

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA NOHUT GEVENİ (*Astragalus cicer*  
L.)'NE GEN AKTARIMI

-

Derya GÜRLEK

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2006

Her Hakkı Saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA NOHUT GEVENİ (*Astragalus cicer* L.)'NE GEN AKTARIMI

Derya GÜRLEK

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Bu çalışmanın amacı, nohut gevenine (*Astragalus cicer* L.) *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yönteminin geliştirilmesidir. Öncelikle adventif sürgün rejenerasyon oranını yükseltmek için, *in vitro*'da hipokotil ve kotiledon eksplantları değişik oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, kinetin, TDZ ve IBA) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, en yüksek indirek adventif sürgün rejenerasyon oranı (%53.3) ve eksplant başına sürgün sayısı (3.3), 1.0-2.0 mg/l BAP ve 0.2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında ve hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Gen aktarımı çalışmalarında, pAoPR1 GUS-INT, pPR1a GUS ve p35S GUS-INT vektörlerini içeren 2260 *A. tumefaciens* hatları ile hipokotil eksplantları değişik inokulasyon ve ko-kültivasyon metotlarıyla inoküle ve ko-kültive edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, tüm bakteri hatları için, en uygun inokulasyon süresinin 30 dk, ko-kültivasyon süresinin 48 saat ve en uygun ko-kültivasyon ortam fazının ise sıvı rejenerasyon ortamı olduğu belirlenmiştir. Seçici ortamda gelişen kalluslardan elde edilen sürgünler seçici köklendirme ortamında (1/2 MS + 0.25 mg/l NAA) köklendirilmiştir. Yapılan histo-kimyasal GUS analizi sonucunda köklenen bitkiciklerin tamamının GUS negatif olduğu görülmüştür.

**2006, 56 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Nohut geveni, *Astragalus cicer* L., biki rejenerasyonu, *Agrobacterium tumefaciens*, gen aktarımı

## ABSTRACT

Master Thesis

GENETIC TRANSFORMATION OF CICER MILKVETCH (*Astragalus cicer* L.)  
via *Agrobacterium tumefaciens*

Derya GÜRLEK

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

Supervisor: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

The objective of the study was to improve a *Agrobacterium*-mediated transformation method for cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). Firstly, in order to develop a high frequency of regeneration system, hypocotyls and cotyledon explants were cultured on MS basal medium containing various growth regulators combinations (BAP, kinetin, TDZ and IBA). According to results of the study, the highest adventitious shoot regeneration ratio (53.3%) and number of shoots per explant (3.3) were obtained from hypocotyls on MS media supplemented with 1.0 or 2.0 mg/l BAP and 0.2 mg/l IBA.

In the genetic transformation studies, hypocotyl explants were inoculated with 2260 *Agrobacterium* strains harboring pAoPR1 GUS-INT, pPR1a GUS and p35S GUS-INT plasmids using various inoculation and co-cultivation methods. According to the results of the study; the most suitable inoculation time, co-cultivation time and phase of co-cultivation were determined as ½ hour, 48 hours and liquid regeneration medium, respectively. The shoots developed from calli on selection medium (1/2 MS + 0.25 mg/l NAA) rooted in the rooting medium. It was observed that the rooted plants did not show GUS gene expression according to histochemical GUS assay carried out.

**2006, 56 pages**

**Key Words:** Cicer milkvetch, *Astragalus cicer* L., plant regeneration, *Agrobacterium tumefaciens*, gene transfer

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca her zaman yanımda olan, tez çalışmamda olduğu gibi her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Yine tez konusunun belirlenmesinde ve tez çalışmamın her aşamasında her türlü yardım ve bilgisini esirgemeyen, büyük bir sabırla, ilgi ve desteğini eksik etmeyen hocam sayın Doç. Dr. Serkan URANBEY'e çok çok teşekkür ederim.

Laboratuvarıda bize çalışma imkanı sağlayan Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a ve çalışmalarına yardım ve katkılarından dolayı başta Araş. Gör. Satı ÇÖÇÜ olmak üzere Doç. Dr. Khalid M. Khawar'a, Dr. İskender PARMAKSIZ'a, Doç. Dr. Dilek BAŞALMA'ya, Hüseyin Cevahir KALYONCU'ya, arkadaşlarım Seyran SAN, Cuma KARAOĞLU, Can Devın İÇEL, Şeyda DANIŞVER ve diğer bütün laboratuvar arkadaşlarıma, lisans ve yüksek lisansım süresince bana çok emeği geçen sayın Arslan ÖKSEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, her zaman yanımda olan ve bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan anneme, babama ve kardeşlerime ayrı ayrı teşekkür ediyorum.

Derya GÜRLEK

Ankara, Şubat 2006

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1 <i>Astragalus</i> Cinsine Ait Bazı Türlerde Doku Kültürü, Hızlı Çoğaltım ve Gen Aktarımı Çalışmaları.....	5
2.2 Bazı Önemli Yemlik ve Yemeklik Baklagil Türlerindeki Doku Kültürü, Hızlı Çoğaltım ve Gen Aktarımı Çalışmaları.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1 Araştırma Yeri.....	15
3.2 Bitki Materyali.....	15
3.3 Doku Kültürü Çalışmaları.....	15
3.3.1 Besin ortamı ve kültür koşulları.....	15
3.4 Doku Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Materyalin Elde Edilmesi.....	17
3.4.1 Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi.....	17
3.4.2 Sürgün rejenerasyonu.....	17
3.4.3 Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi.....	18
3.5 Gen Aktarım Çalışmaları.....	18
3.5.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> materyali.....	18
3.5.2 <i>A. tumefaciens</i> ile gen aktarımı.....	18
3.5.3 Bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi.....	19
3.5.4 Bakterinin uzun süreli korunması.....	19
3.5.5 Gen aktarılmış (transgenik) bitkilerin belirlenmesi.....	20
3.5.6 Bitki dokularında GUS aktivitesinin histokimyasal lokalizasyonu.....	20
3.6 Antibiyotikler.....	20

3.7	Verilerin İstatiksel Değerlendirilmesi.....	21
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	22
4.1	Nohut Geveni Tohumlarının In Vitro Çimlenme Oranları.....	22
4.2	Adventif Sürgün Rejenerasyonu .....	22
4.2.1	Farklı BAP konsantrasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	22
4.2.2	Farklı kinetin konsantrasyonlarının hipokotil ve kotiledon eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	26
4.2.3	Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	29
4.2.4	Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının kotiledon yaprak eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	32
4.2.5	İndirgenmiş MS besin ortamı ve NAA konsantrasyonlarının nohut geveninin <i>in vitro</i> köklenmesi üzerine etkileri.....	35
4.3	Gen Aktarımı .....	38
4.3.1	Farklı bakteri konsantrasyonlarının gen aktarımı üzerine etkileri.....	38
4.3.2	İnokulasyon süresinin gen aktarımı üzerine etkisi.....	38
4.3.3	Ko-kültivasyon süresinin gen aktarımı üzerine etkisi.....	39
4.3.4	Ko-kültivasyonda kullanılan farklı ortam fazının gen aktarımı üzerine etkisi.....	41
4.3.5	<i>A. tumefaciens</i> aracılığıyla nohut gevenine <i>bar</i> geni aktarım çalışmaları.....	43
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
	KAYNAKLAR.....	49
	ÖZGEÇMİŞ.....	56

## SİMGELER DİZİNİ

BAP	6-Benzilaminopurin
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etildiamin tetra asetik asit
g, mg, µg	Gram, miligram, mikro gram
IAA	Indol-3-asetik asit
IBA	Indol-3-bütirik asit
Km	Kanamisin
l, ml, µl	Litre, mili litre, mikro litre
M	Molarite
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog bazal besin ortamı
MSO	Hormonsuz Murashige ve Skoog bazal besin ortamı
N	Normalite
NA	Nutrient agar
NAA	Naftalen asetik asit
NB	Nutrient broth
NPTII	Neomisin fosfotransferaz II
<i>NPTII</i>	Neomisin fosfotransferaz II geni
T-DNA	Transfer edilmiş DNA
TDZ	Thidazuran (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
Ti	Tümör oluşturan
X-GLUC	5 bromo-4 kloro-3 indolil β-D-glukoronid

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Nohut geveni hipokotil eksplantları üzerinde kallus ve sürgün oluşumu.....	26
Şekil 4.2	Farklı kinetin konsantrasyonlarında hipokotil eksplantında kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra kallus oluşumu.....	27
Şekil 4.3	Farklı kinetin konsantrasyonlarında kotiledon eksplantında kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra kallus oluşumu.....	29
Şekil 4.4	Nohut geveninde <i>in vitro</i> köklendirme ve köklenen bitkilerin aklimatizasyonu .....	37
Şekil 4.5	p35S GUS-INT ile inoküle edilen hipokotil eksplantında kaçak sürgün oluşumu.....	43



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Farklı büyüme dönemlerinde nohut geveninin içerdiği mineral madde miktarları.....	2
Çizelge 3.1	MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları.....	16
Çizelge 3.2	Kullanılan büyümeyi düzenleyiciler ve çözünme ortamları ile saklanma koşulları.....	16
Çizelge 3.3	<i>Agrobacterium</i> hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	20
Çizelge 3.4	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	21
Çizelge 4.1	Farklı <i>in vitro</i> çimlendirme yöntemlerinin nohut geveni tohumlarının çimlenme oranına etkileri.....	22
Çizelge 4.2	Farklı BAP konsantrasyonlarının kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	24
Çizelge 4.3	Farklı BAP konsantrasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	25
Çizelge 4.4	Farklı kinetin konsantrasyonlarının hipokotil eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	27
Çizelge 4.5	Farklı kinetin konsantrasyonlarının kotiledon eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	28
Çizelge 4.6	Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil eksplantında kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	30
Çizelge 4.7	Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	31
Çizelge 4.8	Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının kotiledon eksplantında kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	33
Çizelge 4.9	Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının kotiledon eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri.....	34
Çizelge 4.10	Farklı konsantrasyonlardaki MS besin ortamı ve NAA	

konsantrasyonlarının köklenme üzerine etkileri.....	35
Çizelge 4.11 Farklı inokulasyon süresinin kanamisine dayanıklı kallus geliştiren eksplant oranı ile <i>Agrobacterium tumefaciens</i> bulaşıklığı üzerine etkisi.....	39
Çizelge 4.12 Farklı ko-kültivasyon süresinin kanamisine dayanıklı eksplant oranı ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> bulaşıklığı üzerine etkileri.....	40
Çizelge 4.13 Farklı bakteri hatları ile ko-kültivasyon ortam fazının kanamisine dayanıklı kallus oluşturma oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı, köklenen sürgün oranı üzerine etkisi.....	41
Çizelge 4.14 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA pRGG <i>bar</i> 4404 hattı ile gen aktarımı sonuçları.....	44



## 1. GİRİŞ

Ülkemizde mevcut bulunan yem açığının kapatılmasında alınacak tedbirlerden birisi de halen birkaç yem bitkisi türü ile sınırlı olan yem bitkileri tarımımıza, alternatif olabilecek yeni yem bitkisi türlerini ilave etmektir. Önemli bir iklim ve toprak çeşitliliğine sahip olan ülkemiz birçok yem bitkisi türlerinin yetiştirilmesine çok elverişlidir. Ancak tarla tarımı içerisinde yem bitkileri ekim alanı, bugün küçümsenecek bir nitelik taşımaktadır. Çünkü tarımda ileri ülkelerde yem bitkileri ekim alanı tarla tarımı içerisinde ortalama %25 oranında yer alırken ülkemizde bu oran maalesef %3 civarında kalmaktadır. Bugün çiftlik hayvanlarımızın kaba yem ihtiyaçları çayır-meralar başta olmak üzere, yem bitkileri ile saman, şeker pancarı posası ve diğer kaynaklardan sağlanmaktadır. Yem bitkisi olarak ise, özellikle yonca, korunga, fiğ, sudan otu, hayvan pancarı ve mısır hasılı kullanılmaktadır (Avcıoğlu vd. 2000).

Ülkemizde tarımı yapılmayan ancak mevcut yem bitkilerine ilave edilebilecek nohut geveni (*Astragalus cicer* L.) değişik iklim ve toprak şartlarına geniş bir uyum sağlama özelliğine sahip olup, ülkemizin kuzeydoğu bölgelerinde kendiliğinden yetişmektedir. Türün bağlı bulunduğu Geven (*Astragalus* L.) cinsi Türkiye florasını oluşturan baklagillerde en büyük cinstir. Dünyada 370'den fazla türü tespit edilmiş olup bunlardan 26'sı Türkiye'de bulunmuş ve yeni tür olarak kaydedilmiştir (Chamberlain and Matthews 1969).

Rizomlu olmasıyla otlatmaya dayanıklı bir mera bitkisi niteliği yanında erozyonu da önleyebilen nohut geveni yurdumuzun hemen her yerinde hem kıraç hem sulu şartlarda yetiştirilebilmekte, yeşil yem, kuru ot veya silo yemi olarak değerlendirilebilmektedir. Yılda 2-7 kez biçilebilen nohut geveninin ortalama kuru madde verimi 0.8-1.1 ton/da'dır. Sulanabilir koşullarda ise ve farklı biçim sıklığında kuru madde verimi 0.9-1.0 ton/da arasında değişebilmektedir (Townsend *et al.* 1978). Loepky *et al.* (1996) yaptıkları çalışmada, 6. yıldan sonra kuru madde veriminin yoncaya eşdeğer olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca besleme değeri bakımından da çok değerli bir yem bitkisi olan nohut geveni 15.4-18.1 arasında ham protein içermektedir (Loeppky *et al.* 1996). Nohut geveninin çeşitli büyüme dönemlerinde içerdiği mineral madde miktarları Çizelge 1.1’de verilmiştir (Gervais 2000).

Çizelge 1.1 Farklı büyüme dönemlerinde nohut geveninin içerdiği mineral madde miktarları

Mineral maddeler (g/kg)	Büyüme dönemi		
	Çiçek tomurcuğu	% 10 çiçeklenme	Tam çiçeklenme
Ca	14.2	15.0	15.9
P	03.2	3.0	2.8
K	33.0	30.0	27.0
Mg	1.6	1.7	1.8
Na	0.19	0.18	0.18
S	1.8	1.8	1.6
Mn	44	50	67
Zn	27	24	24
Cu	9.2	9.2	10.2
Fe	258	300	-

Kaynak : (Gervais 2000).

Verimsiz topraklarda da yetişebilmesi, hayvanlarda şişme yapmaması ve birçok üstün özellikleri nedeniyle nohut geveni hayvancılığımızın büyük bir çıkması olan kaba yem ihtiyacının karşılanmasında düşünülebilecek ve klasik diyebileceğimiz mevcut yem bitkilerine ilave edilebilecek bir yem bitkisidir. Bir baklagil olan nohut geveninin çok sayıda hastalık ve zararlısı mevcuttur.

