



T.C.  
NECMETTİN ERBAKANÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TÜRKİYE'DE SİYAH  
NOHUT(*Cicer arietinum* L.) BİTKİSİNDE  
*in vitro* REJENERASYON ÇALIŞMALARI

Arife KİRTİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mart-2019  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Arife KİRTİŞ tarafından hazırlanan “Türkiye’de Siyah Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisinde *in vitro* Rejenerasyon Çalışmaları” adlı tez çalışması 25/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

.....

#### Danışman

Doç. Dr. Muhammad AASIM

.....

#### Üye

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Süleyman Savaş DURDURAN  
FBE Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Arife KİRTİŞ

25/03/2019

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## TÜRKİYE’DE SİYAH NOHUT(*Cicer arietinum* L.) BİTKİSİNDE *in vitro* REJENERASYON ÇALIŞMALARI

Arife KİRTİŞ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muhammad ASİM

2019, 39 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Muhammad ASİM

Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.) yemeklik baklagillerin en önemli bitkilerinden birisidir. Nohut genel olarak iki farklı tip Kabuli tipi ve Desi tipi olarak bulunmaktadır. Siyah nohut tıbbi açıdan önemli bir bitkidir ve bitkinin potansiyeli biyoteknolojik yöntemler kullanarak daha da artırılabilir. *In vitro* rejenerasyon protokolü geliştirilerek sürekli bitki materyali sağlanması, mevsime bağlı kalmadan istenildiği kadar üretilebilmesi, biyoçeşitliliğe zarar vermeden sistemin sürdürülebilmesi gibi avantajlar sağlanabilecektir. Bu çalışmada bitki materyali olarak siyah nohutun *in vitro* koşullarda çoğaltılması hedeflenmiştir. Tez kapsamında siyah nohut bitkisinin farklı eksplantları (sürgün ucu, kotiledon boğum ve tohum), farklı oranlarda (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 3,00 mg/L) benzilaminopurin (BAP), thidiazuron (TDZ) ve kinetin (KIN) bitki büyüme düzenleyicilerini içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında 8 haftalık kültüre alınmıştır. Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantları ise 3-4 günlük *in vitro* çimlenmiş fidelerden elde edilmiştir. Sterilizasyon için % 5 NaOCl (çamaşır suyu) 15 dakika uygulanması en uygun bulunmuştur. Çalışmalar sonucunda tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Kültür ortamlarında en fazla sürgün sayısı (46,05) tohum eksplantından 0.50 mg/L TDZ içeren MS besi ortamında elde edilmiştir. Tüm eksplantlar ve hormonlar kıyaslanıldığında en uzun sürgün (10,67) tohum eksplantından 0,25 mg/L BAP konsantrasyonunda kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünler farklı konsantrasyonlarda (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 mg/L) indol-3-butirik asit (IBA) içeren besi ortamlarında köklenmeye bırakılmıştır. *In vitro* köklenen bitkiler perlit ve torf karışımı (4:1) bulunan saksılarda dış koşullara adaptasyon sağlamıştır. Saksılarda bitkilerde çiçeklenme ve tohumlar elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Siyah nohut, *In vitro*, Kotiledon boğum, Köklendirme, Rejenerasyon, Sürgün ucu

## ABSTRACT

## MS THESIS

### ***In vitro* REGENERATION STUDIES OF BLACK CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) PLANT OF TURKEY**

Arife KİRTİŞ

#### **THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY**

**Advisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammad ASIM**

**March 2019, 39 Pages**

**Jury**

**Assoc. Prof. Dr. Muhammad ASIM**

**Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ**

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an important edible legumes plant and is distinguished as Kabuli and Desi type. Desi type chick pea occurs in various shades of brown and black colours. Black chickpea is an important medicinal plant and its potential can be increased by using biotechnological tools. Advantages like continuous availability of plant material, off season unlimited plant production and sustainable system development without damaging the biodiversity can be achieved through *in vitro* regeneration. *In vitro* regeneration of black chickpea was set as an objective in this study. Different explant (shoot tip, cotyledonary node and seed) were cultured on Murashige & Skoog (MS) medium fortified with 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00 mg/L of benzilaminopurin (BAP), thidiazuron (TDZ) and kinetin (KIN) for a period of 8 weeks. Shoot tip and cotyledonary node explants were taken from 3-4 d old *in vitro* germinated seedlings. Application of 5 NaOCl % for 15 min was found best for sterilization of the seeds. Maximum number of 46.05 shoots were obtained from MS medium enriched with 0.50 mg/L TDZ. Comparing all explants and hormones, the longest shoots were tabulated from seed explants cultured on MS medium containing 0.25 mg/L BAP. The shoots were cultured on different concentrations (0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L) of indole-3-butyric acid (IBA) for rooting. *In vitro* rooted plantlets were successfully adapted in pots containing mixture (4:1) of perlite and peat moss. Flowering followed by seeds were taken from the plants adapted in the pots.

**Key Words:** Black chickpea, Cotyledonary node, *in vitro*, Regeneration, Rooting, Shoot tip

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans sürecim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, bilgilerini aktarıp çalışmalarımı bilinçli bir şekilde devam ettirmem için yönlendiren, bilimsel çalışmalar konusunda çok şey öğrenmem için elinden geleni yapan, çalışmamın konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana yardımcı olan Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden danışmanım Doç. Dr. Muhammad ASİM'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu süre boyunca benden desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve laboratuvar ortamında çalışmalarına yardım eden tüm arkadaşlarıma ayrıca, teşekkür ederim.

Arife KİRTİŞ  
KONYA-2019

# İÇİNDEKİLER

|   |            |
|---|------------|
| <b>ÖZET</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>v</b>   |
| <b>ÖNSÖZ</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>vii</b> |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>  | <b>ix</b>  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>  | <b>x</b>   |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>  | <b>xi</b>  |
| <b>1. GİRİŞ</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1. Nohut ( <i>Cicer arietinum</i> L.) Bitkisinin Sınıflandırılması ve Özellikleri | 1          |
| 1.2. Nohut ( <i>C. arietinum</i> ) Bitkisinin Besin Değeri                          | 2          |
| 1.3. Nohut ( <i>C. arietinum</i> ) Bitkisinin Tıbbi Önemi                           | 2          |
| 1.4. Bitki Doku Kültürü   | 3          |
| <b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b>  | <b>4</b>   |
| <b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>  | <b>11</b>  |
| 3.1. Bitki Materyali  | 11         |
| 3.2. Deneme Yeri  | 11         |
| 3.3. Büyüme Ortamları ve Büyüme Koşulları   | 11         |
| 3.4. Yüzey Sterilizasyonu   | 11         |
| 3.5. Eksplant İzolasyonu  | 12         |
| 3.6. Köklendirme ve Adaptasyon  | 13         |
| 3.7. İstatistiksel Değerlendirme  | 13         |
| <b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA</b>   | <b>14</b>  |
| 4.1. Siyah Nohut Tohumların Yüzey Sterilizasyon Çalışması                           | 14         |
| 4.2. Siyah Nohutun Sürgün Ucu Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları          | 15         |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3. Siyah Nohutun Kotiledon Boğum Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları..... | 19        |
| 4.4. Siyah Nohutun Tohum Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları .....          | 24        |
| 4.5. Köklendirme .....   | 29        |
| 4.6. Adaptasyon .....  | 31        |
| <b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>   | <b>39</b> |





## ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1:** Siyah nohut bitkisinin farklı hormonlar ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları .....16
- Çizelge 4.2:** Siyah nohut bitkisinin BAP ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....17
- Çizelge 4.3:** Siyah nohut bitkisinin TDZ ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....17
- Çizelge 4.4:** Siyah nohut bitkisinin KIN ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....17
- Çizelge 4.5:** Siyah nohut bitkisinin farklı hormonlar ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları .....21
- Çizelge 4.6:** Siyah nohut bitkisinin BAP ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....22
- Çizelge 4.7:** Siyah nohut bitkisinin TDZ ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....22
- Çizelge 4.8:** Siyah nohut bitkisinin KIN ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar.....23
- Çizelge 4.9:** Siyah nohut bitkisinin farklı hormonlar ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları.....25
- Çizelge 4.10:** Siyah nohut bitkisinin BAP ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....26
- Çizelge 4.11:** Siyah nohut bitkisinin TDZ ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....26
- Çizelge 4.12:** Siyah nohut bitkisinin KIN ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar .....26

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1.** *In vitro* rejenerasyon için çimlenmiş tohumdan elde edilen sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantları.....12
- Şekil 4.1.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun BAP içeren MS besi ortamında sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu.....18
- Şekil 4.2.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun TDZ içeren MS besi ortamında sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu.....19
- Şekil 4.3.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun BAP içeren MS besi ortamında kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu.....21
- Şekil 4.4.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun TDZ içeren MS besi ortamında kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu .....22
- Şekil 4.5.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun BAP içeren MS besi ortamında tohum eksplantından sürgün rejenerasyonu.....27
- Şekil 4.6.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun KIN içeren MS besi ortamında tohum eksplantından 8 hafta sonra sürgün rejenerasyonu.....28
- Şekil 4.7.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun TDZ içeren MS besi ortamında tohum eksplantından sürgün rejenerasyonu .....29
- Şekil 4.8.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun IBA içeren MS besi ortamında kök rejenerasyonu ..... 30
- Şekil 4.9.** *In vitro* koşullarda elde edilen siyah nohut bitkiciklerinin perlit ve torf (4:1) karışımı içeren saksılarda adaptasyonu sonucu çiçeklenmesi ve elde edilen tohumlar.....31

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

|                |   |                           |
|----------------|---|---------------------------|
| cm             | : | Santimetre                |
| dk             | : | Dakika                    |
| Mg             | : | Miligram                  |
| mL             | : | Mililitre                 |
| L              | : | Litre                     |
| pH             | : | asitlik-alkalilik faktörü |
| C <sup>0</sup> | : | derece santigrat          |
| µM             | : | Mikromol                  |
| %              | : | Yüzde                     |
| &              | : | Ve                        |

### Kısaltmalar

|       |   |                                |
|-------|---|--------------------------------|
| BAP   | : | 6-benzilaminopürin             |
| HCl   | : | hidroklorik asit               |
| IBA   | : | indol-3-bütirik asit           |
| KIN   | : | Kinetin                        |
| MS    | : | Murashige ve Skoog besi ortamı |
| NAA   | : | Naftalen asetik asit           |
| NaOH  | : | sodyum hidroksit               |
| NaOCl | : | sodyum hipoklorit              |
| TDZ   | : | Thidiazuron                    |
| LED   | : | Işık veren diotlar             |
| 2-İP  | : | Izopentil adenin               |
| 2,4-D | : | 2,4-Diklorofenoksi asetik asit |

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisinin Sınıflandırılması ve Özellikleri

Nohut, Leguminosae (baklagiller) familyasının *Cicer* cinsine ait bir baklagil türüdür. Nohutun (*Cicer arietinum* L.) sahip olduğu iki ana tip Kabuli ve Desi (Wang ve ark., 2010) tüm dünyada en çok kullanılan nohutlardır (Macar ve ark., 2017).

Kabuli tip nohut Himalaya (Pakistan – Afganistan arası bir bölge) kökenli olup, daha narin ve ince bir tabakaya sahiptir ve diğer tiplerden daha iri boyuttadır (Mohammadi, 2015). Türkiye’de en çok Kabuli türü nohut, yetiştirilmektedir (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013). Genellikle krem beyaz renkli olup, nohut üretiminde üçüncü sıradadır (Purushothaman ve ark., 2014). Bunun yanı sıra, Kabuli tipi nohut Batı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika, Amerika ve Güney Asya ülkelerinde de yetiştirilmektedir (Miao ve ark., 2009; Segev ve ark., 2012; Mohammadi, 2015). Pakistan, Hindistan ve Türkiye ise başlıca nohut üreten ülkelerdir (Ghribi ve ark., 2015).

Desi tipi nohut, diğer türlere göre daha küçüktür ve tohum katmanı da kabadır (Purushothaman ve ark., 2014). Antosiyanin pigmentasyonuna sahiptir ve çiçekler pembe renklidir (Jukanti ve ark., 2012). Dünyadaki en büyük yetiştirme alanları, Pakistan ve Hindistan’dır (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013). Pakistan, Hindistan ve İran’da *dhal/dal/lapey* (kırık nohudu) ve nohut unu yapımında yaygın olarak (Macar ve ark., 2017), kızartmalarda ve çorba yapımında kullanılmaktadır. Büyüyen diğer Desi tip nohutu ülkeleri arasında Türkiye (Ghribi ve ark., 2015), İran, Meksika ve Etiyopya da yer almaktadır (Mohammadi, 2015). Nohut (*Cicer reticulatum*), kültüre alınan ilk türlerden sayılmaktadır ve aynı zamanda arkeolojik kazılarda bulunan tohumlarla (Jamalmadi, 2015) yabani atalara benzemesinden dolayı en erken kültüre alınan bitkilerden biri olarak kabul edilmektedir (Mohammadi, 2015).

Desi tipi siyah nohut Türkiye’de Malatya, Elazığ ve Gaziantep yöresine ait, oldukça koyu renkli ve küçük taneli yöresel bir nohut olarak kullanılmaktadır. Halk arasında kara nohut olarak da bilinir.

## 1.2. Nohut (*C. arietinum*) Bitkisinin Besin Değeri

Yarı Kurak Tropikler için Uluslararası Mahsul Araştırma Enstitüsü'ne (ICRISAT) göre nohut tohumları ortalama %23 protein, %64 karbonhidrat, %47 nişasta, %6 çözünebilir şeker, %5 yağ, %6 ham lif ve %3 kül içermektedir. Fosfor (340 mg/100g), kalsiyum (190 mg/100g), magnezyum (140 mg/100g), demir (7 mg/100g) ve çinko (3 mg/100g) için yüksek mineral içeriği bildirilmiştir.

