

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KURAKLIKLA İLİŞKİLİ MİR408 GENİNİN NOHUT (*Cicer arietinum* L.)
BİTKİSİNE *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA AKTARILMASI**

Mortaza HAJYZADEH

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mortaza HAJYZADEH tarafından hazırlanan “**Kuraklıkla İlişkili miR408 geninin Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Aktarılması**” adlı tez çalışması 13/10/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Orhan ARSLAN
Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Hayrettin KENDİR
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Cengiz SANCAK
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Cengiz BALOĞLU
Kastamonu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

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

13.10.2014

Mortaza HAJYZADEH

ÖZET

Doktora Tezi

KURAKLIKLAR İLİŞKİLİ MİR408 GENİNİN NOHUT (*Cicer arietinum* L.)
BİTKİSİNE *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA AKTARILMASI

Mortaza HAJYZADEH

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Nohut (*Cicer arietinum* L.) protein, vitamin ve mineral maddelerce zengin önemli bir yemeklik tane baklagil bitkisidir. Nohut bitkisi baklagil üretiminin üçte birini oluşturmakta ve yetersiz beslenme sorunlarının giderilmesinde önemli rol oynamaktadır. Yaşam süreleri boyunca nohut bitkisi kuraklık stresinden olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu stresi tozle edebilmeleri için bitkiler nohut dahil olmak üzere karmaşık bir gen regülasyon kompleksi içermektedirler. MikroRNA'lar kodlanmayan küçük RNA ailesinde olup, hedef genlerinin ifadelerini transkripsiyon sonrası düzeyde regüle etmektedirler. Bu ailenin üyesi olan miR408 abiyotik stres çalışmaları sonucunda kuraklık stresine karşı ifade seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Fakat miR408'in günümüze kadar biyolojik işlevi ve fonksiyonu bilinmemektedir; ancak, kuraklık stresinde miR408 ekspresiyon seviyesinde artış izlenmektedir. Bu çalışmada, ilk aşamada BAP, GA3 ve BAP + GA3 ön muamelesiyle ve daha sonra farklı oranda BAP + NAA içeren MS ortamında yüksek oranda Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin nohut çeşidlerinde plumula ve embriyonik eksen eksplantlarından yüksek oranda bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Çalışmanın 2. aşamasında ise nohut bitkisinin Gökçe çeşidine ait embriyo eksplantları kullanarak *Agrobacterium tumefaciens*'nin LBA4404 suşunun miR408 pEARLYGATE103 içeren hattıyla kuraklığa dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir. Çalışmada, transgenik miR408 içeren bitkileri, 17 gün kuraklık koşulları altında tutulmuştur. Transgenik bitkileri, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında her hangi bir kuraklık belirteci göstermeden hayatta kalmayı başardıkları izlenmiştir. qRT PCR analizi sonucunda transgenik bitkilerinde yüksek seviyede miR408 ekspresiyonu izlenmiş olup, buna karşın hedefi olan *plantacyanin* genin ekspresiyon seviyesinde azalma tespit edilmiştir.

Ekim 2014, 137 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nohut, *cicer arietinum* L., biki rejenerasyonu, *Agrobacterium tumefaciens*, gen aktarımı, miR408, gelişme, bakır birikimi, *plantacyanin* qRT-PCR

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

TRANSFORMATION OF CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) WITH DROUGHT GENE RELATED MIR408 GENE USING *Agrobacterium tumefaciens* AS VECTOR

Mortaza HAJYZADEH

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar

Chickpea plants from drought stress during life is affected negatively. Chickpea (*Cicer arietinum* L.); is an important edible grain legume plant rich in protein, vitamins and mineral elements. Chickpea constitute one third of all legumes grown all over the world and play an important role in eliminating the problem of malnutrition. Chickpea plants are negatively affected by drought stress throughout life time. Like so many plants, this stress is regulated by a complex gene regulation mechanism in chickpea plants. microRNAs belong to small non coding RNA families and regulate transcription of target gene expression levels. In this study, BAP in the first stage, GA₃ and BAP + GA₃ pretreatment with and then containing different BAP + NAA high proportion of chickpea Gokce on MS medium, live, plumule in Er99 and Reserves of the chickpea cultivar and obtained plant regeneration from embryonic axes explants. mir408 belonging to this family shows increased level of expression during drought stress. However, mir408 biological functions are not known until today. However, increased level of expression is monitored in drought stress. The first stage of this study, constituted pretreatments with BAP, GA₃ and BAP + GA₃ and thereafter the explants were regenerated on MS medium containing different concentrations of BAP + NAA using chickpea cv. Gokce, Yaşa, Er99 and Akçin plumule and embryonic axis explants. 2nd stage of the study constituted treatment of embryo explants with cv Gökçe using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 with mir408 pearlygate103 line to obtain drought tolerant plants. Transgenic plants containing mir408, were left to drought stress for 17 days in this study. Transgenic plants were compared with control plants and they showed survival without showing any symptom of stress. When transgenic plants were compared with control plants they survived drought stress without showing any sign of stress. qRT-PCR analysis revealed high level of mir408 expression in transgenic plants; whereas, decrease in the level of target plantacyanin gene expression was detected.

October 2014, 137 pages

Key Words: Chickpea, drought stress, plant regeneration, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, miR408, Copper accumulation, plantacyanin qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) ve eş danışman hocam Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e (Çankırı Karatekin Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. miR408 genin içeren plazmislerin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen ve gen aktarımında kullanılan bakteri ırklarını temin eden Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e ayrıca teşekkürü bir borç bilirim. Bilimsel bilgi ve görüşünden sonsuz faydalandığım ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında her türlü destek ve katkılarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) sonsuz teşekkür ederim. Çalışmanın çeşitli aşamalarında, bilimsel ve manevi desteğinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. Serkan Uranbey'e, Dr. Guray AKDOĞAN'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü). Yard. Doç. Dr. Arif İPEK, Yard. Doç. Dr. Sezer OKAY ve Yard. Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ'a (Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) Tik jüri hocalarım Prof. Dr. Orhan ARSLAN'a, Prof. Dr. Hayrettin KENDİR'e ve ders aldığım tüm hocalarıma da sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, çalışmam boyunca sıkıntılı anlarımı paylaştığım ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Huriye YANIK, Hussain Abdullah Ahmed, Araş. Gör. Behcet İNAL, Esmâ ÖZHÜNER'e, ve Alireza MANEVİ'ye, TARBİYOTEK (Ankara Üniversitesi) ve UNVERLAB (Çankırı Karatekin Üniversitesi) laboratuvarlarında çalışan ve isimlerini tek tek yazamadığım bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca eğitimim için hiçbir fedakarlıktan kaçmayan, mutlu ve üzüntülü anlarımı paylaşan sevgili annem, babam, ağabeyim ve kardeşime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunuyorum.

Bu tez çalışmasının farklı aşamalarında, TARBİYOTEKLAB ve UNVERLAB'dan, sağlanan maddi imkanlar ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Mortaza HAJYZADEH
Ankara, Ekim 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	9
2.1 Yemeklik Tane Baklagillerde Doku Kültürü Çalışmaları.....	9
2.2 Agrobacterium tumefaciens ile Nohut Bitkisinde Gen Aktarım.....	
Çalışmaları.....	13
2.3 Mir408'in Kuraklığa Karşı Etkisi.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1 Materyal.....	24
3.1.1 Bitki materyali.....	24
3.1.2 Büyüme düzenleyicileri ve saklama koşulları.....	24
3.1.3 Rejenerasyon için kullanılan eksplantlar.....	24
3.1.4 <i>In vitro</i> 'da Yüzey Sterilizasyonu	25
3.1.5 Eksplant İzolasyonu ve Kültürü.....	25
3.1.6 Bitkilerin <i>in vitro</i> koşullarda bitkilerin dış şartlarına adaptasyonu.....	26
3.2 İstatistiki Analizler.....	27
3.3 Ath Pre-miRNA408'in Klonlanması.....	27
3.3.1 Gateway klonlama.....	29
3.3.2 Ligasyon ürünlerin trasformasyonu.....	29
3.3.3 Elektro Kompotant Hücre Hazırlanması.....	32
3.3.4 Plasmidlerin electroporasyon ile Transformasyonu.....	33
3.4 Gen Aktarım Çalışmaları.....	33
3.4.1 Bakteri materyali.....	33
3.4.2 Bakteri kültürlerinin saflaştırılması ve büyütülmesi.....	33
3.4.3 Antibiyotikler ve kullanım koşulları.....	34
3.4.4 <i>A.tumefaciens</i> Gv2260 hattıyla genaktarım çalışmalarının.....	
optimizasyonu.....	34
3.4.5 <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 (pEARLYGATE103) ve LBA4404.....	
(pEARLYGATE101) bakteri hatları ile Gen Aktarım.....	35
Çalışmaları.....	
3.5 Gen Aktarımı Yapılan Bitkilerin Belirlenmesi.....	36
3.5.1 DNA izolasyonu.....	36
3.5.2 CTAB tamponun hazırlanması.....	37
3.5.3 CTAB yöntemine göre DNA izolasyonu.....	37
3.5.4 Primer dizileri.....	38
3.6 PCR Analizleri.....	39
3.6.1 PCR Programı.....	39
3.6.2 Agaroz jel elektroforezi.....	40
3.6.3 Verilerin değerlendirilmesi.....	40

3.7 Transgenik Bitkilerin Kuraklık Stresi ile Test Edilmesi.....	40
3.8 RNA İzolasyonları ve Saflaştırılması.....	41
3.9 cDNA Sentezi.....	41
3.9.1 cDNA optimizasyonu.....	42
3.10 Real Time (Eş zamanlı) qRT-PCR Uygulamaları.....	42
3.11 miRNA'lara Özgü cDNA sentezi.....	44
3.11.1 miR408'in qRT-PCR ile miktar ölçümü.....	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	47
4.1 Nohut Bitkisinin Yüzey Sterilizasyon.....	47
4.2 Nohut Bitkisinin Doku Kültürü Çalışmalarında Gökçe, Yaşa, Er99 ve.....	
Akçin Çeşitlerinde BAP, GA ₃ , Ve BAP +GA ₃ ile Ön Muamelesi Ve.....	
Mikroçoğaltım Üzerindeki Etkileri.....	49
4.2.1 Gökçe, çeşidine ait plumula eksplantının mikroçoğaltımı.....	50
4.2.2 Yaşa, çeşidine ait plumula, eksplantının mikroçoğaltımı.....	53
4.2.3 Er99, çeşidine ait plumula, eksplantının mikroçoğaltımı.....	56
4.2.4 Akçin çeşidine ait plumula, eksplantının mikroçoğaltımı.....	58
4.2.5 Gökçe çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı.....	61
4.2.7 Yaşa çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı.....	64
4.2.8 Er99 çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı.....	67
4.2.9 Akçin çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı.....	70
4.2.10 Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşidlerine ait radikula, eksplantının.....	
mikroçoğaltımı.....	73
4.3 Gökçe, Yaşa, Akçin Ve Er99 Çeşitlerinde Elde Edilen Sürgünlerin Kök.....	
Rejenerasyonu.....	74
4.3.1 Gökçe, çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin.....	
köklendirilmesi.....	75
4.3.2 Yaşa çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin.....	
köklendirilmesi.....	78
4.3.3 Er 99 çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin.....	
köklendirilmesi.....	81
4.3.4 Akçin çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin.....	
köklendirilmesi.....	83
4.3.5 Gökçe, çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen.....	
sürgünlerin köklendirilmesi.....	85
4.3.6 Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen.....	
sürgünlerin köklendirilmesi.....	87
4.3.7 Er 99 çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen.....	
sürgünlerin köklendirilmesi.....	90
4.3.8 Akçin çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen.....	
sürgünlerin köklendirilmesi.....	92
4.3.9 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu.....	94
4.4 Plasmid Transformasyonun Doğrulanması.....	97
4.5 Gen Aktarım Çalışmaları.....	98
4.5.1 A. tumefaciens 'nin GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile gen	
aktarım.çalışmalarının optimizasyonu.....	98
4.5.2 A. tumefaciens 'in LBA 4404 pEARLYGATE miR408 ve LBA 4404.....	
pEARLYGATE 101 bakteri hatları ile gen aktarımı.....	107
4.5.3 Aday transgenik bitkilerin PCR analizi.....	109

4.5.4 Transgenik bitkilerin kuraklık stresine karşı verdiği tepkiler.....	110
4.5.5 Transgenik miR408 ve kontrol bitkilerin qPCR analizleri.....	113
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	116
5.1 Streilizasyon Çalışmaları.....	116
5.2 Nohut Bitkisinde Yürütülen Bitki Rejenerasyon Çalışmaları.....	117
5.3 Gen Aktarım Çalışmaları.....	119
5.4 Transgenik mir408 Bitkilerinde Kuraklık Stresine Karşın Tolerans.....	119
KAYNAKLAR.....	123
ÖZGEÇMİŞ.....	135

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bp	Baz çifti
dk	Dakika
M	Molarite
Mb	Mega baz çifti
mg	Miligram
ml	mililitre,
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Celsius
pmol	Pikomol
rpm	Santrifüj işleminde dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye

Kısaltmalar

AUG	Augmentin
BAP	6-Benzilaminopurin
cDNA	Komplementer DNA
DCL1	Dicer benzeyen 1
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
F primer	Forward Primer (ileri doğru olan primer)
GUS	P-glukuronidaz
IBA	İndol butirik asit
K.O.	Kareler ortalaması
kDA	Kilodalton
Km	Kanamisinmonosülfat
kPa	Kilopaskal
miRNA(miR)	mikroRNA
mRNA	mesajcı RNA (messenger RNA)
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NA	Nutrient agar
NAA	Naftalenasetik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient broth
Nos	Nopalin sentaz

NptII	Neomisin fosfotransferaz II geni
NPTII	Neomisin fosfotransferaz II
OCI	Oryzasistein-I
p	plazmit
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
Ppt	Fosfonitricin
R	primer Reverse primer (geri yönde olan primer)
RISC	RNA indüklenmiş susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
S.D.	Serbestlik derecesi
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris- Borik asit-EDTA
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
Tm	Erime sıcaklığı
U	Unit
V.K.	Varyasyon kaynakları
Vir	Virulens geni
X-gluc	5 Bromo - 4 kloro - 3 indolil glukoronid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	MikroRNA RISC kompleksine bağlanarak hedef rehber RNA'ya bağlanıp ve parçalar.....	5
Şekil 1.2	streslerden etkilenen miRNA'lar.....	6
Şekil 3.1	pre-miR408 geninin jelelektroforezi görüntüsü.....	28
Şekil 3.2	pre-miR408 geninin M13 primerler eşliğinde koloni PCR sonucu.....	31
Şekil 3.3	Vektörlerin Hazırlanması a: Hazırlanan pEALYGATE103, b: attr1 ve attr2 bölgeleri arasında klonlanmış olan pre-miR408 geni, c: pEARLYGATE101 plazmidi (vektör kontrol).....	32
Şekil 4.1	Nohut tohumlarının yüzey sterilizasyonu	49
Şekil 4.2	Çoklu sürgün elde etmek amacıyla Akçın çeşidine ait 2 günlük aday nohut embriyo eksplantların, a. 25 mg/l BAP, b. 25 mg/l GA ₃ c. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃ ile ön muamele yapılmış eksplantların şematik görüntüsü.....	50
Şekil 4.4	Gökçe çeşidinde a. 25 mg/l BAP ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	53
Şekil 4.5	Yaşa çeşidinde a. 25 mg/l BAP ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.09 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.09 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	55
Şekil 4.6	Er99 çeşidinde A: 25 BAP mg/l ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu B: 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	58
Şekil 4.7	Er99 çeşidinde plumula eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	61
Şekil 4.8	Gökçe çeşidinde embriyonik eksen eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	64
Şekil 4.9	Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	67
Şekil 4.10	Er99 çeşidinde embriyonik eksen eksplantından 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen sürgün rejenerasyonu.....	70
Şekil 4.11	Akçın çeşidinde embriyonik eksen eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	73

Şekil 4.12	Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda Radikula eksplantında elde edilen sürgün rejenerasyonu.....	74
Şekil 4.13	Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi ve farklı BAP - NAA oranlard elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu.....	78
Şekil 4.14	Yaşa çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu.....	80
Şekil 4.15	Er 99 çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu.....	83
Şekil 4.16	Akçin çeşidinde 25 mg/l GA ₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu.....	85
Şekil 4.17	Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantından kök rejenerasyonu.....	87
Şekil 4.18	Yaşa çeşidinde 25 mg/l GA ₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu.....	90
Şekil 4.19	Er 99 çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantının kök rejenerasyonu.....	92
Şekil 4.20	Akçin çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu.....	94
Şekil 4.21	a. Köklendirilmiş bitkilerin saksıya aktarılmadan önce suda bekletilmesi b. saksılara şaşırtılmış bitkilerin üzerine açık mavi ve şeffaf poşetler ile kapatılması.....	96
Şekil 4.22	Elde edilen bitkilerin saksılara aktarılması a. Bitkilerin tırtıta şaşırtılması b. Bitkilerin Dış koşullara alıştırma esnasında poşetlerin ağzlarının açılması.....	96
Şekil 4.23	Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu.....	97
Şekil 4.24	35s primerler ile yapılmış koloni PCR sonucu.....	98
Şekil 4.25	OD600=0.5 bakteri yoğunluğunda inoküle edilen embriyoların a. sürgün seleksiyon ortamında elde edilen sürgünler, b. elde edilen sürgünlerin kök seleksiyon ortamında köklendirmeleri.....	100
Şekil 4.26	a. 35s primerler ile yapılmış PCR sonucu, NTC: negatif kontrol, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: bitki örnekleri, PC: pozitif kontrol, 11: bitki örneği b. <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen OD600=0.5 transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizin sonucu..	100
Şekil 4.27	OD600=0.8 bakteri yoğunluğunda inoküle edilen embriyoların.....	100
Şekil 4.28	a. OD600=0.8 ile inoküle edilen embriyoların 35s primerler ile yapılmış PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, bitki örnekleri, PC: pozitif kontrol ve NTC: negatif kontrol b. <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen OD600=0.8 transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizin sonucu.....	101
Şekil 4.29	OD600=1.5 bakteri yoğunluğunda inoküle edilen embriyoların.....	101
Şekil 4.30	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen embriyonik eksen eksplantından aday transgenik bitkiler.....	102
Şekil 4.31	a. 35s primerler ile yapılmış PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 bitki örnekleri, NTC: negatif kontrol ve PC: pozitif kontrol b. Embriyonik eksen <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen aday transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizin sonucu...	104
Şekil 4.32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen plumula eksplantından aday transgenik bitkiler.....	104

Şekil 4.33	Tek kotiledon embriyo eksplantından <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen aday transgenik bitkiler a. seleksiyon ortamından elde edilen sürgünler b. Yaşayan sürgünlerin seleksiyon ortamında köklendirmeleri.....	105
Şekil 4.34	a. 35s primerler ile yapılmış PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 bitki örnekleri, NTC: nehativ kontrol ve PC: pozitif kontrol b. tek çenekli embriyo kotiledon eksplantında <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile inokülasyon sonucunda elde edilen aday transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizinin sonucu.....	106
Şekil 4.35	Çift kotiledon embriyo eksplantından <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen aday transgenik bitkileri.....	106
Şekil 4.36	a. 35s primerler ile yapılmış PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, bitki örnekleri, PC: pozitif kontrol NTC: nehativ kontrol ve b. çift çenekli embriyo kotiledon eksplantında <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile inokülasyon sonucunda elde edilen aday transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizinin sonucu.....	107
Şekil 4.37	Embriyo eksplantlarının farklı dozlarda PPT içeren MS ortamında optimizasyonu	108
Şekil 4.38	Transgenik miR408 ve kontrol bitkilerin elde edilmesi.....	109
Şekil 4.39	Transgenik miR408 bitkilerin pcr analiz sonuçları.....	110
Şekil 4.40	Transgenik ve kontrol miR408 bitkilerinin kuraklık testleri.....	111
Şekil 4.41	Transgenik ve kontrol bitkilerinde 17 gün kuraklık stresinden sonra yapılan istatistik verilerin analizi A: yaprak sayısı B: bitki boyu.....	112
Şekil 4.42	Temizlenmiş RNA lara ait %2'lik agaroz jel görüntüsü. 1: 35s::miR408, 2: kuraklık stresi ile muamele edilen 35s::bar (kontrol), 3: transgenik olmayan ve kuraklık stresine tabi tutulmayan (mock) bitkisi.....	113
Şekil 4.43	18s optimizasyonun %1'lik agaroz jelde görünümü 1, 2, 3 : 35s::miR408 1/5, 1/10, 1/20 seyrelitmesi, 4, 5, 6: kuraklık stresi ile muamele edilen 35s::bar (kontrol) 1/5, 1/10 ve 1/20 seyrelitmesi, 7, 8, 9: transgenik olmayan ve kuraklık stresine tabi tutulmayan (mock) bitkisi 1/5, 1/10 ve 1/20 seyrelitmesi NTC: negatif kontrol.....	114
Şekil 4.44	qRT analizinin sonuçları a: bar ve b: plantacyanin ekspresyon seviyeleri.	115
Şekil 4.45	qRT analizinin sonucunda elde edilen miR408'in ekspresyon seviyeleri..	115

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	CTAB tamponu hazırlanmasında gerekli olan kimyasallar.....	37
Çizelge 3.2	PCR işleminde kullanılan primer dizileri.....	38
Çizelge 3.3	qRT-PCR’da bir örnek için (1X) kullanılan malzemeler.....	43
Çizelge 3.4	miRNA cDNA sentezi için tasarlanan RT ve ileri primerler.....	44
Çizelge 4.1	Nohudun 4 çeşidinde 20 dk süre ile farklı oranlarda uygulanmış ticari çamaşır suyunun bulaşık oranı, tohum çimlenmesi, ve gelişen fidelerin sürgün uzunluğu ile ilgi verilerin varyans analizi sonuçları.....	48
Çizelge 4.2	Nohudun Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerinin 20 dk süre ile farklı oranda uygulanmış ticari çamaşır suyunun bulaşık oranı, tohum çimlenmesi, ve gelişen fidelerin sürgün uzunluğu ile ilgi Duncan testi sonuçları.....	48
Çizelge 4.3	Gökçe çeşidinde değişik ön muamele yapılmış embriyolardan elde edilen plumula eksplantının farklı oranlarda BAP veya NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi.....	50
Çizelge 4.4	Gökçe çeşidinde Farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarda sürgün rejenerasyonu.....	51
Çizelge 4.5	Yaşa çeşitinde değişik önmuamele yapılan embriyolardan elde edilen plumula eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgünrejenerasyonunu.etkisine ait varyans analizi.....	53
Çizelge 4.6	Yaşa çeşidine farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantı ve sonra farklı BAP ve NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu.....	54
Çizelge 4.7	Er 99 çeşidin 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA ₃ ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃ önmuamelesi yapılan embriyolardan elde edilen plumula eksplantların farklı oranlarda BAP veya NAA dozları içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	56
Çizelge 4.8	Er99 çeşidinde Farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarda sürgün rejenerasyonu.....	57
Çizelge 4.9	Akçin çeşitinde değişik önmuamele yapılmış embriyolardan elde edilen plumula eksplantının Farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonunu ve etkisine ait varyans analizi.....	59
Çizelge 4.10	Akçin çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu.....	60
Çizelge 4.11	Gökçe çeşitinde değişik önmuamele yapılmış embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi.....	62
Çizelge 4.12	Gökçe çeşidinde Farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantı ve sonra farklı BAP ve NAA dozlarının içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu.....	63

Çizelge 4.13	Yaşa çeşidinde değişik önmuamele yapılmış embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının Farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi.....	65
Çizelge 4.14	Farklı ön muamele ve BAP ve NAA dozlarının içeren besin ortamlarının Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	66
Çizelge 4.14	Er99 çeşitinde değişik önmuamele yapılan embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının Farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi.....	68
Çizelge 4.16	Er99 çeşidinde Farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyo eksen eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarda sürgün rejenerasyonu.....	69
Çizelge 4.17	Akçin çeşitinde değişik önmuamele yapılan embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının Farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi.....	71
Çizelge 4.18	Akçin çeşidinde Farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyo eksen eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarda sürgün rejenerasyonu.....	71
Çizelge 4.19	Gökçe çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin 6mg/l GA ₃ ile farklı oranlarda IBA dozlarında kök rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	75
Çizelge 4.20	Gökçe çeşidinin plumula eksplantından 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA ₃ ön muamelesinden elde edilen sürgünlerin 6 mg/l GA ₃ ve farklı oranda IBA içeren MS ortamında kök oluşumu ve sürgün başına kök oluşum oranı ile ilgili sonuçları.....	76
Çizelge 4.21	25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA ₃ ön muamele sonucunda elde edilen Gökçe çeşidinin plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA ₃ ile farklı oranda IBA içeren MS ortamında kök uzunluğunda ön muamelelerin etkileri.....	77
Çizelge 4.22	Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA ₃ ön muamele sonucunda elde edilen plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA ₃ ile farklı oranlarda IBA içeren MS ortamında oluşan köklerin uzunluğunda köklendirme ortamların etkileri.....	77
Çizelge 4.23	25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA ₃ ön muamele sonucunda elde edilen Yaşa çeşidinin plumula eksplantından gelişen sürgünler ve daha sonra 6 mg/l GA ₃ ile ön muamele yapıp, farklı oranda IBA içeren MS ortamda kök oluşumu ile ilgili sonuçları.....	79
Çizelge 4.24	Yaşa çeşidinin plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin Farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu	79
Çizelge 4.25	Er 99 çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin, farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren oramlarda köklendirmesi ve etkilerini ait varyans analizi sonuçları.....	81
Çizelge 4.26	25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA ₃ ön muamele sonucunda elde edilen Er99 çeşidinin plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA ₃ ile farklı oranda IBA içeren MS ortamında kök uzunluğunda ön muamelelerin etkileri.....	82

Çizelge 4.27	Er99 çeşidinde 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA ₃ ön muamele sonucunda elde edilen plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA ₃ ile farklı oranlarda IBA içeren MS ortamında oluşan köklerde, köklendirme ortamların etkileri.....	82
Çizelge 4.28	Akçin çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi ve etkilerini ait varyans analiz sonuçları.....	83
Çizelge 4.29	Akçin çeşidinin plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin Farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu.....	84
Çizelge 4.30	Gökçe çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi ve etkilerini ait varyans analiz sonuçları.....	86
Çizelge 4.31	Gökçe çeşidinin embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin Farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu.....	86
Çizelge 4.32	Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi ve etkilerini ait varyans analiz sonuçları.....	88
Çizelge 4.33	Yaşa çeşidinin embriyonik eksn eksplantından edilen sürgünlerin Farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu.....	89
Çizelge 4.34	Er 99 çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi ve etkilerini ait varyans analiz sonuçları.....	91
Çizelge 4.35	Er99 çeşidinin embriyonik eksn eksplantından edilen sürgünlerin Farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu.....	91
Çizelge 4.36	Akçin çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi ve etkilerini ait varyans analiz sonuçları.....	92
Çizelge 4.37	Akçin çeşidinin embriyonik eksen eksplantından edilen sürgünlerin Farklı oranlarda GA ₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu.....	93
Çizelge 4.38	Gökçe çeşidinde T ₀ GUS transgenik bitkilerin analiz sonuları.....	99
Çizelge 4.39	Gökçe Gökçe çeşidinde T ₀ GUS transgenik bitkilerin analiz sonuları.....	103

1. GİRİŞ

Leguminosae (baklagiller) familyası, nohut bitkisi dahil olmak üzere 650 cins ve 18000 türden oluşmaktadır (Varshney vd. 2009). Anavatanı, Kuzey Pakistan ve Güney Afganistan'daki Himalaya etekleri ile Türkiye'nin Mezopotamya bölgesi olan (Duke 1981, Muehlbauer ve Tullu 1997, Popelka ve Higgins 2007) nohut bitkisi Meksika, Arjantin, Şili, Peru, Amerika ve Avustralya'da oldukça önemli besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Nohut dünyadaki baklagil üretiminin üçte birini karşılamaktadır. İnsan ve hayvanların tükettiği önemli besin kaynağı olan nohut, yüksek miktarda protein (ortalama % 23), lif, ve karbonhidrat (% 64) içermektedir. Proteinler, hazmolma dereceleri oldukça yüksek ve içerdiği aminoasitler yönünden hayvansal kaynaklı proteinlere yakın olmalarından dolayı insan beslenmesinde büyük öneme sahiptir (Thudi vd. 2011). Ayrıca, kalsiyum, magnezyum, potasyum, fosfor, demir, çinko ve manganez gibi zengin mineral içeriğine sahip olmasından dolayı besleyici bitki olarak yetersiz beslenme sorunlarının giderilmesinde önemli rol oynamaktadır (Thudi vd. 2011). Nohut ayrıca bir baklagil bitkisi olası nedeniyle tarımsal açıdan son derece değerli bir üründür. Ekim zamanı ve çevre koşullarına bağlı olarak azot ihtiyacının % 42 - 70'ini simbiyotik yolla sağlayabilmektedir (Beck 1988). Nohut köklerinde simbiyotik yaşayan *Rhizobium* spp. bakterileri, havanın serbest azotunu toprağa bağlayarak hem kendisi için hem de kendisinden sonra ekilecek bitkiler için azotça zengin toprak oluşturmaktadır. Nohut bitkisinde simbiyotik yolla toprağa bağlanan azot miktarı, bir yılda 8 kg/da olarak hesaplanmıştır (Sepetoğlu 1992).

Günümüzde dünyada üretimi gerçekleştirilen baklagiller arasında fasulye ilk sırada yer almakta, Fasulyeyi, nohut izlemekte olup, geniş bir üretim alanına sahip olan nohut pek çok ülkede yetiştirilmekte ve dünyada 10.7 milyon ha alanda nohut tarımı yapılmaktadır. Ekim alanlarının 8 milyon ha ile %74.7'sine sahip olan Hindistan, Pakistan, İran ülkelerini sırası ile Asya, Orta Doğu ve Kanada takip etmektedir (Anonymous 2010, Anonymous 2011, Varshney vd. 2011). Türkiye, 455 bin hektar nohut ekim alanı ve yıllık 487 - 562 bin ton nohut üretimi ile Hindistan'dan sonra ikinci sırada yer almasına rağmen 1990 - 2010 yılları arasında ekim alanı ve üretiminde %31 düşüş tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 1980 yılından sonra ihracat olanaklarının

gelişmesi, artan iç pazar talebi ve bilhassa nadas alanlarının daraltılmasına paralel olarak ekim alanı artış göstermiştir. Ancak, 1992 yılından itibaren ihracatın düşüş göstermesiyle birlikte ekim alanlarında 1990 öncesine göre azalma gözlenmiştir. Nohut bitkisinin tarımı 1990 yılında ekim alanı 890.000 hektar iken (Anonim, 2011), 2013 Türkiye’deki toplam ekim alanı 446218 hektar, üretimi 530634 ton ve verimi ise 1189 kg/da’dır (Anonymous 2011).

Önemli bir tarımsal sanayi ürünü olan nohut, yemeklik, leblebilik ve bazı ülkelerde hayvansal gıda olarak da kullanılmaktadır (Akçin 1988, Devos 1988 ve Gül vd. 2006). Kültür nohutları, kahverenkli Desi tipi ve beyaz veya krem renkli Kabuli tipi olmak üzere iki tipten oluşmaktadır (Varshney vd. 2011). Dünyadaki nohut üretiminin yaklaşık % 80’ini oluşturan Desi tipi nohut çeşitleri Afganistan, İran, Pakistan, Hindistan, Etiyopya, Avustralya ve Türkiye’nin Güney Doğu Anadolu Bölgesi’nde geniş ekim alanına sahiptir. Desi tipi nohut çeşitleri, soğuğa daha fazla dayanıklılık göstermesine karşın Kabuli tipi soğuğa az dayanıklılık göstermektedir (Kaur vd. 2005, Leport vd. 2006).

Nohut dünyanın pek çok ülkesinde ve farklı ekolojilerde kolaylıkla yetiştirilebilmesine rağmen, özellikle bazı abiyotik ve biyotik stres faktörleri nohut tarımını sınırlandırmakta, ya da özellikle kuraklık gibi abiyotik stres faktörleri nohut verimini önemli ölçüde olumsuz etkilemektedir. Blindiği üzere, bitkiler yaşam süreleri boyunca çeşitli abiyotik ve biyotik stres faktörlerine maruz kalmaktadırlar. Bitkinin farklı gelişme dönemlerinde görülen stres faktörleri, büyüme ve gelişmenin olumsuz yönde etkilenmesi sonucunda büyük oranda verim kaybına yol açmaktadır. Stresle beraber ortaya çıkan hasarlar, bitkinin çevreye olan genetik adaptasyon derecesine bağlı olarak değişmektedir. Abiyotik stresler (kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, oksidatif stresler vb.), bitkisel üretiminin büyük oranda verim kaybına neden olmaktadır (Mahajan ve Tuteja 2005). Biyotik stresler (yabancı otlar, patojenler ve özellikle böcek zararlıları) ise direk verim kaybına ve farklı bitki hastalıklarına neden olmaktadır. Tüm kültürü yapılan bitki türlerinde doğal stres faktörü olan kuraklığın, ortalama % 26, mineral eksikliğinden kaynaklanan stres faktörünün % 20, soğuk stresinin ise % 15’lik ürün kaybına neden olmaktadır (Blum 1986). Nohut üretiminde de biyotik stres faktörlerinin neden olduğu

verim kaybının yaklaşık % 58', abiyotik stres faktörlerinin neden olduğu verim kaybının ise % 42'lik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Singh vd. 1994). En önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olan kuraklık, özellikle topraktaki ve havadaki nem miktarının azaltmaktadır (Kalefetoğlu 2006). Kuraklık sonucu meydana gelen nem azalması çoğu zaman bitkinin solmasına, hatta bitkinin ölümüne neden olabilmektedir. Kuraklık stresi, su eksikliğine bağlı olarak bitkinin genetik potansiyelinin ortaya çıkmasını tamamen veya kısmen engellemektedir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin hücresel fonksiyonlarında meydana gelen olumsuz değişiklikler, meyve/ürün oluşumunda azalmaya neden olmaktadır. Bitkiler, kuraklık stresine karşı üç farklı dirençlilik mekanizması göstermektedirler. Bunlar sırasıyla kuraklıktan kaçmak, kuraklıktan kaçınma ve kuraklığa dayanıklılık olmak üzere tolerans bitkilerin gösterdikleri direnç kazanımlarıdır. Bitkiler, kuraklık stresine maruz kaldıklarında bu direnç mekanizmaları sayesinde yaşamlarını sürdürmektedirler. Bitkilerde, bu direnç mekanizmalarının etkisiyle bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişimler sonucunda kök sisteminin gelişmesi, stomaların küçülmesi ve sayılarının azalması, yaprak yüzeylerinin daralması, bitki boyunun kısalması, fotosentezin sabitlenmesi gibi farklılıklar meydana gelmektedir. Bazen tek gen ya da bir kaç gen tarafından kontrol edilen ve işlenmiş olan bu mekanizmalar, bitkilerde kuraklık stresine karşı kısmen veya tamamen bir dirençlilik kazandırmaktadır. Ayrıca bu genlere ait ifade seviyelerinin artması veya azalması ile bitkilerde dirençlilik sağlanmaktadır. Su eksikliği, bitkiler tarafından hızla algılanmakta ve moleküler değişimler sonucu strese karşı dirençlik genlerinin ifadeleri erkenden kaydedilmektedir. Kuraklık stresinde, sözkonusu genlerin aktivleşmesi sonucunda stomaların belli dereceye kadar açık kalabilmesini, bitki stres hormonlarından absisik asit sentezini, ışık ve karbondioksit absorbansı gibi metabolik olayların aktivlenmesi, sinyal iletim ve yanıt mekanizmalarını harekete geçirmesine sebep olmaktadır (Schroeder vd. 2001).

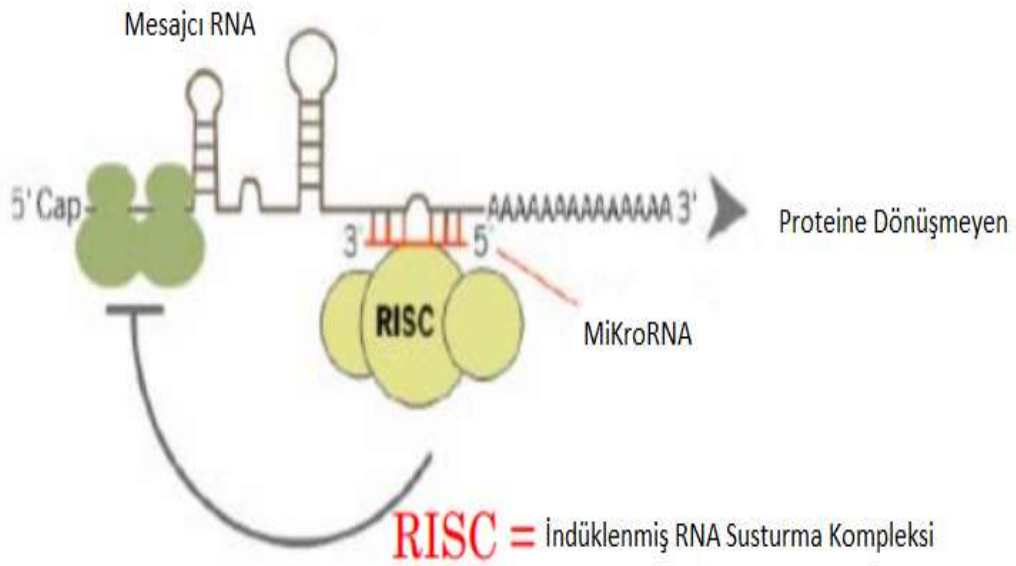
Kuraklık stersine dayanıklılık gibi çeşitli özellikleri bitkilere kazandırmak ve streslere karşı yüksek toleranslı bitkiler elde etmek amacıyla farklı biyoteknolojik yöntemleri uygulanmaktadır. Geleneksel ıslah yöntemleriyle kuraklığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi uyuşmazlık, genetik bağlılık, istenen özelliklerin seçiminin ve stabilizasyonunun uzun zaman alması gibi sorunlardan dolayı oldukça zor olup, uzun

zaman gerektirir. Bir bakıma, klasik bitki ıslahı yöntemleri ile istenilen birden fazla özelliğin bir bitkide bir araya getirilebilmesi oldukça güç ve zaman alıcı bir işlem olup, son yıllarda kullanılan genetik mühendisliği yaklaşımları, bu güçlüklerin üstesinden gelebilecek alternatif yollar sunmaktadır. Bilindiği üzere son yıllarda farklı organizmalardan izole edilen, zararlılara, herbisitlere dayanıklılığı kodlayan genler *A. tumefaciens* ve doğrudan gen aktarma yöntemleri ile kültür bitkilerine aktarılmış, geniş tarım alanlarında bu ürünler üretilmeye başlanmıştır. Bunun yanında moleküler teknikler klasik bitki ıslahına entegre edilerek moleküler işaretleyiciler bitki ıslah süreçleri kısaltılarak yeni genotipler geliştirilmeye başlanmıştır.

Son yıllarda moleküler hücre biyolojisindeki devrim yaratıcı keşifler, organizmaların çeşitli stres faktörlerine karşı dayanıklılık mekanizmalarında başka faktörlerin rol oynadığını ortaya koymuştur. 2003 yılında mikroRNA (miRNA)'ların keşfiyle, bitkilerde çeşitli streslere karşı dirençlilik mekanizmalarının nasıl çalıştığı açığa kavuşmuştur. miRNA'lar, bu streslere yanıt olarak gen ifadelerini düzenleyerek yeni fonksiyonların gelişmesini sağlamaktadırlar. Bilim dünyasında miRNA sistemi ile ilişkili yeni abiyotik stres çalışmaları sonucunda miRNA'lar, bitkilerin genomik fonksiyonlarını etkilediği ve değiştirmektedir. (Zhang vd. 2005). miRNA'ların son yıllarda bu özelliklerinden dolayı moleküler bitki ıslahında kullanılabilme potansiyeli ortaya çıkmıştır.