Kara çekirge (*Melanoplus spp.*) (Hewitt *et al.* 1982) patates yaprak piresi, bezelye yaprak biti (*Acyrtosiphon pisum*) ve yonca hortumlu böceği (*Hypera postica*) (Kephart *et al.* 1990) nohut gevenin gelişimini ve büyümesini olumsuz yönde etkileyen önemli zararlılardır. Bunun yanında nohut geveninde bakteriyel kökenli kök, kök tacı ve gövde hastalıkları büyük ekonomik kayba neden olabilmektedir (Townsend 1993). Nohut geveninde hastalık ve zararlılarla ilaçlı mücadelesi ekonomik olmamaktadır. Ayrıca, kullanılan bu kimyasal maddeler besin zincirinde ayrılmadan uzun süre kalabilmekte, çoğu kez hayvan ve dolayısıyla insan sağlığı için tehlikeli olabilmektedir. Bu durum ise

çevre sağlığı açısından endişe kaynağı olmaktadır. İleride ülkemiz koşullarına uygun nohut geveni çeşitleri geliştirilmesi durumunda özellikle böceklere ve hastalıklara dayanıklılık genlerinin aktarılması önümüzdeki yıllarda önem arz edebilecektir. Ayrıca, *Astragalus* türlerinin erkencilik, yüksek ot ve tohum verimi, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla ıslah çalışmalarına hız verilmesi gerekmektedir.

Günümüzde özellikle son 15 yıldan beri bitki ıslahında uygulanmakta olan biyoteknolojik yöntemler hem zaman, hem de kesinlik açısından çok iyi sonuç vermeye başlamıştır. Gelişmiş genetik mühendisliği tekniklerinin başarıyla uygulanması sonucunda herbisitlere, böceklere ve virüslere karşı dayanıklılıkları artırılmış olup, mısır, buğday, soya, kolza ve pamuk gibi ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinde transgenik çeşitlerin üretimine geçilmiştir. Halen sınırlı sayıda bitkide uygulamaya yönelik sonuçların alındığı çalışmaların, rekombinant DNA teknolojisinin hızla ilerleme göstermesi nedeniyle, kısa sürede yaygın olarak tüm bitkilerde kullanılabilir duruma geleceği göz önünde bulundurulmalıdır. Genetik mühendisliği tekniklerinin kullanılmasıyla, ıslah süresinin kısaltılmasının yanında; melezlemede karşılaşılan engeller, genetik bağlılık sorunları ve gen havuzlarından yararlanmadaki sınırlamalar kolayca ortadan kaldırılabilir. Ancak, arzu edilen tarımsal özelliği belirleyen bir genin, üzerinde çalışılan kültür bitkisine aktarılabilmesi, özellikle etkin bir gen aktarma sisteminin geliştirilerek uygulamaya konmasına bağlıdır.

Genetik mühendisliği çalışmalarında olumlu gelişmelerin yanında birçok sorun söz konusudur. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımında, gen aktarım oranı son derece düşük olduğundan, gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek oranda adventif sürgün oluşumu da gen aktarma çalışmalarının başarısında önemli rol oynamaktadır. Ancak, bitkilerde *in vitro* bitki rejenerasyonu önemli bir sorundur. Bu bazı bitki türlerinde büyük ölçüde optimize edilirken, bazı bitki türlerinde ise hala büyük sorunlarla karşılaşılmaktadır. Bu problemin çözülmesi için bu kültürlerin morfojenetik kapasitelerini etkileyen fizyolojik, ekolojik ve genetik faktörlerin net olarak bilinmesi gerekmektedir. Rejenerasyon kapasitesinin arttırılabilmesi için kullanılan genotip, besin maddeleri, kültür koşulları, hormonlar, eksplantın fizyolojik

yaşı ve tipi gibi faktörlerin ve bu faktörler arasındaki etkileşimlerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Gen aktarımına başlamadan önce mutlaka üzerinde çalışılacak bitki türü için gen aktarımına uygun yüksek frekansta bir adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek oranda adventif sürgün oluşumu gen aktarımının başarısında önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı da nohut geveni (*Astragalus cicer* L.) bitkisinde uygulanan gen aktarma sistemine uygun bir adventif sürgün oluşumu ve yüksek oranda gen aktarılmış (transgenik) bitki elde edilmesidir. Bu çalışmalar ileride herbisitlere, böceklere ve hastalıklara dayanıklı genlerin geven türlerine aktarılmasında temel teşkil edebilecektir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde son yıllarda *Astragalus* cinsine ait bazı türler ile önemli yemlik ve yemelik baklagil türlerindeki doku kültürü, hızlı çoğaltım ve gen aktarımı çalışmaları özetlenmiştir.

### 2.1 *Astragalus* Cinsine Ait Bazı Türlerde Doku Kültürü, Hızlı Çoğaltım ve Gen Aktarımı Çalışmaları

Cho *et al.* (1998), yaptıkları çalışmada *Agrobacterium rhizogenes* ile Çin gevenine (*Astragalus sinicus*) gen aktarımını başarmışlardır. Çalışmada kullanılan pB121 binari vektörünü taşıyan DC-AR2 *A. rhizogenes* ırkı, plazmidinde GUS aktivitesini kodlayan uidA genini içermektedir. Gen aktarımı, mikimopin ve histokimyasal GUS analizi ile belirlenmiştir. *In vitro* da çimlendirilen bitkiciklerin oluşan kökleri, DC-AR2 *A. rhizogenes* ırkı ile inoküle edilmiştir. Enfeksiyondan 15 gün sonra test edilen köklerin %46'sı GUS pozitif bulunmuştur. Daha sonra GUS aktivitesi gösterenler Southern Blot analizi ile teyit edilmiştir.

Luo and Jia (1998), *Astragalus adsurgens* türünde hipokotil eksplantlarından yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır. İki haftalık hipokotil eksplantları 9 µM 2,4-D ve 2.2 µM BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınmış daha sonra 0.5 µM NAA ve 8.9 µM BAP içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda %75 oranında rejenerasyon frekansına ulaşılmıştır.

Luo *et al.* (1999), yaptıkları çalışmada, *Astragalus adsurgens* türünde kallus kültürü ile yüksek oranda somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu elde etmişlerdir. Çalışmada en yüksek embriyonik kallus (%62) hipokotil eksplantından 2 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu elde edilen kalluslar daha sonra 1-2 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren somatik embriyo teşvik ortamına aktarılmış ve yüksek oranda (%63-74) embriyogenesis görülmüştür.

Cho and Widholm (2002a), yaptıkları çalışmada *Agrobacterium rhizogenes* ile gen aktarılmış *Astragalus sinicus*'un saçak köklerinden sürgün rejenerasyon protokolu



geliştirmişlerdir. pB121 binari vektörünü taşıyan DC-AR2 *A. rhizogenes* ırkı ile trasforme edilen hipokotil uçlarından gelişen saçak köklerden 7.5-10 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında somatik embriyolar gelişmiştir.

Cho and Widholm (2002b), yaptıkları çalışmada *Agrobacterium tumefaciens* ile *Astragalus sinicus*'e gen aktarım protokolu geliştirmişlerdir. pBINm-gfp5-ER binari vektörünü taşıyan EHA 105 ırkı plazmidinde npt II ve GFP genlerini taşımaktadır. Bu ırk ile enfekte eksplantlar 1 mg/l NAA ve 1 mg/l TDZ içeren SR besi ortamında kültüre alınmış 75 mg/l kanamisin ve 200 mg/l Timentin içeren ortamda transgenik adayı sürgünler seçilmiştir. Köklendirilen sürgünlerden elde edilen transgenik bitkiler Southern Blot ve Western Blot analizi ile teyit edilmiştir.

Uranbey *et al.* (2003), nohut giveninde (*Astragalus cicer* L.) hipokotil, gövde, kotiledon ve petiol eksplantlarını çeşitli konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. En yüksek adventif sürgün rejenerasyonu hipokotil eksplantlarından 10 µM BAP and 0.1 µM NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir.

Hou and Jia (2004a), *Astragalus melilotoides* türünde somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla hipokotil ve gövde eksplantlarından yüksek frekansta bitki rejenerasyonu başarmışlardır. 2.69 µM NAA ve 4.44 µM BA içeren MS besin ortamında hipokotil eksplantlarından %98.3 oranında somatik embriyo oluşumu elde edilmiştir.

Hou and Jia (2004b), *Astragalus melilotoides* türünde embriyogenik kalluslardan izole edilen protoplastlardan bitki rejenerasyonunu başarmışlardır. Hipokotil eksplantlarından gelişen embiyonik kalluslardan izole edilen protoplastlar, 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP 0.2 mg/l kinetin, 0.2 M glikoz ve 0.5 mg/l manitol, 500 mg/l kazein içeren KMP8 içeren katı ve sıvı besin ortamında kültüre alınmış daha sonra 0.5 mg/l NAA ve 1-2 mg/l BAP içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. %56.3 somatik embriyonesis ve %21.6 organogenesis başarılmıştır.

## 2.2 Bazı Önemli Yemlik ve Yemeklik Baklagil Türlerindeki Doku Kültürü, Hızlı Çoğaltım ve Gen Aktarımı Çalışmaları

Mroginski and Kartha (1981), bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde promordial yaprakları belirli aralıklarla, değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS vitaminli B<sub>5</sub> besin ortamında kültüre almışlardır. En yüksek oranda sürgün oluşumunu 0.1 µM NAA ve 10 µM BAP içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca, örneklerin yaşının sürgün oluşumunu etkilediğini gözlemişlerdir.

Hussey and Gunn (1984), çimlendirilen bezelye tohumlarından aldıkları eksplantları, 1 mg/l BAP ve 4-8 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamına alarak kallus ve sürgün oluşumunu teşvik etmişlerdir. 2-4 hafta sonra aynı ortamlara 0.25 mg/l IBA daha ilave edilmiştir. Bu ortamlarda rejenere olan sürgünler, ½ MS mineralleri, %15 şeker ve 2 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmiştir.

Rubluo *et al.* (1984), yaptıkları çalışmada, farklı konstrasyonlardaki bazı sitokinin ve oksin kombinasyonlarını kullanarak, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bezelye yaprakçıklardan öncelikle sürgünler daha sonra da tam bitkiler elde etmişlerdir. BAP, NAA, IBA ve IAA içeren MS besin ortamında olgunlaşmamış yaprakçıklar ortalama 0.9-1.8 mm uzunluğunda sürgünler oluşturmuştur. Oluşan sürgün yüzdesi, ortalama %26-38 arasında değişmiştir. BAP ve NAA içeren ortamda, olgunlaşmış yapraklardan gelişen sürgünlerin oranı %7'ye kadar düşmüştür. GA<sub>3</sub>'in sürgün oluşumunda etkili olmadığı, pikloram ve 2,4-D'nin ise olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, adventif sürgün rejenerasyonunun büyük ölçüde sıcaklık ve genotipten etkilendiği belirtilmiştir.

Mathews (1987), *Vigna radiata* bitkisinde sürgün ucu, kotiledon, kotiledon boğum, promordial yapraklar ve kökleri farklı BAP dozlarında kültüre almıştır. Sürgün ucu, kotiledon ve kotiledon boğumlardan direkt sürgün oluşumu elde etmiştir. Farklı eksplantlardan farklı hormon düzeylerinde farklı gelişme gözlemiştir.

Natali and Cavallini (1987), bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde 5 farklı çeşitte

olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo ekseni örneklerini değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. 2 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren MS0 ortamında tüm çeşitlerin olgunlaşmamış embriyo ekseni örneklerinde sürgün oluşumu gözlenirken, 3 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS0 ortamında ise sadece Dolce Provenza, 5075 ve Espresso Generoso çeşitlerinden sürgün oluşumu gözlenmiş, 0.5 mg/l BAP ve 3 mg/l NAA içeren MS ortamından ise hiçbir çeşitte sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen sürgünler 2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir.

Hussey *et al.* (1989), bezelye dokularının meristem uçlarını *A. tumefaciens* (C58 ve Ach 5) ve *A. rhizogenes* (9402)'in yabancı hatları ile inokule etmişler, her iki ırkın da tümör ve saçak kök oluşturduğunu bildirmişlerdir. Uç meristemler yaşlı meristem uçlarına göre tümör oluşumu bakımından daha iyi sonuç vermiştir. *A. rhizogenes* en çok sap ucundaki meristematik dokularda saçak kök oluşturmuştur. Yapılan histolojik (dokusal) incelemede, enfekte olan hücrelerin ilk önce çok sayıda vakuol içerdiği, daha sonra ise hücrelerden tümör oluştuğu tespit edilmiştir.

Hobbs *et al.* (1989), *A. tumefaciens*'in bazı yabancı (A281, C58 ve Ach5) hatları ile bazı bezelye (*Pisum sativum* L.) genotiplerini inokule etmişlerdir. Çalışma sonunda, A281'in en virulent hat olduğu görülmüştür. Oluşturdukları tümör sayısı ve boyutuna göre hatlar büyükten küçüğe A281, C58 ve Ach5 şeklinde sıralanmıştır. Her bir genotip, tümör oluşumu bakımından farklı tepkiler göstermiş, bu bakımdan genotip X hat interaksyonu önemli bulunmuştur. *In vivo* ve *in vitro* koşullarında yapılan inokulasyonlarda değişik sonuçlar elde edilmiştir. Tümörlerden alınan kallusların bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlarda gelişmesi T-DNA'nın aktarıldığını göstermiştir. Yapılan Southern blot analizi ile de T-DNA'nın aktarıldığı ispat edilmiştir.

Warkentin and McHughen (1990), yaptıkları çalışmada, *A. tumefaciens* aracılığıyla mercimeğe gen aktarmışlardır. Serada yetiştirilen mercimek bitkilerinin sap uçları *A. tumefaciens* (C58, GV 3111, A281, ve Ach5)'in 4 yabancı hattı ile inokule edilmiştir. İnokulasyon sonunda sap ve sap uçlarında tümör oluşumu sağlanmıştır. *A.*

*tumefaciens*'in GV 3111 hattı ile muamele edilen embriyolardan alınan trasgenik sürgünler kanamisin içeren ortamdan seçilmiştir. Daha sonra gen aktarımını doğrulamak amacıyla sonuçlar flourometrik ve histokimyasal GUS analizine tabii tutulmuştur.