Nohutun besinsel değeri, kabuli ve desi nohut arasında önemli bir farklılık olmadığını bildirmiş olup (Jukanti ve ark., 2012), Kabuli tipi nohut, Desi tiplerine kıyasla daha fazla çözünür şeker içermektedir. Kabuli ve Desi tipleri arasındaki protein içerikleri tutarsızdır (Rinco'n ve ark., 1998), ancak desi tipi nohutların protein sindirimi düşüktür (Sa'nchez-Vioque ve ark., 1999). Desi tipi nohutlarda amino asit içerikleri istatistiksel olarak benzerdir (Wang ve ark., 2010), ancak ham yağ oranı Kabuli tipi nohuttan daha düşüktür (Shad ve ark., 2009). Desi tipi nohutta baskın olan nötr lipit triaçilgliseroldür (Zia-Ul-Haq ve ark., 2007). Desi nohutlar ayrıca, biokanin A ve formononetin, izoflavonlar gibi bazı metabolitleri de içermektedir (Mazur ve ark., 1998).

## 1.3. Nohut (*C. arietinum*) Bitkisinin Tıbbi Önemi

Siyah nohut kullanımının avantajları arasında kilo kaybı, kolesterol seviyesini düşürme, kardiyovasküler riskli hastalığa karşı antioksidanlar (Segev ve ark., 2011), antosiyaninler (Jukanti ve ark., 2012), siyanidin, delphindin, petunidin, filonutrientler ve kan damarlarını sağlıklı tutan ve oksidatif stresi önleyen alfa lipolik asit (ALA)'yı azaltma sayılabilmektedir. Ayrıca, kan şekeri seviyesini ve düşük glisemik indeksi (GI) korur ve tip-2 diyabet riskini azaltmaktadır (Saba, 2017). Yüksek demir ve alternatif protein kaynağı nedeniyle kansızlığı önlemektedir. Ayrıca, meme kanseri riskini azaltmaya, osteoporozu önlemeye ve menopoz sonrası kadınlarda ateş basmalarını azaltmaya yardımcı olan saponinler içermektedir. Diyet lifleri kabuli tipi nohutta daha fazladır (Rinco'n ve ark., 1998; Jukanti ve ark., 2012). Divertikülit hastalığını ve kabızlığı azaltmak için çözünmeyen (toplam lifin 2/3'ü) lifler yardımcıdır. Siyah nohutun faydaları arasında lökoderma, cilt bakımı ve kepek tedavisi ile saç dökülmesine karşı mücadele de bulunmaktadır (Saba, 2017).

#### 1.4. Bitki Doku Kültürü

Doku kültürü hücrelerin, dokuların, organların veya tüm bir bitkinin kontrollü beslenme ve çevre şartları altında aseptik kültürüdür (Thrope, 2007).

Bitkilerin hızlı bir şekilde klonal olarak çoğaltılması, geleneksel yöntemlerle kolay çoğaltılmayan bitkilerin çoğaltılması, hastalık etmenlerinden arınmış sağlıklı bitki elde edilmesi, ıslah amaçlı yapılan çalışmalar, haploid bitkilerin elde edilmesi, bitki gen kaynaklarının korunması, sekonder metabolitlerin elde edilmesi için doku kültür son yıllarda tercih edilen hızlı bir yöntemdir.

Bitki doku kültürünün aşamaları genel olarak; ana bitkinin seçimi ve hazırlanması, bitki dokusunun sterilizasyonu, kültür ortamının hazırlanması, eksplantların alınıp besin ortamına yerleştirilmesi, eksplantların sürgün oluşturması ve sürgünlerin sürekli olarak bölünmesi, sürgünlerin köklendirme ortamına aktarılması, iklime alıştırmaya, bitkilerin toprağa transferi şeklindedir.

*In vitro* doku kültürü teknikleri, ekonomik bitkilerin gelişmesi için biyoteknolojik ve moleküler marker tekniklerinin uygulanmasına yönelik önemli bir adımdır. Şimdiye kadar yapılan tüm çalışmalarda Kabuli tipi nohut çeşitlerinin protokolleri geliştirilmiştir ve Desi tipi özellikle siyah tip nohut çeşidi ile herhangi bir bitki rejenerasyon protokolüne rastlanmamaktadır.

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak siyah nohutun *in vitro* koşullarda çoğaltılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 ve 3,00 mg/L 6-benzilaminopürin (BAP), thidiazuron (TDZ) ve kinetin (KIN) kullanılarak, siyah nohutun sürgün ucu, kotiledon boğumu ve tohum eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon potansiyeli araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Brandt ve Hess (1994), nohutun Desi tip cv. Annigeri ve Kabuli tipi cv. ICCV6 olmak üzere iki temsilci çeşidini *in vitro* olarak rejenerere etmiş ve kotiledon boğumlardan ve meristem uçlarından çoğaltmışlardır. Her iki çeşitte de, 4,4 µM 6-benzilaminopürin içeren B5 ortamına kültüre alınan tüm kotiledon boğum eksplantlarından 3 hafta içinde ekspant başına yaklaşık yedi sürgün elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre meristem uçların çok sayıda sürgün oluşumu için çok daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, elde edilen sürgünlerin köklendirmesi için IBA kullanılmıştır. Elde edilen bitkicikler toprağa aktarılmış ve sera koşullarında adaptasyon sağlanmıştır.

Murthy ve ark. (1996), nohutta (*C. arietinum*) *in vitro* rejenerasyon için N-fenil-N'(1, 2, 3-tidiazol-5-yl) TDZ veya BAP içeren MS ortamı üzerinde olgun tohumları eksplant olarak kullanılmıştır. TDZ'nin, rejenerasyonun bir endüktif sinyali olarak BAP'a kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. Maksimum morfogenez oluşum 10 µM TDZ konsantrasyonunda gözlenmiştir. Bitkiciklerin elde edilmesi için, adventif sürgünler, 2,5 µM naftalinasetik asit (NAA) içeren MS ortamı üzerinde köklendirilmiştir. Çalışma sonucu bitkiler hem adventif sürgünler yoluyla hem de somatik embriyo oluşum yoluyla elde edilmiş ve adaptasyon için toprağa transfer edilmiştir.

Arora ve Chawla (2005), kallus indüksiyonu yoluyla organojenik bitki rejenerasyonu çalışmaları yapmışlardır. Çalışmalarında farklı büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları içeren ortamlarda Pusa 256 ve PG 186 genotiplerinden elde edilen olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmamış kotiledon, olgunlaşmış embriyo aksilleri ve olgunlaşmış kotiledon eksplantları kullanılmıştır. 1 mg/L BAP içeren ve içermeyen, 0.5-2 mg/l NAA içeren ortamlarda farklı muameleler sonucu, kallus indüksiyonu için çalışmalar yapılmıştır. 2 mg/L NAA ve 1 mg/L BAP içeren ortamda olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarından maksimum (% 90) kallus elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yüksek kallus indüksiyon sıklığı olan muamelelerin sürgün rejenerasyonu için uygun olmadığı gösterilmiştir. Kallus indüksiyonu sırasında eksplantlar, genotipler ve büyüme düzenleyicileri arasında bir etkileşim bulunup, sürgün rejenerasyonunda önemli bir rolleri olduğu ortaya konulmuştur.

Das ve Sarmah (2006), Kabuli tipi nohut için, yarı embriyonik eksenli kotiledon eksplantları kullanılan bir *in vitro* rejenerasyon sistemi geliştirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre BAP ve KIN ile NAA içeren MS ortamında çok sayıda sürgün elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünler köklendirmek için kullanılmış ve ayrıca, *in vitro* aşılansmıştır. Eksplantların bir *Agrobacterium* suşu AGL1 ile muamelesi sonucu transgenik bitki elde edilmiştir.

Anwar ve ark. (2008), nohut (*C. arietinum*) için eksplant olarak yarım embriyo içeren tek kotiledon eksplantı kullanarak hızlı, tekrarlanabilir ve verimli bir rejenerasyon yöntemi geliştirmiştir. 4 µM TDZ, 10 µM 2-iP (izopentil adenin) ve 2 µM KIN ile desteklenmiş MS ortamında kültürde 14 günden sonra sürgün elde edilmiştir ve bu sürgünler 5 µM 2-iP ve 2 µM KIN içeren MS ortamı üzerinde uzamaya bırakılmıştır. Sağlıklı, güçlü ve % 100 köklenme için, sürgünlerin kesilmiş uçları 10-14 dakika 100 µmol / ml IBA ile muamele edildikten sonra MS ortamına aktarılmıştır. Daha sonra elde edilen bitkiler 1:1 oranında kum (çakıl) ve biyo-gübre ile karıştırılan bahçe toprağına aktarılmış olup, adaptasyon sağlanmıştır. Bitkicikler saksılarda vejetatif büyüme ve gelişme sonunda çiçeklenme ve ardından tohum üretimi göstermiştir.

Paul ve ark. (2008), nohutun iki çeşidinden (BO-362 ve BO-329) sürgün üretimine yönelik fide eksplantlarının cevabını araştırmıştır. Eksize edilmiş radikül ucuna sahip 2 günlük eksplantlar, 5 µM BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Her iki çeşidin de sürgün oluşumuna duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan histolojik çalışmalar, kotiledon nodal bölgesinden *de novo* sürgünlerin gelişimini ortaya koymuştur. 2 günlük fide eksplantlarından 7 adet sürgün elde edilmiştir. Daha sonra, bu protokol kullanılarak her iki nohut çeşidinden (BO-212 ve BO-261) BAP ortamında elde edilen sürgünler 9,8 µM IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Ayrıca, MS ortamında BAP üzerinde gelişen sürgünlerin 15 gün süreyle ön muamelesi ve daha sonra 20 gün boyunca 9,8 µM IBA içeren MS ortamına aktarılmasıyla, % 70-78 civarında sağlıklı kökler ve sürgünler elde edilmiştir. Son olarak, bitkiciklerin % 80-85'i vermikülit içeren toprağına aktararak % 60-65 adaptasyon sağlanmıştır ve verimli bitkiler üretilmiştir.

Yousefiara ve ark. (2008), çalışmalarında üç nohut genotipinin (MCC252, MCC283 ve MCC505) deformasyona uğramış embriyo eksenlerinden çok sayıda sürgün indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Araştırmacı modifiye MS ortamı üzerinde kullanılmıştır. Çeşitli konsantrasyonlarda TDZ veya BAP veya zeatin içeren B5 ortamı + vitaminleri içeren ortam kullanılmıştır. Normal çok sayıda sürgün



indüksiyonunda BAP'in en etkili sitokinin olduğu bulunmuştur. Sürgünler, büyüme düzenleyici içermeyen ortam üzerinde uzamış ve daha sonra  $1 / 4 \times$  MS tuzları ve B5 vitaminleri + % 3 sükröz + % 0,8 agar ile IBA (0,4 veya 1 mg/L) içeren ortamlarda sürgünler köklenmiştir. En yüksek oranda köklenme frekansı, 0,4 mg/L IBA içeren bir ortamda izlenmiştir. Bitkicikler, 7 ila 14 gün boyunca sıvı ortamda ( $1 / 4 \times$  MS tuzları ve B5 vitaminleri + %3 sukroz + 0,4 mg/L IBA) alıştırma sağlandıktan sonra Perlit ile doldurulmuş saksılara aktarılmıştır. Bu çalışma ile %70'den fazla bitkide adaptasyon sağlanmıştır.

Rekha ve Thiruvengadam (2009), nohut (*C. arietinum*) bitkisinde *in vitro* rejenerasyon için kotiledon boğum ve koltuk altı eksplantları kullanmıştır. Çok sayıda sürgün elde etmek amacıyla BAP, KIN ve adenindisülfat (Ads) içeren B5 vitaminleri (MSB5) ile MS ortamı kullanılmıştır. Kotiledon boğumdan ve koltuk altı meristemlerden sürgünler elde etmişlerdir. Maksimum sürgün sayısı ve en uzun sürgünler kotiledon boğumda 1,0 mg/L BAP ve koltuk altı meristem eksplantlarında 1,5 mg/L BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. Test edilen iki farklı eksplantta kotiledon boğumlardan daha fazla sayıda sürgün elde edilmiştir. Uzatılmış sürgünler toplanıp kök indüksiyonu için 0,5 - 2,0 mg/L IBA, indol-3-asetik asit (IAA) ya da NAA içeren MS ortamına aktarılmıştır. Maksimum köklenme tepkisi, 1,5 mg/L IBA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Toprak ortamına aktarılan *in vitro* rejenere bitkiciklerden %99 adaptasyon sağlanmıştır.

Anwar ve ark. (2010), nohut üretiminin zor olduğunu belirtmiştir. Doğrudan DNA transferi yoluyla doğrudan gen aktarımı bildirilmiş olmasına rağmen, *Agrobacterium* aracılı transformasyon tercih edilen yöntemdir ve embriyonik eksenlerinin birlikte ekilmesinden türetilen transgenik bitkiciklerin üretimi için standart protokoller geliştirilmiştir. Abiyotik stres toleransı geliştirmek amacıyla nohut bitkisinde birkaç transformasyon çalışması bulunmaktadır. Abiyotik streslere karşı bakteriyel *codA* geni toleransı kullanılarak transgenik nohut geliştirilmiştir.

Aasim ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada nohutun cv. Gökçe genotipinde, ön muamele edilmiş olgun embriyo ve embriyonik eksen eksplantlarından sürgün rejenerasyonu rapor etmişlerdir. Eksplantlar, 7 gün boyunca 10 mg/L BAP ile ön muamele edilmiştir. Ardından 0,25 mg/L NAA içeren veya içermeyen, 4 mg/L aktif kömür ve 1 mg/L polivinilpirolidon (PVP) ile 0,25, 0,50, 1,00 ve 2,00 mg/L BAP içeren MS ortamı kullanılmıştır. Tüm eksplantlarda sürgün rejenerasyonu görülmüştür. Olgun embriyoda eksplant başına maksimum (14.75) sürgün, 0,25 mg/L NAA ile 2,0 mg/L

BAP içeren MS ortamı üzerinde kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünler, 4 haftalık kültürden sonra 1,0 mg/L IBA (indol-3 bütirik asit) içeren MS ortamına köklenme sağlamak için bırakılmıştır. Köklü bitkicikler, iklime alıştırmak için saksılara aktarılmıştır.