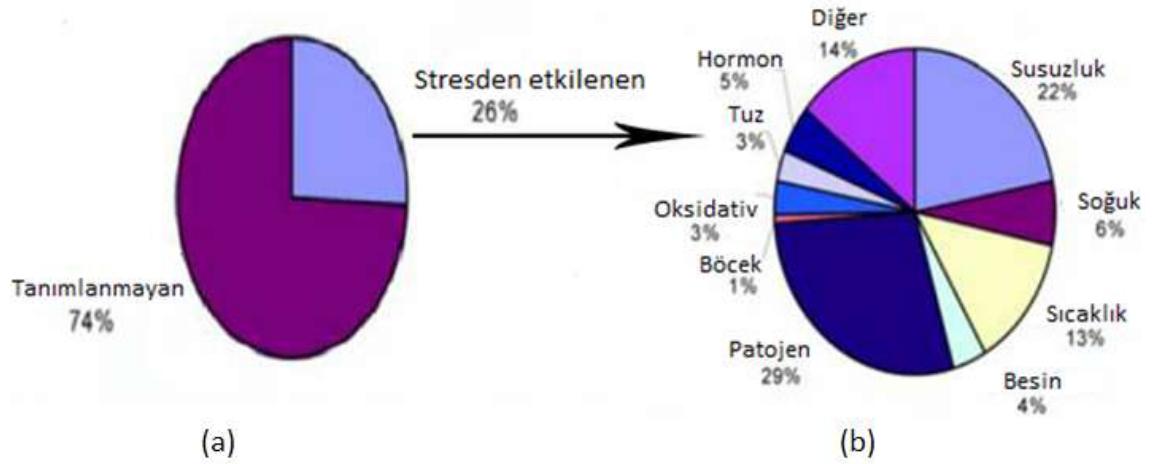
miRNA, ökaryotlarda transkripsiyon sonrası gen regülasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan yaklaşık 20 - 24 nükleotit uzunluğunda olan kodlanmayan küçük endojen RNA dizileridir (Bartel, 2004, Kurihara ve Watanabe, 2004, Chen ve Rajewsky 2007, Voinnet, 2009). Primer (Pri) - miRNA'lar, Dicer adlı endonükleaz ile etkileşerek önce pre-miRNA'lara, sonra olgun miRNA'lara (fonksiyonel miRNA) dönüştürülmektedir. Fonksiyonel miRNA'ya dönüştükten sonra RNA- indüklenmiş susturma kompleksi RISC (RNA inducing gene silencing) ile bütünleşip, bir veya daha çok hedefledikleri mRNA ile kısmi komplementer yapı oluşturup ve parçalarlar (Şekil 1.1). Hedeflenen mRNA'lar, parçalanma veya translasyonel baskılama yoluyla regüle edilmektedir (Llave vd. 2002a). Gen ifadelerin düzenlenmesinde bazen tek bir miRNA, birden fazla hedef geni etkiler ya da birden fazla miRNA ortak bir hedef genin düzenlenmesinde bir

arada hareket edebilmektedir (Chen ve Rajewsky 2007). miRNA'ların farklı fonksiyona sahip birçok genin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadıkları bitkilerin farklı dokularında tespit edilmiştir (Kurihara ve Watanabe 2004, Chen ve Rajewsky 2007, Voinnet 2009, Zhang ve Li 2013). Özellikle strese yanıt vb. mekanizmalarda görev alan çeşitli miRNA'lara ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır. (Jones-Rhoades vd. 2006, García ve Frampton 2008, Voinnet 2009, Özhuner vd. 2013).



Şekil 1.1 MikroRNA RISC kompleksine bağlanarak hedef rehber RNA'ya bağlanıp ve parçalar

Yapılan çalışmalar sonucunda farklı organizmalarda bulunan miRNA'ların korunmuş olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar birçok farklı miRNA ailesi tespit edilmiştir ve MirBase veri bankasında (<http://www.mirbase.org/>) yaklaşık olarak 28645 miRNA ailesinin dizileri bulunmaktadır. Birçok miRNA ailesi (miR156, mir172, miR396, miR408 gibi) bitkilerde yüksek seviyede korunmuştur ve stres cevabında da çok önemli roller üstlenmektedir (Özhuner vd. 2013). Bu korunmuş miRNA ailesinden olan miR408 ise günümüze kadar 20 den fazla bitkide saptanmıştır (Axtell ve Bowman 2008, Kozomara ve Griffiths-Jones 2011, Cuperus vd. 2011).



Şekil 1.2 Streslerden etkilenen miRNA'lar

a. Abiyotik ve biyotik stres'lere karşı artan miRNA'ların ekspresiyonları b. Farklı stres faktörlerinde görev alan miRNA'ların dağılımı (Zhang vd. 2005)

Şimdiye değin yapılan çalışmalarda, miR408'in bitkilerde kuraklık stresine karşı ifade seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Örneğin, susuzluk stresinde şeftali (*Prunus persica* L.), *Adi yonca* (*M. truncatula*), *arpa* (*H. vulgare*) ve *çeltikte* (*O. Sativa*) bitkilerinde miR408'in ifade seviyesinin artmış olduğu görülmüştür (Trindade vd. 2010, Kantar vd. 2010, Zhou vd. 2010, ve Eldem vd. 2012). Ayrıca yüksek verimli dizileme tekniği ile miR408'in farklı streslerde ifade seviyesinde belirgin değişiklikler meydana gelmesi görülmüştür. Örneğin bitki büyümesinde önemli olan besin minerallerinin eksikliği sonucunda, miR408'in ifade seviyesinde önemli derecede değişiklikler izlenmiştir. Keten bitkisinde yapılan çalışmada, inorganik fosfat eksikliğinde miR408'in aşırı ifade olduğu ve fosfat eksikliğinde artışı izlenmiştir (Nataliya vd. 2014). Çeltikte kuraklık stresinde, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ seviyesine bağlı olarak miR408'in ifadesinde artış belirlenmiştir (Mutum vd. 2013). Buna ilaveten, metal kompleksleşmesi, oksidatif stres ya da sinyal iletiminde bilinen bir fonksiyonu belirli olmayan korunmuş miRNA'lar arasında yer alan miR408'in metal stresi tarafından regüle edildiği bulunmuştur (Valdes-Lopez vd. 2010, Lima vd. 2011, Zhou vd. 2012, Burklew vd. 2012).

Bakır, bitkilerin normal büyüme ve yaşam döngülerini sağlayabilmeleri için gerekli olan en önemli 14 minerale birisidir. Bakır ile birleşen proteinlerin, doğrudan miR408 tarafından düzenlenen pek çok hedefi olduğu bilinmektedir. Bakır eksikliğinin sonucu

olarak sentezlenen miR408, bakır seviyesinin korunmasında önemli rol üstlenmiştir. Ayrıca fotosentez yapan dokularda, köklere göre daha fazla ifade edildiği bilinmektedir. (Abdel-Ghany ve Pilon 2008). Bakır miRNA'ların ailesinden olan miR408, bakırı kofaktör olarak kullanan proteinlerin oluşumunda görev almaktadır. Bakır proteinlerinin önemine göre sıralandırılıp veya öncelendirilip bakır miktarlarına göre proteinlerin oluşumuna sırası ile izin vermektedir (Trindade 2011). Susuzluk koşullarında ise bakırın, kök hücrelerine girdikten sonra köklerden çıkışı ve sürgünlere kadar taşınması gerekmektedir. Bitkilerin besin maddelerini, transpirasyon vasıtasıyla köklerden yapraklara taşıma gücünü oluşturdukları bilinmektedir (Trindade vd. 2010). Ancak, bitkiler, kuraklık stresine maruz kaldıklarında, hayatta kalmak için az su tüketerek stomalarını yüksek oranda kapalı tutmaktadırlar (Nunes vd. 2008). Böylece, transpirasyon esnasında bitki daha az su kaybına maruz kalmamakla birlikte dehidrasyon oranı azaltmakta ve buna bağlı olarak stres gerginliğini de azaltmaktadır. Ancak su ve bakır ve diğer minerallerin, ksilemlerden yapraklara taşınması için transpirasyonun çekim gücüne ihtiyaç duyulmaktadır. Su eksikliği ve stomaların kapanması sonucunda minerallerin, yapraklara ve fotosentez işlemi yapılan organlara kadar taşınımı zorlaşmaktadır. Bu durumda, bitkilerde diğer mineraller ile birlikte bakır eksikliğinde ortaya çıkmaktadır. Bakır miRNA'ları, bakırın azalması ile bu stresi algılayıp yanıt vermektedirler (Abdel-Ghany ve Pilon 2008). Bakır eksikliği neticesinde bakır miRNA'ları sentezlenip ve bazı bakır ile ilişkili mRNA'ları hedefleyip ve parçalarlar. Bu merkezi düzenleyici sistemin sonucunda bakır içeren proteinler, önem sırasına göre sentezlenmektedirler (Yamasaki vd. 2009).

miR408, bakır içeren *plantacyanin* ve lakkaz gibi proteinlerin (*plantacyanin*, LAC3, LAC12, LAC13 ve *P1B-ATPaz*) transkripsiyon sonrası düzeyinde ifadelerini kontrol etmektedir. (Abdel-Ghany ve Pilon 2008, Trindade vd. 2010, Feng 2010, Ravet vd. 2011). Fakat bakır ile ilişkili olan *plastosiyanin* genleri, mikroRNA'lar tarafından parçalanmaz aksine desteklenmektedirler (Ravet vd. 2011). Fitosiyanin familyasına ait olan *plastosiyanin* (PC) proteinleri, tek bir bakır iyonu içermektedirler (Dong vd. 2005). Bakırın serbest elektronu, sitokrom *b6f* kompleksi ile fotosistem I arasında elektron taşıyıcısı olarak kullanarak (Weigel vd. 2003), ototrof mekanizmasında görev almaktadırlar (Dongve vd. 2005). Bitkiler bakır eksikliğinde, *plastosiyanin* proteinin

oluşturabilmesi için diğerk bakır içeren proteinlerin oluşumlarını miR408 vasıtası ile engellenmektedir (Yamasaki vd. 2007, Abdel-Ghany ve Pilon 2008). Bu düzenlemede sınırlı bakır koşullarında bakırın, fotosentezin temelini oluşturan plastosiyanin enzimine (Weigel vd. 2003) bağlanmasına izin vermektedir (Burkhead vd. 2009). Böylece bakırı sadece fotosentezde kullanmakta olup, kuraklık stresi sonucunda meydana gelen bakır eksikliğinde bitkinin fotosentez yapmasına ve hayatta kalmasını sağlamaktadır (Burkhead vd. 2009).

Tarımda artan su sıkıntısından dolayı gelişen kuraklık stresi (Seckler vd. 1999, Turner 2001) kültür bitkilerin verimini olumsuz yönde etkilenmetedir. Birçok bitki gibi nohut bitkisinde de kurak şartlara bağlı olarak büyüme ve gelişmesini yavaşlatan, verimliliğini düşüren terminal kuraklıktan etkilenmektedir (Keskin 2012). Nispeten kuraklığa dayanıklı olan nohut bitkisi, çeşitlerine bağlı olarak farklı oranlarda verimde azalma göstermektedir (Khodadadi 2013). Kuraklığın bitki üzerindeki etkileri, stresin şiddetine, süresine ve diğerk stres faktörlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Arora vd. 2002). Bu bağlamda, bu çalışmanın amacı; nohut bitkisinde su stresine maruz kalan bitkilerde belirli mikroRNA'ların fonksiyonlarının belirlenmesi ve kuraklıkla ilişkili olduğu düşünülen mir408 geni aktarılarak kuraklığa karşı toleranslı bitkilerin geliştirilmesidir. Ayrıca alışma kapsamında, mir408 geni ile birlikte glyphosate ve L-phosphinothricin herbisitine dayanıklığı kodlayan BAR geni bitkilere aktarılarak hem adı geçen herbisitlere dirençli hemde kuraklık stresine karşı dayanıklı bitkilerin üretilmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Yemeklik Tane Baklagillerde Doku Kültürü  alışmaları

Nohut bitkisinde, *in vitro* koşullarda birçok bitki rejenerasyonu çalışmaları bulunmaktadır. Günümüzde kullanılan rejenerasyon yöntemlerinde, kallus fazı olmaksızın organogenez (Surya vd. 1992, Batra vd. 2002, Singh vd. 2002), kallustan elde edilen organogenez (Barna vd. 1994, Amuniddin ve Singh 1995, Srivastava vd. 2001), kallus fazı olmaksızın somatik embriyogenez (Murthy vd. 1996, Kiran vd. 2005) ve kallustan elde edilen somatik embriyogenez (Barna ve Wakhlu 1993, Yousefiara vd. 2008) olmak üzere toplam dört çeşit protokol bulunmaktadır. Ancak günümüze kadar yapılan çalışmaların incelenmesi sonucunda, özellikle de kök rejenerasyonunda, tekrarlanabilir ve etkili metodlar bulunmamaktadır. Nohut bitkisinde, *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında oluşan sürgünlerle ilgili kök uyarımı ve bitkiciklerin dış ortamlara adaptasyonunun başarı oranı oldukça düşüktür (Barna vd. 1994). Bu yüzden, güvenli bir *in vitro* bitki rejenerasyonu ve mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, bu tez kapsamında yapılan çalışmada, kallus fazı olmaksızın organogenez kullanımı ile çoklu sürgün rejenerasyonu, köklendirme ve dış şartlara adaptasyon ile ilgili sorunların çözümünde daha etkili protokollerin geliştirilmesi söz konusu olmuştur. Bu konuda, daha önce yapılmış çalışmaların  zetleri aşağıda verilmiştir.

Anil vd. (1986), nohut bitkisinde farklı oranlarda IAA kullanılması sonucunda hipokotil eksplantlarının sürgün uçlarından çoklu sürgün oluşumunu not etmişlerdir.

Islam ve Riazuddin (1993), farklı konsantrasyonlarda BAP ve IAA kullanarak nohutun hipokotil eksplantlarından kallus oluşumunu, daha sonra sürgün rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Barna ve Wakhlu (1993), nohut bitkisinin kotiledon eksplantlarından herhangi bir sürgün rejenerasyonu elde edememişlerdir.

Barna ve Wakhlu (1994), nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinde olgunlaşmamış yaprak eksplantları üzerinde, kallus oluşumunu ve adventif sürgün rejenerasyonunu elde etmişlerdir. Kallusların oluşumunda, 10 µM NAA ve 5 µM BAP içeren besin ortamları kullanılmıştır. Ayrıca, çalışmalarında kullandıkları eksplantlar arasında en fazla sürgün rejenerasyonunu, 10 µM BAP ve 0.1 µM IBA içeren MS besin ortamında epikotil eksplantından elde etmişlerdir. Kök oluşumunda, 1 µM IBA içeren besin ortamı kullanılmıştır.

Singh vd. (2002), nohut bitkisinde C235, ICC12269, ICC4951, ICC11531, BG256 ve bir yerel çeşitlerinde, embriyonik eksen eksplantı kullanarak, farklı konsantrasyonlarda Thidiazuron (TDZ) (0,1-10 mg/l), BAP (0,5 ve 1 mg/l), Kn (0,5 ve 1 mg/l) ya da Zeatin (2,0-4,0 mg/l) içeren MS ortamında en fazla sürgün rejenerasyonunu 0,2 mg dm⁻³ TDZ içeren besin ortamından elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünleri, büyüme düzenleyicileri bulunmayan ¼ × MS ortamında 12 - 15 gün süresi boyunca aklimatize edilmişlerdir. Daha sonra toprak içeren saksılara şaşırtmışlardır. Bu işlemde, yaşayanların % 70'ten fazla olduğu, bitkilerin normal olarak geliştiği, fertil çiçeklerin ve tohumların üretildiğini rapor edilmiştir.

Huda vd. (2003), nohut bitkisinde organogenez ve kallus indüksiyonu yoluyla kotiledon eksplantlarından çoklu sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır. Kallus indüksiyonu ve farklı sıklıklarda sürgün rejenerasyonunun, kullandıkları büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarında ve kombinasyonlarında gözlemişlerdir. En yüksek kallus oluşumu, % 95 oranında 3 mg/L 2,4-D + 3 mg/L BAP + MS üzerinde gözlenmiştir. 2 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA bulunan MS ortamının katılaştırılmasıyla kallus başına sürgün sayısı 2,50 olup, sürgünlerin maksimum tomurcuk oluşum yüzdesi % 40 olmuştur. Rejenere olan sürgünlerin % 77'si, 1 mg/L IBA içeren ½ × MS ortamında en yüksek oranda kök geliştirmiştir. Rejenere olan bitkiler, aklimatizasyondan sonra başarılı bir biçimde toprağa yerleştirilmiştir.

Sarker vd. (2005), BCh-2, BCh-4 ve BCh-5 nohut çeşitlerinde, kotiledon nod eksplantından 3.0 mg/l BAP ve 0.04 mg/l NAA içeren 4 × MS mikro-tuzlar ve MSB5 besin ortamı kullanarak en fazla sürgün rejenerasyonunu elde etmişlerdir. Ayrıca

kesilmiş olgun embriyo akses eksplantlarının BCh-4 ve BCh-5 çeşitlerinde, 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l Kn, 0.2 mg/l NAA, 4 mg/l tyrosine, 880 mg/l CaCl₂ ve 3800 mg/l KNO₃ içeren MS ortamında, sürgün rejenerasyonu oluşturmuşlardır. Ayrıca, 1.0 mg/l Kn içeren besin ortamında elde edilen sürgünlerde, 0.2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilen sürgünlerde en iyi kök rejenerasyonunu izlemişlerdir.

Shagufta vd. (2007), *in vitro* koşullarda elde edilen nohut sürgünlerinin köklendirilmesi için değişik konsantrasyonlarda NAA ve IBA içeren MS besin ortamları kullanmışlardır. Daha sonra, sürgünleri $\frac{1}{2} \times$ MS besin ortamına aktararak köklendirmişlerdir. En iyi kök oluşumunu, 1.0 μ M NAA içeren besin ortamı olarak belirtmişlerdir.

Yousefiara vd. (2008), nohut bitkisinin MCC252, MCC505 ve MCC283 çeşitlerinde, embriyo eksen eksplantı kullanarak bitki rejenerasyonu ve çoklu sürgün uyarımında BAP kullanımını uygun görmüşlerdir. Elde edilen sürgünleri, 0,4 mg/L IBA içeren $\frac{1}{4} \times$ MMS tuzlarından ve B5 vitamininden oluşan besin ortamında köklendirmişlerdir. En yüksek kök rejenerasyonunu, 0,4 mg/L IBA içeren besin ortamında izlemişlerdir. MMC252 ve MMC505 genotiplerinin 2 mg/L BAP, MCC283 genotipinin ise 2 mg/L zeatin içeren besin ortamında rejenere olan sürgünlerinin, köklenme ortamlarında kalın yayılan kökler şeklinde köklenmeyi olumlu yönde etkilediğini izlemişlerdir. Kullandıkları yöntemde, bitkicikleri ilk olarak sıvı $\frac{1}{4} \times$ MMS tuzları ve B5 vitaminleri, % 3 sukroz ve 0,4 mg/L IBA içeren ortamda kültüre almışlardır. 7 - 14 gün sonra, 1:1 oranında kokopit ve perlit içeren saksılara şaşırtılan bitkilerin % 70'inde, aklimatizasyonu sağlayabilmişlerdir.

Rekha ve Thiruvengadam (2009), nohut bitkisinde kotiledon boğum ve koltuk altı meristem uçları eksplantlarından, *in vitro* koşullarda hızlı sürgün rejenerasyonunu elde etmeyi başarmışlardır. Fakat kotiledon boğum eksplantında en fazla sürgünleri 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamında ve koltuk altı meristem uçları eksplantında en uzun sürgünleri 1.5 mg/l BAP içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünleri, 0.5 – 2.0 mg/l IBA, IAA veya NAA içeren MS ortamında köklendirmişlerdir. En iyi

köklenmeyi, 1.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamında izlemişlerdir. Daha sonra toprağa aktarılan bitkilerin, % 99 oranında adaptasyonu gerçekleşmiştir.

Saleem vd. (2010), çalışmalarında, KK - 1 ve Hassan - 2K yerli nohut çeşitlerinde, 3.0 ve 5.0 µM BAP içeren MS ortamında iyi bir sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini belirtmişlerdir. sonuçlarına göre yüksek oranda BAP içeren MS ortamlarında sürgün oluşumunda geçikmeye sebep olduğuna, fakat düşük oranda BAP içeren besin ortamlarında her iki çeşitte de % 88-89 oranında sürgün oluşumuna rastlamışlardır.

Ghanti vd. (2010), ICCV-10 ve Annigeri nohut çeşidinde, olgunlaşmamış kotiledon eksplantı kullanarak 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l abscisic acid (ABA) içeren MS ortamında % 36.6 kadar embriyoların oluşumu ile başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak, ICCV - 10 çeşidinde, Annigeri çeşidine göre daha fazla oranda sürgün oluşumu görmüşlerdir.

Banu vd. (2011), nohutun Barichhola-4, Hyprochhola, Binachhola-3 ve Binachhola-çeşitlerinde, *in vitro* koşullarda da embriyo eksplantı kullanarak en fazla sürgün oluşumunu 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l Kn, 0.2 mg/l NAA, 2 × CaCl₂ ve NH₄NO₃ konsantrasyonları içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Ayrıca, 1.0 mg/l kn içeren ortamdan gelişmiş sürgünleri, 0.2 mg/l IBA içeren ortamda köklendirmişlerdir.

Yadav vd. (2012), hedefe yönelik SRC-1 ve JGK nohut genotiplerinin de embriyonik eksen eksplantını kullanmışlardır. Sürgün rejenerasyonunda, 8.0 mM benzyl amino purine (BAP), 0.5 mM naphthalene acetic acid (NAA) ve 0.1 M sucrose içeren B5 vitamince zengin MS ortamını en uygun sürgün rejenerasyonu ortamı olarak belirtmişlerdir. 4 mM NAA, 3 mM IAA veya 4 mM IAA ,% 2 sucrose içeren ½ × MS ortamını da en iyi köklendirme rejenerasyonu ortamı olarak tanıtmışlardır.

Shaheena vd. (2012), nohut bitkisinde, sürgün ucu eksplantından *in vitro* koşullarda çoklu sürgün ve bitki rejenerasyonu üzerinde çalışmışlardır. Çoklu sürgün üretiminde, 3.0 mg/l TDZ içeren MS ortamında, 3 haftalık bir sürede iyi bir rejenerasyon elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Aasim vd. (2012), nohut bitkisinde embriyonik eksen eksplantına, 10 mg/l benzylaminopurine (BAP) içeren MS ortamında 10 gün boyunca ön muamele yapmışlardır. Daha sonra ön muamele edilen eksplantları, 0.25–2.00 mg/l BAP ve 0.25 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) içeren MS rejenerasyon ortamında kültüre almışlardır. Elde edilen sonuçlarına göre, ön muamele yapılmış eksplantlarda 2-5 kat daha fazla sürgün rejenerasyonu izlemişlerdir. Ayrıca rejenerasyon ortamındaki, NAA eşliğinde düşük konsantrasyonda BAP içeren ortamlarda, sürgün sayısını pozitif etkilediği halde aksine NAA eşliğinde farklı BAP konsantrasyonları içeren ortamlarda, sürgün sayısını önemli şekilde inhibe ettiğini izlemişlerdir. Ayrıca 45 ve 60 g/L (R1) sucrose + 1.00 mg/l indole-3 butyric acid ortamında, sürgünlerin kök oluşum oranının % 50 arttığını belirtmişlerdir. 45–60 g/l sucrose (R2) içeren MS ortamında, köklenme frekansını % 60 – 100 arasında arttırdığını belirtmişlerdir.

2.2 *Agrobacterium tumefaciens* ile Nohut Bitkisinde Gen Aktarım Çalışmaları

Nohut bitkisinin üretimi, çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerden olumsuz şekilde etkilenmektedir. Tarımda artan kuraklık stresi (Seckler vd. 1999, Turner 2001), nohut verimini olumsuz yönde etkilemektedir. Geleneksel ıslah yöntemleriyle bu streslere karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi oldukça zordur. Nohut bitkisi için özellikle kuraklığa karşı dayanıklı bitkilerin ıslahı/geliştirmesi büyük önem taşımaktadır. Bugünlerde, genetik mühendisliği yaklaşımları, ile bu zorlukların başına çıkmak mümkündür. Bu yöne *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarım yöntemi en fazla ve tercih edilen yöntem olarak bilinmektedir. Fakat, nohut bitkisinde önceki çalışmaları göz önüne alarak çok fazla transformasyon çalışmaları bulunmamaktadır (Anwar vd. 2010).

Gen aktarım yönteminde, totipotensi özelliğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genlerin entegrasyonu ve aynı hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bitkilere, hem doğrudan (elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve biyolistik vb), hem de dolaylı olarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım çalışmaları yapılmaktadır (Arı vd. 2001). *A. tumefaciens*, ile inoküle edildiği dokularda tümör oluşumuna sebep olmakta ve plasmidin T-DNA bölgesindeki genlerin,

bitki hücrelerine geçmesini takiben bitki genomuna entegre olmasını sağlamaktadır (Chilton vd. 1980).

Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla gen aktarım yöntemi önemli avantajlara sahiptir; Bitki genomuna bireylerin bir veya birkaç kopyasının girdirilmesini, girdirilen genlerin fazla ifade edilmesini, aktarılan genlerin daha az fragmentasyonunu yani daha uzun DNA dizilerinin aktarılmasını sağlamaktadır (Hadi vd. 1996, Tinland vd. 1995). Buna ilaveten, *Agrobacterium* partikül bombardımanı protokolüyle karşılaştırıldığında uygun bitki türlerinde çok daha etkili bir transformasyon aracıdır (Bidney vd. 1992).

En önemli dezavantajı ise *Agrobacterium*'un konakçı spesifik olmasıdır. Belli bitki türlerinde düşük transformasyon etkinliğiyle sınırlanır (Finer vd. 2000). Konak doku spesifik *Agrobacterium*'la birleşen düşük transformasyon etkinliği gibi çeşitli problemlerin üstesinden gelinmiştir. Bunlar *Agrobacterium tumefaciens* ırklarının virülensinin değiştirilmesi (Hood vd. 1993, Torisky vd. 1997) enfeksiyon alanlarının sayısının artırılması için eksplant dokuların yaralanması (Trick vd. 1998, Santarem vd. 1998) ve ko-kültür ortamına thiol bileşiklerinin eklenmesini (Olhoft vd. 2001, Olhoft ve Somers 2001) kapsamaktadır. Bu hususlarda nohut bitkisinde, *A. tumefaciens* ile gen aktarım çalışmaları, önemli bulguları ile birlikte yayınlanma sırasına göre aşağıda verilmektedir.

Fontana vd. (1993), nohut bitkisinde ilk kez transformasyon yapmışlardır. Çalışmalarında, apikal meristem eksplantına gen aktarımını başarmışlardır. İnokülasyonda, LBA4404 (NPT-II ve GUS genleri içeren) bakteri hattı kullanmış olup, inokülasyondan 3 hafta sonra sürgünleri 50 mg/l kanamisin içeren seleksiyon ortamına aktararak transgenik aday sürgünleri elde etmişlerdir. Kanamisin içeren ortamda, kök rejenerasyonu elde edemediklerinden dolayı kök rejenerasyonunu, kanamisin içermeyen ortamda gerçekleştirmişlerdir.

Chowrira vd. (1995), DNA elektroporasyon yöntemini kullanarak soya, börülce, fasulye, nohut ve mercimek bitkilerinin boğum meristemlerine gen aktarımını gerçekleştirmişlerdir.

Kar vd. (1997), *Heliothis armigera*'ya karşı dayanıklı transgenik nohut bitkiler elde etmişlerdir. Hedefe yönelik CaMV35S promotor ve NOS terminatör dizileri tarafından kontrol edilen cry1Ac geni ve seleksiyon amacıyla NPT-II genini içeren plasmidler kullanılarak bitkilere gen bombardımanı yapmışlardır. Elde edilen eksplantlara, 3 hafta boyunca 25 mg/l kanamisin içeren besin ortamında seleksiyon yapıldıktan sonra canlı kalan sürgünler, 50 mg/l kanamisin içeren ortama aktarılmıştır. Elde edilen aday transgenik sürgünlere yapılan moleküler analizler sonucunda, fonksiyonel cry 1Ac genini içeren bitkilerin elde edildiğini belirtmişlerdir. Cry1Ac geninin ifade edildiği transgenik nohut bitkilerinde, *H. armigera* larvalarının gelişiminin engellendiğini izlemişlerdir. NPT-II geninin, transgenik sürgünlerin seleksiyonunda etkili bir markör olduğunu belirtmişlerdir.

Husnain vd. (1997), nohutta partikül bombardımanı yöntemi ile zigotik embriyo eksplantlarında gen dağılımını etkileyen faktörleri, sürgün ve köklerden elde ettikleri embriyo eksen eksplantını kullanarak *NptII* ve *uidA* genlerini çalışmışlardır.

Akbulut vd. (2003), nohut bitkisinde kotiledon boğum ve embriyo eksen eksplantları, çeşitli büyüme düzenleyicileri BAP, TDZ içeren ortamlar kullanılarak yeni ve tekrarlanabilir rejenerasyon ve transformasyon yöntemleri geliştirmişlerdir. Rejenerasyon çalışmalarında, 3 mg/l BAP içeren MS ortamında 3.7 adet sürgün oluşumunu izlemişlerdir. Sürgünlerin köklendirilmesinde, 0.1 mg/l IBA içeren besin ortamı kullanmışlardır. Ayrıca transformasyon çalışmalarında, *A. tumefaciens* (KYRT1, C58C1, EHA105) hatları kullanmışlardır. En yüksek aktarma frekansını, geçici GUS aktivitesi sonucunda pTJK136 taşıyan KYRT1 hattıyla 24 saat inkübasyon neticesinde izlemişlerdir.

Polowick vd. (2004), nohut bitkisinde olgunlaşmış embriyo eksen eksplantlarını, EHA105 (35S promotor ve NOS terminatör tarafından kontrol edilen GUS ve NPT-II genleri) bakteri hattı ile inoküle etmişlerdir. İnokülasyondan sonra bitkilerin seleksiyonunda iki farklı seleksiyon yöntemi kullanmışlardır. Birincisinde; eksplantlar, bakteri ile muamele edildikten sonra, öncelikle 50 mg/l daha sonra 150 mg/l kanamisin içeren ortama aktarılmıştır. İkincisinde ise; eksplantlar, öncelikle 50 mg/l sonrasında iki

kere 75 mg/l kanamisin içeren ortamda daha sonrasında 150 mg/l kanamisin içeren ortamda kültüre almışlardır. Birinci seleksiyon yönteminde, gen aktarım oranını % 1.3, ikinci yöntemde ise bu oranı % 3.1 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca kanamisinin, köklendirme oranını olumsuz yönde etkilediğini fakat kaçak sürgünlerin hayatta kalabilme oranını en az seviyeye düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca eksplant dokularının yaralanmasını, asetosrington kullanılmasını ve 4 günlük ko-kültüvasyon uygulanmasını başarılı bir gen aktarımında ön görmüşlerdir. Çalışma sonucunda, F1 bitkilerinde 3:1 Mendel açılımını gözlemlemişlerdir.

Sarmah vd. (2004), *Agrobacterium* aracılığı ile fasulyenin α AI1 genini, nohut bitkisinin desi tipine aktarmayı başarmışlardır. Elde ettikleri transgenik tohumlarda, fazla oranda α AI1 geni ifade edildiğinden dolayı *Callosobruchus maculatus* ve *C. chinensis*' in gelişiminin engellendiğini ve güçlü bir direnç sisteminin sağlandığını belirtmişlerdir. Bitkilerin seleksiyonunda, kanamisin kullandıklarını ifade etmişlerdir. Ayrıca transgenik α AI1 nohut tohumlarında, % 90 oranında *C. maculatus*'un yumurta veriminin azaldığını belirtmişlerdir.

Singh vd. (2004), fosfinotrisin - acetyltransferase (pat) ve aspartat kinaz (AK) gibi değişik seleksiyon markör genlerini kullanarak söz konusu olan genlerin, transgenik nohut seleksiyonunda etkili ve güvenilir antibiyotik olmadıklarını belirtmişlerdir.

Sanyal vd. (2005), nohut bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla böceklere dayanıklı transgenik bitkileri elde etmek için 35S promotor başlığı ile *cry1Ac* genini aktarmışlardır. Southern analizi sonucunda aktarılan genlerin, T₀ ve T₁ transgenik bitkilerinde genomik DNA'larına entegre olduğunu teyit etmişlerdir. T₀ ve T₁ bitkilerinde Cry1Ac proteininin birikimini, 14.5 - 23.5 ng mg⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları bioassay çalışmalarında, Cry1Ac proteinin 10 ng/mg'den daha fazla oranda *Helicoverpa armigera*'ya karşı etkili olduğunu ve yüksek seviyede koruma sağladığını belirtmişlerdir.

Ignacimuthu vd. (2006), *Phaseolus vulgaris* tohumlarından izole ettikleri alpha-amylase inhibitor geninin, *Agrobacterium* aracılığıyla nohut bitkisinin K850 çeşidine

transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Fakat 288 adet kanamisine direnç gösteren bitkilerde, sadece % 0.3 oranında transformasyonun gerçek olduğunu teyid etmişlerdir. Analizlerde PCR ve Southern hybridizasyonu kullanmışlardı ve protein düzeyinde Western blot analizi ile alpha-amylase inhibitor proteinin varlığını ispatlamışlardır. Ayrıca, biyogüvenlik testleri sonucunda transgenik nohut tohumlar üzerinde yetiştirilen bruchid *C. maculatus* böceğinin hayatta kalma oranında önemli derecede azalma izlemişlerdir. Tüm transgenik bitkilerde, 03:01 oranında segregasyon izlenmiştir.

Akbulut vd. (2008), nohut fidelerinde in planta transformasyon tekniklerinin etkinliğini araştırmayı amaçlamışlardır. Sıvı indüksiyon ortamındaki kokültivasyon periyodu (2, 8, 16, 24 h), pTJK136 plazmidini içeren *Agrobacterium* ırkları (C58C1, EHA 105 ve KYRT), gelişimsel dönem (16 saat su alıp şişmiş ve 40 saat çimlenmiş), mikroyaralama ve 5 farklı genotipi içeren *Agrobacterium* aracılı transformasyonun erken dönemleri sırasında nohut fidelerinde β - Glukuronidaz (gus) geninin transferiyle ilgili olarak birçok faktörü araştırmışlardır.

Singh vd. (2009), nohut bitkisinde farklı *Agrobacterium* hatları kullanarak, GUS ve PPT genlerini taşıyan pCGP125 ile aktarımını gerçekleştirmişlerdir. 2 mm'lik sürgün uçları, inokülasyon kokültivasyondan sonra 2 mg/l PPT ile muamele edildikten sonra PPT içermeyen besin ortamına aktarılmıştır. Sürgün oluşumundan sonra sürgünler, 10 mg/l PPT içeren besin ortamında kültüre alınmıştır. Yaşayan sürgünler, her iki haftada bir 20 mg/l PPT içeren ortamda alt kültüre alınmıştır. Her kültürden sonra canlı kalan bitkilerin sayısında azalmalar izlenmiştir. Çalışma sonucunda, transformasyonun, % 1.22-3.33 arasında gerçekleştiği kaydedilmiştir.

Öz vd. (2009), nohut bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla kotiledon boğum eksplantlarında seleksiyon ajanların ve antibiyotiklerin etkisini çoklu sürgün ve kök rejenerasyonunda incelemişlerdir. Ayrıca mekanik yaralanma ve vakum infiltrasyonun etkilerini transformasyonda incelemişlerdi. Bir ay boyunca çeşitli konsantrasyonlardaki selektif ajan ve antibiyotiklerde bekletilen eksplantlardan elde edilen sürgün ve kök sayılarını kaydetmişlerdir. Nohut bitkisinde, en uygun seleksiyon ortamını bulmak için 100 mg/l kanamycin, 20 mg/l hygromycin, 3 mg/l fosfinotricin ve 5 mg/l glifosat

kullanmışlardır. Sonuç olarak, selektif ajanların en düşük dozlarında bile (50 mg/l kanamycin, 10 mg/l hygromycin, 3 mg/l phosphinotricin, 1 mg/l glifosat) sürgünlerin kök rejenerasyonlarını inhibe ettiklerini izlemişlerdir. Aday transgenik bitkilerin, 4 ve 16 gün transformasyondan sonra yapılmış GUS histokimyasal analizi sonucunda mekanik yaralanma ve 200 mm Hg'de 40 dk. vakum infiltrasyon yönteminin transformasyonda daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Sharmila vd. (2010), nohut bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla gen transformasyonunun daha fazla tercih edildiğini ve embriyonik eksen eksplantlarından elde edilen transgenik bitkilerin üretiminde bir protokol geliştirilmesini belirtmişlerdir.

Temizgül vd. (2011), nohut bitkisinde farklı çeşitlerin, farklı eksplantların (kotiledon boğumları ve embriyo eksenleri) ve çeşitli büyüme düzenleyicilerin değişik konsantrasyonlarını kullanarak rejenerasyon ve transformasyonda etkilerini araştırmışlardır. Farklı eksplantlarda, Agrovakum infiltrasyonu, Agroinokülasyonu, Agroenjeksiyonu ve imbibisyon (şişirme, emdirme) gibi farklı transformasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Analizlerde, geçici GUS aktivitesini ve seleksiyon ortamında yaşayan eksplantların sayısını incelemişlerdir. Kullanılan farklı *Agrobacterium tumefaciens* suşları (KYRT1, C58C1 ve EHA 101) arasında en başarılı transformasyon EHA 101 suşundan, seleksiyon ortamında yaşayan en fazla eksplantları ise Er çeşidinden elde etmişlerdir.

Sharmin vd. (2012), Barichhola-4 (Bch-4) ve Barichhola-5 (Bch-5) nohut çeşitlerine *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımını gerçekleştirmişlerdir. Eksplant olarak tek çenekli embriyo kotiledon, kesilmiş embriyo (decapitated embryo (DE) ve sürgünün son kısmından kesilmiş tek çenekli embriyo kotiledon kullanmışlardır. Denemede *Agrobacterium* LBA4404 hattı ve GUS, NptII genlerini içeren binary pBI121 plasmidini kullanmışlardır. En yüksek transformasyon sonucu, Barichhola-5 (Bch-5) çeşidinin kesilmiş embriyo (decapitated embryo (DE) eksplantından elde edilmiştir. En yüksek rejenerasyonu 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l Kn ve 0.2 mg/l NAA ile CaCl₂ ve KNO₃ içeren MS ortamında izlemişlerdir. Aday transgenik sürgünlerin seçiminde 150 mg/l kadar yüksek oranda kanamycin kullanmışlardır ve gus geninin ifadesini, GUS

histokimyasal analizi sonucunda sürgünlerin çeşitli dokularında mavi renk şeklinde izlenmişlerdir. Ayrıca, NptII geninin, genomik DNA'ya entegrasyonunu PCR analizi ile tespit etmişlerdir.

Mehrotra vd. (2013), nohut bitkisinde etkili bir transformasyon sistemini geliştirerek, P-362 çeşidinin olgun embriyonik eksen eksplantlarında kallus elde etmişlerdir. Bar geninin aktarılabilmesi ve kanamisin ortamda bitki seleksiyonu için transformasyonda NptII genini içeren p35SGUS-INT plasmidi kullanılmıştır. Transformasyonu, 10 günlük MEA yaralanmış kallus eksplantlarına yapılmıştır. Transformasyonda bakteri yoğunluğu OD (600) 0.3 olarak belirlenmiş ve bununla birlikte 200 µM asetosiringon (acetosyringone) ilavesi, 4s sonikasyon, ve 6 dakika vakum infiltrasyonu yapılmıştır. GUS histokimyasal analizi sonucunda, artan eksplant sayısında 1.0'den 38.6'a kadar artış izlenmişlerdir. Ayrıca optimizasyon denemelerinde, binary vektör pRD400-cry1A kullanmış ve transformasyon frekansını T₀ bitkilerinde % 3.6 olarak belirtmişlerdir. Transgenik bitkilere yapılan, PCR, RT-PCR ve Southern hybridizasyonu analizleri sonucunda, T(0) ve T(1) bitkilerinde stabil trans Formasyon yapabildiklerini rapor etmişlerdir.

