



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



**BİÇİM SONRASI KURAKLIK STRESİNE MARUZ BIRAKILAN
YAYGIN YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE
KURAKLIK STRESİNE TOLERANTLIĞI SAĞLAYAN BAZI
SPESİFİK GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Selçuk ÇETİN

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE-2020

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİÇİM SONRASI KURAKLIK STRESİNE
MARUZ BIRAKILAN YAYGIN YONCA
(*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE
KURAKLIK STRESİNE TOLERANTLIĞI
SAĞLAYAN BAZI SPESİFİK GENLERİN İFADE
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Selçuk ÇETİN

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 23/12/2020

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

ÇANAKKALE-2020

Selçuk ÇETİN tarafından Prof. Dr. İskender TİRYAKİ yönetiminde hazırlanan ve 23/12/2020 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Biçim Sonrası Kuraklık Stresine Maruz Bırakılan Yaygın Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinde Kuraklık Stresine Tolerantlığı Sağlayan Bazı Spesifik Genlerin İfade Seviyelerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

.....

Başkan

Prof. Dr. Metin TUNA

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yonca SURGUN ACAR

.....

Üye

Doç. Dr. Pelin KANTEN

Müdür

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Sıra No: (Enstitü tarafından doldurulacak)

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından desteklenmiştir. Proje no: 116O417

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Selçuk ÇETİN

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak gelişimime çok büyük katkıları olan saygı değer bölüm başkanımız ve danışman hocam olan Sayın **Prof. Dr. İskender TİRYAKİ**'ye sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Deneylerin gerçekleştirilmesinde bizlere yol gösteren, her türlü desteği saylayarak yardımcı olan kıymetli hocam Sayın **Dr. Uğur SARI**'ya teşekkür ederim. Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen laboratuvar çalışma arkadaşlarım **Erman ÇAVUŞOĞLU**, **Beste CELEP**, **Enes Gökhan YILMAZ** ve **Çağlar KAYA**'ya teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca hem maddi hem manevi desteklerini esirgemeyerek her daim arkamda olan annem **Emine ÇETİN**, babam **Ali ÇETİN**, abim **Taner ÇETİN**'e ve manevi abim **Şaban ÖZEL**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK-TOVAG 116O417 proje kapsamında yürütülmüş olup tezin tamamlanabilmesi için sağlanan maddi destekten dolayı **TÜBİTAK**'a teşekkür ederiz.

Selçuk ÇETİN
Çanakkale, Aralık 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde oranı
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
<i>18S rRNA</i>	<i>18S ribozomalRNA</i> geni
ATP	Adenozin Trifosfat
BKS	Bitki kanopy sıcaklığı
B.Ö.	Biçim öncesi
B.S.	Biçim sonrası
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Ct	Eşik döngüsü
da	Dekar
ddH ₂ O	Duble distile su
DEPC	Dietil pirokarbonat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
DREB	Kuraklıktan sorumlu element bağlama
EMS	<i>Ethylmethane sulfonate</i>
EtBr	Etidyum bromür
EtOH	Etil alkol
F	İleri primer
FAO	Uluslararası Gıda ve Tarım Örgütü
Ha	Hektar
IAEA	Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu
kg	Kilogram
LEA	Geç embriyogenez
M ₂	İkinci jenerasyon mutant
M ₃	Üçüncü jenerasyon mutant
MAS	Markör Yardımlı Seleksiyon

MgCl ₂	Magnezyum klorür
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen glikol
Ph	Asitlik-bazlık
<i>ProDH</i>	Prolin dehidrojenaz geni
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Kantitatif özellik lokusu
R	Geri primer
<i>RD2</i>	Kuraklıktan sorumlu <i>RD2</i> geni
RG	Referans gen
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPM	Dakikadaki devir sayısı
RT	Ters transkriptaz
SAS	İstatistik analiz programı
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
sn	Saniye
Ta	Bağlanma sıcaklığı
TBE	Tris-borate-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Ünite
UV	Ultraviyole
X	Aday mutant genotip kodu
VIS	Görünür bölge ışık
WT	Transgenik olmayan / Yabanıl tip
Z	Kontrol bitkisi kodu

ÖZET

BİÇİM SONRASI KURAKLIK STRESİNE MARUZ BIRAKILAN YAYGIN YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE KURAKLIK STRESİNE TOLERANTLIĞI SAĞLAYAN BAZI SPESİFİK GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk ÇETİN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

23/12/2020, 98

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG 116O417 numaralı proje kapsamında aseptik şartlarda kurağa tolerantlığı tespit edilen ve saksılarda kontrollü koşullarda yetiştirilen 3 farklı mutant (M₃) yonca genotipinin birinci biçim sonrasında kuraklık stresine verdikleri tepkilerin kuraklık stresine karşı tolerantlıktan sorumlu lokus spesifik (*MsProDH* ve *MtRD2*) genlerin ifade seviyelerinde meydana getirdiği değişimlerin belirlenmesi amacıyla 2017-2020 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Moleküler Genetik ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada ayrıca biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü bazı agro-morfolojik özelliklerin yanı sıra bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarları da incelenmiştir. Biçim sonrası uygulanan kuraklık stresinin 0, 18 ve 24. günlerinde alınan yaprak örneklerinden total RNA'lar izole edilmiş ve ardından cDNA'lar sentezlenmiştir. Çalışmada *Ms18S rRNA* geni RT-qPCR analizlerinde referans gen (RG) olarak kullanılmıştır. Her bir genotipe ait örneklerin RT-qPCR analizleri 3 teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Kuraklık stresine karşı tolerantlıktan sorumlu lokus spesifik genlerin ifade seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarlarına ait veriler SAS istatistik paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamalar en küçük asgari fark (LSD) %5 önemlilik seviyesinde test edilmiştir. Çalışmada kullanılan X18, X20, X50 mutant bitkiler ile Z1 (sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinin *MsProDH* relatif gen ifade seviyeleri kuraklık stresinin 18. gününde sırasıyla 0,81, 4,57, 14,80, 0,19, 20,65 olurken 24. günde sırasıyla 0,19, 0,26, 1,78, 4,20,

49,56 olarak belirlenmiştir. X18, X20, X50, Z1 ve Z2 bitkilerinin *MtRD2* relatif gen ifade seviyeleri kuraklık stresinin 18. gününde sırasıyla 0,28, 6,48, 14,84, 0,96, 1,23 olurken 24. günde sırasıyla 0,13, 0,25, 3,63, 5,33, 2,34 olarak belirlenmiştir. X18, X20, X50, Z1 ve Z2 bitkilerinin total klorofil miktarları 0. günde sırasıyla 58,48, 60,27, 65,55, 70,88, 58,08 mg/kg, 18. günde sırasıyla 48,66, 53,98, 56,96, 38,95, 46,05 mg/kg ve 24. günde sırasıyla 53,41, 49,22, 45,67, 46,21, 47,69 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Varyans analiz sonuçları birinci biçim sonrası kuraklık stresine maruz kalan mutant ve kontrol yonca bitkilerinde incelenen agro-morfolojik ve fizyolojik özellikler bakımından önemli farklılıkların olduğunu göstermiştir. Sonuçlar birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresinin, kuraklık stresinin süresi ve bitki genotipine bağlı olarak ilgili lokus spesifik genlerin relatif ifade seviyelerinde büyük değişikliklere neden olduğunu ve mutant bitkilerin kuraklık stresini daha iyi tolere edebildiğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Yaygın yonca, Kuraklık stresi, Gen ifadesi, Gerçek zamanlı kantitatif PCR

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME SPECIFIC DROUGHT RELATED GENE EXPRESSION LEVELS OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.) APPLIED DROUGHT STRESS RIGTH AFTER CUTTING

Selçuk ÇETİN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Advisor: Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

23/12/2020, 98

This study was carried out to determine the changes in expression levels of loci-specific genes (*MsProDH* and *MtRD2*) responsible for drought stress tolerance on 3 alfalfa mutants (M_3) which were determined as drought tolerant in aseptic conditions at germination stage in TUBITAK-TOVAG project (116O417). The experiment was carried out in a growth chamber. The plants grown in pots and application of drought started right after the cutting at first blooming stage in Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Molecular Genetics and Biotechnology Laboratory between years of 2017-2020. The plant canopy temperatures and total chlorophyll contents of plants were also determined along with some agro-morphological characters on the 0th, the 18th and 24th days of drought stress. The cDNAs were synthesized from total RNAs isolated from leaf samples taken on the days of the 0th, the 18th and 24th of drought stress. The *Ms18S rRNA* gene was used as a reference and 3 technical replications were used in RT-qPCR analysis for each sample. Relative gene expression levels of drought related loci-specific genes were determined by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The data of plant canopy temperatures and total chlorophyll contents were analyzed by using the SAS statistical package program and the means were separated based on the least significant difference (LSD) at 5% significance level. The *MsProDH* relative gene expression levels of X18, X20, X50 mutants, Z1 (aqueous) and Z2 (anhydrous) control plants were determined as 0,81, 4,57, 14,80, 0,19, 20,65 and 0,19, 0,26, 1,78, 4,20, 49,56 on the 18th and 24th days of drought stress, respectively while the *MtRD2* relative gene expression levels of the same plants in given order were determined as 0,28, 6,48, 14,84, 0,96, 1,23 and 0,13, 0,25, 3,63, 5,33, 2,34 18th and 24th days of

drought, respectively. The total chlorophyll contents of the plants ranged from 58,48 to 70,88 mg/kg, from 38,95 to 56,96 mg/kg, and from 45,67 to 53,41 mg/kg on 0th, 18th and 24th days of drought stress, respectively. The results of variance analysis showed significant differences among the mutants and control plants for the morphological and physiological parameters measured for drought stress which were applied to the mutants grown in pots after cutting at first blooming stage. The results of this study revealed that drought stress greatly changed the relative expression levels of drought related loci-specific genes based on the duration of drought stress and the plant genotype used.

Keywords: Common alfalfa, Drought stress, Gene expression, Real-time quantitative PCR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Gen İfade Analizleri ve Kullanılan Teknikler.....	7
1.2.1. SYBR Green Yöntemi.....	10
1.2.2. Referans/Kontrol (Housekeeping) Genlerin Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Çalışmalarındaki Önemi.....	13
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
2.1. <i>Ethylmethane sulfonate</i> (EMS) ile Mutasyon Islahı	15
2.2. Polietilen glikol (PEG) Kimyasalı ve Yapay Kuraklık Stresi.....	17
2.3. Yoncada Morfolojik Özellik Çalışmaları.....	19
2.4. SPAD Ölçümü ve Total Klorofil İçeriği	21
2.5. Kuraklık Stresiyle İlgili Seçilen Genler	22
2.5.1. Prolin Dehidrojenaz Geni (<i>ProDH</i>)	22
2.5.2. Kuraklıktan Sorumlu <i>RD2</i> Geni.....	24
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	26
3.2.2. Bitkilerin Biçim Öncesine İlişkin Bazı Agro-morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	27
3.2.3. Total Klorofil Miktarı Ölçümü.....	30
3.2.4. Yaprak Örneklerinin Alınması ve Bitkilerin Biçimi	31
3.2.5. Bitkilerin Yaş Ot Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	32
3.2.6. Bitkilerin Kuru Ot Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	33

3.2.7. Gerçek Kuraklık Stresinin Uygulanması ve Yaprak Örneklerinin Alınması.....	33
3.2.8. Saksıların Tartılması	34
3.2.9. Bitki Kanopy Sıcaklıklarının Belirlenmesi	35
3.2.10. Kuraklık Stresinin 18. ve 24. Günü İncelenen Bazı Agro-morfolojik Özellikler	36
3.2.11. Total RNA İzolasyonu	38
3.2.12. Total RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	40
3.2.13. Total RNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
3.2.14. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	42
3.2.15. Referans ve Hedef Genlere Ait PCR Testleri.....	44
3.2.16. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Kantitatif PCR İle Gen İfade Analizleri	47
3.2.17. Verilerin Analizi.....	50
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	51
4.1. Tomurcuklanma Gün Sayıları	51
4.2.1. Ana Dal Sayısı (adet/bitki).....	52
4.2.2. Bitki Boyu (cm).....	52
4.2.3. Ana Gövde Kalınlığı (mm)	52
4.2.4. Yan Dal Sayısı (adet/bitki).....	53
4.2.5. Çiçek Salkı Durumu (1-3).....	53
4.2.6. Çiçek Rengi (1-5).....	53
4.2.7. Yaprak Rengi (1-3)	53
4.2.8. Yaprakta Dişlilik Durumu (1-3).....	53
4.2.9. Kulakçık Şekli (1-4).....	53
4.2.10. Kulakçıkta Antosiyanin (0-1).....	54
4.2.11. Koltuk Sürgününde Antosiyanin (0-1).....	54
4.2.12. Gövdede Antosiyanin (0-1).....	54
4.2.13. Yaprakta Tüylülük (0-1)	54
4.2.14. Gövdede Tüylülük (0-1).....	54
4.2.15. Yaprak Boyu (cm).....	54
4.2.16. Orta Yaprakçık Boyu (mm).....	55
4.2.17. Orta Yaprakçık Eni (mm).....	56
4.3. Bitkilerin Yaş ve Kuru Ot Ağırlıkları	56
4.4. Saksı Tartım Değerleri	57

4.5. Bitki Kanopy Sıcaklıkları.....	58
4.6. Kuraklık Stresi Uygulanan Bitkilerden Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler.....	64
4.6.1. Kuraklık Stresinin 18. Günü Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler	64
4.6.2. Kuraklık Stresinin 24. Günü Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler	67
4.7. Total Klorofil İçeriği	70
4.8. RT-qPCR Reaksiyonlarına Ait Amplifikasyon ve Erime Eğrileri.....	72
4.9. Kuraklık Spesifik Genlerin Relatif Gen İfade Seviyeleri	81
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	I



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 1. Bitkilerin kuraklık stresi gibi abiyotik stres faktörlerine karşı oluşturduğu stres toleranlığının şematik gösterimi (Akhtar ve diğerleri, 2012)'den modifiye edilmiştir 7
- Şekil 2. RNA temelli gen ifade analizi belirlemede kullanılan teknikler (Hess ve diğerleri, 1989; Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011)'den modifiye edilmiştir 8
- Şekil 3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR'in reaksiyon döngüsüne ait bir görsel (Heid ve diğerleri, 1996)'dan modifiye edilmiştir 11
- Şekil 4. Floresan bir boya olan SYBR Green'in ışıma yapmasına ilişkin basamaklar (Van der Valden ve diğerleri, 2003)'den modifiye edilmiştir 12
- Şekil 5. Erime eğrisi grafiğine örnek bir görsel (Yüzbaşıoğlu, 2008). 13
- Şekil 6. İnkübasyon süresi sona ermiş olan petrilerde kökçük gelişimi gösteren aday mutant (M_3) genotiplerin belirlenmesi ve bitkilerin gelişim süreci a-b. PEG infiltrasyon yöntemiyle yarı kuvvetli MS ortamda kökçük gelişimi gösteren aday mutant genotiplerin belirlenmesi ve petrilerden alınması, c-d. Fidelerin viyollere dikilmesi ve geliştirilmesi, e. Viyollerde yetiştirilen fidelerin saksılara transfer edilmesi, f-g-h. Saksılara transfer edilen fidelere ait genel görseller 27
- Şekil 7. Bazı agro-morfolojik özellikler ve SPAD (toplam klorofil) verilerine göre seçilerek çalışmada kullanılan aday mutant yonca genotiplerinin biçim öncesine ait genel görünüşleri a. X18, b. X20, c. X50, d. Z1 (sulu kontrol), e. Z2 (susuz kontrol) 28
- Şekil 8. Bitkilerin biçim öncesi (B.Ö.) ve kuraklık stresi altında yapraklardan total klorofil miktarlarının ölçülmesi a. Total klorofil ölçümünde kullanılan Minolta SPAD-502 marka klorofilmetre cihazına ilişkin bir görsel, b-c. Aday mutant genotiplerin orta yaprakçıkları kullanılarak klorofil miktarlarının ölçülmesine ilişkin görseller 31
- Şekil 9. Çiçek tomurcuğu oluşum evresine gelen aday mutant genotiplerin biçim öncesi yaprak örneklerinin alınması ve bitkilerin biçilmesi a. Tomurcuklanma dönemi, b. Biçim öncesi yaprak örneklerinin alınmasına ilişkin bir görsel, c. Bitkilerin biçilmesine ilişkin bir görsel 32
- Şekil 10. Biçilen bitkilerin yaş ot ağırlıklarının belirlenmesine ilişkin bir görsel 32
- Şekil 11. Yonca bitkilerine ait yaş otların kurutulması ve kuru ot tartımına ilişkin görseller a-b. Yaş otların kurutulması işleminde kullanılan etüve ilişkin görseller, c. Bitkilerin kuru ot ağırlıklarının belirlenmesi 33
- Şekil 12. Biçilen bitkilerin iklim odasında kuraklık stresi şartlarında yetiştirilmesi ve yaprak örneklerinin alınması a. Biçilen bitkilerin iklim odasındaki genel görüntüleri, b. Kuraklık stresi altında yeniden gelişim gösteren aday mutant genotiplere ait genel görüntü, c. Kuraklık stresi altında gelişen bitkilerden yaprak örneklerinin alınmasına ilişkin bir görsel 34
- Şekil 13. Saksı tartımlarına ilişkin görseller a. Bitkilerin biçim günü saksı tartımına ilişkin bir görsel, b-c. Kuraklık stresi uygulanan aday mutant genotiplerin farklı zaman aralıklarında saksı tartımlarına ilişkin görseller 34
- Şekil 14. Stres şartlarında yetiştirilen bitkilerin farklı zaman aralıklarında bitki kanopy sıcaklıklarının belirlenmesi a-b-c. Kuraklık stresinin 18. günü alt, orta ve üst kısımlardan bitki kanopy sıcaklıklarının belirlenmesine ilişkin görseller, d-e-f. Kuraklık stresinin 24. günü alt, orta ve üst kısımlardan bitki kanopy sıcaklıklarının belirlenmesine ilişkin görseller 35
- Şekil 15. Kuraklık stresinin 18. ve 24. günü aday mutant genotiplerin (M_3) bazı agro-morfolojik özelliklerinin belirlenmesine ilişkin görseller a. Ana gövde

kalınlığının belirlenmesi, b. Bitki boyunun ölçülmesi, c. Orta yaprakçıkların en ve boylarının belirlenmesi	37
Şekil 16. Bitkilerin çiçek rengi ve çiçek salkım durumlarının belirlenmesine ilişkin görseller a. X18, b. X20, c. X50, d. Z1, e. Z2	38
Şekil 17. Total RNA izolasyon aşamasına ilişkin görseller a-b. Yaprak örneklerinin steril ortamda porselen havan içerisinde homojenizasyonu, c. İzole edilen total RNA örnekleri, d. Total RNA'ların %2'lik agaroz jele yüklenmesi ve elektroforez yapılarak koşturulması.....	40
Şekil 18. Total RNA örneklerinin elektroforetik jel görüntüsü 1: DNA ladder (2 µl), 2: Z1 biçim öncesi, 3: Z1 kuraklık stresinin 18. günü, 4: Z1 kuraklık stresinin 24. günü, 5: Z2 biçim öncesi, 6: Z2 kuraklık stresinin 18. günü, 7: Z2 kuraklık stresinin 24. günü, 8: X18 biçim öncesi, 9: X18 kuraklık stresinin 18. günü, 10: X18 kuraklık stresinin 24. günü, 11: X20 biçim öncesi, 12: X20 kuraklık stresinin 18. günü, 13: X20 kuraklık stresinin 24. günü, 14: X50 biçim öncesi, 15: X50 kuraklık stresinin 18. günü, 16: X50 kuraklık stresinin 24. günü, Z1: Sulu kontrol, Z2: Susuz kontrol.....	42
Şekil 19. mRNA'dan cDNA sentezlenmesine ait adımları temsil eden bir görsel (Tobin ve Dusheck, 2001)'den modifiye edilmiştir	44
Şekil 20. Bitkilere ait cDNA örneklerinin Ms18S rRNA, MsProDH ve MtrD2 genlerine ait ileri ve geri primer dizileri kullanılarak PCR testi a. Çalışmada kullanılan Termal Cyler cihazına ilişkin bir görsel, b. PCR ürünü cDNA'ların %2'lik agaroz jele yüklenmesi ve elektroforez yapılması.....	46
Şekil 21. Ms18S rRNA ileri ve geri primerler kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen cDNA örneklerine ait %2'lik elektroforetik jel görüntüsü 1: DNA ladder (2 µl), 2: Z1 biçim öncesi, 3: Z1 kuraklık stresinin 18. günü, 4: Z1 kuraklık stresinin 24. günü, 5: Z2 biçim öncesi, 6: Z2 kuraklık stresinin 18. günü, 7: Z2 kuraklık stresinin 24. günü, 8: X18 biçim öncesi, 9: X18 kuraklık stresinin 18. günü, 10: X18 kuraklık stresinin 24. günü, 11: X20 biçim öncesi, 12: X20 kuraklık stresinin 18. günü, 13: X20 kuraklık stresinin 24. günü, 14: X50 biçim öncesi, 15: X50 kuraklık stresinin 18. günü, 16: X50 kuraklık stresinin 24. günü, Z1: Sulu kontrol, Z2: Susuz kontrol	46
Şekil 22. Tüm örneklerle ait mix cDNA'ların hedef genlerle PCR'da test edilmesi sonucu ortaya çıkan elektroforetik jel görüntüsü 1: DNA ladder (2 µl), 2: MtrD2 geni, 3: DNA ladder (2 µl), 4: MsProDH geni	47
Şekil 23. Çalışmada kullanılan Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR cihazı a. Gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazına ilişkin genel bir görüntü, b. Örneklerin yüklendiği plakaların cihaza yerleştirildiği hazne	49
Şekil 24. Birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresi boyunca günlere göre saksı ağırlıklarında (kg) meydana gelen değişimler (KS: Kuraklık stresi).....	57
Şekil 25. X18 genotipinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)	61
Şekil 26. X20 genotipinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)	62
Şekil 27. X50 genotipinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)	62
Şekil 28. Z1 sulu kontrol bitkisinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3).....	63
Şekil 29. Z2 susuz kontrol bitkisinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3).....	63
Şekil 30. Aday mutant genotipler ile kontrol bitkilerinin biçim öncesi, kuraklık stresinin	

18. ve 24. günü total klorofil içeriğinde meydana gelen değişimler (mg/kg).....	70
Şekil 31. MsProDH primerleri ve X18 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri.....	72
Şekil 32. MsProDH primerleri ve X18 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri	72
Şekil 33. MsProDH primerleri ve X20 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri.....	73
Şekil 34. MsProDH primerleri ve X20 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri	73
Şekil 35. MsProDH primerleri ve X50 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri.....	74
Şekil 36. MsProDH primerleri ve X50 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri	74
Şekil 37. MsProDH primerleri ve Z1 sulu kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri.....	75
Şekil 38. MsProDH primerleri ve Z1 sulu kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri.....	75
Şekil 39. MsProDH primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri.....	76
Şekil 40. MsProDH primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri.....	76
Şekil 41. MtRD2 primerleri ve X18 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri	77
Şekil 42. MtRD2 primerleri ve X18 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri.....	77
Şekil 43. MtRD2 primerleri ve X20 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri	78
Şekil 44. MtRD2 primerleri ve X20 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri.....	78
Şekil 45. MtRD2 primerleri ve X50 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri	79
Şekil 46. MtRD2 primerleri ve X50 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri.....	79
Şekil 47. MtRD2 primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri.....	80
Şekil 48. MtRD2 primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri.....	80
Şekil 49. Biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü alınan yaprak dokularında MsProDH geninin relatif gen ifadesine ilişkin grafik (n=3).....	81
Şekil 50. Biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü alınan yaprak dokularında MtRD2 geninin relatif gen ifadesine ilişkin grafik (n=3).....	83

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Türkiye’de 2010-2018 yılları arası yaygın yoncanın ekim alanı, hasat alanı, yeşil ot üretimi ve kuru ot verim miktarları (TÜİK, 2018).	2
Tablo 2. İzole edilen total RNA’nın spektral olarak konsantrasyon ve saflıklarının tayini	41
Tablo 3. cDNA sentez aşamaları ve reaksiyon için gerekli bileşenler	43
Tablo 4. <i>Ms18S rRNA</i> ileri ve geri primerleriyle cDNA örneklerinin test edilmesinde kullanılan PCR protokolü	44
Tablo 5. Termal cyclers cihazına ait PCR koşulları	45
Tablo 6. RT-qPCR analizleri için gerekli olan reaksiyon bileşenleri ve miktarları	47
Tablo 7. İfade seviyeleri araştırılan hedef ve referans genlere ait ileri/geri primer dizileri ve Ta (°C) bilgileri	48
Tablo 8. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyon koşulları	49
Tablo 9. Aday mutant yonca (M_3) genotipleri ile kontrol bitkilerinin saksıya transferinden itibaren çiçek tomurcuğu oluşturma tarihleri ve gün sayıları	51
Tablo 10. Aday mutant yonca (M_3) genotipleri ile kontrol bitkilerinin biçim öncesine ilişkin belirlenen bazı agro-morfolojik özellikleri	52
Tablo 11. Bitkilerin birinci biçim öncesi yaprak boylarına (cm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	54
Tablo 12. Bitkilerin birinci biçim öncesi orta yaprakçık boylarına (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	55
Tablo 13. Bitkilerin birinci biçim öncesi orta yaprakçık enine (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	56
Tablo 14. Bitkilere ait yaş ve kuru ot ağırlıkları (g/bitki)	56
Tablo 15. Kuraklık stresinin farklı zamanlarında ölçülen bitki kanopy sıcaklıklarına (°C) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerler (n=3)	59
Tablo 16. Kuraklık stresinin 18. gününe ilişkin belirlenen bazı agro-morfolojik özellikler	64
Tablo 17. Kuraklık stresinin 18. günü bitkilerin orta yaprakçık boyuna (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	65
Tablo 18. Kuraklık stresinin 18. günü bitkilerin orta yaprakçık enine (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	66
Tablo 19. Kuraklık stresinin 24. gününe ilişkin belirlenen bazı agro-morfolojik özellikler	67
Tablo 20. Kuraklık stresinin 24. günü bitkilerin orta yaprakçık boyuna (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	68
Tablo 21. Kuraklık stresinin 24. günü bitkilerin orta yaprakçık enine (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)	69

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Yem bitkileri, hayvan beslenmesi için gerekli besin maddelerini bünyesinde bulunduran, tüketildiklerinde hayvan sağlığına ve onların ürünlerine zararlı olmayan bitkilerdir. Doğal alanlarda kendi kendilerine yetişebildikleri gibi tarımsal alanlarda da yetiştiriciliği yapılan yem bitkilerinin üretimi tarla, çayır ve mera gibi farklı alanlarda yapılmaktadır (Avcıoğlu ve diğerleri, 2000).

Kurak ve yarı-kurak iklim şartlarının hakim olduğu ülkemizde yem bitkilerinin yetiştirilmesini kısıtlayan en önemli çevresel faktörlerden birisi yağışların yetersiz olmasıdır. Diğer sorunlar ise kaliteli tohumluk üretiminin yetersizliği, sulama imkânlarının yetersiz olması ve ekim nöbetinin çiftçiler tarafından henüz tam olarak benimsenmemiş olması olarak sıralanabilir (Avcıoğlu ve diğerleri, 2000).

Yaygın yonca (*Medicago sativa* L.), ülkemizin tüm bölgelerinde rahatlıkla yetişebilen ve ekim alanı gün geçtikçe artış gösteren bir yem bitkisidir. Bu nedenle yaygın yonca, ülkemizde üzerinde önemle durulması gereken ve daha fazla ıslah çalışması yürütülmesine ihtiyaç duyulan yem bitkisi türlerinden biridir (Elçi, 2005). Yaygın yonca uzun ömürlü çok yıllık bir yem bitkisi olmasına rağmen, yonca cinsi içerisinde çok sayıda tek yıllık tür de yer almaktadır. Dikkat çeken renkli çiçekleri ile baklagiller (*Fabaceae*) ailesinin önemli bir cinsi olan yoncanın 87 türü bulunmaktadır ve çiçekli bir bitkidir (Small, 2011; Gholami ve diğerleri, 2014).

Yaygın yoncanın çiçek yapısı salkım formundadır ve helezonik yapı sergileyen meyvelerde böbrek şekline benzeyen tohumlar oluşmaktadır (Avcıoğlu ve diğerleri, 2009). Yoncanın tarımsal açıdan yüksek öneme sahip yaklaşık 10 türü bulunmaktadır. Bu türler arasında kültürü yapılan çeşitler birbirinin aynısı olan genomlardan oluşmuştur ve autotetraploid ($2n=4x=32$) kromozom sayısına sahiptir (Li ve Brummer, 2012). Ayrıca diploid ($2n=2x=16$) ve tetraploid ($2n=4x=32$) kromozom yapısına sahip *Medicago* türleri de bulunmaktadır. Bu türler taksonomik olarak kromozom sayısı, polen yapısı, tüylülük durumu, tohum ve bakla yapısı bakımından farklı özellikler ortaya koymakta ve bu şekilde birbirinden ayırt edilebilmektedir (Hanson ve diğerleri, 1988).

Yabancı döllenen bir bitki olan yaygın yonca (*Medicago sativa* L.) Anadolu'da uzun yıllardır yetiştirilmekte olup bitkinin M.Ö. 2000-1000 yılları arasında kültüre alındığı düşünülmektedir (Sabancı, 2009). Zengin ve uzun bir geçmişe sahip olan yaygın yoncanın gen merkezi Akdeniz havzası - Güneybatı Asya (Türkmenistan, İran, Afganistan ve

civarı)'dır. Buna ek olarak dünya üzerinde ilk kültürü yapılan yem bitkileri arasında başı çekmektedir (Kır, 2003). Tüm bu özellikler nedeniyle yaygın yonca cinsinin en tanınmış üyesidir (Avcıoğlu ve diğerleri, 2009).

Genetik tabanı oldukça zengin ve değişken olan yaygın yonca farklı arazi ve toprak özelliklerine yüksek adaptasyon sağlayabildiği için geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılan bir yem bitkisi olma özelliğindedir. Yüksek verimin yanı sıra besin değerlerinin ve kalitesinin yüksek olması yaygın yoncayı cazip bir yem bitkisi konumuna getirmiştir (Radovic ve diğerleri, 2009).

Dünya genelinde yeşil ot bakımından yaklaşık 255 milyon ton olan yaygın yonca üretimin büyük bir kısmını (%70) Batı Avrupa, Amerika ve Arjantin sağlamaktadır. TÜİK, (2018) verilerine göre Türkiye'deki yaygın yonca üretim miktarı ise yeşil ot olarak 17,5 milyon ton civarındadır.

Tablo 1

Türkiye'de 2010-2018 yılları arası yaygın yoncanın ekim alanı, hasat alanı, yeşil ot üretimi ve kuru ot verim miktarları (TÜİK, 2018).

Yıl	Ekim Alanı (Da)	Hasat Alanı (Da)	Yeşil Ot Üretimi (Ton)	Kuru Ot Verimi (kg/da)
2010	5,688,107	5,648,422	11,676,115	2067
2011	5,585,525	5,545,763	12,076,159	2178
2012	6,741,832	6,620,705	11,539,382	1742
2013	6,286,419	6,264,502	12,616,178	2014
2014	6,923,055	6,874,768	13,432,968	1954
2015	6,620,459	6,595,357	13,949,958	2115
2016	6,501,107	6,482,615	15,714,381	2424
2017	6,594,319	6,594,319	17,561,190	2674
2018	6,351,052	6,351,052	17,544,964	2771

Tablo 1'de görüldüğü üzere Türkiye'de yaygın yoncanın ekim, hasat ve verim miktarı yıllara göre farklılık sergilemesine karşın önemli bir artış göstermektedir. Yaygın yonca ekimi en çok 2014 yılında 6,923,055 dekarlık alanla gerçekleşmesine rağmen üretilen yeşil ot miktarı 17,561,190 ton ile en çok 2017 yılında gerçekleşmiştir. En çok kuru ot verimi ise 2771 kg/da ile 2018 yılında elde edilmiştir.

Yaygın yonca, ruminant (geviş getiren) çiftlik hayvanlarının (koyun, keçi, sığır vesair) beslenmesi için olağanüstü bir bitkidir ve iyi bir şekilde dengelenmiş olan aminoasit yapısı sayesinde önemli bir protein kaynağıdır (Soya ve diğerleri, 2004). Bununla birlikte yaygın yoncada vitamin ve mineral madde içeriği yüksek düzeylerde dir. Yaygın yonca %15-22 oranında bitkisel ham protein içeriğine sahiptir ve hayvanlar için önemli bir kaliteli kaba yem kaynağıdır. Yaygın yoncanın içeriğindeki sodyum, magnezyum, fosfor, kalsiyum, klor, potasyum, kükürt, bor, molibden, demir, bakır gibi çeşitli minerallere ek olarak zengin bir vitamin deposudur (Soya ve diğerleri, 2004). Diğer yem bitkilerine kıyasla kül (%9,2), nişasta (%38,8), yağ (%1,9) ve sindirilebilir selüloz (%32,2) içerikleri daha yüksektir (Soya ve diğerleri, 2004). Birçok bitki tarafından direkt olarak kullanılması mümkün olmayan atmosferik gaz formundaki azotu, organik azot formuna çevirebilmesi bir baklagil yem bitkisi olan yaygın yoncanın bir diğer önemli özelliğidir (Conner, 2002). Tüm bu özelliklerinden dolayı yaygın yonca, birçok farklı kaynaktan yem bitkilerinin kraliçesi olarak isimlendirilmiştir (Summers ve Putnam, 2008).

Hayvanlar tarafından sindirilme oranının yüksek olması ve yüksek besin içerikleri ile dünyada genelinde tarımı yapılan yaygın yonca, taze olarak tüketildiğinde hayvanlarda şişmeye sebebiyet vermektedir. Bu nedenle yaygın yonca hayvanlara genellikle kuru ot olarak verilmekle birlikte pellet yem, silaj ya da çok az miktarda otlatılarak da hayvanlara yedirilir (Suttie, 2000; Radovic ve diğerleri, 2009; Lacefield ve diğerleri, 2009).

Çok yıllık bir bitki olan yaygın yonca gelişkin bir kök sistemine sahiptir ve derinlere inen kökleri toprağın bünyesini iyileştirmekte ve toprak erozyonun önlenmesine de yardımcı olmaktadır (Açıkgöz, 2001). Diğer baklagillerde olduğu gibi yaygın yoncanın köklerinde nodül yapısında bulunan ve simbiyotik yaşam sergileyen “*Rhizobium*” bakterileri havadaki serbest azotu bağlayarak topraktaki azot miktarını artırmaktadır (Zhang ve Wang, 2015).

Güney ve Batı Anadolu iklim koşullarında yaygın yoncadan 7 ile 10 yıl arasında ürün alınabilirken, Orta ve Doğu Anadolu iklim koşullarında ise bu süre 20 ile 30 yıla kadar çıkabilmektedir. Yaygın yoncada yıllık biçim sayısı ise iklim, sulama ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak 4 ile 12 arasında değişim göstermektedir (Avcıoğlu ve diğerleri, 2009).

Yaygın yoncanın kurağa en hassas olduğu dönemler, çimlenme ve fide dönemleri ile biçim sonrası yeniden gelişme dönemidir. Bitki bu üç dönemde meydana gelebilecek kuraklık stresinden ciddi oranda etkilenir (Kaplan ve diğerleri, 2015). Gelişkin bir yaygın yoncanın kaliteli ve yüksek bir verim oluşturabilmesi için 1-2 haftadan fazla susuz

kalmaması gerekmektedir (Avcıoğlu ve diğerleri, 2009).

Genel olarak yaygın yoncanın kurak koşullara karşı sergilediği tolerantlık gelişen kök sistemi sayesinde ekimden sonra geçen 3 ila 4 yıllık bir süreçte kazanılmaktadır. Ancak ekildiği yılda gelişkin bir kök yapısı oluşturamayan bitkiler ekildiği yıl ve sonrasında geçen birkaç yıllık süreçte kuraklık stresine karşı tolerantlık seviyeleri bir hayli düşüktür (Avcıoğlu ve diğerleri, 2009).

Yaygın yonca gelişimini tamamladığında oluşturduğu derin kazık kökleri sayesinde kuraklık stresine karşı genel olarak tolerantlık sergilemektedir. Fakat bir yılda defalarca biçilebilen yaygın yonca her biçim sonrasında yeni ve zengin vejetatif aksamalar oluşturmaktadır. Bu nedenle diğer kültür bitkileriyle kıyaslama yapıldığında, özellikle kurak bölgelerde daha çok suya gereksinim duymaktadır. İklimsel değişiklikler neticesinde kuraklıkların ciddi oranda artması beklenmektedir ve böylelikle atmosferdeki buharlaşma yoluyla su kaybının daha da artacağı öngörülmektedir (Wissuwa ve diğerleri, 1997). Buharlaşma yoluyla meydana gelen su kayıpları özellikle yetiştirme sezonunda suya çok fazla ihtiyaç duyan ve su kıtlığında ciddi verim kaybı yaşayan kültür bitkilerini olumsuz yönde etkilemektedir. Yaygın yonca gibi tarımsal açıdan önem arz eden bitkilerin kurağa tolerant hale getirilmesi veya tolerantlık seviyelerinin arttırılması için acilen ciddi adımlar atılmalıdır (Carnicer ve diğerleri, 2011; Peng ve diğerleri, 2011; Williams ve diğerleri, 2013; Vicente-Serrano ve diğerleri, 2014).

Kuraklık genel olarak dört başlık halinde incelenmektedir. Meteorolojik kuraklıklarla başlayan bu serüven tarımsal ve hidrolik kuraklıklar olarak devam etmektedir (Mishra ve Singh, 2010). Son olarak sosyo-ekonomik kuraklık insanları ve ekonomiyi olumsuz etkileyerek daha da belirgin hale gelmektedir. Meteorolojik kuraklıkta yağışların mevsim değerlerinin altında olması ve bu durumun uzun bir süre devam etmesi olarak bilinir. Tarımsal kuraklık, topraktaki su miktarının bitkinin gereksinimlerini karşılayamayacak seviyeye düşmesi ve tarımsal ürün kayıplarının başlaması olarak tanımlanmaktadır (Mengü ve diğerleri, 2011). Yer altı suları, nehir ve göl gibi tatlı su kaynaklarındaki gözle görülür azalmalar hidrolik kuraklık olarak tanımlanırken, sosyo-ekonomik kuraklık ise diğer üç kuraklık tipinin meydana gelmesi sonucu ekonomik dengenin altüst olması olarak tanımlanmıştır (Mishra ve Singh, 2010).

Kuraklığa karşı yapılan ıslah çalışmalarının ilerlemesindeki yavaşlıkların en önemli sebeplerinden birisi, kuraklık stresi mekanizmasının oldukça karmaşık bir yapıda olmasından kaynaklanmaktadır (Verslues ve diğerleri, 2006).

Genomik ve bitki fizyolojisi gibi alanlarda, son yıllardaki elde edilen başarılar sayesinde bu konu hakkında yeni yöntemlerin gelişmesine ve bitkilerin kuraklık stresine karşı geliştirdikleri mekanizmaların daha iyi bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır (Tuberosa ve Salvi, 2006).

Bitkiler; agro-morfolojik, fizyolojik ve gen ifade seviyelerindeki farklılıklar sayesinde geliştirdikleri stratejilerle kuraklığa karşı yaşamsal faaliyetleri için adaptasyon geliştirmeye çalışmaktadır. Oluşturulan stratejilerden biri kuraklık stresinden kaçış olarak adlandırılırken, diğer bir strateji ise kurağa karşı oluşturulan tolerantlık mekanizmasıdır. Kuraklık koşullarında gövde ve yapraklardaki su içeriğini yüksek seviyelerde tutabilme kabiliyetine kuraklık stresinden kaçış denilmektedir. Kurağa karşı tolerantlık ise bitkinin sap ve yapraklarındaki su seviyesinin düşük olmasına rağmen normal bitkisel fonksiyonlarını gerçekleştirebilme kabiliyeti olarak tanımlanmıştır (Levitt ve Levitt, 1980). Kurak koşullara maruz kalan bitkiler strese karşı farklı yanıtlar vermektedir. Bu yanıtlar bitkinin türüne ve genotipine, hücrelerin kaybetmiş olduğu suyun miktarına, kuraklığın süresine, bitki yaşına, gelişimine, organ ve hücre tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bray, 1997). Bitkiler genellikle yaprak alanlarının küçülmesi, kök sistemlerinin yoğunlaştırılması, stoma sayısının azalması, stomalardan gaz geçişinin yavaşlaması gibi çeşitli morfolojik ve fizyolojik özelliklerini değiştirerek kuraklık stresinden kaçmaktadır (Quan ve diğerleri, 2016).

Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde, kuraklığa karşı tolerantlıktan sorumlu olan genlerin ifadelerinin gerçekleşmesi ile birlikte oluşan bazı özel proteinlerin birikmesi sonucu fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal mekanizmalar aktif hale gelmektedir (Amtmann ve diğerleri, 2005).

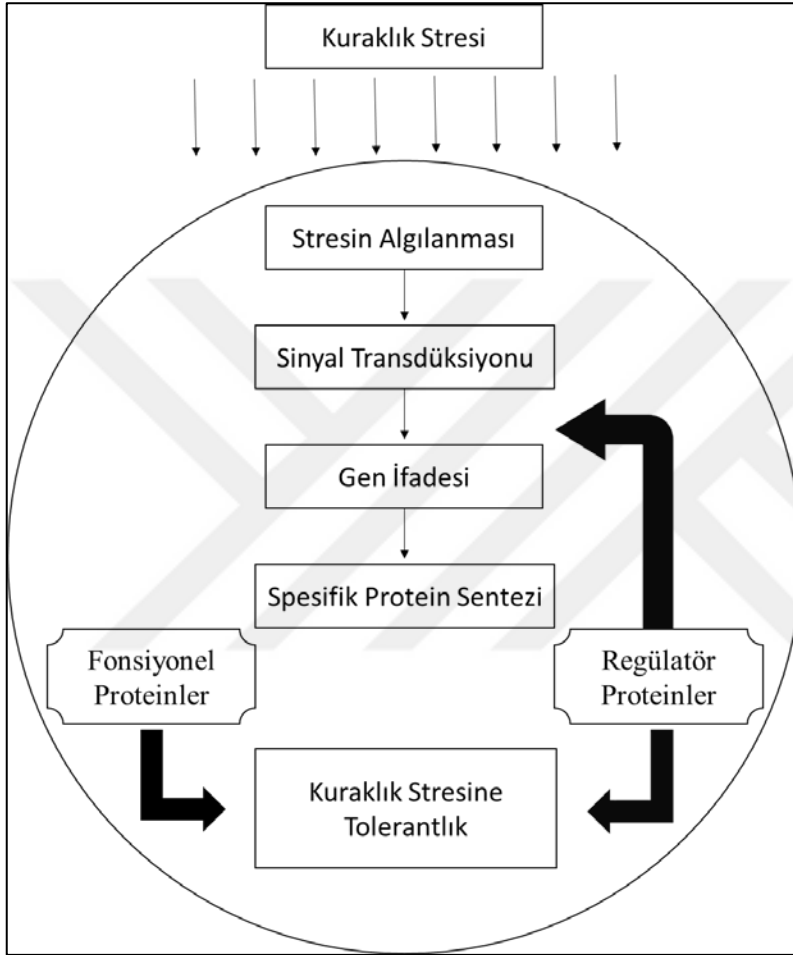
Kuraklıktan kaçınan bitkiler, orta şiddetli bir kuraklık stresi meydana geldiği zaman yaşamlarını sürdürebilmektedir fakat yüksek şiddetli kuraklığa maruz kaldıklarında yaşamsal fonksiyonlarını sürdüremeyerek canlılıklarını yitirirler. Kurağa toleran olan bitkilerde tolerantlıktan sorumlu olan genlerin ürünleri sayesinde koruyucu olan mekanizmalar aktif hale gelerek kurak koşullarda canlılıklarını sürdürebilmektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Kurağa toleran bitki genotiplerinin geliştirilmesine yönelik yapılacak olan ıslah çalışmalarında kullanılan genotiplerin kuraklık stresinden oldukça az etkilenmesi ve stres altında verim potansiyelini koruyabilen genotipler olması istenmektedir. Ayrıca kurağa toleran olarak geliştirilen bitki genotiplerinin optimum koşullar altında, yüksek verimli diğer çeşit ya da genotipler kadar iyi bir performans göstermesi gerekmektedir (Tiryaki, 2016).

Kurak koşullara karşı geliştirilen kurağa tolerantlık mekanizması kantitatif olarak kalıtım sergilemektedir (Ghandilyan ve diğerleri, 2009). Kantitatif özellik lokusu (QTL) kromozom üzerindeki kuraklığa karşı tolerantlıktan sorumlu olan gen bölgelerinin tespit edilmesinde başarıyla kullanılmasının yanı sıra kuraklık şartlarında morfolojik ve fizyolojik farklılıklarla birlikte bitkide meydana gelen gelişimsel farklılıkları da kontrol etmektedir (Teulat ve diğerleri, 1997). Buna karşılık kuraklık stresinden sorumlu olan gen lokasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılmakta olan QTL analizleri için tolerant ve hassas özellikler sergileyen iki farklı genotip kullanıldığında, QTL analizleriyle tespit edilmiş gen lokasyonlarının elit bitki çeşidine aktarılması tarımsal olarak birkaç sorunu tetiklemektedir. Bu sorunlardan birincisi, analizler sonucunda tespit edilmiş QTL bölgelerinde istenmeyen bitkisel özellikleri barındıran gen bölgelerinin elit bitki çeşidine transfer olması durumudur. İkinci sorun ise QTL analizleri sonucunda ilgili genlerin bulundukları lokasyonları ve bu lokasyonların kromozom üzerindeki konumunu tespit etmede kullanılan DNA markörleri arasındaki linkage (gen bağılılığı)'in marköre dayalı seleksiyon (MAS) çalışmalarında genetik rekombinasyonlar nedeniyle segregasyona uğraması gerçeğidir (Lanceras ve diğerleri, 2004). İlgili karaktere etki eden genlerin çok sayıda olmasının yanı sıra bu genler kendi aralarında (epistatik) etkileşim içerisindedir. Bu durum bitkilerde kuraklık stresine karşı gerçekleştirilen ıslah çalışmalarını içeren QTL çalışmaların uygulamaya koyulmasını oldukça zorlaştırmaktadır (Francia ve diğerleri, 2005; Akar ve diğerleri, 2009). Fakat bitki boyu, bitki ozmotik dengesi, çiçeklenme zamanı ve süresi gibi farklı bitkisel karakterlerden sorumlu olan genler bitkinin kurak şartlara karşı uyum sağlamasında oldukça önemli bir rol üstlenmektedir (Bhatnagar-Mathur ve diğerleri, 2008).

Farklı bitki türlerinde günümüze kadar stresle ilişkili çok farklı genler tespit edilmiş ve bu genler bitkilerden izole edilmiştir. Kuraklık stresine karşı bitkilerin vermiş oldukları yanıtlar çok karmaşıktır. Bu karmaşıklığın detaylı bir şekilde araştırılması ve anlaşılması yakın tarihte geliştirilmiş olan transkriptom çalışmaları sayesinde olanak bulmuştur (Hazen ve diğerleri, 2005; Verslues ve diğerleri, 2006; Verslues ve Juenger, 2011).

Moleküler düzeyde kuraklık stresi ve kuraklık stresine karşı tolerantlık sisteminin anlaşılabilmesi adına ilgili genlerin bitki dokularındaki ifade seviyelerinin tespit edilmesi, sonraki yapılacak olan çalışmalar adına büyük önem arz etmektedir. Kuraklık stresi ile aktif hale gelen *LEA* (Late-Embryogenesis Abundant) ve *DREB* (Dehydration Response Element Binding) gibi transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra oluşan gen ürünleri kuraklığa karşı cevabın oluşmasında büyük bir göreve sahiptir. Böylece ilgili genlerin sinyalizasyon

mekanizması aktif hale gelmektedir. Akabinde hücre ve organelleri stresin olumsuz etkilerine karşı koruma altına alınır ve böylece kuraklık stresine tolerantlık sağlanmış olur (Romo ve diğerleri, 2001; Zhu, 2002). Protein ürünü, fonksiyonel proteinler ve düzenleyici proteinler olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Abiyotik stres tolerantlığı, her iki protein türünün birleşik etkisinin (Şekil 1) sonucudur (Akhtar ve diğerleri, 2012).



Şekil 1. Bitkilerin kuraklık stresine karşı oluşturduğu stres tolerantlığının şematik gösterimi (Akhtar ve diğerleri, 2012)'den modifiye edilmiştir

1.1. Gen İfade Analizleri ve Kullanılan Teknikler

Bitkiler kuraklık stresine karşı karşıya kaldığı zaman fotosentez ve hücre bölünmesi gibi olaylar zarar görmeye başlar ve bu olayların neticesinde verimde azalmalar gerçekleşir. Kuraklıkla birlikte hücredeki enerji (ATP) üretimi ve solunum olayları olumsuz etkilenmektedir. Stresle birlikte hücrede reaktif oksijen türleri (ROS) gibi birtakım metabolitler salgılanır ve bu metabolitler hücrede birikmeye başlar. Buna ek olarak kuraklık, gen ifadesindeki değişimler sonucu üretilen proteinin de değişmesine yol açmaktadır (Lawlor ve Tezara, 2009).

Bilindiği üzere kuraklık, verim ve kalitenin azalmasına neden olan en önemli abiyotik streslerden birisidir. Bu nedenle ürün kayıplarını engellemek ya da minimum seviyelere indirgeyebilmek için stres mekanizmasının ve yollarının iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Bu mekanizmaların anlaşılabilmesi için kurağa maruz kalmış bitkilerdeki kuraklıktan sorumlu olan genlerin tespit edilmesi ve stres koşullarında ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi gerekmektedir (Chaves ve diğerleri, 2009).

Gün geçtikçe yenilenerek ilerlemeye devam eden moleküler teknikler ve teknolojiler sayesinde birçok fonksiyondan sorumlu olan genlerin kısa bir zaman zarfında değerlendirmesi yapılabilmektedir. Geliştirilen bu yöntemler genlerin ekspresyonunda meydana gelen farklılıkların anlaşılmasında kullanılan moleküler analiz yöntemleridir (Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011).

Bitkilerin maruz kaldıkları stres, bitki tarafından algılandığı zaman birtakım tepkilere ve değişimlere yol açmaktadır. Oluşan tepkinin ve değişimlerin sorumlusu olan gen ya da genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi için yapılan gen ifade analizleri stres mekanizmasının moleküler olarak anlaşılması adına oldukça önemlidir. Gen ifade analizleri için protein ve RNA tabanlı moleküler analiz yöntemleri (Şekil 2) geliştirilmiştir (Bakır, 2012).

Dizileme Temelli Teknikler	PCR Temelli Teknikler	Hibridizasyon Temelli Teknikler	Hibridizasyon ve PCR Kombinasyonlu Teknikler
Gen İfadesinin Seri Analizi (SAGE)	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	DNA Microarray	Simgesel Fark Analizi (RDA)
İfade Dizisi Etiketleme Yoluyla Dizileme (EST)	Diferansiyel Display Tekniği (DD)	Dot/Northern Blot Tekniği	Çıkarılmış Hibridizasyon ve Diferansiyel Display Kombinasyonu (ESD)
RNA Polimeraz ile Dizileme (RNAP)		Nükleaz Koruma Tekniği	
Kitlesel Paralel İmza Dizilemesi (MPSS)		Ayrıcı Plak Hibridizasyon Tekniği	Çıkarılmış Hibridizasyon Kütüphanesi (SHL)
		<i>In-situ</i> Hibridizasyon Tekniği	

Şekil 2. RNA temelli gen ifade analizi belirlemede kullanılan teknikler (Hess ve diğerleri, 1989; Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011)'den modifiye edilmiştir

1.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR)

Gerçek zamanlı kantitatif (sayısal) PCR (RT-qPCR), DNA'nın zincirlerine bağlanan spesifik floresan boya ve işaretli probalar kullanılarak amplifikasyonun anlık olarak bir monitör yardımıyla izlenmesine imkân tanıyan bir laboratuvar tekniğidir. Kullanılan floresan boya çift sarmallı DNA molekülüne bağlanır. DNA miktarı artış gösterdikçe doğru orantılı bir şekilde floresan ışımının da artış gösterdiği bir nükleik asit çoğaltım yöntemidir (Kubista ve diğerleri, 2006). Bu yöntem; PCR temelli çalışmalarda en yüksek verimin alınabilmesi amacıyla geliştirilmiştir (Roche, 2015). Gerçek zamanlı kantitatif PCR kullanılarak yapılan çalışmaların yaygınlaşmasının ana sebeplerinden birisi de çalışmadaki hata payının %1'den daha az seviyelerde olmasıdır (Şanlıdilek, 2009).

Abiyotik stres faktörleri (tuzluluk, ısı şoku, soğuk şoku, kuraklık, CO₂ yoğunluğu vesair) tüm bitkilerin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olur ve bitkilerde bazı önemli değişimlerden (bitki morfolojisindeki değişimler, metabolizmadaki değişimler ve fizyolojik değişimler) sorumludur. RNA tabanlı bir yöntem olan RT-qPCR tekniği bu değişikliklerin meydana gelmesini sağlayan ilgili genlerin tespit edilmesi ve bu genlerin ifade düzeylerini analiz etmek için son yıllarda kullanılan en güvenilir yöntemlerden biri olduğu küresel anlamda kabul edilmiştir (Kozera ve Rapacz, 2013).

Aynı anda birden çok örneğin analizine imkân sağlayan RT-qPCR teknolojisi sayesinde mutasyon, patojen, DNA kopya sayısı, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), DNA hasarı, metilasyon ve kromozom bozukluklarının belirlenmesine olanak sağlayarak çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır (Kubista ve diğerleri, 2006).

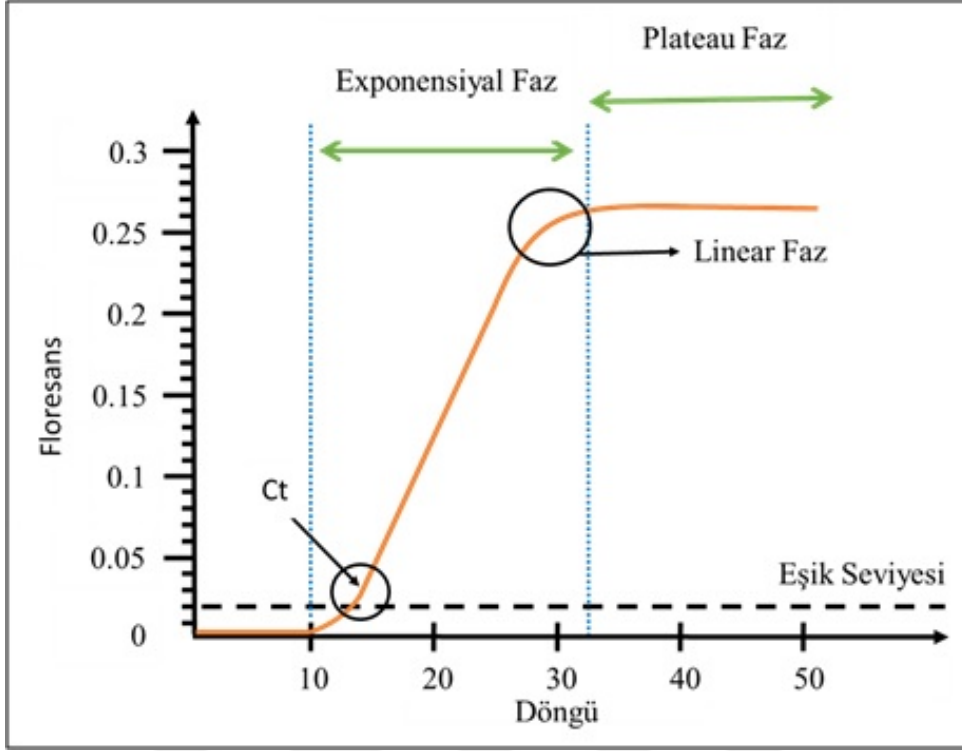
Gerçek zamanlı kantitatif PCR'da çalışma yapabilmek için öncelikle üzerinde çalışma yapılacak olan canlı materyalin doku veya hücreleri homojenize edilerek RNA molekülü izole edilir. Ardından homojenizata DNaz enzimi eklenerek DNA kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanır. Elde edilen RNA'lar reverse (ters) transkripsiyon enzimiyle cDNA (mRNA'ya eşlenik olan DNA molekülü) sentezlenmesi yapılmaktadır. Akabinde cDNA'lar genlerin hızlı, doğru ve hassas bir şekilde ifade edilebilmesi için gerekli olan reaksiyon bileşenleriyle birlikte cihaz markasına özel olarak üretilen kuyucuklara konularak bir RT-qPCR cihazına yerleştirilir ve analiz süreci başlar. Ardından elde edilen veriler analiz edilir ve sonuçlar kıyaslanır (Günel ve Aydın, 2009).

1.2.1. SYBR Green Yöntemi

Gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışmalarında bazı floresan boyalar (SYBR Green ve TaqMan) kullanılmaktadır. Bu boyalar DNA'ya bağlanmak suretiyle floresan ışımlar yapar ve ürün oluşumunun anlık olarak tespit edilmesine yardımcı olur. Floresan ışımaya temeline dayalı olan SYBR Green dizi spesifik bir boya değildir ve çift zincirli DNA'ya (dsDNA) bağlanarak 497-520 nm dalga boyunda ışımaya yapmaktadır (Monis ve diğerleri, 2005). Reaksiyonun gerçekleşmesi için cDNA, genin amplifikasyonu için spesifik tasarlanmış primerler ve floresan boya gereklidir (Kozera ve Rapacz, 2013).

Reaksiyon için gerekli karışım hazırlandığında SYBR Green, cDNA ve primerler henüz tam olarak reaksiyona girmedikleri için floresan ışımaya yok denecek kadar azdır. Primerlerin kalıp cDNA'a bağlanabileceği optimum sıcaklık (T_a) vardır ve bu sıcaklık verilen komut doğrultusunda cihaz tarafından otomatik olarak ayarlanmaktadır. Primerler tek zincire sahip olan cDNA'ya bağlanmaya başlar ve çift zincirli DNA yapısı meydana gelmektedir. DNA'daki iki zincirin arasına yerleşerek ışımaya yapan SYBR Green boyası, DNA miktarının artışıyla doğru orantılı olarak ışımaya yapmaktadır. Meydana gelen ışımaya cihazdaki bir dedektör tarafından algılanır ve oluşan ürün miktarı anlık olarak bir monitörden gözlemlenebilmektedir (Şanlıdilek, 2009).

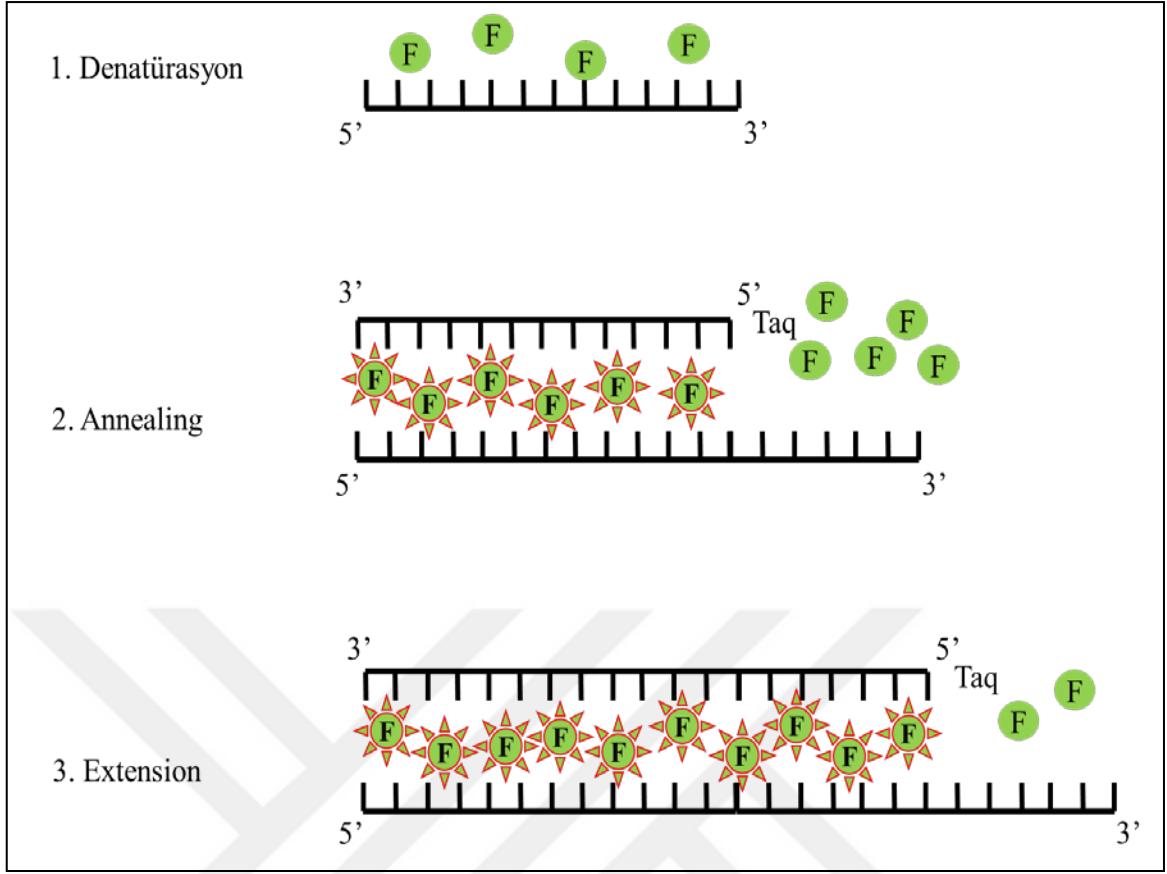
Temel olarak RT-qPCR'da gerçekleşen reaksiyon 3 adımda tamamlanmaktadır (Şekil 3). Bunlardan ilkinin yükselme (exponensial) fazı teşkil etmektedir. Devamında doğrusal (linear) faz gelmektedir ve bunu durağan (plateau) fazı takip etmektedir (Şekil 3). Yükselme fazı olarak bilinen exponensiyal faz, reaksiyon etkinliğinin %100'e ulaştığı fazdır ve PCR ürünleri her döngüde iki kat olacak şekilde (2^n) artmaktadır. Ürün miktarında artış gerçekleştikçe SYBR Green tarafından meydana gelen floresan ışımaya da artmaktadır. Linear fazda reaksiyonun gerçekleşebilmesi için hazırlanan karışımın bileşenleri reaksiyon süresi boyunca azalmaktadır. Bunun sonucunda ürün oluşumu yavaşlar ve üretim durmaya başlar. Üretilen ürün miktarı azaldıkça floresan ışımaya da azalır ve reaksiyon hızı düşmeye başlar. Plateau fazda reaksiyon için gerekli olan primerler ve diğer elzem bileşenler neredeyse bitme noktasına geldiği için yeni PCR ürünlerinin üretimi tamamen durur (Ginzinger, 2002; Kubista ve diğerleri, 2006). Reaksiyonun başladığı ve ürünlerin çoğaldığı sırada eşik seviyesi ve floresans değerinin kesiştiği nokta, C_t (Threshold cycle) değerini vermektedir ve C_t değeri, gerçekleşen ışımaya artmaya başladığı noktayı belirtmektedir. Bu nokta aynı zamanda exponensial faza ilk geçiş noktasını göstermektedir. Bir reaksiyonun exponensial faza erken ya da geç başlaması, hedef DNA'nın ortamdaki miktarına göre değişmektedir (Pfaffl, 2001).



Şekil 3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR'ın reaksiyon döngüsüne ait bir görsel (Heid ve diğerleri, 1996)'dan modifiye edilmiştir

Farklı örneklerin reaksiyona girdiği ve ışımların başlangıç noktası olan Ct değeri birbiriyle kıyaslanabilmektedir (Wong ve Medrano, 2005). Bu kıyaslama RT-qPCR analizleri için temel bileşendir. Bir diğer temel bileşen ise verilerin analiz edileceği yöntemin (absolute quantification/relative quantification) belirlenmesidir. Çalışmada iyi bir ekspresyon gerçekleştiren ve kontrol amacıyla kullanılacak olan örnekler seri seyreltmeler (serial dilution) sonucunda standart olarak belirlenebilmektedir. Standartlar arasındaki önemli olan nokta, kalıp oranlarının ölçülebilir ve tekrarlanabilir olmasıdır (Pfaffl, 2001).

Kontrol olarak kullanılan örneklerden elde edilen standart seyreltmeler hazırlanır ve bu standart seyreltmelere varsayımsal olarak bir konsantrasyon miktarı belirlenir. Hazırlanan standart kullanılarak varsayımsal olarak belirlenen konsantrasyona karşılık gelen seyreltmelerin Ct değeri tespit edilmektedir. Bu Ct değerleri sayesinde bir standart eğri oluşturulmaktadır ve mutlak kantifikasyon (absolute quantification) ya da göreceli kantifikasyon (relative quantification) hesaplanmaktadır (Dheda ve diğerleri, 2004).



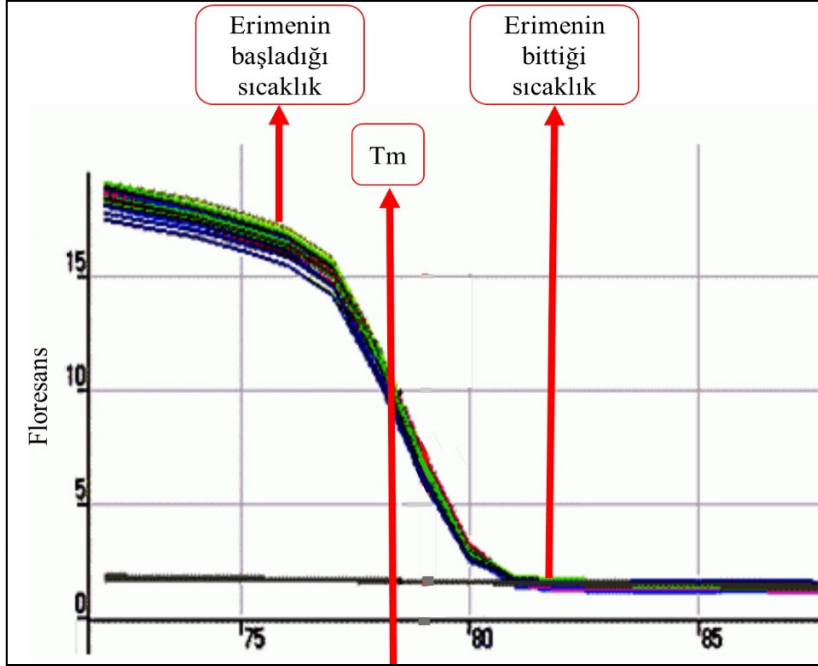
Şekil 4. Floresan bir boya olan SYBR Green'in ışıma yapmasına ilişkin basamaklar (Van der Valden ve diğerleri, 2003)'den modifiye edilmiştir

Reaksiyonun ilk adımı olan denatürasyon aşaması 95 °C sıcaklıkta başlar (Şekil 4). Bu aşamada floresans sıfır olduğu için herhangi bir okunma gerçekleşmemektedir. Annealing (bağlanma) basamağında primerler DNA'ya bağlanmaktadır ve bu aşamada SYBR Green DNA'nın çift zincir yapısına penetre olarak ışıma yapmaya başlamaktadır. Fakat az miktarda bağlanma olduğu için güçlü bir ışıma söz konusu değildir. Son adım olan extention (uzama) basamağında SYBR Green bağlanma miktarı belirli bir noktaya kadar artarak maksimum ışıma gerçekleşmektedir (Şekil 4).

Reaksiyon sonlandığı zaman deney sonuçlarını analiz etmek için relatif kantifikasyon ve standart eğri olmak üzere iki analitik yöntem vardır (Ginzinger, 2002; Kubista ve diğerleri, 2006).

SYBR Green yönteminde bazen spesifik olmayan bağlanmalar sonucu ürün oluşumu ya da primer dimerleri oluşabilmektedir. İstenmeyen bağlanmalar sonucunda floresan ışıma meydana gelir. Fakat floresan ışıma miktarındaki artış istenilen ürünlerin elde edildiği anlamına gelmemektedir (Bustin ve Mueller 2005). Oluşan ürünlerin spesifik olup olmadığını tespit etmek için öncelikle PCR yaparak elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki

görüntüleri analiz edilmelidir. Bu yöntemle ek olarak RT-qPCR cihazının Şekil 5'teki gibi vermiş olduğu erime eğrileri incelenerek spesifik olmayan bağlanmalar ve primer dimerleri tespit edilebilmektedir (Yüzbaşıoğlu, 2008).



Şekil 5. Erime eğrisi grafiğine örnek bir görsel (Yüzbaşıoğlu, 2008).

Çift zincir yapısına sahip olan her bir DNA'nın spesifik bir erime sıcaklığı (melting temperature) vardır ve bu sıcaklık değeri "T_m" ile gösterilmektedir (Şekil 5). DNA'nın denatürasyonu sonucunda SYBR Green boyası serbest kaldığı için floresans seviyesi de düşmeye başlamaktadır. Böylece amplifikasyonun doğruluğu erime eğrisi grafiğinden faydalanılarak tespit edilmektedir. Erime sıcaklıklarının (T_m) kesin bir şekilde tespit edilebilmesi için erime pikleri (melting peaks) adı verilen grafikten yararlanılmaktadır ve bu yöntem yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yüzbaşıoğlu, 2008).

1.2.2. Referans/Kontrol (Housekeeping) Genlerin Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Çalışmalarındaki Önemi

Farklı organizmalardan alınan doku ya da hücre tiplerinde yapılacak olan gen ifade analizi çalışmalarında referans genin öncelikli olarak seçilmesi gerekmektedir (Dheda ve diğerleri, 2004). Seçilen referans genin biyotik ve abiyotik faktörlerce meydana gelen stres koşullarında ifade seviyesi değişmeyen ya da çok az değişen referans/kontrol (housekeeping) gen olması, çalışmaların doğruluğu açısından oldukça önemlidir (Pfaffl, 2001; Bustin, 2002).

İfade seviyesi araştırılan bir geni incelemek için; aynı organizmaya ait farklı zamanlarda alınan doku örneklerinden izole edilen total RNA'lar ile sentezlenen cDNA miktarlarının diğer örneklerle göre başlangıç farklılıkları oranlanarak ifade seviyesinin değişmediği düşünülen bir gen ile normalize edilir. Elde edilen cDNA konsantrasyonlarının, kararlı bir şekilde ifade olduğu varsayılan referans genlerle normalize edilmesi, RNA konsantrasyonlarındaki farklılıkların, biyolojik örnekler arasında transkript değişikliklerinin doğru belirlenmesini etkileyecek olan ters transkripsiyonun etkinliği gibi kontrol edilemeyen faktörlerin etkisini en aza indirmek için gereklidir (Castonguay ve diğerleri, 2015).

Referans genleri seçmek için çeşitli istatistiksel yaklaşımlar geliştirilmiştir (Guénin ve diğerleri, 2009). GeNorm, BestKeeper ve NormFinder gibi istatistiksel algoritmalar, belirli bir biyolojik örnek setinde RT-qPCR verilerinin normalize edilmesi için en uygun referans gen ya da hedef genlerin değerlendirilmesi için geliştirilmiştir (Vandesompele ve diğerleri, 2002; Pfaffl ve diğerleri, 2004). Referans genlerin, RT-qPCR verilerinin normalize edilmesindeki önemini kabul ederek, çeşitli referans genlerin bitkiler de dahil olmak üzere farklı organizmalarda spesifik koşullar altında ifade kararlılıkları incelenmiştir (Andersen, 2004; Brunner ve diğerleri, 2004; Radonic ve diğerleri, 2004).

Gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışmalarında normalizasyon için *gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)*, *β -aktin*, *β -tubulin*, *fosfoglisarat kinaz (PKG)*, *ribozomal protein (RPL)* ve *18S ribozomal RNA (18S rRNA)* en yaygın kullanılan referans genlerdir (Warrington ve diğerleri, 2000).

Bu çalışma, aseptik şartlarda kurağa tolerantlığı çimlenme evresinde tespit edilen ve saksılarda kontrollü şartlarda yetiştirilen mutant yonca genotiplerine, birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresinin *MsProDH* ve *MtRD2* genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler ile bazı agro-morfolojik özellikler, bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarlarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Ethylmethane sulfonate* (EMS) ile Mutasyon İslahı

Klasik melezleme kullanılarak yapılacak olan bir ıslah programında, kullanılmak istenen bitki türünün arzu edilen bir özellik bakımından ıslah edilebilmesi için ilgili türün gen havuzunda istenilen özelliğin bulunması gerekmektedir. Eğer istenilen özellik ilgili bitki türünün gen havuzunda yoksa melezleme ve seleksiyonlar ile başarı elde etmek mümkün değildir. Bu gibi istenilen özellik veya özellikler bakımından varyasyon yaratmak gerekmektedir. Mutasyon uygulamaları bu amaçla kullanılabilecek en uygun yöntemlerden biridir. Ayrıca mutasyon ıslahıyla yeni özellikler kazandırılmış bitkiler, transgenik bitki kategorisinde değerlendirilmediği için mutant bitkilerin yetiştirilmesi ve hammadde olarak kullanılmasında herhangi bir sınırlama bulunmamaktadır (Dobres, 2008).

Mutasyon ıslahı, kurağa karşı tolerant bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde önemli bir ıslah yöntemi olarak kullanılmaktadır (De Oliveira ve diğerleri, 2005). Bitki ıslahçılarının mutasyon ıslahına başvurmalarının temel amacı, oluşturulan mutant bitkiler arasındaki varyasyonu artırarak ticari açıdan önemli olan bitkisel karakterleri barındıran genotipleri ortaya çıkarmaktır (Ndou, 2012).

Mutasyon ıslahı uygulaması sonrasında istenilen özellikleri sergileyen mutant bitki hatlarının üretilmesi mümkündür. Bu durum klasik melezlemeyle kıyaslandığında hem zamansal hem de finansal olarak tasarruf sağlayarak araştırmacıları sonuca ulaştırmaktadır. İstenilen bir özelliği meydana getirebilecek olan mutasyonların doğal olarak oluşma ihtimali oldukça düşüktür. Bu nedenle, bitki ıslahçıları yaptıkları çalışmalarda mutasyon ihtimalini artırmak için kimyasal ya da fiziksel mutajenik maddeleri kullanmaktadırlar (Hewawasam ve diğerleri, 2004).

Uygulanmak istenen mutasyon ıslahında kullanılacak olan mutajenin özellikleri ve uygulama şekli oldukça önemlidir. Bunların yanı sıra mutajenin bitki materyaline uygulama dozu, oluşacak olan nokta mutasyon sıklığı, mutasyon tipi türlere göre farklılıklar sergilemektedir. Uygulanan mutajenin bitkilerde düşük fizyolojik hasar vermesi ve yüksek genetik çeşitlilik oluşturması önemli bir noktadır. Kromozomda değişikliklere neden olarak bir genin allelini diğer bir allel yapısına dönüştürebilir (Aberathne ve diğerleri, 2004; Saleem ve diğerleri, 2005).

Kimyasal bir mutajen olan *Ethylmethane sulfonate* (EMS) bitki ve hayvan gibi canlılarda karsinojenik ve mutajenik etki gösteren bir madde olmasından dolayı genetik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Hoftman, 1981; Könen ve Çavaş, 2008).

Jenks ve diğerleri (2007), mutajenin konsantrasyonu ve uygulama süresi mutasyonu açığa çıkarmadaki en önemli faktörler olarak gösterilmektedir. Mutajenin uygulama dozu belirli bir seviyeye kadar mutasyon oluşumunu artırmaktadır. Fakat çok yüksek dozda uygulanan mutajen genetik çeşitliliği artırırken bitki hücrelerindeki enzim aktivitelerinin değişmesi sonucu M₂ ve M₃ jenerasyonlarında yaprakta sarı lekelerin (kloroz) oluşması, klorofil eksikliği, kotiledonlarda bozukluklar, erken ya da geç çiçeklenme ve anormal yaprak çıkışı gibi fizyolojik zararlara neden olabileceğini tespit etmişlerdir.

Griffiths ve diğerleri (1996), EMS mutajeni DNA'nın yapısına katılmak yerine tek bir bazda değişime neden olan nokta mutasyonunu meydana getirdiğini ve böylece DNA'da spesifik yanlış eşleşmeye sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Brown (2002), EMS nokta mutasyonlarının oluşabilmesi için yeterli ve güçlü bir kimyasal olduğunu belirtmiştir. DNA üzerindeki nükleotidlere alkil grubu ekleyerek mutasyona yol açtığını ve eklenen alkil grubun etkisi alkil grubunun türüne ve nükleotidin düzenlendiği lokasyona göre değişiklik gösterdiğini bildirmiştir.

Luan ve diğerleri (2007), EMS gibi kimyasal mutajenlerin uygulanması oldukça kolay olduğunu, pahalı ve özel alet-ekipmanlara ihtiyaç duyulmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca daha kolay tahmin edilebilen özel mutasyonların oluşturulmasında kullanıldığını bildirmişlerdir.

Ndou (2012), farklı ekmeklik buğday çeşitlerine farklı dozlarda EMS mutajeni uygulamış ve uygulama konsantrasyonunun artışıyla birlikte fide boylarındaki azalmaların yanı sıra mutant ve kontrol çeşitlere çimlenme gün sayısı bakımından kıyaslama yapmıştır. Elde ettiği bulgularda mutant tohumların kontrol tohumlarına nazaran daha az çimlendiğini ve konsantrasyon artışına bağlı olarak fide çıkış sürelerinin uzadığını tespit etmiştir.

FAO ve IAEA (2019), Mutant Çeşitliliği Veritabanı (MVD) verilerine göre 1950 yılında sadece 3 adet olan mutant bitki sayısı 2000 yılında 2641 adet olmuştur. Günümüzde 3303 adet mutant bitki çeşidinden sadece 107 adedi kimyasal mutajen olan EMS ile mutant hale getirilmiştir. Mutant bitki genotiplerinin geliştirilmesine başta Asya (Çin, Hindistan ve Japonya) olmak üzere Avrupa ve Kuzey Amerika ülkeleri katkı sağlamaktadır. Türkiye'de ise 2019 yılı itibarıyla toplamda 10 adet mutant bitki çeşidi bulunmaktadır ve bu mutant bitkiler arasında yaygın yonca bulunmamaktadır.

2.2. Polietilen glikol (PEG) Kimyasalı ve Yapay Kuraklık Stresi

Molekül ağırlığı yüksek bir madde olan polietilen glikol (PEG), tohum içine su alımını azaltıp ortam şartlarını ayarlayarak kuraklık stresini oluşturmakta ve böylelikle kurak koşullara tolerant hatların seçimine olanak sağlamaktadır. Bitki için herhangi bir toksik etkiye sahip olmayan PEG₆₀₀₀, bitkinin kök sistemi tarafından alınmamaktadır. Fakat zaman içerisinde çözeltinin oksijen derişimini azaltarak tolerant tohumların bile çimlenmesini olumsuz etkilemektedir. Eğer yapılan çalışma çimlendirme kâğıdı gibi bir malzeme üzerinde yapılıyorsa, kâğıdı sık sık yenileyerek oksijen derişimi normal seviyelere getirilebilmektedir (Semerci ve diğerleri, 2008). Polietilen glikol kullanılarak farklı bitkiler üzerinde yapılan çalışmaların, kontrollü ortamlarda başarıyla kurak şartlar yaratarak bitkileri strese soktuğu bildirilmiştir (Chen ve diğerleri, 2010).

Tilaki ve diğerleri (2009), farklı yonca çeşitlerine ait tohumlara farklı seviyelerde PEG₆₀₀₀ uygulamasıyla strese maruz bırakarak tohum çimlenmesi üzerine ciddi farklılıkların olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre -0,2 MPa PEG uygulanan tohumlara ait çimlenme oranları kontrol grubuyla kıyaslandığında arttığını, -0,4 MPa değerinde azaldığını ve -0,8 MPa seviyesinde ise tohum çimlenmesini durdurduğunu gözlemlemiştir.

Moussa ve Abdel-Aziz (2008), yaptıkları çalışmada kurağa tolerant (Giza 2) ve kurağa hassas (Trihybrid 321) mısır çeşitlerini PEG içeren ortamda 21 gün boyunca kuraklık stresine maruz bırakarak iki çeşit arasındaki ölçümlerde bazı ciddi farklılıklar olduğunu belirlemiştir.

Wang ve diğerleri (2009), yaptıkları çalışmada 6 farklı yonca çeşidine ait tohumların tuz ve kuraklık stresi altında çimlenme oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmada tuzluluk stresi olarak 0 (kontrol), 200 mM NaCl konsantrasyonu kullanılırken kuraklık stresi için %0 (kontrol), %35 PEG konsantrasyonu kullanılmıştır. Tuzluluk ve kuraklık bakımından karşılaştırılan çeşitler arasında Xinmu No.1 çeşidi tolerantlık sergilerken Northstar çeşidi hassas olarak belirlenmiştir. NaCl veya PEG işleminden sonra Xinmu No.1, Northstar ile karşılaştırıldığında daha fazla fide büyümesi göstermiştir. Yoncada PEG kimyasalı kullanarak kuraklık stresinin suni bir şekilde oluşturulabileceğini ve stres sonucu oluşan farklılıklardan elde edilen ölçümlerin belirlenerek kurağa hassas ya da kurağa tolerantlık özelliğine sahip genotiplerin seleksiyonunda kullanılabileceğini tespit ederek sonuçların başarılı olduğunu ortaya koymuştur.

