

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BOR HİPERAKÜMÜLATÖR BİTKİLERDE *miR408* VE *Bor2*
GENLERİNİN YÜKSEK DÜZEYDE İFADESİNİN BOR
FİTOREMEDİASYONUNA ETKİLERİ**

İbrahim Ertan ERKAN

Danışman
Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

DOKTORA TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA-2019



© 2019 [İbrahim Ertan ERKAN]

TEZ ONAYI

İbrahim Ertan ERKAN tarafından hazırlanan "**Bor Hiperakümülatör Bitkilerde miR408 ve Bor2 Genlerinin Yüksek Düzeyde İfadesinin Bor Fitoremediasyonuna Etkileri**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Seyhan ULUSOY
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Halime ÜNLÜ
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Arzu KART
Süleyman Demirel Üniversitesi

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf UÇAR

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

İbrahim Ertan ERKAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Pamuğun Tarihçesi ve Genel Özellikleri	3
2.1.1. Pamuğun tarihçesi	3
2.1.2. Pamuğun genel özellikleri	3
2.2. Dünyada Pamuk Üretimi	5
2.3. Türkiye’de Pamuk Üretimi	6
2.4. Karanfilin Tarihçesi ve Genel Özellikleri	8
2.4.1. Karanfilin tarihçesi	8
2.4.2. Karanfilin genel özellikleri	9
2.5. Türkiye’de Karanfil Üretimi	10
2.6. Bor Stresi ve Borun Bitkiler Üzerindeki Etkileri	11
2.6.1. Fitoremediasyon	15
2.7. Doku Kültürü Çalışmaları	20
2.8. Transformasyon Çalışmaları	32
2.9. <i>miR408</i> Geninin Özellikleri	42
2.10. Bor Tolerans Mekanizmalarıyla İlgili Potansiyel Genler	47
2.10.1. <i>Plastosiyanin</i>	47
2.10.2. <i>PIP;1</i> ve <i>PIP;2</i>	48
2.10.3. <i>Boron transporter 1</i> ve <i>Boron transporter 2</i>	49
2.10.4. <i>Mitogen-activated protein kinase (MAPK)</i>	49
2.10.5. <i>NADPH:cytochrome P450 reductase 2 (CPR2)</i>	50
3. MATERYAL VE YÖNTEM	52
3.1. Materyal	52
3.1.1. Bitki materyali	52
3.1.2. Bitki doku kültürü ortamları	52
3.1.3. Bakteri suşları ve plazmidler	52
3.1.4. Bakteri kültür ortamları	53
3.2. Yöntem	53
3.2.1. Doku kültürü çalışmaları	54
3.2.2. Transformasyon çalışmaları	56
3.2.3. Genetik transformasyonun moleküler düzeyde doğrulanması	61
3.2.4. Transgenik bitkilerde bor toleransının analizi	63
3.2.5. İstatistiksel analizler	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	68
4.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve <i>In Vitro</i> Çimlendirilmesi	68
4.2. Doku kültürü ile Rejenerasyonun Optimizasyonu	70
4.2.1. Pamuk bitkisinin gen transferine uygun sürgün rejenerasyonunun optimizasyonu	70

4.2.2. Karanfil bitkisinin gen transferine uygun sürgün rejenerasyonunun optimizasyonu	72
4.3. Transformasyon Çalışmaları	73
4.3.1. <i>BOR2</i> geninin klonlaması	73
4.3.2. Genetik transformasyonda kullanılacak bakteri hatlarının GUS boyamayla seçilimi.....	74
4.3.3. Pamuk bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon	75
4.3.4. Pamuk bitkisinin transformasyon sonrası köklendirilmesi	77
4.3.5. Karanfil bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon	77
4.3.6. Karanfil bitkisinin transformasyon sonrası köklendirilmesi	80
4.3.7. Bitkilerin dış ortama aklimatizasyonunun sağlanması.....	80
4.4. Genetik Transformasyonun Moleküler Düzeyde Doğrulanması	82
4.4.1. PCR analizleri	82
4.4.2. Southern blot analizi	83
4.5. Pamuk Bitkisinde Bor Toleransının Analizi	85
4.6. Transgenik Bitkilerde Bor Toleransının Analizi.....	86
4.6.1. Gen ifadesi düzeyinde analizler	86
4.6.2. Biyokimyasal analizler.....	98
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	105
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ.....	130

ÖZET

Doktora Tezi

BOR HİPERAKÜMÜLATÖR BİTKİLERDE *miR408* VE *Bor2* GENLERİNİN YÜKSEK DÜZEYDE İFADESİNİN BOR FİTOREMEDİASYONUNA ETKİLERİ

İbrahim Ertan ERKAN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

Bu çalışmada *miR408* geninin pamuk ve karanfil bitkilerine *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transgenik bitkilerin rejenerasyonu her iki bitki içinde gerçekleştirilmiştir. Ancak F1 eldesi yalnızca pamuk bitkisinde gerçekleştirilebilmiştir. *miR408* geninin bor fitoremediasyon potansiyeli F1 jenerasyon transgenik pamuk bitkilerinde moleküler ve biyokimyasal seviyede incelenmiştir. Bu amaçla transgenik ve kontrol pamuk bitkilerine 1. gün ve 5. gün 7.5 mM olmak üzere iki farklı süreyle şiddetli bor stresi uygulanmış ve tepkiler karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

mir408 geninin varlığının transgenik bitkilerde artan bor stresi altında *PIP1;1* gen ifade seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde *PIP2;1* gen ifade seviyesi transgenik bitkilerde artan bor stresi ile birlikte artmaktadır. MDA ve iyon sızıntısı miktarları, transgenik bitkilerin bor uygulamaları altında bor uygulanan kontrol bitkilere göre üstün dayanım özelliği gösterdiğini ve daha az strese girdiğini göstermektedir.

Transgenik bitkiler bor stresinin ilk gününde aşırı borla karşılaştığında *Boron transporter 1* geninin ifadesini azaltarak bitkilere bor girişini azaltmıştır. Ancak 5 günlük stres sonunda, bu genin ifadesinin artarak bitkilere bor girişinin arttığı tespit edilmiştir. *miR408* geninin, *boron transporter 1* geninin ifade seviyesini düzenleyerek bitkilerin bor dengesinin sağlanmasında görev aldığı belirlenmiştir. Transgenik bitkilerde *Boron transporter 2* gen ifadesinin, stres süresi uzadıkça arttığı belirlenmiştir. Birinci stres gününde *Boron transporter 2* gen ifadesinin transgenik bitkilerde düşük olmasının bir nedeninin *Boron transporter 1* geninin ifade seviyesini düşürerek bitki içerisine bor alınımını azaltması nedeniyle olduğu tespit edilmiştir.

Bağıl su içerikleri, transgenik bitkilerde 1. stres gününde kontrol bitkilerden daha yüksek yüzdeye sahip ve istatistiksel olarak önemli iken, 5. stres gününde bu yüzdenin düşerek bor uygulanan kontrol bitkileri ile aynı seviyeye geldiği belirlenmiştir. Prolin içerikleri transgenik bitkilerde 1. stres gününde bor uygulanan kontrol bitkilerin seviyesinin altındayken, 5. stres gününde artmıştır. Bu sonuçlar

Boron transporter 1 ve *Boron transporter 2* genleri arasındaki ilişkiyi destekler niteliktedir.

Plastosiyanın gen ifadesinin stresle birlikte arttığı belirlenmiştir. Birinci stres gününde transgenik bitkilerde *plastosiyanın* gen ifadesi bor uygulanan kontrol bitkilerine göre daha düşük seviyede kalırken, 5. stres gününde kontrol bitkilerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Plastosiyanın*'in bakır eksikliğinde ifade edilen bir gen olduğu bu nedenle artan stres koşullarında bitkinin bakır ihtiyacı duyması nedeniyle arttığı belirlenmiştir. *miR408* geni, artan bor stresi (5. gün) altında transgenik bitkilerde *plastosiyanın* gen ifadesini düzenleyerek bor uygulanan kontrol bitkilerine kıyasla %11 artırmıştır.

Transgenik bitkilerin toplam klorofil içerikleri, 1.stres gününde bor uygulanan kontrol bitkilerinden yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Beşinci gün bor stresinde transgenik bitkilerin toplam klorofil içerikleri, bor uygulanan kontrol bitkilerden daha yüksek seviyede olup istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Transgenik bitkilerin toplam klorofil içeriklerini artan bor stresiyle birlikte, kontrol bitkilerine kıyasla daha iyi düzeyde koruduğu tespit edilmiştir. *miR408* geninin bor stresi altında *MAPK* ve *CPR2* gen ifadelerinin düzenlenmesinde etkin bir rol oynamadığı anlaşılmıştır. *EF1A8*'in bor stresi altında kullanılabilir uygun bir referans gen olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pamuk, *Agrobacterium tumefaciens*, genetik transformasyon, *miR408*, bor fitoremediasyonu.

2019, 130 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EFFECTS OF *miR408* and *Bor2* OVEREXPRESSION IN BORON HYPERACCUMULATOR PLANTS FOR BORON PHYTOREMEDIATION

İbrahim Ertan ERKAN

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

In this study, genetic transformation of *miR408* gene to cotton and carnation plants was carried out via *Agrobacterium*. The regeneration of transgenic plants was performed successfully in both plants. However, F1 seed production could only be achieved in cotton plants. Boron phytoremediation potential of *miR408* gene was investigated at the molecular and biochemical level by the use of F1 generation transgenic cotton plants. For this purpose, severe boron stress was applied to the transgenic and control cotton plants at two different durations, namely 1 day and 5 days at the rate of 7.5 mM B and the responses were examined comparatively.

The *mir408* gene was found to increase the expression level of *PIP1;1* gene under long term boron stress in transgenic plants. Similarly, the *PIP2;1* gene expression level increased with increasing boron stress in transgenic plants. Levels of MDA and ion leakage indicated that transgenic plants were more tolerant to boron stress when compared to control plants.

Boron transporter 1 gene expression level decreased in transgenic plants when encountered with excess boron on the 1st day of stress. However, at the end of the 5th stress day, increased expression of this gene was found to increase boron input to the plants. The *miR408* gene was determined to regulate the expression level of *boron transporter 1* gene in the provision of boron balance in plants. Similarly *boron transporter 2* gene expression was increased with the exposure of longer stress duration in transgenic plants. The reason for the lower *Boron transporter 2* gene expression in transgenic plants on the 1st day of stress might be resulted from the decrease of *Boron transporter 1* gene expression and eventually decreased boron intake of plant tissues.

Plant relative water content percentages (%) were higher and statistically significant in transgenic plants compared to control plants under boron stress on the 1st day of stress, while this percentage decreased and found to be statistically insignificant between transgenic and boron stressed control plants on the 5th day of stress. Plant proline contents did not exhibit statistically significant difference in transgenic plants when compared to boron stressed control plants on the first day of stress; however the difference increased at the duration of five days. These results also supported the relationship between *Boron transporter 1* and *Boron transporter 2* genes.

The expression of *plastocyanin* gene was increased with the duration of stress. On the 1st day of stress, *plastocyanin* gene expression in transgenic plants was found to be lower than boron stressed control plants, whereas it was found to be higher on the 5th day of stress when compared to boron stressed control plants. *Plastocyanin* is a gene expressed in the lack of copper; however plants are unable to absorb essential copper under increased stress conditions. This might be the reason for the *plastocyanin* gene expression increase under long stress duration. *miR408* gene seems to regulate *plastocyanin* gene expression under long stress duration in transgenic plants with 11% more expression compared to boron stressed control plants.

Although the total chlorophyll content of transgenic plants was higher than boron stressed control plants at the 1st day of stress, the difference was not statistically significant. However, at the 5th day of boron stress, increase in the total chlorophyll content of transgenic plants compared to boron stressed control plants was statistically significant. Therefore, transgenic plants have been found to maintain their total chlorophyll contents under severe boron stress when compared to boron stressed control plants. The *miR408* gene was found to play no effective role in the regulation of *MAPK* and *CPR2* gene expressions under boron stress. *EFIA8* was found to be a suitable reference gene which can be used under boron stress.

Keywords: Cotton, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, *miR408*, boron phytoremediation.

2019, 130 pages

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca beni her zaman pozitif yönde motive eden ve yönlendiren, çalışma süresince değerli bilgileri ile beni eğiten ve karşılaştığım zorlukları fikir ve tecrübeleri ile aşmamda yardımcı olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince, Tez İzleme Komitesi'nde yer alarak bilimsel düşüncelerini benimle paylaşan, ilgilerini esirgemeyen hocalarım sayın Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK'e ve sayın Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışma arkadaşlarım Dr. Özlem ARAS ASÇI, Hande Nur KUMBUL ve Dr. Tunhan DEMİRCİ'ye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu süreçte bana olan inançlarını kaybetmeyerek tezimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İbrahim Ertan ERKAN
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Türkiye toprakları bor haritası	13
Şekil 2.2. Fitoremediasyon stratejisinin şematik gösterimi	17
Şekil 2.3. <i>Agrobacterium</i> aracılığıyla genetik transformasyon.....	33
Şekil 3.1. Projede kullanılan deney şeması	54
Şekil 4.1. Pamuk bitkisinin <i>in vitro</i> çimlendirilmesi.....	69
Şekil 4.2. Karanfil bitkisinin <i>in vitro</i> çimlendirilmesi	69
Şekil 4.3. Pamuk bitkisinde kallustan sürgün rejenerasyonu.....	71
Şekil 4.4. Pamuk bitkisinde optimum kinetin ortamı oranını belirleme	71
Şekil 4.5. GUS boyamasına ait görüntüler.....	74
Şekil 4.6. Pamuk yabancı kontrol bitkilerle herbisit seçilimi, petri tabakları soldan sağa sırasıyla 1 mg/l, 2mg/l ve 3 mg/l amonyum glufosinat seçilimini temsil etmektedir.	75
Şekil 4.7. Pamuk bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon	76
Şekil 4.8. Karanfil yabancı kontrol bitkilerle herbisit seçilimi.....	78
Şekil 4.9. Karanfil’de transformasyon sonrası kallus ve sürgünlerin oluşması	79
Şekil 4.10. Pamuk bitkisinin dış ortama aklimatizasyonu	81
Şekil 4.11. BAR geni taşıyan pamuk ve karanfil transgenik bitki hatlarının PCR ile teyit edilmesi	82
Şekil 4.12. 35S geni taşıyan pamuk ve karanfil transgenik bitki hatlarının PCR ile teyit edilmesi	83
Şekil. 4.13. DIG ile işaretlemenin doğrulanması	84
Şekil 4.14. Southern blot, x-ray film üzerinde transgenik pamuk hatlarının doğrulanması	84
Şekil 4.15. Pamuk bitkisinde perlit üzerinde bar (herbisit) seçilimi, soldan sağa sırasıyla kontrol, 2, 3, 4, 5 mg/l amonyum glufosinate içermektedir.....	85
Şekil 4.16. Pamuk bitkisinde bor toleransının belirlenmesi.....	86
Şekil 4.17. <i>Plastosiyanın</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1 gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5 gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B(5), Transgenik+B(5).....	87
Şekil 4.18. <i>Plastosiyanın</i> gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	87
Şekil 4.19. <i>PIP1;1</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol(5), K+B(5),Transgenik+B(5).	88
Şekil 4.20. <i>PIP1;1</i> gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	89
Şekil 4.21. <i>PIP2;1</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5), Transgenik+B (5).	90
Şekil 4.22. <i>PIP2;1</i> gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	90
Şekil 4.23. <i>Boron transporter 1</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5),Transgenik+B (5).....	91

Şekil 4.24. <i>Boron transporter 1</i> gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	92
Şekil 4.25. <i>Boron transporter 2</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1 gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5),Transgenik+B (5).....	93
Şekil 4.26. <i>Boron transporter 2</i> gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	93
Şekil 4.27. <i>MAPK</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5),Transgenik+B (5).....	94
Şekil 4.28. <i>MAPK</i> gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	95
Şekil 4.29. <i>CPR2</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol(5), K+B(5), Transgenik+B(5).....	96
Şekil 4.30. <i>CPR2</i> gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.	96
Şekil 4.31. <i>Translation elongation factor (EF1A8)</i> gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5), Transgenik+B (5).	97
Şekil 4.32. <i>Translation elongation factor (EF1A8)</i> gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Dünya lif pamuk üretimi (bin ton)	5
Çizelge 2.2. Dünya lif pamuk verimleri (Kg/Ha)	6
Çizelge 2.3. TÜİK verilerine göre pamuk ekim alanları ve üretimi	8
Çizelge 2.4. Türkiye’de karanfil üretimi adet (milyon)	10
Çizelge 2.5. Türkiye’de yıllara göre karanfil ekim alanları(m ²).....	11
Çizelge 2.6. Farklı kirleticiler için kullanılan fitoremediasyon teknikleri	16
Çizelge 3.1. Pamuk bitkisinde kullanılan büyüme düzenleyiciler	55
Çizelge 3.2. Karanfil bitkisinde kullanılan büyüme düzenleyiciler.....	56
Çizelge 3.3. Olası transgenik bitkilerin doğrulanması için kullanılan gen bölgeleri ve primerler	62
Çizelge 3.4. PCR döngü basamakları ve zamanları	62
Çizelge 3.5. Gen bankası erişim numaraları	65
Çizelge 4.1. Pamuk bitkisinde rejenerasyonun için kullanılan farklı hormon konsantrasyonları	72
Çizelge 4.2. Karanfil bitkisinde rejenerasyonun optimizasyonu için kullanılan farklı hormon konsantrasyonları	73
Çizelge 4.3. Malondialdehit (MDA) miktarının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	98
Çizelge 4.4. Malondialdehit (MDA) miktarının 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	99
Çizelge 4.5. İyon sızıntısının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	100
Çizelge 4.6. İyon sızıntısının 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	100
Çizelge 4.7. Bağlı su içeriğinin 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	101
Çizelge 4.8. Bağlı su içeriğinin 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	101
Çizelge 4.9. Prolin miktarının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi.....	102
Çizelge 4.10. Prolin miktarının 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi.....	103
Çizelge 4.11. Toplam klorofil miktarının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	103
Çizelge 4.12. Toplam klorofil miktarının 5.gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

As	Arsenik
AgNO ₃	Gümüş nitrat
B	Bor
BAP	6-Benzilaminopurin
BA	Benzil adenin
BR	Brassinosteroid
BSU	Bağlı su içeriği
°C	Derece Celsius (Selsiyus)
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Cd	Kadmiyum
Cl	Klor
Cr	Krom
Cu	Bakır
DIG	Digoksinin
Fe	Demir
GA ₃	Giberellik asit
Hg	Civa
Hs	Hassiyum
IAA	Indol-3-asetik asit
IBA	Indol 3 butirik asit
K	Potasyum
KIN	Kinetin
KNO ₃	Potasyum nitrat
MCS	Çoklu klonlama bölgesi
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
Mo	Molibden
MS	Murashige ve Skoog ortamı
N	Azot
NAA	Naftalen asetik asit
NAD	Nicotinamide adenin dinucleotide
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NH ₄ NO ₃	Amonyum Nitrat
P	Fosfor
Pb	Kurşun
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PVP	Polivinilpirolidon
Se	Selenyum
SSC	saline-sodium citrate
TBA	Tiobarbiturik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultraviyole
YEB	Yeast Extract Broth

ZEA	Zeatin
Zn	Çinko
2,4 D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2 ip	2-Isopentenyladenine



1. GİRİŞ

Moleküler biyoloji ve gen mühendisliği bilimlerinin gelişimiyle birlikte son yıllarda çeşitli genlerin işlevleri detaylı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Özellikle genlerin farklı streslere karşı ne tür cevaplar verdiği merak konusudur. Bitkilerin gen haritaları çıkartılarak gen ifade düzeyleri araştırılmaktadır. Bazı stres etmenleri bitkinin büyüme gelişme ve tohum verimini olumsuz yönde etkilediğinden bu stres etmenleri altında ifadesi artan veya azalan genlerin görevlerinin anlaşılması için günümüzde yoğun çaba sarf edilmektedir. Uzun yıllardan beri bazı genlerin çeşitli hastalıklarla mücadelede etkin bir şekilde kullanılması, bu alanın potansiyelini gözler önüne sermektedir. Genetik mühendisliğiyle birlikte araştırmacılar bazı potansiyel görevleri bilinen genleri başka bitkilere çeşitli genetik transformasyon metodları yardımıyla transfer etmektedirler.

Pamuk ile karanfil dünya ve ülkemiz topraklarının önemli bitkilerdendir. Pamuk genellikle çok değerli olan lif özelliğinin yanında hayvan yemi olarak kullanılmakta ve yağından faydalanılmaktadır. Karanfil kesme çiçekçilikte kullanılan önemli süs bitkilerinin başında gelmektedir. Bu nedenle iki bitkinin de aktif tarımda daha verimli bir şekilde kullanılması için bitkilerin sahip olduğu özelliklerin daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

Fitoremediasyon, kirleticilerin toprak ve sudan bitki bünyesine alınarak zararsız hale getirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Raskin vd., 1997). Ağır metaller herhangi bir müdahale olmaksızın toprakta parçalanmadan yüzyıllarca kalabilmektedir (Hooda, 2007). Fitoremediasyon çalışmalarında son yıllarda transgenik bitkilerden yararlanılmaktadır. Transgenik bitkilerde aşırı düzeyde ifade edilen genlere bağlı olarak metal bağlayıcı proteinlerin ve peptitlerin biyosentezleri de dahil olmak üzere genler, toksik iyonları daha az toksik veya kolay uzaklaştırabilen formlara ya da kombinasyonlara dönüştürebilirler (De Mello-Farias vd., 2011).

Türkiye’de dahil olmak üzere bor rezervine sahip olan Amerika, Çin, Güney Afrika gibi ülkelerde madenler, endüstriyel aktiviteler, tarım alanlarında sulama, gübreleme gibi insan kaynaklı faktörler bor fazlalığına neden olur (Türe ve Bell, 2004). Her ne

olursa olsun özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bor fazlalığı yerel bir problem olmayıp küresel bir problemdir (Onthong vd., 2011; Cervilla vd., 2012).

Bir hastalığa tedavi geliştirmek için öncelikle hastalığa yol açan mekanizmaların anlaşılması gerektiği gibi, önemli tarım bitkilerinde abiyotik streslere dirençli çeşitler geliştirmek de bitkilerin ne tür mekanizmalarla bu streslere tepki verdiklerini anlamaya dayalıdır. Bu çalışmada *miR408* geninin, bor fitoremediasyonu üzerindeki etkileri pamuk ve karanfil bitkileri üzerinde araştırılmıştır. Pamuk ile karanfil bitkileri, insan hayatı için ve ekonomik olarak önemli kültür bitkilerindedir. Bu bitkilerin rekombinant DNA teknikleriyle çevresel stres ve kirlilikle mücadele amacıyla genetik kapasitelerini artırmak da ihtiyaç ve önem arz etmektedir.

Bu doktora tezi çalışmasında pamuk ve karanfil bitkilerinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla genetik transformasyon gerçekleştirilmiştir. Pamuk bitkisinde *mir408* geni yüksek düzeyde ifade edilerek bor fitoremediasyonu üzerine kazandırdığı özellikler moleküler ve biyokimyasal olarak incelenmiştir. Bazı bitkilerde *mir408* geninin potansiyel etkileri üzerine yapılan araştırmalar incelendiğinde, bakır miktarının düzenlenmesi, bazı abiyotik stress faktörlerine tolerans, fotosentez kabiliyetinin gelişmesi, dallanma ve verim artışı üzerine olumlu etkilerinin olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, ilerleyen zamanlarda bor toleransının yanında, çok çeşitli stres etmenlerine karşı pamuk bitkisinin genetik kapasitesinin geliştirilmesi için de rehber niteliğinde olma potansiyelindedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Pamuğun Tarihçesi ve Genel Özellikleri

2.1.1. Pamuğun tarihçesi

Pamuk tarımının yaklaşık 7000 yıl önce Hindistan ve Güney Amerika'da yapıldığını arkeolojik kaynaklar göstermektedir. Pakistan'daki İndus Nehri Vadisi'nde pamuk, M.Ö. 3000 yıllarında pamuk haline getirildi, eğrildi ve dokundu. Aynı zamanda, Mısır'ın Nil vadisinin yerlileri pamuklu giysiler yapıyor ve giyiyorlardı. (National Cotton Council of America, 2018).

Arap tüccarlar, Avrupa'ya yaklaşık M.S. 800 yıllarında pamuklu kumaşları getirdiler. Columbus 1492 yılında Amerika'yı keşfettiğinde Bahama Adalarında pamuk yetiştiğini fark etmiştir. Daha sonra pamuk 1500 yılına kadar tüm dünya genelinde bilinir hale gelmiştir (Bell, 1999; Riello ve Parthasarathi, 2011).

2.1.2. Pamuğun genel özellikleri

Pamuk Malvaceae familyasından cinsi *Gossypium* olan türü *Gossypium hirsutum* ($2n = 52$), *Gossypium barbedense* ($2n = 52$), *Gossypium herbaceum* ($2n = 26$) ve *Gossypium arboreum* ($2n = 26$) olmak üzere 4 türden oluşmaktadır. *Gossypium hirsutum* ülkemiz topraklarının önemli endüstri bitkileri içerisinde bulunan bir lif ve yağ bitkisidir (Yılmaz, 1999; Kolsarıcı, 2009).

Gossypium barbadense ile sağlanan dünya lif üretimi yaklaşık %5 civarında olup tarımı Sudan, ABD, Mısır ve Peru gibi ülkelerde yapılmaktadır (Ogtr, 2008). *Gossypium barbadense* uzunluğu maksimum 3,5-4 cm, ince ve dayanıklı liflere sahiptir. Liflerinden kaliteli, ince ve pahalı poplin kumaşlar üretilir. Lif randıman verimleri, *Gossypium hirsutum* türü pamuklardan daha düşüktür (Gürel vd., 2000).

Gossypium herbaceum ve *Gossypium arboreum* Asya kökenli eski dünya pamukları ($2n = 26$), kapalı kozalı pamuklardır. Bu türlerin verimleri düşük lifleri kısa ve

kalındır. Bu nedenle ülkemizde Amerikan kökenli yeni dünya pamuklarından olan *Gossypium hirsutum* açık kozalı (upland) pamuklar kullanılmaktadır. Ülkemizde yapılan pamuk tarımının yaklaşık %99.5'i *Gossypium hirsutum* ile yapılmaktadır. Dünyada bu oranın %90'dan fazla olduğu bilinmektedir (Gürel vd., 2000; Genç vd., 2005).

Pamuk tohumu ekildiğinde iki zamanda düşük sıcaklıklara hassastır. Bunlardan ilki tohumun su almaya başlayarak metabolik aktivitenin başladığı zaman ikincisi ise büyümenin başlamasıyla meydana gelen üşüme zararı olarak bilinmektedir (Kerby vd., 1989; Haliloğlu, 2015).

Pamuk çimlendikten sonra tepe tomurcuğunun büyümesiyle uzamaya başlar. Yetiştirme süresince büyüme hızına sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler etki etmektedir. Pamuk çalı formunda çok yıllık bitki olmasına rağmen iklim şartlarından dolayı ticari olarak tek yıllık bitki olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır (İşler, 2013). Pamuk bitkilerinin sapı boğum ve boğum aralarından oluşmaktadır. Bu sap üzerinde bulunan boğumlardaki yaprak altı tomurcuklardan yan dallar meydana gelmektedir. Ana sap meyve ve odun dallarını ihtiva etmektedir. Odun dalları kalın, uzun ve bol yapraktan meydana gelmektedir. Odun dallarının aksine meyve dalları az yapraklıdır ve meyve dalının her bir boğumu üzerinde iki ayrı tomurcuk bulunur. Bunlar yaprak ve çiçek tomurcuklarıdır. Meyve dalı sayıları tür, çeşit, yetiştirme ve çevre şartlarına göre değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (İşler, 2013; Haliloğlu, 2015). Yapraklar şekil, renk ve tüylülük olarak tür ve çeşitlere göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. Meyve dalları üzerinde çiçek tomurcukları ilk anda yeşil renkli piramit görüntüsüne benzemektedirler. Bu piramit görüntüsüne tarak adı verilmiştir. Tarakların görünebilir hale gelmesi için ekimden sonra yaklaşık 30-40 gün geçmesi gerekmektedir. Taraklar üç yaprakçık ile tomurcuğu oluşturur. Bu yapraklara brakte adı verilmektedir. Brakte yaprakları gelişen tomurcuğu her türlü dış etkene karşı korumaktadır. Pamuk bitkisinin çiçeği üç brakte, braktelerin içinde beş adet çanak yaprak, içte beş adet taç yaprak, bir adet dişi organ ve erkek organlardan meydana gelmektedir (İşler, 2013). Pamuk bitkisinin çiçekleri açıldığında, taç yapraklar beyaz veya sarı renklidir. Daha sonra döllenme tamamlanınca taç yapraklar önce kızarır sonra dökülür. Kozu oluşur ve

olgunlaştığında çenetlerin birleşme yerlerinden çatlayarak açılır. Pamuk bitkisi tohumlarının çimlenmesi için ortalama toprak sıcaklığı en az 13-15 °C olması gerekmektedir. Ortalama sıcaklığı yıllık yaklaşık 16 °C, büyüme mevsimi sıcaklığı ise 20 °C ve üzeri sıcaklıklar pamuk yetiştiriciliği için uygundur (Oğlakçı, 2012; İşler, 2013; Haliloğlu, 2015).

2.2. Dünyada Pamuk Üretimi

Dünyada üzerinde yapılan pamuk tarımının lideri son yıllarda Çin'i geride bırakan Hindistan olmuştur. Fakat Çin uzun yıllar boyunca pamuk tarımına öncülük etmiştir. 2017/2018 üretim yılı tahminlerine göre dünyada en çok pamuk üreten beş ülke (Çizelge 2.1) sırasıyla; Hindistan, Çin, ABD, Pakistan ve Brezilya olurken tüketimde ise ilk beş ülke Çin, Hindistan, Pakistan, Türkiye ve Bangladeş almıştır.

Çizelge 2.1. Dünya lif pamuk üretimi (bin ton) (Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Mart 2018 - ICAC) (*) Tahmin

Sıra	Ülkeler	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018*
1	Hindistan	6.770	6.562	6.240	5.865	6.296
2	Çin	6.929	6.500	5.260	4.900	5.345
3	ABD	2.811	3.553	2.820	3.738	4.266
4	Pakistan	2.076	2.305	1.610	1.663	2.094
5	Brezilya	1.705	1.563	1.550	1.530	1.703
6	Avustralya	890	528	470	931	968
7	Türkiye	760	724	640	703	852
8	Özbekistan	940	885	860	789	804
	Diğer	3.402	3.581	1.624	2.975	3.041
	Toplam	26.283	26.201	21.074	23.094	25.369

Uluslararası Pamuk İstişare Komitesi (ICAC) raporuna göre; 2013/2014 yılları ile 2017/2018 üretim yılları arasında küresel çapta yaklaşık 32,1 milyon hektar pamuk tarımı yapılmış ve özellikle son dönemde pamuk ekim alanında yaşanan azalma 2017/2018 yıllarındaki üretim ile son bulmuştur. Pamuk tarımı yapılan yaklaşık 33 milyon hektar alanın %37'si Hindistan'da olup Hindistan'ı ABD, Çin ve Özbekistan izlemektedir. Türkiye ise pamuk ekim alanı açısından 9'uncu sırada bulunmaktadır.

Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi Uluslararası Pamuk İstişare Komitesi raporuna göre Türkiye dünyada 2017/2018 sezonunda lif pamuk veriminde üçüncü sırada yer almaktadır. Fakat aynı yıl TÜİK raporu verilerine göre ülkemiz dünya lif pamuk veriminde ikinci sırada yer almaktadır. Hindistan ve Özbekistan gibi büyük üretici ülkeler dünya verim ortalamasının altında lif pamuk üretimi yapmaktadır. Bu gibi büyük üretici ülkelerin verim düzeylerinde yaşanacak artış dünya pamuk üretiminde kayda değer bir değişime neden olacaktır.

Çizelge 2.2. Dünya lif pamuk verimleri (Kg/Ha) (Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Mart 2018 - ICAC) (*) Tahmin

Sıra	Ülkeler	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018*
1	Avustralya	2.136	2.228	2.196	1.670	1.936
2	İsrail	1.810	1.786	1.786	1.761	1.892
3	Türkiye	1.419	1.573	1.475	1.674	1.817
4	Çin	1.506	1.503	1.427	1.676	1.693
5	Meksika	1.625	1.668	1.449	1.575	1.587
6	Brezilya	1.520	1.507	1.506	1.629	1.399
7	G.Afrika	1.172	1.205	1.208	850	1.098
8	Yunanistan	1.120	997	997	1.009	1.028
9	Suriye	976	981	883	983	954
10	ABD	921	939	963	983	876
	Dünya Ortalaması	804	781	765	778	765

Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2’de dünya pamuk üretimi ve lif verimi rakamları verilmiştir. Dünyada en fazla pamuk tüketimi yapan ülkeler araştırıldığında Çin, Hindistan, Pakistan gibi devlerin başta geldiği anlaşılmaktadır. Yine ICAC 2018 verilerine göre ülkemiz pamuk tüketiminde dünya devlerinin ardından en çok pamuk kullanan 4’üncü ülke olmuştur.

2.3. Türkiye’de Pamuk Üretimi

Pamuk yetiştiriciliğinin Türkiye’de M.Ö 330 yılına kadar dayanan bir tarihçesi olmasına karşın pamuk üretimindeki gelişmeler 11. yüzyılda Selçuklu Türkleri döneminde gerçekleşmiştir (Gençer, 1999). Daha sonra Osmanlı imparatorluğu pamuk bitkisi yetiştiriciliğini 13 ve 14 yüzyıllarda Balkanlardan başlayarak genişletmiştir. Mısır’dan getirilen pamuk tohumlarının Ege ve Çukurova’da çiftçilere dağıtılmasıyla pamuk üretimine başlanmıştır. Ayrıca verilen desteklerle pamuk üretimi cazip hale getirilmiştir. Türkiye için pamuk yetiştiriciliğinde yaşan en

önemli gelişmeler cumhuriyet döneminde olmuştur. Bu dönemde pamuk üretim istasyonları, araştırma enstitüleri ile devlet üretme çiftlikleri çalışmalara başlamıştır. Pamuk tohumu üretimi ve ıslahına yönelik bilimsel çalışmalara başlanmıştır. Yapılan araştırma ve çalışmalara 1925'den günümüze pamuk yetiştiriciliğinde ve veriminde başarılı artışlar sağlandığı ortaya konan raporlar tarafından teyit edilmektedir (Gençer vd., 2005).

Pamuk tarımı ülkemizin de içinde yer aldığı pamuk kuşağı denilen kuzey yarım kürede 37° N, Güney yarım kürede 35° S enlem dereceleri arasında yapılmaktadır. Ülkemizde yapılan pamuk tarımının yaklaşık %99,5'u *Gossypium hirsutum* ile yapılmaktadır. Türkiye'de pamuk üretimi Akdeniz'de Antalya, Çukurova, Hatay, Güneydoğu bölgesinde Gaziantep, Kahramanmaraş, Diyarbakır, Urfa, Mardin olması ile birlikte Muğla, Denizli, İzmir gibi illerde pamuk yetiştiriciliği için uygun olarak belirlenmiştir. Pamuğun genel özellikleri kısmında belirtilen yetiştirme sıcaklık ortalamaları ülkemiz içinde optimum değerlerdir (Gürel vd., 2000).

Türkiye'de pamuk ekim alanlarının (Çizelge 2.3) boyutu 2008 den itibaren çok az bir değişim göstermektedir. Pamuk lif verim bakımından olumlu gelişmeler yaşansa da artan piyasanın artan talebini karşılayamamaktadır. TÜİK verilerine göre 2013 yılı ile 2018 (2018 yılı tahmini değer) yılları arasındaki sezonlarda ortalama üretimin tüketimi karşılaması %56.06'da kalmıştır. 2013/2014 sezonunda bu değer %62 olarak tespit edilmişken azalan üretim ve artan talep nedeniyle bu oran azalmaktadır.

Çizelge 2.3. TÜİK verilerine göre pamuk ekim alanları ve üretimi (TÜİK, 2017)

Yıllar	Ekim alanı (dekar)	Üretim (ton)	Verim kg/dekar
2005	5 468 800	2 240 000	410
2006	5 907 000	2 550 000	432
2007	5 302 528	2 275 000	429
2008	4 950 000	1 820 000	368
2009	4 200 000	1 725 000	411
2010	4 806 500	2 150 000	447
2011	5 420 000	2 580 000	476
2012	4 884 963	2 320 000	475
2013	4 508 900	2 250 000	499
2014	4 681 429	2 350 000	502
2015	4 340 134	2 050 000	472
2016	4 160 098	2 100 000	505
2017	5 018 534	2 450 000	488

Uluslararası Pamuk İstişare Komitesi raporuna (Çizelge 2.2) göre dünya lif pamuk verimi sıralamasında ülkemiz 3'üncü sırada yer almaktadır. Aynı zamanda Çizelge 2.3'de TÜİK verilerine göre ekim alanı, üretimi ve yıllara göre verim oranları sayısal olarak verilmiştir. Türkiye'de pamuk üretiminin kısıtlayan bazı etmenler şunlardır. Üretimin maliyetli olması, standardizasyonu sorunları, iletişim sorunları, hasat sonrası yabancı madde sorunları gibi sorunlar pamuk üretimini kısıtlamaktadır.

2.4. Karanfilin Tarihçesi ve Genel Özellikleri

2.4.1. Karanfilin tarihçesi

Karanfil çiçeğinin tarihi, yaklaşık M.Ö 370 yıllarında yaşayan ve 500'e yakın bitkinin morfolojik özelliklerini de araştıran Theophrastus'un karanfil çiçeğini cins adı olan *Dianthus* bitkisinden Dios Anthos (tanrıların çiçeği) olarak bahsetmesinden esinlendiği bildirilmektedir. Karanfil (*Dianthus*), kesme çiçekçiliğinde kullanılma amacıyla 17 yüzyılda Fransa'da geliştirildiği daha sonra 18 yüzyılın sonlarına kadar A.B.D ıslah çalışmalarına tabi tutulduğu bildirilmektedir (Besemer, 1980; Whealy, 1992). Yirminci yüzyılda geliştirilen ve ismini ıslahçısından alan William Sim karanfil çeşidi bütün dünyaya yayılarak yetiştiriciliği yapılmaya başlanmıştır (Kazaz, 2006).

2.4.2. Karanfilin genel özellikleri

Karanfil (*Dianthus caryophyllus L.*) yayılış olarak dünyanın birçok ülkesinde üretimi yapılan *Caryophyllaceae* familyasından değişik renkli, güzel görünümlü çiçeklere sahip vejetatif olarak yetiştirilen bir süs bitkisidir. Karanfil'in dikiminden çiçek açımına kadar geçen süre yaklaşık 70-120 gün arasında değişmektedir (Holley ve Baker, 1991; Korkut, 1998; Aydınşakir, 2009).

Karanfiller diploid ($2n = 30$) bitkiler olmasına rağmen tetraploid ($4n = 60$) özellik de gösterirler (Galbally ve Galbally, 1997). Ticari olarak yetiştirilen çeşitlerin diploid olduğunu ve diploid olarak yetiştirilen karanfillerin çiçeklerinin tetraploid den küçük olmasına karşın daha verimli olarak yetiştirildiği belirtilmektedir. Değişken renkte 5 petale (açık pembe-mor gibi) sahiptir. Karanfil kimöz çiçeklenme tipine sahip olup standart veya sprej olarak yetiştirilebilmektedir (Whealy, 1992). Kimöz çiçek tipinde ana eksenin ucunda çiçek açar ve büyüme ana ekseninde sona ermektedir. Daha sonra yan eksenler uzayarak ana eksenlerin yerini almaktadır (Özçağiran, 2001; Jurgens vd., 2003a; Kazaz, 2006).

Karanfil çiçeği farklılaşmadan önce uzun günlerde yaklaşık 10 yaprak çifti, kısa günlerde ise ortalama 18 yaprak çifti oluşturmaktadır. Karanfilde uç alma işlemi yapılırken sapın dip kısmından alınan boğumun yüksek vejetatif özellik taşıdığı, sapın uç kısmına doğru gidildikçe vejetatif özelliğin azaldığı belirtilmektedir (Besemer, 1980; Whealy, 1992; Jurgens vd., 2003b).

Karanfil yetiştiriciliği kumlu-tınlı veya tınlı-kumlu topraklarda yapılmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda topraksız karanfil yetiştiriciliğinin de yapıldığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda ideal yetiştiricilik için toprağın pH'sının yaklaşık 7.0 olduğu belirtilmektedir. Sıcaklık isteği gündüz 16-21 °C, gece sıcaklığı 10-14 °C arasında olması gerekmektedir. Sıcaklığın bu değerler arasında olması büyümeye, yaprak kalitesine ve çiçek ömrüne etki eden önemli bir etmendir. Ani sıcaklık değişimleri karanfil yetiştiriciliğinde kaliks çatlamalarına neden olabileceğinden sıcaklık kontrol altında tutulmalıdır (Holley ve Baker, 1991; Reid, 2000; Özzambak, 2003).

2.5. Türkiye’de Karanfil Üretimi

Türkiye’de süs bitkisi yetiştiriciliğine 1940-1950 yılları arasında başlanmıştır. Antalya ve çevresinde 1985 yılından sonra yoğun olarak süs bitkisi yetiştiriciliğinin yapıldığı bildirilmiştir. Antalya ve çevresinde yapılan bu üretim ihracata yönelik olurken, Ege ve Marmara bölgelerindeki üretimin ise iç piyasaya pazarlamak amacıyla olduğu belirtilmektedir (Taşcıoğlu ve Sayın, 2005; Doldur, 2008).