2.3 miR408'in Kuraklığa Karşı Etkisi

Günümüze kadar mirbase veritabanında bulunan 30424 miRNA ailelelerinden birisi olan miR408, en fazla korunmuş miRNA'lar arasında yer almaktadır (Kozomara ve Griffiths-Jones 2011). miR408'in 107 homolog dizisi, yirmiden fazla bitkide görülmüş ve dizilerin sentezlenmesinin çevresel stresler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Zhang ve Li 2013). Birçok araştırmacı tarafından miR408'in, çevresel faktörler arasında en fazla kuraklık stresinden etkilendiği rapor edilmiştir (Kantar vd. 2010, Trindade vd. 2010). Bunu yanı sıra, başka stres faktörlerin de rol oynadığı, mekanik stresi (Lu vd. 2005) ve reaktif oksijen türlerinde (Li vd. 2011) rapor edilmiştir. Günümüze kadar kuraklık stresi ile ilgili yapılan çalışmalarda, özellikle hububat ailelerinden *Medicago truncatula* (Trindade vd. 2010) ve *Hordeum vulgare* (Kantar vd. 2010)'de, miR408'in ifade seviyelerinde artış izlendiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, *Prunus persica* (Eldem vd. 2012) ve *Oryza sativa* (Zhou vd. 2010) bitkilerinde, miR408'in ifadesinin kuraklık

stresinde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, miR408'in ifade seviyesindeki değişiklikler, bazı metallerin (Valdés-López vd. 2010, Lima vd. 2011, Gielen vd. 2012, Zhou vd. 2012), fosfat (Melnikova vd. 2014), kalsiyum (Mutum vd. 2013) ve bakır minerallerinin eksikliği ile ilgili yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Fakat günümüze kadar yapılan fonksiyonel çalışmalar doğrultusunda miR408'in, bakır içeren enzimlerin regülasyonunda da rol oynadığı belirlenmiştir. Böylece bakır eksikliğinde miR408, bakır içeren transkriptlerin bir kısmını hedefleyip yok ederek bakırın, fotosentezle ilişkili olan plastosiyanin geni tarafından tüketilmesine ve fotosentezin devam etmesine izin vermektedir. Bu mekanizmanın sonucunda, bitkinin stres koşullarında fotosentez yapmasına ve hayatta kalabilmesine neden olmaktadır (Abdel-Ghany ve Pilon 2008, Burkhead vd. 2009).

Trindade vd. (2010), *Medicago truncatula* bitkisinde, bazı korunmuş miRNA'ların kuraklığa karşı ifade seviyelerindeki değişimleri izlemişlerdir. Bunların arasında miR169'in ifade seviyesinde sadece kök dokusunda azalma izlenirken, miR398a/b ve miR408'in hem kök hem de yapraktaki ifade seviyelerinde aşırı derecede artış gösterdiğini kayıdetmişlerdir. Ayrıca miR169'un, köklerde azalması ile hedef geninin MtHAP2-1 transkriptlerinin birikiminin uyumlu olmadığını belirtmiş ve aralarındaki regülasyonun mRNA seviyesinde olmadığını veya başka bir mekanizma tarafından kontrol edildiğini ya da söz konusu olan miRNA'ların su eksikliğinden sorumlu olmadığını açıklamışlardır. Fakat, miR398a/b ve miR408'in ifadelerinin artması ile hedefledikleri transkriptlerin (sırası ile COX5b ve plantacyanin) azalması sonucunda bu miRNA'ların kuraklık stresiyle doğrudan ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Mutum vd. (2013), pirinç bitkisinde mir408'in etkisini, kuraklık stresi altında kuraklığa hassas (Pusa Basmati 1 ve IR64) ve dayanıklı (Nagina 22 ve Vandana) 4 farklı çeşitte incelemişlerdir. mir408'in ifade seviyesinde, hassas çeşitlerde azalma, dayanıklı çeşitlerde ise artış tespit edilmiştir. Ayrıca, dayanıklı çeşitlerde plastocyanin benzeri proteinin, mir408 tarafından hedeflendiğini ve azaldığını fakat hassas çeşitlerde buna ters sonuç izlemişlerdir. Her dört çeşitte de miR408'e ait herhangi bir dizi varyasyon izlenmemiştir. Ayrıca mir408'in, squamosa promoter binding-like 9 tarafından kontrol

edildiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte çeşide bağlı olarak dayanıklılık gösteren bitkilerde miR408'in, $[Ca^{2+}]$ tarafından regüle olduğunu göstermişlerdir.

Ozhuner vd. (2013), arpa bitkisinde, bor stresine karşı miRNA'ların büyüme ve gelişme aşamalarında etkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, farklı kök ve yaprak gibi dokularda miRNA'ları birbirleri ile kıyaslayarak sınıflandırmışlardır. Toplamda 31 bilinen ve 3 yeni miRNA'ya rastladıklarını belirtmiş ve bunlardan 25'inin bor stresinde uyarıldıklarını tespit etmişlerdir. miR156d, miR171a, miR397 ve miR444 sadece yapraklarda ifade edilmesinden dolayı çeşitli miRNA'ların, dokuya spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Buna ilaveten, arpada toplam 934 transkriptin miRNA'lar tarafından kontrol edildiğini ve parçalandığını belirtmişlerdir. Bilgisayara dayalı analizler sonucunda, birçok miRNA'nın korunmuş transkriptom faktörlerin, örneğin Squamosa promoter-binding, MYB, Auxin response factor (ARF) gibi hedeflediklerini ve parçaladıklarını izlemişlerdi ve bunların bir çoğu bitkinin gelişim dönemlerinde ve strese karşı rol aldıklarını belirtmişlerdi. Sonuç olarak bor stresine maruz kalan arpa bitkilerinde, miR408'in önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Nataliya vd. (2014), fosfat eksikliğini, verim sınırlayıcı önemli major faktörlerden biri olarak tanımlamışlardır. Keten bitkisinde, yüksek verimli dizileme tekniğini kullanarak inorganik fosfat eksikliğinde korunmuş miRNA ailelerinin arasında yer alan miR398, miR399 ve miR408'in ifade seviyelerindeki değişiklikleri kaydetmişlerdir. Fosfat eksikliğinde, miR399 ve miR408'in arttığını fakat miR398'in ifade seviyesinin farklı olduğunu belirlemişlerdir. Keten bitkisinde, korunmuş miRNA'lar arasında yer alan miR399 ve miR408 hakkında domates gibi başka bitki türlerinden sadece miR398'in ekspresiyonunda benzerlik izlemişlerdir.

Macovei vd. (2012), transgenik pirinç bitkisinde, osa-miR414, osa-miR408 ve osa-miR164e ifade profillerini tuzluluk stresinde kontrol PDH45 (Pea DNA Helicase) incelemişlerdir. Söz konusu olan miRNA'ların tahmini hedef genlerini, bilgisayar ortamında incelemişlerdir. Sonuç olarak, DEAD-box helicase familyasına ait olan OsABP (ATP-Binding Protein), OsDSHCT (DOB1/SK12/helY-like DEAD-box Helicase) ve OsDBH (DEAD-Box Helicase) genlerini tahmin etmişlerdir. Elde edilen

sonuçları, 5' RLM-RACE tekniği kullanarak teyid etmişlerdir. Transgenik bitkilerde qRT-PCR analizi sonucunda da 100 ve 200 mM NaCl uygulamalarında OsABP, OsDBH ve OsDSHCT genlerinin ifade seviyelerinde artış izlemişlerdir. Buna karşın, osa-miR414, osa-miR164e ve osa-miR408'in ifadelerinde önemli derecede azalma tespit etmişlerdir.

Feng vd. (2010), tütün bitkisinde, miR408'in birikiminin bakır eksikliğini pozitif etkilediğini ve bitkilerde besin eksikliği durumlarına karşı önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Tütünde miR408 fonksiyonlarını incelemek amacıyla, Arabidopsis bitkisine ait AtmiR408'ini tütün bitkisine aktarmışlardır. miR408'in fonksiyonel karakterizasyonu analizinde, seçilen iki transgenik bitkide SOD, POD ve CAT gibi antioksidant enzimlerin aktivitelerinde azalma tespit etmişlerdir. Transgenik hatlarda, özellikle de yüksek bakır koşullarında, klorofil miktarlarında değişimler ve köklerin büyümesi izlenmiştir. Böylece bakır eksikliğinde miR408'in antioksidant enzimlerini regüle ederek, bitki büyümesinde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Zhang vd. (2013), Squamosa promoter binding protein - like7 (spl7) transkripsiyon faktörünün, bakır eksikliğinde mir408'in promotorunda yer alan GTAC motiflerine bağlandığını belirlemişlerdir. Böylece mir408'in, mutant bitkilerde büyüme kusurlarını izlemişlerdi. Ayrıca mir408'i, vejetatif büyümede en güçlü modülatör olarak tanımlamışlardır. mir408'in ifade seviyesinin, çevresel faktörlerden etkilendiğini ve bu hususta henüz biyolojik fonksiyonunun tam olarak belli olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Arabidopsis bitkisinde, mir408'i aşırı ifadesini ve yapay miRNA tekniği ile susturularak T - DNA insört hatlar oluşturmasıyla tamamen yok edilmesinin etkisini bitki büyümesinde incelemişlerdir.

Ren ve Tang. (2012), sukrozdan etkilenen miRNA'ların belirlenmesinde microarray tekniğini, aday miRNA'ların tespitinde ise northern blot tekniğini kullanmışlardır. Analizler sonucunda, miR398, miR408, miR319 ve miR160 ailelerinin sukrozdan etkilendiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, sukrozla uyarılan miR398 ve miR408'in, SPL7 transkripsiyon faktörü ile ilişkili olduğunu da belirtmişlerdir. Fakat, sukroz ile etkilenmesi sonucunda ifade seviyesinde artış gösteren miR398 ve miR408'in, bakır

fazlalığında ise ifade seviyelerinin azaldığını ve yüksek dozlarda sukroz muamelesinde bakır birikiminin bastırıldığını açığa çıkarmışlardır. SPL7'nin yokluğunda ve sukroz eksikliğinde, bakırın birikiminde azalma izlemişlerdir. Sonuç olarak, SPL7'nin varlığında ve yokluğunda, bakırın birikiminin sukroz tarafından kontrol edildiğini belirtmişlerdir.

Kantar vd. (2010), arpa bitkisinde, korunmuş ve kuraklıkla ilişkili olan mikroRNA'ları tanımlamaya çalışmışlardır. Toplam 18 farklı aileden oluşan 28 yeni miRNA tespit etmişlerdir. Nükleotid analizler sonucunda, pre-miRNA'ların yaklaşık 46 – 114 nükleotid uzunluklarında olup ortalama 77.14 nükleotid içerdiklerini ve 28 yeni miRNA'da tahminen 445 mRNA'yı hedefleme potansiyeline sahip olduklarını belirtmişlerdir. Kuraklık stresinde, bunların değişik seviyede ifade edildiklerini; ayrıca, bazılarında kök ve yaprak dokularında ifade davranışlarının benzerliğini izlemişlerdir. Sonuç olarak Hvu-miR156, Hvu-mi166, Hvu-miR171, ve Hvu-MIR408 ailelerinin, dehidrasyon stresine karşı etkili olduklarını belirlemişlerdir. Söz konusu miRNA'ların kuraklık stresi sonucunda hedefledikleri transkriptlerinin belirlenmesi için 5' RLM-RACE yöntemini kullanarak, yaprak dokularında 7 adet farklı parçalanmış transkriptlere rastlamışlardır. *In situ* analizleri sonucunda, aynı miRNA'lar tarafından parçalanabilecek 15 adet farklı EST bulduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca, miRNA'ların ve hedef transkriptlerin ifade seviyelerini ölçerek aralarında pozitif kolerasyon olduğunu yani miRNA'nın ifade seviyesi artarken hedef genin seviyesinin azaldığını belirlemişlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Bu çalışmada, Türkiye’de yetiştirilen Gökçe, Er 99, Yaşa05 ve Akçin 91 nohut çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitlere ait tohumlar, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Ankara Yenimahalle Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü’nden temin edilmiştir.

3.1.2 Büyüme düzenleyicileri ve saklama koşulları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, Merck KGaA (Damstadt, Almanya), Sigma Aldrich Chemical Co. (St Lo. MO, ABD) ve Duchefa Biochemie (Harlem, Hollanda) firmalarından temin edilmiştir. NAA, IAA, BAP ve GA₃ stok çözeltileri, 1 mg/ml derişimde 1N NaOH veya etanol ile çözüldükten sonra 10 ml su ile tamamlanarak 4 °C’de saklanmıştır.

3.1.3 Rejenerasyon için kullanılan eksplantlar

Rejenerasyon için plumula, embriyonik eksen ve radikula olmak üzere üç farklı eksplant kullanılmıştır (Şekil 3.1). Eksplantları elde etmek için öncelikle embriyolar, *in vitro* koşullarda 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren MS besin ortamında 48 saat boyunca bekletilmiştir. Bu ön muamelelerden sonra embriyolardan izole edilen plumula, embriyonik eksen ve radikula eksplantları, istenilen ortamlarda kültüre alınmıştır. Bütün besin ortamlarının kültür kapları ve saf su sterilizasyonu, Hirayama firmasına ait otoklavda 118 kPa basınç altında, 121°C’de, 20 dk bekletilerek yapılmıştır. Petri kutuları, Memmert firmasına ait etüvde 160°C’de, 2 saat bekletilerek steril edilmiştir.

3.1.4 *In vitro*'da yüzey sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu, doku kültürü çalışmalarında dikkate alınması gereken önemli aşamalardan biridir. Yüzey sterilizasyonu için eksplantlara uygulanacak olan kimyasalların, bitkiye zarar verme olasılığı çok yüksektir. Bu nedenle kullanılacak kimyasalların, en az miktarda ve en kısa sürede muamele edilmesi gerekmektedir.

Baklagil bitkilerinin sterilizasyonu ile ilgili Türkiye'de, Bhatti (2001), Sağlam (2010) ve Aasim (2010)'ın yapmış oldukları çalışmalar öne çıkmaktadır. Ayrıca, Nur (2010), Temizgül ve Akbulut (2010) tarafından yapılan çalışmalarda, nohut bitkisinde yüzey sterilizasyonu esnasında karşılaşılan sorunların çözümlerine açıkça değinilmiştir.

Her bitkinin, yüzeysel olarak bakteri, mantar vb. organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli olan dezenfektan dozu ve uygulama süresi farklı olmaktadır. Bu yüzden sterilizasyon işlemlerinde, her çeşide ait tohumların optimizasyonu için ayrı ayrı uygun dezenfektan dozu ve uygulama süresinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu hususta nohut tohumlarının yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarıyı sağlayacak en düşük dezenfektan dozunun (50 adet tohum için) belirlenmesi için 20 dk süre ile % 75, % 60, % 45, % 30 ve % 15 oranlarında ticari çamaşır suyu (Ace-Türkiye, % 5 NaOCl) kullanılmıştır. Daha sonra steril saf su ile 3 × 5 dk boyunca durulama işlemi yapılmıştır. Embriyoları elde etmek amacıyla tohumlar, kotiledonların kolay açılabilmesi ve tohum kabuklarının yumuşaması için bir gün boyunca steril saf su içeren kaplarda bekletilmiştir.

3.1.5 Eksplant izolasyonu ve kültürü

Steril edilen tohumlar, 24 saat steril saf suda bekletilen tohumlardan çıkartılan embriyo eksplantları, öncelikle steril petri kaplarında 25 mg/l BAP, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA3, 25 mg/l GA3, % 3 (w/v) sukroz ve % 0.65 (w/v) agar ile katılaştırılarak hazırlanan MS besin ortamında (Murashige ve Skoog 1962) 2 gün boyunca ön muameleye tabi tutulmuştur.

Daha sonra embriyolardan elde edilen plumula, embriyonik eksen ve radikula eksplantları, sürgün oluşumu için değişik BAP ve NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. 25 gün sonra, eksplantlar üzerinde gelişen sürgünler incelenmiştir.

Tüm kültürler, iklim dolabında (Sanyo Versatile Growth Chamber) $24 \pm 1^\circ \text{C}$ 'de, 16 saat ışık (6000 luks) ve 8 saat karanlık fotoperiyodu ayarlanarak kültüre alınmıştır. Denemenin her muamelesinde, 4 tekerrür ve her tekerrürde 5'er eksplant olmak üzere kullanılmıştır. Bu muamelede, 25 gün sonra hızlı gelişme gösteren eksplantlar değerlendirmeye alınmıştır.

Rejenere olan sürgünler kesildikten sonra, çeşitli NAA ve sürgünler üzerinde nekrozu ve fenolik bileşiklerin aktivasyonunu önlemek amacıyla aktif kömür içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Başka bir çalışmada, *in vitro* koşullarda gelişen sürgünler, 45 g/l sukroz, farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren $\frac{1}{2} \times$ MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Altı hafta sonra köklenen sürgünlere ait verileri değerlendirilmiştir. Denemenin her muamelesinde, her tekerrürde 5'er eksplant olmak üzere 3 tekerrür kullanılmıştır.

Mikroçoğaltım sonucu elde edilen veriler, "SPSS for Windows" programı aracılığıyla one way ANOVA yapılmış, muamele ortamlarını karşılaştırmak için IBM SPSS ver. 21 bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi uygulanmıştır.

3.1.6 Bitkilerin *in vitro* koşullarda dış ortam şartlarına adaptasyonu

Köklendirilmiş bitkiler, köklerine yapışmış agar içeren ortamı uzaklaştırmak için köklerine zarar verilmeyecek şekilde çeşme suyu ile yıkandıktan sonra ve 3 litre çeşme suyu içeren kaplarda 30 dk bekletilmiştir (Aasim vd. 2008). Bitkilerin, dış ortam koşullarına adaptasyonunu sağlamak için kum, kum + torf (1:1) ve sadece torf içeren saksılarda denemeler yapılmıştır. Kum ve torf karışımının sterilizasyonu, aktarma yapılmadan önce 160°C sıcaklıkta, 2 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra köklendirilmiş bitkiler, yukarıda belirtilen 0.5 litre karışımları içeren 10 × 8 × 9 cm

saksılara şaşırtılmıştır. Her saksının alt kısmında, drenaj için birkaç delik açılmıştır. Tarla kapasitesine kadar sulanan bitkiler, sera koşullarında 16 saat ışık fotoperiyodunda tutulmuştur.

Bitkiler aktarılmadan önce kullanmış olan torf, kum ve torf + kum karışımını içeren saksılara 300 ml kadar su verilmiştir. Bitkilerin, alışma sürecinde nem dengelerini koruyabilmelerini ve kültür kaplarında olduğu gibi kapalı ortam şartlarını sağlayabilmek için saksıların üzerine şeffaf, açık mavi ve beyaz poşetler geçirilmiştir. Seraya aktarılan bitkilerin poşetleri, 1 hafta sonra çıkartılmıştır. Bitkiler dış ortam koşullarına adaptasyon sağladığından dolayı serada yaşamaya devam edebilmişlerdir.

3.2 İstatistiki Analizler

Denemeler, faktöriyel deneme desenine göre kurulmuştur. Her muamele, içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu, 4 tekerrürlü olacak şekilde 100 × 10 mm'lik petri kutularında yapılmıştır. Elde edilen veriler, IBM SPSS 21 bilgisayar programı aracılığıyla Oneway Anova veya Univariate varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalamaların kullanılmasıyla uygulanan Duncan testi sonucunda en iyi besin ortamı ve kültür koşulları belirlenmiştir.

3.3 Ath Pre-miRNA408'in klonlanması

Pre-mir408 geninin çoğaltımında, *A. thaliana* bitkisinin genomik DNA'sı üzerinden tarama yapılmıştır. Bu nedenle öncelikle *Arabidopsis thaliana* bitkisinin mirbase veritabanında yer alan pre-mir408 gen dizisi elde edilmiştir:

5'AAGGTTAGATTGGTATTGCAATGAAAGAAGACAAAGCGGTAATGAGAGA
GAGACAGGGAACAAGCAGAGCATGGATTGAGTTTACTAAAACATTAAACG
ACTCTGTTTTGTCTCTACCCATGCACTGCCTCTTCCCTGGCTCCCTCTTTTTTT
CTCTATATTTCTCTCTCTCCTTTCATTTACAGCTTTCAATGGAATTTTATTGC
TACTGCTAACG 3'

Daha sonra dizinin hem 5' hem de 3' tarafından ilk 20 baz çifti kullanılarak, ileri ve geri primerler manuel olarak tasarlanmıştır. Gateway sisteminden yararlanabilmek için 5' ve 3' primerlerin sonuna AttB uçları ilave edilmiştir.

Athpre-

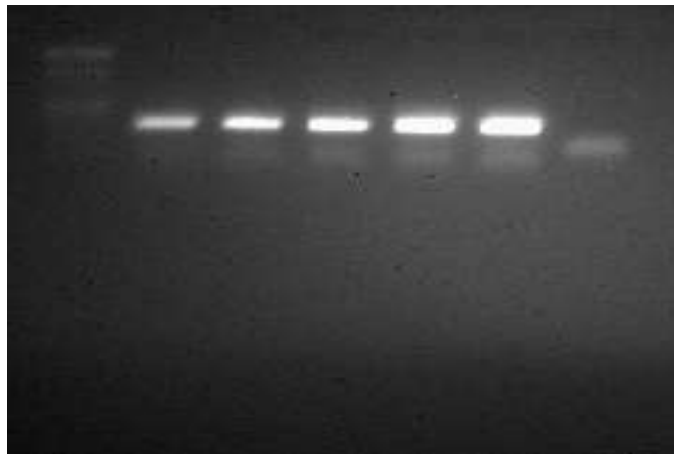
miR408F5' ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGGTTAGATTGGTATTGCAA
3'

Ath pre-

miR408R5' ggggACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTTAGCAGTAGCAATAAAAT
3'

Sentezletilen özgün ileri ve geri primerleri, *A. thaliana* Col-5-(yabani tip) genomik DNA'sı kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel elektroforezi sonucunda, 276 baz çifti içeren istenilen bölge görüntülenmiştir (Şekil 3.1). PCR işlemi, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 0.5 µM özgün ileri ve geri primerler, 100 ng genomik DNA ve 1 U Taq polimeraz içeren toplam 25 µL hacmindeki karışımda gerçekleşmiştir.

PCR koşulları, ön ısıtma 94°C'de 6 dk, toplam 35 döngü boyunca 45'er sn olmak üzere parçalanma 94°C'de,bağlanma 52°C'de, uzama 72°C'de ve son uzama 72°C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.1 pre-miR408 geninin jel elektroforezi görüntüsü

3.3.1 Gateway klonlama

Jel elektroforezinde görüntülenen miR408 genine ait bantların, jelden kesildikten sonra saflaştırılmasıyla jelden geri kazanımı sağlanmıştır. Jel saflaştırılması işlemi, Qiagen firmasına ait kit protokolünde yazıldığı gibi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminden sonra elde edilen PCR ürünü, Gateway klonlama sistemi ile ifade vektörüne aktarılmıştır. Bu klonlama yönteminde, öncelikle saflaştırılan PCR ürünü, attB bölgeleri (attB1, attB2), pDONOR vektörü ise attP bölgeleri (attP1, attP2) tarafından çift taraflı kuşatılır. attB bölgeleri tarafından çift taraflı kuşatılan PCR ürününün, attP bölgeleri tarafından çift taraflı kuşatılan pDONOR vektörüne ligasyonu için Gateway® BP Clonase™ II enzim karışımı kullanılmıştır. BP klonaz tarafından katalizlenen ligasyon işleminde, attL1 bölgesini üretmek için attB1 bölgesi sadece attP1 bölgesiyle rekombine olurken, attL2 bölgesini üretmek için attB2 bölgesi sadece attP2 bölgesiyle rekombine olur. Böylece attL1 ve attL2 bölgeleri ile çift taraflı kuşatılmış seçilen DNA parçaları giriş klonları içerisinde oluşturulur. Ligasyon işlemi için 7 ul attB-PCR ürünü (150 ng), 1 ul pDONR/Zeo vektörü (150 ng) ve 2 µL BP enziminden oluşan karışım, ependorf tüpüne alınarak 25°C’de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünlerinin E. coli’ye transformasyonu yapılmıştır.

3.3.2 Ligasyon ürünlerinin transformasyonu

Ligasyon ürününün transformasyonu için öncelikle E.coli Dh5- α hücreleri, kompetant hale getirilmiştir. E.coli Dh5- α stoğundan seçilen tek bir koloni, herhangi bir antibiyotik içermeyen 2 ml LB ortamına inoküle edilmiştir. Hücreler 37° C, 200 rpm’de gece boyunca çoğaltılmıştır. Daha sonra, 1 ml gece boyunca çoğaltılan kültürden alınıp, 100 mL LB ortamı üzerine ilave edilerek 37° C, 200 rpm’de ODA590 nm 0.375 değerine ulaşana kadar steril beherde büyütülmüştür. Beherin içindeki kültür, 50 mL’lik tüplere dağıtılıp, 10 dk buzda bekletilmiştir. Tüp içindeki kültür, 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz atılmıştır. Pellet, 5 mL soğuk steril CaCl₂ (4 mM)’de çözülüp 2500 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz atılmıştır. Her pellet, tekrar 2 mL soğuk CaCl₂ (4 mM)’de çözülüp santrifüj edilmiştir.

Bu aşama tekrarlanmıştır. E.coli Dh5- α kompetant hücreleri, yeni hazırlanan 4 mM, 2 mL CaCl₂'da çözülüp, 4°C'de bir gece boyunca bekletildikten sonra ligasyon ürünlerinin transformasyon işlemi için kullanılmaya hazır hale gelmiştir. Eppendorf tüpün içine alınan 5 μ L ligasyon ürününün üzerine 50 μ L E.coli Dh5- α kompetant hücre ilave edilmiştir. 30 dk buzda bekletildikten sonra 42°C'de 45 saniye inkübe edilerek sıcaklık şoku verilmiştir. Daha sonra hızlıca 2 dk buza alınıp soğutulmuştur. Çözeltinin içine 200 μ L LB sıvı ortamı ilave edilerek, 37°C'de 45 dk inkübe edilmiştir. Doğru kolonilerin seçilebilmesi için bakteri, seleksiyon ortamında 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.

Bakteri seleksiyon ortamının hazırlanmasında otoklavlanmış, 40° C'ye kadar soğutulmuş 50 mL LB agar içerisine, 50 μ L amfisilin (50 μ g/mL) mavi beyaz kolonilerden mavi kolonilerin seçilmesini sağlayan 100 μ L 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal 80 μ g/mL) ve hücrelerin büyümesinin indüklenmesi yanısıra β -galactosidase geninin uyarılabilmesi için 50 μ L isopropylthiogalactoside (IPTG 100 μ g/mL) ilave edilmiştir.

Transformasyon sonucunda elde edilen bakteri ürünü, steril bir öze ile ortam üzerine yayıldıktan sonra 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasından sonra büyüyen kolonilerin arasından beyaz koloniler seçilmiştir. Seçilen beyaz kolonilerden her biri, 200 μ L LB ortamın içerisinde 37°C'de 3 saat boyunca çalkalanarak çoğaltılmıştır. M13 primerleri kullanılarak yapılan koloni pcr analizi sonucunda, klonlamanın doğruluğu teyit edilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra sekanslama analizi ile dizi tespit edilmiştir. Pozitif örnekler, % 40 gliserol ilave edilerek son hacmi tamamlandıktan sonra -85°C'de stoklanmıştır.

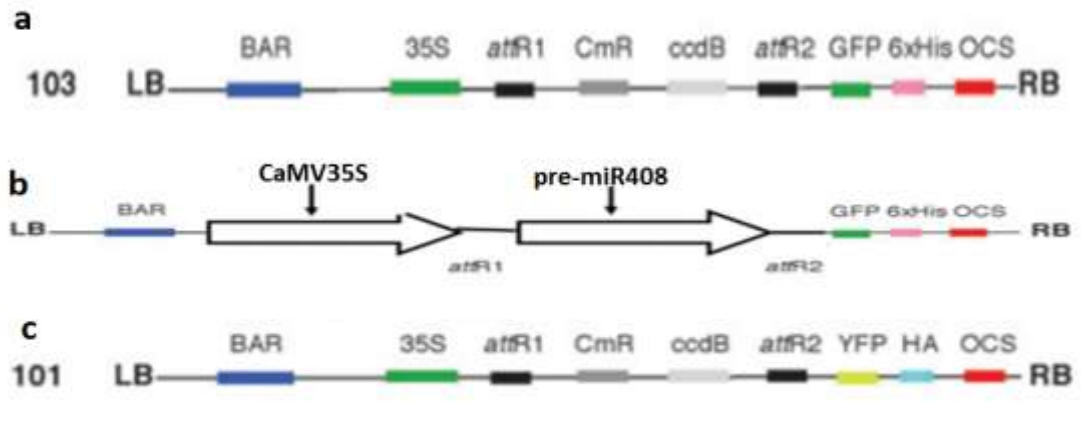


Şekil 3.2 pre-miR408 geninin M13 primerler eşliğinde koloni PCR sonucu

LR klonaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda, attL1 ve attL2 bölgeleri tarafından kuşatılan DNA parçalarının, ikinci bir rekombinasyon reaksiyonu tarafından attR1 ve attR2 bölgelerini içeren pDEST vektörlere transfer edilmesiyle ifade klonu oluşur. Oluşan rekombinant DNA yapıları ifade klonu olarak bilinmektedir. pENTRY klonlarının üretiminden sonra giriş klonu oluşturabilmek için pEarlyGate103 uyumlu vektör seçilmiştir. Bu vektör, miR408'in aşırı ifade edilmesi için kullanılmıştır. Sağ sınır (RB) ve sol sınır (LB) bölgeleri arasında 35S-*Bar*-Gateway-GFP-His tag-OCS 3' bulunmaktadır. LR reaksiyonu sonucunda Gateway bölgesine, pre-miR408 geni ligasyonu yapılmıştır (Şekil 3.3 a,b). LR reaksiyonunda, 1 µL LR Clonase™ enzim karışımı (katalog no.11791-019), 1 µL hedefvektör, 1 µL giriş vektör, 2 µL 5X LR klonaz reaksiyon tamponu ve TE tamponu ilave edilerek reaksiyonun son hacmi 10 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım, 25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ligasyonun sonucunda elde edilen 35s :: pre-mir408 içeren pEARLYGATE103 plazmidinin, *A. tumefaciens* LBA 4404 hattına elektroporatör cihazı kullanılarak (3.3.4 bölümüne bakınız) daha önce hazırlanan elektro kompetant hücrelerine transformasyonu yapılmıştır (3.3.3 bölümüne bakınız). Elde edilen transformasyon ürünü, 50 mg/l kanamisin içeren LuriaAgar ortamında kültüre alındıktan sonra 28°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Büyüyen kolonilerden, 35s primerleri kullanarak yapılan koloni PCR analizi sonucunda, transformasyonun doğruluğu teyit edilmiştir.

Kanıtlanmış koloniler, son hacmi % 40 gliserol ilave edilerek son hacme tamamlandıktan sonra -85°C’de stoklanmıştır.

Böylece pEARLYGATE103 plazmidine, *Ath* pre-mir408 geni klonlanmıştır. Ayrıca kontrol bitkilerinin üretiminde, *Bar* geni içeren pEARLYGATE101 (boş plazmit) plazmidi kullanılmıştır. Konstrakt haritaları, Şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3 Vektörlerin hazırlanması

a. Hazırlanan pEARLYGATE103, b. attR1 ve attR2 bölgeleri arasında klonlanmış olan pre-miR408 geni, c. pEARLYGATE101 plazmidi (vektör kontrol)

3.3.3 Elektro kompetant hücre hazırlanması

Gece boyunca çoğaltılan bakteri kültüründen 1 ml alınıp üzerine 40 ml LB ilave edilerek 28°C’de 200 rpm’de 4 saat boyunca bekletilmiştir. Bakteri kültürünün, daha önceden steril edilmiş ve soğutulmuş falkon tüplere dağıtılmasının hemen ardından 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, 40 ml soğuk suda çözündürülmüştür. Daha sonra 4°C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Son aşama 2 kere tekrarlandıktan sonra pellet, 4 ml soğuk steril % 10’luk gliserolda çözündürülmüştür. Ardından 4°C’de 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra bakteripelletinin üzerine 500 ul % 10’luk gliserol ilave edilerek pelletin çözünmesi sağlanmıştır.

3.3.4 Plazmitlerin elektroporasyon ile transformasyonu

Elektroporasyon tüpüne, 10 µl bakteri, 1 µl plazmit ve 3 mL elektrolit tamponundan hazırlanan karışımın üzerine 11 µl resturasyon tamponu ilave edilmiştir. Daha sonra Neon pipet ucu ile çözeltiden 10 µl alındıktan sonra Neon pipetii elektroporasyon cihazına yerleştirilmiştir. Cihaz, 1800 wata ayarlanıp çalıştırılmıştır. Böylece plazmitlerin, elektro kompetant hücrelere transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.4 Gen Aktarım Çalışmaları

3.4.1 Bakteri materyali

Bakteri materyali olarak, *A. tumefaciens* GV2260 (p35S GUS-INT), LBA4404 (pEALRLYGATE103) ve LBA4404 (pEARLYGATE101) bakteri hatları kullanılmıştır. Nohut bitkisinde yapılan gen aktarım çalışmalarının optimizasyonunda, öncelikle hazırda bulunan *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260::p35 gus int hattı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildikten sonra en iyi bitki transformasyon protokolü optimize edilmiştir. LBA 4404::pEARLYGATE103 (35s::Bar + pre-miR408) hattı, transgenik miR408 bitkilerinin ve LBA 4404::pEARLYGATE101 (35s::Bar) hattı ise kontrol bitkilerinin elde edilmesi için optimize edilen protokola tabi tutulmuştur. Bakteri materyalinin çoğaltılmasında, LB ortamı (Luria ve Bertani, 1951) kullanılmıştır. Bakteri seleksiyon amaçlı her üç plazmidin taşıdığı NptII geninden dolayı 50 mg/l kanamisin monosülfat kullanılmıştır. Çoğalan bakteriler, % 40 gliserol ilavesiyle son hacme tamamlanarak -85°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 Bakteri kültürlerinin saflaştırılması ve büyütülmesi

Sıvı bakteri kültürlerinin çoğaltılması için -85°C'de stoklanan bakterilerden, 100 µl alınıp NA besin ortamı üzerine steril bir öze aracılığıyla yayılmıştır. Kültür içeren petri kutuları, ters çevrilerek 28°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. *A. tumefaciens* kolonilerinin oluştuğu gözlemlendikten sonra büyütülmüş olan bireysel kolonilerden, steril bir öze ile alınan tek koloniler, gerekli antibiyotikleri içeren NB (1.0 g/l Yeast

extract, 2.0 g/l Pepton, 5.0 g/l NaCl, Sigma Chemical Co St Lo, Mo) ortamına konulmuştur. Daha sonra bakteri kültürleri, 28°C’de 190 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 1 gün süreyle çoğaltılmıştır. Bakteri çözeltisi, 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen üst sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Bakterilerin inokülasyon ortamına alıştırılması için üzerine aynı hacimde, daha önce hazırlanan ve steril edilen MES,asetosiringon içeren $1 \times$ MS veya $1/2 \times$ MS ortamı ilave edilmiştir. Bakteri çözeltisi, çok hassas bir şekilde (birkaç kere alt üst yapılarak) karıştırılarak pelletin, inokülasyon tamponu içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. 28°C’de 200 rpm’de 1 saat boyunca çalkalayıcıda tekrar çalkalanması sonucunda transformasyon işlemi tamamlanmıştır. Çalışmalar, kontaminasyon riskini önlemek amacıyla laminar flow kabin içerisinde yapılmıştır.

3.4.3 Antibiyotikler ve kullanım koşulları

Bakteri ve bitki seleksiyonu için Duocid, kanamisin monosülfat, fosfinotrisin ve amfisilin antibiyotikleri kullanılmıştır. Antibiyotikler, bakteri ve bitki büyütme ortamına ilave edilmeden önce mikro filtrelerden (Millipore, MA, ABD) geçirilerek steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan ortamlar, 40 – 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Filtre sterilizasyonundan sonra stok çözeltiler -20°C’de muhafaza edilmiştir. İnokülasyonu yapılmış dokuların, bakterilerden kurtulması için geniş spektrumlu Duocid antibiyotiği, transgenik GUS bitkilerinin seleksiyonunda kanamisin monosülfat, transgenik miR408 ve bar bitkilerinin seleksiyonunda fosfinotrisin, bakteri seleksiyonunda ise kanamisin monosülfat ve amfisilin kullanılmıştır.

3.4.4 A. tumefaciens Gv2260 hattıyla gen aktarım çalışmalarının optimizasyonu

Gen aktarımında öncelikle embriyo eksplantı kullanılmıştır. Gen aktarımında indüksiyon tamponu olarak $1/2$ sıvı MS kullanılmıştır. Ortam pH’sının sabit hale getirilmesi (10 mM) MES [2(N-Morpholino) ethanesulfonic acid] ve bakterilerin saldırma gücünün, virülensliğinin arttırabilmesi için (100 mM) asetosiringon ilave edilmiştir (Koc vd. 1997). Nohut bitkinde, en yüksek transformasyon frekansını

gerçekleştirebilmek için bakteri yoğunluğunun optimizasyonu yapılmıştır. Bu hususta, bakteri yoğunlukları OD₆₀₀ değerinde ölçülüp 0.5, 0.8 ve 1.5 konsantrasyonlarında denenmiştir. Transformasyon çalışmalarının optimizasyonundan önce *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260 (p35S GUS-INT) hattı kullanılmıştır. Transformasyonun gerçekleştirilmesinde, embriyo eksplantı kullanılmadan önce bistüri ile yaralanmış ve vakum infiltrasyon amaçlı steril filtre kağıdının üzerinde bir süre laminar flow kabin içerisinde bekletildikten sonra bakteri içeren inokülasyon tamponu içinde 25 - 30 dk bekletilmiştir. İnokülasyondan sonra eksplantlar, (100 mM) asetosiringon ve (10 mM) MES içeren MS ortamında 2 gün boyunca ko-kültivasyona alınmıştır. Daha sonra bakteri gelişimini önlemek için eksplantlar, steril saf su ile yıkandıktan sonra 500 mg/l Duocid içeren sıvı rejenerasyon ortamında birkaç dk bekletilmiştir. sadece gen aktarılmış eksplantlardan sürgün gelişimini sağlamak için plazmitin taşıdığı NptII geninden dolayı 50 mg/l kanamisin monosülfat ve bakteri büyümesini engellemek için 500 mg/l Duocid içeren sürgün ve kök rejenerasyon ortamında eksplantlar kültüre alınmıştır. Daha sonra elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, en iyi bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ değerinde seçilmiştir. İkinci denemede, en iyi bakteri yoğunluğu esas alınarak tek kotiledon (flamingo eksplantı) ve çift kotiledon taşıyan embriyo, embriyonik eksen ve embriyonik plumula eksplantlarında transformasyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda transformasyon için seçilen en uygun eksplant, transgenik miR408 ve *Bar* bitkilerinin (kontrol olarak) elde edilmesi için kullanılmıştır.

3.4.5 *A. tumefaciens* LBA4404 (pEARLYGATE103) ve LBA4404 (pEARLYGATE101) bakteri hatları ile Gen Aktarım Çalışmaları

A. tumefaciens LBA4404 (pEARLYGATE103) ve LBA4404 (pEARLYGATE101) bakteri hatları, bitki seleksiyonu için *bar* geni taşımaktadır. Transformasyon çalışmalarında, önce *bar* genine karşı kullanılan ppt (phosphinothricin) antibiyotiğinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu hususta, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5.0 mg/l içeren MS besin ortamında, transgenik olmayan embriyo eksplantları kültüre alınarak LD₁₀₀ değerinde ayarlanmıştır. 3 hafta sonra verilerin değerlendirilmesi sonucunda, en öldürücü ppt oranı belirlenmiştir. Transgenik miR408 ve *bar* (kontrol bitki) bitkilerinin elde edilmesinde yukarıda belirtilen en uygun eksplant ve en etkili inokülasyon yöntemi kullanılmıştır. İnokülasyondan sonra eksplantlar, ko-kültivasyon tamponu ortamında 2

gün boyunca ko-kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlar, seleksiyon sürgün ve kök rejenerasyonu ortamlarında kültüre alınarak aday transgenik bitkiler elde edilmiştir. Daha önce yapılan doku kültürü çalışmaları sonuçlarına göre seçilen sürgün ve kök rejenerasyonu ortamlarına, bitki seleksiyonunda en öldürücü ppt dozu olan ve *Agrobacterium* gelişiminin önlenmesini sağlayan 500 mg/l Duocid ilave edilmiştir. Gelişen bitkiler, serada adaptasyon sağlamışlardır.

