

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DE YAYGIN OLARAK YETİŞTİRİLEN İKİ BAKLA (*Vicia faba* L.)
ÇEŞİDİNİN MİKROÇOĞALTIMI VE *Agrobacterium tumefaciens*
ARACILIĞIYLA SN19 (CryIBa/CryIIa) HİBRİD GENİNİN AKTARILMASI

Farzad NOFOUZI

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2016

Her hakkı saklıdır

*Bu Tezi,
Yetişmede biiyik emegi gezen
Canım Annem Turan ALIZADEH
ve
Rahmetli Babam Rahim NOFOUZI'ye
ithaf ederim*

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

02.02.2016

Farzad NOFOUZI



ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'DE YAYGIN OLARAK YETİŞTİRİLEN İKİ BAKLA (*Vicia faba* L.) ÇEŞİDİNİN MİKROÇOĞALTIMI VE *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA SN19 (CryIBa/CryIIa) HİBRİD GENİNİN AKTARILMASI

Farzad NOFOUZI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Bakla bitkisi (*Vicia faba* L.) önemli bir protein kaynağı olup, insan ve hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Tozlaşmadaki zorluklar, genetik havuzunun sınırlı olması ve güvenilir bir rejenerasyon sistemi olmadığı için bakla çeşitlerinde ıslah çalışmalarının ilerlemesi oldukça yavaştır. Bu çalışmada, geleneksel ıslah programlarına entegre olacak hızlı gen aktarma teknolojisi ile birlikte verimli bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye'de yetiştirilen Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin mikro çoğaltımı ve *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı için zigotik embriyo eksplantı kullanılmıştır. Denemelerde farklı BAP - NAA ve TDZ içeren MS ortamları rejenerasyon için kullanılmıştır. Ayrıca, rejenerasyonda destekçi madde olarak L-Glutamin ve Casein Hydrolysate de kullanılmıştır. Aynı zamanda 100 mg/l sıvı BAP hormonu ile farklı saatlerde priming yapıldıktan sonra TDZ içeren ve içermeyen MS ortamında kültüre alınmıştır. Deneme sonuçlarına göre en fazla sürgün sayısı 10.33 adet 3.00 mg/l BAP içeren MS ortamında Filiz 99 çeşidi için ve Eresen 87 çeşidi ise 10.30 adet sürgün 5.00 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirilmiş olup, sera koşullarında 1:1 oranda tarla toprağı ile torf içeren saksılarda dış koşullara adaptasyon sağlanmıştır. Her iki çeşide ait alıştırılmış bitkilerde çiçek ve bakla oluşumu gözlenmiştir. Daha sonraki denemelerde GV2260 p35S GUS-INT ve EHA 105::AoPR1 SN19 *Agrobacterium tumefaciens* hattı ile embriyo eksplantına inokulasyon sonucunda transgenik pozitif bitkiler elde ve PCR ile teyit edilmiştir.

Şubat 2016, 108 sayfa

Anahtar Kelime: Bakla (*Vicia faba*), Doku kültürü, Genetik transformasyon, *Agrobacterium tumefaciens*

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

MICROPROPAGATION OF TWO COMMONLY GROWN BROAD BEAN (*Vicia faba* L.) VARIETIES IN TURKEY AND *Agrobacterium tumefaciens* MEDIATED TRANSFORMATION USING HYBRID GENE SN19 (CryIBa/CryIIa)

Farzad NOFOUZI

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

Supervisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Broad bean is an important source of protein and plays important role in feeding humans and animals. Difficulties in pollination, limited genetic pool and lack of secured regeneration system makes has made advancements in broad bean breeding very slow. This study aimed to develop a technology for integration with traditional breeding system to achieve increased regeneration. This study used zygotic embryo explants of widely grown cv. Filiz 99 and Eresen 87 in Turkey for regeneration and genetic transformation studies. The study used BAP –NAA and TDZ for regeneration studies. Moreover, L-Glutamin and Casein Hydrolysate were also used as regeneration supporting material. Other studies used 100 mg/l BAP to prime embryos followed by culture on different concentrations of BAP. Maximum number of 10.33 shoots per explant on Filiz 99 and Eresen 87 cultivars was noted on MS medium containing 3 and 5 mg/l BAP respectively. Regenerated shoots were rooted on 1 mg/l IAA, transferred to pots containing peat moss and soil (1:1) in greenhouse to obtain flowering and pod set. Other experiments made use of GV2260 p35S GUS-INT ve EHA 105::AOPR1 SN19 strains of *Agrobacterium tumefaciens* to obtain transgenic positive plans and confirmed them with PCR.

February 2016, 108 pages

Key Words: Broad Bean (*Vicia faba*), Tissue culture, Genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*

TESEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi, öneri, yardım ve desteğini esirgemeyen ve bilimseliğini örnek aldığım çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) canı gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında beni yönlendiren, tez izleme komitesindeki değerli hocalarım, Prof. Dr. Orhan ARSLAN'a (Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi), ve Prof. Dr. Cemalettin Y. ÇİFTÇİ'ye (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı), ayrıca önemli katkı ve desteklerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) olmak üzere Prof. Dr. Nilgün BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Başkanı), Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı), Prof. Dr. Saime ÜNVER'e (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı), Prof. Dr. Dilek BAŞALMA'ya (Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) ve Tarla Bitkileri Bölümü akademik, laboratuvar ve idari personeline, moleküler tekniklerde desteğini gördüğüm Prof. Dr. Ali ERGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü) sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, hayatımın bu aşamasına kadar birçok fedakarlıklar göstererek, maddi ve manevi destekleriyle, hep yanımda olan sevgili canım anneme ve rahmetli babama, abilerim, kız kardeşime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunuyorum.

Farzad NOFOUZI

Ankara, Şubat, 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMALAR.....	12
2.1 Doku Kültürü Çalışmaları.....	12
2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Bitkilere Gen Aktarımı Çalışmaları.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1 Bitki Materyali.....	30
3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları.....	30
3.3 Tohumların <i>In vitro</i> Koşullarda Sterilizasyonu.....	31
3.4 Eksplant Seçimi.....	31
3.5 Rejenerasyon Çalışmaları.....	31
3.5.1 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanin iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	31
3.5.2 Farklı TDZ dozlarının baklanin iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	32
3.5.3 Farklı saatlerde BAP hormonu lie priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	32
3.5.4 100 mg/l Sıvı BAP hormonu ile 0, 12, 24 saat süre priming den sonra farklı konsantrasyonda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	32

3.5.5 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması	33
3.5.6 Farklı BAP + 0.01 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi	33
3.5.7 Farklı BAP + 0.02 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	33
3.5.8.Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate konsantrasyonların Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	34
3.6 Rejenere Olmuş Bakla Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	34
3.7 Elde Edilen Köklenmiş Bitkilerin Dış Şartlara Aktarılması.....	35
3.8 Bakteri Materyali.....	35
3.9 Bakteri Kültürlerinin Saflaştırılması ve Büyütülmesi.....	36
3.10 Antibiyotikler.....	36
3.11 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Bakla Bitkisine Gen Aktarımı.....	37
3.12 Bakteri Kültürlerinin Kısa ve Uzun Süreli Korunması.....	38
3.13 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi.....	38
3.13.1 Histokimyasal GUS analizi.....	39
3.13.2 DNA izolasyonu ve PCR analizi.....	39
3.14 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	41
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	42
4.1 Baklanın <i>in vitro</i> Koşullarda Sürgün Rejenerasyonu.....	42
4.1.1 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	42
4.1.2 Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	45
4.1.3 Farklı süreler ile BAP hormonu ve priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunu	48
4.1.4 100 mg/l sıvı BAP hormonu ile 0, 12, 24 saat süre priming den sonra farklı konsantrasyonda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu...	51

4.1.5 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması.....	58
4.1.6 Farklı BAP + 0.01 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	61
4.1.7 Farklı BAP + 0.02 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	64
4.1.8 Farklı BAP, NAA, L-glutamin ve casein hydrolysate dozlarında iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi.....	68
4.2 <i>In vitro</i> 'da Geliştirilen Bitkiciklerin Dış Şartlara Alıştırılması.....	72
4.3 Baklada Gen Aktarım Çalışmaları.....	75
4.3.1 Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin kanamisin monosülfat bitki seleksiyon ortamında LD ₁₀₀ dozunu belirlenmesi.....	75
4.3.2 Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin fosfinotrisin bitki seleksiyon ortamında LD ₁₀₀ dozunu belirlenmesi.....	78
4.3.3 <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 S GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı..	81
4.3.4 <i>A. tumefaciens</i> EHA 105:: 35 S SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı.....	85
4.3.5 <i>A. tumefaciens</i> EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı...	86
5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	104

SİMGELER DİZİNİ

BAP	6-Benzilaminopurin
bp	baz çifti
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
dNTP	Deoksi ribo nükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
F	F testi
g, mg, µg	gram, miligram, mikrogram
GUS	P-glukuronidaz
HCl	Hidroklorik Asit
IBA	Indol Butirik Asit
kDA	Kilodalton
Km	Kanamisin monosülfat
K.O.	Kareler ortalaması
kPa	Kilopaskal
l, ml, µl	Litre, mililitre, mikrolitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	Naftalen asetik asit
NA	Nutrient agar
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient broth
<i>NptII</i>	Neomisin fosfotransferaz II geni
PCR	Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
Ppt	Fosfinotrisin
Rif	Rifampisin
S.D.	Serbestlik derecesi
TBE	Tris- Borik asit-EDTA
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
Vir	Virulens geni
V.K.	Varyasyon kaynakları
X-gluc	5 Bromo - 4 kloro - 3 indolil glukoronid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Çiçeklenmiş bakla bitkilerinin tarlada bir görüntüsü.....	2
Şekil 1.2	Bakla(Vicia faba) Bitkisinin Tohumu.....	6
Şekil 1.3	Bakla (Vicia faba) tohum böceği [Bruchus rufimanus]'nin bakla tohumlarına verdiği zarar.....	8
Şekil 4.1	Baklanın Filiz 99 kültür Çeşidinin BAP ve NAA dozları bakımından zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	45
Şekil 4.2	Baklanın Filiz 99 kültür çeşidinin TDZ içeren ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	48
Şekil 4.3	Baklanın Filiz 99 kültür çeşidinin BAP hormonu ile priming yapılmış zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	51
Şekil 4.4	Baklanın Eresen 87 kültür çeşidinin BAP hormonu ile priming veTDZ içeren MS ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	54
Şekil 4.5	Baklanın Eresen 87 kültür çeşidinin BAP içeren MS ortamlarında zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	61
Şekil 4.6	Baklanın iki kültür çeşidinin zigotik embriyo eksplantından BAP-NAA içeren ortamda bitki rejenerasyonuna etkileri.....	64
Şekil 4.7	Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 kültür çeşidinin BAP- NAA içeren MS ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	68
Şekil 4.8	Filiz 99 ve Eresen 87 bakla kültür bakla çeşitlerinin BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate içeren ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	71
Şekil 4.9	<i>In vitro</i> 'da Geliştirilen Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinden elde edilen bitkilrinin dış şartlara alıştırılması.....	75
Şekil4.10	Filiz 99 ve Eresen 87 bakla kültür çeşitlerine ait ksplantların kanamisin monosülfat içeren seleksiyon ortamında LD ₁₀₀ dozunu belirlenmesi.....	76
Şekil 4.11	Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin eksplantlarının fosfinotrisin seleksiyon ortamında LD ₁₀₀ dozunu belirlenmesi.....	79

Şekil 4.12	Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35s GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı.....	82
Şekil 4.13	Filiz 99 çeşidin <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35S GUS INT bakteri hattı ile elde edilen Kanamisin monosülfata dayanıklı ve npt-II geninin varlığının pcr ile teyit edilmesi.....	84
Şekil 4.14	Eresen 87 çeşidin <i>A. tumefaciens</i> GV2260 p35 GUS INT bakteri hattı ile elde edilen Kanamisin monosülfata dayanıklı ve npt-II geninin varlığının pcr ile teyit edilmesi.....	84
Şekil 4.15	Filiz 99 ve Eresen 87 bakla kültür çeşitlerin <i>A. tumefaciens</i> EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı.....	87
Şekil 4.16	Filiz 99 çeşidin <i>A. tumefaciens</i> EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile elde edilen fosfinotrisine dayanıklı ve Bar geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	88
Şekil 4.17	Eresen 87 çeşidin <i>A. tumefaciens</i> EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile elde edilen fosfinotrisine dayanıklı ve Bar geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi.....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	2010-2014 yılları arasında Türkiye yemeklik tane baklagillerin ekiliş, üretim ve verim değerleri.....	3
Çizelge1.2	Türkiye’de 2014 yılında baklagil bitkilerine ait ekim, hasat, üretim ve verim ile ilgili istatistiksel verileri.....	3
Çizelge1.3	Baklanın 2005-2013yılları arasında dünyada ekim alanı, üretim ve verim değerleri	4
Çizelge1.4	Ülkeler itibariyle bakla ekim alanı, verim ve üretim değerleri	5
Çizelge 3.1	Kullanılan Hormonlar, çözücüler ve saklama koşulları.....	30
Çizelge 3.2	Bakteri hatları ve özellikleri.....	36
Çizelge 3.3	Agrobacterium hatlarının büyütülmesinde kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	37
Çizelge 3.4	Gen aktarımı yapılan dokuların seleksiyonunda kullanılan antibiyotikler, çözücüler ve saklama koşulları.....	37
Çizelge 3.5	PCR işleminde kullanılan primer dizileri.....	40
Çizelge 4.1	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	43
Çizelge 4.2	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi analizi sonuçları.....	44
Çizelge 4.3	Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	46
Çizelge 4.4	Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi analizi sonuçları.....	47
Çizelge 4.5	Farklı süreler ile BAP hormonu ve priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	49

Çizelge 4.6	Farklı süreler ile BAP hormonu ve priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi sonuçları	50
Çizelge 4.7	Priming yapmadan (kontrol) farklı konsantrasyonda TDZ İçeren MS ortamına kültüre alınması sonucu iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	52
Çizelge 4.8	Priming yapmadan (kontrol) farklı konsantrasyonda TDZ İçeren MS ortamına kültüre alınması sonucu iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunu.....	53
Çizelge 4.9	Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyonu ile 12 saat priming yaptıktan sonra farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	55
Çizelge 4.10	Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile embriyo eksplantların 12 saat priming yaptıktan sonra farklı oranda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin sürgün rejenerasyonunun etkisine ait T testi analizi sonuçları.....	56
Çizelge 4.11	Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile 24 saat priming yaptıktan sonra iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantların farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması ile sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	57
Çizelge 4.12	Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile 24 saat priming yaptıktan sonra iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantların farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması ile sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi sonuçları.....	58

Çizelge 4.13	İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınmasının sürgün rejenerasyonuna etkisi ait varyans analizi sonuçları.....	59
Çizelge 4.14	İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması sonucu sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları.....	59
Çizelge 4.15	İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması sonucu sürgün rejenerasyonuna etkisi ait Duncan testi sonuçları.....	60
Çizelge 4.16	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	62
Çizelge 4.17	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait ortalama çizelgesi.....	63
Çizelge 4.18	Farklı BAP + 0.02 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	65
Çizelge 4.19	Farklı BAP ve NAA içeren MS ortamında iki bakla kültür çeşidinin eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan testi analizi sonuçları.....	66
Çizelge 4.20	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait ortalama çizelgesi.....	67
Çizelge 4.21	Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate dozlarında iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi sonuçları.....	69
Çizelge 4.22	Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate dozlarında iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu etkisine ait T test analizi sonuçları.....	70

Çizelge 4.23	Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde Kanamisin Monosülfat seleksiyon ortamında LD ₁₀₀ ve nptII gen'ine dirençli olan transgenik bitkilerin seleksiyon yapabilmesi için kanamycin monosülfat dozlarının belirlenmesi.....	77
Çizelge 4.24	Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde Fosfinotrisin seleksiyon ortamında LD ₁₀₀ ve bar gen'ine dirençli olan transgenik bitkilerin seleksiyon yapabilmesi için Fosfonitricin dozlarının belirlenmesi.....	80
Çizelge 4.25	<i>A. tumefaciens</i> GV2260:: p35S GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı.....	83
Çizelge 4.26	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105:: 35S SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı.....	85
Çizelge 4.27	<i>A. tumefaciens</i> EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı.....	88

1. GİRİŞ

Hızlı nüfus artışı, tarım alanlarının son sınırlarına ulaşması, toplumlara ya da bölgelere özgü bir çok nedenden dolayı dünyanın pek çok yerinde yetersiz ve dengesiz beslenme sorununu ortaya çıkarmaktadır. Bugünkü sayılara göre dünya nüfusu 7,7 milyar kişi iken, araştırmalara göre bu rakam 2020 yılında 8.3 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. (Anonim 2015a). Dünya genelinde nüfusun giderek artması, tarım topraklarının elden çıkmasına ve ardından da tarımsal üretimin azalmasına neden olmaktadır. Bu sorun bazı ülkelerde toplu ölümlerle, bazılarında ise sağlık problemlerinin artışı şeklinde kendini göstermekte olup, tek çözüm yolu da bitkisel ve hayvansal üretimi artırmaktadır. Dünya genelinde insan beslenmesindeki bitkisel proteinlerin % 22'si ve karbonhidratların % 7'si yemeklik tane baklagillerden sağlanmaktadır. Bileşimlerinde % 18 - 36 oranında protein içermesi ve bu proteinlerin içerisinde mutlak gerekli aminoasitlerin bulunması oldukça önemlidir (Khawar 2001).

