % 33,33-66.66 arasında değişmiştir



**Şekil 4.3.** Fasulye tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenmesi

#### 4.1.2. Filtre Kâğıtlarının Fasulye Tohumlarının Çimlenmesine Etkisi

Fasulye tohumlarının çimlenmesine filtre kağıdının etkisi 2 şekilde incelenmiştir. İlki filtre kağıtlarının MS besin ortamı üzerine yerleştirilmesi, diğeri ise filtre kağıtlarının MS besin ortamı olmaksızın magenta kabı içerisine yerleştirilmesi şeklinde olmuştur.

Filtre kâğıtları yaklaşık 5 tohumun çimlenmesine izin verecek büyüklükte kareler halinde kesilerek etüvde 160 °C'de 2 saat steril edilmiştir. Tohum sterilizasyonunda manyetik karıştırıcı kullanılmış ve her bir çeşit için ideal olan süre ( Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 için 10 dk) ve dozda (Yunus-90 % 10, Göynük-98 % 50 ve Önceler-98 % 25 ) steril edilen tohumlar steril saf suda 24 saat bekletilmiştir. Daha sonrabir beher içerisine konulan steril saf su ile filtre kâğıtları ıslatılmıştır. Yaklaşık olarak 15 ml MS ortamının bulunduğu magenta kapları içerisine yerleştirilen filtre kağıtları üzerine tohumlar konularak kapakları streç film kullanılarak kapatılmıştır (Şekil 4.4.). Tohumlar iklim odasına çimlendirilmek üzere konulmuştur. Tohumların bu yöntemle çimlendirilmesi sonucunda Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinde % 100, Göynük-98 çeşidinde % 50 oranında çimlenme gözlenmiştir.

Sadece filtre kâğıdı kullanılarak magentalarda yapılan tohum ekimlerinde ise tohumlarda çimlenme oranı her bir çeşit için % 100 olmuştur. Fakat filtre kağıtlarının 2

ile 3 gün sonunda kuruması sonucunda çimlenme hızı durmuş ve gelişimleri MS+filtre kâğıdı olan uygulamaya daha göre yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde, sadece filtre kâğıdı uygulaması olan denemeye 3. günlerinde steril mikropipet yardımıyla 1000 µl steril saf su ilave edilerek yavaşlayan tohum gelişmesine etkisi olup olmayacağı denenmiştir. Ancak bu uygulama tohum kültürlerinde kontaminasyon oluşumuna sebep olmuştur.



**Şekil 4.4.** MS+filtre kağıdı uygulaması ile fasulye tohumlarının çimlenmesi ve gelişimi

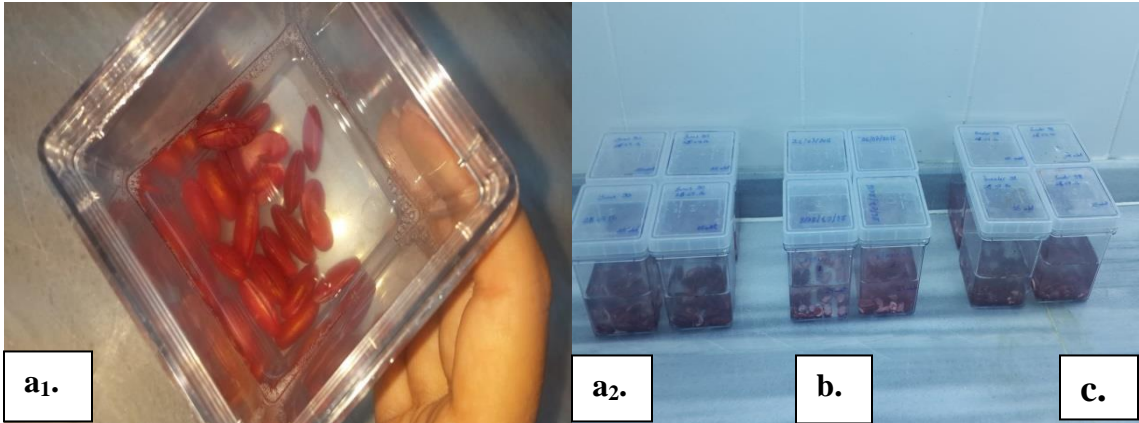
#### 4.1.3. Tohum Canlılık Testi Bulguları

Tetrazolium (TTC) testi, tohumların canlılıklarını belirlemenin yanı sıra tohumun gücünü (vigor) belirlemeye de yardımcı olan biyokimyasal bir testtir. Bu testin esası canlı ve cansız dokuların tetrazoliumklorid ile oluşturduğu renk farklılığına dayanmaktadır. Renksiz olan tetrazolium solüsyonu, canlı bitki dokularındaki oksidaz enzimleri tarafından indirgenerek, kırmızı renkli formazan adlı maddenin oluşumuna neden olur. Böylece canlı hücreler kırmızı renge boyanır. Buna karşılık ölü hücrelerde hiçbir reaksiyon oluşmadığı için kırmızıya boyanma olmaz ve cansız dokular renksiz kalır (Kantar ve ark., 1995).

Bu test ilk kez Almanya'da Lakon (1942) tarafından ortaya atılmış ve yine aynı araştırmacı (1950) tohumların boyanmasını değerlendirmenin tahıllarda tohum gücünü belirlemede kullanımına ilişkin çalışmaları başlatmıştır. Daha sonra Avrupa ve

Amerikada'da bu testin, diğer tohum türlerinde de tohumların gücünü belirlemede kullanımına yönelik yöntem geliştirme çalışmalarını devam etmiştir. Bu testin canlı tohumların gücünü belirlemede çok hızlı bir yöntem olmasının yanı sıra tohumların hasadı, işlenmesi, depolanması ve dağıtımları sırasında tohumlarda oluşabilecek kalite kayıplarının belirlenmesinde de çok etkin bir şekilde kullanılabilceği belirtilmektedir (ISTA, 1995).

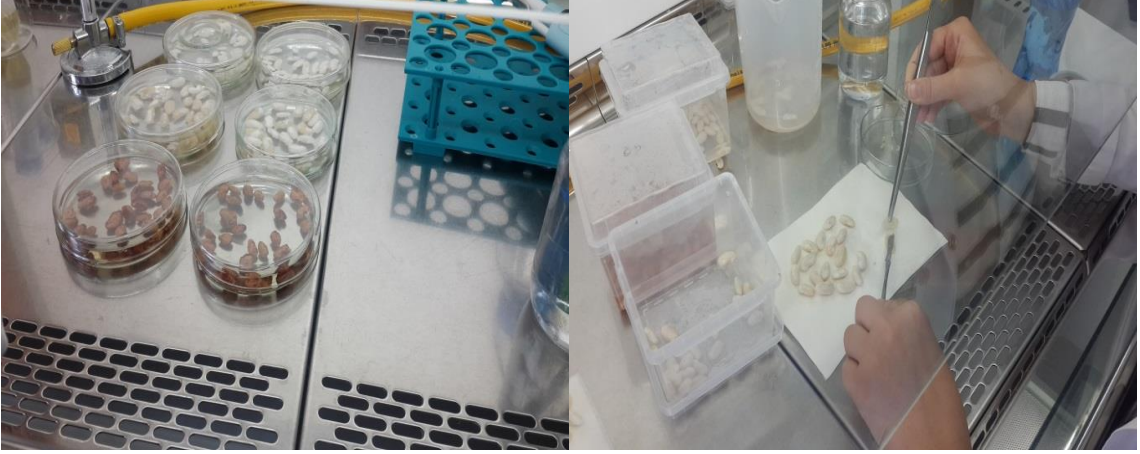
Bitki tohumlarının canlılık tespiti için 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit (TTC) yöntemi kullanılarak fasulyenin Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 çeşitlerine ait tohumlar 3x20 olarak hazırlanmış ve magenta kaplarına 150 ml TTC solüsyon ilave edilmiştir. 24 saat 1µg/µl oranda hazırlanmış trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içinde bekletilen tohumları kırmızı renge boyandığı görülmüştür (Şekil 4.5.). Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi Göynük-98 çeşidinde tam anlamı ile boyanma gözlemlenememiştir. Tohum üzerinde bazı bölgeler kırmızı ile başlarken; o kırmızılıkları pembeye yakın açıklıklar takip etmiştir. Diğer iki çeşidimizde ise böyle bir sorunla karşılaşılmanın ve canlı tohumları ile embiyo yüzeyleri formazan oluşmu ile tamamen kırmızı renge boyanmıştır.



**Şekil 4.5.** Fasulye çeşitlerine (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>.Yunus-90, b. Göynük-98 ve c. Önceler-98) ait tohum canlılık testi uygulaması sonrası boyanan tohumlar

#### 4.1.4. Yunus-90 Fasulye eşidinin Olgunlaşmış Embriolarına Farklı Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Yunus-90 çeşidine ait tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar sterilizasyon protokolüne göre laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde steril edilip olgunlaşmış embriyoları tohumlardan çıkartılmıştır (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** Laminar flow biyogüvenlik kabini içerisinde steril edilmiş tohumlar ve olgunlaşmış embriyoların çıkartılması

Elde edilen olgunlaşmış embriyoların BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) ve NAA (0.00 ve 0.25 mg/l)'in farklı dozlarında sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmek amacıyla besin ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 4.7.).



**Şekil 4.7.** Fasulye çeşitlerine ait olgunlaşmış embriyoların MS besin ortamına ekilmesi

Dört haftalık zaman diliminin sonunda olgunlaşmış embriyoların, eksplant başına düşen sürgün sayısı ve sürgün oluşum oranı (%) sayımları yapılmıştır (Şekil 4.8.). Yunus-90 fasulye çeşidi için varyans analiz tablosu ve ortalamalar arasındaki farklılığı kıyaslamak için Duncan testi analizi tablosu sırasıyla Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmiştir.



**Şekil 4.8.** MS besin ortamında Yunus-90 fasulye çeşidinin olgunlaşmış embriyoların gelişmesi

**Tablo 4.7.** Yunus-90 fasulye çeşidinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA etkisine ait Varyans Analizi sonuçları

V.K	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
BAP	3	0.13	5.42**	577.77	1.12*
NAA	1	0.16	6.66**	0.00	0
BAP×NAA	3	0.23	9.33**	933.33	1.80*
Hata	16	0.02		516.66	
<b>Genel Toplam</b>	<b>23</b>				

\* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Analizler tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel analizine göre yapılmıştır. BAP uygulamasının dört ve NAA uygulamasının iki seviyesi olacak şekilde deneme kurulmuştur. Tablo 4.7’de BAP ve NAA faktörlerinin eksplant başına düşen sürgün sayısı üzerine etkilerini değerlendirmek üzere elde edilen varyans analiz tablosu yer almaktadır. Analiz sonuçları, BAP uygulamasının dört seviyesine ilişkin ortalamalar



arasında ( $p<0.01$ ) ve NAA faktörünün iki seviyesinin ortalamaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda BAP×NAA interaksiyon etkisinin de istatistiksel açıdan önemli olduğu sonucuna varılmıştır ( $p<0.01$ ).

Ayrıca, sürgün oluşum oranı bakımından BAP uygulamaları arasında 0.05 düzeyinde ve BAP×NAA interaksiyon bakımından 0.05 düzeyinde interaksiyon bulunmuştur. Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, BAP uygulamasının iki, üç ve dördüncü seviyelerinin ortalamaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmadığı, bahsi geçen 1. ve 4. seviyenin sırasıyla önemlilik derecelerinin düşük ve yüksek farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bir başka ifade ile iki ve üçüncü seviyedeki etkilerin önemli derecede farklı olduğu gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.8.** Yunus-90 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA'nın Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet) ait Duncan Analizi sonuçları

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	
	0	0,25
0,50	0.13c	0.20c
1,00	0.46b	0.33b
1,50	0.40b	0.53a
2,00	0.86a	0.13d

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p<0.05$ )

Tablo 4.8'de analizler tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel düzeninde BAP uygulamasının dört ve NAA uygulamasının iki seviyesi olacak şekilde yürütülmüştür. Tabloda BAP ve NAA faktörlerinin Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, BAP uygulamasının iki, üç ve dördüncü seviyelerinin ortalamaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmuştur. Farklı oranlarda (1,2,3,4 mg/l) BAP içeren ortam üzerinde explant başına sürgün oluşum sayısı 0.13 ile 0.86 adet ve farklı oranlarda BAP + 1 mg/l NAA içeren ortamda 0.13-0.53 adet arasında değişmiştir.