Ülkemiz kesme çiçekçiliğinin en fazla yetiştirilen ve ihracatı yapılan çiçeğinin karanfil olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda Türkiye’de en fazla ekim alanına sahip olan kesme çiçek karanfildir (Tapkı, 2018). Ülkemizde 2011 yılından itibaren ve takip eden yıllarda yaklaşık 600 milyon adet karanfil üretimi yapıldığı Çizelge 2.4’de verilmektedir. Karanfil üretiminin 2016 yılında 593.2 milyon adet olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2.4. Türkiye’de karanfil üretimi adet (milyon) (TÜİK, 2018)

Karanfil üretimi adet (milyon)					
2011	2012	2013	2014	2015	2016
588.4	622.5	594.4	600.3	591	593.2

Türkiye, kesme çiçek ihracatında karanfil çiçeği %76.3 pay ile önemli bir yere sahiptir (Temel ve Öztürk, 2016). TÜİK verilerine (Çizelge 2.5) göre karanfil ekim alanlarına bakıldığında 2017 yılında 4.8 milyon m² alanda karanfil yetiştirilmektedir. Kesme çiçekçilikle ilgili verileri Türkiye İstatistik Kurumu 2012 yılından itibaren paylaşmaya başlamıştır (Temel ve Öztürk, 2016).

Çizelge 2.5. Türkiye’de yıllara göre karanfil ekim alanları(m²) (TÜİK, 2018)

2011	5 039 571
2012	5 042 487
2013	4 890 177
2014	4 949 750
2015	4 809 655
2016	4 823 955
2017	4 874 354

Türkiye süs bitkileri ve ihracatçılar birliği raporuna göre 2017 yılı döneminde gerçekleşen süs bitkileri ihracatının 2016 yılına göre %4 daha fazla olduğu belirtilmektedir (Süs Bitkileri Sektör Raporu, 2018). Süs bitkileri içerisinde kesme çiçek üretim payının %68 üzerinde olduğu bildirilmektedir. Ülkemizin toplam süs bitkileri ihracatının 81,5 milyon ABD doları olduğu ve dünyada 26 sırada yer aldığı bildirilmektedir (Tapkı, 2018). Ülkemizde süs bitkilerinin ticari öneminin tam olarak anlaşılmamış olması, yetiştiricilerin yeterli bilgi sahibi olmaması gibi nedenlerden dolayı süs bitkileri üretimi diğer gelişmiş ülkelere göre daha geride kaldığı bildirilmektedir (Aydınşakir, 2009).

2.6. Bor Stresi ve Borun Bitkiler Üzerindeki Etkileri

Bor periyodik cetvelde B simgesi ile gösterilen III-A grubuna ait, atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81 olan, bitki beslemesi için gerekli elementler arasında bulunmaktadır (Boşgelmez vd., 2001). Bor element olarak amorf veya kristal yapıda, suda çözünmeyen bir halde toz şeklinde bulunurken, normal sıcaklıklarda oldukça kararlardır.

Araştırmacılar stresin tanımını farklı yapmış olsalar da stres, büyüme ve gelişmeye olumsuz yönde etki eden, yaşam için optimum koşulların değişmesiyle meydana gelen durum olarak açıklanmaktadır. Bitkilerde stres büyüme ve gelişmenin, anabolik ve katabolik reaksiyonların yavaşlamasına veya durmasına neden olan her türlü madde ya da durumlar olarak da tanımlanmaktadır (Babaoğlu vd., 2002).

Mikrobesin elementleri (Zn, Fe, Mn, Cu, B, Mo, Cl) arasında bor stresinin belirtileri yaygın olarak görülen problemlerin başında gelmektedir (Gezgin vd., 2002). Bor bitkiler için düşük konsantrasyonlarda gerekli, yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etkiye sahiptir. Bu nedenle, özellikle toprak ve sulardaki bor miktarları ile reaksiyonlarının bilinmesi gerekmektedir (Uygan ve Çetin, 2004).

Topraklardaki bor fazlalığı dünyanın birçok yerinde özellikle kurak ve yarı kurak bölge topraklarında bitki yetiştiriciliğini sınırlayan önemli bir mineral beslenme problemidir. Noksanlığının olduğu alanlarla karşılaştırılırsa borca zengin topraklar daha az olmasına rağmen dünyanın değişik bölgelerinde bitkisel verimi bor noksanlığına göre daha çok düşürdüğü görülmektedir. Bu nedenle bor toksisitesi verim düşüşlerinin başta gelen nedenleri arasında gösterilmektedir (Cartwright vd., 1986).

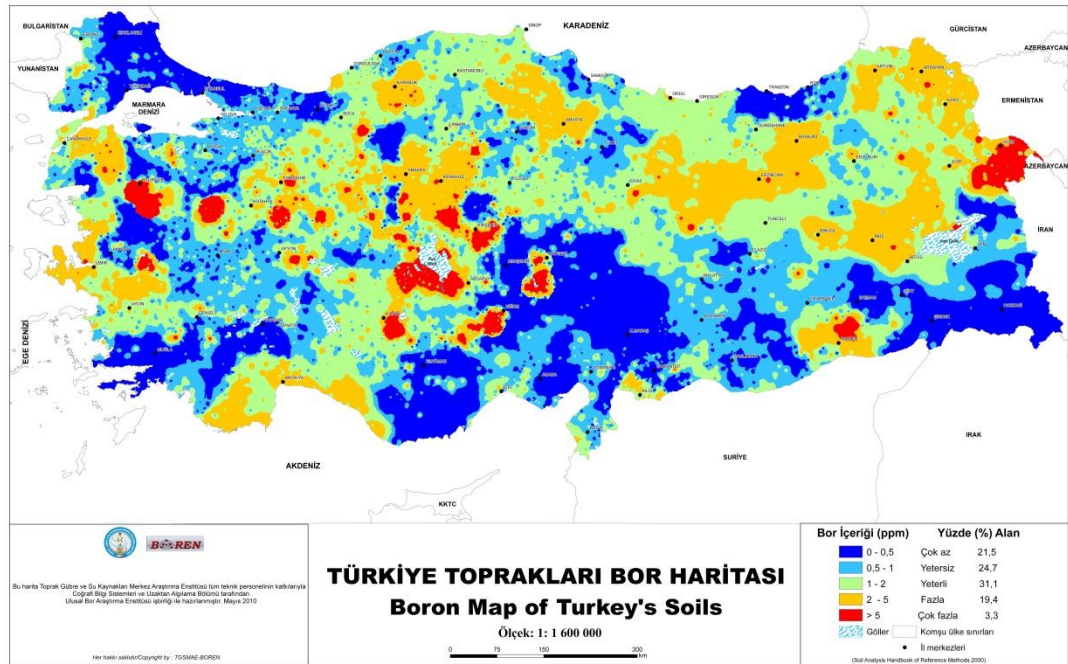
Mikrobesin elementlerinin incelendiği yapılan bir araştırma sonucunda Konya, Afyon, Karaman, Aksaray, Niğde, Nevşehir ve Kayseri illerini de içine alan Orta Güney Anadolu bölgesi topraklarından alınan 898 adet toprak örneğinin %90'ında demir, %62'sinde çinko, %27'sinde bor, %5'inde mangan, %2'sinde bakır noksanlığı ve %18'inde bor fazlalığı tespit etmişlerdir (Gezgin vd., 2002) .

Bor toksisitesi veya bor noksanlığı borun miktarına bağlı olarak bitkiler arasında değişmektedir. Genel olarak bor toksisitesi ve bor noksanlığı arasındaki fark çok dar bir alanda gözlemlenmektedir. Örneğin topraktaki bor konsantrasyonu 0.5 mg/kg dan az ise bor noksanlığı, 5.0 mg/kg dan fazla ise bor toksisitesi olarak belirtilmektedir (Ryan ve Rashid, 2006). Toksikite ve noksanlık arasındaki fark içsel bor konsantrasyonu düşünüldüğünde daha da hassas bir hal almaktadır.

Türkiye'de dahil olmak üzere bor rezervine sahip olan Amerika, Çin, Güney Afrika gibi ülkelerde madenler, endüstriyel aktiviteler, tarım alanlarında sulama, gübreleme gibi insan kaynaklı faktörler bor fazlalığına neden olmaktadır (Türe ve Bell, 2004). Her ne olursa olsun özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bor fazlalığı yerel bir problem olmayıp küresel bir problemdir (Onthong vd., 2011; Cervilla vd., 2012). Bazı bitkilerde bor stresine karşı, dayanıklı çeşidin duyarlı olan çeşide göre yeşil

aksamında daha az bor bulundurma yeteneği ile adaptasyon gösterdiği belirtilmektedir (Nable vd, 1997). Bor toksisitesinin bitkilerin kök ve yeşil aksam büyümesini engelleyen ve tane verimini ciddi şekilde sınırlayan bir mikro element problemi olduğu ifade edilmektedir (Alkan, 1998).

Şekil 2.1’de Türkiye toprakları bor haritasında görüldüğü üzere ülkemizin büyük bir kısmında bor fazlalığı ve aşırı fazlalığı vardır. Ulusal bor araştırma enstitüsü tarafından geliştirilen bu haritada sarı ve kırmızı bölgeler sırasıyla bor fazlalığı ve aşırı fazlalığını temsil etmektedir. Bitkilerin bor toleransı ve toksisitesi arasında çok az bir alan olduğundan bor toksisitesi ülkemiz topraklarının başlıca problemlerinden bir tanesidir. Nitekim Antalya, Gaziantep’in kısmi bölgeleri, Mardin, Denizli, İzmir gibi ülkemizin pamuk yetiştirilmeye müsait bazı bölgelerinde bor fazlalığı görülmektedir.



Şekil 2.1. Türkiye toprakları bor haritası (Boren, 2010)

Bor bitkiler içerisinde transpirasyon akımı yardımıyla taşınmaktadır. Kısaca açıklamak gerekirse su ve çözünen maddelerin kökler tarafından topraktan alınıp ksilem yardımıyla yapraklara taşınmasıdır. Bor bu yöntemle bitki bünyesine alınıp yaşlı yaprakların uçlarında veya köşelerinde birikmektedir. Bu nedenle toksisitenin

semptomları (sararma ve nekroz yamaları) ilk olarak yaşlı yapraklar üzerinde görülmektedir. Yapraklarda klorotik bölgeler, hasarın artmasıyla birlikte nekrotik bölgelere dönüşerek yaprak köşeleri ve kenarlarından yaprak orta damarına doğru ilerlediği belirtilmektedir (Ahmed vd., 2008; Rosolem ve Bogiani, 2011). Pamuk bitkisinde bu nekrotik bölgeler yapraklardaki bor fazlalığını göstermektedir. Bor fazlalığına bağlı olarak meydana gelen bu semptomlar 2700-6400 mg/kg bor konsantrasyonunda meydana gelmektedir (Cassman, 1993). Bor konsantrasyonu genelde yaprak yaşıyla beraber artmaktadır. Hatta bazı durumlarda yaşlı yapraklarda toksik seviyeye ulaşırken yeni gelişen yapraklarda noksanlığı görülebileceği belirtilmektedir (Brown ve Shelp, 1997). Bor konsantrasyonu sitozolde aşırı derecede arttığında NAD^+ ve RNA'nın yapısına zarar vererek metabolik fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bildirilmektedir (Loomis ve Durst, 1992; Rosolem ve Bogiani, 2011). Bor toksisitesi vasküler bitkileri farklı şekillerde negatif etkilemektedir. Bunlardan bazıları fotosentez oranı, yaprak klorofil içeriği, kök hücre bölünmesi, lignin ve süberin seviyelerinin negatif etkilenmesi olarak ifade edilmektedir (Reid, 2007).

Bor kimyasıyla ilgili bilinmesi gereken bazı önemli bilgiler mevcuttur. Bor cis-yapısında iki hidroksil grubuna bağlanma yeteneğine sahiptir. Bor ATP, NADH ve NADPH gibi moleküllerin riboz parçalarına bağlanarak metabolik bozulmalara yol açmaktadır. Ayrıca hücre duvarının yapısının değişmesine de neden olmaktadır. Araştırmacılar borun hem serbest şekerdeki riboza hemde RNA içerisindeki riboza bağlanarak hücre bölünmesinin bozulmasına neden olduğunu bildirilmektedir (Reid vd., 2004; Rosolem ve Bogiani, 2011). Hücre çeperinde rhamnogalakturonan-II (RG-II) ile kompleks oluşturma yeteneğine sahip olduğu ifade edilmektedir (Kobayashi vd., 1996). Borun RG-II ile etkileşimi sonucunda RG-I'nin yapısında Ca'un bağlanabileceği bir takım değişikliklerin meydana geldiği bildirilmektedir. Böylece yüksek bor konsantrasyonuna sahip ortamlarda gelişen bitkilerin yapraklarındaki eğilme ve bükülmelere karşı ortaya çıkan elastikiyet açıklanabilmektedir (Hakkı vd., 2005)

Bor toksisitesine bağlı olarak fotosentez hızının azaldığı, reaktif oksijen türevlerinin ve membran lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmektedir (Wang vd., 2011). Kurak koşullarda pamuk bitkisinin kritik bor toksisite seviyesini belirlemek amacıyla

yapılan çalışmada artan bor dozlarına bağlı olarak bitki kuru madde veriminin düştüğünü, en yüksek kuru madde veriminin 2 mg bor kg⁻¹ dozunda elde edildiğini, buna karşın 5 mg bor kg⁻¹ dozunda maksimum kuru madde veriminin %90'nın elde edildiğini ve ilk toksisite belirtilerinin bu dozda görüldüğünü bildirilmiştir. Ayrıca yüksek bor dozlarında yaprak dokularında N, Ca, Mg, Mn, Zn ve Fe içeriklerinde azalma olduğu ancak P, K ve Cu içeriklerinde istatistiksel açıdan artış olduğu belirtilmiştir (Ahmed vd., 2008). Genel anlamda bor toksisitesinde, yaşlı yaprakların yaprak uçları sararır ve nekrozlar oluşur. Daha sonra belirtiler yaprak kenarlarına ve orta damara doğru yayılarak yapraklar yanık bir görünüm alır ve erkenden dökülür. Pamuk bitkisindeki belirtiler ise yaşlı yapraklarda görülmektedir. Yaprak ucundan itibaren kloroz ve nekrozlar oluşur, sonraki aşamada ise belirtiler yaprak geneline yayılarak döküme neden olmaktadır (Kaptan, 2013).

Bitkilerin bora olan toleransları genetik kapasiteye bağlı olarak değişmektedir. Bora karşı hassas olan tahıllar yapraklarda bor konsantrasyonunu düşürerek bor stresinden kaçınmaktadırlar. Bitkilerde bor toleransında borun taşınımının sağlanması gerekmektedir. *BOR1* geni düşük bor konsantrasyonlarında köklerden sürgünlere bor taşımaktadır (Takano vd., 2002). Ancak bor konsantrasyonu toksik seviyelere geldiğinde *BOR1* endositoz yokluğuyla parçalanmaktadır (Takano vd., 2005). Model bitki *A. thaliana* *BOR4-GFP* geni bor toksisitesi altında bitkilerin büyümesini sağlamaktadır (Miwa vd., 2007). Ayrıca arpa ve buğday bitkilerinde bor toksisitesine tolerans geni olan *BOR2* genini yüksek lisans çalışmamızda bazı aquaporin genleri ile birlikte incelediğimizde bor taşınımındaki rolleri açıkça görülmektedir (Akçay ve Erkan, 2016).

2.6.1. Fitoremediasyon

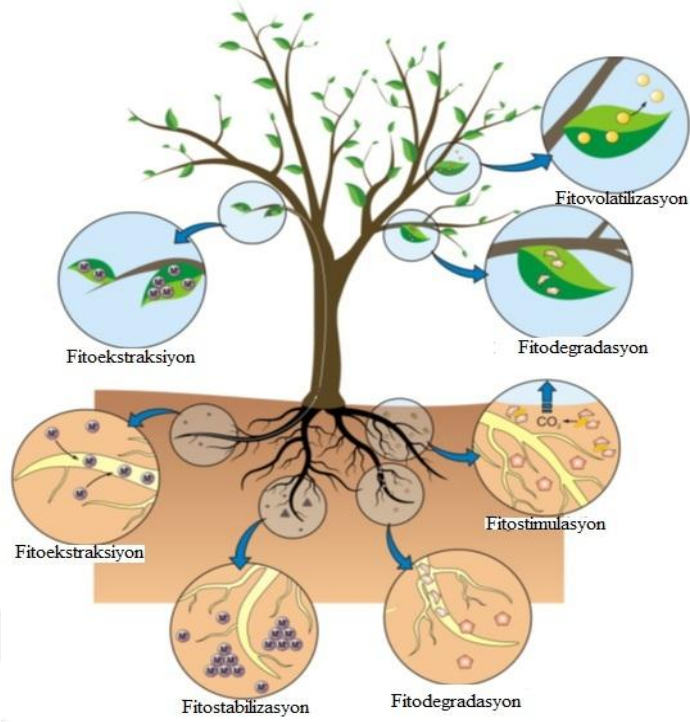
Ağır metallerin toprakta aşırı derecede birikmesi toprağı verimsiz hale getirmektedir. Ayrıca ağır metaller besin maddeleri yoluyla insan ve hayvan sağlığı üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahiptir. Bu nedenle toprak gereksiniminden fazla olan ağır metalleri depolama özelliğine sahip hiperakümülatör adı verilen bitkiler vasıtasıyla toprağın temizlenmesi (Fitoremediasyon) sağlanabilmektedir (Asri ve Sönmez, 2006). Fitoremediasyon, kirleticilerin toprak ve sudan bitki bünyesine alınarak zararsız hale getirilmesi olarak tanımlanır (Raskın vd., 1997). Bitkilerin ağır metal

toksisitesine karşı toleransları bitki türüne, element çeşidine ve stres süresine bağlı olarak değişirken, stresten etkilenen doku ve organın genel yapısına bağlı olarakta değişmektedir (Özay ve Mammadov, 2013). Bu nedenle farklı ortamlar ve kirleticiler için kullanılan çeşitli fitoremediasyon teknikleri Çizelge 2.6’da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Farklı kirleticiler için kullanılan fitoremediasyon teknikleri (Hamutoğlu vd., 2012)

Mekanizma	Süreç hedefi	Ortam	Kirleticiler	Bitkiler
Fitoekstraksiyon	Kirletici alma ve uzaklaştırma	Toprak, sediment ve çamur	Metaller, metalloidler ve radyonükleidler	Hindistan hardalı, ay çiçeği, hibrit kavaklar
Rizofiltrasyon	Kirletici alma uzaklaştırma	Yüzey ve yer altı suyu	Metaller, radyonükleidler	Ay çiçeği, hindistan hardalı, su sümbülü
Fitostabilizasyon	Kirletici etkisizleştirme	Toprak, sediment ve çamur	As, Cd, Cr, Cu, Hs, Pb, Zn	Hindistan hardalı, hibrit kavaklar, çimler
Rizodegradasyon	Kirletici giderme	Toprak, yer altı suyu	Organik bileşikler	Kırmızı dut, çimler
Fitodegradasyon	Kirletici giderme	Toprak, sediment ve çamur, yer altı suyu, yüzey suyu	Organik bileşikler, Klorinat çözücüler, Herbisitler, Fenoller	Alg, Hibrit kavaklar, siyah söğüt, servi
Fitovolatilizasyon	Kirleticiyi buharlaştırma	Toprak, sediment çamur ve yer altı suyu	Klorinat çözücüler, Bazı inorganikler (Se, Hg, As)	Kavaklar, yonca, hindistan hardalı

Çizelge 2.6’da verilen farklı fitoremediasyon tekniklerinin şematik gösterimi Şekil 2.2’de sunulmaktadır. Potansiyel tehlike ağır metallerin herhangi bir müdahale olmaksızın toprakta parçalanmadan yüzyıllarca kalabilmesinden kaynaklanmaktadır. Kirlenmiş alanların çoğunun eski haline geri döndürülmesi ve besin zincirine toksik elementlerin girişinin minimize edilmesi zorunlu hale gelmektedir (Hooda, 2007). Organik kirleticilerin aksine özellikle elemental kirleticilerin toprak, su ve havadan temizlenmesi daha zordur (Kramer ve Chardonnens, 2001).



Şekil 2.2. Fitoremediasyon stratejisinin şematik gösterimi (Favas vd., 2014)

Bitkiler gibi ototrofik organizmalar güneş ışığını ve karbondioksiti karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahiptir. Ancak bitkiler topraktan su ve diğer besin maddelerini alabilmek için kök sistemine bağlı olduklarından dolayı yan etki olarak doğal veya yapay çeşitli toksik bileşikler için farklı detoksifikasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Eapen vd., 2007; Van Aken, 2008).

Fitoremediasyon, ilk olarak yabancı türlerde ve özel alanlarda gözlemlenmiştir. Ardından genetiği değiştirilmiş genotiplerin gelişmesiyle mahsul veren bitkilerden de yararlanmıştır. Çalışmanın ardındaki mantık farklı iklim koşullarında kolayca büyütülüp yetiştirilebilen, kirleticilerin miktarını kayda değer bir şekilde azaltan yüksek biokütleyle sahip bitkiler geliştirmektir. Bu nedenle araştırmacılar derin kök sistemine sahip, hızlı büyüeyebilen ve kirleticilere karşı dayanıklı olan fitoremediasyon özelliğine sahip bitkiler seçmektedirler (Marmioli ve McCutcheon, 2003). Bazı ülkelerde transgenik bitkilerin yetiştiriciliği ekosistem için hala risk olarak algılanmaktadır (Peuke ve Rennenberg 2005). Transgenik bitkilerle çevresel arındırma gelecekte daha olumlu bir bakış açısına sahip olacaktır. Marmioli ve McCutcheon (2003), ana dezavantaj genetik mühendisliği ile üretilen bitkilerde

fitoremediasyonun uygulanabilirliği, bakım ve izlemenin kurulabilmesi için artan maliyet, atıkların imhası için gösterilen maliyetlerdir. Birkaç yıl sonra tahminen başlangıç olarak yapılan girişimlerin genetik mühendisliği ile yetiştirilen bitkilerle ne kadar ilerlediği görülecektir.

Bitkilerin çeşitli ve farklı metal tolerans mekanizmaları olmasına rağmen, transgenik bitkilerde metal birikiminin ve toleransının arttığına dair birçok rapor vardır. Transgenik bitkilerin hepsinde olmasa da çoğunda aşırı derecede ifade olan genlere bağlı olarak metal bağlayıcı proteinlerin ve peptitlerin biyosentezleri de dahil olmak üzere genler toksik iyonları daha az toksik veya kolay uzaklaştırabilen formlara veya kombinasyonlara dönüştürebilirler (De Mello-Farias vd., 2011).

Fitoremediasyon teknolojisi, çok sayıda çeşit gösteren kirletilmiş metal toprak ve su gibi ajanları temizlemeye yönelik geliştirilmiştir. Bundan dolayı uygulama öncesi geniş bir araştırma ile spesifik metal hiperakümülatör türler gerektirir. Diğer faktörler fitoremediasyon başarısı için, kirleticiye biyo-uygun biçimde bağlanmıştır. Eğer metallere organik toprağa çok güçlü bir şekilde bağlanmışsa bitkiler için almak mümkün olmamaktadır. Ayrıca bitkiler bazı kirleticilere karşı oldukça özgündürler. Örneğin bazı *Gypsophila* ve *Puccinellia* bitkileri bor hiperakümülatörleri olup diğer kirleticiler için hassas olabilir (Babaoğlu vd., 2004).

Transgenik bitki yaklaşımının fitoremediasyon için umut vadecici olduğu görülmüş ancak şimdiye kadar sadece bir kaç saha çalışması yapılmıştır (Zhao, vd., 2009). Ayrıca ağır metallere birikimi ve bu metallere olan tolerans, fitoekstraksiyon potansiyeli olan bitki ve bir çok gen tarafından kontrol edilir. Genetik düzenlemeler hızlı büyüyen bitkilerde genlerin özelliklerini geliştirip genlerde ekspresyon seviyelerini değiştirir. Metal birikimine dahil olan genlerin fonksiyon ve düzenleme, maddenin bitkiye alınımı kökten gövdeye translokasyonu ve detoksifikasyon mekanizmasının tamamen anlaşılması gerekmektedir. Bu sorunun çözülmesi transgenik yaklaşımla çok uzak değildir (Rascio vd., 2011).

Lisansüstü çalışmamda bor toksisitesi altında *boron transporter* ve bazı *aquaporin* genlerinin yüksek ekspresyon seviyelerine ulaştığı ve bor taşınımında önemli görevleri olduğu belirlenmiştir (Akçay ve Erkan, 2016). Ayrıca bu genlerin plazma

membranı üzerinde yüksüz formda taşındığı tespit edilmiştir (Marschner ve Marschner, 2012). Ek olarak *BOR2* plazma zarında efflux tipte bir bor taşıyıcısı olup yan köklerde ve köklerin epidermis uzama bölgelerinde güçlü bir şekilde ifade edilmektedir (Miwa vd., 2013). Aynı zamanda *Bot1* (bor 1 ortholog) geni bor toksisitesi toleransından sorumlu gen olarak tanımlanmıştır (Hayes ve Sutton, 2010). Yapılan diğer bir araştırmada borun muhtemel olarak mRNA'da riboz ile etkileştiği ve transkripsiyon ve translasyonu etkileyerek stabilitesini değiştirdiği belirtilmektedir (Pommerrenig vd., 2015).

Bor fitoremediasyonu sağlamak amacıyla yapılan bir çalışmada *P. distans* bitkisinin kullanıldığı belirtilmiştir. Çalışmayı gerçekleştiren araştırmacılar *Puccinellia distans*'ın çoğu bitkinin yaşayamadığı yüksek bor düzeylerinde yetişebilmesine rağmen bu bitki hakkında çok şey bilinmediğini belirtmektedir. Bu bitkinin bor tolerans mekanizmasını aydınlatmak için çok az çalışma yapılmıştır. RNA sekanslama yöntemiyle bu bitkinin bor toleransı ve hiperakümüasyonu alakalı genlerin analiz edildiği ifade edilmektedir. Yapılan sekans analizi sonucunda *P. distans*'ın hiperakümüasyon mekanizması birçok transkriptomik değişikliğine neden olmuştur. Buna örnek olarak malat yolağının değişimi ve hücre duvarı yapısının değişmesiyle fazla bor, toksik etki yapmadan buradan ayrılmaktadır. Aynı zamanda bazı bor taşıyıcı ve aquaporin genlerinin ekspresyonlarının arttığı da bildirilmektedir (Öztürk vd., 2017).

Günümüzde moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinin gelişmesiyle birlikte çeşitli genlerin potansiyel etkilerinin araştırılarak görevlerinin belirlenmesi ve yeşil çevrenin korunması önem arz etmektedir. Halihazırda farklı kirleticilere karşı farklı fitoremediasyon kabiliyeti olan bazı bitki ve genlerin etkili kullanımıyla birlikte doğayla dost bir teknoloji geliştirilmesi yakın gelecekte mümkün olacaktır. Örneğin dünya genelinde insanoğlunun borat minerallerini cam, tekstil, ilaç, orman ve kozmetik alanlarında kullanması nedeniyle çevre kirlenmesinde önemli sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Özellikle ülkemizde bazı sulama suyu kaynaklarının, bor bakımından çok zengin olan jeotermal su kaynaklarıyla karışması sonucu bor toksisitesine neden olarak verimli topraklarımızı kirletmektedir. Bu nedenle yeşil ıslah olarak anılan fitoremediasyon ve gen mühendisliği yardımıyla borca kirli

topraklarda bora dayanıklı hiperakümülatör bitkiler yetiştirerek topraklarımızı diğer hassas türlerin yetiştirilmesi için uygun hale getirmek artık hayal değildir.

2.7. Doku Kültürü Çalışmaları

Bitki doku kültürü bitki çoğaltımında ve gelişiminde kullanılan en önemli modern tekniklerden bir tanesidir. Bitki doku kültürü teknikleri kültüre alınan hücre, doku ve organların aseptik şartlar altında ışık, sıcaklık, nem gibi faktörlerin kontrol altında tutulmasıyla yapılmaktadır. Bitki doku kültürünün temel bir bilim olarak gelişimi bitki hormonlarının keşfi ve karakterize edilmesiyle yakından ilişkilidir. Ayrıca bitki hücrelerini ve dokularını kültürde yetiştirmenin yanı sıra gelişimlerini kontrol etme yeteneğinin, tarımda, bahçecilikte ve endüstriyel kimyada birçok pratik uygulamanın temelini oluşturduğu bildirilmektedir (Evans vd., 2003; Dagla, 2012).

Bitki doku ve organlarının izolasyonunu kontrollü laboratuvar koşulları altında yapma fikri 19 yüzyılda ortaya çıkmıştır. Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt 1898 yılında izole edilmiş ve tamamen farklılaşmış hücrelerin kültürünü yapan ilk kişidir. İlk olarak yapraklardan izole edilmiş tek bir hücreyi sükroz içeren Knop's (1865) salt ortamı üzerinde büyötmüştür. Bu çabasıyla Haberlandt izole edilen yaprak hücresini hayatta tutmayı başarmış fakat bu basit büyüme ortamında nispeten başarılı olsa da gerekli bitki hormonlarının ortamda olmaması nedeniyle hücre bölünmesi başarılı bir şekilde gerçekleşmemiştir. Haberlandt'ın asıl istediği şey eksplantların besin ortamlarında gelişmeye devam edip çoğalmasını sağlamak istiyordu. Yani potansiyel olarak kalıcı doku kültürünü oluşturmak amacıydı ancak bu hedefe oksinlerin keşfinden sonra ulaşılmıştır (Dodds ve Roberts 1987; Bhojwani ve Razdan, 2004).

Başarılı bir bitki hücre kültürü büyük ölçüde besin ortamının kalitesine bağlıdır. Kimyasal olarak tanımlanmış bileşikler içeren ortam sentetik ortamdır. En erken bitki doku kültürü ortamlarından bir tanesi White (1939) tarafından geliştirilen kök kültür ortamıdır. Formülü Murashige ve Skoog (1962) tarafından hazırlanan MS ortamı ve daha sonra Linsmaier ve Skoog (1965), Gamborg ve arkadaşları (1968), Schenk ve Hildbrandt (1972) tarafından revize edilen ortamın standart besin ortamı olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir. MS ortamı organik maddelerin doku kültürü üzerindeki etkisini test etmek amacıyla geliştirilmiştir (Dagla, 2012; Baday, 2018).

In vitro koşullarda hücresele totipotensi, kallus farklılaşması ve vejetatif çoğalmanın oluşturulması, bitki bilimleri alanında yeni bir dünya ortaya çıkarmıştır. Örneğın arzu edilen özelliğe sahip bir bitkinin hızlı bitkisel çoğaltılması veya mikro çoğaltımı aksiller sürgün uyarımı yoluyla mümkündür. Eğer istenirse elde edilen sürgünler tam bitkicikleri oluşturmak için *in vitro* köklendirme yapılabilir. Somatik embriyogenez ve organogenez diğeri mikro çoğaltım yöntemleridir. Bitki tohumlardan elde edilen fideler, nadir ve nesli tükenmekte olan bitki türlerinin büyük ölçekli çoğalması için bir kaynak olarak da kullanılabilir.

Herhangi bir eksplant tipinden bitki rejenerasyonu çeşitli fazları içerir. İlk aşamada, dokular ya organojenik ya da embriyojenik uyarılara cevap vermek için yetkin hale gelir. İndüksiyon aşamasında, hücreler bir sürgün, kök veya bir embriyo oluşturmaya karar verir. Son aşamada, hücrelerin bir organ veya embriyoya büyümesi tamamlanır. Rejenerasyonun ilk aşaması, sisteme dolaylı organogenez olarak adlandırılan bir kallus büyümesi periyodunu içerebilir. Ancak genellikle hücreler kallus oluşturmadan direkt olarak organ veya embriyo oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bu olay direkt rejenerasyon olarak adlandırılmaktadır.

Bitkilerde genetik transformasyon çalışmalarına başlamadan önce genetik transformasyonu arzu edilen bitkinin doku kültürü ile rejenerasyon prosedürünü mutlaka çok iyi bilmek gerekmektedir. Araştırılan bitkinin hangi bitki hormonunda ne tepki vereceği hangi sükröz oranında daha iyi gelişim göstereceği çok iyi araştırılarak mutlaka denenmelidir. Özellikle sürgün ve kök gelişimi hakkında bitkilerin vereceği farklı tepkiler araştırılmalıdır.

Genetik transformasyonda dolaylı ve doğrudan rejenerasyon sistemlerinden faydalanılmaktadır. Doğrudan rejenerasyon sistemlerinde filiz tomurcuklarının oluşması ve sürgünlere farklılaşması nispeten kısa zamanda tamamen farklılaşmış bitkilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Bu nedenle genetik transformasyon çalışmalarında bu sistemlerin kullanılması tercih edilmesine rağmen bazı dezavantajlara sahiptir. Örneklendirmek gerekirse genetik transformasyon sırasında yüksek frekanslı kimerik bitkilerin, yani doğrudan rejenerasyon sistemiyle kısmen transforme olmuş rejenerantların gelişimi mümkün olabilmektedir.

2.7.1. Pamukta doku kültürü çalışmaları

Pamukta somatik embriyogenez ilk olarak Price ve Smith (1979), tarafından *Gossypium koltzchianum* bitkisinde gözlemlenmiş ama herhangi bir bitki rejenerasyonu rapor edilmemiştir.

Davidonis ve Hamilton (1983), pamuk kallus rejenerasyonunun coker 310 çeşidinde gerçekleştirildiğini ifade etmektedir. Somatik embriyo gelişimi Linsmaier ve Skoog tarafından geliştirilen besin ortamında kültüre alınan iki yaşındaki kalluslardan spontane olarak gelişmiştir. Kallus uyarımı için 2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l kinetin (KIN) kullanılırken somatik embriyogenesis için MS ortamında, NH₄NO₃ içermeyen normalin iki katı KNO₃ konsantrasyonu ve 0.1 mg/l Gibereellik asit (GA₃) kullanıldığı belirtilmektedir.

Finer ve Smith (1984), pamuk yaprak dokularından kallus geliştirmek için denemeler yapmışlar fakat başarısızlığa uğramışlardır. Hipokotil ve kök eksplantlarından kallus elde etmeyi başarmışlardır. Kallus gelişimi için 2 mg/l Indol-3-asetik asit (IAA) + 1 mg/l KIN kullanılırken somatik embriyogenesis için 0.1 mg/l 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4 D) + 10 mM glutamine kullanılmıştır. *G. klotzschianum* ile kallustan somatik embriyo gelişimi çalışmaları embriyoların düşük verimi ve sürekli anormal gelişimleri nedeniyle engellendiği bildirilmektedir.

Shoemaker vd. (1986), yaptıkları araştırmada kallus geliştirmek için hipokotil eksplantlarını kullanılmışlardır. Araştırmada yavaş büyüyen gri ve şeffaf kalluslar embriyogenik olarak gözlemlenirken soluk sarı kalluslar embriyogenik olmamıştır. Kallus uyarımı için 2 mg / l IAA + 1 mg/l KIN ortamının kullanıldığı belirtilmektedir. Somatik embriyogenesis için 2 mg/l Naftalen asetik asit (NAA) + 1 mg/l KIN hormon kombinasyonunun kullanıldığını bildirmişlerdir.

Troolinder ve Goodin (1987), pamuk bitkisinden kallus başlangıcı için hipokotil eksplantlarının kullanıldığı daha sonra elde edilen küçük kallusların süspansiyon kültüründe büyütüldüğünü ifade etmektedirler. Daha sonra kalluslar yarı katı besin ortamına taşınmış somatik embriyo gelişimi tamamlanmıştır. Araştırmacılar kallus

uyarımı için 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l KIN kullanırken somatik embriyo gelişimi için 0.1 mg/l GA₃ + 0.1 mg/l IAA hormonlarını kullanmışlardır.

Bir başka çalışmada Finer (1988), pamukta yüksek düzeyde embriyogenik süspansiyon kültürü elde etmeyi başarmıştır. Kallus kültürlerini, aseptik şartlarda yetiştirdiği tohumlardan çimlendirdiği bitkilerdeki kotiledon dokularını kullanarak elde etmiştir. Kallus uyarımını 2 mg/l NAA + 1 mg/l KIN hormonlarıyla yapmıştır. Süspansiyon kültürleri başlatmak için kallus dokuları 0.5 mg/l picloram yada 5 mg/l 2,4- D içeren sıvı ortama alınmıştır. Embriyogenik doku gelişimi için oksin ihtiva etmeyen 15 mM glutamin içeren sıvı ortama aktarılmıştır. Çok sayıda somatik embriyo üretimi başarılmıştır. Aynı zamanda araştırmacı tohumdan yetiştirilen bitkilere göre rejenera olan bitkilerin daha küçük olduğunu gözlemlediğini belirtmektedir.

Trolinder ve Xhixian (1989), Coker 312 çeşidinde yapılan araştırmada yüksek ortalama, düşük verimli embriyogenik ve embriyogenik olmayan 4 farklı sonuc alındığı bildirilmiştir. On üç farklı büyüme düzenleyici, ortalama ve düşük verimli olan ortamların kalitesini yükselterek yüksek verimli embriyogenik dokular elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Kallus uyarımı için 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l KIN, somatik embriyogenesis için 0.1 mg/l GA₃ ve 0.1 mg/l IAA gibi büyüme düzenleyicilerin kullanıldığı bildirilmiştir.

Jingyin ve Jianming (1990), pamukta *in vitro* sürgün rejenerasyonu araştırması sonucu sürgün rejenerasyonun da genotipin önemli olduğunu belirtmişlerdir. Sürgün rejenerasyonu için 0.1 mg/l ZEA, 0.02 mg/l 6-Benzilaminopurin (BAP), 1.9 g/l KNO₃ ve %3 sükröz içeren MS besin ortamında rejenerasyon başarısının %87.5 olduğunu belirlemişlerdir.

Firoozabady ve DeBoer (1993), farklı pamuk çeşitlerinden embriyogenik kallus elde etmek için hipokotil ve kotiledon eksplantlarının 5 mg/l 6-purine (2ip), 0.1 mg/l NAA büyüme düzenleyicileri ile kültüre alınmıştır. Elde edilen kalluslar embriyogenik kallus gelişimi için 5 mg/l NAA, 1 mg/l 2İP ortamına aktarıldığı belirtilmektedir.

Zhang (1994), 7 çeşit pamukta yapılan doku kültürü çalışmasında ilk alt

kültürden sonra embriyogenik kallus elde etmeyi başardıklarını ifade etmiş, daha sonra bu embriyoların çimlenme sürelerinin bazılarının 1 ay bazılarının 2 ay olduğunu gözlemlediklerini belirtmiştir. Ayrıca kullanılan aktif karbonun bitki sayısının artmasında olumlu etkisinin olduğunu belirtilmektedir. Başarılı bir şekilde köklendirilen bitkilerin farklı sezonlarda toprağa aktarıldıktan sonra yaşamının %100 olduğu ifade edilmektedir.

Agrawal vd. (1997), pamukta sürgün uyarımı için Anjali-LRK 516 çeşidinde yaptıkları çalışmada, kotiledon boğumları kullanılarak gerçekleştirildiği belirtilmektedir. Otuz beş günlük bitkilerden eksplantlar alındığı ve eksplant başına en fazla sürgünün 4.7 olduğu belirtilirken MS besin ortamına ilave olarak 2.5 mg/l BAP ve 2.5 mg/l KIN kullandığı bildirilmektedir. Sürgünlerin uzaması için sıvı ya da katı ortam kullanılmış fakat herhangi bir büyüme düzenleyici ilave edilmemiştir. *In vitro* da yetişen sürgünlerin ½ MS içeren katı besin ortamında 0.05 ve 0.1 mg/l NAA hormonlarının ilavesi ile köklendirildiği ifade edilmektedir.

Kumar vd. (1998), Coker 310 çeşidinde somatik embriyogenesis yoluyla yüksek frekanslı *in vitro* rejenerasyon yapmayı başardıklarını ve hatta Coker 310 FR olarak isimlendirdiklerini belirtmişlerdir. Coker310 FR rejenerasyon yeteneği zayıf olan Hindistan'da yetiştirilen MCU 5, MCU 7, Khandwa 2, Bikaneri Nerma, F 846 olarak adlandırılan çeşitlerle melezlenmiş ve *G. barbadense* L. x *G. hirsutum* L. Coker 310 FR dışındaki bütün F1'lerin somatik embriyogenesis yardımıyla rejenere olduğu bildirilmiştir.

Zapata vd. (1999), yapılan diğer bir çalışmada 3 farklı çeşitten aseptik şartlarda çimlendirilen 3-4 günlük bitkilerden alınan sürgün uçlarını çeşitli kombinasyonlarda 0.1 mg/l NAA + 1 mg/l BA içeren yarım ve tam güç MS besin ortamlarına koymuşlardır. Sürgün uçlarından elde edilen sürgünlerin %58'i başarılı bir şekilde büyüyüp 6 hafta içinde köklendikleri belirtilmektedir. Elde edilen bitkilerin hepsinin fenotipik olarak normal ve tohum potansiyeline sahip olduğu vurgulanmaktadır.

Zhang vd. (2000), somatik embriyogenesisin hızlı, etkili ve sürekli rejenerasyon elde etmek için uygun bir sistem olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla kullanılan iki çeşitten hipokotil ve kotiledon eksplantlarını kullanarak somatik

embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyon prosedürü geliştirmişlerdir. Direk somatik embriyogenesis için 0.1 mg/l zeatin (ZEA) ve 2 mg/l aktif karbon içeren MS ortamı kullanılırken, kallus başlangıcı ve embriyogenik kallus çoğaltımı için 0.1 mg/l ZEA + 0.1 mg /l 2,4-D + 2 g/l aktif karbon içeren ortamın kullanıldığı belirtilmektedir.