Banu ve ark. (2011), *in vitro* rejenerasyon sistemini yerel olarak yetiştirilen Barichhola-4, Hyprochhola, Binachhola-3 ve Binachhola-4'ün olgunlaşmış embriyo eksplantlarından doğrudan organogenez ile elde etmişlerdir. En fazla sürgün rejenerasyonu CaCl<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>'ün çift konsantrasyonları ile birlikte 0,5 mg/L BAP, 0,5 mg/L KIN, 0,2 mg/L NAA ile desteklenmiş MS ortamı üzerinde elde edilmiştir. Bunun dışında dekapite edilen embriyo bağlı kotiledon ile birkaç deney yapılmıştır. Bu eksplantların kullanılmasıyla, en fazla çok sayıda sürgünler, 3,0 mg/L BAP ve 0,04 mg/L NAA ile MS ortamını içeren MSB ortamı üzerinde elde edilmiştir. 1,0 mg/L KIN takviyeli ortamda rejenere edilen sürgünler, dört çeşitte de 0,2 mg/L IBA içeren MS ortamı üzerinde iyi bir tepki göstermiştir. Mikro aşılmanın nohutta *in vitro* köklenme için alternatif bir teknik olduğu gözlenmiştir.

Parveen ve ark. (2012), nohut bitkisinde sürgün ucu eksplantını direkt *in vitro* çok sayıda sürgün indüksiyonu ve bitkicik rejenerasyonu için kullanmıştır. Sürgün uçlarından, çok sayıda sürgün indüksiyonu için TDZ (1,0 – 7,0 mg/L) içeren MS ortamı kullanılmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı 2 ile 10 arasında değişmiştir. Bireysel sürgünler aseptik olarak kesilmiş ve sürgün uzaması için aynı ortamda alt kültür alınmıştır. Uzatılmış sürgünler, kök indüksiyonu için IBA (1,0 - 5,0 mg/L) içeren ortama aktarılmış olup, % 86 oranında adaptasyon sağlanmıştır.

Yadav ve Singh (2012), doğrudan nohut rejenerasyon sistemini Desi tipi nohutlar için optimize etmişlerdir. Tüm embriyonik eksenler, iki genotip L550 ve JGK-1'den bir embriyonik eksen ve kotiledon boğum eksplantları kullanılmıştır. Nohut genotipine, eksplant tipine ve kültür ortamına bağlı olarak, sürgün üreten eksplantların (frekans) yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla %10 ila %83 ve 1 ila 58 arasında değişmiştir. Protokolün etkinliğinin bir göstergesi olan sürgün yenileme kapasitesi, kültürlenmiş 100 eksplant başına 47 ila 2508 sürgün arasında değişmiştir. MS'in B5 vitaminleri 8,0 µM BAP + 0,5 µM NAA ve 0,1 M sakkaroz kullanılmıştır. 4 µM NAA, 3 µM IAA veya 4 µM IAA içeren 1/2 × MS ortamı + % 2 sükröz ile nohut genotiplerinde yüksek bir köklenme yüzdesi sağlanmıştır. Eksplant eldesinden başlayıp, toprakta tam bir bitkinin kurulmasına kadar olan rejenerasyon süreci 105 - 110 gün olmuştur. Bu optimize rejenerasyon metodunun, Kabuli tip nohutların ıslahı için genetik

transformasyon yoluyla ilgilenilen genlerin sokulmasını kolaylaştırmak için umut vaat ettiği belirtilmiştir.

Aasim ve ark. (2013), 10 gün boyunca 10 mg/L BAP ile ön koşullandırılmış ve koşullandırılmamış plumular apeksler ile 0,25 mg/L NAA ve 0,25 - 2,00 mg/L BAP içeren MS ortamı kullanılmıştır. İki kültür koşulu karşılaştırıldığında önceden koşullandırılmış eksplantların, koşulsuz eksplantlara kıyasla eksplant başına 2 kat ila 5 kat daha fazla sürgüne sahip olduğu görülmüştür. Kültür ortamındaki NAA'nın varlığı, daha düşük BAP konsantrasyonlarında önceden şartlandırılmış eksplant başına sürgün sayısını arttırmıştırken, koşulsuz eksplantların ortalama sürgün uzunluğunu inhibe etmiştir. 1,00 mg/L IBA ile 45 ve 60 g/L oranında artan sükröz konsantrasyonu, sürgünlerin çok sayıda ve erken sertleşmesiyle % 50 köklenmeye neden olmuştur. Çok sayıda sürgünlerin 45–60 g / L sükröz içeren MS ortamı üzerinde alt kültürlenmesi, köklenme sıklığını %60 ila %100 arttırmıştır. Köklü bitkicikler başarıyla iklimlendirilmiştir.

Kadiri ve ark. (2014), çalışmalarında *in vitro* sürgün rejenerasyonu için iki Orta Doğu nohut çeşidinin (Balila ve Wady) köklenmesi için hızlı, verimli ve tekrarlanabilir bir protokol araştırmıştır. Çeşitli eksplantların (dekapitatif embriyo aksilleri, embriyo aksillerinin fragmanları, kotiledonların bazal parçası olan embriyo aksillerinin fragmanları, kotiledonların tamamı ve yarısı) organojenik özelliğini, farklı konsantrasyonları ve sitokinin (BAP ve zeatin) veya sitokinin benzeri aktivitesi olan (TDZ) bileşiği içeren MS ortamı üzerinde test etmişlerdir. Balila genotipinde en yüksek seviyede sürgün rejenerasyonu, 0,25 mg/L BAP içeren ortamda kotiledonun bazal kısmı dahil olmak üzere embriyo aksilleri fragmanları kullanılarak elde edilmiştir. Balila genotipi için 0,25 mg/L'den ve Wady genotipi için 0,5 mg/L'den daha yüksek BAP konsantrasyonları sürgün rejenerasyonunda azalmaya neden olmuştur. Zeatin (1, 3 ve 5 mg/L) ve TDZ (1, 3 ve 5 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamlarında, en yüksek seviyede sürgün farklılaşması embriyo aksillerinin fragmanlarından elde edilen kallustan elde edilmiştir. Wady genotipinden kallusun organojenik yeteneği, 5 mg/L'ye kadar zeatin ve TDZ konsantrasyonlarının artmasıyla artmıştır. Tersine, Balila için sürgün frekansının giderek azalması ve her iki genotip için kök gelişimi, BAP, Zeatin ve TDZ'nin artan konsantrasyonları ile gözlenmiştir.

Miraz ve ark. (2015), nohut (*C. arietinum*) bitkicik rejenerasyonu için MS ortamında farklı konsantrasyonlar ve büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarını, kotiledon boğumu, epikotil ve hipokotilden eksplant olarak kallus indüksiyonu ve

bitkicik rejenerasyonu için nispi verimliliğini gözlemlemek amacıyla kullanmıştır. Bu eksplantlar arasında kotiledon boğumunda %56,25, epikotillerde ise %51,04 sürgünler elde edilmiştir. Büyüme düzenleyici kombinasyonları arasında en yüksek kallus indüksiyon oranı (% 91,11), 0,2 mg/L NAA, 3 mg/L BAP ve 2 mg/L KIN içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Sunil ve ark. (2015), *C. arietinum* K850 çeşidinin tohumlarından elde edilen kotiledon boğumu eksplantını kullanarak *in vitro* rejenerasyon çalışmaları gerçekleştirmiştir. Çok sayıda sürgün eldesi için çeşitli oksin ve sitokinin konsantrasyonları kullanılmıştır. Maksimum rejenerasyon 0,5 mg/L BAP içeren besi ortamından elde edilmiştir. Çok sayıda sürgünlerin maksimum verimliliği 0,5 mg/L BAP ve 0,05 mg/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4D) içeren ortamdan elde edilmiştir. Kök indüksiyonu için, iyi gelişmiş sürgünler IBA ve IAA içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır. 0,1 mg/L IBA ile desteklenmiş ortamlarda başarılı köklenme elde edilmiş ve köklü bitkiler toprağa aktarılmıştır.

Kumari ve ark. (2018), TDZ'nin nohut (*C. arietinum*) dokularına aşırı maruz kalmasını önleyen etkili bir rejenerasyon protokolü rapor etmişlerdir. Bunlardan ilkinde, çeşitli TDZ konsantrasyonları (15, 20 ve 25  $\mu$ M) ile kısa süreli tohum ön muamelesi için iki ayrı deney tasarlanmıştır. İkincisinde ise TDZ ön muamelesinden yoksun olarak deney tasarlanmıştır. TDZ ile ön işlemden geçirilmiş ve TDZ ile ön işlemden geçirilmemiş tohumlardan hazırlanan koltuk altı meristem eksplantları daha sonra 4  $\mu$ M TDZ içeren veya içermeyen sürgün indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon yüzdesi (% 69), eksplant başına sürgün sayısı ( $20,66 \pm 0,5$ ), çok sayıda sürgün indüksiyonu için alınan minimum gün sayısı ( $7,3 \pm 0,5$ ) bakımından önemli etkiler gözlenmiştir. Ek olarak, 5  $\mu$ M benziladenine, 2  $\mu$ M KIN ve 2  $\mu$ M giberellik aside sahip sürgün uzatma ortamı, en yüksek dallanma ve maksimum sürgün uzunluğunu göstermiştir. Sonuç olarak, nohutta yalnızca TDZ ön muamelesi kullanılarak kolay ve etkili bir rejenerasyon protokolü sunulmuştur.

Amer ve ark. (2019), inatçı bir mahsul olan nohutun (*C. arietinum*) ıslahı için genetik mühendislikte verimli bir rejenerasyon sistemi olmaması nedeniyle büyük ölçüde sınırlandırıldığını belirtmişlerdir. İki Mısır kökenli nohut çeşidinde *in vitro* rejenerasyon çalışmaları için Giza 531 ve Giza 4 çeşitleri seçilmiştir. Sürgün ve kök rejenerasyonu için embriyo eksplantları ile farklı tip ve konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Kotiledon boğumu ile birlikte embriyo eksenlerinin sürgünlerin köklenme tepkileri için en umut verici eksplant türleri olduğu izlenmiştir.

BAP ve IBA, sırasıyla en yüksek sürgün ve kök oluşum yüzdesini sağlamışlardır. Giza 531 çeşidi, sürgün oluşumu için Giza 4'ten daha iyi bir yanıt vermesine rağmen, kök indüksiyonu için daha düşük performans sergilemiştir.

Literatür sonuçlarına göre nohut bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu için geliştirilen protokollerde kullanılan farklı çeşitlerde nohutların, farklı eksplantlar ve farklı büyüme düzenleyiciler için sürgün rejenerasyonunun farklı tepkiler verdiği görülmektedir. Nohut (*C. arietinum*) bitkisinde yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında ortak olarak belirtilen sorunun genellikle köklendirme aşamasında zorluklar olduğu tespit edilmiştir.



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Bitki Materyali**

Bu tez kapsamında bitki materyali olarak siyah nohut tohumları kullanılmıştır. Tohumlar Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR tarafından temin edilmiştir.

#### **3.2. Deneme Yeri**

Bu çalışma Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji bölümü laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.3. Büyüme Ortamları ve Büyüme Koşulları**

Bu tez çalışmasında MS (Murashige ve Skoog, 1962) mineral tuz ve vitaminleri kullanılmıştır. Temel besi ortamı hazırlamak için % 3 sükröz kullanılmış ve besi ortamı % 0,6 gr agar ile katılaştırılmıştır. Yapılan çalışmaya göre besi ortamlarına 6 farklı dozda (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 ve 3,00 mg/L) bitki büyüme düzenleyici olarak sitokin (BAP, TDZ, KIN) ilave edilmiştir. Besi ortamlarının pH'ı 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 5,6 – 5,8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlarda 1.2 atmosfer basınç altında 121 °C sıcaklıkta sterilizasyon sağlanmıştır.

Tez kapsamında yapılan tüm kültürler, beyaz ışık yayan diyotlar (LED'ler) kullanılarak 16 saatlik ışık fotoperiyodu ile  $24 \pm 2$  °C sıcaklıkta iklim odasına inkübe edilerek sağlanmıştır.

#### **3.4. Yüzeysel Sterilizasyonu**

Siyah nohuta ait tohumların sterilizasyonu için ticari çamaşır suyu (Ace, Türkiye - %5 NaOCl) farklı oranlar ( % 25, 50, 75 ve 100) ve farklı sürelerde (5, 10, 15 ve 20 dk.) uygulanarak yüzeysel sterilizasyon ile ilgili optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra tohumlar  $3 \times 5$  dk. steril saf su ile durulanmıştır. Sterilizasyon sonrası

tohumlar steril Magenta GA7 kaplarına MS ortamı , % 3,0 sükröz ve % 0,65 agar içeren besi ortamına aktarılmış, beyaz LED ışık altında 16 saatlik ışık fotoperiyodu ile  $24 \pm 2$  °C'de iklim odasına inkübe edilerek kültüre alınmıştır.

### 3.5. Eksplant İzolasyonu

MS ortamında çimlenmiş bitkilerden (Şekil 3.1.), *in vitro* koşullar altında steril bistüri ve pens yardımıyla kotiledon boğumu ve sürgün ucu bölgelerinden eksplantlar alınmıştır. Eksplantlar hasar vermeden dikkatli şekilde izole edilmiştir. Ayrıca, steril tohumlar da eksplant olarak kullanılmıştır. Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmıştır.

Daha sonra, elde edilen eksplantlar farklı konsantrasyonlarda (0,25, 0,50, 1,0, 1,50, 2,0 ve 3,0 mg/L) BAP, KIN ve TDZ içeren MS ortamına cam petri kaplarında aktarılmış olup, büyütme odasında 8 hafta kültüre alınmıştır.