Bunun yanı sıra çalışma esnasında yapılan gözlemlerde; kök ve sürgün oluşumu ile birlikte birkaç tane albino bitki oluşumu görülmüştür. Bu da tamamen farklı alemlerde bile ortak olarak bulunan genlerden ötürü benzer sonuçların doğabileceğini

göstermektedir. Albino bitkilerde, hiç klorofil bulunmaz. Bu da fotosentez yapamamalarına neden olmaktadır. Tarih bilimci Sandy Lyndon; albinizmin, hücrelere renk veren pigmentlerin oluşumuna engel olan genetik bir mutasyondan kaynaklandığını belirtmiştir. Hayvanlarda, dolayısıyla insanlarda, albinizm o kadar da ciddi bir sorun olmadığını dile getirirken; bitkilerde çok ciddi sorunlar doğurduğunu söylemiştir. Çünkü bir bitkiyi bitki yapan etmenin yani klorofilin yoksunluğunda bitkinin fotosentez yapamayacağını ve dolayısıyla güneş ışınlarından besin üretemeyeceğini söylemiştir. Albino bitkilerin yaşayabilmelerinin tek sebebinin ise köklerinin ortak olduğu ebeveyn konumundaki bir bitkiden gerekli besinleri emiyor olması olarak açıklamıştır (Welsh, 2010). Yapmış olduğumuz bu çalışmada 1 aylık gözlem diliminin sonucunda albino bitkilerin gelişim süreçleri de incelenmiştir (Şekil 4.9.).



**Şekil 4.9.** Yunus-90 çeşidinin zigotik embriyolarının yapraklarında görülen kısmi albino oluşumları

Fakat diğer sağlıklı bitkiler gibi fiziksel ve morfolojik gelişim süreçlerine bakıldığında farklılık göstermiştir. Yaprak, gövde ve kök yapıları parçalı ve pütürlü bir yüzeye sahip olup aynı zamanda en hassas bir temasta bile dağılma göstermiştir.

#### 4.1.5. Göynük-98 Fasulye Çeşidinin Olgunlaşmış Embriyolarına Farklı Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Göynük-98 çeşidine ait tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar sterilizasyon protokolüne göre laminar flow biyogüvenlik kabini içerisine steril edilip olgunlaşmış embriyoları tohumlardan çıkartılmıştır. Elde edilen olgunlaşmış embriyoların BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) ve NAA (0.00 ve 0.25 mg/l)'in farklı dozlarında sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda; her üç çeşitte de BAP'ın (1.00 ve 1.50 mg/l) tek başına olgunlaşmış embriyoların gelişimi için yeterli olduğu gözlemlenmiştir. Fakat çeşit bazında bakıldığında Göynük-98 çeşidinde sterilizasyon esnasında fazlasıyla tohum kaybı olmuştur. Çünkü sterilizasyon esnasında tohum kabuğunun yırtılması ve endospermde parçalanmalar gözlemlenmiştir. Bu durum ise olgunlaşmış embriyonun plumula kısmı ile embriyonik gövdesinin birbirinden ayrılmasına sebep olmuştur. Sonuç olarak; Göynük-98 çeşidinde zamandan, kimyasal malzemelerden ve tohum materyalinden üç kata kadar kayıp gözlemlenmiştir. Kayıplara rağmen kurulan denemede ise sonuçlara bakıldığında kontaminasyon hala istenilen seviyede aşılmamıştır. Elde edilen verilerin Göynük-98 fasulye çeşidi için Varyans ve Duncan Analizi sonuçları Tablo 4.9. ve Tablo 4.10.'de verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Göynük-98 fasulye çeşidinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA etkisine ait Varyans Analizi sonuçları

V.K	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
<b>BAP</b>	3	0.14	1.40*	1133.33	4.85**
<b>NAA</b>	1	0.10	3.20**	1666.66	7.14**
<b>BAP×NAA</b>	3	0.05	1.73*	777.77	3.33**
<b>Hata</b>	16	0.03		233.33	
<b>Genel Toplam</b>	23				

\* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Analizler tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel düzende BAP uygulamasının dört ve NAA faktörünün iki seviyesi olacak şekilde yürütülmüştür. Tablo 4.9'da BAP ve NAA faktörlerinin eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün oluşum oranı üzerine etkilerini değerlendirmek üzere elde edilen varyans analizi tablosu yer

almaktadır. Analiz sonuçları, sürgün oluşum oranında BAP uygulamasının dört seviyesine ilişkin ortalamalar arasında ( $p<0.05$ ) ve NAA uygulamasının iki seviyesinin ortalamaları arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda BAP×NAA interaksiyon etkisinin de istatistiksel açıdan önemli ( $p<0.05$ ) olduğu sonucuna varılmıştır. BAP uygulamasını sürgün oluşum oranı üzerine olan etkisi, BAP ve NAA faktörünün arasında  $p<0.01$  düzeyinde farklılık göstermektedir ve BAP×NAA arasında  $p<0.01$  düzeyinde bir etkileşim göstermektedir.

**Tablo 4.10.** Göynük-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA'nın Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet) ait Duncan Analizi sonuçları

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	
	0	0,25
0,50	0.60a	0.46b
1,00	0.33b	0.73a
1,50	0.20c	0.33c
2,00	0.20c	0.46b

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p<0.05$ )

Tablo 4.10'da BAP ve NAA faktörlerinin Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları yer almaktadır. Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, farklı oranlarda (1,2,3,4 mg/l) BAP içeren ortam üzerinde eksplant başına sürgün oluşum sayısı % 20 ile % 60 ve farklı oranda BAP +1 mg/l NAA içeren MS ortamında 0.20-0.73 arasında değişmiştir.

#### 4.1.6. Önceler-98 Fasulye Çeşidinin Olgunlaşmış Embriolarına Farklı Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Önceler-98 çeşidine ait tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar sterilizasyon protokolüne göre laminar flow biyogüvenlik kabini içerisine steril edilip tohumlardan çıkartılmıştır. Elde edilen olgunlaşmış embrioların BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) ve NAA (0.00 ve 0.25 mg/l)'in farklı dozlarında sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda; her üç çeşitte de BAP'ın (1.00 ve 1.50 mg/l) tek başına olgunlaşmış embrioların gelişimi için yeterli olduğu gözlemlenmiştir. Olgunlaşmış embriyoya rahatlıkla erişilip tahrip edilmeden en rahat çıkarılan çeşit Önceler-98 çeşidi olup gelişim açısından ikinci sırada yer almaktadır.

Çalışmanın her aşamasında orta derece bir gelişim seyredip negatif ya da pozitif yönde hem rakamsal hem de gözle görülür derecede pik yapmamıştır. Elde edilen verilerin Önceler-98 fasulye çeşidi için Varyans ve Duncan Analizi sonuçları Tablo 4.11 ve Tablo 4.12’de verilmiştir.

**Tablo 4.11.** Önceler-98 fasulye çeşidinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA etkisine ait Varyans Analizi sonuçları

V.K	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
<b>BAP</b>	3	0.09	3.339**	105.55	0.27
<b>NAA</b>	1	0.13	5.06**	416.66	1.08*
<b>BAP×NAA</b>	3	0.11	4.39*	505.55	1.31*
<b>Hata</b>	16	0.02		383.33	
<b>Genel Toplam</b>	23				

\* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Tablo 4.11’de BAP ve NAA faktörlerinin eksplant başına düşen sürgün sayısı ile sürgün oluşum oranı üzerine etkilerini değerlendirmek üzere elde edilen varyans analiz tablosu yer almaktadır. Analiz sonuçları, sürgün oluşum oranında BAP uygulamasının dört ve NAA uygulamasının seviyesine ilişkin ortalamalar arasında ( $p<0.01$ ) ve bir farklılık olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca sürgün oluşum oranı bakımından, BAP dozları arasında istatistiksel olarak her hangi farklılık yokken NAA dozları arasında 0.05 düzeyinde ve BAP×NAA arasında  $p<0.05$  düzeyinde etkileşim görülmektedir.

**Tablo 4.12.** Önceler-98 fasulye çeşidinin rejenerasyonu üzerine farklı dozlarda BAP ve NAA’nın Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet) ait Duncan analizi sonuçları

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	
	0	0,25
<b>0,50</b>	0.60d	0.86a
<b>1,00</b>	0.73c	0.40d
<b>1,50</b>	0.86b	0.60c
<b>2,00</b>	1.00a	0.73b

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p<0.05$ )

Analizler tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel düzeninde BAP uygulamasının dört ve NAA faktörünün iki seviyesi olacak şekilde yürütülmüştür. Tabloda BAP ve NAA faktörlerinin Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, yalnız BAP muameleleriyle eksplant başına sürgün sayısı 0.60-1.0 adet ve farklı oranda BAP + 1 mg/l NAA uygulaması açısından 0.40-0.86 adet arasında değişmiştir.

#### 4.1.7. Fasulye Çeşitlerinde Apikal Meristemlere Değişik Oranlarda BAP+NAA Konsantrasyonlarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Steril edilen tohumlar *in vitro* koşullarda MS besisi ortamında çimlendirilerek, 5-7 günlük bitkiciklerin apikal meristemleri izole edilmiştir. Elde edilen apikal meristem eksplantlarının sürgün rejenerasyonu bakımından BAP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) ve NAA (0.00 ve 0.25 mg/l)'in farklı dozlarında sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir (Şekil 4.10.).



**Şekil 4.10.** Fasulye Çeşitlerinde Apikal Meristem eksplantları eldesi için çimlendirilmiş 7-10 günlük bitkicikler

Uygulama esnasında; MS besisi ortamında magenta kaplarına kültürü gerçekleştirilen tohumların, çimlendirilmesinde karşılaşılan kontaminasyondan dolayı, sorunu çözmek amacıyla farklı yöntemler denenmiştir. İlk olarak *in vivo* şartlarda hazırlanan toprak (3/1) ve torf (3/2) karışımında; viyollere ekilen tohumlar çimlendirilerek, 5-7 günlük bitkiciklerin apikal meristemleri alınmıştır (Şekil 4.11.). Her bir çeşit için NaOCl'nin % 5, 10, 25 ve 50'lik dozda, 5 dk'lık sabit süre ile kabin

içerisinde sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fakat yapılan uygulama sonucunda olumlu bir sonuç elde edilememiştir.



**Şekil 4.11.** Fasulye çeşitlerinden apikal meristem ekspantının alınması

İkinci bir uygulama olarak çimlenmede yaşanan sorunu çözmek için; MS besi ortamı üzerine steril saf suda ıslatılan filtre kâğıdı magenta kaplarına serilerek arasına tohumlar yerleştirilip üzeri kapatılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda kontaminasyon kırılmış ve Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitleri için çimlenme oranı %100 olmuştur. Göynük-98 çeşidinde çimlenmede zorluk yaşansa da diğer yöntemlere göre MS + kâğıt arası uygulaması ile çimlenme oranı % 60'lara kadar yükselmiştir. Bu yöntem kullanılarak elde edilen apikal meristemler BAP+NAA'lı besi ortamlarına ekimi gerçekleştirilmiştir. Dört haftalık zaman diliminin sonunda apikal meristemlerin, eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) sayımları yapılamamıştır. Besin ortamına konulan apikal meristemlerin; ikinci ve üçüncü günlerden itibaren kontaminasyon oluşumları başlamıştır. Çeşit bazında kontaminasyon gelişim süreçlerine bakıldığında; Göyük-98 çeşitinin 2. günde, Önceler-98'in 2.- 3. günlerde ve son olarak çalışmanın her aşamasında olumlu sonuç veren Yunus-90 çeşitinin ise 5. gün itibari ile kontaminasyon oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12.).