Sakhanokho vd. (2001), bir diğerk çalışmada farklı pamuk çeşitlerini somatik embriyogenesis ile çoğaltmak için protokol geliştirdiklerini belirtmektedir. Kallus uyarımı için 1.0 mg /l KIN + 2.0 mg/l NAA ortamı, kallus çoğaltımı için 0.1 mg /l KIN + 0.5 mg/l NAA ortamı kullanılırken somatik embriyogenesis için iki kat fazla KNO₃ içeren hormonsuz MS besin ortamının kullanıldığı bildirilmektedir. Elde edilen somatik embriyoları olgunlaştırmak için 0.5 mg/l NAA + 0.05 mg/l KIN ortamı kullanılmıştır.

Tripathy vd. (2002), Hindistan pamuk çeşitlerinden elde edilen kalluslardan etkili bir bitki rejenerasyonunun yapıldığını bildirmektedir. Epikotil, hipokotil, kotiledon, yaprak ve kök gibi eksplantlar kallus oluşumu için kullanılsa da kotiledonların bu amaçla kullanımının daha etkili olduğu ifade edilmektedir. Araştırmacılar farklı ortamlar ve farklı büyümeyi düzenleyiciler denemişler ve MS ortamına ilave olarak 2 mg/l benzil adenin (BA) ve 2 mg/l IAA eklenmesiyle elde edilen ortamın en iyi rejenerasyon ortamı olduğunu belirtmişlerdir.

Mishra vd. (2003), yaptıkları çalışmada kallus uyarımı ve gelişimi için 10.7 µM NAA + 0.2 µM 2,4-D kullanırken, somatik embriyo gelişimi için iki kat yoğun KNO₃ içeren ve NH₄NO₃ içermeyen hormonsuz MS besin ortamını kullandıklarını belirtmişlerdir. Somatik embriyo çimlenmesi için 5.7 µM IAA kullandıklarını da ifade etmişlerdir.

Wu vd. (2004), yetiştirmesi zor olan 10 adet çin pamuk çeşidinde yeni ve etkili bir somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyon prosedürü geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Kallus ve embriyogenik kallus üretimi ve uyarımı için optimum hormon konsantrasyonunun 2.46 µM IBA + 2.32 µM KIN olduğunu belirlemişlerdir. Somatik embriyogenesis uyarımı için iki kat yoğun KNO₃ içeren ve NH₄NO₃ içermeyen hormonsuz MS besin ortamını kullanırlarken, somatik embriyo gelişimi

için L-asparagine (Asn)/L-glutamine (Gln) (7.6/13.6 mM) kullandıklarını belirtmişlerdir.

Leelavathi vd. (2004), özellikle transformasyon aşamasında eksplant olarak kullanılan kırılğan kalluslar, yaprak, hipokotil ve kotiledon bölgelerinden MS ortamında %3 lük maltozda, 0.5 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l 2,4-D elde edilmesiyle prosedürün toplam tamamlanma süresinin kısaltılabildiğini belirtmektedir. Somatik embriyogenesisin böyle kallusların 4 hafta hormonsuz MS ortamında %3 maltozla alt kültüre alınmasıyla gözlemlendiği belirtilmiştir.

Ikram (2005), pamuk bitkisinde somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunun bu bitkinin doku kültürü ve biyoteknolojisinin temeli olduğunu vurgulamaktadır. Kallus uyarımı için 2.0 mg/l NAA, 0.1 mg/l ZEA ve 0.1 mg/l KIN büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamının uygun olduğunu ifade etmektedir. Kalluslar 6 haftalık olduklarında 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Somatik embriyogenesis için kalluslardan herhangi birini seçmeye ihtiyaç olmadığı belirtilmektedir. Çünkü bütün kalluslardan somatik embriyo elde edildiği ifade edilmektedir. NH₄NO₃'ün kallusların somatik embriyo farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı belirtilirken 2 haftadan uzun süre kültürde tutulması durumunda embriyolar için ölümcül olduğu da belirtilmektedir.

Khan vd. (2006), çeşitli pamuk çeşitlerinde somatik embriyogenesis ve organogenesis ile ilgili *in vitro* çalışmalar yapmışlardır. *Gossypium hirsutum* çeşitleri olan SH-131, LH-900, Hybrid H8, Khandwa-2, ve *Gossypium arboreum* çeşitleri BD-1, BD-6, Sarvottam, Jawahar Tapti bitkilerinin *in vitro* rejenerasyon kabiliyetleri incelenmiştir. Eksplant olarak kotiledonlar ve hipokotillerin kullanıldığı belirtilmektedir. *G. Arboreum* çeşitlerinde kuvvetli bir kallus oluşumunun gözlemlendiği ifade edilmiştir. 2-Isopentenyladenine (2iP) somatik embriyo oluşumunda etkilidir. Ayrıca sürgün gelişiminde BA'nın etkili olduğu belirtilmektedir.

Brassinosteroidlerin pamukta somatik embriyogenesis oluşturma potansiyeline Aydın vd. (2006), tarafından bakılmıştır. On günlük fidelerden alınan hipokotiller 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l KIN büyüme düzenleyicilerini içeren MS B5 ortamına kallus

uyarımı için alınmıştır. Bir ay sonra üretilen kallus parçaları toplanmış ve çeşitli konsantrasyonlarda BR (0.1,0.5, 1 μ M) içeren ortamlara alınmıştır. Kontrole kıyasla BR uygulamasının kallus kütlelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmektedir. Farklı BR konsantrasyonları farklı somatik embriyo olgunlaşmasına neden olmaktadır. Somatik embriyogenesis uyarımının özellikle 0.5 mg/l BR konsantrasyonunda gerçekleştiği bildirilmektedir. Bu çalışma sonucunda brassinosteroid (BR)'in kallus gelişimini olumsuz etkilediği fakat somatik embriyo gelişiminde uyarıcı rolü olduğu sonucuna varılmıştır.

Abdellate vd. (2007), *in vitro* adventif sürgün rejenerasyon sistemlerini *Agrobacterium* ve biolistik aracılığıyla gen transferi yaparak transgenik bitki elde etmede en uygun yöntem olarak vurgulamaktadır. Mevcut çalışmada adventif sürgün rejenerasyonunun direkt olarak pamuk kotiledon nodlarından yapılabileceği belirlenirken meristem kısımlarından kaçınılması gerektiğini belirtilmiştir. Sürgün gelişiminin MS B5 ortamına KIN veya BA, NAA ilavesiyle gerçekleşebileceği belirtilmektedir. Farklı büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonları sürgün gelişimini önemli derecede etkilemektedir. KIN hormonunun BA'dan daha etkili olduğunu ve en etkili KIN konsantrasyonunun 2 mg/l olduğu ifade edilmektedir. BA ve KIN sürgün gelişiminde kullanılırken ortama NAA ilavesinin sürgün gelişimine olumsuz etki ettiği belirtilmektedir.

Özyiğit ve Gözükırmızı (2008), pamukta etkili mikroçoğaltım sistemi geliştirmek amacıyla bir çalışma yapmışlar. İki farklı pamuk çeşidinden kotiledon nodlarını kullanarak sürgün ve kök uyarımını başardıklarını vurgulamışlardır. Rejenerasyon, Çukurova 1518 çeşidinde MS ortamına ilaveten 0.1 mg/l KIN, 2 mg/l NAA ve 1 g/l PVP içeren ortamda %75 olurken Nazilli 84S bitkisinin kotiledon boğumlarında 0.1 mg/l KIN ve 1 g/l polivinilpirolidon (PVP) içeren MS kültür ortamında %80 oranında rejenerasyon olmuştur. Çalışmayı yapan araştırmacılar bu sistemin hızlı olması nedeniyle gen transferi çalışmalarında kullanılabileceğini ifade etmektedirler.

Hussain vd. (2009), somatik embriyoların hipokotil eksplantlarından farklılaştığı ve çok farklı morfoloji gösterdiğini bildirmektedir. Altı farklı tipte somatik embriyonun kotiledonlardan gelişmelerinin gözlemlendiği belirtilmektedir. Büyüme hormonlarından 2,4-D ve KIN kullanılması ile %95 oranında normal embriyo elde

edildiği ifade edilmiştir. Boynuz şeklindeki embriyoların sürgün üretiminde başarısız olduğu belirtilmektedir. Somatik embriyo morfolojisine bakmaksızın, rejeneren olan bitkilerin fenotipik olarak tohumdan büyüyen bitkilere benzer olduğu vurgulanmaktadır.

Bir başka çalışmada Khan vd. (2010), pamuk bitkisinde yüksek düzeyde etkili somatik embriyogenesis tabanlı bir rejenerasyon sistemi geliştirdiklerini belirtmektedir. Embriyogenik kallusların hipokotil ve kotiledon yapraklardan MS besin ortamına KIN ve 2,4-D gibi büyüme düzenleyicilerin ilavesiyle meydana geldiği ifade edilmektedir. Kallus başlangıcı için 0.1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN kullanılmıştır. Somatik embriyo oluşumu için iki kat yoğun KNO₃ içeren ve NH₄NO₃ içermeyen hormonsuz MS besin ortamını kullandıklarını belirtmişlerdir. Buna ek olarak somatik embriyo olgunlaşması için 0.1 mg/l ZEA kullanıldığı bildirilmiştir.

Bazargani vd. (2011), yaptıkları çalışmada pamuktan çok sayıda sürgün ucu elde etmek için iki ticari çeşidin (Sahel ve Varamin) seçildiğini belirtmektedir. Eksplantlar 3 ve 4 günlük fidelerden alınmış sürgün uyarıcı ortamlara koyulmuştur. Bu ortamlar Kinetin (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l), BAP (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l), NAA (0.0, 0.1, 1.0 mg/l) ortamlarıdır. Yaklaşık iki ay sonra 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l BAP konsantrasyonundan maksimum sayıda (her eksplanttan 3-4 adet) sürgün elde edildiği bildirilmiştir.

Sagannavar vd. (2012), kallus uyarımı ve somatik embriyogenesis amacıyla pamuk bitkisinde farklı eksplantlar kullanarak yaptıkları çalışmada en çabuk kallus oluşumunun 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN kullanıldığında hipokotil eksplantlarında %99 oranında olduğunu bildirmiştir. Kalluslardan en fazla oranda somatik embriyogenesis elde etmek için MS ortamına ilave olarak 0.01 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l KIN gibi büyüme düzenleyicilerin kullanıldığı bildirilmiştir.

Bir diğer araştırmacı Ezhilarasi vd. (2013), sürgün ucu rejenerasyonu için farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyiciler denemiştir. MS ortamına ilaveten 0.05 mg/l TDZ, 1.0 mg/l NAA koyulduğunda rejenerasyon %98 olurken, 0.01 mg/l TDZ, 1.0 mg/l NAA koyulduğunda rejenerasyon %95 olmuştur. Elde edilen sürgünlerin

uzamasının GA₃, köklendirilmesinin 1 mg/l NAA yardımıyla sağlandığı belirtilmektedir.

Bakhsh vd. (2016), pamuk tohumunun *in vitro* çimlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada farklı büyüme ortamları ve farklı düzeyde sükröz içeren ortamlarda araştırma yaptıklarını bildirmektedirler. Sükröz miktarının azaltılmasıyla çimlenme yüzdesinin arttığını bildirmişler. Ayrıca agar ve phytigel gibi farklı ortam katılaştırıcı ajanların çimlenme oranında etkili olduğu, en yüksek çimlenme oranının agarlı ortamda yaklaşık %73 olurken, phtyigel içeren ortamda bu oranın %96 olduğu ifade edilmektedir.

2.7.2. Karanfilde doku kültürü çalışmaları

Ionov (1990), William Sim çeşidiyle yapılan çalışmada 100 mg/l myoinositol, thiamine-HCl ve 1 mg/l naftalen asetik asit (NAA) içeren modifiye Morel ortamında bitkilerin çoğaltılmasından en iyi sonuçları aldığını belirtmektedir. Ayrıca MS besin ortamında çoğaltım için 0.02 mg/l NAA ve farklı KIN (0.5, 1 ve 2 mg/l) konsantrasyonları kullanıldığı ifade edilmektedir. En verimli sürgün oluşumunun MS ortamına 2 mg/l kinetin (KIN) eklenmesiyle oluştuğu bildirilmektedir. Elde edilen sürgünlerin hepsi *in vitro* da başarı ile köklendirilmiş fakat dış ortama alınan bitkilerin düşük yaşama kabiliyetinde olduğu belirtilmiştir.

Frey ve Janick (1991), karanfilde sürgün rejenerasyonunun genotip, eksplant kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerin miktarına göre değiştiğini bildirmektedir. Bitkiler petal, kaliks, node ve internode eksplantlarından rejenere edilmeye çalışılmıştır. Fakat sadece petal, kaliks ve nodal bölgeler rejenere olmuştur. Maksimum çoğaltım, petal eksplantlarının, MS besin ortamına ilaveten 0.05 µM Thidiazuron (TDZ) ve 0.5 µM NAA içeren ortama transferiyle olmuştur.

Yantcheva vd. (1998), karanfil bitkisinden etkili bir direkt somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu elde etmek için farklı çeşitlerin yaprak eksplantlarının kullanıldığını belirtmektedir. MS sıvı besin ortamına ilaveten 1 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ve 0.2 mg/l 6-Benzilaminopurin (BAP) büyüme düzenleyicileri kullanılarak kallus fazı olmaksızın embriyogenesis uyarımı sağlandığı

belirtilmektedir. Somatik embriyo olgunlaşmasının sıvı MS ortamına kazein hidrolaz (1000 mg/l) ilavesiyle uyarıldığı belirtilmektedir. Bu yöntemlerle geliştirilen bitkilerin morfolojilerinin donör bitkiler ile aynı olduğu ifade edilmiştir.

Iantcheva vd. (2005), iki farklı sprej karanfil çeşidi (Fea ve Rossitza) için yaprak eksplantlarından bitki rejenerasyonu denemiştir. Adventif sürgünlerin direkt uyarımı için BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin katı MS besin ortamı içine eklendiği belirtilmektedir. Her iki çeşit için de en uygun rejenerasyon ortamı 0.9 mg/l BAP ve 0.9 mg/l NAA olarak belirtilmektedir. Eksplant rejenerantlarının sayısı kabaca 7-8 arasında değişmektedir. Her iki bitki içinde embriyogenik kallusların hem karanlık hem de aydınlıkta elde edilebileceği belirtilirken, somatik embriyoların 0.05 mg/l BAP ve 250 mg/ kazein hidrolaz kullanılarak elde edildiği ifade edilmektedir. Ayrıca her iki bitki de normal fenotip özelliği göstermekte ve bitkilerin *in vitro* şartlarda köklendirilebileceği vurgulanmaktadır.

Çetin vd. (2007), tarafından yapılan bir araştırmada, karanfil bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu için kullanılan besin ortamları arasında, içeriğini 0.02 mg/l NAA ile 2,00 mg/l Kinetin'in oluşturduğu ortamda alt kültüre alınan sürgün uçlarında özellikle ilk dikim ortamı olarak 2 mg/l Kinetin ve 0.02 mg/l NAA katkılı ortam ile 2 mg/l BAP ve 0.02 mg/l NAA ortamlarının kullanıldığı kültürlerde gelişmenin iyi olduğu belirtilmiştir. Benzer sonuçlar Ioannov (1990) tarafından da elde edilmiştir. Sürgünlerin kök oluşturma potansiyelleri bakımından göstermiş oldukları performanslar incelendiğinde ise, her iki köklendirme ortamında da sürgünlerin köklenme oranlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu ortamlar içerisinde en yüksek kök oluşum oranı %32.42 ile 2 mg/l IBA ve 0.01 mg/l BAP katkılı MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu ortamı, %25.95 kök oluşum oranı ile 0.05 mg/l IBA ve 0.01 mg/l BAP içeren MS besin ortamının izlediği ifade edilmektedir.

Bir diğer çalışmada Ali vd. (2008), karanfil bitkisinde sürgün oluşumu, sürgün çoğaltımı ve köklendirme üzerine araştırma yapmıştır. Sürgün oluşumu için apikal ve nodal meristem bölgeleri eksplant olarak kullanılmıştır. Sadece BAP içeren ve KIN'i farklı kombinasyonlarda içeren ortamlarda sürgün oluşumu izlenmiştir. En iyi sürgün oluşumunun MS ortamına ilaveten 4 mg/l BAP içeren ortamlarda olduğu belirtilmiştir. Eksplant olarak sürgün oluşumunun inkokülasyondan 6 gün sonra

apikal mersitemlerde ve 7 gün sonra ise nodal meristemlerde olduğu bildirilmektedir. Apikal meristemlerin sürgün oluşturmada nodal meristemlere göre daha belirgin etkisi olduğu ifade edilmiştir. Maksimum sürgün sayısına 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında ulaşılmıştır. BAP yerine KIN kullanılmasının sürgün oluşturmada başarısız olduğu vurgulanmıştır. Oluşturulan sürgünler 5 cm olduğunda köklemeleri için 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamına transfer edilmiş ve başarı ile köklenen bitkiler dış ortama alıştırılarak yaşamlarının devam ettirildiği belirtilmiştir.

Kanwar vd. (2009), karanfil bitkisinde büyüme düzenleyicilerin etkisi ve eksplantlarla olan ilişkisini, kalluslardan *in vitro* sürgün tomurcuklarının oluşum sürecinin araştırılması yoluyla bildirmişlerdir. Yapraklar ve internod eksplantları farklı miktarlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BA içeren ortamda gözlemlenmiştir. Araştırmacılar 27 farklı sürgün rejenerasyon ortamını denemiş ve sadece 2 mg/l TDZ, yalnız ZEA veya NAA ve IAA'lı kombinasyonlar da kallus oluşturmayı başardıklarını belirtmektedirler. En yüksek ortalama sürgün oluşumu 2 mg/l TDZ ve 1 mg/l IAA olarak gözlemlenmiştir.

Karanfil bitkisinde bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* sürgün çoğaltma ve köklendirmesi Kharrazi vd. (2011), tarafından araştırılmıştır. İzole edilen aksiler tomurcuklardan farklı seviyelerde BAP, KIN ve 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında sürgün çoğaltım oranının testi yapılmıştır. Rejenere olan sürgün ortamlarına farklı oranlarda NAA ve IBA eklenmesi köklenmeyi sağlamaktadır. En iyi köklenme 0.5 mg/l NAA içeren ortamda olmuştur. En yüksek sürgün oranının ise eksplant başına 6,17 olduğu bildirilmiştir.

Khatun vd. (2013), karanfil bitkisinde etkili bir *in vitro* çoğaltım prosedürünün oluşumunu sağladıklarını belirtmektedir. Yaptıkları çalışmada sürgün uçları ve nodal segmentleri eksplant olarak kullanmışlardır. Farklı eksplantlar arasında nodal segmentler uygun şartlarda kültüre alındığı zaman (MS+1 mg/l BAP) sürgün uçlarına göre daha yüksek sayıda sürgün verdikleri belirtilmektedir. Kültür belirlenen şartlarda başlatıldıktan sonra, takip eden alt kültürlerde %10 hindistan cevizi suyu kullanıldığında sürgün sayısının arttığı ifade edilmektedir. Ayrıca 100 mg/l üre ilavesiyle de oluşan sürgünlerin boyunun arttığı belirtilmiştir. Son olarak iyi gelişmiş

sürgünleri köklendirmek amacıyla sürgünler 1 mg/l NAA içeren 1/2 MS besin ortamına transfer edilmiştir. Bitkiler dış ortama başarılı bir şekilde alıştırıldığında yaşama oranının %80 olduğu ifade edilmektedir.

Matter vd. (2017), karanfil yapraklarından kallus uyarımı için protokol geliştirdiklerini ifade etmektedirler. Kallus üretimi için MS ortamına ilave olarak 2 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. Farklı miktarlarda metil jasmonat uygulamalarının kallus dokuları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak 20 µM metil jasmonat uygulamasının en yüksek büyüme oranını (98.21 mg/gün) sağladığı bildirilmektedir.

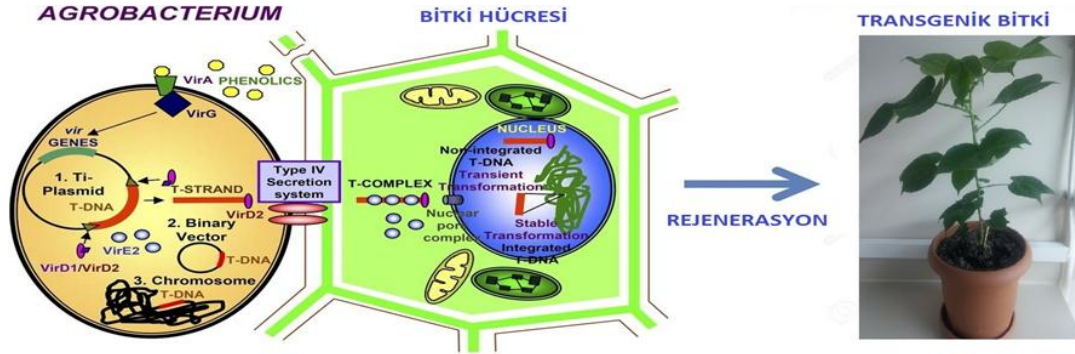
Bitkiler büyüme ve gelişmeleri için bazı gerekli elementlerinin yanı sıra büyümeyi düzenleyicilere de ihtiyaç duyarlar. Khatun vd. (2018), karanfilde büyük ölçekli mikroçoğaltım yapmak için çabalamışlar fakat klasik MS ortamıyla bunun mümkün olmadığını belirtmişlerdir. Daha sonra karanfilde etkili bir büyüme için hindistan cevizi suyunun *in vitro* da etkisine sitokin hormonuyla birlikte bakıldığı ifade edilmiştir. Sürgün uyarımının en yüksek olduğu ortam içerisinde 1 mg/l BA ile birlikte %10 hindistan cevizi suyu bulunmaktadır. Sürgün ucu ve nodal segmentler eksplant olarak kullanıldığında çoğalma oranının 4 kattan daha fazla olduğu belirtilmektedir. Köklendirme ortamı için en ideal ortamın ise ½ MS besin ortamına 1 mg/l NAA ilavesiyle oluşturulduğu ifade edilmektedir.

2.8. Transformasyon Çalışmaları

Genetik mühendisliği, bitki çeşitlerinin var olan ve arzulanan farklı özelliklerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle bitkilerde genetik transformasyon çalışmaları günümüzde genetik mühendisliğinin en gelişmiş alanlarından bir tanesidir. Genetik mühendisliği aracılığıyla transgenik bitki üretimi, amaçlanan özelliği başarılı bir şekilde kullanarak verim kayıplarının önüne geçmek ve tarım ilacı kullanımını azaltmak gibi amaçlarla kullanılabilir.

Bitki genetik transformasyonunda başarılı sistemlerden bir tanesi *Agrobacterium* aracılığıyla (Şekil 2.2) gerçekleştirilmektedir. Bunun için iki önemli adım gereklidir. Birinci adım, yabancı bir geni genetik transformasyon aracılığıyla bitki genomuna

dahil etmek için çalışmaktır. İkinci adımda ise tek bir hücreden tüm bitkiyi elde etmeye çalışmak amaçlanmaktadır (Zhang vd., 1996; Divya vd., 2008).



Şekil 2.3. *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyon (Altpeter vd., 2016'dan değiştirilerek alınmıştır.)

Her iki adımda başarıyı etkileyen çok etmen vardır. Örneğin birinci adımda başarılı bir transformasyon için kullanılan transformasyon tekniği, çeşitli bileşenlerin yoğunluğu, vakum infiltrasyonu şiddeti gibi başarıyı etkileyen çok sayıda faktör vardır. İkinci adım için de başarıyı etkileyen birçok faktör vardır. Örneğin herhangi bir somatik hücre genomdaki tüm bilgiyi içermesine ve teoride bir hücreden bütün bir bitkinin oluşumuna izin vermesine rağmen doku kültürü teknikleri her hücreden somatik embriyogenesis veya sürgün elde edilebilecek kadar yeterli bir sistem değildir. Bu nedenle bitki rejenerasyonu, pamuk, karanfil ve diğer birçok bitki türünde transformasyonu kısıtlayan faktördür. Son 20 yıldır bitki doku kültürü tekniklerinin de gelişmesiyle birlikte yeni rejenerasyon yöntemlerinin etkili bir şekilde transformasyon çalışmaları için kullanılması eskiye göre günümüzde daha etkin bir şekilde genetik mühendisliği çalışmalarının yapılmasına izin vermektedir.

2.8.1. Pamukta yapılan transformasyon çalışmaları

Pamuk bitkisinde ilk transformasyon 1987 yılında birbirinden bağımsız iki grup tarafından (Firoozabady vd., 1987; Umbeck vd., 1987) *nptII* geninin pamuk genomuna *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonu ile elde edilmiştir. İlk transgenik bitki teknikleriyle başarılı sonuçlar almak, bitki rejenerasyon sistemlerinin eksikliği nedeniyle pamuk bitkisinde de oldukça zor olmuştur.

Agrobacterium aracılığıyla yapılan bir çalışmada iki bakteri suşunun kullanıldığı belirtilmektedir. Bunlar EHA105 ve LBA4404 suşlarıdır. Doku kültüründe eksplant olarak sürgün uçlarının kullanıldığı ifade edilmektedir. LBA 4404 bakteri suşunda transformasyon başarısı %0.67 olurken EHA105 bakteri suşunda başarı oranının %1 olduğu belirtilmektedir. Araştırmacıların PCR ve Southern Blot ile transgenik özelliği doğruladıkları ifade edilmektedir (Jiang, 2004).

Bir *Arabidopsis* geni olan *GF14λ*'ün pamuk bitkisinde oynayabileceği fizyolojik rolleri keşfetmek için pamuk bitkisine aktırıldığı ve promotor olarak *CaMV35S* kullanıldığı belirtilmektedir. Sonuç olarak transgenik pamukların su stresi toleransının geliştiği ifade edilmektedir. Transgenik hatların kuraklık şartlarında da kontrol bitkilere göre daha az solduğu ve daha çok fotosentez kabiliyetine sahip olduğu belirtilmektedir. Bu çalışma gerçekleştirilirken araştırmacılar EHA101 bakteri suşu ve pCGN1578 plazmidi kullandıklarını belirtirken, eksplant olarak hipokotil eksplantlarını kullandıklarını belirtmektedirler. Seçim ortamında 50 mg/l kanamisin kullanıldığı ifade edilmektedir (Yan vd., 2004).

Bir diğer araştırmada *AtNHX1* geninin yüksek düzeyde ifadesinin sodyum/proton taşıyıcısını kodlayarak tuz stres toleransı sağladığı belirtilmektedir. *AtNHX1* geninin yüksek düzeyde ifadesi, vakuollere sodyum alınımını artırmaktadır. Dolayısıyla artan çözünen madde konsantrasyonu transgenik bitkilerde tuz toleransı sağlamaktadır. *AtNHX1* içeren transgenik pamukların tuzluluk ve kuraklığa karşı dayanıklılık gösterdiği gibi daha çok biyokütle ve fiber içerdiği de belirtilmektedir. Bu çalışmada araştırmacılar GV3101 bakteri suşunu, pBISN1 plazmid ve *Supermas* promotorunu kullandıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca hipokotilleri eksplant olarak tercih ettikleri vurgulanmaktadır (He vd., 2005).

Coker 312 çeşidi kullanılarak yapılan transformasyon çalışmasında hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanılmıştır. *A. tumefaciens* bakteri suşu olarak LBA4404 kullanılırken, *CaMV35S* promotorunun kontrolü altında bir pBI-d35SΩ-uidA-nos plazmidi'nin kullanıldığı belirtilmektedir. Seçim ortamında 40 µg/ml G418 antibiyotigi kullanılarak kaçışların engellendiği ifade edilmektedir (Rajasekaran vd., 2005).

Pamuk bitkisinde genetik transformasyon yardımıyla herbisite dayanıklılık geninin seleksiyon markırı olarak kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır. *A. tumefaciens* bakteri suşu olarak LBA4404 kullanılırken, plazmid olarak CaMV35S promotorunun kontrolünde pGRA1300 kullanıldığı belirtilmektedir. Transformasyonda hipokotil eksplantlarının kullanıldığı ifade edilmektedir. Seçilim ortamı olarak 0, 1, 5, 10, 20 and 30 mM glyphosate konsantrasyonları denenmiştir. Sonuç olarak 5 mM ve üzerinde konsantrasyonların kullanılabilceği belirlenmiştir (Zhao vd., 2006).

Agrobacterium aracılığıyla yapılan diğeri bir transformasyon çalışmasında AGL-1 suşu kullanılmıştır. Bu bakteri suşuna pER8-HPT-GhRI plazmidi entegre edilmiş olup *NOS* promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Bu plazmid'in *HPT* bitki seleksiyon markırını içerdiği ifade edilmektedir. Coker 312 pamuk çeşidiyle yapılan bu transformasyon çalışmasında hipokotil ve kotiledon eksplantlarının kullanıldığı belirtilmektedir. Seçilim, higromisin aracılığıyla yapılmıştır. Ayrıca hipokotil eksplantlarının kotiledonlara kıyasla higromisin seçiminde daha güçlü olduğu belirtilmektedir (Meng vd., 2007).

NC71 pamuk çeşidinde yapılan bir transformasyon çalışmasında, pKIWI105 plazmidini içeren LBA 4404 *A. tumefaciens* bakteri suşunun kullanıldığı ifade edilmektedir. Bu vektör *NPTII* ve *GUS* genlerini taşıyarak CaMV35S promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Fidelerin apikal meristemleri *Agrobacterium* ile muamele edilerek transformasyonun gerçekleştiği bildirilmektedir (Keshamma vd., 2008).

Bir diğeri transformasyon çalışmasında Coker 312 pamuk çeşidi kullanılmıştır. Transformasyonda *A.tumefaciens* bakteri suşu olarak LBA4404 kullanıldığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada CaMV35S promotoru tarafından kontrol edilen pCB4 plazmidinin kullanıldığı belirtilmektedir. Bu plazmid herbisit dayanıklılık geni olan *Bar* genini taşımaktadır. Ayrıca bu transformasyon çalışmasında eksplant olarak sürgün uçlarının kullanıldığı belirtilmektedir. Seçilim amacıyla kullanılan 0.3 mg/l Basta konsantrasyonunun transgenik olmayan bitkileri elemine ettiği ifade edilmektedir. PCR ve Southern Blot analizleri yapılarak gen transferinin doğrulandığı bildirilmiştir (Daud vd., 2009).

Pamuk bitkisine *AnnBj1* geninin transformasyonu ile abiyotik stres toleransının ve fiber kalitesinin arttığı belirtilmektedir. Annexinler kalsiyum bağımlı multigene ailesine aittir. Aynı zamanda fosfolipid ve sitoskelet bağlayan proteinlerdir. Örneklendirmek gerekirse tuz ve kuraklık streslerine karşı bitkilerin toleransının arttığı ifade edilmektedir. Bununla birlikte yaş ağırlık, bağıl su içeriği ve kuru ağırlığın stres şartlarında arttığı belirtilmektedir. Ayrıca kontrol bitkilere göre *AnnBj1* transgenik pamuk bitkisinin antioksidatif sistem bileşenleri üzerinde daha olumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir. Transformasyonun hipokotil eksplantları kullanılarak gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Transformasyonda GV2260 *Agrobacterium* suşu kullanılırken, CaMV35S promotor ve pCAMBIA2300-*AnnBj1* plazmidi kullanılmıştır (Divya vd., 2010).

Bir diğer çalışmada *Arabidobisis* bitkisinde *AVPI* geninin vakuolar pirofosfatazları kodladığı belirtilmektedir. Bu pirofosfatazlar vakuolar membranda proton pompası olarak görev yapmaktadır. *AVPI* geninin yüksek düzeyde ifadesi *Arabidobisis*, domates, pirinç gibi bitkilerde kuraklık ve tuz stresine karşı bitki performansını artırmaktadır. Ayrıca *AVPI* geninin yüksek düzeyde ifadesi kök sistemindeki oksin taşınımını uyardığı için ileri düzeyde kök sisteminin gelişmesini sağladığı belirtilmektedir. Bu gen pamuk bitkisinde yüksek derecede ifade edildiğinde yüksek derece tuzluluk ve kuraklık şartlarında test edilmiştir. *AVPI* genini ifade eden pamuk bitkileri kontrol bitkilere göre tuzluluk ve kuraklık şartlarında daha güçlü bir büyüme göstermiştir. Ayrıca bu transgenik pamuk bitkilerinin fiber kalitesinin kontrol bitkilere göre fiber kalitesinin en az %20 daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada doku kültüründe hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanılmıştır. Seçilim ortamında 50 mg/l kanamisin kullanıldığı ifade edilmektedir. Transformasyonda GV3101 *Agrobacterium* suşu ve ps35-*AVPI* plazmid kullanılırken, promotor olarak CaMV35S kullanılmıştır (Pasapula vd., 2011).

Pamuk bitkisinde Z35 çeşidinde yapılan transformasyon çalışmasında *A. tumefaciens* suşu olarak EHA105 kullanılmıştır. Bu çalışmada *LOS5* genini ihtiva eden pCambia1300 plazmidi kullanılarak transformasyon çalışmalarının gerçekleştirildiği ifade edilmektedir. Sürgün uçları *Agrobacterium* ile 15-20 dk muamele edilmiştir. Ko-kültivasyon ortamı olarak, acetosyringon ve kinetin içeren MS ortamı kullanılmıştır. Ayrıca bu ortamın katılaştırıcı özelliğinin Phytigel ile sağlandığı

belirtilmektedir. Seçilim ortamında higromisine karşı (30 mg/l) dayanıklı sürgünlerin belirlenerek recovery ortamında yetişmesinin sağlandığı belirtilmektedir (Yue vd., 2012).

Coker 312 pamuk çeşidinde yapılan bir diğer transformasyon çalışmasında hipokotil eksplantlarının kullanıldığı belirtilmiştir. Araştırmacılar transformasyon çalışmasında Bayley ve arkadaşlarının daha önce geliştirdiği metodu kullanmaktadır. Transformasyon çalışmalarında PSARK::IPT plazmidi kullanılırken, promotor olarak CaMV35S kullanıldığı belirtilmektedir. Seçilim ortamı olarak 50 mg/l kanamisin kullanılmıştır (Kuppu vd., 2013).

YZ1 pamuk çeşidinde yapılan bir çalışmada *nptII* gibi seçici markır ihtiva eden pCambia 2300S plazmidine *SNACI* geninin yerleştirildiği belirtilmektedir. Bu vektör daha sonra LBA4404 *A. tumefaciens* suşuna aktararak kullanılmıştır. Transformasyon aşamasında hipokotil eksplantlarının kullanıldığı bildirilmektedir. Seçilim için kanamisin kullanılmıştır. Aynı zamanda bitkilerin transformasyon nedeniyle strese girdikleri için somatik embryogenesis yeteneğinin azaldığı belirtilmektedir (Liu vd., 2014).

Yapılan diğer bir transformasyon çalışmasında pROKII plazmidinin içerisine CaMV35S promotorunun kontrolünde *TaMnSOD* geni yerleştirilmiştir. Bu rekombinant vektör *nptII* içermektedir. *A. Tumefaciens* suşu olarak EHA105 kullanılmıştır. Pamuk bitkisi olarak Fy112 çeşidinin kullanıldığı belirtilmektedir. Transformasyonu başlatmak için hipokotil eksplantları kullanılmıştır (Zhang vd., 2014).

Herbisite toleranslı pamuk geliştirmek için yapılan bir çalışmada pamuk bitkisi olarak Coker 312 çeşidinin kullanıldığı ifade edilmektedir. Transformasyon için *A.tumefaciens* kullanılan bu çalışmada Bayer Crop Science tarafından geliştirilen pGSC1700, pUC19 dan türetilmiş olan ve pTSIH09 vektörü kullanılmıştır. Transformasyon çalışmalarında hipokotil ekplantlarından yararlanılmıştır. Ayrıca *2mEPSPS* ve *HPPD W336* proteinlerinin ifade edilmesiyle glufosat ve isoxaflutole herbisit toleransı sağladığı bildirilmiştir (Weeks, 2017).

Pamukta sürgün ucu eksplantları kullanılarak yapılan transformasyon çalışmasının hızlı ve tutarlı olduğu belirtilmektedir. *CP4-EPSPS*, CaMV35S promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Ekspresyon vektörünün (pBI-35SCP4) LBA4404 *A.tumefaciens* bakteri suşuna yerleştirildiği ifade edilmektedir. Glufosatın öldürücü konsantrasyonu transformasyon çalışmasından önce belirlenmiştir. İlk herbisit uygulamasıyla bitkilerin %95'nin öldüğü belirtilmektedir. Geriye kalanların seçilimi 20 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Olası transgenik bitkiler %0.4 glufosat uygulamasına kadar dayanmıştır. Elde edilen olası transgenik bitkiler Southern blot analizi yapılarak doğrulanmıştır (Guo vd., 2018).

2.8.2. Karanfilde yapılan transformasyon çalışmaları

Başarılı bir genetik transformasyonu birçok faktör etkilemektedir. Bitki kondisyonu, kullanılan *Agrobacterium* suşu, inokulasyon metodu ve ko-kültivasyon ortamı, başarı oranını etkileyen başlıca faktörlerdir.

Karanfil bitkisinde ICMP 8302 ve AGL0 gibi iki farklı *A.tumefaciens* bakteri suşu kullanılarak transformasyon çalışmalarının yapıldığı bildirilmiştir. ICMP 8302 suşu pKIWI110 binary vektörünü içerirken, AGL0 suşu PKIWI105 veya pCGP407 içerdiği belirtilmektedir. pKIWI105 plazmidini NOS promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Araştırmacılar bitki eksplantları olarak yaprakları kullanmıştır. Transformasyon çalışmasında 5 dakika vakum infiltrasyonu yapılmıştır. Daha sonra ko-kültivasyon ortamında 3 gün boyunca bekletildiği belirtilmiştir. Seçilim ortamı için farklı kanamisin (0, 25, 50, 75, 100 mg/l) konsantrasyonları denenerek ilk etapta 100 mg/l kanamisin, transformasyona tabi tutulan bitki eksplantlarıyla bir araya getirilerek seçilim yapılmıştır. Sonuç olarak ekibin başarılı bir şekilde transformasyon yaparak transgenik bitki elde ettiği belirtilmektedir. Ayrıca Southern blot analiziyle elde edilen bitkilerin doğrulandığı belirtilmiştir (Lu vd., 1991).

EHA 101 *A. tumefaciens* bakteri suşu kullanılarak yapılan diğer bir transformasyon çalışmasında pAGS188 vektöründen tasarlanan pWTT2084 plazmidinin kullanıldığı ifade edilmiştir. Bitki seçilimi için pWTT2084 plazmidini tütün chlorsulfuron dirençli *surB* genini içermektedir. Bu gen CaMV35S promotorunun kontrolü altında

çalışmaktadır. Kimerik GUS geni CaMV35S promotorunu içermektedir. Araştırmacılar *E.coli* tabanlı bu β -glucuronidase kodlayan bölgeyi görsel seçim için kullanmıştır. Yapılan bu transformasyon çalışmasında White sim, Manon, Nathalie karanfil çeşitleri kullanılmıştır. Transformasyonda aksiler meristemler ve yaprakların eksplant olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Seçim ortamı için 2 μ g/l chlorsulfuron kullanılmıştır. Ekip Southern blot analizi yaparak transformasyonu doğrulamıştır (Firoozabady vd., 1995).

Biolistik PDS 1000 ile yapılan diğer bir çalışmada pDP532 plazmidi kullanılmıştır. BU plazmid *uidA* reporter genini içermektedir. GUS, *uidA* tarafından kodlanırken, seçim markır geni *bar*, fosfonitrisin-asetiltransferaz kodlamaktadır. Her iki geninde CaMV35S promotorunun kontrolü altında çalıştığı belirtilmektedir. Tungusten partiküller sıvı süspansiyonda 5 μ g plazmid DNA ile kaplanmıştır. Bombardımandan önce transformasyon etkinliğini değerlendirmek için farklı bombardıman basınçlarının (1300 ve 1500 p.s.i) başlangıç platinde (6, 9 cm) denendiği belirtilmektedir. Her bombardımanda 1 μ g DNA kullanılmıştır. Seçim ortamında 1.5 mg/l herbisit bialophos kullanıldığı belirtilmektedir. Southern blot analiziyle transformasyonun doğrulandığı vurgulanmıştır (Zuker vd., 1995).

Yapılan diğer bir çalışmada AGLO ve EHA105 *A. tumefaciens* bakteri suşları kullanılmıştır. Bu suşlardan EHA 105 pKIWI105 plazmidini taşıırken AGLO pCGN7001 plazmidini taşıdığı bildirilmiştir. Her iki plazmid CaMV35S promotorunun kontrolünde GUS geni taşımaktadır. Bombardıman yoluyla bitki köklerini yaraladıktan sonra bakterilerle (OD550 0.5) muamele edilmiştir. Ko-kültivasyon sürecinde bitkiler ön yüzleri ortama temas edecek şekilde bekletildiği ifade edilmektedir. Ko-kültivasyon 3 gün karanlık 2 gün aydınlık olmak üzere 5 gün süreyle yapılmıştır. Kanamisin seçilimi gerçekleştirildikten sonra yaşayan bitkilerin Southern analiziyle doğrulandığı ifade edilmiştir (Zuker vd., 1999) .