Milattan binlerce yıl önce insanların beslenmesinde yemeklik baklagiller kullanılmıştır (Akçin 1988, Khawar 2001). Karbonhidrat ve özellikle yüksek oranda protein içerdikleri için yemeklik baklagillerin çok önemli bir besin maddesi oldukları belirtilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı dünyada az gelişmiş ülkeler protein ihtiyaçlarının büyük bir kısmını bu kaynaktan temin etmektedirler. Yemeklik tane baklagiller; ayrıca çok miktarda A, B ve D vitaminlerini de içermektedir (Akçin 1988).

Dünyada 40 dan fazla baklagil türü insan beslenmesinde kullanılırken, Türkiye'de yalnız 6 adet yemeklik baklagilin tarımı yapılmaktadır (Şehirli 1988). Bakla (*Vicia faba* L.), yakın doğuda kültüre alınan en eski bitkilerden olup, Leguminosae familyasının Papilionoideae alt familyasına ait tek yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 1.1) (Uluocak,1984).



Şekil 1.1 Çiçeklenmiş bakla bitkilerinin tarlada bir görüntüsü (Anonim 2015b)

Ana yurdu Avrupa ve Asya kıtaları olan baklanın 5.000 yıl kadar önceleri Çin'de yetiştirildiği bilinmektedir. Türkiye'de bakla bitkisi yeni ekim yapılmaya başlamıştır ve gelecekte protein ihtiyaçlarına karşılamak açısından büyük bir potansiyeline sahiptir.

Yemelik tane baklagiller ve özellikle bakla bitkisi, bitkisel üretimde; insan ve hayvan beslenmesi, ekim nöbeti ve ekonomik yönden önemli bir yere sahiptir. Bakla, Türkiye'de çok yoğun olarak ekilmeyen bir yemelik tane baklagil olmasına rağmen yemelik tane baklagiller içerisinde 4. sırada bulunmaktadır (Çizelge 1.1) ve TÜİK (2014) verilerine göre toplam ekim alanı içinde yaklaşık % 3,11'lik bir paya sahiptir. Bakla Türkiye'de nohut, mercimek ve fasulyeden sonra en fazla ekimi ve üretimi yapılan bir yemelik baklagil bitkisidir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1 2010-2014 yılları arasında Türkiye yemeklik tane baklagillerin ekiliş, üretim ve verim değerleri

Bitkiler		Ekiliş Dekar				
		2010	2011	2012	2013	2014
Nohut		4556900	4464129	4162416	4235570	3885175
Mercimek	Yeşil	228922	225248	226903	206783	170476
	Kırmızı	2116000	1923225	2147875	2605000	2324461
Kuru Fasulye		1.033811	946254	93174	84763	911103
Bakla		43742	37816	46350	37360	32274
Bitkiler		Üretim Ton				
		2010	2011	2012	2013	2014
Nohut		531000	487000	518000	506000	450000
Mercimek	Yeşil	25400	26000	28000	22000	20000
	Kırmızı	422000	380000	410000	395000	325000
Kuru Fasulye		212758	200673	200000	195000	215000
Bakla		887	7963	7868	7818	6971
Bitkiler		Verim Kg/dekar				
		2010	2011	2012	2013	2014
Nohut		119	122	127	121	116
Mercimek	Yeşil	111	116	123	106	117
	Kırmızı	200	198	193	152	144
Kuru Fasulye		206	212	215	230	238
Bakla		203	211	184	209	216

Çizelge 1.2 Türkiye’de 2014 yılında baklagil bitkilerine ait ekim, hasat, üretim ve verim ile ilgili istatistiksel verileri (Anonim 2015c)

Ürün adı	Ekilen alan (de)	Hasat edilen alan (de)	Üretim (ton)	Verim (kg/de)
Bakla (Hayvan Yemi)	26840	26840	7956	296
Bakla (Yemeklik)	32274	32272	6971	216
Bezelye	11490	11490	2987	260
Börülce	19408	19408	2006	103
Burçak (Dane)	42297	42262	4403	104
Buy (Çemen Otu)	1979	1974	218	110
Fasulye (Kuru)	911103	904496	215000	238
Mercimek (Kırmızı)	2324461	2263357	325000	144
Mercimek (Yeşil)	170476	170341	20000	117
Mürdümük (Dane)	12725	12725	1291	101
Nohut	3885175	3881693	450000	116
Toplam	7438228	7366858	1035832	1805

Tarımsal ürünler içerisinde yemeklik tane baklagiller geniş adaptasyon yeteneği, tanelerinin zengin protein, nişasta, yüksek oranda mineral madde, özellikle demir, fosfor ile magnezyum, çeşitli vitaminler içeriği ve havanın serbest formdaki azotunu toprağa bağlayabilme yetenekleri gibi üstün özelliklere sahip olduğu için hem insan hem de hayvan beslenmesinde büyük önem arz etmektedir (Bozoğlu ve Topal 2005).

Baklagiller içinde yer alan bakla, ekildikleri toprağa dekara 5-12 kg (Özbek 1988) ile 25-30 kg (Russel, 1952) arasında azot bağlamaktadır.

Dünya’da baklanın ekim alanı 2005 yılında 2634 (ha) iken 2013 yılında 2041(ha), verimi 2005 yılında 1687 (kg/ha), 2013 yılında ise 1717 (kg/ha), üretimi 2005 yılında 4426 ton iken 2013 yılında 3503 tona düştüğü belirtilmiştir (Çizelge 1.3)(Anonim 2016).

Çizelge1.3 Baklanın 2005-2013 yılları arasında dünyada ekim alanı, üretim ve verim değerleri (Anonim 2016)

Yıllar	Ekim Alanı (bin ha)	Üretim (bin ton)	Verim (kg/ha)
2005	2634	4426	1687
2006	2409	4081	1694
2007	2448	3883	1586
2008	2475	4259	1720
2009	2446	4289	1753
2010	2485	4167	1677
2011	2411	4420	1833
2012	2514	4565	1816
2013	2041	3503	1717

FAO, (Anonim 2016) verilerine göre dünyada başlıca en fazla bakla üretimi Çin, Etiyopya, Fransa ve Mısır ‘da yapılmaktadır (Çizelge 1.4).

Çizelge1.4 Ülkeler itibariyle bakla ekim alanı, verim ve üretim değerleri (Anonim 2016)

Ülkeler	Ekim Alanı (bin ha)		Üretim (bin ton)		Verim (kg/ha)	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014
Çin	922	925	1586	1595	1720	1724
Etiyopya	538	443	991	838	1841	1893
Fransa	68	74	245	278	3605	3719
Mısır	44	46	157	158	3577	3420
Türkiye (yemeklik ve hayvan yemi)	7	6	18	15	2519	2525

Baklada tane verimi stabil olmayıp değişkenlik göstermekte, her zaman çevresel koşullarından büyük ölçüde etkilenmektedir (Lawes vd. 1983). Bakla tane verimindeki kararsızlık durumuna etki eden başlıca faktörler aşırı miktarda çiçek oluşumu ve açan çiçek sayısının %87'sine kadar ulaşabilen çiçek dökümleridir (Gates vd. 1983). Dyke ve Prew (1983) yaptıkları çalışmalarda bakla verimindeki değişkenliğin buğday veya arpaya göre iki kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Bakla tohumları, çok fazla miktarda selüloz içerdiğinden dolayı diğer tip baklagil tohumlarına göre sindirimi daha zordur (Keskin, 1981). Daha önce yapılmış çalışmalara göre içerdiği metabolitler kansere yakalanma riskini azaltır, eylaf/lif miktarının fazla olması kolesterol düzeyini düşürür ve içerdiği insülin maddesi ile şeker hastalarının kan şekerini düzene sokan önemli bir bitki olarak bilinmektedir (Yıldız 2008).

Tohumlarında bulunan yüksek protein içeriği (ortalama % 25) baklayı insan ve hayvan beslenmesinde değerli bir besin haline getirmektedir (Musallam vd. 2004).

Kuru bakla tanesi % 20 - 36, yeşil bakla % 5 - 7 oranında protein ihtiva etmekte, aynı zamanda bakır, nikotinik asit, folat ve C vitamini de içermektedir (Manga vd. 1995, Vural vd. 2000, Hamilton, 2005). Dolayısıyla insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir

protein kaynağı olarak kullanılmaktadır. Türkiye’de bakla tarımı geleneksel yöntemlerle yapılmaktadır.

Kuru 100 gr baklanın 341 kilo kalori, 58.29 gr karbonhidrat, 26.12 gr protein, 1.53 gr yağ, 25 gr lif, 0 mg kolesterol, 13 mg sodyum, 1.026 mg potasyum, 103 mg kalsiyum, 15mg Vitamin (A) , 0.366 mg Vitamin (B₆), 1.4mg Vitamin (C), 0.555 mg Tiyamin (B₁), 0.333 mg Riboflavin (B₂), 2.832 mg Niyasin (B₃), 423 µg Folik Asit (B₉), 6.7mg demir, 192 mg magnezyum, 1.626 mg manganez, 421 mg fosfor ve 3.14 mg çinko içermektedir (Anonymous 2015 d).

Firschbeck vd. (1975), bakla bitkisinin -5 °C hava sıcaklığına kadar dayanabileceğini, toplam vejetasyon sresinin 130 - 180 gün arasında olduğunu ve 60 - 90 gün içinde ieklenebildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, bitkide yaklaşık 15 bakla bulunduğunu ve her baklada 3 - 6 adet tohumun yer aldığını, böylece dekardan yaklaşık 350 - 500 kg tohum veriminin alınabildiğini vurgulamışlardır (şekil 1.2).



şekil 1.2 Bakla (*Vicia faba*) Bitkisinin Tohumu

Türkiye'nin 2014 yılındaki bakla ekilişi 32274 dekar, üretimi 6971 ton ve verimi de 216 kg/da olarak rapor edilmiştir. Akdeniz'den Karadeniz'e kadar bütün sahil kesiminde yetişme özelliğinde olmakla beraber 2014 İstatistikî Bölge Birimleri Sınıflandırması (İBBS) bilgilerine göre ekim alanın % 40,85 Batı Marmara ve % 32,57 Ege'ye ait olduğu belirlenmektedir (Anonim, 2015c). Toplam üretim alanının % 40,81 ve üretim miktarının % 43,71'ine Balıkesir ve Çanakkale illeri sahiptir. Akdeniz ve Güney Ege'de turfanda sebze olarak yetiştirilen bakla Kuzey Ege ve Güney Marmara'da kuru tanesi için yetiştirilmektedir.

Baklada tane veriminin düşük olmasının sebepleri; uygun çeşit eksikliği, çiftçilerin tohumluğunu kendi yerel popülasyonundan temin etmesi, az miktarda sertifikalı tohumluk kullanılması, çeşitli hastalık ve zararlıların olması olarak görülmektedir. Bitki kök, gövde ve yapraklarında, depodaki ürün taneleri içerisinde yaşayan ve zarar veren tohum böcekleri larvaları bakla tanelerinin kalitesini düşürmekte ve ekonomik olarak büyük kayıplar meydana getirmektedir. Bakla tohum böcekleri larvaları, konukçuları olan bakla taneleri içinde beslenmeleri süresince oyuklar meydana getirerek tanelerin ekonomik ve besin değerini düşürmekte, dışkı ve vücut artıkları ile taneyi kirletmekte, ürünle birlikte tarladan ambara taşınmakta ve ambarda da üremesine devam ederek verdiği zararı büyütmektedir (Rehm ve Espig 1991). Bu şekilde tanelerin gıda kalitesi düşmekte ve aynı zamanda çimlenme kabiliyetlerinde yaklaşık % 70 oranında azalmalar söz konusu olmaktadır (Dörtbudak vd. 1999).

Bakla tohum böceği (*Bruchus rufimanus*), yalnız bakla değil, ayrıca fasulye ve nohut bitkilerine de saldırılmaktadır. Olgun böcek kışın depo veya bakla tohumları içinde saklanıp yazın bakla tarlasına girip çok döl vererek bakla üzerine yaklaşık 9 – 48 yumurta bırakmaktadır. Kuluçka dönemi 11 gün olmakla birlikte larvalar yumurtalardan çıkıp bakla içine yerleşmektedirler. Bazen tohum içinde 7 olgun böceğe rastlanmaktadır (Sekil 1.3).



Şekil 1.3 Bakla (*Vicia faba*) tohum böceği [*Bruchus rufimanus*]'nin bakla tohumlarına verdiği zarar

Bu şekilde sürekli bir zarar söz konusu olmakta ve delinmiş, içinin büyük kısmı yenilmiş, besin değeri tamamen kaybolmuş bakla taneleri hayvan yemi ve gübre olarak dahi kullanılamaz hale gelmekte, bu zarardan dolayı, iç ve dış piyasada önemli yeri olan baklanın pazar değeri düşmektedir.