Çalışma sonucunda her hangi bir kontaminasyon görülmediği için bununla ilgili varyans ve Duncan analizi yapılamamıştır.



**Şekil 4.12.** Fasulye çeşitlerinde apikal meristemlere değişik oranlarda BAP+NAA muamelesi ve kontaminasyon sunucu magenta kaplarından elde edilen görüntüler

#### 4.1.8. Fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Priming Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

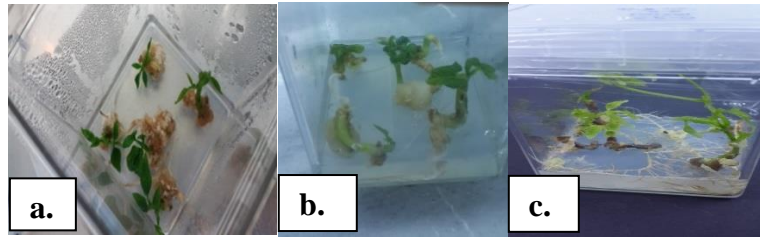
Steril edilen tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletildikten sonra tohumlardan olgunlaşmış embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar yüksek dozda (10 mg/l IAA) oksin içeren bir ortamda 5 gün bekletilmiş ve elde edilen plumula eksplantlarının BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir (Şekil 4.13.). Oksin ön muamelesi uygulanmış ve uygulanmamış deneme arasında gözle görülür farklılıklar mevcuttur. Ön muamelesi olgunlaşmış embriyoların 5 günlük bekleme sürecinde gelişim şeklini ve sürecini fizyolojik olarak güçlendirmiştir.



**Şekil 4.13.** Fasulye çeşitlerinde olgunlaşmış embriyo eksplantlarına ön muamelesi uygulaması



Ön muamelesi uygulaması yapılmayan olgunlaşmış embriyolarda; plumula kısımları oldukça narin ve cansız durmakta bu durumun ise gelişim sürecinin ötelenmesine sebep olmaktadır. Hem zamandan kazanmak hemde sağlıklı bir zigotik embriyo gelişimi için ön muamele uygulamasının etkisi büyüktür. Dört haftalık zaman diliminin sonunda olgunlaşmış embriyoların, eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) gelişimlerinin sayımları yapılmıştır (Şekil 4.14.). Elde edilen verilerin her bir çeşit için varyans ve Duncan analizi sonuçları aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.14.** Olgunlaşmış embriyolara ön muamelesi uygulaması yapılmış fasulye ( **a.** Yunus-90, **b.** Göynük-98, **c.** Önceler-98 ) çeşitlerinin gelişimi

#### 4.1.8.1. Yunus-90 Fasulye Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Steril edilen tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletildikten sonra tohumlardan olgunlaşmış embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar yüksek dozda (10 mg/l IAA) oksin içeren bir ortamda 5 gün bekletilmiş ve elde edilen plumula eksplantlarının BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir. Ön muamelesi uygulanmayan deneme ile ön muamelesi uygulanmış deneme arasında gözle görülür farklılıklar mevcuttur. Ön muamelesi olgunlaşmış embriyoların 5 günlük bekleme sürecinde gelişim şeklini ve sürecini fizyolojik olarak güçlendirmiştir.

Ön muamelesi uygulaması yapılmayan olgunlaşmış embriyolarda; plumula kısımları oldukça narin ve cansız durmakta bu durumun ise gelişim sürecinin ötelenmesine sebep olmaktadır. Hem zamandan kazanmak hemde sağlıklı bir zigotik

embriyo gelişimi için ön muamelesi uygulamasının etkisi büyüktür. Dört haftalık zaman diliminin sonunda olgunlaşmış embriyoların, eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) gelişimlerinin sayımları yapılmıştır (Tablo 4.13.).

**Tablo 4.13.** Yunus-90 fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısının (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) Varyans Analizi

V.K	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
<b>BAP-Ön Muamelesi</b>	3	0.02	0.38	193.44	193.44
<b>Hata</b>	20	0.06		650	650
<b>Genel Toplam</b>	23			193.44	193.44

BAP ön muamelesi ile ilgili gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Analizler altı tekerrür olacak şekilde yürütülmüştür. Tablo 4.13'de BAP ön muamelesinin eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) üzerine etkilerini değerlendirmek üzere elde edilen varyans analiz tablosu yer almaktadır. Analiz sonuçları, BAP ön muamelesi faktörünün dört seviyesine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık bulunmadığını göstermektedir ( $p>0.05$ ). Bunun yanı sıra Yunus-90 çeşidine ait bitkilerde yaprak sayılarının 2'li ve 5'li yapılarda gelişim gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.15.).



**Şekil 4.15.** Yunus-90 çeşidinde ön muamelesi uygulaması ile dış ortamlara alıştırılan olgunlaşmış embriyolarda morfolojik olarak farklılık gösteren 2'li ve 5'li yaprak yapıları

#### 4.1.8.2. Göynük-98 Fasulye Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Steril edilen tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletildikten sonra tohumlardan olgunlaşmış embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar yüksek dozda (10 mg/l IAA) oksin içeren bir ortamda 5 gün bekletilmiş ve elde edilen plumula eksplantlarının BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir. Ön muamelesi uygulanmayan deneme ile ön muamelesi uygulanmış deneme arasında gözle görülür farklılıklar mevcuttur. Ön muamelesi olgunlaşmış embriyoların 5 günlük bekleme sürecinde gelişim şeklini ve sürecini fizyolojik olarak güçlendirmiştir.

Ön muamelesi uygulaması yapılmayan olgunlaşmış embriyolarda; plumula kısımları oldukça narin ve cansız durmakta bu durumun ise gelişim sürecinin ötelenmesine sebep olmaktadır. Hem zamandan kazanmak hemde sağlıklı bir zigotik embriyo gelişimi için ön muamelesi uygulamasının etkisi büyüktür. Dört haftalık zaman diliminin sonunda olgunlaşmış embriyoların, eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) gelişimlerinin sayımları yapılmıştır ( Tablo 4.14.).

**Tablo 4.14.** Göynük-98 fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısının (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) Varyans Analizi

V.K	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
<b>BAP- Ön muamelesi</b>	3	0.08	0.29	861.11	0.29
<b>Hata</b>	20	0.06		650	
<b>Genel Toplam</b>	23			861.11	0.29

BAP ön muamelesi ile ilgili gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Analizler altı tekerrür olacak şekilde yürütülmüştür. Tablo 4.14'de BAP ön muamelesinin Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve Sürgün Oluşum Oranı (%) üzerine etkilerini değerlendirmek üzere elde edilen varyans analiz tablosu yer

almaktadır. Analiz sonuçları, BAP ön muamelesi faktörünün dört seviyesine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığını göstermektedir ( $p>0.05$ ).

#### 4.1.8.3. Önceler-98 Fasulye Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Steril edilen tohumlar steril saf su içinde 24 saat bekletildikten sonra tohumlardan olgunlaşmış embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar yüksek dozda (10 mg/l IAA) oksin içeren bir ortamda 5 gün bekletilmiş ve elde edilen plumula eksplantlarının BAP'ın farklı konsantrasyonlarında (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) sürgün rejenerasyonuna tepkisi incelenmiştir. Ön muamelesi uygulanmayan deneme ile ön muamelesi uygulanmış deneme arasında gözle görülür farklılıklar mevcuttur. Ön muamelesi olgunlaşmış embriyoların 5 günlük bekleme sürecinde gelişim şeklini ve sürecini fizyolojik olarak güçlendirmiştir.

Ön muamelesi uygulaması yapılmayan olgunlaşmış embriyolarda; plumula kısımları oldukça narin ve cansız durmakta bu durumun ise gelişim sürecinin ötelenmesine sebep olmaktadır. Hem zamandan kazanmak hemde sağlıklı bir zigotik embriyo gelişimi için ön muamelesi uygulamasının etkisi büyüktür. Dört haftalık zaman diliminin sonunda olgunlaşmış embriyoların, eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) gelişimlerinin sayımları yapılmıştır ( Tablo 4.15.).

**Tablo 4.15.** Önceler-98 fasulye Çeşitlerinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasının BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına düşen sürgün sayısının (adet) ve sürgün oluşum oranı (%) Varyans Analizi

V.K	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Oluşum Oranı (%)	
		K.O.	F	K.O.	F
<b>BAP Ön muamelesi</b>	3	0.13	1.82	1394.44	1.82
<b>Hata</b>	20	0.07		763.33	
<b>Genel Toplam</b>	23			1394.44	1.82

BAP ön muamelesi ile ilgili gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Analizler altı tekerrür olacak şekilde yürütülmüştür. Tablo 4.15’de BAP ön muamelesi Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve Sürgün Oluşum Oranı (%) üzerine etkilerini değerlendirmek üzere elde edilen varyans analiz tablosu yer almaktadır. Analiz sonuçları, BAP ön muamelesi faktörünün dört seviyesine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığını göstermektedir ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.16.** Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamele Uygulamasında BAP’ın Farklı Konsantrasyonlarında Eksplant Başına Sürgün Sayısı Üzerine Varyans Analizi

V.K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F
<b>ÇEŞİT</b>	2	0.52	7.62**
<b>BAP Ön muamelesi</b>	3	0.12	1.87
<b>ÇEŞİT X BAP- Ön muamelesi</b>	6	0.06	0.89
<b>Hata</b>	60	0.06	
<b>Genel Toplam</b>	71		

\*\* $p<0.01$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

BAP ön muamelesi ile ilgili gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Analizler altı tekerrür olacak şekilde yürütülmüştür. Tablo 4.16’da fasulyenin 3 çeşidinde olgunlaşmış embriyo eksplantlarına ön muamelesi uygulamasında BAP’ın farklı konsantrasyonlarında eksplant başına sürgün sayısı (adet) üzerine varyans analizi verilmiştir. Çeşitler içerisinde en iyi sonuç Yunus-90 çeşidinde elde edilirken bunu Önceler-98 çeşdi takip etmektedir. Göynük-98 çeşidinde kontaminasyon kaynaklı ileriye dönük sonuçlar elde edilemezken bir aylık gözlemlerde minimum seviye de olsa veri alınacak gelişimi göstermiştir. Analiz sonuçları, üç çeşide ait BAP ön muamelesi faktörünün dört seviyesine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığını göstermektedir ( $p>0.05$ ). Gelişimde görülen etkinin 10 mg/l IAA ile ön muamelesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

**Tablo 4.17.** Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasında BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında eksplant başına sürgün sayısı (adet) üzerine Duncan Analizi

ÇEŞİT	BAP ÖN MUAMELESİ				Genel Ortalama
	0,50 mg/l	1,00 mg/l	1,50 mg/l	2,00 mg/l	
Yunus-90	0.23	0.23	0.36	0.30	0.28b
Göynük-98	0.33	0.36	0.30	0.56	0.39b
Önceler-98	0.66	0.40	0.50	0.73	0.57a

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p<0.05$ )

Tablo 4.17'da BAP ön muamelesinin farklı seviyeleri ve üç farklı fasulye çeşidinin eksplant başına sürgün sayısı (adet) üzerine etkisini araştırmak üzere elde edilen varyans analizi sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçları, çeşit faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir ( $p<0.05$ ). Buna karşılık, bapriming faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında ve Çeşit×BAP ön muamelesinin interaksiyonunda istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p>0.05$ ). Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, üçüncü çeşidin grup ortalaması ile diğer iki çeşidin grup ortalamaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu, bir başka ifade ile farklılığın üçüncü çeşitten kaynaklandığı görülmektedir.