Hamidi ve Safarnejad (2010), farklı ozmotik basınçlar altında 6 yonca çeşidinin çimlenme yüzdesi ile kök ve sürgün büyümesini ölçmek için *in-vitro* koşullarda gerçekleştirdikleri çalışmada, bitkilerin polietilen glikol (PEG₆₀₀₀) kullanılarak oluşturulan farklı şiddetlerdeki kuraklık stresine (0 (kontrol), -3, -6, -9 bar) karşı tepkilerini test etmişlerdir. Oluşturulan ozmotik basınçta strese maruz bırakılan yonca (Yazdi, Simmer Chenskaya, CUF-101, Hamedani, Maupa, Qareh Yonjeh) tohumlarında önemli farklılıklar meydana gelmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, kültür ortamının ozmotik potansiyeli azaltılarak yüksek kuraklık stresine maruz bırakılan yonca çeşitlerinde çimlenme oranı ve hızı, kök ve sürgün uzunluğu ve tohum canlılık indeksi gibi parametrelerde önemli bir düşüş olduğu bildirilmiştir.

Carmen ve Nadalea (2012), yaptıkları çalışmada yoncaya ait 6 adet çeşide farklı seviyelerde kuraklık stresi (0, -2,95, -4,91 ve -10,27 bar) uygulanmış ve bitki tohumlarının stres altında çimlenme oranları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tohumların çimlenme performansı ve oranında ciddi azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir.

Castroluna ve diğerleri (2012), yonca tohumlarının kuraklık stresi altında çimlenme oranlarını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada üç ayrı yonca çeşidine PEG₆₀₀₀ kullanarak sırasıyla 0, -0,5, -1 ve -1,5 MPa seviyesinde kuraklık stresi uygulamıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda -1,5 MPa seviyesindeki kuraklık stresi altında tohum çimlenmesinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak çeşitlerin sapçık ve kökçük uzunluklarının çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir.

Çarpıcı ve Erdel (2015), Bilensoy-80, Gözlü-1, Prosementi, Alsancak ve İside yonca çeşitlerine ait tohumları ve farklı PEG₆₀₀₀ (0, -2,95, -4,91 ve -10,27 bar) seviyeleri kullanarak bitkilerin kuraklık stresine karşı verdikleri tepkiler incelenmiştir. Düşük seviyelerde uygulanan kuraklık stresi, çeşitlere ait tohumların çimlenmesini fazla etkilememiş fakat -10,27 bar stres altında çimlenme oranları önemli ölçüde azalmış ve bazı çeşitlerin (Gözlü-1, Prosementi, İside) çimlenmeleri tamamen durmuştur. Çeşitlerin sapçık uzunluğu ve vigor indeksi -2,91 bar seviyesinden itibaren olumsuz etkilenirken kökçük gelişimi -4,91 bar seviyesinden itibaren etkilenmeye başlamıştır. Çalışma sonuçlarına göre çimlenme potansiyeli ve oranı, kökçük uzunluğu, sapçık uzunluğu ve fide vigoru (gücü) bakımından çeşitlere göre önemli farklar olduğunu belirlemiştir. Bununla birlikte Bilensoy-80 ve Alsancak çeşitlerinin diğer çeşitlere göre çimlenme döneminde kurağa karşı daha tolerant olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3. Yoncada Morfolojik Özellik Çalışmaları

Bitkilerin maruz kaldığı kuraklık stresine karşı oluşturduğu kuraklık toleranlığını tespit edebilmek için fizyolojik ve morfolojik karakterlerin rutin olarak ölçülmesi gerekmektedir. Bitki boyu, bitki kanopy sıcaklığı, yapraktaki klorofil a/b ve SPAD ölçümleri kurağa karşı toleranlığı araştırmak için önemli parametrelerdir. Bu veriler ışığında kontrol bitkisi ve strese maruz kalmış bitkiler arasındaki farklar hem fizyolojik hem de morfolojik olarak karşılaştırılmalıdır. Ayrıca stres uygulanan bitkiler ile kontrol bitkilerinin görsel olarak kıyaslanması da mümkün olabilmektedir. Sonuç olarak her iki bitki grubunun verim miktarlarındaki farklılıklar ve değişimler değerlendirilebilmektedir (Lopez ve diğerleri, 2014).

Şeker (2003), iki farklı yonca çeşidinin (Kayseri ve Bilensoy-80) morfolojik özellik bakımından incelendiği çalışmada, Kayseri yoncasının sap kalınlığı ortalama 4 mm ölçülürken Bilensoy-80'de ortalama 3,70 mm ölçülmüştür. Ana dal sayısı bakımından Kayseri yoncası ortalama 16,80 adet/bitki, Bilensoy-80 ise ortalama 12,30 adet/bitki olarak bulunmuştur.

Şeker ve diğerleri (2003), Doğu Anadolu doğal florasından toplanan yonca genotipleri, kontrol olarak kullanılan Kayseri ve Bilensoy-80 çeşitleriyle kıyaslanarak bazı morfolojik ve fizyolojik özellik parametreleri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre sap kalınlığı 2,87 - 4,00 mm aralığında çıkmıştır ve doğal floradan toplanan yoncaların sapları, Kayseri ve Bilensoy-80 çeşitlerine göre daha ince olduğu tespit etmiştir. Yaprakçık eni bakımından incelenen yoncalar 6,33 - 10,58 mm arasında değişkenlik göstermiştir. Çalışmada bulguları çeşitlerin genotiplere göre daha geniş ve uzun yaprakçıklara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Belirlenen ana dal üzerindeki yan dalların sayısı ortalama olarak 12,3 - 27,4 adet/bitki arasında tespit etmişlerdir.

Kavut (2004), İzmir-Bornova ekolojisinde yetişmiş olan 4 farklı yonca genotipinin kullanıldığı çalışmada bitkilerin 22,0 - 24,3 günde çiçeklendiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak kullanılan bitkilerin ana dal sayısının 12,14 - 12,41 adet/bitki, bitki boyu 61,7 - 65,8 cm, sap kalınlığı 2,78 - 2,90 mm olduğunu belirlemiştir.

Powell ve Bork (2005), nemli koşulların yonca üzerindeki etkisini belirlemek için farklı nem değerlerinde yonca bitkilerini yetiştirmişlerdir. Nem miktarı yüksek seviyelerde olan ortamlarda bitkilerin daha iyi gelişim gösterdiği belirlemiştir. Bu doğrultuda sap kalınlığı %17 - 42, yaprak alanı %24 - 30, bitki boyu ise %23 - 24 oranında artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Annicchiarico (2006), yoncaya ait farklı ekotip ve çeşitlerin soğuk koşullara dayanma, morfolojik özellik ve genetik yapının belirlenmesine yönelik yaptığı çalışmada bitki boyu 54,5 - 61,9 cm olarak tespit edilirken, ana dal sayısı 4,5 - 8,02 adet/bitki olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan 7 çeşidin 2 tanesinin farklı dallandığı belirlenmiştir. Diğer 5 çeşit yakın bölgelerdeki çeşitlerle yakın olarak kümelendiği ve çeşitlerin kendi aralarında önemli ölçüde genetik çeşitlilik sergilediği bildirilmiştir.

Demiroğlu ve diğerleri (2008), yaptıkları çalışmada kullandıkları farklı yonca genotiplerinin hem agronomik hem de morfolojik özelliklerini araştırmışlardır. En uzun ana dal 80,24 cm ile Bacana çeşidinde gözlenirken en kısa ana dal 59,73 cm ile Elçi çeşidinde tespit edilmiştir. Çeşitlere göre farklılık gösteren ana dal kalınlığı 2,33 - 3,07 mm aralıklarında değer sergilemiştir. Ana dal sayısı 11,00 - 11,88 adet/bitki aralığında çıkmıştır. Yapılan istatistik analizler sonucu çeşitler arasında ana dal sayısı bakımından önemli bir çeşitlilik gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Yeşil ve Şengül (2009), yoncanın 20 farklı ekotipinden elde edilen tohumları kullanarak yaptıkları çalışmada, geliştirilen bitkilerin %61'i dik, %19'u yatık ve %20'si yarı yatık şekilde gelişim gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte yapılan ölçümlerde ortalama bitki boyu 67,7 cm olan bitkilerin arasında önemli varyasyonların olduğu tespit edilmiştir. Ana dal üzerindeki ortalama yan dal sayısı 10 adet/bitki olarak belirlenirken ortalama ana dal sayısı en az 5,2 en çok 12,0 adet/bitki, sap kalınlığı bakımından ise en az 2,08 en çok 6,04 mm olarak belirlemişlerdir. Yaprak boyu ortalama 19,96 mm, genişlik ise 7,68 mm olarak kaydetmişlerdir.

Tucak ve diğerleri (2009), farklı yonca çeşitleri kullanılarak ana bileşen analiziyle bitkilerin dış görünüşüne ilişkin özellikleri belirledikleri çalışmada bitki boyu, ana dal sayısı, yaprak özellikleri, kuru ve yaş ot ağırlıkları, gelişim durumu ve bitkilerin biçildikten sonra sergiledikleri gelişimleri incelemişlerdir. Bitkiler biçildikten iki hafta sonra bitki boyları ölçülerek biçim sonrası bitki performansı belirlenmiştir. Bitkilere ait özellikler arasında önemli farklılık tespit edemediklerini bildirmişlerdir. İki ana bileşen %58,21 oranında farklılık oluşturmuştur. Buna göre ot verimi, bitkilerin gelişme durumu, biçimden sonra yeniden gelişme ve bitkilere ait orta yaprakçık uzunluklarının çeşitliliğin sağlanmasında etkili özellikler olduğu tespit etmişlerdir.

Öten ve diğerleri (2016), Antalya doğal vejetasyonundan topladıkları yaygın yonca (*M. sativa*), yaygın yabani yonca (*M. polymorpha*), mini yonca (*M. minima*), sarı çiçekli yonca (*M. falcata*), düğmeli yonca (*M. orbicularis*), kirpi yoncası (*M. ciliaris*), pıtıraklı yonca (*M. hispida*) ve dikenli fiçı yoncası (*M. turbinata*) türlerinde bitki boyu, fizyolojik olgunlaşmaya gelene kadar geçen gün sayısı, çiçek oluşumu için geçen gün sayısı, salkım başına oluşan çiçek sayısı, çiçek rengi ve bindane ağırlığı gibi morfolojik özellikleri incelemişlerdir. Yapılan bitki boyu ölçümlerinde en uzun bitki boyu 120 cm ile *M. sativa*'da gözlemlenirken en kısa bitki boyu 20 cm ile *M. orbicularis*'de gözlemlenmiştir. *M. polymorpha* 238 gün, *M. ciliaris* 155 gün, *M. sativa* ise 184 ila 192 gün aralığında fizyolojik olum gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Çiçeklenme için geçen gün sayısına en erken ulaşan tür 120 gün ile *M. turbinata* olurken en geç çiçeklenen bitki 155 gün ile *M. sativa* olduğunu bildirmişlerdir. Salkımdaki çiçek sayısı en fazla 5 - 20 adet ile *M. sativa*'da gözlemlenirken en az çiçek 1 - 5 adet ile *M. polymorpha*'da gözlemlenmiştir. Çiçek rengi *M. sativa*'da mor ve lila olarak kaydedilirken diğer yonca türlerinde sarı olarak kaydetmişlerdir. Tohumların bindane ağırlıkları kıyaslandığında; *M. sativa* 2,1 - 3,7 g, *M. polymorpha* 0,8 - 6,2 g, *M. minima* 0,6 - 2,7 g, *M. falcata* 1,9 - 2,3 g, *M. orbicularis* 2,2 - 3,8 g, *M. ciliaris* 1,2 - 1,8 g, *M. hispida* 1,2 - 4,0 g ve *M. turbinata* 0,8 - 1,1 g olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, incelenen özellikler bakımından yonca (*Medicago* sp.) türlerinde önemli farklılıkların olduğunu tespit etmişlerdir.

2.4. SPAD Ölçümü ve Total Klorofil İçeriği

Sadeghi-Shoae ve diğerleri (2014), klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b değerleri bitkinin total klorofil miktarını oluşturduğu ve bu değerlerin bitki türüne ve genotipe bağlı olarak önemli ölçüde varyasyon gösterdiği bildirmiştir.

Fischer (2001), buğday bitkisi üzerinde SPAD-502 klorofilmetre cihazının etkinliğini test ettiği çalışmada en ideal ölçüm zamanının bitkinin klorofil miktarının yüksek olduğu çiçeklenme sonrası dönem olduğunu belirlemiştir. Ayrıca SPAD-502 klorofilmetre cihazının yaprak yapısını hasara uğratmayan ekonomik bir yöntem olduğunu bildirmiştir.

Genotipten kaynaklanan farklılıkların, kuraklık ya da diğer çevresel faktörlere göre bitki total klorofil miktarını daha fazla etkilemektedir (Li ve diğerleri, 2006). Kuraklık, tuzluluk yüksek sıcaklık gibi abiyotik streslere karşı bitkilerin vermiş olduğu tepkilerin belirlenmesinde bitki SPAD değerinin önemli olduğu bildirilmiştir (Efeoğlu ve Terzioğlu, 2009).

Balkan (2011), yaptığı çalışmada kurağa tolerant ve kurağa hassas buğday çeşitlerinin SPAD değerlerini karşılaştırmış ve tolerant çeşitlerin total klorofil miktarının hassas çeşitlere göre daha yüksek olduğu belirlemiştir.

Talebi (2011), yaptığı çalışmada kurak koşullar altında yetiştirilen bitkilerin verim ve SPAD değerleri arasında önemli bir ilişki olduğunu belirlemiştir. Ancak araştırmacı bu ilişkinin sulu şartlarda yetiştirilen bitkilerde gözlenmediğini belirtmiştir.

Zhang ve diğerleri (2016), *CsLEA* genleri transfer edilen transgenik yonca genotiplerinin kuraklık ve tuz stresine karşı vermiş oldukları tepkilerin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada 0, 10 ve 15 gün kuraklık stresi uygulanmıştır. Kuraklık stresine maruz bırakılan transgenik yonca hatları ve kontrol bitkilerinin toplam klorofil içeriğinde kuraklık stresinin şiddetine bağlı olarak azalmalar meydana geldiğini belirlemişlerdir. Bunun yanında net fotosentetik oranın ve klorofil içeriğinin kuraklık stresi boyunca tüm bitkilerde azaldığını fakat transgenik olmayan (WT) bitkilerin klorofil seviyelerinin transgenik bitkilere göre daha büyük bir azalma sergilediğini bildirmişlerdir.

Singh ve diğerleri (2017), kurağa hassas (JL-3) ve kurağa tolerant (PDL) olmak üzere iki mercimek (*Lens culinaris* M.) genotipi kullanmış ve fide aşamasında kuraklık stresi uygulanarak transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada yapılan total klorofil miktarı ölçümlerine göre kuraklık stresi altında her iki mercimek genotipinin de klorofil içeriğinin çok önemli oranda azaldığını belirlemişlerdir.

2.5. Kuraklık Stresiyle İlgili Seçilen Genler

2.5.1. Prolin Dehidrojenaz Geni (*ProDH*)

Verbruggen ve Hermans (2008), yaptıkları araştırmalarda *ProDH* aktivitesi ve *ProDH* gen ekspresyonunun bitkinin gelişimi sırasında modifiye edilerek meristemler, polen, pistil ve çiçek gibi hücre gelişimini destekleyen dokularda meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Szabados ve Savouré (2010), dehidrasyon, aşırı sıcaklık, kuraklık stresi ve diğer abiyotik stres faktörleri altında *ProDH* geninin ifade seviyesinin düştüğü ve prolin sentezinin uyarılarak prolin birikimini teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Stres faktörünün ortadan kalkmasıyla *ProDH* geninin stres sırasında biriken prolini tüketmek için tekrar aktif hale gelerek ifade seviyesinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Verslues ve diğerleri (2006), kuraklık, tuzluluk ve dehidrasyonun gibi abiyotik stres faktörlerinin *ProDH* gen ifade seviyesini düşürerek aşağı-regüle (down-regulation) ettiğini bildirmişlerdir.

Peng ve diğeri (1996), aynı *Arabidopsis thaliana* bitkisinde kuraklık stresi altında *P5CS* ve *ProDH* genlerinin zıt gen ifadesi sergilediğini belirlemişlerdir. Kuraklık stresi altında *P5CS* geninin ifade seviyesi yukarı-regülasyon (up-regulation) sergilerken *ProDH* geninin ifade seviyesi aşağı-regülasyon göstermiştir. Kuraklık stres şartları sonlandırıldığında ise *ProDH* geninin ifade seviyesinde artış gözlemlenirken *P5CS* geni down-regüle olmuştur. Çalışma sonuçlarına göre stres şartlarında biriken prolin içeriğinin hem *P5CS* hem de *ProDH* genlerinin ifade seviyeleri tarafından kontrol edildiğini belirlemişlerdir.

Nakashima ve diğeri (1998), *Arabidopsis thaliana* *ProDH* gen ifade seviyesinin dehidrasyon, rehidrasyon ve hipoozmolarite tarafından etkilenerek değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. *ProDH* geni rehidrasyon ve hipoozmolarite koşullarında yukarı-regülasyon sergilerken dehidrasyon sonucu biriken prolin nedeniyle aşağı regülasyon sergilediğini tespit etmişlerdir. Buna ek olarak *ProDH* geninin kotiledon, kök uçları, stigma, polen taneleri ve ovül gibi hücre bölünmesinin yüksek olduğu kısımlarda düşük seviyelerde ifade olduğunu belirlemişlerdir.

Hayashi ve diğeri (2000), *Arabidopsis thaliana*'da aydınlık ve karanlık döngülerinde *P5CS* ve *ProDH* gen ifadelerinin prolin üretimini ve düzenlenmesini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada stres uygulanmayan *Arabidopsis* bitkilerinde sürekli aydınlık ve sürekli karanlık ortamda prolin birikimi olduğunu bildirmişlerdir. Hem aydınlık hem de karanlık koşullarda *P5CS* geninin ifade olduğu belirlenirken *ProDH* geninin sürekli ışık koşullarında neredeyse hiç gen ifade profili sergilemediğini tespit etmişlerdir.

Miller ve diğeri (2005), yoncanın tuzluluk stresi altında ve stres sonrası prolin birikimiyle prolin dehidrojenaz (*MsProDH1* ve *MsProDH2*) genlerinin ifade seviyesi arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada tuzluluk stresi altında ve stres sonrası bitkilerin serbest prolin içeriğindeki değişimlerin *MsProDH1* ve *MsProDH2* genlerinin ifade seviyeleriyle ters orantılı olduğunu belirlemişlerdir. Buna ek olarak stres uygulamasının ardından *MsProDH* genlerinin ifade seviyelerinde çarpıcı bir düşüş gözlenirken stres sonrası hızlı bir artış meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Quan ve diğeri (2016), iki farklı yonca çeşidinin (Longdong ve Algonquin) kuraklık stresine karşı vermiş oldukları tepkileri transkripsiyonel seviyede karşılaştırmalı olarak test ettikleri çalışmada, *MtProDH* geninin iki bitkide de köklerde, yapraklara göre daha yüksek ekspresyon sergilediğini belirlemişlerdir. Buna ek olarak kuraklık stresi altında Longdong çeşidinde, Algonquin çeşidine göre *MtProDH* geninin düşük ekspresyon

sergilediğini belirlemişlerdir.

2.5.2. Kuraklıktan Sorumlu *RD2* Geni

Tang ve diğerleri (2013), kurağı tolere edebilen transgenik yonca genotiplerinin geliştirilmesine yönelik yaptıkları çalışmada *Glycine soja* bitkisinden izole edilen *GsZFP1* (Çinko Parmak Protein 1) genini *Agrobacterium* aracılığıyla yoncaya transfer etmişlerdir. *GsZFP1* geninin aşırı ifadesi sonucu yoncanın gelişmiş tuzluluk ve kuraklık tolerantlığı sergilediği belirlenmiştir. Elde ettikleri transgenik hatlar (20 ve 41 nolu genotipler) 0, 1, 3, 6 ve 12 saat boyunca %20'lik PEG₆₀₀₀ ile muamele edilmiş ve yapay kuraklık stresi altında *MtRD2*, *MtP5CS*, *MtRAB18* ve *MtCOR47* genlerinin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Bu genlerin ifadeleri hem transgenik olmayan hem de transgenik bitkilerde kuraklık tarafından uyarıldığını ve zaman içerisinde benzer gen ifade profilleri gösterdiğini tespit etmişlerdir. *MtCOR47* geninin ifade seviyesi *GsZFP1* aşırı ifade (over-expression) transgenik hatlarda (#20 ve #41) transgenik olmayana göre yapay kuraklık stresinin 0. ve 3. saatlerinde yüksek ifade olurken *MtRAB18*, *MtP5CS* ve *MtRD2* genleri yapay kuraklık stresinin 3. ve 6. saatlerinde yüksek ifade profilleri sergilediğini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre *GsZFP1*'in kuraklıktan sorumlu genlerin ifade seviyelerini artırdığı ve bu genlerin ifade durumlarının kuraklık tolerantlığıyla bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar *MtRD2* geninin yanı sıra *MtRAB18* ve *MtCOR47* genlerinin *Arabidopsis RD2*, *RAB18* ve *COR47* genleri ile homolog genler olduğunu ve bu genlerin kuraklık stresiyle ilişkili markör gen olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Quan ve diğerleri (2016), kurağa hassas (Algonquin) ve kurağa tolerant (Longdong) olmak üzere iki yonca (*Medicago sativa* L.) çeşidi üzerinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresi altında *MtRD2* gen ifade seviyesinin Longdong çeşidinde Algonquin çeşidine göre hem köklerde hem de yapraklarda yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Her iki bitkinin kök ve yapraklarındaki *MtRD2* gen ifade seviyesini inceleyen araştırmacılar bu genin yaprak dokularında kök dokularına göre daha yüksek seviyede ifade olduğunu tespit etmişlerdir.

Samota ve diğerleri (2017), kurağa tolerant (Nagina-22) ve kurağa hassas (Pusa Sugandh-5) olmak üzere iki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) genotipine ait tohumlara metil jasmonat (JA-Me), salisilik asit (SA) ve paclobutrazol (PB) uygulanarak kuraklık stresine olan etkilerinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde belirlenmesine yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada, tohum priming uygulamasının AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-Responsive Factor) transkripsiyon faktörü familyasında yer alan *RD1* ve *RD2* genlerinin kuraklık stresi altındaki gen ifade seviyelerini incelemişlerdir.

Çalışma sonuçlarına göre priming uygulanan her iki genotipte kuraklık stresi altında *RD1* ve *RD2* genlerinin kuraklık toleranlığında çok önemli rol oynadıklarını ve genlerin yukarı regülasyon sergileyerek ifade seviyelerinde artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Hou ve diğerleri (2018), pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) kuraklıktan sorumlu genlerin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada *RD2* geninin kurağa tolerantlık için oldukça önemli bir gen olduğunu bildirmişlerdir.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak TÜBİTAK-TOVAG 116O417 numaralı proje kapsamında Bilensoy-80 çeşidine ait yaygın yonca tohumlarına kimyasal bir mutajen olan EMS (*Ethylmethane sulfonate*) uygulandıktan sonra 2. jenerasyonda (M_2) kendileme yapılarak elde edilen M_3 yonca tohumlarının *in-vitro* şartlarda çimlenme evresinde yapılan kurağa tolerantlık testleri sonucu kurağa tolerant olduğu belirlenen mutant yonca genotipleri kullanılmıştır.

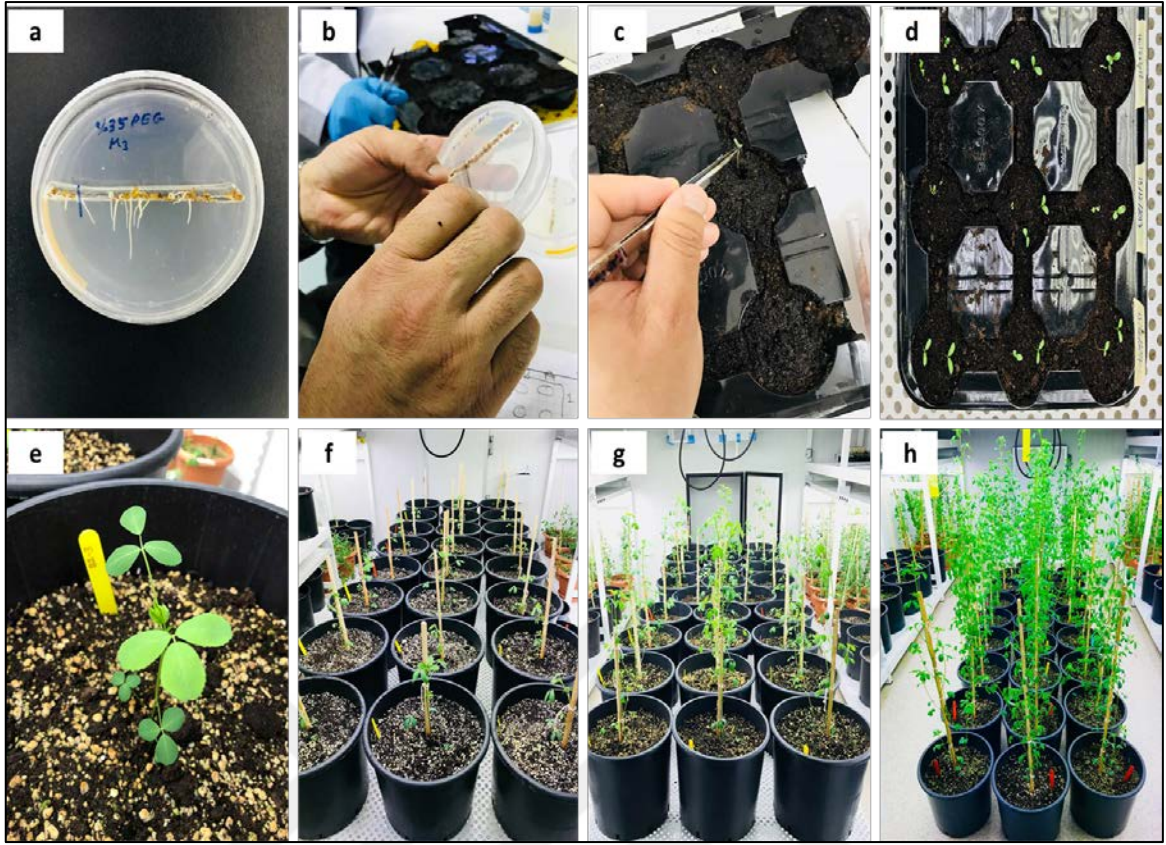
3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

In-vitro şartlarda kurağa tolerantlığı tespit edilen aday mutant yonca genotipleri fide aşamasına kadar viyollerde torf içerisinde kontrollü şartlarda geliştirilmiş ve belirlenen genotip koduna etiketlenerek 3:1 (v/v) oranında torf ve perlit karışımı bulunan 20 litrelik plastik saksılara transfer edilmiştir.

Bitkilerin transfer edildiği saksılar $25\pm0,5$ °C sıcaklık, %65 nem ve 18 saat aydınlık / 6 saat karanlık ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) şartlarına sahip iklimlendirme odasına transfer edilmiş ve bitkilerin yetiştirilmesine bu ortamda devam edilmiştir (Şekil 6).

Rutin olarak kontrol edilen bitkiler ihtiyaca göre gerekli miktarlarda sulanarak yetiştirilmiştir.



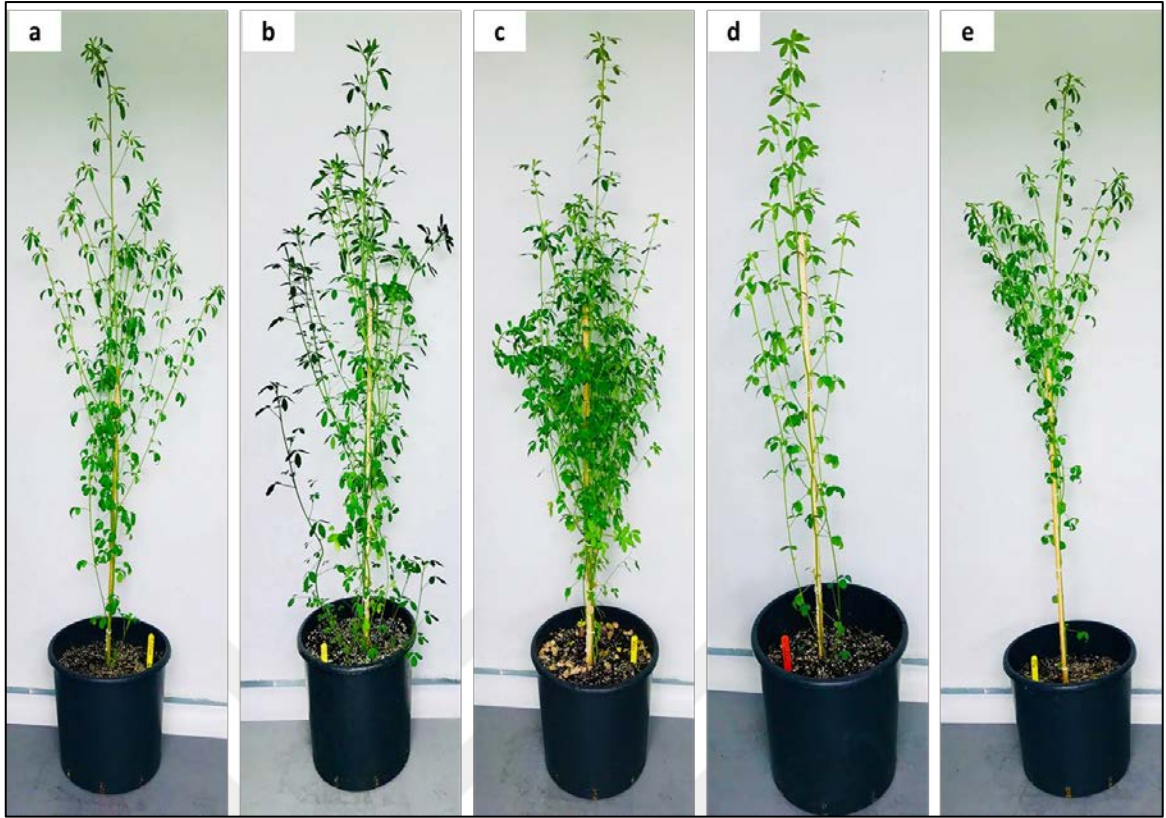
Şekil 6. İnkübasyon süresi sona ermiş olan petrilerde kökçük gelişimi gösteren aday mutant (M_3) genotiplerin belirlenmesi ve bitkilerin gelişim süreci a-b. PEG infiltrasyon yöntemiyle yarı kuvvetli MS ortamda kökçük gelişimi gösteren aday mutant genotiplerin belirlenmesi ve petrilerden alınması, c-d. Fidelerin viyollere dikilmesi ve geliştirilmesi, e. Viyollerde yetiştirilen fidelerin saksılara transfer edilmesi, f-g-h. Saksılara transfer edilen fidelere ait genel görseller

3.2.2. Bitkilerin Biçim Öncesine İlişkin Bazı Agro-morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Tomurcuklanma Gün Sayılarının Belirlenmesi

İklimlendirme odası koşullarında yetiştirilen yaygın yonca bitkileri rutin olarak kontrol edilerek fidelerin saksıya transfer tarihi ve ilk tomurcuk oluşturma gün sayısı arası geçen süre kaydedilmiştir.

Çiçek tomurcuğu oluşum aşamasına gelen bitkiler tarla kapasitesine kadar sulanmış ve saksılardaki suyun 24 saat boyunca drene olması beklenmiştir. Ardından aday mutant genotipler ile kontrol bitkilerinin biçim öncesi diğer bazı agro-morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Agro-morfolojik özelliklerine göre seçilmiş olan aday mutant (M_3) yonca genotiplerinin genel görüntüleri Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 7. Bazı agro-morfolojik özellikler ve SPAD (toplam klorofil) verilerine göre seçilerek çalışmada kullanılan aday mutant yonca genotiplerinin biçim öncesine ait genel görünüşleri a. X18, b. X20, c. X50, d. Z1 (sulu kontrol), e. Z2 (susuz kontrol)

Ana Dal Sayısı (Bitki/Adet)

Hasat zamanı gelen her bir bitkinin torf seviyesinden itibaren oluşturdukları ana dallar sayılarak tespit edilmiştir.

Bitki Boyu (cm)

Her bir bitkinin boyu torf seviyesinden itibaren en tepedeki sürgüne kadar olacak şekilde şerit metre yardımıyla ölçülmüştür.

Ana Gövde Kalınlığı (mm)

Bitkilerin ana gövde kalınlığını belirlemek için bir önceki adımda (bitki boyu) ölçülen en uzun ana gövdeye ait kalınlık 0,1 mm'ye duyarlı dijital kumpas kullanılarak torf seviyesinden itibaren yaklaşık 10 cm yukarısından ölçüm alınarak tespit edilmiştir.

Yan Dal Sayısı (Bitki/Adet)

Her bir bitki için bitkiye ait hem boy hem de kalınlık bakımından en gelişmiş ana gövde belirlenmiş ve bu ana gövde baz alınarak ana gövde üzerindeki yan dallar sayılarak tespit edilmiştir.

Çiçek Rengi (1-4)

Çiçeklenen bitkilerin çiçek renkleri 1-4 skalası,

(1: Açık pembe, 2: Pembe, 3: Açık mor, 4: Mor) kullanılarak tespit edilmiştir.

Çiçek Salkım Durumu (1-3)

Bitkilerin çiçek salkım durumları 1-3 skalası,

(1: Tek çiçek, 2: Seyrek salkım, 3: Sık salkım) kullanılarak tespit edilmiştir.

Yaprak Rengi (1-3)

Yaprak rengi bitkinin alt, orta ve üst kısımları gözlemlenerek yoğun bir şekilde hakim olan yaprak rengi 1-3 skalası,

(1: Açık yeşil, 2: Yeşil, 3: Koyu yeşil) kullanılarak tespit edilmiştir.

Yaprakçıkta Dişlilik Durumu (1-3)

İlgili bitkiye ait yaprakçıkların dişlilik durumunu belirlemek için bitkinin alt, orta ve üst kısmındaki yapraklar incelenmiş ve genel olarak hakim olan dişlilik durumu 1-3 skalası,

(1: Yok, 2: Hafif belirgin, 3: Çok belirgin) kullanılarak tespit edilmiştir.

Yapraktaki Kulakçık Şekli (1-4)

Her bir bitkinin alt, orta ve üst bölgelerindeki yapraklara ait kulakçıklar incelenmiş ve ilgili bitkinin kulakçık şekli 1-4 skalası,

(1: Mızrakvari belirgin küçük, 2: Mızrakvari belirgin büyük, 3: Midyevari belirgin küçük, 4: Midyevari belirgin büyük) kullanılarak tespit edilmiştir.

Kulakçıkta Antosiyanin (0-1)

Bitkilerin kulakçıkları genel olarak incelenmiştir ve antosiyanin maddesinin olup olmadığı 0-1 skalası,

(0: Antosiyanin yok, 1: Antosiyanin var) kullanılarak tespit edilmiştir.

Koltuk Sürgününde Antosiyanin (0-1)

Bitkilerin koltuk sürgünleri incelenerek antosiyanin maddesinin olup olmadığı oluşturulan 0-1 skalası,

(0: Antosiyanin yok, 1: Antosiyanin var) kullanılarak tespit edilmiştir.

Gövdede Antosiyanin (0-1)

Bitkilerin oluşturduğu ana gövde torf seviyesinden itibaren en uç kısma kadar incelenerek gövdede antosiyanin maddesinin olup olmadığı 0-1 skalası,

(0: Antosiyanin yok, 1: Antosiyanin var) kullanılarak tespit edilmiştir.

Gövdede Tüylülük (0-1)

Bitkilerin ana sapları büyüteç (2X) yardımıyla incelenerek tüylenmenin olup olmadığı 0-1 skalası,

(0: Yok, 1: Var) kullanılarak tespit edilmiştir.

Yaprak Boyu (cm)

Bitkiden rastgele seçilen 4 adet yaprağa ait yaprak boyu 0,1 mm hassasiyete sahip olan şeffaf cetvel kullanılarak ölçülmüştür.

Orta Yaprakçık Boyu (cm)

Bitkiden rastgele seçilen 4 adet yaprağın orta yaprakçık boyları 0,1 mm hassasiyete sahip olan şeffaf cetvel kullanılarak ölçülmüştür.

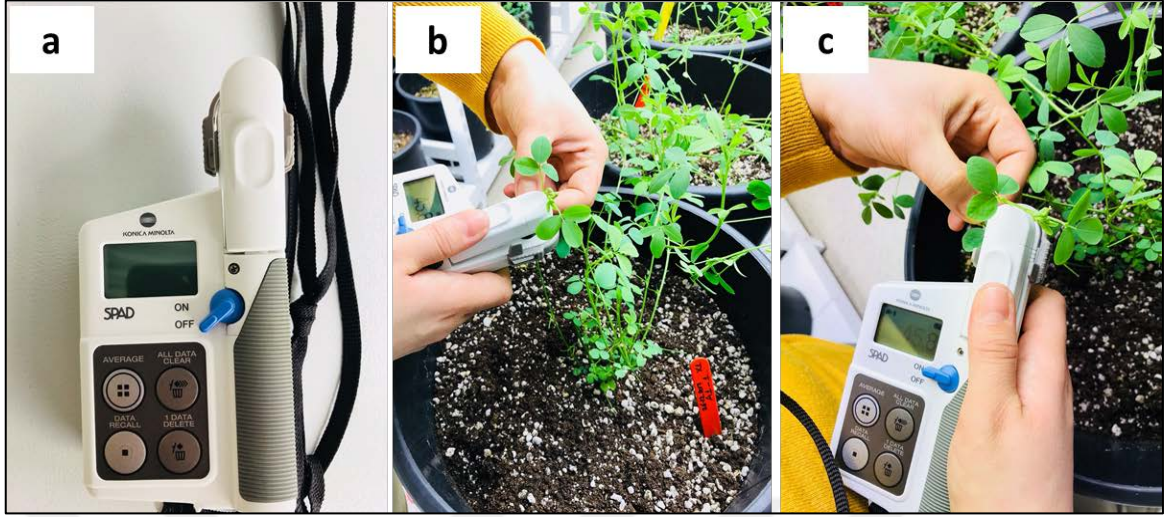
Orta Yaprakçık Eni (mm)

Bitkiden rastgele seçilen 4 adet yaprağın orta yaprakçık enleri 0,1 mm hassasiyete sahip olan şeffaf cetvel kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.3. Total Klorofil Miktarı Ölçümü

İlk çiçek tomurcuğu oluşum evresine gelen (Şekil 9a) ve birinci biçim öncesine ait bazı agro-morfolojik özellikleri belirlenen aday mutant yonca genotiplerinin biçim öncesi ve kuraklık stresi altında yapraklarındaki toplam klorofil miktarını belirlemek için Minolta marka SPAD-502 model klorofilmetre cihazı kullanılmıştır (Şekil 8a). Total klorofil ölçümleri her bir bitkiye ait rastgele seçilen 10 adet yaprağın orta yaprakçıklarından 3'er ölçüm alınarak toplam 30 tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 8b-8c).

Ölçümler sabah 9-12 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 8. Bitkilerin biçim öncesi (B.Ö.) ve kuraklık stresi altında yapraklardan total klorofil miktarlarının ölçülmesi a. Total klorofil ölçümünde kullanılan Minolta SPAD-502 marka klorofilmetre cihazına ilişkin bir görsel, b-c. Aday mutant genotiplerin orta yaprakçıkları kullanılarak klorofil miktarlarının ölçülmesine ilişkin görseller

3.2.4. Yaprak Örneklerinin Alınması ve Bitkilerin Biçimi

Çiçek tomurcuğu oluşum evresine gelen bitkilerden (Şekil 9a) gen ifade analizlerinde kullanılmak üzere yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örnekleri önceden hazırlanan alüminyum folyolara bitki kodu, örneklerin alınma tarihi ve bitkinin hangi döneminde yaprak örneği alındığına dair gerekli bilgiler etiketlenmiştir. Örneklerin alınması sırasında folyoların altına -80 °C’de dondurulan buz aküleri yerleştirilmiştir. Bir makas yardımıyla yaprak örnekleri yaprakçıkların yaprak sapıyla birleştiği noktadan kesilerek alınmıştır ve ilgili kodlarla etiketlenmiş folyoların içine yerleştirilmiştir (Şekil 9b). Biçim öncesine ilişkin spesifik gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için bitkinin tümünü homojen olarak temsil edecek şekilde sağlıklı yapraklar örnek olarak alınmıştır. Folyolara alınan yaprak örnekleri dikkatlice kapatıldıktan sonra hızlı bir şekilde -80 °C sıcaklığına sahip olan dolaba yerleştirilmiştir ve analiz gününe kadar depolanmıştır.