Baklagil tohum böceklerinin sebep olduğu ekonomik zararları azaltmak ve kaliteli ürün sağlamak için böceklere dirençli bitkilerin ıslah edilmesi gerekmektedir. Fakat, bütün baklagillerde olduğu gibi baklada da böceklere dayanıklılık ıslah çalışmaları hemen hemen bulunmamaktadır. Bu çalışma ile bakla bitkisine *Agrobacterium* aracılığıyla tohum böceklerine karşı gen aktararak, böceklere dayanıklı bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Moleküler biyolojinin önemli çalışma alanlarından biri de, zararlılarla mücadeledir. Bu mücadele yönteminde, böcekler üzerinde toksik etki yapan proteinlerin sentezinden sorumlu genler bitkilere aktarılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan genler doğal ve sentetik *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) δ -endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan *crystalline* (*cry*) genleridir. ilk *Bt* geni taşıyan transgenik ürünler 1995 yılında piyasaya çıkmıştır. Bu ürünler, sırasıyla *cryIAb*, *cryIAC* ve *cry3A* genlerini içeren mısır, pamuk ve patates bitkileridir. Bugün ticari olarak *cryIAb*, *cryIAC*, *cryIFa*, *cry3Bb*,

cry34Ab, *cry35Ab* genlerini içeren mısır, *cryIAc* ve *cryIIAb* genlerini içeren pamuk ile *cryIIAa* genlerine sahip patates ticari çeşitleri piyasada bulunmaktadır (Ryan 1990).

Lektinler çoğu bitkide bulunan ve glikoprotein, glikolipid ve polisakkaritlere bağlanma özelliği gösteren proteinlerdir. Lektinler kardelen, bezelye, buğday, soya, sarımsak, tatlı patates, nohut ve yarfıstığı gibi birçok bitkinin tohum ve depo organlarında bulunmaktadır. Lektinlerin böcekler üzerinde toksik etki yaptığı gözlenmiş, ancak bu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, lektinlerin böcek orta bağırsağındaki epitel hücreler üzerinde bulunan bazı karbonhidrat moleküllerine bağlanarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Değişik organizmalardan izole edilen bazı lektinlerin Homoptera, Coleoptera, ve Lepidoptera familyasına dahil böceklere dayanıklılık sağlamaktadır.

Türkiye koşullarında baklanın klasik bitki ıslahında özellikle çeşit azlığı, melez çeşitlerden yararlanma imkanların az olması, elde edilen ürün miktar ve kalitesinde önemli katkıları sağlanmamakla birlikte; hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere bitkilerin ıslah edilmemesi nedeniyle diğer birçok tarımsal özelliklerini ıslahında da önemli sınırlamalarla karşılaşmaktadır.

Günümüzde insanoğlunun karşılaştığı en büyük sorun, artan nüfusun beslenmesidir. Bu amaçla kültür bitkilerinin ıslahı üzerinde çalışılmakla birlikte, ürünlerdeki nicelik ve nitelik artışı söz konusu olup, ancak son 30 yılda geliştirilen ıslah üzerinde yöntemlerinin modern teknolojiyle birleşmesi sonucunda bir çok ilerleme izlenmektedirler. Genel olarak bakıldığında ıslah programlarında, seleksiyon çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulduğundan, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık her zaman ikinci planda kalmıştır (Özcan ve Özgen 1996).

Yıllardan beri bitkiler, hastalık ve zararlıların saldırılarına karşı kimyasal ilaçlarla korunmuş; ancak, kullanılan bu ilaçların ayrışmadan uzun süre kalabilmeleri insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir.

Kimyasal ilaçlar genelde mantarlara karşı etkili olmakla birlikte, virüs, viroid ve bakterilere karşı yetersiz kalmaktadır.

Son 70 yıl içerisinde, klasik bitki ıslahı yöntemleri sayesinde, özellikle melez çeşitlerden yararlanarak elde edilen ürünün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmakla birlikte; bazı hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık başta olmak üzere bitkinin diğer bir çok tarımsal özelliklerini ıslahta büyük engellerle rastlanmaktadır. Bu durum, öbür bitkiler gibi bakla bitkisinde de yabancı otlardan ve zararlılardan korumak için uzun sürmeyen alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesinin ihtiyacını göstermektedir.

Ayrıca, daha önce bakla bitkisinde yapılmış doku kültürü ve transgenik bitki eldesine yönelik çalışmalarda baklagillerin zor ve inatçı (recalcitrant) olduğu tespit edilmişken (Khalafalla ve Hattori 2000, Böttinger 2001) dünyanın çeşitli yerlerinde bakla üzerinde az sayıda çalışma bulunmaktadır (Gelvin 1998, Rezmer vd. 1999, Hanafy vd. 2005, Rajesh vd. 2005). Türkiye’de lupinus türü baklalarda RAPD, SSR ve Agrobacterium ile gen aktarım çalışmaları bulunurken (Babaoğlu vd. 2000, Yorgancılar vd. 2009) *Vicia faba* üzerinde yalnız doku kültürü çalışması rastlanmaktadır.

Tüm genetik mühendislik çalışmalarında arzu edilen bir genin kültür bitkisine aktarılabilmesi için etkili gen aktarma sisteminin geliştirilmesi ile bağlıdır. Bugünlerde kullanım alanı giderek yaygınlaşan bitki doku kültürü ve genetik mühendisliği ihtiva eden tarımsal biyoteknoloji teknikleriyle, bu olumsuzlukların kolayca aşılabilmesi mümkün olmuştur. Bu yöntemleri kullanarak orijinal bitkinin genomu tahrip etmeden istenilen karakterlerin aktarılmasına yönelik bir ya da birçok gen bitkilere aktarılabilmesi mümkündür ve klasik ıslah yöntemlerde rastlanan engeller ve genetik bağlılık gibi sorunlarını ortadan kaldırılabilmesi mümkün olmuş olup, başka gen havuzlarından yararlanarak ıslah çalışmalarındaki sınırlamalar ortadan kaldırabilmektedir (Özcan ve Özgen 1996).

Bugüne kadar bakla bitkisinde yapılan doku kültürü ve gen aktarım çalışmalarında başarı oranı oldukça düşük olup, *Agrobacterium* aracılığıyla transgenik bakla bitkisi elde edilmesinde kallus yoluyla ilerlendiği için sonuçların tekrarlanabilirliği oldukça düşüktür. Bu tezin amacı ise; öncelikle Eresen 87 ve Filiz 99 bakla çeşitlerinde gen aktarımına uygun doğrudan sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi ve daha sonra, *A. tumefaciens* aracılığıyla transgenik bitkilerin üretimi olmuştur.



2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMALAR

Tarımsal ürünler içerisinde Bakla bitkisi geniş adaptasyon yeteneğine sahip olmak üzere, havanın serbest formdaki azotunu (5-30 kg/dekar) toprağa bağlayabilme yeteneğinden ve tanelerinin zengin protein, nişasta, yüksek oranda magnezyum, fosfor, demir ile çeşitli vitaminler içerdiği için insan ile hayvan beslenmesinde büyük önem arz etmektedir. Bakla klasik ıslah programlarında, seleksiyon ve melezleme çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulduğundan, biyotik (yabani otlar, hastalık ve zararlılar) ve abiyotik (kuraklık, tuz stres vb) faktörlere karşı dirençliliği gibi ıslahında da önemli sınırlamalarla ve büyük engellerle karşılaştırılarak bakla tanelerinin kalitesini düşürmekte ve ekonomik olarak büyük kayıplar meydana getirmektedir. Bu durum, bakla bitkisinde de her iki tip strese karşı uzun sürmeyen alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda bakla ıslahına yardımcı gen aktarımına uygun bir doğrudan sürgün rejenerasyon sistemin geliştirilmesi ile *A. tumefaciens* aracılığıyla transgenik bitkilerin geliştirilmesi için çalışmaları yapılmıştır. Bu konuyla ilgili yakından ilişki olan daha önceden yapılmış bazı çalışmaları aşağıda verilmiştir.

2.1 Doku Kültürü Çalışmaları

Gamborg vd. (1974), bezelye (*Pisum sativum* L)'de apikal hücrelerden sürgün oluşturmayı başarmışlardır. Sürgün uçlarını yumuşaması için bir gün suda bekletmişler ve hücreleri agarlı ortamda geliştirmişlerdir. Bu hücreler 0.2 - 5 μ M BAP ve 1 mM NAA içeren besin ortamında 4 - 6 hafta içinde kallus ve sürgün oluşturmuştur. Kalluslar çok sayıda sürgün oluşturmuş ancak gelişen sürgünlerden iyi bir köklenme meydana gelmemiştir.

Mroginski ve Kartha (1981) yaptıkları çalışmada, *in vitro*'da elde edilen 3 günlük bezelye yapraklarını, 0.1, 1 ve 10 μ M BAP ve NAA içeren B5 ortamlarına aktarmışlardır. Her ortamda 45-90 gün içinde, primer kallustan sürgünlerin geliştiği görülmüştür. En çok sürgün sayısı, 10 μ M NAA ve BAP içeren B5 ortamlarından elde

edilmiştir. 10 günlük yaprak eksplantları sürgün oluşturmamış, sürgün oluşturmayan kallusların 1M NAA içeren B5 ortamında köklendiği görülmüştür.

Jacobson ve Wilfred (1984), bazı bezelye çeşitlerine (Dippes, Gelbe ve Victoria) ait yaprak eksplantlarını, 0.06 mg/l pikloram içeren MS besin ortamına aktarmışlar, burada gelişen kallusları sıvı ortama alınarak embriyoid oluşumunu sağlamışlardır. Sıvı ortamda embriyoidlerin kallustan bir kaç gün sonra ayrıldığı görülmüştür. Torpedo şeklindeki bu embriyoidler daha sonra katı ortama aktarılmıştır. Aynı çeşitlerin epikotillerinden gelişen kalluslardan da embriyogenesinin meydana geldiği görülmüştür.

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

Natali ve Cavallini (1987), bezelyede olgunlaşmamış embriyolardan gelişen kalluslardan yeni bitkiler elde etmişlerdir. Bu amaçla, kotiledonlardan embriyo eksenleri izole edilerek değişik konsantrasyonda BAP ve NAA içeren besin ortamında kültüre alınmıştır. Gelişen sürgünler, 2 mg/l IBA içeren besin ortamında köklendirilmiştir. Rejenerasyon kabiliyeti ile genotip arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür. Yapılan histolojik incelemede, sürgünlerin organogenesis yoluyla geliştiği belirlenmiştir. Elde edilen 20 bitkinin, 11'i diploid ($2n = 14$), 9'u ise aneusomatik ($2n = 12 - 16$) olarak bulunmuştur.

Saxena ve King (1987), olgunlaşmış mercimek embriyolarından elde edilen embriyo eksenlerini ve kotiledonları, 1 - 10 mg/l arasında değişen konsantrasyonlarda 2,4-D ve NH_4NO_3 içeren MS ve değiştirilmiş B5 besi ortamında kültüre almışlardır. Somatik embriyogenesis oluşturmak amacıyla, kalluslar 4 - 6 hafta sonra hormonlu ve hormone içermeyen besin ortamlarına alınmışlardır. Burada oluşan somatik embriyolar, 70 g/l

Glutamin, değişik oranlarda BAP ve IAA içeren B5 ortamına aktarılmıştır. Oluşan somatik embriyolardan yeni bitkicikler elde edilmiştir.

Lehminger-Merten ve Jacobson (1989), bezelye protoplastlarından somatik embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır. Pikloram ve 2,4-D içeren besin ortamının embriyoid oluşumu için gerekli olduğu görülmüştür. Çalışmada 2 genotip yüksek oranda embriyogenik kallus oluşturmuştur. Hormonsuz besin ortamında her 2 genotipten yüksek oranda embriyogenik kallus oluşumu saptanmıştır. Daha sonra ise somatik embriyolar, GA₃ içeren besin ortamında geliştirilmiştir.

Singh ve Raghuvansi (1989), mercimekte boğum araları, meristem uçları ve kalluslardan yeni bitkiler elde etmek amacıyla boğum araları ve meristem uçlarını farklı hormonlar içeren MS besin ortamına almışlar, 4 hafta sonra sürgün ve kök oluşumunu incelemişlerdir. Kinetin içeren besin ortamında kallus ve köklenme olmadan çok sayıda direkt sürgün oluşmuş, en iyi kallus oluşturma ortamının 1.0 mg/l Kinetin ve 10.0 mg/l 2-4,D içeren MS besin ortamı olarak belirlenmiştir. Sürgün boğumları yeni bitkicik oluşturmak için MS temel besin ortamına alınmış ve daha sonra toprağa aktarılmıştır.

Fakhrai vd. (1989) bakla (*Vicia faba*) bitkisinde sap ve kotiledon boğum eksplantlarında % 3 şeker, 2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren MS ortamında organogenesis yoluyla sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Gelişen sürgünler % 1.5 şeker, 0.1 mg/l NAA ve 0.5 mg/ kinetin ierenyarım MS besin ortamında köklendirilmiştir.

Ghanem (1995) yaptığı çalışmada, 2,4-D içermeyen MS besin ortamında mercimek yaprak, sap ve kök eksplantlarında kallus oluşturamamış, her bir eksplantta kallus ve sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçlar, 0.5 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l Kinetin içeren besin ortamından elde etmiştir. Tuz içeren besin ortamında yeşil ve kuru bitki ağırlığı ile büyüme indeksi ve büyüme oranının azaldığı görülmüştür. Tuzlu ortamda (6000 ppm NaCl) büyüyen kalluslar yeniden alt kültür yapılarak (4 haftalık süre) 1 mg/l BAP ve

0.25 mg/l IAA içeren ortamda geliştirilmiş, embriyolarda ise sürgün oluşumu görülmemiştir.

Khalafalla ve Hattori (2000), bakla (*Vicia faba L.*) bitkisi üzerinde in vitro şartlarında köklenme ve sürgün rejenerasyonunu etkileyen etilen ve thidiazuron içeren ortamları incelemiştir. Kök oluşumu üzerindeki etilen 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) ve üç etilen inhibitörleri {gümüş nitrat (AgNO_3), asetil salisilik asit (ASA) ve kobalt klorür (CoCl_2)} kök oluşumu ile ilgili 760 örnek üzerinde ve TDZ içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. ACC kök oluşumunu engellemiştir. Buna karşılık, AgNO_3 etilen inhibitörü uygun konsantrasyonlarda kök çıkmasını ve sürgün başına artan kök sayısını, kök büyüme oranı ve kök uzunluğu gelişimini teşvik etmiştir. Her iki CoCl_2 ve ASA uygun konsantrasyonlarda köklenme verimliliğinin artmasına sebep olmuştur.

Khawar ve Özcan (2002), MS besin ortamında gelişen Ali Dayı mercimek çeşidine ait 10 günlük sürgünleri keserek, köklendirme için 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l IBA içeren MS besin ortamına aktarmışlardır. Dört hafta sonra en yüksek köklendirme oranını (% 25), sürgün başına ortalama kök sayısını (7.87 adet) ve ortalama kök uzunluğunu (7.18 cm) 0.25 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir. Ancak, diğer IBA uygulamalarında kök oluşumunu uyaramamışlardır.

Çöçü (2002), Fiğ'de gen aktarımına uygun yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonun ve meristemlerden hızlı çoğaltanının amaçlandığı çalışmada 8 ayrı fiğ çeşidine ait olgunlaşmamış embriyo ekseni ve kotiledon eksplantları değişik oranlarda büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün sayısı 9.47 adet ile Sarıelçi çeşidinden 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden elde edilmiştir, diğer çeşitlerde ise en fazla sürgün sayısı Uludağ (6.03 adet), Nilüfer (4.26 adet) ve Ürem (5.93 adet) çeşitlerinde 1 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA, Emir çeşidinde (3.27 adet) 2 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA, Kubilay çeşidinde (5.56 adet) 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA, Çubuk çeşidinde (1 adet) 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS besin

ortamlarından elde edilmiştir. Hızlı çoğaltan çalışması ise Karaelçi çeşidinde yapılmış, eksplant olarak sap ve kotiledon boğumları kullanılmıştır. En yüksek sürgün çoğaltanı % 90 ile 1 mg/l BAP ve 0.02 mg/l IBA içeren MS besin ortamında kültüre alınan kotiledon boğumlarından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 2.5 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir.