Karanfil bitkisinde nod eksplantlarından etkili bir transformasyon çalışması yapabilmek için ko-kültivasyon ortamının çok önemli olduğu belirtilmektedir. Yüksek bir genetik transformasyon etkinliği için nod eksplantları pKT3 plazmidini içeren AGL0 *A.tumefaciens* suşuyla mumale edilmiştir. pKT3 plazmidi *GUS* ve *NPTII* içermektedir. Araştırmacılar ko-kültivasyon ortamında hormon kullandığında

transformasyon çalışmalarında başarı olmadığını belirtmiştir. Beş gün ko-kültivasyon yapıldıktan sonra nod eksplantları sekiz radyal segmente ayrılarak seçilim ortamına alınmıştır. Başlangıçta 20 mg/l olan geneticin (g418), daha sonraki alt kültürlerde sırasıyla 30 mg/l ve 40 mg/l konsantrasyonuna çıkartıldığı belirtilmiştir. Çeşitler arasında transformasyon başarısı değişmektedir. Elde edilen sürgünlerin doğrulanmasının PCR ve Southern blot yoluyla yapıldığı bildirilmektedir (Nontaswatsri vd., 2004).

Karanfil yaprak eksplantlarının kullanıldığı transformasyon çalışmasında EHA101 ve C58C1 *A. tumefaciens* suşlarının kullanıldığı bildirilmiştir. EHA101 pEHA101 plazmidini içerirken C58C1 pGV2260 plazmidini içermektedir. Kanamisin, mannose ve ppt bitkilerin seçilim toleranslarının anlaşılması için kullanılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada seçilim ajanlarının bitki çeşidine bakteri suşuna bağlı olarak bitki eksplantları üzerinde farklı etkilere sahip olduklarını belirtmektedir. Wild type farklı karanfil çeşitlerinin normalde dayanıklı olduğu kanamisin, mannose ve ppt konsantrasyonlarını belirleyip daha sonra *Agrobacterium* ile muamele sonrası bu konsantrasyonların değiştiği bildirilmektedir. Özetle bu çalışmada araştırmacılar farklı bakteri suşu ve bitki çeşitleri kullanarak bitki eksplantlarının seçilim ajanlarına karşı verdiği tepkiyi araştırmıştır (Zhang vd., 2005).

A. tumefaciens EHA101 suşu kullanılarak yapılan çalışmada, sürgünlerden alınan yaprak eksplantlarının transformasyon için kullanıldığı belirtilmiştir. Ek olarak 100 μ M acetosyringone ile 15 dakika transformasyon yapıldığı ifade edilmektedir. Ayrıca transformasyon yapılan bitki dokuları, ko-kültivasyon ortamında karanlıkta 24 °C'de bir hafta bekletilmiştir. Ko-kültivasyon ortamında 0.49 μ M BA ve 0.57 μ M 2,4-D gibi büyümeyi düzenleyiciler yer almaktadır. Araştırmacılar ayrıca genel olarak kullanılan üç günlük ko-kültivasyon denemesini de yapmış fakat BD ortamı yerine suyla nemlendirilen filtre kağıdı kullanmışlardır. Özet olarak transformasyona tabi tutulan yaprak eksplantlarının bir ay boyunca higromisinde seçilimi yapılmıştır. Üç ay sonra yaprak eksplantlarından sürgünler meydana gelmektedir. Transgenik bitkilerin elde edilerek büyütülmesinin toplamda on beş ay aldığı belirtilmiştir (Kinouchi vd., 2006).

Karanfil çiçeğinde yapılan bir genetik transformasyon çalışmasında nod eksplantları kullanılmıştır. Nod eksplantları transformasyondan 3-5 gün önceden kültüre alınmaktadır. *Agrobacterium* ile on dakika muamele edildikten sonra 50 µM acetosyringone ve su ile ko-kültivasyon yapıldığı belirtilmiştir. Ko-kültivasyon ortamında hormon kullanımının bazı bitkilerde olumlu etki yaparken bazılarında düşük besin içeriğine sahip olan hormonsuz ortamların ko-kültivasyon için uygun olduğu belirtilmektedir. Ayrıca acetosyringone'un transformasyon çalışmalarında virülans genlerinin aktivasyonunda önemli rolleri olduğu fakat 100 µM üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirtilmektedir (Nontaswatsri ve Fukai, 2006).

GV3130 *A. tumefaciens* suşu kullanılarak yapılan bir başka çalışmada pPCV702 plazmidinin kullanıldığı ifade edilmektedir. Bu plazmid CaMV35S promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Araştırmacılar *PttKNI* (pPCV35S:*PttKNI*) ve *NPTII* genlerini Götting üniversitesinden temin etmişlerdir. Transformasyon için kotiledon eksplantlarını önceden kültüre almışlar. Ko-kültivasyon ortamı olarak MS ortamına ilave edilen 1 mg/l BA+ 0.1 mg/l NAA gibi büyüme düzenleyiciler ile üç gün karanlıkta inkübasyon yapılmıştır. Ko-kültivasyon ortamından sonra bitkiler ½ ve ¼ MS ortamında 50 mg/l kanamisin ile seleksiyon yapılmıştır. İki, üç santimetre boyuna erişen sürgünler köklendikten sonra %60-70 nem içeren ortamda, 16 saat aydınlık 8 saat karanlıkta ve 23/15 °C şartlarında yetiştirildikleri bildirilmiştir (Meng vd., 2009).

Karanfil Tempo çeşidi kullanılarak yapılan transformasyon çalışmasında pBin B1 plazmidini içeren *A. tumefaciens* suşu EHA105 kullanılmıştır. Bu plazmid böcek dayanıklılık geni olan *cryIAb* ve *NPTII* geni içermektedir. Bu genler sırasıyla CaMV35S ve NOS promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Ko-kültivasyon ortamında tutulma süresinin transformasyon verimliliğini çok önemli düzeyde değiştirdiği belirtilmektedir. Eksplantlar transformasyondan önce 96 saat boyunca şartlandırıldıktan sonra 72 saat ko-kültivasyon yapıldığında transformasyon verimliliğinin optimum düzeye çıktığı belirtilmektedir. Ayrıca 100 mg/l kanamisin konsantrasyonunun seçim için optimum değer olduğu ifade edilmektedir (Kanwar ve Kumar, 2011).

Arka Flame ve IIHRS-1 karanfil çeşitleriyle yapılan denemeler sonrasında IIHRS-1'in rejenerasyon potansiyeli Arka Flame ile aynı gibi görünmesine rağmen IIHRS-1'in daha yüksek rejenerasyon göstermesi nedeniyle transformasyon çalışması için kullanıldığı belirtilmektedir. Transformasyon çalışmasında, eksplant olarak yaprakların kullanıldığı ifade edilmektedir. Transformasyonda pROK2 plazmidini taşıyan *A. tumefaciens* suşu LBA4404 kullanılmıştır. Bu plazmid 35S promotorunun kontrolü altında çalışmaktadır. Ayrıca *nptII* seçim markırı da içermektedir. Seçim ortamında 75 mg/l kanamisin kullanılmıştır. Olası transgenik bitkilerin rejenerasyon oranının oldukça yüksek olduğu belirtilirken, sürgünlerin köklendirilmesinde çok büyük zorlukla karşılaşıldığı ifade edilmektedir (Prasad vd., 2016).

2.9. *miR408* Geninin Özellikleri

miRNA'lar 24-26 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan küçük RNA molekülleri olup dizilimlerinin yüksek yapılı bitkiler arasında yüksek düzeyde korumuş olduğu ifade edilmektedir. Susturma mekanizması yoluyla post transkripsiyonel gen regülasyonuna katılırlar (Chen ve Rajewsky, 2007; Eldem vd., 2013). *miRBase* v.21 göre *miR408*, 28645 *miRNA* ailesinin üyeleri arasında en çok korunanlardan bir tanesidir (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2011).

miR408 gen ifadesininin çevre koşullarından önemli bir şekilde etkilendiği ancak biyolojik fonksiyonun bilinmediği belirtilmiştir. Bu nedenle *miR408*'in strese vereceği yanıtlar günümüzde *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde araştırılmaktadır. *miR408* ve hedef genlerinin ifadesi tuzluluk, soğuk, oksidatif stresler, kuraklık ve ozmotik streslerdeki rolleri günümüzde araştırılmaktadır. Transgenik bitkilerle yapılan analizlerde *miR408* ifadesinin tuzluluk, soğuk ve oksidatif streslerde arttığı belirtilmiştir. Hücrel antioksidan kapasitesi *miR408* ifadesi yüksek olan bitkilerde artmakta, bununla birlikte açık bir şekilde reaktif oksijen türevlerinin seviyesi azalmaktadır. Genel olarak *miR408* geninin abiyotik stres cevaplarında önemli olduğu aynı zamanda *miR408*'in bitkinin yaşamasında temel fonksiyonu olduğu belirtilmektedir (Ma vd., 2015). Çeşitli bitkilerde farklı stres etmenlerine karşı *miR408* geninin verdiği bazı cevapları örneklendirmek gerekirse, *Medicago truncatula* (Trindade vd., 2010) ve *Hordeum vulgare*'de (Kantar vd., 2010) *miR408*

ifade seviyeleri kuraklık stresinde artarken, *Prunus persica* (Eldem vd., 2012) ve *Oryza sativa* (Zhou vd., 2010) bitkilerinde azalmaktadır.

Plastosiyanın, bakır (Cu) bağlanmasından sorumlu bir gen olarak doğrudan *miR408* tarafından düzenlenir. Cu eksikliğine yanıt olarak *miR408* ifadesinin bakır seviyesinin düzeltilmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Abdel-Ghany ve Pilon, 2008). Pirinç bitkisinde *miR408* geninin farklı düzenleme mekanizmaları araştırılmıştır. Kuraklık stresinin etkilerinin genetik olarak incelendiği çalışmada *miR408* geninin kuraklıkta potansiyel etkilerinin araştırıldığı belirtilmektedir. Osa-*miR408* geninin düzenleme şeması araştırılırken kuraklığa karşı hassas ve toleranslı olmak üzere iki farklı pirinç çeşidi kullanılmıştır. Kuraklık stres cevabı olarak kuraklığa hassas olan çeşidin *miR408* transkript seviyesi azalmış fakat toleranslı olan çeşidin yükselmiş olduğu belirtilmektedir (Mutum vd., 2013).

Plastosiyanın protein ailesi üyelerinin *miR408* geni tarafından düzenlendiği bildirilmektedir. Ayrıca ters ekspresyon profili göstermektedirler, yani kuraklık sırasında toleranslı çeşitlerde daha düşük bir seviyede ifade edilmektedirler. Aslında benzer çeşitli spesifik stres cevaplarının *miR408* ifadesini düzenleyen *Oryza sativa squamosa* promoter-binding-like 9 transkripsiyon faktörlerinde de bulunduğu bildirilmektedir (Mutum vd., 2013). Yapılan bir diğer çalışmada *Arabidopsis* bitkisinde *AGO1* ve *AGO2*, küçük RNA ile etkileşim göstermektedir. Birçok miRNA 5' U'ya sahiptir. *AGO1*, stres cevabında kapsamlı ve önemli bir rol oynamaktadır. *AGO2* sadece anti bakteriyel savunma mekanizmasıyla ilişkili olup 5' A'ya sahip *mir393* tarafından düzenlenmektedir. Yapılan araştırma sonucunda 5' A'ya sahip olan *miR408*, hem *AGO1* hemde *AGO2* yoluyla hedefi olan *plantacyanin* ifadesini düzenlemektedir. *miR408* 5' ucunda adenosin içeren birkaç *miRNA*'dan bir tanesidir. Bu sonuçlar *miR408*'in 5' ucu sonlanma kuralından farklı olarak *AGO1* ve *AGO2* ile etkileşim gösterdiğini belirtmektedir. Ayrıca *mir408*'in normal büyüme koşullarında bitkilerde düşük seviyede bulunduğu fakat çeşitli stres koşulları altında özellikle bakır eksikliğinde miktarının arttığı bildirilmektedir (Maunoury vd., 2011).

Nohut bitkisinde yapılan kuraklık stresi çalışmasında *miR408* geninin, bitkilerdeki fenotipik gözlem sonuçlarını olağanın dışında değiştirdiği belirtilmektedir. Sekiz gün boyunca uygulanan kuraklık stresinden sonra kontrol bitkilerinde klorozis, solmalar

ve kurumalar başlamış, transgenik bitkilerde ise hiç bir stres belirtisinin tespit edilmediği belirtilmiştir. 17 gün uygulama sonuçlarından sonra kontrol bitkilerinin şiddetli bir şekilde solduğu, transgenik bitkilerin ise yüksek stres toleransına sahip olduğu belirtilmektedir. Buna ek olarak aynı ekibin yaptığı bir diğer gözlem ise kuraklık stresinden bağımsız olarak transgenik *miR408* bitkilerinin boylarında önemli bir azalma olduğu, fakat *miR408* aşırı ifade (overexpress) edilmiş bitkilerde yaprak sayısının arttığıdır. Transgenik bitkilerde ve vektör kontrol bitkilerinde yaprak alanında ise hiç bir morfolojik değişimin kayıt edilmediği bildirilmiştir (Hajyzadeh vd., 2015). Yapılan bir diğer çalışmada yonca bitkisinde kuraklık stresinde *miR408* kök ve gövdede güçlü bir şekilde aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca bakır proteinlerinden sorumlu olan *COX5b*'nin düzenlenmesini sağladığı bildirilmektedir (Trindade vd., 2010). Başka bir çalışmada bezelye bitkisinde 10 gün boyunca yapılan kuraklık stresi çalışmasında en çok korunan miRNA ailesinden olan *miR398* ve *miR408* genlerinin etkilerinin araştırıldığı belirtilmektedir. Dehidrasyonun kök ve gövdede *miR408*'in ifadesini güçlü bir şekilde azalttığı bildirilmektedir (Jovanovic vd., 2014).

Çiçeklenme zamanı merak uyandıran bir konu olmanın yanı sıra tarımda tohum olgunlaşmasında da önemli bir role sahiptir. Özellikle buğday gibi bitkilerde çiçeklenme zamanı tohum verimini ciddi derece etkilemektedir. MikroRNA'nın, tahıllarda başlanma zamanını nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bununla birlikte *miR408*'in aşırı derecede ifadesi buğday bitkisinde erken başlanma fenotipi göstermektedir. *TaTOC1s* gen ifadesinin *mir408* tarafından düzenlenerek azaldığı belirtilmektedir. Sonuç olarak *miR408* geninin buğday bitkisinde *TaTOC1s* ifadesini düzenleyerek başlanma süresini ayarlama fonksiyonu olduğu bildirilmektedir (Zhao vd., 2016).

miR408 geninin potansiyel etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada buğday bitkisinde *miR408* hedef geni olan *TaCLP1*'in abiyotik stres ve şerit pas hastalığına karşı dayanıklılık sağladığı ifade edilmektedir (Feng vd., 2013). Buğday bitkisinin stres toleransında *mir408*'in önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalar ışığında aydınlatılmıştır. Çeşitli stres faktörleri altında *mir408* geninin fonksiyonunu örneklendirmek gerekirse, pamuk bitkisinin RKN nematod enfeksiyonunda *miR408* geninin ifade seviyesi en az %25 arttığı bildirilmektedir (Pan vd., 2018). Pamuk

bitkisinde yapılan bir diğ er araştırmada *miR408*'in Cotton leaf curl Allahabad virus gen ifadesinin baskılanmasını sağlayarak virüse dayanıklı pamuk geliştirme potansiyeli olduğu belirtilmektedir (Shweta, 2014). *miR408* ifadesinin çevresel stresler nedeniyle değiştiği yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Zhang ve Li, 2013). *miR408*'in ifadesinin dehidrasyon (Kantar vd., 2010; Trindade vd., 2010), mekanik stres (Lu vd., 2005) ve artan reaktif oksijen türevleriyle birlikte uyarıldığı anlaşılmaktadır (Li vd., 2011; Hajyzadeh vd.,2015).

miR408'in potansiyel etkilerini anlamak için yapılan diğ er bir çalışmada fotosentez etkinliği üzerinde araştırma yapılmıştır. Bitkilerin tahıl, meyve ve besin olarak kullanılmasının fotosentez kabiliyetlerine bağlı olduğu belirtilmektedir. *miR408* bitkilerde en çok korunan miRNA'lardan bir tanesidir. *Arabidopsis*, tütün ve pirinç bitkisinde *miR408*'in aşırı ifadesinin potansiyel etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışma yapılmıştır. Transgenik bitkilerin hepsinin kloroplastlarında bakır içeriğinde artış gözlemlendiği bildirilmektedir. Plastosiyaninin kayda değer miktarda artış göstermesi fotosentetik genlerin uyarılmasını sağlamaktadır. Gaz alışverişi ve optik spektroskopik analizleri yoluyla, *miR408* genini aşırı derecede ifade eden bitkilerde ışıktan faydalanma ve karbondioksit fiksasyonu yoluyla fotosentez kabiliyetini artırabildiği bildirilmektedir. Transgenik her üç bitkininde tohum boyutlarının büyüdüğu belirtilmiştir. Bu nedenle *miR408* geninin aşırı ifade edildiği transgenik pirinç bitkisinde iki yıl boyunca yapılan deneme alanlarında bitki veriminin önemli derecede arttığı belirtilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda *miR408* geninin fotosentez düzenlenmesinde önemli rolü olması nedeniyle farklı bitki ve çeşitlerde fotosentez kabiliyetlerinin artırılarak verim artışının sağlanabileceği bir kanıt niteliğindedir (Pan vd. 2018). Yapılan bir diğ er çalışmada *miR408*, pirinç bitkisinde salkım dallarını ve tane sayısını artırarak verim artışı üzerinde olumlu etkilerinin gözlemlendiği bildirilmektedir. *OsmiR408*, *phytoeyanin* gen ailesinden olan *uclacyanin*'in (*UCL*) *OsULC8*'i baskılayarak ürün verimini düzenlediği belirtilmektedir. *ULC8* geninin aşırı ifadesi verimi azaltırken, bu genin baskılanması veya çıkarılması verimi artırmaktadır (Zhang vd., 2017).

mir408 Arabidopsis bitkisinde abiyotik stres cevaplarında önemli bir oynamaktadır. Ancak *Salvia miltiorrhiza* bitkisindeki *miR408* çok az araştırılmıştır. Sm-*miR408*, klonlanarak tütün bitkisinde aşırı derecede ifade edilmiştir. Sonuç olarak transgenik

bitkilerde tohum çimlenmesinin daha iyi olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerde, tuz stresi altında reaktif oksijen türlerinin miktarının azaldığı bildirilmiştir. Transgenik bitkilerin CAT ve SOD gibi enzim aktivitelerini artırarak tuz stresiyle mücadele ettiği belirtilmektedir (Guo vd., 2018).

miR408 fonksiyonunun *Arabidopsis* bitkisinde vejetatif gelişmede önemli rol oynadığı bilinmesine rağmen üretken bir gelişim için oldukça büyük bir bilinmeyen olarak kalmıştır. *miR408* aşırı ifadesinin (overexpress) transgenik *Arabidopsis* bitkisinde bitki morfolojisinde dahil olmak üzere yaprak alanını, petiol uzunluğunu, bitki boyunu, çiçek boyutunu ve silikva boyunu önemli derecede artırmaktadır. Aynı zamanda biyokütle ve tohum veriminin de arttığı belirtilmiştir. Transgenik bitkilerde artan bitki boyunun öncelikli nedeninin hücre çoğalmasından ziyade hücre genişlemesinden kaynaklandığı ve tutarlı olarak yüksek seviyede *myosin* gen ifadesi ve giberellik asit (GA) ölçüldüğü bildirilmiştir. Aksine *miR408* aşırı ifadesi ile düzenlenen hedefler *Plantacyanin* ve *Laccase 13* ile biyokütle ve tohum verimi azalmaktadır. RNA sekanslanmasının ortaya çıkardığı birincil metabolizma ve stres tepkisine katılan bu genlerin tercihen *miR408* aşırı ifade edilmiş bitkilerde zenginleştiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları *miR408*'in biyokütle ve tohum veriminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve *miR408*'in tarım ürünlerinin yerel hale getirilmesine dahil olan muhtemel aday gen olduğu belirtilmiştir (Song vd., 2018). Aynı zamanda *Arabidopsis* bitkisinin demir eksiliğinde *miR408* geninin potansiyel etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Carrió-Seguı vd., 2019).

Arabidopsis thaliana bitkisinde on dört gün boyunca doku kültüründe 1 mM ve 3 mM bor uygulandığı belirtilmektedir. Toksik borun fidelerde fenotipik olarak artan borla oluşan klorozla bağlantılı olarak, fotosentetik pigmentlerin azalmasına neden olduğu ifade edilmektedir. Çözünen ve çözünmeyen şeker miktarının birikiminde ise artışa neden olduğu bildirilmektedir. Artan bor konsantrasyonu ile birlikte antosiyanin, flovonid ve prolinin oksidatif stres toleransının sağlanması için artarak uyarıldığı belirtilmektedir. 1 mM bor uygulanmasının *miR398* ifadesini artırırken, 3 mM borun *miR398* ve *miR408* ifadesinde önemli bir değişiklik gerçekleştirmediği bildirilmiştir (Kayıhan vd., 2016).

Pirinç bitkisinde *OsmiR408* geninin aşırı derecede ifadesi küçük ve genç fidelerde soğuk toleransı sağlamaktadır. *OsmiR408* transgenik pirinç bitkileriyle yapılan kuraklık stres denemelerinde ise bitkilerin wild type bitkilere göre kuraklık stresine karşı daha hassas hale geldiği bildirilmektedir (Sun vd., 2018).

2.10. Bor Tolerans Mekanizmalarıyla İlgili Potansiyel Genler

Gerçekleştirilen bu tez çalışması dahilinde, önceden gerçekleştirilen çalışmalarda edinilen bulgular göz önüne alınarak transgenik bitkilerde *miR408* geninin bor stresi altındaki potansiyel etkilerini anlayabilmek için *Plastosiyanın*, *PIP; 1* ve *PIP; 2*, *Boron transporter 1*, *Boron transporter 2*, *MAPK* ve *CPR2* genlerinin ifade seviyelerinin incelenmesinin yararlı olacağı hipotezlenmiştir.

2.10.1. *Plastosiyanın*

Plastosiyanın, tilakoid lümeninde bulunan çözünebilir bakır iyonlarının bir proteindir. Buradaki elektronları fotosistem'e transfer eder (Weigel vd., 2003). *Plastosiyanın*, bakır (Cu) bağlanmasından sorumlu bir gen olarak doğrudan *miR408* tarafından düzenlenir. Cu eksikliğine yanıt olarak *miR408* ifadesi bakır seviyesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Abdel-Ghany ve Pilon, 2008). *mir408*'in normal büyüme koşullarında bitkilerde düşük seviyede bulunduğu fakat çeşitli stres koşulları altında özellikle bakır eksikliğinde miktarının arttığı bildirilmektedir (Maunoury vd., 2011).

Önceki çalışmalar, *mir408* geninin bakır proteinlerini kodlayan genlerin ifade seviyelerini düzenlediğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda *mir408* bakırla ilişkili transkriptlerin kuraklık stresinde bakır homeostasinin koordinasyonunu sağlamaktadır (Hajyzadeh 2015). Yapılan bir diğer çalışmada yonca bitkisinde kuraklık stresi altında *miR408*'in kök ve gövdede güçlü bir şekilde aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Ayrıca bakır proteinlerinden sorumlu olan *COX5b*'nin düzenlenmesini sağladığı da bildirilmektedir (Trindade vd., 2010).

Arabidosis, tütün ve pirinç bitkisinde *miR408* geninin aşırı ifadesinin potansiyel etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Transgenik bitkilerin

hepsinin kloroplastlarındaki bakır içeriğinde artış gözlemlendiği bildirilmektedir. *Plastosiyanin*'in kayda değer miktarda artış göstermesi fotosentetik genlerin uyarılmasını sağlamaktadır. Gaz alışverişi ve optik spektroskopi analizleri yoluyla, *miR408* genini aşırı derecede ifade eden bitkilerde ışıktan faydalanma ve karbondioksit fiksasyonu yoluyla fotosentez kabilyetini artırabildiği bildirilmektedir (Pan vd., 2018).

2.10.2. *PIP;1 ve PIP;2*

Maurel vd. (2008), aquaporinlerin bitki hücrelerinde iç membranlarda bulunan kanal proteinleri olduklarını belirtmişlerdir. Aquaporinler buldukları yerlerde su, küçük nötr çözülmüş maddeler borik asit ve silisilik asit veya karbon dioksit gibi gazların taşınımını kolaylaştırırlar. Yüksek düzeyde korunan bitki aquaporinlerinden olan *PIP*, (Plazma membran instrinsic proteins) hücre zarında başlıca su geçişini sağlayan geçitlerdir (Yanefv vd., 2015).

Aquaporinler, öncelikli olarak suyun plazmalemma veya tonoplast boyunca geçişinden sorumlu içsel membran bağlı proteinlerdir. (Maurel vd., 1993; Kammerloher vd., 1994) *PIP* aquaporinleri bitkilerde hücre zarı üzerinde bulunan başlıca su taşıyan izoformlardır (Chaumont vd., 2014). Aquaporinler üzerinde yapılan önceki çalışmalar, *PIP1* ve *PIP2* izoformlarının farklı bölgelerde lokalize olduğu belirtilmektedir (Stanfield vd., 2017). Kavakta yapılan bir çalışmada *PIP1* ağırlıklı olarak iç bölgelerde bulunurken, *PIP2*'nin başlıca olarak hücre zarında bulunduğu belirtilmektedir. *PIP1* ve *PIP2* aquaporinlerinin rolü fonksiyonel olarak muhtemelen farklıdır. *PIP2* temel su kanalı olarak görev almaktadır (Yanefv vd., 2015). *PIP1* ise muhtemelen CO₂ ve O₂ gibi diğer moleküllerin taşınımını sağlamaktadır (Uehlein vd., 2008). *PIP1*'in, *PIP2* ye göre su taşıma yeteneği çok daha yavaş olduğu ve *PIP1* 'in daha çok plazma membranı yerine içsel membranlarda bulunduğu belirtilmektedir. *PIP1*'in içsel yerleşimi bitki hücre zarında su taşınmasından ziyade düzenleyici bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda *PIP1*'in *PIP2* yi su kanalı olarak kontrol ederek düzenleyici etkisinin olabileceği belirtilmektedir (Fetter vd., 2004).

PIP1 ve *PIP2* arasındaki yapısal ana fark N ve C terminal uçlarındaki uzunluğun farklılığıdır. *PIP1* ile yapılan fonksiyonel analizlerde, *PIP1* tek başına ifade edildiğinde hücre zarında bulunmamaktadır. *PIP1*'in hücre zarındaki trafiğide *PIP2* ile olan etkileşiminin keşfi, *PIP* aquaporinlerine yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Yanefv vd., 2015).

2.10.3. Boron transporter 1 ve Boron transporter 2

Bitkilerin bor toleransları genetik kapasiteye bağılı olarak değişmektedir. Bora karşı hassas olan tahıllar yaprak bor konsantrasyonunu düşürerek bor stresinden kaçınmaktadırlar. Bitki bor toleransında borun taşınımının sağlanması gerekmektedir. *BOR1* geni düşük bor konsantrasyonlarında köklerden sürgünlere bor taşımaktadır (Takano vd., 2002). Ancak bor konsantrasyonu toksik seviyelere geldiğinde *BOR1* endositoz yoluyla parçalanmaktadır (Takano vd., 2005). Model bitki *A. thaliana* *BOR4-GFP* geni bor toksisitesi altında bitkilerin büyümesini sağlamaktadır (Miwa vd., 2007). Ayrıca arpa ve buğday bitkilerinde bor toksisitesine tolerans geni olan *BOR2* geninin bazı aquaporin genleri ile birlikte bor taşınımında etkin bir rol oynadıkları belirlenmiştir (Akçay ve Erkan, 2016).

BOR2 plazma zarında efflux tipte bir bor taşıyıcısı olup yan köklerde ve köklerin epidermis uzama bölgelerinde güçlü bir şekilde ifade edilmektedir (Miwa vd., 2013). Aynı zamanda Bot1 (bor 1 ortholog) geni bor toksisitesi toleransından sorumlu gen olarak tanımlanmıştır (Hayes ve Sutton, 2010).

2.10.4. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

MAPK bitkilerde sinyal iletiminde çok kritik bir role sahiptir. *MAPK* yüksek düzeyde korunan genler tarafından kodlanmaktadır (Hamel vd., 2006). Bitkilerde *MAPK* yolları büyüme ve gelişmenin düzenlenmesi, programlı hücre ölümü ve soğuk, sıcak, reaktif oksijen türleri, kuraklık, UV, patojen saldırıları gibi farklı çevre uyarıcılarına karşı cevap oluşturmaktadır. Stres sinyallerinin algılanması ve iletimi uygun cevapların oluşturulması bitkilerin adaptasyon ve yaşamsal faaliyetleri için kritiktir. Kinaz basamakları ve *MAPK* sınıfı, bitkilerde çeşitli abiyotik ve biyotik stres sinyallerinde olağanüstü bir rol oynamaktadır (Pitzschke vd., 2009).

Bitki stres sinyali, savunma hormonlarının biyosentezi, sinyalizasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, stoma düzenlemesi (kapanması), savunma geni aktivasyonu, fitoaleksin biyosentezi, hücre duvarı güçlendirme ve hücre ölümüne hipersensitivite cevap, dahil olmak üzere çoklu savunma yanıtlarının sinyalleşmesinde rol oynarlar (Meng ve Zhang, 2013).

MAP kinazlar üzerinden sinyal iletim karmaşıklığı, *MAP kinazlar*'ın çok katmanlı gen aileleri olmasıyla ayrıca katmanlanır. *MAPK* gen ifadesi çevresel stres cevaplarında çoğunlukla pozitif olarak düzenlense de bazı *MAPK* genleri stres toleransında negatif rol oynamaktadır. Örneğin pirinç bitkisinde *MAPK* ailesinden *OsMAPK33* aşırı derecede ifadesi, Arabidopsis bitkisinde *MKK9* geninin aşırı düzeyde ifadesi sırasıyla pirinç ve Arabidopsis bitkilerini tuz stresine karşı hassas hale getirmiştir. Arabidopsis bitkisinde *MKK9* geninin inaktive edilmesiyle bitkinin 150 mM tuz konsantrasyonunda dahi çimlendiği bildirilmektedir (Xu vd., 2008; Lee vd., 2011; Moustafa vd., 2014).

2.10.5. NADPH:cytochrome P450 reductase 2 (CPR2)

Bitkiler yaşamları boyunca ışık, sıcaklık ve su gibi faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca bitkiler büyüme ve gelişmeleri boyunca farklı biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalmaktadır (Chen vd., 2012). Bu stres faktörleri büyümenin farklı evrelerinde bitki büyümesini sınırlamaktadır. *Cytochrome P450 (CYP)* gen ailesi çeşitli biyosentez ve detoksifikasyon mekanizmalarıyla bitki büyüme ve gelişmesinde, strese karşı bitkinin korunmasında hayati bir öneme sahiptir. Bazı *Cytochrome P450* genleri terpenoitler, flavonoidler, steroidler, alkaloidler, fenilpropanoidler, glukosinolat ve siyanojenik glikozit gibi çeşitli sekonder metabolit grublarını katalizleyerek büyüme ve gelişmede önemli rol oynarlar (Li vd., 2012; Jun vd., 2015).

Cytochrome P450 tüm fitohormonlara ve çok sayıda biyopolimere (lignin, suberin vb.) biyosentez yada katabolizm yoluyla katkıda bulunmaktadır. Ayrıca P450'nin pigment, koku, antioksidan, allelokimyasallar ve savunma bileşikleri üzerindeki fonksiyonları önemlidir (Renault vd., 2014).

Mühendisliği yapılmış *P450*'nin, taksol ve indol alkaloidleri gibi antineoplastik ilaçların maliyetini düşürmek ve fitoöstrojenler ile antioksidanlar gibi nutrasötiklerin içeriklerindeki miktarı artırmak için kullanılmaktadır. Herbisitler, kirleticiler ve diğer xenobiotik'ler bazı bitki *P450* enzimleri tarafından metabolize edilir. Bu *P450*'ler herbisit toleransı modifikasyonunda ve biyoremediasyonda kullanılan araçlardır (Morant vd., 2003).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Bu çalışmada Aydın Pamuk Araştırma Enstitüsünden alınan GSN-12 pamuk çeşidi ile Sveryverts firmasından temin edilen karanfil çeşidi kullanılmıştır.

3.1.2. Bitki doku kültürü ortamları

Farklı uygulamalara göre 1 litreye 4.4 gram MS-MS (Murashige ve Skoog, 1962), MS bazal veya B5 vitaminli (Gamborg, 1968) MS ortamları denenerek en uygun olanı kullanılmıştır. Farklı rejenerasyon çalışmalarına göre MS veya 1/2 MS içeren ortamlar tercih edilmiştir. Kullanım şekline göre ortamlara %0.8 agar ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerden kinetin (KIN), thidiazuron (TDZ), benzil amino pürin (BAP), naftalen asetik asit (NAA), indol butirik asit (IBA), indol-3-asetik asit (IAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) gibi büyümeyi düzenleyiciler kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak sükroz, antibiyotik olarak sefotaksim, kanamisin ve rifampisin kullanılmıştır. Kullanılmadan önce tüm büyüme düzenleyiciler ve antibiyotikler 0.2 µm por büyüklüğü olan filtre sterilizasyonundan geçirilmiştir. Kullanılmadan önce tüm ortamlar ve bileşenler distile su içerisinde çözülmüş ve 121 °C'de 20 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.3. Bakteri suşları ve plazmidler

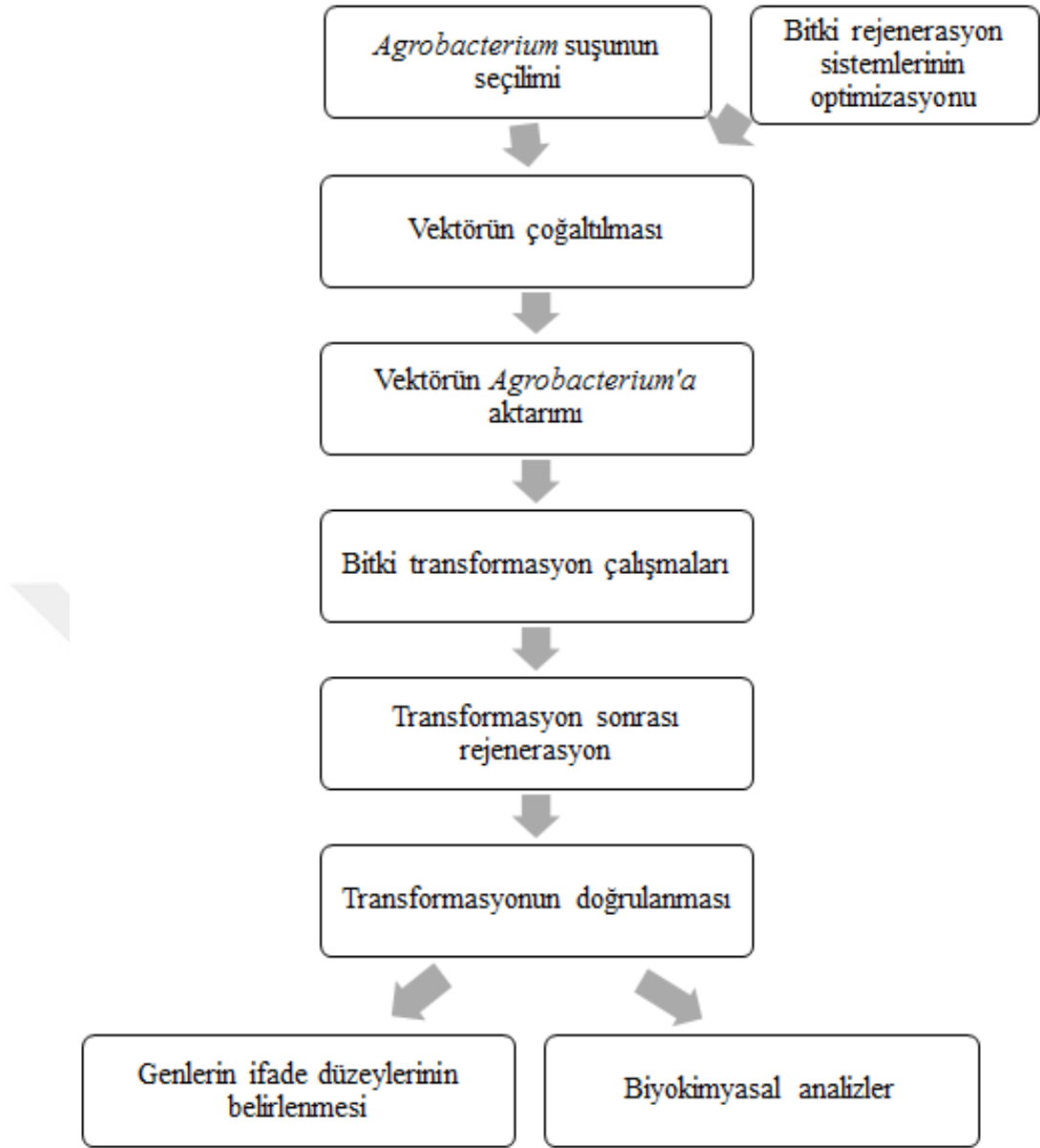
Agrobacterium tumefaciens EHA105 ve LBA4404 bakteri suşlarına aktarılan *pCAMBIA2301*, *gus* geni ihtiva etmektedir. Transformasyon çalışmalarına geçmeden önce hangi bakteri suşunun kullanılan bitkiler ve yöntem ile daha etkin olduğu araştırılmıştır. EHA105 ve LBA4404 bakteri suşlarının her ikisine de *pEarlyGate103 miR408* vektörü aktarılmıştır. Vektörün çoğaltılması işlemlerinde *E.coli* DH5α bakteri suşu kullanılmıştır.

3.1.4. Bakteri kültür ortamları

Agrobacterium'un büyütülmesinde Yeast Extract Broth (YEB) kullanılmıştır. YEB ortamında 13.5 g/l nutrient broth, 1 g/l yeast extract, 5 g/l sükroz ve 2 mM MgSO₄.7H₂O kullanılmıştır. YEB-MES ortamının pH 5.6 olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyin amacına göre 20 mg/l rifamfisin, 50 mg/l kanamisin, 10 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) ve 20 µM 3',5'-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone (acetocyringone) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Pamuk ve karanfil eksplantlarının farklı rejenerasyon ortamları çalışma boyunca değerlendirilerek en uygun ortam bitkilerin gelişmine göre belirlenmiştir. *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan transformasyon çalışmalarının optimizasyonunda en etkili rejenerasyon sistemi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan proje deney şeması smartart grafiği olarak şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Projede kullanılan deney şeması

3.2.1. Doku kültürü çalışmaları

Doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde aseptik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Tohum yüzey sterilizasyonu ve *in vitro* çimlendirme

Pamuk ve karanfil tohumları %70'lik etil alkol ile muamele edilip steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra pamuk bitkisi %10'luk sodyum hipoklorit içerisinde 7

dakika muamele edilip 3 kere steril saf suyla durulanmıştır. Karanfil bitkisi %20'lik sodyum hipoklorit içerisinde 10 dakika muamele edilip 3 kere steril saf suyla durulanmıştır. Her iki tohumun yüzey sterilizasyonu yapıldıktan ve tohumların yüzeyindeki fazla su steril kurutma kağıdı yoluyla temizlendikten sonra tohumlar direk olarak %3 şeker ve %0.8 agar içeren MS besin ortamına çimlenmesi için transfer edilmiştir. Tohumlar kontrollü bitki büyütme odalarında 23 °C sıcaklıkta 16 saat ışık ve 8 saat karanlık döngüde olacak şekilde yetiştirilmiştir.

3.2.1.2. Genetik transformasyona uygun sürgün rejenerasyonu

Bitkilerde genetik transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmek için çalışılan bitkinin transformasyona uygun yüksek düzeyde sürgün rejenerasyon protokolünün optimizasyonu yapılmalıdır. Bu nedenle pamuk ve karanfil bitkileri için farklı eksplantlar ve hormonlar kullanılarak en uygun rejenerasyon yöntemi belirlenmiştir.