Gerekli agro-morfolojik özellik parametreleri ve yaprak örnekleri alınan bitkiler saksıdaki torf seviyesinden 10 cm yukarıdan olacak şekilde bir makas yardımıyla biçilmiştir (Şekil 9c). İlk kez biçilen bitkilere 24 gün kuraklık stresi uygulanmıştır. Sulu kontrol olarak kullanılan bitki düzenli olarak sulanmıştır.



Şekil 9. Çiçek tomurcuğu oluşum evresine gelen aday mutant genotiplerin biçim öncesi yaprak örneklerinin alınması ve bitkilerin biçilmesi a. Tomurcuklanma dönemi, b. Biçim öncesi yaprak örneklerinin alınmasına ilişkin bir görsel, c. Bitkilerin biçilmesine ilişkin bir görsel

3.2.5. Bitkilerin Yaş Ot Ağırlıklarının Belirlenmesi

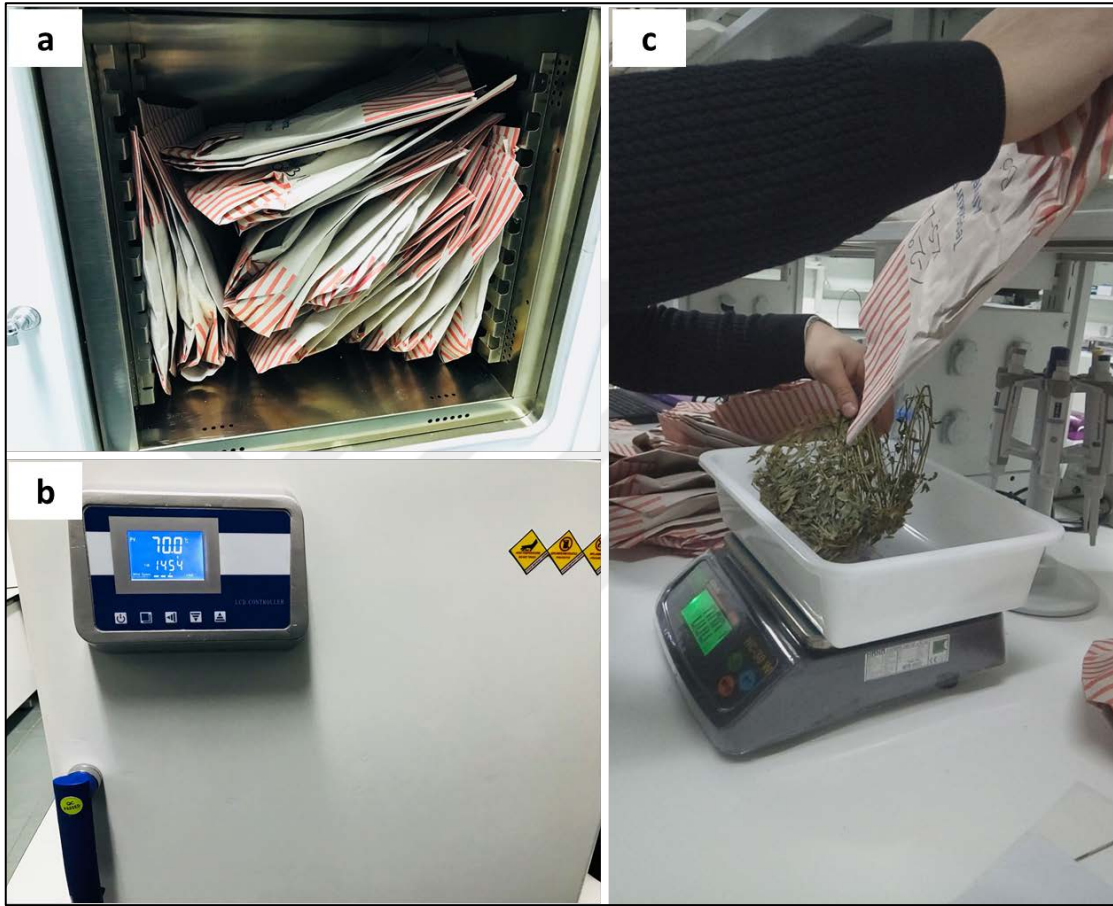
Biçilen her bir bitkinin yaş ot ağırlığı HANA HC-30W dijital terazi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Biçilen bitkilerin yaş ot ağırlıklarının belirlenmesine ilişkin bir görsel

3.2.6. Bitkilerin Kuru Ot Ağırlıklarının Belirlenmesi

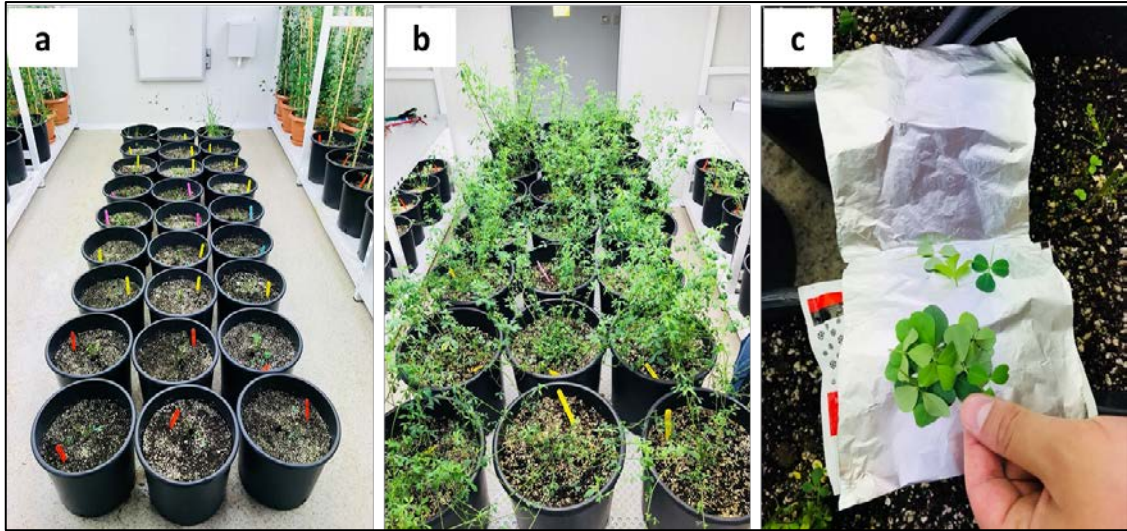
Kese kâğıtlarına yerleştirilen yaygın yoncaya ait yaş otlar sıcaklığı önceden 70 °C'ye ayarlanmış olan etüvün içerisine yerleştirilmiştir ve 48 saat boyunca tamamen kuruması sağlanmıştır (Şekil 11a-11b). Bitkilerin kuru ot ağırlıklarını belirlemek için HANA HC-30W dijital terazi kullanılmıştır ve veriler kaydedilmiştir (Şekil 11c).



Şekil 11. Yonca bitkilerine ait yaş otların kurutulması ve kuru ot tartımına ilişkin görseller a-b. Yaş otların kurutulması işleminde kullanılan etüve ilişkin görseller, c. Bitkilerin kuru ot ağırlıklarının belirlenmesi

3.2.7. Gerçek Kuraklık Stresinin Uygulanması ve Yaprak Örneklerinin Alınması

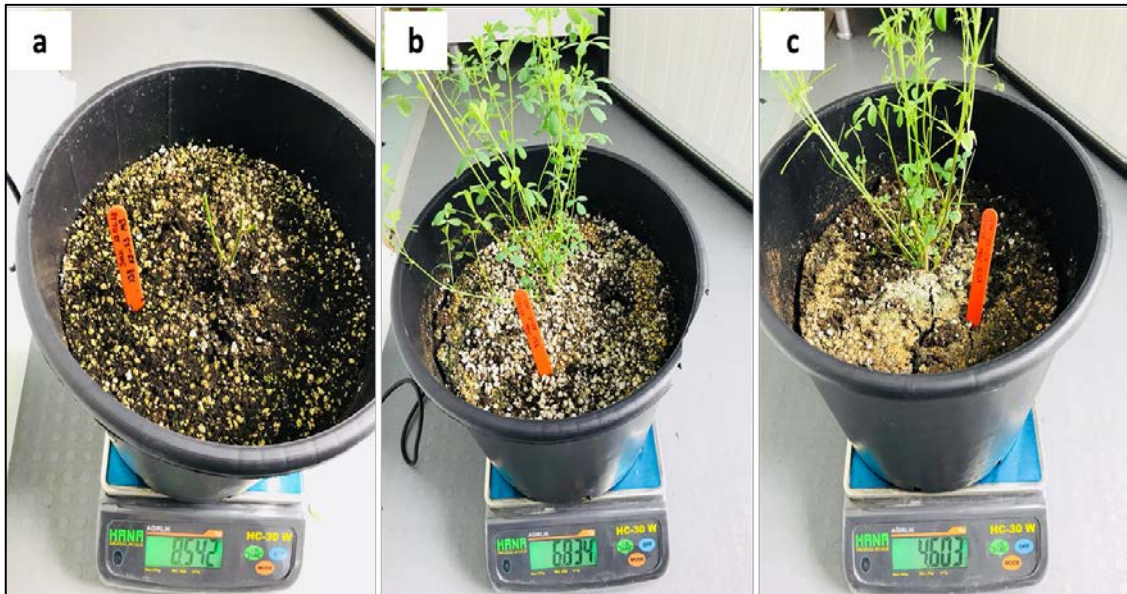
İlk kez biçilen bitkiler iklim odasına 24 gün boyunca kuraklık stresi altında gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 12a-12b). Kuraklık uygulanan bitkilerden kuraklık stresinin 18. ve 24. günlerinde bazı agro-morfolojik özellikler belirlenmiş ve kuraklık stresi boyunca her 6 günde bir SPAD değerleri ölçülmüştür. Bitkilerden biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günlerinde yaprak örneklerinin alım işlemi 3.2.4'te belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 12c).



Şekil 12. Biçilen bitkilerin iklim odasında kuraklık stresi şartlarında yetiştirilmesi ve yaprak örneklerinin alınması a. Biçilen bitkilerin iklim odasındaki genel görüntüleri, b. Kuraklık stresi altında yeniden gelişim gösteren aday mutant genotiplere ait genel görüntü, c. Kuraklık stresi altında gelişen bitkilerden yaprak örneklerinin alınmasına ilişkin bir görsel

3.2.8. Saksıların Tartılması

Bitkiler biçildikten sonra kuraklık stresinin uygulanmaya başladığı ilk günden (Şekil 13a) son güne kadar saksılarda meydana gelen ağırlık değişimlerin tespit etmek için HANA HC-30W dijital terazi kullanılarak kuraklık stres uygulaması boyunca her 3 günde bir tartılmıştır (Şekil 13b-13c).



Şekil 13. Saksı tartımlarına ilişkin görseller a. Bitkilerin biçim günü saksı tartımına ilişkin bir görsel, b-c. Kuraklık stresi uygulanan aday mutant genotiplerin farklı zaman aralıklarında saksı tartımlarına ilişkin görseller

3.2.9. Bitki Kanopy Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Kuraklık stresi şartlarında yetiştirilen aday mutant yonca genotiplerinin her 3 günde bir olmak üzere bitkinin alt, orta ve üst kısımlarından bitki kanopy sıcaklıkları belirlenmiştir. Bitki kanopy sıcaklıkları Oncomeds® marka infrared dijital termometre kullanılarak bitkiye yaklaşık 5 cm uzaklıktan ölçülmüştür. Ölçümler günün aynı saat aralıklarında ve %65 nem koşullarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Stres şartlarında yetiştirilen bitkilerin farklı zaman aralıklarında bitki kanopy sıcaklıklarının belirlenmesi a-b-c. Kuraklık stresinin 18. günü alt, orta ve üst kısımlardan bitki kanopy sıcaklıklarının belirlenmesine ilişkin görseller, d-e-f. Kuraklık stresinin 24. günü alt, orta ve üst kısımlardan bitki kanopy sıcaklıklarının belirlenmesine ilişkin görseller

3.2.10. Kuraklık Stresinin 18. ve 24. Günü İncelenen Bazı Agro-morfolojik Özellikler

Biçimden sonra kuraklık stresine maruz bırakılarak gelişim gösteren bitkilerin kuraklık stresinin 18. ve 24. günü aşağıdaki agro-morfolojik özellikleri belirlenmiştir.

Ana Dal Uzunluğu (cm)

Kuraklık stresinin 18. ve 24. günlerinde bitkiye ait en gelişkin ana dal uzunluğu torf seviyesinden itibaren şerit metre ile ölçülmüştür (Şekil 15b).

Ana Gövde Kalınlığı (mm)

Kuraklık stresi altında gelişim gösteren bitkilerin ana gövde kalınlığını belirlemek için en uzun ana gövdeye ait kalınlık 0,1 mm'ye duyarlı dijital kumpas kullanılarak torf seviyesinden itibaren yaklaşık 10 cm yukarısından ölçüm alınarak belirlenmiştir (Şekil 15a).

Doğal Bitki Boyu (cm)

Hiçbir şekilde destek uygulanmayan bitkilerin doğal vejetasyondaki gelişimleri baz alınarak torf seviyesinden itibaren en tepedeki sürgüne kadar olacak şekilde şerit metre yardımıyla doğal bitki boyları ölçülmüştür.

Yan Dal Sayısı (Adet)

Kuraklık stresi altında yetiştirilen her bir bitki için bitkiye ait hem boy hem de kalınlık bakımından en gelişmiş ana gövde belirlenmiş ve bu ana gövde baz alınarak ana gövde üzerindeki yan dallar sayılarak tespit edilmiştir.

Bitkideki Toplam Yaprak Sayısı (Adet/Bitki)

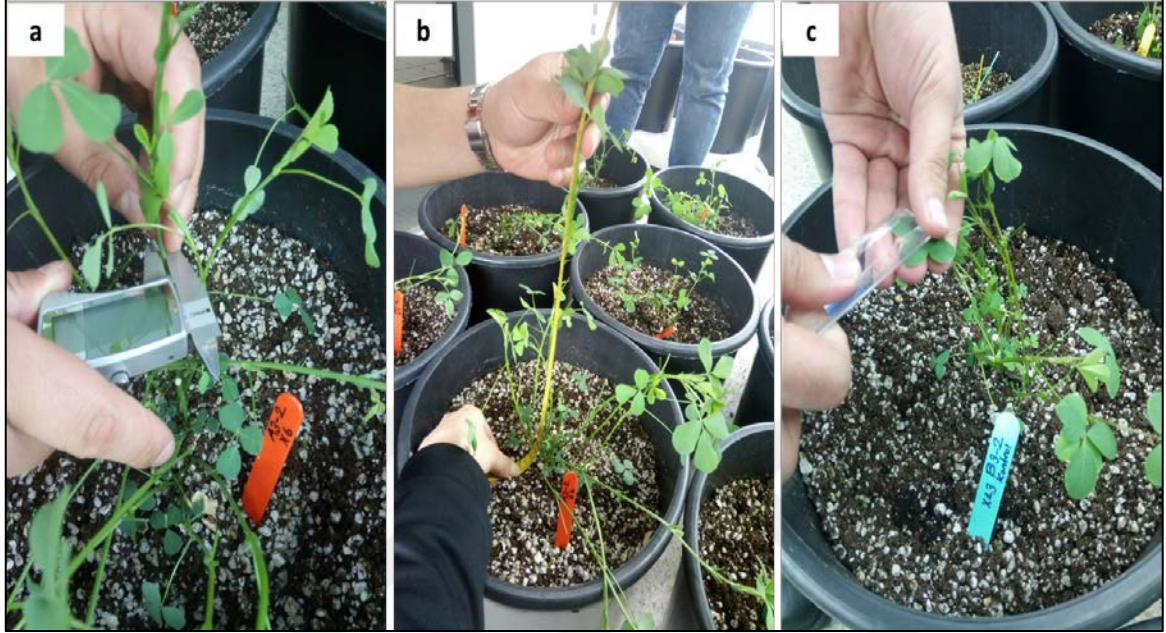
Kuraklık stresi altında yetiştirilen bitkilerin oluşturdıkları toplam yaprak sayısı adet/bitki olacak şekilde sayılarak belirlenmiştir.

Orta Yaprakçık Boyu (mm)

Kuraklık stresi altında yetiştirilen bitkilerin rastgele seçilen 4 adet yaprağın orta yaprakçık boyları 0,1 mm hassasiyete sahip olan şeffaf cetvel kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 15c).

Orta Yaprakçık Eni (mm)

Kuraklık stresi altında yetiştirilen bitkilerin rastgele seçilen 4 adet yaprağın orta yaprakçık enleri 0,1 mm hassasiyete sahip olan şeffaf cetvel kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 15c).



Şekil 15. Kuraklık stresinin 18. ve 24. günü aday mutant genotiplerin (M_3) bazı agromorfolojik özelliklerinin belirlenmesine ilişkin görseller a. Ana gövde kalınlığının belirlenmesi, b. Bitki boyunun ölçülmesi, c. Orta yaprakçıkların en ve boylarının belirlenmesi

Çiçek Rengi (1-4)

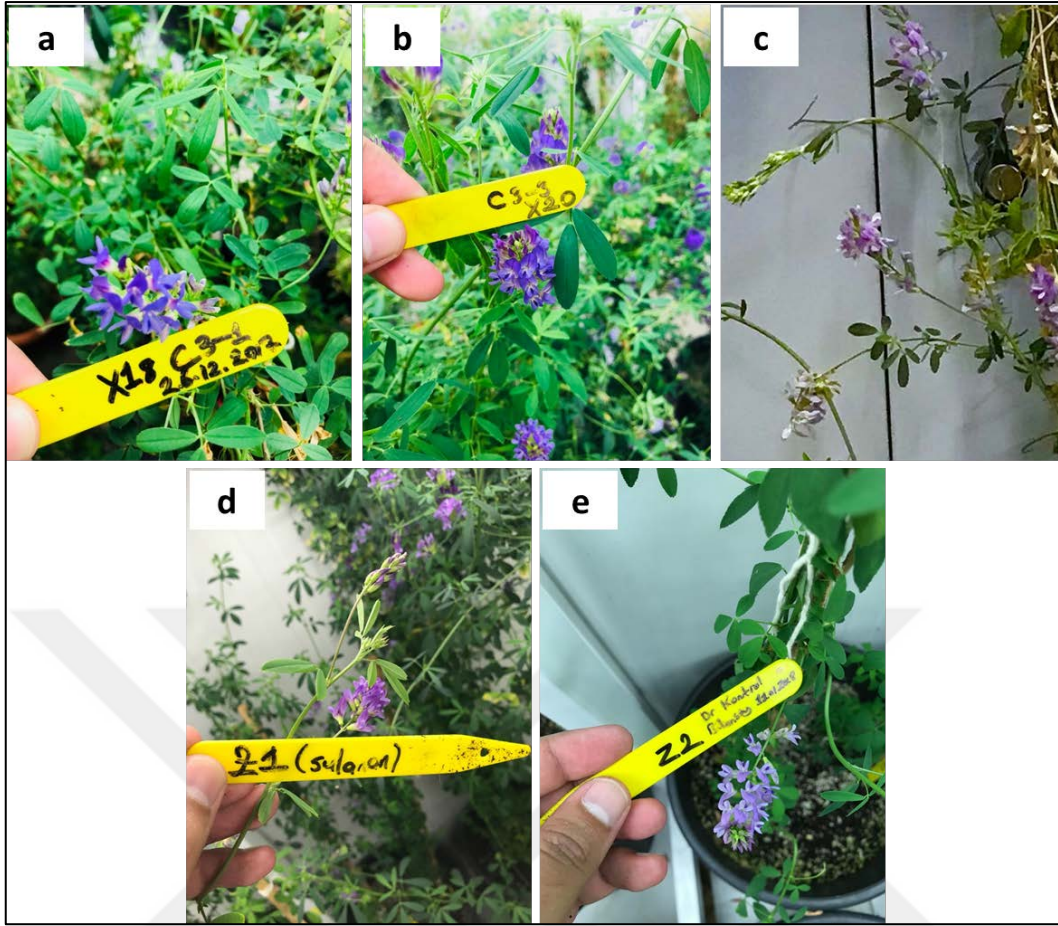
Kuraklık stresi altında çiçeklenen bitkilerin çiçek renkleri 1-4 skalası,

(1: Açık pembe, 2: Pembe, 3: Açık mor, 4: Mor) kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 16).

Çiçek Salkım Durumu (1-3)

Kuraklık stresi altında bitkilerin çiçek salkım durumları 1-3 skalası,

(1: Tek çiçek, 2: Seyrek salkım, 3: Sık salkım) kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. Bitkilerin çiçek rengi ve çiçek salkım durumlarının belirlenmesine ilişkin görseller a. X18, b. X20, c. X50, d. Z1, e. Z2

3.2.11. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu ticari RNA izolasyon kiti (Vivantis GF-1) kullanılarak firmanın sunmuş olduğu protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Total RNA izolasyonu için önceden steril edilerek -80 °C’de soğutulan porselen havan ve havaneli steril kabine yerleştirilmiştir. Ardından -80 °C’de depolanan yaklaşık 100 mg ilgili donmuş yaprak örneği (Şekil 17a) 400 µl TR buffer + 5 µl 2-mercaptoethanol karışımı eklenerek homojenize edilmiştir (Şekil 17b). Öğütülen homojenizatlar 2m santrifüj tüplerine alınarak vorteks yardımıyla güçlü bir şekilde çalkalanmıştır. İyice çalkalanan örnekler oda sıcaklığında (20 - 25 °C) 3 dakika boyunca maksimum hızda (13000 RPM) santrifüj edilmiştir.

Supernatant, kit tarafından sağlanan homojenizasyon kolonuna (#1) aktarılarak oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası homojenizasyon kolonunun alt kısmındaki toplama tüpüne biriken supernatant (sıvı kısım) kullanılmak üzere tutulmuştur. Supernatantın içerisine 350 µl %80’lik etanol (EtOH) ilave edilmiştir ve

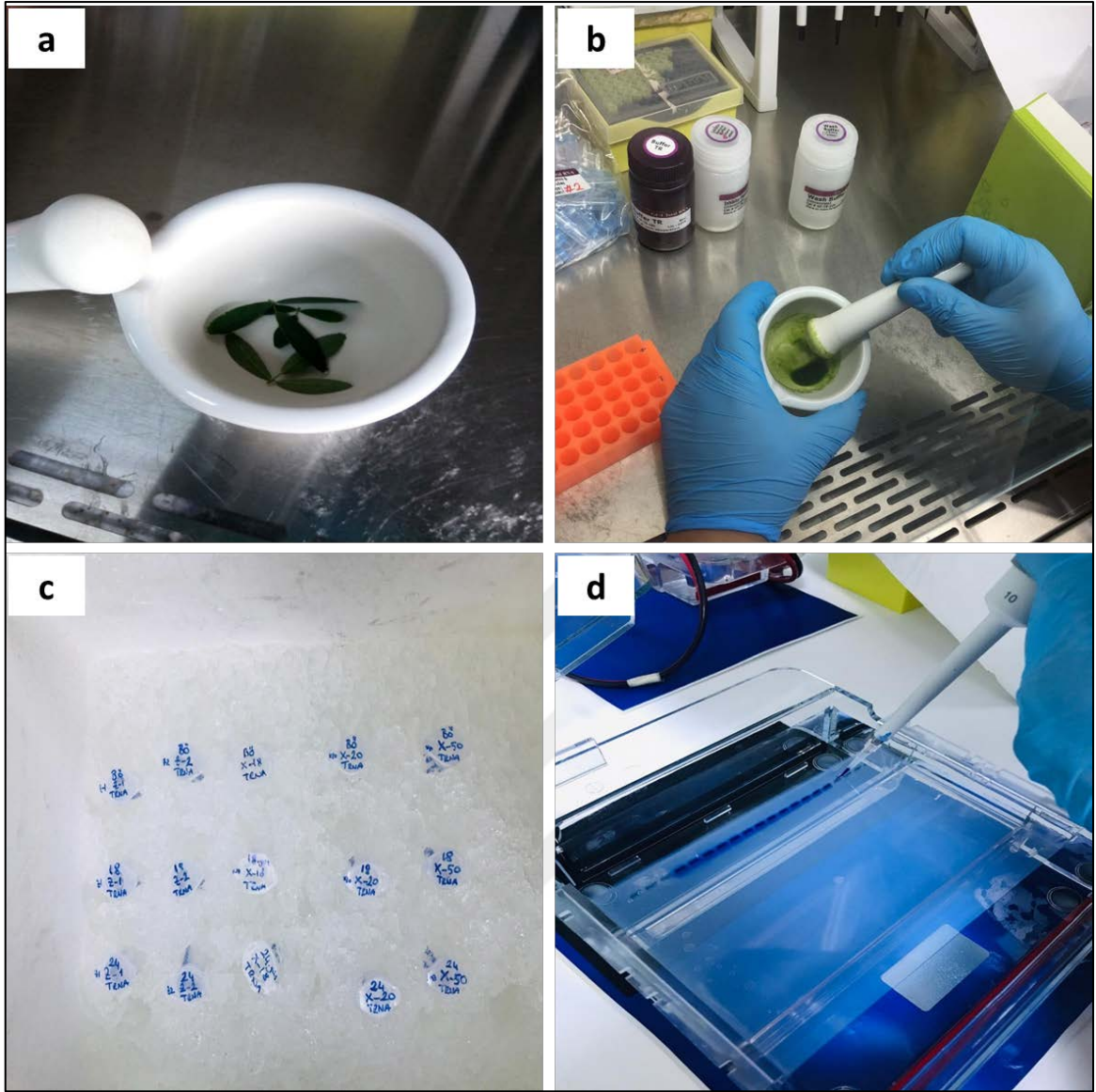
elde edilen karışım bir mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır.

Karıştırma işleminden sonra numune maksimum 650 µl olacak şekilde bir mikropipet yardımıyla RNA bağlama kolonuna boşaltılarak alt kısımdaki toplama tüpünde birikmesi sağlanmıştır ve ardından 9500 RPM’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Arta kalan supernatantın içerisine 350 µl %80’lik etanol ilave edilmiş ve elde edilen karışım bir mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır.

Karıştırma işleminden sonra numune maksimum 650 µl olacak şekilde RNA bağlama kolonuna boşaltılarak alt kısımdaki toplama tüpünde birikmesi sağlanmıştır ve ardından 9500 RPM’de 1 dakika santrifüj edilerek bu işlem kalan supernatantın işlenmesi için bir kez daha tekrar edilmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra 30 ml saf etanol eklenerek hazır hale getirilen inhibitor removal bufferdan 500 µl ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 13000 RPM santrifüj edilmiştir. Ardından toplama tüpünde biriken sıvı kısım atılmıştır.

İzole edilen total RNA’lardan DNA’yı uzaklaştırmak amacıyla DNase I digestion (parçalama) buffer hazırlanmıştır. Bir örneğe ait RNA’ları ayrıştırmak için 7 µl DNase I enzimi, 56 µl digestion buffer ve 7 µl enhancer (güçlendirici) buffer gerekmektedir ve bir örnek için total hacim 70 µl olacak şekilde DNase I digestion karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım olası RNA bozulmalarını engellemek için buz üzerine yerleştirilerek (Şekil 17c) kullanılmıştır ve bir mikropipet yardımıyla 70 µl DNase I Digestion enzimi, RNA bağlama kolonunun merkezine bırakılarak yaklaşık 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından RNA bağlama kolonuna 500 µl wash (yıkama) buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika 9500 RPM’de santrifüj yapılarak tüpün alt kısmında biriken sıvı atılmıştır. Bu işlem bir kere daha tekrar edilmiştir. RNA bağlama kolonundaki buffer kalıntılarını tamamen uzaklaştırmak için oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 9500 RPM’de ek bir santrifüj yapılmıştır. Bu işlemin ardından RNA bağlama kolonlarının üst kısmı yeni bir 2 ml hacmindeki santrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra filtrenin merkezine 40-60 µl RNase içermeyen (RNase Free) su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir ve 9500 RPM’de santrifüj edilmiştir.

İzole edilen total RNA’lar %2’lik agaroz jele yüklenerek 80 voltluk bir gerilim altında 30-40 dakika elektroforez yapılarak koşturulmuştur (Şekil 17d). Ardından total RNA’lar cDNA sentezi yapılana kadar -20 °C’de depolanmıştır.



Şekil 17. Total RNA izolasyon aşamasına ilişkin görseller a-b. Yaprak örneklerinin steril ortamda porselen havan içerisinde homojenizasyonu, c. İzole edilen total RNA örnekleri, d. Total RNA'ların %2'lik agaroz jele yüklenmesi ve elektroforez yapılarak koşturulması

3.2.12. Total RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Yaprak dokularından izole edilen total RNA'ların miktar ve saflık tayini Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-VIS (ultraviyole-görünür bölge ışık) Spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Cihazda ölçüm yapılmadan önce yükleme haznesi 2 µl dH₂O ile temizlenerek kurulanmıştır. Ardından örnek başına 2 µl yükleme yapılarak A₂₆₀/A₂₈₀ ve A₂₆₀/A₂₃₀ nm UV absorbans değerlerinde total RNA saflık ve kalitesinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için spektral ölçümler yapılmıştır. A₂₆₀/A₂₈₀ nm absorbans değerinin 1,8 - 2,2 değerlerinde olması RNA'nın yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.

A_{260}/A_{230} nm dalga boyundaki absorbans değeriindeki saf nükleik asit değerleri A_{260}/A_{280} nm absorbans değerinden yüksektir ve RNA için beklenen değer 2,0 - 2,2 arasında değişiklik göstermektedir (Tablo 2).

Tablo 2

İzole edilen total RNA'nın spektral olarak konsantrasyon ve saflıklarının tayini

Örnekler	Yükleme Hacmi (1000ng)	A260/A280	A260/A230	Konsantrasyon (ng/μl)
B.Ö. Z1	2,51	2,2	2,4	398
B.Ö. Z2	0,59	2,2	2,5	1681
B.Ö. X18	0,41	2,2	2,3	2437
B.Ö. X20	0,56	2,2	2,2	1784
B.Ö. X50	0,57	2,2	2,5	1748
18. Gün Z1	0,58	2,2	2,3	1736
18. Gün Z2	0,69	2,2	1,8	1455
18. Gün X18	0,43	2,2	2,4	2343
18. Gün X20	0,56	2,2	2,4	1773
18. Gün X50	0,39	2,2	2,4	2540
24. Gün Z1	0,59	2,2	1,8	1703
24. Gün Z2	0,73	2,2	2,4	1373
24. Gün X18	0,42	2,2	2,4	2386
24. Gün X20	2,08	2,2	2,4	480
24. Gün X50	0,77	2,2	2,4	1292

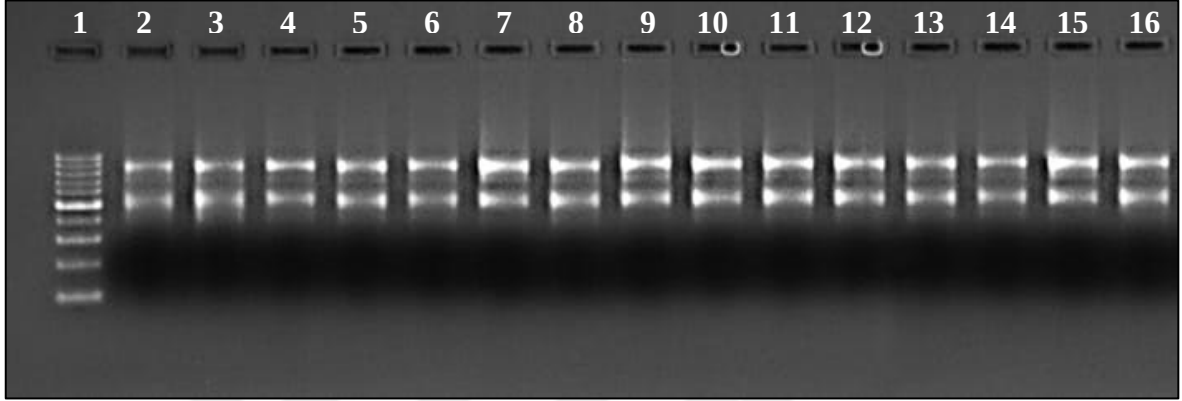
(B.Ö: Biçim öncesi, Z: Kontrol bitkileri, X: Aday mutant yonca genotipleri)

3.2.13. Total RNA Agaroz Jel Elektroforezi

Total RNA'ları koşturmada kullanılan agaroz jeli %2'lik hazırlamak için hassas terazide 2 gram agaroz tartılmış ve 100 ml 1X DEPC Water eklenerek hafif bir şekilde çalkalanmıştır. Hazırlanan çözelti mikrodalga fırına yerleştirilerek yaklaşık 2 - 2,5 dakika boyunca kısa aralıklarla çıkarılıp çalkalanmak suretiyle agaroz çözeltisinin tamamen homojen olması sağlanmıştır.

Homojenize olan agaroz çözeltisine stoktan (10mg/ml konsantrasyon) alınan 1 μl Etidyum Bromür (EtBr) eklenerek tamamen karışana kadar hafifçe çalkalanmıştır. Jelin döküleceği kuvvet dengeye getirildikten sonra taraklar yerleştirilmiştir ve döküm için uygun sıcaklığa gelen agaroz çözeltisi yavaş bir şekilde küvete dökülmüştür. Oluşan baloncuklar pipet ucu yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra jelin 20-30 dakika polimerize olması beklenmiştir.

Elektroforez tankına 1X DEPC Water koyulduktan sonra jel küvet ile birlikte tankın içine yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa 2 µl 100 bp DNA Ladder yüklendikten sonra diğer kuyucuklara her bir örnek için 1 µl total RNA + 5 µl Bromofenol blue yükleme boyasından oluşan karışım yüklenmiştir. Jele yüklenen örnekler 80 voltluk bir gerilim altında 25-30 dakika boyunca koşturulmuştur ve ardından UV transilluminatörde görselleştirilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Total RNA örneklerinin elektroforetik jel görüntüsü 1: DNA ladder (2 µl), 2: Z1 biçim öncesi, 3: Z1 kuraklık stresinin 18. günü, 4: Z1 kuraklık stresinin 24. günü, 5: Z2 biçim öncesi, 6: Z2 kuraklık stresinin 18. günü, 7: Z2 kuraklık stresinin 24. günü, 8: X18 biçim öncesi, 9: X18 kuraklık stresinin 18. günü, 10: X18 kuraklık stresinin 24. günü, 11: X20 biçim öncesi, 12: X20 kuraklık stresinin 18. günü, 13: X20 kuraklık stresinin 24. günü, 14: X50 biçim öncesi, 15: X50 kuraklık stresinin 18. günü, 16: X50 kuraklık stresinin 24. günü, Z1: Sulu kontrol, Z2: Susuz kontrol

3.2.14. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Reverse (ters) transkriptaz enziminin mRNA ile reaksiyonu sonucunda mRNA üzerindeki bazlara eşlenik olacak şekilde DNA molekülü sentezlendiğinde cDNA sentezi gerçekleşmiş olur. Sentetik oligonükleotitler mRNA'nın 3' ucundaki poli A kuyruğuna bağlanarak ters transkriptaz enziminin aktivitesi sonucunda tek iplikli cDNA molekülü oluşmaktadır. PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan Taq DNA Polimeraz enzimi, tek iplikli cDNA molekülünü çift iplikli yapıya (Şekil 19) dönüştürür (Tobin ve Dusheck, 2001).

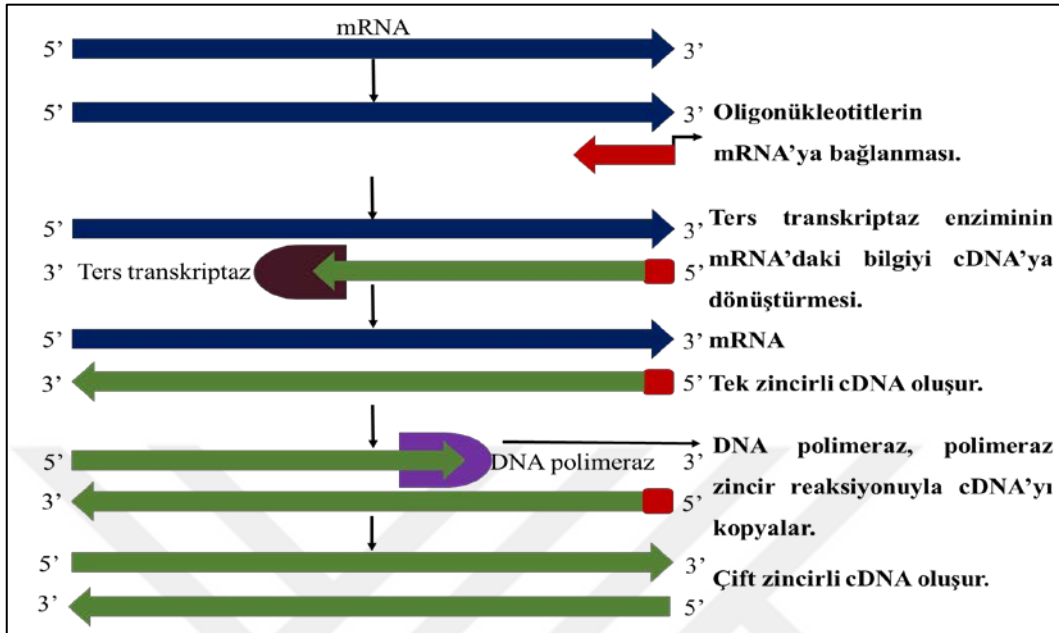
Tablo 3
cDNA sentez aşamaları ve reaksiyon için gerekli bileşenler

Bileşen	Miktar (Her bir örnek için)
Total RNA	1 µl
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µl
Steril H ₂ O (nuclease free)	10 µl
65 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübasyon	
5X Reaksiyon Buffer	4 µl
RiboLock Rnase İnhibitör (20U/µl)	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
ReverAid M-MuLV (200U/µl)	1 µl
Total hacim	20 µl
42 °C sıcaklıkta 60 dakika inkübasyon	
70 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübasyon	

Komplementer DNA sentez protokolüne göre ilk adımda total hacim 12 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen tüpün içerisine 1 µl (~1000 ng) total RNA, 1 µl oligo (dT)₁₈ primeri ve 10 µl nükleaz içermeyen steril saf su eklenmiştir. Elde edilen karışım, GC bakımından zengin RNA örneklerinin ve RNA'nın sekonder yapısını denatüre etmek için 5 dakika boyunca 65 °C sıcaklıktaki su banyosunda inkübe edilmiştir. Karışımı tüpün dibinde biriktirmek için çok kısa (2 sn) santrifüj yapılmıştır ve akabinde buzun üzerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan karışıma sırayla 4 µl 5X Reaksiyon Buffer, 1 µl mRNA hariç diğer RNA moleküllerini inhibe etmeye yarayan Rnase inhibitör (20U/µl), 2 µl 10 mM dNTP ve 1 µl ReverAid M-MuLV (Moloney-Murin Lösemi Virüsü) reverse transkriptaz enzimi (200U/µl) eklenerek total hacim 20 µl olarak ayarlanmıştır (Tablo 3).

Tüm karışım vortekste çok kısa bir süre (2 sn) çalkalandıktan sonra çok kısa bir santrifüjleme işlemi (2 sn) yapılmıştır. Ardından reverse transkriptaz enziminin çalışması için optimum sıcaklık olan 42 °C'de 60 dakika su banyosunda inkübe edilerek uzama gerçekleştirilmiştir. Hemen sonrasında reverse transkriptaz enziminin aktivitesini durdurmak için 70 °C sıcaklığa ayarlanmış olan ısı bloğunda 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Tablo 3). Sentezlenen cDNA molekülleri 1/20 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Komplementer DNA örnekleri gradient PCR ve gerçek zamanlı kantitatif PCR analizleri yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Komplementer DNA sentezi Şekil 19’da gösterilen reaksiyon adımlarına göre sentez edilmektedir.



Şekil 19. mRNA’dan cDNA sentezlenmesine ait adımları temsil eden bir görsel (Tobin ve Dusheck, 2001)’den modifiye edilmiştir

3.2.15. Referans ve Hedef Genlere Ait PCR Testleri

Kurağa tolerant aday mutant yonca genotipleri ve kontrol bitkileri olmak üzere toplamda 5 bitkiden birinci biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü alınan yaprak örneklerine ait cDNA’lar *Ms18S rRNA* referans geninin ileri ve geri primeri (Tablo 7) kullanılarak Tablo 4’deki PCR protokolüne göre test edilmiştir.

Tablo 4

Ms18S rRNA ileri ve geri primerleriyle cDNA örneklerinin test edilmesinde kullanılan PCR protokolü

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
PCR-Grade H ₂ O	22 µl
5X Reaksiyon tamponu	10 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	1 µl
<i>Ms18S rRNA</i> ileri primer	1 µl
<i>Ms18S rRNA</i> geri primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
cDNA örneği	1 µl
Total hacim 39,125 µl olarak ayarlandı.	

