

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NOHUT BİTKİSİNDE (*CICER ARIETINUM* L.)  
*AGROBACTERIUM* ARACILI GEN TRANSFERİNİN  
ETKİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN VAKUM İNFİLTRASYONU  
VE SONİKASYONUN BİRLİKTE KULLANIMININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Sema Selvi Nur TAŞYAPAN**

**Tezi Yöneten  
Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT**

**Biyoloji Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2010  
KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NOHUT BİTKİSİNDE (*CICER ARIETINUM* L.)  
*AGROBACTERIUM* ARACILI GEN TRANSFERİNİN  
ETKİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN VAKUM İNFİLTRASYONU  
VE SONİKASYONUN BİRLİKTE KULLANIMININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Sema Selvi Nur TAŞYAPAN**

**Tezi Yöneten  
Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT**

**Biyoloji Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından  
FBY-08-577 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2010  
KAYSERİ**

Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT danışmanlığında **Sema Selvi Nur TAŞYAPAN** tarafından hazırlanan “**Nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) *Agrobacterium* aracılı gen transferinin etkinleştirilmesi için vakum infiltrasyonu ve sonikasyonun birlikte kullanımının araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

22.07.2010

**JÜRİ:**

Başkan: Doç. Dr. Osman GÜLŞEN



Üye: Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT



Üye: Yrd. Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK

**ONAY:**

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 13/08/2010 tarih ve 2010/29...04 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

13/08/2010

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ  
**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

'Nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) *Agrobacterium* aracılı gen transferinin etkinleştirilmesi için vakum infiltrasyonu ve sonikasyonun birlikte kullanımının araştırılması' konulu tez çalışmasının seçiminde ve yürütülmesinde paylaştığım bilgi ve tecrübelerinden dolayı danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatım boyunca bana her zaman manevi destek veren, değerli fikir ve düşüncelerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında kullanmış olduğum sonikatörlerden birini temin eden Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde öğretim üyesi olan sayın Doç Dr. Kemal SARIOĞLU'na ve Doç. Dr. Osman SAĞDIÇ'a, ayrıca değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Zülal KESMEN'e de paylaştığım değerli fikir ve tecrübelerinden dolayı özellikle çok teşekkür ediyorum.

Tüm öğrenim hayatımda olduğu gibi, yüksek lisans çalışmalarımda da her zaman ve her koşulda benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve canım kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, hedeflere ulaşırken her zorluk karşısında sabırlı ve azimli olmak gerektiğini bana öğreten değerli ilkokul öğretmenim İsmail ALTINTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Türkiye Cumhuriyeti'ni kurarak gençlere emanet ettiği bu topraklarda rahatça eğitim almamızı sağlayan ulu önderimiz M. Kemal ATATÜRK'ü, aziz şehit ve gazilerimizi saygıyla anıyorum ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

**NOHUT BİTKİSİNDE (CICER ARIETINUM L.) AGROBACTERIUM ARACILI  
GEN TRANSFERİNİN ETKİNLEŞTİRİLMESİ İÇİN VAKUM  
İNFİLTASYONU VE SONİKASYONUN BİRLİKTE KULLANIMININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Sema Selvi Nur TAŞYAPAN**  
**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2010**  
**Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Mikail Akbulut**

**ÖZET**

Bu çalışmanın amacı yaygın olarak yetiştirilen nohut kültürlerimizden biri olan Beyaz Nohut için güvenilir, tekrarlanabilir bir rejenerasyon ve transformasyon sistemi geliştirmektir. Doku kültürü çalışmalarında MS tuzları ve Gamborg vitaminlerini içeren modifiye MS ortamı (MS-Gamborg) kullanılmıştır. MS-Gamborg ortamı 0.25-0.5 g/L kazein ve 1 g/L glutamin ile desteklenmiş ve çoklu sürgün oluşturmak için çeşitli büyüme düzenleyicileri (BAP, Kn, TDZ, zeatin, IAA, giberillik asit) eklenmiştir. Çoklu sürgün oluşturmak amacıyla plumula ve radikula kısımları kesilmiş 4-5 gün çimlendirilen fidelerden elde edilen akseller kullanılmıştır. Tüm çalışmalar boyunca en fazla sürgün sayısı 10 µM BAP kullanılan (ortalama 4.2 sürgün) MS-Gamborg ortamında elde edilmiştir. 0.5 mg/L Kn, 0.5 mg/L BAP ve 0.2 mg/L IAA uygulaması ile en düşük sürgün sayısı (ortalama 1.5 sürgün) elde edilmiştir. Agrobacterium temelli transformasyonun etkinliğini artırmak için sonikasyon, sonikasyon-vakum infiltrasyonu, agroinfiltrasyon, ve ayrıca yaralama–agroinfiltrasyon kombinasyonları gibi parametreler test edilmiştir. Sonikasyonla birlikte vakum infiltrasyonu kombinasyonunun en etkili uygulama olduğu tespit edilmiştir. En iyi stabil transformasyon bulguları banyo tipi sonikatörle 5 sn ara ile 20 ve 30 sn sonikasyon uygulaması ile elde edilmiştir. Ayrıca ara vermeden 40 sn yapılan sonikasyon uygulaması ile selektif ortamda yaşayan çok sayıda sürgün elde edilmiştir. 1 dk'dan 20 dk'ya kadar uygulanan sonikasyon süreleri içinde en etkili stabil transformasyon bulguları 1 ve 5 dk yapılan sonikasyon ile elde edilmiştir. Aday transformant bitkicikler 2-3 seleksiyon döngüsü sonucunda seçilmiştir ve PZR ile moleküler analizleri yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Nohut, Transformasyon, Agrobacterium, Sonikasyon

**AN INVESTIGATION ON THE COMBINATION OF SONICATION AND  
VACUUM INFILTRATION TO ENHANCE AGROBACTERIUM MEDIATED  
TRANSFORMATION IN CHICKPEA (CICER ARIETINUM L.)**

**Sema Selvi Nur TAŞYAPAN**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**M.Sc. Thesis, July 2010**

**Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mikail AKBULUT**

**ABSTRACT**

Main purpose of this study was to develop an efficient and reproducible regeneration and transformation system for a local chickpea cultivar. A modified tissue culture medium (MS-Gamborg) was used throughout the regeneration and transformation studies. MS-Gamborg medium was fortified with casein (0.25 g/L) and L-glutamin (1 g/L). Various plant growth regulators (BAP, TDZ, zeatin, IAA, and giberellicacid) were used for multiple shoot inductions. Plumuls and radicles of 4 or 5 day germinated seedlings were removed and used as an explant for multiple shoot induction. Maximum shoot inductions were observed when 10 µM BAP (4.2) was used as a sole growth regulators. Multiple shoot induction was the lowest when MS-Gamborg medium was supplied with 0.5 mg/L Kn, 0.5 mg/L BAP and 0.2 mg/L IAA. The impact of several parameters, such as sonication, sonication-vacuum infiltration, agroinfiltration and Agrobacterium mediated transformation with wounding of explant tissue were tested to increase the efficiency of Agrobacterium mediated transformation. Combination of vacuum infiltration with sonication had remarkable effect on the efficiency of Agrobacterium mediated transformation of local chickpea cultivar. The best stable transformation results were obtained from bath type sonicator with the parameters of 20 and 30 s sonications with 5 s intervals. Continuous 40 second sonication resulted in many living plantlets in selective medium. Among the 1 to 20 min of sonication durations, 1 and 5 min of sonication gave the best results. Putative transformants were selected in 2-3 cycles of selection and analyzed by polymerase chain reaction (PCR).

**Key words:** Chickpea, Transformation, Agrobacterium, Sonication

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
TABLolar LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	x
1. BÖLÜM	
GİRİŞ .....	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	
2. 1. Nohut .....	5
2. 1. 1. Orijini .....	5
2. 1. 2. Genel Botaniği .....	6
2. 1. 3. Dünyada ve Türkiye’de Nohut .....	6
2.1.4. Tarımı .....	7
2. 2. Nohut Verimine Etki Eden Faktörler .....	9
2.2.1. Biyotik Faktörler .....	9
2.2.2 Abiyotik Faktörler .....	11
2.3. Nohut Tohumlarının Besinsel İçeriği .....	11
2.4. Baklagillerde Doku Kültürü .....	12
2.5. Nohutta Doku Kültürü .....	13
2.6. <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Transformasyon .....	15
2.6.1. <i>Agrobacterium</i> ’la Gen Transferinin Avantajları ve Dezavantajları .....	17
2.7. Baklagillerde Transformasyon .....	18
2.8. Nohutta Gen Transferi .....	21
2.9. Sonikasyon Yardımlı <i>Agrobacterium</i> Aracılı Transformasyon (SAAT) .....	23
2.9.1. Sonikasyon (Ultrason, Sonoporasyon) .....	23
2.9.2. SAAT Uygulamasının Avantajları .....	24
2.9.3. Baklagillerde SAAT Uygulamaları .....	25

### 3. BÖLÜM

#### MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller .....	28
3.1.1. Bitki Materyali .....	28
3.1.2. Transformasyon Sırasında Kullanılan Cihazlar .....	28
3.1.2.1. Sonikatörler .....	28
3.1.2.2. Vakum İnfiltrasyon Aleti .....	29
3.1.3. Bitki Doku Kültürü Ortamları .....	30
3.1.4. Kültür Şartları .....	31
3.1.5. Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteriyel Suşlar.....	31
3.1.6. Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Plazmitler .....	32
3.1.7. Bakteriyel Kültür Ortamları .....	32
3.1.8. <i>Agrobacterium</i> İndüksiyon Ortamı .....	32
3.2. Yöntemler .....	33
3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu .....	33
3.2.2. Tohum Çimlendirme .....	33
3.2.3. Embriyodan Çoklu Sürgün İndüksiyonu .....	34
3.2.4. Transformasyon .....	34
3.2.4.1. <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Yapılan Transformasyonlar .....	35
3.2.4.2.1. Prob Tipi Sonikatörle Yapılan Uygulamalar .....	35
3.2.4.2.2. Banyo Tipi Sonikatör İle Yapılan Uygulamalar .....	38
3.2.5. Transformantlar Oldukları Varsayılan Eksplantların Analizi .....	41
3.2.5.1. GUS Histokimyasal Analizler .....	41
3.2.6. Transformantların Moleküler Analizi .....	41
3.2.6.1. DNA İzolasyonu .....	41
3.2.6.2. Aday Transgenik Bitkilerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	42
3.2.7. İstatiksel Analizler .....	42

### 4. BÖLÜM

#### BULGULAR

4.1. Rejenerasyon Çalışmaları .....	43
4.1.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu .....	43
4.1.2. Direkt Organogenez .....	44

4.1.3. İndirekt Organogenez Çalışmaları .....	52
4.1.3.1. Kallus İndüksiyonu .....	52
4.2. Transformasyon Çalışmaları .....	53
4.2.1. Prob Tipi Sonikatör Kullanılarak Yapılan Uygulamalar .....	53
4.2.2. Banyo Tipi Sonikatörle Yapılan Uygulamalar .....	55
4.3. Transformasyonu Etkileyen Parametreler .....	57
4.3.1. Embriyo Yaşının ve Kokültivasyon Süresinin Etkisi .....	57
4.3.2. Bakterinin Optik Yoğunluğu ve <i>Agrobacterium</i> Suşlarının Etkisi .....	59
4.3.3. Sonikasyonun ve Vakum İnfiltrasyonun Transformasyona Etkisi .....	59
4.3.4. Kokültivasyon Ortamına Eklenen Maddelerin Transformasyona Etkisi .....	62
4.3.5. Sonikasyon Sırasında Kullanılan Kaplar .....	63
4.4. Aday Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri .....	64
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA VE SONUÇ .....	66
KAYNAKLAR .....	73
EKLER .....	89
ÖZGEÇMİŞ .....	111

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2.1. Türkiye'de genel olarak baklagil üretiminde nohutun yeri .....	7
Tablo 3.1. Kokültivasyon ortamına eklenen çeşitli maddeler .....	31
Tablo 3.2. Prob tipi sonikatörle uygulanan parametrelere bazı örnekler .....	37
Tablo 3.3. Transformasyon sırasında uygulanan bazı bakteriyel konsantrasyon ve vakum infiltrasyon parametreleri .....	38
Tablo 3.4. Transformasyon sırasında uygulanan bazı vakum infiltrasyon parametreleri .....	39
Tablo 4.1. Çeşitli kombinasyon ve konsantrasyonlarda uygulanan büyüme düzenleyicilerinin çoklu sürgün oluşumuna etkisi .....	45

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Sonikasyon uygulanan cihazlar .....	29
Şekil 3.2. Vakum infiltrasyon cihazı .....	30
Şekil 3.3. Sonikasyon ve vakum infiltrasyon yardımıyla yapılan <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonun kısa bir şeması .....	40
Şekil 4.1. Çoklu sürgün olumu uyarıldıktan sonra spontan köklenme .....	46
Şekil 4.2. Çoklu sürgün ortamından sonra hormon bulunmayan ara ortamda uyarılan kökler .....	48
Şekil 4.3. Çeşitli kokültivasyon ortamlarından sonra farklı büyüme düzenleyici kombinasyonlarının uygulanmasıyla oluşan ortalama sürgün sayıları .....	49
Şekil 4.4 Farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarının kullanımı sonucunda oluşan sürgünler .....	51
Şekil 4.5. Kendiliğinden köklenmiş veya 1mg/L IBA ortamında köklendirilmiş eksplantlar ve bu eksplantların toprağa aktarılması .....	52
Şekil 4.6. Kallus benzeri yapılardan sürgün indüksiyonu ve nohut embriyosundan elde edilen kalluslardan rejenere olan sürgünler .....	53
Şekil 4.7. Aynı sonikasyon ve vakum infiltrasyon parametresi uygulanan farklı iki suştan elde edilen artan kanamisin ve aynı miktardaki ppt konsantrasyonlarındaki seleksiyon ortamlarında yaşayan sürgünlerin ortalaması (%) .....	55
Şekil 4.8. Nohut eksplantlarında oluşan geçici GUS ifadeleri .....	57
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki farklı seleksiyon ortamlarında yaşayan nohut eksplantları ve seleksiyonda yaşayan sürgünlerin rejenerasyonu .....	58
Şekil 4.10. Seleksiyonda ortamında kimerik görünümlü nohut eksplantlarının ve kimerik olan GUS ifadeleri .....	62
Şekil 4.11. Sonikasyon sırasında kullanılan 100 ml'lik erlenmayer .....	64
Şekil 4.12. PCR amplifikasyonunun agaroz jel görüntüsü .....	65

**KISALTMALAR VE SİMGELER**

**Amp:** Ampisilin

**BAP:** Benzilaminopürin

**2,4-D:** 2,4-Diklorofenoksi asetik asit

**Carb:** Karbenisilin

**Cef:** Sefotaksim

**GA<sub>3</sub>:** Giberellik asit

**Gent:** Gentamisin

**GUS:** Beta-glukuronidaz

**IAA:** İndol asetik asit

**IBA:** İndol bütirik asit

**Kn:** Kinetin

**MES:** Morfolinoethansülfonik asit

**MS:** Murashige ve Skoog

***npt II*:** Neomisin fosfotransferaz geni

**OD:** Optik yoğunluk

**ppt:** Fosfotrisin (herbisit)

**Rif:** Rifampisin

**SAAT:** Sonikasyon yardımlı *Agrobacterium* aracılı transformasyon

**Spect:** Spektinomisin

**Strept:** Streptomisin

**TDZ:** Thidiazuron

**YEB:** Maya özütü besiyeri (Yeast Extract Broth)

**Zea:** Zeatin

## 1. BÖLÜM

### GİRİŞ

Dünya nüfusunun beslenmesinde en çok kullanılan baklagiller, tek yıllık otsu bitkilerden çok yıllık odunsu bitkilere kadar uzanan geniş ve çeşitli bir ailedir, azot fiksasyon kapasiteleri sayesinde, doğada toprak ekosistemlerini yöneten esas bileşenlerdir. Baklagiller toprak verimliliğini arttırmanın dışında gıda, besin, hayvan yemi, iplik, endüstriyel tıp bileşenleri ve süs bitkileri üretmek amacıyla da kullanılmaktadır [1].

Daneli baklagiller geliştirmekte olan ülkelerde gıdalardaki proteini sağlamakta ve sürdürülebilir tarımsal sistemlerde önemli bir rol oynamaktadır. Ekin üretimi ya da kalitesindeki birçok sıkıntı konvensiyonel yetiştirme (bitki ıslahı) ve yönetim ilerlemesiyle sınırlandırılmaktadır. Fakat gereken özelliklerin mevcut germplazmında eksik olduğu durumlarda vardır. Genetik transformasyon belli sıkıntılara çözüm sağlamaktadır, diğer taraftan geliştirmekte olan ülkelerde gıda güvenliği artmaktadır [2]. Sürdürülebilir önemli transformasyon sistemleri, geleneksel yetiştirme teknikleriyle birleştirildiğinde hem kalite hem de ekin verimini geliştirmeye yardım edebilmektedir. Bu amaçla günümüzde gen aktarım ve rejenerasyon sistemlerini içine alan çeşitli biyoteknolojik yöntemler uygulanmaktadır.

Bitkilerin kök, gövde, yaprak, üreme organları ve hücreleri gibi değişik kısımları *in vitro* koşullarda besin maddeleri hormonlar ve vitaminler gibi kimyasal, ışık ve nem gibi fiziksel gereksinimleri sağlandığında kültüre alınabilmektedir. Doku kültürü olarak adlandırılan bu yöntem kültüre alınan bitki hücreleri ya da dokularına gen aktarımı yapılabilmesine olanak hazırlamakta, daha sonra da özellikle uygun besin ortamı ve hormonların varlığında gen aktarılmış bitki kısımları olgun bitki haline getirilerek, aktarılan genin özelliğini taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Laboratuvar

koşullarında gen aktarım yöntemleri kullanılarak klasik ıslah yöntemlerine göre çok daha küçük mekanlarda, mevsimsel ve eşeyssel kısıtlamalara bağımlı olmaksızın, kısa sürelerde, istenilen bitkiye istenilen genetik özellikler kazandırılmaktadır. Bunun için mutlaka tekrarlanabilir bir bitki- hücre rejenerasyon sistemine ihtiyaç vardır.

Bitkilere gen aktarım çalışmaları 1980'li yılların başlarında başlamıştır. Genlerin yapı ve fonksiyonlarının analizi, düzenleme mekanizmalarının aydınlatılması gibi temel biyolojik konuların araştırılmasında yeni ve güçlü bir yöntem olarak yerini almıştır. Gen aktarım sistemleri kullanılarak bitki gelişiminin kontrolü ile ilgili süreçler araştırılmaktadır. Transgenik bitkiler metabolik yolların tanımlanması, genin çalışmasını kontrol eden cis ve trans etkili elementlerin belirlenmesi ve çeşitli çevresel stres koşullarına verilen tepki mekanizmalarının anlaşılması açısından önemli araçlar haline gelmiştir [3].

Bu temel uygulamalara ilave olarak gen aktarımı ile bitkilere çeşitli çevresel baskılara (kuraklık, don, yüksek asidite ve tuzluluk vb.), bakteriyel, viral ve fungal hastalıklarla, çeşitli kimyasal bileşiklere dayanıklılık özelliği kazandırılmaktadır. Ayrıca, aşağıdaki çalışmaların yapılmasına imkan tanımaktadır:

1. Tahılların besin kalitesinin artırılması (depo proteinleri, karbonhidratlar ve yağ asitleri gibi içsel ürünlerin miktar ve bileşenlerinin değiştirilmesi) ve gıda dışındaki sektörler için hammadde olarak kullanılan nişasta, protein ve yağ kalitesinin geliştirilmesi,
2. Bitkilerin sekonder metabolitler, antibiyotikler ve aşılardan gibi ilaç endüstrisinde kullanılan değerli maddeleri bol miktarda üretmeleri,
3. Toprak, su, ışık ve gübre gibi ucuz gereksinimleri nedeniyle mikroorganizmalar ve hayvan hücrelerine alternatif olarak yabancı kaynaklı genlerin aktarılmasıyla, bitkilerde heterolog proteinlerin üretimi gibi birçok amaçla bitkilerde gen aktarım çalışmaları yapılmaktadır [3].

Günümüzde yeryüzünde 44,2 milyon hektar alanı transgenik ekinler oluşturmaktadır. Geçen 20 yıl boyunca, 100'den fazla bitki türünde transformasyonlar yapılmıştır.

Bunların içinde en önemlileri mısır, buğday, patates, domates, soya fasulyesi, pamuk ve pirinçtir [4].

Baklagil transformasyon sistemleri diğer bitki gruplarına benzemekle birlikte baklagilleri transforme etmek diğer türleri transforme etmekten daha zordur. Bundan dolayı baklagiller başka dikotiledonlu bitkilerle de karşılaştırıldığında transformasyon ve rejenerasyon açısından oldukça inatçı bir gruptur. Ancak fasulye, soya fasulyesi, bezelye, yonca ve fiğ gibi başlıca taneli baklagiller için stabil transformantlardan elde edilen rutin protokoller günümüzde mevcuttur.

Nohutun ıslahı eşey uyumu eksikliği nedeniyle engellenen yabancı türlerden yararlanılarak türler arası genetik varyasyona dayanır. Konvensiyonel olmayan gen aktarım metodları ilk olarak bu sıkıntıya çözüm bulabilecek gibi görünmektedir. Ancak bu sorunların çözümü için tam bir bitki rejenerasyon protokolüne büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır [5]. Nohutun *in vitro* rejenerasyonu ile ilgili birçok çalışma yayınlanmasına karşın transgenik bitkilerin elde edilmesini amaçlayan birkaç yayın bulunmaktadır. Rapor edilen bu rejenerasyon protokollerinin tekrar edilebilirliği düşüktür ve çoklu sürgün yöntemi kullanılarak *in vitro* koşullar altında rejenerasyonu optimize etmek bu açıdan oldukça zordur. Çünkü nohut rejenerasyonu, rejenere edilen bitkinin genotipine ve çevresel koşullara bağlılık göstermektedir. Transformasyon ve rejenerasyon olaylarını tek başına ele almak mümkün olmamaktadır, çünkü birinin eksikliği veya yetersizliği ile diğeri de kısır bir döngüye girmektedir. Bu açıdan araştırmacı her iki çalışmanın da birlikte yürütülmesi ve kararlı bir biçimde sürdürülmesi gerektiğini bilmelidir.

Nohutta farklı transformasyon teknikleri kullanılmıştır. Çeşitli *Agrobacterium* ırkları ile *Agrobacterium* aracılı transformasyon ve doğrudan gen aktarım tekniklerinden olan partikül bombardımanı çalışmaları yapılmıştır. Ancak uygulanan her iki teknikte de yüksek frekansta stabil bir transformasyon ve tam bir bitki rejenerasyonu gözlemlenememiştir. Bir bitkinin transformasyon sisteminin başarılı olarak adlandırılabilmesi için gelişmiş bir gen teknoloji sistemine sahip olması gerekmektedir. İyi bir gen teknoloji sistemi için ön gereklilikler şöyle sıralanabilir:

1. Öncelikle doku kültüründe etkili, güçlü ve tekrarlanabilir bir bitki rejenerasyonu,

2. Selektif ajanla ilişkili uygun seçilebilir bir işaret ( marker) geni,
3. İlgili gen ya da genlerin ifade edilebilmesi için uygun hücre, doku ve organ tipinde yeniden yapılanması,
4. Bağımsız transgenik olayların elde edilmesi,
5. Aktarılan gen ya da genlerin sonraki nesillere stabil olarak geçişi,
6. Transgenik fenotipin etkin olarak elde edilmesi,
7. Özgür bir şekilde uygulanabilme, örneğin tüm teknolojilerde kullanılacak lisanslarının olması
8. Sağlık ve çevre hususunda güvenli kullanımı için onay düzenlemesi
9. Farklı tarımsal ekolojik zonlar için germplazmı geliştirmeye açık olmalıdır [2].

Nohut Türkiye’de yetiştirilen önemli ürünler arasındadır. Doğal gen kaynaklarının araştırılmasının yanında biyoteknolojik yöntemlerle bazı karakterlerinin iyileştirilmesi ürün kalite ve miktarını artırabilir. Önerilen tezin nihai amacı nohut bitkisinin agronomik bakımdan iyileştirilmesi için uygun gen transfer yöntemlerinin geliştirilmesidir. Geliştirilen yöntem daha sonra agronomik olarak nohut bitkisine üstün karakterler kazandıracak olan genlerin transferinde kullanılmasında bir basamak oluşturacaktır. Nohut bitkisine çeşitli böcek zararlılar, nematodlar ve bazı fungal hastalıklar zarar vermektedir. Zararlılara ve hastalıklara direnç sağlayan genlerin aktarılması sonucunda verim artışıyla birlikte ürünün kalitesi de yükselecektir. Hastalık ve zararlılara dirençli nohut çeşitlerinin geliştirilmesi insan ve çevre sağlığı açısından zararlı olan tarım ilaçlarının kullanılmasını da azaltmış olacaktır. Ayrıca transgenik bitki teknolojisi kullanılarak nohudun besin değeri de yükseltilebilecektir. Baklagil tohumları normal diyetlerde 15 esansiyel elemente ve iyi bir mineral kaynağı olarak önemli yere sahip olmasına karşın, bu mineraller hayvansal gıdalara göre göreceli olarak düşüktür. Bu anlamda en fazla kükürtlü aminoasitlerce zengin proteinler ürettirilerek besin değeri de yükseltilebilecektir.

Bu çalışmanın başlıca amacı bölgesel nohut türleri için uygun bir *in vitro* rejenerasyon sistemi ve *Agrobacterium* aracılığıyla nohut transformasyonunda sonikasyon ve vakum infiltrasyon tekniklerinin birlikte kullanılarak etkili bir transformasyon metodu geliştirmek ve transformasyon için uygun doku kültürü ortamlarını optimizasyonunu yapmaktır.

## 2. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER

#### 2. 1. Nohut

*Cicer* L.cinsi Fabaceae (Leguminosae) familyası, Papilionaceae altfamilyasına aittir. Nohut 9 tek yıllık, 33 çok yıllık ve bir tane de sınıflandırılmamış tür olmak üzere 43 tür içermektedir [6]. Kültürü yapılan nohut *Cicer arietinum* L. eski dünyada evcilleştirilmiş ilk taneli baklagillerden biridir [7].

#### 2. 1. 1. Orijini

Nohut kendi kendine tozlaşan diploid ( $2n=2x= 16$ ) yaklaşık olarak 750 Mbp'lik orta ölçekli bir genoma sahip olup [8, 9, 10] seleksiyon yoluyla *Cicer reticulatum* yabani atasından ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir [6,10].

Nohut çok büyük olasılıkla günümüz Türkiye'sinin Güneydoğu bölgesinde ve bitişiğindeki Suriye bölgesinde ortaya çıkmıştır. Ladizinsky ve Adler (1976) [11] tohum protein elektroforez çalışmalarını temel alarak *C. reticulatum*'un kültürü yapılan nohutun yabani atası olduğunu ve bu bitkinin orijin merkezinin Güneydoğu Türkiye olduğunu düşünmüşlerdir. Nohutun yabani atası üzerinde hala çelişki olmasına rağmen, interspesifik hibridizasyon [12], karyotip [13] ve izozim örneklerinin [14] analizleri, dokuz tek yıllık nohut türünde nohutun orijini ile ilgili Ladizinsky ve Adler'in bulgularını desteklemektedir [15]. Vavilov (1926) [16], iki önemli orijin merkezi belirtmiştir, Güneybatı Asya ve Akdeniz, ikinci bir merkez olarak Etiyopya'dan bahsetmiştir.

Nohutun iki ana grubu vardır. Kabulü tipleri göreceli olarak büyük, beyaz veya soluk krem renklidir, yuvarlak tohumlara sahiptir ve daha çok Akdeniz'de, Orta ve Güney Amerika'da ve ilk olarak bundan seleksiyon ve mutasyonla oluştuğu belli olan küçük ve angular tohumları çeşitli şekilde pigmentli veya siyah olan desi tipidir, bu tiptekiler kıta altı Hindistan ve Doğu Afrika'da yetişmektedir [17,15].

### 2. 1. 2. Genel Botanığı

Nohut fideleri hipogealdir. Plumulanın büyümesiyle dik bir sürgün oluşur. Primer kök uzundur ve lateral kökleri oluşturur. Yapraklar her bir nodtan tek olarak çıkarlar ve alternat yaprak dizilişinde ve genel olarak unipinnat birleşik olarak düzenlenirler. Küçük bir petiyole sahip yaprak ana gövdesi (rachis) üzerinde düzenlenen her bir yaprak 11-13 yaprakçıktan oluşur. Stipüller genellikle 3-4 mm uzunluğunda ve 2-4 mm genişliğindedir. Korolla haricinde bitkinin bütün dış yüzeyi, glandular ve angular tüylerle kaplıdır [18].

Uzun kültivarlar uygun koşullar altında 130 cm'ye kadar büyürken, genellikle bitkiler 20 cm' den 100 cm'ye kadar bir yüksekliğe ulaşmaktadır [19].

Çiçekler tipik olarak papilionaceous'tur. Çiçekler aksillar rasemlerdeki her bir pedisel ve pedunkul üzerinden çıkarlar. Desi tipinde korolla genellikle mor, kabulü tipinde ise beyaz veya nadiren mavidir. *Cicer* cinsindeki bitkiler çiçek başına sadece bir karpele sahiptir.

Nohut, bitki başına birkaç taneden 1000 taneye kadar değişen sayıda şişmiş tohum zarfına sahiptir. Tohum zarfının boyutu oldukça çeşitlidir, ancak bu özellik onun çevreden en az etkilenmesini sağlar. Tohum zarfı şekli romboid, oblong ve ovattır [20]. Tohum karakteristik olarak gaga şeklindedir, sıklıkla angular ve buruşuktur. Nadiren bezelye gibi yuvarlaktır. Tohum yüzeyi buruşuk, düz ya da tuberküllü olabilir [21].

### 2. 1. 3. Dünyada ve Türkiye'de Nohut

Nohut ( *Cicer arietinum* L. ) kurufasulye ve bezelyeden sonra dünyada üçüncü en önemli taneli baklagil ürünüdür [22,23]. Nohut Batı Asya, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Güney-Doğu Amerika ve Avustralya'da önemli bir daneli baklagildir [24]. Ayrıca bu bitkiler atmosferik azotu simbiyotik olarak bağlamaları sayesinde toprak verimliliğini arttırmakta eşsiz bir yeteneğe sahiptirler [25].

Nohut ekonomik olarak önemli on daneli baklagilden biridir, özellikle kıta altı Hindistan'da ve Ortadoğu bölgelerinde hem insanlar hem de ve hayvanlar için değerli bir protein kaynağı sunmaktadır [26]. 2002'de Dünya genelinde 10,7 milyon hektar

alandan nohut hasat edilmiştir ve toplam tane üretimi 8,2 milyon tondur. Dünyada nohutun en büyük üreticisi ve tüketicisi Hindistan'dır ve dünya genelinde toplam üretimin ve hasat edilen alanların % 60'tan daha fazla olduğu hesaplanmıştır [22]. Geçen 40 yılın üzerinde, Hindistan'da nohut üretiminde önemli bir ilerleme sağlanmıştır. 1960'ların başında Hindistan'daki çiftçilerin tarlalarında hektar başına tane verimi 0,55 tondan ortalama olarak 0,8 tona kadar yükselmesine rağmen, başlıca hasat edilen alanlardaki azalma sebebiyle üretilebilirlik 4-6 ton arasında sabit kalmıştır [22]. İlerleme kaydedilmesine rağmen, Akdenizde çiftçinin tarlalardaki ortalama üretimi ve maksimum verim potansiyeli arasında hektar başına 6 tona varan büyük bir boşluk bulunduğu tarım işleri idaresince kaydedilmiştir [27].

Pek çok kaynağa göre, Türkiye'de yaklaşık 7000-7500 yıl öncesine kadar nohut yetiştirildiği düşünülmektedir. Türkiye'de 2000 yılında toplam baklagil üretimi içerisinde nohut % 41, mercimek % 27, fasulye % 17 ve diğerleri toplam % 15'tir. Tablo 2.1'de Toplam baklagil üretimindeki nohutun yeri gösterilmiştir [28].

Tablo 2.1. Türkiye'de genel olarak baklagil üretiminde nohutun yeri 1000 Ton

ÜRÜNLER	1980	1996	1997	1998	1999	2000
<b>Nohut</b>	275	732	720	625	560	548
<b>Mercimek</b>	195	645	515	540	380	353
<b>K.Fasulye</b>	165	230	235	236	237	230
<b>Bakla</b>	52	46	46	43	39	37
<b>Bezelye</b>	7	4	4	3	3	3
<b>TOPLAM</b>	818	1 832	1 700	1 600	1 360	1 316
<b>(Diğerleri Dahil)</b>						

#### 2.1.4. Tarımı

Kurak bölgelerimizde yağmura bağlı olarak yetiştirilir. Ani soğuklara hassas olmakla beraber -10°C'ye kadar dayanabilir. Ancak sert kışlara dayanmaz. Bu nedenle yurdumuzda erken ilkbaharda ekilir. Nohut fazla nemi sevmeyen bir bitkidir. İlkbaharda ekildikten sonra hava ve toprak sıcaklığı gittikçe arttığından nohudun çıkışı ve gelişmesi hızlanır. Fazla nem ve fazla sıcak dane tutumuna zarar verir. Çiçeklenme ve dane doldurma devresinde fazla yağış, çiçeklenme ve bakla bağlama üzerindeki olumsuz

etkisinin yanısıra, antraknoz hastalığı epidemisi için de ortam hazırladığından istenmez. Vejetatif dönemdeki hafif yağışlar ise bitki gelişmesini teşvik eder.

Süzek ve çok ağır olmayan killi topraklar veya kara ve kırmızı topraklar nohut tarımı için uygundur. Kuvvetli ve derine giden kökleri ile fakir topraklarda da oldukça verimli bir şekilde yetiştirilir. Nohut bitkisi tuza dayanıklı olarak bilinir. Fakat alınabilir kalsiyum miktarının fazlalığı, ürünün pişme kalitesi üzerine olumsuz etkide bulunmaktadır.