Şekil 3.1. *In vitro* rejenerasyon için çimlenmiş tohumdan elde edilen sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantları

### 3.6. Köklendirme ve Adaptasyon

Sekiz haftalık *in vitro* koşullarda rejenerasyon sağlamış sürgünler farklı konsantrasyonlarda (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 mg/L) IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Sürgünler 6 hafta boyunca köklenme ortamında bekletilmiştir. *İn vitro* köklü bitkiciklerin iklimlendirilmesi, Koca ve Aasim (2015) tarafından verilen protokol kullanılarak büyüme doalbinda torf ve perlit (4 : 1) içeren saksılara aktararak gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Her muamele 6 eksplant bulunan 3 tekerrürlü Magenta GA7 kapları veya cam petrilere ile oluşmuştur. Elde edilen veriler “SPSS 20 for Windows” parogramı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortamları karşılaştırmak amacıyla Duncan (DMRT) testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistiksel analizden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran, 1967).



## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Siyah Nohut Tohumların Yüzey Sterilizasyon Çalışması

Tohum sterilizasyonu, büyümeyi ve rejenerasyonu etkileyen önemli bir faktördür. Nohut bitkisi ile yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında yüzey sterilizasyonu için genel olarak çamaşır suyu (Brandt ve Hess, 1994; Murthy ve ark., 1996; Das ve Sarmah, 2006; Yousifera ve ark., 2008; Rekha ve Thiruvengadam, 2009; Aasim ve ark., 2011; Banu ve ark., 2011; Aasim ve ark., 2013; Al-Tanbouz, 2013; Kadiri ve ark., 2014; Miraz ve ark., 2015; Al-Tanbouz ve Abu Qaoud, 2016) kullanılmıştır. Ayrıca, civa klorür ( $HgCl_2$ ) (Arora ve Chawla, 2005; Anwar ve ark., 2008; Paul ve ark., 2008; Ghanti ve ark., 2010; Parveen ve ark., 2012; Kadiri ve ark., 2014; Sunil ve ark., 2013), Tween 20 ve Tween 80 ( Brandt ve Hess, 1994; Murthy ve ark., 1996; Al-Tanbouz, 2013; Kadiri ve ark., 2014; Miraz ve ark., 2015; Al-Tanbouz ve Abu Qauoud, 2016) ve % 70 etanol (Murthy ve ark., 1996; Das ve Sarmah, 2006; Anwar ve ark., 2008; Yousifera ve ark., 2008; Kadiri ve ark., 2014) gibi temizleyiciler de sterilizasyon için kullanılmaktadır.

Mekanik hasarlı siyah nohut tohumları sterilizasyon işlemlerinde kullanılmamıştır. Ayıklanmış bitki tohumlarının sterilizasyonu için % 25, 50, 75 ve 100 oranlarında ticari çamaşır suyu (Ace, Türkiye - %5 NaOCl) kullanılmıştır. Tohumlar her bir oran için 5, 10, 15 ve 20 dk çamaşır suyu ile muamele edilmiştir. Sterilize edilen tohumlar 1 hafta MS ortamında kültüre bırakılmıştır. En düşük konsantrasyonda (% 25) çamaşır suyu kullanıldığında % 100 çimlenme olmasına rağmen kontaminasyon kaydedilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (% 50, 75 ve 100) çamaşır suyu kullanıldığında ise çimlenme %100 olurken kontaminasyon da görülmemiştir. Tohumların zarar görmemesi adına nohut tohumlarının sterilizasyonunun %50 konsantrasyonda 15 dk süreyle yapılmasının uygun olduğuna karar verilmiş ve tüm sterilizasyon işlemleri buna uygun yapılmıştır. Çimlenme ile ilgili verilerde varyans analizi yapılmamıştır.

#### 4.2. Siyah Nohutun Sürgün Ucu Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları

Bu denemede kullanılan sürgün ucu eksplantları 12 - 14 günlük *in vitro* koşullarda çimlenmiş fidelerden izole edilmiştir. Bu eksplantlar daha sonra farklı oranlarda (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 ve 3,00 mg/L) BAP, TDZ ve KIN içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

Sürgün ucu bol miktarda meristem doku içerdiği için rejenerasyon için uygun bir eksplanttır. Nohut bitkisinin farklı türlerinde yapılan çalışmalarda sürgün ucu eksplantından başarıyla sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Brandt ve Hess, 1994; Yousefiara ve ark., 2008; Rekha ve Thiruvengadam, 2009; Banu ve ark., 2011; Parveen ve ark., 2012; Al-Tanbouz ve Abu-Qaoud, 2016).

Bu denemede bir hafta sonunda eksplantlarda tek sürgün oluşumu gözlenmeye başlamıştır. İki hafta sonunda ise eksplantlarda çok sayıda sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Hormonlar kıyaslandığında TDZ içeren ortamda diğer hormonlara göre çok sayıda sürgün oluşumu izlenmiştir. Anwar ve ark. (2008) ve Parveen ve ark. (2012), kendi çalışmalarında nohut bitkisinin sürgün ucu eksplantından yüksek sürgün indüksiyonunu TDZ içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar sürgün rejenerasyonunda düşük konsantrasyonlarda TDZ'nin BAP ve KIN'den daha iyi olduğunda uzlaşmıştır (Saini ve Jaiwal, 2002; Jayanand ve ark., 2003; Yoshida, 2002; Anwar ve ark., 2010).

Kallus oluşumu tüm hormon (BAP, TDZ ve KIN) içeren besi ortamlarında gözlenmiştir. En fazla kallus oluşumu (kallus çapı) TDZ içeren besi ortamında (Şekil 4.2.) gözlenmiştir (veri verilmemiştir).

TDZ içeren ortamda oluşan sürgünler açık renkli, şişkin gövdeli durumdayken (Şekil 4.2c,d), BAP içeren ortamlarda oluşan sürgünler açık renkli ve hiperhidrik (Şekil 4.1c), KIN içeren ortamlarda oluşan sürgünler normal renk ve gövdeli olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde Brandt ve Hess (1994), nohut ile yaptıkları çalışmada uzun süreli kültürde hiperhidrasyonu önemli bir problem olarak belirtmişlerdir. Ayrıca, Sawardekar (2007), yüksek konsantrasyonda kullanılan BAP'ın eksplantların şişmesine ve sürgünlerin hiperhidrasyonuna neden olduğunu ileri sürmüştür.

Eksplantlar incelendiğinde BAP içeren ortamlarda 4 hafta sonunda sürgünlerde köklenmeler oluşmaya başladığı da gözlemlenmiştir (Şekil 4.1a,b).

Eksplantlar besi ortamında 8 hafta boyunca bekletilip sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri alınmıştır. Bu veriler daha sonra varyans analizine tabi tutulup sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Siyah nohut bitkisinin farklı hormonlar ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

| V.K.              | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                      | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |         | Sürgün Uzunluğu (cm) |          |
|-------------------|-----|---------------------------------|----------------------|--------------------------------------|---------|----------------------|----------|
|                   |     | K.O.                            | F                    | K.O.                                 | F       | K.O.                 | F        |
| <b>Sürgün ucu</b> |     |                                 |                      |                                      |         |                      |          |
| BAP               | 5   | 34,722                          | 1,000 <sup>ö</sup> s | 2,214                                | 9,109** | 0,114                | 1,709*   |
| Hata              | 12  | 34,722                          |                      | 0,243                                | -       | 0,067                | -        |
| Genel Toplam      | 17  | -                               | -                    | -                                    | -       | -                    | -        |
| V.K.              | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                      | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |         | Sürgün Uzunluğu (cm) |          |
|                   |     | K.O.                            | F                    | K.O.                                 | F       | K.O.                 | F        |
| <b>Sürgün ucu</b> |     |                                 |                      |                                      |         |                      |          |
| TDZ               | 5   | 22,222                          | 1,000 <sup>ö</sup> s | 42,093                               | 2,356** | -                    | -        |
| Hata              | 12  | 22,222                          | -                    | 17,867                               | -       | -                    | -        |
| Genel Toplam      | 17  | -                               | -                    | -                                    | -       | -                    | -        |
| V.K.              | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                      | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |         | Sürgün Uzunluğu (cm) |          |
|                   |     | K.O.                            | F                    | K.O.                                 | F       | K.O.                 | F        |
| <b>Sürgün ucu</b> |     |                                 |                      |                                      |         |                      |          |
| KIN               | 5   | 714,420                         | 10,341**             | 1,254                                | 6,102** | 0,496                | 11,910** |
| Hata              | 12  | 69,087                          | -                    | 0,206                                | -       | 0,042                | -        |
| Genel Toplam.     | 17  | -                               | -                    | -                                    | -       | -                    | -        |

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.1 incelendiğinde yapılan varyans analizi sonucunda BAP ve TDZ hormonlarında rejenerasyon açısından istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir. KIN hormonu ise rejenerasyon açısından 0,05 düzeyinde önemli farklılık göstermiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından tüm hormon ortamlarında 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından BAP içeren ortamda 0,05 düzeyinde, KIN içeren ortamda ise 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2, 4.3, 4.4’te verilmiştir.

Çizelgeler incelendiğinde sürgün rejenerasyon yüzdesi BAP içeren ortamlarda % 91,66 - 100 (Çizelge 4.2), TDZ içeren ortamlarda % 93,33 - 100 (Çizelge 4.3) ve

KIN içeren ortamlarda % 62,20 - 100 (Çizelge 4.4) arasında görülmüştür. Benzer şekilde Brandt ve Hess (1994), nohut rejenerasyon çalışmasında sürgün ucu eksplantlarında % 96 rejenerasyon görmüşlerdir. Ayrıca, rejenere sürgünlenen meristem uçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

**Çizelge 4.2.** Siyah nohut bitkisinin BAP ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| BAP (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Sürgün Uzunluğu (cm) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,25       | 100                             | 2,75 <sup>b</sup>                    | 1,96 <sup>ab</sup>   |
| 0,50       | 91,66                           | 2,58 <sup>b</sup>                    | 2,26 <sup>a</sup>    |
| 1,00       | 100                             | 4,08 <sup>a</sup>                    | 1,99 <sup>ab</sup>   |
| 1,50       | 100                             | 4,08 <sup>a</sup>                    | 1,72 <sup>b</sup>    |
| 2,00       | 100                             | 3,75 <sup>a</sup>                    | 1,87 <sup>ab</sup>   |
| 3,00       | 100                             | 2,08 <sup>b</sup>                    | 2,16 <sup>ab</sup>   |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p < 0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

**Çizelge 4.3.** Siyah nohut bitkisinin TDZ ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi ait sonuçlar

| TDZ (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 0,25       | 100                             | 17,13 <sup>a</sup>                   |
| 0,50       | 93,33                           | 6,20 <sup>b</sup>                    |
| 1,00       | 100                             | 12,20 <sup>ab</sup>                  |
| 1,50       | 100                             | 15,06 <sup>a</sup>                   |
| 2,00       | 100                             | 11,26 <sup>ab</sup>                  |
| 3,00       | 100                             | 13,40 <sup>ab</sup>                  |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p < 0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

**Çizelge 4.4.** Siyah nohut bitkisinin KIN ile muamele edilmiş sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi ait sonuçlar

| KIN (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Sürgün Uzunluğu (cm) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,25       | 100 <sup>a</sup>                | 3,26 <sup>a</sup>                    | 2,60 <sup>cd</sup>   |
| 0,50       | 100 <sup>a</sup>                | 2,40 <sup>bc</sup>                   | 2,54 <sup>cd</sup>   |
| 1,00       | 100 <sup>a</sup>                | 3,00 <sup>ab</sup>                   | 2,28 <sup>d</sup>    |
| 1,50       | 62,20 <sup>b</sup>              | 2,10 <sup>c</sup>                    | 2,90 <sup>bc</sup>   |
| 2,00       | 100 <sup>a</sup>                | 3,60 <sup>a</sup>                    | 3,43 <sup>a</sup>    |
| 3,00       | 100 <sup>a</sup>                | 3,70 <sup>a</sup>                    | 3,01 <sup>b</sup>    |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p < 0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

BAP içeren besi ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı 2,08 - 4,08 arasında kaydedilmiştir. En az sayıda sürgün (2,08) 3,00 mg/L BAP içeren ortamda görülürken, en fazla sürgün (4,08) 1,00 ve 1,50 mg/L BAP içeren ortamlarda görülmüştür. Brandt ve Hess (1994), 4,4  $\mu$ M BAP ve 0,05  $\mu$ M IBA içeren DKW-C-a ortamı üzerinde kültürlenmiş meristem uçlarından % 96'sında eksplant başına 10 adet sürgün elde edilmiştir.

TDZ içeren besi ortamlarında eksplant başına sürgün sayısının diğer hormonlara göre fazla olduğu gözlemlenmiştir. En fazla sayıda sürgün (17,13) ve en az sayıda sürgün (6,02) sırasıyla 0,25 mg/L ve 0,50 mg/L TDZ içeren ortamlarda görülmüştür. Parveen ve ark. (2012), çok sayıda sürgün çoğalması için en iyi kültürü sürgün ucu eksplantlarından 3,0 mg/L TDZ üzerinde üç hafta içinde gözlemişlerdir. Eksplant başına sürgün sayısı 2 – 10 adet arasında değişmiştir.