Çöçü vd. (2003), yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 8 ayrı fiğ çeşidinde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerini değişik oranlarda büyüme düzenleyiciler içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden en yüksek sürgün rejenerasyonu % 95 ile Kubilay çeşidinden 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamından; eksplant başına en fazla sürgün 9.47 adet ile Sarıelçi çeşidinden 2 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında ise hiç sürgün rejenerasyonu elde edememişlerdir. Gelişen bu sürgünleri daha sonra, keserek 2.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamında köklendirmişlerdir. Son olarak köklenen sürgünler saksılara aktarmışlardır.

Khawar vd. (2004), mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) gen aktarımına uygun hızlı ve etkili bir sürgün rejenerasyon sistemi geliştirmek için yürüttükleri bu çalışmada TDZ'nin en aktif sitokinin benzeri bileşiklerden olduğunu ve birçok bitki türünde sitokininlerden daha yüksek oranlarda sürgün rejenerasyonu sağladığını bildirmektedirler. Yaygın olarak üretimi yapılan mercimek çeşitlerinden Ali Dayı ve Kayı – 91 çeşitlerine ait yaprak, gövde, gövde boğumu ve kotiledon boğum eksplantları farklı oranlarda TDZ içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kotiledon ve gövde boğumlarından, başlangıç kallus gelişimini takiben organogenesis aracılığıyla çok sayıda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Yaprak ve gövde eksplantlarında ise kallus ve sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Kotiledon boğumları gövde boğumlarından daha yüksek sürgün rejenerasyon kabiliyetine sahip olmuştur. Her iki çeşitte de en yüksek sürgün rejenerasyonu 0.25 mg/l TDZ içeren MS besin ortamlarında kotiledon boğumlarından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler (10 – 20 mm uzunlukta) 0.25 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş ve köklenen sürgünler son olarak kum içeren saksılara aktarılmıştır.

Hamdy ve Hattori (2006), iki bakla (Waza Soramame, Cairo 241) çeşidinde nod eksplantı kullanarak somatik embriyo elde etmişlerdir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda sitokinin (BAP, TDZ, BA) ve oksin (NAA) kullanılmıştır. En fazla sürgün sayısı %78 - 83 arasında Waza Soramame ve Cairo 241 çeşitlerinde 2.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ayrıca, Waza Soramame çeşidi 0.58 mg/l TDZ veya 1.24 mg/l BA artı 2.15 mg/l NAA içeren MS ortamında da en fazla sürgün rejenerasyonuna sahip olmuştur. Daha sonra, embriyonik dokuların gelişmesi için eksplantları IAA ve düşük miktarda 2,4-D içeren ortamlara aktarılmıştır.

Ismail vd. (2006), sürgün ucu ve kotiledon eksplantları kullanarak bazı bakla çeşitlerinde (G 461 ve G 674) sürgün rejenerasyonunu araştırmışlardır. Eksplantlar için farklı BAP ve NAA konsantrasyonları içeren VSI ortamı (MS + B5 vitaminleri) kullanılmıştır. Her 2 eksplant arasında kıyaslama sonucu, transformasyon bakımından kotiledon eksplantları, sürgün ucu eksplantlarına göre daha elverişli olduğu ortaya çıkmıştır. Ortamlar 3 hafta 28 ± 2 °C ve 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyodunda tabii tutulduktan sonra VSI ortamına 2 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA ya 3 mg/L BAP ve 0.05 mg/L NAA ilave ederek her iki çeşitten kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca, sürgün ucu eksplantı için 5 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA ve 3 mg/l BAP ve 0.05 mg/l NAA içeren VSI ortamı sırasıyla G 461 ve G 674 çeşitleri için en iyi kültür ortamı olarak tespit edilmiştir.

Chishti vd. (2006) yaptıkları çalışmada, *L. officinalis* sürgün eksplantını kullanarak, en verimli hızlı çoğaltım protokolünü geliştirmek amacıyla farklı oranda BAP, Kinetin ve IAA içeren MS ortamı kullanmışlardır. Bu denemede 4 hafta sonra en iyi adventif sürgün oluşumu (% 80), 2 mg/l BAP içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için 1 mg/l IBA içeren, ½ MS ortamı kullanılmış olup, 4 hafta sonra % 80 köklenme görülmüştür. Daha sonra köklenen bitkiler kum, kil 14 ve vermikülit karışımı (1:1:1) içeren karışımına şaşırtılmış 25 °C sıcaklıkta ve % 60 nem oranında dış koşullarına alıştırmıştır.

Abdelwahd vd. (2008), bakla bitkilerinin mikroçğaltım ortamlarında fenolik bileşenleri önlemek amacıyla bakla tohumlarını polivinilpirrolidon (PVP) ile muamele edip, aktif kömürlü ve farklı antioksidanlar (askorbik asit, sistein ve gümüş nitrat) içeren ortamlara kültüre alınmıştır. Sonuçlara göre, tohumları MS ortamına kültüre almadan önce gece boyunca suda ıslatıp (tohum kılıfını soyarak için) daha sonra 1 saat boyunca PVP çözeltisi (1000 mg/l) ile tohumlar muamele edilmiş ve % 3 sakaroz, % 0.8 ağıar, 2 mg/l BAP, 2 mg/l TDZ ile askorbik asit (1 mg/l) ya da aktif kömür (10 g/l) içeren MS ortamında çok büyük ölçüde eksplantlarda kahveleşmesinde azalma görülmüştür ve sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır.

Bahgat vd. (2009), bakla rejenerasyon sistemini geliştirmek için yaptıkları çalışmada Mısırlı kökenli bakla "Giza 2 've '24 Hyto' çeşitlerini kullanmışlardır. Epikotil ve sürgün uçları eksplantlarını kullanarak MS veya Gamborg ortam, % 3 sukroz ve % 0.025 askorbik ve sitrik asit ile % 0.8 agar içeren 10 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 2,4-D ve 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarında kallus elde edilmiştir. Embriyonik kallus için en iyi ortam BAP + NAA + 2,4-D olarak belirlenmiştir. Daha sonra somatik embriyoların gelişmesini sağlamak için B5 ortamına aktarılmıştır.

Aasim vd. (2009), börülcenin Akız çeşidinin plumula uçları uçları 10 mg/l BAP ile ön muamele ettikten sonra 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.00, 1.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren veya içermeyen MS ortamına alınmıştır. Daha sonra eksplantlar üzerinde NAA olan veya olmayan BAP içeren bütün MS ortamlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Ancak 0,1 mg/l NAA eklenmesi sürgün uzunluğu ve kallus çap üzerinde olumlu etkiye sahip olmuştur. Eksplant başına en fazla sürgün 7,11 adet; 1.00 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. BAP ile NAA içeren ve içermeyen ortamlar karşılaştırıldığında BAP - NAA içeren ortamların daha iyi olduğu tespit edilmiştir. 1 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmış bütün sürgünler 0.50 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklenen bitkiler oda sıcaklığında, torprak dolu kaplarda kültüre alınmıştır. Bütün bitkiler 3 ay sonra çiçeklenmiş ve seralarda tohuma bırakılmıştır.

Çetin (2010), Bakla (*Vicia faba* L.) bitkisinde gen aktarımına uygun bir sürgün rejenerasyonu sisteminin geliştirilmesi için çalışılmıştır. Bu amaçla Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin tohumları saf su, sukroz içermeyen sıvı MS ortamı, şekerli su ve şekerli sıvı MS içeren ortamlarda 24 saat ön muameleye tabi tutulmuştur. Daha sonra plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları farklı oranda BAP ile NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu şekerli su ön muamelesinde 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besi ortamında plumula uçlarından elde edilmiştir. Beş hafta sonra sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS besi ortamında köklendirilmiştir. İkinci denemede ise her iki çeşidin embriyoları 10 mg/l BAP içeren MS ortamlarında 6 gün bekletilmiştir. Daha sonra embriyolardan alınan plumula uçları farklı oranda BAP ve BAP ile NAA içeren MS besi ortamlarında rejenerasyona tabi tutulmuştur. En fazla sürgün rejenerasyonu 10 mg/l BAP içeren ortam ile ön muamele yapılmış plumula uçları eksplantalardan 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamda elde edilmiştir. Yine beş hafta sonra sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS besi ortamında köklendirilmiştir. Her iki denemeden elde edilen bitkiler çiçeklendirme ve tohum tutturma amacıyla seraya aktarılmıştır.

Anwar vd. (2011), yaptıkları çalışmada, bakla (*Vicia faba* L.) üzerinde hızlı, tekrarlanabilir ve etkili rejenerasyon yöntemi geliştirmek amacıyla yarım kesilmiş embriyonik ekseni ile tek kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. 6 µM TDZ ile 10 µM 2-iP ve 4 µM kinetin içeren MS ortamında 30 - 50 adventif tomurcuklar elde edilmiş olup, iki hafta sonra sürgünler 6 µM 2-iP ve 2 µM kinetin içeren MS ortamlarına aktarıldı. 5 cm uzunluğunda sürgünler 10 - 14 gün içinde 5 µM IBA içeren ortamlarda sağlıklı ve güçlü kök oluşturmuşlardı. TDZ adventif tomurcuk teşvik ederken 5 µM IBA köklendirme için en uygun konsantrasyon olarak tespit edilmiştir, ancak, yüksek oranda TDZ dozların rejenerasyon üzerinde olumsuz etkileri bırakıp, toksik olduğu tespit edilmiştir.

Skrzypek vd. (2012), Dört Polonya kökenli Bronto, Dino, Tibo, Nadwiślański bakla çeşitlerinde kallus elde etmek için 7 ve 14 günlük fidelerin epikotil parçaları ve olgunlaşmamış tohum kotiledonların nodları kullanılmıştır. Kallus oluşumu eksplant kaynağına bağlı olarak % 81 - % 97 arasında değişmiştir. Sürgünler ise sadece test

edilen tüm çeşitlerin kotiledon nodlarından elde edilmiştir. Ortalama, eksplantların % 50 sinde, 1.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.25 mg/l GA3, 1.0 g/l casein hydrolysate, 750 mg/l inositol, % 3 sukroz ve % 0.4 agar içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 6 ile 9 adet sürgünler kallus düğümlerinden elde edilmiştir. Sürgünler 2 mg/l NAA içeren yarım kesilmiş MS ortamında % 11 oranında köklenmiştir. Elde edilen % 10 bitkilerin dış koşullarına adaptasyon sağlanmış olup, bitkilerde çiçeklenme, bakla ve tohum üretimi izlenmiştir.

Klenotičova vd. (2013), Düşük -Tannin içeren bakla çeşidinde in vitro şartlarında rejenerasyon sistemini optimize etmek için Askorbik asit, sitrik asit, glutatyon ve aktif kömür gibi çeşitli antioksidanlar kültür ortamına alınarak sürgün uçları ve kotiledon böğümü eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Antioksidanların kullanması kallus olumunda olumsuz etki bırakmıştır ve (50 mg/l) sitrik asit uygulamalarında büyük ölçüde eksplantların nekrotik oluşumunda azalmasının neden olmuştur. Bunlarla birlikte sürgün ucu kültüründe askorbik asit ile sitrik asit sürgün büyümesini tamamen engellemiştir. Antioksidanlar ile asetosiringon kombinasyonu sürgün çoğalmasını olumlu etkilemiştir.

Bu çalışmada Almaghrabi (2014), bakla bitkisinin kotiledon eksplantında daha başarılı kallus elde etmek amacıyla Eksplantları 1, 2, 3 ve 4 mg/L 2,4-D içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Daha önceden büyüme hormonu uygulanan iki farklı (Giza 2 Giza 843) çeşitlerin 14 - 21 günlük fidelerinden Kotiledon eksplantları toplanmıştır. Sonuçlara göre, farklı 2,4-D hormon konsantrasyonların oluşan kallusların yaş ağırlığı ve üzerinde belirgin hiperhidrisiti oluşumunun sebep olarak bilgiler elde edilmiştir. Kallus oluşumu % 72 - 97 arasında sırasıyla 4 mg/l ve 2 mg/l içeren 2,4-D ortamlarda elde edilmiştir. En fazla kallus ağırlığı (0.714 g) Giza 843 çeşidin ait ve 4mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde gelişen kalluslardan elde edilmiştir.

2.2 *Agrobacterium tumefaciens* ile Bitkilere Gen Aktarımı Çalışmaları

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

Warkentin ve McHughen (1991) yaptıkları çalışmada, *A. tumefaciens* aracılığıyla mercimeğe gen aktarmışlardır. Serada yetiştirilen mercimek bitkilerinin sap uçları 4 yabancı *A. tumefaciens* (C58, GV 3111, A281, ve Ach5) hattı ile inokule edilmiştir. İnokulasyon sonunda sap ve sap uçlarında tümör oluşumu sağlanmıştır. Embriyolardan gelişen embriyolarda non-onkogenik GV 3111 *A. tumefaciens* hattı ile inokule edilmiş ve kanamisin içeren besin ortamında gelişen sürgünler seçilmiştir. Daha sonra gen aktarımını doğrulamak amacıyla flourometrik ve histokimyasal GUS analizler yapılmıştır.

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

Warkentin ve Mchughen (1992), mercimek sap ucu, epikotil ve kök eksplantlarını GV 2260 p35 GUS-INT *A. tumefaciens* hattı ile inokule etmişlerdir. İnokule edilen epikotil ve kök eksplantlarında yaklaşık 9 gün, sap uçlarında ise 17 gün sonra GUS ekspresyonu gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan keten bitkisine göre mercimekte GUS geni ekspresyon seviyesinin çok daha düşük olduğu görülmüştür. Araştırma sonunda, epikotil ve kök eksplantları, sap ucu ve kotiledon boğumlarının transgenik bitki elde etmek için uygun eksplantlar olduğu bildirilmiştir.

Fontana vd. (1993), nohut apikal meristemlerini LBA4404 (NPT-II ve GUS geni içeren) bakteri hattı ile inoküle etmişlerdir. Ko-kültürasyondan sonra eksplantları kanamisin içermeyen ortamda 3 hafta tuttuktan sonra 50 mg/l kanamisin içeren ortama alarak transgenik aday sürgünleri belirlemişlerdir. Kanamisin içeren ortamda köklenme olmadığı için köklendirme işlemini kanamisin içermeyen ortamda gerçekleştirmişlerdir. Transformasyon frekansını % 4 olarak belirlemişlerdir.

Grant vd. (1995), olgunlaşmamış kotiledonları kullanarak *A. tumefaciens* aracılığıyla bezelyeye gen aktarmışlardır. Bolero, Trounce, Bohatyr ve Huka bezelye çeşitlerinden transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Kullanılan *A. tumefaciens* hattının plazmidinde, fosfinotrisin ve kanamisine dayanıklılığı kodlayan NPT-II ve bar genler bulunduğundan, transgenik bezelye bitkilerinin seleksiyonu, 10 mg/l fosfinotrisin içeren besin ortamında yapılmıştır. Ayrıca, transgenik bitkilerde fosfinotrisin asetil transferaz enzim testi kullanılarak bar geninin ekspresyonu tespit edilmiştir.