3.2.1.3. Pamuk bitkisinde sürgün rejenerasyonu

Pamuk bitkisinde literatür çalışmalarının ışığında denenen hipokotil, epikotil, sürgün ucu, kotiledon boğumları ve yapraklar eksplant olarak kültüre alınmıştır. Bitkiler tohumlardan *in vitro*'da 5 ila 7 gün yetiştirilmiş temel besin ortamı olarak MS-MS (Murashige ve Skoog 1962), agar ve karbon kaynağı olarak sükröz kullanılmıştır. Pamukta fenolik maddelerin salgılanması nedeniyle eksplantlarda kararma problemi olmuş bu problem aktif karbon kullanılarak giderilmiştir. Ayrıca etilen biyosentezini durdurmak için Gümüş Nitrat ($AgNO_3$) kullanılmıştır. Pamuk bitkisinde kullanılan büyümeyi düzenleyiciler Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Pamuk bitkisinde kullanılan büyüme düzenleyiciler

Pamuk bitkisinde kullanılan büyüme düzenleyiciler						
IBA	2,4-D	Kinetin	TDZ	NAA	ZEA	BAP

3.2.1.4. Karanfil bitkisinde sürgün rejenerasyonu

Karanfil bitkisi için en uygun kallus uyarımının thidiazuron (TDZ) ve naftalen asetik asit (NAA) içeren MS besin ortamı olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen kalluslar benzil amino pürin (BAP) içeren MS ortamına alınarak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Sürgünler indol butirik asit (IBA) kullanılarak köklendirilmiştir. Köklenen sürgünler hormonsuz MS ortamına aktararak bitkilerin büyümesi sağlanmıştır. Karanfil bitkisinde kullanılan büyümeyi düzenleyiciler Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Karanfil bitkisinde kullanılan büyüme düzenleyiciler

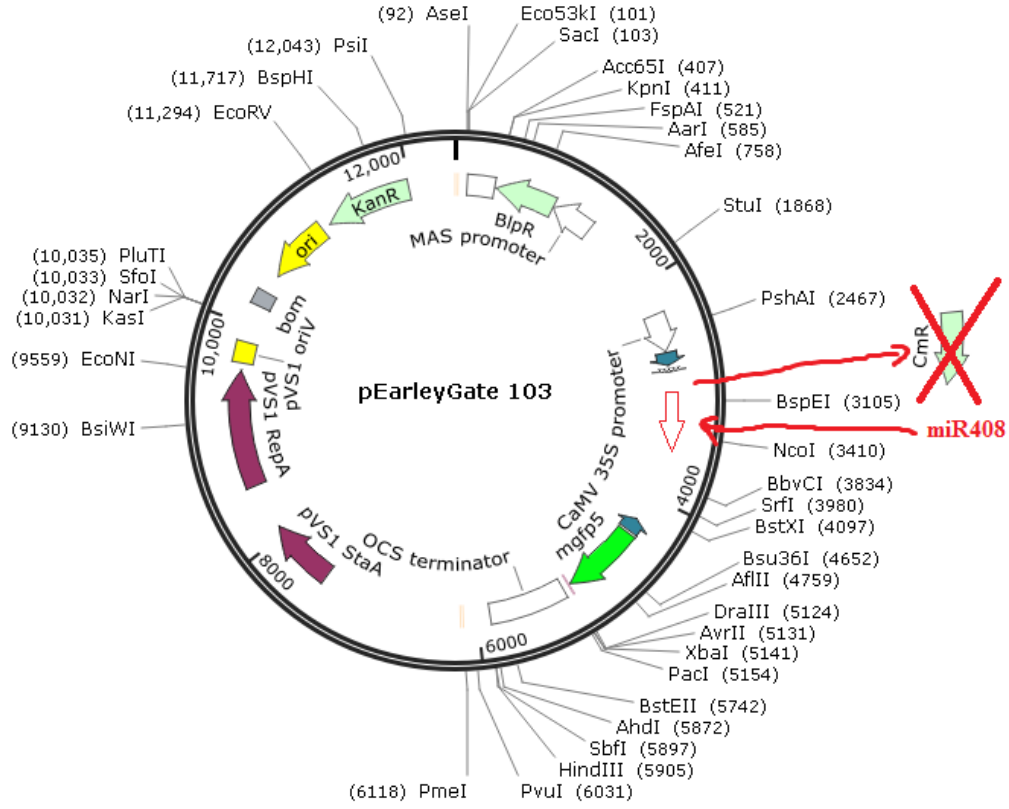
Karanfil bitkisinde kullanılan büyüme düzenleyiciler						
IBA	2,4-D	Kinetin	TDZ	NAA	ZEA	BAP

3.2.1.5. Sürgünlerin köklendirilmesi

Karanfil ve pamuk bitkilerinin köklendirilmesi için IBA, IAA ve NAA gibi hormonların farklı kombinasyonları denenmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesinde kültür zamanı çok önemli bir rol oynamaktadır. Her iki bitkide de köklenme konusunda kullanılan büyüme düzenleyicisi miktarı ve kültür zamanından aşırı derecede etkilenmektedir. Kültür zamanı aşıldığında kökler kırılğan bir hale gelerek hassaslaşmaktadır. Köklendirme aşaması da kontrollü olarak 23 °C’de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık döngüde bitki büyütme kabininde yapılmıştır.

3.2.2. Transformasyon çalışmaları

Pamuk ve karanfil bitkileri için transformasyon çalışmaları uygun eksplantlar ve vakum infiltrasyonu kullanılarak *Agrobacterium* aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Transformasyon çalışmalarına başlamadan önce *BOR2* geninin klonlama çalışmaları ve *Agrobacterium* suşunun *GUS* boyamasıyla seçilim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan *miR408* geni LBA4404 *Agrobacterium* suşu içerisinde temin edilmiştir. Şekil 3.2’de *miR408* geninin pEarleyGate103 vektörünün içerisine gateway klonlama yoluyla yerleştirildiği gösterilmektedir.



Şekil 3.2. pEarleyGate103 *miR408* plazmidinin görünümü

Başka bir araştırma grubundan temin edilen *miR408*, *Arabidopsis thaliana Col-5* genomik DNA'dan çoğaltıldığı bilinmektedir. Bu ekip gen parçalarını uygun primerler kullanarak çoğaltmıştır. Çoğaltılan parça pEarleyGate 103 plazmidinin içine gateway klonlama sistemi ile alınmıştır. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi gateway klonlama yoluyla pEarleyGate 103 vektöründen attR1 ve attR2 bölgeleri arasındaki *chloramphenicol* çıkartılıp yerine *miR408* yerleştirilmiştir.

3.2.2.1. Genetik transformasyonda kullanılacak bakteri suşlarının GUS boyamasıyla seçilimi

Pamuk ve karanfil bitkileri için çeşitli eksplantlarla *GUS* seçilimi gerçekleştirilmiştir. *GUS* geni ihtiva eden *pCAMBIA2301* daha önceden kompetan hale getirilmiş EHA105 ve LBA4404 *Agrobacterium* suşlarına ısı şoku yardımıyla aktarılarak *GUS* seçilimi gerçekleştirilmiştir.

Bütün eksplantlar ve dokular GUS sübstrat solüsyonu içerisinde (0.1 M NaPO₄ Buffer, 0.5 mM K-ferricyanide ve 0.5 mM K-ferrocyanide (pH 7.0), 10 mM EDTA, 1 mM XGlucoronide ve %10 h/h Triton X-100) 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Eğer eksplantlar saklanmak istenirse fixative solüsyonuna (%10 h/h formaldehide, %20 h/h ethanol ve %5 h/h acetic acid) transfer edilerek birkaç ay korunabilmektedir. Dokular etil alkolle muamele edilerek klorofil uzaklaştırılmış, renk değişimi ortaya çıkarılmıştır.

3.2.2.2. Vektör saflaştırma

Agrobacterium suşu LBA4404 pEarlyGate103 vektörü içerisinde *miR408* geni temin edilmiştir. *miR408* genini içeren bu vektör, bakteriden STES (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-CI pH:8, 1 mM EDTA pH:8), SOLI (50 mM glucose, 25 mM Tris-CI pH:8, 10 mM EDTA pH:8), SOLII (0.2 N NaOH, %0.1 SDS), SOLIII (5 M K-acetat, Glacial acetic acid, dH₂O) ve Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1 h/h) kullanılıp saflaştırılarak izole edilmiştir.

3.2.2.3. Kompetan *Agrobacterium* ve *E.coli* bakterilerinin hazırlanması

Genetik transformasyon çalışmalarında arzu edilen geni içeren plazmid saflaştırıldıktan sonra çeşitli *Agrobacterium* ve *E.coli* bakteri suşlarına aktarabilmek için bu bakterilerin kompetan olması gerekmektedir. Örneğin bu tez çalışmasında *Agrobacterium*'dan saflaştırılan plazmid konsantrasyonu çok düşük olduğu için *E.coli* içerisinde çoğaltılıp tekrar saflaştırılmıştır. Bu nedenle kompetan *Agrobacterium* ve *E.coli* eldesi gerçekleştirilmiştir.

Kompetan *Agrobacterium* hazırlanması için EHA105 ve LBA4404 suşları kullanılmıştır. Tek bir koloni LB ortamında bir gece büyütüldükten sonra bir miktar bakteri alınarak erlen içerisinde bir gece daha büyütülmüştür. Daha sonra 0,15 M ve 20 mM CaCl₂ kullanılarak ve santrifüj işlemleri yapılarak kompetan *Agrobacterium* elde edilmiştir.

Kompetan *E.coli* hazırlanması için DH5α suşu kullanılmıştır. Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu

metod ile bir veya birkaç koloni erlenlerde bir gece büyütülmüştür. Daha sonra LB ortamıyla seyreltilip iki saat daha büyütülerek OD₆₀₀ 0,6 olana kadar büyütülmüştür. Ardından 10 mM ve 75 mM CaCl₂ kullanılarak kompetan *E.coli* bakterileri elde edilmiştir.

3.2.2.4. Farklı *Agrobacterium* suşlarına plazmid transformasyonu

Agrobacterium suşu LBA4404 pEarlyGate103 vektörü içerisinde *miR408* geni temin edilerek pEarlyGate103 ile birlikte saflaştırılmıştır. Farklı *Agrobacterium* suşlarına aktarım için pEarlyGate103miR408, *E.coli* suşu kompetan DH5α içerisinde çoğaltılmıştır. Daha sonra plazmid *E.coli*'den saflaştırılmıştır. *Agrobacterium* suşu EHA105 içerisine transforme edilmiştir. LB ortamında 20 mg/l rifampisin, 50 mg/l kanamisin antibiyotikleriyle seçim yapılarak pEarlyGate103 miR408 genini taşıyan EHA105 kolonileri elde edilmiştir. Gliserol stokları hazırlanarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.5. *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyon

miR408 genini taşıyan pEarlyGate103 vektörünün EHA105 bakteri suşuna entegre edilmesiyle transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. -80 °C'de muhafaza edilen stoklardan bakteriler alınarak sıvı YEB (13.5 g/L nutrient broth, 1 g/l yeast extract, 5 g/l sükröz ve 2 mM MgSO₄.7H₂O) ortamı içerisine bakteri seçim antibiyotikleri olan kanamisin ve rifampisin eklenecek büyütülmüştür. Sıvı ortamda büyütülen bakteriler katı YEB ortamı ihtiva eden petri tabaklarına çizilmiştir. Petri tabaklarından tek bir koloni alınarak bir gece büyütülmüştür. Ardından YEB + MES ortamında belirtilen antibiyotikler ve acetosyringone kullanılarak erlenlerde büyütülmüştür. 100 ml YEB ortamına 10 mM MES ve 20 µM of acetosyringone ilave edilmiştir.

Bakteri kültürleri 185 rpm'de ve 28 °C'de çalkalamalı inkübatörde OD₆₀₀ 1 olana kadar inkübe edilmiştir. Büyütülen bakteriler +8 °C'ye ayarlanmış santrifüj kullanılarak 4000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası çökelen bakteri pelletleri MMA ortamı (4.3g/l MS tuzu, 10 mM MES, %2 (a/h) sükröz ve 200 µM acetosyringone, pH 5.6) kullanılarak çözdürülmüş ve 1 saat 22

⁰C’de karanlıkta bekletilmiştir. Bakteriler karanlıkta beklerken pamuk bitkisinin kotiledon boğumları, karanfil bitkisinin yaprak eksplantları steril bisturi ve pensler yardımıyla transformasyondan hemen önce yaralanarak transformasyona hazır hale getirilmiştir.

Ekplantlar hazırlandıktan sonra bakterilerle bir araya getirilerek vakum infiltrasyonu yardımıyla 20 dakika boyunca farklı vakum basınçlarında transformasyon gerçekleştirilmiştir. Pamuk bitkilerinde vakum basıncı 500 mmHg, karanfil bitkilerinde ise vakum basıncının 300 mmHg olarak ayarlanması uygun bulunmuştur. Eksplantlar %3 sükröz %0.8 agar içeren MS besin ortamında 23 ⁰C’de 3 gün boyunca karanlıkta ko-kültivasyon yapılmıştır. Ko-kültivasyon ortamında pamuk bitkisinde bitki büyüme düzenleyicilerinden 0.1 mg/l KIN kullanılmıştır. Ayrıca pamuk bitkisi için hormon içermeyen MS ortamı da denenmiştir. Karanfil bitkisi için herhangi bir büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı kullanılmıştır. Her iki bitki içinde ko-kültivasyon ortamlarına 100 mikromolar acetosyringone ve 10 mikromolar MES eklenmiştir. Ko-kültivasyondan sonra bitkiler uygun hormon kombinasyonları, sefotaksim ve amonyum glufosinate kullanılarak seçim ortamına transfer edilmiştir. Bitkiler 23 ⁰C’de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ortamda 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğuna sahip floresan lambalar kullanılarak kültüre alınmıştır. Eksplantlar maksimum 3 haftada bir alt kültüre alınarak besin ortamı tazelenmiştir.

3.2.2.6. Transformasyon sonrası rejenerasyon

Transformasyon sonrası aşırı strese giren bitki eksplantları ko-kültivasyon ortamından alınıp uygun büyüme düzenleyicileri, sefotaksim ve bar içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Bu ortamların transformasyon öncesi optimizasyon çalışmaları yapılarak rejenerasyon ve köklenme kabiliyetleri belirlenmiştir.

3.2.2.6.1. Pamuk bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon

Pamuk bitkisinde ko-kültivasyon sonrasında seçim ortamına alındığında kararma problemi oluşmuştur. Bu problem nedeniyle çeşitli önlemler alınmıştır. Bitkilerin büyüme düzenleyicilerine verdikleri tepkiler transformasyon öncesine göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle hem kararma problemini aşmak için hem de bitki

ekplantlarının daha verimli kalması amacıyla ortamlara 1.5 g/l aktif karbon ve 10 mg/l gümüş nitrat ilave edilmiştir.

3.2.2.6.2. Karanfil bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon

Transformasyon sonrası ko-kültüre alınan bitki ekplantları seçim ortamına alındığında tıpkı pamuk bitkisi gibi büyüme düzenleyicilerine verdikleri tepkiler değişmiştir. Özellikle sürgün uyarımında ve köklenmede transformasyon öncesine göre hormon konsantrasyonları tekrar optimize edilmiştir. Transformasyon öncesinde kallus oluşumu, kalluslardan sürgün oluşumu ve köklenmesi daha hızlı gerçekleşirken transformasyon sonrasında bu sürecin uzadığı tespit edilmiştir.

3.2.2.6.1. Köklenen bitkilerin aklimatizasyonu

Transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştiren eksplantlar çeşitli büyüme düzenleyicileri kullanılarak köklendirildikten sonra dış ortama alıştırılması gerekmektedir. Bitki doku kültürü ortamlarında eksplantlar yüksek nem altında yetiştirilip köklendirildiğinden dolayı bitkiler kademeli olarak dış ortama alıştırılmıştır. Bitkiciklerin gövde ve özellikle kök kısımlarındaki agar kalıntıları iyice yıkanıp toprağa transfer edilmiştir.

3.2.3. Genetik transformasyonun moleküler düzeyde doğrulanması

Genetik transformasyonun moleküler düzeyde doğrulanması için PCR ve Southern Blot analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Potansiyel transgenik bitki yapraklarından genomik DNA izolasyonları Qiagen DNeasy Plant Mini Kit ve Vivantis Plant DNA Extraction kit manuellere uyularak gerçekleştirilmiştir

3.2.3.2. PCR analizleri

PCR analizlerini gerçekleştirmek için olası transgenik bitkilerin ve kontrol bitkilerin (transformasyon yapılmayan) genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu için 0.1 gram bitki genç yapraklarından alınarak önceden soğutulmuş havanlar içerisinde sıvı azot yardımıyla iyice parçalanarak toz haline getirilmiştir. Genomik DNA izolasyonları üretici firmaların önerileri doğrultusunda Qiagen DNeasy Plant Mini Kit ve Vivantis Plant DNA Extraction kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR analizleri *Bar* ve *35S* genlerinin primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Bar* geninin çoğaltımı için ‘cttcagcaggtgggtgta’ primer forward ve ‘acaagcacggtcaacttc’ primer reverse kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Primer bağlanma sıcaklığı 49.1 °C olarak hesaplanıp kullanılmıştır. *35S* geninin çoğaltımı için ‘gccatcattgcgataaagg’ primer forward ve ‘ggtcttgcaaggatagtg’ primer reverse kullanılmıştır. Primer bağlanma sıcaklığı 48.1 °C olarak hesaplanıp kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Olası transgenik bitkilerin doğrulanması için kullanılan gen bölgeleri ve primerler

Gen bölgesi	Primeler	Çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu (bp)
<i>Bar</i>	F:CTTCAGCAGGTGGGTGTA R:ACAAGCACGGTCAACTTC	246 bp
<i>35S</i>	F:GCCATCATTGCGATAAAGG R:GGTCTTGCAAGGATAGTG	195 bp

PCR analizlerinin döngü basamakları ve zamanlarına ait bilgiler Çizelge 3.4’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. PCR döngü basamakları ve zamanları

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	
Primerlerin bağlanması	-	45sn	35
Uzama	72 °C	45 sn	
Final uzama	72 °C	10 dk	

10X TBE tampon ((1L stok) 108 gr tris base, 55 gr borik asit, 40 ml 0.5 M EDTA pH:8) ve 50X TAE ((1 L stok) 242 tris base, 57.1 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA pH:8) bufferlarının her ikisinde bu çalışma sırasında denenerak kullanılmıştır. PCR ürünlerini görüntülemek için 0.5X TBE veya 1X TAE buffer miktara göre %0.8 agaroz jel olacak şekilde mikrodalga fırında çözdürülmüştür. Sıcaklık 55-60 °C düştüğünde DNA'nın transilliminatörde UV altında görünebilmesi için etidyum bromür ilave edilmiştir. Elektroforez işlemi 80-100 V aralığında gerçekleştirilmiştir. DNA'lar yeterince koşturulduktan sonra elektroforez sonlandırılıp jel transilliminatörde kontrol edilerek fotoğraflanmıştır.

3.2.3.3. Southern blot analizi

Genomik DNA ile gene özgü spesifik primerlerle PCR yapılmıştır. Ardından genomik DNA'lar pEarlyGate103 vektörleri çoklu klonlama bölgesi (MCS) içinden seçilen SacI restriksiyon enzimiyle kesilerek Southern Blot analizinde kullanılmıştır. Analiz Maniatis vd. (1982), tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA parçaları %1'lik agaroz jelde yürütülerek ayrıştırılmıştır. 10X SSC çözeltisi ((1L 20X SSC stok) 175 gr NaCl, 88 gr Na₃ sitrat 2H₂O) kullanılarak blot yapılmış ve jeldeki DNA örnekleri artı yüklü naylon membrana (Amersham Hybond+) transfer edilmiştir. Naylon membrana aktarılan DNA parçaları 80°C'de 2 saat bekletilerek membrana sabitlenmiştir. Hibridizasyon, digoksinin (DIG) ile işaretlenmiş, *miR408* genine özgü DNA probu olan 35S kullanılarak uygun hibridizasyon sıcaklığında 16 saat süreyle hibridizasyona tabi tutulmuştur. Hibridizasyon sonrasında membran yıkanmış ve Anti-DIG alkalın fosfataz (Roche DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II) ve CDP-Star (Biolabs) kullanılarak membran üzerindeki sinyal görüntülenmeye hazır hale getirilmiştir. Görüntüleme, membran üzerindeki ışımaya maruz bırakılan X-ışınlarına duyarlı bir film aracılığı ile karanlık odada gerekli banyo solüsyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Transgenik bitkilerde bor toleransının analizi

Transgenik bitkilerde bor toleransının analizleri hem gen ifadesi düzeyinde hem de biyokimyasal olarak gerçekleştirilmiştir. F1 jenerasyon transgenik bitkiler 40 gün

boyunca ½ Hoagland çözültüsüyle sulanıp yetiştirilmiştir. Daha sonra ½ Hoagland çözültüsünün içerisine 7.5 mM H₃BO₃ uygulanarak bitkilerin bor tolerans analizleri kontrol bitkiler ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bitkiler 40. gün gelişimlerini tamamladıktan sonra verilen stres, 1. gün (41. gün) ve 5. gün (45. gün) olmak üzere iki farklı günde örnekler toplanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi

Gen ifadesi düzeyinde analizlerin gerçekleştirilebilmesi için RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA moleküllerinin kalitesi ve miktarı belirlendikten sonra cDNA Sentez Kiti yardımıyla cDNA'lar elde edilmiştir. Sonra genlere spesifik (Çizelge 3.5) olarak hazırlanan primerler kullanılarak semi kantitatif RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR döngü zamanları Çizelge 3.4 ile aynı iken döngü sayısı 28 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bantlar %0.8'lik agaroz jel üzerinde ayrıştırılarak Biolab UV Tech jel görüntüleme sistemiyle görüntülenmiştir. Görüntülenen bantlar NIH (National Institute of Health) tarafından geliştirilen ImageJ yazılımı ile analiz edilerek gen ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar belirlenmiştir.

3.2.4.1.1. Genlere spesifik primerlerin dizaynı

Gen bankası erişim numaraları tabloda (Çizelge 3.5) belirtilen genlere ait mRNA dizilimlerine NCBI (National Center For Biotechnology Information) veri tabanından erişilmiştir. Her bir gen için RT-PCR'da kullanılmak üzere spesifik primerler tasarlanmıştır.

Çizelge 3.5. Gen bankası erişim numaraları

Bitki	Gen	Erişim numarası
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Plastocyanin</i>	CD486298
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PIP1;1</i>	EF079900
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>PIP2;1</i>	EF079901
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Boron transporter 1</i>	XM_016886698
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Boron transporter 2</i>	XM_016863428
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase (MAPK)</i>	DQ132852
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>NADPH:cytochrome P450 reductase 2 (CPR2)</i>	FJ719369
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Translation elongation factor 1A-8 (EF1A8)</i>	DQ174257

Çizelge 3.5’de belirtilen gen bölgelerine özgü primerler, PrimerPremier 6.0, CA, ABD primer tasarım programıyla tasarlanmıştır.

3.2.4.1.2. RNA izolasyonu

Pamuk yapraklarından RNA izolasyonu guanidin-izotiyosiyanat lisis ve silika-membran saflaştırması metodlarına dayalı Qiagen RNeasy bitki mini kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen toplam RNA’ların miktarı spektrofotometrik olarak Nanodrop 2000 ile kalitesi ise %1’lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılıp görüntülenerek belirlenmiştir.

3.2.4.1.3. Ters transkripsiyon

Elde edilen RNA moleküllerinden Fermentas First Strand cDNA Sentez Kiti (Fermentas, ABD) kullanılarak oligodT primerleri yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. Biyokimyasal analizler

3.2.4.2.1. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Hücre zarı hasarının belirlenmesi amacıyla MDA miktarları Ohkawa vd. (1979) metoduna göre hesaplanmıştır. Başlangıçta 0.2 g gövde dokusu sıvı azotla homojenize edilerek 1 ml %5 trikloroasetik asit (TCA) eklenmiştir. Santrifüjü takiben aynı hacimde %20'lik TCA içinde %0.5 tiobarbiturik asit (TBA) eklenerek 96 °C'de 25 dakika bekletilmiştir. Örnekler buz içinde soğutularak absorbans 532 nm'de okunmuştur. Spesifik olmayan absorbans ise 600 nm'de belirlenerek ilk absorbans değerinden çıkartılmıştır.

3.2.4.2.2. İyon sızıntısı

İyon sızıntısı Nanjo vd. (1999) yöntemiyle yaprakların 0.4 M mannitol içeren test tüplerinde 3 saat çalkalanarak bekletilmiştir. Elektriksel iletkenlik 0.01 mSs/cm-300 mSs/cm aralığında ölçüm yapabilen Thermo Scientific Orion 013016MD MD 2 kondaktivimetre probu kullanılarak C1 olarak belirlenmiştir. Kaynayan suda 10 dakika bekletilip oda ısısına soğutulan örneklere C2 okuması yapıp sızıntıya bağlı iletkenlik $[(C1/C2) \times 100]$ formülüyle hesaplanmıştır.

3.2.4.2.3. Bağlı su içerikleri

Bağlı su içerikleri (BSU), Smart ve Bingham (1974)'a göre $BSU (\%) = [(YA - KA)/(TA - KA)] \times 100$ formülüne göre belirlenmiştir. Turgid ağırlık, dokuların 24 saat oda ısısında distile su içinde bekletilmesiyle hesaplanmıştır.

3.2.4.2.4. Prolin

Prolin miktarları Bates vd. (1973), metoduna göre belirlenmiştir. Başlangıçta 0,2 g örnek sıvı azotla parçalanarak 1 ml %3 sülfosalisilik asit içinde çözdürülmüştür. Ardından 0.1 ml supernatant, 0.2 ml asid ninhidrin, 0.2 ml %96 asetik asit ve 0.1 ml %3 sülfosalisilik asitle karıştırılmıştır. Karışımlar 96°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 ml toluenle karıştırılarak tekrar santrifüjlenmiştir. Üst fazın absorbans değeri 520 nm'de okunarak prolin miktarları belirlenmiştir.

3.2.4.2.5. Toplam klorofil miktarının belirlenmesi

Toplam klorofil miktarları metanol bazlı metod esas alınarak belirlenmiştir (Lichtenthaler ve Wellburn, 1983). Hazırlanan dokular metanolle homojenize edilerek 23 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant metanol ile karıştırılarak 653 ve 666 nm'de absorbansı okunmuştur. Klorofil a ve klorofil b içeriklerinin hesaplanmasından sonra total klorofil miktarları belirlenmiştir.

3.2.5. İstatistiksel analizler

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 16.0 programıyla değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar One Way Anova, Tukey Testi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, pamuk ve karanfil bitkilerinde *mir408* geninin *Agrobacterium* aracılığıyla genetik transformasyonunun, bitkilerin bor toleransı üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda öncelikle, bitkilerin doku kültüründe yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlardan yetiştirilmesi ve farklı büyüme düzenleyiciler ile birlikte rejenerasyon potansiyellerinin tam anlamıyla belirlenmesi sağlanmıştır. Transformasyon sürecinde kullanılan bakteri suşu, ko-kültivasyon ve seçilim ortamlarının optimizasyonları yapılmıştır. Seçilim yapılarak elde edilen bitkiler PCR ve Southern Blot yapılarak doğrulanmıştır. Transgenik bitkiler büyütülerek tohum elde edilmiştir. Bor stresi altında transgenik bitkilerin gösterdiği tepkiler kontrol bitkilerle kıyaslamalı olarak biyokimyasal ve moleküler olarak araştırılmıştır.

4.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu ve *In Vitro* Çimlendirilmesi

Bitki doku kültürü çalışmalarının önemli adımlarından bir tanesi olan yüzey sterilizasyon koşullarının belirlenmesi *in vitro* çalışmalar için önemlidir. Yüzey sterilizasyon protokolü seçilirken tohuma en az zarar veren ve her türlü enfeksiyonu engelleyen en düşük dozun belirlenmesi gerekmektedir. Nitekim yapılan denemeler sonrasında en uygun sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir.

Çok sayıda sterilizasyon ortamı denenmiş olmakla birlikte optimum çimlenmenin pamuk bitkisi için %10'luk sodyum hipoklorit içerisinde 7 dakika, karanfil bitkisi için %20'lik sodyum hipoklorit içerisinde 10 dakika muamele edilmesi en uygun sterilizasyon protokolü olarak belirlenmiştir. Şekil 4.1'de pamuk bitkisinde ait doku kültürü çimlenme fotoğrafı verilmiştir. Şekil 4.2'de ise karanfil bitkisine ait doku kültürü çimlenme fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 4.1. Pamuk bitkisinin *in vitro* çimlendirilmesi

Yüze sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlardan her iki bitki içinde %0, %1.5, %3 sükröz içeren ½ MS ve 1/1 MS ortamları ayrı ayrı denenmiş fakat çimlenme oranının kayda değer olarak değişmediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak optimum çimlenme oranı %3 sükröz içeren ½ MS besin ortamında pamuk bitkisi için yaklaşık %85 karanfil bitkisi için %60 oranında gerçekleşmiştir.



Şekil 4.2. Karanfil bitkisinin *in vitro* çimlendirilmesi

4.2. Doku kültürü ile Rejenerasyonun Optimizasyonu

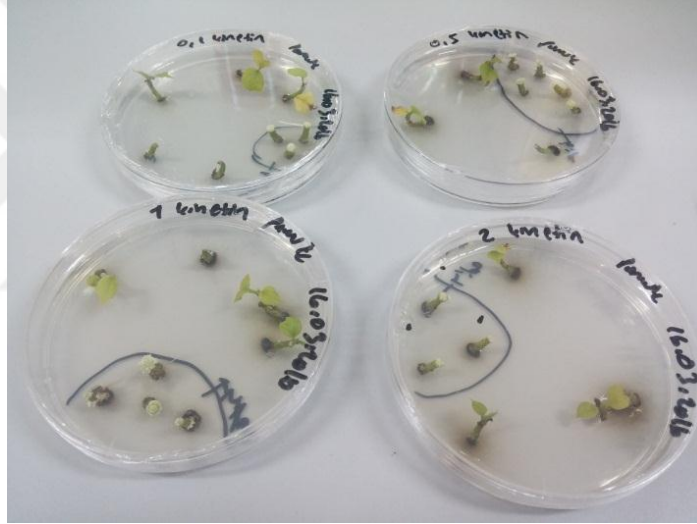
Genetik transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmek için *in vitro* şartlarda çalışılan bitki, hatta çeşit için rejenerasyon protokolleri geliştirmek bir ön koşuldur. Bu nedenle pamuk ve karanfil bitkileri için uygun ortam ve büyüme düzenleyicileri tespit etmek çalışmanın kritik noktalarından bir tanesini oluşturmaktadır. Nitekim yapılan çalışmalarla her iki bitki içinde sürgün rejenerasyonun optimizasyonu sağlanmıştır.

4.2.1. Pamuk bitkisinin gen transferine uygun sürgün rejenerasyonunun optimizasyonu

Pamuk bitkisinde yaprak ve hipokotil gibi eksplantlar kullanarak kallus yoluyla sürgün elde etmenin son derece zor ve uzun zaman aldığı çok sayıda araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Hem aydınlık hem karanlık ortam şartlarında, 5 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında kallus elde edilmesi için sayısız denemeler yapılmıştır. Ayrıca ½ MS besin ortamına eklenen 0.1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l 2,4 D + 0.5 mg/l KIN hormon kombinasyonları denenmiş ve sonuç olarak kallus oluşumunun hipokotil eksplantlarında görüldüğü tespit edilmiştir. Şekil 4.3'de pamuk bitkisinden elde edilen kalluslardan sürgün rejenerasyonu görülmektedir. Şekil 4.4'de görselleri paylaşılan KIN hormon kombinasyonlarının en uygunu 0.1 mg/l olarak belirlenmiştir



Şekil 4.3. Pamuk bitkisinde kallustan sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.4. Pamuk bitkisinde optimum kinetin ortamı oranını belirleme

Çalışma boyunca kallustan bitki rejenerasyonu başarılı olmuş olsa da etkili bir rejenerasyon oluşmadığı için kotiledon boğumlarından transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Transformasyon çalışmalarında 0.1 mg/l KIN sürgün rejenerasyonu için kullanılmıştır. Çizelge 4.1'de pamuk bitkisinde rejenerasyonun optimizasyonu için denenen hormon konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Pamuk bitkisinde rejenerasyonun için kullanılan farklı hormon konsantrasyonları

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)							Kotiledon boğumu		Kallus oluşumu %
IBA	2,4-D	KIN	TDZ	NAA	ZEA	BAP	Rejenerasyon oranı (%)	Sürgün/eksplant sayısı	Hipokotil
-	0.1	0.5	-	-		-	-	1	100
-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-
0.1	-	0.1	-	-		-	-	-	-
-	-	-	-	2	0.1	-	-	-	-
-	-	-	0,1	-	-	-	100	-	-
-	-	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-
-	-	0.1	-	-	-	-	100	1	-
0.1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	0.1	100	1	-
-	-	-	-	0.1		0.5	-	-	100
-	-	-	-	5	-		-	-	60

4.2.2. Karanfil bitkisinin gen transferine uygun sürgün rejenerasyonunun optimizasyonu

Karanfil bitkisi için en uygun kallus ortamının 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA içeren ½ MS besin ortamı olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen kalluslardan 2 mg/l BAP hormon konsantrasyonu kullanılarak sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesinde 1 mg/l IBA konsantrasyonu kullanılmıştır. Köklenen sürgünler hormonsuz ½ MS ortamına aktarılarak bitkilerin büyümesi sağlanmıştır. Çizelge 4.2’de karanfil bitkisinde rejenerasyonun optimizasyonu için kullanılan farklı hormon konsantrasyonlarına ait bilgiler gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. Karanfil bitkisinde rejenerasyonun optimizasyonu için kullanılan farklı hormon konsantrasyonları

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)							Sürgün/eksplant sayısı	Kallus oluşumu %	
IBA	2,4-D	KIN	TDZ	NAA	ZEA	BAP	-	Hipokotil	Yaprak
-	-	-	1	0.1	-	-	-	100	100
-	-	-	-	-	-	1	15	-	-
-	-	-	-	-	-	2	22	-	-
0.1	0.1	-	-	-	-	-	-	60	60
-	-	-	-	0,02	-	2	7		
-	0.5	-	-	-	-	-	-	80	40
-	-	-	-	0.9	-	0.9	-	-	-
-	-	2	-	0.02	-	-	4	-	-

4.3. Transformasyon Çalışmaları

Transformasyon çalışmaları pamuk ve karanfil bitkileri için uygun eksplantlar kullanılarak vakum infiltrasyonu ile birlikte *Agrobacterium* aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Transformasyon çalışmalarına başlamadan önce *BOR2* geninin klonlanması ve ideal *Agrobacterium* suşunun GUS boyama ile seçim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra pamuk ve karanfil bitkilerine *miR408* geninin transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

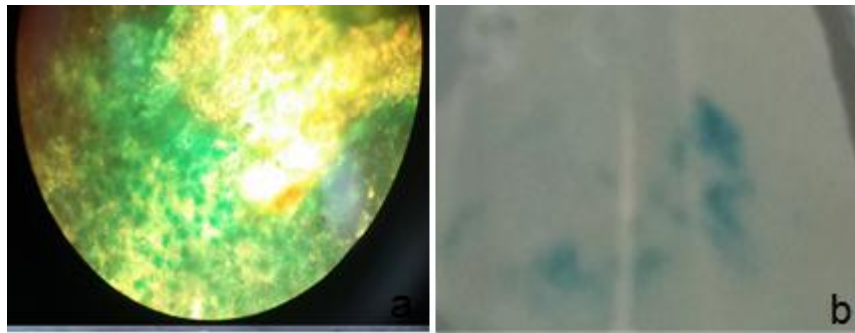
4.3.1. *BOR2* geninin klonlanması

BOR2 geninin klonlanması için 12 farklı arpa çeşidi kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiş fakat tüm denemelere rağmen temin edilen bitki çeşitlerinden *BOR2* geni çoğaltılamadığı için klonlama gerçekleştirilememiştir. Cezayir arpa çeşidi olan Sahara 3771'in bu genin etkili bir homologunu ihtiva ettiği ilgili literatürde belirtildiğinden bu arpa çeşidinin temin edilmesi için çok sayıda araştırma grubuyla bağlantı kurulmuş fakat temin edilememiştir. Bu genin sentetik olarak üretiminin çok maliyetli olması nedeniyle de yalnızca *miR408* geniyle transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Genetik transformasyonda kullanılacak bakteri hatlarının GUS boyamayla seçilimi

GUS geni ihtiva eden pCAMBIA2301 daha önceden kompetan hale getirilmiş EHA105 ve LBA4404 *Agrobacterium* suşlarına ısı şoku yardımıyla aktarılmış ve bakteriler optimum suşun seçilimi amacıyla bitki transformasyonunda kullanılmıştır. Pamuk ve karanfil bitkileri için iki farklı *Agrobacterium* suşuyla transformasyon sonrasında çeşitli eksplantlarda *GUS* boyama gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5).

GUS analizi öncesinde transformasyona yatkın ve rejenerasyon potansiyeli yüksek eksplantlar belirlenmiştir. *GUS* geni içeren pCAMBIA2301 vektörünü taşıyan LBA4404 ve EHA105 *Agrobacterium* suşları kullanılarak bitki transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Genetik transformasyon vakum infiltrasyonu yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Transformasyon çalışmalarında hangi *Agrobacterium* suşunun daha başarılı olduğunun belirlenmesi için *GUS* boyama gerçekleştirilmiştir. Bu analiz çok defa tekrar edilip önemli bulgular elde edilmiştir. EHA105 suşunun LBA4404 suşuna göre daha etkin bir transformasyon başarısı gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca vakum basıncının pamuk ve karanfil bitkilerinin transformasyon başarısında etkili olduğu gözlemlenmiştir. Pamuk bitkilerinde vakum infiltrasyonu için optimum değer 500 mmHg olarak belirlenmiştir. Pamuktan farklı olarak karanfil bitkisi için vakum infiltrasyonu 300 mmHg ve 500 mmHg olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. GUS boyamasına ait görüntüler a) pamuk b) karanfil

4.3.3. Pamuk bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon

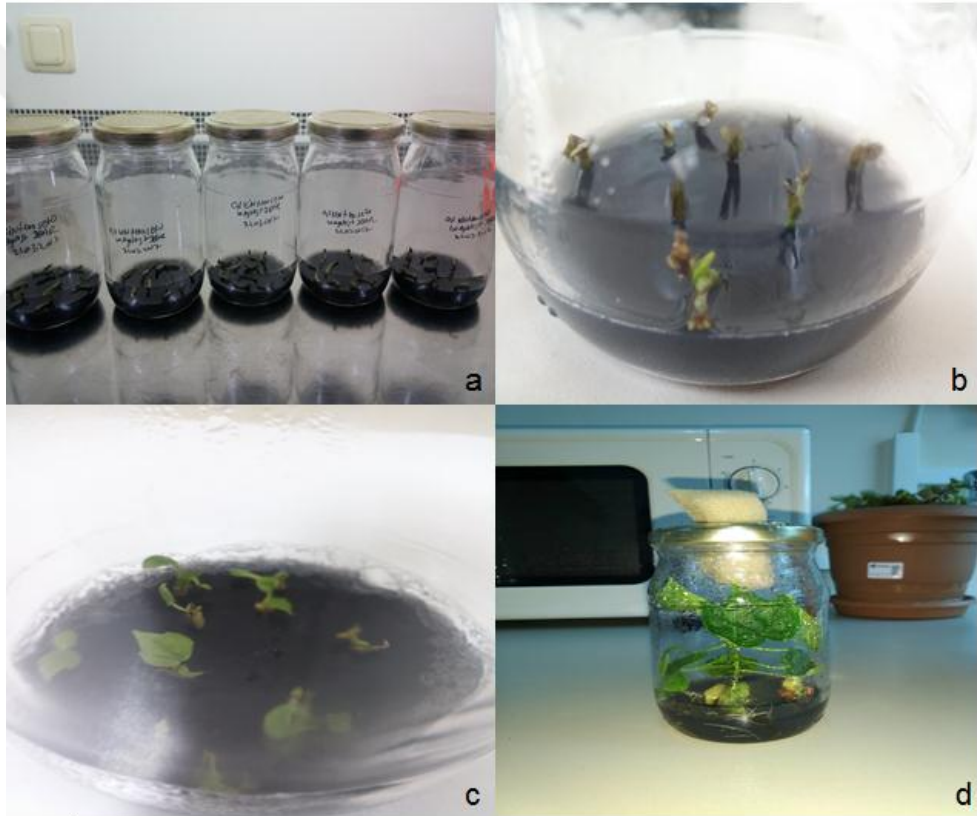
Pamuk eksplantları ko-kültivasyon ortamından alınıp seçilim (bar) için uygun büyüme düzenleyicileri ve sefotaksim içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Pamuk bitkisinde transformasyon öncesi farklı büyüme düzenleyicilerini içeren birçok ortam denenmiştir. Bu büyümeyi düzenleyicilerden sürgün uyarımı konusunda en iyi olduğu gözlenen 0.1 KIN kullanılmıştır. Transformasyon sonrası olası transgenik hatların belirlenmesi için ammonium glufosinate ile herbisit seçilimi yapılmıştır. Herbisit 'Ammonium glufosinate' seçilim konsantrasyonunun belirlenmesi için transformasyon öncesi kontrol bitkilerle deneme yapılmıştır. 1 mg/l, 2mg/l ve 3 mg/l Ammonium glufosinate konsantrasyonları uygulanmıştır. Şekil 4.6'da belirtilen konsantrasyonlara ait denemelerin fotoğrafları paylaşılmıştır.



Şekil 4.6. Pamuk yabancı kontrol bitkilerle herbisit seçilimi, petri tabakları soldan sağa sırasıyla 1 mg/l, 2mg/l ve 3 mg/l amonyum glufosinat seçilimini temsil etmektedir.

Bitkiler MS ortamlarına ek olarak 2 mg/l herbisit uygulamasında ölmesine rağmen transgenik bitkilerin seçilim oranını artırmak için 3 mg/l herbisit kullanılmıştır. Transformasyonu gerçekleştirilen eksplantlar 0.1 mg/l KIN + 100 mg/l sefotaksim + 3 mg/l ammonium glufosinate içeren MS/MS ortamında seçilim başlatılmıştır. Bitki eksplantlarında transformasyon öncesinde başlayan kısmi kararma transformasyon

sonrasında artarak eksplantların ölümüne neden olduğu için bitki doku kültürü ortamlarına aktif karbon ilave edilmiştir. Aktif karbon litreye 1 ile 1.5 gram arasında uygulanmıştır. Aktif karbon ilavesiyle bitki eksplantlarındaki kararma azalmıştır. Daha sonra bu ortamlara Gümüş Nitrat (AgNO_3) ilave edilmiştir. Yani aktif karbonlu MS besin ortamı 0.1 mg/l KIN + 100 mg/l sefotaksim + 3 mg/l ammonium glufosinate + 10 mg/l AgNO_3 içermektedir. Bu ortamda başarılı bir şekilde rejenerasyon olan bitkiler ayrılarak ortamlar tazelenmiştir. Bu aşamada tamamen kararmış veya rejenerasyon olamayacak kadar kötü durumda olan eksplantlar ortamlardan derhal uzaklaştırılmıştır. Şekil 4.7’de pamuk bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon görsel olarak sunulmuştur.