Toprak hazırlığı yapmak için nohut yetiştirilen bütün bölgelerimizde, hububat hasatından sonra tarla, sonbaharda pullukla 15-20 cm. derinliğinde sürülür. Böylece bitki artıklarının toprağa gömülmesi ve karışması sağlanır. İkinci toprak işleme ilkbaharda ekimden önce tarla tava gelir gelmez kazayağı-tırmık ya da diskaro kullanılarak yapılır.

Nohut köklerinde yeralan bakteriler toprağa azot kazandırır ve kendinden sonra ekilecek bitkilerin verimini artırır. Bu sebeple nohutun çok fazla azot ihtiyacı bulunmamaktadır. Bitkinin ilk gelişme devresinde ihtiyaç duyduğu en uygun gübre dozları saf madde olarak; 2-2,5 kg. azot ve 5-6,5 kg. fosfordur. Bu miktarlar dekara 12-14 kg. DAP gübresine karşılık gelmektedir. Nohudun fosforlu gübreye ihtiyacı vardır.

Ülkemizde ekim zamanı yörelere göre şubat ortası ile nisan ayları arasında değişiklik gösterir. Nohut ekiminin ilkbahar son donlarından 7-10 gün önce yapılması önerilir. Sahil kesimlerinde kışların sert geçmediği yerlerde kışlık olarak da ekilebilir. Nohut ekimi yurdumuzda genellikle serpme olarak yapılmaktadır.

Serpme ekim yönteminde fazla tohumluk kullanılmaktadır. Erken ekimlerde ve tavlı topraklarda mibzerle ekim yapmak en idealidir. Mibzerle ekimde dekara 12-14 kg. tohum atılır. Son yıllarda geliştirilen iri taneli nohutlarda tohumluk miktarı 100 dane ağırlığı dikkate alınarak, metrekareye 45 dane gelecek şekilde artırılır. Geç ekimlerde ekim derinliği biraz daha artırılmalıdır. Ekimden sonra merdane çekmek çıkışın daha çabuk ve düzenli olmasını sağlar. Mibzerle ekimde sıra arası 30-35 cm olmalıdır. Ancak ara çapası ile yabancı otları kontrol etmek amaçlanıyorsa nohudun 45 cm sıra aralığında ekilmesi tavsiye edilir. Ekim derinliği ise 4-6 cm olmalıdır. Ekimden sonra 1-2 gün içerisinde yabancı ot ilacı uygulamak, yabancı otların gelişmesini yavaşlatır.

Nohutta dane dökme problemi olmadığından kuruyan bitkiler orakla biçilerek veya elle yolunarak hasat edilir. Hasat edilen bitkiler ufak yığınlar halinde iyice kuruyuncaya kadar bekletilir. Daha sonra harman makinalarında veya diğer yöntemlerle harman yapılır. Harman sırasında danelerin kırılmaması ve çatlamamasına dikkat edilir [29].

## 2. 2. Nohut Verimine Etki Eden Faktörler

### 2.2.1. Biyotik Faktörler

Nohut verimine etki eden biyotik faktörler genel olarak bakteri, fungus ve virüslerin sebep olduğu bazı hastalıklar, ayrıca böcekler ve yabancı otlar gibi zararlılar tarafından oluşturulan hasarlar olup üretilebilirlik potansiyelini önemli derecede azaltmaktadır. Birçok raporda bunu doğrulamaktadır. Nohutta böceklere ve hastalıklara karşı dirençte artış, ürün potansiyelini üç katına kadar arttırabilmektedir [23,30].

*Agrobacterium*, Rhizobiaceae familyasından toprakta yaşayan Gram negatif bir bakteridir. Dikotiledonlu bitkilerde *A. tumefaciens* kök boğazı uruna, *A. rhizogenes* ise saçak kök oluşumuna neden olmaktadır. Çoğu çift çenekli bitkiyi kök boğazında oluşan yaralardan enfekte ederek tümör oluşumuna neden olmaktadır. Enfeksiyon bölgesindeki aşırı ve düzensiz hücre bölünmeleri, tarımı yapılan birçok bitkide büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. *Agrobacterium*'un fitopatojenik özellikleri uzun yıllar önce belirlenmiştir [31, 32].

Nohutla ilişkili olabilecek çok sayıda herbivor böcek rapor edilmesine rağmen [33,34], bazı gruplar daha da yaygındır. Örneğin baklagil tohum zarfı böceği *Helicoverpa armigera*, larval dönemdeki besin tercihi olarak üreme yapıları gibi nitrojence zengin bitki kısımları üzerinde ve büyümekte olan uçlarda aşırı ürün kayıplarına neden olmaktadır [35]. Bitki özsuyu emen zararlılar özellikle *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphidae) nohuta çok sayıda viral hastalık taşımasıyla bilinmektedir [36] ve *Callosobruchus* cinsi kınkanatlı böceklerde (*C. chinensis* Linnaeus, *C. analis* Fabricus) [37] bunlar arasında yerini almaktadır. Depolanmış nohutlar Brucidae'ye ait böcekler tarafından yapılan saldırılara oldukça duyarlıdır, özellikle *C. maculatus* (Col: Brucidae) ve azuki fasulye tohum kurdu *C. chinensis* [38,39]. Bu böcekler aynı zamanda bezelye, bakla ve azuki fasulyesi gibi depolanmış başka tane baklalara da zarar vermektedir.

Nohut germplazmının tohum böceklerine karşı dereceli olarak dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu direncin kabuğun fiziksel özellikleriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Örneğin siyah renk, pürüzlülük, değişen kimyasal içerik, kalınlık gibi [26, 40, 41, 42, 43, 44]. Nohut dane üretimi çoğu zararlı böcekler tarafından verilen zararlarla kötü bir şekilde etkilenmektedir. Bu kayıpların ana sorumlusu, lepidopter olan, tohum kurdu *Heliothis armigera* Hubner'dir. Böcek zararına karşı direnç için genetik kaynakların mevcut olmaması nedeniyle tohum zarfı kurduna karşı dirençli nohut hatlarını arttırmak için bitki ıslahı yararlı değildir [45]. Tohum zarfı böceği *Helicoverpa armigera* ve *Heliothis virescens*'in yalnız başlarına tane verimine % 22-35 zarar verdiği rapor edilmiştir [15].

Nohut, bazı zararlılara ve fungal saldırılara karşı yüksek duyarlılık göstermektedir [23, 46-48]. *Fusarium oxysporum* solgunluğunun nematodlarla birlikte etkisi ciddi ürün kaybına neden olmaktadır [49].

Ascochyta yanıklığı nohutta yıkıcı bir hastalıktır, nohut yetiştirilen ülkelerde yaygın bir şekilde oluşmaktadır. ICRISAT ve ICARDA ıslah programlarında kullanmak için biyotik streslere karşı direnç kaynağı belirlemişlerdir. Dünya nohut koleksiyonu bir seri biyotik ve abiyotik stres için değerlendirilmiş ve direnç kaynağı tanımlanmıştır. Örneğin ICARDA'daki germplazmın değerlendirilmesi sonucu 19370 hattın 32'si Ascochyta yanıklığına (*Ascochyta rabiei* [Pass.] Lab.), 5174 hattın 110'u fusarium solgunluğuna (*Fusarium oxysporum*), 6025 hattın 8'i nohut yaprak kurduna (*Liriomyza cicerina* Rond.) ve 9095 hattın 13'ü soğuğa, 4165 hattın 19'u kuraklığa karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Maalesef 5153 hattın hiçbirisi tohum böceği *C. chinensis*'e karşı dirençli değildir ve test edilen 9257 hattın hiçbirisi nematod kistine (*Heterodera ciceri*) karşı dirençli değildir [15].

Nohut rizobiyosunun doğal olmayan ırklarla inokülasyonu, bu ekinin üretimini arttırmak amacıyla kullanılmasına rağmen, verim bu alanda hala düşüktür. Verimi sınırlayan tek faktör nohut simbiyozisinin N<sub>2</sub> bağlama potansiyeli değil aynı zamanda bu alanlarda ozmotik stresin hakim olması yoluyla ve simbiyontların her ikisinin adaptasyon eksikliği, sınırlayıcı faktörlerdir [50].

### 2.2.2 Abiyotik Faktörler

Nohut bitkisi başta kuraklık olmak üzere soğuk, sıcaklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslerden etkilenmektedir [51]. Diğer ürünlerin aksine nohut kuraklığa karşı dirençli olarak düşünülmesine rağmen, kuraklığın yoğun olarak nohut üretilen bölgelerde sınırlayıcı faktör olduğu bilinmektedir.

Donma (-1.5 °C'nin altındaki) ve soğuma (-1,5 ile 15 °C arasındaki) sıcaklıklarının ürün gelişiminin çeşitli dönemlerinde nohutu etkilediği bilinmektedir [52]. Donma stresinin etkisi çimlenme ve vejetatif gelişim sırasında detaylı çalışılmıştır. Düşük sıcaklık koşulları altındaki tarlada nohut çiçeklerinin düştüğü rapor edilmiştir [53,54]. Clarke ve Siddique'in hipotezleri (2004) [55], fakir tohum zarfı/tohum ve düzensiz verime yol açtığından, 15 °C'nin altındaki sıcaklıkların nohut poleni üzerinde kötü bir etkisi olduğunu rapor etmişlerdir.

### 2.3.Nohut Tohumlarının Besinsel İçeriği

Nohut hem insanlar hem de hayvanlar tarafından tüketimi uygun olan proteince zengin bir baklagil gıdasıdır. Dünyada en kalabalık nüfusa sahip alanlarda yaşayanların çoğunun beslenmesinde başlıca üründür ve 40'ın üzerinde ülkede yetiştirilmektedir [56].

Nohut bitkisi önemli bir protein, fosfor, demir ve belli sayıda suda çözünen vitaminlerin kaynağıdır ve içerdiği yağ miktarının hepsi doymamış yağdır. Baklagil gıdaları taneli hububat ve nişastalı gıdaların oluşturduğu beslenmeye ek protein sağlarlar. Başlıca kotiledonlardan elde edilen protein konsantrasyonu % 17- 40 kadardır [57]. Baklagiller proteince tahıllardan daha zengindirler, özellikle de kırmızı ve beyaz et kaynağı düşük ya da yetersiz olduğunda önemli diyet protein kaynağı olarak temsil edilirler.

Baklagiller ana protein kaynağı olarak et ile karşılaştırıldığında, kükürt içeren amino asitler yönünden eksiktir ancak lizine genellikle zengindir [2, 58]. Nohut, gibi baklagillerin tohum proteinleri sistein ve metiyonin gibi kükürtlü aminoasitler bakımından göreceli olarak eksiktir [59].

Nohut tohumunda % 48,2-67 karbonhidrat, % 12-31,5 protein, % 41-50 nişasta % 6 yağ bulunur [60]. Proteinlerin sindirilebilirliği % 76-78 arasında değişirken, bu oran karbonhidratlarda % 57-60 arasındadır [61,62].

#### 2.4. Baklagillerde Doku Kültürü

Taneli baklagillerde bitki doku kültürü çalışmaları temel olarak Murashige ve Skoog (MS) [63] ortamında mikronütrient ve azotun modifikasyonu ile çeşitli büyüme düzenleyicileri BAP, Kinetin (Kn), TDZ, zeatin, GA<sub>3</sub>, IAA, 2,4-D ve IBA kullanılarak bitkiden elde edilen materyallerden (eksplantlardan) *in vitro* ortamda çoklu sürgünlerin elde edilmesi, boyunun uzatılması ve köklendirilmesi gibi uygulamaları kapsamaktadır.

Baklagil türlerinin rejenerasyonunda en sık kullanılan iki metod, somatik embriyogenez ve organogenez olarak isimlendirilen metodlardır. Her iki yöntemde bitki doku kültürü ortamlarına bitki büyüme düzenleyicileri ve diğer faktörler eklenerek rejenerasyon kontrol edilmektedir. Çeşitli *Pisum sativum* L. (bezelye) eksplantlarında, olgunlaşmamış yapraklardan [64], kotiledon nodlarından [65], hipokotillerden [66], embriyolardan [67], fidelerin çeşitli organlarından [68] ve protoplast kültürlerinden [69] organogenez ve embriyogenez yoluyla rejenerasyon rapor edilmiştir [70]. Soya fasulyesi [71], bezelye [72], yonca [73], börülce [74], yer fıstığı [75], güvercin bezelyesi [76], üçgül [77] ve mercimek [78, 79] için çeşitli rejenerasyon protokolleri uygulanmıştır.

Doku veya protoplastlardan kalluslar aracılığıyla indirekt rejenerasyon Leguminosae familyası üyelerinin birçoğu için etkili değildir. Taneli baklagiller için geliştirilen çoğu metod olgunlaşmış ya da çimlenmekte olan embriyo eksenlerinden gelişen dokuyu kullanır. Birçok durumda, bu dokular adventif rejenerasyona izin verir, rejenerasyon eksenlerden elde edilen aksillar sürgünlerin büyümesine bağlıdır [80].

Embriyojenik eksenlerden elde edilen transgenik bitkiler, taneli baklagillerde en başarılı transformasyon sistemleri elde edilmesine izin vermiştir [70,71]. Gövde nodal segmentleri ya da kotiledon-hipokotil bölümleri [81] ve apikal eksplantlar [82,83] gibi eksplantlar terminal ve aksillar meristemlere sahiptirler ve bu yüzden yüksek sürgün rejenerasyon kapasiteleri bulunmaktadır.

## 2.5. Nohutta Doku Kültürü

Nohut rejenerasyonunda, kallus fazı olmaksızın organogenez [84, 85, 86], kallustan elde edilen organogenez [5, 87, 88], kallus fazı olmaksızın somatik embriyogenez [89,51] ve kallustan elde edilen somatik embriyogenez [90-95] olmak üzere toplam dört metot uygulanmıştır.

Kallus fazı olmaksızın organogenez kullanımı çoklu sürgün indüksiyonunda en başarılı bulunmuştur.

Nohutta genotip, eksplantlar, büyüme düzenleyicileri, sıcaklık, nem, fotoperyot ve sulama gibi çeşitli fiziksel faktörlere komple rejenerasyon bağımlılığı nedeniyle rapor edilen rejenerasyon protokolleri tekrar edilebilir şekilde yaygın değildir. Buna ek olarak oluşan sürgünlerle ilgili kök uyarımı ve bitkiciklerin aklimatizasyonu dış çevrede başarılı değildir. Bu yüzden çoklu sürgün metodu kullanılarak *in vitro* koşullar altında optimize etmek ve arttırmak yararlı görülmüştür. Yousefiara ve ark. (2008) [95] 0,1-0,2 mg/L TDZ, 1-2 mg/L BAP ve 1-2 mg/L zeatin uygulamalarını içeren ve B5 ortamının vitaminleriyle desteklenmiş modifiye edilmiş MS ortamında nohutun 3 genotipinin MCC252, MCC505 ve MCC283 baş kısmı kesilerek embriyo eksenleri bütün bitki rejenerasyonu ve çoklu sürgün uyarımını değerlendirmişlerdir. Çoklu sürgün uyarımında en etkili sitokininin BAP olduğunu bulmuşlardır. Sürgünler, büyüme düzenleyicisi bulunmayan ortamda uzatılmış ve ¼ MMS tuzları ve B5 vitaminleri, % 3 sukroz, % 8 agar ve 0,4 mg/L IBA bulunan ortamda köklendirilmiştir. 0,4 mg/L IBA içeren ortam en yüksek köklenme frekansı ile sonuçlanmıştır. MMC252 ve MMC505'li genotipler 2 mg/L BAP ve MCC283'te 2 mg/L zeatin ortamı sürgün uyarımında yüksek frekans oluşturan en iyi ortamlarda kalın yayılan kökler şeklinde köklenmeyi olumlu yönde etkilemiştir. Bitkicikler ilk olarak sıvı ortamda ¼ MMS tuzları ve B5 vitaminleri, % 3 sukroz ve 0,4 mg/L IBA bulunan ortamda 7-14 gün kadar aklimatize edilmiştir, sonra 1:1 oranında kokopit ve perlit ile doldurulmuş saksılara taşınmış ve büyüme sürgün ve kökler daha iyi gelişene kadar büyüme çemberinde saklanmıştır. Böylece saksılara aktarılan bitkilerin yaşama oranının % 70 olduğu rapor edilmiştir [95].

Huda ve ark. (2003) [57] nohutun *C. arietinum* L. kotiledon eksplantlarından organogenez ve kallus indüksiyonu yoluyla çoklu sürgün rejenerasyonunu

başarmışlardır. Kallus indüksiyonu ve farklı sıklıklarda sürgün rejenerasyonu büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarının kullanıldığını gözlemişlerdir. En yüksek kallus oluşumu % 95 oranında 3 mg/L 2,4-D + 3 mg/L BAP + MS üzerinde gözlenmiştir 2mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA bulunan MS ortamının katılaştırılmasıyla kallus başına sürsün sayısı 2,50 olmakla birlikte, sürgünlerin maksimum tomurcuk oluşum yüzdesi % 40 olmuştur. Rejenere olan sürgünlerin % 77'si 1 mg/L IBA içeren yarı güçte MS bazal ortamında en yüksek oranda kök geliştirmiştir. Rejenere olan bitkiler aklimatizasyondan sonra toprağa başarılı bir biçimde yerleştirilmiştir.

Nohutun kotiledon eksplantlarının doku kültürüne alınmasıyla elde edilen bitkiciklerin rejenerasyonu oldukça zor olmaktadır. Barna ve Wakhlu (1993) [90] eksplant olarak kotiledonların kullanılmasıyla herhangi bir sürgün rejenerasyonu gözlemleyememişlerdir. Tek başına oksin türü (2,4-D) veya sitokinin kombinasyonunun (BAP, Kn) % 100 kallus uyarımı yapmakta olduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [96, 97, 98]. Huda ve ark (2003) yaptıkları bu araştırmalarda sitokinin olmaksızın 2,4-D'nin kallus uyarımı yaptığını gözlemlemişlerdir [57]. Fakat daha iyi proliferasyon için oksin (2,4-D, NAA ve IAA) ve sitokinin (BAP, Kn) gerektiği ve aynı zamanda yalnız başına 2,4-D'nin kök oluşumunu teşvik ettiği gözlemlenmiştir. Huda ve ark. (2003) farklı konsantrasyonlarda BAP ya da Kn ( 0.5-3 mg/L) bulunan ortamlarda herhangi bir sürgün üretememiştir, fakat 0.5 mg/L Kn ya da 0,1 mg/L IAA ile birlikte kök üretmişlerdir. BAP ya da Kn, oksinle (NAA ve IAA) kombine edildiğinde kallustan sürgünler üretildiği rapor edilmiştir [57]. Anil ve ark 1986 [99] IAA eklenmesiyle nohutun hipokotil eksplantlarının sürgün ucundan çoklu sürgün oluşumunun arttığını rapor etmişlerdir. İslam ve Riazuddin (1993) [100] nohutun hipokotil eksplantlarından elde edilen kallus kültüründen sürgün oluşumunda farklı konsantrasyonlarda BAP ve IAA kullanmışlardır.

Nohut, *Cicer arietinum* L., önemli bir daneli baklagil bitkisidir. Bu bitkide somatik embriyolar ve sürgünler düşük frekansta rejenerasyon gösterir ve *in vitro*da yetiştirilen bitkiciklerin toprak üzerine transferinde hayatta kalma şansı azdır [87,94]. Doku kültüründe yetiştirilen bitkiciklerden yaşayanların toprağa transfer edilmesi büyük bir engel olarak kalmıştır. Son zamanlarda vermikülit/toprağa transfer edilen ve kültür odasının steril koşullarında ve kontrol altında yetiştirilen bitkiciklerin % 60 - 80'inin

hayatta kaldığı rapor edilmiştir [101]. Direkt olarak olgunlaşmamış kotiledonlardan [84] ya da kotiledon benzeri yapılar (CLS) yoluyla [102,84], kotiledon nodları, sürgün uçları [103], baş kısmı kesilen embriyolar [104,105] olgun tohumlardan [101] sürgün rejenerasyonu rapor edilmesine rağmen, yaprakçıklardan [100,93] ve olgunlaşmamış kotiledonlardan [91,106] somatik embriyogenez rapor edilmiştir. Ghianti ve ark. (2010) nohutun olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından direkt somatik embriyogenez ve bitki rejenerasyonunu rapor etmişlerdir [107].

Singh ve ark. (2002) [85] nohutun embriyo eksenlerinin plumular uçlarının kesilmesiyle elde edilen çoklu sürgün rejenerasyonu farklı konsantrasyonlarda Thidiazuron (TDZ) ( $0,1-10\text{mg dm}^{-3}$ ), BAP( $0,5$  ve  $1\text{ mg dm}^{-3}$ ), Kn ( $0,5$  ve  $1\text{ mg dm}^{-3}$ ) ya da Zeatin ( $2,0-4,0\text{ mg dm}^{-3}$ ) bulunan MS ortamında değerlendirmişlerdir. C235, ICC12269, ICC4951, ICC11531, BG256 genotipli ve bir lokal kültivardan elde edilen eksplantların % 100'ünde çoklu sürgünler üretildiği gibi,  $0,2\text{ mg dm}^{-3}$  TDZ en etkili sitokinin olarak bulunmuştur. Sürgünler büyüme düzenleyicileri bulunmayan ortamda uzatılmış,  $\frac{1}{4}$  MS tuzları bulunan MS ortamında 12-15 gün aklimatize edilmiş ve toprakla dolmuş saksılara transfer edilerek daha sonra tarlaya taşınmıştır. Bu işlemde yaşayanların % 70'ten fazla olduğu, bitkilerin normal olarak geliştiği, fertil çiçeklerin ve tohumların üretildiği rapor edilmiştir.

## 2.6. *Agrobacterium* Aracılığıyla Transformasyon

*Agrobacterium* cinsinin üyeleri toprak mikroflorasının eşsiz bir bileşenidir, büyük çoğunluğu saprofitiktir, genellikle çürümekte olan organik madde üzerinde yaşamaktadırlar ve Gram negatif bir bakteridir [108]. *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* çeşitli bitki türlerinde transgenik bitki üretmek için en sık kullanılan gen aktarım ajanlarıdır [109]. Bu bakteriler bitki patojeni olarak da bilinmektedirler. Her iki bakterinin yapmış olduğu hastalıkla da stabil parça entegrasyonu (transfer edilen ya da T-DNA) ve transferine neden olur, alıcı bitki genomlarına T-DNA entegre olabildiğinden bakteriden kök uyarıcı Ri ve tümör uyarıcı Ti parçası T-DNA sınırları arasına sokulan yabancı genler bu açıdan önemlidir. Yabancıl tip *Agrobacterium*'dan elde edilen plazmidlerde T-DNA üzerindeki onkojenik genlerin ifadesi normal olarak tümör oluşumuna geçmeksizin bitki hücrelerinin fizyolojisini değiştirir. Bununla beraber, böyle genlerin çıkarılması Ti ya da Ri plazmidlerinin silahsızlandırılmasıyla

sonuçlanır, içsel büyüme düzenleyicilerinin dengesini etkilemeksizin bitki hücrelerine yabancı genler sokulur. Daha sonra böyle hücreler fenotipik olarak normal bitki hücrelerinde rejenere olmayı teşvik eder [80].

*Agrobacterium tumefaciens*, yaygın bir toprak bakterisidir ve alemler arası gen transferi yapmakta olağan üstü yeteneği bulunmaktadır [108]. *Agrobacterium* önemli derecede geniş organizma gruplarına gen transferi yapabilir. Çok sayıda monokotil ve dikotil Angiospermleri ve Gymnospermlere ek olarak *Agrobacterium*, mayaları, Ascomycetes ve Basidiomycetesleri içeren fungusu transforme edebilir [110]. Bununla birlikte dikotiledonlu bitkilerin bir kısmı ve monokotiledonlu bitkilerin çoğu *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı oldukça inatçıdır [111].

*Agrobacterium tumefaciens* dikotiledonlu bitkilerin genomlarında tümör oluşumunu uyaran (Ti) plazmidinin bir parçasının spesifik olarak girdirilmesiyle hayati önemde bir mekanizma geliştirmektedir. T-DNA bölgesi çift sarmal Ti ve Ri plazmidi üzerinde bulunan ve bakteriden bitki hücresine aktarılarak bitki genomuyla birleşen küçük bir DNA parçasıdır [112,113]. DNA transferi için esansiyel olan genler Ti plazmidinin virülens (*vir*) bölgesi içinde kodlanır. T-DNA tümör uyaran büyük bir (Ti) plazmidi içinde kodlanır ve bunun uçlarında bulunan 25 kb'lik korunmuş sınır dizi ile belirlenebilir. Bu sınır dizi, DNA transferi için önemli olan ve sadece cis ya da trans hareket eden elemandır [111]. Bu stratejinin temelinde, *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla genlerin girdirilmesi için değişik yöntemler tasarlanmıştır, bu yöntemlerin büyük çoğunluğunu ikili vektör sistemi oluşturmaktadır [114].

*vir* genleri tarafından kodlanan birçok protein *Agrobacterium* aracılı transformasyonda önemli rol oynamaktadır. Bu bölgenin aynı bakteri hücresinde, ancak başka bir plazmid üzerinde bulunduğu zamanda T-DNA aktarımının gerçekleşmesi için onun trans hareket eden bir yapıda olduğunu göstermektedir [116,117]. T-DNA'nın dışında ve sol sınıra yakın olan, yaklaşık 30-40 kb uzunluğunda virülens (*vir*) bölgesi T-DNA aktarımında mutlak gerekli olan altı ana operon *virA*, *virB*, *virC*, *virD* ve *virG* ve gerekli olmayan diğer iki operon *virF* ve *virH*' de meydana gelmektedir.

*Agrobacterium*'dan T-DNA aktarımı dört ana aşamada gerçekleşmektedir.

1. *Agrobacterium*'un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması

2. Virülens genlerinin uyarılması
3. T-DNA transferi ve
4. T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonudur [31].

Bitki transformasyonu daima etkili transgen ifadesiyle sonuçlanmaz. T-DNA ayrıca bitki genomunun uygun ve sessiz bölgelerine entegre olabilir. Entegre olan T-DNA'nın genom içindeki pozisyonu aktarılan genlerin ifade edilebilme yeteneğini oluşturur. T-DNA transkripsiyonel aktivasyon elemanları ya da enhansırlardan uzağa veya yakına entegre olabilir. Transgenleri taşıyan T-DNA'nın aktivasyonu ile sonuçlanır [110].

*virG*'nin kopyasındaki bir artış *vir* gen ifadesinde bir artışla sonuçlanır [118]. Gen ifadesindeki bu artış çok kopyalı plazmidle ilgili *virG*'nin varlığında gözlenen bitkilere DNA aktarımının daha yüksek etkinlikte olmasından sorumludur [118,119].

Bitkiler farklı uyarma yeteneğinde ve hücrel konsantrasyonlarda çeşitlilik gösteren farklı indükleyici moleküller üretmektedir. Bu çeşitlilikte, farklı konukçularda *vir* gen ifadesinde farklılıklara yol açar, bundan dolayı *Agrobacterium tumefaciens* karşı duyarlılıkları da etkilemektedir. Bakterinin başarılı bir enfeksiyon için esas olan yeterli T- zincir DNA'sının sentezlenmesinde ve transferindeki yeteneksizliği nedeniyle düşük seviyede *vir* gen ekspresyonu bitkiyi inatçı yapabilmektedir. Hansen ve arkadaşlarının (1994) [119], yaptığı çalışma bu sonucu desteklemektedir. *vir* genlerinin konstitütif ifadesi *Agrobacterium tumefaciens*'in transformasyondaki etkinliğinin önemli derecedeki artışına ve daha da önemlisi *Agrobacterium tumefaciens* ırkının konakçı çeşidinin genişlemesine yol açmıştır. Ke ve ark. (2001) [111] modifiye edilmiş *Agrobacterium tumefaciens* ırkları kullanarak soya fasulyesi ve pirince DNA transferinde bu sayede önemli bir artış gözlemlemişlerdir.

### **2.6.1. *Agrobacterium*'la Gen Transferinin Avantajları ve Dezavantajları**

*Agrobacterium* arzu edilen genetik özelliklerin hızlı ve etkili bir şekilde bitkilere aktarımı için genetik olarak değiştirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı T-DNA'nın direkt dağılımı üzerinde önemli avantajlara sahiptir; Bitki genomuna bireylerin bir veya birkaç kopyasının girdirilmesi, girdirilen genlerin yüksek ifade edilmesi, aktarılan genlerin daha az fragmentasyonu yani daha uzun DNA

aktarılmasını sağlar [120,121], ek olarak *Agrobacterium* partikül bombardımanı protokolüyle karşılaştırıldığında uygun bitki türlerinde çok daha etkili bir transformasyon aracıdır [122].

*Agrobacterium* ırkları, bakteri indüksiyonu, bakteri konsantrasyonu, kokültür süresi ve yaralama prosedürü gibi sistematik analizler gibi çok sayıda uygulama, türlerin transformasyonunu önemli derecede etkilemektedir [123]. Ayrıca *Agrobacterium* kullanılarak bitki dokusunun başarılı transformasyonu bakteriyel enfeksiyon, konak seçimi ve hedef dokunun transformasyon yeteneği gibi birkaç faktöre dayanır [124].

En önemli dezavantaj *Agrobacterium*'un konakçı spesifik olmasıdır. Belli bitki türlerinde düşük transformasyon etkinliğiyle sınırlanır [125]. Konak doku spesifik *Agrobacterium*'la birleşen düşük transformasyon etkinliği gibi çeşitli problemlerin üstesinden gelinmiştir. Bunlar *Agrobacterium tumefaciens* ırklarının virülensinin değiştirilmesi [126,127] enfeksiyon alanlarının sayısının artırılması için eksplant dokuların sonikasyonu [124,128] ve ko-kültür ortamına thiol bileşiklerinin eklenmesini [129,130] kapsar.

## 2.7. Baklagillerde Transformasyon

Baklagilleri transforme etmek diğer türleri transforme etmekten daha zordur. Baklagiller *in vitro*da transformasyon ve rejenerasyona karşı bir hayli genotip spesifik olduğundan rekalsitrant (inatçı) olarak düşünülür ve sadece nadiren rejenerasyona karşı istekli varyeteler kültive edilebilmektedir. Buna ek olarak rejenerasyon oldukça yavaş ve transformasyon frekansı (her bir eksplanttan üretilen transforme olmuş bitkilerin sayısı) oldukça düşüktür. Birçok baklagil türünde somatik embriyogenez ya da organogenezin uyarımı zordur. Totipotent hücrelerin kaynağı olarak mersitematik hücre kültürlerinin kullanımı transformasyon metodlarının bir çeşidi olarak rapor edilmiştir.

Daneli baklagiller bir grup olarak başka dikotiledonlu bitkilerin çoğuyla karşılaştırıldığında, özellikle Solanaceae üyeleriyle, *in vitro* genetik manipulasyonu kabul etmeye en az istekli gruptur [131]. Soya fasulyesi stabil olarak transgenik bitkiler elde edilen ilk daneli baklagildir. *Phaseolus* ve *Vigna* cinslerinin genetik mühendisliği Nagl ve ark. (1997) [132] tarafından gözden geçirilmiştir. Baklagillerde herbisitlere karşı direnç [70,83], böceklere karşı direnç [70,133] ve tohum proteinlerindeki

metiyonin oranını değiştirerek arttırmak, istenen özellikteki gen integrasyonlarıdır. [134].

Baklagiller için birçok transformasyon metodu denenmiştir. Ancak daha çok *A. tumefaciens* enfeksiyonu ile transformasyon yaygındır. *İn vitro* koşullardaki doğasından dolayı daneli baklagillerde transformasyon başarısı sınırlanmaktadır [135]. Buna rağmen, soya fasulyesi [136,137], bezelye [66], yer altı yoncası [138] ve nohut [107,139] gibi baklagillerde *Agrobacterium* aracılı transformasyon gösterilmiştir. *Medicago sativa* (yonca) gibi *in vitro* somatik embriyogeneze istekli türlerde *A. tumefaciens* ile eksplant kokültivasyonuna dayanan, göreceli olarak hızlı ve etkili transformasyon sistemleri geliştirilmiştir. *Agrobacterium* aracılı transformasyon kullanılarak transgenik *Arachis hypogaea* (yer fıstığı) bitkileri rapor edilmiştir. Ayrıca doku kültürü bağımsız transgenik yer fıstığı (*A. hypogaea* L. cv. TMV-2) bitkileri üretilmiştir. İlk transformantların yanı sıra T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> generasyon bitkilerinin moleküler özellikleri yer fıstığında yabancı genlerin girişini ve kalıtımını doğrulamıştır [140]. *Lotus japonicus*' un *Agrobacterium* aracılı transformasyon protokolü eksplant olarak hipokotil segmentlerinin kullanılmasıyla yapılmıştır [141]. *Lens culinaris* M.'in (mercimeğin) çeşitli dokularında sürgün apeksi, epikotil, kökleri [142], nodal segmentleri [143], kotiledon nodu [144], embriyojenik eksenleri [145], *Agrobacterium* aracılı transformasyon ve partikül bombardımanı kullanılarak geçici *gus* geni ifadesi rapor edilmiştir [146]. Bu çalışmaların hiçbirinde stabil olarak transforme edilen bitkiler rapor edilememiştir. *İn planta* elektroporasyonu uygulamasıyla [147], partikül bombardımanı yoluyla [148] ve *Agrobacterium* aracılı transformasyonla [149] mercimek stabil olarak transforme edilmiştir.