Chowrira (1995), nohut, fasulye, mercimek ve börülce boğum meristemlerinin DAN elektroporasyonu sonucu bu bitkilerin doku ve dölllerinde GUS markör geninin görünüsünü izlemişler ve transgenik dokular tespit ederek in vitro doku kültürü metotları uygulamadan yeni transgenik bitkiler elde etmişlerdir.

Mahmoudian (2000) bu çalışmada, Sultan-1 ve Fırat-87 mercimek çeşitlerinde doku kültürü koşullarının optimizasyonunu ve *Agrobacterium* infiltrasyonuna ve partikül bombardmanına dayalı transformasyon sistemleri araştırılmıştır. Dolaylı ve dolaysız

organogenesis, bu çalışmadaki in vitro regenerasyonunun iki temel yolunu oluşturmaktadır. Çalışmadaki regenerasyon deneyleri boyunca, regenerasyon için belirleyici rolü bilinen üç önemli faktör, yani genotip, eksplant türü ve hormon kompozisyonları incelenmiştir. Dolaylı organogeneziste, üç değişik eksplant türünün regenerasyon tepkisi, üç değişik büyüme ortamında incelenerek, araştırılmıştır. Her iki çeşidin boğum içeren parçaları, 0.1 mg/L GA ve 10 mg/L Kinetin içeren ortamlarda, kallogenesis ve sürgün regenerasyonu açısından, en iyi sonuç veren eksplantlar olarak belirlenmiştir. Dolaysız organogeneziste ise, 1 mg/L BAP içeren ortamlarda tutulan kotiledon bağlantılı boğumlar, regenerasyon sistemi olarak kullanılmış ve sürgün oluşturmak için, potansiyeli yüksek eksplantlar olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle bahsi geçen eksplantlar transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Regenere olmuş sürgülerinin köklendirilmesinde, 0.1 mg/L IAA veya 0.1 mg/L EBA içeren köklendirme ortamlarının ile mikrografting tekniğinin üstünlüğü saptanmıştır. Transformasyon deneylerinde *A. tumefaciens* GV2260:p GUS INT ve, pBSGUSINT transformasyon vektörü kullanmıştır. Transformasyon sisteminin verimliliği, geçici gen ifadesinin histokimyasal GUS analizi ile belirlenmesiyle saptanmıştır. Bu analizler sonucunda, mercimekteki kotiledon bağlantılı boğumlarda her iki transformasyon sisteminde, genetik transformasyon için kullanılabilirliği tespit edilmiştir.

Jeleni vd. (2000), üç farklı bakla çeşidinde (Lobab Lippoi-Macaristan, Topolo – Hırvatistan ve Oşlje Bosna-Hersek) 9 farklı *Agrobacterium* [Doğal Tip (A281 ve B6S3), transkonjugant (C58C1(pArA4abc) ve C58C1(pArA4b), A. B6S3 çok köklü, mutant (GV3101pGV2255), GV3101 (pGV2215) ve GV3101 (pGV2235) ve *A. rhizogenes* yabancı tip (8196 ve 15834)] hatlarını genetik transformasyon için kullanmışlardır. Test edilen tüm hatlar ile sadece tümör dokusu elde edilmiş ve en etkili sonuçları Lobab Lippoi çeşidinde C58C1(pArA4b), bakteri hattı ile elde edilmiştir. A281 ve B6S3 hatlarıyla yapılan çalışmalarında en iyi sonuçlar Topolo ve Oşlje çeşitlerinde izlenmiştir.

Yan vd. (2000), soya fasulyesinde gen aktarımı frekansı üzerine olgunlaşmamış zigotik kotiledon büyüklüğü, *Agrobacterium* yoğunluğu, ko-kültivasyon süresi ve seleksiyon rejiminin etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla, EHA 105 (ST-LS1 intron içeren *GUS* geni ve higromisin fosfotransferaz geni) bakteri hattını kullanmışlardır. Arastırma

sonuçlarına göre, 5 mm'den küçük zigotik kotiledonlar ko-kültüvasyondan sonra hemen ölmüştür. Bakteri yoğunluğu arasında bir farklılık gözlemlenmemişlerdir. 4 gün ve üzerindeki ko-kültüvasyon süresi kotiledonların canlılık oranını ve embriyogenik potansiyelini azaltmıştır. Direk yüksek dozda (25 mg/l) seleksiyon ortamı yerine öncelikle düşük dozda (10 mg/l) sonra yüksek dozda higromisin uygulaması daha etkili bulmuşlardır. Bu çalışma sonucunda transformasyon frekansı % 0.03 olarak belirlemişler ve döllerde 3:1 Mendel açılımını gözlemlenmişlerdir.

Khawar (2001), Mercimeğe ait 21 genotipin kotiledon boğum eksplantlarından 0.05 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Daha sonra en yüksek adventif sürgün elde edilen 7 genotipe (Pul 11, Akm 261, Ill 62, Akm 49, Kışlık 21, Akm 565 ve Akm 362) gen aktarımı yapılmıştır. Bu hatların kotiledon boğum eksplantlarının GV2260 (pGV2260) :: p35S GUS INT, EHA 105 (pTiBo542):: p35S GUS INT ve LBA 4404(pAL 4404) :: pRGG bar bakteri hatlarıyla inokulasyonu sonucunda yüksek oranlarda transgenik sürgünler elde edilmiş, ancak bu sürgünler daha sonra IBA'lı ortamda köklendirilememiştir. Köklendirme problemini aşmak için, *GUS* pozitif sürgünler kesilerek önceden in vitro tohumdan geliştirilmiş Kayı 91 çeşidinin fidecikleri üzerine aşılanmıştır. Değişik genotiplerden 16 aşı yapılmış olup, bu aşılarından 11 tanesi tutarak gelişme göstermiştir. Aşılanan bu bitkicikler daha sonra saksılara aktarılmış ve iklim dolaplarında dış şartlara alıştırmaya çalışılmıştır. İklim dolabında gelişen bu bitkiciklerden yaprak örnekleri alınarak PCR analizi yapılmıştır. PCR analizine göre 8 bitkinin transgenik olduğu belirlenmiştir. Ancak, transgenik bitkiler daha sonra iklim dolabında gelişmeyerek ölmüşlerdir.

Naimov vd. (2003), hibrid SN19 genini kullanarak patatese gen aktarma yaparak ve *Leptinotara decemlineata* (C.) larva ve erginleri ile *Ostrinia nubilalis* ve *Phthorimaea operculella* (L.) larvalarına karşı dayanıklı transgenik bitkiler elde etmişlerdir. SN19, cry1Ba (domain I ve domain III, Coleoptera takımı üzerinde etkili) ve cryIIa (domain III, Lepidoptera takımı üzerinde etkili) hibrididir. Hibrid SN19 geni aktarılmış bitkilerde toplam çözünebilir protein içerisinde toksin miktarı % 0.025 olarak bulunmuştur. Domain II'de 28 adet tek nükleotid modifikasyon yapıldığı zaman toksin oranı % 0.25'e çıkmıştır. *Leptinotarsa decemlineata* (C.) larva ve erginleri ile *Ostrinia nubilalis* ve

Phthorimaea operculella (L.) larvaları ile yapılan bioassaylerde % 100 ölüm görülmüştür.

Erişen (2003), araştırmada bazı ticari yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinde ve hatlarında adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Adventif sürgün rejenerasyonunda farklı besin ortamlarında (MS, B5h, SH) değişik bitki büyümesini düzenleyiciler (BAP, NAA, kinetin, adenin, 2,4-D ve TDZ) ve onların farklı konsantrasyonları değişik eksplant kaynaklarında denenmiştir. Yapılan denemelerde yaprak eksplantının en yüksek sıklıkla adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan eksplant olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çeşitler arasında en yüksek sıklıkla adventif sürgün rejenerasyonu oluşturan çeşidin % 33,33 ile Verco çeşidi olduğu ve en uygun besin ortamının B5h olduğu tespit edilmiştir. Denenen bitki büyümesini düzenleyicilerinden ise somatik embriyo oluşumunda 2,4-D ve kinetinin, embriyolardan sürgün gelişiminde ise hormon içermeyen ortamların etkili olduğu ve en uygun ortamın 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortam olduğu belirlenmiştir. Adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında test edilen çeşitler arasında en başarılı sonuçların alındığı Verco çeşidinin yaprak ve yaprak sapı eksplantlarına 3 farklı *A. tumefaciens* hattı (EHA 105, LBA4404, GV 2260) ile gen aktarım çalışması yapılmıştır. Çalışmalarda katı ve sıvı ko-kültürasyon ortamları kullanılarak yapılan farklı sürelerde ko-kültürasyon uygulamaları sonucunda sadece yaprak eksplantında 11 GV2260 hattında katı ko-kültürasyon ortamında ve 2 günlük ko-kültürasyon uygulamasından *GUS* pozitif embriyo veren eksplant elde edilmiştir. Transformasyon sıklığı % 2,68 olarak tespit edilmiştir.

Barik vd. (2005), *Lathyrus sativus* bitkisinde *A. tumefaciens* ile gen aktarımını etkileyen faktörleri (eksplant tipi, büyüme devresi, hücre yoğunluğu, inokulasyon zamanı, ko-kültürasyon zamanı, bakteri hattı ve ön inkübasyon) araştırmışlardır. Bu amaçla p35S *GUS* INT binary vektörünü içeren LBA4404 ve EHA 105 bakteri hatlarını kullanmışlardır. En yüksek transformasyon frekansını 4 gün ön inkübasyona süresi, 10 dakika 109 hücre/ml bakteri yoğunluğu ile inokülasyon, 4 gün ko-kültürasyon süresinden elde etmişlerdir. Bakteri hatları arasında transformasyon etkinliği bakımından bir farklılık bulamamışlardır. Transgenik bitkilerin seleksiyonu için en

uygun kanamisin dozunu 100 mg/l, bakteri eliminasyonu için ise en uygun antibiyotik dozunu ise 500 mg/l sefotaksim olarak belirlemişlerdir. T₁ bitkilerinde 3:1 Mendel açılımı saptamışlardır.

Uranbey vd. (2005), tütünde gen aktarımı üzerine ko-kültüvasyon sıcaklığının (18–20 °C), periyodunun (24 – 96 saat) ve ortamının (katı-sıvı) etkisini belirlemek amacıyla yaprak disklerini GV2260 p35S GUS-INT bakteri hattı ile inoküle etmişlerdir. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra kanamisine dayanıklı sürgünler kesilerek 100 mg/l kanamisin ve 250 mg/l augmentin içeren ortamda köklendirilmiştir. Transgenik aday bitkiler *GUS* ve PCR analizi ile belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre en yüksek transformasyon frekansının 22 – 24 °C’de 48 saat sıvı ortamda ko-kültüvasyona bırakılan yaprak disklerinde elde edildiği bildirilmiştir.

Mutasim vd. (2005), *A. tumefaciens* aracılığıyla Adzuki fasulyesine [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi] higromisin fosfotransferaz (*hpt*), yeşil floresan protein (*sgfp*) ve fosfinotrisin asetiltransferaz (*bar*) genlerini aktararak transgenik bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada *A.tumefaciens*’in *pZHBG* içeren EHA105 hattı ve 210 adet epikotil eksplantı kullanılmıştır. Ko kültüvasyon ortamına 100 mM asetosringon ve 10 mg/l of BA ilave edilmiştir. 15 mg/l higromisin içeren ortamdan seçilen sürgünler köklenme ortamına aktarılmıştır. Tespit edilen 31 adet transgenik bitki toplam bitki sayısının %14’dür. Transgenik bitkiler PCR ve southern blot analizleri ile tespit edilmiştir. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) analizi ile de *bar* ve *hpt* genleri tespit edilmiştir. Ayrıca, *sgfp*- pozitif transgenik bitkilerinde de *bar* geni tespit edilmiştir.

Wang vd. (2005), mısır bitkisinde bir Lepidopter olan *Ostrinia furnacalis*’e dayanıklı bitkiler elde etmek amacıyla GNA lektin geninin kullanmışlardır. Çözünebilir protein içerisinde % 0.24 GNA ekspresyonu gösteren bitkilerin *Ostrinia*’ya karşı dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Chen vd. (2005), çeltiğe cry2A genini Agrobacterium aracılığıyla aktarmışlardır. Yapılan PCR analizinde 102 adet tek bitkiden 71 tanesinin cry2A genini içerdiğini belirlemişler. Transgenik bitkilerde Cry2A protein miktarı 9.65 – 12.11 µg/g arasında değişim göstermiştir. Transgenik bitkilerin Lepidoptera takımına ait çeltik zararlılarına karşı önemli ölçüde koruma sağladığını gözlemişlerdir.

Sağlam vd. (2005), gen aktarım çalışmaları esnasında fasulyenin Aras, Eskisehir–855, Sehirali–90 çeşitlerinin tohumları tarlada ekilip ve akşam güneş batmadan yarım saat önce her üç çeşidin açılmamış ve açılmak üzere olan çiçekleri el ile açılıp *A. tumefaciens*'in nononkogenik GV2260, EHA105, LBA4404 bakteri hatları ile asılanmış ve aşılana her bir çiçek aydınlatma kağıtları ile dışarıdan tozlaşmayı engellemek amacıyla muhafaza altına alınarak etiketlenmiştir. Hasat zamanı olgun baklalar hasat edilerek baklalar içerisindeki tohumlar iklim odasında saksılar içerisine ekilmiş ve gelişen bitkiler ile *GUS* testi yapılmıştır. *GUS* testi sonucunda *in planta* polen yoluyla *Agrobacterium*'un nononkogenik hatlarıyla transformasyon gerçekleştirilemediği görülmüştür. *A. tumefaciens*'in A281 ve *A. rhizogenes*'in 15834 onkogenik hatları seyreltilmeden tarladaki bitkilerin üst kısımlarının koltukaltı bölgelerine enjektör yardımıyla enjekte edilmiştir. *A. tumefaciens*'in A281 hattı ile gövdelerin alt kısımlarına yapılan aşılama hiç transformasyon gözlenmemiş fakat az da olsa tümör oluşumu tespit edilmiştir. Aynı şekilde *A. rhizogenes*'in 15834 hattı ile bitkilerin alt kısımlarına yapılan aşılama sonucunda gözlenmezken üst kısımlarda yaklaşık %20 oranında kök yerine küçük tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir.

Estrada-Navarrete vd. (2006), fasulye bitkisi ve onun yabani akrabalarından olan *P.coccineus*, *P. lunatus* ve *P.acutifolius*'da gen aktarımı çalışmaları yapmışlar ve % 75 – 90 arasında transformasyon görmüşlerdir. Marker gen olarak 35S promotor, yeşil floresans protein ve β-glukuronidaz kullanmışlardır. *Rhizobium* ile muamele sonucunda transgenik ve normal bitkilerin köklerinde meydana gelen azot fiksasyon oranında değişiklik görülmediği bildirmişlerdir.

Dita vd. (2006), baklagil bitkilerinin birkaç zararlıya karşı hassas olduğunu, verimde büyük kayıplara yol açtıklarını ve bundan dolayı zararlılara dayanıklılığı basarmada, α -amilaz inhibitör genleri, proteaz inhibitör genleri, *Cry* genleri ve lektin genlerinin baklagillere transfer edilecek genler olduğunu bildirmişlerdir.