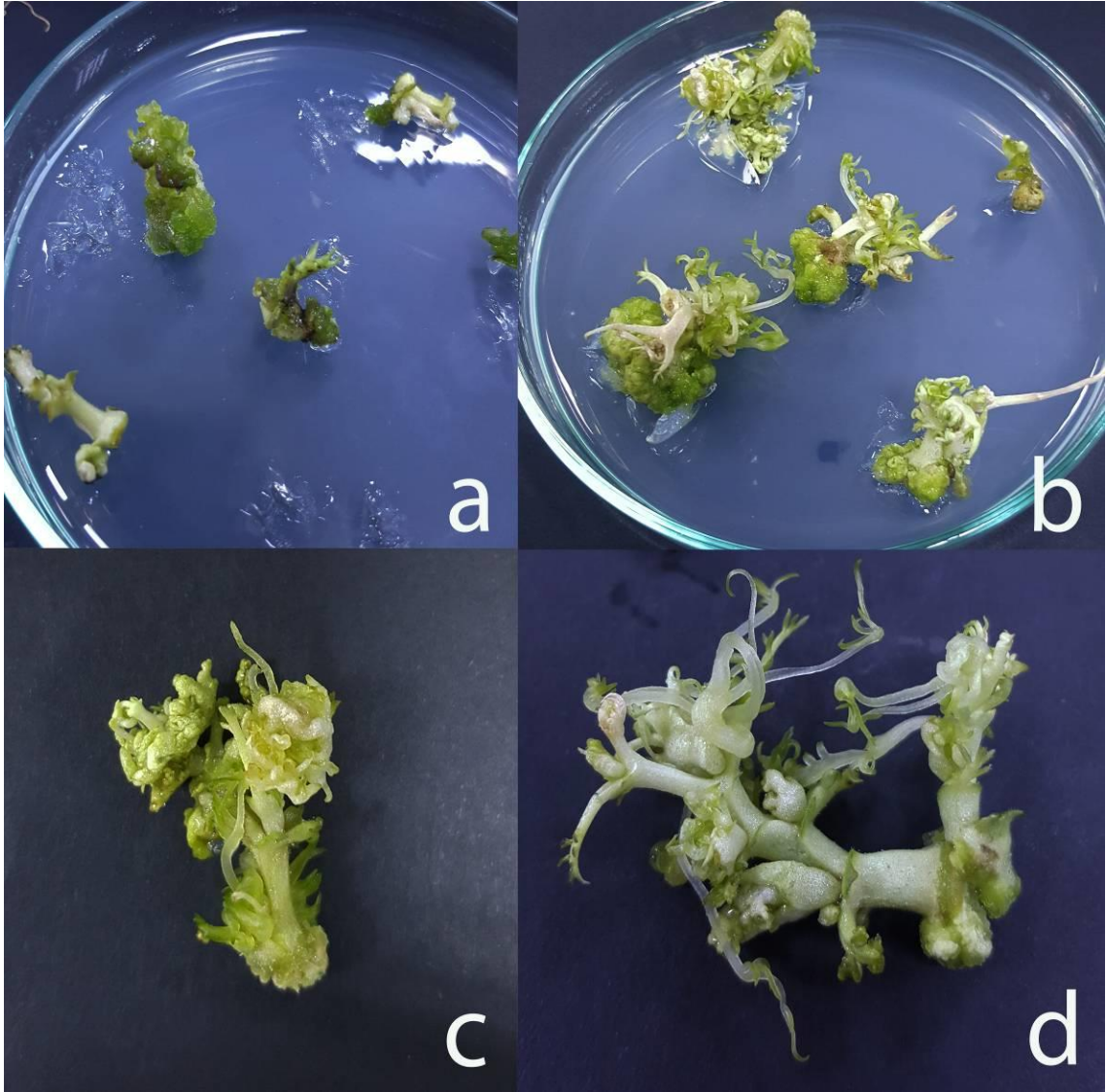
KIN içeren besi ortamlarında ise eksplant başına sürgün sayısı 2,10 - 3,70 arasında değişmiştir. En fazla sürgün (3,70) 3,00 mg/L KIN içeren ortamda, en az sürgün (2,10) 1,50 mg/L KIN içeren ortamda görülmüştür. Benzer şekilde, tek başına TDZ veya KIN eklenmiş MS ortamı, soya fasulyesi, börülce, yer fıstığı, nohut ve fasulyenin sürgün ucu apikal meristemlerinin rejenerasyon potansiyelini arttırmıştır.



**Şekil 4.1.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun BAP içeren MS besi ortamında sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu (a,b) 4 hafta sonra (c) 8 hafta sonra sürgün oluşumu

Sürgün uzunluğu açısından incelendiğinde BAP içeren ortamlarda 1,72 - 2,26 cm, KIN içeren ortamlarda ise 2,28 - 3,43 cm uzunluğunda sürgünler olduğu not edilmiştir. TDZ içeren ortamda çok kısa sürgünler olduğu için varyans analizi yapılmamıştır. BAP içeren ortamlarda en uzun sürgün (2,26 cm) 0,50 mg/L konsantrasyonda, en kısa sürgün (1,72 cm) ise 1,50 mg/L konsantrasyonda görülmüştür.

KIN içeren ortamda ise en uzun (3,43 cm) ve en kısa (2,28 cm) sürgünler sırasıyla 2,00 mg/L ve 1,00 mg/L KIN konsantrasyonlarında gözlenmiştir.



**Şekil 4.2.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun TDZ içeren MS besi ortamında sürgün ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) 2 hafta sonra (b) 4 hafta sonra sürgün ve kallus oluşumu (c,d) 8 hafta sonra sürgün oluşumu

#### 4.3. Siyah Nohutun Kotiledon Boğum Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları

Tez kapsamında yapılan bu denemede eksplant olarak siyah nohut bitkisinin kotiledon boğumları kullanılmıştır. Bezelye (Özcan ve ark., 1993), korunga (Özcan ve ark., 1996), koca fiğ (Sancak, 1999), Macar fiği (Sancak ve ark., 2000) ve yaygın fiğ

(Çöçü ve ark., 2003) gibi başka baklagillerde yapılan daha önceki çalışmalarda olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarının ve embriyonik eksenlerin adventif sürgün rejenerasyonu kapasitelerinin yüksek olduğu ve rejenerasyon için iyi bir başlangıç materyali olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Erdoğan ve ark., 2005).

Fabaceae familyasındaki bitkilerin rejenerasyonu zordur ve nohut bitkisi de yapılan çalışmalarda bir geri dönüşümlü bitki olarak kabul edilir (Aasim ve ark., 2013) ve araştırmacılar, eksplant olarak kotiledonu kullanarak daha yüksek çoğalma oranını elde etmiştir (Chakraborti ve ark., 2006). Nohut bitkisinde yapılan sürgün rejenerasyon çalışmalarında kotiledon boğumu (Brandt ve Hess, 1994; Das ve Sarmah, 2006; Anwar ve ark., 2008; Rekha ve Thiruvengadam, 2009; Yadav ve Singh, 2012; Kadiri ve ark., 2014; Sunil ve ark., 2014; Miraz ve ark., 2015), kotiledonların bazal kısmı veya yarısı (Kadri ve ark., 2014), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış kotiledon (Arora ve Chawla, 2005) eksplantları yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu denemede kullanılan kotiledon boğum eksplantları 12 - 14 günlük *in vitro* koşullarda çimlenmiş fidelerden steril ortamda izole edilmiştir. Bu eksplantlar farklı oranlarda ( 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ve 3,00 mg/L) BAP, TDZ ve KIN içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlardan sürgün oluşumu TDZ içeren ortamlarda diğerlerine göre daha önce gerçekleşmiştir. TDZ içeren besi ortamında 4 - 6 günde tek sürgün oluşumu gözlenirken, BAP ve KIN içeren besi ortamlarında 1 hafta sonra tek sürgün oluşumu gözlenmiştir. Bir hafta sonra TDZ içeren ortamlarda eksplantlarda çok sayıda sürgün oluşumu gözlenirken, BAP ve KIN içeren ortamlarda iki hafta sonra çok sayıda sürgün oluşumu gözlenmiştir.

BAP ve TDZ içeren ortamlarda kallus oluşumu görülmüştür (Şekil 4.3b,c ve Şekil 4.4a,b,c). En fazla kallus oluşumu TDZ içeren besi ortamında gözlenmiştir (veri alınmamıştır). Miraz ve ark. (2015), çalışmalarında kotiledon boğum eksplantının, en yüksek kallus yüzdesini (56,25) oluşturduğunu görmüştür. Kadiri ve ark., (2014), çalışmalarında farklı TDZ konsantrasyonları ile desteklenmiş ortamlarda, nohut eksplantlarının büyük miktarda yeşil kırılğan kallus ürettiğini 3 hafta sonra sürgün tomurcuklarının bu kallus yüzeyinde farklılaştığını rapor etmişlerdir.

TDZ içeren ortamlarda sürgünler açık renkli, BAP içeren ortamlarda açık renkli ve ince, KIN içeren ortamlarda ise normal renkli durumdadır. KIN içeren ortamlarda köklenme oluşumu da görülmüştür. Eksplantlar besi ortamında 8 hafta boyunca bekletilip sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün

uzunluğu verileri kaydedilmiştir. Bu veriler daha sonra varyans analizine tabi tutulup sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun BAP içeren MS besi ortamında kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) 2 hafta sonra (b,c) 8 hafta sonra sürgün oluşumu

**Çizelge 4.5.** Siyah nohut bitkisinin farklı hormonlar ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

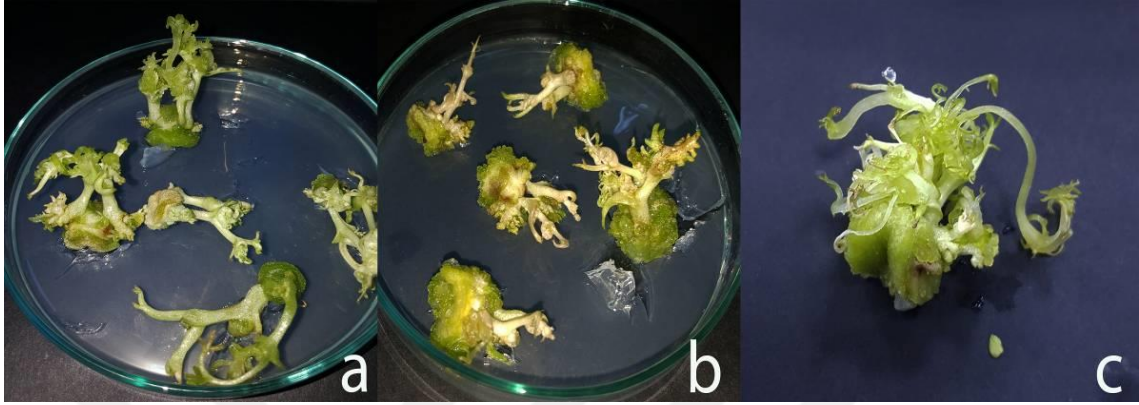
| V.K.                   | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                     | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          | Sürgün Uzunluğu (cm) |         |
|------------------------|-----|---------------------------------|---------------------|--------------------------------------|----------|----------------------|---------|
|                        |     | K.O.                            | F                   | K.O.                                 | F        | K.O.                 | F       |
| <b>Kotiledon boğum</b> |     |                                 |                     |                                      |          |                      |         |
| BAP                    | 5   | 55,556                          | 0,800 <sup>ös</sup> | 4,898                                | 19,106** | 0,530                | 2,445** |
| Hata                   | 12  | 69,444                          | -                   | 0,256                                | -        | 0,217                | -       |
| Genel Toplam           | 17  | -                               | -                   | -                                    | -        | -                    | -       |
| V.K.                   | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                     | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          | Sürgün Uzunluğu (cm) |         |
|                        |     | K.O.                            | F                   | K.O.                                 | F        | K.O.                 | F       |
| <b>Kotiledon boğum</b> |     |                                 |                     |                                      |          |                      |         |
| TDZ                    | 5   | 22,222                          | 1,000 <sup>ös</sup> | 72,285                               | 9,553**  | -                    | -       |
| Hata                   | 12  | 22,222                          | -                   | 7,567                                | -        | -                    | -       |
| Genel Toplam           | 17  | -                               | -                   | -                                    | -        | -                    | -       |
| V.K.                   | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                     | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          | Sürgün Uzunluğu (cm) |         |
|                        |     | K.O.                            | F                   | K.O.                                 | F        | K.O.                 | F       |
| <b>Kotiledon boğum</b> |     |                                 |                     |                                      |          |                      |         |
| KIN                    | 5   | 35,556                          | 0,800 <sup>ös</sup> | 0,648                                | 3,411**  | 1,578                | 1,857*  |
| Hata                   | 12  | 44,444                          | -                   | 0,190                                | -        | 0,850                | -       |
| Genel Toplam           | 17  | -                               | -                   | -                                    | -        | -                    | -       |

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi varyans analizi sonucunda tüm hormonlarda rejenerasyon açısından farklılık görülmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından tüm hormonlarda 0,01 düzeyinde önemli farklılık görülmüştür. Sürgün



uzunluğu açısından BAP içeren besi ortamında 0,01 düzeyinde önemli farklılık, KIN içeren besi ortamında ise 0,05 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.6, 4.7 ve 4,8'de verilmiştir.



**Şekil 4.4.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun TDZ içeren MS besi ortamında kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu (a,b) 2 hafta sonra (c) 8 hafta sonra sürgün oluşumu

**Çizelge 4.6.** Siyah nohut bitkisinin BAP ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| BAP (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Sürgün Uzunluğu (cm) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,25       | 100                             | 2,75 <sup>c</sup>                    | 3,54 <sup>a</sup>    |
| 0,50       | 91,66                           | 2,85 <sup>c</sup>                    | 2,61 <sup>b</sup>    |
| 1,00       | 100                             | 2,08 <sup>c</sup>                    | 3,17 <sup>ab</sup>   |
| 1,50       | 100                             | 4,00 <sup>b</sup>                    | 2,82 <sup>ab</sup>   |
| 2,00       | 100                             | 5,50 <sup>a</sup>                    | 2,34 <sup>b</sup>    |
| 3,00       | 91,66                           | 4,50 <sup>b</sup>                    | 2,82 <sup>ab</sup>   |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p < 0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

**Çizelge 4.7.** Siyah nohut bitkisinin TDZ ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| TDZ (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 0,25       | 100                             | 18,66 <sup>a</sup>                   |
| 0,50       | 93,33                           | 11,33 <sup>bc</sup>                  |
| 1,00       | 100                             | 7,80 <sup>c</sup>                    |
| 1,50       | 100                             | 16,13 <sup>ab</sup>                  |
| 2,00       | 100                             | 7,00 <sup>c</sup>                    |
| 3,00       | 100                             | 7,80 <sup>c</sup>                    |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p < 0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

**Çizelge 4.8.** Siyah nohut bitkisinin KIN ile muamele edilmiş kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| KIN (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Sürgün Uzunluğu (cm) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,25       | 100                             | 3,20 <sup>ab</sup>                   | 3,83 <sup>ab</sup>   |
| 0,50       | 100                             | 2,30 <sup>c</sup>                    | 4,15 <sup>ab</sup>   |
| 1,00       | 100                             | 3,00 <sup>abc</sup>                  | 3,15 <sup>b</sup>    |
| 1,50       | 93,33                           | 2,40 <sup>bc</sup>                   | 3,77 <sup>ab</sup>   |
| 2,00       | 100                             | 3,00 <sup>abc</sup>                  | 5,11 <sup>a</sup>    |
| 3,00       | 93,33                           | 3,50 <sup>a</sup>                    | 4,83 <sup>ab</sup>   |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p < 0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

Çizelgeler incelendiğinde kotiledon boğum eksplantının BAP içeren ortamda sürgün rejenerasyonunun % 91,66 - 100 (Çizelge 4.6), TDZ ve KIN içeren ortamlarda % 93,33 - 100 (Çizelge 4.7 ve 4.8) arasında olduğu görülmüştür.