Şekil 4.7. Pamuk bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon a) ko-kültivasyondan alınan eksplantların seçilim ortamına aktarılması b,c) seçilim ortamında rejenerasyon d) bitkilerin köklenmesi ve seçilimin tamamlanması

Şekil 4.6’da kontrol bitkilerle yapılan ammonium glufosinate seçilimi Şekil 4.7’de görüldüğü gibi transgenik bitkilere uygulanmıştır. Şekil 4.7.a, ko-kültivasyondan alınan eksplantların seçilim ortamına aktarılmasını temsil etmektedir. Bu

eksplantlardan kararanlar derhal ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha iyi durumdakiler bir araya getirilerek gözlemlenmeye devam edilmiştir (Şekil 4.7.b). Ardından çok sayıda eksplantlardan rejenerasyon belirtisi gösterenler tek bir kavnozda toplanıp seçilime devam edilmiştir (Şekil 4.7.c). Son olarak uzun süre seçilimi gerçekleştirilen bitkiler köklendirilip aklimatizasyona hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.7.d).

4.3.4. Pamuk bitkisinin transformasyon sonrası köklendirilmesi

Transformasyon öncesi 0.1 mg/l KIN içeren MS ortamında rejenerasyon olan pamuk eksplantlarının bir süre sonra kök oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir. Fakat oluşan köklerin çok zayıf ve kırılkan olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bitkicikler köklendirilmek için 1 mg/l IBA içeren ortamlara transfer edilerek belli miktar tutulduktan sonra hormonsuz MS ortamında köklenmenin ve bitki gelişiminin devamlılığı sağlanmıştır.

Transformasyon sonrasında bitki eksplantlarının hızla kararması nedeniyle elde edilen sürgünlerde aktif karbonlu ortamlarda köklendirilmiştir. Fakat transformasyon sonrası elde edilen sürgünlerin köklenmesi süresi uzamıştır. 1 mg/l IBA içeren ortamlarda köklenme sağlanmıştır. Bitkiler köklendikten sonra IBA içeren ortamda yetiştirilmeye devam ederse köklenen bölgede kallus başlangıcı meydana gelerek kökleri kırılkan hale getirmektedir. Bu nedenle köklenme süresi çok önemlidir. Köklenen bitkiciklerin hormonsuz MS ortamına transfer edilerek gelişimleri sağlandıktan sonra aklimatizasyon aşamasına geçilmiştir.

4.3.5. Karanfil bitkisinde transformasyon sonrası rejenerasyon

Karanfil eksplantları ko-kültivasyon ortamından alınıp seçim (bar) için uygun büyüme düzenleyicileri ve sefotaksim içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Karanfil bitkisinde transformasyon öncesinde sürgün gelişimi, kallus uyarımı ve köklenmeyi sağlayan çok sayıda ortam denenmiştir. Karanfil bitkisinde kallus aracılığıyla çok sayıda sürgün elde edilebileceğinden kallus gelişimi sağlanıp sürgünler elde edilmiştir. Kallus eldesi için en uygun ortamın 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA olduğu belirlenmiştir. Elde edilen embriyogenik kalluslardan sürgün gelişimi

sağlanmıştır. Sürgün gelişimi bazı kalluslardan 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. Fakat sürgün çoğaltımı temel olarak embriyogenik kallusların hormonsuz MS besin ortamına transferiyle olmuştur. Sürgünlerin çoğaltımı ise 2 mg/l BAP içeren MS besin ortamıyla sağlanmıştır. Daha sonra oluşan sürgünler 1 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirilmiştir.

Transformasyon sonrası olası transgenik hatların belirlenmesi için ammonium glufosinate ile herbisit seçilimi yapılmıştır. Herbisit 'Ammonium glufosinate' seçilim konsantrasyonunun belirlenmesi için transformasyon öncesi wild type bitkilerle deneme yapılmıştır. Bu kapsamda eksplantlara 0.125 mg/l, 0.25 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l, 2mg/l ve 3 mg/l ammonium glufosinate konsantrasyonları uygulanmıştır. Şekil 4.8'de 0.125 mg/l, 0.25 mg/l ve 0.5 mg/l konsantrasyonlara ait denemeler gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Karanfil yabani kontrol bitkilerle herbisit seçilimi, petri tabakları soldan sağa sırasıyla 0.125 mg/l, 0.25 mg/l ve 0.5 mg/l amonyum glufosinat seçilimini temsil etmektedir.

Transformasyonu gerçekleştirilen eksplantlar 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA + 100 mg/l sefotaksim + 0.5 mg/l ammonium glufosinate içeren MS/MS ortamında seçilim başlatılmıştır. Wild type eksplantların 0.5 mg/l ammonium glufosinate seçiliminde yaşamları son bulmaktadır. Bu sonuçlara dayanarak olası transgenik hatların seçiliminde 0.5 mg/l ammonium glufosinate kullanımı tercih edilmiştir.

Transformasyon sonrası bitki eksplantları seçim için 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA + 100 mg/l sefotaksim + 0.5 mg/l ammonium glufosinate içeren ortamda seçilime bırakılmıştır. Ortama gümüş nitrat ($AgNO_3$) da ilave edilmiş fakat olumlu bir etki gözlemlenmediğinden çıkarılmıştır. Bitki eksplantları maksimum 3 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Şekil 4.9'da karanfilde transformasyon sonrası kallus ve sürgün oluşumu gösterilmektedir. Transformasyon sonrasında ko-kültivasyon ortamından alınan eksplantlar Şekil 4.9.a'da görüldüğü gibi 0.5 mg/l ammonium glufosinate içeren ortamda belirtilen uygun büyüme düzenleyiciler ile birlikte kültüre alınmıştır. Eksplantlardan kallus oluşumu Şekil 4.9.b'de görülmektedir. Kallus oluşturmayan yaprak eksplantları ve kallus oluşturan yaprak eksplantlarının kallus oluşturmayan kısımları ortamı kararttığı için uzaklaştırılmıştır. Belirlenen herbisit konsantrasyonunda kalluslar büyümeye devam etmiştir (Şekil 4.9.c). Kalluslardan sürgün oluşumu ise Şekil 4.9.d'de görülmektedir.



Şekil 4.9. Karanfil’de transformasyon sonrası kallus ve sürgünlerin oluşması a) Ko-kültivasyon sonrasında eksplantların seçim ortamına transferi b) Ekplantlardan olası transgenik kallusların meydana gelmesi c) Kallusların görünüşleri d) Karanfil bitkisinde kalluslardan sürgün oluşumu

4.3.6. Karanfil bitkisinin transformasyon sonrası köklendirilmesi

Karanfil bitkisinde transformasyon öncesinde sürgünlerin köklendirilmesi için 1 mg/l IBA kullanılmıştır. Fakat transformasyon sonrasında seçim ortamında elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için 1 mg/l IBA uygulandığında köklenme kısmen başarısız olmuştur. Transformasyon sonrası 1 mg/l IBA kullanıldığında köklenme süresi öncesine göre çok aşırı uzamaktadır. Köklenme başarısı açısından bu konsantrasyonun transformasyon öncesine göre yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle IBA miktarı artırılarak 1.5 mg/l ve 2 mg/l'ye çıkarılmıştır. Sonuç olarak 2 mg/l IBA kullanılarak transformasyon öncesi kullanılan 1 mg/l IBA kadar köklenme başarısı olmasada yakın oranda köklenme sağlanmıştır. Karanfil bitkileri köklendirildikten sonra IBA içeren ortamdan hemen alınmalıdır. Çok uzun süre bu ortama maruz kalan köklerde kısmen kallus başlangıcı görülerek köklerin fonksiyonunu yitirmesine sebep olmaktadır. Sürgünler köklendirildikten sonra bitkiler hormonsuz MS ortamına transfer edilerek bitkilerin sürgün ve kök gelişimini tamamlamaları sağlanmıştır.

4.3.7. Bitkilerin dış ortama aklimatizasyonunun sağlanması

Doku kültürü ortamlarında başarılı bir şekilde seçilimi gerçekleştirilen sürgünler köklendirilip gelişimlerini tamandıktan sonra dış ortama alıştırılmaları gerekmektedir. Doku kültürü ortamlarında yüksek nem altında yetiştirildiği için bitkiler kademeli olarak dış ortama alıştırılmalıdır. Örneğin Şekil 4.7.d'de görülen gelişimini tamamlamış bir bitki, kökleri koparılmadan ve sürgünlerine zarar vermeden nazikçe bulunduğu ortamdan sökülüştür. Doku kültürü ortamlarından sökülen bitki kökleri ve gövdelerinin bazı kısımlarına sıvanan agar kalıntıları iyice temizlenmiştir. Doku kültürü ortamlarından sökülen bitkilerde agar sıvanmasının yanı sıra karbon kaynağı olarak sukroz kullanıldığı için bitkilerin bulaşıklı kısımları, kökleri ve sürgünleri (Şekil 4.10) incitilmeden su altında yıkanarak temizlenmiştir.



Şekil 4.10. Pamuk bitkisinin dış ortama aklimatizasyonu a) Şekil 4.7.d’de gösterilen pamuk bitkisinin sökülerek yıkanması b) Yıkanan bitkinin saksıya dikimi ve nem dengesinin sağlanması için üzerinin ışık geçirgen bir torbayla kapatılması c) Bitkilerin dış ortama tamamiyle adaptasyonu d) Bitkilerin yetişkin hale gelerek tohum verimine hazır hale gelmesi

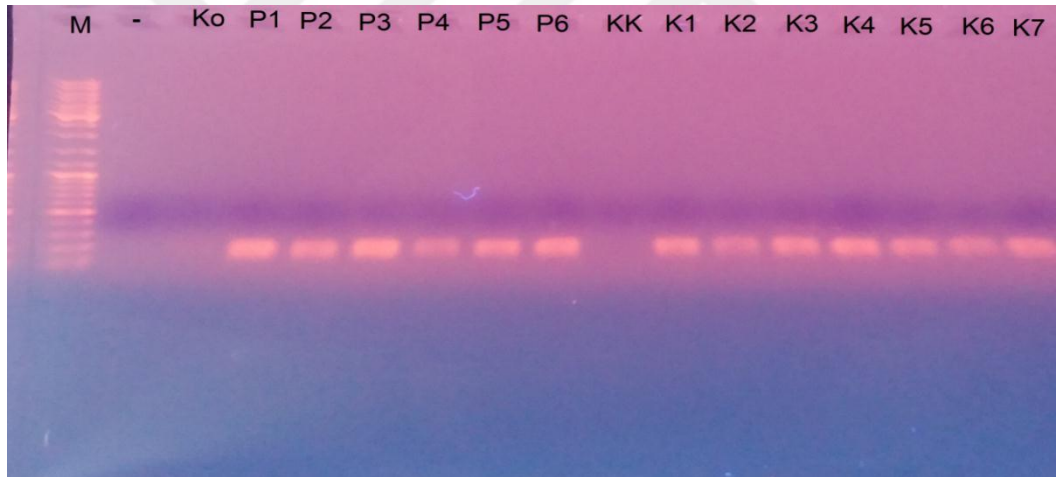
Eğer bitkiler yeterince temizlenmezse kirli kısımlarda çürüme meydana gelmektedir. Bu nedenle zor şartlarda yetiştirilen bitkilerin kaybedilme ihtimali çok yüksek olmaktadır. Bitkilerin doku kültürü ortamlarından sökülmesi için sürgün ve kök gelişimini tamamlaması beklenmiştir. Şekil 4.10.b’de görüldüğü gibi sökülüp yıkanan bitkilerin saksılara transferi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada bitkilerin ilk saksılara dikiminde can suyu verilmiştir. Daha sonra ışık geçirgen bir plastik materyalle sarılıp nem dengesi korunmuştur. Bu materyal üzerinde her gün iki adet delik açılıp bitkilerin dış ortama yavaş yavaş adaptasyonu sağlanmıştır. Şekil 4.10.c ve d’de görüldüğü gibi bitkiler dış ortama tamamen adapte olmuş ve tohum eldesi için yetiştirilmeye devam edilmiştir. Bu teknikle karanfil bitkilerinde dış ortama adaptasyonu sağlanmıştır.

4.4. Genetik Transformasyonun Moleküler Düzeyde Doğrulanması

Genetik transformasyonun doğrulanması için, herbisit seçilimiyle büyütülen olası transgenik bitkilerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin transgenik olup olmadıkları PCR ve Southern blot analizleri yapılarak doğrulanmıştır.

4.4.1. PCR analizleri

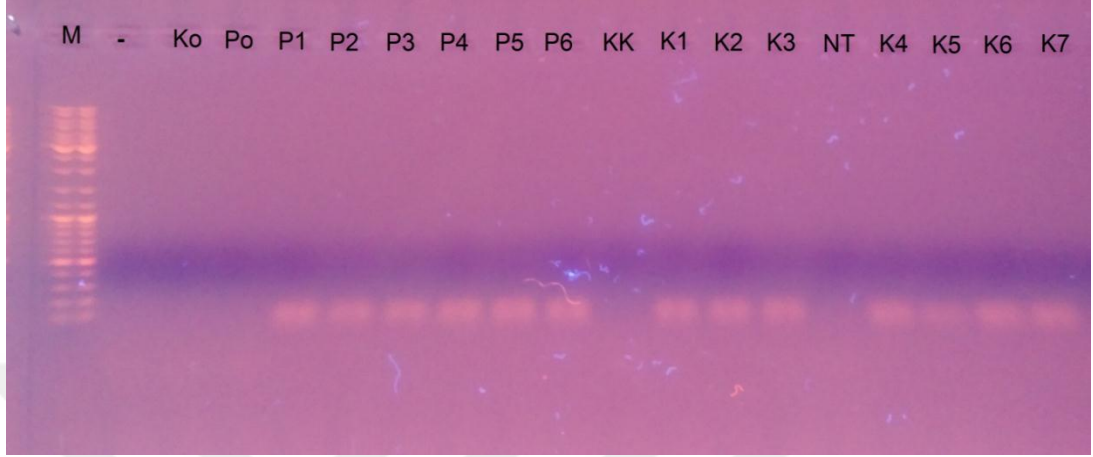
Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de sırasıyla *Bar* ve *35S* primerleriyle yapılan agaroz jel fotoğrafları paylaşılmıştır. Şekil 4.11’de verilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü *bar* seçilimi yapılan farklı transgenik bitkilerden DNA izolasyonu yapılarak Çizelge 3.3’te belirtilen *bar* primeri kullanılarak PCR yapılmasıyla elde edilmiştir.



Şekil 4.11. BAR geni taşıyan pamuk ve karanfil transgenik bitki hatlarının PCR ile teyit edilmesi

*M: Markör - : negatif kontrol (DNA içermeyen) Ko: wild type kontrol transformasyon yapılmayan P1-P6 kuyucuklar: pamuk *bar* geni taşıyan hatlar KK: karanfil kontrol wild type transformasyon yapılmayan K1-K7:Karanfil *bar* geni taşıyan hatlar.

Şekil 4.12’de verilen agoroz jel elektrofarezi görüntüsü bar seçilimi yapılan farklı transgenik bitkilerden DNA izolasyonu yapılarak Çizelge 3.3’te belirtilen 35S primeri kullanılarak PCR yapılmasıyla elde edilmiştir.



Şekil 4.12. 35S geni taşıyan pamuk ve karanfil transgenik bitki hatlarının PCR ile teyit edilmesi

*M: Markör - : negatif kontrol (DNA içermeyen) Ko: wild type kontrol transformasyon yapılmayan Po: transgenik olmayan P1-P6 kuyucuklar: pamuk 35S geni taşıyan hatlar KK: karanfil kontrol wild type transformasyon yapılmayan K1-K7: Karanfil bar geni taşıyan hatlar NT: transgenik olmayan karanfil.

PCR ile doğrulama işlemleri sonlandırıldıktan sonra Southern blot analizi yapılarak genetik transformasyonun doğrulanması tamamlanmıştır.

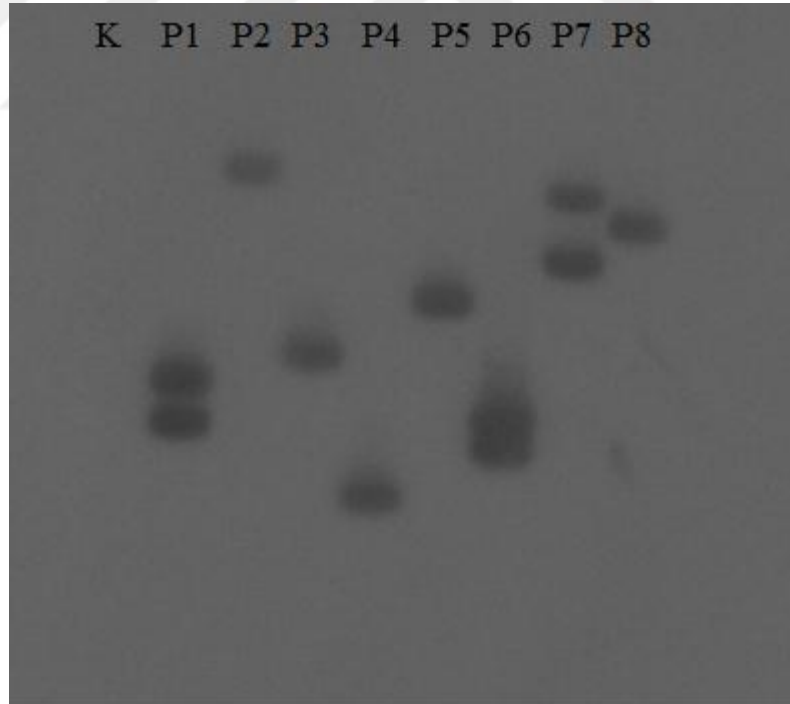
4.4.2. Southern blot analizi

Southern blot analizi gerçekleştirilerek transgenik bitki hatları doğrulanmıştır. Şekil 4.13’de görüldüğü gibi DIG ile işaretlemenin doğrulanması yapılmıştır.



Şekil. 4.13. DIG ile işaretleme nin doğrulanması

Hibridizasyon sonrasında membran yıkanmış ve Anti-DIG alkalın fosfataz (Roche) ve CDP-Star (Biolabs) kullanılarak membran üzerindeki sinyal görüntülenmeye hazır hale getirilmiştir. Görüntüleme, membran üzerindeki ışımaya maruz bırakılan X-ışınlarına duyarlı bir film aracılığı (Şekil 4.14) ile karanlık odada gerekli banyo solüsyonları (sırasıyla developer, fixer ve su) kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.14. Southern blot, x-ray film üzerinde transgenik pamuk hatlarının doğrulanması

*K: Kontrol P1-P8: Transgenik pamuk hatlarını temsil etmektedir. Soldan sağa sırasıyla P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 ve P8 olmak üzere 8 farklı transgenik pamuk hattı

elde edimiştir. P1, P6 ve P7 numaralı hatlarda iki transgen kopyasının, diğer hatlarda ise tek transgen kopyasının bitki genomuna entegre olduğu belirlenmiştir.

4.5. Pamuk Bitkisinde Bor Toleransının Analizi

Transgenik bitkilerde bor toleransının belirlenmesine geçmeden önce wild type bitkiler ile perlit üzerinde tekrar bar seçilimi (Şekil 4.15) yapılmıştır. Bitki doku kültürü ortamlarında kullanılan bar konsantrasyonunun perlit üzerinde de aynı konsantrasyonlarda bitkileri öldürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Pamuk bitkisinde perlit üzerinde bar (herbisit) seçilimi, soldan sağa sırasıyla kontrol, 2, 3, 4, 5 mg/l amonyum glufosinate içermektedir.

Şekil 4.15’de görüldüğü üzere 2 mg/l herbisit konsantrasyonunda yabancı kontrol bitkiler ölmektedir. Bu nedenle potansiyel transgenik bitkilerin seçiminde 2 mg/l amonyum glufosinate konsantrasyonu kullanılmıştır.

Yabancı kontrol pamuk bitkilerinden bor analizleri yapılarak uygulanacak bor konsantrasyonu da belirlenmiştir. Bu kapsamda kontrol, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 mM bor, ½ Hoagland çözeltisinin içerisinde (Şekil 4.16 soldan sağa sırasıyla) bitkilere uygulanmıştır. mir408 geni taşıyan transgenik pamuk bitkilerinin bor toleransının, kontrol bitkilerle kıyaslanması amacıyla 7.5 mM bor uygulanması uygun bulunmuştur.



Şekil 4.16. Pamuk bitkisinde bor toleransının belirlenmesi

4.6. Transgenik Bitkilerde Bor Toleransının Analizi

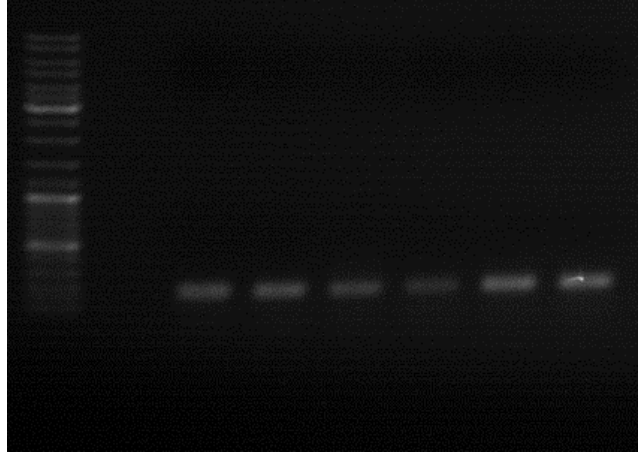
Transgenik bitkilerde bor toleransı belirleme çalışmalarından önce T1 jenerasyonuna ait tohumlar, amonyum glufosinate uygulaması altında çimlendirilerek bar seçilimi yapılmış ve Mendel kalıtım yasasına göre transgen taşımayan homozigot bitkiler ayıklanmıştır. Transgenik bitkilerde bor toleransının kontrol bitkileri ile kıyaslamalı analizleri gen ifadesi ve biyokimyasal düzeyde gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Gen ifadesi düzeyinde analizler

Pamuk bitkisinde gen ifadesi düzeyinde analizler, *Plastosiyenin*, *PIP1;1* aquaporin, *PIP:2* aquaporin, *Boron transporter 1*, *Boron transporter 2*, *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, *NADPH:cytochrome P450 reductase 2 (CPR2)*, *Translation elongation factor 1A-8*, genleriyle gerçekleştirilmiştir. Transgenik ve kontrol bitkilerin yukarıda belirlenen genlere ait ifade düzeyleri bor stresi altında araştırılmış ve *miR408* ile bahsedilen genler arasındaki etkileşim ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır.

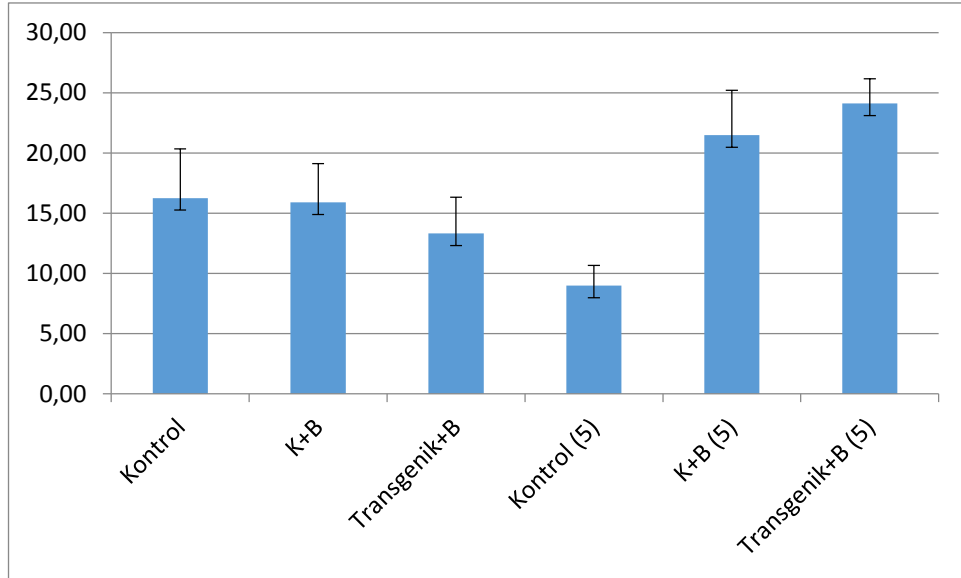
4.6.1.1. *Plastosiyenin*

Plastosiyenin gen ifadesi Şekil 4.17'de, gen ifadesine ait grafik ise Şekil 4.18'de gösterilmektedir. *Plastosiyenin* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.17'de görülen *plastosiyenin* gen ifadesine ait bantlar 215 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.17. *Plastosiyanin* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1 gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5 gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B(5), Transgenik+B(5).

Beşinci gün bor stresine tabi tutulan transgenik bitkilerin, K+B bitkilerine kıyasla *plastosiyanin* gen ifade düzeyleri yaklaşık %11, kontrol bitkilere kıyasla %62 daha fazladır. Aynı zamanda 5. gün bor stresine tabi tutulan kontrol (K+B) ve transgenik (+B) bitkilerin 1. gün bor stresinde kontrol (K+B) ve transgenik (+B) bitkilerine kıyasla *plastosiyanin* gen ifadesinin daha fazla olduğu görülmektedir.

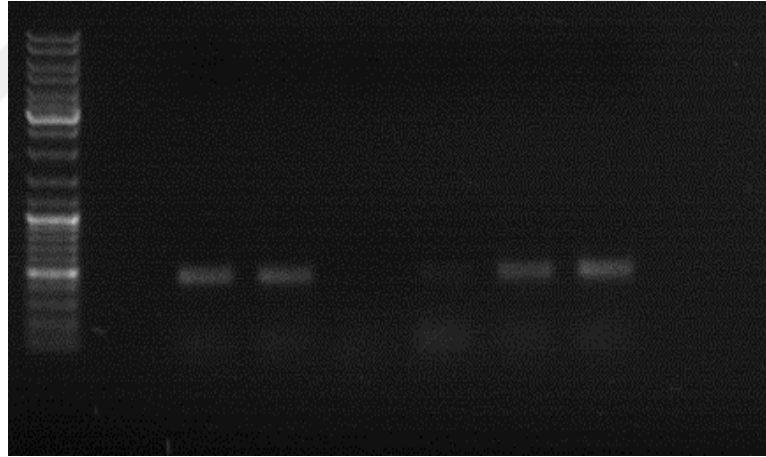


Şekil 4.18. *Plastosiyanin* gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Birinci gün bor uygulaması altında K+B içeren bitkilerin transgenik (+B) bitkilere göre *plastosiyanin* gen ifadesinin yaklaşık %16 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bor uygulanmamış kontrol (K) bitkileriyle bor uygulanan kontrol (K+B) ve transgenik bitkiler karşılaştırıldığında 1. stres günündeki değişimin 5. stres gününe kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Birinci stres gününde bor uygulanmayan kontrol bitkilerin *plastosiyanin* gen ifadelerinin bor uygulanan kontrolden %2, transgenik bitkiden ise yaklaşık %18 daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

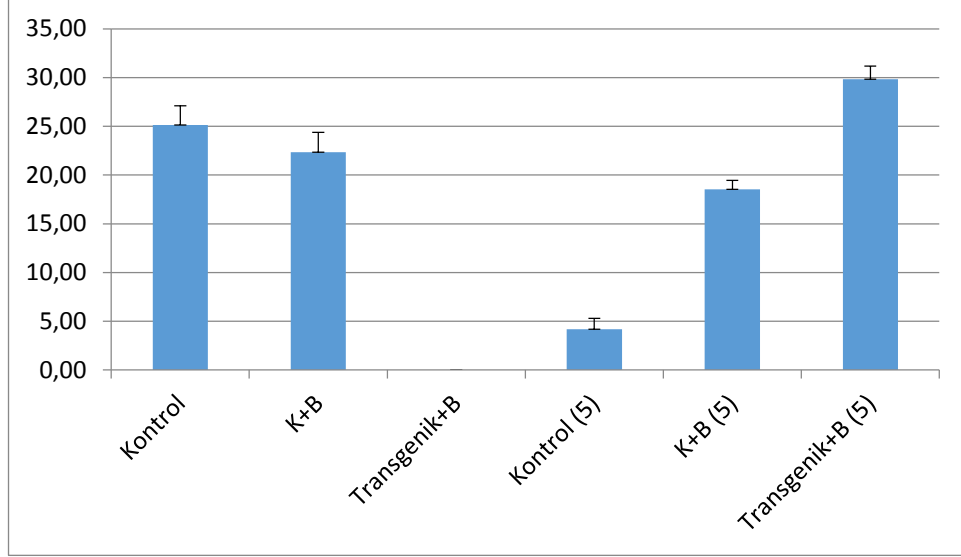
4.6.1.2. *PIP1;1*

PIP1;1 gen ifadesi Şekil 4.19'da, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.20'de sunulmuştur. *PIP1;1* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.19'da görülen *PIP1;1* gen ifadesine ait bantlar 463 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.19. *PIP1;1* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol(5), K+B(5),Transgenik+B(5).

Birinci gün bor uygulaması altında transgenik bitkilerde *PIP1;1* geni ifade edilmemiştir. Fakat 5. gün stres uygulaması altında transgenik bitkilerdeki *PIP1;1* gen ifadesinin kontrol (K) ve borlu kontrol (K+B) bitki gruplarına kıyasla en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

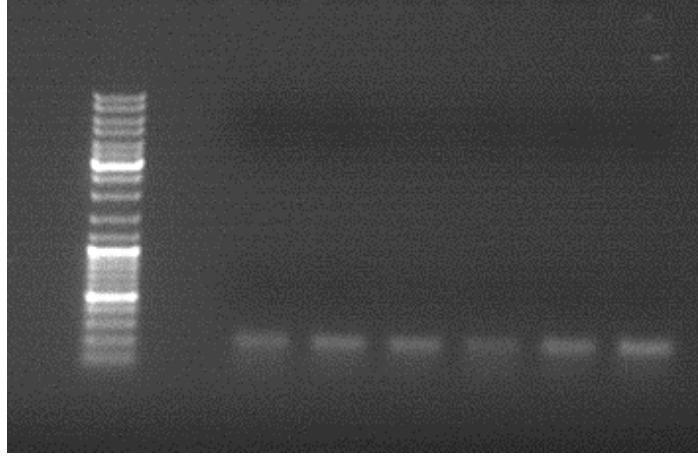


Şekil 4.20. *PIP1;1* gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Birinci gün stres setinde bor içermeyen kontrol bitkilerin, borlu kontrol (K+B) bitkilere kıyasla *PIP1;1* gen ifadesinin yaklaşık %11 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Beşinci gün bor stresi altında transgenik bitkilerin, borlu kontrol (K+B) bitkilerine göre *PIP1;1* gen ifadesini %37, borsuz kontrol (K) bitkilere göre %85 artırdığı belirlenmiştir.

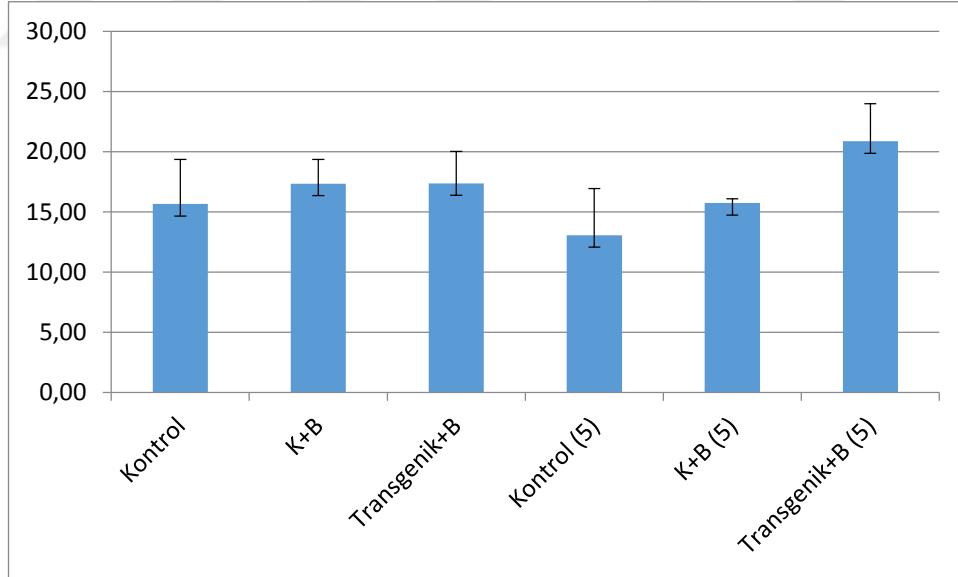
4.6.1.3. *PIP2;1*

PIP2;1 gen ifadesi Şekil 4.21’de, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.22’de sunulmuştur. *PIP2;1* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.21’de görülen *PIP2;1* gen ifadesine ait bantlar 192 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.21. *PIP2;1* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5), Transgenik+B (5).

Birinci gün bor stresi altında transgenik bitkilerin, K+B bitkilere göre gen ifadesinin değişmediği fakat borsuz kontrol (K) bitkilerine göre *PIP2;1* gen ifadesinin %9 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Beşinci gün bor stresi altında *PIP2;1* gen ifadesinin 1. gün bor stresine göre daha fazla değiştiği belirlenmiştir.



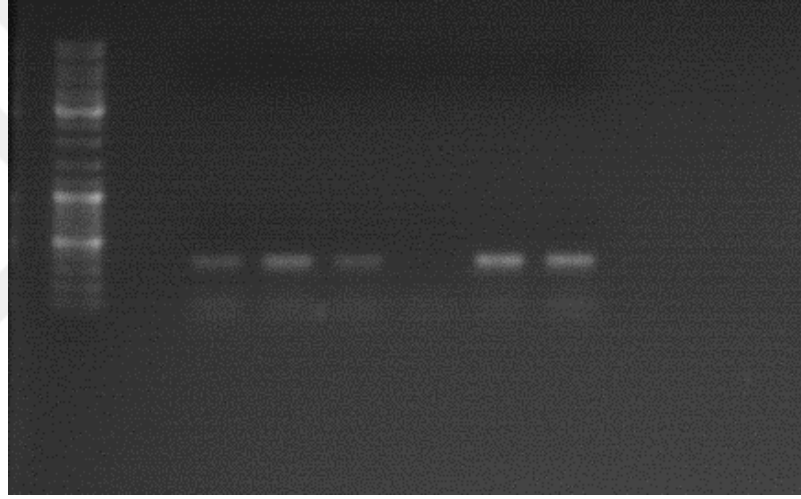
Şekil 4.22. *PIP2;1* gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Beşinci gün bor stresi altında transgenik bitkilerin *PIP2;1* gen ifadesi bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerden %37, bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerden

%24 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak 5. gün bor stresi altında transgenik bitkilerde *PIP2;1* gen ifadesinin 1. gün stres altındaki transgenik bitkilerden %16 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

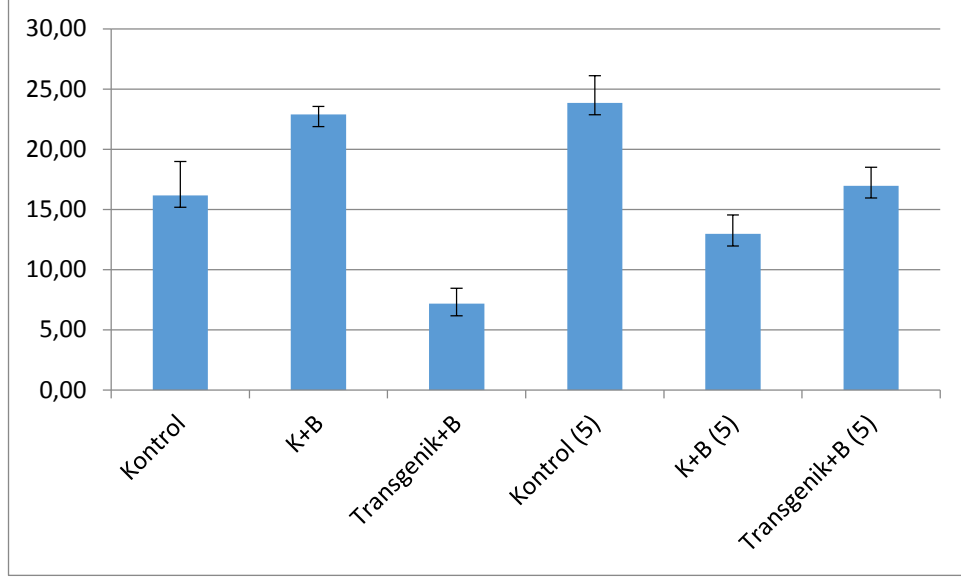
4.6.1.4. *Boron transporter 1*

Boron transporter 1 gen ifadesi Şekil 4.23’de, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.24’de sunulmuştur. *Boron transporter 1* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.23’de görülen *Boron transporter 1* gen ifadesine ait bantlar 345 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.23. *Boron transporter 1* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5),Transgenik+B (5).

Birinci gün bor stresi altında kontrol (K+B) bitkilerin *Boron transporter 1* gen ifadesini transgenik (+B) bitkilere göre %68 ve bor içermeyen kontrol bitkilerine kıyasla %29 daha fazla ifade ettiği tespit edilmiştir. Birinci gün bor stresi altında *Boron transporter 1* genini en az ifade eden bitkilerin transgenik bitkiler olduğu belirlenmiştir.

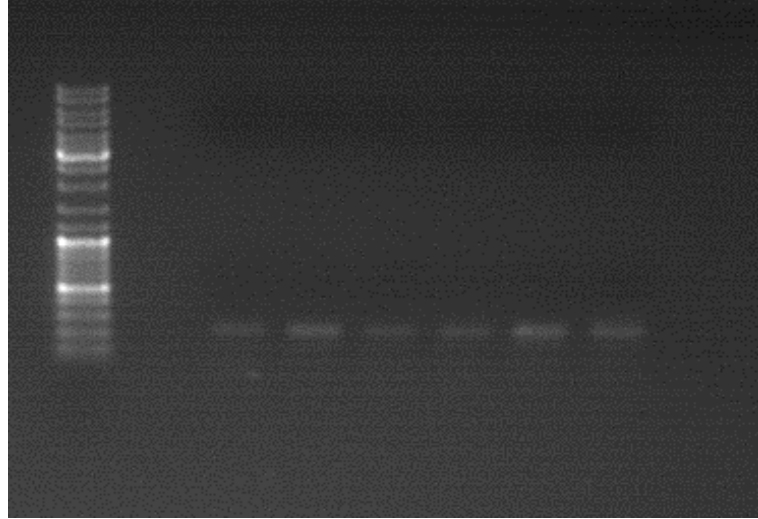


Şekil 4.24. *Boron transporter 1* gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Beşinci gün stres koşulları altında kontrol (K) bitkilerin en fazla *Boron transporter 1* gen ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bor uygulaması olmayan kontrol (K) bitkilerde *Boron transporter 1* gen ifadesinin, bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerden %45, transgenik bitkilerden yaklaşık %29 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerin 5. stres günündeki gen ifadesinin, 1. stres gününe göre azaldığı tespit edilmiştir.

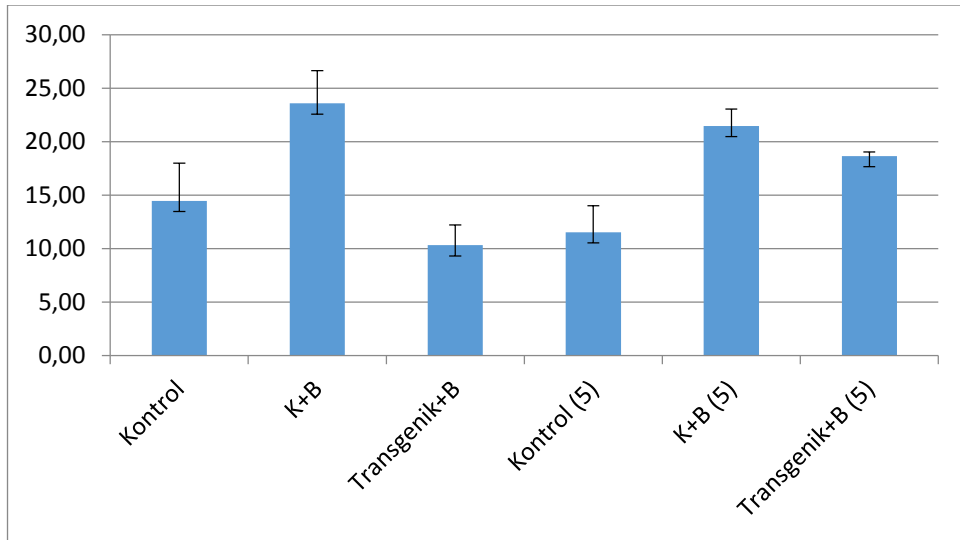
4.6.1.5. *Boron transporter 2*

Boron transporter 2 gen ifadesi Şekil 4.25'de, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.26'da sunulmuştur. *Boron transporter 2* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.25'de görülen *Boron transporter 2* gen ifadesine ait bantlar 224 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.25. *Boron transporter 2* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1 gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5),Transgenik+B (5).

Birinci gün bor uygulamasında K+B bitkilerinde, kontrol ve transgenik bitkilere kıyasla *Boron transporter 2* gen ifadesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Birinci gün bor uygulamasında K+B bitkilerinin *Boron transporter 2* gen ifadesinin, kontrol bitkilerden %38, transgenik bitkilerden yaklaşık %56 daha fazla olduğu belirlenmiştir.