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli olan reaksiyon bileşenleri ve hacimleri Tablo 4’de verilmiştir. Çalışmada kullanılan hedef genlerin PCR testleri, ilgili genlere ait (*MsProDH* ve *MtRD2*) ileri ve geri primer çiftleri (Tablo 7) kullanılarak aynı protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Tablo 4).

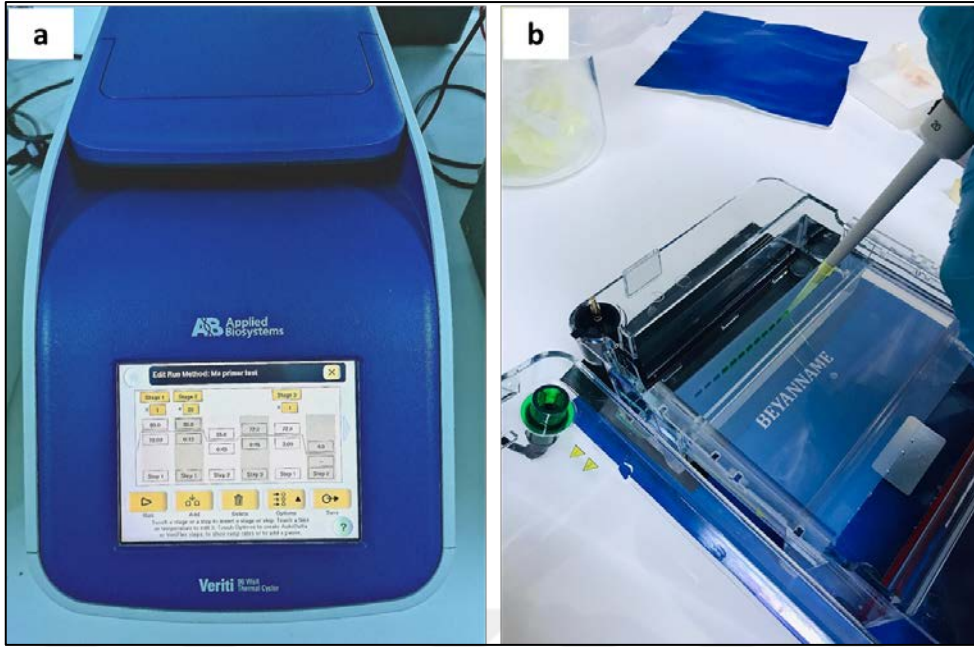
Tablo 5
Termal cycler cihazına ait PCR koşulları

Basamaklar	Uygulanan Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon aşaması	95 °C	10 dk	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	15 sn	35 döngü
Bağlanma (Annealing)	55 °C	45 sn	
Uzama (Extention)	72 °C	45 sn	
Son uzama	72 °C	3 dk	1 döngü

Reaksiyon koşullarında ilk olarak bir döngülük 95 °C 10 dakika ön denatürasyon aşamasıyla cDNA’ların çift sarmal yapısının ayrılması sağlanmıştır. Ardından 95 °C 15 saniye denatürasyon, kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklığı (Ta) olan 55 °C’de 45 saniye bağlanma ve 72 °C’de 45 saniye uzama basamakları olmak üzere toplam 35 döngü uygulanmıştır. En nihayetinde 72 °C’de 3 dakika boyunca son bir uzama basamağı gerçekleştirilerek reaksiyon tamamlanmıştır (Tablo 5).

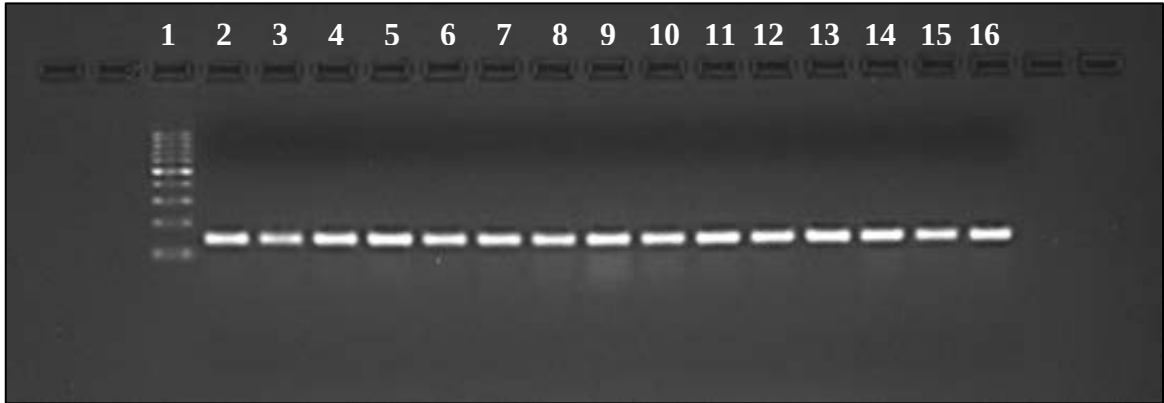
PCR reaksiyonu için Applied Biosystems® Veriti® 96 Well termal cycler cihazı kullanılmıştır (Şekil 20a).

PCR ürünleri, 100 ml TBE buffer kullanılarak hazırlanan %2’lik agaroz jelde 80 voltluk bir gerilim altında yaklaşık 30-40 dakika boyunca koşturulmuştur (Şekil 20b).



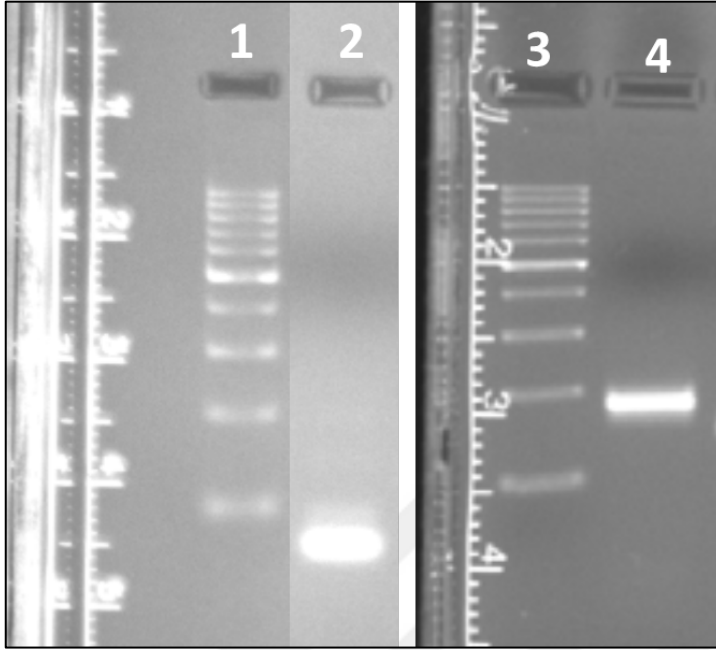
Şekil 20. Bitkilere ait cDNA örneklerinin *Ms18S rRNA*, *MsProDH* ve *MtRD2* genlerine ait ileri ve geri primer dizileri kullanılarak PCR testi a. Çalışmada kullanılan Termal Cycler cihazına ilişkin bir görsel, b. PCR ürünü cDNA'ların %2'lik agaroz jele yüklenmesi ve elektroforez yapılması

Ardından UV transilluminator Bio-Print ST4 (Vilber Lourmat, France) cihazı ile jel görselleştirilerek cDNA'ların varlıkları belirlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. *Ms18S rRNA* ileri ve geri primerler kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen cDNA örneklerine ait %2'lik elektroforetik jel görüntüsü 1: DNA ladder (2 µl), 2: Z1 biçim öncesi, 3: Z1 kuraklık stresinin 18. günü, 4: Z1 kuraklık stresinin 24. günü, 5: Z2 biçim öncesi, 6: Z2 kuraklık stresinin 18. günü, 7: Z2 kuraklık stresinin 24. günü, 8: X18 biçim öncesi, 9: X18 kuraklık stresinin 18. günü, 10: X18 kuraklık stresinin 24. günü, 11: X20 biçim öncesi, 12: X20 kuraklık stresinin 18. günü, 13: X20 kuraklık stresinin 24. günü, 14: X50 biçim öncesi, 15: X50 kuraklık stresinin 18. günü, 16: X50 kuraklık stresinin 24. günü, Z1: Sulu kontrol, Z2: Susuz kontrol

Hedef genlere ilişkin (*MsProDH* ve *MtRD2*) PCR testlerinin %2'lik agaroz jeldeki elektroforetik jel görüntüleri Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22. Tüm örneklerle ait mix cDNA'ların hedef genlerle PCR'da test edilmesi sonucu ortaya çıkan elektroforetik jel görüntüsü 1: DNA ladder (2 µl), 2: *MtRD2* geni, 3: DNA ladder (2 µl), 4: *MsProDH* geni

3.2.16. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Kantitatif PCR İle Gen İfade Analizleri

Genlerin ifade seviyelerini belirlemede kullanılan RT-qPCR analizlerini gerçekleştirmek için Ampliqon RealQ Plus SYBR Green/ROX Master Mix kiti kullanılmıştır. Reaksiyon protokolü üretici firmanın tarif ettiği şekilde Tablo 6'da gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6

RT-qPCR analizleri için gerekli olan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

RT-qPCR Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (Her bir örnek için)
RealQ Plus 2X Master Mix	5 µl
PCR-Grade H ₂ O	4 µl
cDNA (1/20 Seyreltilmiş)	1 µl
İleri Primer	0,5 µl
Geri Primer	0,5 µl
Total Hacim 11 µl olarak ayarlandı.	

Her bir cDNA örneğinin RT-qPCR analizlerini gerçekleştirmek için 5 µl SYBR Green Master Mix'e 4 µl PCR suyu eklenerek kısa süreli vorteks ve santrifüj yapılmıştır. Ardından 1 µl 1/20 oranında ddH₂O seyreltilmiş olan ilgili cDNA örneği, ifade seviyesi araştırılan gene ait 0,5 µl ileri ve 0,5 µl primer dizileri (Tablo 7) ilave edilerek kısa süreli vorteks ve santrifüj yapılmıştır (Tablo 6). Raksiyonun tüm aşamaları, gen ifadelerinde değişimlerin yaşanmaması için buzun üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7

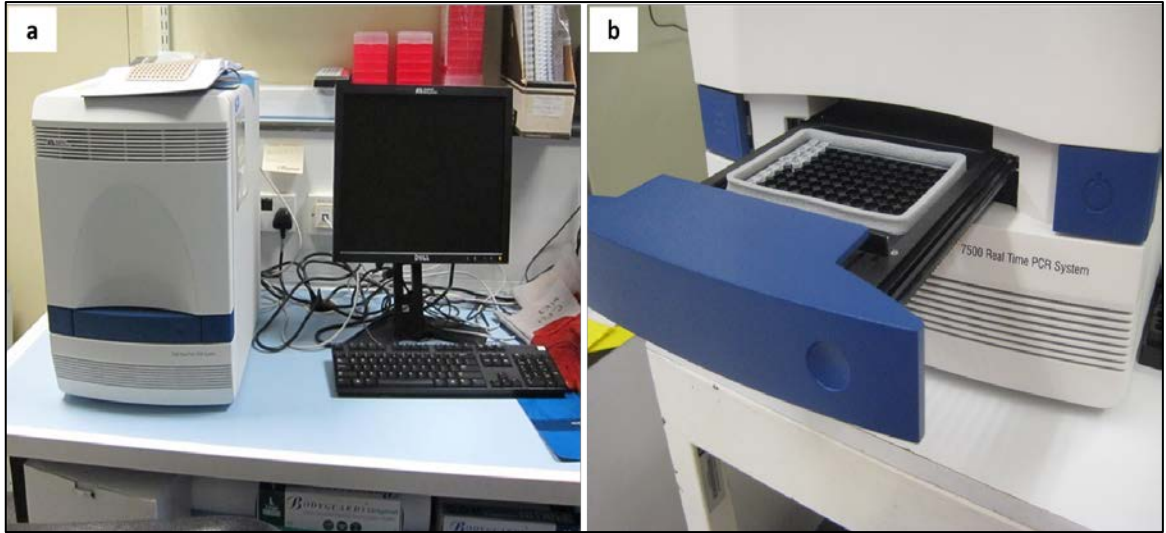
İfade seviyeleri araştırılan hedef ve referans genlere ait ileri/geri primer dizileri ve Ta (°C) bilgileri

Gen Adı	5'-3' İleri (F) ve Geri (R) Primerler	Ta (°C)
<i>MsProDH</i>	F: GGCTGCTGCAAAAGCAGG R: GCCCTTCTCAAGAGGTATGG	55
<i>MtRD2</i>	F: GCAGCTGTGGTTCTGGGGACC R: AGCAATACTCACCGACGCTTCCT	55
<i>Ms18S rRNA</i>	F: GGGCTCGAAGACGATCAG R: AGCCTTGCGACCATACTCC	55

Tablo 7'de *Medicago sativa* Proline Dehydrogenase (*MsProDH*), *Medicago truncatula* Responsive to Drought 2 (Quan ve diğerleri, 2016) ve *Medicago sativa* 18S ribosomal RNA (Chang ve diğerleri, 2012) genlerine ait ileri/geri primer dizileri ve primer bağlanma sıcaklıkları (Ta °C) görülmektedir.

Yapılan çalışmada aday mutant yonca genotiplerine (X18, X20 ve X50) ve kontrol bitkilerine (Z1: sulu kontrol ve Z2: susuz kontrol) ait örneklerin spesifik gen ifade analizleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'nda bulunan Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 23a-23b).

Çalışmada kullanılan kontrol ve aday mutant yonca genotiplerinin biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. günü ve 24. gününe ait cDNA örneklerinin RT-qPCR analizi 3 teknik tekrar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için hazırlanan karışım ilgili cihaza özel olarak üretilen plakanın kuyucuklarına dikkatli bir şekilde baloncuk oluşturulmadan aktarılmıştır ve gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazına yerleştirilmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazında gerçekleştirilecek olan reaksiyonda kullanılan kuraklık spesifik primerlerin bağlanma sıcaklıklarına (Ta) ait bilgiler (Tablo 7) göz önünde bulundurulmuştur ve cihaz bu bilgilere göre programlanmıştır.



Şekil 23. Çalışmada kullanılan Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR cihazı a. Gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazına ilişkin genel bir görüntü, b. Örneklerin yüklendiği plakaların cihaza yerleştirildiği hazne

Tablo 8
Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyon koşulları

RT-qPCR Koşulları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Initial Denaturation	95	15 dk	1 Döngü
Amplification			
Denaturation	95	15 sn	35 Döngü
Bağlanma (Annealing)	55	40 sn	
Uzama (Extention)	72	40 sn	
Melting Curve	95	20 sn	1 Döngü
	67	60 sn	
	97	0 sn	

Gerçek zamanlı kantitatif PCR koşullarında ilk olarak bir döngü 95 °C 15 dakika başlangıç denatürasyonu uygulanmıştır. Reaksiyonun amplifikasyon yani ürünlerin çoğalma aşamasında 95 °C’de 15 saniye denatürasyon, 55 °C’de 40 saniye bağlanma ve 72 °C’de 40 saniye uzama basamakları olmak üzere toplam 35 döngü uygulanmıştır. Melting curve aşaması toplamda bir döngü olacak şekilde 95 °C’de 20 sn, 67 °C’de 60 sn ve 97 °C’de 0 sn olarak ayarlanmıştır. Kullanılan primerlerin erime eğrilerinin olduğu melting curve aşamasının tamamlanmasıyla reaksiyon sonlandırılmıştır (Tablo 8).

Kuraklık stresi uygulanan aday mutant genotiplerin ve kontrol bitkilerinin analiz edilen her bir gen için biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. gününe ait pik profilleri RT-qPCR cihazı ile tespit edilmiştir. Elde edilen piklerden faydalanılarak floresan ışımanın logaritmik olarak artmaya başladığı nokta olan Ct değerleri belirlenmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR ön denemeleri neticesinde analizlerde daha kararlı ve teknik tekrarlar arasında daha az varyasyon gösterdiği tespit edilen *Ms18S rRNA* geni RT-qPCR amplifikasyonlarında referans (housekeeping) gen olarak seçilmiştir ve bu genin ifade seviyesi temel alınarak ilgili kuraklık spesifik genlerin (*MsProDH* ve *MtRD2*) kuraklık stresi altındaki relatif ifade seviyeleri belirlenmiştir.

3.2.17. Verilerin Analizi

Bazı agro-morfolojik özellikler, bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarı verileri SAS paket programında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yapılmıştır ve ortalamalar en küçük asgari fark (LSD) %5 önemlilik seviyesinde ($p < 0,05$) test edilmiştir.

Referans olarak kullanılan gen ile kuraklıktan sorumlu lokus spesifik genlerin Ct değerlerini çıkarınca ΔCT değeri elde edilirken, strese maruz bırakılan bitkiler ile kontrol bitkilerinin Ct değerlerini çıkarınca $\Delta\Delta CT$ değeri elde edilmektedir. Her bir örneğin Ct değerinde meydana gelen standart sapmalar Microsoft Office Excel programıyla hesaplanmıştır. ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ hesaplamada kullanılan formüller aşağıdaki gibidir;

$$\Delta CT = CT_{\text{ÖRNEK}} - CT_{\text{REFERANS}},$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{STRES}} - \Delta CT_{\text{KONTROL}} \text{ (Livak ve Schmittgen, 2001).}$$

Çalışma sonucunda ilgili genlerin relatif ifade seviyeleri arasındaki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Tomurcuklanma Gün Sayıları

Bitkilerin viyollerden saksılara transfer edilme tarihleri, saksılarda yetiştirilen bitkilerin ilk tomurcuk oluşturdıkları tarihler ve saksıya transfer edilmesinden itibaren çiçek tomurcuğu oluşumuna kadar geçen gün sayıları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9

Aday mutant yonca (M_3) genotipleri ile kontrol bitkilerinin saksıya transferinden itibaren çiçek tomurcuğu oluşturma tarihleri ve gün sayıları

Genotip	Saksıya Transfer Tarihi	İlk Tomurcuklanma Tarihi	Saksıya Transfer ve Tomurcuklanma Arası Geçen Süre
X18	26.12.2017	05.02.2018	41 Gün
X20	26.12.2017	31.01.2018	36 Gün
X50	12.01.2018	27.02.2018	46 Gün
Z1	12.01.2018	24.03.2018	71 Gün
Z2	12.01.2018	20.03.2018	67 Gün

Tablo 9’da görüldüğü üzere aday mutant yonca genotiplerinin kontrol bitkilerine göre daha erken sürede tomurcuklanma dönemine geldiği belirlenmiştir. Tomurcuklanma dönemine en kısa sürede gelen bitki 36 gün ile X20 genotipi olurken en uzun sürede gelen bitki ise 71 gün ile Z1 sulu kontrol bitkisi olmuştur.

4.2. Biçim Öncesi Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler

İklimlendirme odasında kontrollü şartlarda yetiştirilen aday mutant yonca genotipleri genel olarak tomurcuklanma dönemine geldiklerinde önemli olan bazı agro-morfolojik özellikleri incelenmiştir. İncelenen agro-morfolojik özellikler ve elde edilen bulgular Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10

Aday mutant yonca (M₃) genotipleri ile kontrol bitkilerinin biçim öncesine ilişkin belirlenen bazı agro-morfolojik özellikleri

Genotip	BÖ Ana Dal Sayısı (adet/bitki)	BÖ Bitki Boyu (cm)	BÖ Ana Gövde Kalınlığı (mm)	BÖ Yan Dal Sayısı (adet/bitki)	BÖ Yaprak Rengi (1-3)	BÖ Yaprakcıkta Dişlilik (1-3)	BÖ Kulakcık Şekli (1-4)	BÖ Gövdede Antosiyanin (0-1)	BÖ Yaprakta Tüylülük (0-1)	BÖ Gövdede Tüylülük (0-1)	BÖ Yaprak Boyu Ortalaması (cm)	BÖ Orta Yaprakçık Boyu Ortalaması (mm)	BÖ Orta Yaprakçık Eni Ortalaması (mm)
X18	2	148	3,9	16	2	2	1	1	0	0	5,35 b	31,5 a	9,75 b
X20	8	125	3,6	14	2	3	2	0	0	0	6,75 a	30,7 a	13,5 ab
X50	2	142	4,0	15	3	2	2	0	1	1	5,27 b	32,2 a	12,5 ab
Z1	6	125	2,5	19	3	2	2	0	0	0	3,85 c	24,2 b	14,7 a
Z2	2	127	2,2	16	3	2	2	0	0	0	4,92 bc	27,0 ab	15,0 a
LSD _{0.05}											1,31	6,65	4,05
											n=4	n=4	n=4

4.2.1. Ana Dal Sayısı (adet/bitki)

Bitkilerin biçim öncesi ana dal sayıları incelendiğinde en çok ana dal oluşturan bitki 8 adet ile X20 genotipi olduğu görülmektedir. Ana dal oluşumu en az olan bitkiler ise X18, X50 mutant yonca genotipleri ile Z2 susuz kontrol bitkisi olmuştur ve her birinin 2 adet ana dal oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).

4.2.2. Bitki Boyu (cm)

Bitki boyu bakımından bitkiler incelendiğinde en uzun boylanma gösteren bitki 148 cm ile X18 genotipi olurken en kısa boylanma gösteren bitkiler ise 125 cm ile X20 gnotipi ve Z1 sulu kontrol bitkisinin olduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).

4.2.3. Ana Gövde Kalınlığı (mm)

Ana gövde kalınlığı bakımından bitkiler incelendiğinde en kalın gövdeye sahip olan bitki 4,0 mm ile X50 genotipi olurken en ince gövdeye sahip bitki 2,2 mm ile Z2 susuz

kontrol bitkisi olduğu tespit edilmiştir. Tablo genel olarak incelendiğinde aday mutant genotiplerin kontrol bitkilerine göre daha kalın bir ana gövde yapısı sergilediği görölmektedir (Tablo 10).

4.2.4. Yan Dal Sayısı (adet/bitki)

Bitkilere ait en gelişmiş ana dal üzerindeki yan dal sayısı bakımından bitkiler incelendiğinde en çok yan dal oluşturan bitki 19 adet ile Z1 sulu kontrol bitkisi olurken en az yan dal oluşturan bitki 14 adet ile X20 genotipi olduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).

4.2.5. Çiçek Salkı Durumu (1-3)

Bitkiler biçim öncesi tomurcuklanma dönemine yakın zaman aralıklarında geldiği ve tomurcuklanma döneminde bitkiler biçildiği için çiçek oluşturmamıştır. Dolayısıyla bu özellik incelenememiştir.

4.2.6. Çiçek Rengi (1-5)

Bitkiler biçim öncesi tomurcuklanma dönemine yakın zaman aralıklarında geldiği ve tomurcuklanma döneminde bitkiler biçildiği için çiçek oluşturmamıştır. Dolayısıyla bu özellik incelenememiştir.

4.2.7. Yaprak Rengi (1-3)

Bitkilerin yaprak renkleri incelendiğinde X18 ve X20 genotipleri yeşil (2) yaprak rengi özelliği sergilerken X50 genotipi ile Z1 ve Z2 kontrol bitkilerinin koyu yeşil (3) yaprak rengi sergilediği belirlenmiştir (Tablo 10).

4.2.8. Yaprakta Dişlilik Durumu (1-3)

Her bir bitkinin yaprakçıkları genel olarak incelendiğinde X20 genotipinin yaprakçıklarındaki dişlilik durumu çok belirgin (3) olarak tespit edilirken X18, X50, Z1 ve Z2’de belirgin (2) olarak belirlenmiştir (Tablo 10).

4.2.9. Kulakçık Şekli (1-4)

Bitkilerin kulakçık şekilleri incelendiğinde X18 genotipinin kulakçık şekli mızrakvari belirgin büyük (1) olarak belirlenirken X20, X50, Z1 ve Z2 bitkilerinde ise kulakçık şekli mızrakvari belirgin küçük (2) olarak belirlenmiştir (Tablo 10).

4.2.10. Kulakçıkta Antosiyanin (0-1)

Bitkilerin kulakçıklarında antosiyanin maddesi belirlenememiştir.

4.2.11. Koltuk Sürgününde Antosiyanin (0-1)

Bitkilerin koltuk sürgününde antosiyanin maddesi belirlenememiştir.

4.2.12. Gövdede Antosiyanin (0-1)

Bitkiler genel olarak incelendiğinde X18 genotipinin gövdesinde antosiyanin maddesi var (1) iken diğer bitkilerin gövdelerinde antosiyanin maddesi belirlenememiştir (Tablo 10).

4.2.13. Yaprakta Tüylülük (0-1)

Bitkiler genel olarak incelendiğinde X50 genotipinin yapraklarında tüylülük var (1) iken diğer bitkilerin yapraklarında tüylülük belirlenememiştir (Tablo 10).

4.2.14. Gövdede Tüylülük (0-1)

Bitkiler genel olarak incelendiğinde X50 genotipinin gövdesinde tüylülük var (1) iken diğer bitkilerin gövdelerinde tüylülük belirlenememiştir (Tablo 10).

4.2.15. Yaprak Boyu (cm)

Bitkilerin yaprak boyuna (cm) ait ortalama, minimum ve maksimum değerler Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11

Bitkilerin birinci biçim öncesi yaprak boylarına (cm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	5,35 b	4,2	6,0
X20	6,75 a	5,7	7,6
X50	5,27 b	4,8	5,7
Z1	3,85 c	3,1	5,2
Z2	4,92 bc	4,1	6,1
* 5,22			
LSD: 1,31			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 16,34			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 11 incelendiğinde tüm bitkilerin ortalama yaprak boyu uzunluğunun 5,22 cm olduğu, ortalama en uzun yaprak boyunun 6,75 cm ile X20 genotipinden, ortalama en kısa yaprak boyunun 3,85 cm ile Z1 sulu kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir. Minimum yaprak boyu uzunluğu 3,1 cm ile Z1 sulu kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum yaprak boyu uzunluğu 7,6 cm ile X20 genotipinden elde edildiği görülmektedir.

4.2.16. Orta Yaprakçık Boyu (mm)

Bitkilerin orta yaprakçık boyuna (mm) ait ortalama, minimum ve maksimum değerler Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12

Bitkilerin birinci biçim öncesi orta yaprakçık boylarına (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	31,5 a	26	34
X20	30,7 a	30	31
X50	32,2 a	26	37
Z1	24,2 ab	21	29
Z2	27,0 b	20	35
* 29,15			
LSD: 6,75			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 15,04			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 12 incelendiğinde tüm bitkilerin ortalama orta yaprakçık boyunun 29,15 mm olduğu, ortalama en uzun orta yaprakçık boyunun 32,2 mm ile X50 genotipinden, ortalama en kısa orta yaprakçık boyunun 24,2 mm ile Z1 sulu kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir. Minimum orta yaprakçık boyu 20 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum orta yaprakçık boyu 37 mm ile X50 genotipinden elde edildiği görülmektedir.

4.2.17. Orta Yaprakçık Eni (mm)

Bitkilerin orta yaprakçık enine (mm) ait ortalama, minimum ve maksimum değerler Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13

Bitkilerin birinci biçim öncesi orta yaprakçık enine (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	9,75 b	9	12
X20	13,5 ab	12	15
X50	12,5 ab	12	14
Z1	14,7 a	10	20
Z2	15,0 a	9	21
*13,10			
LSD: 4,05			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 20,11			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 13 incelendiğinde tüm bitkilerin ortalama orta yaprakçık eninin 13,10 mm olduğu, ortalama en uzun orta yaprakçık eninin 15 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden, ortalama en kısa orta yaprakçık eninin 9,75 mm ile X18 genotipinden elde edildiği görülmektedir. Minimum orta yaprakçık eni 9 mm ile X18 genotipi ve Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum orta yaprakçık eni 21 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir.

4.3. Bitkilerin Yaş ve Kuru Ot Ağırlıkları

İklim odasında sulanarak kontrollü şartlarda yetiştirilen bitkilerin yaş ve kuru ot ağırlıkları Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14

Bitkilere ait yaş ve kuru ot ağırlıkları (g/bitki)

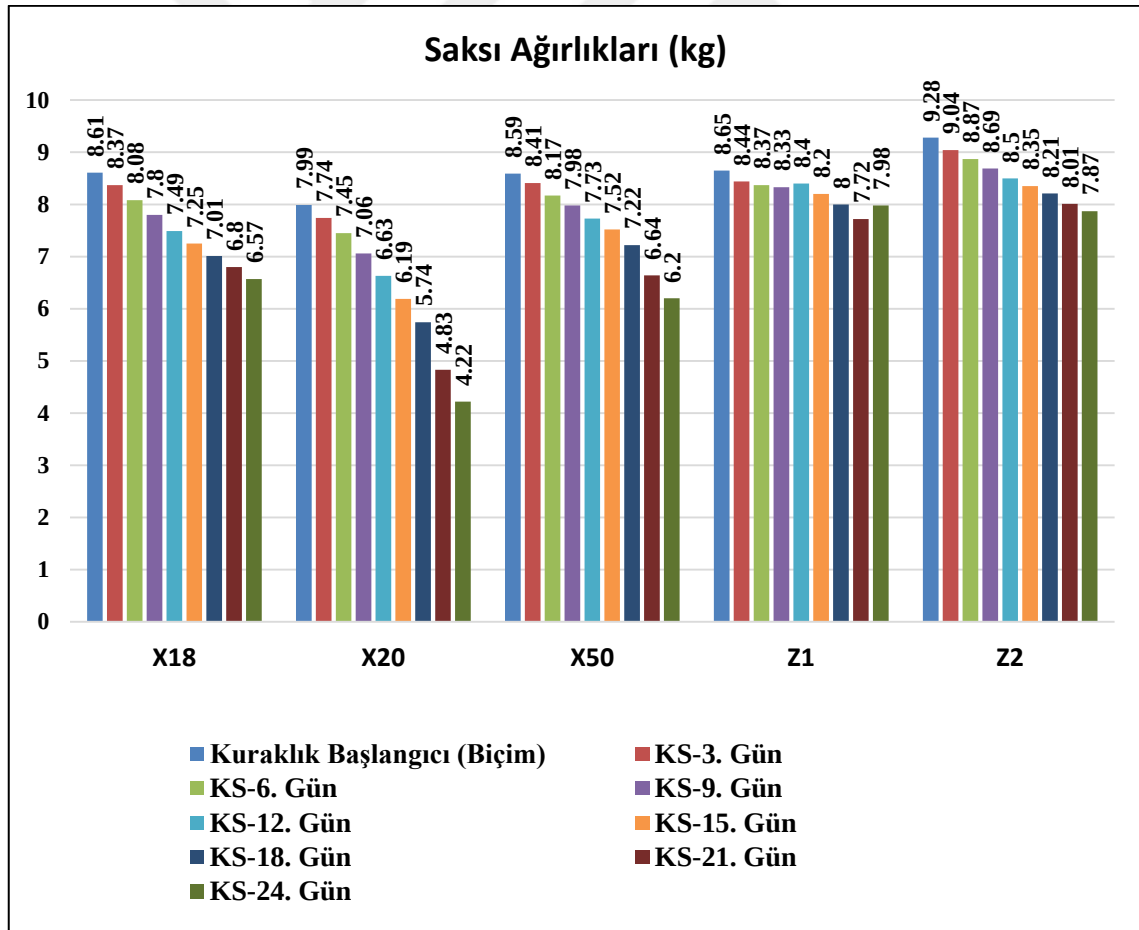
Genotip	Yaş Ot Ağırlığı (g/bitki)	Kuru Ot Ağırlığı (g/bitki)
X18	52	9
X20	65	13
X50	64	12
Z1	31	7
Z2	13	2

Tablo 14 incelendiğinde tomurcuklanma dönemine kadar sulanarak yetiştirilen bitkilerin yaş ot ağırlıkları karşılaştırıldığında aday mutant yonca genotiplerinin kontrol bitkilerine göre daha fazla yeşil ot ürettikleri görülmektedir.

Yaş ot ağırlığı bakımından en iyi performansı 65 g/bitki ile X20 ve 64 g/bitki ile X50 genotipleri sergilerken en düşük performansı 13 g/bitki ile Z2 susuz kontrol bitkisinin sergilediği belirlenmiştir. Kuru ot ağırlığı en fazla 13 g/bitki ile X20 ve 12 g/bitki ile X50 genotiplerinden elde edilirken, kuru ot ağırlığı en az 2 g/bitki ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilmiştir (Tablo 14).

4.4. Saksı Tartım Değerleri

Aday mutant yonca genotipleri ile kontrol bitkilerine birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresinin ilk gününden son gününe kadar saksı ağırlıklarında kuraklık stresinin süresine göre meydana gelen değişimler Şekil 24’de verilmiştir.



Şekil 24. Birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresi boyunca günlere göre saksı ağırlıklarında (kg) meydana gelen değişimler (KS: Kuraklık stresi)

Şekil 24 genel olarak incelendiğinde her üç günde bir yapılan tartımlara göre Z1 sulu kontrol bitkisinin bulunduğu saksı hariç tüm saksılarda suyun uzaklaşarak ağırlık azalışlarının meydana geldiği görülmektedir.

Saksılara su verme işleminin durdurulduğu ve kuraklık stresinin başlatıldığı gün yapılan tartımlarda X18, X20, X50 mutant bitkileri ile Z1 (sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinin saksı ağırlıkları sırasıyla 8,61, 7,99, 8,59, 8,65, 9,28 kg olarak tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 18. günü X18, X20, X50 ve Z2 bitkilerinin saksı ağırlıklarının sırasıyla 7,01, 5,47, 7,22 ve 8,21 kg olduğu belirlenirken kuraklık stresinin 24. günü bu değerler sırasıyla 6,57, 4,22, 6,2 ve 7,87 kg olarak belirlenmiştir. Kuraklık stresinin ilk gününden son gününe kadar yapılan tartımlar sonucunda X18’de 2,04, X20’de 3,77, X50’de 2,39 ve Z2’de 1,41 kg azalma olduğu tespit edilmiştir. Z1 sulu kontrol bitkisi düzenli olarak sulanmıştır (Şekil 24).

4.5. Bitki Kanopy Sıcaklıkları

Kuraklık stresinin farklı zamanlarında ölçülen bitki kanopy sıcaklıklarına (°C) ait ortalama, minimum ve maksimum değerler Tablo 15’te verilmiştir.

Tablo 15

Kuraklık stresinin farklı zamanlarında ölçülen bitki kanopy sıcaklıklarına (°C) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerler (n=3)

	KS 6. Gün			KS 9. Gün			KS 12. Gün			KS 15. Gün			KS 18. Gün			KS 21. Gün			KS 24. Gün		
Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum	Ortalama*	Minimum	Maksimum	Ortalama*	Minimum	Maksimum	Ortalama*	Minimum	Maksimum	Ortalama*	Minimum	Maksimum	Ortalama*	Minimum	Maksimum	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	19,53 c	19,1	20,1	21,40 a	21,2	21,7	17,33 c	17,8	18,2	21,46 a	21,4	21,6	20,00 bc	19,4	20,3	19,86 b	19,7	20,0	20,63 b	20,4	20,9
X20	19,73 bc	19,6	19,8	21,80 a	21,7	21,9	18,33 c	18,2	18,4	21,06 b	20,9	21,2	19,36 c	19,2	19,7	20,23 ab	20,2	20,3	20,60 b	20,4	21,0
X50	19,76 bc	19,5	20,1	20,06 c	19,6	20,5	19,40 b	19,1	19,6	20,73 cd	20,7	20,8	20,86 a	20,8	21,0	20,63 a	20,3	20,9	21,40 a	21,0	21,9
Z1	20,23 ab	20,0	20,4	20,80 b	20,8	20,8	20,50 a	20,2	20,8	20,80 c	20,7	20,9	20,50 ab	20,3	20,6	20,43 a	20,1	20,9	20,56 b	20,4	20,9
Z2	20,56 a	20,3	20,8	20,33 c	20,2	20,5	20,40 a	20,2	20,5	20,53 d	20,1	20,9	20,33 ab	19,9	20,9	20,56 a	20,4	20,9	20,56 b	20,1	20,9
*	19,96			20,88			19,31			20,92			20,21			20,34			20,75		
LSD	0,568			0,465			0,561			0,251			0,734			0,465			0,687		
Alpha	0,05			0,05			0,05			0,05			0,05			0,05			0,05		
V.K. (%)	1,51			1,18			1,54			0,63			1,93			1,81			1,75		
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.																					

(KS: Kuraklık stresi, V.K: Varyasyon katsayısı).

Kuraklık stresinin 6. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklık lığı nın 19,96 $^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama bitki kanopy sıcaklık ğı (BKS) 20,56 $^{\circ}\text{C}$ ile Z2 susuz kontrol bitkisinden, en düşük ortalama BKS 19,53 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edilmiştir. Minimum BKS 19,1 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edilirken, maksimum BKS 20,8 $^{\circ}\text{C}$ ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).

Kuraklık stresinin 9. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklık lığı nın 20,88 $^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama BKS 21,80 $^{\circ}\text{C}$ ile X20 genotipinden, en düşük ortalama BKS 20,06 $^{\circ}\text{C}$ ile X50 genotipinden elde edilmiştir. Minimum BKS 19,6 $^{\circ}\text{C}$ ile X50 genotipinden elde edilirken, maksimum BKS 21,9 $^{\circ}\text{C}$ ile X20 genotipinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).

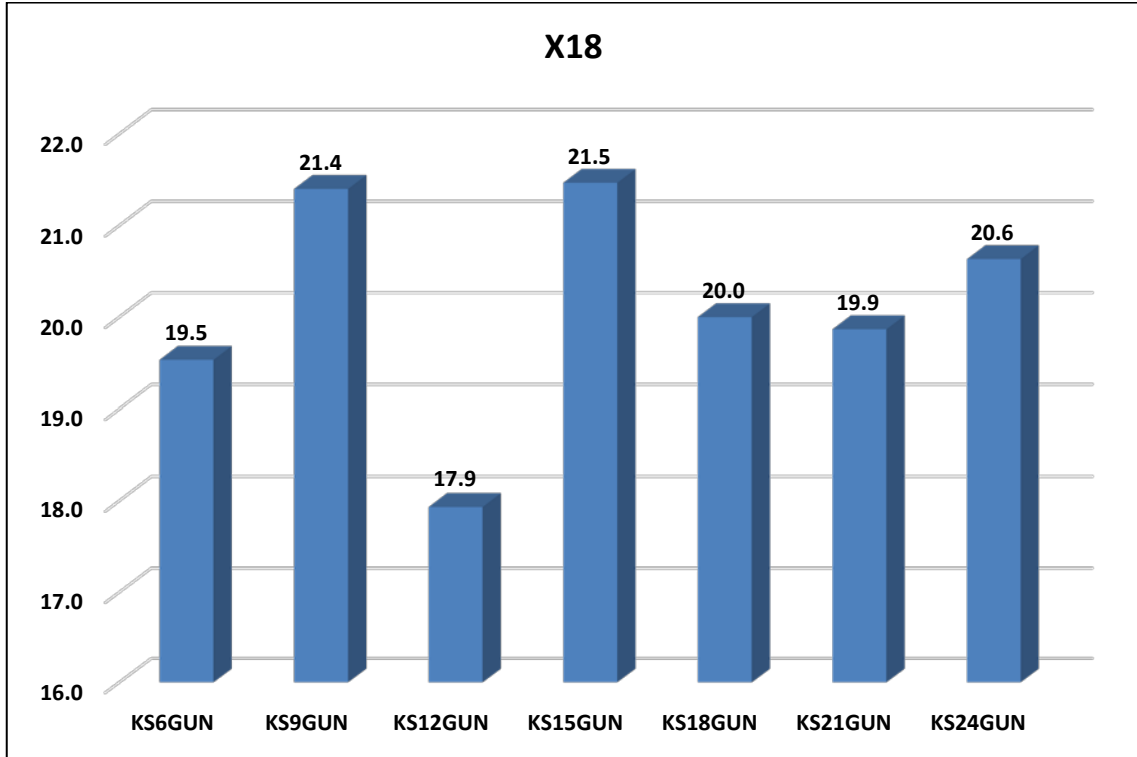
Kuraklık stresinin 12. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklık lığı nın 19,31 $^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama BKS 20,50 $^{\circ}\text{C}$ ile Z1 sulu kontrol bitkisinde, en düşük ortalama BKS 17,33 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edilmiştir. Minimum BKS 17,8 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edilirken, maksimum BKS 20,8 $^{\circ}\text{C}$ ile Z1 sulu kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).

Kuraklık stresinin 15. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklık lığı nın 20,92 $^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama BKS 21,46 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden, en düşük ortalama BKS 20,53 $^{\circ}\text{C}$ ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilmiştir. Minimum BKS 20,1 $^{\circ}\text{C}$ ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum BKS 21,6 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).