**Tablo 4.18.** Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamelesi Uygulamasında BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Oluşum Oranı (%) üzerine Varyans Analizi

V.K.	S.D.	Sürgün oluşum oranı (%)	
		K.O.	F
ÇEŞİT	2	4955.55	7.20**
BAP Ön Muamelesi	3	1175.92	1.71*
Çeşit×BAP Ön Muamelesi	6	637.03	0.92
Hata	60	687.77	
Genel Toplam	71		

\* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

BAP ön muamelesi ile ilgili gerçekleştirilen istatistiksel analizlerde univariate varyans analizi kullanılmıştır. Analizler altı tekerrür olacak şekilde yürütülmüştür. Tablo 4.18’de fasulyenin 3 çeşidinde olgunlaşmış embriyo eksplantlarına ön muamelesi uygulamasında BAP’ın farklı konsantrasyonlarında sürgün oluşum oranı üzerine varyans analizi verilmiştir. Çeşitler bazında farklılık Yunus-90 ‘da görülmüştür. Diğer çeşitler de herhangi bir farklılık etkisi gözlemlenememiştir. Analiz sonuçları, iki çeşide ait BAP ön muamelesi faktörünün dört seviyesine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.19.** Fasulyenin 3 Çeşidinde Olgunlaşmış Embriyo Eksplantlarına Ön Muamele Uygulamasında BAP’ın Farklı Konsantrasyonlarında Sürgün Oluşum Oranı (%) üzerine Duncan Analizi

ÇEŞİT	BAP ÖN MUAMELESİ				Genel Ortalama
	0,50 mg/l	1,00 mg/l	1,50 mg/l	2,00 mg/l	
Yunus-90	23.33	26.66	36.66	30.00	29.16b
Göynük-98	33.33	36.66	30.00	56.66	39.16b
Önceler-98	66.66	40.00	50.00	73.33	57.50a

Aynı sütunda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ( $p<0.05$ )

Tablo 4.19’da BAP ön muamelesi farklı seviyeleri ve üç farklı fasülye çeşidinin Sürgün oluşum oranı üzerine etkisini araştırmak üzere elde edilen duncan analizi sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçları, çeşit faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğunu göstermektedir. Sürgün oluşum oranına benzer şekilde, BAP ön muamelesi faktörünün seviyelerine ilişkin ortalamalar arasında interaksiyonunda istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p>0.05$ ). Duncan çoklu karşılaştırma sonuçları incelendiğinde, üçüncü çeşidin grup ortalaması ile diğer iki çeşidin grup ortalamaları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu belirlenmiştir.

#### 4.1.9. *In Vitro* Koşullarda Geliştirilen Bitkiciklerin Dış Şartlara Alıştırılması

Doku kültürü ile elde edilen bitkiler, dış ortama alıştırmak amacıyla steril torf içeren 15 cm’lik saksılara aktarılmış ve üzerleri yaklaşık 1 hafta şeffaf poşet ile

kapatılarak, iklim odasında büyümeye bırakılmıştır (Şekil 4.16.). Gün aşırı bitki yaprakları sprey su ile nemlendirilerek dış ortama olan adaptasyonuna hız kazandırılmıştır. İklim odasında  $24 \pm 1$  °C, 3000 lüks ışık 16 saat ışık fotoperiyodu ve % 50 nem sağlanmıştır. İki aylık bir sürecin sonucunda sağlıklı tohumları elde edilmiştir.

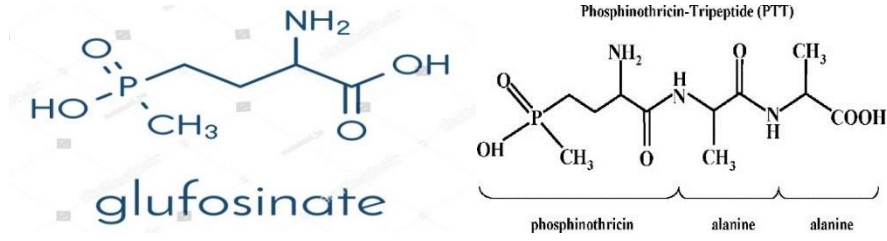


**Şekil 4.16.** *In vitro* koşullarda geliştirilen bitkiciklerin dış şartlara (aklimatizasyon) alıştırılması

#### 4.2. GEN AKTARIM ÇALIŞMALARI

Baklagil bitkilerinde seçilebilir markırlar olarak herbisit tolerans genleriyle birlikte antibiyotik direnç geninin yerleştirilmesi, transformasyonun etkinliğini büyük ölçüde arttırmaktadır. *Bar* geni herbisitler için güçlü bir seleksiyon ajanıdır (Taşyapan, 2010). En yaygın kullanılan herbisitler ise gluphosinate veya fosphinotricin'dir (Şekil 4.17.).





**Şekil 4.17.** Glufosinate ve phosphinothricin kimyasal formülü

*A. tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı çalışmasında, bakteri materyali olarak LBA 4404 ve GV2260 bakteri hatları kullanılmıştır. Bu yolla fasulyenin Yunus-90, Göynük-98, Önceler-98 çeşitlerine herbisitlere dayanıklılık geni aktarılmaya çalışılmıştır. *Bar* geni, *Streptomyces hygroscopicus*'dan izole edilen ve glufosinat amonyuma tolerans sağlayan bir gendir. Ayrıca *bar* geninin, herbisit glufosinat amonyuma karşı tolerans kazandıran fosfinotrisin asetiltransferazı (PAT)'da kodladığı bilinmektedir (Ermolli, 2006).

*Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 hattı herbisit tolerans geni (*bar*) ve  $\beta$ -glucuronidase kodlayan uida (GUS) geni ile birlikte 35S promotorunu taşıyan binari vektör taşımakta (pRGG)'dir.

*Agrobacterium tumefaciens*'in non-onkogenik GV2260 p35S GUS-INT hattı ise p35S GUS-INT plazmidi T-DNA bölgesinde seçici NPT-II ve gözlenebilen GUS markör genlerini taşımaktadır.

#### 4.2.1. *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 PRGG *bar* Hattı İle *In vitro* Koşullarda Fasulyenin Tohum Eksplantlarına Gen Aktarım Çalışması

*In vitro* koşullarda yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohum eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra steril filtre kağıtlarında, tohum yüzeyinde kalan su emdirilerek,

- 25 °C'de 1 gün ayarlanmış iklim odasında kokültivasyona tabi tutulmuştur.
- 25 °C'de 2 gün ayarlanmış iklim odasında kokültivasyona tabi tutulmuştur.
- 28 °C'de 1 gün ayarlanmış iklim dolabında kokültivasyona tabi tutulmuştur.
- 28 °C'de 2 gün ayarlanmış iklim dolabında kokültivasyona tabi tutulmuştur.

Bu şekilde dört farklı uygulama denenmiştir. Daha sonra, eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfotrisin ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra, transgenik aday bitkiler 160 °C sıcaklıkta ve 1.5 saat süre ile etüvde steril edilmiş torf ve perlit (1:1) içeren saksılara aktarılmış olup, 25 °C sıcaklığında ve poşet içerisinde iklim dolabında gelişmeleri takip edilmiştir. Bitkilerde belirgin gelişmeler gözlemlendiğinde poşetler uzaklaştırılmış olup, % 45 nemde adaptasyona bırakılmıştır (Şekil 4.18.).



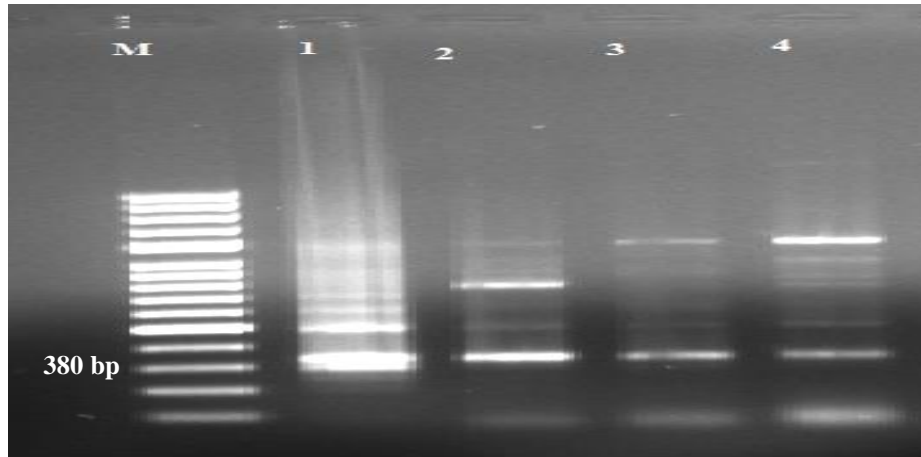
**Şekil 4.18.** LBA4404 pRGG *bar* hattı ile inoküle edilmiş fasulye bitkilerinin dış koşullara alıştırılması

Adaptasyon sonunda elde edilen transgenik aday bitkilerin sayısı Tablo 4.20’de verilmiştir. Buna göre Yunus-90 çeşidinde toplam 80 adet tohumdan 76 adet transgenik aday bitki, Önceler-98 çeşidinde 80 adet tohumdan 40 adet transgenik aday bitki elde edilirken, Göynük-98 çeşidinde toplam 80 adet tohumdan bakteriyel kontaminasyon sebebi ile transgenik aday bitki elde edilememiştir. Transgenik aday bitkilerin her biri dış koşullara uyum sağlamıştır.

**Tablo 4.20.** *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in vitro* koşullarda tohum eksplantına gen aktarım uygulaması

Uygulamalar	Yunus-90		Göynük-98		Önceler-98	
	Kullanılan tohum sayısı (adet)	Transgenik aday bitki sayısı (adet)	Kullanılan tohum sayısı	Transgenik aday bitki sayısı	Kullanılan tohum sayısı	Transgenik aday bitki sayısı
25 °C/ 1 Gün	20	18	20	0	20	11
25 °C/ 2 Gün	20	19	20	0	20	13
28 °C/1 Gün	20	20	20	0	20	9
28 °C/2 Gün	20	19	20	0	20	7

DNA izolasyonu yapılan örneklerin, LBA 4404 pRGG *bar* *A. tumefaciens* hattıyla elde edilen transgenik aday bitkiler *bar* primerleri ile PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR analizi yapılan bitki sayısı; Yunus-90 çeşidinde 25 °C'de 1. ve 2. günlerden birer adet, Önceler-98 çeşidinde ise 28 °C'de 2. günde bir adet olup analiz sonuçları PCR + olarak çıkmıştır. Göynük-98 çeşidinde kontaminasyondan kaynaklı örnek elde edilemediği için analiz gerçekleştirilememiştir. PCR analizinde; NPT-II ve *bar* geni spesifik primerler kullanılmış ve aktarılan genleri taşıyan transgenik bitkiler teyit edilmiştir. Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerine ait PCR analizi sonuçları Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.19.** Fasulyede transgenik aday bitkilerde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi, 1. (25 °C – 1 gün) ve 2. (25 °C – 2 gün) kulvarlar Yunus 90 PCR+; 3. (28 °C – 2 gün ve 4. (28 °C – 1 gün) kulvarlar Önceler 98 PCR+; M: Markör.

*Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in vitro* koşullarda tohum eksplantına gen aktarım çalışmalarında; her bir çeşittin uygulamalarından 20 adet tohum kullanılarak transgenik aday bitkiler elde edilmiştir. Muamele sonucunda; Elde edilen bu bitkilerden yaprak örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmış daha sonrasında ise PCR analizine tabi tutulmuştur. PCR analizi sonucunda Yunus-90 (25 °C – 1 gün - 25 °C – 2 gün) ve Önceler-98 (28 °C – 2 gün - 28 °C – 1 gün) çeşitlerinden alınan örneklerde bant oluşumları gözlemlenerek PCR+ elde edilmiştir.