Jackson and Hobbs (1990), bezelye (*Pisum sativum* L.)'nin kotiledon boğumlarından, 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında çok sayıda adventif sürgün elde etmişlerdir. Sitokinin konsantrasyonu arttıkça sürgün ucu sayısının da arttığı görülmüştür. Ancak, 5 mg/l BAP içeren besin ortamında oluşan sürgünler camsılaşıma göstermişler ve köklenememişlerdir. Kullanılan bütün çeşitlerin boğumları 5 gün sonra sürgün oluşturmuş ve bu sürgünlerden 21 gün sonra eksplant alınmıştır. Yapılan histolojik çalışmalar, boğum ve sürgünlerin yüzeysel doku tabakalarından geliştiğini göstermiştir. Bu sistemin transgenik bitkiler elde etmek için kullanılabilceği bildirilmiştir.

Puonti-Kaerlas *et al.* (1990), bezelye bitkisine *A.tumefaciens* aracılığıyla bazı markör genleri (NPT-II, HPT-II) aktararak higromisin ve kanamisin antibiyotiğine dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada sap ve epikotil eksplantları kullanılmıştır. Transgenik kalluslar 15 mg/l higromisin ve 75 mg/l kanamisin içeren besin ortamında seçilmiştir. Higromisin içeren besin ortamında çok az sayıda sürgün elde edilmiştir. Kanamisin içeren besin ortamında ise hiç sürgün oluşmamıştır. Rejenere olan sürgünler köklendirilerek gelişen bitkicikler seraya aktarılmıştır. DNA analizi ile kallusların ve bitkiciklerin transgenik olduğu ispat edilmiştir.

Genga *et al.* (1990), fasulye bitkisinin *Phaseolus vulgaris* ve *Phaseolus coccineus* türlerinde onkogenik *A. tumefaciens* hatlarıyla transformasyon çalışması ile iki genotipte tümör oluşumu gözlenmiştir. Ancak tümör oluşma frekansı, tümör çapı ve bitki türleri özel görülmüştür. *NPT II* transformasyonu PCR ile tespit edilmiştir.

Thomas *et al.* (1991), *Medicago truncatula* ile kanamisine dayanıklılık genlerini taşıyan ikili ve nononkogenik Ti plazmidi içeren *A. tumefaciens* hatlarını kullanarak gen aktarım çalışmalarında fertil transgenik bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir. sonuca ulaşmada rejenerasyon protokolü ve kullanılan eksplantın rejenerasyon yeteneğinin

etkili olduğunu, fakat Ri plazmidin T-DNA'sı üzerindeki genlerin somatik embriyogenesisi olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. bu nedenle sadece T-DNA bölgesi bulunmayan disarmed Ti plazmidi veya *rol A* geni inaktif edilmiş Ri plazmidi içeren hatlarla muamele edilen dokularda transgenik bitki rejenerasyonu gözlediklerini belirtmişlerdir. Fertil transgenik bitkileri sadece nononkogenik *A. tumefaciens* ile yaptıkları denemelerden elde ettiklerini ve NPT-II genini R1 dölüne aktardıklarını kaydetmişlerdir.

Lulsdorf *et al.* (1991), yaptıkları çalışmada, bazı *A. tumefaciens* hatlarıyla (EHA 101 ve LBA 4404) bezelye (*Pisum sativum* L.) uç meristemlerini inokule ederek, 2,3 ve 4 gün süreyle ko-kültivasyona bırakmışlardır. *A. tumefaciens* EHA 101 (pB 11042) hattı ile inoküle edilen eksplantlar yüksek oranda kallus oluşturmuştur. Bu hatla inoküle eksplantların %76'sı kanamisin (50mg/l), %77'si ise higromisin (25 mg/l) içeren besin ortamında kallus oluşturmuştur. Buna karşılık, LBA 4404 hattı ile inoküle edilen eksplantların %63'ü higromisin, %17'si kanamisine dayanıklı kallus oluşturmuştur.

Golds *et al.* (1991), yaptıkları çalışmada, 3 yonca ve 1 korunga kültür çeşidi A4T (pRiA4b) *Agrobacterium rhizogenes* hattı ile inoküle etmişlerdir. yoncada çeşide bağlı tepkiyi incelemişlerdir. Vertus, Regen-s Rangelander çeşitlerinin enfekte olmuş gövde eksplantlarının %94, %25 ve %4'ünden transgenik kök elde edilmiştir. Korungada; Hampshire Giant çeşidinde çeşide bağlı tepki incelenmiştir. Fidelerin kotiledon eksplantlarından %78, hipokotillerinden %50 oranında cevap alınmıştır. Yaprak eksplantlarından transgenik kök elde edilememiştir.

Warkentin and Mc Hughen (1992), mercimek sap ucu, epikotil ve kök eksplantlarını GV 2260 p35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inoküle etmişlerdir. İnoküle edilen epikotil ve kök eksplantlarında yaklaşık 9 gün, sap uçlarında ise 17 gün sonra GUS ekspresyonu gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan keten bitkisine göre mercimekte GUS geni ekspresyon seviyesinin çok daha düşük olduğu görülmüştür. Araştırma sonunda, epikotil ve kök eksplantları, sap ucu ve kotiledon boğumlarının transgenik bitki elde etmek için uygun eksplantlar olduğu bildirilmiştir.

Özcan *et al.* (1992), bezelyede olgunlaşmamış kotiledonlardan sürgün rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Çalışma sonunda, 0.5 mg/l BAP ve 4 mg/l NAA içeren MS besin ortamında çoklu sürgünler elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu embriyoların kotiledondan koparıldığı bölgede gerçekleşmiştir. Ancak eksplantlarda embriyoların varlığı, sürgün oluşumuna engel olmuştur. Besin ortamına AgNO<sub>3</sub> ilave edildiğinde rejenere olan sürgün sayısının değişmediği, fakat iyi gelişmiş yapraklara sahip sürgünler elde edilmesine rağmen, köklenme kapasitesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Rejenere olan sürgünler, 1 mg/l IBA içeren ortamda köklendirilip, daha sonra komposta aktarılarak büyütülmüştür.

Franklin *et al.* (1993), fasulye bitkisinin *A. tumefaciens*'in pKYLX71GUS içeren EHA101 hattı ile muamelesi sonucunda elde edilen yaprakları ve hipokotillerinden gelişen transgenik sürgünleri 50 mg/l kanamisin içeren ortamdan seçilmiştir. Transformasyon GUS, florometrik analiz ve Southern Analizi ile tespit edilmiştir.

Barna and Wakhlou (1994), olgunlaşmamış nohut (*Cicer arietinum*) yapraklarından oluşan kalluslardan organogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. En iyi kallus oluşumu, 10 µM NAA ve 5 µM BAP içeren besin ortamından alınmıştır. Gövde dokularının en alt kısımlarından alınan eksplantlar için en iyi sürgün rejenerasyonu ortamının ise 10 µM BAP ve 0.1 µM IBA içeren MS0 besin ortamı olduğu görülmüştür. En iyi kök oluşumu ise 1 µM IBA içeren ortamdan elde edilmiştir.

White and Voisey (1994), ak üçgül (*Trifolium repens*) bitkisinde yüksek oranda adventif sürgün oluşumu elde etmek için, 3 günlük fidelerden elde ettikleri kotiledonları değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS0 besin ortamında kültüre almışlardır. En yüksek oranda sürgün, 1 mg/l BAP ve 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Lewis and Bliss (1994), fasulye bitkisinin 10 çeşidini *A. tumefaciens*'in C58 onkogenik hattı ile muamele etmişlerdir. Çeşitler arasında tümör oluşumu ve çapı bakımından farklılıklar görülmüştür. En fazla UW325 yabani fasulye çeşidinde tümör oluşumu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra en az tümör oluşumu kültür çeşidi olan Olathe'de

gözlenmiştir. GUS testi sonucunda da en az GUS aktivitesi yabancı fasulye çeşidi UW325'te gözlenmiştir. Monthcalm çeşidinde tümör oluşumu fazla fakat GUS aktivitesi az kaydedilmiştir. Ortamda Asetosrygone kullanımı ile virulansda bir değişiklik gözlenmemiştir. UW325 çeşidinin meristematik uçlarında yapılan GUS testinde %60'dan fazla transformasyon gözlenmiştir.

Desgagnes *et al.* (1995), *Medicago sativa*'nın rejenerasyon yeteneği yüksek üç genotipten elde edilen 11 ıslah hattı ile gen aktarım çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında C58, A281, LBA 4404 *Agrobacterium* hatlarını kullanmışlardır. Deneme sonucunda PCR ve southern hibridizasyon yöntemleri ile yaptıkları analizlerde üç genotipten de transgenik kallus ve transgenik bitki elde ettiklerini belirtmişlerdir. Genetiplein kullanılan bakteri ırkları ile vektörlere farklı cevaplar verdiğini bu nedenle iyi bir transformasyon için genotip-bakteri ırkı-vektör kombinasyonunun önemli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca kanamisin transgenik olmayan materyalin ayırt edilmesinde oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Damiani *et al.* (1995), baklagil yem bitkilerinin çeşitli türlerine kanamisin ve higromisin antibiyotiklerine dayanıklılık genlerini taşıyan vektörleri içeren *A. rhizogenes* ve *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapmıştır. *M. sativa*'dan kanamisine dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmesine rağmen *M. arborea*, *Lotus corniculatus*, *L. tenuis*, *Onobrychis viciifolia* türlerinden transgenik bitki eldesi mümkün olmamıştır. Transformasyon etkinliğinin *Agrobacterium* hattından etkilenmediğini gözlemlemişlerdir.

Samac (1995), *A. tumefaciens* kullanarak 9 ticari *M. sativa* çeşidinde transformasyon çalışması yapmıştır. Araştırmacı GUS ve NPT-II genini taşıyan ikili vektörleri içeren 3 hat ile A208, A348, A281, A136 yabancı bakteri ırklarını kullanmıştır. 2 haftalık kök ve kotiledon eksplantlarını bakteriler ile inoküle etmiştir. Elde ettiği sonuçlara göre doku kültüründe bitki çeşidinin, bitki transformasyonunda bakteri ırkının yüksek oranda etkili olduğunu belirtmiştir.

Schroeder *et al.* (1995), pMCP3 plazmid vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* aracılığıyla

börülceden izole edilen A1 genini bezelyeye aktararak, bezelyede alfa amilaz sentezini engellemişlerdir. A1 geni, T5 generasyonuna kadar gösterilmiş ve kullanılan bu yöntemle mercimek bitkisine gen aktarabileceği ortaya konmuştur. Fasulye bitkisinin *Phaseolus vulgaris* ve *Phaseolus coccineus* türlerinde onkogenik *A. tumefaciens* hatlarıyla transformasyon çalışması yapılmıştır. Her iki genotipte de tümör oluşumu gözlenmiş, fakat tümör oluşma frekansı ve tümör çapı bitki türlerine göre farklılık göstermiştir. *NPT-II* transformasyonu PCR ile tespit edilmiştir.

Özcan *et al.* (1996a), gen aktarımına uygun adventif sürgün oluşumu sağlamak için, *in vitro* koşullarda gelişen korunga (*Onobrychis viciifolia*) fidelerinden elde ettikleri kotiledon ve hipokotil örneklerini değişik besin ortamlarında kültüre almışlardır. En yüksek oranda sürgün, 0.5 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren MS0 ortamında kültüre alınan hipokotil örneklerinden elde edilmiştir. Gelişen sürgünler daha sonra, 1 mg/l IBA ya da 1 mg/l NAA içeren MS0 ortamlarında köklendirilmiştir.

Özcan *et al.* (1996b), korunga (*Onobrychis viciifolia*) bitkisinde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksen örneklerini değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS0 besin ortamında kültüre almışlardır. Genel olarak, olgunlaşmamış embriyo eksenlerinin sürgün oluşturma kapasitesi olgunlaşmamış kotiledonlardan daha yüksek bulunmuştur. En yüksek oranda sürgün, 0.5 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren MS0 ortamında kültüre alınan örneklerden elde edilmiştir. Gelişen sürgünler daha sonra, 1 mg/l IBA ve 1 mg/l NAA içeren MS0 ortamlarında köklendirilmiştir.

Özgen *et al.* (1998), gen aktarımına uygun adventif sürgün oluşumu sağlamak için, tarlada yetiştirilen korunga (*Onobrychis viciifolia*) fidelerinden elde ettikleri yaprakçık, yaprak sapı ve sap örneklerini, değişik oranlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. En yüksek oranda sürgün, 20 µM BAP ve 0.5 µM NAA içeren MS0 ortamında kültüre alınan sap örneklerinden elde edilmiştir. Gelişen sürgünler daha sonra 5 µM IBA içeren 1/2 MS ortamında köklendirilmiştir.

Yılmazlar (1999), korunga, çayır üçgülü ve İskenderiye üçgülünün kotiledon, hipokotil, kök, gövde ve yaprak eksplantlarını *in vitro* gelişen bitkiciklerden izole ederek A281 ve



A136 NC *Agrobacterium tumefaciens* hatlarıyla inoküle etmiştir. İnokülasyondan 6 hafta sonra çayır üçgülü eksplantlarının hiçbirinde tümör oluşumu gözlenmemesine karşı kullanılan korunga ve İskenderiye üçgülü eksplantlarında yüksek oranda tümör oluşumu gözlenmiştir. Her iki bitkide de en yüksek tümör oluşumu A281 hattı ile inoküle edilen hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Sancak *et al.* (2000), yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için Macar fiğinin (*Vicia pannonica*) olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerini değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS0 besin ortamında kültüre almışlardır. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinin sürgün rejenerasyon kapasitesi olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından yüksek bulunmuştur. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonu 20 µM BAP ve 2.5 µM NAA içeren ortamdan elde edilirken, olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde ise 5 µM BAP ve 5 µM NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 1/2 MS ve 5 µM IBA içeren ortamda köklendirilip başarılı bir şekilde seraya aktarılmıştır.

Khawar and Özcan (2002), tarafından MS besin ortamında gelişen Ali Dayı mercimek çeşidine ait 10 günlük sürgünler kesilerek, köklendirme için 0.25, 0.5, 1.0, ve 2.0 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamına aktarılmıştır. Dört hafta sonra en yüksek köklendirme oranı (%25), sürgün başına ortalama kök sayısı (7.87 adet) ve ortalama kök uzunluğu (7.18 cm) 0.25 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamından elde edilmiştir. Ancak, diğer IBA uygulamalarında kök oluşumu uyarılamamıştır.

Havas *et al.* (2004), fasulye bitkisine glusfosanate ammonium'a dayanıklılık genlerini *A. tumefaciens* yoluyla çiçek saplarına aşımışlardır. Çalışma sonucunda gelişen baklaların birinci ve ikinci tohumlarında transformasyon gözlenmiştir ve PCR ile tespit edilmiştir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Araştırma Yeri**

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.2 Bitki Materyali**

Çalışmada kullanılan nohut geveni populasyon olup, A.Ü. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Doç.Dr. Cafer Sırrı Sevimay'dan temin edilmiştir.