3.5 Gen Aktarımı Yapılan Bitkilerin Belirlenmesi

Optimizasyon denemelerinde kullanılmış olan GV2260 *Agrobacterium tumefaciens* suşunun hatlarında ve Gus geni taşıyan transgenik aday bitkilerinin belirlenmesinde, öncelikle Histokimyasal GUS analizi (Jefferson 1987) sayesinde transformasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bitki dokuları, 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10 mM EDTA, % 0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) içeren çözeltide, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler, % 95’lik etanolde yıkanmış, transgenik dokularda mavi renk bölgeleri gözlenmiştir. GUS analizi sonucunda pozitif sonuç veren örnekler, 35s promotor primerleri kullanılarak PCR analizine tabi tutulmuştur.

3.5.1 DNA izolasyonu

Aday transgenik bitkilerin DNA izolasyonları, hem kit kullanılarak hem de manuel olarak yapılmıştır. Kullanılan it yöntemi, Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Valencia, CA) protokolünde yazıldığı gibi uygulanmıştır. Manuel olarak kullanılan CTAB yönteminde ise ekstraksiyon tamponu ve TE (Tris Elution) tamponlarının hazırlanmasında, 1M Tris HCL (pH 8.0), 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 5 M NaCl stok çözeltisi kullanılmıştır. Transgenik aday bitkilerin DNA izolasyonlarında, daha önceden -80°C derin dondurucuda stoklanan yaprak örnekleri kullanılmıştır.

3.5.2 CTAB tamponun hazırlanması

CTAB tamponu (çizelge 3.1)'de verildiği gibi hazırlanıp stoklanmıştır. Stok çözeltisi kullanılmadan önce filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Çizelge 3.1 CTAB tamponu hazırlanmasında gerekli olan kimyasallar

Kimyasallar	Hacim (1 örnek için) 1×
CTAB	12.5 mg
ddH ₂ O	360 µL
1M Tris	62.5 µL
5M NaCl	175 µL
0.5M EDTA	25 µL
B-mercaptoethanol	1.25 µL
Toplam	12.5 mL

3.5.3 CTAB yöntemine göre DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda, 500 mg yaprak doku parçası kullanılmıştır.

1. Yaprak örnekleri, sıvı azot kullanılarak havanlarda ezilmiştir. Havanlar, kullanılmadan önce 2 saat boyunca 200°C sıcaklıkta etüv cihazında steril edilmiştir.
2. Toz haline getirilen yaprak dokuları, 2 mL'lik ependorf tüplerine alındıktan sonra üzerine 500 ml CTAB ekstraksiyon tamponu ilave edilmiştir. 65 °C'de 40-60 dk inkübe edildikten sonra her 10-15 dk aralığında tüpler alt üst edilmiştir.
3. Daha sonra 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

4. Pellete dokunmadan, oluşan üst faz, yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 550-750 µl hacminde, 24:1 oranında soğuk kloroform/izoamil alkol ilave edilmiştir. 13000 rpm’de 15-30 dk santrifüj edilmiştir.
5. Yeni bir tüpe aktarılan üst fazın üzerine 750 µl soğuk isopropanol ilave edildikten sonra -20 °C’de 2-3 saat bekletilmiştir. 13000 rpm’de 15-20 dk santrifüj edilen örneklerin, çöktürme işlemi yapılmıştır.
6. Elde edilen pellet, 1 mL % 70’lik EtOH’da yüzdürülüp yıkandıktan sonra 10000 rpm’de 7 dk santrifüj edilmiştir..
7. Pelletler, etanolü uzaklaştırmak için oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50 µl TE (pH 7.5) tamponu içinde çözünmüştür.
8. RNA’ları ortamdan uzaklaştırmak için 50 mg/ml RNase (sigma) ilave edilen örnekler, 37 °C’ de 30 dk inkübe edilmiştir.

3.5.4 Primer dizileri

Transgenik bitkileri belirlemek amacıyla PCR ile çoğaltılan 35s promotor, *BAR* ve pre-miR408 genlerinin primer dizileri çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 PCR işleminde kullanılan primer dizileri

Primer	Diziler
pre-miR408-F	ggggACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTaaggtagattggtg ttgcaa
pre-miR408-R	ggggACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT cgt tag cag tag caa taa aat
<i>Bar</i> geni-F	CATCGAGACAAGCACGGTCAA
<i>Bar</i> geni-R	ATATCCGAGCGCCTCGTGCAT
35s promotor-F	AAGGAAGGTGGCTCCTACAAA
35s promotor-R	GGGTCTTGCGAAGGATAGTG

3.6 PCR Analizleri

Nohut bitkisinden izole edilen DNA örnekleri, 35s promotor, *Bar* geni ve pre-miR408 bölgelerinin transfer oldukları ve bitki genomuna entegre edilmesi açısından PCR analizleri yapılmıştır.. Bu genlere özgü tasarlanan primerler, oligonükleotid sentezi yapan bio basic firması tarafından hazırlanmıştır (çizelge 3.2). PCR işleminde 35s promotor, *Bar*, pre-miR408 genleri için sağ ve sol sınır olmak üzere ileri ve geri primerler kullanılmıştır. PCR analizi, 2.5 mM MgCl₂ (15 mM), 0.5 mM dNTP (10 mM), 0.4 µM özgün ileri ve geri primerler, 1.4 x Taq DNA polimeraz tamponu (+KCl, -MgCl₂), 100 ng genomik DNA, 1 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 2x steril destile su içeren toplam 25 µL hacmindeki karışımda gerçekleşmiştir. Ayrıca her reaksiyon için bitki negatif kontrol (transgenik olmayan bitki), pozitif kontrol (plazmit) ve negatif kontrol (örnek yerine su, NTC) kullanılmıştır. PCR döngüsü tamamlandıktan sonra PCR ürünleri ve molekül ağırlığı bilinen markör, agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

3.6.1 PCR programı

Reaksiyonlar, primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre Biometra T-personal thermocycler cihazında gerçekleştirilmiştir.

94 °C 5 dk (ön ısıtma)

95 °C 40s dk (parçalanma)

52-54-60 °C 40s dk (3 farklı primerin bağlanması)

72 °C 40s dk (uzama)

40 döngü

72 °C 10 dk

4 °C ∞

3.6.2 Agaroz jel elektroforezi

PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünler, % 1'lik agaroz jel elektroforezinde 100 volt, 100 Amperde yürütölüp ayrılmıştır. % 1'lik agaroz jelin hazırlanmasında 1 g agaroz, 100 ml 1×TBE (10.8 g/l Trizma - base, 5.5g/l borik asit, 4 ml 0.5 M EDTA pH=8) tampon içinde mikrodalgada eritilmiştir. Sıcaklığı 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra DNA'nın UV ışını altında görüntülenebilmesi için 0.8 µl Etidyum bromür ilave edilmiştir. Jel, taraklı kalıbına döküldükten sonra soğumaya bırakılmıştır. Agaroz jel katılaşıp taraklar çıkartıldıktan sonra jel, 1×TBE tamponunu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR sonucunda elde edilen DNA örnekleri, içerisine DNA yükleme boyası (fermantase) ilave edilerek pipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. 100 voltta 1 saat elektroforez cihazında yürütölün jelin, 260 nm dalga boyunda UV transillimünatör üzerinde görüntüsü alınmıştır.

3.6.3 Verilerin değeriendirilmesi

PCR analizi sonucunda, kontrol bitkilerinde 35s promotor, *bar* bölgeleri ve transgenik pre-miR408 bitkilerinde ise 35s promotor, *bar* ,pre-miR408 in yer aldığı ayrı ayrı tespit edilmiştir. Kontrol bitkilerinde, her iki bölgenin bulunduğu ve transgenik miR408 bitkilerinde ise her 3 bölgenin bulunduğu bitkiler seçilerek devam edilmiştir.

3.7 Transgenik Bitkilerin Kuraklık Stresi ile Test Edilmesi

Kuraklık stresi, bitkilerin seraya aktarılmasından 10 gün sonra başlatılmıştır. Bu süreçte, bitkilerin dış ortam koşullarına adaptasyonusağlanmışır. Kuraklık stresi, 17 gün boyunca devam etmiştir. Bitkilerin stresten önce ve sonrasında gösterdikleri morfolojik değışiklikler izlenmiştir. Sonuçların veri analizi,, IBM - SPSS v.20 Oneway ANOVA programı aracılığıyla yapılmıştır. Kontrol ve transgenik bitkilerde önemli bulunan değerieler, Student's t-test programına tabi tutulmuştur.

3.8 RNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

Bitkilerin RNA izolasyonu, yaprak örnekleri kullanılarak Trizol® (Invitrogen, CA, USA) yöntemi ile yapılmıştır. Öncelikle örnek sayısı kadar steril ependorf tüplere, 1 ml Trizol reaktifi konulmuştur. Daha önceden - 85°C’de stoklanan her bitkinin yaprak örnekleri, 100 – 150 mg alınıp, sıvı azot içeren havanlarda toz haline getirildikten sonra Trizol içeren ependorf tüplere aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilen tüplerin içine 0,2 ml kloroform ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler, 15 saniye boyunca sert bir şekilde elle karıştırılıp, 3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 4°C’de 15000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni tüpe aktarılmış ve üzerine 500 µl soğuk izopropil alkol ilave edildikten sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 4°C’de 15000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip üst faz uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 1 ml % 75’lik etanol ilave edildikten sonra hafif vuruşlarla pelletin, etanol içerisinde yüzmesi sağlanmıştır. Örnekler, 4°C’de 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atılmıştır. Pellet, oda sıcaklığında 10 - 15 dk kurutulup 30 µl steril ddH₂O ilavesinin ardından, RNA’ların çözünmesi için 57°C’de 10 dk ısı bloğunda inkübe edilmiştir. RNA’ların saflaştırılmasında ise QIAGEN Rneasy kiti kullanılmıştır. Her aşama kit protokolünde yazıldığı gibi yapılmıştır. İzole edilen RNA’lar, -85°C’de muhafaza edilmiştir (Ünver 2008).

3.9 cDNA Sentezi

Saflaştırılmış RNA’lardan, cDNA sentezi gerçekleştirmek için öncelikle Nanodrop cihazında (Thermo Scientific NANODROP 2000c Spectrophotometer), RNA’ların kalite ve miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra izole edilen RNA’ların bütünlüğü, % 2’lik agaroz jelde 100 voltta 1 saat yürütüldükten sonra görüntülenmiştir.

Tek zincir cDNA sentezinde, SuperScript™ III- RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen CA, USA) kullanılmıştır. Bu hususta, RNA’lardan 1.5 µg olacak şekilde alınıp üzerine 0.1 mM dNTPs, 30 pmol oligo (dT)₂₀ ve steril ddH₂O ilave edildikten sonra 13 µL’ye tamamlanmıştır. 65 °C’de 5 dk inkübe edilen tüpler, hemen buza alınıp 2 - 3 dk bekletilmiştir. Sonra her tüpün toplam hacmi 20 µL olacak şekilde, 1× First

Strand Buffer, 5 µM DTT, 200 U SuperScriptTMIII- RNase H- Reverse Transcriptase ve 40 U RNase inhibitor (Invitrogen CA, USA) ilaveleri yapılmıştır. 50 °C’ de 90 dk inkübe edilmesinin hemen ardından 70 °C’de 15 dk inkübe edilerek reaksiyon durdurulmuştur.

3.9.1 cDNA optimizasyonu

Elde edilen cDNA’lar, 1/5, 1/10 ve 1/20 oranlarında seyreltilmiştir. PCR işleminde, 18S rRNA primerleri (İleri: 5’-TTTGACTCAACACGGGGAAA-3’ ve Geri: 5’-CAGACAA ATCGCTCCACCAA-3’) kullanılarak cDNA oluşumunda bölgenin varlığı teyid edilmiştir. PCR analizi, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 0.4 µM 18S rRNA ileri ve geri primerleri, 1.4 x Taq DNA polimeraz tamponu (+KCl, -MgCl₂), 2’şer µL seyreltilen cDNA, 1 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 2 × steril destile su içeren toplam 25 µL hacmindeki karışımda gerçekleşmiştir. Daha sonra örnekler, PCR cihazında aşağıdaki döngü koşullarına tabi tutulmuştur. Ön ısıtma 94°C’de 7 dk, toplam 35 döngü boyunca 94°C’de 1 dk, 60°C’de 1 dk, 72°C’de 1 dk ve uzama 72°C’de 15 dk olarak ayarlanmıştır. PCR döngüsü tamamlandıktan sonra PCR ürünleri, agaroz jelde molekül ağırlıkları bilinen markörler kullanılarak yürütülmüştür.

3.10 Real Time (Eş zamanlı) qRT-PCR Uygulamaları

qRT-PCR metodu, transgenik bitkilere aktarılan genlerin, bitki genomuna entegrasyonunun teyidi yapıldıktan sonra ilgili genlerin transkriptom düzeyinde ifade edilip edilmediklerini ve miR408’in hedeflediği transkriptlerin ifade seviyelerinde değişikliğin söz konusu olup olmadığını belirtmek amacıyla uygulanmıştır. qRT-PCR analizlerinde, *bar* geni ve miR408’in hedef geni olan *plantacyanin* geninin ifade seviyeleri belirlenmiştir. Bu amaca yönelik *bar* ve *plantacyanin* genlerine özgü tasarlanan ileri ve geri primer dizileri (*bar* ileri: ATATCCGAGCGCCTCGTG CAT ve geri: CATCGAGACAAGCACGGTCAA *plantacyanin* ileri: AAGGCAAACACTTTAGAGCCGG ve geri: TTGCCCCTGTCGGTGTTTT) kullanılmıştır. Deneyler, SYBR Green I Master karışımı kiti (Roche kat. No: 04707516001) kullanılarak, Roche Light Cycler 480 cihazında gerçekleştirilmiştir.

qRT-PCR deneyleri, üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Öncelikle her bir örnekteki RNA miktarı, 18S rRNA primerleri (X16077.1) kullanılarak normalize edilmiştir. İfade seviyesi analizleri, 'threshold' (Cp) değeri üzerinden hesaplanmıştır. qRT-PCR'da kullanılan malzemeler, 1X için çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 qRT-PCR'da bir örnek için (1X) kullanılan malzemeler

İçerik	1× (Hacim)
SYBR Master (2X)	10 µl
İleri primer (100 pmol)	0,1 µl
Geri primer (100 pmol)	0,1 µl
Su (PCR Grade)	7,8 µl

Deney planına göre, hazırlanan seyreltme tüplerinden 2'şer µl, master karışımından 18'er µl konulmuştur. Optikal Plate' in üzeri kapatılarak Light Cyclers 480 (Roche) cihazına yerleştirilmiştir.

qRT- PCR reaksiyon koşulu;

Ön ısıtma ----- 1 döngü ----- 95°C None 5 dk. ----- 4.4

Çoğaltma----- 55 döngü-----kuantifikasyon

95 °C None 10 s. -----4.4

55 °C None 20 s. -----2.2

72 °C Single 10 s. -----4.4

Erime eğrisi -----1 döngü----- Erime eğrisi

95 °C None 5 s. -----4.4

55 °C None 1 dk. -----2.2

97 °C Continuous ----- 0.1

Soğutma -----1 döngü

40°C 30 s. -----2.2

3.11 miRNA'lara Özgü cDNA Sentezi

Transgenik bitkilerde miR408'in ifade seviyesinin ölçülmesi için yaprak örneklerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak miRNA cDNA sentezi yapılmıştır. Ardından miR408'in ifade düzeylerini tespit etmek için qRT-PCR metodu uygulanmıştır. miRNA'lara özgü cDNA sentezlenmesinde "sap-ilmik" denilen yapıyı içinde barındıran ve miRNA'nın 3' ucundaki son 6 nükleotide eşlenik olan diziye sahip primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 miRNA cDNA sentezi için tasarlanan RT ve ileri primerler

miR408-F (ileri)	ATGCACTGCCTCTTCCCTGGC
miR408-RT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC GCCAGG

miRNA'ya özgü cDNA sentezlemek için öncelikle izole edilen toplam RNA'ların, 1,5 µg'da eşitlenerek başlaması sağlanmıştır. Sonra 1 µl oligodT primeri ilave edilmiştir. PCR cihazında, 65 °C'de 5 dk bekletildikten hemen sonra buza alınmıştır. miRNA cDNA sentezinin ikinci aşamasında her bir tüpe; 4 µl 5X First strand tampon çözeltisi, 2 µl 0,1 M DTT, 0,1 µl RNase out (40 U/µl), 0,25 µl SSIII (200 U/µl) karışımı ilave edilmiştir. Ayrıca kontrol amaçlı içinde sadece SSIII enzimi yerine, enzimin miktarı kadar su bulunan (0,25 µl SSIII yerine 0,25 µl ddH₂O), içinde RT primeri yerine RT primeri miktarı kadar su bulunan ve içinde RNA yerine RNA miktarı kadar su bulunan tüpler hazırlanmıştır. Tüm tüpler, tekrar PCR cihazına yerleştirilip 16°C'de 3dk, 50 döngü boyunca 30°C'de 30 sn, 42°C'de 30sn, 50°C'de 1 sn ve son aşama olarak 85°C'de 5 dk bekletilmiştir. miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR işlemlerinde, Varkonyi - Gasic vd. (2007) tarafından geliştirilen protokoller esas alınmıştır. miRNA cDNA sentezinin ilk aşaması için öncelikle farklı RNA örneklerinden, 1,5 µg alınarak tüm örneklerin reaksiyona giren RNA miktarları eşitlenmiştir. Daha sonra 1 pmol RT primer ve 0.25 mM dNTP (10 mM) ilave edildikten sonra toplam hacim ddH₂O ile 13.65 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler, 65°C'de 5 dk inkübe edildikten hemen sonra buza

alınmıştır. İkinci aşamada her bir tüpe; 4 µl 5× First strand tampon çözeltisi, 2 µl 0,1 M DTT, 0,1 µl RNase out (40 U/µl), 0,25 µl SSIII (200 U/µl) karışımı ilave edilmiştir. miRNA cDNA sentezi ve qRT - PCR deneylerinde ayrıca kontrol amaçlı NoRT, NoRNA ve NoSSIII reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. NoRNA kalıp RNA'nın bulunmadığı, NoSSIII reverse transkriptaz enziminin bulunmadığı ve NoRT özgün RT primerinin bulunmadığı kontrol cDNA reaksiyonlarıdır. Böylece bu aşamada NoSSIII reaksiyonunda 0,25 µl SSIII yerine 0,25 µl ddH₂O, primeri olmayan bunun yerine RT primeri miktarı kadar su bulunan bir tüp ve içinde RNA olmayan bunun yerine RNA miktarı kadar su bulunan bir tüp ilave edilmiştir. Ardından 16°C'de 30 dk, 60 döngü boyunca 30°C'de 30 sn, 42°C'de 30 sn, 50°C'de 1 sn ve reaksiyonun durdurulması için 85°C'de 5 dk inkübe edilmiştir.

3.11.1 MiR408'in qRT-PCR ile miktar ölçümü

Bu çalışmada, miR408'in ifade seviyesinin belirlenmesinde, hassasiyeti yüksek, göreceli ve sayısal olarak ölçüm sağlayan qRT-PCR metodu kullanılmıştır. miR408'in ifade seviyesini ölçmek için uygulanan metod temelde iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, tasarlanan sap-ilmik RT primerinin, ölçülmesi amaçlanan miRNA'ya yapışarak onun üzerinden cDNA sentezini gerçekleştirmesi sağlanır. İkinci aşamada ise özel olarak miR408 için tasarlanan ileri primeri ve sap-ilmige uygun olan evrensel geri primeri ile özel bir qRT-PCR reaksiyonu yapılmıştır (Cheen vd. 2005).

qRT-PCR işlemleri, Roche SYBER Green Master karışımı kullanılarak Light Cycler 480 (Roche, Almanya) Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar, qRT cihazına özgü optikal platete yapılmıştır. Toplam 20 µl hacminde, 2 × Master karışımı, 100'er pmol ileri (5'-GTGCAGGGTCCGAGGT 3') ve evrensel geri primeri (5'-GTGCAGGGTCCGAGGT 3'), 2 µl miRNA cDNA'sı (RT stem-loop cDNA) 3 farklı kütüphanenin üç farklı cDNA seyreltmesi (1/2, 1/4 ve 1/8) ile üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Hazırlanmış olan kontrol cDNA'larının (NoRT, NoSSIII, NoRNA) sadece tek seyreltmesi (1/10) kullanılmıştır. qRT - PCR'ın kontrolü için negatif kontrol (NTC) hazırlanmıştır. qRT-PCR işlemi için qRT-PCR cihazında reaksiyon aşamaları, ön ısıtma (parçalama) 95°C'de 5 dk, 50 döngü boyunca çoğaltma 95 °C'de 5 sn, 56°C'de 10 sn,

72°C’de 1 sn ve 1 döngü boyunca erişme sıcaklığı 95 °C’de 1 sn, 40°C’de 120 sn, 95°C olarak ayarlanmıştır. Her reaksiyon 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur (Unver ve Budak 2009). Sonuçlar, Light Cycler ®480 Software yazılımı aracılığıyla analiz edilmiştir. İfade değerleri 2^{-Ct} olarak hesaplanmıştır (Varkonyi-Gasic vd. 2007, Unver vd. 2009). qRT-PCR analizleri sonucunda, transkriptom düzeyinde *bar* geninin ve miR408’in ifade seviyeleri, kontrol ve miR408 transgenik bitkilerinde ölçülmüştür. Yapılan hesaplamalar grafik haline dönüştürüldükten sonra verilerin karşılaştırılmaları yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Nohut Bitkisinin Yüzey Sterilizasyonu

Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin tohumlarının yüzey sterilizasyonu, oda sıcaklığında 20 dk süre ile % 75, 60, 45, 30 ve 15 oranlarda ticari çamaşır suyu (Ace-Türkiye, % 5 NaClO) kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra steril saf su ile 5 × 3 dk durulama yapılmıştır. Steril edilen tohumlar, steril petri kapları içerisinde % 3 (w/v) sukroz içeren, % 0.65 (ağırlık/hacim) agar ile katılaştırılan MS besin ortamında, 24 ± 2°C’de 16 saat ışık fotoperiyodunda 1 hafta kültüre alınmıştır. Kültüre alınan eksplantlarda, fungus ve bakteriden dolayı gelişen bulaşıklık, ayrıca çimlenme oranı ve oluşan sürgünlerin uzunlukları ölçüldükten sonra elde edilen verilerin istatistiki analizi yapılmıştır (Çizelge 4.1). Elde edilen ANOVA sonuçlarına göre, çeşitler arasındaki bulaşıklık yüzdesinde, tohum çimlenme yüzdesinde (%) ve gelişen fidelerin sürgün uzunluğu (cm) bakımından herhangi bir farklılık görülmemiştir. Ancak uygulanmış farklı çamaşır suyu oranları arasındaki bulaşıklık yüzdesinde, tohum çimlenme yüzdesinde (%) ve gelişen fidelerin sürgün uzunluğu (cm), bakımından 0.01 düzeyinde farklılık tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca çeşitler ve uygulanmış çamaşır suyu oranları arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Uygulanmış çamaşır suyu oranları arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmış ve sonuçları çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi Gökçe, Yaşa91, Er99 ve Akçin çeşitlerinde, 5 farklı oranda çamaşır suyu ile muamelesi sonucunda bulaşıklık oranı 0 – 40.00 arasında değişmiş olup, % 15’lik doz uygulamasında bulaşıklık oranı % 40 iken, geri kalan muamelelerde bulaşıklık görülmemiştir. Tohumlarda çimlenme yüzdesi, 0 - 100 arasında değişmiş olup, % 15’lik doz uygulamasında en fazla tohum çimlenme oranı % 100.00 olarak ve %30’luk doz uygulanmasında çimlenme oranı % 86.66 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1a). Fakat her artan doz uygulaması, tohumlardaki çimlenme oranını olumsuz yönde etkilemiştir. Bundan dolayı, en fazla orandaki % 75’lik çamaşır suyu uygulamasında tohum çimlenme oranı % 0.00 olarak en az oranda tespit edilmiştir (Şekil 4.1b).

Çimlenmiş tohumların sürgün uzunluğu, 0.05 - 2.08 cm arasında değişiklik göstermiştir. En uzun sürgün, % 15’lik çamaşır suyu dozu uygulanan tohumlardan elde edilmiştir. Çamaşır suyu konsantrasyonları arttıkça, çimlenen tohumların sayısında belirgin azalmalar kaydedilmiştir. % 30’luk çamaşır suyu muamelesi sonucunda sürgün uzunluğu 1,25 cm iken, yüksek dozlarda (% 45, 60 ve 75) çamaşır suyu ile steril edilmiş tohumlarda sürgün uzunluğu sırasıyla 0.32, 0.36 ve 0.05 cm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en fazla çimlenme ve en düşük bulaşıklık oranı ve en uzun sürgünler % 30’luk çamaşır suyu uygulamasında elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 Nohudun 4 çeşidinde 20 dk süre ile farklı oranlarda uygulanmış ticari çamaşır suyunun bulaşıklık oranı, tohum çimlenmesi ve gelişen fidelerin sürgün uzunluğu ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları

VK	sd	Bulaşıklık yüzdesi (%)		Tohum çimlenme yüzdesi (%)		Gelişen fidelerin sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	3853,33	13,13	120,00	0,23	2,29	55,11
Uygulanmış çamaşır suyu oranları	4	2013,33	6,86**	7813,33	15,42**	1,43	34,52**
Çeşitler × Uygulanmış çamaşır suyu oranları	4	1853,33	6,31	920,00	1,81	1,34	32,19
Hata	20	293,33		506,67		0,04	
Genel Toplam	29						

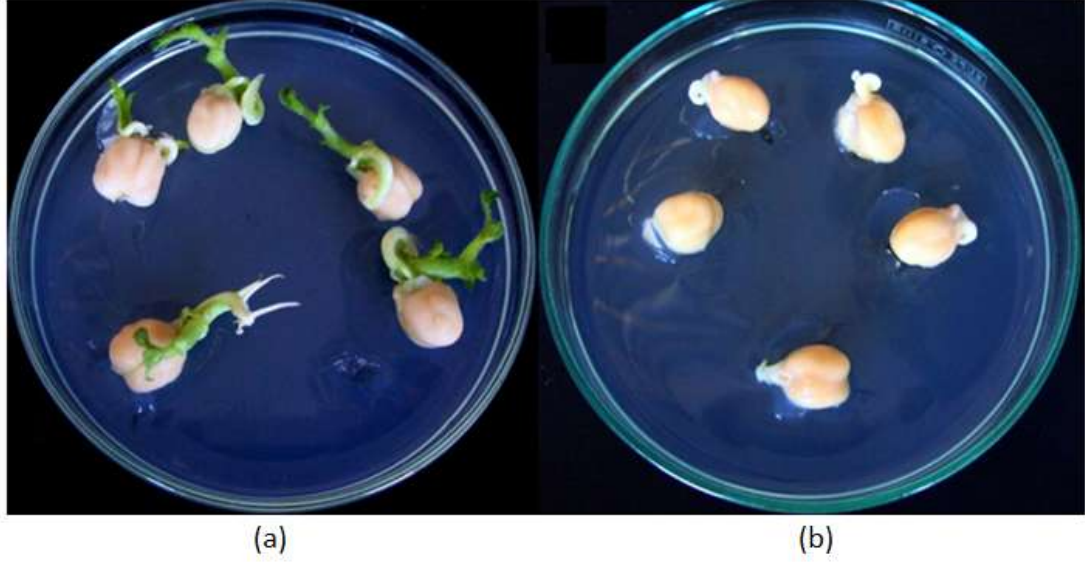
**P<0.01

Elde edilen verilerin analiz sonuçlarına göre, bu tez kapsamında tohumların yüzey sterilizasyonu için % 30’luk çamaşır suyu tercih edilmiştir.

Çizelge 4.2 Nohudun Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerinin 20 dk süre ile farklı oranda uygulanmış ticari çamaşır suyunun bulaşıklık oranı, tohum çimlenmesi ve gelişen fidelerin sürgün uzunluğu ile ilgili Duncan testi sonuçları

Çamaşır suyu oranları (%)	Bulaşıklık yüzdesi (%)	Tohum çimlenme yüzdesi (%)	Gelişen fidelerin sürgün uzunluğu (cm) ¹
15,00	40,00a	100,00a	2,08a
30,00	0,00c	86,66ab	1,25b
45,00	0,00c	66,67b	0,32c
60,00	0,00c	60,00b	0,32c
75,00	0,00c	0,00c	0,050d

Aynı sütunda farklı harflerle verilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur.

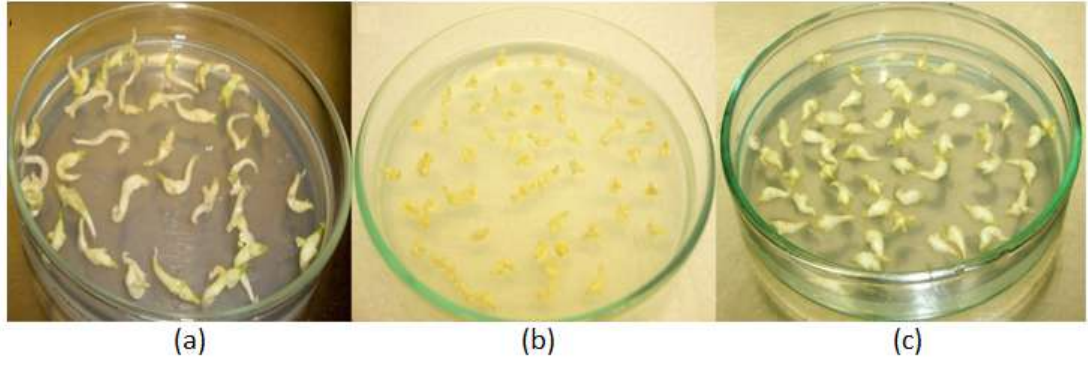


Şekil 4.1 Nohut tohumlarının yüzey sterilizasyonu

a. Gökçe çeşidinin % 30'luk çamaşır suyu ile steril edilen MS ortamında çimlenen tohumları ve gelişen sürgünleri, b. Gökçe çeşidinin % 75'lik çamaşır suyu ile steril edilen tohumları üzerindeki sürgün gelişimi

4.2 Nohut Bitkisinin Doku Kültürü Çalışmalarında Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin Çeşitlerinde BAP, GA₃ ve BAP +GA₃ ile Ön Muamelesi ve Mikroçoğaltım Üzerindeki Etkileri

Nohut bitkisinin Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerinin steril edilen tohumları, bir günlük steril saf su içeren kaplarda bekletilerek tohum kabuklarının yumuşatılması sağlanmıştır. Kabuklar uzaklaştırıldıktan sonra kotiledonlar, bistüri ve pens yardımıyla açılıp embriyolar izole edilmiştir. Çalışmanın devamında çoklu sürgün elde etmek amacıyla aday embriyo eksplantları, öncelikle 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃ ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ % 3 (w/v) sukroz içeren ve % 0.65 agar (w/v) ile katılaştırılan MS besin ortamında kültüre alınarak 2 gün ön muamele yapılmıştır (Şekil 4.2). Daha sonra plumula, embriyonik eksen ve radikula eksplantları izole edilip, farklı oranda BAP - NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 25 gün sonra elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir. Sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi ve Duncan testi sonuçları ayrı ayrı aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4.2 Çoklu sürgün elde etmek amacıyla Akçin çeşidine ait 2 günlük aday nohut embriyo eksplantları

a. 25 mg/l BAP b. 25 mg/l GA₃ c. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ile ön muamele yapılmış eksplantların şematik görüntüsü

4.2.1 Gökçe çeşidine ait plumula eksplantının mikroçoğaltımı

Yukarıda belirtildiği gibi nohut bitkisinin Gökçe çeşidine ait embriyolar, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃ ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren MS ortamlarında-ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra plumula eksplantı izole edilmiştir. Plumula eksplantı, MS (kontrol) ile 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA (10 adet son muamele) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. 25 gün sonra elde edilen sonuçlar, varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Gökçe çeşidinde değişik ön muamele yapılmış embriyolardan elde edilen plumula eksplantının farklı oranlarda BAP veya NAA içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	30,01	0,11	5,582	7,29**	1,19	6,18**
Son muameleler	9	257,02	0,97	4,306	5,63**	2,73	14,22**
Ön muameleler × son muameleler	18	243,36	0,92	2,200	2,87**	0,35	1,85*
Hata	60	262,65		0,76		0,192	
Genel toplam	89						

** $P \leq 0.01$ düzeyinde önemli, * $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön ve son muamelelerde herhangi bir farklılık ve ayrıca ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından ön muamele ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muamele arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Sürgün uzunluğu (cm) bakımından ön muamele ve son muamele sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muamele arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Gökçe çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**			Sürgün uzunluğu (cm)*		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP
0.00	0.00	83,33	91,66	0.00	0.00	83,33	91,66	0.00	0.00	83,33
0.50	0.00	83,33	100,00	0.50	0.00	83,33	100,00	0.50	0.00	83,33
0.50	0.01	91,66	91,66	0.50	0.01	91,66	91,66	0.50	0.01	91,66
0.50	0.03	91,66	100,00	0.50	0.03	91,66	100,00	0.50	0.03	91,66
0.50	0.05	91,66	100,00	0.50	0.05	91,66	100,00	0.50	0.05	91,66
0.50	0.07	100,00	100,00	0.50	0.07	100,00	100,00	0.50	0.07	100,00
0.50	0.09	100,00	100,00	0.50	0.09	100,00	100,00	0.50	0.09	100,00
0.50	0.11	91,66	100,00	0.50	0.11	91,66	100,00	0.50	0.11	91,66
0.50	0.13	100,00	67,91	0.50	0.13	100,00	67,91	0.50	0.13	100,00
0.50	0.15	91,66	91,66	0.50	0.15	91,66	91,66	0.50	0.15	91,66

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında Tukeys testine göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur, *Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında Tukeys testine göre 0.05 düzeyinde farklılık bulunmuştur.

Sürgün oluşum yüzdesi

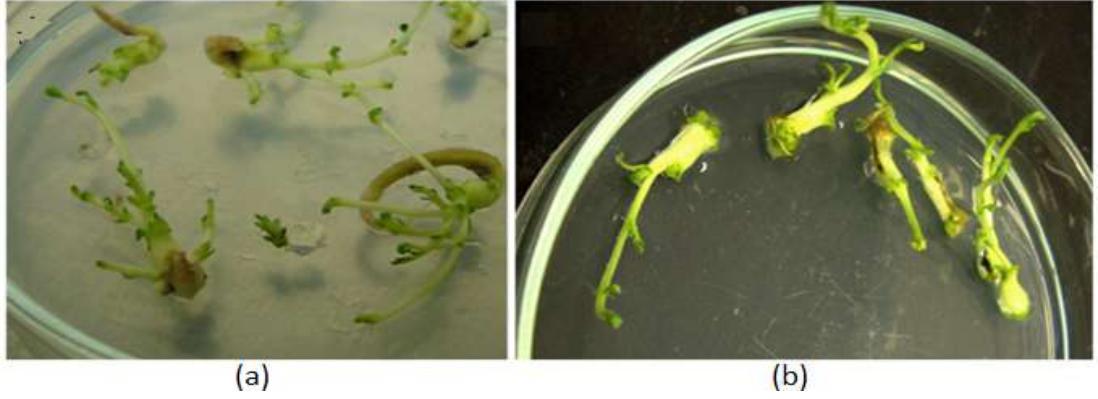
Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP + NAA son muamelesi sonucunda sürgün oluşum yüzdesi % 83.33 - 100 arasında ve 25 mg/l GA₃ ile ön muamelede ise % 67,91 - 100.00 arasında ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde % 66,66 - 100.00 arasında değişmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı

Bu denemede 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP + NAA içeren ortamlarda yapılan son muamele sonucunda, eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 5,00 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.09 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelede ise eksplant başına sürgün sayısı 0.91 ve 3.16 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.05 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ile ön muamele sonucunda, eksplant başına sürgün sayısı 1.33 ile 3.41 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

BAP-NAA içeren ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerde uzunluk bakımından 25 mg/l BAP ön muamele sonucunda elde edilen sürgün uzunluğu 0.40 ve 1.53 (cm) arasında değişim göstermiştir. En uzun sürgünler, 0.5 mg/l BAP içeren MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamele sonucunda, sürgün uzunluğu 0.57 ile 3.35 cm arasında değişim göstererek, en uzun sürgünler MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ön muamele sonucunda, sürgün uzunluğu 0.21 - 1.95 (cm) arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgüler MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir (Şekil 4.4). Muameleler arasındaki kıyaslama sonucunda, en uzun ve kısa sürgünler 25 mg/l GA₃ ile 25 mg/l BAP + 25 GA₃ ön muamele sonucunda elde edilmiştir.