Geçen 10 yıl süresince, bitki hücrelerine yabancı DNA girdirmek için *A. tumefaciens*'e alternatif olarak *A. rhizogenez*'i geliştirmeye ilgi gösterilmektedir. Transforme olmuş köklerden bitkiler elde edilmesi bu sistemin en önemli özelliğidir. Porter (1991) [150] farklı *A. rhizogenez* ırkları kullanarak *Glicine* türlerinde, *P. vulgaris*'te, *Pisum sativum*'da, *Vicia faba*, *V. sativa*, *Vigna aconitifolia* ve *V. unguiculata*'da transforme edilen köklerin uyarımıyla alakalı literatürleri gözden geğirmişlerdir. Örneğin *Cicer arietinum* [151,152] ve *Lupinus angustifolia* ve *L. mutabilis*'te [153] transforme olmuş köklerin uyarımı rapor edilmiştir. *Vigna aconitifolia*'dan [154] ve yabancı soya fasulyesi *Glicine canencens* [155] ve *G. argyrea*'nın [156] köklerinden transforme olmuş, bitkiler

sadece kültür edilenlerden rejenerere olabilmıştır. Kültür edilen bezelyenin saçlı köklerinden sınırlı başarı rapor edilmiştir [134]. *Vicia faba*'nın 8 farklı kültürvarından kotiledon dokuları ve gövde segmentleri Ri plazmidi ve neomisin fosfotransferaz taşıyan *A. rhizogenez* ile enfekte edilmiştir, ancak transforme olan köklerin rejenerasyonu rapor edilmemiştir [157]. Yine Pickard ve ark. *Vicia narbonensis*'in epikotil segmentleri ve sürgün uçlarını higromisin fosfotransferaz kodlayan plazmid taşıyan *A. tumefaciens* ile ko-kültivasyon yapmışlardır. İnoküle edilen eksplantlar higromisin içeren ortama taşınmış ve bunların % 18'inin higromisin dirençli kallus olduğu rapor edilmiştir. Ancak bu eksplantlardan elde edilen putatif olarak transforme edilmiş higromisin dirençli kallusların varlığı ilkin kanıt olarak gösterilmesine rağmen, transgenik bitkiciklerin elde edilmesi Pickard ve ark. tarafından rapor edilememiştir [158].

Çok sayıda baklagil türü mikroenjeksiyon, elektroporasyon ve mikroprojektil bombardımanı [159] gibi doğrudan DNA aktarım yöntemleriyle transforme edilmiştir. Mercimek kök protoplastlarından plazmid DNA'nın ko-elektroporasyonu Maccarrone ve ark. tarafından (1995) [160] rapor edilmiştir.

*In planta* teknikleri hücre süspansiyon veya protoplastlardan ya da kallustan elde edilen sürgün üretimine dayanmadığından rejenerasyon avantajına sahiptir. Potansiyel olarak bu metodlar daha hızlıdır, hücrelerin ve doku kültürünün karmaşıklığından kaçınır ve somaklonal varyasyon olasılığını azaltır. Oger ve ark. (1996) [161] *L. japonicus* için *A. tumefaciens*'e dayanan bir *in planta* protokolü anlatmışlardır. Bu metod kotiledon bağlanma bölgelerine doğrudan inokulasyonu içerir. Bitkinin rejenerasyon kabiliyetinden yararlanarak kendiliğinden transforme olmuş sürgünleri üretir. Benzer bir prosedür soya fasulyesi [162] ve nohutta [163] geliştirilmiştir.

Biyolistikle birlikte *Agrobacterium* aracılı transformasyonun birleştirilmesi ilginç bir bakış açıdır. Bu yüzden, Hansen ve Chilton (1996) [164] yeni bir sistemden, agrolistikten bahsetmişlerdir.

Tahıl ve baklagil bitkilerinin her ikisinde de seçilebilir markırlar olarak herbisit tolerans genleriyle birlikte antibiyotik direnç geninin yerleştirilmesi transformasyon etkinliğini büyük ölçüde arttırmıştır [165,166,70]. BASTA seleksiyon için ilk kez ve *bar* geni

güçlü bir seleksiyon ajanı olduğundan en yaygın kullanılan herbisittir (gluphosinate veya phosphinotricin). Bezelyede rejenerasyon organogenez yoluyla olmuştur ve transforme edilen bitkiler 15 mg/ml ppt ile seçilmiştir. Bar ve neomisin fosfotransferaz (*nptII*) genleri kullanılarak ilk transgenik bezelye bitkileri elde edilmiştir ve sonraki nesillerin döllerinde ifade edilmiştir. Tipik 3:1 oranında Mendel kalıtımı göstermiştir. Rejenere olan bitkilerin transformasyonu *nptII* ve *ppt* probu kullanılarak ve northern blot analizi ile değerlendirilmiştir. Tarla uygulamasında BASTA herbisiti ile spreylendiğinde transforme olan bitkiler direnç gösterdiği rapor edilmiştir [70]. *gus* veya *uidA* geni glukuronidaz enzimi (GUS) ifade eder ve kimerik gen yapıların belirteci olarak veya bitkilerde basit bir şekilde geçici ekspresyonu değerlendirmekte çok sık kullanılmaktadır. GUS bununla birlikte transformasyonun hızlı ve etkili bir şekilde ölçülmesine izin vermesine rağmen, rejenerasyon ve seleksiyonun etkili bir şekilde taranmasını sağlayamaz.

## 2.8. Nohutta Gen Transferi

Nohuta spesifik genlerin aktarılması genetik mühendisliği yoluyla başarılmıştır. Günümüzde nohutun transformasyonu ile ilgili sadece birkaç rapor mevcuttur [136]. Nohut bitkileri kök uyaran *Agrobacterium* ırklarıyla birlikte muamele edildiğinde saçak kökler elde edilirken [152], *Agrobacterium*'un yabani ırkları kullanılarak transforme olmuş kalluslar elde edilmiştir [167, 168].

Nohut ilk kez Fontana ve ark. (1993) [104] tarafından transformasyon yapılmıştır ve bu çalışmada *Agrobacterium* aracılı gen transferi kokültivasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda DNA integrasyonunun varlığı *Southern* hibridizasyonu yoluyla gösterilmiştir.

Sharmila ve ark. (2010) [169] doğrudan DNA transfer metodları rapor edilmesine rağmen, *Agrobacterium* aracılı transformasyonun daha çok tercih edildiğini ve embriyonik eksenlerin kokültivasyonundan elde edilen transgenik bitkilerin üretimi için standart protokoller yayınlandığını rapor etmişlerdir.

Sarmah ve ark. (2004) [26] tarafından *Agrobacterium* aracılı gen transferiyle fasulyenin  *$\alpha$ AI* genini nohutun desi tipine aktarmış ve bu tohumlarda yüksek düzeyde ifade edilen

*αAII* geni *Callosobruchus maculatus* ve *C. chinensis*' in gelişimini engelleyerek büyük bir direnç oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Yöntemde kanamisin seleksiyonu kullanılmıştır. Transgenik nohut tohumlarındaki *αAII*'in varlığında *C. maculatus*'un yumurta verimi % 90 oranında azaldığını rapor etmişlerdir.

Akbulut ve ark. (2008) [163] nohut fidelerinde *in planta* transformasyon tekniklerinin etkinliğini araştırmayı amaçlamışlardır. Sıvı indüksiyon ortamındaki kokültivasyon periyodu (2, 8, 16, 24 h), pJK136 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 ve ark. (2004) [170] Phosphinotricine - acetyltransferase (*pat*) ve aspartat kinaz (*AK*) genleri kullanılarak transgenik nohut üretimi için etkili ve güvenilir bir antibiyotik olmayan seleksiyon stratejisi geliştirmiştir.

Yine Polowick ve ark. (2004) [56] nohutun *Agrobacterium* aracılı transformasyonunu yapmışlardır, gen integrasyonu, ifadesini ve kalıtımını rapor etmişlerdir.

Diğer daneli baklagiller gibi nohutun embriyonel eksenin kotiledon nodu ve apikal meristeminin meristematik hücreleri daha önce birçok araştırmacı tarafından genetik transformasyon için kullanılmıştır [26, 56, 105, 139, 170, 171, 172]. Bununla birlikte transformasyon frekansı etkili biyoteknolojik uygulamalar için yeterli bulunamamıştır.

Daha önceki raporların çoğunda *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarım metodu kullanılmıştır. Ancak nohutun transformasyonu için partikül tabanca bombardımanının kullanılması ile ilgili bazı raporlarda transformasyon frekansı oldukça düşüktür [170,45]. Taneli legümenlerin moleküler genetik çalışmalarındaki ilerlemeler, özellikle nohutta, gen ifadesi promotör analizi ve ürün geliştirmekte genlerin ifadesi için etkin genetik transformasyon metodları gereklidir. Bu yüzden, nohutta basit hızlı, yüksek frekansta transformasyon sisteminin gelişimi partikül bombardımanı yoluyla yapılmıştır. Bazı araştırmacılar *Agrobacterium* aracılı transformasyon sistemini daha az etkin bir metod olarak rapor etmişlerdir. Indurker ve ark. (2006) [48] *Bacillus thuringiensis*'in insektisidal kristal protein geni *cryIAc*' i partikül bombardımanı

yöntemiyle nohuta stabil olarak aktarmışlardır. Nohutta *Agrobacterium* aracılı transformasyonun kullanıldığı daha önceki çalışmalardaki düşük transformasyon frekansı ile karşılaştırıldığında bu çalışmada epikotil eksplantlarının partikül bombardımanı kullanarak *C. arietinum*'da çok yüksek transformasyon frekansı (% 18) olduğu rapor edilmiştir. Transgenik T<sub>0</sub> bitkileri kontrol bitkileriyle karşılaştırılarak *Heliothis armigera* ve *Spodoptera litura* larvalarında yüksek ölüm oranı ve bunlara karşı daha fazla koruma geliştiğini göstermişlerdir [48].

Hüsnain ve ark. (1997) [173] partikül bombardımanı yoluyla nohutun zigotik embriyo aksisindeki gen dağılımını etkileyen çeşitli faktörleri, sürgün ve köklerden elde edilen embriyo eksenini kullanarak *nptII* ve *uidA* genlerini çalışmışlardır.

Yine Kar ve ark. (1997) [45], olgunlaşmış tohumların sürgün ve kök meristemini uzaklaştırılmasıyla embriyo eksenini ve sürgün apeksini deneysel materyal olarak kullanarak, bombardıman yöntemiyle CryIA seleksiyon markırı olarak *nptII* geni içeren plazmidle birlikte transformasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu eksplantlar MS makrotuzları ve 4X MS mikrotuzları, B5 vitaminleri, 0,004 mg/L NAA, 30 mg/L sukroz bulunan ortamda bombardıman yapıncaya kadar 24 saat kültüre almışlardır. Gen aktarılmış kanamisin dirençli nohut bitkileri bombardımanın tekrarlanan seleksiyonuyla ve çoklu sürgün yoluyla elde etmişlerdir.

Diğer transformasyon çalışmalarında olduğu gibi nohutta da, transformasyon frekansı eksplant tipine, kültürlere ve kullanılan plazmidlere bağlıdır [48].

## **2.9. Sonikasyon Yardımlı *Agrobacterium* Aracılı Transformasyon (SAAT)**

### **2.9.1. Sonikasyon (Ultrason, Sonoporasyon)**

*Agrobacterium*'un hedef dokulardaki özel hücrelere varma yeteneksizliği ve konak özgülüğü *Agrobacterium* aracılı bitki transformasyonunu sınırlayabilir. Dikotiledonlar, monokotiledonlar ve gymnospermler gibi çeşitli bitki gruplarında bu gibi engellerin üstesinden gelen ve DNA transferini arttıran *Agrobacterium* aracılı transformasyona dayanan yeni ve etkili bir teknoloji belirlenmiştir. Bu yeni teknoloji, sonikasyon yardımlı *Agrobacterium* aracılı transformasyon (SAAT) olarak adlandırılmaktadır. *Agrobacterium* varlığında bitki dokusunun kısa ultrason periyotlarına tabi tutulmasını

içermektedir [174]. Taramalı elektron ve ışık mikroskobu SAAT uygulamasının küçük ve birbirine benzeyen yarıkları ve *Agrobacterium*'un bitki dokularına kolayca girebilmesi için doku boyunca kanallar oluşturduğunu göstermektedir [128,175].

### 2.9.2. SAAT Uygulamasının Avantajları

Bitki hücrelerinde kalın ve sert bir hücre çeperi bulunmaktadır. Sonikasyon bitki protoplastlarına ve tam bitki hücrelerini etkili bir şekilde transforme etmek için kullanılan yeni bir methodur [176,177]. Birçok araştırmacı tarafından ultrason kullanımının bitki hücrelerine ve protoplastlarına nükleik asitlerin geçişini kolaylaştırdığı açıklanmıştır [178,179,180].

SAAT uygulaması rekalsitrant bitkilerde transformasyon oranlarını arttırmaktadır. Bu *Agrobacterium* dağılımının etkinliğinin transformasyon ve enfeksiyon aşamasına karışan faktörleri aydınlatmaya yardım eder.

SAAT olgunlaşmamış kotiledonlar, somatik ve zigotik embriyolar, kökler, hücreler, sürgün uçları, embriyojenik süspansiyon hücreleri, bütün tohumlar ve yaprak dokularını da içeren birçok farklı bitki dokusunda geçici transformasyon etkinliğini artırır [181].

Bu yöntem diğer transformasyon metodlarına benzemez. Bu sistem birkaç hücre tabakasına gömülmüş meristematik dokularda transformasyon etkinliğine sahiptir. SAAT uygulanmayan kotiledonların sadece yüzeyinde bakteriler gözlemlenirken SAAT uygulanan dokularda, epidermal hücrelerde şiddetli bir şekilde kolonileşme olmuştur. Hücrelerin çoğunda ve ayrıca subepidermal hücrelerde de çok sayıda bakteri gözlemlenmiştir. Bazı durumlarda 7-8 hücre tabakasına kadar girebilmektedir, kolonilerin bazıları subepidermal hücreleri hem sarmış hem de bütün hücelere bitişiktir. Bu SAAT'in komşu hücrelerde zarar olmaksızın çok bölgeleşmiş derin mikro yaralanmaya izin verdiğini göstermektedir. Kotiledon nodları ve sürgün meristemleri gibi alt yüzeyler transformasyon için hedeflendiği zaman bu daha derin olan yaralar avantajlıdır. Çok sayıda kolonize olmuş hücrelerin varlığıyla bütün hücelere bitişik sağlıklı hücreler, komşu kolonileşmiş hücrelerin içinden gelen *Agrobacterium* tarafından transforme edildiği rapor edilmiştir [173].

Kimyasal olarak uyarılan transformasyonlar, elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül bombardımanı gibi SAAT dışındaki diğer transformasyon metodlarının her biri çeşitli eksikliklere sahiptir. Polietilenglikol gibi kimyasal olarak uyarılan transformasyon bitkilere karşı çoğu zaman toksiktir. Elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül bombardımanı yoğun iş gücü, ve karmaşık ekipman gerektirir, pahalıdır ve düşük seviyede transformasyon elde edilmektedir. Elektroporasyonu tüm bitkilere ve bütün hücrelere uygulaması zordur. Partikül bombardımanı gen parçalarını ve aynı genle bağlantılı diğer genlerin çoklu gen kopyalarını girdirmeye eğilimlidir, bu yüzden çok sayıda bitkide istenen özelliklerin ifade edilmesi ısrarla sınırlanmaktadır. Bu metodlarla bitkilere aktarılan çoklu gen kopyalarının bütün insertleri farklı lokasyonlardadır ve bu yüzden sıklıkla gen ifade edilmez. Bununla birlikte DNA insertlerinin ne kadar kopyası olduğu ve nerede olduğunu kontrol etmek zordur. Aynı zamanda hedef doku yüzeyin altında bulunduğundan partikül bombardımanı oldukça düşük bir etkinliğe sahiptir [181].

SAAT oldukça kolaydır ve düşük maliyetli bir methodtur. Esas olarak düşük hassaslıkta ve hassas olmayan *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonun etkinliğini artırır.

Dokular SAAT uygulamasına geniş ölçüde cevap göstermesine rağmen doku daha uzun SAAT uygulamalarıyla zarar görür ve doku kültürü cevabı azalır. Bu açıdan uygulamalarda minimum SAAT süresi en çok istenmekle beraber yüksek düzeyde GUS ifadeleri elde etmek önemlidir.

Sonikasyon yapılan eksplantlar mekanik ve kimyasal etkilere maruz kalmaktadır. Bu etkiler çoğu zaman SAAT uygulamasından sonra doku kültürüne alınan eksplantlarda kahverengileşme ve kallus oluşturma şeklinde gerçekleşmektedir [124], hatta bazen eksplantların tamamen ölümüyle sonuçlanır.

### **2.9.3. Baklagillerde SAAT Uygulamaları**

Bitki transformasyonu için *Agrobacterium* kullanımının ana dezavantajı organizmanın konak spesifik olmasıdır ve belli bitkilerde düşük transformasyon etkinliğiyle sonuçlanmasıdır. Ayrıca *Agrobacterium*'u hedef hücre ve dokulara girdirmekte uygulanan yöntemler çoğu zaman yetersiz kalmaktadır ve bu da hem geçici hem de

stabil transformasyon etkinliğini sınırlandırmaktadır. Bu amaçla günümüzde transformasyon çalışmalarında SAAT uygulamasına hızlı bir eğilim görülmüştür. Bu sebeple *Agrobacterium*'la birlikte sonikasyon kullanılarak transformasyon çalışmaları önemini her geçen gün arttırmaktadır ve gelecekte birçok araştırmacı tarafından transformasyon çalışmalarında en çok uygulanan ve pratik bir yöntem olacaktır.

Bitki dokusu üzerinde ve alt yüzeyinde binlerce mikroyara ile sonuçlanan sonikasyonun sebep olduğu deliklerin oluşumu, SAAT metodunun etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu yaralama durumu *Agrobacterium*'un daha derine girmesine izin vererek ve klasik mikroskopik yaralamalardan daha fazla tüm doku boyunca bitki hücrelerinin enfekte edilme olasılığını arttırmaktadır [124,125,182]. Özellikle transformasyon ve rejenerasyona karşı diğer bitki grupları içerisinde en inatçı olarak düşünülen baklagiller sonikasyon yardımıyla *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyona daha olumlu cevap vermekte olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [169].

*Lea* geni (late embryogenesis abundant) ile birlikte *Phaseolus vulgaris*'in *Agrobacterium* aracılı transformasyonda sonikasyon ve vakum infiltrasyon kullanımı ilk teşebbüs olarak rapor edilmiştir. Bu metod transgenik fasulye bitkilerinin üretimi ile ilgili ilk başarılı rapordur ve doku kültürü adımı içermeksizin etkili bir transfer sistemi geliştirilmiştir. *Brassica napus*'tan elde edilen lea proteinine sahip, tuz ve su eksikliği stresi koşulları altında büyüme yeteneği artan transgenik fasulye bitkileri üretildiği rapor edilmiştir [182].

Siyah akasya nitrojen fikse eden orman tarımı özellikleri bakımından değerli, süs, hayvan yemi, kereste ve bal üretimi açısından değerli bir legümen ağacıdır. Herbisit dirençli transgenik *Robinia pseudoacacia* L. (siyah akasya) elde etmekte SAAT temelli bir protokol geliştirilmiştir. SAAT metodunun transformasyonu arttırmadaki etkisi diğer legümenleri de kapsayan birçok tür için rapor edilmiştir [183].

Sonikasyonla oluşan mikroyaralama bitki dokularının içinde derin etkin bir enfeksiyon yapılmasına ve soya fasulyesinin (*Glycine max*) embriyojenik süspansiyon hücrelerinin stabil olarak transformasyonuna izin vermektedir. Partikül bombardımanı ve yalnız başına *Agrobacterium* ile birlikte transforme edilmesi zor olan meristem gibi diğer hedef dokuların transformasyonu, SAAT kullanımıyla kolaylaştırılabilmektedir [124].

SAAT kullanılan soya fasulyesi kotiledonları, sonikasyon yapılmayan dokulardan daha hızlı ve daha fazla kolonileşme göstermiş ve artan transformasyon oranları elde edildiği rapor edilmiştir [125].

SAAT uygulanan soya fasulyesi, Ohio atkestanesi (*Aesculus glabra*), fasulye, beyaz ladin ağacı, buğday ve mısırın çeşitli dokularında geçici  $\beta$ -glukuronidaz ifadesinde 100 kattan 1400 kata kadar bir artış gözlemlenmiştir. Soya fasulyesi ve *Aesculus glabra*'nın embriyojenik süspansiyon hücre kültürlerinde SAAT uygulaması kullanılarak stabil transformasyon elde edilmiştir [174].

Pathak ve Hamzah (2008) nohutta *Agrobacterium* aracılı transformasyonu geliştirmek için etkili ve üretilebilir bir SAAT protokolü rapor etmişlerdir. Sonikasyon yapılmaksızın sadece *Agrobacterium* uygulamasına göre transformasyon etkinliğinin iki kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir [184].

## 3. BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Bitki Materyali

Sonikasyon yardımlı *Agrobacterium* aracılı transformasyon ve rejenerasyon çalışmalarının her ikisinde de bitki materyali olarak yaygın olarak tarımı yapılan lokal nohut kültüvarlarından Beyaz Nohut kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Transformasyon Sırasında Kullanılan Cihazlar

###### 3.1.2.1. Sonikatörler

Araştırma sırasında prob tipi ve banyo tipi sonikatör olmak üzere iki farklı tip sonikatör; kullanılmıştır. 3 farklı sonikatör cihazı ile uygulamalar yapılarak en iyi sonuç alınan sonikatörle deneyler sürdürülmüştür. Bandelin Sonopuls tip UW. 2070 markalı prob tipi sonikatörde otomatik güç, % döngü, zaman ayarları dijital olarak, Sonorex marka banyo tipi (1 A, 220-240 V, p 80/180 W, 35 kHz) sonikatörle sadece dk ayarı manuel olarak ve otomatik dk ayarı olan Selecta marka ultrason cihazı ile sonikasyon yapılmıştır (Şekil 3. 1).

Nohut eksplantlarına yapılan sonikasyon uygulaması, eksplantların ultrasonik dalgalardan en az seviyede hasarlanması ve en yüksek GUS ifadesi için optimize edilmiştir.



Şekil 3.1. Sonikasyon uygulanan cihazlar A) Prob tipi sonikatör; B) Banyo tipi sonikatör

### 3.1.2.2. Vakum İnfiltrasyon Cihazı

Çimlendirilmiş nohut fidelerinin aksenlerinden elde edilen eksplantlara, sadece *Agrobacterium*, *Agrobacterium*-sonikasyon veya *Agrobacterium*-sonikasyon-vakum infiltrasyonu birlikte uygulanmıştır. Vakum infiltrasyonu için değişik negatif basınçlar (200, 250, 300, 400, 500 ve 600 mm Hg) ve süreler (15, 20, 25, 30 ve 40 dk) uygulanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Vakum infiltrasyon cihazı

### 3.1.3. Bitki Doku Kültürü Ortamları

Bitki doku kültürü için MS tuzları ve Gamborg vitaminlerinden oluşan modifiye ortam (MS Gamborg) kullanılmıştır. Ortam 30 g/L sukroz, 0,25 – 0,5 g/L kazein, 1 g/L glutamin ile desteklenmiştir. Çoklu sürgün uyartımı için BAP, kinetin, TDZ ve zeatinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılmıştır. Köklendirme amacıyla IAA, NAA, IBA ve 2,4-D kullanılmıştır. Ortam % 0,8 ultra saf agar ile katılaştırılmıştır. Ortam ayrıca 10 mM MES ile tamponlanmıştır. Nohut embriyo eksplantları transformasyon işlemine tabi tutulduktan sonra gösterilen çeşitli kokültivasyon ortamlarına taşınmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Kokültivasyon ortamına eklenen çeşitli maddeler

Kokültivasyon ortamına eklenen çeşitli maddeler		
a)1. MS Gamborg 2. 10 mM MES 3. 30 g/L sukroz, 4. 400 mg/L sistein 5. 100 µM asetosiringon 6. % 0.8 ultra saflıkta agar 7. 100 mg/L askorbik asit	b) 1. MS Gamborg 2. 10 mM MES 3. 30 g/L sukroz 4. 400 mg/L sistein 5. 100 µM asetosiringon 6. % 0.8 ultra saflıkta agar 7. 100 µg/ml azaserin	c) 1. MS Gamborg 2. 10 mM MES 3. 30 g/L sukroz 4. 400 mg/L sistein 5. 100 µM asetosiringon 6. % 0.8 ultra saflıkta agar 7. 0.5 ppm selenyum

Tohum çimlendirmek için % 0.5 agar içeren, yarı konsantrasyonda, sukroz içermeyen MS bazal ortamı kullanılmıştır. Transformasyon ve rejenerasyon çalışmaları için % 0,8 agar içeren MS Gamborg ortamı kullanılmıştır.

Ortamların pH'sı 5,7-5,8'e ayarlanarak 121 °C'de 20 dk otoklav ile sterilizasyon yapılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaktan etkilenen diğer maddeler filtre sterilizasyonu ile steril edilmiş ve MS ortamına, ortam uygun sıcaklığa ulaşınca eklenmiştir. Doku kültürü ve transformasyon çalışmalarında kullanılan ortamlar Ek A'da gösterilmiştir.

#### 3.1.4. Kültür Şartları

Doku kültürü çalışmalarında 16 saat fotoperiyot, 25 °C sıcaklık uygulanmıştır. Bitki büyütme çemberi olarak Sanyo Gallenkamp markasının SGC097.CFX.f modeli kullanılmıştır. Bitkiler toprağa transfer edildiğinde % 60 nem uygulanmıştır.

#### 3.1.5. Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteriyel Suşlar

*Agrobacterium tumefaciens*'in üç suşu; C58C1/pTJK136 [185], EHA105/pDNEM3300 [126] ve KYRT1/pTJK136 [127] suşları *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. KYRT1/pTJK136 kromozomal Rifampisin (Rif), Karbensilin ve Gentamisin (Gent) direnç genlerini,

C58C1/pTJK136 kromozomal Rif ve Ampisilin (Amp) direnç genlerini, EHA105/pDNEM3300 kromozomal rif direnç genini taşımaktadır.

### 3.1.6. Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Plazmitler

pTJK136 ikili vektörü bakteriyel seleksiyon için streptomisin/spektinomisin adenil transferaz ve *uidA* genini içeren pTHW136'nın bir türevidir. Aynı zamanda kanamisine direnç sağlayan neomisin fosfotransferaz (*nptII*) genini de T-DNA sınırları içinde bulundurmaktadır.

pDNEM3300 binary vektörü bakteriyel seleksiyon için *nptII* genini, bitki seleksiyonu içinde *bar* genini içermektedir. Aynı zamanda şeker pancarından izole edilen *HSI proI* genini de sınırları içinde bulunduran pCAMBIA vektörün bir türevidir. Plazmit haritaları Ek B'de gösterilmiştir.

### 3.1.7. Bakteriyel Kültür Ortamları

YEB ve YEB-MES ortamları gerekli antibiyotiklerle desteklenerek *Agrobacterium* kültürlerinin büyütülmesinde kullanılmıştır (Ek C).

### 3.1.8. *Agrobacterium* İndüksiyon Ortamı

*Agrobacterium* indüksiyonu için çeşitli ortamlar kullanılmıştır. MS bazal tuzları içeren ortama değişik glukoz konsantrasyonları (0,1 g/100 ml, 0,5 g/100 ml ve 1 g/100 ml) ve 20 mM MES eklenerek ortam pH'ı 5.5 e ayarlanmış ve otoklav edilmiştir. Otoklavdan sonra içine 200 µM asetosiringon ve *Agrobacterium* suşlarına uygun olan çeşitli antibiyotikler eklenerek 7-8 saatdan 24 saata kadar değişen sürelerde çalkalamalı inkübatörde 27°C'de 200 rpm'de uyarılmıştır.

Transformasyon çalışmalarında sıvı indüksiyon ortamı olarak ayrıca MMA [56] ortamı da kullanılmıştır. Çöktürülen bakteri MMA ortamında (4,3 g/L MS tuzu, 10 mM MES, 200 µM asetosiringon ve % 2 sukroz, pH 5.6) solüsyon haline getirildikten sonra hazırlanan eksplantlar sonikasyon yapılmıştır. Bakteriyel indüksiyon ortamları Ek D'de gösterilmiştir.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için önce % 70'lik etil alkol ile yıkayıp durulanmıştır. Daha sonra çeşitli konsantrasyonlarda (% 10, 15, 20, 25 ve 30) ve sürelerde (10, 15, 20, 25 ve 30 dk) sodyum hipokloritte bekletilerek sterilizasyon yapılmıştır. En uygun konsantrasyon ve süre belirlenerek deneyler yapılmıştır.

Nohut tohumları (100-120 adet), 500 ml'lik erlenmayer içerisine konulmuş öncelikle % 70 lik etil alkol ile 3 dk çalkalandıktan sonra distile su ile durulanmıştır. Daha sonra % 15'lik sodyum hipoklorit içine 3-4 damla twin-20 eklendikten sonra 30 dk veya % 20'lik sodyum hipoklorit içine içinde 20 dk çalkalanmıştır. Süre sonunda eksplantlar en az 3 kez steril dH<sub>2</sub>O ile iyice durulanmıştır. Durulama suyu döküldükten sonra bir miktar steril dH<sub>2</sub>O içinde 12-16 saat kadar imbibisyon yapılmıştır.

### 3.2.2. Tohum Çimlendirme

Yüzey sterilizasyonu yapılan nohutlar bir gece steril dH<sub>2</sub>O içinde bekletilerek su alıp şişmesi sağlanmıştır. Ertesi sabah nohutların bulunduğu kaptaki su dökülerek tohumlar steril kurutma kağıdına yerleştirilmiş, fazla suları alınarak eksplantların hazırlanması steril kağıt üzerinde yapılmıştır.

Aşağıdaki çimlendirme protokolleri takip edilmiştir.

- Yarı katı MS bazal tuzları bulunan her bir petriye yüzey sterilizasyonu yapılmış 10 adet nohut tohumu yerleştirilmiş ve transformasyondan önce 1-2 gün kadar bekletilmiştir.
- Yüzey sterilizasyonu yapılan ve 16 saat steril distile suda bekletilen nohut tohumları petri kabı boyutuna uygun olarak kesilmiş ve steril edilmiş çift kat kurutma kağıdı üzerine 6 ml su konulduktan sonra yerleştirilmiştir ve burada 1-2 gün kadar çimlenmeye bırakılmıştır.

- Çimlendirmek için 16 saat imbibisyon yapılan tohumlardan nohut embriyoları çıkarıldıktan sonra direkt olarak sukroz bulunmayan MS Gamborg ortamına yerleştirilmiştir.

### 3.2.3. Embriyodan Çoklu Sürgün İndüksiyonu

Bir gece steril distile suda bekletilen nohut tohumlarının kotiledonları açılarak embriyo çıkarılmış, daha sonra da 4-5 gün MS Gamborg ortamında çimlendirildikten sonra embriyonun plumula, radikula ve kotiledonları steril bir bistüri ile kesilmiş ve farklı hormonlar içeren doku kültürü ortamlarına çoklu sürgün uyarılması için yerleştirilmiştir.

Sürgün oluşturma ortamında 2 hafta kalan embriyo kotiledon nodlarından gelişen 1-2 cm uzunluğundaki sürgünler kesilerek alt kültürleri yapılmak üzere sürgün uzama ortamına alınmıştır. Sürgün uzama ortamında uygun uzunluğa erişen sürgünler büyüme düzenleyicisi bulunmayan ara ortama alınarak 1-2 hafta bekletilmiştir. Sürgünler bu aşamadan sonra köklendirme ortamına aktarılmış köklenenler steril edilmiş torf-toprak karışımı bulunan plastik bardaklara aktarılarak saklama kapları içerisinde aklimatize edilmiştir.

### 3.2.4. Transformasyon

Aşağıda belirtilen protokoller *Agrobacterium* temelli transformasyonun etkinleştirilmesi için kullanılmıştır:

- Kotiledon nodları veya olgunlaşmış embriyonun sadece agroinfiltrasyonu,
- Agrobacterium* aracılı transformasyonun etkinleştirilmesi için olgunlaşmış embriyolara sonikasyon uygulaması,
- Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonun etkinleştirilmesi için olgunlaşmış embriyolarda sonikasyon ve vakum infiltrasyon tekniklerinin birlikte kullanılmasının etkisinin araştırılması

- *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonun etkinleştirilmesi için olgunlaşmamış embriyolarda sonikasyon ve vakum infiltrasyon tekniklerinin birlikte kullanılmasının etkisinin araştırılması

#### **3.2.4.1. *Agrobacterium* Aracılığıyla Yapılan Transformasyonlar**

**Eksplant Hazırlığı:** Yüzey sterilizasyonu yapılmış ve yaklaşık 16 saat boyunca steril distile suda bırakılmış, ya da imbibisyon sonrası belirli sürelerde (1-7 gün) çimlendirilmiş nohutların plumul, radikul ve kotiledon kısımları alınmış ve eksplant olarak kullanılmıştır.

**Bakteri Kültürü:** Tek koloniden elde edilen ve uygun antibiyotiklerle hazırlanan 5 ml'lik bakteri kültürü 27 °C'de 200 rpm'de çalkalanarak büyütülmüş daha sonra, 50 ml'lik YEB veya YEB-MES ortamında OD 0.1-1.5 oluncaya kadar büyütüldükten sonra 5000 g'de santrifüj edilmiş ve oluşan pellet 100 ml'lik sıvı indüksiyon ortamına alınmıştır. Bu ortama 100-200 µM asetosiringon ve uygun antibiyotikleri eklenmiş ve bu ortamda 6-7 saatten 24 saate kadar değişen aralıklarda çalkalamalı inkübatörde bakterinin *vir* genlerinin uyarılması sağlanmıştır. İndüksiyon ortamında uyarılan bakterinin de OD.'si ölçülmüş ve 5000 g'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Elde edilen pelletin OD si transformasyon sırasında uygulanılmak istenen değere göre ayarlanmış ve 100-200 µM asetosiringon eklenmiştir. Transformasyon için hazırlanan eksplantlar içinde bakteri bulunan indüksiyon sıvısında 45 dk veya 1.5 saat kaldıktan sonra sadece *Agrobacterium*, *Agrobacterium* + sonikasyon, *Agrobacterium* + vakum, *Agrobacterium* + sonikasyon + vakum infiltrasyonu gibi çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Ayrıca steril bir iğne yardımıyla embriyo yaralanarak transformasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### **3.2.4.2.1. Prob Tipi Sonikatörle Yapılan Uygulamalar**

Ependorf tüplerinin her birine hazırlanan embriyo eksplantlarından 10-12 adet konulmuş ve her bir deney için toplam 100-150 adet eksplant kullanılmıştır. Eksplantlar hazırlanırken eş zamanlı olarak uyarılmış *Agrobacterium* kültürü de hazırlanmıştır. Uyarılmış bakteri kültürü 5000 g'de santrifüj edilmiş ve oluşan pellet 100-200 µM

asetosiringon içeren sıvı indüksiyon ortamında çözülmüştür. Uyarılmış *Agrobacterium* süspansiyonundan 1250 µl sıvı alınarak hazırlanmış olan eksplantların üzerine eklenmiştir. Sonikatör probu % 70'lik alkol ile steril edilmiş ve içerisinde indüksiyon ortamı ve eksplantları bulunduran ependorf tüpe daldırılmıştır.