#### **3.3 Doku Kültürü Çalışmaları**

##### **3.3.1 Besin ortamı ve kültür koşulları**

Tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmış olup, % 3 sukroz içeren ve % 0.7'lik agar (Sigma Type A) ile katılaştırılan MS (Murashige and Skoog 1962) ortamı, temel besin ortamı olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Tüm ortamların hazırlığında saf su kullanılmıştır. Ayrıca, gerekli durumlarda besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Ortamın pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanarak 5.8'e ayarlanmıştır. Besin ortamının sterilizasyonu, 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C'de 20 dakika otoklavda yapılmıştır. Petri kutuları yanmaz kağıtlara sarılarak 160 °C'de 2 saat etüvde sterilize edilmiştir.

Her deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her petriye (100 x 10 mm'lik) adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında 10, hızlı çoğaltımda ise 5 eksplant yerleştirilmiştir. Tüm kültürler 25 °C'de 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta 35 µM Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> florasan ışığında, kültür odasında büyütülmüştür. Büyümeyi düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra saf su ile istenen miktarlarda ve oranlarda stok solüsyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Bitki büyüme düzenleyicileri, otoklavlama işleminden önce ortama katılmıştır.

Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları  
(Murashige and Skoog 1962)

Besin Maddeleri		Konsantrasyonu (mg/l)
Makro Elementler	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.000
	KNO <sub>3</sub>	1900.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000
Mikro Elementler	KI	0.830
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.300
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.850
	Na <sub>2</sub> EDTA.	37.250
Vitaminler	Myo-Inositol	100.000
	Nikotinik Asid	0.500
	Pyrotinik Asid	0.500
	Thiamin-HCl	0.100
	Glysin	2.000

Çizelge 3.2 Kullanılan büyüme düzenleyiciler ve çözünme ortamları ile saklanma koşulları

Hormonlar	Çözücü	Saklama sıcaklığı( °C)
<b>Oksinler</b>		
NAA	1N NaOH	+4
IBA	1N NaOH	+4
<b>Sitokininler</b>		
Kinetin	1 N NaOH	+4
BAP	1 N NaOH	+4
TDZ	DMSO	+4

### 3.4 Doku Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Materyalin Elde Edilmesi

#### 3.4.1 Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Nohut gevenine ait tohumlar, steril kabin içerisinde %50'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde 2 dk bekletildikten sonra %70'lik ethanolde 2 dk önsterilizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra %50'lik çamaşır suyunda (Ace) 30 dk süreyle manyetik karıştırıcılarda sterilizasyona maruz bırakılmıştır. Son olarak tohumlar 3 defa 5 dk süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Bu şekilde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan tohumlar,

**I. Yöntem:** % 3 sukroz içeren % 0.7 agar ile katılaştırılan MSO besin ortamında

**II.Yöntem:** 7.5 ml steril su içeren petri kabı içerisinde filtre kağıtları arasında olmak üzere iki farklı şekilde çimlendirmeye alınmışlardır. Her petri kabına 25 adet tohum konmuştur. Nohut geveni tohumlarında çimlenme % olarak ifade edilmiş, bu değer petri kabında çimlenen tohumların toplam tohum sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur.

#### 3.4.2 Sürgün rejenerasyonu

Bu tez çalışmasında nohut geveninde yapılan daha önceden doku kültürü çalışmaları göz önüne alındığında Uranbey *et al.* (2003) tarafından en iyi rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu bildirilen hipokotil eksplantı üzerinde özellikle durulmuştur. Bununla birlikte kotiledon eksplantları da çalışmada kullanılmıştır. Bu amaçla, eksplantlar *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen 10-12 günlük fidelerden izole edilmiştir.

Kotiledon eksplantı, kotiledonun petiole bağlandığı kısmı kesilip atılarak rejenerasyon ortamına yerleştirilmiştir. Hipokotil eksplantı da 5 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak rejenerasyon ortamına konmuştur. İzole edilen bu eksplantlar, farklı oranlarda büyümeyi düzenleyiciler (BAP, TDZ, Kinetin ve IBA), %3 sukroz ve %0.7 agar içeren MS rejenerasyon ortamında her petri kabında 10 eksplant olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır.

### 3.4.3 Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa geldiğinde kesilerek farklı konsantrasyonlarda NAA (0.25, 0.5 ve 1.0 mg/l) içeren farklı kuvvetlerdeki (1/1, 3/4, 1/2 ve 1/4) MS besin ortamında magenta kaplarında köklendirilmeye alınmıştır. Her magentaya 5 adet sürgün yerleştirilmiştir.

## 3.5 Gen Aktarım Çalışmaları

### 3.5.1 *A. tumefaciens* materyali

pAoPR1 GUS-INT, pPR1a GUS ve p35S GUS-INT vektörlerini içeren GV 2260 *A. tumefaciens* hatları nohut gevenine gen aktarımında kullanılmıştır. pAoPR1 GUS plazmidinde GUS geni AoPR1 promotörü, PR1a-GUS plazmidinde PR1a promotörü ve p35S GUS-INT plazmidinde ise CaMV35S promotörü tarafından kontrol edilmektedir. Bakteri hatlarının plazmidinde, T-DNA bölgesinde NPT-II ve GUS markör genleri bulunmaktadır. Ayrıca, GV 2260 kromozomları üzerinde bakteriyel rifampisine dayanıklılık genleri bulunmaktadır. AoPR1 promotörü kuşkonmaz bitkisinden (*Asparagus officinalis*) izole edilmiştir. Kullanılan p35S GUS-INT plazmidini pBin 19 çift vektöründen geliştirilmiştir. GUS geninin kodlama bölgesine bitkisel bir intron geni klonlanarak GUS-INT geni elde edilmiştir. Bu şekilde GUS geninin *A. tumefaciens* içerisindeki ekspresyonu engellenmiştir. Araştırmada kullanılan bir diğer bakteri hattı LBA pRGG *bar* 4404'ün plazmidinde ise fosfinotrisine dayanıklılığı kodlayan *bar* ve GUS geni bulunmaktadır.

### 3.5.2 *A. tumefaciens* ile gen aktarımı

Gen aktarımında kullanılacak olan *A. tumefaciens* hatları, 28°C'de seçici antibiyotikleri içeren sıvı NB ortamında 24-48 saat süreyle büyütülmüşlerdir. Bu bakteri kültürleri 1/10, 1/25 ya da 1/50 oranında seyreltilmiş, en iyi rejenerasyon kapasitesine sahip olan yaprak eksplantı, bu süspansiyon içerisinde 15, 30 ve 45 dk süreyle inoküle edilmiştir. Eksplantlar 24, 48 ve 96 saat süreyle katı rejenerasyon ya da sıvı rejenerasyon

ortamında çalkalayıcıda ko-kültivasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra eksplantlar seçici antibiyotik içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu ortam, *Agrobacterium*'un gelişimini durdurmak için bir antibiyotik (augmentin) ve sadece gen aktarımı yapılan sürgünlerin gelişmesi için kanamisin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ko-kültivasyon aşamasında aşırı bakteri gelişimi olduğu durumlarda, eksplantlar, 1000 mg/l augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Daha sonra eksplantlar, augmentin (500 mg/l) ve sadece gen aktarılmış sürgünlerin gelişimini sağlamak için de farklı konsantrasyonlarda kanamisin içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. LBA pRGG bar 4404 *A. tumefaciens* hattında ise seçici antibiyotik olarak 2-10 mg/l fosfotrisin kullanılmıştır. Bu ortamda gelişen kallus ve sürgünler sürekli olarak kontrol altında tutularak, 15 günde bir alt kültüre alınmıştır.

### **3.5.3 Bakteri kültürünün saflaştırılması ve büyütülmesi**

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

### **3.5.4 Bakterinin uzun süreli korunması**

Bakteri kültürleri “Stretch film” ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4 °C'de 6 hafta korunmuştur. Daha uzun süreli muhafaza işlemi eşit miktarda bakteri kültürü ve % 40 glycerol içeren NB 2 ml'lik cryogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı

bir şekilde dondurulup, -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür (Armitage *et al.* 1988).

### 3.5.5 Gen aktarılmış (transgenik) bitkilerin belirlenmesi

Yaklaşık 6 hafta sonra seçici rejenerasyon ortamında gelişen aday transgenik sürgünler, kanamisin içeren besin ortamlarında köklendirildikten sonra saksılara aktarılmıştır. Bu bitkilere gen aktarılıp aktarılmadığı histokimyasal GUS analizi yöntemi ile belirlenmiştir.

### 3.5.6 Bitki dokularında GUS aktivitesinin histokimyasal lokalizasyonu

Bu işlem bazı değişikliklerle birlikte Jefferson (1987) ve Özcan (1993)'a göre yapılmıştır. GUS geni aktarılmış bitki dokuları 37 °C'de 4-12 saat süreyle, 100 mM Sodyum fosfat (pH 7.0), 10 mM EDTA, %1 Triton X-100 ve 1 mM X-GLUC içerisinde inkübe edildikten sonra %70'lik etanol içerisinde sabitlenmiştir. Dokular içerisindeki mavi renge göre GUS geninin ekspresyonu belirlenmiştir.

## 3.6 Antibiyotikler

Büyüme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler (0.44µ) kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40-45 °C'ye düşmüş olan katı ortamlara ilave edilmiştir. Çizelge 3.3 ve 3.4'de kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları verilmiştir.

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

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

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

Antibiyotikler	Çözücü	Saklama sıcaklığı( °C)
Kanamisin	Su	+4
Fosfonitrisin	Su	+4
Augmentin*	Su	+4

\*Ko kültüründen sonra *Agrobacterium tumefaciens*'in gelişimini engellemek için kullanılmıştır.

### 3.7 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her muamele içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 3 ya da 4 tekerrürlü olarak 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen verilere, Düzgüneş vd. (1983) tarafından bildirildiği şekilde varyans analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizler, MSTAT-C bilgisayar programında yapılmıştır.



## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

### 4.1 Nohut Geveni Tohumlarının *In Vitro* Çimlenme Oranları

Çalışmada *in vitro* koşullarda nohut geveni tohumlarının çimlendirilmesinde kullanılan I. Yöntem (% 3 sukroz içeren % 0.7 agar ile katılaştırılan MSO besin ortamında) ve II. Yöntem (7.5 ml steril su içeren petri kabı içerisinde fitre kağıtları arasında) arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde önemli bulunmuş, varyans analizi sonuçları ve Duncan Testi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı *in vitro* çimlendirme yöntemlerinin nohut geveni tohumlarının çimlenme oranına etkileri

	I. Yöntem	II. Yöntem
Çimlenme oranı (%)	5 b	85 a

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi I. Yöntemden ortalama %5 çimlenme oranı saptanırken, bu oran II. Yöntemde ortalama %85’e çıkmıştır. Çimlenme oranları da dikkate alındığında, nohut geveni için en uygun *in vitro* çimlendirme yönteminin II. Yöntem olduğuna karar verilmiştir. Bundan sonraki adventif sürgün rejenerasyonu ve gen aktarım çalışmalarına materyal temin etmek için tüm kültürler kültür odasında florasan ışığı altında 16 saat ışık 8 saat karanlık ve 23 °C’de II. Yöntemdeki gibi çimlenmeye bırakılmıştır.

### 4.2 Adventif Sürgün Rejenerasyonu

#### 4.2.1 Farklı BAP konsantrasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri

*In vitro* adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla *in vitro*’da gelişen bitkiciklerden alınan hipokotil eksplantları (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l dozlarında BAP ve 0.2 mg/l IBA içeren MSO ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra bütün eksplantlar üzerinde kallus oluşumu başlamış ve bu kalluslar üzerinde adventif sürgün uçları gözlenmiştir. Kültür başlangıcından 6-7 hafta sonra sürgünler 1-2 cm büyüklüğe ulaşmıştır, 10 hafta sonra ise 3-4 cm’lik uzunluğa

ulaşarak köklendirme ortamına aktarılmaya uygun hale gelmiştir (şekil 4.1). Farklı BAP ve IBA konsantrasyonlarının hipokotil eksplantlarındaki adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri belirlemek amacıyla IBA miktarı (0.2 mg/l) sabit tutularak farklı BAP konsantrasyonlarını (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Farklı BAP konsantrasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelge 4.2’de de görüldüğü gibi farklı BAP konsantrasyonlarının, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkileri 0.01 düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Farklılıkların önem düzeyini belirleyebilmek amacıyla Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı BAP konsantrasyonlarının kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	SD	Kallus (%)			Sürgün oluşturan eksplant oranı			Eksplant başına sürgün sayısı		
		KT	KO	F	KT	KO	F	KT	KO	F
<b>Tekerrürler</b>	2	625.537	312.769	1.7021	400.801	200.401	3.1238	1.596	0.798	1.7424
<b>Ortamlar</b>	4	272.731	68.183	0.3711	1439.503	359.876	5.6096**	15.604	3.901	8.5175**
<b>Hata</b>	8	1470.029	183.754		513.225	64.153		3.664	0.458	
<b>Toplam</b>	14	2368.297			2353.529			20.864		

\*\* ) 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.3 Farklı BAP konsantrasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

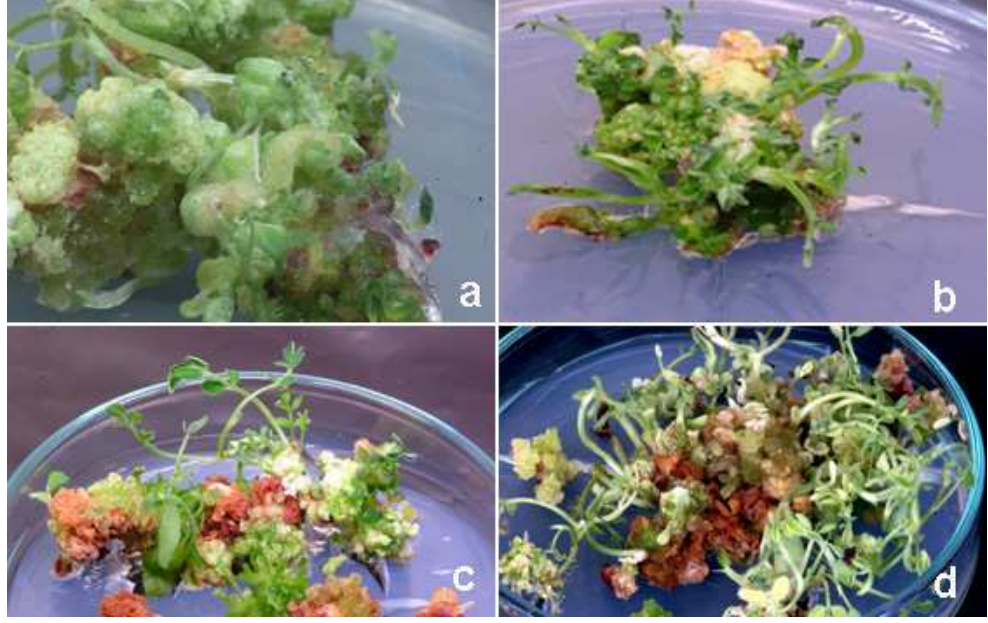
Hormonlar (mg/l)		Kallus (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
BAP	IBA			
0.1	0.2	66.6	13.3 b*	0.53 b*
0.5	0.2	73.3	16.6 ab	0.53 b
1.0	0.2	83.3	53.3 a	2.4 ab
2.0	0.2	83.3	40.0 ab	3.3 a
4.0	0.2	70	40.0 ab	1.7 ab

\*) Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar 0.01 düzeyinde istatistiki olarak farklıdır.