Şekil 4.4 Gökçe çeşidinde a. 25 mg/l BAP ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.2 Yaşa çeşidine ait plumula eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Yaşa çeşidine ait embriyolar, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra plumula eksplantı izole edilmiştir. Plumula eksplantı, 0.00, 0.50 mg/l BAP + 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış olup, 25 gün sonra elde edilen veriler, varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları, çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Yaşa çeşidinde değişik ön muamele yapılan embriyolardan elde edilen plumula eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	20,83	1,50	276,08	125,64**	5,81	29,43**
Son muameleler	9	31,63	2,27	7,18	3,26**	1,20	6,11**
Ön muameleler × son muameleler	18	36,26	2,61	4,32	1,96*	0,48	2,44**
Hata	60	13,88		2,19		0,19	
Genel toplam	89						

** $P \leq 0.01$ düzeyinde önemli, * $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön muameleler ve son muamelelerde herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Benzer şekilde sürgün ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ön ve son muamelelerde, 0.01 düzeyinde farklılık ve ön ve son muameleler arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından ön muameleler ve son muameleler arasında hem 0.01 düzeyinde farklılık hem de 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Yaşa çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantı ve farklı BAP ve NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*			Sürgün uzunluğu (cm)**		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l Bap + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	83.33	100,00	100,00	3.50b	1.16c	1.07c	0,90b	2.92a	2.39a
0.50	0.00	100.00	100,00	100,00	5.56ab	1.91abc	3.08ab	0,87b	2.10b	1.32b
0.50	0.01	100.00	100,00	100,00	8.00ab	2.44ab	4.00a	0,96b	1.76bcd	0.96b
0.50	0.03	100.00	100,00	100,00	8.95a	1.83abc	3.16ab	0,85b	1.63bcde	0.75b
0.50	0.05	100.00	100,00	100,00	8.33a	2.38ab	3.66ab	1,18a	1.30cde	0.70b
0.50	0.07	100.00	100,00	100,00	5.76ab	2.58a	3.08ab	1,08a	1.65bcde	0.45b
0.50	0.09	100.00	100,00	100,00	7.13ab	1.90abc	2.58ab	1,26a	1.99bc	0.75b
0.50	0.11	100.00	100,00	100,00	8.00ab	1.58c	2.83ab	1,34a	1.08de	0.73b
0.50	0.13	100.00	100,00	100,00	10.16a	1.66bc	2.25bc	0,96b	1.57bcde	0.33b
0.50	0.15	100.00	100,00	91,66	10.00a	1.25c	2.61ab	0,86b	0.97e	0.30b

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir. * Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Sürgün oluşum yüzdesi

Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda sürgün oluşum yüzdesi, % 83.33 - 100 arasında, 25 mg/l GA₃ ile ön muamelede ise % 100.00 ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesi sonucunda % 91,66 - 100.00 arasında değişmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı

Bu denemede 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre, eksplant başına sürgün sayısı 3.50 ve 10.16 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.13 NAA mg/l içeren MS ortamından elde edilmiştir. Aynı denemede, 25 mg/l GA₃ ile ön muameleden sonra eksplantların farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre eksplant başına sürgün sayısı 1.16 ve 2.58 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.07 NAA mg/l içeren MS ortamından elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ile ön muameleden sonra eksplantların farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre, eksplant başına sürgün sayısı 1.07 ve 4.00 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

Bu deneme kapsamında 25 mg/l BAP ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP-NAA içeren MS ortamında eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerin uzunluğu 0.860 ile 1.34 (cm) arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP + 0.11 NAA mg/l içeren MS ortamından elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda eksplantların son muamele sonuçlarına göre sürgün uzunluğu 0.97 ve 2.92 cm arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda eksplantların son muamele sonuçlarına göre, sürgün uzunluğu 0.30 - 2.39 cm arasında değişim göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Yaşa çeşidinde a. 25 mg/l BAP ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.09 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA₃ ön muameleden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.09 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.3 Er99 çeşidine ait plumula eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Er 99 çeşidine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃ ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamda 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra plumula eksplantı izole edilmiştir. Daha sonra ön muamele yapılmış plumula eksplantları, 0.00, 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında 25 günlük kültüre alınmış olup, elde edilen sonuçlar, varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Er 99 çeşidinin farklı oranlarda BAP ve GA₃ ile ön muamelesi ve elde edilen plumula eksplantının farklı oranlarda BAP veya NAA dozları içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu ve etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S. D.	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	6,94	0,50	146,14	88,27**	4,67	24,12**
Son muameleler	9	12,34	0,88	10,20	6,16**	4,84	24,99**
Ön muameleler x son muameleler	18	14,66	1,056	3,58	2,16**	1,05	5,43**
Hata	60	13,88		1,65		0,19	
Genel toplam	89						

** $P \leq 0.01$ düzeyinde önemli

Elde edilen varyans analizi sonuçlarına göre, sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön muamele ve son muamelelerde herhangi bir farklılık ve ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve sürgün uzunluğu (cm) bakımından ön muameleler ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık, ön x son muameleler arasında da 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Er99 çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**			Sürgün uzunluğu (cm)**		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	100,00	100,00	100,00	3.21cd	1,00c	1.20c	1.79ab	3,80a	2.03a
0.50	0.00	100,00	100,00	100,00	4.99bcd	1,00c	2.76ab	2.37a	4,30a	1.23b
0.50	0.01	100,00	100,00	100,00	10.13a	2,36a	3.63a	1.11bcd	1,57b	0.91bc
0.50	0.03	100,00	100,00	100,00	8.03ab	1,95ab	3.03ab	1.73ab	1.43bc	0.70bc
0.50	0.05	100,00	100,00	100,00	7.19abc	1,58bc	2.67ab	1.74ab	0.98bc	0.68bc
0.50	0.07	100,00	100,00	100,00	4.75bcd	1,50bc	2.31bc	1.15bc	1.16bc	0.58bc
0.50	0.09	100,00	100,00	100,00	5.09bcd	1,44bc	2.23bc	1.27b	1.17bc	0.81bc
0.50	0.11	100,00	91,667	100,00	5.53bcd	1,36bc	2.80ab	1.45b	0.62c	0.75bc
0.50	0.13	100,00	100,00	100,00	2.33d	1,33bc	2.21bc	0.47cd	0.73bc	0.56bc
0.50	0.15	100,00	100,00	91,667	5.75bcd	1,25bc	1.96bc	0.40d	0.65bc	0.35c

** 0.01 düzeyinde önemli

Sürgün oluşum yüzdesi

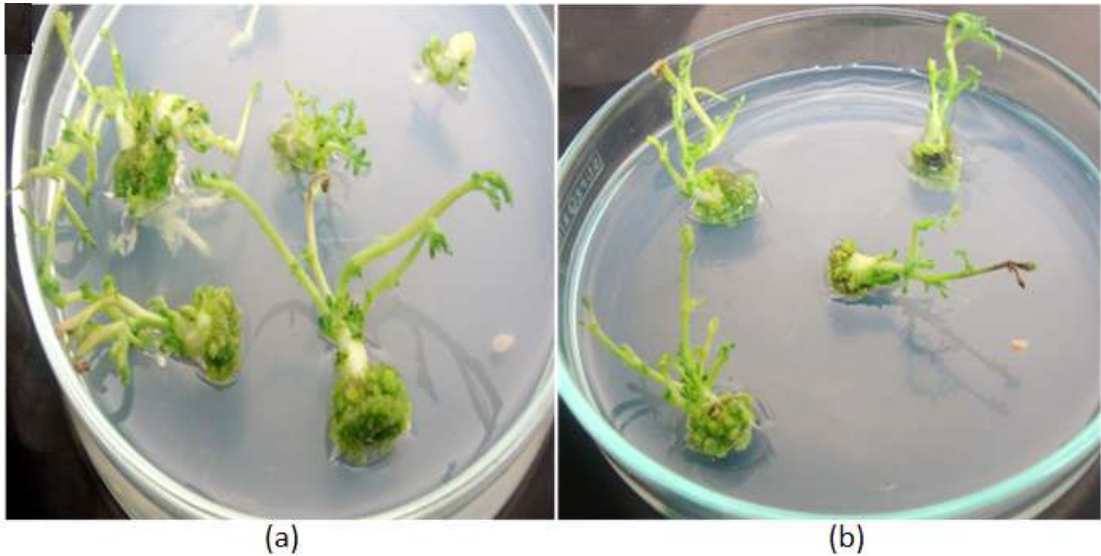
Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre sürgün oluşum yüzdesi % 100.00 ve 25 mg/l GA₃ ile ön muamelede ise % 91,66 - 100.00 arasında ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde % 91,66 - 100.00 değişmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı

Eksplant başına sürgün sayısı 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre 2.33 ve 10.13 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelede 1.00 ve 2.36 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ ile ön muamelede 1.20 ve 3.63 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

BAP-NAA içeren ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerde uzunluk bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde 0.40 ve 2.37 (cm) arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelede 0.62 ve 4.30 arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP içeren ortamdan (kontrol) elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde 0.35 - 2.03 (cm) arasında değişim göstermiş olup, MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir. (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Er99 çeşidinde a. 25 BAP mg/l ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.03 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.4 Akçin çeşidine ait plumula eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Akçin çeşidine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 GA₃ içeren ortamlarda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra plumula eksplantı izole edilmiştir. Plumula eksplantı, MS (kontrol) ile 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA (10 adet son muamele) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. 25 gün sonra elde edilen sonuçlar, varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Akçin çeşidinde değişik ön muamele yapılmış embriyolardan elde edilen plumula eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	215,27	5,16	358,15	108,63**	2,44	7,36**
Son muameleler	9	108,79	2,61	16,515	5,01**	2,61	7,88**
Ön muameleler x son muameleler	18	76,38	1,83	9,49	2,88**	1,22	3,70**
Hata	60	41,66		3,29		0,33	
Genel toplam	89						

**P< 0.01 düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından, ön ve son muamelelerde herhangi bir farklılık ve ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından ön muamele ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muameleler arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Sürgün uzunluğu (cm) bakımından ön muamele ve son muamele sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön x son muamele arasında 0.01 düzeyinde etkileşim

bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.10’da verilmiştir

Çizelge 4.10 Akçin çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen plumula eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**			Sürgün uzunluğu (cm)**		
BAP (mg/l)	NA A (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	100,00	100,00	100,00	2,41d	1.0000c	1.0000c	1.77ab	3,41a	1.80a
0.50	0.00	100,00	100,00	100,00	8,91abc	1,8333bc	2.4333a	0.97b	1,24b	1.23b
0.50	0.01	100,00	100,00	100,00	8,50abc	2,66b	2.50a	0.81b	0,53d	0.60c
0.50	0.03	100,00	100,00	91,66	7,08bcd	1,86bc	1.33bc	0.82b	0,73cd	0.50c
0.50	0.05	100,00	100,00	100,00	13,16a	1,16c	1.91abc	0.92b	0,40d	0.46c
0.50	0.07	100,00	100,00	100,00	10,83ab	2,40b	1.91abc	0.86b	0,73cd	0.46c
0.50	0.09	100,00	100,00	100,00	10,41ab	3,58a	2.00ab	0.83b	1,13bc	0.46c
0.50	0.11	100,00	100,00	100,00	5,91bcd	1,00c	2.33a	0.91b	0,39d	0.60c
0.50	0.13	100,00	91,66	83,33	7,41abcd	1,00c	2.50a	1.37b	0,37d	0.46c
0.50	0.15	100,00	100,00	75,00	3,66cd	1,38c	1.16bc	3.32a	0,38d	0.33c

**Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında Tukeys testine göre 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur.

Sürgün Oluşum Yüzdesi

Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA son muamelesi sonucunda sürgün oluşum yüzdesi % 100.00, 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde % 75,00 - 100.00 arasında ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde ise % 91,66 - 100.00 arasında değişmiştir.

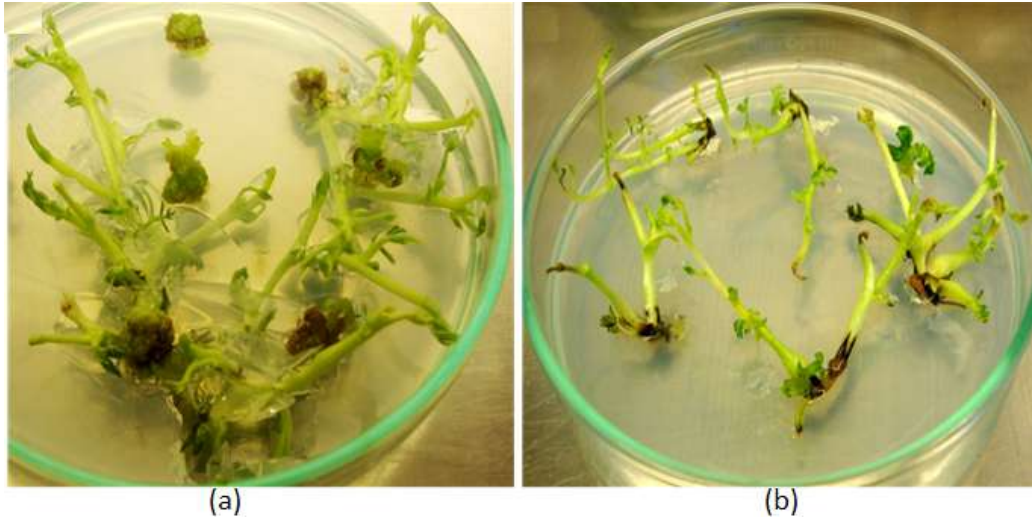
Eksplant Başına Sürgün Sayısı

Eksplant başına sürgün sayısı 25 mg/l BAP ile ön muamele ve farklı oranlarda BAP + NAA içeren ortamlarda yapılan son muamele sonuçlarına göre 13,16 ve 2.41 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.05 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 1.00 ve 3.58 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.09 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ ile ön muamelede 1.00 ve 2.50

adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l ve 0.5 mg/l BAP + 0.13 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

BAP-NAA içeren ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerde uzunluk bakımından 25 mg/l BAP ön muamele sonucunda 0.81 ve 3.32 (cm) arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP + 0.15 NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 0.37 ve 3.41 arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler MS ortamdan (kontrol) elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde 0.33 - 1.80 (cm) arasında değişim göstermiş olup, MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Er99 çeşidinde plumula eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.5 Gökçe çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Gökçe çeşidine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra embriyonik eksen eksplantı izole edilmiştir. Embriyonik eksen eksplantı, 0.00, 0.50

mg/l BAP + 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış olup, 25 gün sonra elde edilen sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Gökçe çeşidinde değişik ön muamele yapılmış embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	416,94	2,03	18,54	10,65**	0,38	1,99
Son muameleler	9	313,24	1,53	3,39	1,95	4,23	21,73**
Ön muameleler x son muameleler	18	222,50	1,08	2,37	1,36	,161	0,82
Hata	60	204,44		1,73		0,19	
Genel toplam	89						

** $P \leq 0.01$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön ve son muamelelerde herhangi bir farklılık ve ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından ön muamelede istatistiki olarak 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur. Son muamele sonucunda herhangi bir farklılık ve ön muamele x son muameleler arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Sürgün uzunluğu (cm) bakımından ön muamele sonucunda herhangi bir farklılık bulunmamış iken son muamele sonucunda istatistiki olarak 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur. Ayrıca ön x son muameleler arasında istatistiki olarak etkileşim bulunmamıştır. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Gökçe çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantının, farklı BAP ve NAA dozlarını içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	100,00	83,33	91,66
0.50	0.00	100,00	100,00	100,00
0.50	0.01	90,00	100,00	75,00
0.50	0.03	100,00	100,00	91,66
0.50	0.05	91,66	83,33	75,00
0.50	0.07	100,00	75,00	100,00
0.50	0.09	91,66	75,00	100,00
0.50	0.11	91,667	75,00	75,00
0.50	0.13	91,66	91,66	91,66
0.50	0.15	83,33	83,33	91,66
Eksplant başına sürgün sayısı**				
25mg/l bap		25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	
3,45a		2,59b	1,88b	
Ortam		Sürgün uzunluğu (cm)**		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)			
0.00	0.00	2,84a		
0.50	0.00	1,10b		
0.50	0.01	0,79b		
0.50	0.03	0,78b		
0.50	0.05	0,88b		
0.50	0.07	0,91b		
0.50	0.09	0,74b		
0.50	0.11	0,55b		
0.50	0.13	0,57b		
0.50	0.15	0,49b		

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında LSD testine göre 0.01 düzeyinde farklılığı

Sürgün oluşum yüzdesi

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda sürgün oluşum yüzdesi % 83.33 - 100.00 aralığında, 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde % 75,00 - 100.00 aralığında ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde ise % 75.00 - 100.00 aralığında değişmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı

Eksplant başına sürgün sayısı (adet) sadece ön muameleler arasında 0.01 düzeyinde önemli bulunmuş olup, 1.88 -3.45 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

Sürgün uzunluğu ise sadece son muamele sonucunda 0.01 düzeyinde önemli bulunmuş olup, 2.84 ve 0.49 arasında değişim göstermiştir. En uzun sürgünler, MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Gökçe çeşidinde embriyonik eksen eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.07 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.7 Yaşa çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Yaşa çeşidine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamlarda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra embriyonik eksen eksplantı izole edilmiştir. Embriyonik eksen eksplantı, 0.00, 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS

besin ortamlarında kültüre alınmış olup, 25 gün sonra elde edilen sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 Yaşa çeşidinde değişik ön muamele yapılmış embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	1173,61	15,36	563,48	284,90**	12,30	58,65**
Son muameleler	9	185,95	2,43	12,58	6,36**	0,91	4,38**
Ön muameleler x son muameleler	18	185,95	2,43	8,63	4,36**	0,30	1,46*
Hata	60	76,38		1,97		0,21	
Genel toplam	89						

** $P \leq 0.01$ düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda, sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön ve son muamelelerinde herhangi bir farklılık ve ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından ön muamele ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muamele arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Sürgün uzunluğu (cm) bakımından ön muamele ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muamele arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14 Farklı ön muamelelerde BAP ve NAA dozlarını içeren besin ortamlarının Yaşa çeşidinin embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**			Sürgün uzunluğu (cm)*		
BA P (mg/ l)	NA A (mg /l)	25MG/ L bap	25 G/ GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	100,00	100,00	91,66	4.33d	1.50b	1,75d	1.44a	3.41a	1,32a
0.50	0.00	100,00	100,00	91,66	5.63cd	1.56b	2,33c	0.98c	2.24abc	1,11ab
0.50	0.01	90,00	100,00	100,00	11.00b	2.13ab	2,91a	1.24b	2.52abc	1,03ab
0.50	0.03	100,00	100,00	75,00	15.20a	1.91ab	2,41bc	1.24b	1.83bc	0,59bc
0.50	0.05	91,66	100,00	58,33	8.50bc	2.00ab	1,25e	1.26b	2.13bc	0,62bc
0.50	0.07	100,00	100,00	100,00	9.91bc	2.50a	2,25c	1.03c	2.35ab	0,75bc
0.50	0.09	91,66	100,00	83,33	9.06bc	2.66a	1,25e	1.17bc	1.69bc	0,79abc
0.50	0.11	91,66	100,00	100,00	12.06ab	2.50a	2,66b	1.28b	1.88bc	0,87abc
0.50	0.13	91,66	100,00	91,66	10.16b	2.08ab	2,33c	1.27b	1.63bc	0,60bc
0.50	0.15	83,33	100,00	100,00	9.83bc	1.91ab	1,35e	1.04c	0.97c	0,46c

** 0.01 düzeyinde önemli, ** 0.01 düzeyinde önemli

Sürgün oluşum yüzdesi

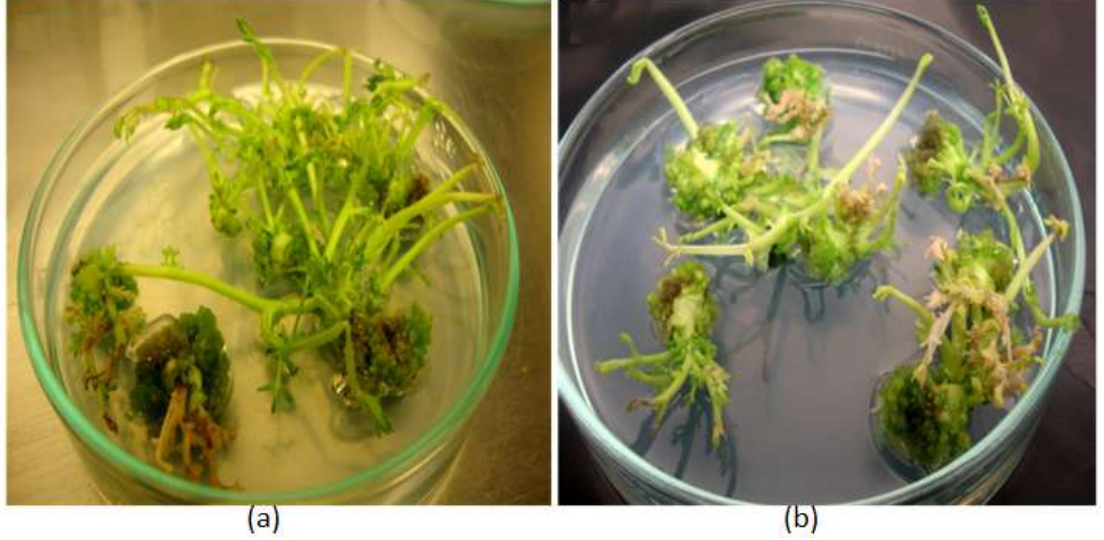
Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muamelesinden sonra farklı oranlarda BAP + NAA son muamelesi sonucunda sürgün oluşum yüzdesi % 83.33 - 100.00 arasında, 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde % 100.00 ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde ise % 58.33 - 100.00 arasında değişmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı

Eksplant başına sürgün sayısı 25 mg/l BAP ile ön muamelesinden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre 15,20 ve 4.33 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.03 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 1.50 ve 2.66 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı, 0.5 mg/l BAP + 0.09 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ ile ön muamelesinde 1.25 ve 2.91 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı, 0.5 mg/l BAP + 0.01 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP + 0.13 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

BAP-NAA içeren ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerin uzunluk bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde 0.98-1.44 (cm), 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 0.97-3.41 aralığında ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde ise 0.46 - 1.32 (cm) aralığında değişim göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.8 Er99 çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Er99 çeşidine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamlarda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra embriyonik eksen eksplantı izole edilmiştir. Embriyonik eksen eksplantı, 0.00, 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış olup, 25 gün sonra elde edilen sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15 Er99 çeşidinde değişik ön muamele yapılan embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	437,50	3,15*	319,13	183,41**	5,817	28,79**
Son muameleler	9	58,64	,42	10,67	6,13**	2,088	10,33**
Ön muameleler x son muameleler	18	167,43	1,20	10,25	5,89**	1,24	6,15**
Hata	60	138,88		1,74		0,20	
Genel toplam	89						

** 0.01 düzeyinde önemli

Elde edilen varyans analizi sonuçlarına göre, sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön muameleler sonucunda 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiş, ayrıca son muameleler arasında herhangi bir farklılık ve ön ve son muameleler arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından hem ön muameleler ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık hem de ön x son muameleler arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Sürgün uzunluğu (cm) bakımından hem ön muameleler hem de son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık bulunmuştur. Ayrıca ön x son muameleler arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16 Er99 çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyo eksen eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**			Sürgün uzunluğu (cm)**		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	100,00	91,66	91,66	4.50bc	0,91b	2,00abc	1.15abc	2,33abc	1,31a
0.50	0.00	100,00	91,66	83,33	8.22ab	,91b	2,51ab	1.53a	3,75a	1,16abc
0.50	0.01	91,66	100,00	100,00	8.14ab	2,66a	2,66a	1.36ab	2,73ab	1,20ab
0.50	0.03	100,00	100,00	75,00	11.17a	2,11ab	2,21abc	1.64a	1,49bc	0,52d
0.50	0.05	100,00	100,00	91,66	11.70a	2,50ab	1,26c	1.77a	1,50bc	0,66cd
0.50	0.07	100,00	83,33	100,00	4.58bc	2,66a	2,33abc	1.84a	1,23bc	0,85abcd
0.50	0.09	100,00	91,66	91,66	11.20a	2,37ab	0,53bc	1.76a	1,22bc	0,82abcd
0.50	0.11	100,00	83,33	100,00	8.41a	1,50ab	1,66abc	1.21ab	0,69c	0,89abcd
0.50	0.13	100,00	100,00	100,00	4.58bc	2,50ab	2,18abc	0.69bc	0,91c	0,93abcd
0.50	0.15	100,00	100,00	83,33	3.73c	1,78ab	1,33c	0.53c	0,85c	0,73bcd

** 0.01 düzeyinde önemli

Sürgün oluşum yüzdesi

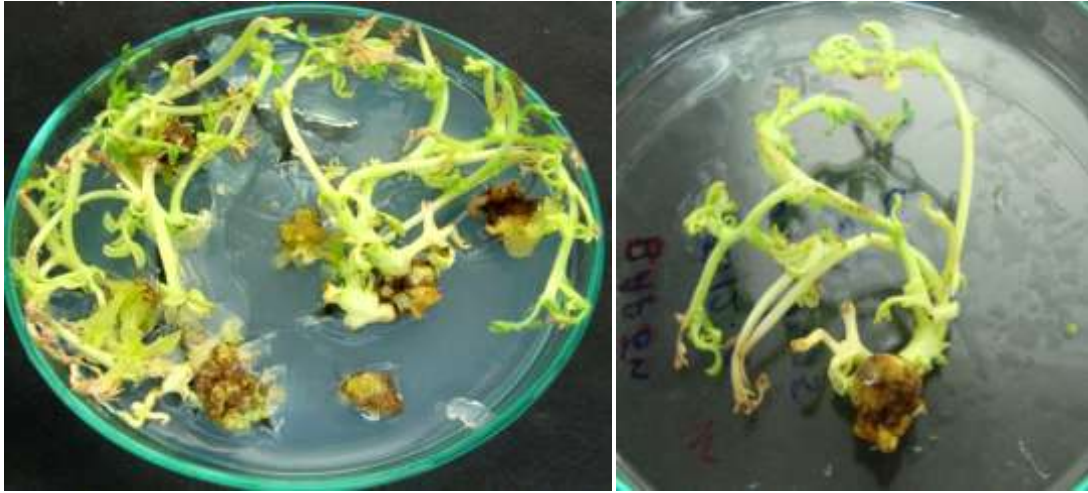
Çizelge 4.16'da görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muamelesinden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre, sürgün oluşum yüzdesi % 91.66 - 100.00, 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde % 83.33 - 100.00 ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde ise % 75.00 - 100.00 aralığında değişmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı

Eksplant başına sürgün sayısı 25 mg/l BAP ile ön muamelesinden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre, 3.73 ve 11.70 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.05 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 0.91 ve 2.66 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 0.53 ve 2.66 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.01 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

BAP-NAA içeren ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerde uzunluk bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde sürgün uzunluğu (cm) 0.53 ve 1.84 (cm) arasında değişmiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP + 0.07 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde sürgün uzunluğu bakımından 0.69 - 3.75 adet arasında değişmiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde 0.52 - 1.31 (cm) arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Er99 çeşidinde embriyonik eksen eksplantından 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen sürgün rejenerasyonu

4.2.9 Akçın çeşidine ait embriyonik eksen eksplantının mikroçoğaltımı

Nohut bitkisinin Er99 çeşidine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamlarda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra embriyonik eksen eksplantı izole edilmiştir. Embriyonik eksen eksplantı, 0.00, 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış olup, 25 gün sonra elde edilen sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonuçları çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17 Akçin çeşidinde değişik ön muamele yapılan embriyolardan elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP veya NAA dozlarında sürgün rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi

V. K.	S. D.	Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K. O.	F	K. O.	F	K. O.	F
Ön muameleler	2	1020,83	13,36	417,45	55,24**	2,67	15,78**
Son muameleler	9	219,13	2,86	23,24	3,07**	1,96	11,58**
Ön muameleler x son muameleler	18	202,93	2,65	17,74	2,34**	0,55	3,27**
Hata	60	76,38		7,55		0,16	
Genel toplam	89						

** 0.01 düzeyinde önemli

Varyans analizi sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%) bakımından ön ve son muamelelerde herhangi bir farklılık ayrıca ön muamele x son muamele arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Eksplant başına sürgün sayısı (adet) bakımından ön muamele ve son muameleler sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muamele arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Sürgün uzunluğu (cm) bakımından ön muamele ve son muamele sonucunda 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muamele x son muamele arasında 0.01 etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18 Akçin çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu

Ortam		Sürgün oluşum yüzdesi (%)			Eksplant başına sürgün sayısı (adet)**			Sürgün uzunluğu (cm)**		
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃	25mg/l BAP	25 mg/l GA ₃	25 mg/l BAP + 25 mg/l GA ₃
0.00	0.00	100,00	91,66	91,66	2,50c	1,16b	1,83b	2,37ab	2,32a	2,25a
0.50	0.00	100,00	100,00	100,00	8,50abc	2,33ab	1,83b	1,41c	1,71b	1,15b
0.50	0.01	100,00	100,00	75,00	9,00abc	3,16a	1,75b	1,25c	1,69b	0,74b
0.50	0.03	100,00	100,00	91,66	10,91abc	3,25a	2,00ab	1,04c	1,49b	0,53b
0.50	0.05	100,00	100,00	75,00	14,27ab	3,16a	1,33c	1,20c	1,44b	0,66b

Çizelge 4.18 Akçin çeşidinde farklı ön muameleler sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantının farklı BAP + NAA dozları içeren besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu (Devamı).

0.50	0.07	100,00	91,66	100,00	16,00a	2,50ab	1,75b	1,01c	0,51c	1,00b
0.50	0.09	100,00	91,66	100,00	7,61abc	2,58ab	2,25a	1,06c	0,78c	0,43b
0.50	0.11	100,00	75,00	75,00	2,91c	2,08ab	1,50c	1,57bc	0,48c	0,56b
0.50	0.13	100,00	75,00	91,66	7,50abc	1,44b	2,00ab	1,10c	0,51c	0,60b
0.50	0.15	100,00	83,33	91,66	6,08bc	1,65ab	2,08ab	2,51a	0,58c	0,64b

** 0.01 düzeyinde önemli

Sürgün oluşum yüzdesi

Çizelge 4.18’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ile ön muamelesinden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre, sürgün oluşum yüzdesi % 100.00, 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde % 75.00 - 100.00 ve 25 mg/l BAP + 25 GA₃ mg/l ön muamelesinde ise % 75.00 - 100.00 aralığında değişmiştir.

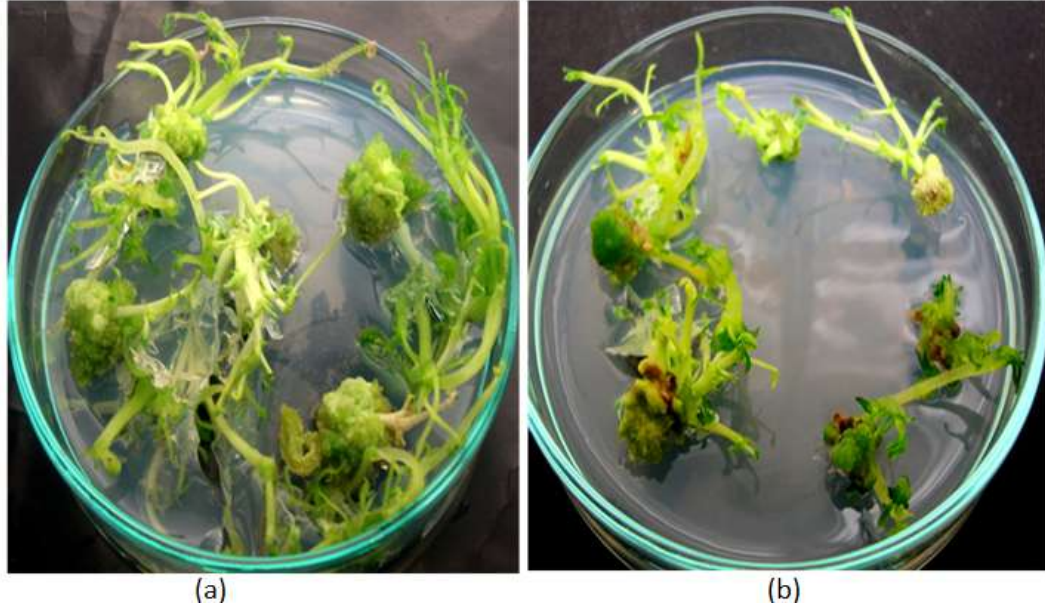
Eksplant başına sürgün sayısı

Eksplant başına sürgün sayısı 25 mg/l BAP ile ön muamelesinden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda son muamele sonuçlarına göre 2.50 ve 10.91 adet arasında değişim göstermiş olup, en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.03 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 1.16 ve 3.25 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.03 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ ile ön muamelesinde 1.33 ve 2.25 adet arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 0.5 mg/l BAP + 0.09 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu

BAP-NAA içeren ortamlarda eksplantlar üzerinde gelişen sürgünlerde uzunluk bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde sürgün uzunluğu bakımından 2.51 ve 1.04 adet arasında değişim göstermiş olup, en uzun sürgünler 0.5 mg/l BAP + 0.15 NAA mg/l içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ile ön muamelesinde 2.32 ve 0.48

(cm) arasında değişim göstermiş ve en fazla sürgün sayısı 1x MS ortamından elde edilmiştir. 25 mg/l BAP + 25 GA₃ ile ön muamelesinde 0.43 ve 2.25 (cm) arasında değişim göstermiş ve en uzun sürgünler MS ortamından (kontrol) elde edilmiştir (şekil 4.11).



şekil 4.11 Akçin çeşidinde embriyonik eksen eksplantından a. 25 BAP mg/l ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu b. 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden sonra 0.50 mg/l BAP – 0.05 mg/l NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.10 Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerine ait radikula eksplantının mikroçoğaltımı

Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerine ait embriyoları, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃, 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ içeren ortamlarda ayrı ayrı 2 gün ön muamele yapıldıktan sonra radikula eksplantı izole edilmiştir. Radikula eksplantı, 0.00, 0.50 mg/l BAP ve 0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13 ve 0.15 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Fakat 25 mg/l BAP ön muamelesi yapılmış eksplantlarda 12-15 kat uzama (şekil 4.12), 25 mg/l GA₃ ön muamelesi yapılmış eksplantlarda 8-10 kat uzama ile şişme ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ ön muamelesi yapılmış eksplantlarda 1 -2 kat uzama görölürken hiçbir eksplantta sürgün oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.12 Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda radikula eksplantında elde edilen sürgün rejenerasyonu

4.3 Gökçe, Yaşa, Akçin ve Er99 Çeşitlerinde Elde Edilen Sürgünlerin Kök Rejenerasyonu

Sürgün rejenerasyonu çalışmalarının sonucunda, 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃ ve 25 mg/l BAP + 25 mg/l GA₃ elde edilen sürgünlerin kıyaslama neticesinde 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde daha hızlı sürgün gelişimi izlenmiştir. Bundan dolayı çalışmanın devamında ve kök rejenerasyonunda 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda izole edilen plumula ve embriyonik eksen eksplantlarının sürgün rejenerasyonu ortamından elde edilen sürgünler ile devam edilmiştir.

İlk denemede Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerinin plumula ve embriyonik eksen eksplantlarından elde edilen sürgünler, köklendirilmeleri için farklı oranlarda (0.00, 0.10, 0.30, 0.50, 0.70, 1,00 mg/l) NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sürgünlerdeki fenolik bileşikler önlemek amacıyla rejenerasyon ortamlarına aktif kömür ilave edilmiştir. Sekiz hafta sonra herhangi bir kök rejenerasyonu elde edilmemiştir. Nitekim eksplantların, yüksek oranda fenolik bileşiklerin salgılanması sonucunda önce karardığı daha sonra da öldüğü gözlenmiştir.

İkinci denemede elde edilen sürgünler, 6 mg/l GA₃ ve (0.1, 0.3, 0.5 mg/l) IBA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra her 2 ön muamele sonucunda elde edilen sürgünlerde kök rejenerasyonu görülmüştür. Sonuçlar değerlendirilip, elde edilen verilerin varyans analizleri aşağıdaki gibi her çeşide ait ayrı ayrı verilmiştir.

4.3.1 Gökçe çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Yukarıda belirtildiği gibi Gökçe çeşidinin embriyolarından öncelikle 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda izole edilen plumula eksplantının, farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında elde edilen sürgünlerinin köklendirilmesi amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyonda) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19 Gökçe çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin 6 mg/l GA₃ ile farklı oranlarda IBA dozlarında kök rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi sonuçları

Vk	Sd	kök oluşum oranı (%)		Sürgün başına kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ön muameleler	1	66,66	0,05	2,07	0,95	61,60	4,37*
Köklendirme ortamları	3	3802,77	2,85	5,86	2,68	76,32	5,41**
Ön muameleler × Köklendirme ortamları	3	1163,88	0,87	0,72	0,33	18,90	1,34
Hata	16	1332,29		2,18		14,09	
Genel toplam	23						

* 0.05 düzeyinde önemli, ** 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.19'da görüldüğü gibi kök oluşum oranı (%) ve sürgün başına kök sayısı (adet) bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca, ön muameleler ve köklendirme ortamları arasında herhangi bir etkileşim de bulunmamıştır.

Kök uzunluğu bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli farklılık izlenmiştir. Ancak her ikisi arasında herhangi bir etkileşim izlenmemiştir. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.20, 4.21 ve 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.20 Gökçe çeşidinin plumula eksplantından 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyon sonuçları

Köklendirme ortamları		Kök oluşum oranı (%)		Sürgün başına kök sayısı (adet)	
		25 mg/l BAP ön muamelesinden elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu	25 mg/l GA ₃ ön muamelesinden elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu	25 mg/l BAP ön muamelesinden elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu	25 mg/l GA ₃ ön muamelesinden elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)				
6	00	33,33	58,33	0,66	2,16
6	0.1	100,00	100,00	3,06	3,82
6	0.3	100,00	58,33	2,66	2,66
6	0.5	50,00	53,33	1,40	1,50

Çizelge 4.20’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamele ve farklı BAP - NAA oranlarından elde edilen sürgünlerin 6 mg/l GA₃ + farklı oranlarda IBA içeren besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda, kök oluşum oranı (%) LSD testine göre istatistiki olarak önemsiz olmasına rağmen 25 mg/l BAP ön muamelesinde 33.33 - 100.00 ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 53.33 - 100.00 aralığında değişmiştir.

Benzer şekilde, sürgün başına kök sayısı (adet) bakımından istatistiki olarak önemsiz olduğu halde BAP ön muamelesinde 0,66 ve 3,06 adet ve GA₃ ön muamelesinde ise 1.5 ve 3.82 arasında sayısal bir farklılık izlenmiştir.

Çizelge 4.21 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen Gökçe çeşidinin plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA₃ ile farklı oranlarda IBA içeren MS ortamında kök uzunluğuna ön muamelelerin etkileri

Ön muameleler	Kök uzunluğu (cm) *
25 mg/l BAP ön muamelesi	3,88
25 mg/l GA ₃ ön muamelesi	7,09

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında t testine göre 0.05 düzeyinde farklılığı önemlidir.

Ancak 25 mg/l BAP ön muamelesinde elde edilen köklerin uzunluk ortalaması 3.88 (cm) ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden elde edilen köklerin uzunluk ortalaması 7.09 (cm) olarak izlenmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.22 Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen plumula eksplantından gelişen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında oluşan köklerin uzunluğuna etkileri

Köklendirme ortamları		Kök uzunluğu (cm)**
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	
6	00	4,78b
6	0.1	10,67a
6	0.3	3,83b
6	0.5	2,65b

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında LSD testine göre 0.01, düzeyinde farklılığı önemlidir.

Ayrıca köklendirme ortamları kıyaslandığında kök uzunluğu 2.65 ve 10.67 (cm) arasında değişim göstermiş (Çizelge 4.21) olup, en uzun kökler 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA içeren MS köklendirme ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi ve farklı BAP–NAA oranlarında elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu

4.3.2 Yaşa çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Yaşa çeşidinde daha önce 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamele sonucunda elde edilen plumula eksplantının daha sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınması ile elde edilen sürgünler, köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.23’de verilmiştir.

Çizelge 4.23 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen Yaşa çeşidinin plumula eksplantından gelişen sürgünler ve daha sonra 6 mg/l GA₃ ile ön muamele yapıp, farklı oranda IBA içeren MS ortamında kök oluşumu ile ilgili sonuçları

Vk	SD	Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ön muameleler	1	234,37	1,28	0,02	0,13**	53,07	2,47
Köklendirme ortamları	3	1484,37	8,14**	3,61	17,89**	22,19	1,03
Ön muameleler × Köklendirme ortamları	3	998,26	5,47**	7,22	35,78**	70,88	3,31*
Hata	16	182,29		0,20		21,41	
Genel toplam	23						

** 0.01 düzeyinde önemli, * 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.23’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı bakımından (%) ön muameleler sonucunda herhangi bir farklılık bulunmazken, köklendirme ortamları arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Benzer şekilde ön muameleler ve köklendirme ortamları arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Sürgün başına kök sayısı bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Benzer şekilde ön muameleler x köklendirme ortamları arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Kök uzunluğu bakımından ön muamelelerin ve köklendirme ortamlarının etkileri bulunmazken, ön muameleler ve köklendirme ortamları arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.24’de verilmiştir.

Çizelge 4.24 Yaşa çeşidinin plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu

Köklendirme ortamı		Kök oluşum oranı (%)**		Sürgünbaşınaköksayısı(adet)**		Sürgün uzunluğu*	
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele
6	00	50,00b	58,33c	1,25	1,483	6,61	7,10
6	0.1	91,66a	75,00b	3,93	1,553	8,85	7,60
6	0.3	58,33b	100,00a	1,08	4,00	2,27	15,50
6	0.5	58,33b	50,00c	1,50	1,00	4,81	4,25

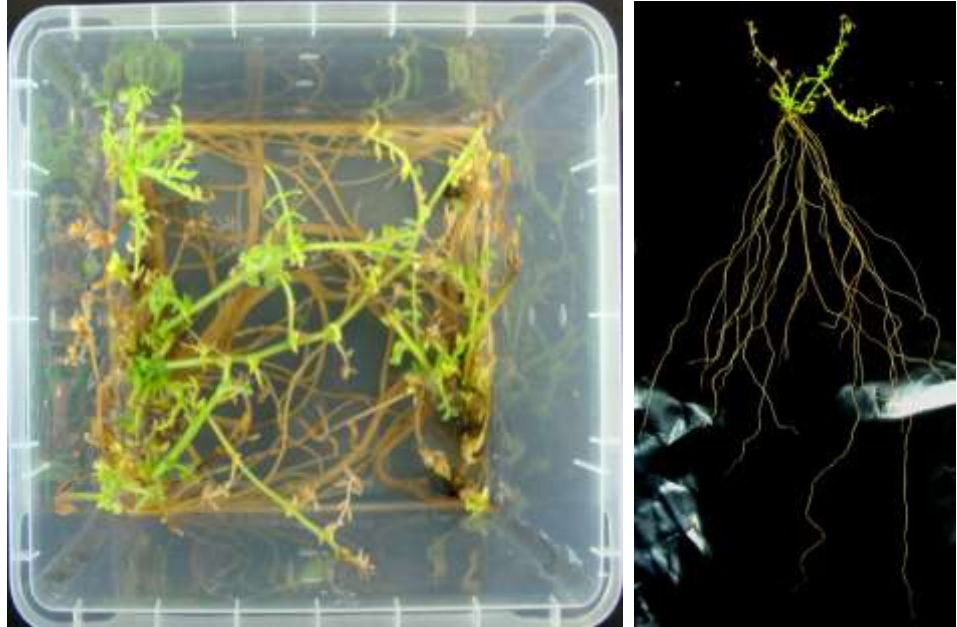
** Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

* Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge4.24’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi ve farklı BAP - NAA oranlarından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃-IBA içeren besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda, kök oluşum oranı bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde % 50.00 - 91.66 arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda ise % 50.00 - 100.00 arasında gözlenmiş ve sırası ile en fazla kök oluşumu oranı 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA ve 6 mg/l GA₃ + 0.3 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Sürgün başına kök sayısı bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde 1.08 ile 3.09 adet arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 1.00 ve 4.00 arasında değişmiş ve en fazla kök sayısı sırası ile 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA ve 6 mg/l GA₃ + 0.3 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür.