Metry vd. (2007), 10 adet Mısır kökenli bakla çeşitlerin embriyo eksplantından % 30 - 92 ve sürgün ucu explantından % 12 - 57'sürgün rejenerasyon, izlenmiştir. embriyo eksplantını kültüre alarak 1 mg/l B5 vitamin, 4.5 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA ve sürgün ucu eksplantı için 5 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA MS ortamına kültüre alınmıştır. Fenolik bileşenleri engellemek için kültürleri bir hafta karanlıkta tutmuşlardır. Rejenerasyon ortamına aktif kömür ilavesinin rejenerasyon frekansı üzerinde olumsuz etkiler tespit edilmiştir. Daha sonra *microprojectile* bombardıman ile iki *pCGP1258* (herbisitlere dayanıklı) ve β - *glucuronidase* (*GUS*) genleri ile transformasyon yapılmıştır. Transgeniklerin belirlenmesi için Southern blot, PCR ve histokimyasal *GUS* testleri ile yapılmıştır. Transformasyon frekansı Giza 40 çeşidinde % 2 gibi olarak tespit edilmiştir.

Sağlam (2009), Fasulye Akman-98 çeşidinin apikal meristem eksplantlarını kullanarak *A. tumefaciens* aracılığıyla böceklere dayanıklı bitkiler elde etmiştir. Bu çalışmada Fasulye bitkisinin olgunlaşmamış kotiledon, plumula ve embriyo ile iki kotiledon eksplantlarından yüksek oranda rejenerasyon sağlanmıştır. GV2260 p35S *GUS*-INT bakteri hattı kullanılarak 3 adet *GUS* pozitif bitki elde edilmiştir. Çalışmada Yalnızca *GNA*, *CryIAC*, *CryIAB*, *Cry2A* (p2A PRD ve p2AST PRD), *CryIC* (p1CST PRD), *SN19* (pMH65, pMH66) genlerini taşıyan bakteri hatları kullanılarak yapılan gen aktarımı çalışmalarından bitki elde edilmistir.

Tsuro vd. (2009), Lavandin bitkisinde yaptıkları gen aktarımı çalışmasında *A. rhizogenes* içeren *pIG121-Hm* genini kullanmışlardır. Bu denemede ko-kültivasyonun beşinci gününde, yaprak ve kallus oluşturan yaprak eksplantları alınarak, *GUS* analizi yapılmıştır ve kallus oluşturan yaprak eksplantlarında *GUS* analiz sonucu pozitif sonuçları elde edilmiştir.. En yüksek adventif sürgün oluşum oranı (% 77.5), 0.02 mg/L CPPU içeren MS ortamında elde edilmiştir.

Hanafy vd. (2013), ilk defa bakla (*Vicia faba*) bitkisinde kuraklık ve tuzluluğa toleranslı patates pR10a geninin aktarıldığını ve ifadesini rapor etmişlerdir. Bakla bitkisi kuraklık ve tuzluluğa duyarlılığı gibi abiyotik stresleri nedeniyle ciddi verim kayıplarına uğramaktadır. Bu çalışmada Patates Desiree çeşidinden tuz veya kuraklığa toleranslı pR10a geni izole edilerek *A. tumefaciens*-aracılığıyla bakla bitkisine genetik transformasyon yapılmıştır. Daha sonra yabancı genlerin kalıtım ve ifadesi, PCR, RTPCR ve Southern blot ve biyoassay ile Lusiferaz aktivitesini teyid ederek tespit etmişlerdir. Üç (3) hafta boyunca su kesilerek kuraklık koşulları altında transgenik bitkilerin yaprakları yeşilken transgenik olmayan bitkilerinde solma ve nekrozlaşma izlenmiştir. Daha sonra yirmi dört saatlik ara ile bitkilere su verilmiştir. Yeniden sulama sonucunda transgenik bitkilerin yaprakları yeşil kalırken, transgenik olmayan bitkilerini daha önceden oluşmuş stresin devamına kurumuşlar ve kurtarılmadan ölmüşlerdir. Ayrıca, transgenik ve transgenik olmayan itkileri arasında bir kıyasma sonucu transgenik bitkileri NaCl stresine karşı daha yüksek tolerans göstermişlerdir.

Abdelwahd vd. (2014), Orobaş bitkisine karşı transgenik tolerans artırmak için kotiledonar boğum eksplantları kullanmışlardır. Araştırmada genotip, *Agrobacterium* hatları, Asetosyringon ve tiyoller ürünlerinin etkileri incelenmiştir. Her iki bakla çeşidin (Lobab ve Aquadulce) kotikedon boğumları pBIBhyg vektöründe IA ve hptII genlerin taşıyan. İki adet *A. tumefaciens* hatları (EHA101 ve AGL1) ile muamele ederek kültüre alınmıştır. Sonuçlar genotip, genotip × asetosiringon etkileşimi ve tiyol bileşiklerin ilave edilmesi bakla bitkisinin sürgün frekansının artmasında pozitif etkileri göstermişlerdir. Dolayısıyla Hygromycin antibiyotiğine en yüksek dirençli sürgünler % 38,3 frekansıyla AGL1 hatıyla ile muamele edilen Aguadulce çeşidinde elde edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Deney materyali olarak seçilen baklanın (*Vicia faba* L.) Filiz 99 ve Eresen 87 Adlı kültür çeşitlerine ait tohumlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü İzmir'den temin edilmiştir.

3.2 Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

Her iki, Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitleri için yapılan denemelerde % 3 sukroz ve % 0.65'lik agar (Duchefa, Holanda) ile katılaştırılan MS ortamı (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında bidistile saf su kullanılmış olup, deneme ihtiyacına göre besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, TDZ, IAA, NAA) ve takviye edici maddeler (L-Glutamin, Casein Hydrolysate, aktif kömür vb) ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'ı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6–5.8'e ayarlanmış olup, 104 kPa basınç altında ve 121°C'de 20 dakika otoklavda tutularak steril edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerin stok solüsyonları uygun çözücülerde çözüldükten sonra bidistile saf su ile istenen miktarlarda ve oranlarda hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Tüm kültürler 20000 lüks beyaz floresan ışığında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24 ± 1 °C'de inkübe edilmiştir. Sterilizasyon ve tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Her muamele; 3 tekerrürlü olarak ve içerisinde 5 adet eksplant bulunan Petri kablari (100 x 10 mm) ya da Magenta (GA⁷) kutularda kültüre alınmıştır. Ayrıca ortamlar, magenta kutular ve saf suyun sterilizasyonu otoklavda yapılırken; cam petrilerin sterilizasyonu ise 160 °C'de 2 saat etüvde tutularak yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Kullanılan hormonlar, çözücüler ve saklama koşulları

Büyüme düzenleyicileri	Çözücü	Saklama koşullari (°C)
BAP	1 N NaOH	4
TDZ	Etanol	4
NAA	1 N NaOH	4
IAA	1 N NaOH	4

3.3 Tohumların *in vitro* Koşullarda Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında kullanılmak amacıyla her iki kültür çeşidinin (Filiz 99 ve Eresen 87) tohumları % 60 oranda çamaşır suyu (Ace, Türkiye) ile 20 dk muamele ederek steril edilip; daha sonra, steril edilmiş tohumları 3'er kere 5'er dk saf suyu ile durularak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır (Çetin 2010). Steril edilmiş tohumların 24 saat $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saf steril su içinde bekletilerek priming yapılmıştır.

3.4 Eksplant Seçimi

Eksplant elde edilmesi için, 24 saat $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saf steril su içinde beklemiş olan steril tohumlar, laminar flow kabin içerisinde tohumlardan testa uzaklaştırılmış olup, kotiledonlar açılmış ve bisturi yardımıyla embriyolar elde edilmiştir.

3.5 Rejenerasyon Çalışmaları

3.5.1 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP – NAA içeren agar ile katılaştırılmış MS ortamı kullanılmıştır. Her iki çeşidinden 24 saat steril saf suda bekletilmiş bakla tohumlarından pens ve bisturi yardımıyla zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole edilip, sürgün rejenerasyon için 0.25 mg/l BAP – 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 ve 2.25 mg/l NAA (10 kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Ayrıca, kontrol olarak MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve eksplant başına sürgün uzunluğu (cm) ile ilgili verilerinin varyans analizi yapılmıştır.

3.5.2 Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda TDZ içeren ve agar ile katılaştırılmış MS ortamı kullanılmıştır. Tohumlar yüzey steril ettikten sonra 24 saat steril saf suda bekletilmiş daha sonra zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole edilip, sürgün rejenerasyon için 0.00, 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.55 mg/l TDZ (6 konsantrasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Ayrıca, kontrol olarak MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün oluşum yüzdesi (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve eksplant başına sürgün uzunluğu (cm) ile ilgili verilerinin varyans analizi yapılmamıştır.

3.5.3 Farklı saatlerde Bap hormonu ile priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşidinin zigotik embriyolarını 1, 2, 3 ve 4 saat 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamda bekletilerek agar ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre tüm ortamlarda % 100 sürgün oluşum izlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Geri kalan iki parametrelerle ilgili verilerle yapılmış olan varyans analizi yapılmıştır.

3.5.4 100 mg/l sıvı BAP hormonu ile 0, 12, 24 saat süre priming den sonra farklı konsantrasyonda tdz içeren ms ortamında kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşidinin zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole ettikten sonra 0, 12 ve 24 saat 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında priming amacıyla bekletilmiştir. Daha sonra sürgün rejenerasyonu için eksplantları 0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 mg/l TDZ (6 konsantrasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Denemede MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Dört hafta sonra bitkileri köklendirmek amacıyla 1mg/l IAA + 2g/l aktif kömür içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Ardından köklenen bitkilerin dış koşullara adaptasyonunu sağlamak için 1:1 oranında torf ve toprak içeren saksıları kullanılmıştır.

3.5.5 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriking yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP içeren MS ortamı kullanılmıştır. Her iki çeşidinden 24 saat steril saf su ile priming yapılmış ardından bistüri yardımıyla baklalardan kotiledonlar uzaklaştırılmış ve zigotik embriyoları izole edilmiştir. Sürgün rejenerasyon için 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00 mg/l BAP (9 konsantrasyonunda) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Üç hafta sonra gelişen sürgünler ana gövdeden bistüri yardımıyla steril kabin içinde ayrılıp 1mg/l IAA içeren MS ortamına köklendirmek için aktarılmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve eksplant başına sürgün uzunluğu (cm) ile ilgili verilerinin varyans analizi yapılmıştır.

3.5.6 Farklı BAP + 0.01 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP – NAA içeren agar ile katılaştırılmış MS ortamı kullanılmıştır. Her iki çeşidinden zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole edilip, sürgün rejenerasyon için 0.01 mg/l NAA – 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00 mg/l BAP (6 kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı (adet), eksplant başına sürgün uzunluğu (cm) ve eksplant başına yan sürgün sayısı (adet) ile ilgili verilerinin varyans analizi yapılmıştır.

3.5.7 Farklı BAP + 0.02 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP – NAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Zigotik embriyolar kotiledonlardan izole edildikten sonra, sürgün rejenerasyon için 0.02 mg/l NAA – 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00 mg/l BAP (6 kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı (adet), eksplant başına

sürgün uzunluğu (cm) ve eksplant başına yan sürgün sayısı (adet) ile ilgili verilerinin varyans analizi yapılmıştır.

3.5.8 Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate konsantrasyonların Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 embriyoları izole ettikten sonra 1.00 mg/l BAP + 0.10 NAA ve 100 mg/l L-Glutamine ile 200 mg/l Casein Hydrolysate (CH) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Üç hafta sonra sürgünleri 1 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Daha sonra köklenen bitkileri dış koşullarına alıştırmak amacıyla 1:1 torf ile toprak içeren saksılara aktarılmış kontrollü sera koşullarında adaptasyon sağlanmıştır.

3.6 Rejenere Olmuş Bakla Sürgünlerinin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler kesilerek 1 mg/l IAA içeren MS besin ortamında, steril Magenta kutularında kültüre alınmıştır, Ancak, transgenik aday bitkileri ise 1 mg/l NAA + 2 g aktif kömür içeren MS ortamlarında köklendirilmiştir.

Ayrıca kullanılan *Agrobacterium* hattına bağlı olarak pGV2260 p35S GUS-INT ile muamele edilmiş transgenik aday bitkilerin seleksiyonu için 100 mg/l Kanamycin Monosülfat ve EHA 105 pTF101.1 35s SN19 hattıyla muamele edilmiş bitkilerin seleksiyonu için 1.5 mg/l Fosfotrisin (*Phosphinothricin*) ile birlikte tüm besin ortamlarına Anti bakteri olarak 500 mg/l Duocid ilave edilmiştir.

Dört hafta sonra köklenen sürgünler iklim odasında ya da serada 1:1 oranda steril toprak ve torf içeren saksılara aktarılmış olup, üzerine plastik poşet geçirilip 20 - 25 ± 2 °C'de bir hafta için tutularak yeni bitkiciklerin hem ortam şartlarına uyması, hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır. Burada gelişen bitkiler normal tarla toprağının bulunduğu saksılara aktarılarak serada geliştirilmiş ve transgenik aday bitkilerden tohum elde edilmiştir.

3.7 Elde Edilen Köklenmiş Bitkilerin Dış Şartlara Alıştırılması

Doku kültüründe yetişen ve köklenen bitkilerin dış şartlara alıştırılması amacıyla, ilk önce magentalarda bulunan bitkiler dikkatlice alınıp, musluk suyu altında yıkanarak köklerinde bulunan agar ile katılaştırılmış besin ortamı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, yüksek nemli ortamda gelişen bitkilerin dış koşullarında beklenen transpirasyon nedeniyle oluşan şoku önlemek amacıyla, bitkileri 20 - 30 dk saf su içerisinde bekletilmiştir. Köklendirilen ve boyları 10-15 cm arasında değişen bitkiler birer adet olacak şekilde tarla toprağı ile Torf (1:1) içeren 13 × 20 cm'lik 0,910 g/cm³ yoğunlukta olan alt tarafı delikli siyah fide tüplerine ve gerekir ise 14.5×13 cm'lik saksılara aktarılmıştır. Aktarılan bitkilerin büyümelerini ölçmek amacıyla, üzerleri 2 cm aralıklar ile işaretlenmiş çubuklar dikilmiştir. Uygulanan denemelerde, bitkilere verilen su miktarları düzenlenerek her iki gün de bir kez olmak üzere 50 ml su verilmiştir. Her saksı/fide tüpü örten poşetleri, her 5 günde bir olacak şekilde delinerek toplam 25 gün sonra tamamen kaldırarak bitkileri yavaş yavaş dış koşullara adapte edilmiştir.

Daha sonraki aşamalarda bitkiler, iyice gelişmesi ve tohum elde edilmesi için; nem (nispi nem oranı :% 69 ± 2), sıcaklık (16 ± 2°C) ve 16 saat ışık fotoperiyodu (20000 luks) altında kontrol edilen seralara aktarılmıştır.

3.8 Bakteri Materyali

Çalışmada Çizelge 3.2'de verilen non-onkogenik *Agrobacterium* bakteri hatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Bakteri hatları ve özellikleri

Bakteri hattı (Seleksiyon Antibiyotik)	Plazmid	Gen kasetleri	Bitki seleksiyonu
GV2260 (50 mg/l Rifampisin)	pTF101.1	NOS promotör- npt II-terminatör 35s promotör - GUS int terminatör	Kanamisin Monosülfat (50-100 mg/l)
EHA 105 (300 mg/l Streptomycin) (100 mg/l Spectinomycin)	pTF101.1	35s promotör - SN19 - terminatör	Fosfinotrisin (1.50mg/l)
EHA 105 (300 mg/l Streptomycin) (100 mg/l Spectinomycin)	pTF101.1	AoPR1 promotör - SN19 - terminatör	Fosfinotrisin (1.50mg/l)

- SN19 (cryIbA/cryIIa) bir hibrid geni olarak kullanılmıştır.