Çizelge 4.3’de de görüldüğü gibi, hipokotil eksplantlarına ait kallus oluşturan eksplant oranı, %66.6-83.3 arasında değişmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En yüksek kallus oluşturan eksplant oranı (%83.3) 1mg/l BAP ve 2.0 mg/l BAP, en düşük kallus oluşturan eksplant oranı (%66.6) 0.1 mg/l BAP içeren MS besin ortamından alınmıştır.

Sürgün rejenerasyon oranı (sürgün oluşturan eksplant oranı), %13.3-53.3 arasında değişmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (%53.3) 1 mg/l BAP, en düşük sürgün rejenerasyon oranı ise (%13.3) 0.1 mg/l BAP içeren MS besin ortamından alınmıştır. Besin ortamları, sürgün rejenerasyonu bakımından, 0.01 düzeyinde 2 grup içerisinde yer almışlardır.

Hipokotil eksplantlarında, farklı besin ortamlarına ait ortalama eksplant başına sürgün sayısı, 0.53-3.3 adet arasında değişmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı 3.3 adet ile 2 mg/l BAP, en düşük eksplant başına sürgün sayısı ise 0.53 adet ile 0.1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l BAP içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Kullanılan besin ortamları eksplant başına sürgün sayısı bakımından 0.01 düzeyinde 2 farklı grup içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.1 Nohut geveni hipokotil eksplantları üzerinde kallus ve sürgün oluşumu  
a. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra kallus oluşumu, b. Kültür başlangıcından 6-7 hafta sonra sürgün oluşumu, c. Kültür başlangıcından 7 hafta sonra 2.0 mg/l BAP ve 0.2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında sürgün oluşumu, d. Kültür başlangıcından 10 hafta sonra 2.0 mg/l BAP ve 0.2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında gelişen sürgünler.

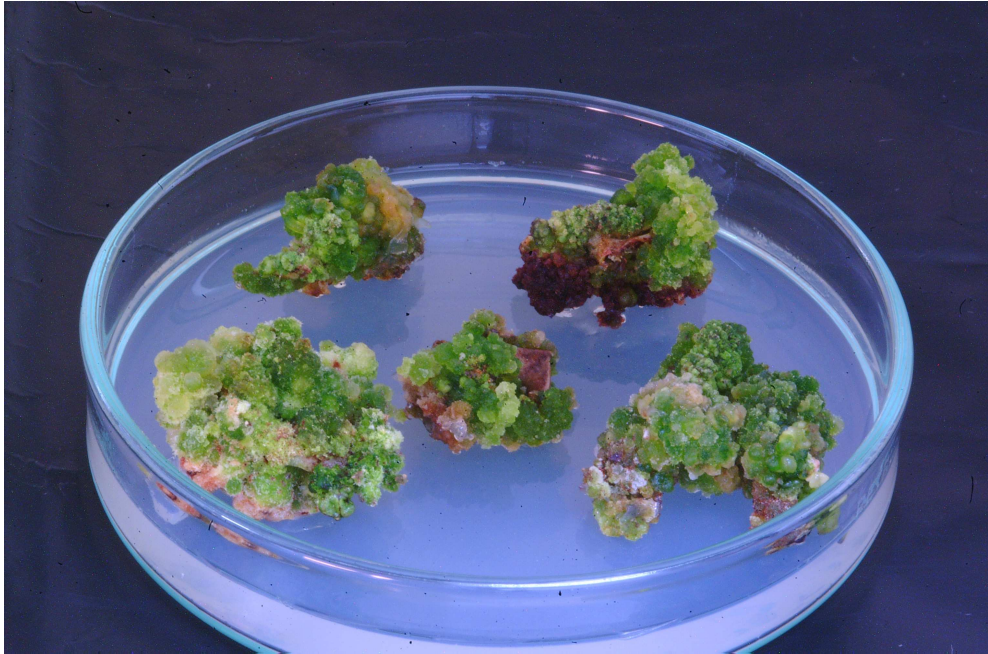
#### 4.2.2 Farklı kinetin konsantrasyonlarının hipokotil ve kotiledon eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri

Farklı kinetin konsantrasyonlarının hipokotil eksplantlarındaki adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri belirlemek amacıyla 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l kinetin dozları esas alınmıştır. Farklı kinetin konsantrasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.4’de de görüldüğü gibi farklı kinetin konsantrasyonları, kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkili olurken, gelişen kalluslarda sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir (Şekil 4.2)

Çizelge 4.4 Farklı kinetin konsantrasyonlarının hipokotil eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri

Hormonlar (mg/l)	Kallus (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
Kinetin			
0.1	63.3	-	-
0.5	26.6	-	-
1.0	43.3	-	-
2.0	53.3	-	-
4.0	40.0	-	-

Çizelge 4.4'de de görüldüğü gibi, hipokotil eksplantlarına ait kallus oluşturan eksplant oranı, %26.6-63.3 arasında değişmiştir. En yüksek kallus oluşturan eksplant oranı (%63.3) 0.1 mg/l kinetin, en düşük kallus oluşturan eksplant oranı (%26.6) 0.5 mg/l Kinetin içeren MS besin ortamından alınmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.



Şekil 4.2 Farklı kinetin konsantrasyonlarında hipokotil eksplantında kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra kallus oluşumu

Farklı kinetin konsantrasyonlarının kotiledon eksplantlarındaki adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri belirlemek amacıyla 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l kinetin

dozları esas alınmıştır. Farklı kinetin konsantrasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Çizelge 4.5’de de görüldüğü gibi aynı hipokotil eksplantlarında olduğu gibi farklı kinetin konsantrasyonlarının, kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkili olurken, gelişen kalluslarda sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir (Şekil 4.3). Bu eksplant kaynağında da uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Farklı kinetin konsantrasyonlarının kotiledon eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri

Hormonlar (mg/l)	Kallus (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
Kinetin			
0.1	16.6	-	-
0.5	3.3	-	-
1.0	13.3	-	-
2.0	30.0	-	-
4.0	23.3	-	-

Çizelge 4.5’de de görüldüğü gibi, kotiledon eksplantlarına ait kallus oluşturan eksplant oranı, %3.3-30.0 arasında değişmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En yüksek kallus oluşturan eksplant oranı (%30.0) 2 mg/l kinetin, en düşük kallus oluşturan eksplant oranı (%3.3) 0.5 mg/l kinetin içeren MS besin ortamından alınmıştır.

Görüldüğü gibi değişik kinetin konsantrasyonlarında hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarında makul bir düzeyde kallus oluşumu gözlenirken, direk ya da indirek yolla adventif sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. Ancak Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’in incelenmesinden görüleceği gibi hipokotil eksplantlarında, aynı kinetin konsantrasyonlarında daha fazla kallus oluşumu saptanmıştır.



Şekil 4.3 Farklı kinetin konsantrasyonlarında kotiledon eksplantında kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra kallus oluşumu

#### 4.2.3 Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Farklı BAP konsantrasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.3), en yüksek sürgün rejenerasyon oranı 1.0 mg/l BAPx0.2 mg/l IBA kombinasyonunda %53.3 olarak saptanmıştır. Ancak, *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu frekansını daha da artırmak amacıyla hipokotil eksplantları, farklı konsantrasyonlarda BAP (1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l) ve TDZ (0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) kombinasyonlarını içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 4-5 hafta sonra bütün eksplantlar üzerinde kallus oluşumu başlamış, 8-10 hafta sonra bazı ortamlarda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi farklı BAP konsantrasyonlarının, kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkileri 0.01, sürgün oluşturan eksplant oranı üzerine ise 0.05 düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Farklılıkların önem düzeyini belirleyebilmek amacıyla Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Çizelge 4.6 Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil eksplantında kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	SD	Kallus (%)			Sürgün oluşturan eksplant oranı			Eksplant başına sürgün sayısı		
		KT	KO	F	KT	KO	F	KT	KO	F
<b>Tekerrürler</b>	2	2695.842	1347.842	10.9446	653.591	326.795	3.7722	0.884	0.442	1.3110
<b>Ortamlar</b>	11	4452.197	4452.197	3.2864**	2004.683	182.244	2.1036*	2.856	0.260	0.7703
<b>Hata</b>	22	2709.491	123.159		1905.916	86.633		7.416	0.337	
<b>Toplam</b>	35	9857.530			4564.190			11.156		

\*, \*\*) Sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.7 Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Hormonlar (mg/l)		Kallus (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
BAP	TDZ			
1.0	0.25	6.6 ab*	3.3 ab*	0.20
1.0	0.5	23.3 ab	6.6 ab	0.53
1.0	1.0	10.0 ab	6.6 ab	0.46
1.0	2.0	13.3 ab	3.3 ab	0.0
2.0	0.25	3.3 b	0.0 b	–
2.0	0.5	3.3 b	0.0 b	–
2.0	1.0	6.6 ab	0.0 b	–
2.0	2.0	23.3 ab	0.0 b	–
4.0	0.25	13.3 ab	0.0 b	–
4.0	0.5	30.0 ab	10.0 ab	0.83
4.0	1.0	33.3 a	13.3 a	0.46
4.0	2.0	26.6 ab	6.6 ab	0.50

\*) Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiki olarak farklıdır.

Çizelge 4.7’de de görüldüğü gibi, hipokotil eksplantlarına ait kallus oluşturan eksplant oranı, %3.3- 33.3 arasında değişmiştir. En yüksek kallus oluşturan eksplant oranı (%33.3) 4 mg/l BAP + 1 mg/l TDZ, en düşük kallus oluşturan eksplant oranı (%3.3) 2 mg/l BAP + 0.25 mg/l TDZ ve 2 mg/l BAP + 0.50 mg/l TDZ içeren MS besin ortamından alınmıştır. Besin ortamları, kallus oluşturan eksplant oranı, 0.01 düzeyinde ise 2 grup içerisinde yer almışlardır.

Sürgün rejenerasyon oranı, %0.0-13.3 arasında değişmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (%13.3) kallus oluşturma oranında olduğu gibi 4 mg/l BAP + 1 mg/l TDZ, en düşük sürgün rejenerasyon oranı ise (%0.0) 2 mg/l BAP’in tüm TDZ dozları (0.25, 0.5 ve 1.0 mg/l) ve 4 mg/l BAP’in 0.25 mg/l TDZ ile yaptığı kombinasyonlarda saptanmıştır. Besin ortamları, sürgün rejenerasyonu bakımından, 0.05 düzeyinde 2 grup içerisinde yer almışlardır.

Hipokotil eksplantlarında, farklı besin ortamlarına ait ortalama eksplant başına sürgün sayısı, 0.0-0.83 adet arasında değişmiştir. Ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı 0.83 adet ile 4 mg/l BAP + 1.0 + mg/l TDZ kombinasyonundan elde edilmiştir. 1 mg/l BAP + 2 mg/l TDZ, 2 mg/l BAP + 0.25 mg/l TDZ, 2 mg/l BAP + 0.50 mg/l TDZ, 2 mg/l BAP + 1.0 mg/l TDZ, 2 mg/l BAP + 2.0 mg/l TDZ ve 4 mg/l BAP + 0.25 mg/l TDZ içeren ortamlarda ise sürgün meydana gelmemiştir.

#### **4.2.4 Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının kotiledon yaprak eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri**

*In vitro* adventif sürgün rejenerasyonu frekansını belirlemek amacıyla kotiledon eksplantları, farklı konsantrasyonlarda BAP (1.0, 2.0 ve 4.0 mg/l) ve TDZ (0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) kombinasyonlarını içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 6-7 hafta sonra bazı eksplantlar üzerinde kallus oluşumu başlamış 8-10 hafta sonra bazı ortamlarda çok düşük düzeyde sürgün oluşumu gözlenmiştir. Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi farklı BAP konsantrasyonlarının, kallus oluşturan eksplant oranı üzerine etkisi 0.01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunurken, sürgün oluşturan eksplant oranı üzerinde ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Farklılıkların önem düzeyini belirleyebilmek amacıyla Duncan testi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının kotiledon eksplantında kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	SD	Kallus (%)			Sürgün oluşturan eksplant oranı			Eksplant başına sürgün sayısı		
		KT	KO	F	KT	KO	F	KT	KO	F
<b>Tekerrürler</b>	2	958.757	479.379	4.2410	61.595	30.797	0.5228	0.035	0.017	0.3806
<b>Ortamlar</b>	11	4488.977	408.089	3.6103**	403.280	36.662	0.6223	0.321	0.029	0.6343
<b>Hata</b>	12	2486.783	113.036		1296.085	58.913		1.012	0.046	
<b>Toplam</b>	35	7934.517			1760.960			1.367		

\*\* ) 0.01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.9 Farklı BAP ve TDZ kombinasyonlarının kotiledon eksplantında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri

Hormonlar (mg/l)		Kallus (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
BAP	TDZ			
1.0	0.25	26.6 a	0.0	0.0
1.0	0.5	13.3 b	3.3	0.2
1.0	1.0	33.3 a	3.3	0.0
1.0	2.0	13.3 b	0.0	0.0
2.0	0.25	13.3 b	0.0	0.3
2.0	0.5	16.6 b	0.0	0.0
2.0	1.0	10.0 b	0.0	0.0
2.0	2.0	0.0 b	0.0	0.0
4.0	0.25	6.6 b	0.0	0.0
4.0	0.5	0.0 b	0.0	0.0
4.0	1.0	0.0 b	0.0	0.0
4.0	2.0	20.0 ab	6.6	0.1

\*) Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar 0.01 düzeyinde istatistiki olarak farklıdır.