Eksplant başına sürgün sayısına bakıldığında en fazla sürgün sayısı TDZ içeren besi ortamlarında elde edilmiştir. TDZ içeren ortamda en fazla (18,66) ve en az sayıda (7,00) sürgün sırasıyla 0,25 mg/L ve 2,00 mg/L konsantrasyonlarda elde edilmiştir. BAP içeren ortamlarda eksplant başına sürgün sayısının 2,08 - 5,50 arasında değiştiği görülmüştür. Rekha ve Thiruvengadam (2009), maksimum sürgün sayısı ve en uzun sürgünleri kotiledon boğumda 1,0 mg/L BAP içeren MS ortamında elde etmiştir. Ayrıca, maş fasulyesinde, BAP içeren ortamda maksimum sürgün sayısı 2 günlük fidelerden kesilen kotiledon eksplantından elde edilmiştir (Paul ve ark., 2008). En fazla sayıda sürgün (5,50) 2,00 mg/L ve en az sayıda sürgün (2,08) 1,00 mg/L konsantrasyonlarda kaydedilmiştir. KIN içeren ortamda ise en fazla sürgün (3,50) 3,00 mg/L, en az sürgün (2,30) 0,50 mg/L konsantrasyonda gözlenmiştir.

Çizelgeler incelendiğinde genel olarak eksplant başına sürgün sayısı ile sürgün uzunluğu arasında zıt bir ilişki görülmüştür. BAP içeren ortamlarda sürgün uzunluğu 2,61 - 3,54 cm, KIN içeren ortamlarda sürgün uzunluğu 3,15 - 5,11 cm arasında not edilmiştir. BAP konsantrasyonunu hafifçe arttırmak suretiyle, sürgün uzamasının azaldığı gözlenmiştir (Ault, 1994). TDZ içeren ortamlarda sürgünler çok kısa olduğu için veri alınmamıştır. En kısa sürgünler 2,00 mg/L BAP ve 1,50 mg/L KIN konsantrasyonlarında kaydedilirken, en uzun sürgünler 0,25 mg/L BAP ve 3,00 mg/L KIN konsantrasyonlarında kaydedilmiştir. Başka bir çalışmada Sunil ve ark. (2015), NAA ve BAP kombinasyonu için maksimum sürgün uzunluğunu (4,13 mm) ve KIN ile desteklenmiş ortamda minimum sürgün uzunluğu (0,99 mm) elde edilmiştir. Ayrıca,

BAP ve KIN'in bir kombinasyonu maksimum 3,37 mm sürgün uzunluğu ve minimum 1,50 mm'lik bir büyüme sağlamıştır. Rekha ve Thiruvengadam (2009), çok sayıda sürgünleri ve en uzun sürgünün maksimum sayısını kotiledon boğumunda 1,0 mg/L BAP içeren MS ortamı üzerinde elde etmişlerdir.

#### 4.4. Siyah Nohutun Tohum Eksplantında Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları

Yapılan bu çalışmada siyah nohutun tohumları eksplant olarak kullanılmıştır. Tohum eksplantı içerdiği farklı meristem bölgelerinden dolayı sürgün rejenerasyonu için en uygun eksplantlardan biridir. Tohum eksplantı gen aktarımı, somaklonal varyasyon veya direkt yan sürgün oluşumu için kullanılabilir (Barik ve ark., 2005, Vaz Patto ve ark., 2011, Ochatt ve ark., 2013). Tohum eksplantı önceden birçok baklagil bitkisinde başarı ile çok sayıda sürgün oluşumu için kullanılmıştır. Bu bitkiler arasında nohut (Polisetty ve ark., 1997), maş fasulyesi (Harisaranraj ve ark., 2008), narbon fiğ (Kendir ve ark., 2009), fıstık (Li ve ark., 1994; Cucco ve Juame, 2000; Gagliardi ve ark., 2000; Palanivel ve Jayabalan, 2002; Pacheco ve ark., 2007), buğday (Shah ve ark., 2003; Malik ve ark., 2004), pirinç (Masaaki ve ark., 2004; Bano ve ark., 2005; Mohd Din ve ark., 2015; Upadhaya ve ark., 2015) gibi baklagiller bulunmaktadır.

Siyah nohutun tohumları sterilizasyon işleminin ardından farklı oranlarda (0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ve 3,00 mg/L) BAP, TDZ ve KIN içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. 3 - 4 gün sonra tekli sürgün oluşumu, bir hafta sonra ise çok sayıda sürgün oluşumu gözlenmiştir. Polisetty ve ark. (1997), kültürden sonraki 45 - 90 günlük zaman diliminde nohutun tohum eksplantından çok sayıda sürgün indüksiyonunu bildirmişlerdir.

Tohum eksplantlarında BAP ve KIN içeren ortamlarda kallus oluşumu görülmemiştir (Şelik 4.5a,b ve Şekil 4.6). Fakat TDZ içeren ortamlarda sert ve kırılğan bir kallus sürekli olarak oluşmuştur. Kallus oluşumunu engellemek amacıyla eksplantlar 2 hafta sonunda MS besi ortamı içeren GA-7 magenta kaplarına aktarılmıştır (Şekil 4.7a,b). Bu sonuçlar, olgun tohum eksplantları kullanılarak farklı BAP konsantrasyonlarına maruz kalan narbon fiğ tohumlarının kallus indüksiyonunu bildiren Kendir ve ark. (2008), bulgularını desteklemektedir. Farklı araştırmalarda maş fasulyesi (Harisaranraj ve ark., 2008), buğday (Malik ve ark., 2004), soğan (Khar ve ark., 2005)

ve pirinç (Bano ve ark., 2005; Mohd Din ve ark., 2016) gibi bitkilerin tohum eksplantından alınan kallus indüksiyonu da rapor edilmiştir.

BAP ve TDZ içeren besi ortamlarında tohumdan oluşan sürgünler açık renkliyen (Şekil 4.5), KIN içeren ortamda oluşan sürgünlerin normal bitki görünümünde (Şekil 4.6) olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, TDZ'ye yanıt olarak hiperhidrik sürgünler, BAP ortamına yanıt olarak normal sürgünler, Aasim ve ark. (2010), tarafından çemen için bildirilmiştir.

Eksplantlar besi ortamında 8 hafta boyunca bekletilip sürgün rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri kaydedilmiştir. Bu veriler daha sonra varyans analizine tabi tutulup sonuçlar Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Siyah nohut bitkisinin farklı hormonlar ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

| V.K.         | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                     | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          | Sürgün Uzunluğu (cm) |           |
|--------------|-----|---------------------------------|---------------------|--------------------------------------|----------|----------------------|-----------|
|              |     | K.O.                            | F                   | K.O.                                 | F        | K.O.                 | F         |
| <b>Tohum</b> |     |                                 |                     |                                      |          |                      |           |
| BAP          | 5   | 0,000                           | 0 <sup>ös</sup>     | 21,444                               | 84,947** | 29,132               | 149,825** |
| Hata         | 12  |                                 | -                   | 0,252                                | -        | 0,194                | -         |
| Genel Toplam | 17  | -                               | -                   | -                                    | -        | -                    | -         |
| V.K.         | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                     | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          | Sürgün Uzunluğu (cm) |           |
|              |     | K.O.                            | F                   | K.O.                                 | F        | K.O.                 | F         |
| <b>Tohum</b> |     |                                 |                     |                                      |          |                      |           |
| TDZ          | 5   | 34,722                          | 1,000 <sup>ös</sup> | 132,227                              | 18,410** | -                    | -         |
| Hata         | 12  | 34,722                          | -                   | 7,182                                | -        | -                    | -         |
| Genel Toplam | 17  | -                               | -                   | -                                    | -        | -                    | -         |
| V.K.         | S.D | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) |                     | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |          | Sürgün Uzunluğu (cm) |           |
|              |     | K.O.                            | F                   | K.O.                                 | F        | K.O.                 | F         |
| <b>Tohum</b> |     |                                 |                     |                                      |          |                      |           |
| KIN          | 5   | 35,556                          | 0,800 <sup>ös</sup> | 3,641                                | 6,854**  | 10,317               | 40,278**  |
| Hata         | 12  | 44,444                          | -                   | 0,531                                | -        | 0,256                | -         |
| Genel Toplam | 17  | -                               | -                   | -                                    | -        | -                    | -         |

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.9 incelendiğinde varyans analizi sonucunda tüm hormonlarda rejenerasyon açısından farklılık görülmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı açısından tüm hormonlarda 0,01 düzeyinde önemli farklılık görülmüştür. Sürgün uzunluğu

açısından BAP ve KIN içeren ortamlarda 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.10, 4.11 ve 4.12’de verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Siyah nohut bitkisinin BAP ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| BAP (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Sürgün Uzunluğu (cm) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,25       | 100                             | 2,94 <sup>e</sup>                    | 10,67 <sup>a</sup>   |
| 0,50       | 100                             | 5,72 <sup>d</sup>                    | 3,16 <sup>c</sup>    |
| 1,00       | 100                             | 6,66 <sup>c</sup>                    | 4,01 <sup>b</sup>    |
| 1,50       | 100                             | 8,55 <sup>b</sup>                    | 2,30 <sup>d</sup>    |
| 2,00       | 100                             | 8,50 <sup>b</sup>                    | 3,34 <sup>bc</sup>   |
| 3,00       | 100                             | 10,61 <sup>a</sup>                   | 2,97 <sup>cd</sup>   |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında  $p<0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

**Çizelge 4.11.** Siyah nohut bitkisinin TDZ ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| TDZ (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 0,25       | 100                             | 34,38 <sup>bc</sup>                  |
| 0,50       | 91,67                           | 46,05 <sup>a</sup>                   |
| 1,00       | 100                             | 36,77 <sup>b</sup>                   |
| 1,50       | 100                             | 29,22 <sup>d</sup>                   |
| 2,00       | 100                             | 28,10 <sup>d</sup>                   |
| 3,00       | 100                             | 30,83 <sup>cd</sup>                  |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalmalar arasında  $p<0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

**Çizelge 4.12.** Siyah nohut bitkisinin KIN ile muamele edilmiş tohum eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisine ait sonuçlar

| KIN (mg/L) | Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%) | Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) | Sürgün Uzunluğu (cm) |
|------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,25       | 100                             | 3,83 <sup>a</sup>                    | 7,54 <sup>b</sup>    |
| 0,50       | 100                             | 2,16 <sup>b</sup>                    | 9,90 <sup>a</sup>    |
| 1,00       | 100                             | 4,05 <sup>a</sup>                    | 6,60 <sup>c</sup>    |
| 1,50       | 94,43                           | 4,16 <sup>a</sup>                    | 7,56 <sup>b</sup>    |
| 2,00       | 100                             | 5,15 <sup>a</sup>                    | 6,80 <sup>bc</sup>   |
| 3,00       | 94,43                           | 5,16 <sup>a</sup>                    | 4,17 <sup>d</sup>    |

*\*\*Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalmalar arasında  $p<0,01$  düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir.*

Sürgün rejenerasyon yüzdesi farklı hormonlar ve oranlarda kullanılmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. BAP içeren ortamlarda % 100

(Çizelge 4.10), TDZ içeren ortamlarda % 91,67 - 100 (Çizelge 4.11) ve KIN içeren ortamlarda % 94,43-100 (Çizelge 4.12) arasında rejenerasyon değişmiştir. *Trachyspermum ammi* bitkisinde yapılan bir çalışmada TDZ ve BAP içeren ortamlarda aynı oranda sürgün rejenerasyon yüzdesi elde edilirken, KIN içeren ortamlarda daha düşük sürgün rejenerasyonu rapor edilmiştir (Koca ve Aasim, 2015).



**Şekil 4.5.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun BAP içeren MS besi ortamında tohum eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) 4 hafta sonra (b) 8 hafta sonra sürgün oluşumu

BAP içeren ortamlarda eksplant başına sürgün sayısı 2,94 - 10,61 arasında kaydedilmiştir. En fazla sayıda sürgün (10,61) 3,00 mg/L BAP içeren ortamda gözlenirken, en az sayıda sürgün (2,94) 0,25 mg/L BAP içeren ortamda gözlenmiştir. KIN içeren ortamlarda diğer hormonlara göre eksplant başına sürgün sayısının daha düşük olduğu gözlenmiş ve 2,16 - 5,16 adet olarak kaydedilmiştir. Ortamlarda en yüksek KIN (3,00 mg/L) kullanıldığında en fazla 5,16 sürgün görülmüştür. Buna karşı en düşük sürgün sayısı ise (2,16 adet) 0,50 mg/L KIN içeren ortamda görülmüştür.

Genel olarak ortamlarda BAP ve KIN konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısının da arttığı görülmüştür.

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından TDZ içeren ortamlarda diğer (BAP ve KIN) ortamlara göre 7 - 10 kat fazla sürgün elde edilmiştir. TDZ içeren ortamlarda 28,10 - 46,05 eksplant başına sürgün sayısı kaydedilirken en fazla (46,05) ve en düşük (28,10) sayı sırası ile 0,50 mg/L ve 2,00 mg/L TDZ içeren ortamda gözlenmiştir. 0,50 mg/L TDZ içeren ortamdan sonra sürgün oluşumu azalmaya başlamıştır. Aasim ve ark. (2013), BAP konsantrasyonundaki artışın nohut sürgünleri üzerinde, Koca ve Aasim (2015), KIN konsantrasyonundaki artışın *T. ammi* tohumları üzerinde benzer etkilerini bildirmiştir.