#### 4.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* Geni Taşıyan GV2260 Geni ile *In Vitro* Koşullarda Fasulyenin Tohum Eksplantlarına Gen Aktarım Çalışmaları

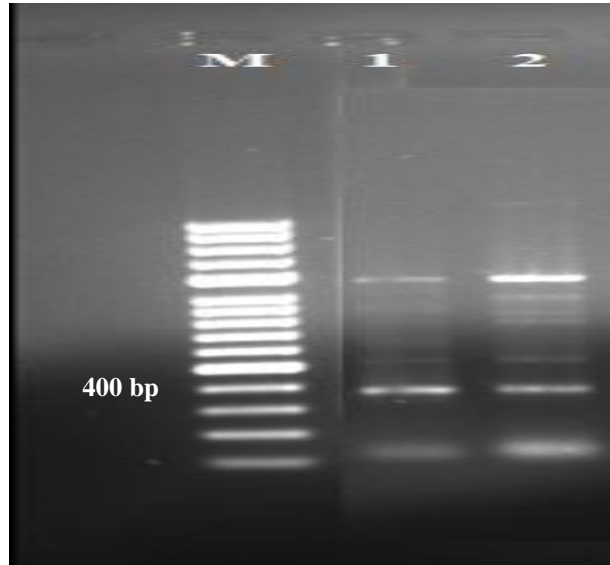
Bakteriler ile 1 mg / 30 ml bakteri olan sıvı MS ortamı içerisine 30 dk GV2260 geni ile inoküle edilmiştir. Muamele sürecinin bitmesi ile 3 adet steril cam petri kutuları içerisine distile su dökülerek tohumlar aşırı bakteri muamelesinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra steril edilmiş filtre kağıtlarında, tohum yüzeyinde kalan su emdirilerek MS (0) besin ortamına ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu denemede bakteri ko-kültivasyonunun günü (1/2 gün) ve iklim odasının derecelerinin (25/28 °C) dört farklı uygulaması denemiş olup bunlar Tablo 4.20.'de verilmiştir. Bu denemede hem iklim odası hemde iklimlendirme dolabı kullanılmıştır. Her bir çeşit için, magenta kaplarına 5'er adet tohum konulacak şekilde 3 tekerürlü deneme kurulmuştur. GV2260 hattı genleri ile inokülasyonu yapıldıktan sonra ekimi gerçekleştirildikten bitkiler iklim odasına saksılara alınarak, dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil 4.20.). Gen aktarımı yapılarak tohumdan elde edilen bitkilerden de tohum (T<sub>0</sub>) oluşumu sağlanmıştır. Uygulama her çeşit için 20 eksplant kullanılarak yapılmıştır (Tablo 4.21.).

- a. 25 °C'de 1 gün ayarlanmış iklim odasında kokültivasyona tabi tutulmuştur.
- b. 25 °C'de 2 gün ayarlanmış iklim odasında kokültivasyona tabi tutulmuştur.
- c. 28 °C'de 1 gün ayarlanmış iklim dolabında kokültivasyona tabi tutulmuştur.
- d. 28 °C'de 2 gün ayarlanmış iklim dolabında kokültivasyona tabi tutulmuştur.

**Tablo 4.21.** *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* Geni Taşıyan GV2260 Geni ile *In vitro* Koşullarda Tohum Eksplantlarına Gen Aktarım Uygulaması

Çeşitler	Yunus-90		Göynük-98		Önceler-98	
	Kullanılan Tohum Sayısı	Transgenik Adayı Bitki Sayısı	Kullanılan Tohum Sayısı	Transgenik Adayı Bitki Sayısı	Kullanılan Tohum Sayısı	Transgenik Adayı Bitki Sayısı
<b>Uygulamalar</b>						
<b>25 °C – 1 Gün</b>	20	20	20	0	20	15
<b>25 °C – 2 Gün</b>	20	19	20	0	20	13
<b>28 °C – 1 Gün</b>	20	20	20	0	20	11
<b>28 °C – 2 Gün</b>	20	19	20	0	20	8

DNA izolasyonu yapılan örneklerin, GV2260 *A. tumefaciens* hattıyla elde edilen transgenik aday bitkilerin PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR analizi yapılan bitki sayısı; Yunus-90 çeşidinde 28 °C'de 2. günden bir adet, Önceler-98 çeşidinde ise 25 °C'de 2. günde bir adet olup analiz sonuçları PCR + olarak çıkmıştır. Göynük-98 çeşidinde kontaminasyondan kaynaklı örnek elde edilemediği için analiz gerçekleştirilememiştir. PCR analizinde; NPT-II ve GV2260 p35 GUS INT geni spesifik primerler kullanılmış ve aktarılan genleri taşıyan transgenik bitkiler teyit edilmiştir. Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerine ait PCR analizi sonuçları Şekil 4.20'da gösterilmiştir.



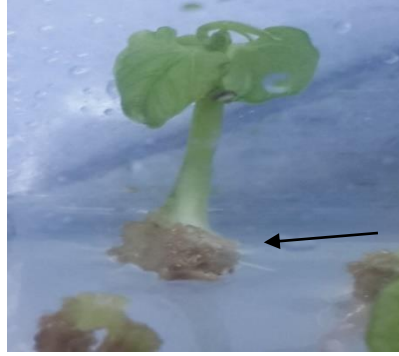
**Şekil 4.20.** Fasulyede transgenik aday bitkilerde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi, 1. (28 °C – 2 gün) kulvar Yunus 90 PCR+; 2. (28 °C – 2 gün) kulvar Önceler 98 PCR+; M: Markör.

*In vitro* koşullarda gelişen 5 haftalık fasulye bitkiciklerden alınan tohum eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 p35 GUS INT hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra 24 saat MS ortamda kokültivasyon yapılmıştır. Daha sonra, eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l Augmentin içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra, elde edilen sürgünler 1.25 mg/l IBA, 50 mg/l kanamisin monosülfat ve 500 mg/l Augmentin içeren MS ortamında kklendirilmiştir. Dört hafta sonra transgenik adayı sürgünlerde köklenme görülmüştür. Bu denemede toplam her bir çeşit için ayrı ayrı, 3 magenta ve her magentada 5 eksplant kullanılmış olup, elde edilen 45 bitki ortalama sürgün oluşum oranı ve eksplant başına düşen sürgün sayısına bakılmıştır. Daha sonra, köklenen transgenik aday bitkiler 160 °C'de sıcaklıkta ve 1,30 saat süre ile steril edilmiş torf, toprak ve perlit karışımını içeren saksılara aktarılmış olup, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Bitkilerde belirgin gelişmeler gözlendiğinde poşetler uzaklaştırılmış olup, % 45 nem ve oda sıcaklığında adaptasyonuna bırakılmıştır. Adaptasyon sonucunda, 45 adet transgenik aday bitkilerden yalnız 37 adet bitki gelişmiş olup, iklim odasında 10 lt'lik saksılara alınmıştır. Daha sonra bu bitkilerde bakla bağlama ve tohum oluşumu gözlemlenmiştir. Tohumlar çalışmanın bir sonraki aşamasında kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

4.2.3. *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in vitro* koşullarda geliştirilen fasulyenin plumula eksplantlarına gen aktarım alışması

Fasulye çeşitlerine ait olgunlaşmış embriyolar 10 mg/l IAA'da 5 gün bekletilmiştir. Olgunlaşmış embriyolardan gelişen 2-3 cm uzunluğundaki plumula eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile (1 mg bakteri/30 ml sıvı MS) 30 dk inokülasyona tabi tutulmuştur. 25 °C'de 1 gün kokltvasyonun ardından eksplantlar steril saf suda yıkanarak, içine 2.0 mg/l IBA, 500 mg/l Agumentin ve 50 mg/l kanamisin monosülfat ilave edilmiş seleksiyon ortamlarında köklendirmeye alınmıştır. Yunus-90 fasulye çeşidinde 4 hafta sonunda 1.2 cm uzunluğunda kök oluşumu meydana gelmiş ancak beş adet köklenmiş bitkiden hiçbirinin dış koşullara adaptasyonu sağlanamamıştır (şekil 4.21.; Tablo 4.22.). Çalışma sonunda her üç fasulye

çeşidinde de köklenmeye başlamış bitkicikler dış koşullara adaptasyonu sağlanamamıştır.



**Şekil 4.21.** Yunus-90 fasulye çeşidinde 4 hafta sonundaki kök oluşumu

**Tablo 4.22.** *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in vitro* koşullarda geliştirilen fasulyenin plumula eksplantlarına gen aktarım uygulaması

Çeşitler	Kullanılan plumula sayısı	Köklenmiş transgenik aday bitki sayısı
Yunus-90	15	5
Göynük-98	15	0
Önceler-98	15	1

*Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in vitro* koşullarda geliştirilen fasulyenin plumula eksplantlarına gen aktarım çalışmasında; her bir çeşit için 3 magenta ve her magentaya 5 adet eksplant konularak deneme kurulmuştur. Çalışma sonucunda diğer uygulamalarda da olduğu gibi Yunus-90 çeşidinde 5 adet transgenik aday bitki eldesi sağlanmış, fakat yalnızca bir adet eksplantta 1 ayın sonucunda gözlem alınabilmiştir. Diğer iki çeşitte sürdürülebilir bir rejenerasyon sağlanamamıştır. Bu noktada ileriye dönük çalışmalarda plumula eksplantı kullanmak hem riskli hemde uzun zaman alırken, olgunlaşmış embriyo kullanımı hem zamandan kazanç sağlamakta hemde daha fazla bitki oluşumu sağlamaktadır. Sürdürülebilir bir bitki eldesi edilemediği için PCR analizi yapılamıştır.

#### 4.2.4. *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* Hattı ile *In Planta* Gen Aktarım Çalışması

Etüvde 160 °C'de 1.5 saat steril edilen toprak, torf ve perlit bire bir oranında karıştırılarak fasulye tohumları viyollerde kültüre alınmıştır. İklim odasında 25 °C'de % 50 nemde ve 3000 lüx ışıktta 7-10 gün boyunca büyümüşür. Her bir bitki 15 cm derinliğindeki kağıt saksılara kültüre alınmıştır. Fasulye bitkiciklerinin sürgün uçları dikkatli bir şekilde açılarak, steril pamuk yardımı ile bakteriyile inokülasyonu sağlanmıştır (Şekil 4.22.). Uygulama her çeşit için 20 eksplant kullanılarak yapılmıştır (Tablo 4.23.).



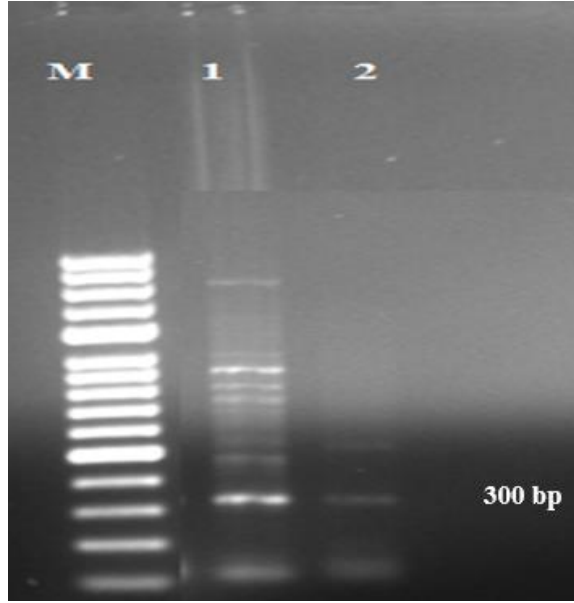
**Şekil 4.22.** *Agrobacterium tumefaciens*'in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in planta* koşullarda makroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarım çalışmaları

**Tablo 4.23.** *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in planta* koşullarda gen aktarım uygulaması

Çeşitler	Kullanılan tohum sayısı	Trangenik adayı bitki sayısı
Yunus-90	20	20
Göynük-98	20	12
Önceler-98	20	18



DNA izolasyonu yapılan örneklerin, LBA 4404 pRGG *bar* *A. tumefaciens* hattıyla elde edilen transgenik aday bitkilerin PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR analizi yapılan bitki sayısı; Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinden birer adet uygulama yapılmış olup, analiz sonuçları PCR + olarak çıkmıştır. PCR analizinde; NPT-II ve LBA 4404 pRGG spesifik *bar* geni primerler kullanılmış ve aktarılan genleri taşıyan transgenik bitkiler teyit edilmiştir. Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerine ait PCR analizi sonuçları Şekil 4.23’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.23.** Fasulyede *in planta* koşullarda transgenik aday bitkilerde *bar* geni varlığının PCR ile teyit edilmesi, 1. (25 °C ) kulvar Yunus 90 PCR+; 2. (25 °C) kulvar Önceler 98 PCR+; M: Markör.