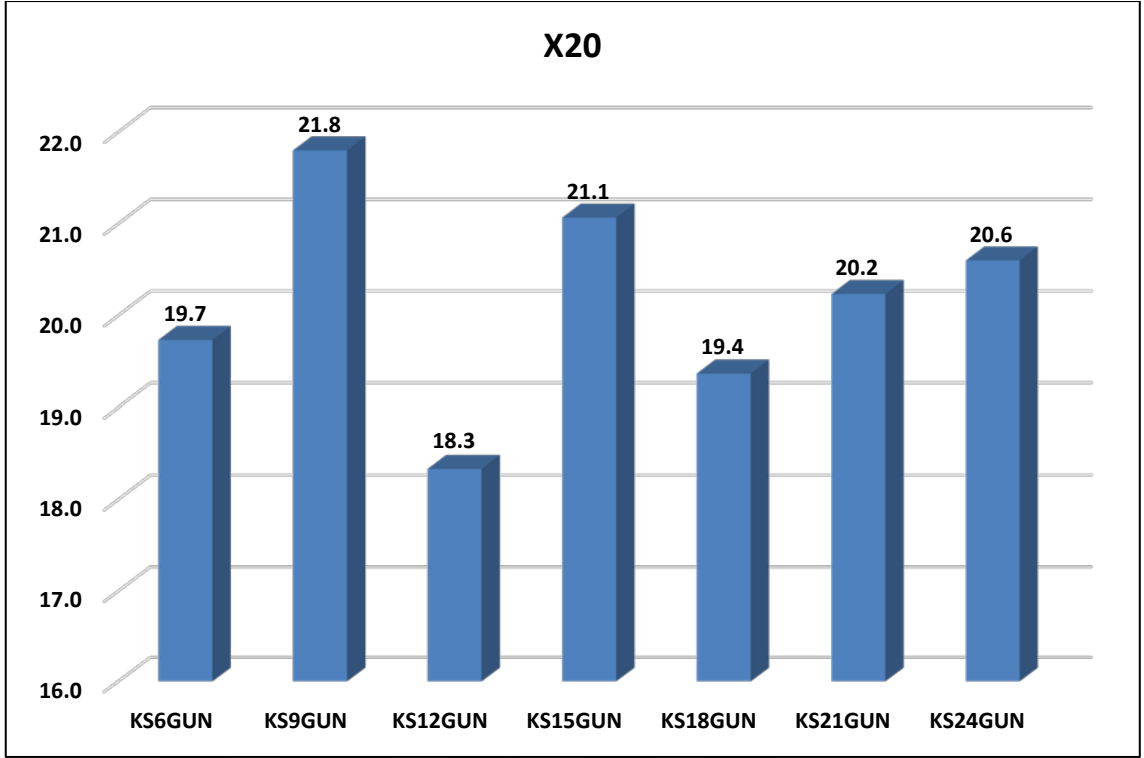
Kuraklık stresinin 18. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklık lığı nın 20,21 $^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama BKS 20,86 $^{\circ}\text{C}$ ile X50 genotipinden, en düşük ortalama BKS 19,36 $^{\circ}\text{C}$ ile X20 genotipinden elde edilmiştir. Minimum BKS 19,2 $^{\circ}\text{C}$ ile X20 genotipinden elde edilirken, maksimum BKS 21,0 $^{\circ}\text{C}$ ile X50 genotipinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).

Kuraklık stresinin 21. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklık lığı nın 20,34 $^{\circ}\text{C}$ olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama BKS 20,63 $^{\circ}\text{C}$ ile X50 genotipinden, en düşük ortalama BKS 19,86 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edilmiştir. Minimum BKS 19,7 $^{\circ}\text{C}$ ile X18 genotipinden elde edilirken, maksimum BKS 20,9 $^{\circ}\text{C}$ ile X50, Z1 ve Z2 bitkilerinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).

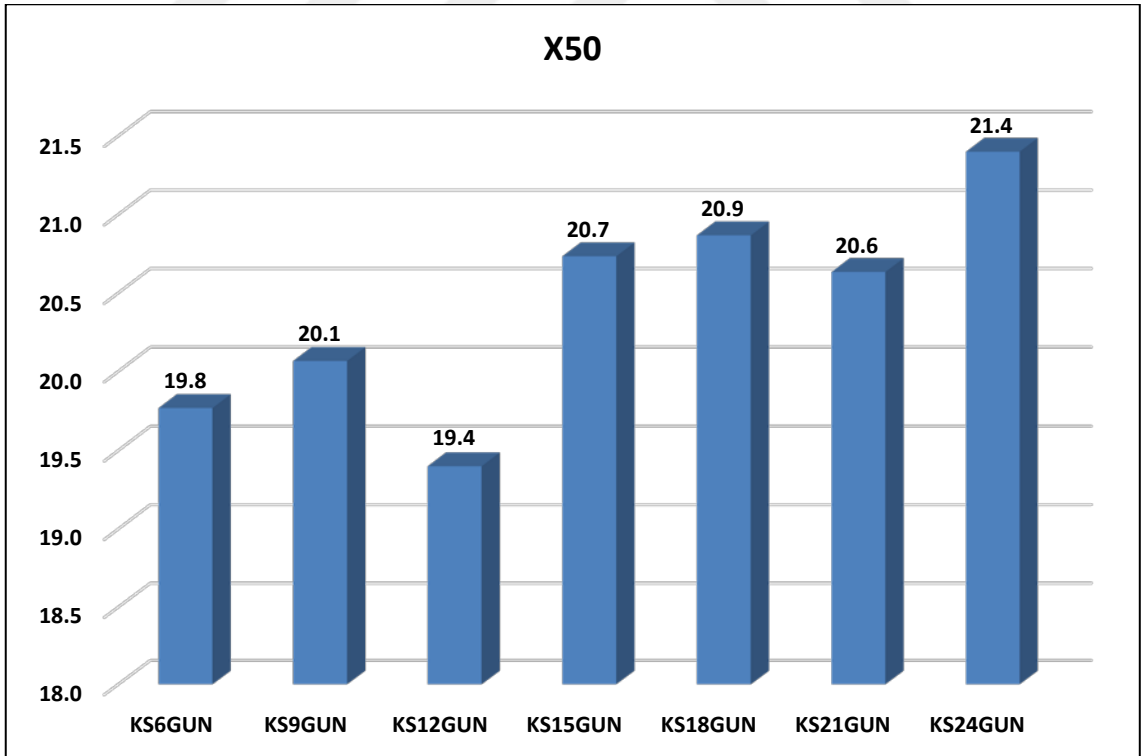
Kuraklık stresinin 24. günü tüm bitkilerin ortalama kanopy sıcaklığının 20,75 °C olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama BKS 21,40 °C ile X50 genotipinden, en düşük ortalama BKS 20,56 °C ile Z1 (sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinden elde edilmiştir. Minimum BKS 20,1 °C ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum BKS 21,9 °C ile X50 genotipinden elde edildiği görülmektedir (Tablo 15).



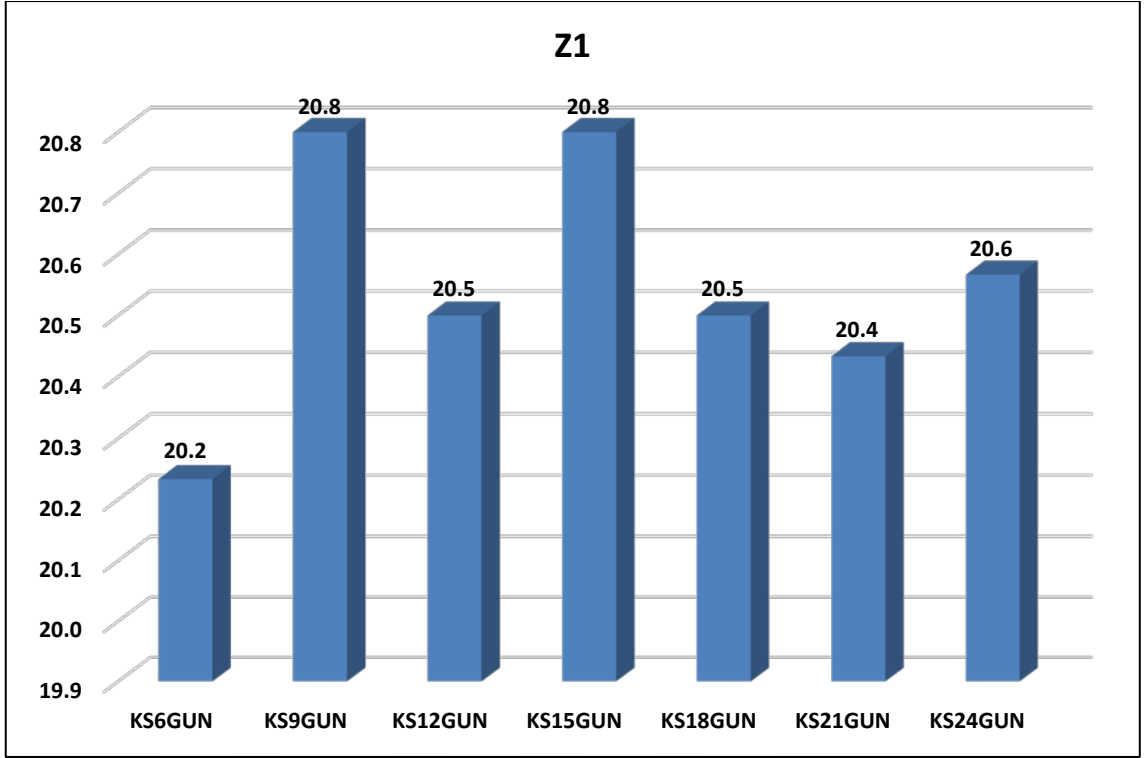
Şekil 25. X18 genotipinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)



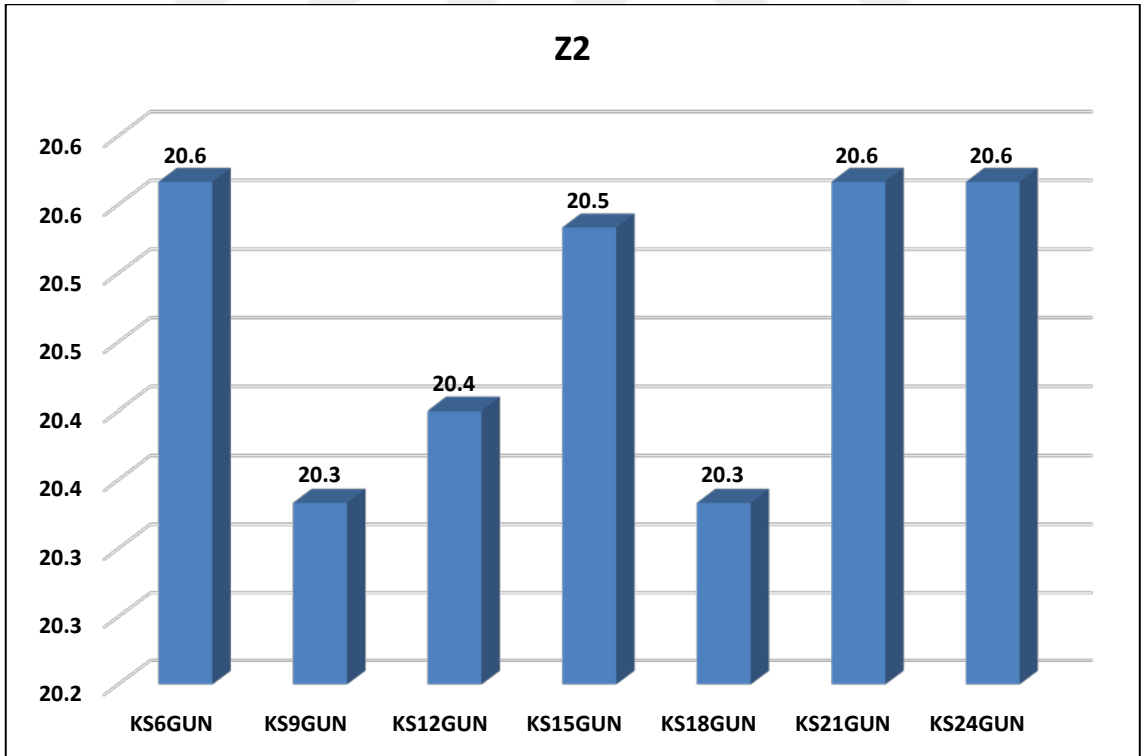
Şekil 26. X20 genotipinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)



Şekil 27. X50 genotipinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)



Şekil 28. Z1 sulu kontrol bitkisinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)



Şekil 29. Z2 susuz kontrol bitkisinin kuraklık stresinin süresine göre bitki kanopy sıcaklığında (°C) meydana gelen değişimler (n=3)

4.6. Kuraklık Stresi Uygulanan Bitkilerden Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler

4.6.1. Kuraklık Stresinin 18. Günü Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler

Biçildikten sonra kuraklık stresi altında yetiştirilen aday mutant (M₃) yonca genotiplerin ve kontrol bitkilerinin kuraklık stresinin 18. günü önemli bazı agro-morfolojik özellikleri incelenmiştir. İncelenen özellikler ve elde edilen bulgular Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16

Kuraklık stresinin 18. gününe ilişkin belirlenen bazı agro-morfolojik özellikler

Genotip	Bitki Boyu (cm)	Ana Gövde Kalınlığı (mm)	Doğal Bitki Boyu (cm)	Yan Dal Sayısı (adet/bitki)	Yaprak Sayısı (adet/bitki)	Orta Yaprakçık Boyu (mm)	Orta Yaprakçık Eni (mm)
X18	36,6	3	15,8	3	36	32,5 a	17,5 b
X20	47,6	3,1	21,2	8	185	21,7 b	22,7 a
X50	50,3	2,9	48,1	4	42	25,5 ab	18,0 ab
Z1	42,1	2,3	31,3	2	53	27,7 ab	18,0 ab
Z2	38	0,8	19,7	0	27	22,7 b	14,0 b
LSD _{0.05}						8,79	4,94
						n=4	n=4

Bitki Boyu (cm)

Kuraklık stresinin 18. gününe ilişkin bitki boyu bakımından bitkiler incelendiğinde en uzun boylanma gösteren bitki 50,3 cm ile X50 genotipi olurken en kısa boylanma gösteren bitkinin 36,6 cm ile X18 genotipi olduğu belirlenmiştir. Z1 sulu kontrol bitkisi 42,1 cm boylanma sergilerken Z2 susuz kontrol bitkisinin 38 cm boylandığı tespit edilmiştir (Tablo 16).

Ana Gövde Kalınlığı (mm)

Kuraklık stresinin 18. günü en kalın ana gövdeye sahip olan bitki 3,1 mm ile X20 genotipi olurken en ince ana gövdeye sahip bitkinin 0,8 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisi olduğu belirlenmiştir. Genel olarak incelendiğinde aday mutant genotiplerin kontrol

bitkilerine göre daha kalın bir ana gövde yapısı sergilediği görülmektedir (Tablo 16).

Doğal Bitki Boyu (cm)

Kuraklık stresinin 18. günü doğal bitki boyu bakımından bitkileri kıyasladığımız zaman en uzun doğal bitki boyu 48,1 cm ile X50 genotipinde olurken en kısa doğal bitki boyu 15,8 cm ile X18 genotipinde olmuştur (Tablo 16).

Yan Dal Sayısı (adet/bitki)

Kuraklık stresinin 18. günü bitkilere ait en gelişmiş ana dal üzerindeki yan dal sayısı bakımından incelediğinde en çok yan dal oluşturan bitki 8 adet ile X20 genotipi olurken Z2 susuz kontrol bitkisinin yan dal oluşturmadağı tespit edilmiştir (Tablo 16).

Yaprak Sayısı (adet/bitki)

Kuraklık stresinin 18. gününe ilişkin bitkilerin oluşturduğu yaprak sayıları bakımından incelediğinde en çok yaprak sayısına sahip bitki 185 adet ile X20 genotipi olurken en az yaprak sayısı 27 adet ile Z2 susuz kontrol bitkisinde tespit edilmiştir (Tablo 16).

Orta Yaprakçık Boyu (mm)

Kuraklık stresinin 18. günü bitkilere ait orta yaprakçık boyu (mm) ortalaması, minimum ve maksimum değerleri Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17

Kuraklık stresinin 18. günü bitkilerin orta yaprakçık boyuna (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	32,5 a	30	40
X20	21,7 b	20	24
X50	25,5 ab	16	33
Z1	27,7 ab	19	33
Z2	22,7 b	20	25
*26,05			
LSD: 8,79			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 21,90			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 17 incelendiğinde kuraklık stresinin 18. günü tüm bitkilerin ortalama orta yaprakçık boyunun 26,05 mm olduğu, ortalama en uzun orta yaprakçık boyunun 32,5 mm ile X18 genotipinden, ortalama en kısa orta yaprakçık boyunun 21,7 mm ile X20 genotipinden elde edildiği görülmektedir. Minimum orta yaprakçık boyu 16 mm ile X50 genotipinden elde edilirken, maksimum orta yaprakçık boyu 40 mm ile X18 genotipinden elde edildiği görülmektedir.

Orta Yaprakçık Eni (mm)

Kuraklık stresinin 18. günü bitkilere ait orta yaprakçık eni (mm) ortalaması, minimum ve maksimum değerleri Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18

Kuraklık stresinin 18. günü bitkilerin orta yaprakçık enine (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	17,5 b	16	20
X20	22,7 a	18	29
X50	18,0 ab	14	21
Z1	18,0 ab	15	21
Z2	14,0 b	13	15
*18,05			
LSD: 4,94			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 17,78			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 18 incelendiğinde kuraklık stresinin 18. günü tüm bitkilerin ortalama orta yaprakçık eninin 18,05 mm olduğu, ortalama en uzun orta yaprakçık boyunun 22,7 mm ile X20 genotipinden, ortalama en kısa orta yaprakçık boyunun 14 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir. Minimum orta yaprakçık eni 13 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum orta yaprakçık eni 29 mm ile X20 genotipinden elde edildiği görülmektedir.

4.6.2. Kuraklık Stresinin 24. Günü Belirlenen Agro-morfolojik Özellikler

Kuraklık stresi altında yetiştirilen aday mutant yonca genotiplerinin kuraklık stresinin 24. günü önemli bazı agro-morfolojik özellikleri incelenmiştir. İncelenen özellikler ve elde edilen bulgular Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19

Kuraklık stresinin 24. gününe ilişkin belirlenen bazı agro-morfolojik özellikler

Genotip	Bitki Boyu (cm)	Ana Gövde Kalınlığı (mm)	Doğal Bitki Boyu (cm)	Yan Dal Sayısı (Adet/bitki)	Yaprak Sayısı (Adet/bitki)	Orta Yaprakçık Boyu (mm)	Orta Yaprakçık Eni (mm)	Çiçek Rengi (1-4)	Çiçek Salkım Durumu (1-3)
X18	58,3	3,1	24,6	6	59	24,0 a	12,0 a	3	2
X20	55,3	3,3	38,6	9	116	21,2 a	9,7 abc	4	2
X50	93	2,9	26	9	120	22,0 a	8,0 cb	3	2
Z1	75,3	3,1	53	8	370	25,2 a	11,0 ab	4	2
Z2	52	0,7	26	5	96	11,5 b	6,5 c	3	3
LSD _{0.05}						4,67	3,85		
						n=4	n=4		

Bitki Boyu (cm)

Kuraklık stresinin 24. gününe ilişkin bitki boyu bakımından bitkiler incelendiğinde en uzun boylanma gösteren bitki 93 cm ile X50 genotipi olurken en kısa boylanma gösteren bitki 52 cm ile Z2 susuz kontrol bitkisi olmuştur (Tablo 19).

Ana Gövde Kalınlığı (mm)

Kuraklık stresinin 24. günü ana gövde kalınlığı bakımından bitkileri kıyasladığımız zaman en kalın gövdeye sahip olan bitki 3,3 mm ile X20 genotipi olurken en ince gövdeye sahip bitki 0,7 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisi olmuştur (Tablo 19).

Doğal Bitki Boyu (cm)

Kuraklık stresinin 24. günü doğal bitki boyu bakımından bitkiler incelendiğinde en uzun doğal bitki boyu 53 cm ile Z1 sulu kontrol bitkisinde olurken en kısa doğal bitki boyu 24,6 cm ile X18 genotipinde olmuştur (Tablo 19).

Yan Dal Sayısı (adet/bitki)

Kuraklık stresinin 24. günü bitkilere ait en gelişmiş ana dal üzerindeki yan dal sayısı bakımından bitkiler incelendiğinde en çok yan dal oluşturan bitkiler 9 adet ile X20 ve X50 genotipleri olurken en az yan dal oluşturan bitki 5 adet ile Z2 susuz kontrol bitkisi olmuştur (Tablo 19).

Yaprak Sayısı (adet/bitki)

Kuraklık stresinin 24. gününe ilişkin bitkilerin oluşturduğu yaprak sayıları bakımından bitkiler incelendiğinde en çok yaprak sayısına sahip bitki 370 adet ile Z1 sulu kontrol bitkisi olurken en az yaprak sayısı 59 adet ile X18 genotipi olmuştur (Tablo 19).

Orta Yaprakçık Boyu (mm)

Kuraklık stresinin 24. günü bitkilere ait orta yaprakçık boyu (mm) ortalaması, minimum ve maksimum değerleri Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20

Kuraklık stresinin 24. günü bitkilerin orta yaprakçık boyuna (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	24,0 a	20	27
X20	21,2 a	18	23
X50	22,0 a	20	25
Z1	25,2 a	19	29
Z2	11,5 b	10	15
*20,80			
LSD: 4,67			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 14,58			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 20 incelendiğinde kuraklık stresinin 24. günü tüm bitkilerin ortalama orta yaprakçık boyunun 20,80 mm olduğu, ortalama en uzun orta yaprakçık boyunun 25,2 mm ile Z1 sulu kontrol bitkisinden, ortalama en kısa orta yaprakçık boyunun 11,5 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir. Minimum orta yaprakçık boyu 10 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edilirken, maksimum orta yaprakçık boyu 29 mm ile Z1 sulu kontrol bitkisinden elde edilmiştir.

Orta Yaprakçık Eni (mm)

Kuraklık stresinin 24. günü bitkilere ait orta yaprakçık eni (mm) ortalaması, minimum ve maksimum değerleri Tablo 21’de verilmiştir.

Tablo 21

Kuraklık stresinin 24. günü bitkilerin orta yaprakçık enine (mm) ilişkin ortalama, minimum ve maksimum değerleri (n=4)

Genotip	Ortalama*	Minimum	Maksimum
X18	12,0 a	8	18
X20	9,7 abc	8	11
X50	8,0 bc	6	10
Z1	11,0 ab	9	13
Z2	6,5 c	6	7
*9,45			
LSD: 3,85			
Alpha: 0,05			
Varyasyon Katsayısı (%): 26,49			
Aynı harf atanan ortalamalar arasındaki farklar önemli değildir.			

Tablo 21 incelendiğinde kuraklık stresinin 24. günü tüm bitkilerin ortalama orta yaprakçık eninin 9,45 mm olduğu, ortalama en uzun orta yaprakçık boyunun 12 mm ile X18 genotipinden, ortalama en kısa orta yaprakçık boyunun 6,5 mm ile Z2 susuz kontrol bitkisinden elde edildiği görülmektedir. Minimum orta yaprakçık eni 6 mm ile X50 genotipi ve Z2 susuz kontrol bitkisinde elde edilirken, maksimum orta yaprakçık eni 18 mm ile X18 genotipinden elde edilmiştir.

Çiçek Rengi (1-4)

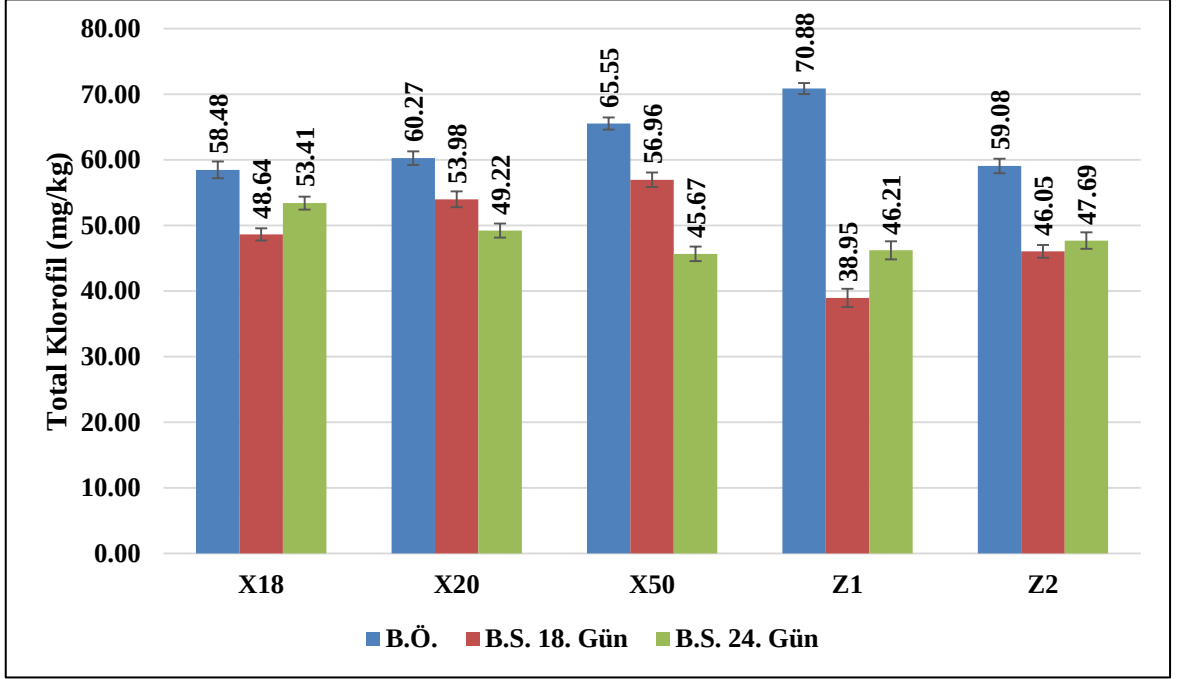
Kuraklık stresinin 24. günü çiçek oluşturan bitkilerin çiçek renklerini belirlemek için kullanılan çiçek rengi skalasına göre X18, X50 ve Z2 açık mor (3) rengine sahip çiçekler oluştururken X20 ve Z1 mor (4) rengine çiçekler oluşturmuştur (Tablo 19).

Çiçek Salkım Durumu (1-3)

Çiçeklenen bitkilerin salkım durumunu belirlemek için kullanılan çiçek salkım durumu skalasına göre X18, X20, X50 ve Z1 bitkileri seyrek salkım (2), Z2 ise sık salkım (3) formuna sahip çiçek salkımları oluşturmuşlardır (Tablo 19).

4.7. Total Klorofil İçeriği

Birinci biçim sonrası kuraklık stresine maruz bırakılan X18, X20 ve X50 aday mutant (M_3) yonca genotipleri ile Z1 (sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinin total klorofil içeriğinde (mg/kg) meydana gelen değişimler Minolta SPAD-502 klorofilmetre ile ölçülmüştür. Birinci biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü total klorofil miktarları (mg/kg) ölçülen bitkilere ait bulgular Şekil 30’da verilmiştir.



Şekil 30. Aday mutant genotipler ile kontrol bitkilerinin biçim öncesi, kuraklık stresinin 18. ve 24. günü total klorofil içeriğinde meydana gelen değişimler (mg/kg)

Kuraklık stresinin 0. günü (B.Ö.), 18 ve 24. günlerinde, X18 genotipinin total klorofil miktarı sırasıyla 58,48, 48,64 ve 53,41 mg/kg olarak belirlenmiştir. X18 genotipine ilişkin total klorofil miktarları biçim öncesine göre kuraklık stresinin 18. gününde %16,77 oranında azaldığı belirlenmiştir. Kuraklık stresinin 18. gününe göre 24. günde ise total klorofil miktarında %9,74 oranında artış meydana gelirken biçim öncesine göre 24. günde %8,67 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 30).

Kuraklık stresinin 0, 18 ve 24. günlerinde, X20 genotipinin total klorofil miktarı sırasıyla 60,27, 53,98 ve 49,22 mg/kg olarak belirlenmiştir. X20 genotipine ilişkin total klorofil miktarları biçim öncesine göre kuraklık stresinin 18. gününde %10,43 oranında azaldığı belirlenmiştir. Kuraklık stresinin 18. gününe göre 24. günde ise total klorofil miktarında %8,81 oranında azalış meydana gelirken biçim öncesine göre 24. günde %18,33 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 30).

Kuraklık stresinin 0, 18 ve 24. günlerinde, X50 genotipinin total klorofil miktarı sırasıyla 60,55, 56,96 ve 45,67 mg/kg olarak belirlenmiştir. X50 genotipine ilişkin total klorofil miktarları biçim öncesine göre kuraklık stresinin 18. gününde %13,10 oranında azaldığı belirlenmiştir. Kuraklık stresinin 18. gününe göre 24. günde ise total klorofil miktarında %19,82 oranında azalış meydana gelirken biçim öncesine göre 24. günde %30,32 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 30).

Kuraklık stresinin 0, 18 ve 24. günlerinde, Z1 sulu kontrol bitkisinin total klorofil miktarı sırasıyla 70,88, 38,95 ve 46,21 mg/kg olarak belirlenmiştir. Z1 sulu kontrol bitkisine ilişkin total klorofil miktarları biçim öncesine göre 18. günde %45,04 oranında azalmıştır fakat 18. güne göre 24. günde ise total klorofil miktarında %18,63 oranında artış belirlenmiştir. Biçim öncesine göre 24. günde ise %34,80 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 30).

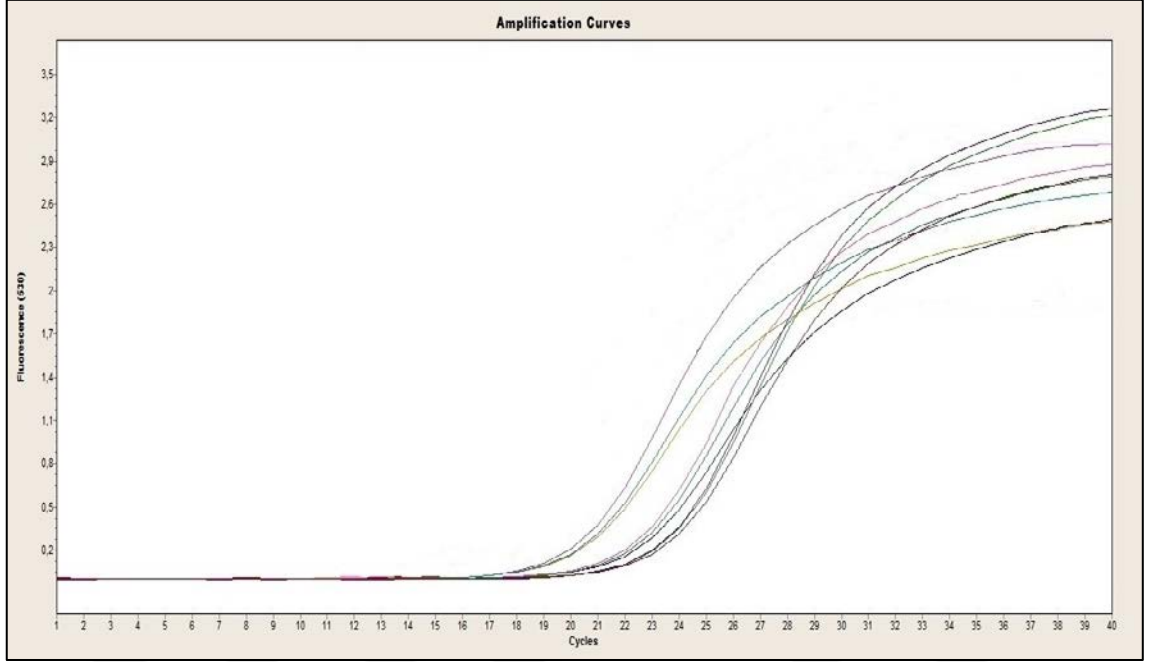
Kuraklık stresinin 0, 18 ve 24. günlerinde, Z2 susuz kontrol bitkisinin total klorofil miktarı sırasıyla 59,08, 46,05 ve 47,69 mg/kg olarak belirlenmiştir. Z2 susuz kontrol bitkisine ilişkin total klorofil miktarları biçim öncesine göre 18. günde %22,05 oranında azaldığı fakat 18. güne göre 24. günde ise total klorofil miktarında %3,56 oranında artış meydana geldiği belirlenmiştir. Biçim öncesine göre 24. günde ise %19,27 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 30).

Birinci biçim öncesi tomurcuklanma döneminde yapılan SPAD ölçüm değerleri, kuraklık stresinin 18. ve 24. gününe göre tüm bitkilerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kuraklık stresi altında yetiştirilen bitkilerin total klorofil miktarındaki azalmalar Zhang ve diğerleri (2016)'nin elde ettiği bulgularla benzerlik göstermektedir. Buna ek olarak bitki biçiminin meydana getirmiş olduğu stresin de klorofil miktarında azalmalara neden olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan stres şartlarında yetiştirilen bitkilerden gerekli analizler için yaprak örnekleri toplanmıştır ve yeni oluşan genç yapraklardan SPAD ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde biçim öncesine göre kuraklık stresinin 18. ve 24. günlerinde SPAD değerlerinin düşük çıktığı tespit edilmiştir. SPAD değerlerindeki bu düşüş, klorofil sentezinin yeni oluşan genç yapraklarda tam olarak gerçekleşememesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

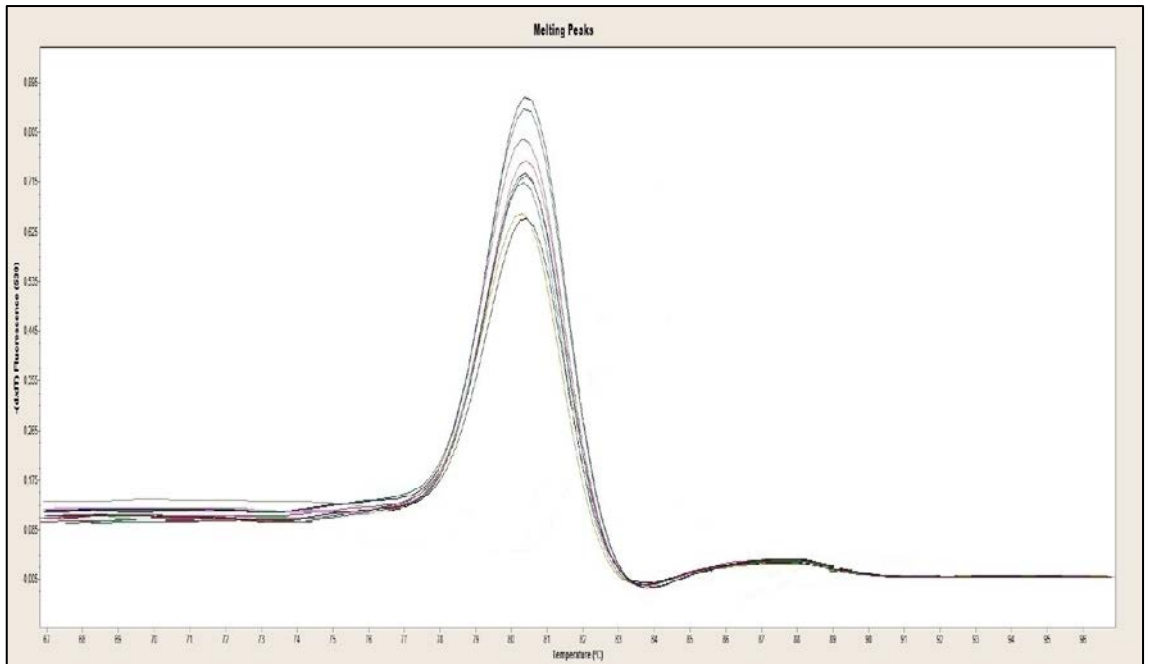
Total klorofil miktarı bakımından tüm bitkilerde önemli varyasyonların olduğu belirlenmiştir. Kuraklık stresi ve kuraklık stresinin süresi ile birlikte bitki genotipinden kaynaklanan farklılıkların bu varyasyonun oluşmasında büyük etkisinin olduğu düşünülmektedir.

4.8. RT-qPCR Reaksiyonlarına Ait Amplifikasyon ve Erime Eğrileri

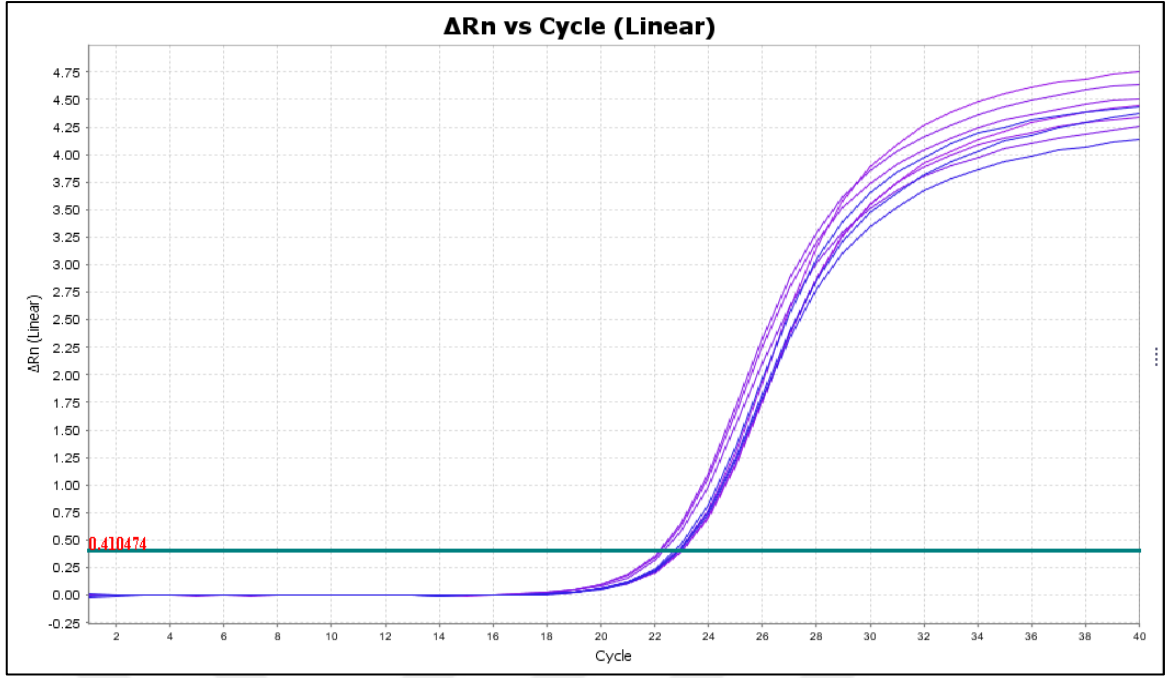
Kullanılan hedef genlere (*MsProDH* ve *MtRD2*) ait ileri ve geri primerler ile bitkilerden 3 farklı zamanda (0. gün, kuraklık stresinin 18. ve 24. günü) alınan yaprak örneklerine ilişkin amplifikasyon ve erime eğrilerine ait görseller Şekil 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 ve 48’de verilmiştir.