Uygulanan sonikasyon parametrelerinden sonra, vakum infiltrasyonu işlemine geçilmiştir. Vakum işleminden sonra eksplantlar steril kurutma kağıdı üzerinde kurutulup kokültivasyon ortamına aktarılmıştır (Ek A). Her bir petriye 10-12 adet nohut eksplantı yerleştirilmiştir.

Farklı kokültivasyon süreleri sonunda geçici GUS ifadesine bakılarak kokültivasyonun transformasyon etkinliğini artırıp arttırmadığı belirlenmiştir.

Kokültivasyondan sonra oluşan sürgünler 100 mg/L ticarcilinli sıvı indüksiyon ortamı veya steril dH<sub>2</sub>O ile çalkalanarak yıkanmış ve 1-1.5 hafta kadar değişik oksin ve sitokinin kombinasyonları ve 100-150 mg/L ticarcilin içeren çoklu sürgün oluşturma ortamlarına alınmıştır. Her bir sürgünü oluşturan ana eksplantlar atılmayarak 500 mg/L cefataksim ve hormon içeren yeni bir ortama alınmış ve 2 haftada bir bu ortam yenilenmiştir. Bu işlem 2. ve 3. sürgünler oluşuncaya kadar sürdürülmüştür ve her oluşan yeni sürgün selektif ortama alınarak değerlendirilmiştir.

Çoklu sürgün ortamında oluşan ilk sürgünler, selektif ortama alınarak yaşayan eksplantlar sayılmıştır. C58C1/pTJK136 ve KYRT1/pTJK136 suşları için selektif ajan olarak ortama sırasına göre 100, 150, 200 ve 300 mg/L kanamisin, EHA105/pDNEM3300 suşu için ise 3, 5 ve 10 mg/L ppt eklenerek seleksiyon yapılmıştır. Yaşayan sürgünler için selektif ajanın dozu artırılarak ve ortama cefotaksim eklenerek yeni bir seleksiyon ortamına alınmış ve transgenik olma ihtimali olan sürgünler seçilmiştir. Sürgünler her selektif döngüde 1-3 hafta kalarak dirençli sürgünler seçilmiştir. Seleksiyondan sonra sürgünler içerisinde 250 mg/L cefotaksim ve büyüme düzenleyicileri bulunan rejenerasyon ortamına alınmıştır. Bu ortamda çoklu sürgün oluşturup ve bu sürgünler sürgün uzama ortamına alınarak köklendirilmeye gidilmiştir.

Çalışmada kullanılan prob tipi sonikatörde uygulanan parametreler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Prob tipi sonikatörle uygulanan parametrelere bazı örnekler

Grup sayısı	Süre (sn)	Döngü x10 %	Güç %
1	2	5	25
			50
			75
			100
2	4	5	25
			50
			75
			100
3	6	5	25
			50
			75
			100
4	8	5	25
			50
			75
			100
5	10	5	25
			20
			75
			100

Optimizasyon sonucunda belirlenen sonikasyon parametrelerine optimum bakteriyel konsantrasyon ve vakum parametreleri uygulanmıştır. Çalışma sırasında uygulanan bazı bakteri yoğunluğu ve vakum infiltrasyon parametreleri Tablo 3.3’te gösterilmiştir. EHA105/pDNEM3300 suşunun plazmidi GUS raportör geni taşımadığı için KYRT1/pTJK136 ve C58C1/pTJK136 için uygulanan ve en yüksek GUS ifadesi gösteren parametreler EHA105/pDNEM3300 suşu için de uygulanmıştır.

Tablo 3.3. Uygulanan Bazı Bakteriyel Konsantrasyon ve Vakum infiltrasyon Parametreleri

Uygulama numarası	YEB O.D.	İndüksiyon ortamının O.D'si	Transformasyon Sırasında Uygulanan son O.D.	Uygulanan Vakum infiltrasyon 30Dk/Bar
1	0.130	0.360	1.2	300
2	0.130	0.370	1.5	300
3	0.280	0.600	1.0	300
4	0.360	0.250	0.4	200
5	0.360	0.250	0.4	300
6	0.360	0.250	0.4	400
7	0.580	0,8	>2	250
8	2	2	>2	200
9	2	0.780	>2	500
10	2	0.3	0.7	400
11	0.3	0.1	0.9	400
12	0.5	0.36	0.9	400
13	0.4	0.3	1.	300
14	0.7	0.4	0.8	300
15	0.9	0.6	>2	300
16	0.2	0.1	0.2	300

### 3.2.4.2.2. Banyo Tipi Sonikatör İle Yapılan Uygulamalar

Transformasyona uygun embriyo döneminin tespit edilmesi için, embriyolar 1 günden 5 güne kadar değişen sürelerde MS Gamborg ortamında tutulmuştur. Ayrıca bazı embriyolar 1 günden 4 güne kadar 1mg/L BAP içeren ortamda tutulmuştur. Transformasyon yapılmadan hemen önce kök ve gövde ucu kesilmiştir. Transformasyon sırasında kullanılacak olan bakteri suşu uygun antibiyotiklerle önce 5 ml YEB-MES ortamında sonrada 50 ml'lik YEB-MES ortamında büyütülmüş, santrifüjle çöktürüldükten 200  $\mu$ M asetoisrington bulunan MMA ortamında son optik yoğunluk 2.4 olacak şekilde çözülmüştür. Daha sonra hazırlanmış olan nohut eksplantları bakteriyel süspansiyon içine atılarak değişik sürelerde 1-5, 7, 10, 15 ve 20 dk veya 5 sn ara ile 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ve 60 sn sonikasyon yapılmıştır. Farklı sonikasyon parametreleri ile birlikte, kontrol grubu olarak sonikasyonsuz *Agrobacterium* + vakum infiltrasyonu kullanılmıştır. Uygulanan bazı vakum infiltrasyon parametreleri şöyledir (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. Transformasyon sırasında uygulanan bazı vakum infiltrasyon parametreleri

Uygulama sırası	Vakum İnfiltasyon Süresi (dk)	Negatif Basınç (mm Hg)
1	20	300
2	20	200
3	20	400
4	25	200
5	25	300
6	30	200
7	30	300

Sonikasyon ve vakum uygulanan eksplantlar daha sonra 400 mg/L sistein ve 100 µM asetosiringon içeren kokültivasyon ortamında 4-7 gün kadar karanlık ortamda tutulmuştur. Kokültivasyondan sonra uygulamaların etkinliğini değerlendirmek için eksplantlar arasından tesadüfi olarak alınan 10-15 adet örnek üzerinde GUS histokimyasal boyama yapılmış ve fotoğraflanmıştır. Geriye kalan eksplantlar ise kullanılan bakteri suşu ve içerdiği plazmide uygun seleksiyon ortamına alınmıştır.

C58C1/pTJK136 ve KYRT1/pTJK136 suşlarının kullanıldığı transformasyon deneylerinde önce 100 mg/L kanamisin ve 200 mg/L ticarcilin içeren ortamda 2 hafta süreyle tutulduktan sonra, 200 mg/L kanamisin ve 200 mg/L ticarcilin içeren ortama aktarılmıştır. İki haftada bir seleksiyon ortamı yenilenmiştir. EHA105/pDNEM3300 ile transformasyon yapılan eksplantlar önce 5 mg/L ppt ve 200 mg/L ticarcillin içeren ortama alınmış, 2 hafta sonra yeni ortamda ppt seviyesi 10 mg/L'ye yükseltilmiştir.

Diğer bir alternatif olarak, kokültivasyondan sonra eksplantlar direkt olarak 300 mg/L kanamisin veya 10 mg/L ppt ve büyüme düzenleyicileri bulunan ortamda seleksiyon yapılmıştır. Seleksiyondan sonra yaşayan sürgünler sayılarak çoklu sürgün oluşturma ortamına alınmıştır, son olarak bitkisel hormon bulunmayan bir ara ortama alınarak köklendirilmiştir. Sonikasyon ve vakum infiltrasyon uygulamasıyla birlikte *Agrobacterium* aracılı transformasyon protokolü Şekil 3.3.'te şematize edilmiştir.

**Eksplantların hazırlanması**

Nohut tohumlarının yüzey sterilizasyonu



Bir gece steril distile suda bekletme



İmbibisyon yapılmış tohumların açılarak embriyoların MS-Gamborg ortamında birkaç gün bekletilmesi



Embriyoların plumula ve radikula kısımlarının kesilmesi



Hazırlanan nohut embriyolarının bakteri solüsyonu içine atılması



Bakteri ile muamele edilmiş embriyoların çeşitli süre veya frekanslarda sonikasyon yapılması



Nohut embriyolarının çeşitli süre ve basınçlarda vakum infiltrasyonu yapılması



Transforme edilen embriyoların steril kurutma kağıdı üzerinde kurutulması



25°C'de 4-7 gün kokültivasyon yapılması



Sürgünlerin seleksiyon ortamına aktarılması



Seleksiyon ortamında yaşayan sürgünlerin rejenerasyonu

**Bakterinin hazırlanması**

27 °C'de YEB veya YEB-MES ortamında 5 ml'lik başlangıç kültürünün hazırlanması



50 ml YEB veya 100 ml YEB-MES ortamında 200 rpm'de 27 °C'de büyütülmesi



5000 g'de santrifüj edilmesi ve pelletin elde edilmesi



Pelletin 100 ml sıvı indüksiyon ortamında 7-8 saat büyütülüp, santrifüj edilmesi ve tekrar yeni sıvı indüksiyon ortamında süspanse edilmesi veya Pelletin OD 2.4 olacak şekilde MMA sıvısında 1 saat süspanse edilmesi



Şekil 3.3. Sonikasyon ve vakum infiltrasyonu yardımıyla yapılan *Agrobacterium* aracılı transformasyonun kısa bir şeması

### **3.2.5. Transformant Oldukları Varsayılan Eksplantların Analizi**

#### **3.2.5.1. GUS Histokimyasal Analizler**

Farklı kokültivasyon sürelerinden sonra ve seleksiyon sonrası yeşil kalan sürgünler tesadüfi olarak alınmış ve Jefferson (1987)'nin protokolüne göre 10 mM X-Gluc solüsyonuna (Ek E) konularak 37 °C'de inkübe edilmiştir. GUS histokimyasal boyama yapılan eksplantlar fikse edildikten sonra, % 70'lik etil alkolde pigmentleri alınmıştır daha sonra da % 96'lık etil alkole alınarak suyu uzaklaştırılan dokunun sertleşmesi sağlanmıştır. Eksplantlar GUS ifade bölgelerinin belirlenmesi için stereo mikroskop altında incelenmiş ve mikroskopa takılan bir kamera yardımıyla fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.2.6. Transformantların Moleküler Analizi**

#### **3.2.6.1. DNA İzolasyonu**

En az üç seleksiyon döngüsü sonucunda elde edilen aday transgenik eksplantlardan genomik DNA CTAB metodu kullanılarak izole edilmiştir.

DNA izolasyonu için 0.25-0.3 gr bitki dokusu alınmış ve bitki dokuları 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu içerisinde ezilmiştir (Ek F). Homojenat hazırlanan 62 °C'lik su banyosunda 30-40 dk inkübasyon yapılarak ters düz edilmiş, üzerine 700 µl kloroform izoamil alkol (24:1 hacimde) çözeltisi ilave edilerek yine yavaşça ters düz edilmiştir (100 defa). Daha sonra 16000 g'de santrifüj edilerek süpernatant 1.5 ml'lik temiz bir ependorfa aktarılmıştır. Üzerine 2/3 oranında 550 µl soğuk izopropanol ilave edilmiş, 30 dk veya daha fazla -20 °C'de bekletilerek 14000 g'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edilmiş, pellet alınmış ve kurutulmuştur. DNA 300 µl TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH7.4) ilave edilerek çözülmüştür. Pellet tamamen çözülene kadar oda sıcaklığında gece boyunca veya 65 °C'de 60 dk bekletilmiştir. 10 mg/ml olan RNase stoğundan her bir örnek için 1 µl RNase ilave edilerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 200 µl TE ve 15 µl amonyum asetat (10 M, pH7.7) ilave edilmiştir. Son olarak çözelti üzerine 2 hacim kadar % 80'lik soğuk etanol ilave edilerek 20 dk veya gece boyunca -20 °C'de bekletilmiştir. 14000 g'de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant dikkatlice döküldükten

sonra pellet kurutulmuştur. Daha sonra üzerine uygun miktarda TE ilave edilerek (100-200 µl) çözülmüş ve DNA konsantrasyonu agaroz jel ile belirlenmiştir.

### 3.2.6.2. Aday Transgenik Bitkilerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Aday transgenik bitkilerden CTAB metodu ile izole edilen DNA'dan spesifik *nptII* ve *bar* primeri kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir.

**a) Reaksiyon Karışımı:** PZR işlemi için 1.5 µl (10X) Taq tamponu, 2 µl (2 mM) MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl (0.2 mM) dNTP karışımı, 0.2 µl (0.5 u) Taq DNA Polimeraz, 0.5 µl (0.3+0.3 pmol) primer F-R, 1.2 µl BSA, 7.1 µl dH<sub>2</sub>O ile toplam 13 µl PZR karışımına 2 µl (30 ng) ilgili DNA eklenmiştir.

**b) Reaksiyon koşulları:** 94 °C'de 5 dk 1 döngü, 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 55 °C'de 1 dk bağlanma, 72 °C'de 2 dk uzama 35 döngü ve 72 °C'de 5 dk son uzama sıcaklığı. Reaksiyon için Sensoquest marka thermocycler kullanılmıştır.

### c) Primer sekansları

*nptII* –primeri forward: 5'gaggctattcggctatgactg, reverse 5'atcgggagcggcgataccgta

### 3.2.7. İstatiksel Analizler

İstatiksel analiz için SPSS programında tek yönlü ANOVA uygulanmıştır. Çalışmalarda her bir grup için en az 30 örnekleme yapılmış ve % 95 güven aralığında LSD testine göre ortalamalar karşılaştırılmıştır. İstatiksel analiz grupları EK G'de verilmiştir.

## 4. BÖLÜM

### BULGULAR

#### 4.1. Rejenerasyon Çalışmaları

*In vitro* rejenerasyon tekrarlanabilir ve güvenilebilir bir transformasyon sisteminin kurulması için ön şarttır. Bu nedenle çalışmanın büyük bir kısmı *in vitro* rejenerasyonunun optimizasyonuna ayrılmıştır.

Bu amaçla farklı hormon kombinasyonları ve konsantrasyonları, farklı eksplant çeşitleri ve eksplant yaşı gibi doku kültürü sistemlerinin başarısını etkileyen önemli birçok faktör çoklu sürgün elde etmek amacıyla test edilmiştir.

##### 4.1.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Başlangıç materyalinin yüzey sterilizasyonu kültüre alınan doku ve organların devamlılığı için çok kritiktir. Birçok fungus ve bakteri tipleri yaygın kontaminasyon kaynağı oluşturabilir. Besin ortamı üzerinde veya içinde beyaz, krem, pembe veya kırmızı renkte genellikle şeffaf koloniler halinde belirirler. Funguslar eksplantla gelebileceği gibi hava kaynaklı da olabilirler [186]. Bu yüzden tohum, doku, organ gibi doku kültüründe kullanılacak bitki materyalinin steril olması ve aynı zamanda canlılığını yitirmemesi gerekmektedir.

Nohut tohumlarının yüzey sterilizasyonu için farklı kimyasallar (sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit, etil alkol) kullanılarak, optimum süre ve konsantrasyon belirlenmiştir.

Lokal kùltivarlardan olan beyaz nohut çeşidi % 70'lik etil alkol içinde 3 dk iyice çalkalanmış sùre sonunda steril distile suyla duruladıktan sonra % 20'lik sodyum hipoklorit içinde 20 dk çalkalanmıştır ve en az 3 kez durulanmıştır. Benzer şekilde ön alkol uygulamasını takiben ancak % 15'lik sodyum hipoklorit ile 30 dk çalkalanarak yapılan sterilizasyon başarılı olmuştur. Bunun dışında yeni hazırlanmış % 5 kalsiyum hipoklorit çözeltisi ile 10 dk yapılan yüzey sterilizasyonu da olumlu sonuç vermiştir.

Fungal kontaminasyonun ciddi problemler oluşturduğu eksplantlarda Nystatine ve Mikanozol gibi antifungal kimyasallar ile eksplantların yıkanması ve doku kùltürü ortamına belli konsantrasyonlarda bu kimyasalların eklenmesi fungal kontaminasyonu azaltmıştır.

#### **4.1.2. Direkt Organogenez**

Rejenerasyon çalışmalarında kallus indüksiyonu ve organogenez için Modifiye MS ortamı (MS-Gamborg) kullanılmıştır. Ayrıca MS-Gamborg ortamına 0.25-0.5 g/L kazein ve 1 g/L glutamin eklenerek çoklu sürgünlerin sağlıklı gelişimi sağlanmıştır.

Çoklu sürgün indüksiyonu için farklı konsantrasyonlarda BAP (0.5- 3 mg/L, 5, 10  $\mu$ M), çeşitli konsantrasyonlarda kinetin (1-5 mg/L), zeatin ribozid ( 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L ve 2 mg/L), IAA (0.2 mg/L) ve GA<sub>3</sub> (0.25-1 mg/L) kullanılmıştır. Ayrıca sürgün sayısını arttırmak için farklı konsantrasyonlarda TDZ de (0.05 mg/L ve 0.1 mg/L) denenmiştir.

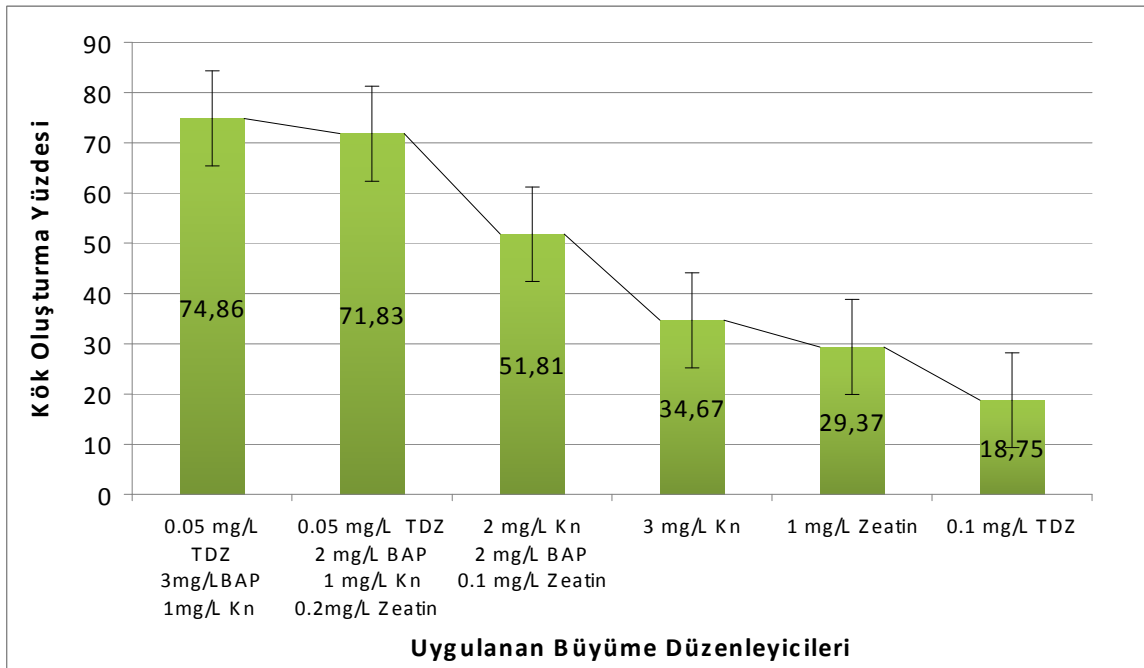
En fazla sürgün sayısı tek başına 10  $\mu$ M BAP kullanımıyla elde edilmiştir. 10  $\mu$ M BAP ile birlikte 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> kullanıldığında çoklu sürgün oluşumu 10  $\mu$ M BAP kullanımına göre kısmen azalmıştır. 10  $\mu$ M BAP ve 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> kullanımından sonra 5  $\mu$ M BAP ve 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> kullanımıyla sürgün sayısında belli miktarda azalma gözlenmiştir. 10  $\mu$ M BAP'a 0.2 mg/L IAA eklendiğinde de sürgün sayısında tek başına 10  $\mu$ M BAP'a göre belirgin bir azalma göstermiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çeşitli kombinasyon ve konsantrasyonlarda uygulanan büyüme düzenleyicilerinin çoklu sürgün oluşumuna etkisi

Uygulanan Büyüme Düzenleyicilerinin Sırası	Ortalama sürgün Sayısı
1) 0.05 mg/L TDZ + 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn	2,2619
2) 0.05 TDZ + 2 mg/L BAP + 1 mg/L Kn + 0.2 mg/L Zea	2,6757
3) 2 mg/L Kn + 2 mg/L BAP + 0.1 mg/L Zea	2,1250
4) 3 mg/L Kn	1,9714
5) 1 mg/L Zea	1,8276
6) 0.1 mg/L TDZ	2,8000
7) 2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA	1,8378
8) 3 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA	1,9487
9) 5 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA	1,9063
10) 0.5 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA	1,6512
11) 1 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA	1,7381
12) 2 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA	1,7209
13) 0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L IAA	1,5714
14) 0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA	2,1566
15) 3 Kn + 1 Zea + 0.2 mg/L IAA	2,4828
16) 10µM BAP	4,2045
17) 10 µM BAP + 0.25 GA <sub>3</sub>	3,6190
18) 5 µM BAP + 0.25 mg/L GA <sub>3</sub>	2,3873
19) 10 µM BAP + 0.2 mg/L IAA	2,5455

Düşük konsantrasyonlarda tek başına 0.1 mg/L TDZ kullanımı da oldukça çok sayıda sürgün oluşturmuştur. 0.1 mg/L TDZ'li ortamda kalan eksplantların sürgün indüksiyonu dışında ana eksenlerinde köklenme ile birlikte anormal sürgün morfolojisi gözlemlenmiştir. 0.1 mg/L TDZ'li ortamdaki ortalama sürgün sayısı; 0.05 mg/L TDZ + 1 mg/L Kn + 2 mg/L BAP + 0.2 mg/L zea, 0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L zea + 0.2 mg/L IAA ve 10 µM BAP + 0.2 mg/L IAA dışındaki diğer hormon uygulamalarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ) (Ek G1). 0.05 mg/L TDZ, 3 mg/L BAP ve 1 mg/L Kn'in birlikte kullanımının çoklu sürgün oluşumunu

olumlu şekilde etkilediği gözlenmiştir. Bu ortamda da çoklu sürgün ile birlikte köklenme meydana gelmiştir. Bu ortamda oluşan sürgünler sağlıklı morfolojiye sahip olup köklenme yüzdeleri de yüksek bulunmuştur. 0.05 mg/L TDZ, 1 mg/L Kn, 2 mg/L BAP ve 0.2 mg/L zeatin ortamında oluşan sürgünler kısa olmakla birlikte sağlıklı, köklerde aynı şekilde kısa olmasına rağmen köklenme yüzdeleri değişkenlik göstermiştir. 2 mg/L Kn, 2 mg/L BAP ve 0.1mg/L zeatin içeren ortamda sağlıklı sürgün oluşumu ve köklenme gerçekleşmiştir. 3 mg/L Kn kullanılan ortamda ortalama 2 sürgün oluşmasına rağmen oluşan sürgünlerden birinin mutlaka çok cılız ve kısa olduğu gözlemlenmiştir. Yalnızca 1 mg/L zeatin’li ortamda oluşan sürgünlerin birçoğunun çok uzun ve zayıf olduğu görülmüştür. 0.1 mg/L TDZ içeren ortamda çok sayıda sürgün elde edilmesine rağmen kendiliğinden kök oluşturma yüzdesinin en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

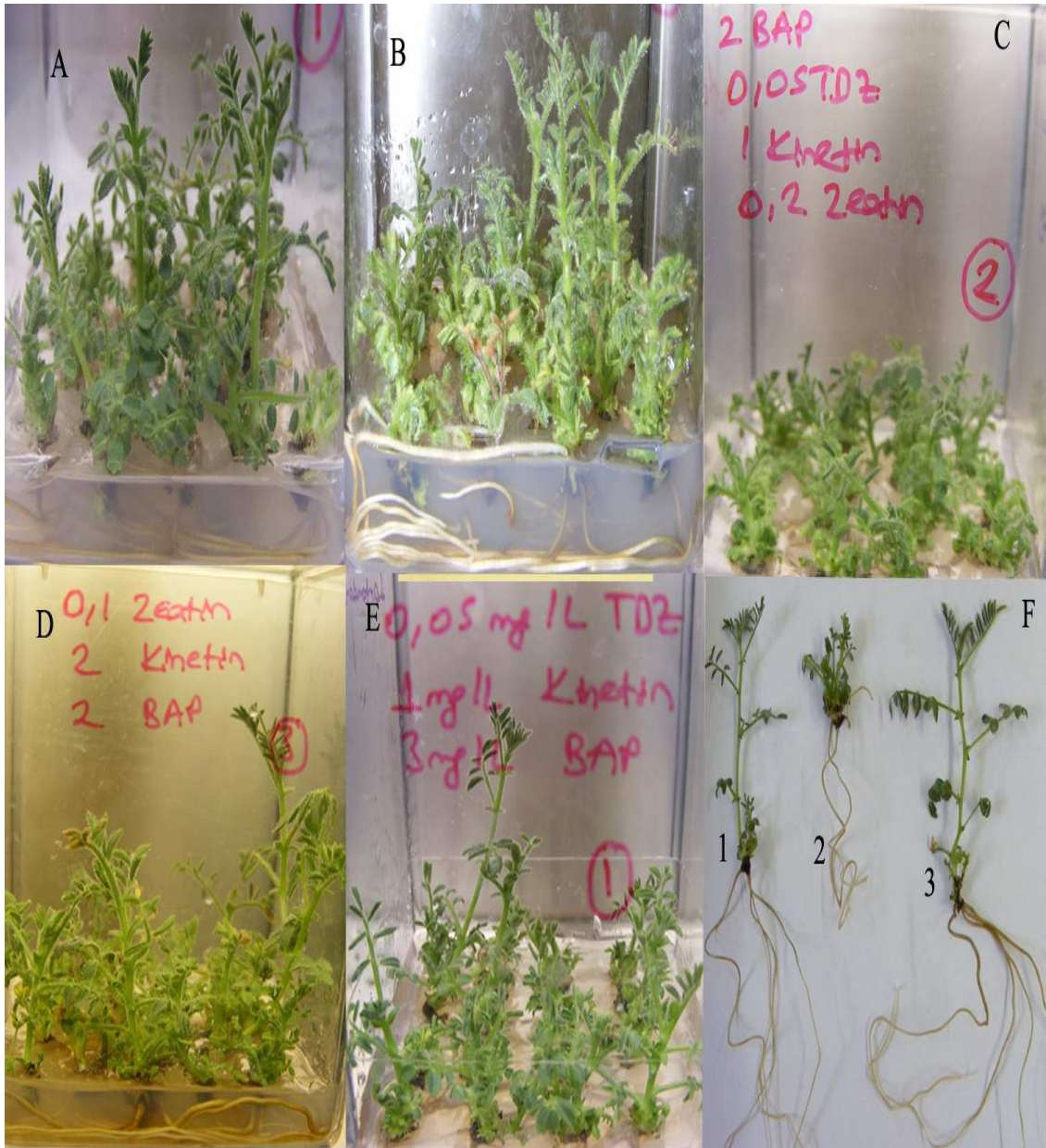


Şekil 4.1. Çoklu sürgün olumu uyarıldıktan sonra spontan köklenme

Kinetin ve zeatin birlikte kullanıldığında oldukça sağlıklı, uzun ve morfolojisi düzgün sürgünler elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Kinetin ve IAA'in birlikte kullanımını sonucu da benzer sonuçlar elde edilmiş, ancak zeatinle birlikte IAA uygulanan gruplara göre morfolojik olarak daha zayıf oldukları gözlenmiştir. Ortama

eklenen zeatinin daha uzun ve sağlıklı sürgünler oluşturmada etkili olduğu anlaşılmıştır. 3mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA ve 5 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA uygulamalarına göre 2 mg/L Kinetin + 0.2 mg/L IAA uygulaması ile oluşan sürgünlerin daha uzun, sağlıklı olduğu ancak bazı eksplantlarda kök oluştuğu görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda sitokinin kullanımının kök oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir. 3mg/L Kn, 1 mg/L zea ve 0.2 mg/L IAA'ın birlikte kullanımı ile çok sayıda sağlıklı sürgün elde edilmiştir. En az sayıda sürgün oluşumu 0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L IAA uygulamasında görülmüştür. Ay\_\_\_\_\_ sürgün sayısının 0.5 mg/L zea + 0.2 mg/L IAA, 1 mg/L zea + 0.2 mg/L IAA ve 2 mg/L zea + 0.2 mg/L IAA dışındaki diğer ortamlardan istatistiksel anlamda farklı olduğu ortaya çıkmıştır ( $P \leq 0.05$ ) (Ek G1).

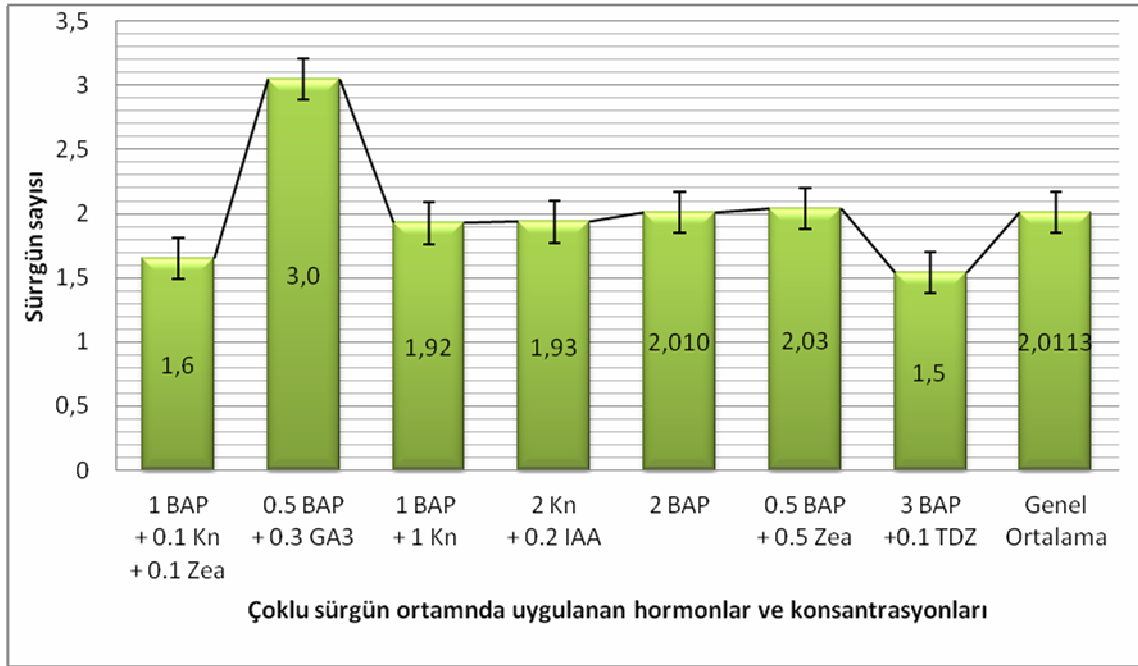
Çoklu sürgün ortamlarında nohut eksplantlarında kökler de uyarılmıştır. Ancak köklerin uyarılmadığı durumlarda sürgünler 1.5-2 hafta kadar büyüme düzenleyicisi içermeyen MS Gamborglu ara ortama alınmış ve daha sonra 1 mg/L IBA'li ortamda köklenme uyarılmıştır (Şekil 4.2). Kökler geliştikten sonra steril edilmiş torf-toprak karışımına aktarılmış ve % 60 nem içeren iklim dolabında büyütülmüştür.



Şekil 4.2. Çoklu sürgün ortamından sonra hormon bulunmayan ara ortamda uyarılan kökler; A,E,F1 0.05 mg/L TDZ, 1 mg/L Kn ve 3 mg/L BAP uygulanan ortamlarda oluşan kökler, B,D ve F3 0.1 mg/L zeatin, 2 mg/L Kn ve 2 mg/L BAP uygulanan ortamlarda oluşan kökler, C ve F2 0.05 mg/L TDZ, 2 mg/L Kn ve 0.2 mg/L zeatin uygulanmış ortamdan sonra oluşan kökler.

Transformasyon sonrası kokültivasyon ortamına alınan eksplantlar çoklu sürgün induksiyonu için 2 hafta süresince 1 mg/L BAP ortamına alındıktan sonra 0.5 mg/L BAP ve 0.5 mg/L GA<sub>3</sub> uygulamasıyla en yüksek sürgün sayısı elde edilmiştir. Kokültivasyon süresince 1 hafta 1 mg/L BAP ortamında tutulduktan sonra 1 mg/L BAP, 0.1 mg/L Kn ve 0.1 mg/L zeatinli ortama alınması sonucu daha düşük sayıda sürgün oluşmuştur. Kokültivasyon ortamında 3 mg/L BAP ve 1 mg/L Kn uygulandıktan sonra,

sürgün sayısının artması için uygulanan değişik hormon gruplarının (1 mg/L BAP ve 1 mg/L Kn), (2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA), (0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L zea), (3 mg/L BAP + 0.1 mg/L TDZ) birlikte uygulamaları ve tek başına 2 mg/L BAP uygulamaları karşılaştırıldığında, en çok sayıda sürgün 0.5 mg/L BAP ve 0.5 mg/L zeatin içeren ortamda elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda uzun süreli hormon uygulamasının daha çok sayıda sürgün oluşumunu uyardığı görülmüştür (Şekil 4.3).