Çizelge 4.9’da da görüldüğü gibi, kotiledon eksplantlarına ait kallus oluşturan eksplant oranı, %0.0-33.3 arasında değişmiştir. En yüksek kallus oluşturan eksplant oranı (%33.3) 1 mg/l BAP + 1 mg/l TDZ, en düşük kallus oluşturan eksplant oranı (%0.0) 2 mg/l BAP + 2 mg/l TDZ, 4 mg/l BAP + 0.50 mg/l TDZ ve 4 mg/l BAP + 1.0 mg/l TDZ içeren ortamdan alınmıştır. Besin ortamları, kallus oluşturan eksplant oranı bakımından, 0.01 düzeyinde ise 2 grup içerisinde yer almışlardır. Sürgün rejenerasyon oranı, %0.0-6.6 arasında değişmiştir. Besin ortamları arasındaki fark, sürgün rejenerasyonu bakımından önemsiz çıkmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı, 0.0-0.3 adet arasında değişirken benzer olarak besin ortamları arasında istatistiki farklılık görülmemiştir.

#### 4.2.5 İndirgenmiş MS besin ortamı ve NAA konsantrasyonlarının nohut geveninin *in vitro* köklenmesi üzerine etkileri

Doku kültürü çalışmalarında elde edilen sürgünlerde, yüksek oranda köklenmeyi teşvik etmek amacıyla 1.5-2 cm uzunluğa ulaşan sürgünler kesilerek, farklı konsantrasyonlarda MS ve NAA içeren ve %7 agar ile katılaştırılmış ortamda köklendirilmeye alınmıştır. Kültür başlangıcından 2 hafta sonra köklenme başlamış 4 hafta sonra çok sayıda gelişkin kök oluşumu meydana gelmiştir. Daha sonra bitkicikler yıkarılarak vermikulit toprak karışımında kültür dolaplarında aklimatize edilerek seraya aktarılmıştır (Şekil 4.4). Farklı kuvvetlerdeki MS ortamlarında NAA dozlarının köklenme oranı ve sürgün başına kök sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10'da da görüldüğü gibi kök oluşturan sürgün oranı ve sürgün başına (ortalama) kök sayısı etkileri 0.01 düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Ayrıca uygulanan MS kuvveti x NAA dozu interaksiyonu 0.01 düzeyinde önemli çıkmıştır.

Çizelge 4.10 Farklı kuvvetlerdeki MS besin ortamı ve NAA dozlarının köklenme üzerine etkileri

Köklendirme ortamı		Köklenme (%)	Sürgün başına kök sayısı
MS	NAA (mg/l)		
1/1	0.25	46.6 d*	8.6 gh*
1/1	0.50	40.0 d	5.16 i
1/1	1.00	70.0 c	10.66 fg
3/4	0.25	76.6 c	8.33 gh
3/4	0.50	80.0 bc	7.33 hi
3/4	1.00	90.0 ab	14.46 de
1/2	0.25	100.0 a	21.20 a
1/2	0.50	100.0 a	19.63 ab
1/2	1.00	93.3 ab	16.56 cd
1/4	0.25	80.0 bc	12.13 ef
1/4	0.50	100.0 a	17.33 bc
1/4	1.00	76.6 c	16.00 cd

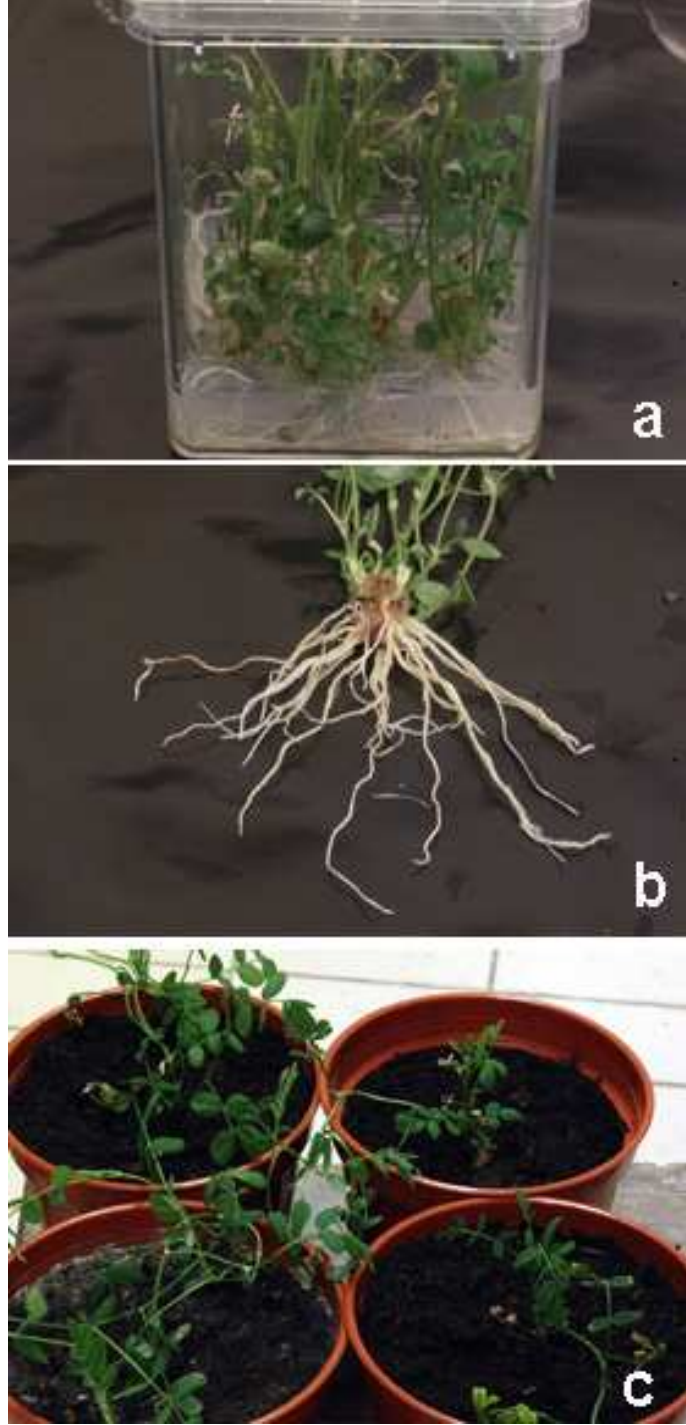
\*) Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar 0.01 düzeyinde istatistiki olarak farklıdır.

Çizelge 4.10'da da görüldüğü gibi, kök oluşturan sürgün oranı, %40.0-100.0 arasında değişmiştir. En yüksek kök oluşturan sürgün oranı (%100) ½ MS + 0.25 mg/l NAA, ½

MS + 0.50 mg/l NAA ve ¼ MS + 0.50 mg/l NAA içeren köklenme ortamlarında bulunmuştur. En düşük kök oluşturan sürgün oranları (%40 ve 46.6) ise 1/1 kuvvetindeki MS ortamının 0.25 ve 0.50 mg/l NAA ile oluşturduğu kombinasyonlarda saptanmıştır.

Farklı MS kuvveti x NAA kombinasyonlarının, sürgün başına ortalama kök sayısı 5.16-21.20 adet arasında değişmiştir. En fazla kök sayısı 21.20 adet ile köklenme oranında olduğu gibi ½ MS + 0.25 mg/l NAA kombinasyonunda saptanırken, en az kök sayısı ise 5.16 adet ile 1/1 MS + 0.50 mg/l NAA kombinasyonunda elde edilmiştir.

Hem köklenme oranı hem de sürgün başına kök sayısı göz önünde bulundurulduğunda ½ MS + 0.25 mg/l NAA, ½ MS + 0.50 mg/l NAA kombinasyonları en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.4 Nohut geveninde *in vitro* köklendirme ve köklenen bitkilerin aklimatizasyonu  
a.  $\frac{1}{2}$  MS ve 0.50 mg/l NAA içeren besin ortamında sürgünlerin köklendirilmesi, b. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra sürgünlerden kök oluşumu, c. Köklendirilen bitkiciklerin saksıya alınarak iklim odalarında aklimatizasyonu.



### 4.3 Gen Aktarımı

Daha önceki doku kültürü çalışmalarında, en yüksek rejenerasyon frekansının, *in vitro*'da yetiştirilen hipokotil eksplantı ile 1-2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l IBA içeren MS besin ortamında elde edildiği belirlenmiştir.

Nohut givenine gen aktarımı amacıyla, pAoPR1 GUS-INT, pPR1a GUS ve p35S GUS-INT vektörlerini içeren GV 2260 *Agrobacterium tumefaciens* hatları ile 2 haftalık 0.5 cm uzunluğundaki hipokotil eksplantları ile inoküle edilmiştir.

#### 4.3.1 Farklı bakteri konsantrasyonlarının gen aktarımı üzerine etkileri

pAoPR1 GUS-INT, pPR1a GUS ve 2260 p35S GUS-INT vektörlerini içeren *A. tumefaciens* hatları, 28°C'de 10 ml'lik NB büyütme ortamında büyütülmüş, 25 ml'lik sıvı rejenerasyon ortamına 0.5, 1 ve 2.5 ml konarak, inokulum 1/10, 1/25 ve 1/50 oranında seyreltilmiştir. Eksplantlar 2 gün süreyle 22-24°C'lik ko-kültivasyona tabi tutulmuşlardır. Kullanılan her üç bakteri hattında da, 1/10 ve 1/25'lik konsantrasyonlarla inoküle edilen hipokotil eksplantlarının tamamının üzerinde 5-7 gün içinde aşırı şekilde *A. tumefaciens* gelişimi görülmüş, ko-kültivasyondan sonra eksplantlar 500-1000 mg/l augmentin ile yıkanmasına rağmen, *A. tumefaciens*'in gelişimi önlenememiştir. 1/25 ve 1/50'lik konsantrasyonda ise ortalama %10 civarında eksplantta *Agrobacterium*'un aşırı büyüdüğü gözlenmiş olup, ko-kültivasyondan sonra 1000 mg/l'lik augmentin ile eksplantların yıkanmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Her üç bakteri hattında 1/25 ya da 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri inokulumunun en uygun olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.3.2 İnokulasyon süresinin gen aktarımı üzerine etkisi

Hipokotil eksplantları, 15, 30 ve 45 dakika süreyle 1/50 oranında seyreltilmiş üç bakteri hatları ile 1/50'lik inokulumda inoküle edilmiş, daha sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. 2 gün süreyle 22-24°C'lik ko-kültivasyondan sonra 1000 mg/l augmentin ile yıkanan eksplantlar, seçici rejenerasyon ortamına (2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l IBA, 50

mg/l kanamisin ve 500 mg/l augmentin içeren MS besin ortamı) aktarılmış, eksplantların etrafında yaklaşık 1 hafta içerisinde *A. tumefaciens* gelişimi görülmüştür. 6 hafta sonra *A. tumefaciens* ile bulaşık eksplant oranı ve kanamisin antibiyotiğine dayanıklı kallus oranı hesaplanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Farklı inokulasyon süresinin kanamisine dayanıklı kallus geliştiren eksplant oranı ile *Agrobacterium tumefaciens* bulaşıklığı üzerine etkisi

Bakteri Hatları	Bulaşık eksplant oranı (%)			Kanamisine dayanıklı kallus oluşturan eksplant oranı (%)			Kanamisine dayanıklı sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		
	15 dk	30 dk	45 dk	15 dk	30 dk	45 dk	15 dk	30 dk	45 dk
p35S GUS-INT	-	-	-	-	10	-	-	-	-
pAoPR1 GUS-INT	-	-	40	-	-	-	-	-	-
pPR1a GUS	-	-	20	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi, her üç bakteri hattında da 15 ve 30 dakikalık inokulasyon süresinde eksplantların tamamında *Agrobacterium tumefaciens* bulaşıklığı görülmemiş, buna karşılık 45 dakikalık inokulasyon süresinde sadece p35S GUS-INT hattında *A. tumefaciens* bulaşıklığına rastlanmazken pAoPR1 GUS-INT ve pPR1a GUS hatlarında sırasıyla %40 ve %20’lik bulaşıklık görülmüştür. Denemede her üç inokulasyon süresinde ve her üç bakteri hattında kanamisine dayanıklı kallus oluşumu (%10) sadece p35S GUS-INT ile inoküle edildiğinde saptanmıştır. Bu sonuçlara göre 30 dakikalık inokulasyon süresinin en uygun süre olduğu görülmüştür.

#### 4.3.3 Ko-kültivasyon süresinin gen aktarımı üzerine etkisi

Hipokotil eksplantları, 30 dakika her üç bakteri hattı ile 1/50’lik bakteri konsantrasyonunda inokule edilerek, 24, 48 ve 96 saat süreyle antibiyotik içermeyen rejenerasyon ortamında 2 gün süreyle 22-24°C’de ko-kültivasyona bırakılmıştır. Daha sonra seçici antibiyotik içeren rejenerasyon ortamına aktarılmışlardır. Buradaki eksplantların etrafında 3 ya da 4 hafta içinde *A. tumefaciens* gelişimi görülmüş, ko-kültivasyondan sonra eksplantlar 1000 mg/l’lik augmentin ile yıkanmasına rağmen *A. tumefaciens*’in gelişimi önlenememiştir. Kültür başlangıcından 8 hafta sonra *A.*

*tumefaciens* ile bulaşık eksplant oranı ve kanamisine dayanıklı kallus oluşturan eksplant oranı Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Farklı ko-kültivasyon süresinin kanamisine dayanıklı eksplant oranı ve *A. tumefaciens* bulaşıklığı üzerine etkileri

Bakteri Hatları	Bulaşık eksplant oranı (%)			Kanamisine dayanıklı kallus oluşturan eksplant oranı (%)			Kanamisine dayanıklı sürgün oluşturan eksplant oranı (%)		
	24 saat	48 saat	96 saat	24 saat	48 saat	96 saat	24 saat	48 saat	96 saat
p35S GUS-INT	-	-	100	-	-	-	-	-	-
pAoPR1-GUS-INT	-	-	100	-	10	-	-	-	-
pPR1a-GUS	-	20	50	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi her üç bakteri hattında da *A. tumefaciens* bulaşıklığı 24 saatlik ko-kültivasyon süresi sonunda olmamıştır. Her bakteri hattında da, ko-kültivasyon süresi 96 saate çıktıkça önemli miktarda *A. tumefaciens* kontaminasyonu olmuş ve bu bulaşıklık sonucu eksplantların öldüğü görülmüştür. 48 saatlik ko-kültivasyon süresinde sadece pPR1a GUS hattında %20 oranında bulaşıklığa rastlanmıştır. En yüksek kanamisine dayanıklı kallus oluşturan eksplant oranı (%10) sadece pAoPR1 GUS-INT hattı ile 48 saat ko-kültive edilen eksplantlarda görülmüştür. Ancak oluşan bu kallustan sürgün gelişimi meydana gelmemiştir. Ayrıca diğer bakteri hatları ile farklı sürelerde ko-kültive edilen eksplantların hiçbirinde direkt ya da kallus üzerinde sürgün oluşumu olmamış eksplantlar kültür başlangıcından yaklaşık 20-25 günlük sürede kanamisinin toksik etkisi nedeniyle canlılıklarını kaybetmiştir. *A. tumefaciens* bulaşıklığının en az, ko-kültivasyon süresinin ise en uzun olduğu uygulama gen aktarımında en uygun süre olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar her üç bakteri hattı için en uygun ko-kültivasyon süresinin 48 saat olduğunu göstermektedir.