6 mg/l GA₃ + farklı oranlarda IBA içeren MS ortamlarında sürgünler üzerinde gelişen kök uzunlukları bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde 2,27 ve 8.85 cm arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 4.25 ile 15.50 cm arasında değişmiş olup, en uzun kökler sırası ile 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA ve 6 mg/l GA₃ + 0.3 mg/l IBA içeren MS ortamlarında görülmüştür (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Yaşa çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu

4.3.3 Er99 çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Er 99 çeşidinde daha önce 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamele ve daha sonra elde edilen plumula eksplantı farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınması sonucunda elde edilen sürgünlerin köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.25’de verilmiştir.

Çizelge 4.25 Er 99 çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin, farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesinin etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Vk	Sd	Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		Ko	F	Ko	f	Ko	f
Ön muameleler	1	2604,16	5,00*	0,38	0,35	12,47	8,76**
Köklendirme ortamları	3	2152,77	4,13*	12,84	11,79**	22,25	15,63**
Ön muameleler × köklendirme ortamları	3	729,16	1,40	0,25	0,23	0,01	0,01
Hata	16	520,83		1,08		1,42	
Toplam	23						

** 0.05 düzeyinde önemli * 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.25’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı ve kök uzunluğu bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Sürgün başına kök sayısı bakımından köklendirme ortamlarında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Bu farklılığın önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan sonuçları çizelge 4.26 - 4.27’de verilmiştir.

Çizelge 4.26 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muameleleri sonucunda elde edilen Er99 çeşidinin plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA₃ ile farklı oranlarda IBA içeren MS ortamlarında kök uzunluğunda ön muamelelerine etkileri

Ön muamele	Kök Oluşum Oranı (%)*	Kök uzunluğu (cm)**
25 mg/l BAP ön muamelesi	60,41b	2,83b
25 mg/l GA ₃ ön muamelesi	81,25a	4,27a

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında t testine göre 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur, * Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında LSD testine göre 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.26'da görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi ve farklı BAP - NAA oranlarında elde edilen sürgünlerin, 6 mg/l GA₃ + farklı oranlarda IBA içeren besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda ortalamalar arasında t testine göre ön muamele bakımından kök oluşum oranında 25 mg/l BAP ön muamelesinde % 60,417 ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde % 81,25 oranında farklılık ve kök uzunluğu bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde 2,83 cm ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 4,27 cm olarak kök uzunluğu izlenmiştir. Böylece en fazla kök oluşum oranı (%) ve en uzun kökler 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.27 Er99 çeşidinde 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muameleleri sonucunda elde edilen plumula eksplantından gelişen sürgünlerin 6 mg/l GA₃ ile farklı oranlarda IBA içeren MS ortamında oluşan köklerin, köklendirme ortamlarına etkileri

Ortam		Kök Oluşum Oranı (%)*	Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)**	Kök uzunluğu (cm)**
GA ₃	IBA			
6	00	75,00ab	2,80b	3,73b
6	0.1	58,33b	1,45c	2,17c
6	0.3	95,83a	4,56a	6,20a
6	0.5	54,16b	1,50c	2,09c

** Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında LSD testine göre 0.01 düzeyinde

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında LSD testine göre 0.05 düzeyinde

LSD testine göre kök oluşumu oranı (%) bakımından ortamlar, 54.16 ve 75.00 arasında değişmiş ve en fazla kök oluşum yüzdesi 6 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür. Sürgün başına kök sayısı (adet) bakımından 1.45 ve 4.56 arasında değişim göstermiş ve en fazla kök sayısı 6 mg/l GA₃ + 0.3 mg/l içeren MS ortamında görülmüştür. Kök

uzunluğu bakımından (cm) 2.09 ve 6.20 arasında değişim göstermiş ve en uzun kökler 6 GA₃ mg/l + 0.3 mg/l içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Er 99 çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin kök rejenerasyonu

4.3.4 Akçın çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Akçın çeşidinde daha önce 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen plumula eksplantının, farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınması sonucunda elde edilen sürgünler, köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.28’de verilmiştir.

Çizelge 4.28 Akçın çeşidinde plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilme etkisine ait varyans analiz sonuçları

Vk	Sd.	Kök oluşum oranı (%)		Sürgün başına kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)	
		Ko	F	Ko	f	Ko	f
Ön muameleler	1	2109,37	40,50	42,26	58,26**	190,49	120,15**
Köklendirme ortamları	3	303,81	5,83	7,90	10,89**	76,49	48,25**
Ön muameleler ×köklendirme ortamları	3	303,81	5,83	3,96	5,46**	104,08	65,65**
Hata	16	52,08		,72		1,58	
Toplam	23						

** 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.26’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı (%) bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında herhangi bir farklılık ve ön muameleler × köklendirme ortamları arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Sürgün başına kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında 0.01 düzeyinde farklılık ve ön muameleler ile köklendirme ortamları arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan sonuçları çizelge 4.29’de verilmiştir.

Çizelge 4.29 Akçın çeşidinin plumula eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu

Ortam (mg/l)		Kök oluşum oranı (%)		Sürgün başına kök sayısı (adet)**		Ortam (mg/l)**	
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele
6	00	75,00	100,00	2,33c	6,87a	8,50c	5,06ba
6	0.1	100,00	100,00	6,33a	6,93a	21,66a	4,76b
6	0.3	83,33	100,00	3,40b	5,87b	9,00b	3,70c
6	0.5	66,66	100,00	2,50c	5,50b	3,83d	6,93a

** Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.29’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muameleleri ve farklı BAP - NAA oranlarında elde edilen sürgünlerin, 6 mg/l GA₃ + farklı oranlarda IBA içeren besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda kök oluşum oranı 25 mg/l BAP ön muamelesinde % 66.66 - 100.00 arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde ise % 100.00 olarak gözlenmiştir.

Sürgün başına kök sayısı (adet) bakımından BAP ön muamelesinde 2,33 ve 6,33 adet arasında olup, en fazla sürgün sayısı 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l içeren MS ortamında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 5.50 ve 6.93 adet arasında değişmiş olup, en fazla sürgün sayısı 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA ve 6 mg/l GA₃ MS ortamında görülmüştür.

6 mg/l GA₃- farklı IBA içeren MS ortamlarında sürgünler üzerinde gelişen kök uzunlukları bakımından 25 mg/l BAP ön muamelesinde 3.83 ile 21,66 cm arasında değişmiş olup, en uzun kökler 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamından ve

GA₃ ön muamelesinde 3.70 ve 6.93 arasında değişmiş olup, en uzun kökler sırası ile 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA ve 6 mg/l GA₃ + 0.5 mg/l IBA içeren MS ortamında görölmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Akçın çeşidinde 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu

4.3.5 Gökçe çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Gökçe çeşidinde daha önce 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda embriyonik eksen eksplantı elde edilmiştir. Daha sonra eksplantlardan farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında elde edilen sürgünler, köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30 Gökçe çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi etkisine ait varyans analiz sonuçları

VK	SD	Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ön muameleler	1	1276,04	1,46	1,35	1,49	23,80	2,77
köklendirme ortamları	3	3023,26	3,46	3,83	4,24	65,98	7,69
Ön muameleler × köklendirme ortamları	3	912,15	1,04	0,79	0,87	33,32	3,88*
Hata	16	872,91		0,90		8,57	
Toplam	23						

* 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.30’da görüldüğü gibi ön muamele ve köklendirme ortamları bakımından kök oluşum oranı (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu (cm) ortalamalarında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Ancak ön muameleler × köklendirme ortamları bakımından kök uzunluğunda 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan analizi sonuçları çizelge 4.31’de verilmiştir.

Çizelge 4.31 Gökçe çeşidinin embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu

Köklendirme ortalamaları (mg/l)		Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)*	
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele
6	00	100,00	71,66	3,70	3,08	10,01a	5,61b
6	0.1	100,00	100,00	2,66	3,53	7,57ba	14,53a
6	0.3	91,66	50,00	2,75	3,58	3,55b	6,03b
6	0.5	41,66	53,33	1,23	2,04	2,20b	5,12b

** Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.31’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı, 25 mg/l BAP ön muamelesinde % 41.66 - 100.00 arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde ise % 50.00 - 100.00 arasında izlenmiştir.

Sürgün başına kök sayısı, 25 mg/l BAP ön muamelesinde 1.23 - 3,70 adet arasında ve GA₃ ön muamelesinde ise 2.04 - 3.58 arasında değişmiştir.

Farklı GA₃-IBA içeren MS ortamlarında sürgünler üzerinde gelişen kök uzunlukları, 25 mg/l BAP ön muamelesinde 10.01 - 2.20 cm arasında değişmiş olup, en uzun kökler 6 mg/l GA₃ içeren MS ortamında elde edilmiştir. 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 5.12 - 14.53 (cm) arasında değişmiş olup, en uzun kökler 6 GA₃ mg/l + 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Gökçe çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantından kök rejenerasyonu

4.3.6 Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Yaşa çeşidinde daha önce 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda embriyonik eksen eksplantı elde edilmiştir. Daha sonra eksplantlardan farklı

oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında elde edilen sürgünler, köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.32’de verilmiştir.

Çizelge 4.32 Yaşa çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilme etkisine ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ön muameleler	1	1666,66	8,00**	9,18	8,95**	12,39	2,25
köklendirme ortamları	3	3368,05	16,16**	23,09	22,50**	256,35	46,70
Ön muameleler × köklendirme ortamları	3	486,11	2,33	6,17	6,02**	54,21	9,87**
Hata	16	208,33		1,02		5,48	
Toplam	23						

** 0.01 düzeyinde önemli, * 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.32’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı (%) ve sürgün başına kök sayısı (cm) bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir. Ancak ön muameleler × köklendirme ortamları arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Kök uzunluğu (cm) bakımından ise ön muameleler ve köklendirme ortamlarında herhangi bir farklılık izlenmemişken, ön muameleler × köklendirme ortamları arasında 0.01 düzeyinde bir etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.33’de verilmiştir.

Çizelge 4.33 Yaşa çeşidinin embriyonik eksen eksplantından edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu

Köklendirme ortamı (mg/l)		Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)**		Kök uzunluğu (cm)	
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele
6	00	58,33	58,33	2,83	1,83	12,57ab	6,36b
6	0.1	91,66	100,00	3,58	4,20	12,37ab	20,66a
6	0.3	58,33	100,00	0,91	3,00	13,33a	16,33ab
6	0.5	33,33	50,00	0,66	0,91	1,66b	2,33c

** Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 33’de görüldüğü gibi 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muameleleri ve farklı BAP - NAA oranlarında elde edilen sürgünlerin, 6 mg/l GA₃- farklı oranlarda IBA içeren besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda 25 mg/l BAP ön muamelesinde kök oluşum oranı % 33.33 - 91.66 arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde ise % 50.00 - 100.00 arasında gözlenmiştir.

Sürgün başına kök sayısı ise 25 mg/l BAP ön muamelesinde 0,66 - 3,58 adet arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 0.91 - 4,20 adet arasında değişmiş ve her iki ön muamelede en fazla sürgün sayısı 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür.

6 mg/l GA₃ + farklı oranlarda IBA içeren MS ortamında sürgünler üzerinde gelişen kök uzunlukları incelediğinde 25 mg/l BAP ön muamelesinde 1.66 - 13,33 cm arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde ve 2.33 - 20.66 arasında değişmiş olup, en uzun kökler sırası ile 6 mg/l GA₃ + 0.3 mg/l IBA ve 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Yaşa çeşidinde 25 mg/l GA₃ ön muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu

4.3.7 Er 99 çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Er 99 çeşidinde daha önce embriyoların 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinden sonra elde edilen embriyonik eksen eksplantlardan, farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarından elde edilen sürgünler, köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.34 Er 99 çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilme etkisine ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ön muameleler	1	1666,66	2,13	0,12	0,14	2,03	0,52
köklendirme ortamları	3	590,27	0,75	1,66	1,91	0,66	0,17
Ön muameleler × köklendirme ortamları	3	486,11	0,62	0,95	1,09	2,06	0,53
Hata	16	781,25		0,87		3,87	
Toplam	23						

Çizelge 4.34’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu (cm) bakımından ön muameleler, köklendirme ortamları ve kök uzunluğu (cm) ortalamalarında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Ayrıca ön muameleler × köklendirme ortamları arasında etkileşim bulunmamakla birlikte kök oluşum oranı (%), sürgün başına kök sayısı (adet) ve kök uzunluğuna (cm) ait ortalamalar çizelge 4.35’de verilmiştir.

Çizelge 4.35 Er99 çeşidinin embriyonik eksen eksplantından edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu

Köklendirme ortamı (mg/l)		Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)	
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele	25 mg/l Bap ön muamele	25 mg/l GA ₃ ön muamele
6	00	66,66	66,66	1,72	1,91	3,51	3,33
6	0.1	58,33	75,00	2,00	3,25	3,05	4,55
6	0.3	75,00	58,33	2,83	2,30	4,40	3,75
6	0.5	58,33	66,66	1,75	1,41	3,33	5,00

25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muamelelerinde istatiki olarak ortalamalar arasında herhangi bir farklılık bulunmamakla birlikte kök oluşum oranı, sürgün başına kök sayısı ve kök uzunluğu olarak sırasıyla % 58.33 - 75.00, 1.41 - 3.25 adet ve 3.05 - 5.00 cm arasında değişim göstermiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Er 99 çeşidinde 25 mg/l BAP ön muamelesi sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantının kök rejenerasyonu

4.3.8 Akçin çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Akçin çeşidinde daha önce 2 günlük 25 mg/l BAP ve 25 mg/l GA₃ ön muameleleri sonucunda elde edilen embriyonik eksen eksplantların daha sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarında elde edilen sürgünleri, köklendirilmeleri amacıyla 6 mg/l GA₃ + 0.0, 0.1, 0.3, 0.5 mg/l IBA (4 farklı kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.36’da verilmiştir.

Çizelge 4.36 Akçin çeşidinde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren ortamlarda köklendirilme etkisine ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Kök Oluşum Oranı (%)		SürgünBaşınaKök Sayısı (adet)		Kök Uzunluğu(cm)	
		Ko	F	Ko	f	Ko	f
Ön muameleler köklendirme ortamları	1	2109,37	40,50	83,90	382,16**	156,39	84,14**
	3	303,81	5,83	2,24	10,24**	49,57	26,67**
Ön muameleler × köklendirme ortamları	3	303,81	5,83	4,36	19,86**	57,36	30,86**
Hata	16	52,08		0,220		1,85	
Toplam	23						

** 0.05 düzeyinde önemli * 0.05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.36’da görüldüğü gibi kök oluşum oranı bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında herhangi bir farklılık ve ön muameleler × köklendirme ortamları arasında herhangi bir etkileşim bulunmamıştır. Sürgün başına kök sayısı (adet) ve kök uzunluğu bakımından ön muameleler ve köklendirme ortamlarında 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir. Kök uzunluğu bakımından, ön muameleler × köklendirme ortamları arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan sonuçları çizelge 4.37’de verilmiştir.

Çizelge 4.37 Akçın çeşidinin embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünlerinin farklı oranlarda GA₃ ve IBA içeren besin ortamlarında kök rejenerasyonu

Köklendirme ortamları (mg/l)		Kök Oluşum Oranı (%)		Sürgün Başına Kök Sayısı (adet)**		Kök uzunluğu (cm)**	
GA ₃ (mg/l)	IBA (mg/l)	BAP ön muamelesi	GA ₃ ön muamelesi	BAP ön muamelesi	GA ₃ ön muamelesi	BAP ön muamelesi	GA ₃ ön muamelesi
6	00	75,00	100,00	1,917	7,700	10,50ab	5,25a
6	0.1	100,00	100,00	5,083	6,700	18,00a	4,95ab
6	0.3	83,333	100,00	3,333	6,975	8,91b	4,77ab
6	0.5	66,667	100,00	2,500	6,417	3,56c	5,58b

** Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01, düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.37’de görüldüğü gibi kök oluşum oranı, 25 mg/l BAP ön muamelesinde % 66.66 - 100.00 arasında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde ise % 100.00 olarak izlenmiştir.

Sürgün başına kök sayısı, 25 mg/l BAP ön muamelesinde 1.91 - 3.33 adet arasında olup, en fazla sürgün sayısı 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamında ve 25 mg/l GA₃ ön muamelesinde 6.41 - 7.70 adet arasında değişmiş olup, en fazla sürgün sayısı 6 mg/l GA₃ içeren MS ortamında görülmüştür.

6 mg/l GA₃ + IBA içeren MS ortamlarda sürgünler üzerinde gelişen kök uzunluklarına bakıldığında, 25 mg/l BAP ön muamelesinde 3.56 - 18,00 cm arasında değişmiş olup, en uzun kökler 6 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamından ve 25 mg/l GA₃ ön

muamelesinde 4.77 - 5.58 cm arasında değişmiş olup, en uzun kökler 6 mg/l GA₃+ 0.3 mg/l IBA içeren MS ortamında izlenmiştir (şekil 4.20).



şekil 4.20 Akçin eşidinde 25 mg/l BAP n muamelesi sonucunda elde edilen kök rejenerasyonu

4.3.9 Elde edilen bitkilerin dış ortam koşullarına adaptasyonu

Köklendirilmiş bitkiler, 8 hafta sonra magentalardan çıkartılıp köklerindeki agar ve diğer kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla eşme suyu ile köklere zarar vermeden yıkanmıştır. Bitkiler, kültür kaplarında yüksek nemli ortam içerisinde yaşamaktadırlar. Kültür kaplarından dış ortam koşullarına adaptasyonlarının sağlanması için çıkartılan bitkiler, dış ortam şartlarında nem oranının düşük olması nedeni ile strese girerek ölmektedirler. Bu aşamada transpirasyon yoluyla bitkilerin su kayıplarını önlemek ve dış ortam koşullarına daha kolay adaptasyon sağlayabilmeleri için doku kültürü ile elde edilen bitkiler, eşme suyu içinde 10 - 15 dk bekletilmiştir (şekil 4.21a).

In vitro koşullarda geliştirilen bitkilerin, dış şartlara alıştırılmaları için saksılarda öncelikle % 80-85 kum, 0.15 - 0.20 mm partikül hacminde steril dere kumu kullanılmıştır. Bitkiler, saksılara şaştırdıktan sonra nem dengesini korumak amacıyla saksıların üzerine açık mavi ve beyaz poşetler geçirilmiştir. Fakat şaştırılan bitkilerin hepsi ölmüştür. Bitkilerin, dere kumunun su tutma kapasitesinin az olması ve sulama esnasında besin maddelerinin yıkanması sonucunda öldüğü düşünülmüştür.

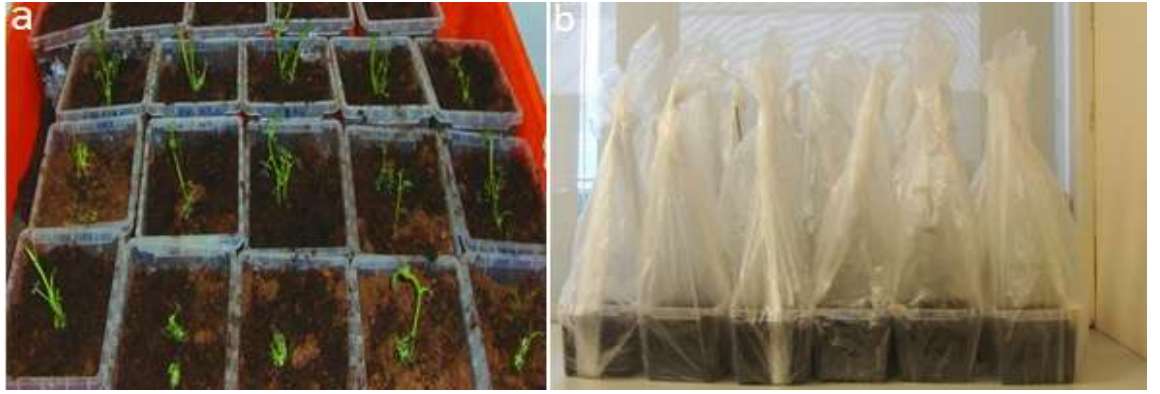
Daha sonra adaptasyon amaçlı ikinci denemede steril edilen kum + trf 1:1 oranında kullanılmıştır. Bitkiler, saksılara şaştırdıktan sonra nem dengesini korumak amacıyla saksıların üzerine açık mavi ve beyaz poşetler geçirilmiştir. Fakat bu karışımda, bitkiler sadece 10 - 15 gün yaşayabilmişlerdir. Daha sonra rme sonucunda hepsi ölmüşlerdir. Nohut bitkisi suyu geçiren, gübrelenmiş, kuvvetli, orta ağır ve yeteri kadar toprağın nemini ihtiva edebilen ayrıca pH=7,0-8,0 aralığında fazla asitli olmayan topraklardan hoşlanan bir bitkidir. Bu denemenin başarısızlığının en büyük sebebi olarak kum-trf karışımının düşük pH değerinde olması ve toprağın asit oranının yüksek olması düşünülmüştür.

nc denemede sadece steril edilen torf kullanılmıştır. Torf, kullanılmadan önce 160 C’de 2 saat boyunca steril edilmiştir. Ayrıca bitkiler saksılara şaştırdıktan sonra nem dengesini korumak için saksıların üzerine açık mavi ve beyaz poşetler geçirilmiştir (şekil 4.21b). Bu deneme sonucunda, bitkilerin sağlıklı şekilde büyüyüp gelişmeleri sonucunda dış ortam koşullarına adapte oldukları görülmüştür. Bitkilerin oda sıcaklığında, poşet içerisindeki gelişmeleri takip edilmiştir. 4. günden itibaren poşetlerin öncelikle ağızları açılmış (şekil 4.22) ve bir hafta sonra tamamen bitkiler poşetlerden ıkartırılıp, sera koşullarında büyümeye bırakılmıştır (şekil 4.23).

Sonuç olarak nohut bitkisinin dış koşullara adaptasyonunda en uygun substrat olarak 6.65 pH ve yüksek oranda mikro ve makro elementler içeren torf belirlenmiştir.



Şekil 4.21.a. Köklendirilmiş bitkilerin saksıya aktarılmadan önce suda bekletilmesi, b. Saksılara şaşırtılmış bitkilerin üzerinin açık mavi ve şeffaf poşetler ile kapatılması



Şekil 4.22 Elde edilen bitkilerin saksılara aktarılması

a. Bitkilerin torfta şaşırtılması b: Bitkilerin dış koşullara alıştırılması esnasında poşetlerin ağızlarının açılması



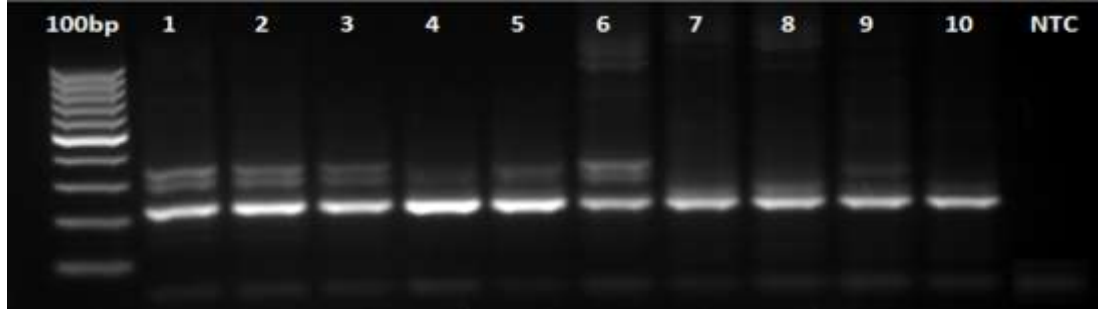
Şekil 4.23 Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

4.4 Plazmit Transformasyonunun Doğrulanması

Nohut bitkisinde, pre-miR408'in dizisine ait herhangi bir veri bulunmadığından dolayı pre-miR408 geninin çoğaltılmasında mirbase veri bankasında mevcut olan *A. thaliana* bitkisine ait dizi, ileri ve geri primerlerinin tasarlanması için kullanılmıştır.

Daha sonra *A. thaliana* Col5 çeşidinin genomik DNA'sı ile söz konusu olan primerlerin eşliğinde yapılan PCR analizi sonucunda 276 baz çifti içeren pre-miR408 geni çoğaltılmıştır. Dizileme analizi sonucunda elde edilen dizinin, *A. thaliana* pre-miR408 dizisine tam homoloji gösterdiği teyid edilmiştir. Sonra elde edilen bant, pEARLYGATE 103 plazmidine klonlandıktan sonra elektroporator ile *A. tumefaciens* LBA 4404 hattına aktarılmıştır. Daha sonra transformasyon ürünü, kanamisin içeren LA (Luria agar) ortamında çizilmiş ve elde edilen bakteriyel kolonilerden 35S primeri eşliğinde koloni PCR yapılmıştır. Kolonilerin doğruluğu teyid edilmiştir (Şekil 4.24).

Elde edilen koloniler, daha sonraki gen aktarım çalışmalarında kullanılmak üzere -85 °C'de stoklanmıştır.



Şekil 4.24 35s primerler ile yapılmış koloni PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5 numara *A. tumefaciens* LBA 4404 pEARLYGATE103 Ath pre-mir408 kolonileri, 6, 7, 8, 9, numara *A. tumefaciens* LBA 4404 pEARLYGATE101 BAR (vektör kontrol) kolonileri, 10 numara pozitif kontrol ve NTC: negatif kontrol

4.5 Gen Aktarım Çalışmaları

Fonksiyonu belli veya belirlenmemiş, doğal veya sentetik olarak elde edilmiş nükleik asit dizilerinin, bitki hücrelerine aktarılmasında çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada *A. tumefaciens* tekniği kullanılmıştır.

4.5.1 *A. tumefaciens*'in GV2260 p35 GUS INT bakteri hattına gen aktarım çalışmalarının optimizasyonu

Gen aktarım çalışmalarının optimizasyonunda, en uygun bakteri ve eksplantı seçebilmek için $OD_{600} = 0.5, 0.8, 1.5$ ve embriyo, plumula, embriyonik eksen, tek kotiledon embriyo ve çift kotiledon embriyo eksplantları kullanılmıştır.

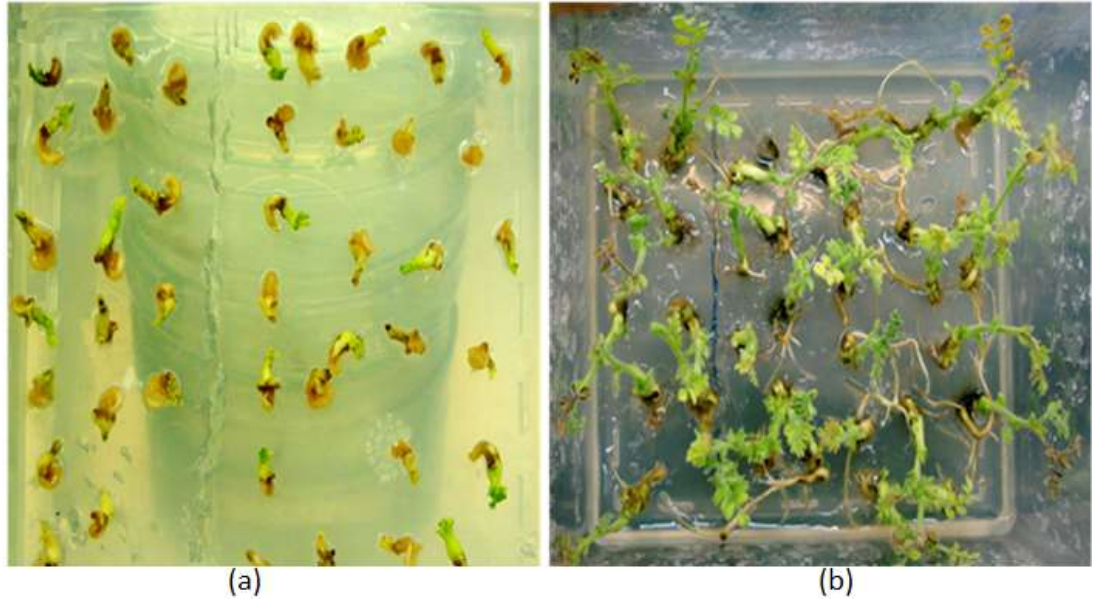
Bu kapsamda, öncelikle bakteri yoğunluğunun OD_{600} optimizasyon çalışması yapılmıştır. *In vitro* koşullarda Gökçe çeşidinden alınan embriyo eksplantları, bistüri aracılığıyla yaralandıktan sonra vakum yaratabilmek için oda sıcaklığında 15 dk kabinde bekletilmiştir. Daha sonra *A. tumefaciens*'in GV2260 p35GUSINT hattı ile 25 - 30 dk ve 0.5, 0.8 ve 1.5 OD_{600} bakteri yoğunlukları ile muamele edilmiştir. İnokülasyondan sonra 48 saat kokültivasyon tamponu ortamında bekletilmiştir. Ardından eksplantlar, 50 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l Duocid içeren sürgün ve kök seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra, kanamisinde yaşayan ve gelişen bitkilerden doku örnekleri alınarak histokimyasal GUS analizi yapılmıştır.

Deneme sonucunda, transformant dokuların tamamında ya da büyük kısmında mavi renkten oluşan hücre kümeleri tespit edilmiştir. Ayrıca histokimyasal GUS pozitif aday sürgünlerin, 35s promotor primerleri ile PCR analizi yapılmıştır. Transgenik bitkilerde bölgenin varlığı teyid edilmiştir. Testlerine ait sonuçların özeti, kanamisine dayanıklı aday transgenik bitki sayısı (adet), GUS histokimyasal analizi sonucunda elde edilen pozitif sonuç (adet) ve histokimyasal GUS pozitif aday sürgünlerden 35s primerleri ile PCR analizi sonucunda elde edilen pozitif bitki sayısı (adet) olmak üzere çizelge 4.38’de verilmiştir.

Çizelge 4.38 Gökçe çeşidinde T₀ GUS transgenik bitkilerin analiz sonuçları

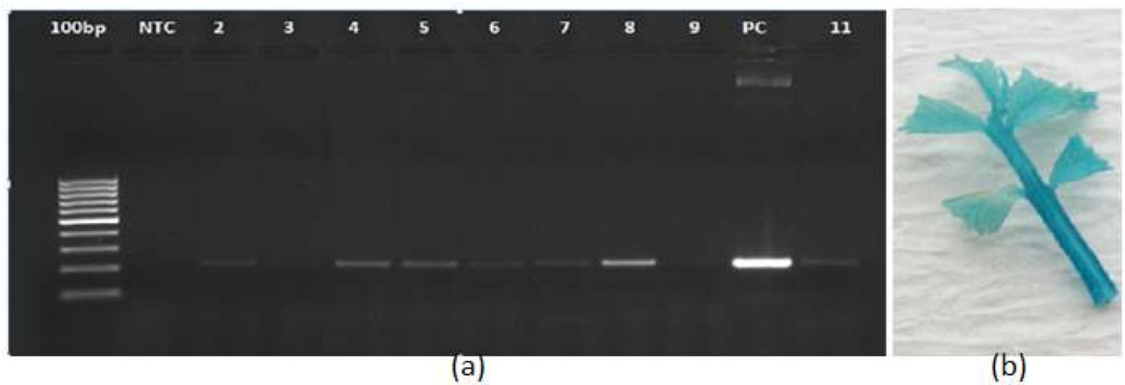
Embriyo Eksplantı üzerinde uygulanan bakteriyel süspansiyon OD ₆₀₀ yoğunluğu	Kanamisine dayanıklı aday transgenik bitki sayısı (adet)	GUS histokimyasal analizinden alınan pozitif sonuç (adet)	GUS pozitif örneklerinin PCR analizi sonucunda 35s primer ile elde edilen pozitif bitki sayısı (adet)
OD ₆₀₀ =0.5	40/100	12	7
OD ₆₀₀ =0.8	21/100	11	3
OD ₆₀₀ =1.5	0/100	0	0

Çizelge 4.38’de görüldüğü gibi birinci denemede p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* bakteri hattıyla Gökçe çeşidinin embriyo eksplantından OD₆₀₀=0.5 bakteri yoğunluğunda inokülasyonu yapılmıştır. Kanamisin içeren sürgün ve kök seleksiyon ortamında, 100 embriyodan 40 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.25).



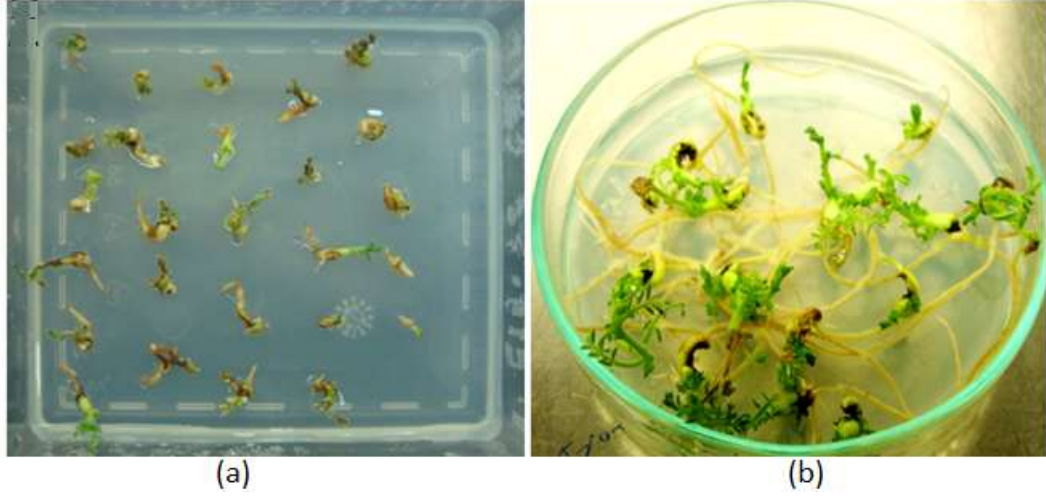
Şekil 4.25 OD600=0.5 bakteri yoğunluğunda inoküle edilen embriyoların a. sürgün seleksiyon ortamında elde edilen sürgünler, b. elde edilen sürgünlerin kök seleksiyon ortamında köklendirilmeleri

Seleksiyon ortamında elde edilen 40 bitkiden 12 bitkinin dokularında histokimyasal GUS analizi sonucunda mavi renk izlenmiştir. GUS histokimyasal analizinde pozitif sonuç veren 12 bitkinin DNA izolasyonu gerçekleştirilip, 35s promotor primerleri kullanılarak PCR işlemlerinin yapılması sonucunda 7 bitkide 35s bölgesinin varlığı teyid edilmiştir (Şekil 4.26. a, b).



Şekil 4.26.a. 35s primerleri ile yapılmış PCR sonucu, NTC: negatif kontrol, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: bitki örnekleri, PC: pozitif kontrol, 11: bitki örneği b. *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen OD600=0.5 transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucu

İkinci denemede p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* bakteri hattıyla Gökçe çeşidinin embriyo eksplantından OD₆₀₀=0.8 bakteri yoğunluğunda inokülasyon yapılmıştır. Kanamisin ile sürgün ve kök seleksiyon ortamında, 100 embriyodan 21 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 OD₆₀₀=0.8 bakteri yoğunluğunda inoküle edilen embriyolar a. sürgün seleksiyon ortamında elde edilen sürgünler, b. sürgün seleksiyon ortamında elde edilen sürgünlerin, kök seleksiyon ortamında köklendirilmeleri

Elde edilen bitkilerden histokimyasal GUS analizi sonucunda, 11 bitkinin dokularında mavi renk izlenmiştir. GUS histokimyasal analizinde pozitif sonuç veren 7 adet bitkinin, 35s promotor primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiş olup, 3 adet bitkide 35s bölgesinin varlığı teyid edilmiştir (Şekil 4.28. a,b).



Şekil 4.28.a.OD₆₀₀=0.8 ile inoküle edilen embriyoların 35s primerleri ile yapılmış PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, bitki örnekleri, PC: pozitif kontrol ve NTC: negatif kontrol b. *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen OD₆₀₀=0.8 transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucu

Üçüncü denemede p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* GV2260 bakteri hattıyla Gökçe çeşidinin embriyo eksplantında OD600=1.5 bakteri yoğunluğunda inokülasyon yapılmıştır. Sürgün ve kök seleksiyon ortamlarında, 100 embriyodan hiçbir bitki elde edilememiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 OD600=1.5 bakteri yoğunluğunda inoküle edilen embriyolar

a. Kokültivasyon ortamındaki embriyolar, b. seleksiyon ortamındaki embriyolar

Elde edilen sonuçlara göre, en iyi bakteri süspansiyon yoğunluk oranı OD₆₀₀=0.5 ve en iyi transformasyon muamelesi 25 - 30 dk, 100 mM asetosiringon ve 10 mM MES eşliğinde kayıt edilmiştir.

Daha sonra Gökçe çeşidinde, plumula, embriyonik eksen, tek kotiledon içeren embriyo ve çift kotiledon içeren embriyo eksplantlarında GV2260 p35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattıyla yukarıda belirtilen protokole tabi tutularak inokülasyonları yapılmıştır. Elde edilen aday transgenik bitkilerin, öncelikle GUS histokimyasal analizi yapılmıştır. GUS analiz sonucu pozitif olan bitkiler, ilaveten 35s primerleri kullanılarak PCR ile teyid edilmiştir. Özet olarak transgenik aday bitkilerine ait sonuçlar, seleksiyon ortamından elde edilen bitkiler (adet), GUS histokimyasal analizinden alınan pozitif sonuç (adet), PCR analiz sonucunda 35s primer ile elde edilen pozitif bitki sayısı (adet) olmak üzere Çizelge 4.39’da verilmiştir.

Çizelge 4.39 Gökçe çeşidinde T₀ GUS transgenik bitkilerin analiz sonuçları

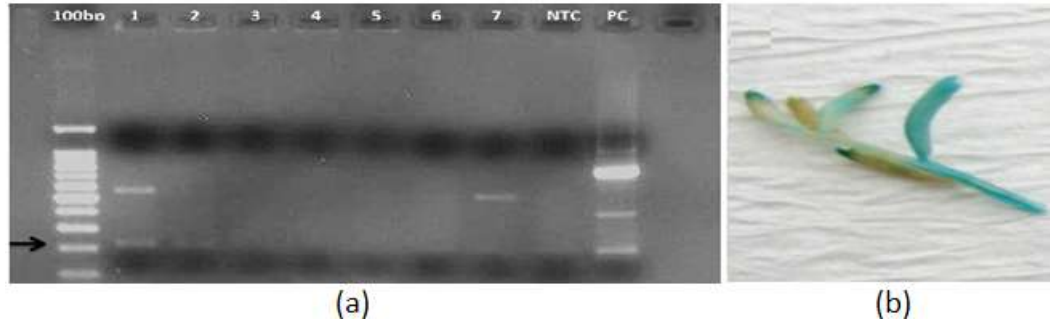
Eksplant	Aday transgenik bitki sayısı (adet)	GUS histokimyasal analizinden alınan pozitif sonuç (adet)	PCR analizi sonucunda 35s primeri ile elde edilen pozitif bitki sayısı (adet)
Embriyonik eksen	15	7	2
Plumula	8	0	0
Tek çenekli embriyo	19	12	5
Çift çenekli embriyo	30	5	1

Çizelge 4.39’da görüldüğü gibi birinci denemede p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* bakteri hattı aracılığıyla Gökçe çeşidinin 100 adet embriyonik eksen eksplantının inokülasyonu yapılmıştır. Kanamisin içeren sürgün ve kök seleksiyon ortamında 15 bitki elde edilmiştir (Şekil 4.30).