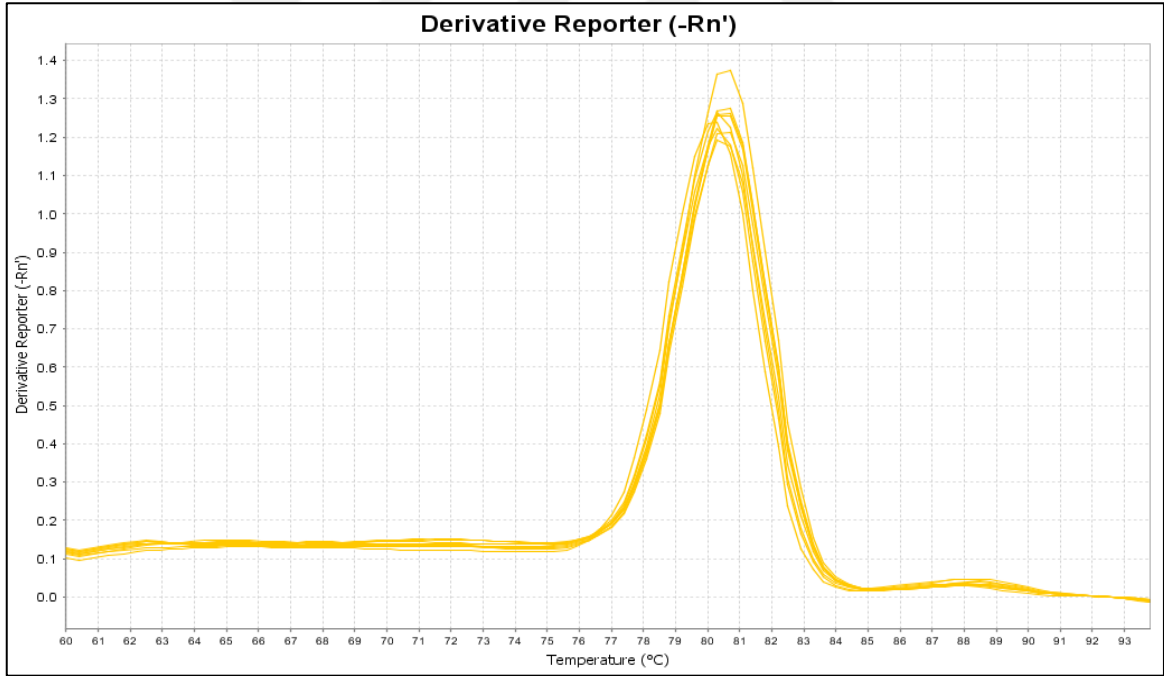
Şekil 31. *MsProDH* primerleri ve X18 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri



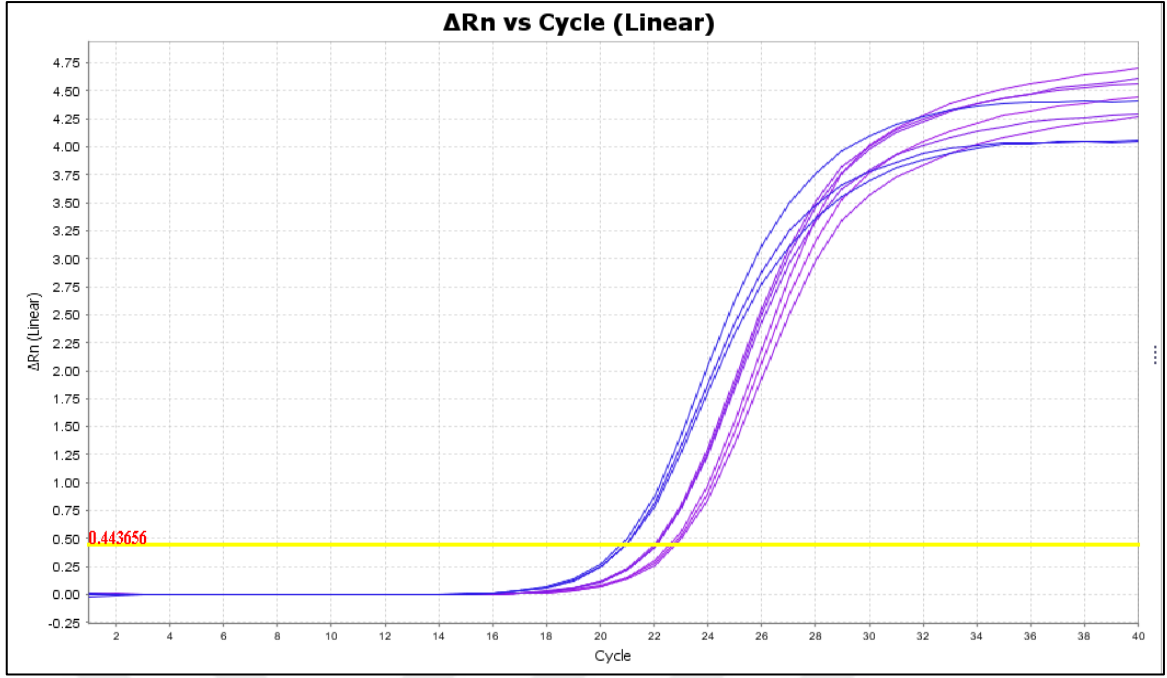
Şekil 32. *MsProDH* primerleri ve X18 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri



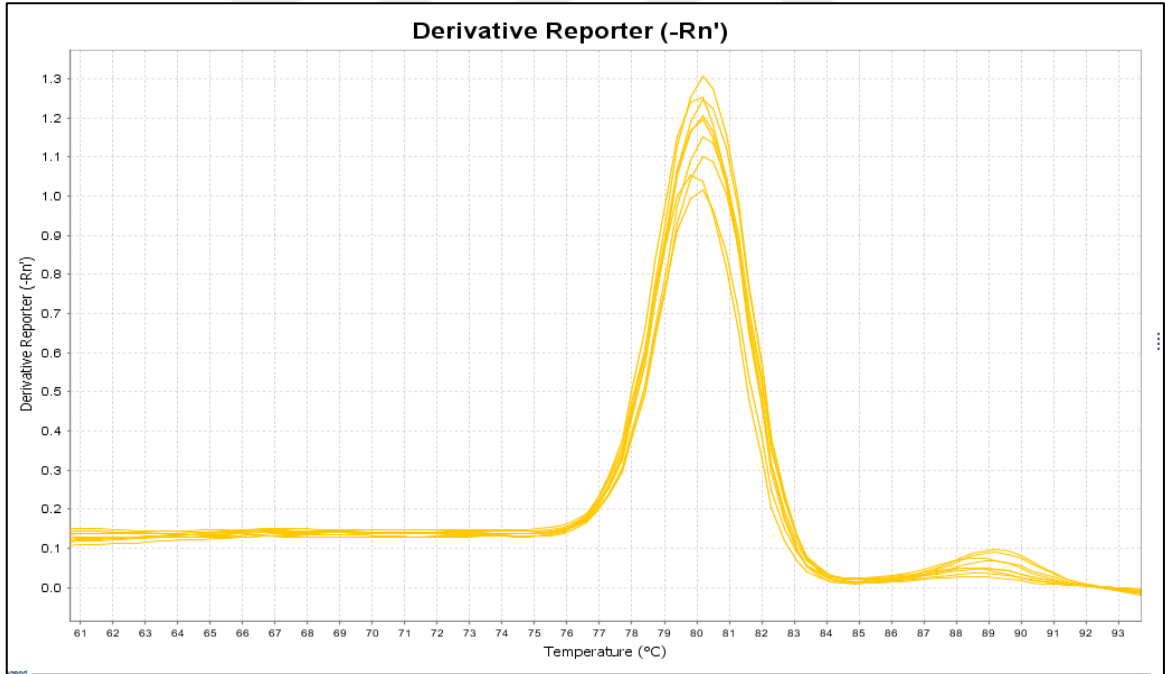
Şekil 33. *MsProDH* primerleri ve X20 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri



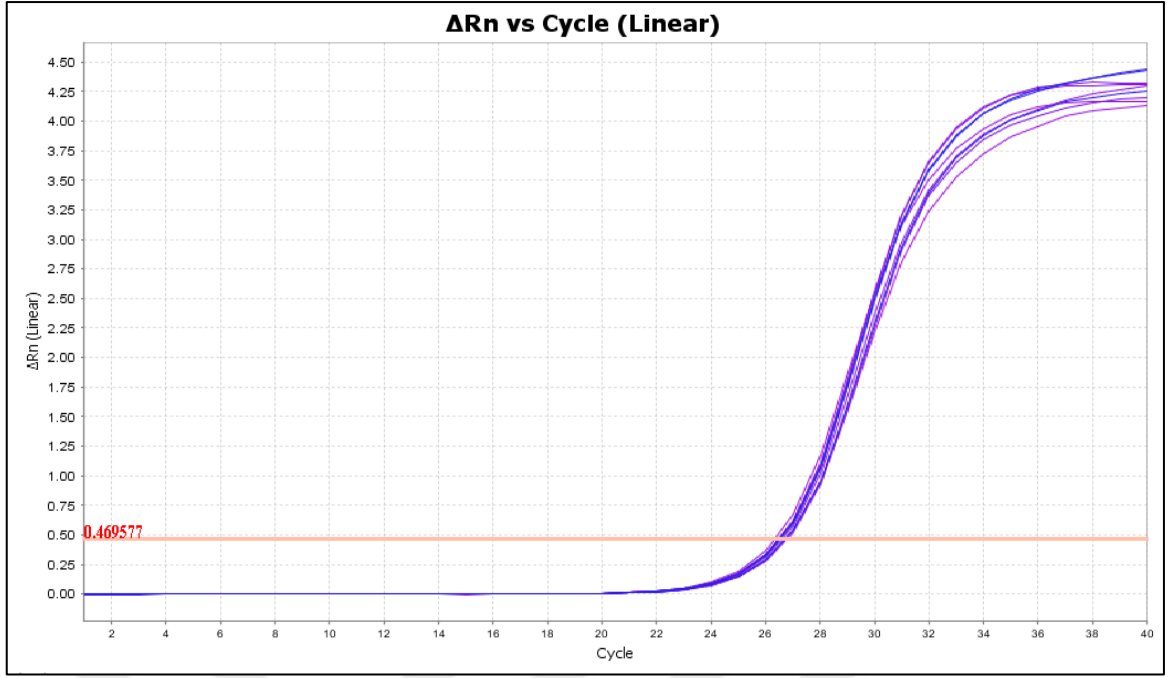
Şekil 34. *MsProDH* primerleri ve X20 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri



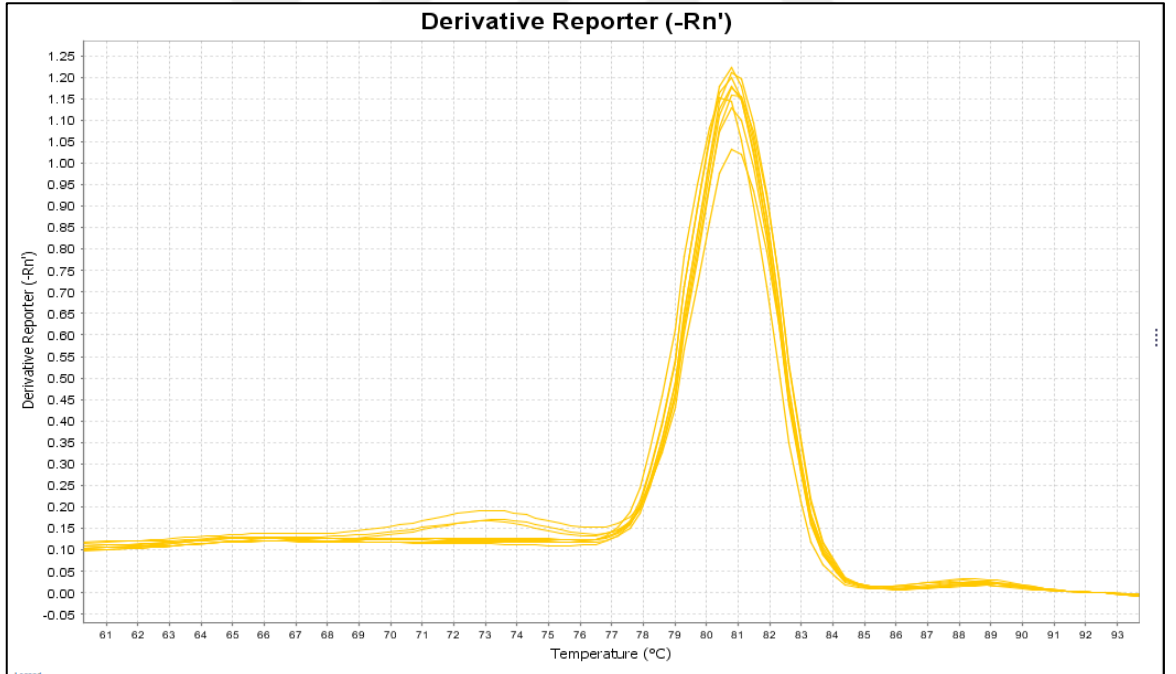
Şekil 35. *MsProDH* primerleri ve X50 genotipine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri



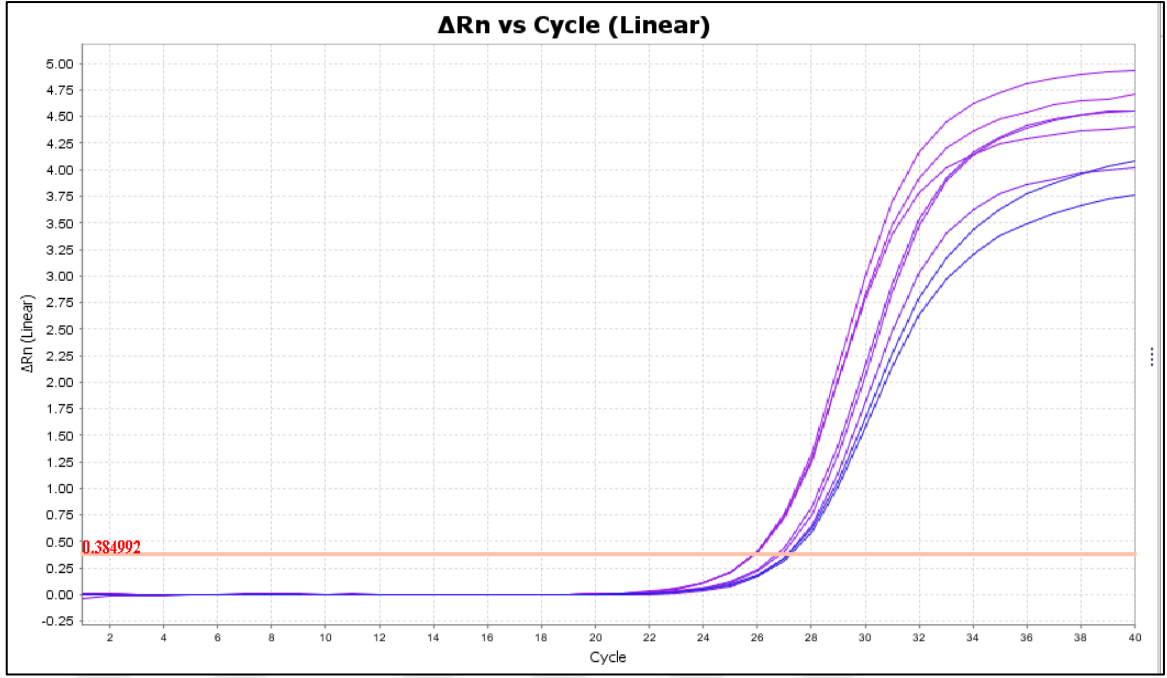
Şekil 36. *MsProDH* primerleri ve X50 genotipine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri



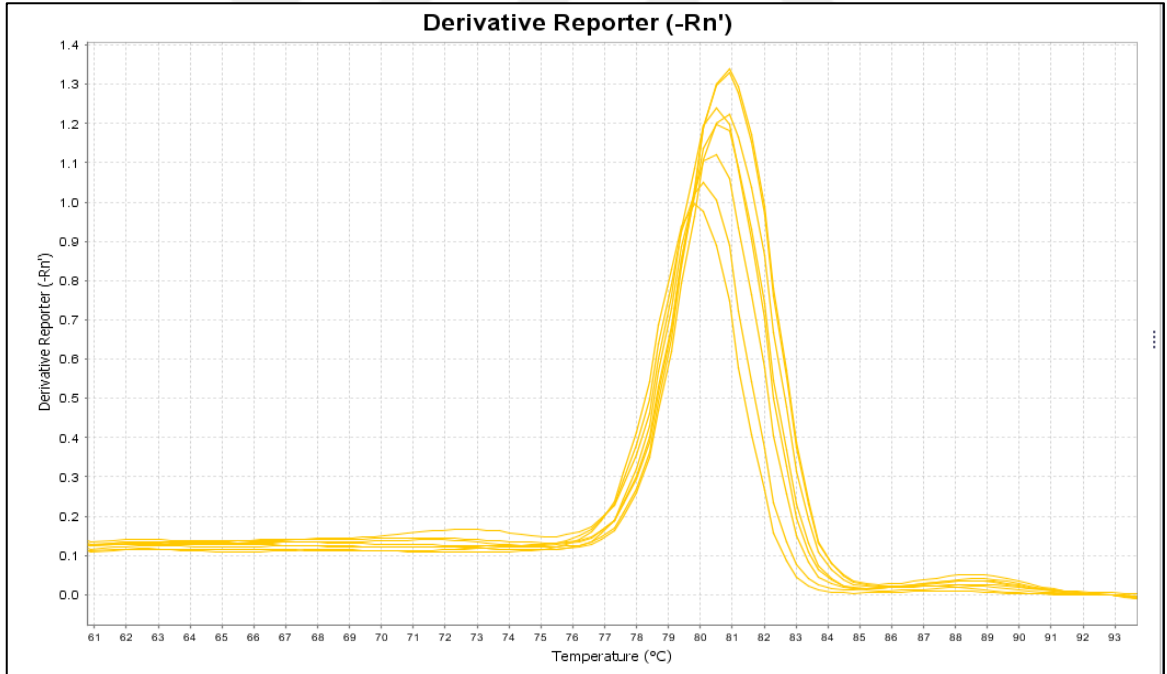
Şekil 37. *MsProDH* primerleri ve Z1 sulu kontrol bitkisine ait örneklere ilişkin amplifikasyon eğrileri



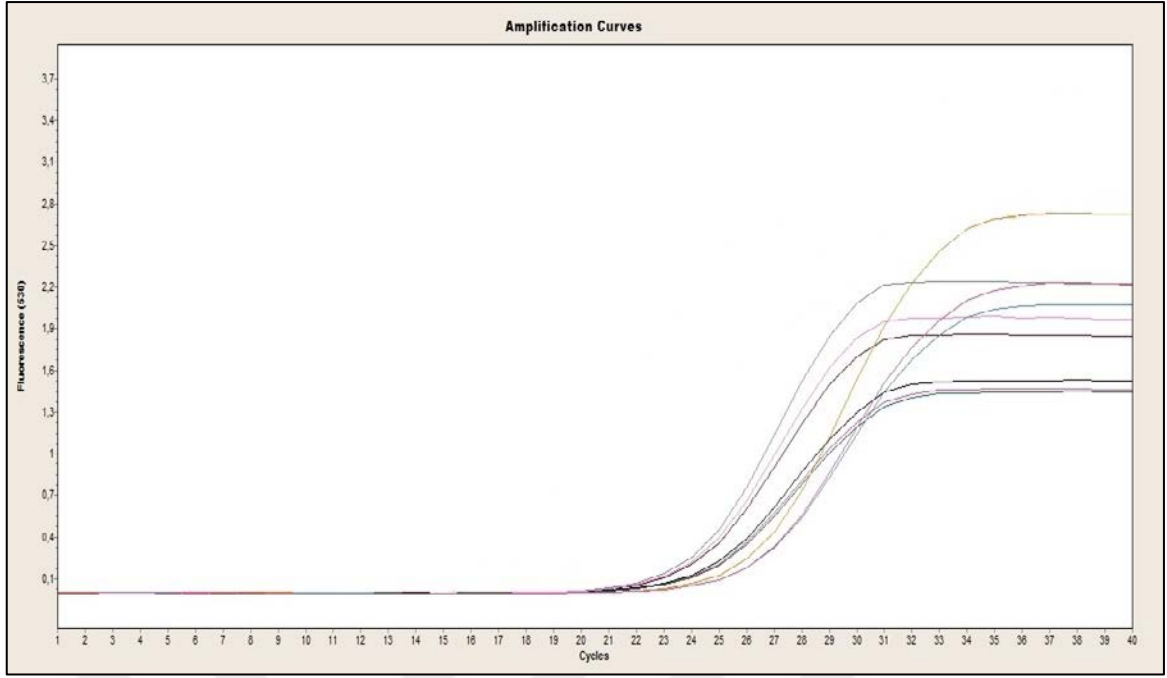
Şekil 38. *MsProDH* primerleri ve Z1 sulu kontrol bitkisine ait örneklere ilişkin erime eğrileri



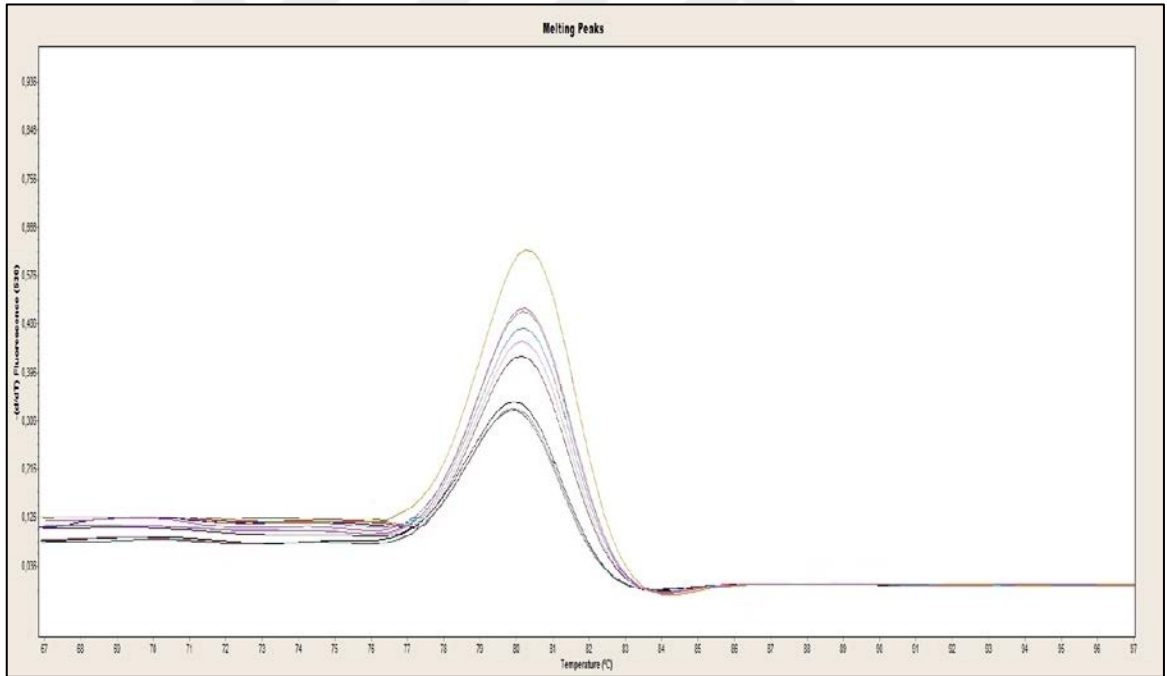
Şekil 39. *MsProDH* primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin amplifikasyon eğrileri



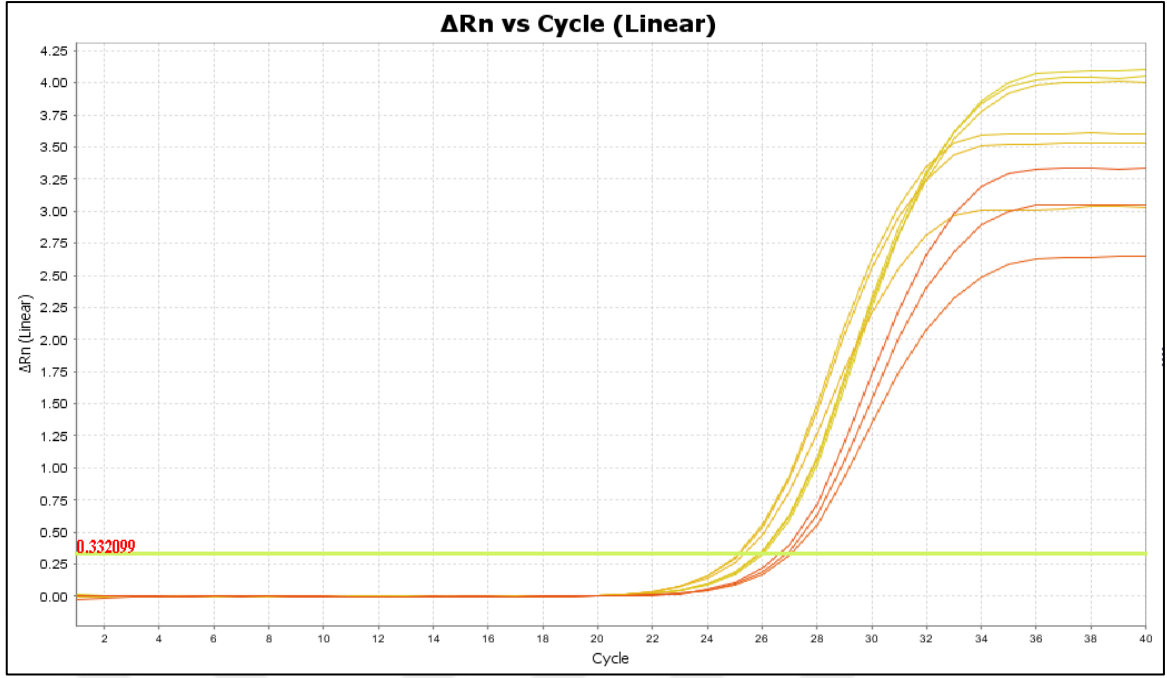
Şekil 40. *MsProDH* primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklerle ilişkin erime eğrileri



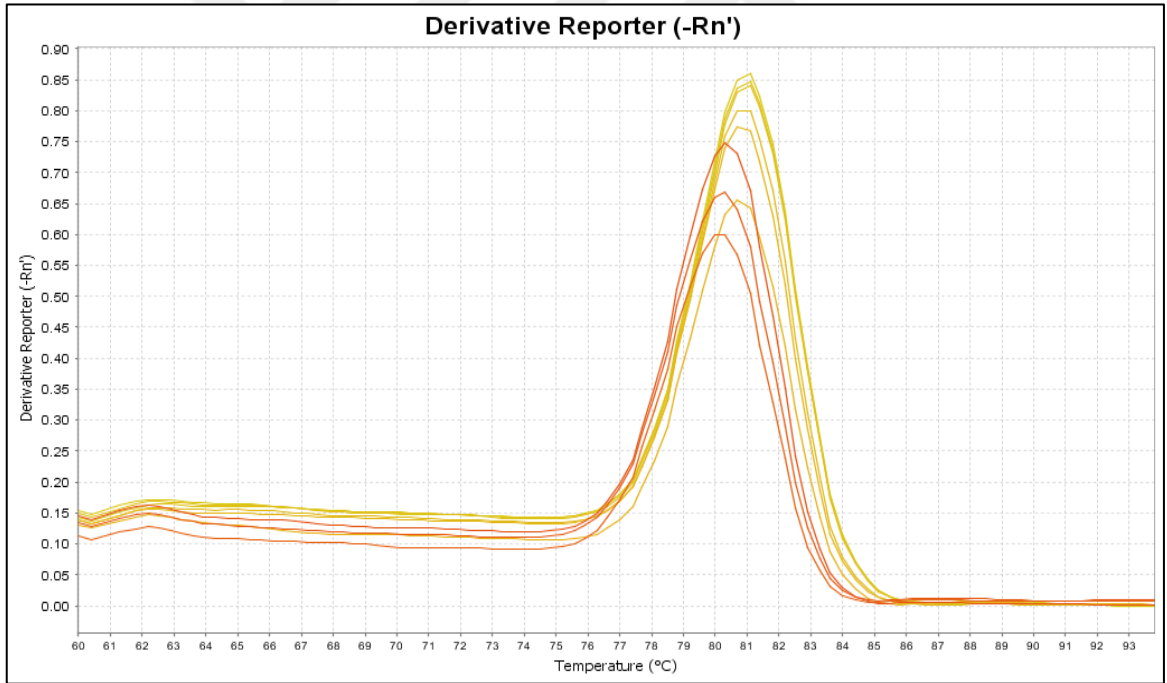
Şekil 41. *MtRD2* primerleri ve X18 genotipine ait örneklere ilişkin amplifikasyon eğrileri



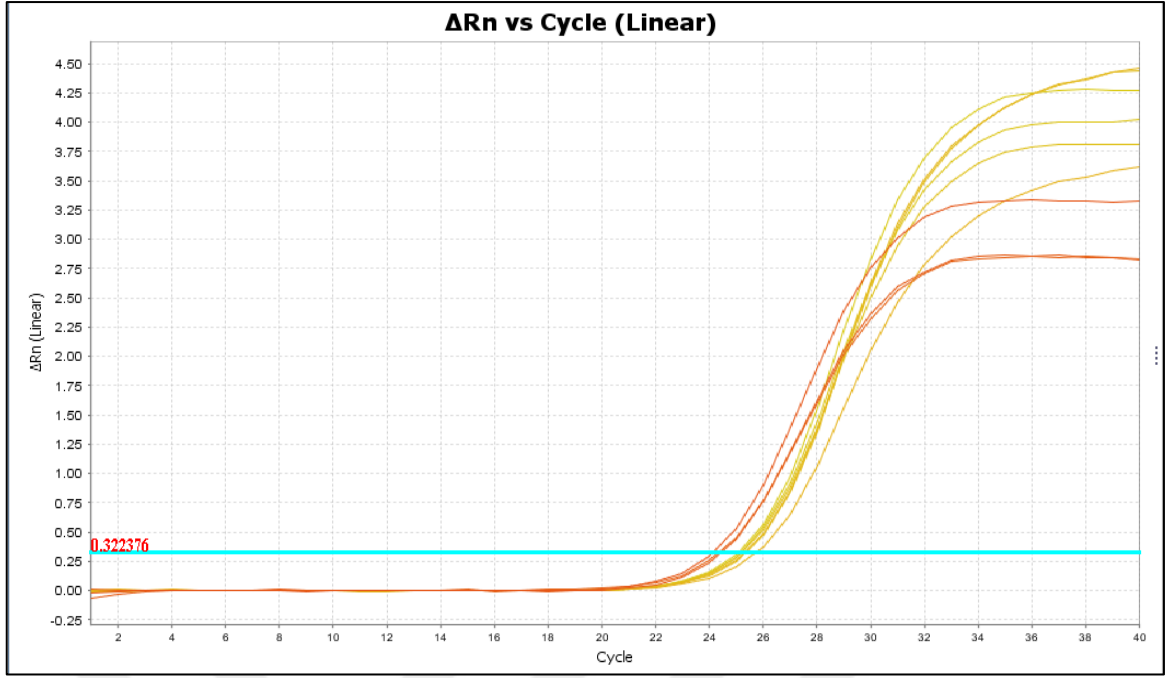
Şekil 42. *MtRD2* primerleri ve X18 genotipine ait örneklere ilişkin erime eğrileri



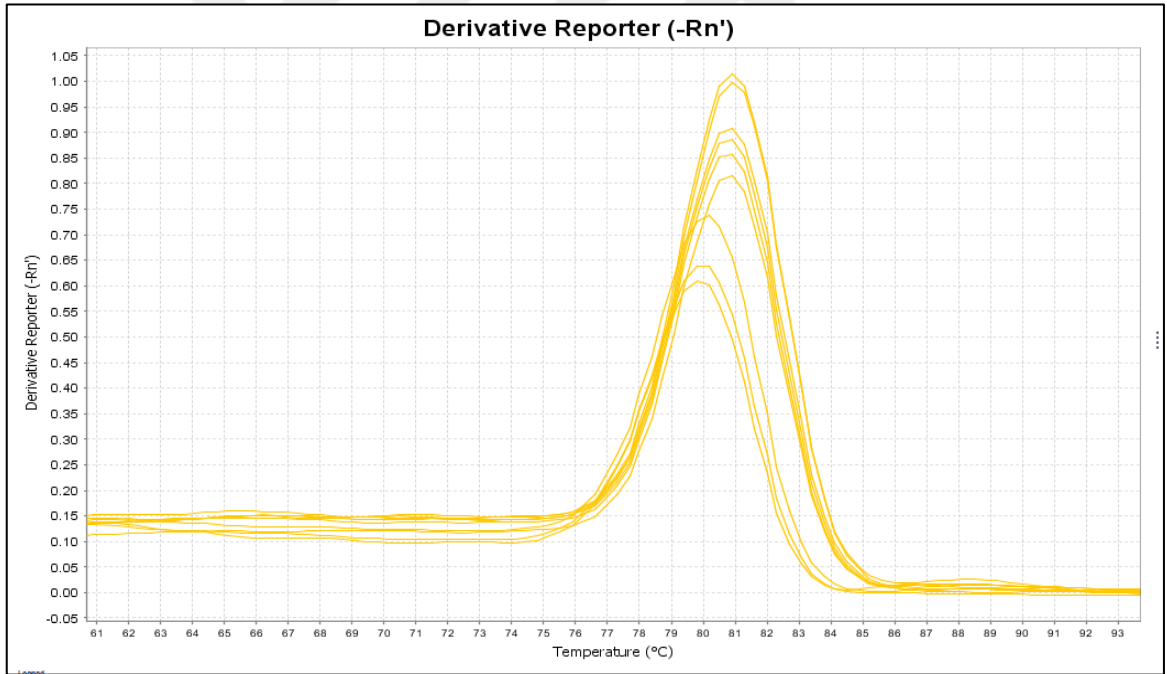
Şekil 43. *MtRD2* primerleri ve X20 genotipine ait örneklere ilişkin amplifikasyon eğrileri



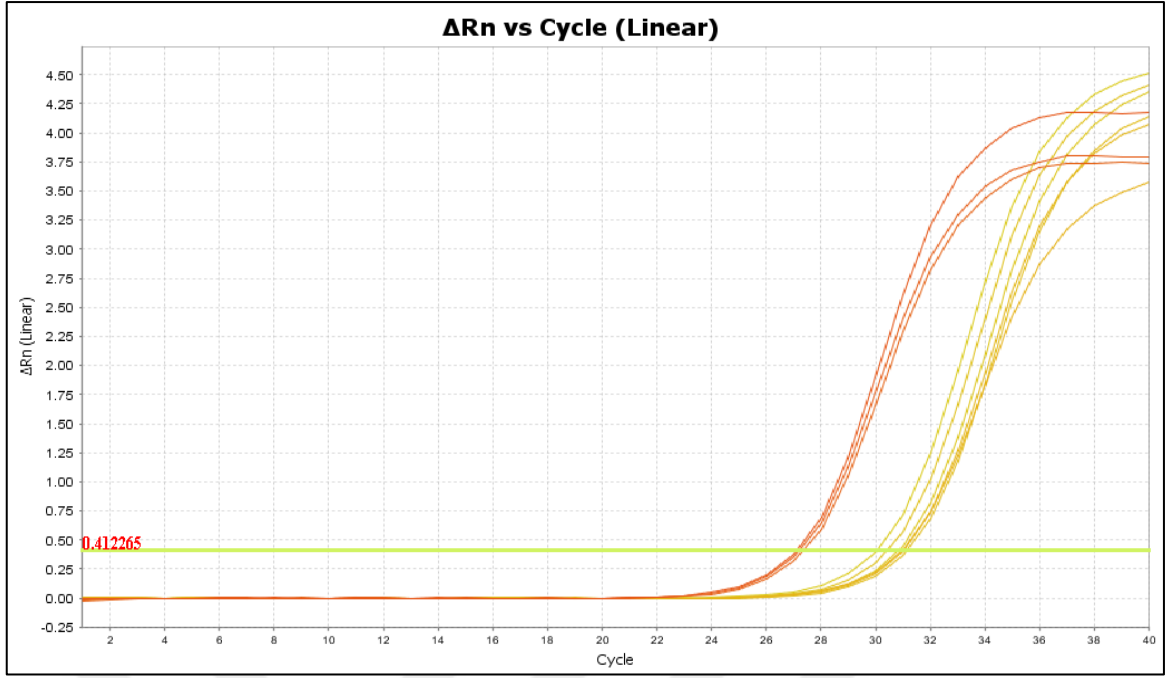
Şekil 44. *MtRD2* primerleri ve X20 genotipine ait örneklere ilişkin erime eğrileri



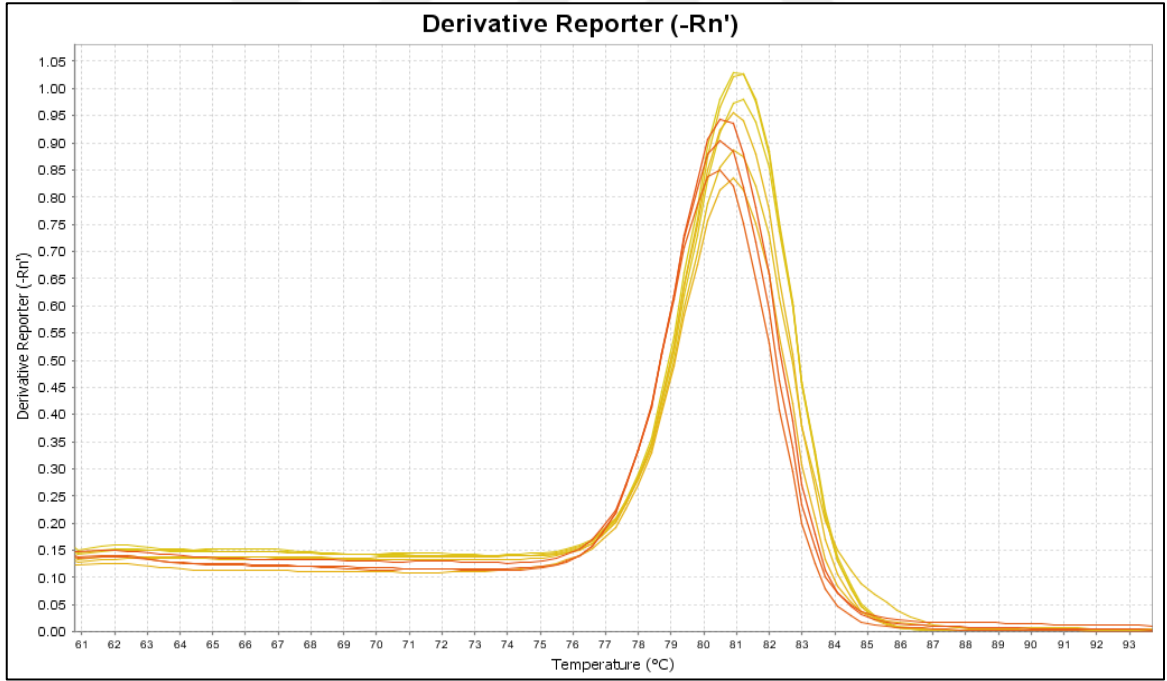
Şekil 45. *MtRD2* primerleri ve X50 genotipine ait örneklere ilişkin amplifikasyon eğrileri



Şekil 46. *MtRD2* primerleri ve X50 genotipine ait örneklere ilişkin erime eğrileri



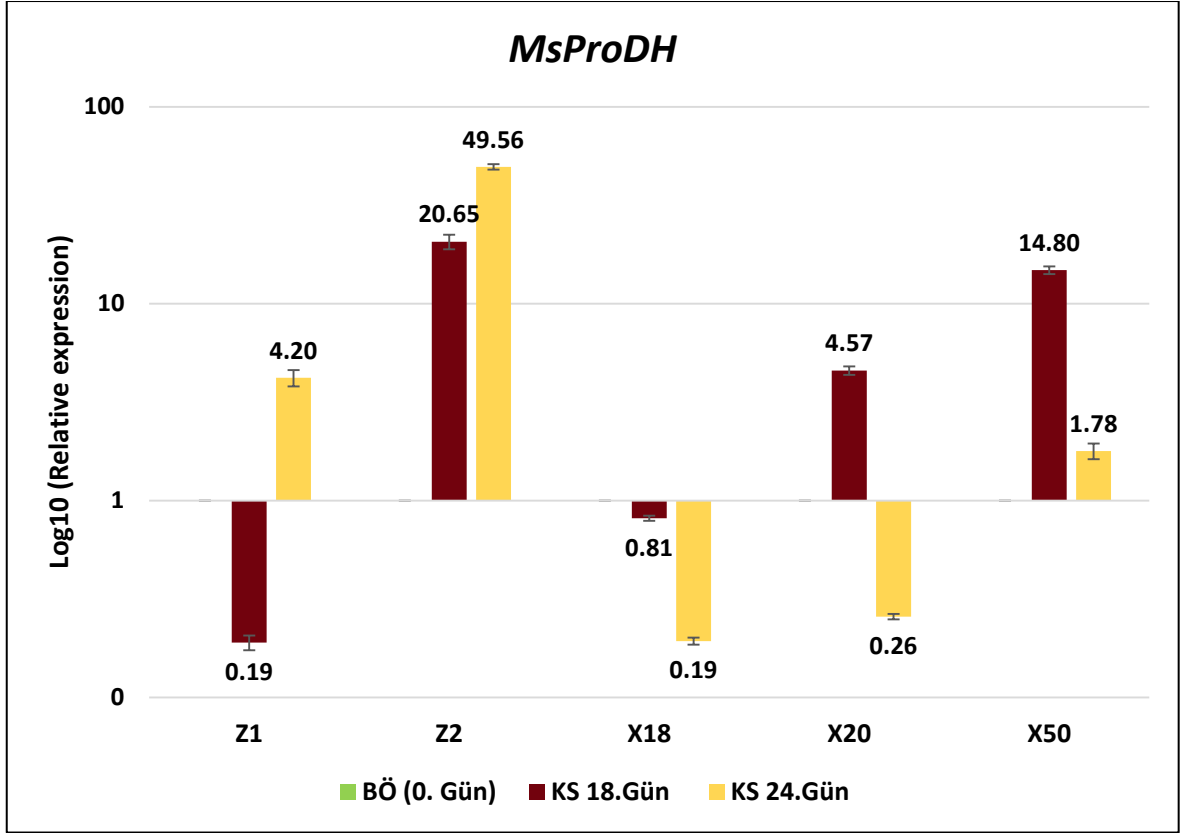
Şekil 47. *MtRD2* primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklere ilişkin amplifikasyon eğrileri



Şekil 48. *MtRD2* primerleri ve Z2 susuz kontrol bitkisine ait örneklere ilişkin erime eğrileri

4.9. Kuraklık Spesifik Genlerin Relatif Gen İfade Seviyeleri

Bilensoy-80 çeşidine ait aday mutant (M_3) yonca genotiplerinin birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresi altında *MsProDH* ve *MtRD2* genlerinin relatif ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 49 ve Şekil 50’de verilmiştir.