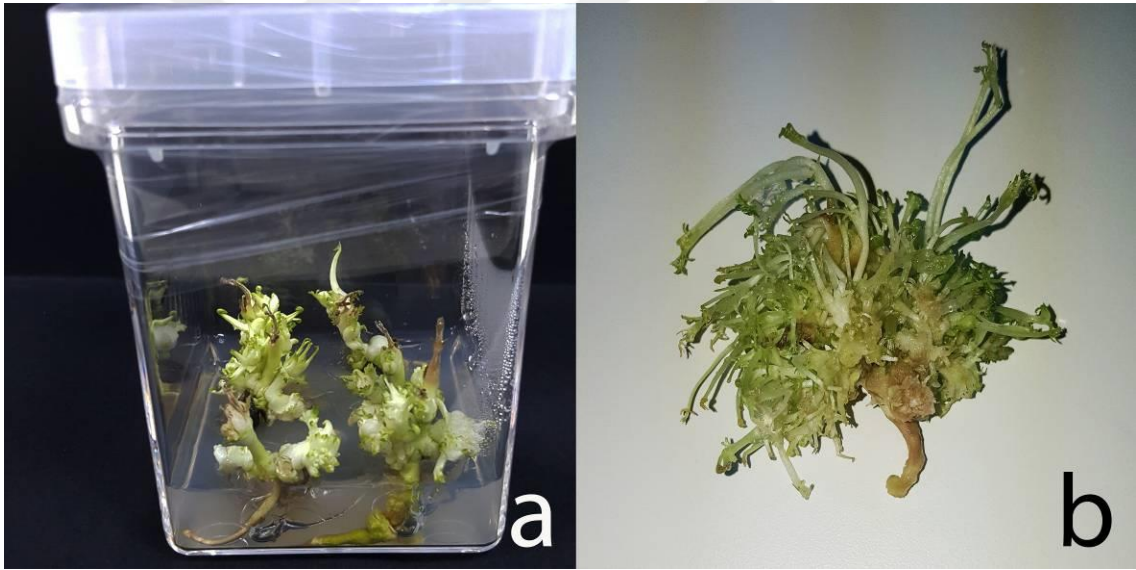


**Şekil 4.6.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun KIN içeren MS besi ortamında tohum eksplantından 8 hafta sonra sürgün rejenerasyonu

TDZ içeren ortamlarda çok kısa sürgünler oluştuğu için sürgün uzunluğu verileri alınmamıştır. TDZ'nin sürgün uzunluğu üzerindeki baskılayıcı etkileri, daha önce *Hygrophila polysperma* (Karataş ve ark., 2013), *T. ammi* (Koca ve Aasim, 2015) gibi farklı bitkilerde de görülmüştür. Diğer hormonlar kullanıldığında sürgün uzunluğu

da etkilenmiştir. Sürgün uzunluğu BAP ve KIN içeren ortamlarda sırasıyla 2,97 - 10,67 cm ve 4,17 - 9,90 cm arasında kaydedilmiştir. En düşük BAP konsantrasyonunda (0,25 mg/L) en uzun sürgünler (10,67) elde edilirken, en yüksek BAP konsantrasyonunda (3,00 mg/L) en kısa sürgünler (2,97) elde edilmiştir. KIN içeren ortamda en kısa (4,17 cm) ve en uzun sürgünler (9,90 cm), 3,00 mg/L ve 0,50 mg/L KIN içeren ortamda sırasıyla kaydedilmiştir. Her iki hormonda oran ve sürgün uzunluğu arasında ters bir ilişki gözlenmiştir. En düşük konsantrasyonda en uzun, en yüksek konsantrasyonda en kısa sürgünler elde edilmiştir. KIN'nin *Liriope platyphylla*'nın sürgün uzunluğu üzerine TDZ veya BAP ile benzer etkileri belirtilmiştir (Park ve ark., 2011). Artmış BAP konsantrasyonunun, nohut (Aasim ve ark., 2013) ve nargile fiğinin (Kendir ve ark., 2009) ortalama sürgün uzunluğu üzerindeki olumsuz etkileri de bildirilmiştir.

BAP ve KIN içeren ortamlardan elde edilen bu sürgünler köklendirme ortamına aktarılmıştır.



**Şekil 4.7.** *In vitro* koşullarda siyah nohutun TDZ içeren MS besi ortamında tohum eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) 8 hafta sonra kallus ve sürgün oluşumu (b) MS ortamına aktarılan eksplantlarda sürgün gelişimi

#### 4.5. Köklendirme

Bazı baklagillerin *in vitro* rejenerasyon sürgünlerinin köklendirilmesi, biyoteknolojik yöntemlerin ıslah çalışmalarında zor olarak görülmektedir (Fratini ve Ruiz, 2003). Nohutun *in vitro* köklendirilmesi için farklı stratejiler ve protokoller kullanılmıştır (Sanyal ve ark., 2005; Chakraborti ve ark., 2006; Aasim ve ark., 2013).



İncelenen çalışmalarda köklendirme için genel olarak IBA kullanılmıştır (Brandt ve Hess, 1994; Das ve Sarmah, 2006; Anwar ve ark., 2008; Paul ve ark., 2008; Yousefiara ve ark., 2008; Rekha ve Thiruvengadam, 2009; Aasim ve ark., 2011; Banu ve ark., 2011; Parveen ve ark., 2012; Aasim ve ark., 2013). Bazı çalışmalarda IAA (Rekha ve Thiruvengadam, 2009; Kadiri ve ark., 2014) ve NAA (Murthy ve ark., 1996; Rekha ve Thiruvengadam, 2009) gibi oksinlerin de kullanıldığı görülmüştür.

Köklenme ile ilgili ilk deneyler, aynı zamanda, siyah nohutun *in vitro* rejenerasyon sürgünlerinin tekrarlayıcı niteliğini de göstermiştir. Daha önce börülce (Aasim ve ark., 2008), çemen otu (Aasim ve ark., 2010), tüylü fiğ (Aasim ve ark., 2011), mercimek (Aasim, 2012), nohut (Aasim ve ark., 2013) ve *T. ammi* (Koca ve Aasim, 2015) gibi diğer baklagiller ile yapılan çalışmalarda IBA içeren ortamda köklenme ile kallus indüksiyonu izlenmiştir. Bu sorunun üstesinden gelmek için tez çalışmasında, BAP veya KIN ortamından koyu yeşil sürgünler seçilmiş olup, ardından farklı IBA konsantrasyonları (0,25, 0,0, 1,00, 1,50 ve 2,00 mg/L) içeren MS ortamı kullanılarak 6 hafta süre ile köklendirme çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.8). Ancak sürgünlerin çoğunda, köklenmiş sürgünlerin tabanından gelen kalluslardan gelişim izlenmiştir.

IBA kullanılarak yapılan çok sayıda sürgün ve kallus indüksiyonu, farklı baklagiller için bildirilen bilinmeyen bir olgudur (Aasim ve ark., 2008, 2010, 2011, 2012, 2013). Köklü bitkiciklerin dikkatli incelenmesi köklenme için spesifik sürgünlerin seçiminin net etkisini ortaya çıkarmıştır. Sertleşmiş sürgünlerin (sert ve koyu yeşil saplar ve yapraklar), bu türden geri dönüşlü bitkilerin köklenmesi için daha uygun olması önerilir (Chakraborti ve ark., 2006).



Şekil 4.8. *In vitro* koşullarda siyah nohutun IBA içeren MS besi ortamında kök rejenerasyonu

#### 4.6. Adaptasyon

Rejenerasyon protokolünün son adımı, *in vitro* köklü bitkiciklerin büyüme odası, sera veya tarla koşulları altında ürün haline getirilmesidir. Bu yönüyle nohut da ıslah ürünü olarak kabul edilir ve sıcaklık, nem, toprak nemi, havalandırma gibi koşullar bitki oluşumunu etkiler (Anwar ve ark., 2008; Aasim ve ark., 2013). Torf içeren ve polietilen torbalarla kaplanmış alt tabakaya aktarılan köklendirilmiş bitkicikler (Aasim ve ark., 2008, 2013), torbaları büyüme odası koşullarından çıkarıldığında tam bir başarısızlığa neden olmuştur.



**Şekil 4.9.** *In vitro* koşullarda elde edilen siyah nohut bitkiciklerinin perlit ve torf (4:1) karışımı içeren saksılarda adaptasyonu sonucu çiçeklenmesi ve elde edilen tohumlar

Nohut ekimleri, iyi su tutma kapasitesine ve havalandırmaya sahip ortam gerektirir (Anwar ve ark., 2008; Aasim ve ark., 2013). Bu nedenle çalışmamızda, torf ve perlit (4 : 1) karışımı toprak kullanılmıştır. Sürgünlerin ortama aktarılması ve polietilen torbalarla kaplanması için benzer prosedürler uygulanmıştır. Kaplar  $24 \pm 1$  ° C, % 60 bağıl nem ve 16 saat ışık fotoperiyodunda ayarlanmış büyüme odasına yerleştirilmiştir. Saksılar 2 hafta sonra kademeli olarak çıkarılmıştır (Aasim ve ark., 2013) ve daha fazla büyüme için büyüme odasında tutulmuştur. Bitkilerin hayatta kalma oranının %80 civarında olduğu görülmüştür. Bu bitkiler çiçek oluşturmuş, ardından tohumları belirlemiştir. Benzer şekilde, Koca ve Aasim (2015), büyüme odasındaki *in vitro* bitkicikleri başarılı bir şekilde iklime alıştırmış ve çiçeklenmeye ve tohumlara ulaşmıştır (Şekil 4.9).

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tez kapsamında siyah nohut bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu için uygun protokol geliştirmek amacıyla farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, TDZ ve KIN) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

1. Denemede kullanılan siyah nohut bitkisinin yüzey sterilizasyonu için % 50 çamaşır suyu (NaOCl) ile 15 dk. muamelenin en uygun olduğu görülmüştür. Sterilizasyon sonucu çimlenme oranı %100 olarak gözlenmiş ve bulaşığa rastlanmamıştır.
2. Denemede kullanılan sürgün ucu, kotiledon boğum ve nohut eksplantları farklı konsantrasyonlarda (0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 ve 3,00 mg/L) BAP, KIN ve TDZ içeren MS ortamında 8 haftalık kültüre alınmıştır.
3. Tüm eksplantlarda yüksek oranda sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir.
4. TDZ içeren ortamlarda % 100 kallus oluşumu görülürken, BAP ve KIN içeren ortamlarda kallus oluşumunun daha az olduğu görülmüştür.
5. Kültür ortamlarında en fazla sürgün sayısı (46,05) tohum eksplantından 0,50 mg/L TDZ içeren ortamda elde edilmiştir.
6. Tüm eksplantlar kıyaslandığında en uzun sürgün (10,67 cm) tohum eksplantından 0,25 mg/L BAP konsantrasyonunda kaydedilmiştir.
7. Denemelerden elde edilen rejenere sürgünlerden fenotip olarak en iyi olanlar KIN ortamında görülmüştür. BAP içeren ortamlarda hiperhidrik sürgün sorunu gözlenirken, TDZ içeren ortamlarda fazla kallus oluşumundan dolayı sürgünlerin bodur kaldığı gözlenmiştir.
8. Kök oluşumu 1 mg/L IBA ile desteklenmiş MS ortamında gözlenmiştir.
9. Köklenen bitkiler perlit ve torf karışımı toprak bulunan saksılarda dış koşullara adaptasyon sağlanmıştır.

Siyah nohut tıbbi açıdan önemli bir bitkidir ve bitkinin potansiyeli biyoteknolojik yöntemler kullanarak daha da arttırabilir. *In vitro* rejenerasyon protokolü geliştirilerek sürekli bitki materyali sağlanması, mevsime bağlı kalmadan istenildiği kadar üretilmesi, biyoçeşitliliğe zarar vermeden sistemin sürdürülebilmesi gibi avantajlar sağlanabilecektir. Ayrıca, geliştirilecek protokol daha sonra gen aktarımı, stres koşullarının incelenmesi, sekonder metabolit vb. gibi diğer biyoteknolojik çalışmalar için de yardımcı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Aasim, M., Khawar, K.M., Özcan, S., 2008, *In vitro* micropropagation from shoot meristems of Turkish Cowpea (*Vigna unguiculata* L.), *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), 149-154.
- Aasim, M., Hussain, N., Umer, E.M., Zubair, M., Hussain, S.B., Saeed, S., Rafique T.S., Sancak, C., 2010, *In vitro* shoot regeneration of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) using different cytokinins, *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7174-7179.
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., Hajyzadeh, M., Mahmud, S.T., Ozcan, S., 2011, *In vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce, *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2020-2023.
- Aasim, M., 2012, Micropropagation of lentil (*Lens culinaris* Medik.) using pulse treatment of mature plumular apices, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 49(2), 149-154.
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., Hajyzadeh, M., 2013, Multiple shoot regeneration of plumular apices of chickpea, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 33-39.
- Ault, J.R., 1994, *In vitro* propagation of *Eriostemon myoporoides* and *Eriostemon "stardust"*, *Horticultural Science*, 29, 686-688.
- Al-Tanbouz, R.I., 2013, *In vitro* regeneration of local chickpea varieties in palestine, Yüksek Lisans Tezi, *An Najah Ulusal Üniversitesi, Nablus, Filistin Lisansüstü Eğitim Fakültesi*, Filistin.
- Al-Tanbouz, R., Abu-Qaoud, H., 2016, *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 17(1&2), 21-30.
- Amer, A., Mohamed, G., Pantaleo, V., Leonetti, P., Hanafy, P.S., 2019, *In vitro* regeneration through organogenesis in Egyptian chickpea, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-8.
- Anwar, F., Sharmila, P., Saradhi, P.P., 2008, An optimal protocol for *in vitro* regeneration, efficient rooting and stable transplantation of chickpea, *Physiol.Mol. Biol. Plants*, 14, 329-335.
- Anwar, F., Sharmila, P., Saradhi, P.P., 2010, No more recalcitrant: Chickpea regeneration and genetic transformation, *African Journal of Biotechnology*, 9(6), 782-797.
- Arora, A., Chawla, H.S., 2005, Organogenic plant regeneration via callus induction in chickpea (*Cicer arietinum* L.)-Role of genotypes growth regulators and explants, *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 251-256.
- Aydemir, L.Y, Yemenicioğlu, A., 2013, Potential of Turkish kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives, *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 686-694.
- Barik, D.P., Mohapatra, U., Chand, P.K., 2005, Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration, *Plant Cell Rep.*, 24, 523-531.