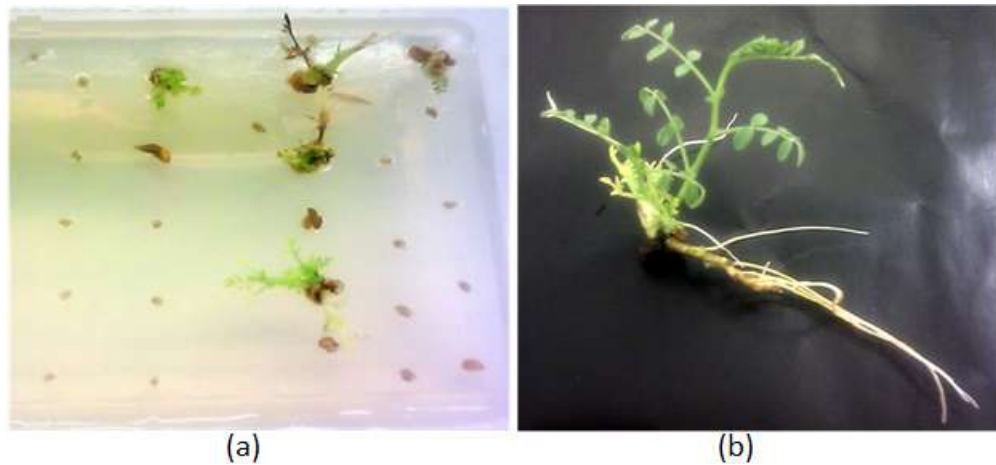
Şekil 4.30 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen embriyonik eksen eksplantından aday transgenik bitkiler

Seleksiyon ortamlarından elde edilen bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucunda, 7 bitkinin dokularında mavi renk izlenmiştir. Elde edilen 7 adet histokimyasal GUS pozitif sürgünlerinin, 35s promotor primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. PCR analizi sonucunda, 2 adet bitkide 35s promotor bölgesinin varlığı teyid edilmiştir (Şekil 4.31.a,b)



Şekil 4.31.a. 35s primerleri ile yapılan PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 bitki örnekleri, NTC: negatif kontrol ve PC: pozitif kontrol b. embriyonik eksen *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen aday transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucu

İkinci denemede gökçe çeşidinin 100 adet plumula eksplantı, p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* bakteri hattıyla inoküle edilmiştir. Kanamisin içeren seleksiyon ortamlarında 8 bitki elde edilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32 *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen plumula eksplantından aday transgenik bitkiler

a. sürgün seleksiyon ortamında elde edilen sürgünler b. elde edilen sürgünlerin seleksiyon ortamında köklendirilmesi

Seleksiyon ortamlarından elde edilen bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucunda herhangi bir sonuç elde edilmemiştir.

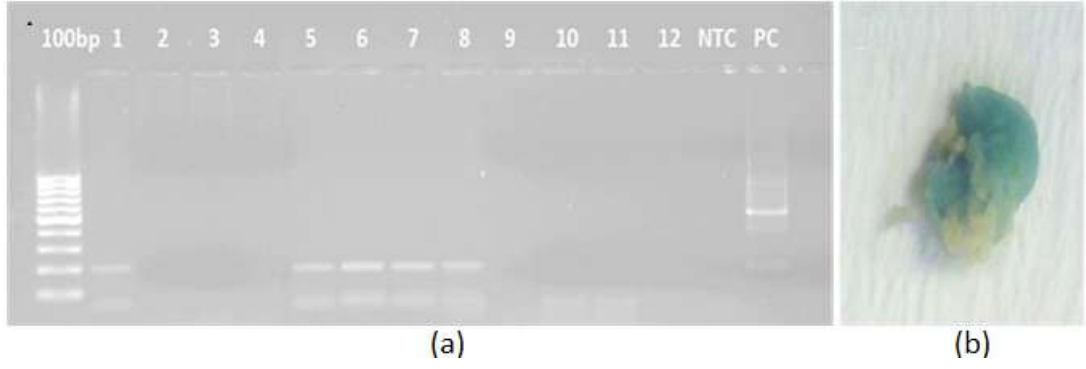
Üçüncü denemede p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* bakteri hattı aracılığıyla Gökçe çeşidinin tek çenekli embriyo kotiledon eksplantında inokülasyonu yapılmıştır. Kanamisin içeren sürgün ve kök seleksiyon ortamında, 100 eksplantından 19 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 Tek kotiledon embriyo eksplantından *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen aday transgenik bitkiler

a. seleksiyon ortamından elde edilen sürgünler b. yaşayan sürgünlerin seleksiyon ortamında köklendirilmesi

Elde edilen bitkilerden histokimyasal GUS analizi sonucunda, 12 adet bitkinin dokularında mavi renk izlenmiştir. Embriyonik eksen eksplantından elde edilen 12 adet histokimyasal GUS pozitif aday sürgünlerin, 35s promotor primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. PCR analizi sonucunda, 5 adet bitkide 35s bölgesinin varlığı teyid edilmiştir (Şekil 4.34.a,b).



Şekil 4.34.a. 35s primerleri ile yapılmış PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 bitki örnekleri, NTC: negatif kontrol ve PC: pozitif kontrol b. tek çenekli embriyo kotiledon eksplantında *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile inokülasyon sonucunda elde edilen aday transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucu b. GUS histokimyasal pozitif bitki dokusu

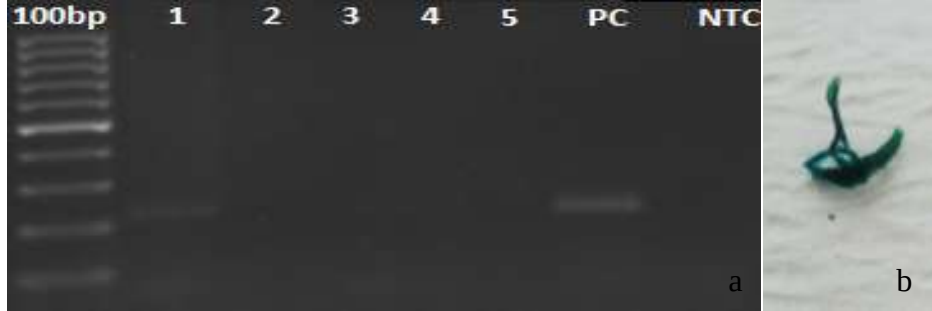
Dördüncü denemede p35S GUS-INT plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* bakteri hattı aracılığıyla Gökçe çeşidinin çift çenekli embriyo kotiledon eksplantında inokülasyon yapılmıştır. Kanamisin içeren sürgün ve kök seleksiyon ortamında, 100 adet eksplantndan 30 adet bitki elde edilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Çift kotiledon embriyo eksplantından *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen aday transgenik bitkiler

Seleksiyon ortamında elde edilen bitkilerin histokimyasal GUS analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, 5 bitkinin dokularında mavi renk izlenmiştir. Daha sonra elde edilen 5 adet histokimyasal GUS pozitif sürgünlerinin, 35s promotor primerleri kullanılarak

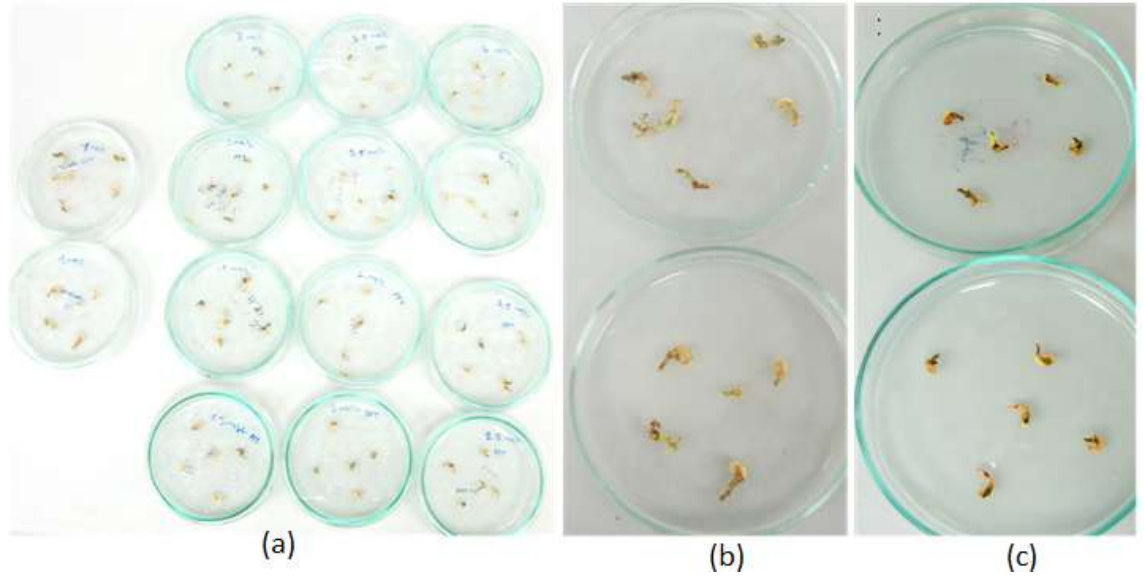
PCR işlemleri gerçekleştirilmiş ve 1 adet bitkide 35s bölgesinin varlığı teyid edilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36.a. 35s primerleri ile yapılan PCR sonucu, 1, 2, 3, 4, 5, bitki örnekleri, PC: pozitif kontrol NTC: negatif kontrol ve b. çift çenekli embriyo kotiledon eksplantında *A. tumefaciens* GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile inokülasyon sonucunda elde edilen aday transgenik bitkilerin histokimyasal GUS analizi sonucu B: GUS histokimyasal pozitif bitki dokusu

4.5.2 *A. tumefaciens*'in LBA 4404 pEARLYGATE miR408 ve LBA 4404 pEARLYGATE 101 bakteri hatları ile gen aktarımı

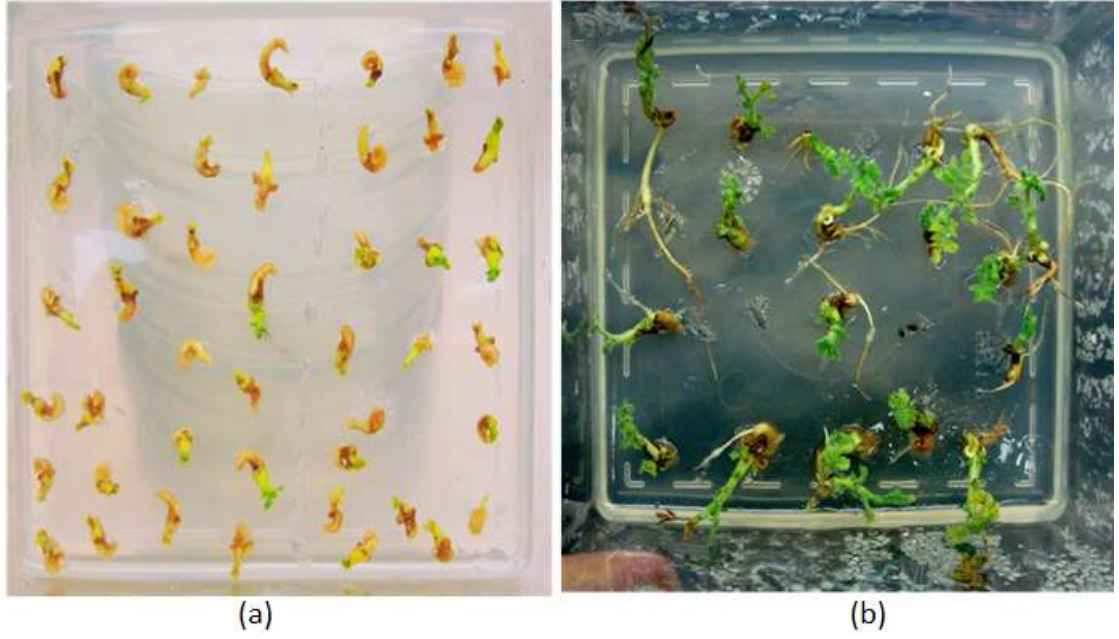
Transformasyon ve bitki seleksiyonu çalışmalarında öncelikle bar geni içerdiklerinden dolayı plazmidlerin, PPT dozu oranının optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında, en uygun PPT dozunu belirlemek için transgenik olmayan embriyo eksplantları, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5.0 mg/l içeren MS besin ortamında her tekerrürde 5'er eksplant olmak üzere toplam 3 tekerrürde 15 adet eksplant kullanılarak kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra elde edilen sonuçlara göre 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5.0 mg/l dozlarda hiçbir embriyo canlı kalmamıştır (Şekil 37a). Ancak 1.0, 1.5 mg/l ppt içeren MS besin ortamında embriyoların 2 gün yaşadıktan sonra öldükleri izlenmiştir. Diğer dozlarda, embriyolarda herhangi bir gelişim söz konusu olamamıştır. Böylece çalışmaların devamında 2.5 mg/l, en uygun doz olarak tanımlanıp sonraki denemelerde aday transgenik bitkilerin seçiminde kullanılmıştır (Şekil 4.37c). Ayrıca elde edilen sonuçlara göre PPT, nohut bitkisinde en güçlü ve en uygun seleksiyon antibiyotiği olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.37 Embriyo eksplantlarının farklı dozlarda PPT içeren MS ortamında optimizasyonu

a. 9 farklı PPT dozunda kültüre alınan bir haftalık embriyolar b. 1 mg/l PPT içeren MS ortamında kültüre alınan bir haftalık embriyolar c. 2.5 mg/l PPT içeren MS ortamında kültüre alınan bir haftalık embriyolar

A. tumefaciens’in LBA 4404 pEARLYGATE miR408 ve *A. tumefaciens*’in LBA 4404 pEARLYGATE 101 hattı ile (kontrol) gen aktarım çalışmalarının gerçekleşmesinde optimizasyon çalışmalarının sonucunda belirtilen protokol kullanılmıştır. Bu hususta gökçe çeşidinin yaralanmış embriyo eksplantı kullanılmıştır. Eksplantlar, 100 mm asetosiringon ve 10 mm MES bakteri yoğunluğu $OD_{600} = 0.5$ içeren sıvı MS ortamında 25 dk inokülasyondan sonra 48 saat kokültivasyon ortamında bekletilmiştir. Daha sonra eksplantlar, 2.5 mg/l fosfinotrisin ile 500 mg/l Duocid içeren MS sürgün seleksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra, fosfinotrisin içeren ortamlarda yaşayan ve sürgün oluşturan transgenik adayı sürgünler (şekil 4.38.a), 6 mg/l GA_3 ve 0.3 mg/l IBA, 2.5 mg/l fosfinotrisin ve 500 mg/l Duocid içeren MS ortamında köklendirme amacıyla kültüre alınmıştır. Altı hafta sonra transgenik adayı sürgünlerde, köklenme görülmüştür (Şekil 4.38.b). Daha sonra, köklenen transgenik adayı bitkiler, daha önce dış koşullara adaptasyon çalışmalarında anlatıldığı gibi torf içeren saksılara aktarılmıştır. Bitkiler, 10 gün boyunca sera koşullarına alıştırılmıştır. Adaptasyonu sağlanan aday transgenik bitkilerden, sonraki PCR analizleri için yaprak örnekleri alınmış ve $-80^{\circ}C$ ’de stoklanmıştır.

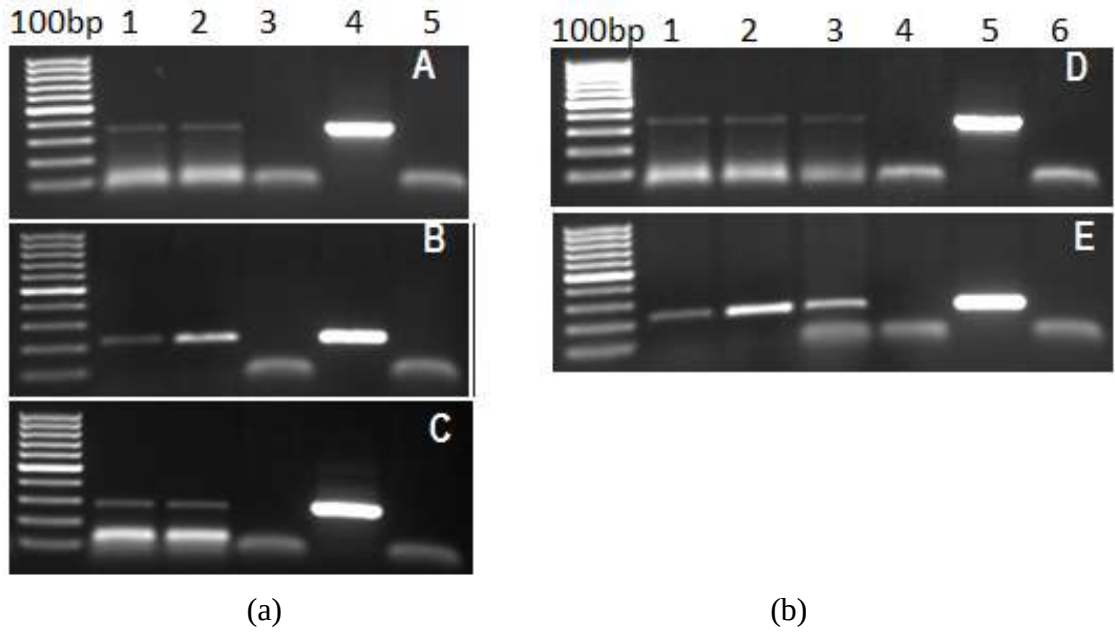


Şekil 4.38 Transgenik miR408 ve kontrol bitkilerin elde edilmesi

a. *A. tumefaciens* LBA 4404 pEARLYGATE miR408 hattı ile seleksiyon ortamında elde edilen sürgünler
b. elde edilen sürgünlerin kök seleksiyon ortamında köklendirilmeleri ve aday transgenik bitkilerin elde edilmesi

4.5.3 Aday transgenik bitkilerin pcr analizi

Transgenik bitkilerin seçiminde, öncelikle nohut bitkisinin genomik DNA'sı ve Ath pre-miR408 primerleri eşliğinde yapılan PCR analizi sonucunda, herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Sonuç olarak Arabidopsis ve nohut bitkisinde pre-miR408 dizilerinin farklı olduğu ve nohutta aynı dizinin mevcut olmadığı düşünülmüştür. Bu nedenle, miR408 transgenik bitkilerin belirtilmesinde aynı primerler kullanılmıştır. Böylece miR408 aday bitkilerde 35s promotor, Bar, Ath pre-miR408 primerleri ve kontrol aday bitkilerde ise 35s promotor ve Bar primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. miR408 transgenik bitkilerinde kullanılan her 3 primerde ve kontrol bitkilerde kullanılan her iki primerde, istenilen bölgelerin varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, plazmidlerin taşıdığı gen dizileri ile taratılan transgenik bitkilerdeki diziler arasında homoloji görülmüştür (Şekil 4.39). Sonuç olarak elde edilen miR408 transgenik T₀ bitkilerinde, transformasyon frekansı % 0.012 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.39 Transgenik miR408 bitkilerin PCR analiz sonuçları

a. transgenik miR408 bitkilerinde bar geninin doğrulanması- sırasıyla 1: 1.bitki, 2: 2.bitki, 3: negatif kontrol (bitki), 4: pozitif kontrol (plazmid), 5: negatif kontrol b. transgenik miR408 bitkilerinde 35s promotor bölgesinin doğrulanması-sırasıyla 1: 1.bitki, 2: 2.bitki, 3: negatif kontrol (bitki), 4: pozitif kontrol (plazmid), 5: negatif kontrol. c. transgenik miR408 bitkilerinde pre-miR408 geninin doğrulanması- sırasıyla 1: 1.bitki, 2: 2.bitki, 3: negatif kontrol (bitki), 4: pozitif kontrol (plazmid), 5: negatif kontrol. d. kontrol bitkilerinde bar geninin doğrulanması- sırasıyla 1: 1.bitki, 2: 2.bitki, 3: negatif kontrol (bitki), 4: pozitif kontrol (plazmid), 5: negatif kontrol. e. kontrol bitkilerinde 35s promotor bölgesinin doğrulanması sırasıyla 1: 1.bitki, 2: 2.bitki, 3: negatif kontrol (bitki), 4: pozitif kontrol (plazmid), 5: negatif kontrol.

4.5.4 Transgenik bitkilerin kuraklık stresine karşı verdiği tepkiler

Transgenik miR408 bitkilerinin, kuraklık stresi altında büyüme, gelişme, üreme ve genetik potansiyel ifadesinin, olumlu veya olumsuz etkileşimlerini anlayabilmek ve bitkilerin strese karşı verdikleri yanıtı tanımlamak amacıyla transgenik ve kontrol bitkileri kuraklık stresine tabi tutulmuştur. Dış koşullara adaptasyondan 10 gün sonra bitkiler bol miktarda sulandıktan sonra tamamen kurak koşullara bırakılarak büyüme ve gelişmeleri izlenmiştir. Kuraklık testleri, miR408 transgenik ve kontrol bitkilerinde aynı koşullar altında ve aynı zamanda başlatılmıştır. Kuraklık stresi esnasında, bitkilerin farklı yaşam döngüleri ve davranışları farklı zamanlarda kaydedilmiştir. Kuraklık stresi, kontrol bitkilerinde solma ve kloroz semptomu belirgin bir şekilde izlenene kadar devam edilmiştir. Kuraklık stresinden 17 gün sonra, kontrol bitkilerinin solmasıyla birlikte fenotipik değişimler kaydedilmiş ve fotoğraf çekimleri yapılmıştır (Şekil 4.40).



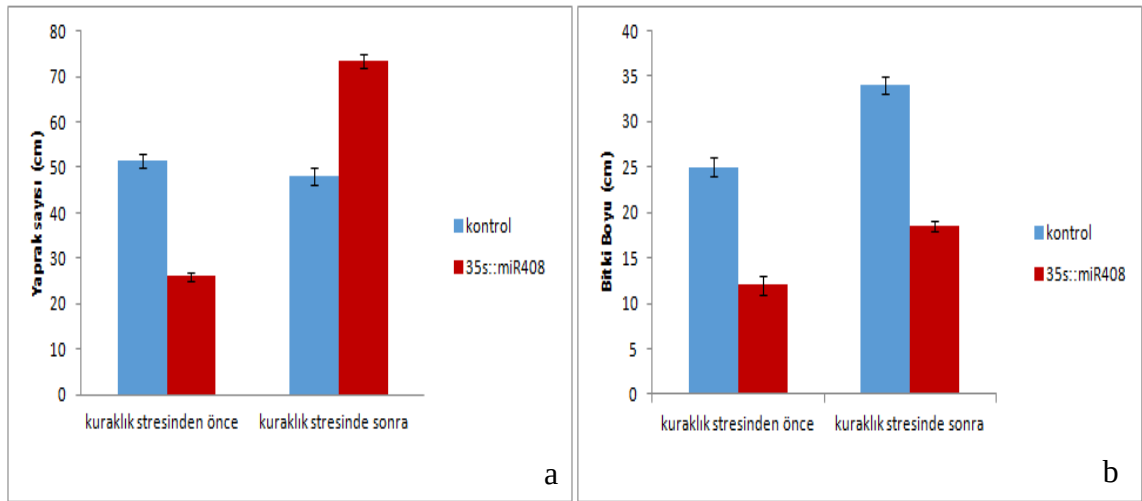
Şekil 4.40 Transgenik ve kontrol miR408 bitkilerinin kuraklık testleri

- a. transgenik miR408, kontrol ve mock bitkileri- kuraklık stresinden önce
- b. transgenik miR408 ve kontrol bitkileri- kuraklık stresinden 8 gün sonra
- c. transgenik miR408 ve kontrol bitkileri kuraklık stresinden 17 gün sonra ve normal koşullarda büyüyen mock bitkisi

Sonuç olarak, kuraklık stresinden 8 gün sonra kontrol bitkilerin alt yapraklarında, kloroz, solma ve kuruma başlamıştır. 17 gün muameleden sonra, kloroz, solma tüm

kontrol bitkilerde belirgin şekilde izlenmiştir. Ancak transgenik miR408 bitkilerinin, strese karşı yüksek tolerans gösterdiği izlenmiştir.

Ayrıca, istatistik analizlerin sonucunda miR408 transgenik bitkilerinde, bitki uzunluğunda belirgin bir şekilde kısalma izlenmiştir. Ancak bitkilerin kısa boylu kalmasına, kuraklık neden olmamıştır çünkü kuraklık stresinden önce de kontrol bitkilerine göre boyları kısa kalmıştır. Ayrıca kuraklığa maruz kalan transgenik miR408 bitkilerinde kontrol bitkilerine göre, yaprak sayısı artmıştır (Şekil 4.41 AB). Transgenik bitkiler, kuraklığa karşı direnç gösterdiklerinden dolayı bu bitkilerin yapraklarında herhangi solma ve dökülme görülmemiştir. Bununla birlikte yeni yaprakların gelişmesi sonucunda yaprak sayılarında artış tespit edilmiştir.

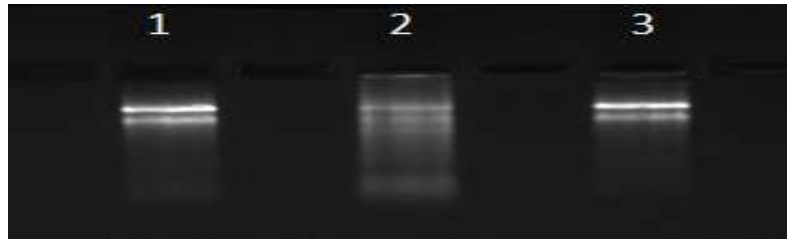


Şekil 4.41 Transgenik ve kontrol bitkilerinde 17 gün kuraklık stresinden sonra yapılan istatistik verilerin analizi a. yaprak sayısı b. bitki boyu

4.5.5 Transgenik miR408 ve kontrol bitkilerinin qPCR analizleri

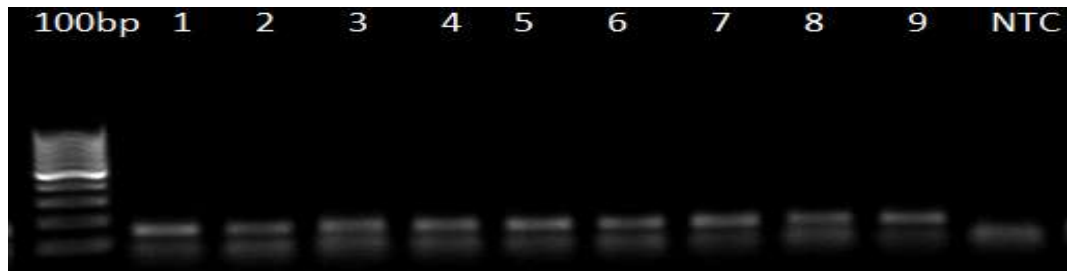
Transgenik bitkilerin transkriptom düzeyinde analizi sonucunda, Bar ve miR408'in hedefi olan *plantacyanin* geninin ifade seviyeleri belirlenmiştir. Bu hususta transgenik olmayan bitki, kuraklık stresi ile muamele edilen kontrol (35s::bar) ve kuraklık stresine

tabi tutulan transgenik miR408 (35s::bar+miR408) bitkilerinden birer tane seçilmiştir. Öncelikle her üç bitkiden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar, Nanodrop 2000c cihazında örneklerin kalitatif ve kantitatif ölçümleri yapıldıktan sonra % 2'lik jelde (1:1 oranında 2'şer μ L numune ve yükleme boyası yüklenerek) yürütülmüştür. Daha sonra Bar ve *plantacyanin* genlerinin ifade seviyelerini ölçebilmek için bitkilerin total RNA örneklerinin temizleme ve saflaştırma işlemi yapılmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.42 Temizlenmiş RNA'lara ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. 1: 35s::miR408, 2: kuraklık stresi ile muamele edilen 35s::bar (kontrol), 3: transgenik olmayan ve kuraklık stresine tabi tutulmayan (mock) bitkisi

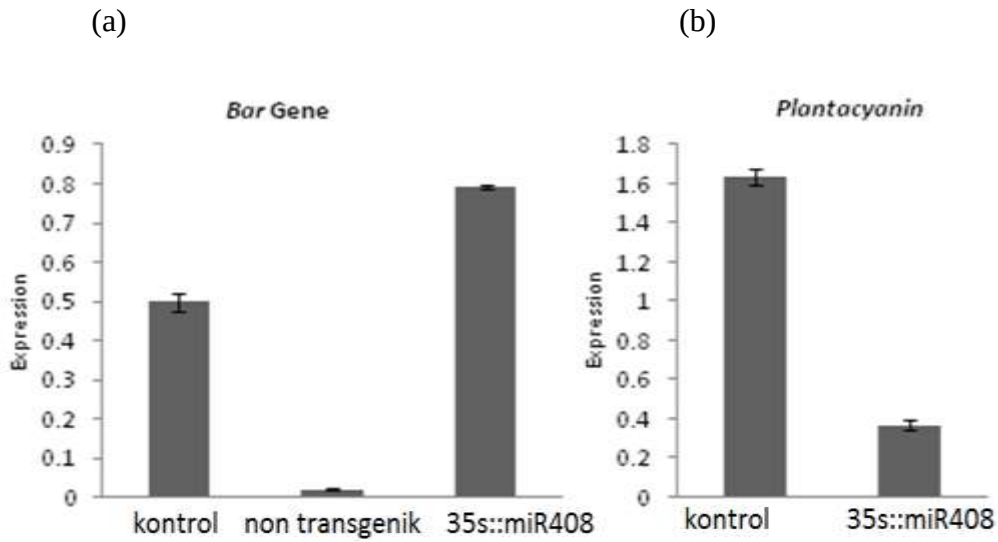
Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmıştır. Nanodrop 2000c cihazında saflık ve konsantrasyon tayinleri yapıldıktan sonra cDNA sentezinin de gerçekleşmesi doğrultusunda 18s optimizasyonu yapılmıştır. 18s optimizasyonunda, 3 kütüphane arasındaki cDNA miktarlarını eşleştirmek için cDNA'ların 1/5, 1/10 ve 1/20 oranlarında seyreltmeleri kullanılmıştır (Şekil 4.43).



Şekil 4.43 18s optimizasyonunun % 1'lik agaroz jelde görünümü 1, 2, 3 : 35s::miR408 1/5, 1/10, 1/20 seyreltmeleri, 4, 5, 6: kuraklık stresi ile muamele edilen 35s::bar (kontrol) 1/5, 1/10 ve 1/20 seyreltmeleri, 7, 8, 9: transgenik olmayan ve kuraklık stresine tabi tutulmayan (mock) bitkisi 1/5, 1/10 ve 1/20 seyreltmeleri NTC: negatif kontrol

Elde edilen sonuçlara göre ve Şekil 4.43’de görüldüğü gibi analizlerin devamı için kütüphanenin 1/10 seyreltmesi uygun görülmüştür.

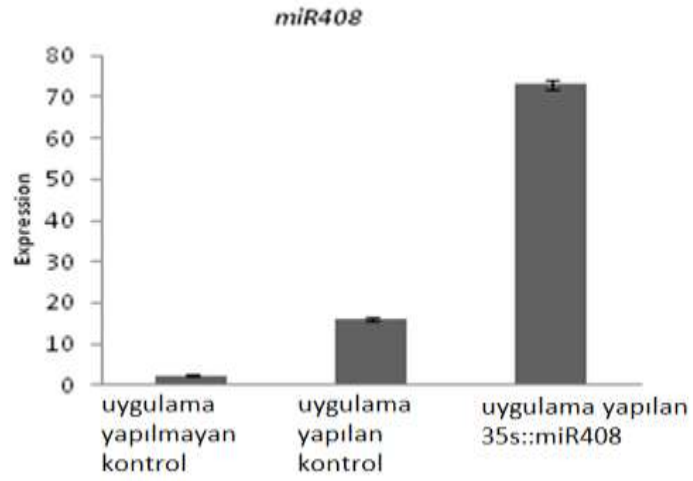
Bar geninin qRT-PCR analizlerinde, transgenik miR408, kontrol ve transgenik olmayan bitki örneklerinde *plantacyanin* geninin ifade seviyesinin ölçülmesinde, transgenik miR408 ve kontrol bitkilerinin cDNA’ları eşit yoğunlukta reaksiyona başlatılmıştır. 18S rRNA geni internal kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre, *bar* geninin transgenik miR408 (35s::miR408) ve kontrol bitkilerinde (35s::bar) ifade edildiği görülmüştür. Ancak transgenik olmayan bitkide herhangi bir ifadesi söz konusu olmamıştır. Böylece transgenik bitkilerde, *bar* geninin ifade olduğu teyid edilmiştir (Şekil 4.44.a). Elde edilen analiz sonuçlarına göre, *plantacyanin* geninin transgenik miR408 bitkisinde (35s::miR408) kontrol bitkisine (35s::bar) göre daha az ifade edildiği tespit edilmiştir. Böylece transgenik miR408 bitkisinde, miR408’in aşırı ifade edilmesi sonucunda hedefi olan *plantacyanin*’in transkriptlerini elimine ederek ifade seviyesinde azalma meydana getirdiği düşünülmüştür (Şekil 4.44.b).



Şekil 4.44.a,b qRT analizi sonuçları a: *bar* ve b: *plantacyanin* genlerinin ifade seviyeleri

Transgenik miR408, kuraklığa tabi tutulan ve tutulmayan kontrol bitkilerinde, miR408’in ifade seviyesini belirlemek için total RNA’lardan qRT PCR analizleri

yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre, kuraklığa tabi tutulan kontrol bitkisinde, kuraklığa tabi tutulmayan kontrol bitkisine göre miR408'in ifade seviyesinin arttığı izlenmiştir. Böylece kuraklık stresinin, nohut bitkisinde miR408'in ifade seviyesinin artmasına neden olduğu düşünülmüştür. Diğer taraftan transgenik miR408'in ifade seviyesinin her iki kontrolden daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 qRT analizi sonucunda elde edilen miR408'in ifade seviyesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nohut yetiştiriciliğinde tarımı yapılan diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi yüksek verim ve kaliteye sahip ürün yetiştirmek esas amaçtır. Bitkilerde, ürünün kalitatif ve kantitatif belirlenmesinde, genetik materyal ve çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. Bundan dolayı son yıllarda yapılan seleksiyon çalışmalarında, genetik faktörlerin etkisinin belirlenmesi önem kazanmıştır. Nohut ekim alanı ve üretiminin azalmasının yanı sıra verim kaybının da olduğu bilinmektedir. Bitkinin büyüme ve gelişmesi sırasında, biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmasından dolayı önemli derecede verim kaybı ortaya çıkmaktadır. Dünya tarımında, çevresel stres faktörleri arasında kuraklık, hastalıktan sonra nohut verimini çeşide bağlı olarak etkileyen ikinci büyük etkendir (Farshadfar vd. 2008, Khodadadi vd. 2013). Kuraklık stresinden dolayı nohut bitkisinde, % 50 oranında verim kaybının görüldüğü bilinmektedir (Croser vd. 2003; Singh vd. 1994). Kuraklık stresine karşı dayanıklılık mekanizmalarının tanımlanması ve yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesi, kurak bölgelerde ürün artışı sağlamak için önemlidir (Fischer ve Maurer 1978).

Kuraklık stresine maruz kalan nohut bitkisi ile ilgili çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu sebeple, bu tez çalışmasında, kuraklık stresine karşı dayanıklı nohut çeşidinin üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. Ayrıca kuraklığa dayanıklı bitki elde edilmesinin, Dünya ve Türkiye ekonomisi için çok büyük bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada, öncelikle nohut bitkisinin değişik eksplantları kullanılarak *in vitro* şartlarda rejenerasyon sistemi optimize edilmiş olup, bitkinin hızlı bir şekilde çoğaltımı sağlanmış ve daha sonra buradan yola çıkarak kuraklık stresine karşı toleranslı bitki elde etmesinde pEARLYGATE408 plasmidini taşıyan *A. tumefaciens* hattı ile gen aktarım çalışmaları yapılmıştır.

5.1 Streilizasyon Çalışmaları

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan tohumların, bakteri, mantar vb. organizmalardan arındırılması için yüzey sterilizasyonu çalışmaları gerekmektedir. Sterilizasyon çalışmalarında, en düşük ve en etkili dezenfektan konsantrasyonunun

belirlenmesi oldukça önemlidir (Bhatti 2001). Ayrıca Yüzey sterilizasyon çalışmalarında hidrojen peroksit, gümüş nitrat, civa, ve diğer kimyasallar arasından sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu), en yaygın olarak kullanılmaktadır (Öztürk 2002). Ancak, yapılan çeşitli doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon amaçlı kullanılan NaOCl, çimlenmeyi doğrudan etkilediği ve engellediğini belirtilmiştir (Sağlam 2005). Bu nedenle, yüzey sterilizasyonu çalışma kapsamında ilk önce en uygun dezenfektan dozu ve uygulama süresi belirlenmeye çalışılmıştır.

sterilizasyon çalışma kapsamında en uygun dezenfektan konsantrasyonunun belirlenmesinde Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin çeşitlerinin tohumları yüzey sterilizasyonu, %75, %60, %45, %30, %15'lik ticari çamaşır suyununda 20 dk, oda sıcaklığında uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda çamaşır suyu muameleler arasında bulaşksız ve en fazla tohum çimlenmesi %30'lük çamaşır suyunda 20 dakika sürede elde edilmiştir. Kullanılan çamaşır suyunun düşük dozları tohumların sterilizasyonu için yeterli olmadığı ve yüksek dozlarda ise eksplantlara zarar verdikleri izlenmiştir. Dolayısıyla, çalışma boyunca %30 çamaşır suyu tohum sterilizasyonu için tercih edilmiştir.

5.2 Nohut Bitkisinde Yürütölen Bitki Rejenerasyon Çalışmaları

Nohut bitkisinde, sınırlı sayıda doku kültürü çalışmaları rapor edilmektedir. Rapor edilmiş çalışmalar ise tekrarlanabilirliği düşük olduğundan verimli sonuçlar elde edilememektedir. Nohut bitkisinde bulunan fenolik bileşiklerden dolayı in vitro ortamda bitki rejenerasyonu çalışmaları oldukça güçtür (Bajaj ve Gosal 1987, Barna ve Wakhlu 1994, Chauhan vd. 2003).

Fenolik bileşiklerin salgılanması sonucunda, gelişen hücreler zarar görerek, nekroz oluşumuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bundan dolayı, nohut bitkisinde doku kültürü ile rejenerasyona uğramış sürgünlerin kök rejenerasyonunun zor olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde daha önce tulipa bitkisinde yapılmış bir çalışmada, tulipa bitkisinin rejenerasyon yeteneğinde, oksidatif strese dolaylı azalma görölmüştür.

(Rossum ve PLas 1997).Oksidatif stresi, serbest radikallerin üretilmesine yol açmakta olup, hücrelerde nekroz oluşumuna sebep olmaktadır.

Bu durumda, birçok araştırmacı tarafından, oksidatif stresin olumsuz etkilerini ortadan kadirabilmek için farklı hormon ve kimyasalların kullanılması önerilmektedir (Taeb ve Alderson 1990).

Bu tez kapsamında, GA₃'ün, nohut bitki rejenerasyonu ve hücre çoğaltımında önemli rol oynadığı görülmüştür. Çalışmanın onuçları, Bostrack ve Struckmeyer (1967)'nin araştırma sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar, çalışmalarında *Antirrhinum maju* bitkisinde apikal meristem eksplantında 50 mg/l GA₃ muamelesi ile yüksek oranda hücrelerin çoğaltımı ile internode aralıklarında uzama görmüşlerdir.

Bitki rejenerasyon çalışmaları, Gökçe, Yaşa, Er99 ve Akçin nohut çeşitlerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında 25 mg/l BAP, 25 mg/l GA₃ ve 25 mg/l BAP+ GA₃ olmak üzere 3 farklı ön muamele sonucunda pulumula, embriyonik eksen ve radikula eksplantları ve daha sonra farklı BAP -NAA içeren sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. En fazla sürgün oluşumu ve eksplant başına düşen sürgün sayısı, BAP ön muamelesi ile elde edilmiştir. Sonuçlar, Aasim (2012)'ın bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde, tek başına oksin kullanımında herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Ancak, GA₃ + IBA'nın, kök oluşumunda pozitif etkiler bıraktığı görülmüştür. Benzer şekilde, Thakare vd. (2011) GA₃'ü, sürgün oluşumunda ve kök uzunluğunda üstünlük gösteren bir hormon olarak tespit etmiştir. Araştırmacı bunun sebebini GA₃ muamelesinin, nispeten nükleik asitin fazla üretilmesinde ve tohum çimlenmesinde sürgün ve kök uzunluğunun hızını arttırmasında yararlı bir hormon olarak bildirmiştir.

Ayrıca, BAP+GA₃ etkileri hakkında bir literatür çalışması bulunmamaktadır.