*Agrobacterium tumefaciens*’in *bar* geni taşıyan LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in planta* koşullarda makroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarım çalışmalarında; her bir çeşitten 20 adet tohum kullanılarak bitkiler elde edilmiş ve bu bitkilere 7-10 günlükken makroenjeksiyon yöntemi ile muamele edilmiştir. Muamele sonucunda; Yunus-90 çeşidinden 20 adet, Göynük-98 çeşidinden 12 adet ve son olarak Önceler-98 çeşidinden 18 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkilerden yaprak örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmış daha sonrasında ise PCR analizine tabi tutulmuştur.

PCR analizi sonucunda Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinden alınan örneklerde bant oluşumları gözlemlenerek PCR+ elde edilmiştir.

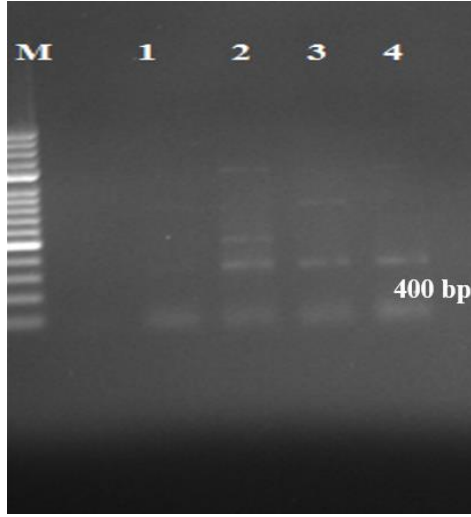
#### 4.2.5. *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 Hattı ile *In Planta* Koşullarda Gen Aktarım Çalışması

Etüvde 160 °C'de 1.5 saat steril edilen toprak, torf ve perlit bire bir oranında karıştırılarak fasulye tohumları viyollerde kültüre alınmıştır. İklim odasında 25 °C'de % 50 nemde ve 3000 lüx ışıkta 7-10 gün boyunca büyümüştür. Her bir bitki 15 cm derinliğindeki kağıt saksılara kültüre alınmıştır. Fasulye bitkiciklerinin sürgün uçları dikkatli bir şekilde açılarak, steril pamuk yardımı ile bakteriyel inokülasyonu sağlanmıştır. Uygulama her çeşit için 20 eksplant kullanılarak yapılmıştır (Tablo 4.24.).

**Tablo 4.24.** *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 hattı ile *in planta* koşullarda gen aktarım uygulaması

Uygulama	Çeşitler					
	Yunus-90		Göynük-98		Önceler-98	
	Kullanılan tohum sayısı	Transgenik aday bitki sayısı	Kullanılan tohum sayısı	Transgenik aday bitki sayısı	Kullanılan tohum sayısı	Transgenik aday bitki sayısı
<b>GV2260 In planta Tohum</b>	20	19	20	11	20	16

DNA izolasyonu yapılan örneklerin, GV2260 *A. tumefaciens* hattıyla elde edilen transgenik aday bitkilerin PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR analizi yapılan bitki sayısı; Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinden birer adet uygulama yapılmış olup, analiz sonuçları PCR + olarak çıkmıştır. PCR analizinde; Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 çeşitlerine ait PCR analizi sonuçları Şekil 4.24'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.24.** Fasulyede *in planta* koşullarda transjenik aday bitkilerde GV2260 geni varlığının PCR analizi ile teyit edilmesi, 1. (25 °C ) kulvar Yunus-90 PCR+; 2. (25 °C ) kulvar Göynük-98 PCR+; 3. (25 °C ) kulvar Önceler 98 PCR+ ; 4. (25 °C ) kulvar Göynük-98 PCR+; M: Markör.

PCR sonuçlarına bakıldığında; Yunus-90, Göynük-98 ve Önceler-98 çeşitlerine ait örneklerde bant oluşumları gözlemlenerek, PCR+ elde edilmiştir. Genel olarak gen aktarım kısmındaki tüm uygulamalara Tablo 4.25 'de yer verilmiştir.

**Tablo 4.25.** Fasulyenin Yunus-90, Göynük-98, Önceler-98 çeşitlerine *Agrobacterium tumefaciens*'in LBA4404 pRGG bar ve GV2260 hatları ile gen aktarımı sonucunda elde edilen transjenik aday bitki sayısı (adet)

UYGULAMALAR	ÇEŞİTLER			
	Kültüre alınan eksplant sayısı	Yunus-90 Transjenik aday bitki sayısı	Göynük-98 Transjenik aday bitki sayısı	Önceler-98 Transjenik aday bitki sayısı
<b>LBA 4404 pRGG bar</b>				
<i>In vitro</i> Tohum	80	76	0	40
<b>GV2260</b>				
<i>In vitro</i> Tohum	80	78	0	47
<b>LBA 4404 pRGG bar</b>				
<i>In vitro</i> Plumula	15	5	0	1
<b>LBA 4404 pRGG bar</b>				
<i>In planta</i> Tüm bitki	20	20	12	18
<b>GV2260</b>				
<i>In planta</i> Tüm bitki	20	19	11	16

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tohumlar ticari çamaşır suyunun (% 5'lik Ace®, NaOCl) % 5, 10, 25 ve 50'lik dozları ile 5, 10 ve 20 dk.'lık sürelerde sterilizasyona tabi tutulmuştur ve kullanılan süre ve dozların hiç birinde bulaşıklık gözlenmemiştir. Yunus-90 fasulye çeşidine ait tohumlarda MS besin ortamlarına ekimi yapıldıktan bir ay sonra en fazla çimlenme oranı (%) ve kontaminasyon oranı (%) sırasıyla % 100 ve % 0 olarak % 10 NaOCl'de 10 dk uygulamasında elde edilmiştir. Göynük-98 fasulye çeşidinde yine aynı doz ve sürede en fazla çimlenme % 46.66 olarak gerçekleşmiştir. Önceler-98'de maksimum çimlenme % 5 NaOCl'de 20 dk da % 66.66 oranında gerçekleşmiştir. Duncan testine bakıldığında ise Yunus-90 çeşidi için elde edilen çimlenme, % 13-100 arasında olurken bu durum Göynük-98'de % 13-46 iken Önceler-98 çeşidinde ise % 20-66 arasında değişmiştir.

Çimlenme oranlarında artış sağlamak amacıyla yapılan tohumların filtre kağıdı ile çimlendirilmesi çalışmasında; filtre kağıtlarının MS besin ortamı üzerine yerleştirilerek yapılan çalışmada steril edilen tohumlar steril saf suda 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra bir beher içerisine konulan steril saf su ile filtre kâğıtları ıslatılmıştır. Yaklaşık olarak 15 ml MS ortamının bulunduğu magenta kapları içerisine yerleştirilen filtre kağıtları üzerine tohumlar konularak kapakları streç film kullanılarak kapatılmıştır. Bu yöntemle Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinde % 100, Göynük-98 çeşidinde % 50 oranında çimlenme gözlenmiştir. Filtre kağıtlarının MS besin ortamı olmaksızın magenta kabı içerisine yerleştirilmesi şeklinde uygulanan diğer çalışmada ise her üç çeşidin çimlenme oranı % 100 olmuştur.

Bitki tohumlarının canlılık tespiti için yapılan 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit (TTC) yöntemi sonuçlarına göre fasulyenin Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerine ait tohumların hepsinde 24 saat sonunda tam kırmızıya boyanma gözlemlenmiş ancak Göynük-98 fasulye tohumlarının bir kısmı pembeye yakın boyanmış olup, canlılıklarının diğer iki çeşide göre daha düşük kaldığı gözlemlenmiştir.

Fasulyenin olgunlaşmış embriyolarından sürgün rejenerasyonu üzerine ön muamelesi uygulamasının etkisi çalışmasında yapılan gözlemlerde; kök ve sürgün

oluşumu görülmemiştir. Dört hafta sonunda; Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinde olgunlaşmış embriyolardan herhangi bir gelişme olmadığı gözlemlenmiştir. Her üç çeşidin MS kontrol ortamlarında gelişme gösterdiği gözlemlenirken; Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitlerinde sürgün ve kök oluşumu, Göynük-98 çeşidine göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Göynük 98 çeşidinin her iki denemede de kontaminasyon oluşumunun gelişimi engellediği görülmüştür. Genel olarak bakıldığında ise sterilizasyon protokolünün belirlenmesi kısmından son gözlemlere kadar kullanılan çeşitler içerisinde Göynük-98 çeşidi her aşamada olumsuz sonuçlar verirken Yunus-90 ve Önceler-98 çeşitleri ise tam tersi yönde olumlu bir gelişim göstermiştir. Fakat her 3 çeşit içinde ön muamele (10 mg/l IAA) ve BAP oranlı ortamlar sürgün oluşumu için ideal bir zemin oluşturamamıştır. Buradan elde edilen sonuç doğrultusunda; fasulyede embriyogenesis tek bir aşamada etkili bir yöntem olabilmıştır. Sürdürülebilir bir yöntem olabilmesi için daha detaylı bir çalışma yapılması gerektiği sonucuna varılmış fakat şu anki sonuçlar gelecek aşamalar için ümitvaridir.

Çeşitler arasındaki morfolojik farklılıklar çalışma seyrini de olumlu ve olumsuz yönde etkilemiştir. Tüm bu aşamalar göz önüne alındığında 3 çeşit içerisinde Yunus-90 çeşidi her anlamda daha dirençli çıkmıştır. Göynük-90 çeşidinin embriyo çıkartma aşamasında tohum yapısının genel olarak dağılması ve embriyolarının çok hassas olması, diğer çeşitlerden iki kat fazla tohum kullanılmasına neden olmuştur. Kontaminasyon etkisini yoğun olarak bu çeşitte görülmesi yapısal olarak hassas olması kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Diğer çeşitlerde böyle bir soruna rastlanmazken, Göynük-90 çeşidinin bekleme süresinin 24 saatten 10 saate düşürülmesi embriyo ve tohum kaybını azalttığı gözlemlenmiştir.

Ön muamele uygulaması; tam anlamıyla *in vivo* şartlardaki gibi bir gelişimi bize *in vitro* şartlarda sağlarken zamandan ve alandan risksiz kazanç sağlamaktadır. Yunus-90 çeşidinde MS'da % 100 sürgün rejenerasyonu gözlemlenirken, kontaminasyon hiç görülmemiştir. Ön muamele + MS uygulamasında yapılan ekimlere kıyasla; sürgün, kök, gövde ve yaprak oluşumlarının, BAP'ın dört farklı oranı ve MS kontrol besi ortamına yapılan ekimlerden daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan IAA

oranı iki çeşidin kontrolünde çıkış olmasını sağlamış fakat doz değişmesinin gelişim üzerine de etkili olup olamayacağı sorularını da akla getirmiştir. Bir sonraki çalışma ile bu farklılık üzerine ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Fasulyenin üç çeşidinde apikal meristemlere farklı oranlarda BAP+NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu oluşumu üzerine etkisine bakıldığında; *in vitro* koşullarda çimlendirme aşamasında bile Göynük-98 çeşidinde çıkışlarda sorun yaşanmış ve diğer iki çeşide göre iki katı tohum kaybı gözlemlenmiştir. Bu kaybı en aza indirmek için farklı yöntemler denenmiş ve en az kaybın filtre kağıdı + MS ortamında elde edilmiştir. Elde edilen bitkiciklerden alınan apikal meristemler, BAP'ın dört farklı dozu ile NAA'nın varlığında (0,25 mg/l) ve NAA kullanılmadan denemeler kurulmuştur. Çeşit bazlı kıyaslama bu çalışmada sadece çimlenmedeki başarı ile kıyaslanabilmiştir. Çünkü yaygın bir kontaminasyon gözlemlenmiş ve analiz edilebilecek bir sonuç rakamsal olarak alınamamıştır. İkinci gün itibari ile Göynük-98, üçüncü ve dördüncü gün itibari ile ise Önceler-98 ve Yunus-90 çeşitlerinde kontaminasyon tüm apikal meristemlere yayılmıştır. Apikal meristemlerden sürgün elde edebilmek için filtre kağıdı yöntemi denenmiş fakat bakteriyel kökenli kontaminasyon burada da görülmüştür. Aynı uygulamanın ön muamele yöntemi kullanılarak da denemesi kurulmuş fakat 5 günlük ön muamele ortamından sonra BAP ve NAA'lı ortamlara konulduğunda kontaminasyon gözlemlenmiştir. 10 mg/l IAA ortamında kontaminasyonun 5 gün boyunca yok denecek kadar az görülmesi farklı besin ortamlarının kullanılması ile elde edilecek sonucun seyrini değiştirebileceği düşüncesini doğurmaktadır. Bu aşamada ileriye dönük farklı yöntem ve uygulamalar ile olumlu bir sonuç elde edilebileceği amaçlanmıştır.