#### 4.3.4 Ko-kültivasyonda kullanılan farklı ortam fazlarının gen aktarımı üzerine etkisi

Hipokotil eksplantları, 30 dk süreyle her üç bakteri hattı tarafından 1/50 konsantrasyonundaki bakteri inokulumu ile inokule edildikten sonra, eksplantlar katı ve sıvı rejenerasyon ortamında 48 saat süreyle 24 °C’de ko-kültivasyona tabi tutulmuştur. Sıvı ortamda eksplantlar 120 devir/dak. çalkalanmıştır. Son olarak eksplantlar seçici antibiyotik içeren rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. İnokulasyondan yaklaşık 5-6 hafta sonra kullanılan her üç bakteri hattı ile inokule edilen bazı hipokotil eksplantlarında kanamisine dayanıklı kalluslar oluşmaya başlamış olup, bazılarında ise direk sürgün oluşumu görülmeye başlanmıştır. Öte yandan, bakterilerle inokule edilmeyen kontrol eksplantları kanamisin içeren rejenerasyon ortamında kallus oluşturamadan kanamisinin toksik etkisiyle öldüğü görülmüştür. Kanamisine dayanıklı kalluslar dört haftada bir alt kültüre alınarak ortamları yenilenmiştir. Canlılığını devam ettiren bazı kalluslar üzerinde 2-3 hafta sonra sürgün oluşumu görülmüş, bu sürgünler köklendirme ortamına alınmıştır. Burada köklenip gelişimine devam eden bitkiciklerde histokimyasal GUS analizi yapılmış, analiz sonucunda bitkilerin tamamı GUS negatif çıkmıştır.

Çizelge 4.13 Farklı bakteri hatları ile ko-kültivasyon ortam fazının, kanamisine dayanıklı kallus oluşturma oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı, köklenen sürgün oranı üzerine etkisi

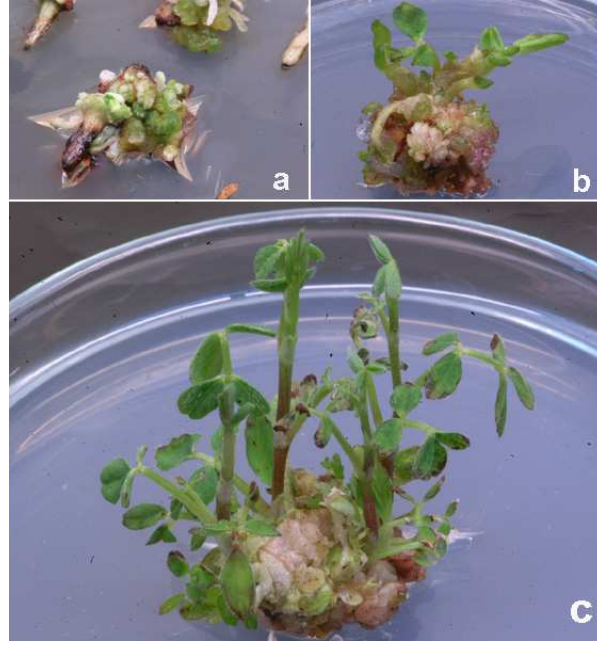
Bakteri hatları	Fazlar	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Köklenen sürgün oranı (%)	GUS pozitif bitki oranı (%)
p35S GUS-INT	Sıvı	30	12.5	0.47	100	-
	Katı	-	-	-	-	-
pAoPR1-GUS-INT	Sıvı	10	-	-	-	-
	Katı	-	-	-	-	-
pPR1a GUS	Sıvı	-	-	-	-	-
	Katı	-	-	-	-	-

Çizelge 4.13’de de görüldüğü gibi, kanamisine dayanıklı en yüksek oranda kallus oluşturan eksplant oranı sıvı ko-kültivasyon ortamında (%30.0) p35S GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlardan alınmıştır. Bu oranı, %10.00 ile sıvı ko-kültivasyon ortamında pAoPR1 GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlar izlemiştir. Her iki hatta da kallus oluşturma oranı bakımından, sıvı ko-kültivasyon ortamının katı ko-kültivasyon ortamına göre daha iyi olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.13’de de görüldüğü gibi, farklı bakteri hatlarında ve ko-kültivasyon ortamında sürgün oluşturan eksplant oranı %0.0-12.50 arasında değişmiştir. En yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı (%12.50) sıvı ko-kültivasyon ortamında p35S GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlardan alınmıştır. pAoPR1 GUS-INT hattı ile inokule edilen eksplantlar %10 oranında kallus oluşturmamasına rağmen, oluşan kalluslarda sürgün gelişimi görülmemiştir. PR1a GUS hattı ile inokule edilen eksplantların hiç biri sıvı ve katı ko-kültivasyon ortamında kallus oluşturmamış, dolayısıyla sürgün meydana getirmeyerek en düşük değeri almıştır.

Farklı bakteri hatları ile ko-kültivasyon ortamında eksplant başına sürgün sayısı, 0.0-0.47 adet arasında değişmiştir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı (0.47 adet) rejenerasyon oranında olduğu gibi sıvı ko-kültivasyon ortamında p35S GUS-INT bakteri hattından elde edilmiştir. p35S GUS-INT ve pAoPR1 GUS-INT hatları için en iyi ko-kültivasyon ortamının sıvı ko-kültivasyon ortamı olduğu söylenebilir.

p35S GUS-INT bakteri hattı ile sıvı ko-kültivasyon ortamından elde sürgünler 75 mg/l kanamisin ve 250 mg/l augmentin içeren köklendirme ortamında ( $\frac{1}{2}$  MS + 0.25 mg/l NAA) köklendirmeye alınmış, sürgünlerin tamamı köklenmiştir. Köklenen bitkiciklerde Jefferson (1987) tarafından bildirilen histokimyasal GUS analizi yapılmıştır. Ancak hepsinin GUS negatif olduğu görülmüştür. Çeşitli nedenlerle besin ortamında bulunan kanamisin antibiyotiğinin toksik etkisi kaybolmakta, seçici rejenerasyon ortamında kalluslar gelişebilmektedir. Bu kalluslardan daha sonra da gelişkin sürgünler meydana gelebilmektedir. Bu sürgünlere kaçak sürgünler denmektedir (Şekil 4.5). Kaçak sürgün oluşumunu önlemek amacıyla seçici besin ortamları 15 günde bir yenilenmiştir.



Şekil 4.5 p35S GUS-INT ile inokule edilen hipokotil eksplantında kaçak sürgün oluşumu  
a. Seçici rejenerasyon ortamında kültür başlangıcından 4 hafta sonra kallus oluşumu, b. 6 hafta sonra kaçak sürgün oluşumu, c. 10 hafta sonra seçici rejenerasyon ortamında gelişen GUS negatif kaçak sürgünler.

#### 4.3.5 *A. tumefaciens* aracılığıyla nohut gevenine *bar* geni aktarım çalışmaları

Tez gerekçesinde adı geçen diğer *Agrobacterium tumefaciens* hattı olan LBA pRGG *bar* 4404 ise plazmidinde fosfinotrisin herbisitine dayanıklılığı kodlayan *bar* geni taşımaktadır.

Hipokotil segmentleri, daha önceden optimize edilen bakteri konsantrasyonu (1/50), inokulasyon süresi (30 dk) ve 24 °C'de 48 saat süreyle sıvı rejenerasyon ortamında ko-kültive edilmiştir. Daha sonra eksplantlar 10 tekrarlamalı olarak fosfinotrisin ve augmentin içeren rejenerasyon ortamına aktarılmışlardır. Yaklaşık 6 hafta sonra kullanılan her üç bakteri hattında da bazı eksplantlarda çok düşük frekansta (%1.25) kanamisine dayanıklı kalluslar oluşmaya başlamış olup, kanamisine dayanıklı kalluslar üç haftada bir alt kültüre alınarak ortamları yenilenmiştir. Canlılığını devam ettiren bu kalluslar üzerinde sürgün oluşumu görülmemiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 *Agrobacterium tumefaciens* LBA pRGG *bar* 4404 hattı ile gen aktarımı sonuçları

<b>Bakteri hattı</b>	<b>Fosfinotrisine dayanıklı kallus oluşturan eksplant oranı (%)</b>	<b>Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)</b>	<b>Eksplant başına sürgün sayısı (adet)</b>	<b>Köklenen sürgün oranı (%)</b>
LBA pRGG <i>bar</i> 4404	1.25	-	-	-

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki genetik mühendisliğinin başarılı uygulamaları sonucunda elde edilen herbisitlere, böceklere ve virüslere dayanıklı bitkiler bugün birçok ülkede yaygın olarak üretilmeye başlanmıştır. Bitki genetik mühendisliğinin kullanıma sokulmasıyla, bitki ıslahında kullanılan gen kaynaklarının sınırları genişletilmiştir. Artık, bitkilere diğer bitkiler dışında, hayvanlardan, bakteri ve virüslerden izole edilen genlerin aktarılması çalışmaları devam etmektedir (Uranbey 2002). Biyoteknolojik yöntemlerle gen aktarma sistemlerinde önce istenilen gen tek hücrelere veya bir doku parçası içerisindeki hücrelere yerleştirilmekte, daha sonra bu hücrelerden doku kültürü teknikleri ile transgenik bitkiler elde edilmektedir. Herhangi bir gen aktarma sisteminin esasını, tam bir bitki oluşturma yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi oluşturur. Öte yandan, bitki elde edilemeden gerçekleştirilecek bir gen aktarım tekniğinin önemi olmamakta ve mutlaka gen aktarılmış yeni bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir. Genelde doku içerisinde gen aktarılmış hücrelerin oranı oldukça düşüktür (Özcan and Özgen 1996). Bu nedenle gen aktarımı yapılan hücrelerden transgenik bitkilerin elde edilebilmesi için, gen aktarımına başlamadan önce mutlaka üzerinde çalışılacak bitki türü için gen aktarımına uygun yüksek frekansta bir adventif sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek oranda adventif sürgün oluşumu gen aktarımı çalışmalarının başarısında önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmalarda ekspantlar genel olarak *in vitro* bitkiciklerden sağlanmaktadır. Birçok türde olduğu gibi nohut geveninde de bu bitkicikler *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan sağlanmaktadır. Bu çalışmada, çimlendirme için tohumlar iki farklı yöntemde tabi tutulmuştur. I. Yöntem’de, tohumlar, %3 sukroz içeren %0.7 agar ile katılaştırılan MSO besin ortamında, II. Yöntem’de ise 7.5 ml steril su içeren petri kabı içerisinde fitre kağıtları arasında olmak üzere iki farklı şekilde çimlendirmeye alınmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek çimlenme oranı (%85) II. Yöntem’de saptanmıştır. I. Yöntemde kullanılan MS besin ortamının tohumların osmotik basıncını olumsuz yönde etkileyerek çimlenmeyi azaltabileceği düşünülmüştür.



Bu sonuçlar, Uranbey *et al.* (2003), tarafından nohut geveninde yapılan çalışma ile tam bir benzerlik göstermektedir.

Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında öncelikle, rejenerasyon kapasitesi Uranbey *et al.* (2003) tarafından yüksek olduğu bildirilen hipokotil eksplantları üzerinde durulmuştur. Hipokotil eksplantları farklı BAP ve kinetin konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra BAP ve TDZ kombinasyonlarının hipokotil ve kotiledon eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine ekileri incelenmiştir.

Farklı BAP konsantrasyonları içerisinde sürgün rejenerasyon oranı (%53.3) ve eksplant başına sürgün sayısı (3.3 adet) bakımından sırasıyla 1.0 ve 2.0 mg/l BAP'ın 0.2 mg/l IBA ile oluşturduğu kombinasyonları içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Bu sonuç daha önceden Uranbey *et al.* (2003), tarafından nohut geveninde yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Daha sonra hem hipokotil ve hem de kotiledon eksplantları farklı kinetin konsantrasyonları içeren MS besin ortamında kültüre alınmış, ancak kinetin her iki eksplant tipinde de adventif sürgün oluşumunu uyarmadığı belirlenmiştir. Benzer olarak, Özcan *et al.* (1995) tarafından başka bir baklagil türü olan bezelyede yapılan çalışmada, besin ortamında bulunan BAP ile kinetin sürgün üretimini artırmadığını bildirmişlerdir. Nohut geveninde hipokotilin kotiledona göre daha iyi adventif sürgün rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu söylenebilir. Başka araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda, diğer önemli baklagil türleri olan korunga (Gu 1987; Özgen *et al.* 1988) ve baklada da (Fakhrai *et al.* 1989) hipokotilin en uygun eksplant tipi olduğu bildirilmiştir.

Tez çalışmasında amaç öncelikle gen aktarımına uygun yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunu geliştirmektir. Gen aktarım frekansını yükseltebilmek için bu kaçınılmazdır. Bu amaçla hipokotil eksplantları, çeşitli konsantrasyonlarda BAP ve TDZ içeren MS besin ortamlarına alınmış, kullanılan BAP ve TDZ kombinasyonlarının sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği görülmüştür. Bazı araştırmacılar, farklı türlerde yürüttükleri çalışmada BAP ve TDZ kombinasyonlarının, *Vigna subterranea* (Lacroix *et al.* 2003), soya (Franklin *et al.* 2004) ve papaya (Bhattacharya *et al.* 2003)

gibi türlerde sürgün oluşturma kapasitesi üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık Wilhelm 1999, *Acer pseudoplatanus*'ta yaptığı çalışmada, BAP ve TDZ'nin tek başına kullanıldığında adventif sürgün rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini, ancak birlikte kullandıklarında sürgün oluşumunu geriletici yönde bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma, bizim bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

Gelişen sürgünler, yüksek oranda köklenmeyi teşvik etmek farklı konsantrasyonlarda MS ve NAA içeren ve % 7 agar ile katılaştırılmış ortamda köklendirilmeye alınmıştır. Farklı bitki türlerinin en iyi köklendiği büyüme düzenleyicisi tipi ve konsantrasyonu farklı olabilmektedir. Farklı baklagil türlerinde yapılan çalışmalarda; mercimeğin 0.25 mg/l IBA (Khawar and Özcan 2002), Macar fiğın 5 µM IBA, (Sancak *et al.* 2000), korunganın 1 mg/l IBA veya 1 mg/l NAA, (Özcan *et al.* 1996), çilek üçgülünün 1-4 mg/l IAA, (Singha *et al.* 1988), nohutun 1 µM IBA ve bezelyenin 2 mg/l IAA içeren besin ortamında (Hussey and Gunn 1984) iyi köklenebildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da % 100'e varan, aynı zamanda sağlıklı kök oluşumları özellikle ½ MS + 0.25 mg/l NAA ve ½ MS + 0.50 mg/l NAA kombinasyonlarında elde edilmiştir. ½ kuvvetindeki indirgenmiş MS'in köklenmeyi olumlu teşvik ettiği görülmüştür. Benzer olarak, Komalavalli and Rao (2000) tarafından *Gymnema sylvestre*'de yapılan bir çalışmada, ½ kuvvetindeki MS besin ortamının köklenmeyi önemli derecede artırdığı bildirilmiştir.