Nohut bitkisinde kök rejenerasyonu çalışmalarında, bitkiden salgılanan fenolik bileşiklerin etkisinden dolayı sürgünlerin kök rejenerasyonlarında oldukça yüksek oranda kararırma gözlenmiştir. Kararmanın, NAA içeren ortamlarda kök rejenerasyonunun kabiliyetini aşırı derecede azalttığı görülmüştür. Fakat farklı eksplantların kullanımı, kök rejenerasyonuna olumsuz etkisini değiştirmemiştir. Ancak GA₃ içeren ortamlarda eksplantların kök rejenerasyon kabiliyetinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

5.3 Gen Aktarım Çalışmaları

Tez kapsamında yapılan *Agrobacterium* aracılı gen aktarım çalışmalarının optimizasyonunda transformasyon üzerine etkiden bazı parametreler ve farklı eksplantlar denenmiştir. Bunlardan bakterinin optik yoğunluğu, inokülasyon ve kokültivasyon ortamına eklenen maddeler çeşitli embriyo, embriyonik eksen, plumula, tek çenekli embriyo ve çift çenekli embriyo eksplantları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre düşük bakteri yoğunluğu embriyo eksplantların yaralanması ve bazı kimyasalların eklenmesi sonucunda, hem GUS ifadesini ve hem transformasyon etkinliğinin arttırdığına sebep olmuştur. Önceki çalışmalarda Yaralama fenolik bileşiklerinin üretilmesini ve ayrıca bakterilerin hücre duvarına tutulmasını dolaylısı gen girişinin arttırdığını ve yaralamadan sonra asetosiringon eklenmesiyle GUS gen ifadesinde artışlar izlediklerini rapor etmişlerdi (Santarem vd. 1998).

5.4 Transgenik mir408 Bitkilerinde Kuraklık Stresine Karşı Tolerans

Kuraklık stresine karşı gelişmiş bitkiler çok karmaşık ve programlanmış mekanizmaya sahip oldukları ve bunların arasından gen ifadelerini transkript sonrası değişimleri ile birlikte hücre yapılarının ve metabolizmalarını stresden kaynaklanan zararlardan koruma altına alabilmektedirler (Zhu 2002). Böylece birçok genin ifade seviyesi, birbirleri ile bağlantılı olarak kompleks bir ağ içerisinde stresden etkilenip değişim göstermektedir (Seki vd. 2002). Gen ifadelerinin değişimi, zamansal ve mekansal olarak transkripsiyon, transkripsiyon sonrası ve translasyon düzeyinde gerçekleşmektedir. Günümüze kadar kuraklık stresi ile ilişkin tanımlanan birçok miRNA'nın, bitkilerde

transkripsiyon sonrası gen ifadesini regüle ettiği bilinmektedir. Günümüze kadar kuraklık stresine karşı miRNA'ların tanımlanması, yüksek verimli dizileme tekniği ile ortaya konulmuştur. Bu teknik sayesinde miRNA'ların, moleküler fonksiyonlarının incelenmesi sonucunda miRNA'lar, düzenleyici ağ sisteminin en önemli üyeleri olarak tanımlanmışlardır (Shalgi vd. 2007, Hobert 2008, Yu vd. 2008, Zhang ve Li 2013). Bu sistemin üyelerinden birisi olan miR408, bilgisayar ortamındaki programlar sonucunda kuraklık stresine karşı yüksek potansiyel taşımaktadır (Kantar vd. 2010, Trindade vd. 2010, Zhou vd. 2010, Eldem vd. 2012). Fakat bu hipotezin doğrulanmasında, günümüze kadar herhangi bir fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. Söz konusu olan miRNA'nın, bugüne kadar yapılan fonksiyonel çalışmalarında ağırlıklı olarak bakır ile ilişki olan genlerde yapılmıştır. Ayrıca miR408 ile kuraklık stresi arasında çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak sadece model organizma olan Arabidopsis bitkisinde incelenmiş (Sunkar vd. 2006, Li vd. 2008, Gou vd. 2011) ve şimdiye kadar herhangi bir kültür bitkisinde rapor edilmemiştir. Bu tez çalışmasında, miR408 geni fonksiyonunun, nohut bitkisinde ve kuraklık stresinde belirlenmesi amaçlanmıştır.

miR408'in ifade seviyesinin, *H. Vulgare*, *M. truncatula* ve Arabidopsis bitkilerinde kuraklık stresi koşullarında arttığı bilinmektedir (Liu vd. 2008, Kantar vd. 2010, Trindade vd. 2010). Ayrıca miR408'in ifade seviyesinin, çeltik bitkisinin kuraklığa dayanıklı genotiplerinde önemli derecede arttığı ve hassas genotiplerde azaldığı rapor edilmiştir (Mutum vd. 2013). Bu çalışmada, kuraklık stresi ile muamele edilen ve edilmeyen kontrol bitkilerinin kıyaslanması sonucunda, miR408'in ifade seviyesinin arttığı izlenmiştir. Diğer sonuçlara göre, transgenik miR408 bitkiler susuzluk koşulları altında normal büyümeye devam ederken, kontrol bitkilerde belirgin kuraklık belirtileri izlenmiştir. Böylece transgenik bitkiler, artan miR408 seviyesinden dolayı kuraklık stresine karşı tolerans gösterebilmişlerdir.

Önceki çalışmalara göre miR408, bakır içeren proteinleri regüle etmekte ve susuzluk stresine karşı bakır ile ilişkili transkriptlerin parçalayıp bakır homeostazisinin koordinasyonunda rol almaktadır (Abdel-Ghany ve Pilon 2008, Trindade vd. 2010). Kuraklık koşulları altında bitkiler, su kayıplarını engelleyebilmek için stomalarını yüksek oranda kapalı tutmakta ve düşük oranlarda su tüketerek hayatta kalma

mücadelesi vermektedirler (Nunes vd. 2008). Bu strateji nedeniyle terlemeden kaynaklı su kayıplarını azaltıp daha uzun süre hayatta kalma şansına sahip olmaktadır. Böylece kuraklık stresi esnasında, ksilemlerden daha az miktarda su taşınır ve terleme inhibe edilir. Fakat bu strateji sonucunda, bakır iyonları dahil olmak üzere mikro ve makro elementlerin de daha az miktarda taşınabilmesi, fotosentez oranının azalması ile sonuçlanır. Bununla birlikte bakır eksikliği, bitki fotosentez oranının azalmasına izin vermemektedir. miR408 başta olmak üzere bakır miRNA'ları, bakır ile ilişkili plantosiyanin gibi transkriptlerin ifade seviyelerini düzenlemektedir (Abdel-Ghany ve Pilon 2008, Trindade vd. 2010). Böylece az miktardaki bakır mineralinin, plantosiyanin tarafından kullanılmasına izin verir (Abdel-Ghany ve Pilon 2008, Yamasaki vd. 2009, Trindade vd. 2010). Sonuç olarak nohut bitkisi başta olmak üzere birçok bitkide korunmuş olan plantasiyanin geninin transkriptleri, miR408'in artışı ile azalmakta olup, (Sunkar ve Zhu 2004, Abdel-Ghany ve Pilon 2008) elde edilen transgenik miR408 ve kontrol bitkilerin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak aşağıdaki öneriler uygun görülmüştür;

1. Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon çimlenmeyi doğrudan etkilemekte ve oldukça önemli olmaktadır. Ticari çamaşır suyu (<%5 NaOCl) sterilizasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kullanılan her 4 çeşide 20 dk, % 30 çamaşır suyu ile sterilizasyon sağlanmıştır.
2. Tez kapsamında kullanılan eksplantlardan plumula ve embriyonik eksen eksplantları ilk önce 25 mg/l BAP ile ön muamelesi ve daha sonra farklı oranlarda BAP artı NAA son muamele sonucunda yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Böylece kullanılan eksplantlar arasında en iyi eksplantın plumula ve embriyonik eksen olduğu belirlenmiştir. plumula eksplantından en fazla 10.83 adet ve Embriyonik eksen eksplantından 16 adet sürgün 25 mg/l BAP ön muamelesinde ve daha sonra 0.5 mg/l BAP artı 0.07 mg/l NAA içeren besin ortamından ve Akçın çeşidinde elde edilmiştir.

3. Sürgünlerin köklendirme çalışmalarında, sürgünlerin kesildiği yerden salgılanan fenolik bileşiklerin etkisinden dolayı kararma gözlenmiş ve dolayısıyla köklendirmeleri zor olmuştur. Fakat fenolik bileşiklerin oluşumunu engellemek amacıyla GA3 ve IBA kullanılmıştır. Nekrozitten dolayı Kararmanın engelleyebilme ve böylece kök rejenerasyon kabiliyetini arttırdığı izlenmiştir. Nohut bitkisinin dış koşullarında adaptasyonu için törfün en iyi substrat olduğu tespit edilmiştir.
4. Nohut bitkisinin *Agrobacterium* ile transformasyonun optimizasyon çalışmalarında yaralanmış embriyo eksplantında ve $OD_{600} = 0.5$ bakteri yoğunluğunda başarılı bir transformasyon gerçekleştirilmiştir.
5. Kontrol bitkiler kıyaslama sonucunda transgenik miR408 nohut bitkisinde Kuraklık stresine karşı dirençlik göstermiştir.
6. Bu çalışmanın devamında kesin bir yargıya varabilmek için, elde edilmiş bitkileri yeniden ekilerek çoğaltılması istenilen genlerin aktarılması ile Mendel açılımının olup olmadığının da aynı zamanda belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçlarla çalışmaya devam edilmesi daha kapsamlı ve kararlı sonuçların ortaya konulmasına yardımcı olacaktır. Kuraklığa dayanıklı çeşit üretiminde yapılacak olan çalışmalarda katkıda bulunacağı umulmaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında dünya ve ülkemiz için ekonomik öneme sahip olan nohut bitkisinde doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları yapılmıştır. Nohut bitkisi ile ilgili bu çalışmaların devam etmesi büyük önem taşımakta ve bu alanda önemli bir açığın kapatılacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aasim, M., Day S., Rezaei, F. and Hajyzadeh, M. 2012. Multiple shoot regeneration of plumular apices of chickpea. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, doi:10.3906/tar-1204-38.
- Aasim, M. 2010. Börölce (*Vigna unguiculata* L.)’de doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları. Doktora tezi. Ankara üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Abdel-Ghany, S.E. and Pilon, M. 2008. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 283 (23):15932-15945.
- Akbulut, M. 2003. Optimization of regeneration and transformation conditions for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Doktora tezi (Basılmamış), Middle East Technical University, 138p, Ankara.
- Akbulut, M., Yücel, M. and Oktem, H.A. 2008. Analysis and optimization of DNA delivery into chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings by *Agrobacterium tumefaciens*. African Journal of Biotechnology v. 7 (8), pp. 1011-1017.
- Akçin, A. 1988. Yemeklik Dane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi Yayınları:43, Ziraat Fakültesi Yayınları:8. Konya
- Amuniddin, C. and Singh, B.P. 1995. Regeneration of chickpea of (*Cicer arietinum* L.) through *in vitro* culture. Plant Tissue Cult. 5(1): 59-63.
- Anil, N., Redy, C.S. and Reddy, G.M. 1986. Multiple shoot and plantlet regeneration from shoot apex and hypocotyl explants of *Cicer arietinum* L. Intl. Chickpea Newsletter 14 : 13-15.
- Anonim. 2011. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). www.tuik.gov.tr/. (Erisim Tarihi: 15.04.2012).
- Anonim. 2007. Kuraklık: Yeryüzünün sessiz felaketi. Türkiye Doğal Hayatı Koruma Vakfı (WWF) Türkiye Kuraklık Raporu, s. 49. www.wwf.org.tr. Erişim Tarihi: 20.12.2009.
- Anonymous. 2010. Food and agriculture organization (FAO). www.fao.org/. (Erisim Tarihi: 15.04.2012).
- Anwar, F., Sharmila, P. and Pardha Saradhi, P. 2010. No more recalcitrant: Chickpea regeneration and genetic transformation. African Journal of Biotechnology Vol 9, ISSN: 1684-5315.
- Arı, Ş. 2001. Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri. Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M. (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 160-169, Konya
- Arora, A., Sairam R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. Curr. Sci. 82, 1227–1238.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter 9:208–218.

- ASIM, M., DAY S., REZAEI R. and HAJYZADEH M. 2012. Multiple shoot regeneration of plumular apices of chickpea Turkish Journal of Agriculture and Forestry Turk J Agric For 37: 33-39 doi:10.3906.
- Axtell, M.J., Bowman, J.L. 2008. Evolution of plant microRNAs and their targets. Trends Plant Sci 13: 343–349.
- Bajaj, Y.P.S. and Gosal, S.S. 1987. Pollen embryogenesis and chromosomal variation in cultured anthers of chickpea. Int. Chickpea Newsl 17: 12-13.
- Banu, A.T., Sarkerb, H.R. and Hoqueb, M. I. 2011. *In vitro* Plant Regeneration of Four Local Varieties of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Grown in Bangladesh Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 46(3), 379-384.
- Barna, K.S and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. Plant Cell Rep. 13: 510-513.
- Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* L. from callus cultures via organogenesis, Plant.Cell.Rep., 13(9):510-13.
- Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 12: 521-524.
- Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. Plant Cell Reports, 13, 510-513.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116(2): 281 – 297.
- Batra, P., Yadav, N.R., Sindhu, A., Yadav, R.C., Chowdhury, V.K. and Chowdhury, J.B. 2002. Efficient protocol for *in vitro* direct plant regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.). India J. Exp. Biol. 40(5):600-602,
- Beck, D.P. 1988. Biological Nitrogen Fixation Studies. Food Legume Improvement Program. Annual Report 1988, Icarda, p.177-183.
- Bhatti, K.M.K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik.)’te Doku Kültürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, YÖK Tez No: 120164, Ankara.
- Bidney, D., Bidney, D.1., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L. and Huffman G. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. 18: 301–313.
- Blum, A. 1986. Breeding crop varieties for stress environments. Critical Reviews in Plant Sciences, 2; 199-237.
- Burkhead, J.L., Gogolin Reynolds, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M. and Pilon, M. 2009. Copper homeostasis. New Phytologist 182 (4):799-816.
- Burklew, C.E., Ashlock, J., Winfrey, W.B. and Zhang, B. 2012. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*nicotiana tabacum*). PLoS One, 7(5):e34783, 2012.

- Chauhan, R., Tiwari, A. and Singh, N.P. 2003. Differential requirement of mature and immature embryo of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for in vitro regeneration. Ind. J. Plant Physiol. 8: 28-33.
- Chen, K. and Rajewsky, N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. Nature Reviews Genetics 8 (2):93-103.
- Chilton, M.D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P. and Qetier, F. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 77:4060-4064.
- Chowrira, G.M., Akella, V. and Lurquin, P.F. 1995. Electroporation mediated gene transfer into intact boğumal meristems in plants generatig transgenik plants without in vitrotissue culture. Molecular Biotechnology, 3,17-23.
- Croser, J.S., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M. and Khan, T.N. 2003. Low temperature stress: implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. Crit. Rev. Plant Sci. 22, 185–219,
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N. and Carrington, J.C. 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. Plant Cell 23: 431–442.
- Devos, P., 1988. Nitrogen value of Lentils and chicpeas and changes during processing. Lentils for everyone symposium. Turkish Grain Board (29-30 th Marmaris-Turkey).
- Dong, J., Kim, S.T. and Lord, E.M. 2005. Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. Plant Physiology 138 (2):778-789.
- Duke, J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, p. 52-57, New York.
- Eldem, V., Akçay, U.Ç., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S. and Unver, T. 2012. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. PloS one 7 (12):e50298.
- Eldem, V., Akçay, U.Ç., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S. and Unver, T. (2012) Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. PloS one 7 (12):e50298.
- Farshadfar, E., Sabaghpour, S.H. and Khaksar, N. 2008. Inheritance of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using joint scaling test. J. Appl. Sci., 8(21); 3921-3937.
- Feng, X.M., Karlsson, A., Svensson, B.H. and Bertilsson, S. 2010. Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste–linking process to microbial communities. FEMS microbiology ecology 74 (1):226-240.
- Finer, K.R. and Finer, J.J. 2000. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. Letters in Applied Microbiology 30: 406-410.
- Fischer, R.A. and Maurer, R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. Aust. J. Agric. Res. 29: 897-912.

- Fontana, G., Santini L., Caretto S., Frugis, G. and Mariotti, D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). Plant cell report, 12:194-198.
- García, P. and Frampton, J. 2008. Hematopoietic lineage commitment: miRNAs add specificity to a widely expressed transcription factor. Developmental cell 14 (6):815-816.
- Kiran Ghanti, S., Sujata, K.G., Srinath Rao, M. Kavi Kishor, P.B. 2010. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. Biologia Plantarum 54 (1): 121-125.
- Gielen, H., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A. 2012. MicroRNAs in metal stress: specific roles or secondary responses? International journal of molecular sciences 13 (12):15826-15847.
- Gou, J.Y., Felippes, F.F., Liu, C.J., Weigel, D. and Wang, J.W. 2011. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. The Plant Cell Online 23 (4):1512-1522.
- Gül, M.K., Egesel, C.Ö., Kahrıman, F. ve Tayyar, Ş. 2006. Çanakkale Yöresinde Nohut Bitkisinin Kışlık Olarak Yetiştirilme Olanakları. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 20(1): 57-66.
- Hadi, M.Z., McMullen, M.D. and Finer, J.J., 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. Plant Cell Rep 15: 500–505.
- Henselová, M., Slováková, L., Martinka, M. and Zahoranová, A. 2012. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma Biologia 67/3: 490—497, 2012 DOI: 10.2478/s11756-012-0046-5.
- Hobert, O. 2008. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. Science 319 (5871):1785-1786.
- Hood, E.E. 1993. New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res 2: 208-218,
- Huda, S., Islam, R., Bari, M.A., and Asaduzzaman, M. 2003. Shoot Differentiation from Cotyledon Derived Callus of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant Tissue Cult. 13:1, 53-59.
- Husnain, T., Malik, T., Riazuddin, S. and Gordon, M.P. 1997. Studies on the expression of marker genes in chickpea. Plant Cell Tissue Org Cult 49: 7–16.
- Ignacimuthu, S. and Prakash, S. 2006. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea with α -amylase inhibitor gene for insect resistance. Journal of Biosciences 2006, 31, 339–345.
- Islam, R. and Riazuddin, S. 1993. Shoot organogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) from callus culture of hypocotyl explants. J. Bio. Sci. 1 : 1-5.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan J. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. Dec 20, 1987; 6(13): 3901–3907. PMCID: PMC553867.

- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:19-53.
- Kalefetoğlu, T. 2006. Nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatlarının kuraklık stresine dayanıklılığının karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Kantar, M., Unver, T. and Budak, H. 2010. Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Functional & integrative genomics* 10 (4):493-507.
- Kar, S., Johnson, T.M., Nayak, D. and Sen, S.K. 1996. Efficient transgenik plant regeneration through *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, 16, 32–37.
- Kaur, M., Singh, N. and Sodhi, N.S. 2005. Physicochemical, cooking, textural and roasting characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *J. Food Eng.*, 69; 511-517.
- Kaur, S., Gupta AK, and Kaur N. 2002. Effect of osmoand hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. *Plant Growth Regulation* 37:17-22.
- Keskin, H. 2012. Physiological And Biochemical Characterization Of Drought Tolerance In Chickpea.
- Khodadadi, M. 2013. Effect of Drought Stress on yield and Water Relative content in Chickpea. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 4 (6):1168-1172.
- Khodadadi, M. 2013. Effect of Drought Stress on yield and Water Relative content in Chickpea. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 4 (6):1168-1172.
- Kiran, G., Kaviraj, C.P., Jogeswar, G., Kavi Kishor, P.B. and Rao R. 2005. Direkt and high frequency somatic embriyogenesis an plant regeneration from hypokotils of chickpea *Cicer arietinum* L. a grain legume *Curr. Sci.*, 89:6, 1012-1018.
- Kozomara, A. AND Griffiths-Jones, S. 2011. miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39: D152–D157.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (34):12753-12758.
- Leport, L., Turner, N.C., Davies, S.L. and Siddique, K.H.M. 2006. Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. *Eur. J. Agron.*, 24; 236-246.
- Li, T., Li, H., Zhang, Y.X. and Liu, JY. 2011. Identification and analysis of seven H(2)O(2)-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Nucleic Acids Res* 39 (7):2821-2833. doi:10.1093/nar/gkq1047.
- Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin and H., Zhu, J.K 2008. The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated

- transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. The Plant Cell Online 20 (8):2238-2251.
- Lima, J., Arenhart, R., Margis Pinheiro, M. and Margis, R. 2011. Aluminum triggers broad changes in microRNA expression in rice roots. Genet Mol Res 10:2817-2832.
- Liu, H.H., Tian, X., Li, Y.J., Wu, C.A. and Zheng, C.C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA 14 (5):836-843. doi:10.1261/rna.895308.
- Llave, C., Kasschau, K., Rector, M. and Carrington, J. 2002a. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. Plant Cell 14, 1605-1619.
- Lu, S., Sun, Y.H., Shi, R., Clark, C., Li L. and Chiang, V.L. 2005. Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. The Plant Cell Online 17 (8):2186-2203.
- Macovei, A. and Tuteja, N. 2012. microRNAs targeting DEAD-box helicases are involved in salinity stress response in rice (*Oryza sativa* L.). BMC plant biology 12 (1):183.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview . Arch Biochem Biophys 444 : 139 – 158.
- Mehrotra, M., Sanyal, I. and Amla, D.V. 2011. High-efficiency *Agrobacterium* - mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and regeneration of insect-resistant transgenic plants. Plant Cell Rep. 30(9):1603-16. doi: 10.1007/s00299-011-1071-5.
- Melnikova, N.V., Belenikin, M.S., Bolsheva, N.L., Dmitriev, A.A., Speranskaya, A.S., Krinitsina, A.A., Koroban, N.V., Samatadze, T.E., Amosova, A.V. and Muravenko, O.V. 2014. Flax Inorganic Phosphate Deficiency Responsive miRNAs. Journal of Agricultural Science (1916-9752) 6 (1).
- Muehlbauer, F.J. and Tullu, A. 1997. *Cicer arietinum* L. In: New Crop Fact Sheet, Purdue University, Center for New Crops and Plant Products. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/Chickpea.html>. Erişim Tarihi: 05.05.2009
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures Physiol. Plant. 15,473-497.
- Murthy, B.N.S., Victor, J., Singh, R.P., Fletcher, R.A. and Saxena P.K. 1996. In vitro regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron Plant. Growth.Regul. 19(3) 233-240.
- Mutum, R.D., Balyan, S.C., Kansal, S., Agarwal, P., Kumar, S., Kumar, M. and Raghuvanshi, S. 2013. Evolution of variety-specific regulatory schema for expression of osa-miR408 in indica rice varieties under drought stress. FEBS Journal 280 (7):1717-1730.

- Nataliya, V.M., Maxim, S.B., Nadezhda, L.B., Alexey, A.D., Anna, S.S., Anastasia A.K., Nadezda, V.K., Tatiana, E.S., Alexandra, V.A., Olga, V. M., Alexander, V.Z. and Anna V. K. 2014. Flax Inorganic Phosphate Deficiency Responsive miRNAs Journal of Agricultural Science; Vol. 6, 1916-9760
- Olhoft, P.M., Lin, K., Galbraith, J., Nielsen, N.C. and Somers, D.A. 2001. The role of thiol compounds in increasing Agrobacterium-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 731–737.
- Olhoft, P.M., Somers, D.A. and Cysteine L. 2001. increases Agrobacteriummediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706–711.
- Ozhuner, E., Eldem, V., Ipek, A., Okay, S., Sakcali, S., Zhang, B., Boke, H. and Unver, T. (2013) Boron stress responsive microRNAs and their targets in barley. PloS one 8 (3):e59543.
- Öz, M.T., eyidoğan, F., yücel, M., and Öktem, H.A. 2009. optimized selection and regeneration conditions for *Agrobacterium* -mediated transformation of chickpea cotyledonary boğumes. Pak. J. Bot., 41(4): 2043-2054.
- Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E. ve Babaoğlu, M. 2001. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi. Özcan S.,Gürel E., Babaoğlu M. (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 112-159, Konya.
- Öztürk, L. and Demir, Y. 2002. In vivo and invitro protective roleof proline. Plant Polowick, P.L., Baliski, D.S. and Mahon, J.D. 2004. *Agrobacterium tumafaciens* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) gene integration, expression and inheritance. Plant Cell Reports, 23,485-491.
- Popelka, J.C. and Higgins, T.J.V. 2007. Chickpea. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transgenic Crops IV. Pua, E.C. and Davey, M.R. (eds.), SpringerVerlag, Vol. 59., p. 251-262, Berlin Heidelberg.
- Ravet, K., Danford, F.L., Dihle, A., Pittarello, M. and Pilon, M. 2011. Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in *Populus trichocarpa* reveals an integrated molecular remodeling for a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves. Plant physiology 157 (3):1300-1312.
- Rekha, K.T. and Thiruvengadam, M. 2009. An efficient micropropagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Philipp. Agric. Sci. 92 (3): 320–326.
- Ren, L. and Tang, G. 2012. Identification of sucrose-responsive microRNAs reveals sucrose-regulated copper accumulations in an SPL7-dependent and independent manner in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 187, 59–68 10.1016/j.plantsci.2012.01.014.
- Rossum M.W.P.C. V. and Van Der Plas L.H.W. 1997. Oxygen Stress in Tulip Bulb Scale Micropropagation Phytion (Austria) Special issue Vol. 37 Fasc. 3 (291)-(296) 1.7.

- Sağlam S. 2010. Tohum Böceklerine (Bruchidae: Coleoptera) Dayanıklı Transgenik Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkilerinin Elde Edilmesine Yönelik Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Sağlam, S. 2005. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)’de doku kültürü ve *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Saleem, K., Mehboob, A., Mehnaz, G.M.F., and Zahoor, A.S. 2010. *In vitro* micro-propagation of indigenous chick pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, KK-1 and Hassan-2K African Journal of Agricultural Research Vol. 5(21), pp. 2934-2938.
- Santarem, ER. 1998. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep* 17: 752–759.
- Sanyal, I., Singh, A.K., Kaushik, M. and Amla, D.V. 2005. *Agrobacterium* -mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Science*, 168, 1135-1146.
- Sarker, R. H., Ferdous, t. and Hoque, M. I. 2005. *In vitro* Direct Regeneration of Three Indigenous Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Varieties of Bangladesh *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 15(2): 135-144.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D. 2001. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 627–658.
- Seckler, D.W., Barker, R. and Amarasinghe, U. 1999. Water scarcity in the twenty-first century. *International Journal of Water Resources Development*, 15; 29-43.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A. and Sakurai, T. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31 (3):279-292.
- Sepetoğlu, H. 1992. Yemeklik Dane Baklagiller, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Notları:24, İzmir, 262 s.
- Shahena P, Venkateshwarlu M, Srinivas D, Jagan Mohan Redy K, Ugandhar T. 2012. Direct *in vitro* shoot proliferation on Chick pea (*Cicer arietinum* L.) from shoot tip explants induced by thidiazuron. *Bioscience Discovery*, 3: 01-05
- Shalgi, R., Lieber, D., Oren, M. and Pilpel, Y. 2007. Global and local architecture of the mammalian microRNA–transcription factor regulatory network. *PLoS computational biology* 3 (7):e131.
- Sharmila, P., Pardha, Saradhi, P: and Anwar, F. 2010. Chickpea regeneration and genetic transformation and more recalcitrant: *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(6): pp. 782-797,
- Sharmin, R.A., Akter, J., Sarker, R.H., Hoque, M.I. 2012. *Agrobacterium* -mediated Genetic Transformation of Local Cultivars of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology* Vol 22, No 1.

- Singh, N.D., Sahoo, L., Saini, R., Sarin, N.B. and Jaiwal, P.K. 2004. *In vitro* regeneration and recovery of primary transformants from shoot apices of pigeonpea using *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 10, 65–74.
- Singh, R. 2002. High frequency multiple shoot regeneration from decapitated embryo axes of chickpea and establishment of plantlets in the open environment. *Biol. Plant.* 45(4):503-508,
- Singh, R., L. Karamdeep, S. S. Bhullar, A. K. Gupta, 1994. Metabolism of free sugars in relation to the activities of enzymes involved in sucrose metabolism and nitrogen assimilation in the developing nodules of chickpea. *Plant Physiol. Biochem.*, 34, 875–888.
- Singh, R., Singh, N. P., Datta, S., Yadav, I. S. and Singh, A. P. 2009. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea using shoot meristem. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 85-90.
- Srivastava, K. 2001. Shoot regeneration from immature cotyledons of *Cicer arietinum* L. *Biol. Plant.* 44(3): 333-337.
- Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K. 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell Online* 18 (8):2051-2065.
- Sunkar, R. and Zhu, J.K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 16 (8):2001-2019.
- Surya, P. 1992. Factor affecting regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) . *Indian J. Exp. Sci.* 30(12): 1149-1153,
- Şanlı, a., muharrem, k. and burhan, k. 2012. nohut (*Cicer arietinum* L.)’Ta yabancı ot mücadele zamanları ile herbisit uygulamalarının verim ve bazı verim unsurlarına etkileri. *Ondokuz mayıs university anatolia journal of agricultural science* 24 (1):13-20.
- Taeb A. G. and Alderson P. G. 1990. Shoot production and bulbing of tulip *in vitro* related to ethylene. - *J. Hortic. Sci.* 65: 199-204.
- Temizgül, R. and Akbulut, M. 2011. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla nohut bitkisi (*Cicer arietinum* L.)’ne gen aktarımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27(1): 1-18.
- Temizgül, R. and Akbulut, M. 2011. *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation In Chickpea (*Cicer arietinum* L.)", *Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology*, cilt.27, ss.1-18.
- Thakare, U., Patil, N. and Malpathak, N. 2011. Performance of chick pea under the influence of gibberellic acid and oxygenated peptone during germination DOI: 10.4236/abb.2011.21007.
- Thudi, M., Bohra, A., Nayak, S.N., Varghese, N., Shah, T.M., Penmetsa, R.V. and Thirunavukkarasu, N., 2011. Novel SSR Markers from BAC-End Sequences, DArT Arrays and a Comprehensive Genetic Map with 1,291 Marker Loci for Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLoS ONE*, 6(11), e27275.

- Tinland, B., Hohn, B. 1995. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. In: Setlow JK (ed) Genetic engineering, v. 17, Plenum Press, New York, pp 209–229,
- Torisky R.S. 1997. Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Rep* 17: 102–108.
- Trick, H.N. and Finer J.J. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17: 482–488, 83.
- Trindade, I., Capitão, C., Dalmay, T., Fevereiro, M.P., dos Santos D.M. 2010. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231 (3):705-716.
- Turner, N.C. 2001. Optimising water use. In: Crop Science: Progress and Prospects. Nösberger, J., Geiger, H.H., Struik, P.C. (eds.), CABI Publishing, pp. 119-135, Wallingford, UK.
- Unlu S. and Yuceer Koc, N.K. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton plants. *Russian Journal of Plant Physiology* May–June, 2006, Volume 53, Issue 3, pp 413-417.
- Unver, T. 2008. Detection and characterization of plant genes involved in various biotic and abiotic stress conditions using DDRT-PCR and isolation of interacting proteins. PhD Thesis, Middle East Technical University.
- Unver, T. and Budak, H. 2009a. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta*, 230; 659-669.
- Unver, T., Namuth-Covert, D. and Budak, H. 2009b. Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *International Journal of Plant Genomics*, 2009; 1-11 pp.
- Uranbey, S., Çöçü, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar. K.M., Mirici, S. ve Özcan, S. 2003. “Efficient adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch”. *Biotech. and Biotech. Equip.*, 17, 33-37.
- Valdés-López, O., Yang, S.S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P.H., Reyes, J.L., Vance, C.P. and Hernández, G. 2010. MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New phytologist* 187 (3):805-818.
- Valdés-López, O., Yang, S.S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P.H., Reyes, J.L., Vance, C.P. and Hernández, G. 2010. MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New phytologist* 187 (3):805-818
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F. and Hellens, R.P. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 2007, 3:12 doi:10.1186/1746-4811-3-12.

- Varshney, R. K., Hiremath, P. J., Lekha, P., Kashiwagi, J., Balaji, J., Deokar, A. A. and Vadez, V., 2009. A comprehensive resource of drought- and salinityresponsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics*, 10, 523.
- Varshney, R. K., Pazhamala, L., Kashiwagi, J., Gaur, P.M., Krishnamurthy, L. and Hoisington, D. 2011. Genomics and Physiological Approaches for Root Trait Breeding to Improve Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum*/i L.). In A. Costa De Oliveira & R. K. Varshney (Eds.), *Root Genomics*(pp. 233–250). Springer Berlin Heidelberg.
- Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136 (4):669-687
- Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F. and Leister, D. 2003. Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278 (33):31286-31289
- Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F., Leister, D. 2003. Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278 (33):31286-31289.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y. and Shikanai, T. 2009. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 21 (1):347-361.
- Yamasaki, M., Wright, S.I. and McMullen, M.D. 2007. Genomic screening for artificial selection during domestication and improvement in maize. *Annals of Botany* 100: 967–973.
- Yousefiara, M., Bagheri, A. and Moshtaghi, N., 2008. Optimizing regeneration condition in chickpea (*Cicer arietinum*L.). *Pakistan J.Biol.Sci.* 11 (7): 1009-1014,
- Yu, X., Lin, J., Zack, D.J., Mendell, J.T. and Qian, J. 2008. Analysis of regulatory network topology reveals functionally distinct classes of microRNAs. *Nucleic acids research* 36 (20):6494-6503.
- Zhang, B., Pan, X.P., Wang, Q.L., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. 2005. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research* 15, 336–360. doi:10.1038/sj.cr.7290302.
- Zhang, H. and Li, L. 2013. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 74 (1):98-109.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M. and Luo, L. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany* 61 (15):4157-4168
- Zhou. L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M. and Luo, L. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany* 61 (15):4157-4168.

- Zhou. L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M. and Luo, L. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany* 61 (15):4157-4168.
- Zhou, Z.S., Song, J.B. and Yang, Z.M. 2012. Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of experimental botany* 63 (12):4597-4613.
- Zhou, Z.S., Song, J.B., Yang and Z.M. 2012. Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of experimental botany* 63 (12):4597-4613
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology* 53 (1):247-273.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mortaza HAJYZADEH
Doğum Yeri : İRAN
Doğum Tarihi : 04.07.1980
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve yıl)

Lise : Molavi lisesi (1998)
Lisans : Islamic Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi (2003)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkieri Anabilimi
Dalı, (2008)

Yayımları (SCI ve diğer)

1. Baloglu CM., Eldem V., **Hajyzadeh M.**, Unver T. Genome-Wide Analysis of the bZIP Transcription Factors in Cucumber. PLoS ONE (2014); 9(4):e96014. DOI: 10.1371/journal.pone.0096014
2. **Hajyzadeh M.**, Cavusoglu A., Sulusoglu M., Unver T. DNA SSR fingerprinting analysis among cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.) types. Food, Agriculture and Environment (JFAE) 2013.
3. Aasim M, Day S, Rezaei F, **Hajyzadeh M.**, Mahmud ST, Ozcan S. 2011. *In vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce. African Journal of Biotechnology 10 (11): 2020-2023 .
4. Söyler D., Canıhoş E., Temel N., **Hajyzadeh M.**, determination of chemical fungicide against soil borne fungal diseases of capers (*Capparis ovata* Desf. var. *herbacea*) during early stages. Pak. J. Agri. (2012) Sci., Vol. 49(3), 345-348
5. Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., **Hajyzadeh, M.** (2013). Multiple shoot regeneration of plumular apices of chickpea. Turk. J. Agric. For. 37:33-39.
6. **Hajyzadeh M.**, Allah Bakhsh, Mirzapour M., Khawar KM. 2012 Genetic transformation of cv. Gokçe of chickpea using mature embryonic axis explants Journal of Biotechnology, Volume 161, Supplement

7. Mirzapour M., Hajyzadeh M., Khawar KM. Kendir H.2012 Comparison of abaxially and adaxially cultured cotyledon explants on *in vitro* regeneration of Vicia sativa cv. Selcuk. Journal of Biotechnology, Volume 161, Supplement
8. Mokhtarzadeh S., **Hajyzadeh M.**, Ahmad H.A., Khawar K.M. The problems in acclimatisation of in vitro multiplied plants of lavandula angustifolia miller under field conditions. 15th acta horticulturae v: 988

Ulusal/Uluslar arası kongre, sempozyum, çalıştay vepanel gibi bilimsel toplantılara ait bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. Ünver T., Erkılıç EG., Özhüner E., Yanık H., Böke H., **Hajyzadeh M.**, İnal B., Eldem V., Parmaksız İ., İpek A., Özcan S. 2012 şlevsel Genomiğin Yeni Oyuncusu; Bitki MikroRNA'ları 2. Ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi. Antalya
2. **Hajyzadeh M.**, Çavusoğlu M., Sülüsoğlu M., Yanık H., İnal B., Erkılıç EG., Ünver T. 2012 Karayemis (Laurocerasus Officinalis Roemer Syn:Prunus Laurocerasus L.) Tiplerinin Ssr Tekniği ile Akrabalıklarının Ortaya Çıkarılması 2. Ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi. Antalya
3. **Hajyzadeh M.**, Ahmed HA., Mokhtarzadeh S., Allah Bakhsh,Khawar KM. 2011 Genetic transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Ciftci under *in vitro* condotions using mature embryo **explants** 3th National Congress of Biosafety and Genetic Engineering . İran/Tehran
4. **Hajyzadeh M.**, Sam Mokhtarzadeh, Hussein Abdullah Ahmed, Khalid Mahmood KHAWAR, Sebahattin ÖZCAN. 2011. Nohut Bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) Pulumula Eksplantlarından *in vitro* Koşullarda Sürgün Rejenerasyonu 1. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi Eskişehir
5. **Hajyzadeh M.**, Ahmed HA, Mokhtarzadeh S, Khawar KM, Özcan S. 2011. Nohut (*Cicer arietinum* L.) Gökçe çeşidinin *In vitro* Köklendirmesi üzerinde GA₃'ün etkileri 25.Ulusal Kimya Kongresi-Erzurum
6. **Hajyzadeh M.**, Ahmed HA., Khawar KM., Özcan S. .2011, nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* l.) Embriyonik eksen eksplantlarından *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu. 9 Tarla Bitkileri Kongresi Bursa.
7. Nofouzi F, **Hajyzadeh M.**, Rashidi V, Tarinajad, AR. 2009. Kuraklığa Dayanıklı Bazı İndekslerin Durum Buğday Hatlarında En İyi Grup Oluşturma ve Değerlendirmesi . Türkiye 8. Tarla Bitkileri Kongresi Antakya/HATAY , Sözlü sunum 829-830 .
8. Çetin G, Mokhtarzadeh S, **Hajyzadeh M.**, Khawar KM, Özcan S. 2011. Bakla (*Vicia faba* L.)'nin eresin 87 çeşidinin plumula eksplantlarından *in vitro* koşullarda adventif sürgün rejenerasyonu. 1. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi, Eskişehir.
9. Ahmed HA, **Hajyzadeh M.**, Khawar KM, Özcan S. 2011. "Farklı Besi Ortamlarda Marfona Patates Çeşidinin *in vitro* Mikro Çoğaltımı" Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi , samsun.

10. Ahmed AH, **Hajyzadeh M**, Khawar KM, Özcan S. 2011. *In vitro* Koşullarda Tokat 10/1 Patates Çeşidinin Hızlı Çoğaltımı 25.Ulusal Kimya Kongresi-Erzurum
11. Mokhtarzadeh S, **Hajyzadeh M**, Ahmed AH, Cetin G , Khawar KM , Özcan S .2011. Farklı Oranda Sitokinin Ve Oksinlerin İngiliz Lavantası (*Lavanta angustifolia* Miller)’Nin Mikroçoğaltım Üzerinde Etkileri 1. Ali Numan Kırar Tarım KongresiEskişehir
12. Mokhtarzadeh S., **Hajyzadeh M.** , Ahmed HA., Khawar KM..2011. *In vitro* koşullarında karabas otu (*Lavandula stoechas* L.) Bitkisini çoğaltımı.9 Tarla Bitkileri Kongresi Bursa
13. Demirhan, S., **Hajyzadeh, M.**, Beyaz, R., Erkılıç, E.G., İnal, B., Yanık, H., Böke, H., Eldem, V., Alagöz, Y., Unver, T. 2011. *Agrobacterium* ile Bitkilere Gen transferi. Fatih Üniversitesi 2. Ulusal Binotek Öğrenci Kongresi, İstanbul.

Diğer Yayınlar (Uluslararası bilimsel kitap)

Aasim M., Khawar KM, Daneshvar-Royandezagh S, Mokhtarzadeh, S., **Hajyzadeh,M.**, Ahmed H, A, Ozcan S. 2010. In: P. SIVAKUMAR, R. GNANAM, K.M. KHAWAR, D. THANGADURAI. *In vitro* tissue culture and *Agrobacterium* mediated genetic transformation in Vetches (*Vicia* sp.). Grain Legume Research.Bioscience Publications 1/115, Puliur, Krishnagiri, Tamil Nadu 635201, India .