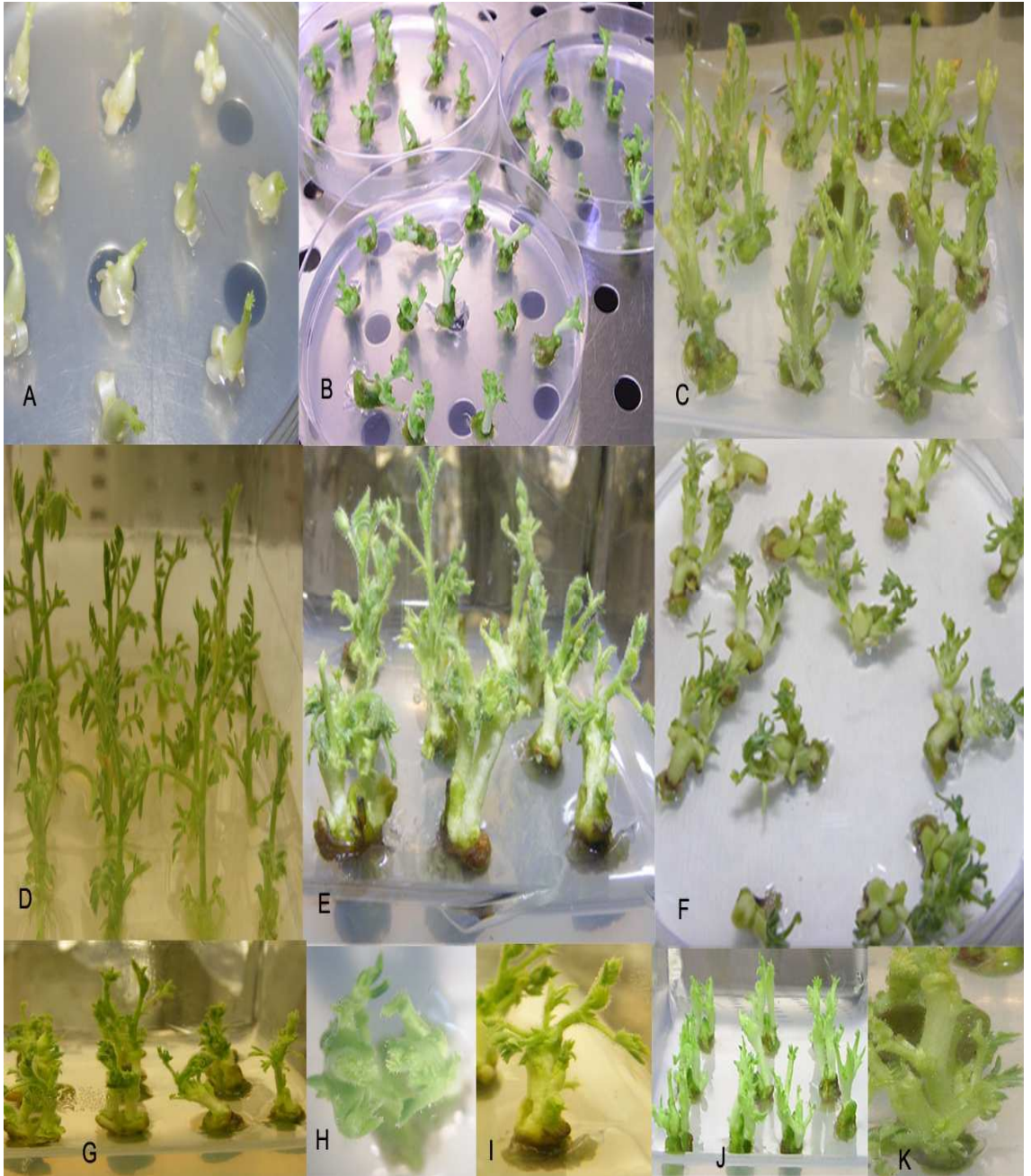
Şekil 4.3. Çeşitli kokültivasyon ortamlarından sonra farklı büyüme düzenleyici kombinasyonlarının uygulanmasıyla oluşan ortalama sürgün sayıları; 1. ve 2. Sütun 1 mg/L BAP bulunan kokültivasyon ortamından sonra belirtilen hormon uygulamasının çoklu sürgün sayısına etkisi görülmektedir. 3.,4.,5.,6. ve 7. sütunlar ise 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn bulunan kokültivasyon ortamından sonra çoklu sürgün ortamında elde edilen sürgün sayılarını göstermektedir.

Rejenerasyon çalışmalarının çoğunda MS Gamborg içeren çoklu sürgün oluşturma ortamlarına 0.25-0.5 g/L kazein ve 1 g/L glutamin eklenmiştir. Ancak kazeinsiz ve glutaminsiz ortamlarda sürgün sayısı ve morfolojisi açısından farklılık görülmemiştir.

Çoklu sürgün çalışmalarında, sürgün uyartımını takiben alt kültür ortamlarında fazla miktarda ve çeşitli sitokininlerin kullanımı sürgünlerde sararma ve sürgün uçlarında nekrozlaşmaya neden olmuş ve yaprak morfolojileri bozulmuştur. Ayrıca yüksek

konsantrasyonda çeşitli sitokinlerin kombine kullanımı sonucu oluşan diğer bir morfolojik anormallik ise çoklu sürgünlerin uçlarının bitişik olmasıdır. Ancak uygulanan hormonların etkisi azalmaya başladığı zaman bitişik çoklu sürgünlerin uçları birbirinden ayrılmıştır. Daha sonraki alt kültür çalışmalarında düşük konsantrasyonda, daha az sayıda ve uzun süreli hormon kullanımının daha sağlıklı çoklu sürgünlerin elde edilmesini sağladığı sonucuna varılmıştır.

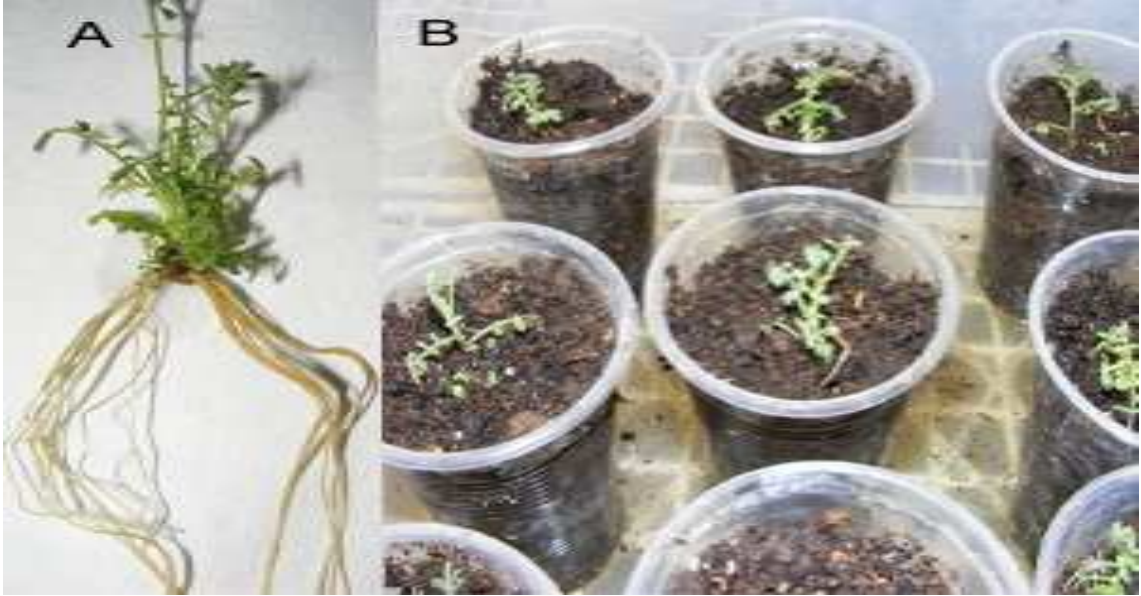
Nohut embriyolarının (4-5 gün çimlendirildikten sonra) kök ve sürgün ucunun kesilmesi (1-2 mm) sonucunda çoklu sürgün sayısının arttığı görülmüştür. Farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarının sonucunda elde edilen sürgünler şekil 4.4.'te görülmektedir.



Şekil 4.4. Farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarının kullanımı sonucunda oluşan sürgünler A) 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn'li kokültivasyon ortamı B, H), 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn'li kokültivasyon ortamından sonra 2 mg/L BAP + 1 mg/L Kn + 0.05 mg/L TDZ + 0.2 mg/L zeatin C,K) 10  $\mu$ M BAP, D) 2 mg/L Kn + 0.2 IAA, E) 3 mg/L Kn + 1 mg/L zeatin + 0.2 mg/L IAA, F) 2 mg/L Kn, 2 mg/L BAP + 0.1 mg/L zeatin, G,I) 3 mg/L + BAP 1 mg/L Kn'li kokültivasyon ortamından sonra 2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA J) 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn'li kokültivasyondan sonra 3 mg/L BAP + 0.1 mg/L TDZ.

Rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarında kendiliğinden kök oluşturan veya 1 mg/L IBA uygulamasından sonra kök oluşturulan sürgünler toprağa aktarılmıştır (Şekil 4.5). 1 mg/L IBA ile oluşturulan köklerin kendiliğinden oluşan köklere göre daha kalın olduğu ve ayrıca oluşan emici tüylerin daha belirgin ve sayılarının da fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak toprağa aktarılan bitkilerin birçoğu yaşamamıştır.

Nohut, önemli bir dane baklagil bitkisi olup daha önce yapılan çalışmalarla somatik embriyolarının ve sürgünlerin düşük frekansta rejenerasyon gösterdiği ve *in vitro*da yetiştirilen bitkilerin toprak üzerine transferinde hayatta kalma şansının az olduğu rapor edilmiştir [86].



Şekil 4.5. A) Kendiliğinden köklenmiş veya 1mg/L IBA ortamında köklendirilmiş eksplantlar B) Bu eksplantların toprağa aktarılması

### 4.1.3. İndirekt Organogenez Çalışmaları

#### 4.1.3.1. Kallus İndüksiyonu

Bu çalışmada önce 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L IAA kullanarak kallus elde edilmeye çalışılmıştır. Çoklu sürgün oluşturma sırasında kendiliğinden oluşan kallus benzeri yapıların rejenerasyonu için 0.5 mg/L BAP, 0.5 mg/L Kn ve 0.2 mg/L IAA kullanılmıştır. Kallus benzeri yapıların sürgün oluşturma süreci 2 ay gibi uzun bir süre almasına rağmen yeterince sağlıklı sürgünler elde edilememiştir. Yüksek dozda ve

farklı kombinasyonda sitokinin uygulanan nohut embriolarından kallus benzeri yapılar oluşmuş ancak bunların rejenerasyonu çok zayıf olmuştur. Kallus benzeri yapılardan ve kallustan elde edilen sürgünler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. A) Kallus benzeri yapılardan sürgün indüksiyonu B) Nohut embriosundan elde edilen kalluslardan rejenerasyon olan sürgünler.

## 4.2. Transformasyon Çalışmaları

Yapılan literatür çalışmalarında nohutun rejenerasyon ve genetik transformasyonunun diğer baklagillere göre daha zor olduğu rapor edilmiştir. Bu sebeple olgunlaşmış nohut embriolarının transformasyon etkinliğinin artırılması için *Agrobacterium*'la birlikte sonikasyon ve vakum infiltrasyonun etkisi araştırılmıştır.

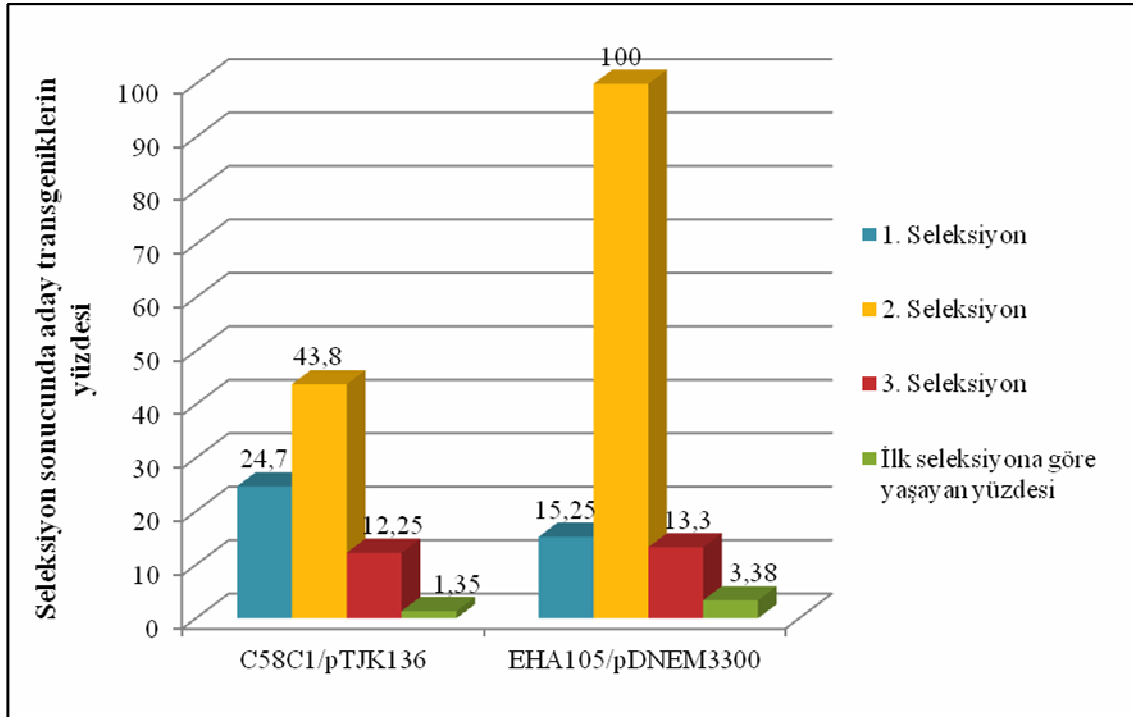
### 4.2.1. Prob Tipi Sonikatör Kullanılarak Yapılan Uygulamalar

Bu çalışmada GUS ifade seviyesine bakılarak optimum sonikasyon ve vakum infiltrasyon parametreleri tespit edilmiş ve stabil transformasyon amacıyla bu parametreler uygulanmıştır. Buna göre % 50 güçte 5 saniyenin % 10'u ara ile 2 kez 2 sn sonikasyon pulsu verilerek ve yine % 50 güç uygulanarak 5 saniyenin % 10'u ara ile 2 ve 3 sn sonikasyon pulsları ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca yine aynı

parametreler uygulanarak sadece güç % 100'e çıkarılarak da olumlu neticeler elde edilmiştir.

Kullanılan prob tipi sonikatörle 1-5 dk aralığında sonikasyon pulsarı verildiğinde eğer döngü sayısı fazla ise güç % 10 uygulansa bile embriyoların içinde bulunduğu tüp sonikasyon sırasında aşırı derece de ısınmış ve daha sonra kokültivasyon sürecinde embriyoların rengi kahverenginin dönüşerek tahrip olduğu gözlenmiştir. Bir dakikanın altında yapılan sonikasyon işlemi ile embriyoların sürgün uçları ve kotiledon kısımlarını içeren meristematik dokuların bulunduğu kısımlar daha etkili bir biçimde GUS ifadesi vermiştir. Ancak 1 dakikanın üstünde sonikasyon yapıldığında dokular büyük ölçüde tahrip olmuş ve kokültivasyon sürecinde birçoğu çok az sayıda sürgün vermiştir. Sonikasyon sırasında, transformasyon etkinliği maksimum seviyeye çıkarılırken dokuların rejenerasyon kabiliyetlerini yitirmemelerine dikkat edilmelidir.

Bu çalışmada nohut embriyoları kullanarak prob tipi sonikatörle yapılan transformasyon çalışmalarında transformasyon etkinliği, sonikasyon yapılmayanlara oranla arttırılmıştır. % 50 güç ile 5 saniyenin % 10'u aralıkla 2 kez 2 sn sonik puls verilerek ve 300 mm negatif civa basıncında 30 dk vakum infiltrasyonu yapılmış ve 7 gün kokültivasyondan sonra sürgün ortamına alınan sürgünler 1 hafta sonra kesilerek sayılmış daha sonra, önce ticarcilimli indüksiyon ortamında yıkanmış ve steril bir kurutma kağıdıyla kurutulmuş, 100 mg/L kanamisin, 150mg/L ticarcilin veya 500 mg/L cefotaxim bulunan ve çeşitli büyüme düzenleyicilerini içeren seleksiyon ortamına alınmıştır. 2-2,5 hafta sonra bu ortamda yaşayan sürgünler 150 mg/L kanamisine, 2 hafta seleksiyondan sonra da canlı kalan sürgünler 200 mg/L kanamisine alınarak yaşayan sürgünler sayılmıştır. EHA105/pDNEM3300 suşu kullanılarak yapılan transformasyonda ilk üç seleksiyon döngüsünde 5 mg/L ppt kullanılmıştır. 2 ay süresince farklı büyüme düzenleyicileri ve 5 mg/L ppt içeren ortamda seleksiyon yapılan sürgünler 2 haftada bir yeni selektif ortama taşınmıştır. Uygulanan selektif ajan konsantrasyonu sabit tutulmasına rağmen zamanla dokularda biriken selektif madde sürgün sayısında dereceli olarak azalmaya neden olmuştur. EHA105/pDNEM3300 ırkı C58C1/pTJK136'a göre daha etkili bulunmuştur (Şekil 4.7).



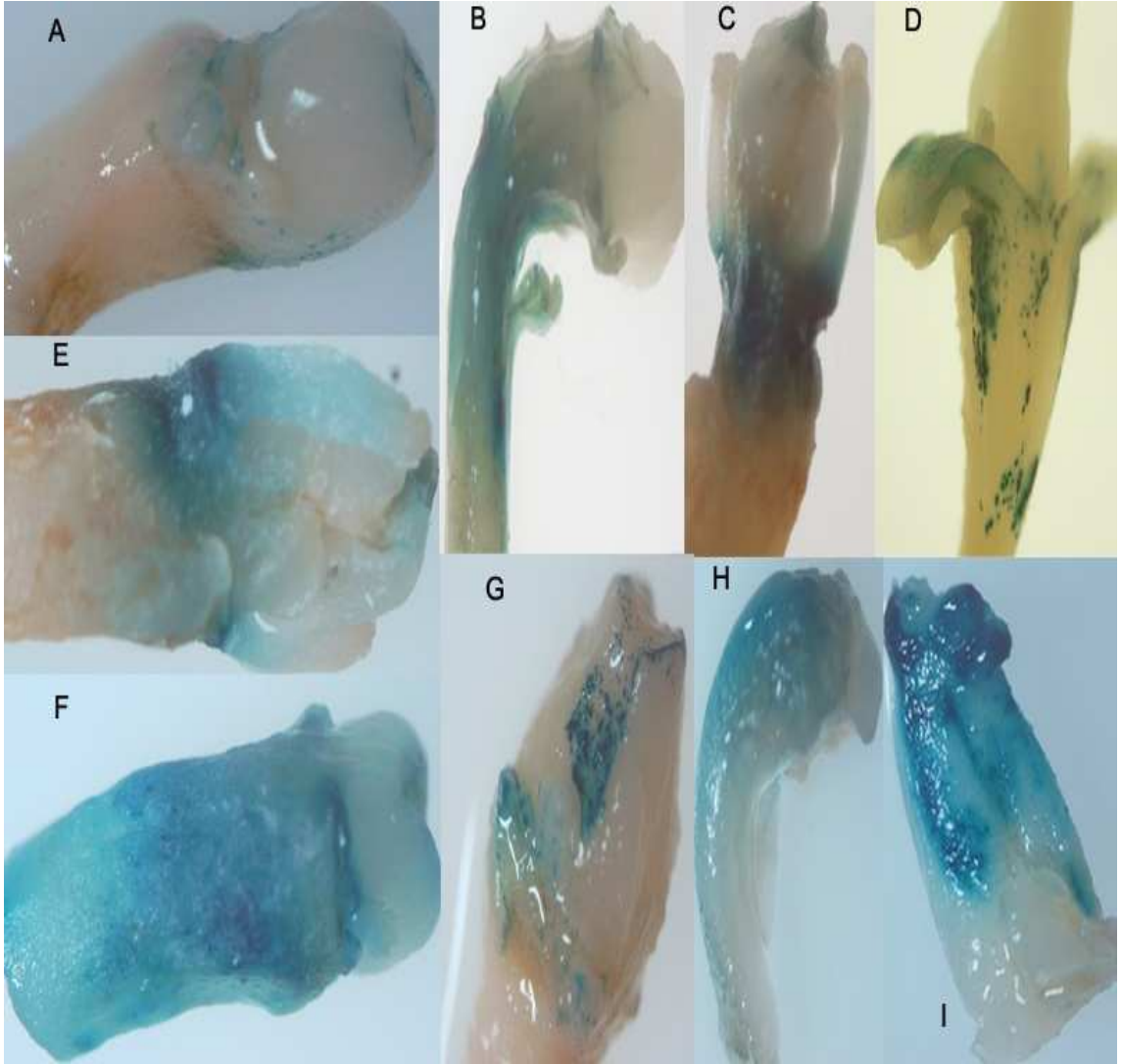
Şekil 4.7. Aynı sonikasyon ve vakum infiltrasyon parametresi uygulanan farklı iki suştan elde edilen artan kanamisin ve ppt konsantrasyonlarındaki seleksiyon ortamlarında yaşayan sürgünlerin ortalaması (%) verilmiştir. (C58C1/pTJK136 için 1. 100 mg/L, 2. 150 mg/L ve 3. seleksiyon 300 mg/L kanamisin, EHA105/pDNEM3300 için 1 ve 2. ve 3. seleksiyon 5mg/L ppt'li ortamda) yapılmıştır.

#### 4.2.2. Banyo Tipi Sonikatörle Yapılan Uygulamalar

Geçici GUS ifadesi sonuçlarına göre optimum sonikasyon süresi 1 dakikanın altındaki süreler olarak belirlenmiş olup 1-3 dk aralığında sonikasyondan olumlu sonuçlar alınmıştır. Prob tipi sonikatörle karşılaştırıldığında, banyo tipi sonikatörlerle 5 sn'den 25 dakikaya kadar olan sürelerde sonikasyon yapılmasına rağmen eksplantlarda belirgin bir zarar görülmemiştir.

GUS ifadesi sonuçları banyo tipi sonikatörde yapılan sonikasyon uygulamalarının prob tipi sonikatörle yapılan transformasyon çalışmalarına göre daha az sayıda eksplantta ve eksplantın çok az bir kısmında geçici GUS ifadesi oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.8).

Kokültivasyondan sonra oluşan sürgünler kesildikten sonra ana eksplant içinde 250-500 mg/L cef. ve çeşitli hormonlar bulunan yeni bir ortama alınmıştır, bunlardan gelişen yeni sürgünlerden de seleksiyona alınanların birçoğu yaşamıştır.



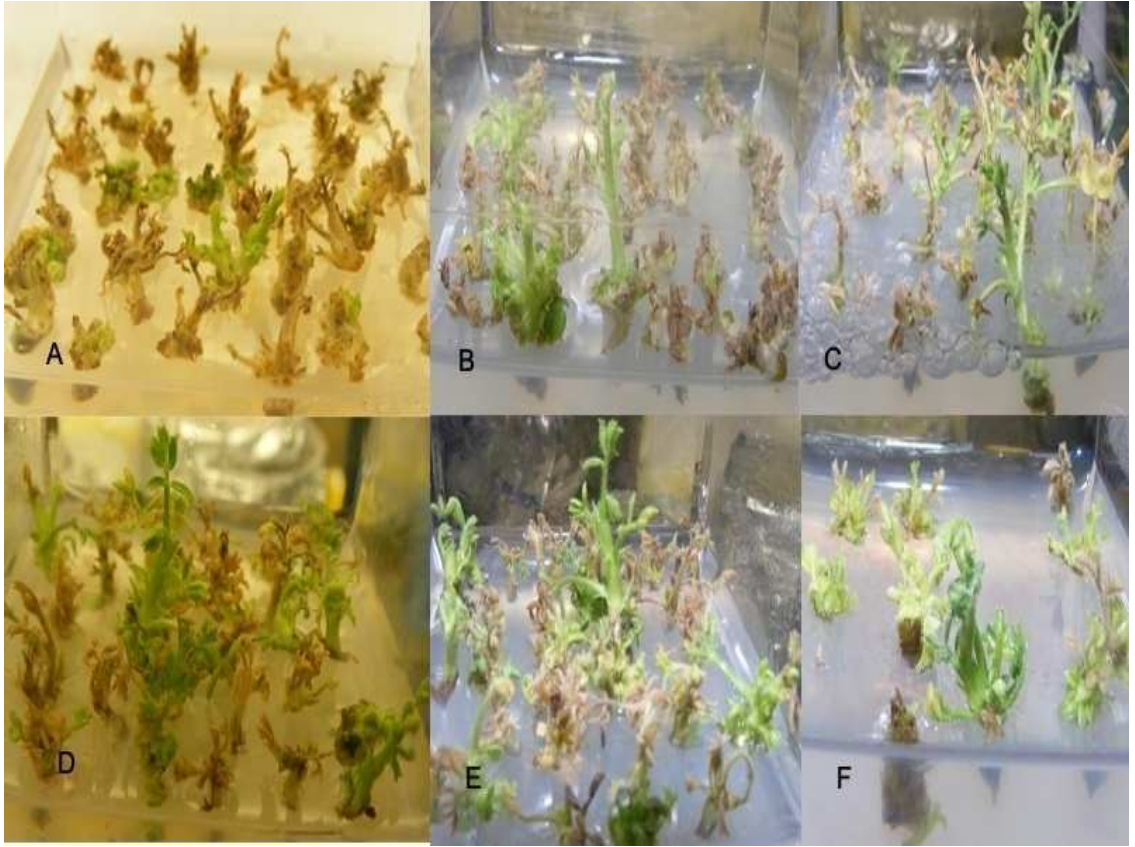
Şekil 4.8. Nohut eksplantlarında oluşan geçici GUS ifadeleri. A) Yalnızca *Agrobacterium* uygulanmış nohut embriyosu, B) Sonikasyon ve vakum infiltrasyonu yapıldıktan sonra B, C, E ve F’de kokültivasyon sonrası kotiledon nodlarından çıkan yeni sürgünlerde görülen GUS ifadesi ve G, H ve I sürgün uç kısımlarında oluşan GUS ifadesi.

### **4.3. Transformasyonu Etkileyen Parametreler**

#### **4.3.1. Embriyo Yaşının ve Kokültivasyon Süresinin Etkisi**

Embriyolar 1 gecelik imbibisyondan sonra çimlendirilmeden ya da 1-7 güne kadar çimlendirildikten sonra transformasyon için kullanılmıştır. En uygun eksplant yaşı 1 veya 4 gün olarak saptanmıştır. 7 günden sonra embriyo yaşı arttığı için dokular iyice farklılaşmış ve gittikçe azalan bir GUS ifadesi görülmüştür.

Kokültivasyon süresi de transformasyonu etkileyen önemli parametrelerden biridir. Optimum kokültivasyon süresi 4-7 gün aralığında bulunmuştur. Her seleksiyon döngüsünden sonra kanamisin ve ppt konsantrasyonları artırılarak canlı ve yeşil kalan sürgünler yeni seleksiyon ortamına alınmıştır. Ancak doğrudan yüksek konsantrasyonlarda selektif ajan kullanılmasıyla daha kısa sürede seleksiyon aynı başarıyla gerçekleştirilmiştir. 2-3 seleksiyon döngüsü sonucunda aday transgenik bitkiler tam olarak seçilmiştir. Seleksiyon sırasında zarar gören sürgünler sararmış veya kahverengileşmiş yaşayanlar ise büyüüp yeni sürgünler vermişlerdir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. A) 5 mg/L ppt konsantrasyonunda ilk seleksiyon döngüsünde yaşayan sürgünler B, D, E) 2. Seleksiyon döngüsünde yaşayan aday transgenik/sürgünler. C) 300 mg/L kanamisin içeren ortamda yaşayan KYRT1/pTJK136 ile transformasyon yapılan aday transgenik sürgünler. F) ppt seleksiyonu sonrası rejenerasyon ortamına alınan EHA105/pDNEM3300 ile transformasyon yapılan aday sürgünler.

Sonradan oluşan ve ana eksplantın dip kısmından doku kültürü ortamına doğru uzayan sürgünler, özellikle de üçüncü sürgünler daha fazla selektif ajan bulunmasına rağmen daha yüksek yaşama oranı göstermişlerdir. 40 sn aralıksız sonikasyon ve 30 dk 300 mm Hg'da vakum uygulanan eksplantların oluşturduğu 3. sürgünlerin doğrudan 10 mg/L ppt'ye alınmasıyla 15 sürgünden 10 tanesi (% 66,66) yaşamıştır. Bunlardan da elde edilen aday transgenik sürgünlerin PZR ile moleküler analizde *bar* geni taşıdığı gösterilmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca 1. ve 2. sürgünlerin yaşama oranlarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

### 4.3.2. Bakterinin Optik Yoğunluğu ve *Agrobacterium* Suşlarının Etkisi

Bakteri YEB veya YEB-MES ortamında belli bir yoğunluğa gelinceye kadar ( OD: 0.5-1.5) büyütülmüş ve transformasyon için kullanılmıştır. Log fazını geçen bakterilerin transformasyonda etkili olmadığı gözlenmiştir. Bakteri yoğunluğu düşük olduğunda (OD 0.1 ve 0.2) geçici GUS ifadesi de çok düşük bulunmuştur. Optik yoğunluk 0.8, 1.5 ve 2.4 olduğunda geçici GUS ifadesi artmıştır.

Transformasyonda kullanılan bakteri suşları ve taşıdıkları plazmidlerin özellikleri etkin bir genetik transformasyon protokolü geliştirmek için önemlidir. Bu çalışmada *Agrobacterium*'un üç farklı suşu C58C1/pTJK136, KYRT1/pTJK136 ve EHA105/pDNEM3300'ın transformasyon etkinlikleri de belirlenmiştir. KYRT1/pTJK136 ve C58C1/pTJK136 suşları transformasyon etkinliği bakımından karşılaştırıldığında aynı deney koşullarında geçici GUS ifadesi bakımından KYRT1/pTJK136 suşunun etkili olduğu görülmüştür. EHA105/pDNEM3300 bakteri suşu ve plazmid kombinasyonu kullanıldığında selektif ortamda yaşayan aday transformant sayısı en fazla bulunmuştur.

Aynı koşullarda eksplantlara KYRT1/pTJK136 ve C58C1/pTJK136 suşlarına 5 sn ara ile 20 sonikasyon ve 20 dk 200 mm Hg vakum infiltrasyonu uygulanmıştır. KYRT1/pTJK136 ile yapılan deneylerde 1. Seleksiyon sonucunda 100 mg/L kanamisin'de eksplantların % 17,91'i yaşamıştır. Yaşayanlar 300 mg/L kanamisin'le yapılan 2. Seleksiyon döngüsüne alındığında % 16,6'sı canlı kalmıştır. Oysa C58C1/pTJK136 suşu ile yapılan deneylerde 100 mg/L kanamisin kullanılarak yapılan ilk seleksiyon sonucunda eksplantların % 7,92'si yaşamıştır ve bunlarında 300 mg/L kanamisin kullanılan 2. seleksiyon döngüsü sonucunda % 37,5'i yaşamıştır. Bu da stabil transformasyon çalışmalarında KYRT1/pTJK136 suşunun C58C1/pTJK136'den daha etkili olduğunu göstermektedir. PZR analizi de seleksiyondan elde edilen bu sonuçları desteklemiştir (Şekil 4.12.).

### 4.3.3. Sonikasyonun ve Vakum İnfiltrasyonunun Transformasyona Etkisi

Bu çalışmada sonikasyonun transformasyona etkisini test etmek için aynı koşullarda iki deney yapılmıştır. Bunlardan ilkinde 1 dk sonikasyon ve 30 dk 300 mg Hg'da vakum

infiltrasyon yapılmıştır. Diğer deneyde ise yalnızca *Agrobacterium* uygulanmıştır. Aday transformantların seleksiyonu sonucunda elde edilen veriler nohutta genetik transformasyon için sonikasyonun yalnızca *Agrobacterium* kullanımına göre çok daha etkili olduğunu göstermiştir. Buna göre yalnızca *Agrobacterium* uygulanan eksplantların 100 mg/L kanamisin'de ilk seleksiyonda % 59,9'u yaşarken, 200 mg/L kanamisin'de ikinci kez yapılan seleksiyon sonucunda bu oran % 25,86 olmuştur. Ancak seleksiyonlarda aynı konsantrasyonlarda selektif ajan kullanılmasıyla 1 dk sonikasyon yapılan eksplantların ilk seleksiyon sonrasında % 69,04 ve 2. seleksiyon sonrasında ise % 20,68'i canlı kalmıştır.