*In vitro* koşullarda geliştirilen bitkiciklerin dış şartlara alıştırılmasında ise öncelikle toprak istekleri bitki gelişimini destekleyen yönde ve bitkilerin *in vivo* şartlardaki hassasiyetleri göz önünde bulundurularak kolay adaptasyon sağlayabilmeleri için otoklavda steril edilmiştir. Magentalardan alınan bitkilerin köklerine zarar verilmeden besin ortamları uzaklaştırılmış, kökleri saf suyla temizlenerek ekimleri gerçekleştirilmiştir. Saksılar sulandıktan sonra üzerlerine 1 hafta duracak steril şeffaf

poşetler geçirilmiştir. İklim odasında  $24 \pm 1$  °C, 3000 lüks ışık 16 saat ışık fotoperiyodu ve % 50 nem sağlanmıştır. Bu süreçte Yunus-90 ve Önceler-98 çeşidine ait bitkilerden adaptasyon sorunundan kaynaklı kayıplar görülmüştür. Fakat iki aylık gözlemler sonucunda bakla oluşumu ve ardından tohum oluşumu gözlemlenmiştir. Elde edilen tohumlarda fiziksel deformasyon gözlemlenmemiştir. Çalışmanın bu basamağı iki çeşit için gözlemlenebilir ve analiz edilebilir olumlu sonuçlar elde etmemizi sağlamıştır. Aynı zamanda gen transformasyonu için iyi bir zemin ve yöntem olduğu sonucuna varılmasında ışık tutmuştur.

Gen aktarım çalışmaları kısmında amaç en başından da belirtildiği üzere herbisit toleranslı bitkiler elde etmektir. *A. tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı çalışmasında, bakteri materyali olarak LBA 4404 pRGG ve GV2260 bakteri hatları kullanılarak herbisitlere dayanıklılık geni olan *bar* geni fasulye çeşitlerine aktarılmıştır. *In vitro* koşullarda yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohum eksplantları *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile 30 dk muamele edildikten sonra steril filtre kağıtlarında, tohum yüzeyinde kalan su emdirilerek; iki farklı kokültivasyon süresi (24-48 saat) ile sıcaklık (25-28 °C) denenmiştir. Uygulama süreci boyunca eksplantlar, iklim odası ve iklim dolabında muhafaza edilmiştir. Eksplantlar 50 mg/l kanamisin monosülfat, 2.5 mg/l fosfotrisin ile 500 mg/l Augmentin bakteriostatik içeren MS seleksiyon ortamına kültüre alınmıştır. Daha sonra, transgenik aday bitkiler 160 °C sıcaklıkta ve 1.5 saat süre ile steril edilmiş torf ve perlit (1:1) içeren saksılara aktarılmış olup, 25 °C sıcaklığında ve üzerleri poşet ile kapatılarak gelişmeleri takip edilmiştir. Adaptasyon sonunda elde edilen transgenik aday bitkiler çeşitlere göre bakıldığında; Yunus-90 çeşidinde kayıp yok denecek kadar azken, Önceler-98 çeşidinde ortalama olarak % 53 kayıp ile transgenik aday bitkiler görülmektedir. Göynük-98 çeşidinde ise kurulan dört farklı deneme sonucunda herhangi bir transgenik aday bitki elde edilememiştir. Uygulamalara bakıldığında LBA 4404 pRGG *bar* hattı için; Yunus-90 çeşidinde 1. günde 28 °C'de % 100 başarı elde edilirken, aynı uygulamada Önceler -98 çeşidinde 9 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. Önceler-98 çeşidinin en iyi sonucu ise 2. günde 25 °C'de 13 adet transgenik aday bitki elde edilerek olmuştur. Aynı uygulamanın

GV2260 gen aktarılmış oranlarında bakıldığında; Yunus-90 çeşidinde 1. gün 25 °C’de ve 1. gün 28 °C’de % 100 başarı sağlanırken, Önceler-98 çeşidinde ise 1. gün 25 °C’de uygulama ile % 65’lik başarı ile en az kayıp sağlanmıştır. Gen aktarım hatlarına bakıldığında ise LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile Yunus-90 çeşidinden 76 adet, Önceler-98 çeşidinden ise 40 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. GV2260 bakteri hattı ile Yunus-90 çeşidinden 78 adet, Önceler-98 çeşidinden ise 47 adet transgenik aday bitki elde edilmiştir. Elde edilen rakamsal veriler sonucunda her iki bakteri hattını kıyaslayacak olursak; GV2260 bakteri hattının, LBA 4404 pRGG *bar* hattından daha fazla transgenik aday bitki elde edilgi sonucuna varılmıştır. Bu farklılığa bakteriler arası adaptasyonun sebep olabileceği düşünülürken uygulamalar arası farklılık da göz önünde bulundurulmuştur. Fakat bakteri hatları dışında kalan tüm muameleler her iki bakteri içinde stabil olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada iki ayrı bakteri ile dört farklı uygulama yapılmış ve her iki çeşitten elde edilen transgenik aday bitkiler dış koşullara alıştırıldıktan sonra bakla ve tohum oluşumu gözlemlenmiştir.

Gen aktarımında farklı bir deneme ise ön muamele uygulaması ile 5 gün 10 mg/l IAA ortamında bekletilen olgunlaşmış embriyolardan alınan plumula eksplantları LBA 4404 pRGG *bar* geni hattı ile muamele edilerek köklenme oluşumunun gözlemlenebileceğine bakılmıştır. *Agrobacterium tumefaciens*’in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ile *in vitro* koşullarda geliştirilen fasulyenin plumula eksplantlarına gen aktarım çalışmasında; Yunus-90 çeşidinde kullanılan 15 örnekten 5 adet transgenik aday bitki elde edilmiş ve yalnızca bir tane örnekte kök oluşumu gözlemlenmiştir. Önceler-98 çeşidinde 15 örnekten 1 adet aday bitki elde edilirken herhangi bir kök oluşumuna rastlanmamıştır. Göynük-98 çeşidinde ise hiçbir şekilde transgenik aday bitki eldesi olmamıştır. Bu yüzden PCR analizi bu çalışmada yapılamıştır.

*Agrobacterium tumefaciens*’in LBA 4404 pRGG *bar* hattı ve GV2260 geni ile *in planta* koşullarda makroenjeksiyon yöntemi ile gen aktarım çalışmalarında; steril edilen toprak, torf ve perlit karışıma üç çeşide ait tohumlar kültüre alınmıştır. İklim odasında 25 °C’de % 50 nemde ve 3000 lüks ışıkta 7-10 gün boyunca büyüyen bitkilerin sürgün uçlarına steril pamuk yardımı ile bakteriyle inokülasyon sağlanmıştır. LBA 4404 pRGG



*bar* hattı ile yapılan in planta yönteminde sırasıyla; Yunus-90 çeşidinde 20 adet (% 100), Göynük-98 çeşidinde 12 adet ve son olarak Önceler-98 çeşidinde ise 18 adet transgenik adayı bitki elde edilmiştir. Aynı uygulamanın GV2260 gen hattı aktarılmış halinde ise Yunus-90 çeşidinde 19 adet, Göynük-98 çeşidinde 11 adet ve son olarak Önceler-98 çeşidinde ise 16 adet transgenik adayı bitki gözlemlenmiştir. Bu uygulamada dış koşullara adaptasyonda hiç bir zorluğa rastlanmazken, transgenik adayı bitki eldesinin yanı sıra bu bitkilerden sağlıklı tohumlar da elde edilmiştir. Çeşitlerden alınan tohumlar etiketlenerek çalışmanın devamı nitelikte olacak olan bir sonraki adımda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Günümüzde, küresel anlamda, modern biyoteknoloji çalışmalarının en yaygın kullanımı bitkisel biyoteknoloji alanındadır. Biyoteknoloji ile ilgili ekonomik göstergeler, bu bilim dalından yararlanma olanaklarının önümüzdeki dönemlerde daha da artacağını göstermektedir. Ülkemizin biyoteknolojiden minimum risk ve maksimum fayda ile yararlanabilmesi için teknoloji transfer eden ülke konumundan, teknolojiyi geliştirebilen ülke konumuna gelmesi gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahmed, E. E.; Bisztray, G. Y. D.; Velich, I. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Acta Biologica Szegediensis*, **2002**, 46(3-4): 27-28.
- Akçin, A. *Yemelik Tane Baklagiller*, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 8. *Konya*, **1988**.
- Akgün, İ.; Tosun, M.; Sağsöz, S. *Biyoteknoloji ve bitki ıslahındaki kullanım alanları. Atatürk Üniv. Zir. Fak. Derg.*, **1996**, 27 (2): 312-323.
- Amugune, B. Anyango, and T. K.Mukiama, **2011**. "Agrobacterium- mediated transformation of common bean," *AfricanCrop Science Journal*, vol. 19, no. 3, pp. 137–147.
- Andradf-Aguilar, J. A.; Jackson, M. T. *Attempts at interspecific hybridization between Phaseolus vulgaris L. and P. acutifolius A. Gray-Using Embryo Rescue, Plant breeding*, **1988**, 101(3), 173-180.
- Anonim, 2016. *Besin Değerleri*, Erişim: <http://www.besindegerleri.gen.tr/> Erişim Tarihi: 01.11.2016
- Aragao, F. J. L.; Barros, L. M. G.; Brasileiro, A. C. M.; Ribeiro, S. G.; Smith, F. D.; Sanford, J. C.; Rech, E. L. *Inheritance of foreign genes in transgenic bean (Phaseolus vulgaris L.) co-transformed via particle bombardment, Theoretical and Applied Genetics*, **1996**, 93(1-2), 142-150.
- Aragao, F. J.; Vianna, G. R.; Albino, M.; Rech, E. L. *Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. Crop Science*, **2002**, 42(4), 1298-1302.
- Arellano, J.; Fuentes, S.I.; Castillo-Espana, P.; Hernandez, G. *Regeneration of different cultivars of common bean (Phaseolus vulgaris L.) via indirect organogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult*, **2009**, 96:1–11.
- Babaoğlu, M.; Yorgancılar, M.; Akbudak, M.A. *Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. *Konya*, **2001**.
- Baudoin, J. P.; Silue, S.; Geerts, P.; Mergeai, G.; Jacquemin, J. M.; Toussaint, A. *Interspecific hybridization with Phaseolus vulgaris L.: embryo development and its genetics, Recent Research Developments in Genetics & Breeding*. **2004**, 1 (2).