*A. tumefaciens* ile gen transferinde gen aktarımı frekansını artırmak amacıyla bazı *in vitro* manipulasyonlar yapılabilmektedir. *A. tumefaciens* ile gen aktarımında, kullanılan bakteri konsantrasyonları, inokulasyon ve ko-kültivasyon süresinin tranformasyon mekanizmasını üzerine etkileri önemli olabilmektedir. Yapılan denemelerde, p35S GUS-INT, pAoPR1 GUS-INT ve pPR1a GUS bakteri hatlarında 1/25 ya da 1/50 oranında seyreltilmiş bakteri inokulumunun en uygun olduğuna karar verilmiştir. Denemede 15, 30 ve 45 dk inokulasyon süresi kullanılmış ve sonuçlara göre 30 dakikalık inokulasyon süresinin en uygun süre olduğuna karar verilmiştir. Eksplantlar, her üç bakteri hattı ile 24, 48 ve 96 saat süreyle antibiyotik içermeyen rejenerasyon ortamında 2 gün süreyle 22-24°C'de ko-kültive edilmiştir. Her bakteri hattında da, ko-

kültivasyon süresi 96 saate çıktıkça önemli miktarda *A. tumefaciens* kontaminasyonu görülmüştür. En yüksek kanamisine dayanıklı kallus oluşturan eksplant oranı (%10) sadece pAoPR1 GUS-INT hattı ile 48 saat ko-kültive edilen eksplantlarda görülmüştür. *A. tumefaciens* bulaşıklığının en az, ko-kültivasyon süresinin ise en uzun olduğu uygulama gen aktarımında en uygun süre olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre her üç bakteri hattı için en uygun ko-kültivasyon süresi 48 saattir. Ayçiçeği, keten ve tütün gibi bitkilerde gen aktarılmış bitki elde edebilmek için eksplantta yaralanan yüzeyin artırılması eksplantların inokulasyondan önce kültüre alınması ya da ko-kültivasyon süresinin uzatılması bazı araştırmacılar tarafından önerilmektedir. (Jordan and Mc Hughen 1988, Mc Hughen *et al.* 1989). Ayrıca çalışmada, *A. tumefaciens*'in etkinliği artırabilmek amacıyla katı ve çalkalayıcıdaki sıvı ko-kültivasyon ortamının etkileri incelenmiştir. Sıvı ko-kültivasyon ortamında çok düşük düzeyde (%12.5) sürgün meydana gelirken, bu sürgünlerin kaçak olduğu yapılan histokimyasal GUS analizi sonucu görülmüştür. p35S GUS-INT, pAoPR1 GUS-INT ve pPR1a GUS vektörlerini taşıyan GV 2260 *A. tumefaciens* hatları ile yapılan gen aktarım çalışmalarında hiç transgenik bitki elde edilememiştir. Ayrıca, LBA pRGG 4404 *bar* plazmidini taşıyan *A.tumefaciens* hattı ile yapılan gen aktarım çalışmaları neticesinde fosfinonitrisine dayanıklı transgenik bitkiler elde edilememiştir.

Sonuç olarak tarımsal açıdan değerli bir yem bitkisi olan nohut geveninde yapılan bu çalışmada, gen aktarma sistemine uygun bir adventif sürgün oluşumu ve gen aktarılmış (transgenik) bitki elde edilmeye çalışılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre yüksek oranda çimlenme ve uygun oranlarda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilirken, gen aktarımı çalışmalarında transgenik bitki elde edilememiştir. Transgenik nohut geveni elde edebilmek için farklı bakteri ırkları kullanılarak daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Armitage, P., Walden, R. and Draper, J. 1988. Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. In Genetic transformation. Edited by Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, P. Blackwell Scientific Publications.
- Avciođlu, R., Açıkgöz, E., Soya, H. ve Tan, A. 2000.V. Teknik Tarım Kongresi. Ankara S: 567.
- Barna, K. S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesisi, Plant Cell Rep., 13:510-513.
- Bhattacharya, J., Renukdas, N.N., Khuspe, S.S. and Rawal, S.K. 2003. Multiple Shoot Regeneration from Immature Embryo Explants of Papaya. Biol. plant. 7(3) 3327-331.
- Chamberlain, D.F. and Matthews, V.A. 1969. Notes from the royal botanic garden edinburgh, materials for a flora of Turkey. Leguminosae-astragalus 3: 285-286.
- Cho, H.J. and Widholm, J.M. 2002a. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 259- 269.
- Cho, H.J. and Widholm, J.M. 2002b. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of the legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 251-258.
- Cho, H.J., Widholm, J.M., Tanaka, N., Nakaniski, Y. and Murooka, Y. 1998. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milkvetch). Plant Sci. 138: 53-65
- Damiani, F., Pupilli, F., Pezzotti, M. and Arcioni, S. 1995. *Agrobacterium* mediated transformation in legumes. Proceedings of the XVI International Grassland

Congress, 1989. 425-426.

Desgagnes, R., Laberge, S., Allard, G., Khoudi, H., Castonguay, Y., Lapointe, J., Michaud, R. and Vezina, L.P. 1995. Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa ( *Medicago sativa* ). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 42: 129-140.

Düzgüneş, O., Kesici T. ve Gürbüz, F. 1983. İstatistik Metotları 1. A.Ü. Zir.Fak. Yay. No: 862, Ankara.

Fakhrai H., Fakhrai H. and Evans P.K. 1989: *In vitro* culture and plant regeneration in *Vicia faba* subsp. *Journal Exp. Bot.* 40: 813-817.

Franklin, C.I., Trieu, T.N., Cassidy, B.G., Dixon, R.A. and Nelson, R.S. 1993. Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Reports* 12 (2): 74-76.

Franklin, G.L., Carpenter, E., Davis, C.S., Reddy, D., Al-Abed, W., Abou Alaiwi, M., Parani, B., Smith and R.V. Sairam. 2004. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. *Plant Growth Regulation*. 43 (1) 73-79.

Genga, A., Allavena, A., Ceriotti, A. and Bollini, R. 1990. Toward genetic transformation of bean by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort.* 280: 527-536

Gervais, P. 2000. L'astragale pois chiche, la coronille bigarrée et le sainfoin (cicer milkvetch, crown vetch and sainfoin). *Université Laval*, Québec, 190pp

Golds, T.J., Lee, J.Y., Husnain, T., Ghose, T.K. and Daver, M.R. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. *Journal of Experimental Botany*. 42: 242, 1147-1157.

Gu, Z. 1987. Callus culture of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and plant regeneration through somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 60: 309-313.

- Havas, I., Bisztray, G.Y.D. and Velich, I. 2004. Attempts for the transformation of bean (*Phaseolus vulgaris*) Poster No.P6-15. 5th IVHCB symposium. In vitro culture and horticultural breeding. Biotechnology as Theory and Practice in horticulture. Debrecen. Hungary.
- Hewitt, G.B., Wilton, A.C. and Lokenz, R.J. 1982. The suitability of legumes for rangeland interseeding and as grasshopper food plants. *Journal of Range Management*, 35, 653-656.
- Hobbs, S.L.A., Jackson, J.A. and Mahon, J.D. 1989. Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell. Rep.* 8; 274-277.
- Hou, S.W. and Jia, J.F. 2004a. High Frequency Plant Regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explant via somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 95-100.
- Hou, S.W. and Jia, J.F. 2004b. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryonic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. *Plant Cell Reports*.
- Hussey, G. and Gunn, H.V. 1984. Plant production in Pea (*Pisum sativum* L. cvs. Puget and Upton) from long-term callus with superficial meristems, *Plant Scie. Letters*, 37, 143-148.
- Hussey, G., Johnson, R.D. and Warren, S. 1989. Transformation of meristematic cells in the shoot apex cultured pea shoots by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogens*. *Protoplasma*, 14; 101-105.
- Jackson, J.A. and Hobbs, S.L.A. 1990. Rapid multiple shoot production from cotyledonary node eksplants of pea. (*Pisum sativum* L). *In vitro Cell Dev. Biol. Pl.* 26; 835-838
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5; 387-405.

- Jordan, M.C. and Mc Hughen, A. 1988. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 7: 281-284.
- Kephart, K.D., Higley, L.G., Buxton, D.R. and Pedigo, L.P. 1990. Cicer milkvetch forage yield, quality and acceptability to insects. *Agronomy Journal*, 82, 477-483.
- Khawar, M.K. and Özcan, S. 2002. Effect of indole-3-butyric acid on *in vitro* root development in lentil (*Lens culinaris* Medik.), *Turk J. Bot.* 26,109-111.
- Komalavalli, N. and Rao, M. V. 2000. In vitro micropropagation of *Gymnema sylvestre* – A multipurpose medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 61: 97-105.
- Lacroix, B., Assoumou, Y. and Sangwan, R.S. 2003. Efficient *in vitro* direct shoot organogenesis and regeneration of fertile plants from embryo explants of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.). *Plant Cell. Rep.* 21 (12) 1153-1158.
- Lewis, M.E. and Bliss, F.A. 1994. Tumor formation and beta- glucuronidase expression in *Phaseolus vulgaris* inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119 (2) :361-366
- Loeppky, H.A., Bittman, S., Hiltz, M.R. and Frick, B. 1996 Seasonal changes in yield and nutritional quality of cicer milkvetch and alfalfa in northeastern Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Science*, 76, 441-446.
- Lulsdorf, M.M., Hans, R., Jennie, A.J., David, S.B., Shaun, L.A., Hobs. 1991. Optimizing the production of transformed pea (*Pisum sativum* L.) callus using disarmed *A. tumefaciens* strains. *Plant Cell Rep.*, 9:479-483.
- Luo, J.P. and Jia, J.F. 1998. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*, *Plant Cell Rep.* 17 567-570.

- Luo, J.P., Jia, J.F., Gu, Y.H. and Liu, J. 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. Plant Science 143: 93-99.
- Mathews, H. 1987. Morphogenetic responses from in vitro cultured seedling explants of mung bean ( *Vigna radiata* L. Wilezek). Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 11: 233-240.
- Mc Hughen, A., Jordan, M. and Feist, G. 1989. A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. J. Plant Physiol. 135: 245-248.
- Mroginski, L.A. and Kartha, K.K. 1981. Regeneration of pea *Pisum sativum* L cv. Century) plants by *in vitro* culture of immature leaflets. Plant Cell Rep., 1; 64-66.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497.
- Natali, L., and Cavallini, A. 1987. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) plantlets by *in vitro* culture of immature embriyos, Plant Breed., 99, 172-176.
- Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation (Ph.D. Thesis), University of Leicester, U.K.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki genetik mühendisliği. Kükem dergisi,1; 69-95.
- Özcan, S., Barghchi, M., Firek, S., and Draper, J. 1992. High frequency adventitious shoot regeneration from immature cotyledons of pea *Pisum sativum* L. Plant Cell Rep., 11; 44-47.
- Özcan, S., Sevimay, C.S., Yıldız, M., Sancak, C. and Özgen, M. 1996a. Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Plant Cell Reports. 16: 200-203.



- Özcan, S., Yıldız, M., Sancak, C. and Özgen, M. 1996b. Adventitious shoot regeneration in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Tr. J. of Botany, 20, 497-501.
- Özgen, M., Özcan, S., Sevimay, C. S., Sancak, C. and Yıldız, M. 1998. High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin, Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 52: 205-208.
- Pounti-Kaerlas, J., Eriksson, T. and Engstrom, P. 1990. Production of transgenic pea (*Pisum sativum*) plants by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Theor. & Appl. Genetics, 80: 246-252.
- Rubluo, A., Kartha, K.K., Mroginiski, L.A. and Dyck, J. 1984. Plant regeneration from pea leaflets cultured *in vitro* and genetic stability of regenerants. J. Plant Physiol., 117; 119-130.
- Samac, D. 1995. Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 43: 271-277.
- Sancak, C., Mirici, S. and Özcan, S. 2000. High frequency shoot regeneration from embriyo explants of Hungarian vetch, Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., 61: 231-235.
- Schroeder, H. E., Gollasch, S., Moor, A., Tabe, L.M., Craig, S, Hardie, D.C., Chrispeels, M. J., Spencer, D. and Higgins, T.J.V. 1995. Plant Physiol. 107 (4);1233-1239.
- Singha, S., Baker, B. S. and Bhatia S.K. 1988. Tissue culture propagation of running buffalo clover (*Trifolium stoloniferum* Muhl. ex A. Eatton). Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 15: 9-11.
- Thomas, M.R., Rose, R.J. and Nolan, K.E. 1991. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. Plant Cell Rep., 11: 113-117.
- Townsend, C.E. 1993. Breeding, physiology, culture and utilization of cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.) *Advances in Agronomy*, 49, 253-308.

- Townsend, C.E., Christensen, D.K. and Dotzenko, A.D. 1978. Yield, quality and persistence of cicer milkvetch as influenced by cutting frequency. *Agronomy Journal*, 70, 109-113.
- Uranbey, S. 2002. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Patates (*Solanum tuberosum* L.) Gen Aktarımı ve Patojen İlişkili Genlerin Transgenik Bitkilerdeki Belirtileri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Uranbey, S., Çöçü, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar. K.M., Mirici, S. ve Özcan, S. 2003. "Efficient adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch". *Biotech. and Biotech. Equip.*, 17, 33-37.
- Warkentin, T.D. and Mc Hughen, A. 1990. Potential for genetic transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik) with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro*, 26, (3), pt. 2, 44 A.
- Warkentin, T.D. and Mc Hughen, A. 1992. Potential for the Genetic Transformation of Lentil (*Lens culinaris* Medik) with *Agrobacterium tumefaciens*. Invited presentation to the International Industrial Biotechnology Conference on Bio-Recognition, June 1-4, 1992, Montreal, Quebec.
- White, D. W. R. and Voisey, C. 1994. Prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover, *Plant Cell Rep.*, 13: 303-308.
- Yılmazlar, B. 1999. Korunga, Çayır Üçgülü ve İskenderiye Üçgülünün *Agrobacterium tumefaciens*'e Karşı Duyarlılığının Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Derya GÜRLEK

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 1979

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Ankara Kurtuluş Lisesi, 1993-1996.

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü,  
1998-2002.

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri  
Anabilim Dalı. 2003-2006.