Transformasyon çalışmalarında yalnızca *Agrobacterium*, yalnızca sonikasyon ve ayrıca sonikasyon-vakum infiltrasyonu birlikte uygulanmış ve geçici GUS ifadelerine bakılarak transformasyon etkinliği araştırılmıştır. Yalnız *Agrobacterium* ile yapılan transformasyon çalışması en düşük GUS ifadesi göstermiş, sonikasyon ve *Agrobacterium* birlikte uygulandığında yalnızca *Agrobacterium* uygulamasına göre daha etkili olmasına rağmen, sonikasyon-vakum infiltrasyonu-*Agrobacterium* birlikte uygulandığında en yüksek GUS ifadesi elde edilmiştir. Sonikasyonla mikroyaracık oluşturulması mekanik yaralamaya göre geçici GUS ifadesi bakımından daha etkili bulunmuştur

Sonikasyonun transformasyonda kullanılan *Agrobacterium* suşlarına bir zarar verip vermediğini araştırmak için aynı deney koşullarında eksplantlar önce sonikasyon yapılmış daha sonra bakteri ile muamele edilmiştir. Ayrıca sonikasyon işlemi bakteri ile birlikte uygulanmış ve geçici GUS ifadesine bakılmıştır. Bakteri ile birlikte sonikasyon yapılan dokularda GUS ifadesi daha yüksek bulunmuş ve önce 100 mg/L kanamisin içeren ortamda sonra da 300 mg/L kanamisin içeren ortamda seleksiyona alınarak test edilmiştir. Bu veriler de bakteri ile birlikte direkt olarak yapılan sonikasyonun daha iyi olduğunu ve bakteriye zarar vermediğini göstermiştir.

Sonikasyonun ardından yapılan vakum infiltrasyonunun sonikasyonun etkinliğini daha da arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada vakum uygulamasının eksplantlara zarar verip vermediği de araştırılmıştır ve 400'den yukarı olan basınçlarda uygulanan vakum infiltrasyonu oluşan sürgün sayısını azaltmış ve bazen (500-600'lerdeki basınçlarda)

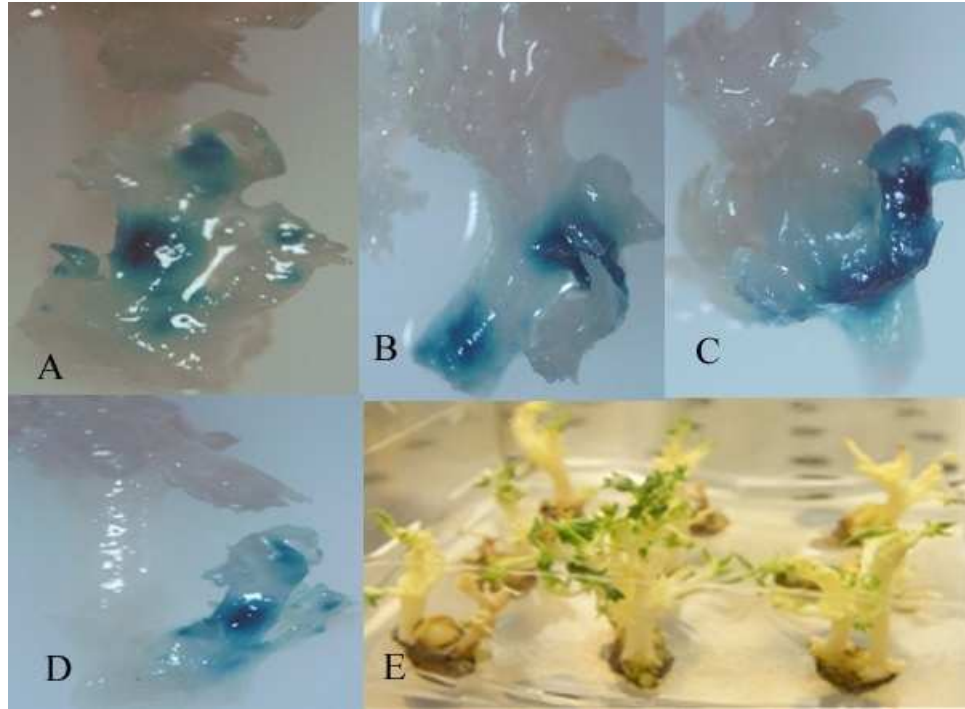
eksplantların ölümüne yol açtığı görülmüştür. Yapılan çalışmada en uygun vakum infiltrasyon parametreleri 30 dk 200 mm Hg ve 20 dk 200 mm Hg olarak bulunmuştur.

Nohut eksplantlarına banyo tipi sonikatörle 5 sn ara ile 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 sn sonikasyon uygulanmıştır. En iyi stabil transformasyon bulguları 5 sn ara ile 20 ve 30sn yapılan sonikasyonlarda görülmüş, ayrıca ara vermeden 40 sn yapılan sonikasyon uygulamasıyla selektif ortamda yaşayan çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Bunların dışında 1 dakikanın üzerindeki sürelerde yapılan sonikasyon çalışmalarında 1 dk'dan 20 dk'ya kadar olan süreler denenmiş olup en etkili stabil transformasyon bulguları 1 ve 5 dk uygulanan sonikasyon süreleri sonucunda elde edilmiştir.

EHA105/pDNEM3300 suşu ile 5 dk sonikasyon ve 20 dk 300 mg Hg'da vakum infiltrasyon uygulandığında, 5 mg/L ppt'deki ilk seleksiyon sonucunda eksplantların % 34,48'i yaşamıştır. İlk seleksiyon sonucunda yaşayan eksplantlar da 2. kez 5 mg/L ppt'de seleksiyona alındığında % 41,50'si yaşamıştır. Canlı kalanlar son olarak 10 mg/L ppt'de seleksiyona alınmış % 40,90 oranında canlılık görülmüştür.

EHA105/pDNEM3300 suşu ile banyo tipi sonikatörde yapılan çalışmalarda 5 sn ara ile 30 sn sonikasyon yapılmış ve daha sonra 20 dk 200 mg Hg'da vakum infiltrasyon uygulanan nohut embriyoları 2-3 seleksiyon sonucunda seçilmişlerdir. İlk seleksiyon döngüsünde 5 mg/L ppt içeren ortamda 52,77'si yaşayan sürgünlerin, 10 mg/L ppt kullanılan 2. seleksiyon ortamında hemen hemen tamamı yaşamıştır. Yaşayan bu sürgünlerin moleküler analizi PZR ile yapılmıştır.

Yapılan seleksiyonlar sonucunda yeşil sürgünlerden örnekleme yapılmış ve GUS ifadelerine bakılmıştır. Kimerik olduğundan şüphelenilen eksplantların kimerik durumları GUS ifadesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Seleksiyonda ortamında kimerik görünümlü nohut eksplantlarının (E), kimerik GUS ifadeleri (A, B, C ve D).

#### 4.3.4. Kokültivasyon Ortamına Eklenen Maddelerin Transformasyona Etkisi

Bu çalışmada temel olarak MS Gamborg modifiye ortamına 400 mg/L sistein, 100 mM asetosiringon eklenmiştir. Bunun dışında 100 µg/ml azaserin, 100 mg/L askorbik asit ve 0.5 ppm selenyumdan biri eklenerek transformasyona etkileri araştırılmıştır.

Selenyumun transformasyonun etkinliğini artırdığı ve çok sayıda aday transgenik bitki elde edilmesini sağladığı PZR da pozitif sonuç veren aday transgenik bitkilerin tamamının Se içeren kokültivasyon ortamından gelmeleriyle anlaşılmıştır. Aynı deney koşullarında selenyum kullanılmadan yapılan transformasyon çalışmalarında selektif ortama alınan bitkilerin çoğu yaşamamış ya da kimerik karakter göstermiştir.

400 mg/L sistein uygulanmış soya fasulyesi kotiledon eksplantlarının, sisteinle kokültivasyon yapılmayan eksplantlara göre sürgün uçlarında 5 kat daha fazla GUS pozitif olduğu görülmüştür [130].

Kokültivasyon ortamında 100 mM asetosiringon bulunan ve asetosiringon uygulanmayan ortamdaki kotiledonların geçici GUS ifadesi değerlendirilmiş ve asetosiringon ilavesinin geçici GUS ifadesini önemli derecede artırdığı rapor edilmiştir.

Asetosiringonun *vir* genlerini aktive etmesi nedeniyle farklı türlerdeki geçici GUS ifadesini arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca uzun süreli sonikasyon uygulaması dikkate alınmaksızın yaralamadan sonra asetosiringon eklenmesiyle geçici gen ifadesinde artışlar rapor edilmiştir [128].

#### **4.3.5. Sonikasyon Sırasında Kullanılan Kaplar**

SAAT uygularken kullanılan kaplar geçici GUS ifadesini ve stabil transformasyonu önemli derecede etkilemektedir. Sonikasyon uygulanan dokunun zarar görmemesi için sonikasyon sırasında kullanılan kabın hacmi, şekli, yapılmış olduğu madde ve kap içerisinde bulunan sıvının hacmi çok önem taşımaktadır. Cam kaplar plastik olanlara göre sonik dalgaları daha iyi iletmektedir. Bu çalışmada prob tipi sonikatörle çalışılırken 2 ml'lik ependorf tüpler, 15 ml'lik ve 50 ml'lik falkon tüpler kullanılmıştır. Ancak aynı sonikasyon sürelerinde en etkili geçici GUS ifadeleri 2 ml'lik ependorf tüpler kullanıldığı durumlarda ortaya çıkmıştır.

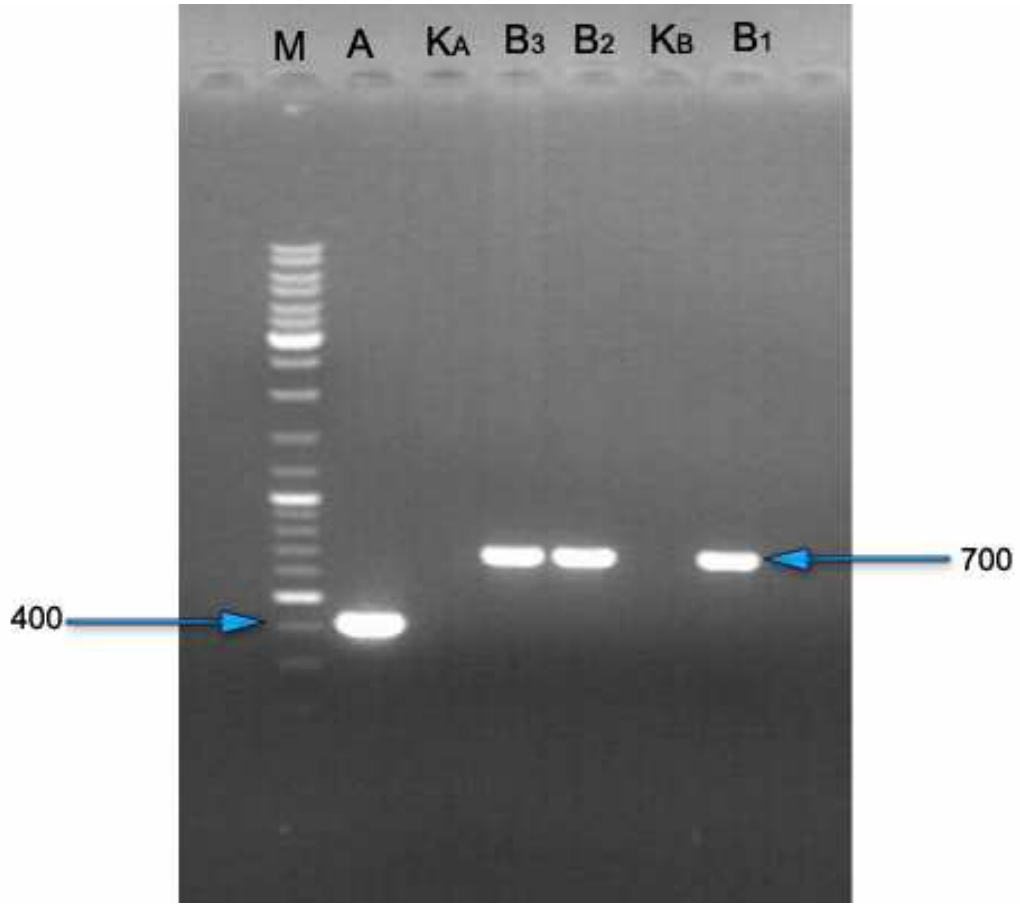
Banyo tipi sonikatör kullanılırken 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri yüzdürülerek uygulanmıştır. Ancak prob tipi sonikatörlerdeki uygulamalar kadar etkili bulunmamıştır. Ayrıca bu sonikatörde 50 ml'lik falkonlar, 50-100 ml'lik cam beher, 10-150 ml'lik cam erlenmayerlerde denenmiştir. Genellikle banyo tipi sonikatörlerde en etkili olarak görülen kaplar 100-150 ml'lik cam erlenmayerler olmuştur. Eksplantın zarar görmemesi için kaplarda belirli miktarda sıvı bulunması gerekmektedir. Aksi takdirde aşırı ısınmanın eksplantları tahrip ettiği gözlenmiştir. Eksplantın içinde bulunduğu sıvı az, kullanılan kabın hacminin büyük ve cam olması durumunda en yüksek ısınma ve doku tahribatı gözlenmiştir. Ayrıca kullanılan dokunun tekstürüne göre uygulanan sonikasyon süresi ve kullanılan kabın özelliğinin araştırmacının kendisi tarafından belirlenmesi gerekmektedir. Şekil 4.13.'de sonikasyon sırasında kullanılan bir kap görülmektedir.



Şekil 4.11. Sonikasyon sırasında kullanılan 100 ml'lik erlenmayer.

#### 4.4. Aday Transgenik Bitkilerin Moleküler Analizleri

Selektif ortamda 3–4 döngü sonucunda yeşil kalan aday transgenik sürgünlerden CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA ile *nptII* ve *ppt* genlerine özgü primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. *ppt* primeriyle yaklaşık 400 bç büyüklüğünde ve *nptII* primeriyle ise yaklaşık 700 bç büyüklüğünde beklenen PZR ürünü elde edilmiştir.



Şekil 4.12. *Agrobacterium tumefaciens*'in KYRT1/pTJK136, C58C1/pTJK136 ve EHA105/PDNEM3300 suşları kullanılarak sonikasyon ve vakum infiltrasyon yöntemi ile transformasyon yapılmış beyaz nohut çeşidinden izole edilen DNA'nın PZR amplifikasyonu (% 1'lik agaroz jel kullanılmış ve etidium bromid ile boyanmıştır). **M**: Marker (SM 331 Fermentas DNA ladder), **A**: EHA105/pDNEM3300 suşu kullanılarak transformasyon yapılmış nohuttan *ppt* primerleriyle elde edilen yaklaşık 400 bp büyüklüğündeki PZR ürünü, **KA**: Transformasyon yapılmamış ve *ppt* primeri ile PZR yapılmış nohut kontrolü, **KB**: Transformasyon yapılmamış ve *nptII* primeri ile amplifikasyon yapılmış kontrol **B<sub>1</sub>** ve **B<sub>2</sub>** farklı zamanlarda KYRT1/pTJK136 suşu kullanılarak yapılmış transformasyondan *nptII* primeriyle elde edilen ve yaklaşık 700 bp büyüklüğünde geni içeren PZR ürünü **B<sub>3</sub>** C58C1/pTJK136 suşu ile transformasyon yapılmış ve *nptII* primeriyle elde edilen 700 bp büyüklüğünde PZR ürünü.

## 5. BÖLÜM

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Rejenerasyon ve transformasyon çalışmaları lokal nohut kültüvarı olan beyaz nohut çeşidi ile gerçekleştirilmiştir. Rejenerasyon çalışmalarında olgunlaşmış embriyo eksplantları kullanılarak apikal ve aksiler sürgünler elde edilmiştir. İndirekt organogenez aracılığıyla embriyolarda yürütülen rejenerasyon çalışmaları başarılı olmamıştır. Ancak, çoklu sürgün indüksiyonu aracılığıyla direkt organogenezden oldukça olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ara bir kallus fazı baklagillerin çoğu için verilmiş çok etkili bir metod değildir. Ara bir kallus fazı ile nohutun rejenerasyonu ile ilgili birkaç rapor bulunmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalarda iki Türk nohudunda (Akçin ve Gökçe) başarılı bir kallus indüksiyonu rapor edilmiştir [187]. Ayrıca Pathak ve Hamza'nın yaptığı bir çalışma da (2008) plumulası kesilmiş nohut embriyolarında 2.2 µM BAP, 2.3 µM kinetin, 1.2 µM IAA kullanarak kallustan sürgün rejenerasyonu yapmayı başarmışlardır [184].

Embriyo eksplantlarından çoklu sürgün uyarmak amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda oksin ve sitokin grubu hormonlar (BAP, TDZ, Zeatin Ribozid, Kinetin, IAA ve GA<sub>3</sub>), kazein ve glutamin kullanılmıştır. Tüm çalışmalar boyunca en fazla sürgün sayısı (ortalama 4.2 sürgün) tek başına 10 µM BAP kullanımıyla elde edilmiştir. Sürgün farklılaşması eksplant tipi, genotip ve BAP konsantrasyonundan etkilenmektedir. Çoklu sürgün uyartımı için en uygun BAP konsantrasyonu genotipe bağlıdır [98].

Embriyolar çok düşük miktarlardaki TDZ konsantrasyonlarında da (0.05 mg/L ve 0.1 mg/L) oldukça yüksek sayıda sürgün vermişlerdir ( $P \leq 0.05$ ) (Ek G1). Ancak düşük konsantrasyonlardaki TDZ ile oluşan sürgünlerle beraber embriyo eksemi de köklenmiştir. Ayrıca bu sürgünlerin yeterince sağlıklı olmadığı ve çeşitli morfolojik anormalliklere sahip olduğu gözlenmiştir.

0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L IAA uygulamaları bütün çoklu sürgün oluşturma çalışmaları çerçevesinde elde edilen en düşük sürgün sayısına sahiptir ( $P \leq 0.05$ ) (Ek G1).

Kinetin ve zeatin birlikte kullanıldığı zaman oldukça sağlıklı, uzun ve morfolojik olarak normal görünüme sahip sürgünler elde edilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlardaki Kinetin ve IAA birlikte kullanıldığında uzun ve sağlıklı sürgünler elde edilmesine rağmen bu sürgünlerin zeatinle-IAA kombinasyonuna göre morfolojik olarak daha zayıf olduğu gözlenmiştir. Bu da ortama eklenen zeatinin uzun ve sağlıklı sürgünler oluşturmak için daha etkili olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada nohut embriyo eksenleri çoklu sürgün oluşturmak için uygulanan tüm büyüme düzenleyicilerine farklı cevaplar vermiştir. Çok sayıda ve yüksek konsantrasyonda büyüme düzenleyicileri kullanıldığı zaman çeşitli morfolojik anormallikler görülmüştür. Çoklu sürgünlerin indüksiyonu ve rejenerasyonu için daha düşük konsantrasyonda ve daha az sayıda hormon uygulanarak daha sağlıklı ve verimli sonuçlar elde edilmiştir.

Nohutun olgunlaşmamış kotiledonlarından rejenerasyonuna  $GA_3$  ve zeatinin etkisi Hita ve ark. (1997) [106] tarafından çalışılmış ve zeatinin somatik embryogenezde en etkili hormon olduğu rapor edilmiştir. Sentetik ve doğal sitokinlerin yanı sıra ortama eklenen 0.2 mg/L kadar IAA'in daha sonraki köklendirme çalışmaları sırasında köklenme sürecine olumlu katkıları olduğu gözlenmiştir.

Çoklu sürgün oluşumu sırasında bazı uygulamalarda kök gelişimi gözlenmiştir. Bu eksplantın bulundurduğu endojen oksinlerden, ya da kullanılan sitokinlerin azlığından kaynaklanabilir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda uygulanan sitokin kullanımının kök oluşumunu baskıladığı belirlenmiştir. Ancak köklenmenin uyarılmadığı durumlarda sürgün veren eksplantlar hormonsuz ortama alınmıştır ve 1 mg/L IBA'li ortamda köklenme uyarılmış yeterli köklenme sağlayan bitkicikler toprağa aktarılmıştır. Ancak aktarılan bitkiciklerin toprakta yaşama oranlarının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Singh ve arkadaşları (2002) yaptıkları bir çalışmada nohut somatik embriyolarının ve sürgünlerin düşük frekansta rejenerasyon gösterdiği ve *in vitro*da

yetiştirilen bitkilerin toprak üzerine transferinde hayatta kalma şansının az olduğu rapor etmişlerdir [85].

Bu çalışmada transformasyon üzerine etki eden çeşitli parametreler denenmiştir. Bunlardan bakterinin optik yoğunluğu, *Agrobacterium* suşlarının etkisi, sonikasyon ve vakum infiltrasyonun etkisi, kokültivasyon ortamına eklenen maddelerin transformasyona etkisi ve sonikasyon sırasında kullanılan kapların özellikleri araştırılmıştır ve ayrıca bunlardan başka eksplant yaşı, kokültivasyon süresi gibi bazı parametrelerde değerlendirilmiştir.

*Agrobacterium* temelli transformasyonun etkinleştirilmesi için yalnızca sonikasyon, sonikasyon ve vakum infiltrasyonu, mekanik yaralama, sadece vakum infiltrasyonu veya *Agrobacterium* uygulaması denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sonikasyon ve vakum infiltrasyonunun birlikte kullanımının transformasyon etkinliğini diğer parametrelere oranla daha fazla arttırdığı gözlenmiştir. Sonikasyonun muhtemelen bitkinin epidermal ve subepidermal dokularının derinlerinde mikroyaralar açarak *Agrobacterium*'un daha derinlere ulaşmasını sağlayarak hem geçici GUS ifadesini hem de stabil transformasyon etkinliğini arttırdığı görülmüştür.

SAAT hedef bitki dokusunda çok sayıda mikroyaralar açılmasıyla *Agrobacterium* enfeksiyonunun etkinliğini artırır. Sonikasyonla açılan bu mikroyaralar bakterinin derindeki doku ve hücrelere girişini kolaylaştırarak transformasyon etkinliğini arttırmaktadır. Yaralama fenolik sinyallerin üretilmesini sağlayabileceği ve bakteriyi hücre duvarına bağlayan aday faktörlerin bakteri girişini arttırabildiği rapor edilmiştir [128].

Sonikasyonun transformasyona etkileri çeşitli sonikasyon parametreleri kullanılarak araştırılmıştır. Sonikasyon yapılan eksplant üzerinde en az hasarla en yüksek GUS ifadesi ve stabil transformasyon oranlarını elde etmek için sonikasyon parametrelerinin her bir cihaz için ayrı ayrı optimize edilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Genel olarak prob tipi sonikatörle sonikasyon ve transformasyon yapılan eksplantlarda banyo tipi sonikatöre göre geçici GUS ifadelerinin daha derinlerde olduğu, eksplantlar üzerinde daha geniş bölgeleri kapsadığı ve daha çok sayıda eksplant üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

Nohut eksplantlarına banyo tipi sonikatörle 5 sn ara ile 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 sn sonikasyon uygulanmıştır. En iyi stabil transformasyon bulguları 5 sn ara ile 20 ve 30 sn yapılan sonikasyonlarda görülmüş, ayrıca ara vermeden 40 sn yapılan sonikasyon uygulamasıyla selektif ortamda yaşayan çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Bundan başka 1 dakikanın üzerindeki sürelerde yapılan sonikasyon çalışmaları için 1 dk'dan 20 dk'ya kadar olan süreler denenmiş olup en etkili stabil transformasyon bulguları 1 ve 5 dk uygulanan sonikasyon sürelerinden elde edilmiştir.

KYRT1/pTJK136 ve C58C/pTJK136 suşları transformasyon etkinliği bakımından karşılaştırıldığında hem geçici GUS ifadesi hemde selektif ortamda gelişen sürgünler açısından, KYRT1/pTJK136 suşunun C58C1/pTJK136 suşuna göre daha etkili olduğu görülmüştür. Seleksiyon ortamlarında en çok sayıda yaşayan sürgün EHA 105/pDNEM3300 suşu kullanılarak elde edilmiştir. Akbulut (2002) C58C1/pTJK136 ve KYRT1/pTJK136 suşlarının etkinliği karşılaştırmış ve bu iki suş arasında fark olmadığını belirtmiştir. Aynı araştırmacı bu iki suş ile EHA 101 suşu arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğunu belirtmiştir [187].

EHA105/pDNEM3300 suşu ile banyo tipi sonikatörde yapılan çalışmalarda 5 sn ara ile 30 sn sonikasyon yapılmış ve daha sonra 20 dk 200 mm Hg'da vakum infiltrasyon yapılan nohut embriyolarından elde edilen sürgünler 2-3 seleksiyon döngüsünde seçilmişlerdir. İlk seleksiyon sonucunda bu eksplantların % 52,77'si yaşamış ve sonraki seleksiyonda neredeyse tamamı 10 mg/L ppt içeren selektif ortamda yaşamıştır. Yaşayan bu sürgünlerin moleküler analizi PZR ile yapılmıştır ve beklenen büyüklükte PZR ürünü elde edilmiştir.

Prob tipi sonikatörle yapılan transformasyon çalışmalarında en yüksek GUS ifadesi gösteren parametrelerin stabil transformasyon amacıyla kullanıldığında selektif ortamda yaşayan sürgün sayısı maksimum olmuştur. Buna göre güç % 50 olacak şekilde 5 saniyenin % 10'u ara ile 2 kez 2 sn sonikasyon pulsu verilerek ve yine % 50 güç uygulanarak 5 saniyenin % 10'u ara ile bir defa 2 ve 3 sn uygulanan sonikasyon pulsları ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Pathak ve Hamza (2008), baş kısmı kesilen nohut embriyolarını kullanarak 50 kHz frekansta 5 sn ara ile 2 sn sonikasyon yapmışlar ve sonikasyon yardımıyla *Agrobacterium* aracılı etkili bir transformasyon protokolü rapor etmişlerdir [184].

Sonikasyonun transformasyonda kullanılan *Agrobacterium* suşlarına bir zarar verip vermeyeceği de araştırılmıştır ve bakteri ile birlikte direkt olarak yapılan sonikasyonun bakteri uygulamadan önce yapılan sonikasyona göre daha etkili olduğu ve bakteriyeye zarar vermediği sonucuna ulaşılmıştır. Buna rağmen bazı araştırmacılar *Agrobacterium* ile birlikte dokuların sonikasyonu, *Agrobacterium* uygulamadan önce dokuların sonikasyonuna karşı geçici ifade seviyelerinin değişmediğini belirtmişlerdir [174]. Ancak *Agrobacterium* ekleyerek sonikasyon yapmanın daha uygun olduğunu tavsiye eden araştırmacılar da bulunmaktadır [125]. *Agrobacterium* varlığında ve yokluğunda sonikasyon yapılmış ve eksplantlar üzerindeki kahverengileşme nedeni araştırılmıştır. sonikasyonun *Agrobacterium*'a zarar vermediği görülmüş ve diğer taraftan sonikasyon bu dokuların bazılarının kahverengileşmesine ve kallus oluşturmaya sebep olduğu rapor edilmiştir [124].

Yapılan çalışmada en uygun vakum infiltrasyon parametreleri 20 ve 30 dk süre ile 200 mm Hg negatif basınç olarak bulunmuştur ve vakum infiltrasyonun transformasyonu arttırdığı görülmüştür. Bechtold ve ark. (1993) [188] tarafından yapılan çalışmada vakum infiltrasyon ile SAAT'in transformasyonun etkinliğini arttırdığı rapor edilmiştir.

İlk kez seleksiyona alınan kotiledonların haricinde ana eksplantların oluşturacağı ikinci, üçüncü ve dördüncü sürgünlerde değerlendirilmiştir. Transformasyonun uygulandığı ana eksplantlar yeni bir sürgün oluşturma ortamına alınmış ve özellikle üçüncü rejenerasyon döngüsünde oluşan sürgünlerin seleksiyon ortamında yaşama oranlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İlk seferde daha yüksek dozda selektif ajan uygulanmasına rağmen 1. ve 2. sürgünlere göre seleksiyon ortamında yaşayabilen çok daha fazla sayıda aday transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Bunların yanısıra kokültivasyon ortamlarına 100 µg azaserin, 100 mg/L askorbik asit ve 0.5 ppm selenyum eklenerek bu maddelerin transformasyonun başarısına etkileri denenmiştir. Özellikle 0,5 ppm selenyum uygulanan çalışmalarda transformasyon etkinliği eklenmeyenlere göre önemli seviyede artmıştır ve çok sayıda aday transgenik bitki elde edilmesini sağlamıştır.

Sonuç olarak, nohut bitkisinin *Agrobacterium* ile transformasyonunun sonikasyon ve vakum infiltrasyonu ile desteklenmesi ile başarılı bir transformasyon gerçekleştirilmiştir.

Gelecekte hastalıklara, herbisitlere, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı dirençli transgenik nohut üretimi için yapılacak olan çalışmalara katkıda bulunacağı umulmaktadır.

Nohut Türkiye’de yetiştirilen önemli ürünler arasındadır. Doğal gen kaynaklarının araştırılmasının yanında biyoteknolojik yöntemlerle bazı karakterlerinin iyileştirilmesi ürün kalite ve miktarını artırabilir.

Yapılan bu transformasyon ve rejenerasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veri ve tecrübeler ışığında yapılacak transformasyon ve rejenerasyon sistemi için yararlı görülen bazı öneriler:

1. Transformasyonun başarısı, iyi bir transformasyonun yanısıra iyi bir ve rejenerasyon sistemiyle birlikte yürütüldüğünde artmaktadır. Nohut bitkisinde direk rejenerasyon başarıyla yapılabilmesine rağmen halen kallus üzerinden indirek rejenerasyondaki başarı yeterli seviyeye ulaşamamıştır. Direk rejenerasyon sistemi transformasyon amacıyla kullanıldığında, transgenik bitkiler elde edilmesine rağmen kimerizm başlıca sorunlar arasında baş göstermektedir. Bu nedenle indirek rejenerasyondaki başarının artırılmasının transformasyonun başarısına önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.
2. Populasyon karışıklığı gibi genetik problemlerin aşılması gerekmektedir. Yerel populasyonların her birinin genotipi farklı olmaktadır. Bu durumda farklı bölgelerden değişik nohut çeşitleri kullanılarak rejenerasyon için uygun kültürler seçilmelidir. Bunun için sadece bu işe özgü kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.
3. Transformasyonun etkinliğinin artırılabilmesi için nohut da dahil olmak üzere Fabaceae’ye ait çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan patojen *Agrobacterium* ırkları tespit edilip, transformasyon için uygun genetik manipulasyonlar yapıp uygun vektör aktarıldıktan sonra yerel nohut kültürlerinin daha etkin bir transformasyonu sağlanabilir.

4. Transformasyon frekansının arttırılabilmesi için farklı yeni Ti plazmidleri tasarlanabilir.

## KAYNAKLAR

1. Olhoft, P.M., Somers, D.A., Samac, D.A., Recent Advances in Legume Transformation Plant Physiology, v.131, pp. 892–899, 2003.
2. Popelka, J.C., Terry, N., Higgins, T. J. V., Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?, Plant Science 167, 195-206, 2004.
3. Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Bitki biyoteknolojisi, genetik mühendisliği ve uygulamaları (2) s.160-161, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 2002.
4. Babu, M.R. et al., Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view Crop Protection 22, 1071–1086, 2003.
5. Srivastava, K., et. al., Shoot regeneration from immature kotiledons of *Cicer arietinum* L. Biol. Plant.44(3): 333-337, 2001.
6. Van der Maesen, L.J.G. *Cicer* L., A Monograph of the Genus with Special Reference to Chickpea (*Cicer arietinum* L.), its Ecology and Cultivation. Maded. Landbouw. Wageningen, pp. 72-10, 1972.
7. Van der Maesen, L.J.G, Origin, history and taxonomy of chickpea. In: eds. M.C. Saxena and K.B. Singh, The Chickpea. CAB International, UK, pp. 11-34, 1987.
8. Auckland, A.K. and van der Maesen, L.J.G., Chickpea. In: eds. W.R. Fehr and H.H. Hadley, Hybridization of Crop Plants. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 249-259, 1980.
9. Kupicha, F.K., The delimitation of the tribe *Vicieae* (Leguminosae) and the relationship of *Cicer* L. Botanical J. Linnean Soc., 74: 131-162, 1977.
10. Arumuganathan, K., Earle, E.D., Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9: 208–21, 1991.
11. Ladizinsky, G., Adler, A., Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. Theor. Appl. Genet., 48: 197-204, 1976.
12. Singh, K.B., Ocampo, B., Interspecific hybridization in annual *Cicer* species. J. Genet. Breed., 47: 199-204, 1993.
13. Ocampo, B., et. al., Karyotype analysis in genus *Cicer*. J. Genet. Breed., 46:229-240, 1992.