- Brasileiro, A. C. M.; Aragão, F. J. L.; Rossi, S.; Dusi, D. M. A.; Barros, L. M. G.; Rech, E. L. *Susceptibility of common and tepary beans to Agrobacterium spp. strains and improvement of Agrobacterium-mediated transformation using microprojectile bombardment, Journal of the American Society for Horticultural Science*, **1996**, 121(5), 810-815.
- Brown, K. L., Brick, M. A., Weisner, L. E., & Manalo, J. R. **1996**. *Germination vs Embryo Rescue of Aged Common Bean Seed*. Annual Report-Bean Improvement Cooperative, 39, 156-157.
- Bügem, **2017**.<https://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf>
- Çevrim, M., **2007**, Fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) partikül bombardımanı. (biyolistik) yöntemiyle gen aktarımının optimizasyonu Erciyes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Dang, W., Wei, Z. M. **2009**. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. *Biologia plantarum*, 53(2), 312-316.
- De Carvalho, M. H. C., Van Le, B., Zuily-Fodil, Y., Thi, A. T. P., & Van, K. T. T. **2000**. *Efficient whole plant regeneration of common bean (Phaseolus vulgaris L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate*. Plant science, 159(2), 223-232.
- Demir, İ., Ellialtıoğlu, Ş., Tıprıdamaz, R., **1994**. The effect of different priming treatments on reparability of aged eggplant seeds. *Acta Horticulturae*, 362: 205-212.
- Dillen, W., Engler, G., Van Montagu, M., & Angenon, G. **1995**. *Electroporation-mediated DNA delivery to seedling tissues ofPhaseolus vulgaris L.(common bean)*. Plant cell reports, 15(1-2), 119-124.
- Encina, A. E., Moral, R. M., Acebes, J. L., & Alvarez, J. M. **2001**. Characterization of cell walls in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to dichlobenil. *Plant Science*, 160(2), 331-339.
- Erdinç, C., Türkmen, O., Demir, S., & Sensoy, S. **2017**. Determination Of The Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. And Magn.) Lambs. Scrib.) Resistance In Some Turkish Bean Genotypes By Artificial Inoculation and Molecular Methods. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(1), 175-185.
- Ermolli, M., Prospero, A., Balla, B., Querci, M., Mazzeo, A., & Van den Eede, G. **2006**. Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and Cry1AB

- genetically modified protein detection and quantification. *Food additives and contaminants*, 23(9), 876-882.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., ... & Li, D. **2006**. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(12), 1385-1393.
- Faostat. **2017**. FAO verileri. <http://faostat3.fao.org/compare/E> Erişim Tarihi: 01.02.2017
- Faria, J. C., Albino, M. M., Dias, B. B., Cançado, L. J., da Cunha, N. B., Silva, L. D. M., ... & Aragão, F. J. **2006**. Partial resistance to Bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated rep gene. *Plant Science*, 171(5), 565-571.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Twyman, R. M. **2004**. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant Biology*, 7(2), 152-158.
- Gatica Arias, A. M., Muñoz Valverde, J., Ramírez Fonseca, P., & Valdez Melara, M. **2010**. In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic journal of Biotechnology*, 13(1), 6-7.
- Geerts, P., Druart, P., Ochatt, S., Baudoin, J. P. **2008**. Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12(1), 41-46.
- Gepts P. **2008**. *Tropical environments, biodiversity, and the origin of crops*. Pp. 1–20 in P Moore and R Ming (eds.) *Genomics of Tropical Crop Plants*. Germany.
- GTHB. **2014**. *Yemeklik Baklagil Çalıştayı*. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü. Ankara
- Gürlek, D., **2006**. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Nohut Geveni (*Astragalus cicer* L.)'ne Gen Aktarımı Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- Hız, M.C., **2015**. Tuz stresi altında taze fasulye bitkisinin transkriptom analizi ve tuza cevap veren genlerin işlevsel analizleri, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 145 s.
- Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M. J., & Kitamura, K. **1996**. *Bruchid* resistance of transgenic azuki bean expressing seed  $\alpha$ -amylase inhibitor of common bean. *Entomologia experimentalis et applicata*, 79(3), 309-315.

- ISTA, **1995**. International rules for seed testing. Seed Science and Technology, (ISTA), 21, 160-186.
- Kahraman, A. **2008**. *Konya Bölgesinde Yetiştirilen Bodur Kuru Fasulye (Phaseolus vulgaris L.) Populasyonlarının Genetik Farklılıklarının ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Kantar, F., & Güvenç, İ. (1995). FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)'de Tane Rengi ile Tohum Kalitesi İlişkisi. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 26(2).
- Kempken ve Kempken, R.K.I., **2001-2004**. *Gentechnik bei Pflanzen*. 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag.
- 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.
- Leon, P., Planckaert, F., Walbot, V. **1991**. Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. *Plant physiology*, 95(3), 968-972.
- Liu, Z., Park, B. J., Kanno, A., 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. *Molecular Breeding*, 16(3), 189.
- Malik KA, Saxena PK **1992**. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L; High frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6BAP and Thidiazuron. *Planta* 186:384-389.
- Mohamed, M. F., Coyne, D. P., & Read, P. E. **1993**. *Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(1), 158-162.
- Mohamed, S. V., Sung, J. M., Jeng, T. L., Wang, C. S. **2006**. *Organogenesis of Phaseolus angularis L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(2), 187-199.xembre
- Mrabet, M., Mnasri, B., Romdhane, S. B., Laguerre, G., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. **2006**. *Agrobacterium strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by Rhizobium gallicum*. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 304-309.

- Mukeshimana, G., Ma, Y., Walworth, A. E., Song, G. Q., Kelly, J. D. **2013**. *Factors influencing regeneration and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*, *Plant biotechnology reports*, 7(1), 59-70.
- Mustafa, H. S., Oraibi, A. G., Ibrahim, K. M., Ibrahim, N. K. **2017**. Influence of Silver and Copper Nanoparticles on Physiological Characteristics of Phaseolus vulgaris L. in vitro and in vivo. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(1), 834-843.
- Nguyen, T., & Sticklen, M. **2012**. *Genetic transformation of common bean (Phaseolus vulgaris L.) with the gus color marker, the bar herbicide resistance, and the barley (Hordeum vulgare) HVA1 drought tolerance genes*. *International Journal of Agronomy*, 2012.
- Ölçer, H. **2001**. *Transgenik Bitkiler: Tarımsal Uygulamaları, Üretim ve Tüketiminin Kontrolü*, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Cilt: 10. Sayı: 40. Sayfa: 21-24. *Kütahya*
- Özdemir, S. **2002**. *Yemeklik Baklagiller*. Hasat Yayıncılık, İstanbul.
- Parker, J. P., & Michaels, T. E. **1986**. *Simple genetic control of hybrid plant development in interspecific crosses between Phaseolus vulgaris L. and P. acutifolius A. Gray*. *Plant breeding*, 97(4), 315-323.
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P., & Hurrell, R. F. **2015**. *The potential of the common bean (Phaseolus vulgaris) as a vehicle for iron biofortification*. *Nutrients*, 7(2), 1144-1173.
- Rossi GB, Valentim-Neto PA, Blank M, Faria JC<sup>1</sup>, Arisi ACM *J Agric Food Chem*. **2017**. Aug 30;65(34):7588-7597. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03220. Epub 2017 Aug 21.
- Sağlam, S., **2004**. *Fasulye (Phaseolus vulgaris L.)'de Doku Kültürü ve Agrobacterium Aracılığı İle Gen Aktarımı*. (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sağlam, S., **2009**. *Tohum Böceklerine (Bruchidae: Coleoptera) Dayanıklı Transgenik Fasulye (Phaseolus Vulgaris L.) Bitkilerinin Elde Edilmesine Yönelik Araştırmalar*. (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Saglam S. **2007**. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinde Olgunlaşmış Embriyolardan Adventif Sürgün Rejenerasyonu Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Saglam, S., Çiftçi, C. Y., Khawar, K. M., Atak, M., & Özcan, S. **2005**. Fasulye Bitkisine *In Planta* Koşullarda Gen Aktarımı. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, 258,
- Saglam, S., Çiftçi, C. Y., Khawar, K. M., Atak, M., Özcan, S. **2005**. *In Vitro* Koşullarda Fasulye Bitkisine Dört Yapraklı Aşamada Transformasyon Çalışmaları. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*,18(2), 291-294.
- Saglam S, Khawar K. M., Çiftçi CY, Özcan S. **2009**. *In vitro* Koşullarda Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisine. Yüksek BAP Ön Muamelesi ve Sonikasyon Metodu ile Gen Aktarımı, 16. *Ulusal biyoteknoloji kongresi*, 13-16 Aralık, Antalya
- Sanchez, S. D., Ruiz, M. S., Maldonado, SH. G., Pineda, E. V., Chavira, M. G., Velazquez, S. **2006**. *common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Plant Science. Cilt 170, Sayı 4, Sayfa 822-827, *İrlanda*.
- Sepetoğlu, H. **2002**. *Yemeklik Dane Baklagiller Ders Kitabı*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, *İzmir*.
- Serçe, S., & Hancock, J. F. **2003**. Assessment of day-neutrality scoring methods in strawberry families grown in greenhouse and field environments. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27(4), 191-198.
- Sonnante, G., Stockton, T., Nodari, R. O., Velásquez, V. B., & Gepts, P. **1994**. *Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Theoretical and Applied Genetics, 89(5), 629-635.
- Taşyapan, S. S. N. **2010**. Nohut Bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) *Agrobacterium* Aracılı Gen Transferini Etkinleştirilmesi için Vakum İnfiltrasyonu ve Sonikasyonun Birlikte Kullanılmasının Karşılaştırılması. (Yüksek Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, KAYSERİ.
- Toubart, P., Desiderio, A., Salvi, G., Cervone, F., Daroda, L., Lorenzo, G., Albersheim, P. **1992**. *Cloning and characterization of the gene encoding the endo polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of Phaseolus vulgaris L.* The Plant Journal, 2(3), 367-373.
- Ulukapı, K.; Onus, A. N. **2012**. *Selekte Edilmiş Bazı Yerel Taze Fasulye (Phaseolus vulgaris L.) Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi-Tarım Bilimleri Dergisi.

- Vardar Kanlítepe, Ç.; Aras, S.; Cansaran, D. **2010**. *Bitki Islahında Moleküler Belirteçlerin Kullanımı ve Gen Aktarımı*. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 67 (1): 36-45.
- Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S. P., & Perl, A. **2005**. *In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (Phaseolus vulgaris L.)—problems and progress*. Scientia Horticulturae, 107(1), 2-10.
- Welsh, **2010**. [http://blogs.discovermagazine.com/discoblog/2010/12/08/a-creepy-monster-of-the-forest-the-albino-vampiric-redwood-tree/#.Wm3Rma5l\\_IV](http://blogs.discovermagazine.com/discoblog/2010/12/08/a-creepy-monster-of-the-forest-the-albino-vampiric-redwood-tree/#.Wm3Rma5l_IV)
- Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Van Montagu, M., Terryn, N., Angenon, G. **2005**. A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (teparty bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. Theoretical and applied genetics, 110(5), 914-924.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem ÜNER  
Doğum Yeri : Antalya  
Doğum Tarihi: 10.02.1992  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurumu ve Yıl)

Lise: Gazipaşa Anadolu Lisesi (2010)

Lisans: Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü  
(2015)

Yüksek Lisans: Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji  
Anabilim Dalı (2015-2018)

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- 2013, Ege Üniversitesi Totem (Tohum Araştırma Merkezi- 3 ay stajyer)
- 2017, Şekerbank T.A.Ş Yetkili Yardımcısı

### Yayımlar/Kongreler/Eğitimler/Seminerler

- 1. Tarım Çalıştayı, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, ( Çifçi/ Ziraat Mühendisi buluşması)-2013.
- 11. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi, Diyarbakır Dicle Üniversitesi-2015.
- 5. Uluslararası Öğrenci Tarım Kongresi, Adana Çukurova Üniversitesi-2015.
- Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji A.B.D. Yüksek Lisans Semineri, Fasulye Islahında Biyoteknoloji -2016.
- 6. Uluslararası Öğrenci Tarım Kongresi, Ankara Üniversitesi-2016.
- 7. Uluslararası Öğrenci Tarım Kongresi, Selçuk Üniversitesi-2017.
- Training Course ‘Impact of Inasive Alien Species on Biodiversity and Ecosystem Services in Extreme Environments’ Eğitim Kursu/ İngilizce Sofya/BULGARİSTAN-2017.
- BAP Projesi, Transgenik Adayı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkilerinin Moleküler Analizi, 2018.