Şekil 49. Biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü alınan yaprak dokularında *MsProDH* geninin relatif gen ifadesine ilişkin grafik (n=3)

Birinci biçim sonrası sulanarak yetiştirilen Z1 sulu kontrol bitkisinin kuraklık stresinin 18. gününde *MsProDH* geninin relatif ifade seviyesi 0,19 olarak belirlenmiş ve aşağı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde ise bu genin relatif ifade seviyesinin 4,20 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 22 kat artarak yukarı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 49).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanarak yetiştirilen Z2 susuz kontrol bitkisinin kuraklık stresinin 18. gününde *MsProDH* genine ait relatif ifade seviyesi 20,65 olarak belirlenmiş ve yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde ise bu genin relatif ifade seviyesinin 49,56 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 2,5 kat artarak yukarı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 49).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanan X18 genotipinin kuraklık stresinin 18. gününde *MsProDH* genine ait relatif ifade seviyesi 0,81 olarak belirlenmiş ve aşağı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde bu genin relatif ifade seviyesinin daha da düşerek 0,19 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 4,6 kat azalarak aşağı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 49).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanan X20 genotipinin kuraklık stresinin 18. gününde *MsProDH* genine ait relatif ifade seviyesi 4,57 olarak belirlenmiş ve yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde bu genin relatif ifade seviyesinin düşerek 0,26 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 17,5 kat azalarak aşağı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 49).

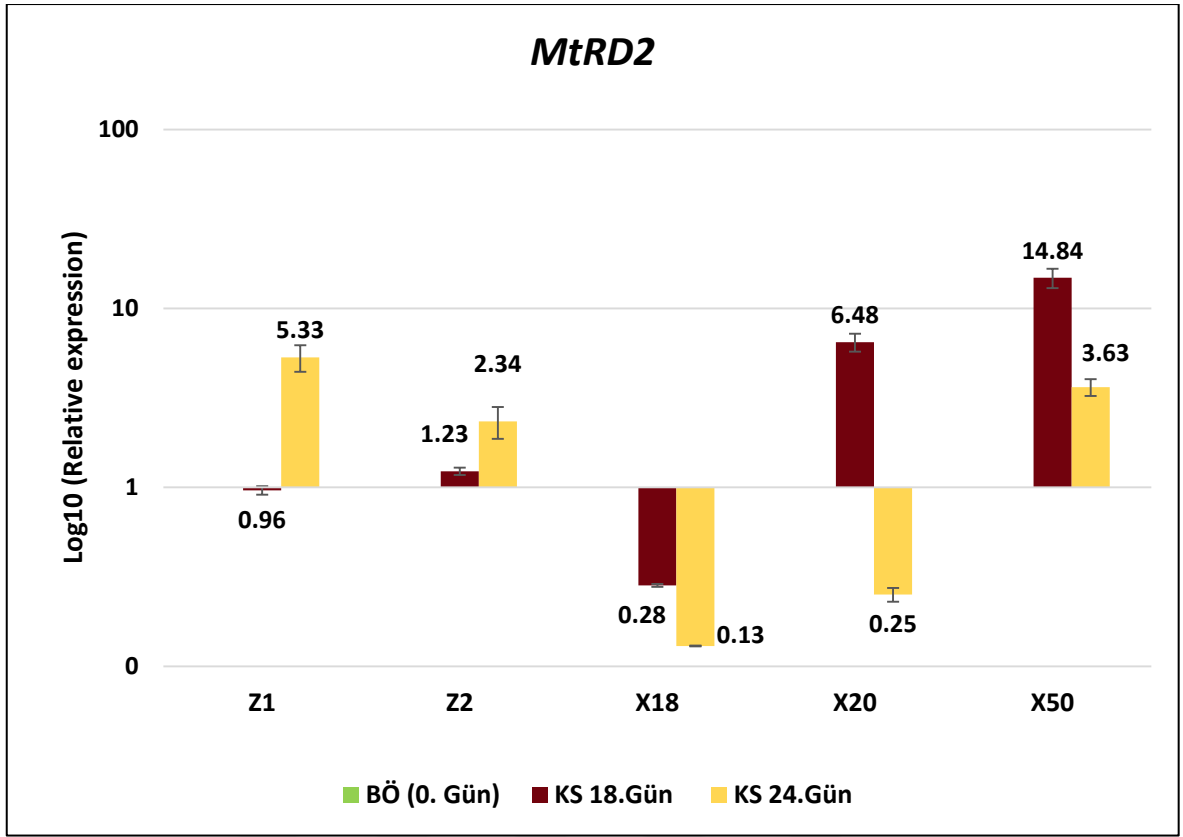
Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanan X50 genotipinin kuraklık stresinin 18. gününde *MsProDH* genine ait relatif ifade seviyesi 14,80 olarak belirlenmiş ve yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde bu genin relatif ifade seviyesinin düşerek 1,78 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 8,3 kat azalmasına rağmen yukarı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 49).

Bitkiler abiyotik stres faktörlerinden biri veya birkaçına maruz kaldıklarında hücrelerin oksidatif hasarlardan korunabilmesi için prolin sentezlemektedirler. Prolin birikimiyle ters orantılı olarak *ProDH* geninin ifade seviyesinde azalış meydana gelmektedir. Stresin ortadan kalkmasıyla birlikte prolin miktarı azalırken ve *ProDH* geninin ifadesi artmaktadır. Böylece bitkilerde strese karşı savunma cevabı oluşmaktadır (Szabados ve Savouré, 2010).

Bu çalışmada *MsProDH* geninin strese maruz bırakılan aday mutant yonca genotiplerinde düşük relatif ifade sergilediği tespit edilmiştir. Hem sulu hem de susuz kontrol bitkilerinde ise bu genin relatif ifade seviyelerinde artışların olduğu belirlenerek önceki yapılan çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Kurağa hassas ve tolerant olmak üzere iki farklı yonca üzerinde yapılan çalışmada *MtProDH* geninin kuraklık stresi altında hassas çeşide göre daha düşük ifade profili sergilediği bildirilmiştir (Quan ve diğerleri 2016).

Bu çalışmada aday mutant (M₃) yonca genotiplerinde kuraklık stresinin şiddetine bağlı olarak *MsProDH* geninin relatif ifade seviyesinde azalmalar tespit edilerek benzer sonuçlar elde edilmiştir ve bitki genotipi ile biçimin meydana getirmiş olduğu strese bağlı olarak *MsProDH* geninin relatif ifade seviyelerinde önemli varyasyonların olduğu belirlenmiştir.



Şekil 50. Biçim öncesi (0. gün), kuraklık stresinin 18. ve 24. günü alınan yaprak dokularında *MtRD2* geninin relatif gen ifadesine ilişkin grafik (n=3)

Birinci biçim sonrası sulanarak yetiştirilen Z1 sulu kontrol bitkisinin kuraklık stresinin 18. gününde *MtRD2* genine ait relatif ifade seviyesi 0,96 olarak belirlenmiş ve aşağı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde ise bu genin relatif ifade seviyesinin 5,33 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 5,5 kat artarak yukarı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 50).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanarak yetiştirilen Z2 susuz kontrol bitkisinin kuraklık stresinin 18. gününde *MtRD2* genine ait relatif ifade seviyesi 1,23 olarak belirlenmiş ve yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde ise bu genin relatif ifade seviyesinin 2,34 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 2 kat artarak yukarı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 50).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanan X18 genotipinin kuraklık stresinin 18. gününde *MtRD2* genine ait relatif ifade seviyesi 0,28 olarak belirlenmiş ve aşağı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde bu genin relatif ifade seviyesinin daha da düşerek 0,13 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 2,2 kat azalarak aşağı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 50).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanan X20 genotipinin kuraklık stresinin 18. gününde *MtRD2* genine ait relatif ifade seviyesi 6,48 olarak belirlenmiş ve yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde bu genin relatif ifade seviyesinin düşerek 0,25 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 26 kat azalarak aşağı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 50).

Birinci biçim sonrası kuraklık stresi uygulanan X50 genotipinin kuraklık stresinin 18. gününde *MtRD2* genine ait relatif ifade seviyesi 14,84 olarak belirlenmiş ve yukarı regülasyon sergilediği tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde bu genin relatif ifade seviyesinin düşerek 3,63 olduğu ve kuraklık stresinin 18. gününe göre 4 kat azalmasına rağmen yukarı regülasyon sergilediği belirlenmiştir (Şekil 50).

Tang ve diğerleri (2013), *GsZFP1* geninin transfer edilmesiyle geliştirilen kurağa tolerant transgenik yonca genotipleri yapay kuraklık stresine maruz bırakarak *MtRD2* geninin ifade seviyesi incelemişlerdir. *GsZFP1* geninin aşırı ifadesi sonucu *MtRD2* geni kuraklık stresi altında 3. ve 6. saatlerde yüksek ifade profili sergileyerek strese yanıt veren bir markör gen olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu genin ifadesinin hem WT (yabanıl tip) hem de transgenik bitkilerde kuraklık tarafından uyarıldığını ve zaman içerisinde benzer gen ifade modelleri sergilediğini tespit etmişlerdir.

Quan ve diğerleri (2016), yaptıkları çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan iki farklı yonca çeşidinde *MtRD2* geninin ifade seviyesini incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre *MtRD2* geninin tolerant yonca çeşidinde hassas çeşide göre kök ve yapraklarda daha yüksek ifade profili sergilediği belirlenmiştir.

Bu çalışmada ise aday mutant (M₃) yonca genotiplerinde kuraklık stresinin şiddetine bağlı olarak *MtRD2* geninin relatif ifade seviyesinde azalmaların meydana geldiği ve önemli varyasyonların olduğu tespit edilmiştir. Bu varyasyonların genotipler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı ve bitki genotipi ile biçimin meydana getirmiş olduğu strese bağlı olarak *MtRD2* geninin relatif ifade seviyesinde azalmalara neden olduğu belirlenmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, aseptik şartlarda kurağa toleranlığı tespit edilen ve saksılarda kontrollü şartlarda yetiştirilen aday mutant yonca genotiplerine, birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresinin *MsProDH* ve *MtRD2* genlerinin relatif ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler ile bazı agro-morfolojik özelliklerin yanı sıra bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarlarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Kontrollü şartlarda yetiştirilen aday mutant (M₃) yonca genotiplerine ait fidelerin saksılara transfer edilmesinden itibaren çiçek tomurcuğu oluşturma gün sayıları kayıt altına alınarak aday mutant genotiplerin kontrol bitkilerine göre daha kısa sürede çiçek tomurcuğu evresine geldiği tespit edilmiştir. Bitkilerin biçim öncesi (0. gün) , kuraklık stresinin 18. günü ve 24. günü incelenen agro-morfolojik özellikler bitki genotipine ve uygulanan kuraklık stresinin süresine bağlı olarak önemli farklılıklar göstermiştir.

Bazı agro-morfolojik özellikler, bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarlarına ait veriler SAS istatistik paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamalar en küçük asgari fark (LSD) %5 önemlilik seviyesinde test edilmiştir. Kuraklık stresinin 6, 9, 12, 15, 18, 21 ve 24. günlerinde ölçülen bitki kanopy sıcaklıklarına ait varyans analiz sonuçları değerlendirildiğinde genotipler arası önemli varyasyonlar tespit edilmiştir.

X18, X20, X50 mutant genotipler ile Z1(sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinin biçim öncesi (0. gün) total klorofil miktarları sırasıyla 58,48, 60,27, 65,55, 70,88, 58,08 mg/kg tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 18. gününde X18, X20, X50 mutant bitkiler ile Z1 ve Z2 kontrol bitkilerinin total klorofil miktarı sırasıyla 48,66, 53,98, 56,96, 38,95, 46,05 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde ise bitkilerin total klorofil miktarları sırasıyla 53,41, 49,22, 45,67, 46,21, 47,69 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin total klorofil miktarları biçim öncesine (0. gün) kıyasla kuraklık stresinin 18. gününde X18, X20, X50 mutant bitkiler ile Z1 ve Z2 kontrol bitkilerinde sırasıyla %16,77, %10,43, %13,10, %45,04 ve %18,63 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin 18. gününe kıyasla 24. günde X18, X20, X50 mutant bitkiler ile Z1 ve Z2 kontrol bitkilerinde sırasıyla %9,74 artış, %8,81 azalış, %19,82 azalış, %18,63 artış, %3,56 artış belirlenmiştir ve her bir genotipin kuraklık stresine karşı verdikleri tepkilerin farklı olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında tespit edilen agro-morfolojik özelliklerin yanı sıra bitki kanopy sıcaklığı ve total klorofil miktarları genel olarak değerlendirildiğinde mutant yonca genotiplerinin birinci biçim sonrası ortaya çıkan 24 günlük kuraklık stresini kontrol bitkilerine göre çok daha iyi tolere edebildiklerini göstermiştir.

Birinci biçim sonrası uygulanan kuraklık stresine maruz kalan mutant yonca genotiplerinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna göre *MsProDH* ve *MtRD2* genlerinin relatif ifade seviyelerinde önemli değişimler meydana geldiği belirlenmiştir. Bu değişimler bitki genotipine ve uygulanan kuraklık stresinin süresine bağlı olarak önemli farklılıklar göstermiştir.

X18, X20, X50 mutant bitkiler ile Z1 (sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinin *MsProDH* relatif gen ifade seviyeleri kuraklık stresinin 18. gününde sırasıyla 0,81, 4,57, 14,80, 0,19, 20,65 olurken 24. günde sırasıyla 0,19, 0,26, 1,78, 4,20, 49,56 olarak belirlenmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde 18. güne kıyasla *MsProDH* relatif gen ifade seviyesi X18'de 4,6 kat artış ile yukarı regülasyon, X20'de 17,5 kat azalış ile aşağı regülasyon, X50'de 8,5 kat azalış olmasına rağmen yukarı regülasyon, Z1'de 22 kat artış ile yukarı regülasyon ve Z2'de 2,5 kat artış ile yukarı regülasyon göstermiştir.

X18, X20, X50 mutant bitkiler ile Z1 (sulu) ve Z2 (susuz) kontrol bitkilerinin *MtRD2* relatif gen ifade seviyeleri kuraklık stresinin 18. gününde sırasıyla 0,28, 6,48, 14,84, 0,96, 1,23 olurken 24. günde sırasıyla 0,13, 0,25, 3,63, 5,33, 2,34 olarak belirlenmiştir. Kuraklık stresinin 24. gününde 18. güne kıyasla *MtRD2* relatif gen ifade seviyesi X18'de 2,5 kat azalış ile aşağı regülasyon, X20'de 26 kat azalış ile aşağı regülasyon, X50'de 4 kat azalış olmasına rağmen yukarı regülasyon, Z1'de 5,5 kat artış ile yukarı regülasyon ve Z2'de 2 kat artış ile yukarı regülasyon göstermiştir.

Çalışma sonuçları birinci biçim sonrası kuraklık stresine maruz bırakılan mutant yonca genotiplerinin kurağa tolerantlık seviyelerinin farklı şekillerde regüle olduğunu, biçim stresi ile birlikte *MsProDH* ve *MtRD2* genlerinin relatif ifade seviyelerinde mutant bitki genetik geri planına (genetic background) bağlı olarak çok değişken tepkiler verdiklerini göstermiştir. Sonuçlar aynı zamanda kullanılan kuraklık ile ilişkili lokus spesifik genlerin kuraklık stresine yönelik çalışmalarda başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Aberathne, W., Hewawasam, W., and Bandara, D. (2004). New phenotypes of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through *in vitro* culture and induced mutations.
- Açıkgöz, E. (2001). Yem bitkileri. (Yenilenmiş 3. baskı). Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, Vipaş A.Ş. Yayın No: 58, İstanbul.
- Akar, T., Francia, E., Tondelli, A., Rizza, F., Stanca, A. M., and Pecchioni, N. (2009). Marker-assisted characterization of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*, 128(4), 381-386.
- Akhtar, M., Jaiswal, A., Taj, G., Jaiswal, J. P., Qureshi, M. I., and Singh, N. K. (2012). *DREB1/CBF* transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Journal of genetics*, 91(3), 385-395.
- Amtmann, A., Bohnert, H. J., and Bressan, R. A. (2005). Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.
- Annicchiarico, P. (2006). Diversity, genetic structure, distinctness and agronomic value of Italian lucerne (*Medicago sativa* L.) landraces. *Euphytica*, 148(3), 269-282.
- Avcıoğlu, R., Geren, H., ve Tamkoç, A. (2009). Yonca (*Medicago sp* L.). Yem bitkileri. Baklagil Yem Bitkileri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. İzmir: Ed. Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R., Karadağ, Y.) Cilt II.
- Avcıoğlu, R., Soya, H., Açıkgöz, E., ve Tan, A. (2000). Yem bitkileri üretimi. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Yayın No: 38, Cilt I (567-586), Ankara.
- Bakır, M. (2012). *Asma çeşit ve anaçlarında kuraklık ve tuz stresi toleranlığına yönelik mikrodizin analizleri ve stres ile ilgili transkriptomların tespiti*. Yayınlanmış Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Balkan A. (2011). *Ekmeklik buğdayda (Triticum aestivum L.) kurağa dayanıklılıkla ilişkili morfolojik ve fizyolojik özelliklerin saptanması üzerine araştırmalar*. Yayınlanmış Doktora Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>

- Baloglu, M. C., Eldem, V., Hajyzadeh, M., and Unver, T. (2014). Genome-wide analysis of the *bZIP* transcription factors in cucumber. *PloS one*, 9(4), e96014.
- Bhargava, S., and Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132(1), 21-32.
- Bhatnagar-Mathur, P., Devi, M. J., Reddy, D. S., Vadez, V., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Sharma, K. K. (2006). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* *DREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) for improving tolerance to drought stress (poster presentation). In *Arthur M. Sackler Colloquia on "From Functional Genomics of Model Organisms to Crop Plants for Global Health"*.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 2(2), 48-54.
- Brown, T. A. (2002). Mutation, repair and recombination. In *Genomes. 2nd edition*. Wiley-Liss.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Bustin, S. A., and Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109(4), 365-379.
- Carmen, D., and Nedelea, G. (2012). The effect of genotype and water stress on germination ability of seeds in some alfalfa varieties. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16(1), 153-156.
- Carnicer, J., Coll, M., Ninyerola, M., Pons, X., Sanchez, G., and Penuelas, J. (2011). Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1474-1478.
- Caruso, A., Cheddor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F. M., Kahlem, G., and Morabito, D. (2008). Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(9), 932-941.
- Castonguay, Y., Michaud, J., and Dubé, M. P. (2015). Reference genes for RT-qPCR analysis of environmentally and developmentally regulated gene expression in alfalfa. *American Journal of Plant Sciences*, 6(01), 132.
- Castroluna, A., Ruiz, O. M., Quiroga, A. M., and Pedranzani, H. E. (2014). Effects of salinity and drought stress on germination, biomass and growth in three varieties of *Medicago sativa* L. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18(1), 39-50.

- Cattivelli, L., Baldi, P., Crosatti, C., Di Fonzo, N., Faccioli, P., Grossi, M., Mastrangelo, A.M., Pecchioni, N. and Stanca, A. M. (2002). Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant molecular biology*, 48(5-6), 649-665.
- Cecchini, N. M., Monteoliva, M. I., and Alvarez, M. E. (2011). Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(4), 1947-1959.
- Chang, E., Shi, S., Liu, J., Cheng, T., Xue, L., Yang, X., Yang, W., Lan, Q. and Jiang, Z. (2012). Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR. *PloS one*, 7(3), e33278.
- Conner, J. K. (2002). Genetic mechanisms of floral trait correlations in a natural population. *Nature*, 420(6914), 407.
- Cook, B. G., Pengelly, B. C., Brown, S. D., Donnelly, J. L., Eagles, D. A., Franco, M. A., and Schultze-Kraft, R. (2005). Tropical forages: an interactive selection tool.
- Cook, D. R. (1999). *Medicago truncatula* model in the making. *Current opinion in plant biology*, 2(4), 301-304.
- Çarpıcı, E. B., ve Erdel, B. (2015). Bazı yonca çeşitlerinde (*Medicago sativa* L.) kuraklık stresinin çimlenme özellikleri üzerine etkisi. *Derim*, 32(2), 201-210.
- Demiroğlu, G., Geren, H., ve Avcıoğlu, R. (2008). Farklı yonca (*Medicago sativa* L.) genotiplerinin Ege Bölgesi koşullarına adaptasyonu. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*.
- De Oliveira Collet, S.A., Collet, M.A. and Maria de Fátima, P. (2005). Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L.(Vitaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(7), 691-703.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., and Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37(1), 112-119.
- Dobres, M. S. (2008). Barriers to genetically engineered ornamentals: an industry perspective. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 1, 14.
- Efeoglu, B., ve Terzioglu, S. (2009). Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature. *EurAsia J. BioSci*, 3, 97-106.
- Elçi, Ş. (2005). Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri. TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. *Mart Matbaası-İstanbul, Ankara*.

- FAO and IAEA, (2019). Mutant variety database. Web Sitesi: <https://mvd.iaea.org/#!/Search?page=1&size=500&sortby=Name&sort=ASC>, Erişim Tarihi: 02.07.2019.
- Fischer, R. A. (2001). Selection traits for improving yield potential. *Application of physiology in wheat breeding*, 13, 148-159.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., and Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317-342.
- Ghandilyan, A., Barboza, L., Tisné, S., Granier, C., Reymond, M., Koornneef, M., Schat, H. and Aarts, M. G. (2009). Genetic analysis identifies quantitative trait loci controlling rosette mineral concentrations in *Arabidopsis thaliana* under drought. *New Phytologist*, 184(1), 180-192.
- Gholami, A., De Geyter, N., Pollier, J., Goormachtig, S., and Goossens, A. (2014). Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Natural product reports*, 31(3), 356-380.
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6), 503-512.
- Griffiths, A., Miller, J.F., Susuki, D., Lewontin, R. C., and Gelbart, W. M. (1996). Gene Mutation. W.H. Freeman and Company, New York, 181- 210.
- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., and Gutierrez, L. (2009). Normalization of RT-qPCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*, 60(2), 487-493.
- Guha, B., and Khuda-Bukhsh, A. R. (2002). Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate. *Chemosphere*, 47(1), 49-56.
- Günel, T. (2007). Gen anlatımının kantitatif analizi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(5), 763-767.
- Günel, T., ve Aydın, K. (2009). Real Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 43-45.
- Hamidi, H., and Safarnejad, A. (2010). Effect of drought stress on alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) in germination stage. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 8(6), 705-709.

- Hanson, A. A. (1988). *Alfalfa and alfalfa improvement*. D. K. Barnes, R. R. Hill, G. H. Heichel, K. T. Leath, O. J. Hunt, G. C. Marten, G. C. & C. W. Stuber (Eds.). Madison, WI: American society of agronomy.
- Hayashi, F., Ichino, T., Osanai, M., and Wada, K. (2000). Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology*, 41(10), 1096-1101.
- Hazen, S. P., Pathan, M. S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang, H.S., Zhu, T., Kreps, J.A., and Nguyen, H. T. (2005). Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional & integrative genomics*, 5(2), 104-116.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Heuzé, V., Tran, G., Boval, M., Noblet, J., Renaudeau, D., Lessire, M., and Lebas, F. (2016). Alfalfa (*Medicago sativa*). *Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO*.
- Hewawasam, W. D. C. J., Bandara, D. C., and Aberathne, W. M. (2004). New phenotypes of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through in vitro culture and induced mutations.
- Hooftman R. N. (1981). The induction of chromosome-aberrations in *Notobranchius rachowi* (Pisces, Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methane sulfonate or benzo[a]pyrene” *Mutation Research*, 91(4- 5), 347-352.
- Hofmann, N. E., Raja, R., Nelson, R. L., and Korban, S. S. (2004). Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 48(2), 173-177.
- Hou, S., Zhu, G., Li, Y., Li, W., Fu, J., Niu, E., Li, L., Zhang, D., and Guo, W. (2018). Genome-wide association studies reveal genetic variation and candidate genes of drought stress related traits in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontiers in plant science*, 9, 1276.
- Jenks, M. A., Hasegawa, P. M., and Jain, S. M. (2007). Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops (pp. 261-283). Dordrecht: Springer.
- Kalefetoğlu, T., and Ekmekci, Y. (2005). The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740.

- Kaplan, Ş., Güçlü, Ş., Baytekin, G., ve Tiryaki, İ. (2015). Yonca (*Medicago sativa* L.) ve çayır üçgülü (*Trifolium pratense* L.) tohumlarının tuz ve kuraklık stresine verdikleri tepkilerin belirlenmesi. *Türkiye*, 11, 7-10.
- Kenganal, M., Hanchinal, R. R., and Nadaf, H. L. (2008). *Ethyl methanesulfonate* (EMS) induced mutation and selection for salt tolerance in sugarcane in vitro. *Indian J Plant Physiol*, 13, 405-410.
- Koç, A., ve Tan, M. (1996). Erzurum meralarında doğal olarak yetişen melez yonca (*Medicago varia* L.)'nın bazı özellikleri. *Türkiye*, 3, 17-19.
- Kozera, B., and Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*, 54(4), 391-406.
- Kömürcü-Bayrak, E., ve Erginel-Ünaltuna, N. (2011). Gen anlatımı analiz yöntemlerine genel bakış. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 28-35.
- Könen S., ve Çavaş T. (2008). Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 49, 434-438.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., and Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Lacefield, G., Ball, D., Hancock, D., Andrae, J., and Smith, R. (2009). Growing Alfalfa in the South. *National Alfalfa and Forage Alliance*.
- Lanceras, J. C., Pantuwan, G., Jongdee, B., and Toojinda, T. (2004). Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant physiology*, 135(1), 384-399.
- Lawlor, D. W., and Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of botany*, 103(4), 561-579.
- Levitt, J., and Levitt, J. (1987). Responses of plants to environmental stresses (Vol. 2). New York: Academic Press.
- Li, R. H., Guo, P. G., Michael, B., Stefania, G., and Salvatore, C. (2006). Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, 5(10), 751-757.
- Li, X., and Brummer, E. C. (2012). Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy*, 2(1), 40-61.

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lopes, M. S., Rebetzke, G. J., and Reynolds, M. (2014). Integration of phenotyping and genetic platforms for a better understanding of wheat performance under drought. *Journal of experimental botany*, 65(21), 6167-6177.
- Luan, Y. S., Zhang, J., Gao, X. R., and An, L. J. (2007). Mutation induced by Ethylmethane sulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*, 88(1), 77-81.
- Mengü, G. P., Anaç, S., and Özçakal, E. (2011). Drought management strategies. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(2), 175-181.
- Miller, G., Stein, H., Honig, A., Kapulnik, Y., and Zilberstein, A. (2005). Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation. *Planta*, 222(1), 70-79.
- Mishra, A. K., and Singh, V. P. (2010). A review of drought concepts. *Journal of hydrology*, 391(1-2), 202-216.
- Monis, P. T., Giglio, S., and Saint, C. P. (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical biochemistry*, 340(1), 24-34.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6), 954-8.
- Moussa, H. R., and Abdel-Aziz, S. M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1(1), 31-36.
- Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118(4), 1233-1241.
- Ndou, V. N. (2012). *Chemical mutagenesis of wheat for herbicide resistance*. Doctoral Dissertation. University of KwaZulu-Natal, College of Agriculture, Engineering and Science, Pietermaritzburg, South Africa. Erişim adresi: <http://ukzn-dspace.ukzn.ac.za/handle/10413/10040>

- Örs, S., ve Ekinici, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, 32(2), 237-250.
- Öten, M., Çeçen, S., ve Erdurmuş, C., (2016). Antalya doğal florasında bulunan yonca (*Medicago* sp.) türlerinin toplanması ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25, 195-199.
- Peng, C., Ma, Z., Lei, X., Zhu, Q., Chen, H., Wang, W., Liu, S., Li, W., Fang, X., and Zhou, X. (2011). A drought-induced pervasive increase in tree mortality across Canada's boreal forests. *Nature climate change*, 1(9), 467.
- Peng, Z., Lu, Q., and Verma, D. P. S. (1996). Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(3), 334-341.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-qPCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.
- Powell, G. W., and Bork, E. W. (2005). Simulated aspen understory microclimate effects on alfalfa growth. *Agronomy journal*, 97(5), 1361-1366.
- Quan, W., Liu, X., Wang, H., and Chan, Z. (2016). Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1256.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., and Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(4), 856-862.
- Radović, J., Sokolović, D., and Marković, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475.
- Roche, (2015). LightCycler® 480 SYBR Green I Master. <https://www.n-genetics.com/products/1295/1023/14087.pdf>
- Romo, S., Labrador, E., and Dopico, B. (2001). Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(11), 1017-1026.

- Sabancı, C. O. (2009). Baklagil yem bitkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vakfı Yayınları* 2, 224s.
- Sadeghi-Shoae, M., Paknejad, F., Shahbazpanahi, B., and Tookaloo, M. R. (2014). Florescence parameters, chlorophyll content and relative water content (RWC) of wheat varieties as affected by different regimes of irrigation. *International Journal of Biosciences*, 4(5), 135.
- Sairam, R. K., and Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current science*, 407-421.
- Saleem, M. Y., Mukhtar, Z., Cheema, A. A., and Atta, B. M. (2005). Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2(2), 141-145.
- Samota, M. K., Sasi, M., Awana, M., Yadav, O. P., Amitha Mithra, S. V., Tyagi, A., Kumar, S., and Singh, A. (2017). Elicitor-induced biochemical and molecular manifestations to improve drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through seed-priming. *Frontiers in plant science*, 8, 934.
- Semerci, H., Öztürk, H., Semerci, A., İzbirak, A., ve Ekmekçi, Y. (2008). Değişik ıslah zonlarından örneklenen Anadolu Karaçamı (*Pinus Nigra* Arnold. ssp. nigra var. caramanica (Loudon) Rehder) orijinlerinin dona ve kuraklığa dayanıklılıklarının belirlenmesi. *TC Çevre ve Orman Bakanlığı Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü, Teknik Bülten*, (21).
- Singh, D., Singh, C. K., Taunk, J., Tomar, R. S. S., Chaturvedi, A. K., Gaikwad, K., and Pal, M. (2017). Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC genomics*, 18(1), 206.
- Small, E. (2010). Alfalfa and relatives: Evolution and classification of *Medicago*. NRC Research Press.
- Soroka, A., ve Lyakh, V., 2009. Genetic variability in sunflower after mutagen treatment of immature embryos of different ages. *HELIA*, 32(51), 33-46.
- Soya, H., Avcıoğlu R., ve Geren H., 2004. Yem bitkileri (İkinci Basım), Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul. 38-47.
- Soya, H., ve Kavut, Y. T. (2004). *Bazı yeni yonca (Medicago sativa L.) çeşitlerinin Bornova koşullarındaki performansları üzerine bir araştırma*. Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>

- Summers, C. G., and Putnam, D. H. (2008). Irrigated alfalfa management for Mediterranean and desert zones (Vol. 3512). *UCANR Publications*, 126-150.
- Suttie, J. M. (2000). Hay and straw conservation: for small-scale farming and pastoral conditions (No. 29). Food and Agriculture Org.
- Szabados, L., and Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Şanlıdilek, D. S. (2009). *Light cyclers real time pcr teknolojisi ile faktör V geninde yeni mutasyon taranması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü. Ankara. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Şeker, H. (2003). Doğu yoncasından elde edilen hatların Kayseri ve Bilensoy-80 çeşitleriyle mukayeseli yaş/kuru ot verimleri ve kuru ot verimlerinin biçimlere göre dağılımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(4).
- Şeker, H., Tahtacıoğlu, L., ve Aygün, C. (2003). Doğu Anadolu yoncasından elde edilen hatların Kayseri ve Bilensoy-80 çeşitleriyle karşılaştırmalı genel mahsul büyüme oranları ve bazı morfolojik özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(4).
- Talebi, R. (2011). Evaluation of chlorophyll content and canopy temperature as indicators for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 1457-1462.
- Tang, L., Cai, H., Ji, W., Luo, X., Wang, Z., Wu, J., Wang, X., Cui, L., Wang, Y., Zhu, Y., and Bai, X. (2013). Overexpression of *GsZFP1* enhances salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology and biochemistry*, 71, 22-30.
- Teulat, B., Monneveux, P., Wery, J., Borries, C., Souyris, I., Charrier, A., and This, D. (1997). Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytologist*, 137(1), 99-107.
- Tilaki, G. A. D., Behtari, B., and Behtari, B. (2009). Effect of salt and water stress on the germination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed. *Volga Ecological Journal*, (2), 158-164.
- Tiryaki, İ. (2016). Yoncada (*Medicago sativa* L.) Kuraklık stresi ve toleranlık mekanizması. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 19(3), 296-304.
- Tobin, A. J., and Dusheck, J. (2001). *Asking About Life*, 2nd ed. New York, NY: Harcourt College Publishing. Adapted from figure 13.7.

- Tuberosa, R., and Salvi, S. (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in plant science*, 11(8), 405-412.
- Tucak, M., Popovic, S., Cupic, T., Simic, G., Gantner, R., and Meglic, V. (2009). Evaluation of alfalfa germplasm collection by multivariate analysis based on phenotypic traits. *Romanian Agricultural Research*, 26, 47-52.
- TÜİK, (2018). *Bitkisel üretim veritabanı*. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> Erişim Tarihi (24.11.2018).
- Van der Velden, V. H. J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and Van Dongen, J. J. M. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17(6), 1013.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 34.
- Verbruggen, N., and Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35(4), 753-759.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
- Verslues, P. E., and Juenger, T. E. (2011). Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 240-245.
- Verslues, P. E., Kim, Y. S., and Zhu, J. K. (2007). Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate: glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant molecular biology*, 64(1-2), 205-217.
- Vicente-Serrano, S. M., Lopez-Moreno, J. I., Beguería, S., Lorenzo-Lacruz, J., Sanchez-Lorenzo, A., García-Ruiz, J. M., C., Morán-Tejeda, E., Revuelto, J., Trigo, and Coelho, F. (2014). Evidence of increasing drought severity caused by temperature rise in southern Europe. *Environmental Research Letters*, 9(4), 044001.
- Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Deng, X. P., and Kwak, S. S. (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 570-577.

- Warrington, J. A., Nair, A., Mahadevappa, M., and Tsyganskaya, M. (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiological genomics*, 2(3), 143-147.
- Williams, A. P., Allen, C. D., Macalady, A. K., Griffin, D., Woodhouse, C. A., Meko, D. M., Swetnam, T.W., Rauscher, S.A., Seager, R., Grissino- Mayer, H. D., Dean, J. S., Cook, E. R., Gangodagamage, C., Cai, M., and McDowell, N. G. (2013). Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality. *Nature climate change*, 3(3), 292.
- Wissuwa, M., Smith, S. E., and Ottman, M. J. (1997). Crown moisture and prediction of plant mortality in drought-stressed alfalfa. *Irrigation Science*, 17(2), 87-91.
- Wong, M. L., and Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Yeşil, M., ve Şengül, S. (2009). Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanan yonca ekotiplerinin bazı morfolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 16(1), 1-6.
- Yüzbaşıoğlu, A. (2008). *Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi*. Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü. Ankara. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Zhang, J., Duan, Z., Zhang, D., Zhang, J., Di, H., Wu, F., and Wang, Y. (2016). Co-transforming bar and CsLEA enhanced tolerance to drought and salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biochemical and biophysical research communications*, 472(1), 75-82.
- Zhang, W. J., and Wang, T. (2015). Enhanced salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) by *rstB* gene transformation. *Plant Science*, 234, 110-118.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Selçuk ÇETİN
Doğum Yeri : Fatsa
Doğum Tarihi : 10.07.1993

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 2017
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 2020
Doktora Öğrenimi :
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce (Orta)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

- 1) SCI
- 2) Diğer

b) Bildiriler

- 1) Uluslararası

Çetin, S., Sarı, U., Tiryaki, İ., Yaygın Yoncada (*Medicago sativa* L.) Biçim Sonrası Uygulanan Kuraklık Stresinin Bazı Spesifik Genlerin İfade Seviyelerinde Meydana Getirdiği Değişimlerin Belirlenmesi, III. International Conferance on Awareness, 5 – 7 December 2019 (**Sözlü Sunum**).

Tiryaki, İ., Sarı, U., Acar, O., Kaya, Ç., **Çetin, S.**, *In-vitro* Screening of Mutant *Medicago sativa* Genotypes for Drought Stress Tolerance at Germination Stage, Global Conference on Plant Science and Research, 23 – 25 September 2019, Valencia, Spain (**Sözlü Sunum**).

Çetin, S., Kaya, Ç., Sarı, U., Tiryaki İ., Çimlenme Evresinde Kurağa Tolerant Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Tespitinde *In-vitro* Şartların Belirlenmesi, I.

International Agriculture, Environment and Health Congressi, 26 Ekim 2019 - 28 Ekim 2019 (**Poster Sunumu**).

Celep, B., Yılmaz, E. G., Kaya, Ç., Çavuşoğlu E., **Çetin, S.**, Tiryaki, İ., The Effects Of Some Medicinal-Aromatic Plant Extracts On Germination Performance of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes,, I. International Symposium on Biodiversity Research, 02 Mayıs 2019 - 04 Mayıs 2019 (**Poster Sunumu**).

Çavuşoğlu E., Kaya, Ç., **Çetin, S.**, Tiryaki İ., Morphological Characterization of Some Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Mutants, I. International Symposium on Biodiversity Research, 02 Mayıs 2019 - 04 Mayıs 2019 (**Poster Sunumu**).

Yılmaz, E. G., Sarı, U., **Çetin S.**, Kaya Ç., Tiryaki, İ.,, Determination of Local Hulled Einkorn (*Triticum monococcum* L.) Genotype Differences by Molecular Markers, I. International Symposium on Biodiversity Research, 02 Mayıs 2019 - 04 Mayıs 2019 (**Poster Sunumu**).

Kaya, Ç., **Çetin, S.**, Sarı, U., Tiryaki, İ., Yonca (*Medicago sativa* L.)’da *In-vitro* Çalışmalar İçin Etkin Tohum Sterilizasyon Yönteminin Belirlenmesi, I. International Agriculture, Environment ve Health Congress, 26 Ekim 2018 - 28 Ekim 2018 (**Poster Sunumu**).

Çetin, S., Tiryaki, İ., Ultra Düşük Sıcaklıkların Kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Tohumlarının Çimlenme Performansı Üzerine Olan Etkileri, III. Plant Physiology Symposium with International Participation, 26 Eylül 2018 - 29 Eylül 2018 (**Poster Sunumu**).

Çetin, S., Kaya, Ç., Sarı, U., Tiryaki, İ., Bazı Bitki Hormonlarının Farklı Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Klonal Yolla Çoğaltılması Üzerine Etkileri, III. Plant Physiology Symposium with International Participation, 26 Eylül 2018 - 29 Eylül 2018 (**Poster Sunumu**).

Celep, B., **Çetin S.**, Kaya, Ç., Tiryaki, İ., Tuz Stresinin Bazı Farklı Mercimek (*Lens culinaris*) Genotiplerinin Çimlenme Performansı Üzerine Etkileri, III. Plant Physiology

Symposium with International Participation, 26 Eylül 2018 - 29 Eylül 2018 (**Sözlü Sunum**).

Şahin T., Kaya Ç., **Çetin S.**, Tiryaki İ., Bazı Aromatik Bitki Özütlerinin Yüksek Otlak Ayırığı (*Agropyron elongatum*) Tohumlarının Çimlenme Performansı Üzerine Etkileri, III. Plant Physiology Symposium with International Participation, 26 Eylül 2018 - 29 Eylül 2018 (**Poster Sunumu**).

2) Ulusal

c) Katıldığı Projeler

Araştırma Bursiyeri, 116 O 417, Kurağa Tolerant Yaygın Yonca (*Medicago sativa*) Genotiplerinin Gelistirilmesi, **TÜBİTAK-1001 ARDEB, TOVAG - Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu**, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 31.10.2017 - 01.10.2019, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 01.04.2017 - 01.10.2019.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

- ✓ Anadolu Etap Penkon Gıda ve Tarım Ürünleri Sanayi ve Tic. A.Ş., Meyve Üretim Tesisi, Çanakkale, Gönüllü Stajyer Mühendis, 2015-2016
- ✓ Monsanto Gıda ve Tarım Tic. Ltd. Şti., Tohumluk Hibrid Mısır Üretimi, Çanakkale/Kumkale, Stajyer Mühendis, 2015-2016

İLETİŞİM

E-posta Adresi : selcukcetin@stu.comu.edu.tr / selcukkctinn@hotmail.com

ORCID : 0000-0002-8805-6791