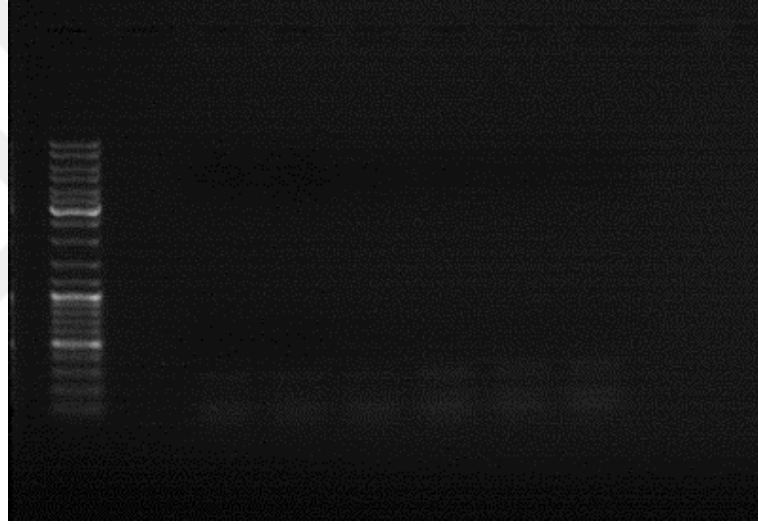


Şekil 4.26. *Boron transporter 2* gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Beşinci gün stres uygulaması altında K+B bitkilerinin *Boron transporter 2* gen ifadesinin, bor uygulanmayan kontrole (K) göre %46, transgenik bitkilere kıyasla %13 daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

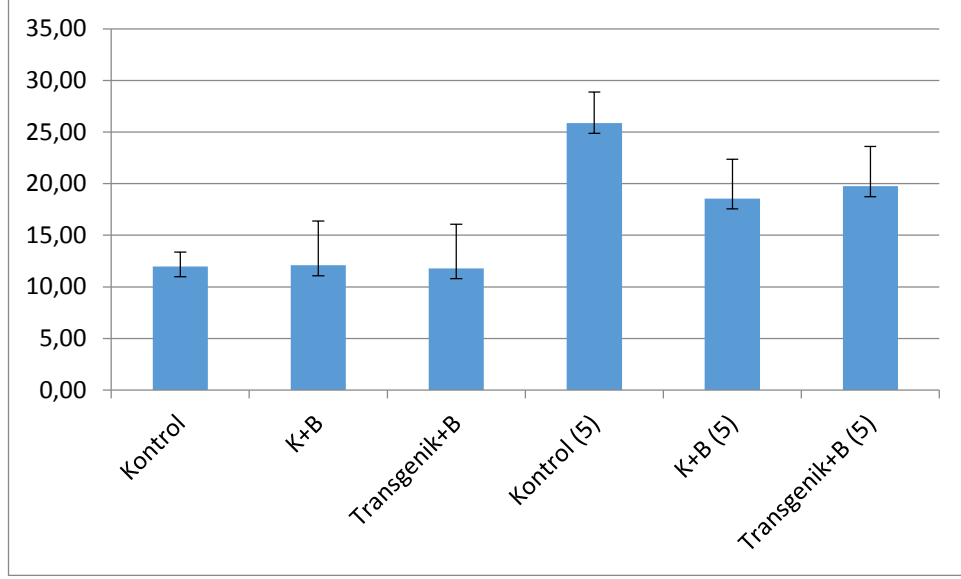
4.6.1.6. *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)*

MAPK gen ifadesi Şekil 4.27’de, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.28’de sunulmuştur. *MAPK* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.27’de görülen *MAPK* gen ifadesine ait bantlar 268 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.27. *MAPK* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5),Transgenik+B (5).

Birinci gün bor uygulanması altında *MAPK* gen ifadelerinde çok az bir değişimin olduğu Şekil 4.28’de görülmektedir. K+B içeren bitkilerin *MAPK* gen ifadesinin, transgenik bitkilere kıyasla %2, bor uygulanmayan kontrol bitkilerine kıyasla yaklaşık %1 oranında daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

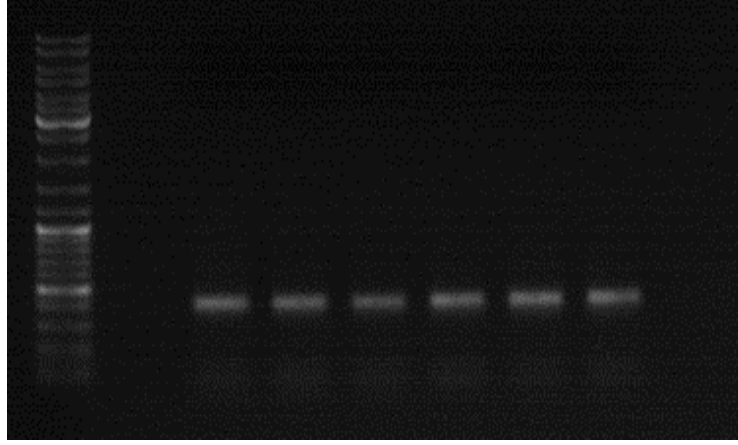


Şekil 4.28. *MAPK* gen ifadesi, X eksenli uygulamaları, Y eksenli bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Beşinci gün stres setinden bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerinin *MAPK* gen ifadesinin, bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerinden %28, transgenik (+B) bitkilerden %23 daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

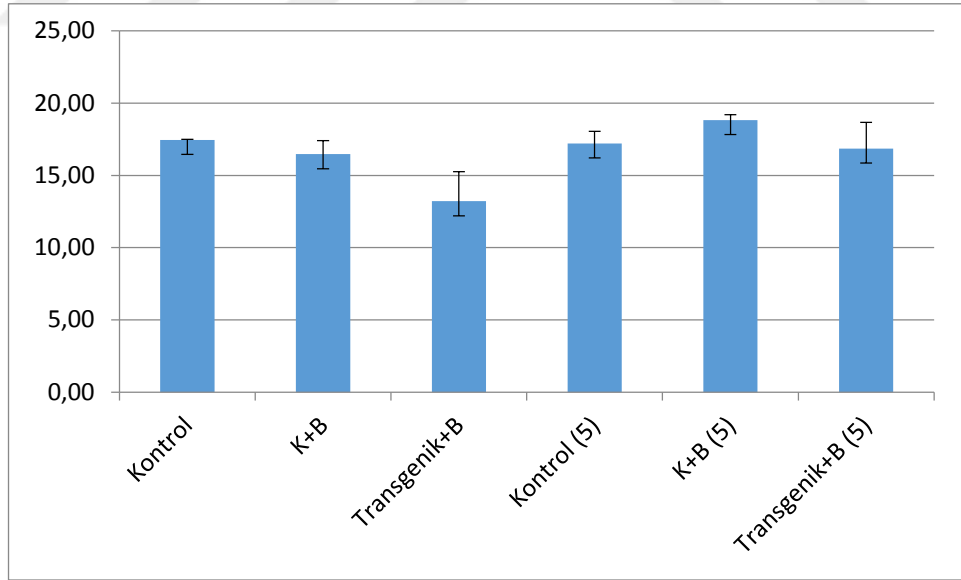
4.6.1.7. *NADPH:cytochrome P450 reductase 2 (CPR2)*

CPR2 gen ifadesi Şekil 4.29'da, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.30'da sunulmuştur. *CPR2* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.29'da görülen *CPR2* gen ifadesine ait bantlar 408 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.29. *CPR2* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol(5), K+B(5), Transgenik+B(5).

Birinci gün stres setinde bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerin *CPR2* gen ifadesinin, K+B içeren bitkilere kıyasla %5, transgenik bitkilere kıyasla %24 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerin 5. gün stres uygulamaları altında *CPR2* gen ifadesinin 1. gün stres uygulamalarına göre arttığı belirlenmiştir.

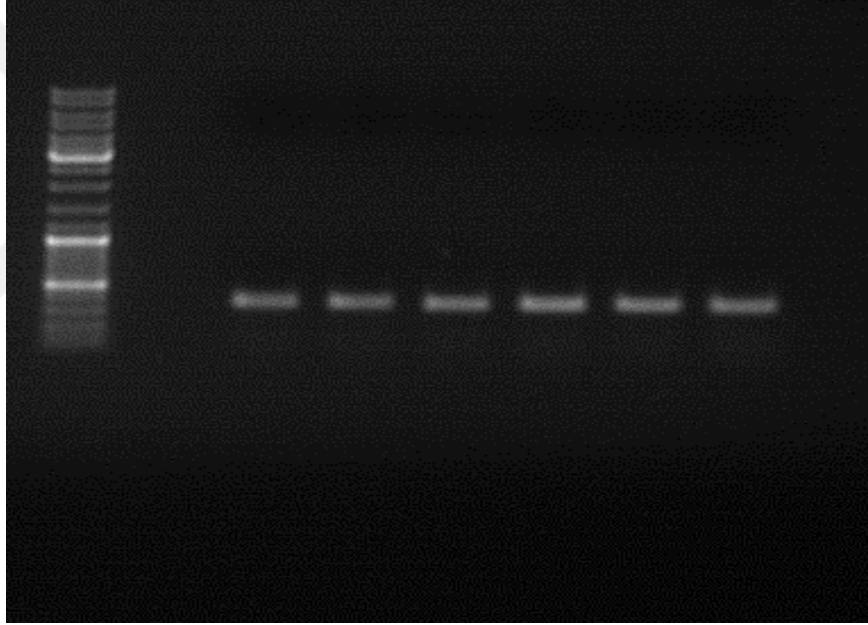


Şekil 4.30. *CPR2* gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

Beş gün stres uygulaması altında K+B bitkilerinin *CPR2* gen ifadesinin, bor içermeyen kontrol bitkilere kıyasla %8, transgenik bitkilere kıyasla %10 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Beşinci gün stres uygulamaları altında K+B bitkilerin *CPR2* gen ifadesinin birinci gün stres uygulamalarına göre arttığı belirlenmiştir.

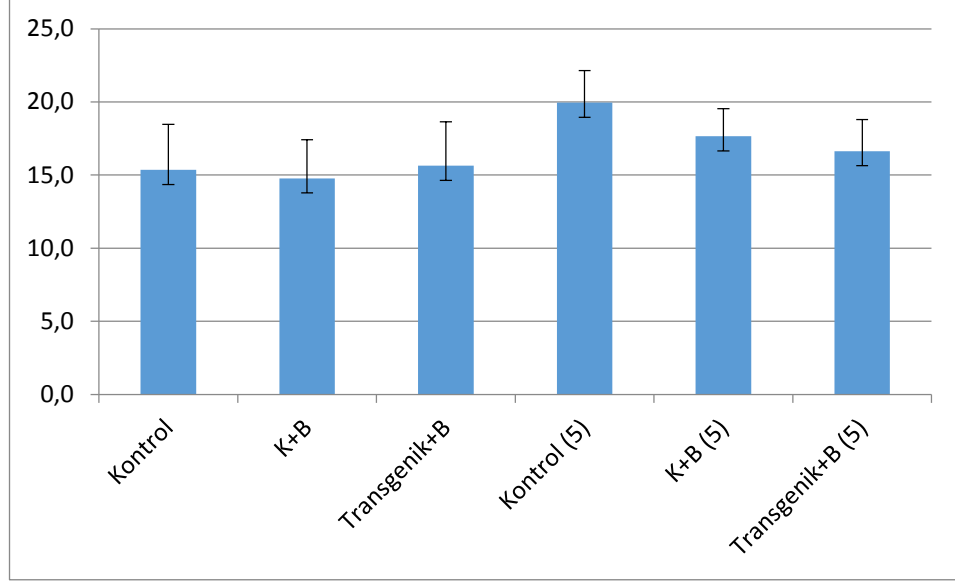
4.6.1.8. *Translation elongation factor 1A-8 (EF1A8)*

EF1A8 gen ifadesi Şekil 4.31’de, gen ifadesine ait grafik Şekil 4.32’de sunulmuştur. *EF1A8* gen ifadesi kontrol ve transgenik bitkilerde 1. gün ve 5. gün bor uygulaması altında incelenmiştir. Şekil 4.31’de görülen *EF1A8* gen ifadesine ait bantlar 373 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.31. *Translation elongation factor (EF1A8)* gen ifadesinin belirlenmesi, bantlar soldan sağa sırasıyla 1. gün bor uygulanan Kontrol, K+B, Transgenik+B ve 5. gün bor uygulanan Kontrol (5), K+B (5), Transgenik+B (5).

EF1A8 homebox gen olarak seçilmiştir. Her iki stres gününde uygulamalar arasındaki farkın (Şekil 4.32) oldukça stabil olduğu görülmektedir.



Şekil 4.32. *Translation elongation factor (EF1A8)* gen ifadesi, X eksenini uygulamaları, Y eksenini bağımlı gen ifadesini, *K: Kontrol, +B: bor uygulaması, (5) : 5. gün bor uygulamasını temsil etmektedir.

4.6.2. Biyokimyasal analizler

Kontrol ve transgenik bitkilerin biyokimyasal olarak malondialdehit (MDA), iyon sızıntısı, bağımlı su içeriği, prolin ve toplam klorofil içerikleri belirlenmiştir.

4.6.2.1. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Kontrol ve transgenik bitkilerin bor stresi altında malondialdehit (MDA) miktarları araştırılmış olup sonuçlar aşağıdaki gibi verilmiştir. Çizelge 4.3'de 1. gün bor stresi altındaki MDA miktarları, Çizelge 4.4'de ise 5. gün bor stresi altındaki MDA miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.3. Malondialdehit (MDA) miktarının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

1. gün stres	MDA(nmol/g)
Kontrol	20,47±4,19 _b
Kontrol+B	34,12±2,95 _a
Transgenik+B	25,51±2,99 _b

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Bir gün bor uygulanan kontrol (K+B) bitkiler en yüksek MDA miktarına sahiptir. Transgenik bitkilere bor uygulamasının kontrol bitkilerine bor uygulamasına kıyasla daha az MDA miktarına sahip olduğu görülmektedir. Bor stresi içermeyen kontrol bitkilerin verileri transgenik bitkilerin verileri ile istatistiksel olarak aynı öneme sahiptir.

Çizelge 4.4. Malondialdehit (MDA) miktarının 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

5. gün stres	MDA(nmol/g)
Kontrol	22,32±3,12 _b
Kontrol+B	36,39±1,16 _a
Transgenik+B	26,13±1,79 _b

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Beş gün bor uygulanan transgenik bitkilerin, bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerine kıyasla daha az MDA içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerin her iki stres gününde de en fazla MDA içeriğine sahip olduğu buna karşın kontrol (K) bitkilerin en az MDA miktarna sahip olduğu tespit edilmiştir. Beş gün boyunca bor uygulanan transgenik bitkilerle, bor uygulanmayan kontrol bitkilerininin MDA sonuçları istatistiksel olarak aynı önem derecesine sahiptir.

4.6.2.2. İyon sızıntısı miktarının belirlenmesi

Kontrol ve transgenik bitkilerin bor stresi altında iyon sızıntısı (%) miktarları araştırılmış ve sonuçlar aşağıdaki gibi verilmiştir. Çizelge 4.5’da 1. gün bor stresi

altındaki iyon sızıntısı (%) miktarları, Çizelge 4.6’de ise 5. gün bor stresi altındaki iyon sızıntısı (%) miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.5. İyon sızıntısının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

1. gün stres	İyon sızıntısı %
Kontrol	23,27±0,97 _b
Kontrol+B	29,01±0,48 _a
Transgenik+B	24,17±0,25 _{ab}

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Birinci gün bor stresine tabi tutulan transgenik ve kontrol (K+B) bitkilerin iyon sızıntısı yüzdeleri kontrol bitkilere göre daha yüksek bir seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bir gün bor uygulanan transgenik bitkilerin, bor uygulanan kontrol bitkilerine kıyasla iyon sızıntısı miktarları daha düşük bir seviyede olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. İyon sızıntısının 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

5. gün stres	İyon sızıntısı %
Kontrol	24,33±1,14 _b
Kontrol+B	29,05±2,24 _a
Transgenik+B	27,55±1,11 _{ab}

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Beşinci gün bor stresinde transgenik bitkilerin, K+B uygulanan bitkilere göre iyon sızıntısı yüzdesinin daha düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Kontrol bitkilerdeki iyon sızıntısı miktarlarının bor uygulanan kontrol ve transgenik bitkilere göre daha

düşük bir seviyede kaldığı belirlenmiştir. Her iki stres gününde de uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

4.6.2.3. Bağlı su içerikleri

Transgenik ve kontrol bitkilerin bor stresi altında bağlı su içerikleri araştırılmış ve sonuçlar aşağıdaki gibi verilmiştir. Çizelge 4.7’de 1.gün bor stresi altındaki bağlı su içerikleri, Çizelge 4.8’da ise 5. gün bor stresi altındaki bağlı su içerikleri verilmiştir.

Çizelge 4.7. Bağlı su içeriğinin 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

1. gün stres	BSU %
Kontrol	90,16±2,57 _a
Kontrol+B	77,6±0,84 _c
Transgenik+B	82,57±1,09 _b

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Bağlı su içeriğinin bir gün bor stresi altında kontrol (K+B) bitkilerde en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bor uygulaması içermeyen kontrol bitkilerde ise bağlı su içeriğinin en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerdeki bağlı su içeriği bor içeren ve içermeyen kontrol bitkileri arasında konumlanmıştır.

Çizelge 4.8. Bağlı su içeriğinin 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

5. gün stres	BSU %
Kontrol	87,55±1,95 _a
Kontrol+B	71,45±3,22 _b
Transgenik+B	77,02±3,12 _b

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Beş gün bor uygulanan kontrol ve transgenik bitkilerde bağıl su içeriğinin bor uygulanmayan kontrol bitkilerden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bor içeren kontrol ve transgenik bitkilerin istatistiksel olarak aynı önem derecesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.6.2.4. Prolin

Prolin miktarları kontrol ve transgenik bitkilerde bor stresi altında araştırılmış ve sonuçlar aşağıdaki gibi verilmiştir. Çizelge 4.9'da 1. gün bor stresi altındaki prolin miktarları, Çizelge 4.10'da ise 5. gün bor stresi altındaki prolin miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.9. Prolin miktarının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

1. gün stres	Prolin($\mu\text{mol/g}$)
Kontrol	34,19 \pm 0,78 _b
Kontrol+B	44,84 \pm 2,86 _a
Transgenik+B	38,83 \pm 2,59 _b

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Birinci gün stres uygulaması altında prolin içeriğinin bor içermeyen kontrol bitkilerde en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bir gün bor uygulanan kontrol bitkilerde prolin içeriğinin en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerdeki prolin miktarı, bor içeren ve içermeyen kontrol bitkileri arasında konumlanmıştır. Bor uygulanmayan kontrol ve bor uygulanan transgenik bitkilerin istatistiksel olarak aynı önem derecesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Prolin miktarının 5. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

5. gün stres	Prolin($\mu\text{mol/g}$)
Kontrol	32,3 \pm 6,86 _b
Kontrol+B	46,04 \pm 2,32 _a
Transgenik+B	39,17 \pm 3,21 _{ab}

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Beş gün bor stresine maruz bırakılan kontrol (K+B) bitkilerde prolin içeriğinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bor uygulanmayan kontrol bitkilerin en düşük prolin miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Transgenik bitkilerin bor içeren ve içermeyen kontrol bitkileri arasında bir prolin içeriğine sahip olduğu Çizelge 4.10'da görülmektedir.

4.6.2.5. Toplam klorofil miktarını belirlenmesi

Kontrol ve transgenik bitkilerin bor stresi altında toplam klorofil miktarları araştırılmış ve sonuçlar aşağıdaki gibi verilmiştir. Çizelge 4.11'de 1. gün bor stresi altındaki toplam klorofil miktarları, Çizelge 4.12'de ise 5. gün bor stresi altındaki toplam klorofil miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.11. Toplam klorofil miktarının 1. gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

1. gün stres	Toplam klorofil
Kontrol	12,08 \pm 0,60
Kontrol+B	11,67 \pm 0,63
Transgenik+B	12,88 \pm 0,27

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Bir gün bor stresi altında toplam klorofil miktarlarında uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Toplam klorofil miktarının 5.gün 7.5 mM B stresi altında belirlenmesi

5. gün stres	Toplam klorofil
Kontrol	12,33±0,97 _a
Kontrol+B	10,45±0,48 _b
Transgenik+B	11,43±0,25 _{ab}

*+B 7.5 mM bor uygulamasının varlığını göstermektedir. Harfler, aynı sütun içinde yer alan verileri 0,05 olasılık düzeyine göre aynı veya farklı kümeler içinde göstermektedir.

Bor uygulaması içermeyen kontrol bitkilerin (K), beş gün stres altında bor içeren kontrol (K+B) ve transgenik bitkilere göre daha fazla toplam klorofil içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerin bor uygulanan kontrol (K+B) ve uygulanmayan kontrol bitkileri arasında bir toplam klorofil içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu doktora tezi çalışmasında pamuk ve karanfil bitkilerinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla genetik transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transgenik bitkilerin rejenerasyonu her iki bitki için de sağlanmıştır. Ancak F1 eldesi yalnızca pamuk bitkisinde gerçekleştirilebilmiştir. *miR408* geninin bor fitoremediasyon potansiyeli F1 jenerasyon transgenik pamuk bitkilerinde moleküler ve biyokimyasal seviyede incelenmiştir.

Bir hastalığa tedavi geliştirmek için öncelikle hastalığa yol açan mekanizmaların anlaşılması gerektiği gibi, önemli tarım bitkilerinde abiyotik streslere dirençli çeşitler geliştirmek de bitkilerin ne tür mekanizmalarla bu streslere tepki verdiklerini anlamaya dayalıdır. Bu çalışmada, çok çeşitli stresler altında bitkilerin tolerans kapasitesini artırdığı bilinen *miR408* geninin, bor fitoremediasyonu üzerindeki potansiyeli pamuk bitkisi üzerinde araştırılmıştır. Pamuk bitkisi, insan hayatı için ve ekonomik bir değer olarak çok önemli bir kültür bitkisidir. Ağır metal toleransı bir çok bitkiye kıyasla üstün olan pamuğun rekombinant DNA teknikleriyle çevresel stres ve kirliliğe karşı genetik kapasitesini artırmak fitoremediasyon için önemli bir strateji sunmaktadır. Bu çalışma kapsamında pamuk bitkilerine *miR408* geni *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarılarak transgenik bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen transgenik bitkilerin bor tolerans kabiliyetleri, 1. gün ve 5. gün olacak şekilde iki farklı stres gününde 7.5 mM bor uygulaması altında kontrol bitkilerle kıyaslamalı olarak biyokimyasal ve moleküler düzeyde incelenmiştir.

Bitkilerde malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonun son ürünlerinden bir tanesidir. MDA miktarı arttıkça membran zararlanmasının arttığı dolayısıyla bitkinin stres seviyesinin arttığı anlaşılmaktadır. Bu bilgiler ışığında bitkilerin MDA içeriğine göz atıldığında 1. gün bor uygulaması altında borlu kontrol (K+B) setinde MDA miktarının en yüksek olduğu, bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerinde ise en düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerin 1. gün bor uygulaması altında MDA içeriğinin, K+B bitkilerine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Ek olarak transgenik bitkilerin MDA içeriğinin, bor uygulanmayan kontrol (K) bitkileriyle istatistiksel olarak farklı olmadığı dolayısıyla membran zararlanmasının daha az olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda 5. gün bor uygulaması altında 1. gün

bor uygulamasına benzer şekilde en yüksek MDA içeriği K+B bitkilerinde olmuştur. Transgenik bitkilerin 5. gün bor uygulaması altında bor uygulanmayan kontrol (K) bitkiler ile yakın seviyelerde MDA içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Her iki stres gününde de transgenik (+B) ve bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerin MDA içeriği istatistiksel olarak aynı bulunmuştur. Bu sonuçlar transgenik bitkilerin daha az strese girdiğini belirtmektedir.

Hücre zarının bütünlüğünün korunup korunmadığının anlaşılması için yapılan bir diğer analiz iyon sızıntısı analizidir. Bu kapsamda eğer hücre zarının bütünlüğü zarar görmüşse iyon sızıntısı miktarı artacak dolayısıyla bitkiler o oranda zarar görecektir. Transgenik bitkilerin iyon sızıntısı seviyelerinin, 1. gün bor uygulaması altında K+B bitkilerden daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde 5. gün bor uygulaması altında transgenik bitkilerin iyon sızıntısı miktarları K+B içeren bitkilerden daha düşük seviyededir. Her iki stres gününde de en düşük iyon sızıntısı miktarları bor uygulanmayan kontrol bitkilerinde olmuştur. Bu veriler MDA analizi ile tutarlılık göstermektedir. MDA ve iyon sızıntısı miktarları, transgenik bitkilerin bor uygulamaları altında K+B bitkilerine göre daha dayanıklı olup daha az strese girdiğini göstermektedir.

Bağıl su içeriği % (BSU), bitkilerin dokularındaki su tutma kapasitesini göstermektedir. Eğer bir bitkide su tutma kapasitesi yüksek ise o bitkinin çevre şartlarından minimum etkilenecek daha az strese girdiği anlaşılmaktadır. Transgenik pamuk bitkilerinin bağıl su içeriğinin, 1. gün bor uygulaması altında K+B bitkilerden daha yüksek olduğu fakat kontrol bitkilerden daha düşük olduğu Çizelge 4.7'de görülmektedir. Ek olarak 1. gün stres uygulamaları sonucunda transgenik bitkilerin istatistiksel olarak K+B bitkilerinden daha iyi bir su tutma kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Beşinci gün stres setinde bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerinin en yüksek bağıl su yüzdesine sahip olduğu Çizelge 4.8'de görülmektedir. Transgenik bitkilerin 5. gün stres uygulamaları altında bağıl su içeriği, K+B bitkilerinden yüksek olsa da bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu sonuçlar ışığında transgenik bitkilerin büyük olasılıkla belli bir zaman aralığına kadar K+B bitkilerinden daha yüksek bir su tutma kapasitesine sahip olduğu fakat muhtemelen artan hücre içi bor konsantrasyonu ile daha fazla baş edemeyerek su tutma kapasitesinin azaldığı sonucuna varılmıştır.

Bitkiler bazı bileşikleri osmoprotektan olarak kullanarak yüksek ozmotik stres, abiyotik ve biyotik streslerden korunmaktadır. Prolin bu osmoprotektanlardan biri olarak stres koşullarıyla bitkilerin mücadele etmesine olanak sağlamaktadır. Birinci gün bor uygulamaları altında prolin içeriğinin K+B bitkilerinde en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.9’da verilen sonuçlarda transgenik bitkilerin prolin içeriğinde, K+B bitkiler kadar olmasa da bir artışın olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerin 5. gün bor stresi altındaki prolin içeriğinin istatistiksel olarak K+B uygulamasından farklı bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar transgenik bitkinin strese maruz kaldığı 1. günden sonra prolin içeriğini artırarak korunma sağladığının bir göstergesidir.

Toplam klorofil içeriği, birinci gün bor stresi altında transgenik bitkilerde daha yüksek olarak görülse de bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Beşinci gün bor stres setinde bor uygulanmayan kontrol bitkilerde toplam klorofil içeriğinin en yüksek olduğu, K+B bitkilerin toplam klorofil içeriğinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerle K+B bitkileri kıyaslamak gerekirse, transgenik bitkilerin toplam klorofil içeriğinin K+B bitkilerine göre istatistiksel olarak daha önemli konumda bulunan bor uygulanmayan kontrol bitkilerine daha yakın olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, transgenik bitkilerin uzun stres şartları altında toplam klorofil içeriğini kontrol bitkilere göre daha iyi düzeyde koruduğunu göstermektedir.

Plastosiyanın, bakır (Cu) bağlanmasından sorumlu bir gen olarak doğrudan *miR408* tarafından düzenlenir. Cu eksikliğine yanıt olarak *miR408* ifadesinin bakır seviyesinin düzeltilmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Abdel-Ghany ve Pilon, 2008). Pamuk bitkisinde 1. gün bor stresi altında *plastocyanin* gen ifadesinin transgenik bitkilerde daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18). Birinci gün bor stres setindeki uygulamalar arasındaki *plastosiyanın* gen ifadesindeki değişimin, 5. gün bor stres setindeki bitkilere göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu farkın muhtemel nedenlerinden bir tanesi, bitkilerin stres seviyesinde meydana gelen artışla birlikte bakır seviyesini korumak için *plastosiyanın* ifadesini artmış olabilecekleridir. Beşinci gün bor stresine tabi tutulan transgenik bitkilerin, K+B bitkilerine kıyasla *plastosiyanın* gen ifade düzeyleri yaklaşık %11 daha fazladır. Artan stresle birlikte transgenik bitkilerde bu genin ifadesinin K+B uygulamasına

göre daha fazla olması *miR408*'in bakır seviyesinin düzeltilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Yüksek düzeyde korunan bitki aquaporinlerinden olan *PIP*, (Plazma membran intrinsic proteins) hücre zarında başlıca su geçişini sağlayan geçitlerdir (Yanoff vd., 2015). Pamuk bitkisinde 1. gün bor stresi altındaki transgenik bitkilerde *PIP1;1* geninin ifade edilmediği belirlenmiştir. Ek olarak 1. gün bor stresi altında K+B ve kontrol (K) bitkileri arasındaki gen ifadesi farkı Şekil 4.20'de görüldüğü gibi az seviyededir. Sonuç olarak 1. gün bor stresi altında transgenik bitkilerde *PIP1;1* geninin ifade edilmemesi *mir408* geninin bor stresi altında *PIP1;1* geninin ifadesini baskıladığı anlamına gelebilir. Beşinci gün bor stresine tabi tutulan transgenik bitkilerin *PIP1;1* geni ifade seviyeleri K+B bitkilerine göre %37, borsuz kontrol (K) bitkilerine göre %85 daha fazladır. Bunun potansiyel nedenlerinden bir tanesi, *mir408* geninin 5. gün bor stresi altında *PIP1;1* geninin ifade seviyesini doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyerek bitkinin homeostatik dengesinin muhafazasını sağlaması olarak düşünülmektedir.

Li vd. (2009), aquaporin genlerinin bitkilerin olumsuz çevre şartlarına maruz kaldığı koşullarda çeşitli bitki dokularında önemli bir rol oynadığını bildirmiştir. Birinci gün bor stresi altında transgenik ve K+B bitkiler arasında *PIP2;1* gen ifadesindeki değişimin çok az düzeyde olduğu görülmektedir. Beşinci gün bor stresi altında transgenik bitkilerin *PIP2;1* gen ifadesinin bor uygulanmayan kontrol (K) bitkilerden %37, bor uygulanan kontrol (K+B) bitkilerden %24 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *mir408* geninin 5. gün bor uygulaması altında *PIP2;1* geninin ifade seviyesini düzenleyerek K+B bitkilerine göre bu genin ifade seviyesini artırdığını göstermektedir. *miR408*'in *PIP1;1* ve *PIP2;1* genlerinin 5. gün bor stresi altında ifade seviyelerini artırdığı dolayısıyla artan stres şartlarında bu aquaporin genlerinin stres toleransında rollerinin olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerde bor taşınımı çeşitli genlerin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Takano vd. (2002), *BOR1* geninin düşük bor konsantrasyonlarında köklerden sürgünlere bor taşıdığını belirtmişlerdir. Takano vd. (2005), ancak bor konsantrasyonu toksik seviyelere geldiğinde *BOR1*'in endositoz yokluğuyla parçalandığını belirtmektedir. Birinci gün stres setinde transgenik bitkilerin *boron transporter 1* genini, K+B ve

kontrol bitkilerine göre çok daha az oranda ifade ettiği belirlenmiştir. Transgenik bitkiler bor stresinin ilk gününde aşırı borla karşılaştığında *boron transporter 1* geninin ifadesini azaltarak bitkilere bor girişini azaltmıştır. Fakat 5. gün stres sonunda, bu genin ifadesinin artarak bitkilere bor girişinin arttığı tespit edilmiştir. *miR408* geninin *boron transporter 1* geninin ifade seviyesini düzenleyerek bitkilerde bor dengesinin sağlanmasında görev aldığı düşünülmektedir.

Yüksek lisans proje çalışmalarım kapsamında arpa ve buğday bitkilerinde *BOR2* genini, bazı aquaporin genleri ile birlikte incelemiş ve bor stresi altında yüksek düzeyde ifade artışı göstererek bor taşınımında önemli roller aldığını belirlemiştik (Akçay ve Erkan, 2016). Bu çalışma kapsamında da 5. gün bor stresi altında transgenik bitkilerin *boron transporter 2* gen ifadesinin, 1. gün bor stresine göre arttığı tespit edilmiştir. Fakat 5. gün bor stresi altında K+B bitkilerin *boron transporter 2* gen ifadesinin, 1. gün bor stresine göre çok az olsada azalmıştır. Birinci stres gününde K+B bitkileri ile transgenik bitkiler arasındaki *boron transporter 2* gen ifadesinin farkı çok fazla iken 5. gün sonunda bu fark çok azalmıştır. Bu sonuçlar *mir408*'in 5. stres günü sonunda *boron transporter 2* gen ifadesini artırarak bor toleransının düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir. Muhtemelen 5. günden daha uzun bor deneme setlerinde de bu artış stabilitesini koruyacaktır.

MAPK bitkilerde sinyal iletiminde çok kritik bir role sahip olup bileşenleri yüksek düzeyde korunan genler tarafından kodlanmaktadır (Hamel vd. 2006). Birinci gün stres uygulaması altında *MAPK* gen ifadesinin tüm uygulamalarda hemen hemen aynı oranda olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde 5. gün stres uygulaması altında *MAPK* gen ifadesinin, transgenik bitkilerde K+B bitkilere göre %6 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her iki stres gününde de *MAPK* gen ifadesindeki değişimin çok az miktarda olduğu belirtilmektedir. Bu sonuçlarla *miR408* geninin bor stresi altında *MAPK* gen ifadesinin düzenlenmesinde etkin bir rol oynamadığı belirlenmiştir.

Jun vd. (2015), *cytochrome P450 (CYP)* gen ailesinin çeşitli biyosentez ve detoksifikasyon mekanizmalarına bitki büyüme ve gelişmesinde ve strese karşı bitkinin korunmasında hayati bir öneme sahip olduğunu belirlemiştir. Bu çalışma da birinci gün bor stresi altında *cytochrome P450 reductase 2 (CPR2)* gen ifadesinin transgenik bitkilerde daha az ifade edildiği belirlenmiştir. Her iki stres gününde de

K+B bitkilerinde, transgenik bitkilere göre az farkla da olsa *CPR2* gen ifadesinin daha yüksek seviyede olduğu Şekil 4.30'da görülmektedir. *miR408* geninin bor stresi altında *MAPK* genine benzer şekilde, *CPR2* gen ifadesinin de düzenlenmesinde etkin bir rol oynamadığı belirlenmiştir.

Wang vd. (2013), yaygın olarak kullanılan çeşitli housekeeping genlerin ifade seviyelerinin farklı dokularda, farklı uygulamalarda ve bazı stres koşulları altında değiştiğini belirtmektedir. Bu nedenle uygun bir referans genin seçilmesi son derece önemlidir. *Translation elongation factor 1A-8 (E1A8)* geninin her iki stres gününde kontrol ve transgenik bitkilerde gen ifade düzeyini koruduğu Şekil 4.32'de görülmektedir.

Biyokimyasal analiz sonuçlarına göre *miR408* geninin çeşitli mekanizmalarla bitki bor tolerans mekanizmalarına etki ettiği düşünülmektedir. Malondialdehit, iyon sızıntısı gibi membran zararlanması hakkında çıkarım sağlayan analizler bu fikri doğrular nitelikte sonuçlar vermektedir. Transgenik bitkilerin malondialdehit miktarı her iki stres gününde de istatistiksel olarak bor uygulanmamış kontrol bitkilerin içerdiği miktardan farklıdır. Benzer şekilde transgenik bitkilerin iyon sızıntısı (%), K+B bitkilerine göre daha düşük bir miktardadır. *PIP1;1* geninin ifade seviyeleri 5. gün stres altında transgenik bitkilerde K+B bitkilerine göre %37 artmıştır. Benzer şekilde *PIP2;1* geninin ifade seviyeleri 5. gün stres altında transgenik bitkilerde K+B bitkilerine göre %24 artmaktadır. Bitkilerin bağıl su içeriklerinin de transgenik bitkilerde K+B bitkilerine oranla daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda incelenen aquaporin genlerindeki ifade artışının, bitkinin su, küçük nötr çözülmüş maddeler ve borik asit gibi maddelerin taşınımında rolleri olduğu düşünülmektedir. *miR408* geninin, *PIP1;1* ve *PIP2;1* aquaporinlerin ifade seviyelerini de artan stres şartlarıyla birlikte düzenlediği belirlenmiştir.

Transgenik bitkilerin prolin seviyelerini, stresin uzun süre uygulanmasıyla artırdığı tespit edilmiştir. Fakat 1. stres gününde K+B bitkilerinin prolin miktarları transgenik bitkilerden daha yüksek bir seviyededir. Bunun potansiyel nedenlerinden bir tanesi *Boron transporter 1* geninin 1. stres gününde bitkiye bor alınımını engellemesi ve prolin miktarının düşük seviyelerde kalmasını sağlaması olabilir. Beşinci gün bor

stresi altında *Boron transporter 1* gen ifade seviyesinin artmasıyla birlikte prolin miktarının da arttığı belirlenmiştir.

Transgenik bitkilerde *Boron transporter 2* gen ifadesinin stres süresi uzadıkça arttığı belirlenmiştir. Birinci stres gününde *Boron transporter 2* gen ifadesinin transgenik bitkilerde düşük olmasının bir nedeninin *Boron transporter 1* geninin bitki içerisinde bor alınımını azaltması olduğu düşünülmektedir. Bitki bünyesinde bor seviyesinin artmasıyla birlikte bor pompalarının etkin bir şekilde kullanımı bitkinin bor tolerans mekanizmalarında başlıca rol oynamaktadır. Bu sonuçlar ışığında *mir408* geninin bitki bor pompalarından olan *Boron transporter 1* ve *Boron transporter 2* genlerinin ifade seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak pamuk bitkisinde *miR408* geninin genetik transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. *miR408* geninin bor stresi altında pamuk bitkilerine kazandırdığı özellikler moleküler olarak incelediğinde aquaporin genleri ve bor taşıyıcı genler üzerindeki düzenleyici etkileri görülmektedir. Gen ifadeleri biyokimyasal analizlerle karşılaştırıldığında, *miR408* geni bor tolerans mekanizmalarına etki ederek bitkilerin metabolik faaliyetlerinin devam etmesini sağlamaktadır. Transgenik bitkilerin, bor stresi altındaki membran zararlanmasının bor uygulanan kontrol bitkilerinden daha az olması transgenik bitkilerin bor stresine karşı kontrol bitkilerden daha üstün tolerans yetenekleri olduğunun göstergesidir. Transgenik bitkilerin bor stresi altında bağlı su içerikleri incelendiğinde K+B bitkilerine göre daha iyi su tutma kapasitesine sahip oldukları anlaşılmaktadır. Bu kapsamda, transgenik bitkilerin bor stres toleranslarının kontrol bitkilerden daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Türkiye toprakları bor haritası incelendiğinde ülkemiz topraklarının büyük bir bölümünde bor fazlalığı veya aşırı fazlalığı bulunduğu görülmektedir (Şekil 2.1). Nitekim Antalya, Gaziantep'in kısmi bölgeleri, Mardin, Denizli, İzmir gibi ülkemizin pamuk yetiştirilmeye müsait bazı bölgelerinde bor fazlalığı görülmektedir. Geliştirilen transgenik bitkilerin ilerleyen yıllarda aktif tarımda kullanılma potansiyelleri bulunduğu gibi fitoremediasyon amacıyla da kullanılabilmesi mümkündür. Bu çalışma gelecekte çeşitli stres etmenlerine karşı pamuk bitkisinin genetik kapasitesinin geliştirilmesi için de rehber niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdellatef, E. L. T. A. Y. B., Khalafalla, M. M., 2007. Adventitious Shoot and Plantlet Formation in Medium Staple Cotton Cultivar (*Gossypium hirsutum* L. cv. Barac). *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(6), 913-916.
- Abdel-Ghany, S.E., Pilon, M., 2008. MicroRNA-Mediated Systemic Down-Regulation of Copper Protein Expression in Response to Low Copper Availability in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (23), 15932–15945.
- Agrawal, D. C., Banerjee, A. K., Kolala, R. R., Dhage, A. B., Kulkarni, A. V., Nalawade, S. M., Hazra, S., Krishnamurthy, K. V., 1997. In Vitro Induction of Multiple Shoots and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 16(9), 647-652.
- Ahmed, N., Abid, M., Ahmad, F., 2008. Boron Toxicity in Irrigated Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 40, 2443-2452.
- Akçay, U. C., Erkan, I. E., 2016. Silicon Induced Antioxidative Responses and Expression of BOR2 and two PIP Family Aquaporin Genes in Barley Grown Under Boron Toxicity. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 318-326.
- Alkan, A., 1998. Farklı Tahıl Türleri ile Buğday ve Arpa Çeşitlerinin Bor Toksisitesine Dayanıklılığının Araştırılması ve Dayanıklılıkta Rol Alan Faktörlerin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 90, Adana.
- Ali, A., Afrasiab, H., Naz, S., Rauf, M., Iqbal, J., 2008. An Efficient Protocol for In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 111.
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L.J., Gelvin, S.B., Jackson, D.P., Kausch, A.P., Lemaux, P.G., Medford, J., Orozco-Cárdenas, M.L., Tricoli, D.M., Daniel, V.J., Virginia, W., Wang, K., Zhang, Z.J, Stewart, C.N., 2016. Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 28, 1510-1520.
- Asri, F.Ö., Sönmez, S., 2006. Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri. *Derim*, 23(2), 36-45.
- Aydin, Y., Talas-Oğras, T., Ipekçi-Altas, Z., Gözükırmızı, N., 2006. Effects of Brassinosteroid on Cotton Regeneration via Somatic Embryogenesis. *Biologia*, 61(3), 289-293.
- Aydişakir, Köksal., 2009. Şakirkesme Çiçek Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) Yetiştiriciliğinde Farklı Sulama Programlarının Verim ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 196, İzmir.

- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları, 374, Konya.
- Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B., Dural, H., 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat. A Boron Hyperaccumulator Plant Species That May Phytoremediate Soils with Toxic B Levels. *Turkish Journal of Botany*, 28(3), 273-278.
- Baday, Saja. J. S., 2018. Plant Tissue Culture. *International Journal of Agriculture and Environmental*, 4(4), 2455-6939.
- Bakhsh, A., Anayol, E., Türkmen, A. K., Özcan, S., 2016. The Effect of Improvised Media and Gelling Agents on In Vitro Germination of Cotton (*Gossypium hirsutum*. L.). *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 20(3), 223-229.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. *Plant Soil*, 39, 205–207.
- Bazargani, M. M., Tabatabaei, B. E. S., Omidi, M., 2011. Multiple Shoot Regeneration of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via shoot apex culture system. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2005-2011.
- Bell, A. A., 1999. Diseases of Cotton. *Cotton: Origin, History, Technology and Production*. John Wiley and Sons, 553-594.
- Besemer, S.T., 1980. Carnations. Editor, Larson, R.A, In: *Introduction to Floriculture*, 47-79, Academic Press. Inc, New York.
- Bhojwani, S. S., Razdan, M. K., 2004. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. A Revised Edition Elsevier, 3.
- Boren Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, 2010. Türkiye Toprakları Bor Haritası. Erişim Tarihi: 20.12.2018. <http://boren.gov.tr/content/images/Turkiyebor.jpg>
- Boşgelmez, A., Boşgelmez, I. I., Savaşçı, S., Paslı, N., 2001. Ekoloji-II. Toprak Başkent Klişe Matbaacılık, 668-674, Ankara
- Brown, P.H., Shelp, B.J., 1997. Boron Mobility in Plants. *Plant Soil*, 193, 85–101
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2).
- Carrió-Seguí, À., Ruiz-Rivero, O., Villamayor-Belinchón, L., Puig, S., Perea-García, A., Peñarrubia, L. 2019. The Altered Expression of microRNA408 Influences the Arabidopsis Response to Iron Deficiency. *Frontiers in plant science*, 10.
- Cartwright, B., Zarcinas, B.A., Spouncer, L.A., 1986. Boron Toxicity in South Australian Barley Crops. *Australian Journal of Soil Research*, 37, 351-359.

- Cassman, K.G., 1993. Cotton *In*: W.F. Bennet (ed.). Nutrient Deficiencies and Toxicities in Crop Plants. ASP Press The American Phytopathological Society ,202.
- Cervilla, L. M., Blasco, J. J., Rios, M. A., Rosales, E., Sánchez-Rodríguez, M. M., Rubio-Wilhelmi, L., Romero, L., Ruiz, J. M., 2012. Parameters Symptomatic for Boron Toxicity in Leaves of Tomato Plants. *Journal of Botany*, 1–17.
- Chaumont, F., Tyerman, S. D., 2014. Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations. *Plant physiology*, 164(4), 1600-1618.
- Chen, K., Rajewsky, N., 2007. The Evolution of Gene Regulation by Transcription Factors and Micrnas. *Nature Reviews Genetics*, 8 (2), 93–103.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., Yu, D., 2012. The Role of WRKY Transcription factors in Plant Abiotic Stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 120-128.
- Çetin E.S., Kazaz, S., Baydar, N.G., 2007. Farklı Besin Ortamlarının Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) Sürgün Ucu Kültürü Üzerine Etkileri. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 24(2), 01-08.
- Dagla, H. R., 2012. Plant Tissue Culture. *Resonance*, 17(8), 759-767.
- Daud, M. K., Variath, M. T., Ali, S., Jamil, M., Khan, M. T., Shafi, M. O. H. A. M. M. A. D., Shuijin, Z., 2009. Genetic Transformation of Bar Gene and Its Inheritance and Segregation Behavior in The Resultant Transgenic Cotton Germplasm. *Pakistan Journal of Botany* 41, 2167-2178.
- Davidonis, G. H. Hamilton, R. H., 1983. Plant Regeneration from Callus Tissue of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Science Letters*, 32, 89–93.
- De Mello-Farias, P. C., Chaves, A. L. S., Lencina, C. L., 2011. Transgenic Plants for Enhanced Phytoremediation–Physiological Studies. In *Genetic Transformation. InTech*, 305-328.
- Divya, K., Anuradha T.S., Jami, S.K., Kirti, P.B., 2008. Efficient Regeneration from Hypocotyl Explants in Three Cotton Cultivars. *Biologia Plantarum* 52, 201–208
- Divya, K., Jami, S. K., Kirti, P. B., 2010. Constitutive Expression of Mustard Annexin, AnnBj1 Enhances Abiotic Stress Tolerance and Fiber Quality in Cotton Under Stress. *Plant Molecular Biology*, 73(3), 293-308.
- Dodds, J. H., Roberts, L. W., 1987. *Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. New York.
- Doldur, H., 2008. Kesme Çiçek Üretimi ve Ticareti. *İstanbul Üniversitesi Coğrafya Dergisi*, (16), 26-45.

- Eapen, S., Singh, S., D'Souza, S.F., 2007. Advances in Development of Transgenic Plants for Remediation of Xenobiotic Pollutants. *Biotechnology Advances*, 25, 442– 451.
- Eldem, V., Akçay, U.Ç., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S., Unver, T., 2012. Genome-Wide Identification of miRNAs Responsive to Drought in Peach (*Prunus persica*) by Highthroughput Deep Sequencing. *PLoS One* 7 (12), 1-12.
- Eldem, V., Okay, S., Unver, T., 2013. PlantmicroRNAs: New Players in Functional Genomics. *Turkish Journal Of Agriculture and Forestry*, 37 (1), 1–21.
- Evans, D. E., Coleman, J. O., Kearns, A., 2003. *Plant cell culture*. Bios Scientific 194, New York .
- Ezhilarasi, T., Nallathambi, G., 2013. Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium Hirsutum L.*) A Rapid In Vitro Method. *Journal of Cell Tissue Research*, 13(3).
- Favas, P. J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M. S., 2014. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, 485-517.
- Feng, H., Zhang, Q., Wang, Q., Wang, X., Liu, J., Li, M., Huang, L., Kang, Z., 2013. Target of taе-miR408, A Chemocyanin-like Protein Gene (TaCLP1) Plays Positive Roles in Wheat Response to High-Salinit, Heavy Cupric Stress and Stripe Rust. *Plant Molecular Biology*, 83(4-5), 433-443.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., Chaumont, F., 2004. Interactions Between Plasma Membrane Aquaporins Modulate Their Water Channel Activity. *The Plant Cell*, 16(1), 215-228.
- Firoozabady, E., Deboer D.L., Merlo, D.J., Halk, E.L., Amerson, L.N., Rashka, K.E., Murray, E.E., 1987. Transformation of Cotton (*Gossypium hirsutum L.*) by *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration of Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology* 10, 105–116.
- Firoozabady, E. DeBoer, D. L., 1993. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Many Cultivars of Cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 29(4), 166-173.
- Firoozabady, E., Moy, Y., Tucker, W., Robinson, K., Gutterson, N., 1995. Efficient Transformation and Regeneration of Carnation cultivars using *Agrobacterium*. *Molecular breeding*, 1(3), 283-293.
- Finer, J. J., Smith, R. H., 1984. Initiation of Callus and Somatic Embryos from Explants of Mature Cotton (*Gossypium klotzschianum Anderss*). *Plant cell reports*, 3(1), 41-43.

- Finer, J. J., 1988. Plant Regeneration from Somatic Embryogenic Suspension Cultures of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant cell reports*, 7(6), 399-402.
- Firoozabady, E., DeBoer, D. L., 1993. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Many Cultivars of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology*, 29, 166–173.
- Frey, L., Janick, J., 1991. Organogenesis in Carnation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(6), 1108-1112.
- Galbally, J., Galbally, E., 1997. *Carnations and Pinks for Garden and Greenhouse*. Timber Press, 1-310, Portland, Oregon.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., K, Ojima., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151–158.
- Gençer, O., 1999. Penbeden Pamuğa. Efsaneden Tarihe, Tarihten Bugüne Adana: Köprü Başı, Yapı Kredi Yayınları, 1392, 591-599, İstanbul.
- Gençer, O., Özüdoğru, T., Kaynak, M. A., Yılmaz, A., Ören, N., 2005. Türkiye’de Pamuk Üretimi ve Sorunları. TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği, VI. Teknik Kongresi. I.Cilt. 3–7 Ocak, Ankara, 459-480.
- Gezgin, S., Dursun, N., Hamurcu, M., Harmankaya, M., Önder, M., Sade, B., Topal, A., Soylu, S., Akgün, N., Yorgancılar, M., Ceyhan, E., Çiftçi, N., Acar, B., Gültekin, İ., Işık, Y., Şeker, C., Babaoğlu, M., 2002. Determination of B Contents of Soils in Central Anatolian Cultivated Lands and its Relations Between Soil and Water Characteristics. *Boron in Plant and Animal Nutrition*, 391-400.
- Guo, W. F., Wang, K. Y., Wang, N., LI, J., LI, G. Q., LIU, D. H., 2018. Rapid and Convenient Transformation of Cotton (*Gossypium hirsutum* L) Using in Planta Shoot Apex via Glyphosate Selection. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(10), 2196-2203.
- Guo, X., Niu, J., Cao, X., 2018. Heterologous Expression of *Salvia miltiorrhiza* MicroRNA408 Enhances Tolerance to Salt Stress in *Nicotiana benthamiana*. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3985.
- Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü 2018. Pamuk Raporu. Erişim Tarihi: 20.12.2018. <http://koop.gtb.gov.tr/data/5ad06c80ddee7dd8b423eb24/2017%20Pamuk%20Raporu.pdf>
- Gürel, A., Akdemir, H., Emiroğlu, Ş.H., Kadoğlu, H., Karadayı, H.B., 2000. Türkiye Lif Bitkileri: Pamuk Tarımı, Teknolojisine Genel Bakış ve Diğer Lif Bitkileri, 17-21 Ocak, Ankara, 525-566.

- Hajyzadeh, M., Turktas, M., Khawar, K. M., Unver, T., 2015. miR408 Overexpression Causes Increased Drought Tolerance in Chickpea. *Gene*, 555(2), 186-193.
- Hakkı, E.E., Babaoğlu, M., Soylu, S., Gezgin, S., Dural, H., 2005. Bitkilerce Bor Alımı Moleküler, Tarımsal ve Çevresel Değerlendirmeler. I.Ulusal Bor Çalıştayı Bildiler Kitabı, 28-29 Nisan, Ankara, 141-146.
- Haliloğlu, H., 2015. Pamuk Üzerine Sıcaklık Stresinin Etkisi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 19(4), 238-249.
- Hamel, L. P., Nicole, M. C., Sritubtim, S., Morency, M. J., Ellis, M., Ehltng, J., Beaudoin, N., Barbazuk, B., Klessig, D., Lee, J., Martin, G., Mundy, J., Ohashi, Y., Dierk, S., Mundy, j., Ohashi, Y., Scheel, D., Sheen, J., Xing, T., Zhang, S., Seguin, A., Ellis, B.E., 2006. Ancient Signals: Comparative Genomics of Plant MAPK and MAPKK Gene Families. *Trends in plant science*, 11(4), 192-198.
- Hamutoğlu, R., Dinçsoy, A. B., Cansaran-Duman, D., Aras, S., 2012. Biyosorpsiyon adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları. *Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69, 69.
- Hatsugai, N., Katagiri, F., 2017. Quantification of Plant Cell Death by Electrolyte Leakage Assay. *The EMBO Journal*, 8(5), 2758.
- Hayes, J., Sutton, T., 2010. Australian Perspectives on Boron Toxicity Tolerance in Cereals. *Breeding Science*. 60(4), 297.
- He, C., Yan, J., Shen, G., Fu, L., Holaday, A. S., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., 2005. Expression of an Arabidopsis Vacuolar Sodium/Proton Antiporter Gene in Cotton Improves Photosynthetic Performance Under Salt Conditions and Increases Fiber Yield in the Field. *Plant and Cell Physiology*, 46(11), 1848-1854.
- Hooda, V., 2007. Phytoremediation of Toxic Metals from Soil and Waste Water. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 367-376.
- Holley, W.D., Baker, R., 1991. *Carnation production II*. Kendall- Hunt Publishing Company , 8403-6308-7, USA.
- Hussain, S. S., Rao, A. Q., Husnain, T., Riazuddin, S., 2009. Cotton Somatic Embryo Morphology Affects Its Conversion to Plant. *Biologia Plantarum*, 53(2), 307-311.
- Ioannov, M., 1990. Production Of Carnation Plants By Shoot-Tip Culture In Vitro *Technical Bulletin Cyprus Agricultural Research Institute*, 117, 8
- Iantcheva, A., Vlahova, M., Atanassova, B., Atanassov, A., 2005. Plant Regeneration via Direct Organogenesis and Somatic Embryogenesis of Two New

- Bulgarian Spray Carnation Cultivars. *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 19(3), 15-19.
- Ikram, ul-Haq ., 2005. Callus Proliferation and Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 206-209.
- İşler, N. 2013. Pamuk. M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Erişim Tarihi: 23.09.2018. <http://mku.edu.tr/files/898-3cdf3a5f-07c3-428d-b25f-e7761193df33.pdf>.
- Jiang, B., 2004. Optimization of Agrobacterium Mediated Cotton Transformation Using Shoot Apices Explants and Quantitative Trait loci Analysis of Yield and Yield Component Traits in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*) Louisiana State University, PhD thesis. 118, Louisiana.
- Jingyin, W., Jianming, S., 1990. Shoot Apex and Axillary Bud Culture of *Gossypium* spp.[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2, 003.
- Jovanović, Ž., Stanisavljević, N., Mikić, A., Radović, S., Maksimović, V., 2014. Water Deficit Down-Regulates miR398 and miR408 in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 26-31.
- Jun, X. U., WANG, X. Y., GUO, W. Z., 2015. The Cytochrome P450 Superfamily: Key Players in Plant Development and Defense. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(9), 1673-1686.
- Jurgens, A., Witt, T., Gottsberger, G., 2003a. Flower Scent Composition in *Dianthus* and *Saponaria* Species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 345-357.
- Jurgens, A., Witt, T., Gottsberger, G., 2003b. Polen Grain Numbers, Ovule Numbers and Polen*Ovule Ratios in Caryophylloideae; Correlation with Breeding System, Pollination, Life Form, Style Number and Sexual System. *Sexual Plant Reproduction*, 14, 279-289.
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G. P., Schäffner, A. R. 1994. Water Channels in the Plant Plasma Membrane Cloned by Immunoselection from a Mammalian Expression System. *The Plant Journal*, 6(2), 187-199.
- Kantar, M., Unver, T., Budak, H., 2010. Regulation of Barley miRNAs Upon Dehydration Stress Correlated with Target Gene Expression. *Functional Integrative Genomics* 10 (4), 493–507.
- Kanwar, J. K., Kumar, S., 2009. Influence of Growth Regulators and Explants on Shoot Regeneration in Carnation. *Horticultural Science*, 36, 140-146.
- Kanwar, J. K., Kumar, S., 2011. Recovery of Transgenic Plants by Agrobacterium Mediated Genetic Transformation in *Dianthus caryophyllus* L.(carnation). *Advances in Applied Science Research*, 2, 357-366.

- Kaptan, M. A., 2013. Pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) bor toksisitesi ve humik madde uygulamasının etkileri. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi,191, Aydın.
- Kayıhan, D. S., Kayıhan, C., Çiftçi, Y. Ö., 2016. Excess Boron Responsive Regulations of Antioxidative Mechanism at Physio-Biochemical and Molecular Levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 337-345.
- Kazaz, S. 2006. Farklı Dikim Sistemleri ve Sıklıklarının Yaz Karanfil Üretiminde Verim ve Kalite Üzerine Etkileri. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 194, Aydın.
- Kerby, T.A., Keeley, M., Johnson, S., 1989. Weather and Seed Quality Variables to Predict Cotton Seedling Emergence. *Agronomy Journal* 81, 415-419.
- Keshamma, E., Rohini, S., Rao, K. S., Madhusudhan, B., Kumar, M. U., 2008. Tissue Culture-independent in Planta Transformation Strategy: An *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Gene Transfer Method to Overcome Recalcitrance in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of cotton science*, 12, 264–272
- Khan, T., Singh, A. K., Pant, R. C., 2006. Regeneration via Somatic Embryogenesis and Organogenesis in Different Cultivars of Cotton (*Gossypium* spp.). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 42(6), 498-501.
- Khan, T., Reddy, V. S., Leelavathi, S., 2010. High-frequency Regeneration via Somatic Embryogenesis of an Elite Recalcitrant Cotton Genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and Efficient *Agrobacterium*-mediated Transformation . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(3), 323-330.
- Kharrazi, M., Tehranifar, A., Neamati, S. H., Bagheri, A., Sharifi Sharif Abad, A., 2011. In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5.
- Khatun, M., Rahman, M. M., Roy, P. K., 2013. In vitro Regeneration and Field Evaluation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) through Shoot Tip and Node Culture. *Journal of applied Science and Technology*, 9(1), 93-99.
- Khatun, M. M., Roy, P. K., Razza, M. A., 2018. Additive Effects of Coconut Water with Various Hormones on Invitro Regeneration of Carnation (*dianthus caryophyllus*). *Journal of animal and plant sciences*, 28(2), 589-596.
- Kinouchi, T., Endo, R., Yamashita, A., Satoh, S., 2006. Transformation of Carnation with Genes Related to Ethylene Production and Perception Towards Generation of Potted Carnations with a Longer Display Time. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(1), 27.
- Kobayashi, M., Matoh, T., Azuma, J., 1996. Two Chains of Rhamnogalacturonan

II are Cross-Linked by Borate-diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls, *Plant Physiology* 110, 1017-120.

- Kolsarıcı, Ö., 2009. Lif ve Kauçuk bitkileri Tarla bitkileri kitabı. (Ed.) Geçit, H.H., Çiftçi, C.Y., Emeklier, H.Y., İkincikarakaya, S., Adak, M.S., Kolsarıcı, Ö., Ekiz, H., Altınok, S., Sancak, C., Sevimay, C.S., Kendir, H. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Ankara.
- Korkut, A.B., 1998. Çiçek yetiştiriciliği, Hasad Ltd., 222, İstanbul.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2011. miRBase: Integrating microRNA Annotation and Deep-Sequencing Data. *Nucleic Acids Research*, 39, 152–157.
- Krämer, U., Chardonnens, A.N., 2001. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 661-672.
- Kumar, S., Sharma, P., Pental, D., 1998. A Genetic Approach to in vitro Regeneration of Non-Regenerating Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Plant Cell Reports* 18, 59–63.
- Kuppu, S., Mishra, N., Hu, R., Sun, L., Zhu, X., Shen, G., Blumwald, E., Payton, P., Zhang, H., 2013. Water-deficit Inducible Expression of a Cytokinin Biosynthetic Gene IPT Improves Drought Tolerance in Cotton. *PLoS One*, 8(5), 64190.
- Lee, S. K., Kim, B. G., Kwon, T. R., Jeong, M. J., Park, S. R., Lee, J. W., Byun, M. O., Kwon, H.B., Matthews, B.F., Hong, C.B., Park, S. C., 2011. Overexpression of the Mitogen-Activated Protein Kinase Gene *OsMAPK33* Enhances Sensitivity to Salt Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of biosciences*, 36(1), 139-151.
- Leelavathi, S., Sunnichan, V. G., Kumria, R., Vijaykanth, G. P., Bhatnagar, R. K., Reddy, V. S., 2004. A Simple and Rapid Agrobacterium-mediated Transformation Protocol for Cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic Calli as a Source to Generate Large Numbers of Transgenic Plants. *Plant cell reports*, 22(7), 465-470.
- Li, D.D., Wu, Y.J., Ruan, X.M., Li, B., Zhu, L., Wang, H., 2009. Expressions of Three Cotton Genes Encoding the PIP Proteins are Regulated in Root Development and in Response to Stresses. *Plant Cell Reports*, 28, 291–30.
- Li, D., Wang, Y., Han, K., 2012. Recent Density Functional Theory Model Calculations of Drug Metabolism by Cytochrome P450. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(11-12), 1137-1150.
- Li, T., Li, H., Zhang, Y.X., Liu, J.Y., 2011. Identification and Analysis of Seven H₂O₂-Responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the Seedlings of Rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Nucleic Acids Research*, 39 (7), 2821–2833.

- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., 1983. Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls a and b of Leaf Extracts in Different Solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591-592.
- Liu, G., Li, X., Jin, S., Liu, X., Zhu, L., Nie, Y., Zhang, X., 2014. Overexpression of Rice NAC gene SNAC1 Improves Drought and Salt Tolerance by Enhancing Root Development and Reducing Transpiration Rate In Transgenic Cotton. *PLoS One*, 9(1), e86895.
- Loomis, W. D., Durst, R. W., 1992. *Chemistry and Biology of Boron*. BioFactors (Oxford, England), 3(4), 229-239.
- Lu, C. Y., Nugent, G., Wardley-Richardson, T., Chandler, S. F., Young, R., Dalling, M. J., 1991. Agrobacterium-mediated Transformation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Nature Biotechnology*, 9(9), 864.
- Lu, S., Sun, Y.-H., Shi, R., Clark, C., Li, L., Chiang, V.L., 2005. Novel and Mechanical Stress Responsive microRNAs in *Populus Trichocarpa* That are Absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 17 (8), 2186–2203.
- Ma, C., Burd, S., Lers, A., 2015. miR408 is Involved in Abiotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 84(1), 169-187.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982. *Southern Transfer. Molecular Cloning (a Laboratory Manual)*, 382-389.
- Marmiroli, N., McCutcheon, S. C., 2003. Making Phytoremediation a Successful Technology. *Phytoremediation Transformation and control of contaminants*, 85-119.
- Marschner, H., Marschner, P., 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier, 672, Germany.
- Matter, M. A., Hanafy, M. S., Aly, U. I., 2017. Effect of Methyl Jasmonate and Mannitol Application on Growth and Eugenol Content in Callus Cultures of Carnation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 27(2), 227-240.
- Maunoury, N., Vaucheret, H., 2011. AGO1 and AGO2 Act Redundantly in miR408-Mediated Plantacyanin Regulation. *PloS one*, 6(12), 28729.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., Chrispeels, M. J., 1993. The Vacuolar Membrane Protein Gamma-TIP Creates Water Specific Channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 12(6), 2241-2247.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., Santoni, V., 2008. Plant Aquaporins Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 595-624.
- Meng, L. S., Song, J. P., Sun, S. B., Wang, C. Y., 2009. The Ectopic Expression of PttKN1 Gene Causes Pleiotropic Alternation of Morphology in Transgenic

- Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(6), 1155.
- Meng, X., Zhang, S., 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245-266.
- Meng, Z. H., Liang, A. H., Yang, W. C., 2007. Effects of Hygromycin on Cotton Cultures and its Application in *Agrobacterium*-mediated Cotton Transformation. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 43(2), 111-118.
- Mishra, R., Wang, H. Y., Yadav, N. R., Wilkins, T. A., 2003. Development of a Highly Regenerable Elite Acala Cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa)—A Step Towards Genotype-Independent Regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(1), 21-35.
- Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fujiwara, T., 2007. Plants Tolerant of High Boron Levels. *Science*, 318,1417.
- Miwa, K., Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T., Fujiwara, T., 2013. Roles of BOR2, a Boron Exporter, in Cross Linking of Rhamnogalacturonan II and Root Elongation Under Boron Limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 163(4), 1699-1709.
- Mohamed, H. I., Akladios, S. A., Ashry, N. A., 2018. Evaluation of Water Stress Tolerance of Soybean Using Physiological Parameters and Retrotransposon-Based Markers. *Gesunde Pflanzen*, 70(4), 205-215.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B. L., Werck-Reichhart, D., 2003. Plant Cytochromes P450: Tools for Pharmacology, Plant Protection and Phytoremediation. *Current opinion in biotechnology*, 14(2), 151-162.
- Moustafa, K., AbuQamar, S., Jarrar, M., Al-Rajab, A. J., Trémouillaux-Guiller, J., 2014. MAPK Cascades and Major Abiotic Stresses. *Plant cell reports*, 33(8), 1217-1225.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Mutum, R. D., Balyan, S. C., Kansal, S., Agarwal, P., Kumar, S., Kumar, M., Raghuvanshi, S., 2013. Evolution of Variety-Specific Regulatory Schema for Expression of *osa-miR408* in indica Rice Varieties under Drought Stress. *The Febs journal*, 280(7), 1717-1730.
- Nable, R.O., Banuelos, G.S., Paul, J.G., 1997. Boron Toxicity. *Plant and Soil*, 79, 198.
- Nanjo, T., Kobayashi, M.Y., Yoshiba, Y., Kakubar, K., Yamaguchi, S.Y., Shinozaki, K., 1999. Antisense Suppression of the Proline Degradation Improves

Tolerance to Freezing and Salinity in *Arabidopsis thaliana* Febs Letters, 461(3), 205-210

National Cotton Council of America. Erişim tarihi :31.05.2018.
<https://www.cotton.org/pubs/cottoncounts/story/pdf.cfm>

Nontaswatsri, C., Fukai, S., Goi, M., 2004. Revised Cocultivation Conditions Produce Effective Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Science*, 166(1), 59-68.

Nontaswatsri, C., Fukai, S. (2006). Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). In *Agrobacterium Protocols*. Humana Press, 2, 311-320.

Oğlakçı, M., 2012. Pamuk Bitkisel Yapısı, Yetiştirilmesi, Islahı ve Lif Teknolojisi. Akademisyen Kitabevi Yayın Dağıtım ve Pazarlama Ltd. Şti. 530, Ankara.

Ogtr, 2008. The Biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). Document prepared by the Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, 87 Australia.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, Y., 1979. Assay of Lipid Peroxides in Animal Tissue by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 51–358.

Onthong, J., Yoajui, N., Kaewsichan, L., 2011. Alleviation of Plant Boron Toxicity by Using Water to Leach Boron from Soil Contaminated by Wastewater from Rubber Wood Factories. *Science Asia*, 37, 314–319.

Özay, C., Mammadov, R., 2013. Ağır Metaller ve Süs Bitkilerinin Fitoremediasyonda Kullanılabilirliği. *Balıkesir Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(1) 67-76.

Özçağırın, R., 2001. Bahçe Bitkileri Döllenme Biyolojisi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doktora Ders Notları. 9, Bornova, İzmir

Öztürk, S. E., Goktay, M., Has, C., Babaoglu, M., Allmer, J., Doganlar, S., Frary, A., 2017. Boron Hyperaccumulation Mechanisms in *Puccinellia Distans* as Revealed by Transcriptomic Analysis. *BioRxiv*, 110403.

Özyiğit, İ. İ., Gözükirmizi, N., 2008. High Efficiency Shoot and Root Formation from Cotyledonary Nodes of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 40, 1665-1672.

Özzambak, M. E., 2003, Karanfil yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Broşür Dergisi Haziran, 36, 16.

Pan, J., Huang, D., Guo, Z., Kuang, Z., Zhang, H., Xie, X., Ma, Z., Gao, S., Lerdau, M.T., Chu, C., Li, L., 2018. Overexpression of microRNA408 Enhances Photosynthesis, Growth, and Seed Yield in Diverse Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(4), 323-340.

- Pan, X., Nichols, R. L., Li, C., Zhang, B., 2018. MicroRNA-Target Gene Responses to Root Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) Infection in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genomics, Elsevier Genomics, 8.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qui, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., Payton, P., 2011. Expression of an Arabidopsis Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase Gene (AVP1) in Cotton Improves Drought-and Salt Tolerance and Increases Fibre Yield in the Field Conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9(1), 88-99.
- Peuke, A.D., Rennenberg, H., 2005. Phytoremediation. *Embo Reports Journal* 6, 497-501.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H., 2009. MAPK Cascade Signalling Networks in Plant Defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 421-426.
- Pommerrenig, B., Diehn, T. A., Bienert, G. P., 2015. Metalloido-Porins: Essentiality of Nodulin 26-like Intrinsic Proteins in Metalloid Transport. *Plant Science*, 238, 212-227.
- Prasad, H. K., Mythili, J. B., Anand, L., Rashmi, H. J., Suneetha, C., 2016. Optimization of Regeneration Protocol and Agrobacterium Mediated Transformation in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Horticultural Science*, 4(2), 120-127.
- Price, H.J., Smith, R.H., 1979. Somatic Embryogenesis in Suspension Cultures of *Gossypium klotzschianum* Anderss. *Planta*, 145, 305-307.
- Rajasekaran, K., Cary, J. W., Jaynes, J. M., Cleveland, T. E., 2005. Disease Resistance Conferred by the Expression of a Gene Encoding a Synthetic Peptide in Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants. *Plant Biotechnology Journal*, 3(6), 545-554.
- Rascio, N., Navari I, F., 2011. Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why Do They Do It? And What Makes Them So Interesting?. *Plant Science*, 180(2), 169-181.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of Metals Using Plants to Remove Pollutants from the Environment. *Current Opinion Birstechnol*, 8, 221 – 226.
- Reid, A., 2000. Standard and Spray Carnations. Australia Department of Agriculture Farmnote, 56.
- Reid, R. J., Hayes, J. E., Post, A., Stangoulis, J. C. R., Graham, R. D., 2004. A Critical Analysis of the Causes of Boron Toxicity in Plants. *Plant, Cell & Environment*, 27(11), 1405-1414.

- Reid, R., 2007. Update on Boron Toxicity and Tolerance in Plants. *Advances in plant and animal boron nutrition*, 83-90.
- Renault, H., Bassard, J. E., Hamberger, B., Werck-Reichhart, D., 2014. Cytochrome P450-Mediated Metabolic Engineering: Current Progress and Future Challenges. *Current opinion in plant biology*, 19, 27-34.
- Riello, G., Parthasarathi, P., (Eds.) 2011. *The Spinning world: A global history of cotton textiles*. Oxford University Press 1200-1850. United Kingdom.
- Rosolem, C. A., Bogiani, J. C., 2011. Physiology of Boron Stress in Cotton. *Stress Physiology in Cotton*, 113.
- Ryan, J., Rashid, A., 2006. Application of Soil and Plant Analysis for Applied Research and Development in West Asia–North Africa: An International Center’s Perspective. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37(15–20), 2185–2198.
- Sakhanokho, H., Zipf, A., Rajasekaran, K., Saha, S., Sharma, G. C., Chee, P. W., 2004. Somatic Embryo Initiation and Germination in Diploid Cotton (*Gossypium arboreum* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology* 40, 177–181.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* cells. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 34, America.
- Sangannavar, P. A., Katageri, I. S., Vamadevaiah, H. M., Khadi, B. M., 2012. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cotton cv. coker-312 (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Cell Tissue Research*, 12(3). 3401-3408.
- Shoemaker, R. C., Couche, L. J., Galbraith, D. W., 1986. Characterization of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 5(3), 178-181.
- Shweta, J. A. K., 2014. In silico Prediction of Cotton (*Gossypium hirsutum*) Encoded microRNAs Targets in the Genome of Cotton Leaf Curl Allahabad Virus. *Bioinformation*, 10(5), 251.
- Smart, R.E., Bingham, G.E., 1974. Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiology*, 53, 258–260.
- Song, Z., Zhang, L., Wang, Y., Li, H., Li, S., Zhao, H., Zhang, H., 2018. Constitutive Expression of miR408 Improves Biomass and Seed Yield in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2114.
- Stanfield, R.C., Hacke, U.G., Laur, J., 2017. Are Phloem Sieve Tubes Leaky Conduits Supported by Numerous Aquaporins? *American Journal of Botany*, 104, 719–732.

- Sun, M., Yang, J., Cai, X., Shen, Y., Cui, N., Zhu, Y., Jia, B., Sun, X., 2018. The Opposite Roles of OsmiR408 in Cold and Drought Stress Responses in *Oryza sativa*. *Molecular Breeding*, 38(10), 120.
- Süs Bitkileri Sektör Raporu 2018. Erişim tarihi :26.09.2018. <http://www.Susbitkileri.Org.Tr/Content/Docs/2017susrapor.Pdf>
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T., 2002. Arabidopsis Boron Transporter for Xylem Loading. *Nature*, 420, 337–340.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, L.X., Wrenn, N.V., Fujiwara, T., 2005. Endocytosis and Degradation of BOR1, A Boron Transporter of *Arabidopsis thaliana*, Regulated by Boron Availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 12276–12281.
- Tapkı, N., Kızıltuğ, T., Çelik, A. D., 2018. Current Situation of Turkey's Cut Flower Production and Trade, Problems and Offered Solutions. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(3), 313-321.
- Taşcıoğlu, Y., Sayın, C., 2005. Türkiye'de Kesme Çiçek Üretim ve İhracat Yapısı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(3), 343-354.
- Temel, M., Öztürk, M., 2016. Türkiye Kesme Çiçek Üretimi ve Dış Ticareti. XII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi, 25-27 Mayıs Isparta, 2147-2154.
- Trindade, I., Capitão, C., Dalmay, T., Fevereiro, M. P., Dos Santos, D. M., 2010. miR398 and miR408 are Up-Regulated in Response to Water Deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231(3), 705-716.
- Tripathy, S., Reddy, G. M., 2002. In Vitro Callus Induction and Plantlet Regeneration from Indian Cotton Cultivars. *Plant Cell Biotechnology Molecular Biology*, 3(4), 137-142.
- Trolinder, N. L., Goodin, J. R., 1987. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 6(3), 231-234.
- Trolinder, N. L., Xhixian, C., 1989. Genotype Specificity of the Somatic Embryogenesis Response in Cotton. *Plant Cell Reports*, 8(3), 133-136.
- Türe, C., Bell, R.W., 2004. Plant Distribution and its Relationship to Extractable Boron in Naturally Occurring High Boron Soils in Turkey. *Israel Journal of Plant Science*, 52, 125–132.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, 2017. Tekstilde Kullanılan Ham Bitkiler. Erişim tarihi : 20.12.2018. http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=58.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, 2018. TÜİK Süs Bitkileri, 2011-2017. Erişim tarihi :26.09.2018. www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001.

- Wang, J.Z., Tao, S.T., Qi, K.J., Wu, J., Wu, H.Q., Zhang, S.L., 2011. Changes in Photosynthetic Properties and Antioxidative System of Pear Leaves to Boron Toxicity. *African Journal of Biotechnology*, 10, 19693-19700.
- Wang, M., Wang, Q., Zhang, B., 2013. Evaluation and Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Under Abiotic Stress in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 44-50.
- Weeks, M., 2017. Petition for a Determination of Nonregulated Status for Herbicide Tolerant Cotton Transformation. Bayer Crop Science USDA Petition Event GHB811,154.
- Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F., Leister, D., 2003. Plastocyanin is Indispensable for Photosynthetic Electron Flow in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31286-31289.
- Whealy, A.C., (Second Edition, Editor Larson, R.A.) 1992. Carnations. Academic Press Inc, 43-65, New York.
- Wu, J., Zhang, X., Nie, Y., Jin, S., Liang, S., 2004. Factors Affecting Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from a Range of Recalcitrant Genotypes of Chinese Cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 40(4), 371-375.
- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., Ren, D., 2008. Activation of MAPK Kinase 9 Induces Ethylene and Camalexin Biosynthesis and Enhances Sensitivity to Salt Stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 26996–27006
- Uehlein, N., Otto, B., Hanson, D. T., Fischer, M., McDowell, N., Kaldenhoff, R., 2008. Function of *Nicotiana glauca* Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO₂ Permeability. *The Plant Cell*, 20(3), 648-657.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K., Swain, W., 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio-Technology* 5, 263–266.
- Uygan, D., Çetin, Ö., 2004. Agricultural and Environmental Effects of Boron, Seydisuyu Water Deposit. II. Uluslararası Bor Sempozyumu. 23-25 Eylül Ankara, 527-540.
- Van Aken, B., 2008. Transgenic Plants for Phytoremediation: Helping Nature to Clean Up Environmental Pollution. *Trends in Biotechnology*, 26(5), 225-227.
- Yan, J., He, C., Wang, J., Mao, Z., Holaday, S. A., Allen, R. D., Zhang, H., 2004. Overexpression of the *Arabidopsis* 14-3-3 Protein GF14 λ in Cotton Leads to a “stay-green” Phenotype and Improves Stress Tolerance Under Moderate Drought Conditions. *Plant and Cell Physiology*, 45(8), 1007-1014.

- Yan eff, A., Vitali, V., Amodeo, G., 2015. PIP1 Aquaporins: Intrinsic Water Channels or PIP2 Aquaporin Modulators?. *FEBS letters*, 589(23), 3508-3515.
- Yantcheva, A., Vlahova, M., Atanassov, A., 1998. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*, 18(2), 148-153.
- Yılmaz, E., 1999. Büyük Menderes Ovasında Pamuk Bitkisinde Kısıtlı Sulama Uygulamasının Verim Ve Bazı Kalite Özelliklerine Etkisinin Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Yue, Y., Zhang, M., Zhang, J., Tian, X., Duan, L., Li, Z., 2012. Overexpression of the AtLOS5 Gene Increased Abscisic Acid Level and Drought Tolerance in Transgenic Cotton. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3741-3748.
- Zapata, C., Srivatanakul, M., Park, S. H., Lee, B. M., Salas, M. G., Smith, R. H., 1999. Improvements In Shoot Apex Regeneration of Two Fiber Crops: Cotton and Kenaf. *Plant cell, tissue and organ culture*, 56(3), 185-191.
- Zhang, J., Sun, J., Liu, J., Zhang, X., 1994. Studies on Plant Regeneration from Somatic Cells and Transferring Technique of Plantlets in Upland Cotton. *Zuo wu xue bao*, 20(2), 210-216.
- Zhang, B. H., Liu, F., Yao, C. B., 2000. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in cotton. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 60(2), 89-94.
- Zhang B.H., Feng, R., Li, X.H., Li, F.L., 1996. Anther Culture and Plant Regeneration of Cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss). *Chinese Sci Bull*, 41, 145-148.
- Zhang, S., Zhu, L. H., Li, X. Y. , Ahlman, A., Welander, M., 2005. Infection by *Agrobacterium tumefaciens* Increased the Resistance of Leaf Explants to Selective Agents in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinensis*). *Plant science*, 168(1), 137-144.
- Zhang, H., Li, L., 2013. Squamosa Promoter Binding protein-like7 Regulated microRNA408 is Required for Vegetative Development in Arabidopsis. *Plant Journal*. 74 (1), 98-109.
- Zhang, D. Y., Yang, H. L., Li, X. S., Li, H. Y., Wang, Y. C., 2014. Overexpression of *Tamarix albiflorum* TaMnSOD Increases Drought Tolerance in Transgenic cotton. *Molecular breeding*, 34(1), 1-11.
- Zhang, J. P., Yu, Y., Feng, Y. Z., Zhou, Y. F., Zhang, F., Yang, Y. W., Lei, M.Q., Zhang, Y.C., Chen, Y. Q. (2017). miRNA MiR408 regulates grain yield and photosynthesis via a phytyocyanin protein. *Plant physiology*, 175, 1175-1185.
- Zhao, F. Y., Li, Y. F., Xu, P., 2006. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Zhongmian 35) Using Glyphosate as a Selectable Marker. *Biotechnology letters*, 28(15), 1199.

- Zhao, F. J., McGrath, S. P., 2009. Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 373-380.
- Zhao, X. Y., Hong, P., Wu, J. Y., Chen, X. B., Ye, X. G., Pan, Y. Y., Wang, J., Zhang, X. S., 2016. The *tae-miR408*-Mediated Control of *TaTOC1* Gene Transcription is Required for the Regulation of Heading Time in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, 170, 1578-1594.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., Luo, L., 2010. Genome-Wide Identification and Analysis of Drought-Responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*. 61 (15), 4157–4168.
- Zuker, A., Chang, P. F. L., Ahroni, A., Cheah, K., Woodson, W. R., Bressan, R. A., Watad, A. W., Hasegawa, P.M., Vainstein, A., 1995. Transformation of Carnation by Microprojectile Bombardment. *Scientia horticultrae*, 64(3), 177-185.
- Zuker, A., Ahroni, A., Tzfira, T., Ben-Meir, H., Vainstein, A., 1999. Wounding by Bombardment Yields Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Molecular Breeding*, 5(4), 367-375.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İbrahim Ertan ERKAN

Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ibrahimertanerkan@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Şehit Ali İhsan Kalmaz Lisesi, Fen Bilimleri (Y.D.A) 2008

Lisans : GOÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, 2012

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji, 2014

Yayınlar

Akcay, U. C., Erkan, I. E., 2016. Silicon Induced Antioxidative Responses and Expression of *BOR2* and two *PIP* Family Aquaporin Genes in Barley Grown Under Boron Toxicity. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 318-326.

Akcay, U. C., Kuru, H. N., Erkan, İ. E., Olgunsoy, P., 2014. Effects of Salicylic Acid on Antioxidative System Components and Two Gene Activities (*top2* and *pdh47*) in Pea (*Pisum sativum* L.) Under Chilling and Freezing Stress. 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 02-06 June, Sarajevo, 134.

Erkan, İ. E., Akcay, U. C., 2016. Bor Stresi Altındaki Buğdayda Silisyum Varlığının Bitki Fizyolojisi İle Hücre Zarı Bor ve Silisyum Taşıyıcıları Üzerindeki Etkisi. International Symposium On Boron In Agriculture, 16-18 November, Ankara, 83-84.

Erkan, İ. E., Kumbul, H. N., 2016. Bor Stresi Altındaki Arpa, Buğday ve Tritikalede Silisyum Varlığının Bitki Fizyolojisi ve Bazı Biyokimyasal Değişimler Üzerine Etkileri. International Symposium On Boron In Agriculture, 16-18 November, Ankara, 95-96.

Akcay, U. C., Erkan, İ. E., Kuru, H. N., 2017. Effects of Silicon Application on Pea (*Pisum sativum* L.) Antioxidative System and *TOP2/PDH47* Gene Activities Under Chilling and Freezing Stress. International Green Biotechnology Congress, 11-13 September, Istanbul, 44.