- Bano, S., Jabeen, M., Rahim, F., Ilahi, S., 2005, Callus induction and regeneration in seed explants of rice (*Oryza sativa* cv. Swat II), *Pak. J. Bot.*, 37, 829-836.
- Banu, T.A., Sarker, R.H., Hoque, M.I., 2011, *In vitro* plant regeneration of four local varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown in Bangladesh, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 46(3), 379-384.
- Brandt, E.B., Hess, D., 1994, *In vitro* regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from meristem tips and cotyledonary nodes. *In vitro Cell. Dev. Bid.*, 30, 75-80.
- Chakraborti, D., Sarkar, A., Das, S., 2006, Efficient and rapid *in vitro* plant regeneration system for Indian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant Cell Tiss Org Cult*, 86, 117–123.
- Cucco, M.F., Jaume, A.D.R., 2000, Protocol for regeneration *in vitro* of *Arachis hypogaea*, *L. Electronic J. Biotech.*, 3, 154-160.
- Çöçü, S., Uranbey, S., ve Sancak, C., 2003, Bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi*, 9 (4): 445- 449.
- Das, P., Sarmah, B.K., 2006, Establishment of an *in vitro* regeneration system suitable for *Agrobacterium* mediated transformation of kabuli type chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Legume Res.*, 29 (3), 163–168.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksız, İ., Sancak, C., Arslan, O., 2005, Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) bitkisinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve hızlı çoğaltım, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11 (1), 60-64.
- Fratini, R., Ruiz, M.L., 2003, A rooting procedure for lentil (*Lens culinaris* Medik.) and other hypogeous legumes (pea, chickpea and Lathyrus) based on explant polarity, *Plant Cell Rep*, 21, 726–732.
- Gagliardi, R.F., Pacheco, G.P., Coculilo, S.P., Valls, J.F.M., Mansur E., 2000, *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*), *Biodiv. Cons.* 9(9), 943-951.
- Ghanti, S.K., Sujata, K.G., Rao, M.S., Kishor, P.B.K., 2010, Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature explants of chickpea, *Biologia Plantarum*, 54 (1), 121-125.
- Ghribi, A.M., Maklouf, I., Blecker, C., Attia, H., Besbes, S., 2015, Nutritional and compositiona study of desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours from Tunisian cultivars, *Advances in Food Technology and Nutrition Sciences Open Journal*, 1(2), 38-47.
- Harisaranraj, R., Babu, S.S., Suresh, K., 2008, Callus induction and plant regeneration of *Vigna mungo* (L.) Hepper via half seed explant, *Ethnobot. Leaflets*, 12, 577-8
- Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Chibbar, R.N., 2012, Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review, *British Journal of Nutrition*, 108, 11-26.
- Kadiri, A., Chalak, L., Bitar, A.E., Nicolas, N., Mroue, S., De March, G.G., 2014, *In vitro* plant regeneration system for two middle east cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Adv Crop Sci Tech*, 2, 125.

- Karataş, M., Aasim, M., Çınar, A., Doğan, M., 2013, Adventitious shoot regeneration from leaf explant of dwarf hygro (*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson), *ScientificWorld J.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/680425> [Ziyaret Tarihi: 5 Kasım 2017].
- Kadiri, A., Halfaoui, Y., Bouabdallah, L., Ighilhariz, Z., 2014, Chickpea (*Cicer arietinum* L.) *in vitro* micropropagation, *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue*, 1, 1304-1309.
- Kendir, H., Sahin-Demirbag, N., Aasim, M., Khawar, K.M., 2008, *In vitro* plant regeneration from Turkish Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L. var. *narbonensis* L.), *African J. Biotech.*, 8, 614-618.
- Khar, A., Bhutani, R.D., Yadav, N., Chowdhury, V.K., 2005, Effect of explant and genotype on callus culture and regeneration in onion (*Allium cepa* L.), *Akdeniz Üni. Ziraat Fak. Derg.*, 18, 397-404.
- Koca, A., Aasim, M., 2015, Establishment of Efficient Micropropagation system in Bishop's Weed (*Trachyspermum AmMi* L) Using Mature Seed Explant, *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25 (2), 478-484.
- Li, Z., Jarret, R.L., Pittman, R.N., James, A., Demski, W., 1994, Shoot organogenesis from cultured seed explants of Peanut (*Arachis hypogea* L.) using Thidiazuron, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 30P, 187-191.
- Masaaki, D., Noriaki, H., Mari, M., 2004, Callus formation from seed explant, growth in suspension culture and plant regeneration of the Japonica Rice cultivar "Koshiibuki", *J. Niigata Agric. Res. Ins.*, 6, 1-5.
- Macar, T.K., Macar, O., Mart, D.İ., 2017, Variability in Some Biochemical and Nutritional Characteristics in Desi and Turkish Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Types, *Celal Bayar University Journal of Science*, 13: 677-680.
- Malik, S.I., Rashid, H., Yasin, T., Minhas, N.M., 2004, Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature seed explants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *Pak. J. Bot.*, 36, 629-634.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wahala, K., 1998, Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans, *J Nutr Biochem*, 9, 193-200.
- Miao, M., Xhang, T., Jiang, B., 2009, Characterisations of kabuli and desi chickpea starches cultivated in China, *Food chemistry*, 113, 1025-1032.
- Miraz, M.F., Mozid, M.A., Haque, M.S., Latif, M.A., 2015, *In vitro* callus initiation of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *International Journal of Natural and Social Sciences*, 2(5), 44-51.
- Mohammadi, K., 2015, Nutritional Composition of Iranian Desi and Kabuli Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Cultivars in Autumn Sowing, *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* 9, 550-553.
- Mohd Din, A.R.J., Ahmad, F.I., Wagiran, A., Abd Samad, A., Rahmat, Z., Sarmidi, M.R., 2015, Improvement of efficient *in vitro* regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas), *Saudi Journal of Biological Sciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.022> [Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2018].

- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15, 473–497.
- Murthy, B.N.S., Victor, J., Singh, R.P., Fletcher, R.A., Saxena, P.K., 1996, *In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron, *Plant Growth Regul*, 19, 233-240.
- Ochatt, S.J., Conreux, C., Jacas, L., 2013, Flow cytometry distinction between species and between landraces within *Lathyrus* species and assessment of true-to-typeness of *in vitro* regenerants, *Plant Syst. Evol.*, 299, 75-85.
- Özcan, S., Firek, S., ve Draper, J., 1993, Selectable marker genes engineered for specific expression in target cells for plant transformation, *Biotechnology*, 11: 218-221.
- Özcan, S., Sevimay, C.S., Yıldız, M., Sancak, C., ve Özgen, M., 1996, Prolific shoot regeneration from immature embryo explant of sainfoin, *Plant Cell Rep.*, 16: 200-203.
- Pacheco, G., Gagliardi, R., Carneiro, L., Callado, C., Valls, J., Mansur, E., 2007, The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis* species from Sections Erectoides and Procumbentes, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 88, 121-126.
- Palanivel, S., Jayabalan, N., 2002, Direct Multiple shoot induction from different mature seed explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Philipp. J. Sci.*, 127-131.
- Park, W.T., Y.K. Kim, Y.S. Kim, N.I. Park, S.Y. Lee, Park, S.U., 2011, *In vitro* plant regeneration and micropropagation of *Liriope platyphylla.*, *POJ.*, 4, 199-200.
- Parveen, S., Venkateshwarlu, M., Srinivas, D., Reddy, K.J.M., Ugandhar, T., 2012, Direct *in vitro* shoots proliferation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from shoot tip explants induced by thidiazuron, *Bioscience Discovery*, 3(1), 01-05.
- Paul, V., Polisetty, R., Chandra, R., Suresh, K., 2008, Age of seedling explant and regeneration potential in chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Phytomorphology*, 58(1&2), 41-48.
- Pawar, S., Jambhale, V., 2018, Regeneration studies in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.), *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 05, 1278.
- Polisetty, R., Paul, V., Deveshwar, J.J., Khetarpal, S., Suresh, K., Chandra, R., 1997, Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant Cell Rep.*, 16, 565–571.
- Purushothaman, R., Upadhyaya, H.D., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Krishnamurthy, L., 2014, Kabuli and desi chickpeas differ in their requirement for reproductive duration, *Field Crop Research*, 163, 24-31.
- Rekha, K.T., Thiruvengadam, M., 2009, An efficient micropropagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *The Philippine Agricultural Scientist*, 3, 320-326.
- Rincón, F., Martínez, B., Ibañez, M.V., 1998, Proximate composition and antinutritive substances in chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by the biotype factor, *J Sci Food Agric*, 78, 382–388.

- Saba, S., 2017, 19 Amazing Benefits Of Black Chickpeas (Kala Chana) For Skin, Hair And Health, <https://www.stylecraze.com/articles/benefits-of-black-chickpeas-for-skin-hair-and-health/> [Ziyaret Tarihi: 27 Haziran 2018].
- Sancak, C., 1999, Koca fiğ (*Vicia narbonensis* L.)'in olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu, *G.Ü.Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 19 (2): 25-33.
- Sancak, C., Mirici, S., ve Özcan, S., 2000, High frequency shoot regeneration from immature embryo explants of Hungarian vetch, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61: 231-235.
- Sa'nchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., 1999, Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization, *Food Chem.*, 64, 237–243.
- Sanyal, I., Singh, A.K., Kaushik, M., Amla, D.V., 2005, *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*, *Plant Sci.*, 168, 1135–1146.
- Shad, M.A., Pervez, H., Zafar, Z.I., 2009, Evaluation of biochemical composition and physicochemical parameters of oil from seeds of desi chickpea varieties cultivated in arid zone of Pakistan, *Pak J Bot.*, 41, 655–662.
- Shah, M.I., Jabeen, M., Ilahi, I., 2003, *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var.Lu-26S, *Pak. J. Bot.*, 35(2), 209-217.
- Segev, A., Badani, H., Galili, L., Hovav, R., Kapulnik, Y., Shomer, I., Galili, S., 2011, Total phenolic content and antioxidant activity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by soaking and cooking conditions, *Food and Nutrition Sciences*, 2, 724-730.
- Snedecor, G. W., Cochran, W. G., 1967, *Statistics methods*, Iowa, 246.
- Sunil, S.P., Robinson, J.P., KarthickBalan, S.S., Anandhprabhakaran, M., Balakrishnan, V., 2015, *In vitro* regeneration and induction of multiple shooting in *Cicer arietinum* L. Using cotyledonary nodal explants, *African Journal of Biotechnology*, 14(13), 1129-1138.
- Thorpe, T., 2007, History of plant tissue culture, *J. Mol. Microbial Biotechnol*, 37, 169-180.
- Upadhyaya, G., Sen, M., Roy, A., 2015, *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var. 'Sita', 'Rupali' and 'Swarna Masuri', *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(5), 24-27.
- Wang, X., Gao, W., Zhang, J., Zhang, H., Li, J., He, X., Ma, H., 2010, Subunit, amino acid composition and *in vitro* digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, *Food Research International*, 43(2), 567-572.
- Vaz, P., Hanbury, C.D., Moorhem, V., Lambein, F., Ochatt, F.S., Rubiales, D., 2011, Grass pea. In: Vega, de. la. MP., Torres, AM, Cubero JI. and Kole, C. (eds.), *Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes*, Science, Lebanon, 151–204.



- Yousefiara, M., Bagheri, A., Moshtaghi, N., 2008, Optimizing regeneration condition in chickpea (*Cicer arietinum L.*), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(7), 1009-1014.
- Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, M., Iqbal, S., 2007, Characterization and compositional study of oil from seeds of desi chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars grown in Pakistan, *J Am Oil Chem Soc*, 84, 1143–1148.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Arife KİRTİŞ  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Karatay – 18.10.1993  
**Telefon** : 05530620251  
**Faks** :  
**e-mail** : [arife\\_kirtis@hotmail.com](mailto:arife_kirtis@hotmail.com)

### EĞİTİM

| Derece        | Adı, İlçe, İl                                | Bitirme Yılı |
|---------------|--|--------------|
| Lise          | : Karatay Lisesi Karatay/KONYA               | 2011         |
| Üniversite    | : Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram/KONYA | 2016         |
| Yüksek Lisans | : Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram/KONYA | 2019         |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl  | Kurum                  | Görevi             |
|------|------------------------|--------------------|
| 2017 | Milli Eğitim Bakanlığı | Biyoloji Öğretmeni |

### YABANCI DİLLER

İngilizce

### YAYINLAR

1. Kirtiş, A., Aasim, M., 2019, Thidiazuron (TDZ) Induced *In vitro* Axillary Shoot Regeneration of Desi Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Applied Biological Sciences (TR-Dizini) (Yüksek lisans tezinden yayımı kabul edildi- In Press)
2. Aasim, M., Kahveci, B., Korkmaz, E., Doğanay, F., Bakırcı, Ş., Sevinc, C., Kirtis, A., 2018, TDZ-IBA induced adventitious shoot regeneration of water balm (*Melissa officinalis* L.), J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci., 6:35-39.
3. Taşbaşı, B.B., Kavcı, E., Kirtiş, A., Day, S., Aasim, M., Khawar, K.M., 2017, Efficacy of sucrose and thidiazuron on *in vitro* shoot regeneration of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). 1st International Congress On Medicinal and Aromatic Plants -Natural and Healthy Life. 10-12 Mayıs 2017 Konya, Türkiye.
4. Aasim, M., Kirtiş, A., Karataş, M., 2017, An insight into *In vitro* propagation of aquatic plants in Turkey. 3rd International Agriculture Congress, 14-18 Ağustos 2017, Skopje, Makedonya.