14. Labdi, M., et. al., Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphism. *Euphytica*, 88: 181-188, 1996.
15. K.B. Singh, Chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Field Crops Research* 53,161-170, 1997.
16. Vavilov, N.I., 1926. *Studies on the Origin of Cultivated Plants.*, Leningrad, pp. 129-238, 1997.
17. Muehlbauer, F.J., Singh, K.B., Genetics of chickpea. In: Saxena, M.C., Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 99–125, 1987.
18. Sheldrake, A.R., Saxena, N.P., The growth and development of chickpea under progressive moisture stress. In: eds. H. Mussel and R.C. Staples, *Stress Physiology in Crop Plants*. John Wiley, Chichester, pp. 465-485, 1979.
19. Reddy, M.V., et. al., Tallest chickpea. *International chickpea Newsletter*, 12: 7-8, 1985.
20. Pundir, R.P.S., Reddy, K.N. and Mengesha, M.H., Pod volume and pod filling as useful traits of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 17: 18-20, 1992.
21. Singh, K.B., Holly, L., Bejiga, G., *A Catalog of Kabuli Chickpea Germplasm: An Evaluation Report of Winter Sown Kabuli Chickpea, Land Races, Breeding Lines and Wild Cicer Species*. International Center for Agricultural Research in the Dry Area (ICARDA), P.O. Box 5466, Aleppo, Syria, pp. 398, 1991.
22. FAO 2003, FAOSTAT, Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy (<http://apps.fao.org>).
23. Romeis, J., et. al., The potential of transgenic chickpeas for pest control and possible effects on non-target arthropods, *Crop Protection*, 1-16, 2004.
24. FAOSTAT Report, 2007. <http://faostat.Fau.org/faostat/servlet>.
25. Sarker, R.H., et.al., *In vitro* Regeneration in Lentil (*Lens culinaris* Medik.) *Plant Tissue Cult.* 13(2) : 155-163, 2003
26. Sarmah et. al., Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor, *Molecular Breeding* 14: 73–82, 2004.
27. Singh, R.P., In: Saxena, M.C., Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK Chickpea breeding, pp. 127–162, 1987.
28. DÍE ve TKB

29. [agaclar.net.com.tr](http://agaclar.net.com.tr)
30. ICRISAT, The Medium Term Plan. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, Andhra Pradesh, India, 1992.
31. Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Bitki biyoteknolojisi, genetik mühendisliği ve uygulamaları (2) s. 113, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 2002.
32. Smith, E.F., Townsend, C.O., A plant-tumor of bacterial origin, *Science*, 25: 671-673, (1907).
33. Van Emden, H.F., Ball, S.L., Rao, M.R., Pest, disease and weed problems in pea, lentil, faba bean and chickpea. In: Summerfield, R.J. (Ed.), *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 519-534, 1988.
34. CPC, Crop Protection Compendium, Global Module, 3rd Edition. CAB International, Wallingford, UK., 2001.
35. Fitt, G.P., The ecology of *Heliothis armigera* in relation to agroecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 17–52, 1989.
36. Kaiser, W.J., et al., Viral diseases of chickpea. In: *Chickpea in the Nineties. Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement*. 4–8 December 1989, ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India, pp. 139–142, 1990.
37. Reed, W., et. al., The chickpea insect pests and their control. In: Saxena, M.C., Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 283–318, 1987.
38. Hariri G., Tahhan O., Updating results on evaluation of the major insects which infest faba bean, lentil and chickpea in Syria. *Arab J. Plant Prot.* 1: 13–21, 1983.
39. Dias C.A.R., Yadav T.D., Incidence of pulse beetles in different legume seeds. *Ind. J. Entom.* 50: 457–461, 1988.
40. Schalk J.M., Chickpea resistance to *Callosobruchus maculatus* in Iran. *J. Econ. Entomol.* 66: 578–579, 1973.
41. Brewer, I.N., Horber, E., Evaluating resistance to *Callosobruchus chinensis* Linn. in different seed legumes. *Proceedings of the Third International Working Conference on Stored-Product Entomology*. October 23-28, Kansas State University, Manhattan, Kansas USA, pp. 435-443, 1984.

42. Ahmed K., Khalique F., Khan I.A., Afzal M. and Malik B.A., Studies on genetic resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) to bruchid beetle (*Callosobruchus chinensis* L.) attack. Pak. J. Sci. Ind. Res. 34: 449–452, 1991.
43. Ahmed K., Khalique F., Khan I.A. and Malik B.A., Genetic differences for susceptibility of chickpea to bruchid beetle (*Callosobruchus chinensis* L.) attack. Pak. J. Sci. Ind. Res. 36: 96–98, 1993.
44. Pacheco I.A., Bolonhezi S., Sartori M.R., Turatti J.M., Paula D.C., Lourencao A.L. and De Paula D.C., Resistance to bruchids, fatty acid composition and grain texture in genotypes of chickpea. Bragantia 53: 61–74, 1994.
45. Kar et.al., Expression of cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis* intransgenic chickpea plants inhibits development of podborer (*Heliothis armigera*) larvae. Transgenic Research 6, 177–185, 1997.
46. van Rheenen, H.A., Pundir, R.P.S., Miranda, J.H., How to accelerate the genetic improvement of a recalcitrant crop species such as chickpea. Curr Sci 653:414–417, 1993.
47. Sonia, Singh R.P., Sharma K.K., Jaiwal, P.K., *In vitro* regeneration and genetic transformation of chickpea. In: Jaiwal PK, Singh RP (eds) Applied genetics of leguminosae biotechnology. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp 69–87, 2003.
48. Indurker, S., Misra, H.S., Eapen, S., Genetic transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with insecticidal crystal protein gene using particle gun bombardment. Plant Cell Rep 26: 755–763, 2007.
49. Smitson, J. B., Thomson, J. A. and Summerfield, R. J., Chickpea (*Cicer arietinum* L.) p.312-390. In: R.J. Summerfield and E.H. Robets (eds.), Grain Legume Crops. Collins, London, UK., 1985.
50. Maâtallah, J., et. al. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. Journal of Applied Microbiology 93, 531–540, 2002.
51. Kiran, G., et. al., 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, 2005.

52. Croser, J.S., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., Khan, T.N., Low temperature stress: implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. Crit. Rev. Plant Sci. 22, 185–219, 2003.
53. Siddique, K.H.M., Loss, S.P., Thomson, B.D., Cool season grain legumes in dryland Mediterranean environments of Western Australia: significance of early flowering. In: Saxena, N.P., Chauhan, Y.S., Johansen, C. (Eds.), Management of Drought in Grain Legumes. International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics, Hyderabad, pp. 151–161, 2003.
54. Srinivasan, A., Johansen, C., Saxena, N.P., Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genetic variation in pod set. Field Crops Res. 57, 181–193, 1998.
55. Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. Field Crops Research, 2004.
56. Polowick P.L., Baliski, D.S., Mahon, J.D., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.): gene integration, expression and inheritance Plant Cell Rep 23:485–491, 2004.
57. Huda, S., et.al., Shoot Differentiation from Cotyledon Derived Callus of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant Tissue Cult. 13:1, 53-59, 2003.
58. Wang Trevor, L., et al., Can We Improve the Nutritional Quality of Legume Seeds? Plant Physiology, Vol. 131, pp. 886–891, 2003.
59. Chiaiese, P., et al., Sulphur and nitrogen nutrition influence the response of chickpea seeds to an added, transgenic sink for organic sulphur. Journal of Experimental Botany, Sulphur Metabolism Special Issue, p. 1-13, 2004.
60. Ignacimuthu, S., Surya, P., *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea with  $\alpha$ -amilaz inhibitor gene for insect resistance. J. Biol.Sci., 31:3, 339-345, 2006.
61. Hulse, J.H., Nature, composition and utilization of grain legumes. p. 11-27. In: Uses of tropical Legumes: Proceedings of a Consultants' Meeting, 27-30 March 1989, ICRISAT Center. ICRISAT, Patancheru, A.P. 502 324, India, 1991.
62. Huisman, J., and van der Poel, A. F. B., Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. p. 53-76. In: F. J. Muehlbauer

- and W. J. Kaiser (eds.) Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 1994.
63. Murashige, T., Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant*:15: 473-497, 1962.
  64. Mroginski L.A., Kartha K.K., Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) plants by *in vitro* culture of immature leaflets. *Plant Cell Rep* 1: 64-66, 1981.
  65. Nielsen S.V.S., Poulsen G.B., Larsen M. E., Regeneration of shoots Regeneration of from pea (*Pisum sativum*) hypocotyl explants. *Physiol Plant* 82: 99-102, 1991.
  66. Kysely W. et.al., Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* 6: 305-308, 1987.
  67. Malmberg R. L., Regeneration of whole plants from callus of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L., *Planta* 146: 243-244, 1979.
  68. Jacobsen H. J, Kysely W., Induction of somatic embryos in pea, *Pisum sativum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 3: 319-324, 1984.
  69. Sato, S., Newell, C., Kolacz, K., Tredo, L., Finer, J., Hinchee, M., Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell rep*12:408-413, 1993.
  70. Schroeder, H.E., et.al., Transformation and regeneration of twocultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology* 101: 751–757, 1993.
  71. Schroeder, H.E. et. al., Bean alpha-amylase confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology* 107, 1233–1239, 1995.
  72. Trieu, A.T., et al., Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J* 22: 531–541, 2000.
  73. Jaiwal, J., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) a recalcitrant grain legume. *Plant-Science*: 161: 239-247, 2001.
  74. Cheng, M., Jarret, R. L., Li, Z., Xing, A. and Demski, J. W., *PlantCell Rep.*, 15: 653–657, 1996.

75. Mohan, M.L., Krishnamurthy, K.V., Plant regeneration from decapitated mature embryo axis and *Agrobacterium* mediated genetic transformation of pigeonpea. *Biolgia Plantarum* 46:4, 519-527, 2003.
76. Larkin, P.J., Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development. *Transgenic Res* 5: 325–335, 1996.
77. Ding, Y.L. et al., Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species. *Plant Science* 165: 1419–1427, 2003.
78. Khawar, K.M., Özcan, S., High frequency shoot regeneration from cotyledonary node explants of different lentil genotypes and *in vitro* micrografting. *Biotech. Biotechnol Eq.* 16:12-17, 2002.
79. Ye, G., et. al., Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 30, pp. 1–8, 2002.
80. Babaoglu M., Davey M., R., Brian, J., Genetic engineering of grain legumes: key transformation events, *AgBiotechNet* v.2, ABN 050, 2000.
81. de Kather, A., Jacobsen, H.J., *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors. *Plant Cell Reports* 9: 276–279, 1990.
82. Pickardt, T., et. al. Transformation of *Vicia narbonensis* via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Reports* 9: 535–538, 1991.
83. Russell, D.R. et. al., Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports* 12: 165–169, 1993.
84. Batra P., et. al., Efficient protocol for *in vitro* direct plant regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *India J. Exp. Biol.* 40(5):600-602, 2002.
85. Singh, R., et.al., 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, 2002.
86. Surya, P., et.al., Factor affecting regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) . *Indian J. Exp. Sci.* 30(12): 1149-1153, 1992.
87. Barna K.S., Wakhlu, A.K., Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* L. from callus cultures via organogenesis, *Plant. Cell. Rep.*, 13(9):510-13, 1994.

88. Amuniddin and B.P. Singh, Regeneration of chickpea of (*Cicer arietinum* L.) through *in vitro* culture. Plant Tissue Cult. 5(1): 59-63, 1995.
89. Murthy et. al., *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron Plant. Growth.Regul. 19(3) 233-240, 1996.
90. Barna K.S., Wakhlu A.K., Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 12: 521-524, 1993.
91. Eapen, S., George, L., Somatic embryogenesis in *Cicer arietinum* L. influence of genotype and auxins. Biol. Plant.,36(3): 343-349, 1994.
92. Sagare, AP., Suhasini, K., Krishnamurthy, K.V., Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) .Plant. Cell. Rep., 128119652-655, 1993.
93. Kumar, D., et. al., Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep 13:468-472, 1994.
94. Kumar, D., et. al., Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Sci., 109(2): 207-213, 1995.
95. Yousefiara, M., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Optimizing regeneration condition in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan J.Biol.Sci. 11 (7): 1009-1014, 2008.
96. Panday, R., Ganopathy, P.S., Isolation of sodium chloride tolerant callus line of *Cicer arietinum* L. Cv. BG-203. Plant Cell Rep. 3 : 45-47, 1984.
97. Anil, N., Reddy, C.S., Reddy, G.M., Growth and differentiation in tissue culture *Cicer arietinum* L. Intl. Chickpea Newsletter 14 : 10-12, 1968.
98. Anil N, Reddy CS and Reddy GM Plant regeneration from callus cultures of *Cicer arietinum* L. Intl. Chickpea Newsletter 14 : 12-13, 1968.
99. Anil N, Redy CS, Reddy GM Multiple shoot and plantlet regeneration from shoot apex and hypocotyl explants of *Cicer arietinum* L. Intl. Chickpea Newsletter 14 : 13-15, 1986.
100. Islam, R., Riazuddin, S., Shoot organogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) from callus culture of hypocotyl explants. J. Bio. Sci. 1 : 1-5, 1993.
101. Polysetty, R., et.al., Multiple shoot induction by Benzyl adenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell rep., 16: 565-571, 1997.

102. Shri, P.V., Davis T.M., Zeatin induced shoot regeneration from immature chickpea (*Cicer arietinum* L.) cotyledons .Plant Cell Tissue Organ Cult. 28: 45-51, 1992.
103. Brandt, E.B., George, L., *In vitro* regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from meristem tips and cotyledonary nodes. *in vitro* cell. dev. Biol. Plant. 30, 75-80, 1994.
104. Fontana G.S., et. al., Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (Chickpea). Plant Cell Rep. 12: 194–198, 1993.
105. Kar S., et. all., Efficient transgenic plant regeneration through Agrobacterium-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep 16:32– 37, 1996.
106. Hita O., Lafarga C., Gaerra H., Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietinum* L.) immature cotyledons : The effect of zeatin, gibberellic acid and inole-3- butyric acid. Acta Physiol. Plant. 19(B): 333-338, 1997.
107. Kiran Ghanti, S., et. al., Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. *Biologia Plantarum* 54 (1): 121-125, 2010.
108. Escobar M.A., Dandekar, A.M., *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease TRENDS in Plant Science v..8 pp. 380-386, 2003.
109. Hooykaas, P.J.J., Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. Plant Molecular Biology 13: 327–336, 1989.
110. Gelvin Stanton B., Agrobacterium- mediated plant transformation: the biology behind the ‘gene- jockeying’ tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 16-37, 2003.
111. Ke, J., et. al., High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens* Plant Cell Reports 20: 150–156, 2001.
112. Chilton, M.D., et.al., T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. *Proc.Natl. Acad.Sci.*, 77: 4060-4064, 1980.
113. Willmitzer, L., et. all., DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plants . *Nature*, 287: 359-361, 1980.

114. Dube, T., Thomson, J.A., Conjugal transfer of plasmid pTF-FC2 from *Agrobacterium* to plant cells in the absence of T-DNA borders. *Plasmid* 50: 1–11, 2003.
115. Stachel, S.E., Nester, E., The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO. J.* 5: 1445–1454, 1986.
116. Horsh, R.B., et.al., Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 223.1229-1231, 1985.
117. Rogowsky, P.M., et. al., CI Regulation of *vir* genes of *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *J Bacteriol* 169: 5101–5112, 1987.
118. Liu, C.N., Li, X.Q., Gelvin, S.B., Multiple copies of *virG* enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 20: 1071–1087, 1992.
119. Hansen, G., Das. A., Chilton, M.D., Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7603–7607, 1994.
120. Hadi, M.Z., McMullen, M.D., Finer, J.J., Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15: 500–505, 1996.
121. Tinland, B., Hohn, B., 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, 1995.
122. Bidney, D., et. al., Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 18: 301–313, 1992.
123. Humara, Q.J.M., López, M., Ordás, R.J., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Reports* 19: 51-58. 1999.
124. Trick, H.N., Finer J.J., Sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17: 482–488, 1998.

125. Finer, K.R., Finer, J.J., 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, 2000.
126. Hood E.E., New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2: 208-218, 1993.
127. Torisky R.S., et. al., Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Rep* 17: 102–108, 1997.
128. Santarem ER., et. al., Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep* 17: 752–759, 1998.
129. Olhoft PM, Lin K, Galbraith J, Nielsen NC, Somers DA The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 731–737, 2001.
130. Olhoft PM, Somers DA L-Cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706–711, 2001.
131. de Katheren, A., Jacobsen, H.J., Cell competence for *Agrobacterium* mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L. *Transgenic Research* 4, 184–19, 1995.
132. Nagl, W., Ignacimuthu, S., Becker, J., Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. *Journal of Plant Physiology* 150: 625–644, 1997.
133. Chrispeels, M.J., de Sa, M.F.G., Higgins, T.J.V. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. *Seed Science Research* 8: 257–263, 1998.
134. Saalbach, I., et. al., A chimeric gene encoding the methionine-rich 2S albumin of the Brazil nut (*Bertolletia excelsa* H.B.K) is stably expressed and inherited in transgenic grain legumes. *Molecular and General Genetics* 242: 226-236, (1994).
135. Nisbet, G.S., Webb K.J., *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry: Legumes and Oilseed Crops.* (Ed. Bajaj, Y. P. S.). Springer-Verlag. Berlin. 10(1): 38-48, 1990.

136. Hinchee M.A.W., et. al., Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio. Technol.* 6: 912-922, 1988.
137. Jacobsen H.J., Biotechnology applied to grain legumes - current state and prospects. In: Proceedings of Ist European Conference on Grain Legumes, Angers, France. pp. 99-103, 1992.
138. Khan M.R.I., et. al., *Agrobacterium* mediated genetic transformation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) *Plant Physiol.* 105(2) : 81-88, 1994.
139. Krishnamurthy, K.V., *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. *Plant Cell Reports* 19: 235-240, 2000.
140. Rohini, V.K., Sankara Rao, K., Transformation of peanut (*Arachis hypogea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant Sci.* 150: 41-49, 2000.
141. Handberg, K., Stougaard, J., *Lotus japonicus*, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J* 2: 487-496, 1992.
142. Warkentin, Y.D., McHughen, A., *Agrobacterium tumefaciens* mediated beta-glucuronidase (GUS) gene expression in lentil (*Lens culinaris* Medik) tissues. *Plant Cell Rep* 11: 274-278, 1992.
143. Mahmoudian, M., et. all., Vacuum infiltration based *Agrobacterium* mediated gene transfer to lentil (*Lens culinaris*) tissues. *Biotech Biotechnol Eq.* 16: 24-29, (2002).
144. Oktem, H.A., et. al., GUS gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment. *Lens Newsl* 26: 3-6, 1999.
145. Lurquin, P.F., et. al., Half-embryo cocultivation technique for estimating the susceptibility of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Biotech* 9: 175-179, 1998.
146. Chowrira, G.M., Akella, V., Lurquin PF Electroporation mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta: Generating transgenic plants without *in vitro* tissue culture. *Mol Biotech* 3: 17-23, 1995.
147. Chowrira, G.M., et. al., Transgenic grain legumes obtained by in planta electroporation-mediated gene transfer. *Mol Biotech* 5: 85-95, 1996.

148. Gulati A, Schryer P, McHughen A., Production of fertile transgenic lentil (*Lens culinaris* Medik) plants using particle bombardment. *in vitro* Cell Dev Biol Plant 38: 316–324, 2002.
149. Celikkol Akcay, U., et. al., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of a recalcitrant grain legume, lentil (*Lens culinaris* Medik). Plant Cell Rep 28: 407–417, 2009.
150. Porter, J.R., Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Critical Reviews in Plant Sciences 10: 387–421, 1991.
151. Riazuddin, S., Husnain, T., Transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). In Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 23. Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV. (Edited by Bajaj, Y.P.S.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 183–193, 1993.
152. Siefkes-Boer, H.J., et.al., Hairy root transformation system in large seeded grain legumes. Israeli Journal of Plant Sciences 43: 1–5, 1995.
153. Babaoglu, M., Genetic Manipulation of Lupins. PhD Thesis. University of Nottingham, Nottingham, UK., 1996.
154. Tepfer, D., Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Physiologia Plantarum 79: 140–146, 1990.
155. Rech, E.L., et. al., Expression of a chimaeric kanamycin resistance gene introduced into the wild soybean *Glycine canescens* using a cointegrate Ri plasmid vector. Plant Cell Reports 8: 33–36, 1989.
156. Kumar, V., Jones, B., Davey, M.R., Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. Plant Cell Reports 10: 135–138, 1991.
157. Ramsey, G., Kumar, A. J. Exp. Bot.41: 841-847, 1990. In:Christou, P. Biotechnology applied to grain legumes Field Crop Research 83-97, 1997.
158. Pickardt, T., Molecular Breeding, 1. 295-301, 1995. In: Christou, P. Biotechnology applied to grain legumes Field Crop Research 83-97, 1997.
159. Christou, P., Plant Journal 2:275-281, 1992. In: Craig, A., Smith P.M.C., Genetic transformation and regeneration of legumes. Nato Asi. Series. v. G39, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, 1997.
160. Maccarrone M., et. al., Interaction of DNA with cationic liposomes: ability of transfecting lentil protoplasts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 186:1417-1422

1992. In: Christou, P. Biotechnology applied to grain legumes Field Crop Research 83-97, 1997.
- 161.** Oger et. al., (1996). In: Genetic transformation and regeneration of legumes. Nato Asi. Series. v.G39, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, 1997.
- 162.** Chee, P.P., Slightom J.L., Methods in Molecular Biology 44:101-119, 1995. In: Genetic transformation and regeneration of legumes. Nato Asi. Series. v. G39, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, 1997.
- 163.** Akbulut, M., Yücel, M., Oktem, H.A., 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, 2008.
- 164.** Hansen, G., Chilton, M.D., 'Agrolistic' transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93: 14978–14983, 1996.
- 165.** Vasil et. al., 1993. In: Genetic transformation and regeneration of legumes. Nato Asi. Series. v. G39, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, 1997.
- 166.** McElroy and Bretell, 1994. In: Genetic transformation and regeneration of legumes. Nato Asi. Series. v. G39, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, 1997.
- 167.** Mohapatra, S.T., Sharma R.P., *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of chickpea, *Cicer arietinum* L. Indian J Exp Biol 29: 758–761, 1991.
- 168.** Islam, R., et. al., Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-chickpea interaction. Plant Cell Rep 13: 561–563, 1994.
- 169.** Sharmila P., Pardha Saradhi, P., Anwar, F., Chickpea regeneration and genetic transformation and more recalcitrant: African Journal of Biotechnology Vol. 9(6): pp. 782-797, 2010.
- 170.** Tewari Singh, N., Use of a herbicide or lysine plus threonine for non-antibiotic selection of transgenic chickpea. Plant Cell Rep 22: 576–583, 2004.
- 171.** Senthil, G., et. al., An efficient transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep 23: 297–303, 2004.

172. Sanyal, I., et. al., *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Sci* 168: 1135–1146, 2005.
173. Husnain, T., et. al., Studies on the expression of marker genes in chickpea. *Plant Cell Tissue Org Cult* 49: 7–16, 1997.
174. Trick, H.N., Finer, J.J., SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research* 6: 329-336, 1997.
175. Liu, Y., Yang, H., Sakanishi A., Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnology Advances*, 2005.
176. Fechheimer, M., et. al., Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84: 8463–8467, 1987.
177. Fechheimer M, Taylor DL. Introduction of exogenous molecules into the cytoplasm of *Dictyostelium discoideum* amoebae by controlled sonication. *Methods Cell Biol*;28: 179– 190, 1987.
178. Joersbo MA., A method for introducing molecules, particularly genetic material into plant cells. Danish patent application; 3251-3289, 1990.
179. Joersbo M., Brunstedt J., Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Rep*; 9: 207–210, 1990.
180. Zhang, L.J, et al. Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Biotechnol*; 9: 996 – 1007, 1991.
181. Finer et. al., U.S.A. Patent, Patent Number, :5,693,512. Date of Patent: Dec.2, 1997.
182. Liu, Z., et. al., The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene. *Molecular Breeding* 16: 189–197, 2005.
183. Zaragoz C., Bertomeu J.M., Arrillaga I., Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT. *Plant Cell Rep.*, 22:832–838, 2004.
184. Pathak, M.R., Hamzah, R.Y., An effective method of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpeas. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93:65–71, 2008.

- 185.** Deblare, R., et al., Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.*, v. 13, pp. 4777-4788, 1985.
- 186.** Babaoğlu M., Gürel, E., Özcan, S., Bitki biyoteknoloğisi doku költürü ve uygulamaları (1), sf. 7-8. Selçuk Üni. Basımevi, Konya 2002.
- 187.** Akbulut, M., Optimization of regeneration and transformation conditions for chickpea (*Cicer arietinum* L.) MSc thesis, METU, 2002.
- 188.** Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G., In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* 316:1194-1149, 1993.

**EKLER****EK A****BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ORTAMLARI**

**A1)** 2.15 gr /L MS Bazal Tuzları (Tohum çimlendirme ortamı)

% 1 sukroz

% 0.5 agar pH 5.5

**A2)** 2.2 g/L MS Gamborg (Tohum çimlendirme ortamı)

% 0.8 agar pH 5.7

**A3)** 4.4 g/L MS Gamborg (kokültivasyon ortamı)

% 3 sukroz

10 mM MES

400 mg/L Sistein

100 µM asetosiringon

% 0.8 agar

(1 mg/L BAP) veya (3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn) veya ( 0.2 mg/L TDZ + 3 mg/L BAP + 1mg/L Kn)

**A4)** 4.4 g/L MS Gamborg (kokültivasyon ortamı)

% 3 sukroz

10 mM MES

400 mg/L Sistein

% 0.8 agar

100 µM asetosiringon

(1 mg/L BAP) veya (3 mg/L BAP + 1mg/L Kn) veya (3 mg/L Kn) veya (2 mg/L Kn + 0.02 mg/L IAA)

100 mg/L askorbik asit veya 0.5 ppm Selenyum veya azaserin

**A5)** 4.4 g/L MS Gamborg (kokültivasyon ortamı)

% 1 Glukoz

10 mM MES

400 mg/L Sistein

% 0.8 Agar

100 µM Asetosiringon

3 mg/L BAP ve 1 mg/L Kn

**A6)** 4.4 g/L MS Gamborg (Çoklu sürgün induksiyon ortamı)

% 3 Sukroz

10 mM MES

0.25 g/L veya 0.5 g/L Kazein

1 g/L Glutamin

(10µM BAP) veya (10 µM BAP + 0.25 mg/L GA<sub>3</sub>) veya (5 µM BAP + 0.25 mg/L GA<sub>3</sub>)  
veya (10 µM BAP + 0.2 mg/L IAA)

% 0.8 Agar, pH 5.7-5.8

**A7)** 4.4 g/L MS Gamborg (Çoklu sürgün induksiyon ortamı)

% 3 Sukroz

10 mM MES

0.25 g/L veya 0.5 g/L Kazein

1 g/L Glutamin

(0.05 mg/L TDZ +3 mg/L BAP + mg/L 1 Kn) veya (0.05 TDZ +2 BAP + 1 Kn + 0.2  
mg/L Zea) veya (2 mg/L Kn + 2 mg/L BAP + 0.1mg/L Zea) veya (3 Kn) veya (1 mg/L  
Zea) veya (0.1 mg/L TDZ)

% 0.8 Agar pH 5.7-5.8

**A8)** 4.4 g/L MS Gamborg (Çoklu sürgün induksiyon ortamı)

% 3 Sukroz

10 mM MES

(2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA) veya (3 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA) veya (5 mg/L Kn + 0.2  
mg/L IAA) veya (0.5 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA) veya (1 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA)  
veya (2 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA) veya (0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L  
IAA) veya (0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA) veya (3  
mg/L Kn + 1 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA)

% 0.8 Agar, pH 5.7-5.8

**A9)** 4.4 g/L MS Gamborg (Kokültivasyon ortamından sonra uygulanan çoklu sürgün indüksiyon ortamı)

% 3 Sukroz

400 mg/L Sistein

100 µM asetosiringon

10 mM MES

% 0.8 Agar pH 5.7-5.8 ve 1 mg/L BAP'tan sonra

4.4 g/L MS Gamborg

% 3 Sukroz

10 mM MES

0.25 g/L veya 0.5 g/L Kazein

1 g/L Glutamin (1mg/L BAP + 0.1 mg/L Kn + 0.1 mg/L Zea) veya (0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>)

% 0.8 Agar, pH 5.7-5.8

**A10)** 4.4 g/L MS Gamborg (Kokültivasyon ortamından sonra uygulanan çoklu sürgün indüksiyon ortamı)

% 3 Sukroz

400 mg/L Sistein

100 µM asetosiringon

10 mM MES

% 0.8 Agar pH 5.7-5.8 ve 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn'den sonra

4.4 g/L MS Gamborg

% 3 Sukroz

10 mM MES

0.25 g/L veya 0.5 g/L Kazein

1 g/L Glutamin (1mg/L BAP + 1mg/L Kn) veya (2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA) veya (2 mg/L BAP) veya (0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L Zea) veya (3 mg/L BAP ve 0.1 mg/L TDZ)

% 0.8 Agar, pH 5.7-5.8

## EK B

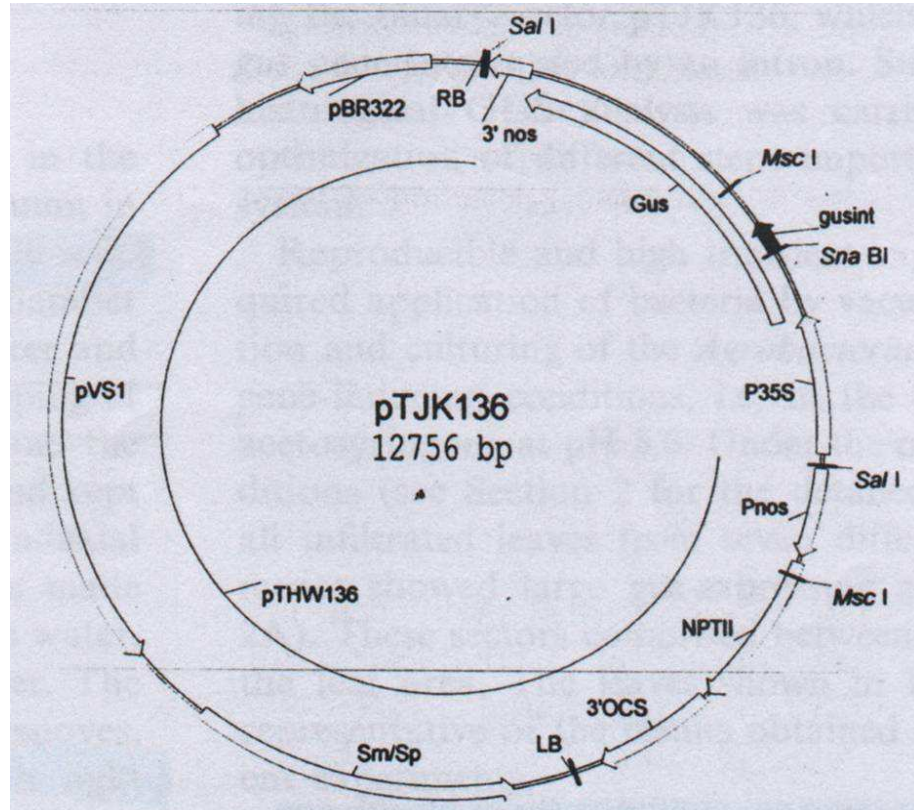
## BİTKİ TRANSFORMASYON VEKTÖRLERİNİN HARİTALARI

**Tablo B1. Bakteri suşlarında bulunan seleksiyon markerleri ve bu çalışmada kullanılan binary plazmitler**

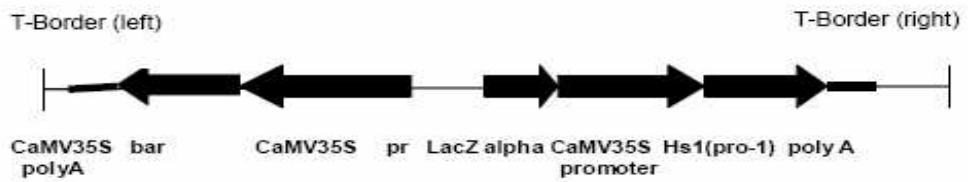
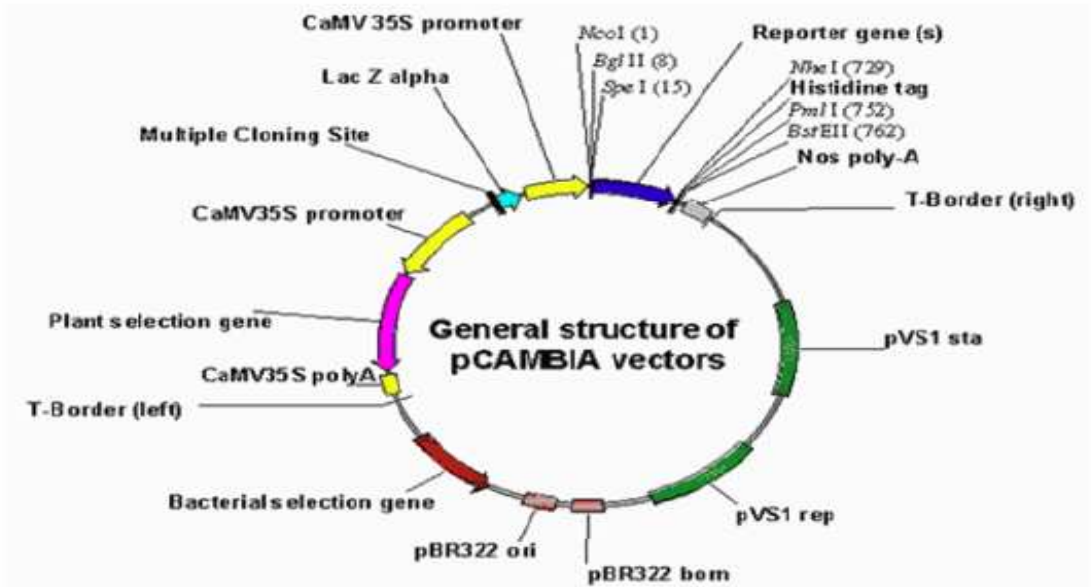
Bakteriyel Suş	Kromozomal Ti Plazmit seleksiyon Markeri	Plazmit	Bakteriyel Seleksiyon Markeri	Bitki Seleksiyon Markeri
KYRT1	Rif <sup>r</sup> (100 mg/L) Carb <sup>r</sup> (100 mg/L) Gent <sup>r</sup> (40 mg/L)	pTJK136	Strept (300 mg/L) Spect (125 mg/L)	Kan ( <i>npt II</i> geni)
EHA105	Rif <sup>r</sup> (20 mg/L)	pDNEM3300	Kanamisin	<i>ppt</i>
C58C1	Rif <sup>r</sup> (100 mg/L) Amp <sup>r</sup> (100 mg/L)	pTJK136	Strep (300 mg/L) Spect (125mg/L)	Kanamisin ( <i>npt II</i> geni)

r: direnç

Rif (Rifampisin), Carb (Karbensilin), Gent (Gentamisin), Amp (Ampisilin), Strep (Streptomisin), Spect (Spektinomisin)

**EK B.1. pTJK136 Plazmid Haritası**

**EK B. 2. pDNEM3300 Plazmit Haritası**



**EK C****BAKTERİYEL KÜLTÜR ORTAMLARI****C.1. Sıvı YEB Ortamı (400 ml)**

5,4g Nutrient Brothe (N.B)

0.4 g Yeast Ekstract

2 g Sukroz

0.1972 g MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O

400 ml dH<sub>2</sub>O pH 7.2 ve içerisinde uygulanacak suşa uygun antibiyotik eklenir. (Tablo C.1.)

**C.2.2. YEB-MES Ortamı (400 ml)**

5,4g Nutrient Brothe (N.B)

0.4 g Yeast Ekstract

2 g Sukroz

0.1972 g MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O

1 g Glukoz,

1 g Sukroz

10mM 0.39 g MES

400 ml dH<sub>2</sub>O pH 7.2

100 µM asetosiringon içerisinde suşa uygun antibiyotikler eklenir (Tablo C.1. )

Tablo. C.1. YEB veya YEB-MES ortamına eklenen suşlara  
uygun antibiyotik konsantrasyonları

<b>KYRT1</b>	<b>C58C1</b>	<b>EHA 101</b>
100 mg/L Rif.	100 mg/L Rif.	100 mg/L Kanamisin
100 mg/L Carb.	100 mg/L Amp.	20 mg/L Rifampisin
125 mg/L Spect.	125 mg/L Spect.	
300 mg/L Strept.	300 mg/L Strept.	
40 mg/L Gent.		

**EK D****BAKTERİYEL İNDÜKSİYON ORTAMLARI****D.1. Sıvı İndüksiyon Ortamı (400 ml)**

1.72 gr MS Tuzları

1 g/100 ml, 0.5 g/100ml, 0.1 g/100ml glukozun değişik konsantrasyonları 1.70 g MES

400 ml dH<sub>2</sub>O

100- 200 µM asetosiringon

**D.2. MMA ortamı (400 ml)**

4,3 g/L MS Tuzları,

10 mM 1.72 gr MES,

% 2 sukroz

400 ml dH<sub>2</sub>O

200 µM asetosiringon

**EK E**  
**GUS HİSTOKİMYASAL BOYASI**

**E1. GUS boyama solüsyonu**

0.1 M KPO<sub>4</sub> Buffer, pH 7.0

10 mM EDTA

0.5mM K-ferricyanide, pH 7.0

0.5 mM K-ferrocyanide, pH 7.0

1 mM 5- bromo-(X-Gluc)

10% v/v Triton X-100

**E2. GUS Fiksatif Solüsyonu**

10 v/v Formaldehit

20 % v/v Etanol

5% v/v Asetik asit

**EK F**

**DNA EKSTRASYON ÇÖZELTİSİ**

Trizma 1M

30 g/250 ml su

pH 8.0

EDTA 0.5 M, pH 8.0

37.2 g/100 ml su (pH 8.0 EDTA)

1000 ml ekstraksiyon çözeltisi için

%2 (W/v) CTAB

100 mM Tris-HCl Ph 8.0

1.4 M NaCl

20 mM Na EDTA pH 8.0

1000 ml ye saf suyla tamamlanıp % 0.2 oranında ME (Merkaptoetanol) kullanmadan hemen önce eklenmelidir.

## EK G

## TEZ İÇİNDE GEÇEN İSTATİKSEL ÇALIŞMALAR

## EK G1

VAR00002

## Descriptives

Uygulanan Büyüme Düzenleyicilerinin Sırası	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
1	42	2,2619	,54368	,08389	2,0925	2,4313	2,00	4,00
2	37	2,6757	1,00150	,16465	2,3418	3,0096	1,00	6,00
3	40	2,1250	,60712	,09599	1,9308	2,3192	1,00	3,00
4	35	1,9714	,29563	,04997	1,8699	2,0730	1,00	3,00
5	29	1,8276	,53911	,10011	1,6225	2,0327	1,00	3,00
6	20	2,8000	1,10501	,24709	2,2828	3,3172	1,00	5,00
7	37	1,8378	,37368	,06143	1,7132	1,9624	1,00	2,00
8	39	1,9487	,39395	,06308	1,8210	2,0764	1,00	3,00
9	32	1,9063	,29614	,05235	1,7995	2,0130	1,00	2,00
10	43	1,6512	,52932	,08072	1,4883	1,8141	1,00	3,00
11	42	1,7381	,49680	,07666	1,5833	1,8929	1,00	3,00
12	43	1,7209	,59062	,09007	1,5392	1,9027	1,00	3,00
13	119	1,5714	,64534	,05916	1,4543	1,6886	1,00	3,00
14	83	2,1566	,61450	,06745	2,0224	2,2908	1,00	4,00
15	58	2,4828	,86331	,11336	2,2558	2,7098	1,00	5,00
16	44	4,2045	1,53380	,23123	3,7382	4,6709	1,00	7,00
17	42	3,6190	1,39603	,21541	3,1840	4,0541	1,00	6,00
18	142	2,3873	1,04406	,08762	2,2141	2,5605	1,00	7,00
19	44	2,5455	,81994	,12361	2,2962	2,7947	1,00	5,00
Total	971	2,2430	1,02477	,03289	2,1785	2,3076	1,00	7,00

**Uygulanan Hormonlar:** 1) 0.05 mg/L TDZ + 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kn 2) 0.05 mg/L TDZ + 2 mg/L BAP + 1 mg/L Kn + 0.2 mg/L Zea 3) 2 mg/L Kn + 2 mg/L BAP + 0.1 mg/L Zea 4) 3 mg/L Kn 5) 1 mg/L Zea 6) 0.1 mg/L TDZ 7) 2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA 8) 3mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA 9) 5 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA 10) 0.5 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA 11) 1 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA 12) 2 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA 13) 0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L IAA 14) 0.5 mg/L Kn + 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA 15) 3 mg/L Kn + 1 mg/L Zea + 0.2 mg/L IAA, 16) 10µM BAP, 17) 10 µM BAP + 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 18) 5 µM BAP + 0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 19)10 µM BAP + 0.2 mg/L IAA

VAR00002

## ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	385,289	18	21,405	32,174	,000
Within Groups	633,352	952	,665		
Total	1018,641	970			

Dependent Variable: VAR00002

## Multiple Comparisons

LSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 % Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	-,41377(*)	,18390	,025	-,7747	-,0529
	3,00	,13690	,18020	,448	-,2167	,4905
	4,00	,29048	,18668	,120	-,0759	,6568
	5,00	,43432(*)	,19693	,028	,0479	,8208
	6,00	-,53810(*)	,22160	,015	-,9730	-,1032
	7,00	,42407(*)	,18390	,021	,0632	,7850
	8,00	,31319	,18138	,085	-,0428	,6691
	9,00	,35565	,19139	,063	-,0199	,7313
	10,00	,61074(*)	,17695	,001	,2635	,9580
	11,00	,52381(*)	,17799	,003	,1745	,8731
	12,00	,54097(*)	,17695	,002	,1937	,8882
	13,00	,69048(*)	,14639	,000	,4032	,9778
	14,00	,10528	,15445	,496	-,1978	,4084
	15,00	-,22085	,16526	,182	-,5452	,1035
	16,00	-1,94264(*)	,17596	,000	-2,2879	-1,5973
	17,00	-1,35714(*)	,17799	,000	-1,7064	-1,0078
	18,00	-,12542	,14327	,382	-,4066	,1557
	19,00	-,28355	,17596	,107	-,6289	,0618
	2,00	1,00	,41377(*)	,18390	,025	,0529
3,00		,55068(*)	,18605	,003	,1856	,9158
4,00		,70425(*)	,19232	,000	,3268	1,0817
5,00		,84809(*)	,20229	,000	,4511	1,2451
6,00		-,12432	,22637	,583	-,5686	,3199
7,00		,83784(*)	,18963	,000	,4657	1,2100
8,00		,72696(*)	,18719	,000	,3596	1,0943
9,00		,76943(*)	,19690	,000	,3830	1,1558
10,00		1,02451(*)	,18290	,000	,6656	1,3834
11,00		,93758(*)	,18390	,000	,5767	1,2985
12,00		,95475(*)	,18290	,000	,5958	1,3137
13,00		1,10425(*)	,15353	,000	,8030	1,4055
14,00		,51905(*)	,16123	,001	,2026	,8355
15,00		,19292	,17161	,261	-,1439	,5297
16,00		-1,52887(*)	,18194	,000	-1,8859	-1,1718
17,00		-,94337(*)	,18390	,000	-1,3043	-,5825
18,00		,28835	,15055	,056	-,0071	,5838
19,00		,13022	,18194	,474	-,2268	,4873
3,00		1,00	-,13690	,18020	,448	-,4905

	2,00	-,55068(*)	,18605	,003	-,9158	-,1856
	4,00	,15357	,18879	,416	-,2169	,5241
	5,00	,29741	,19893	,135	-,0930	,6878
	6,00	-,67500(*)	,22338	,003	-1,1134	-,2366
	7,00	,28716	,18605	,123	-,0779	,6523
	8,00	,17628	,18355	,337	-,1839	,5365
	9,00	,21875	,19345	,258	-,1609	,5984
	10,00	,47384(*)	,17918	,008	,1222	,8255
	11,00	,38690(*)	,18020	,032	,0333	,7405
	12,00	,40407(*)	,17918	,024	,0524	,7557
	13,00	,55357(*)	,14907	,000	,2610	,8461
	14,00	-,03163	,15700	,840	-,3397	,2765
	15,00	-,35776(*)	,16764	,033	-,6867	-,0288
	16,00	-2,07955(*)	,17819	,000	-2,4292	-1,7299
	17,00	-1,49405(*)	,18020	,000	-1,8477	-1,1404
	18,00	-,26232	,14600	,073	-,5489	,0242
	19,00	-,42045(*)	,17819	,018	-,7701	-,0708
4,00	1,00	-,29048	,18668	,120	-,6568	,0759
	2,00	-,70425(*)	,19232	,000	-1,0817	-,3268
	3,00	-,15357	,18879	,416	-,5241	,2169
	5,00	,14384	,20481	,483	-,2581	,5458
	6,00	-,82857(*)	,22863	,000	-1,2773	-,3799
	7,00	,13359	,19232	,487	-,2438	,5110
	8,00	,02271	,18991	,905	-,3500	,3954
	9,00	,06518	,19950	,744	-,3263	,4567
	10,00	,32027	,18569	,085	-,0441	,6847
	11,00	,23333	,18668	,212	-,1330	,5997
	12,00	,25050	,18569	,178	-,1139	,6149
	13,00	,40000(*)	,15684	,011	,0922	,7078
	14,00	-,18520	,16439	,260	-,5078	,1374
	15,00	-,51133(*)	,17458	,003	-,8539	-,1687
	16,00	-2,23312(*)	,18474	,000	-2,5957	-1,8706
	17,00	-1,64762(*)	,18668	,000	-2,0140	-1,2813
	18,00	-,41590(*)	,15393	,007	-,7180	-,1138
	19,00	-,57403(*)	,18474	,002	-,9366	-,2115
5,00	1,00	-,43432(*)	,19693	,028	-,8208	-,0479
	2,00	-,84809(*)	,20229	,000	-1,2451	-,4511
	3,00	-,29741	,19893	,135	-,6878	,0930
	4,00	-,14384	,20481	,483	-,5458	,2581
	6,00	-,97241(*)	,23708	,000	-1,4377	-,5072
	7,00	-,01025	,20229	,960	-,4072	,3867
	8,00	-,12113	,20000	,545	-,5136	,2714
	9,00	-,07866	,20912	,707	-,4891	,3317
	10,00	,17642	,19599	,368	-,2082	,5610
	11,00	,08949	,19693	,650	-,2970	,4760
	12,00	,10666	,19599	,586	-,2780	,4913
	13,00	,25616	,16891	,130	-,0753	,5876
	14,00	-,32904	,17594	,062	-,6743	,0162
	15,00	-,65517(*)	,18550	,000	-1,0192	-,2911

6,00	16,00	-2,37696(*)	,19509	,000	-2,7598	-1,9941
	17,00	-1,79146(*)	,19693	,000	-2,1779	-1,4050
	18,00	-,55974(*)	,16621	,001	-,8859	-,2336
	19,00	-,71787(*)	,19509	,000	-1,1007	-,3350
	1,00	,53810(*)	,22160	,015	,1032	,9730
	2,00	,12432	,22637	,583	-,3199	,5686
	3,00	,67500(*)	,22338	,003	,2366	1,1134
	4,00	,82857(*)	,22863	,000	,3799	1,2773
	5,00	,97241(*)	,23708	,000	,5072	1,4377
	7,00	,96216(*)	,22637	,000	,5179	1,4064
	8,00	,85128(*)	,22433	,000	,4110	1,2915
	9,00	,89375(*)	,23250	,000	,4375	1,3500
	10,00	1,14884(*)	,22076	,000	,7156	1,5821
	11,00	1,06190(*)	,22160	,000	,6270	1,4968
	12,00	1,07907(*)	,22076	,000	,6458	1,5123
	13,00	1,22857(*)	,19712	,000	,8417	1,6154
	14,00	,64337(*)	,20317	,002	,2447	1,0421
	15,00	,31724	,21151	,134	-,0978	,7323
	16,00	-1,40455(*)	,21996	,000	-1,8362	-,9729
17,00	-,81905(*)	,22160	,000	-1,2539	-,3842	
18,00	,41268(*)	,19481	,034	,0304	,7950	
19,00	,25455	,21996	,247	-,1771	,6862	
7,00	1,00	-,42407(*)	,18390	,021	-,7850	-,0632
	2,00	-,83784(*)	,18963	,000	-1,2100	-,4657
	3,00	-,28716	,18605	,123	-,6523	,0779
	4,00	-,13359	,19232	,487	-,5110	,2438
	5,00	,01025	,20229	,960	-,3867	,4072
	6,00	-,96216(*)	,22637	,000	-1,4064	-,5179
	8,00	-,11088	,18719	,554	-,4782	,2565
	9,00	-,06841	,19690	,728	-,4548	,3180
	10,00	,18668	,18290	,308	-,1723	,5456
	11,00	,09974	,18390	,588	-,2612	,4606
	12,00	,11691	,18290	,523	-,2420	,4758
	13,00	,26641	,15353	,083	-,0349	,5677
	14,00	-,31879(*)	,16123	,048	-,6352	-,0024
	15,00	-,64492(*)	,17161	,000	-,9817	-,3081
	16,00	-2,36671(*)	,18194	,000	-2,7238	-2,0097
	17,00	-1,78121(*)	,18390	,000	-2,1421	-1,4203
	18,00	-,54949(*)	,15055	,000	-,8449	-,2540
	19,00	-,70762(*)	,18194	,000	-1,0647	-,3506
	8,00	1,00	-,31319	,18138	,085	-,6691
2,00		-,72696(*)	,18719	,000	-1,0943	-,3596
3,00		-,17628	,18355	,337	-,5365	,1839
4,00		-,02271	,18991	,905	-,3954	,3500
5,00		,12113	,20000	,545	-,2714	,5136
6,00		-,85128(*)	,22433	,000	-1,2915	-,4110
7,00		,11088	,18719	,554	-,2565	,4782
9,00		,04247	,19455	,827	-,3393	,4243
10,00		,29756	,18036	,099	-,0564	,6515

		11,00	,21062	,18138	,246	-,1453	,5666
		12,00	,22779	,18036	,207	-,1262	,5817
		13,00	,37729(*)	,15050	,012	,0819	,6726
		14,00	-,20791	,15835	,190	-,5187	,1028
		15,00	-,53404(*)	,16891	,002	-,8655	-,2026
		16,00	-2,25583(*)	,17938	,000	-2,6079	-1,9038
		17,00	-1,67033(*)	,18138	,000	-2,0263	-1,3144
		18,00	-,43861(*)	,14746	,003	-,7280	-,1492
		19,00	-,59674(*)	,17938	,001	-,9488	-,2447
9,00		1,00	-,35565	,19139	,063	-,7313	,0199
		2,00	-,76943(*)	,19690	,000	-1,1558	-,3830
		3,00	-,21875	,19345	,258	-,5984	,1609
		4,00	-,06518	,19950	,744	-,4567	,3263
		5,00	,07866	,20912	,707	-,3317	,4891
		6,00	-,89375(*)	,23250	,000	-1,3500	-,4375
		7,00	,06841	,19690	,728	-,3180	,4548
		8,00	-,04247	,19455	,827	-,4243	,3393
		10,00	,25509	,19043	,181	-,1186	,6288
		11,00	,16815	,19139	,380	-,2074	,5438
		12,00	,18532	,19043	,331	-,1884	,5590
		13,00	,33482(*)	,16242	,040	,0161	,6536
		14,00	-,25038	,16972	,140	-,5834	,0827
		15,00	-,57651(*)	,17961	,001	-,9290	-,2240
		16,00	-2,29830(*)	,18950	,000	-2,6702	-1,9264
		17,00	-1,71280(*)	,19139	,000	-2,0884	-1,3372
		18,00	-,48107(*)	,15961	,003	-,7943	-,1678
		19,00	-,63920(*)	,18950	,001	-1,0111	-,2673
10,00		1,00	-,61074(*)	,17695	,001	-,9580	-,2635
		2,00	-1,02451(*)	,18290	,000	-1,3834	-,6656
		3,00	-,47384(*)	,17918	,008	-,8255	-,1222
		4,00	-,32027	,18569	,085	-,6847	,0441
		5,00	-,17642	,19599	,368	-,5610	,2082
		6,00	-1,14884(*)	,22076	,000	-1,5821	-,7156
		7,00	-,18668	,18290	,308	-,5456	,1723
		8,00	-,29756	,18036	,099	-,6515	,0564
		9,00	-,25509	,19043	,181	-,6288	,1186
		11,00	-,08693	,17695	,623	-,4342	,2603
		12,00	-,06977	,17591	,692	-,4150	,2754
		13,00	,07973	,14513	,583	-,2051	,3645
		14,00	-,50546(*)	,15326	,001	-,8062	-,2047
		15,00	-,83160(*)	,16414	,000	-1,1537	-,5095
		16,00	-2,55338(*)	,17491	,000	-2,8966	-2,2101
		17,00	-1,96788(*)	,17695	,000	-2,3151	-1,6206
		18,00	-,73616(*)	,14197	,000	-1,0148	-,4575
		19,00	-,89429(*)	,17491	,000	-1,2375	-,5510
11,00		1,00	-,52381(*)	,17799	,003	-,8731	-,1745
		2,00	-,93758(*)	,18390	,000	-1,2985	-,5767
		3,00	-,38690(*)	,18020	,032	-,7405	-,0333
		4,00	-,23333	,18668	,212	-,5997	,1330

	5,00	-,08949	,19693	,650	-,4760	,2970
	6,00	-1,06190(*)	,22160	,000	-1,4968	-,6270
	7,00	-,09974	,18390	,588	-,4606	,2612
	8,00	-,21062	,18138	,246	-,5666	,1453
	9,00	-,16815	,19139	,380	-,5438	,2074
	10,00	,08693	,17695	,623	-,2603	,4342
	12,00	,01717	,17695	,923	-,3301	,3644
	13,00	,16667	,14639	,255	-,1206	,4540
	14,00	-,41853(*)	,15445	,007	-,7216	-,1154
	15,00	-,74466(*)	,16526	,000	-1,0690	-,4203
	16,00	-2,46645(*)	,17596	,000	-2,8118	-2,1211
	17,00	-1,88095(*)	,17799	,000	-2,2302	-1,5317
	18,00	-,64923(*)	,14327	,000	-,9304	-,3681
	19,00	-,80736(*)	,17596	,000	-1,1527	-,4621
12,00	1,00	-,54097(*)	,17695	,002	-,8882	-,1937
	2,00	-,95475(*)	,18290	,000	-1,3137	-,5958
	3,00	-,40407(*)	,17918	,024	-,7557	-,0524
	4,00	-,25050	,18569	,178	-,6149	,1139
	5,00	-,10666	,19599	,586	-,4913	,2780
	6,00	-1,07907(*)	,22076	,000	-1,5123	-,6458
	7,00	-,11691	,18290	,523	-,4758	,2420
	8,00	-,22779	,18036	,207	-,5817	,1262
	9,00	-,18532	,19043	,331	-,5590	,1884
	10,00	,06977	,17591	,692	-,2754	,4150
	11,00	-,01717	,17695	,923	-,3644	,3301
	13,00	,14950	,14513	,303	-,1353	,4343
	14,00	-,43570(*)	,15326	,005	-,7365	-,1349
	15,00	-,76183(*)	,16414	,000	-1,0839	-,4397
	16,00	-2,48362(*)	,17491	,000	-2,8269	-2,1404
	17,00	-1,89812(*)	,17695	,000	-2,2454	-1,5509
	18,00	-,66639(*)	,14197	,000	-,9450	-,3878
	19,00	-,82452(*)	,17491	,000	-1,1678	-,4813
13,00	1,00	-,69048(*)	,14639	,000	-,9778	-,4032
	2,00	-1,10425(*)	,15353	,000	-1,4055	-,8030
	3,00	-,55357(*)	,14907	,000	-,8461	-,2610
	4,00	-,40000(*)	,15684	,011	-,7078	-,0922
	5,00	-,25616	,16891	,130	-,5876	,0753
	6,00	-1,22857(*)	,19712	,000	-1,6154	-,8417
	7,00	-,26641	,15353	,083	-,5677	,0349
	8,00	-,37729(*)	,15050	,012	-,6726	-,0819
	9,00	-,33482(*)	,16242	,040	-,6536	-,0161
	10,00	-,07973	,14513	,583	-,3645	,2051
	11,00	-,16667	,14639	,255	-,4540	,1206
	12,00	-,14950	,14513	,303	-,4343	,1353
	14,00	-,58520(*)	,11665	,000	-,8141	-,3563
	15,00	-,91133(*)	,13062	,000	-1,1677	-,6550
	16,00	-2,63312(*)	,14391	,000	-2,9155	-2,3507
	17,00	-2,04762(*)	,14639	,000	-2,3349	-1,7603
	18,00	-,81590(*)	,10137	,000	-1,0148	-,6170

14,00	19,00	-,97403(*)	,14391	,000	-1,2564	-,6916
	1,00	-,10528	,15445	,496	-,4084	,1978
	2,00	-,51905(*)	,16123	,001	-,8355	-,2026
	3,00	,03163	,15700	,840	-,2765	,3397
	4,00	,18520	,16439	,260	-,1374	,5078
	5,00	,32904	,17594	,062	-,0162	,6743
	6,00	-,64337(*)	,20317	,002	-1,0421	-,2447
	7,00	,31879(*)	,16123	,048	,0024	,6352
	8,00	,20791	,15835	,190	-,1028	,5187
	9,00	,25038	,16972	,140	-,0827	,5834
	10,00	,50546(*)	,15326	,001	,2047	,8062
	11,00	,41853(*)	,15445	,007	,1154	,7216
	12,00	,43570(*)	,15326	,005	,1349	,7365
	13,00	,58520(*)	,11665	,000	,3563	,8141
	15,00	-,32613(*)	,13959	,020	-,6001	-,0522
	16,00	-2,04792(*)	,15210	,000	-2,3464	-1,7494
	17,00	-1,46242(*)	,15445	,000	-1,7655	-1,1593
	18,00	-,23070(*)	,11270	,041	-,4519	-,0095
	15,00	19,00	-,38883(*)	,15210	,011	-,6873
1,00		,22085	,16526	,182	-,1035	,5452
2,00		-,19292	,17161	,261	-,5297	,1439
3,00		,35776(*)	,16764	,033	,0288	,6867
4,00		,51133(*)	,17458	,003	,1687	,8539
5,00		,65517(*)	,18550	,000	,2911	1,0192
6,00		-,31724	,21151	,134	-,7323	,0978
7,00		,64492(*)	,17161	,000	,3081	,9817
8,00		,53404(*)	,16891	,002	,2026	,8655
9,00		,57651(*)	,17961	,001	,2240	,9290
10,00		,83160(*)	,16414	,000	,5095	1,1537
11,00		,74466(*)	,16526	,000	,4203	1,0690
12,00		,76183(*)	,16414	,000	,4397	1,0839
13,00		,91133(*)	,13062	,000	,6550	1,1677
14,00		,32613(*)	,13959	,020	,0522	,6001
16,00		-1,72179(*)	,16307	,000	-2,0418	-1,4018
17,00		-1,13629(*)	,16526	,000	-1,4606	-,8120
18,00		,09543	,12710	,453	-,1540	,3449
16,00		19,00	-,06270	,16307	,701	-,3827
	1,00	1,94264(*)	,17596	,000	1,5973	2,2879
	2,00	1,52887(*)	,18194	,000	1,1718	1,8859
	3,00	2,07955(*)	,17819	,000	1,7299	2,4292
	4,00	2,23312(*)	,18474	,000	1,8706	2,5957
	5,00	2,37696(*)	,19509	,000	1,9941	2,7598
	6,00	1,40455(*)	,21996	,000	,9729	1,8362
	7,00	2,36671(*)	,18194	,000	2,0097	2,7238
	8,00	2,25583(*)	,17938	,000	1,9038	2,6079
	9,00	2,29830(*)	,18950	,000	1,9264	2,6702
	10,00	2,55338(*)	,17491	,000	2,2101	2,8966
	11,00	2,46645(*)	,17596	,000	2,1211	2,8118
12,00	2,48362(*)	,17491	,000	2,1404	2,8269	

	13,00	2,63312(*)	,14391	,000	2,3507	2,9155
	14,00	2,04792(*)	,15210	,000	1,7494	2,3464
	15,00	1,72179(*)	,16307	,000	1,4018	2,0418
	17,00	,58550(*)	,17596	,001	,2402	,9308
	18,00	1,81722(*)	,14073	,000	1,5410	2,0934
	19,00	1,65909(*)	,17390	,000	1,3178	2,0004
17,00	1,00	1,35714(*)	,17799	,000	1,0078	1,7064
	2,00	,94337(*)	,18390	,000	,5825	1,3043
	3,00	1,49405(*)	,18020	,000	1,1404	1,8477
	4,00	1,64762(*)	,18668	,000	1,2813	2,0140
	5,00	1,79146(*)	,19693	,000	1,4050	2,1779
	6,00	,81905(*)	,22160	,000	,3842	1,2539
	7,00	1,78121(*)	,18390	,000	1,4203	2,1421
	8,00	1,67033(*)	,18138	,000	1,3144	2,0263
	9,00	1,71280(*)	,19139	,000	1,3372	2,0884
	10,00	1,96788(*)	,17695	,000	1,6206	2,3151
	11,00	1,88095(*)	,17799	,000	1,5317	2,2302
	12,00	1,89812(*)	,17695	,000	1,5509	2,2454
	13,00	2,04762(*)	,14639	,000	1,7603	2,3349
	14,00	1,46242(*)	,15445	,000	1,1593	1,7655
	15,00	1,13629(*)	,16526	,000	,8120	1,4606
	16,00	-,58550(*)	,17596	,001	-,9308	-,2402
	18,00	1,23172(*)	,14327	,000	,9506	1,5129
	19,00	1,07359(*)	,17596	,000	,7283	1,4189
18,00	1,00	,12542	,14327	,382	-,1557	,4066
	2,00	-,28835	,15055	,056	-,5838	,0071
	3,00	,26232	,14600	,073	-,0242	,5489
	4,00	,41590(*)	,15393	,007	,1138	,7180
	5,00	,55974(*)	,16621	,001	,2336	,8859
	6,00	-,41268(*)	,19481	,034	-,7950	-,0304
	7,00	,54949(*)	,15055	,000	,2540	,8449
	8,00	,43861(*)	,14746	,003	,1492	,7280
	9,00	,48107(*)	,15961	,003	,1678	,7943
	10,00	,73616(*)	,14197	,000	,4575	1,0148
	11,00	,64923(*)	,14327	,000	,3681	,9304
	12,00	,66639(*)	,14197	,000	,3878	,9450
	13,00	,81590(*)	,10137	,000	,6170	1,0148
	14,00	,23070(*)	,11270	,041	,0095	,4519
	15,00	-,09543	,12710	,453	-,3449	,1540
	16,00	-1,81722(*)	,14073	,000	-2,0934	-1,5410
	17,00	-1,23172(*)	,14327	,000	-1,5129	-,9506
	19,00	-,15813	,14073	,261	-,4343	,1180
19,00	1,00	,28355	,17596	,107	-,0618	,6289
	2,00	-,13022	,18194	,474	-,4873	,2268
	3,00	,42045(*)	,17819	,018	,0708	,7701
	4,00	,57403(*)	,18474	,002	,2115	,9366
	5,00	,71787(*)	,19509	,000	,3350	1,1007
	6,00	-,25455	,21996	,247	-,6862	,1771
	7,00	,70762(*)	,18194	,000	,3506	1,0647

8,00	,59674(*)	,17938	,001	,2447	,9488
9,00	,63920(*)	,18950	,001	,2673	1,0111
10,00	,89429(*)	,17491	,000	,5510	1,2375
11,00	,80736(*)	,17596	,000	,4621	1,1527
12,00	,82452(*)	,17491	,000	,4813	1,1678
13,00	,97403(*)	,14391	,000	,6916	1,2564
14,00	,38883(*)	,15210	,011	,0903	,6873
15,00	,06270	,16307	,701	-,2573	-,3827
16,00	-1,65909(*)	,17390	,000	-2,0004	-1,3178
17,00	-1,07359(*)	,17596	,000	-1,4189	-,7283
18,00	,15813	,14073	,261	-,1180	,4343

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## EK G2

VAR00006

### Descriptives

Uygulanan Hormon Sırası	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için % 95 Güven Aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
1,00	46	1,6522	,56637	,08351	1,4840	1,8204	1,00	3,00
2,00	61	3,0492	1,14639	,14678	2,7556	3,3428	1,00	6,00
3,00	81	1,9259	,49441	,05493	1,8166	2,0352	1,00	3,00
4,00	93	1,9355	,41195	,04272	1,8506	2,0203	1,00	3,00
5,00	93	2,0108	,81420	,08443	1,8431	2,1784	1,00	6,00
6,00	81	2,0370	,57975	,06442	1,9088	2,1652	1,00	3,00
7,00	74	1,5405	,68625	,07977	1,3815	1,6995	1,00	4,00
Total	529	2,0113	,80238	,03489	1,9428	2,0799	1,00	6,00

**Uygulanan hormonlar:** **A)** 1 mg/L BAP'tan sonra **1)** 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L Kn + 0.1 mg/L Zea **2)** 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>, **B)** 3 mg/L BAP ve 1 mg/L Kn'den sonra **3)** 1 mg/L BAP + 1 mg/L Kn **4)** 2 mg/L Kn + 0.2 mg/L IAA **5)** 2 mg/L BAP **6)** 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L Zea **7)** 3 mg/L BAP ve 0.1 mg/L TDZ

### ANOVA

VAR00006

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	89,220	6	14,870	30,960	,000
Within Groups	250,712	522	,480		
Total	339,932	528			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00006  
LSD

(I) VAR00005	(J) VAR00005	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	-1,39701(*)	,13533	,000	-1,6629	-1,1311
	3,00	-,27375(*)	,12795	,033	-,5251	-,0224
	4,00	-,28331(*)	,12492	,024	-,5287	-,0379
	5,00	-,35858(*)	,12492	,004	-,6040	-,1132
	6,00	-,38486(*)	,12795	,003	-,6362	-,1335
	7,00	,11163	,13012	,391	-,1440	,3673
	2,00	1,00	1,39701(*)	,13533	,000	1,1311
3,00		1,12325(*)	,11749	,000	,8924	1,3541
4,00		1,11370(*)	,11418	,000	,8894	1,3380
5,00		1,03843(*)	,11418	,000	,8141	1,2627
6,00		1,01214(*)	,11749	,000	,7813	1,2429
7,00		1,50864(*)	,11985	,000	1,2732	1,7441
3,00		1,00	,27375(*)	,12795	,033	,0224
	2,00	-1,12325(*)	,11749	,000	-1,3541	-,8924
	4,00	-,00956	,10533	,928	-,2165	,1974
	5,00	-,08483	,10533	,421	-,2917	,1221
	6,00	-,11111	,10890	,308	-,3250	,1028
	7,00	,38539(*)	,11144	,001	,1664	,6043
	4,00	1,00	,28331(*)	,12492	,024	,0379
2,00		-1,11370(*)	,11418	,000	-1,3380	-,8894
3,00		,00956	,10533	,928	-,1974	,2165
5,00		-,07527	,10163	,459	-,2749	,1244
6,00		-,10155	,10533	,335	-,3085	,1054
7,00		,39494(*)	,10796	,000	,1829	,6070
5,00		1,00	,35858(*)	,12492	,004	,1132
	2,00	-1,03843(*)	,11418	,000	-1,2627	-,8141
	3,00	,08483	,10533	,421	-,1221	,2917
	4,00	,07527	,10163	,459	-,1244	,2749
	6,00	-,02628	,10533	,803	-,2332	,1806
	7,00	,47021(*)	,10796	,000	,2581	,6823
	6,00	1,00	,38486(*)	,12795	,003	,1335
2,00		-1,01214(*)	,11749	,000	-1,2429	-,7813
3,00		,11111	,10890	,308	-,1028	,3250

7,00	4,00	,10155	,10533	,335	-,1054	,3085
	5,00	,02628	,10533	,803	-,1806	,2332
	7,00	,49650(*)	,11144	,000	,2776	,7154
	1,00	-,11163	,13012	,391	-,3673	,1440
	2,00	-1,50864(*)	,11985	,000	-1,7441	-1,2732
	3,00	-,38539(*)	,11144	,001	-,6043	-,1664
	4,00	-,39494(*)	,10796	,000	-,6070	-,1829
	5,00	-,47021(*)	,10796	,000	-,6823	-,2581
	6,00	-,49650(*)	,11144	,000	-,7154	-,2776

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## ÖZ GEÇMİŞ

Sema Selvi Nur TAŞYAPAN 1984 yılında Kayseri’de doğdu. İlköğrenimine Nevşehir’de Alp Arslan İlkokulun’da başladı ve İlköğrenimini Kayseri’de Kadı Burhanettin Orta Okulu’nda tamamladı. Liseyi Mustafa Eminoglu Anadolu Lisesi’nde bitirdi. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2007 yılında Biyoloji Bölüm Birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. Halen bu bölümde yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

Yenidoğan Mah. Bahar Cad.

Dönence Apt. No: 6/4

TALAS – KAYSERİ

[sema.seraph@hotmail.com](mailto:sema.seraph@hotmail.com).

Tel: 0538 377 78 19