3.9 Bakteri Kültürlerinin Saflaştırılması ve Büyütülmesi

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

3.10 Antibiyotikler

Bakteri büyütme ortamlarına ilave edilmeden önce her antibiyotik mikro filtreler (0.44µ) kullanılarak steril edilmiş ve otoklavdan çıktıktan sonra ısısı 40 – 45 °C'ye düşmüş olan ortamlara ilave edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. GV2260 p35s GUS INT, bakteri hattı büyütülerek ortama 50 mg/l rifampisin, 50 mg/l kanamisin monosülfat eklenmiştir. SN19 geni içeren EHA 105 bakteri hattını büyütülürken 50 mg/l rifampisin, 300 mg/l

Streptomycin ve 100 mg/l Spectinomycin eklenmiştir. Rifampisin metanol, kanamisin monosülfat, Streptomycin ve Spectinomycin ise su ile çözüldükten ve filtre sterilizasyonundan sonra stok çözeltiler - 20 °C’de muhafaza edilmiştir.

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

Antibiyotikler	Kullanım oranları (mg/l)	Stok (mg/ml)	Çözücüler	Saklama koşulları (°C)
Rifampisin	50	25	Metanol	-20
Kanamisin monosülfat	50	50	Su	-20
Streptomycin	300	100	Su	-20
Spectinomycin	100	100	Su	-20

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

Antibiyotikler ve çözücüler	Stok	Seleksiyon için kullanılan konsantrasyon (mg/l)		Baklada kullanılan konsantrasyon	Çözücü saklama koşulları (°C)
		Tütün	Bakla		
Duocid	100	500	500	Su	- 20
Kanamisin monosülfat	50	50	100	Su	-20
Fosfinotrisin (<i>Phosphinothricin</i>)	10	----	1.50	Su	-20

Besi ortamlarında bulunan Duocid Antibiyotiği Ko kültürasyondan sonra *A. tumefaciens*’in gelişimini engellemek için kullanılmıştır.

3.11 *Agrobacterium tumefaciens* ile Bakla Bitkisine Gen Aktarımı

Baklada embriyoları gen aktarma işleminde eksplant olarak kullanılmıştır. Denemeye alınan değişik gen aktarma vektörlerini içeren *A. tumefaciens* hatları ile bu eksplantlar inoküle edilmiştir (Çizelge 3.2).

Değişik plazmidleri içeren *A.tumefaciens* hatları 28°C’de 50 mg/l kanamisin monosülfat ve rifampisin, 300 mg/l streptomycin ve 100 mg/l spectinomycin içeren NB ortamında 1-2 gün süreyle büyütülmüş, daha sonra eksplantlar sıvı rejenerasyon ortamı + bakteri kültürleri (OD₆₀₀ değeri = 0.8) içerisinde 30 dk süreyle tutularak inokulasyon sağlanmıştır. İnokulasyondan sonra eksplantlar 2 günlük sürede rejenerasyon ortamında tutularak ko-kültivasyona alınmıştır. Bundan sonra, eksplantlar *Agrobacterium* gelişimini engellemek için Duocid (500 mg/l), sadece gen aktarılmış sürgünlerin gelişimini sağlamak için kullanılmıştır. *Agrobacterium* GV2260 hattı ile muamele edilmiş eksplantları üzerinde gelişen sürgünlerin seleksiyon için kanamisin (100 mg/l) ve EHA 105 bakteri hattı ile muamele edilmiş eksplantlarından gelişen sürgünlerin seleksiyon için 1.50 mg/l fosfinotrisin rejenerasyon ortamına ilave edilmiştir. Bu ortamda gelişen sürgünler 3 hafta sonra köklendirme ortamına kültüre alınmıştır.

3.12 Bakteri Kültürlerinin Kısa ve Uzun Süreli Korunması

A. tumefaciens kültürleri, seleksiyon antibiyotikler içeren 5 – 10 ml NB (Lab-Lemco Powder 1.0 g/l; Yeast extract 2.0 g/l; Pepton 5.0 g/l; Sodyum klorit 5.0 g/l) ortamında bir gece 28 °C’de 150 devir/d (rpm)’da inkübatörde büyütülmüştür. Kısa süre için kullanılmak amacıyla NA (Nutrient Agar) içeren ortamda çizilerek 28 °C’de büyütülmüştür ve daha sonra elde edilen bakteri kültürleri streç film ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4 °C’de 6 hafta korunmuştur.

Bakteri kültürlerin daha uzun süreli muhafaza işlemi için, eşit miktarda bakteri kültürü ve % 40 gliserol içeren NB, 2 ml’lik kriyogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı bir şekilde dondurulup, - 80 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkündür.

3.13 Gen Aktarılmış Bitkilerin Belirlenmesi

Belirlenmiş seleksiyon rejenerasyon ortamında gelişen aday transgenik sürgünler, kanamisin monosülfat ve fosfinotrisin içeren besin ortamında köklendirildikten sonra

saksılara şaşırtılmıştır. Bu bitkilerin transgenik olup, olmadıkları aktarılan genlere göre histokimyasal GUS ve PCR analizi ile teyit edilmiştir.

3.13.1 Histokimyasal GUS analizi

Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993)'in tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 10 ml sodyum fosfat buffer (pH = 7.0), 200 µl EDTA, % 0.1 Triton X – 100 ve 10 mg/l 5 bromo–4 chloro 3 indolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular % 100'lük alkolde yıkanarak mavi bölge belirlenmiştir.

3.13.2 DNA izolasyonu ve PCR analizi

DNA izolasyonu lefort yöntemi (Lefort vd, 1998) kullanarak yapılmıştır. Transgenik aday bitkilerden alınan yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde ezilmiştir. Yaprak örneklerinin bulunduğu 1.5 ml'lik her bir tüp içine 1ml DNA ekstraksiyon solüsyonu (1M Tris pH = 8; 0.5 M EDTA; 4 M LiCl; CTAB; PVP; Tween 20) eklenerek karıştırılmış ve üzerine 10 µl 2-Merkapto ethanol eklenilmiştir. Örnekler 65 °C - 40 dk su banyosunda çalkalayarak bekletilmiştir. Daha sonra oda koşullarında soğutularak üzerine 700 µl kloroform/izoamil alkol eklenerek 20 - 25 defa sallanmıştır. 30 dk buz üzerinde beklettikten sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine 800 µl isopropanol eklenip, 20 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Herhangi bir katı kısmın alınmamasına dikkat edilmiştir. DNA lar toplandıktan sonra örnekler 14000 rpm'de 3 dk santrifüj ettikten sonra üst tabaka oluşturulan sıvı atılarak soğuk % 70'lik etil alkolden 1ml eklenmiş, 2 dk 14000 rpm'de yeniden santrifüj edilmiştir. İçindeki alkol dökülerek DNA peleti iyice kurutulmuş ve 50 µl H₂O (nuclease free) eklenerek çözülmüştür. Elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Primer Dizileri

Transgenik bitkileri belirlemek amacıyla *NPT-II* ve *Bar* dizileri PCR ile çoğaltılmıştır. Çizelge 3.5’de transgenik bitkileri belirlemek amacıyla *NPT-II* ve *Bar* bölgelerinin çoğaltımında kullanılan primer dizileri görülmektedir.

Çizelge 3.5 PCR işleminde kullanılan primer dizileri

Hedef	Baz dizilişi	Hedef büyüklüğü
<i>NPT-II</i> geni	F- TTG CTC CTG CCG AGA AAG R- GAA GGC GAT AGA AGG CGA	458
<i>Bar</i> geni	F- TGC ACC ATC GTC AAC CAC TA R- ACAGCG ACC ACG CTC TTG AA	380

PCR reaksiyon koşulları

3 µl DNA

2.5 µl 10X PCR tamponu

3 µl MgCl₂ (25 mM)

2 µl dNTP (10 mM)

P₁ 2 µl, P₂ 2 µl

0.2 µl Tag DNA polymerase

10.3 µl dH₂O kullanılarak 25 µl toplam hacimde yapılmıştır. Reaksiyonlar, Biometra Tpersonal thermocycler aletinde aşağıdaki döngü koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

PCR Programı

95 °C 10 dk

94 °C 1 dk

58 °C 1 dk

72 °C 2 dk (2- 39)

72 °C 10 dk

4 °C son

Örneklerin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR reaksiyonları % 1'lik agaroz gel elektroforezi ile ayrılmıştır. Bunun için 1 gr agaroz 100 ml 1 × TBE (10.8 g/l Trizma-base, 5.5 g/l Borik asit, 4 ml 0.5 M EDTA pH = 8) tamponunda mikrodalga fırında çözdürülmüş ve sıcaklığı 50 – 60 °C'ye düştüğünde DNA'nın UV'de görüntülenebilmesi için 5 µl etidyum bromür eklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 Voltta 1 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel UV lambası üzerinde kontrol edilmiştir.

3.14 Verilerin İstatistiksel Analizi

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuş ve elde edilen veriler MSTAT-C bilgisayar programı ile varyans analiz ve Duncan testi yapılmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Baklanın *In Vitro* Koşullarda Sürgün Rejenerasyonu

4.1.1 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP – NAA içeren agar ile katılaştırılmış MS ortamı kullanılmıştır. Her iki çeşidinden 24 saat steril saf suda bekletilmiş bakla tohumlarından pens ve bistüri yardımıyla zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole edilip, sürgün rejenerasyon için 0.25 mg/l BAP – 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 ve 2.25 mg/l NAA (10 kombinasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Ayrıca, MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Sürgün oluşum yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre sürgün oluşum yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Ancak, sürgün uzunluğu ile ortamlar arasında farklılığın 0.05 düzeyinde önemli olduğu görülmektedir.

Sürgün oluşum yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı ile çeşitler arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Ancak, eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılığın olduğu tespit edilmiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi ile Ortamlar × Çeşitler interaksyonu arasında 0.01 düzeyinde önemli etkileşim görülmüştür. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından Ortamlar × Çeşitler interaksyonu arasında 0.05 düzeyinde önemli etkileşim izlenmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D.	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	10	121.21	1.53	0.58	1.88	7.64	2.42*
Çeşitler	1	54.54	0.69	0.37	1.19	18.56	5.88*
Ortamlar×Çeşitler	10	227.87	2.89**	0.62	2.01*	6.71	2.12*
Hata	44	78.78		0.31		3.15	
Genel Toplam	65						

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Her parametre ve çeşitlerin ortalamaları arasında etkileşim düzeylerini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır. Duncan testi sonuçları çizelge 4.2 de verilmiştir.

Her iki çeşidinin zigotik embriyo eksplantından yüksek (% 80.00 – 100.00) oranda sürgün rejenerasyon elde edilmiştir.

Filiz 99 çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı 1.00 – 2.50 adet arasında ve Eresen 87 çeşidinde ise 1.12 - 2.30 adet arasında değişmiştir. Filiz 99 çeşidinde en fazla sürgün oluşum 0.25mg/l BAP - 0.00 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.1.a). Kullanılmış embriyo eksplantın gelişen kökleri 7 - 10 gün sonra şişmiş olup, kallus haline gelmişlerdir (Şekil 4.1.b). Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için kallus uzaklaştırıldı ve sürgünleri 1mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmiştir (şekil 4.1.c,d). Köklenmiş 3-4 cm'lik bitkilerde ortalama 6 - 8 adet kök izlenmiştir (Şekil 4.1.d,e). Ortamda iki hafta kaldıktan sonra sürgünler 3-4 cm boy almışlardır. Eresen 87 çeşinde ise en fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP -1.00 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP -1.75 mg/l NAA içeren ortamda izlenmiştir. Her iki çeşidine ait köklendirilmiş sürgünleri (bitkileri) dış koşullara alıştırmak amacıyla 1:1 toprak ve torf içeren saksılara şaşırtarak Materyal ve Yöntem'de anlatıldığı gibi sera koşullarına büyüme, çiçeklenme ve bakla oluşumu için alınmıştır (Şekil 4.1.e).

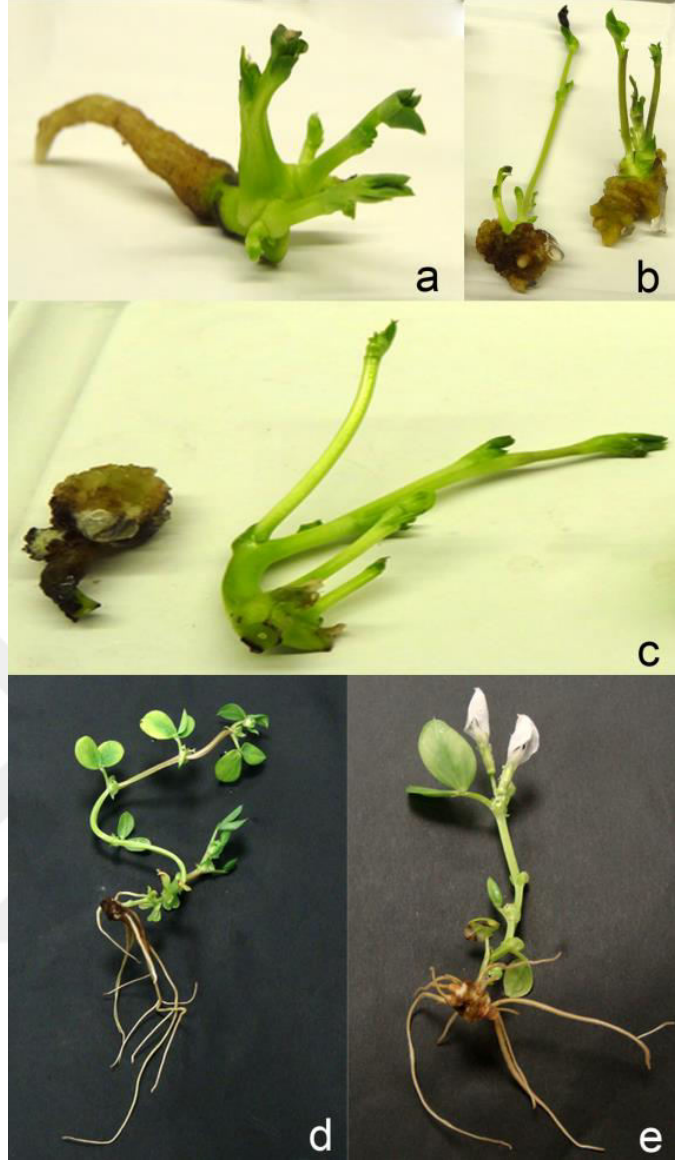
Filiz 99 çeşidinde eksplant başına sürgün uzunluğu 2.13 – 6.90 cm arasında ve Eresen 87 çeşidinde 1.70 – 6.50 cm arasında değişmiştir. Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde sırasıyla en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP - 0.75 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP - 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamdan elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi analizi sonuçları

Hormon dozları (mg/l)		Sürgün oluşum yüzdesi (%)**		Eksplant başına sürgün Sayısı (adet)*		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)*	
BAP	NAA	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
0.25	0.00	93.33 ab	93.33 ab	2.50 a	1.60 abcd	2.30 bcd	2.20 bcd
0.25	0.25	100.00 a	100.00 a	1.90 abcd	2.20 abc	4.80 abcd	1.70 d
0.25	0.50	100.00 a	93.33 ab	1.70 abcd	1.12 cd	3.90 abcd	6.50 a
0.25	0.75	93.33 ab	93.33 ab	1.40 abcd	1.40 abcd	6.90 a	2.90 bcd
0.25	1.00	100.00 a	80.00 b	1.80 abcd	2.30 ab	5.30 abc	3.60 abcd
0.25	1.25	100.00 a	100.00 a	1.30 bcd	2.00 abcd	5.60 ab	2.70 bcd
0.25	1.50	80.00 b	100.00 a	1.13 cd	1.50 abcd	6.45 a	3.60 abcd
0.25	1.75	93.33 ab	80.000 b	1.00 d	2.30 ab	3.60 abcd	2.20 bcd
0.25	2.00	100.00 a	100.00 a	1.70 abcd	1.12 cd	2.70 bcd	2.90 bcd
0.25	2.25	93.33 ab	100.00 a	1.00 d	1.30 bcd	2.60 bcd	4.50 abcd
Kontrol		100.00 a	80.00 b	1.70 abcd	1.90 abcd	2.13 bcd	1.90 cd

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.

**Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.01 düzeyinde farklılığı görülmüştür.



Şekil 4.1 Baklanın Filiz 99 kültür Çeşidinde farklı BAP ve NAA dozları kullanılarak zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Zigotik embriyo eksplantından elde edilen sürgünler, b. Rejenerasyon ortamında bulunan hormon etkisinden ortaya çıkan kallus ve şişkinlikler, c. Rejenere olmuş sürgüleri köklendirmek için kallusun uzaklaştırılması, d. 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklenmiş bitki, e. İklim odasında köklendirilmiş ve çiçeklenmiş bitkileri

4.1.2 Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda TDZ içeren ve agar ile katılaştırılmış MS ortamı

kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyondan sonra tohumları 24 saat steril saf suda bekletilmiş, daha sonra zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole edilip, sürgün rejenerasyon için 0.00, 0.05, 0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.55 mg/l TDZ (6 konsantrasyon) içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Ayrıca, kontrol olarak MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün oluşum yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu ile ilgili verilerinin varyans analizi sonuçları çizelge 4.3’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre tüm ortamlarda % 100 sürgün oluşum izlendiği için varyans analizi yapılmamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında sırasıyla 0.01 ve 0.05 düzeyinde önemli farklılık izlenmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından çeşitler arasında 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu ile ortamlar × çeşitler interaksyonu arasında 0.05 düzeyinde farklılık meydana geldiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	6	2.15	5.33**	14.91	2.52*
Çeşitler	1	6.09	15.05**	138.84	23.46**
Ortamlar×Çeşitler	6	0.95	2.35*	18.93	3.20*
Hata	28	0.40		5.91	
Genel Toplam	41				

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmıştır. Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4 de verilmiştir.

Her iki çeşidinin zigotik embriyo eksplantından yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir.

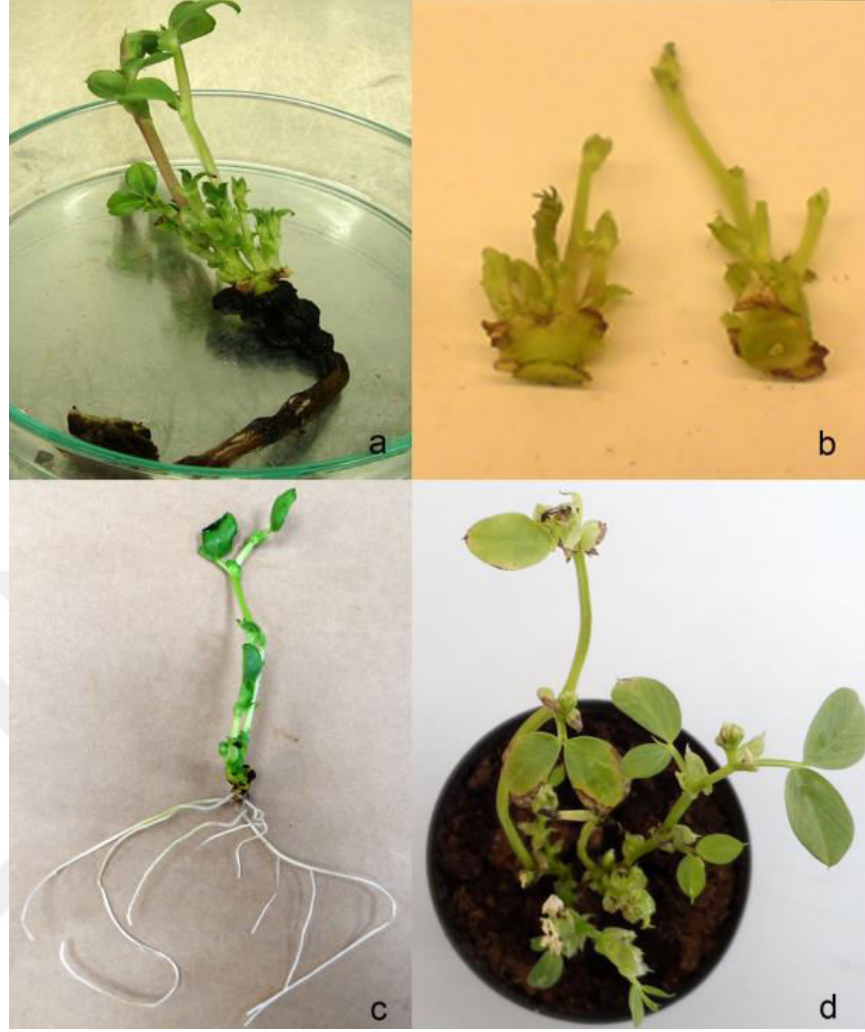
Filiz 99 çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı 3.00 – 5.33 adet arasında ve Eresen 87 çeşidinde ise 2.00 – 3.30 adet arasında değişmiştir. Filiz 99 çeşidinde en fazla sürgün 0.15 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.2.a). Köklendirmeden önce, rejenere olmuş sürgün tabanlarında bulunan deforme ve nekroz kitle bistüri yardımı ile sürgünlerden uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.2.a,b). Sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir (Şekil 4.2c). Eresen 87 çeşidinde ise en fazla sürgün 0.55 mg/l TDZ içeren ortamda izlenmiştir. Her iki çeşidine ait köklendirilmiş sürgünleri Materyal ve Yöntem’de anlatıldığı gibi saksılara şaşırtılmış ve seraya aktarılmıştır (Şekil 4.2.d).

Filiz 99 çeşidinde eksplant başına sürgün uzunluğu 1.88 – 4.05 cm arasında ve Eresen 87 çeşidinde 2.70– 10.03 cm arasında değişmiştir. Her iki çeşidinde en uzun sürgün 0.05 mg/l TDZ içeren MS ortamdan elde edilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı TDZ dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi analizi sonuçları

TDZ (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)*	
	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
0.05	100.00	100.00	3.00 bcd	2.33 cd	4.05 cde	10.03 a
0.15	100.00	100.00	5.33 a	3.00 bcd	2.61 de	8.77 ab
0.25	100.00	100.00	3.00 bcd	2.66 cd	3.22 de	6.77 abcd
0.35	100.00	100.00	3.00 bcd	2.00 d	3.33 de	8.16 abc
0.45	100.00	100.00	3.00 bcd	2.66 cd	2.88 de	5.22 bcde
0.55	100.00	100.00	4.00 b	3.30 bc	2.50 de	2.70 de
kontrol	100.00	100.00	1.50 de	1.66 de	1.88 e	4.30 bcde

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.



Şekil 4.2 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 kültür çeşidinin TDZ içeren ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Zigotik embriyo eksplantından elde edilen sürgünler, b. Rejenere olmuş sürgüleri köklendirmek için uzamış siyah kök dokusunun uzaklaştırılması, c. 1 mg/l IAA içeren MS ortamında Filiz 99 kültür çeşidinin köklenmiş hali, d. Köklenen bitkilerin saksılara aktarılması ve sera koşullarında çiçeklenmesi

4.1.3 Farklı süreler ile BAP hormonu ve priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunu

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşidinin zigotik embriyoları 1, 2, 3 ve 4 saat süre ile 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında bekletildikten sonra agar ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tüm ortamlarda %100 sürgün oluşum izlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Geri kalan iki parametre ile ilgili verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları çizelge 4.5’de verilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından BAP priming süreleri arasında her hangibir farklılık izlenmemiştir.

Benzer şekilde, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından çeşitler arasında da her hangibir farklılık izlenmemiştir.

Ancak, eksplant başına sürgün sayısı arasında her hangi etkileşim bulunmazken, eksplant başına sürgün uzunluğu açısından BAP priming süreleri × çeşitler intraksiyonu arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.5 Farklı süreler ile BAP hormonu ve priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
BAP priming süreleri	3	1.05	1.80	14.78	1.26
Çeşitler	1	0.66	1.14	17.34	1.48
BAP priming süreleri ×Çeşitler	3	0.22	0.38	43.87	3.75*
Hata	16	0.58		11.67	
Genel Toplam	23				

* $P < 0.05$,

Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar çizelge 4.6'da verilmiştir.

Her iki çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı 1.00 - 2.00 adet arasında değişmiştir (Şekil 4.3.a).

Eksplant başına sürgün uzunluğu açısından, Filiz 99 çeşidinde 2.90- 11.67 cm arasında ve Eresen 87 çeşidinde 8.00 - 11.33 cm arasında değişmiştir (Şekil 4.3.b). En uzun

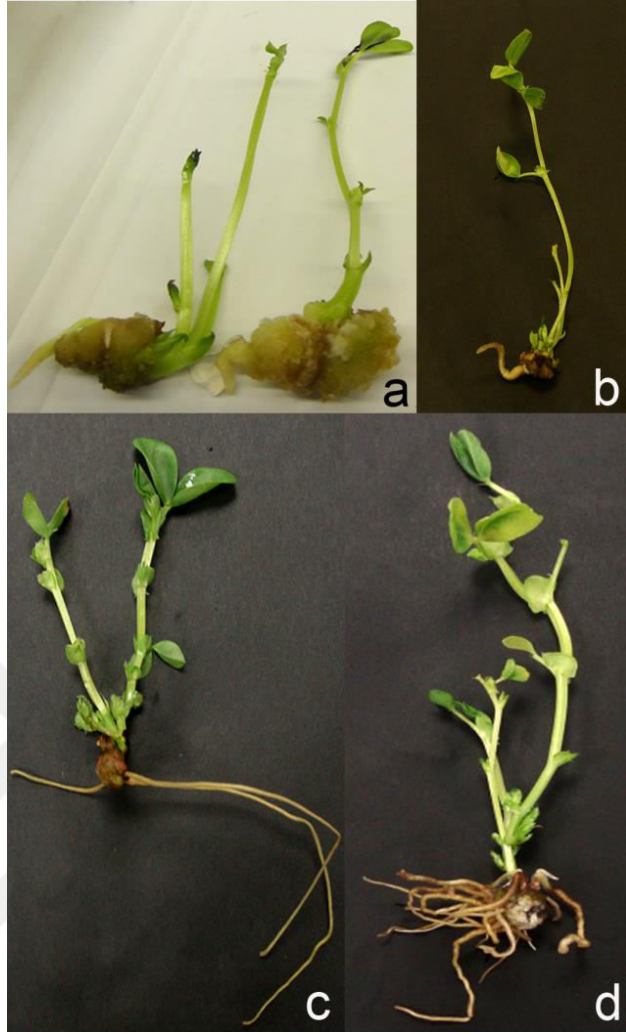
sürgün Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde sırasıyla 2 saat ve 3 saat süre ile 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında priming ile elde edilmiştir.

Üç (3) saat 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamda priming yapılmış embriyolardan gelişen bitkilerde uzun, ince ve az sayıda kök oluşurken (Şekil 4.3.c) bu kökler 1 saat 100 mg/l BAP içeren sıvı MS de bekletilmiş embriyolardan gelişen bitkilerde daha fazla, kalın ve kısa kökleri oluşmuştur (Şekil 4.3.d)

Çizelge 4.6 Farklı süreler ile BAP hormonu ve priming yapılan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi analizi sonuçları

100 mg/l BAP ile priming süreleri (saat)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)*	
	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
1saat	100.00	100.00	1.66	1.00	9.00 ab	8.00 ab
2saat	100.00	100.00	1.00	1.00	11.67 a	10.00 a
3saat	100.00	100.00	1.66	1.00	2.90 b	11.33 a
4saat	100.00	100.00	2.00	2.00	7.63 ab	8.66 ab

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.



Şekil 4.3 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 kültür çeşidinin BAP hormonu ile priming yapılmış zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Baklanın (sol) Filiz 99 ve (sağ) Eresen 87 çeşidine ait zigotik embriyo eksplantından elde edilen sürgünler, b. 2 saat süre ile 100 mg/l BAP sıvı MS ortamında priming sonucu Filiz 99 çeşidinin embriyo üzerinde gelişen yaklaşık 11 cm uzunlukta sürgünler, c. 3 saat süre ile 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında priming sonucu embriyolardan elde edilen sürgünler üzerinde gelişen kök oluşumu, d. 1 saat süre ile 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında priming sonucu embriyoları üzerinde rejenere olan sürgünler üzerinde kök oluşumu

4.1.4 100 mg/l sıvı BAP hormonu ile 0, 12, 24 saat süre priming den sonra farklı konsantrasyonda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşidinin zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole ettikten sonra 0 (priming yapmadan - kontrol), 12 ve 24 saat 100 mg/l BAP içeren sıvı MS ortamında priming yapılmıştır. Daha sonra sürgün rejenerasyonu için eksplantları

0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 mg/l TDZ (6 konsantrasyon) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Denemede MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Dört hafta sonra bitkileri köklendirmek amacıyla 1 mg/l IAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Ardından köklenen bitkilerin dış koşullara adaptasyonunu sağlamak için 1:1 oranında torf ve toprak içeren saksılar kullanılmıştır.

Priming yapmadan kültüre alınan eksplantların (kontrol) farklı konsantrasyonlarda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması

Priming yapmadan farklı konsantrasyonlarda embriyo eksplantların TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması sonucu elde edilen verilerin varyans analizi yapılmıştır. her iki çeşidinde sürgün oluşum yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğuna ait parametreler incelenmiştir ve ortamlar ve çeşitler arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde ve çeşitler arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde gözlenmiştir. Ancak eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından, ortamlar × çeşitler interaksyonu açısından her iki (Filiz 99 ve Eresen 87) çeşidinde 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir. Ortamlar ve çeşitler arasındaki farklılığın ise sırasıyla 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Priming yapmadan (kontrol) farklı konsantrasyonda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması sonucu iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D	Sürgün oluşturan yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	6	85.71	0.90	3.09	2.32	25.40	1.84	1.85	3.12*
Çeşitler	1	152.38	1.60	0.09	0.07	0.19	0.01	14.88	25.00**
Ortamlar×Çeşitler	6	85.71	0.90	1.31	0.98	4.24	0.30	1.71	2.88*
Hata	28	95.23		1.33		13.73		0.59	
Genel Toplam	41								

*P<0.05, **P<0.01

Her 2 çeşit ve her 4 parametrelerle ilgili ortalamalar çizelge 4.8’de vermiştir.

Her iki çeşidinde %80 - 100 arasında sürgün oluşum izlenmiştir.

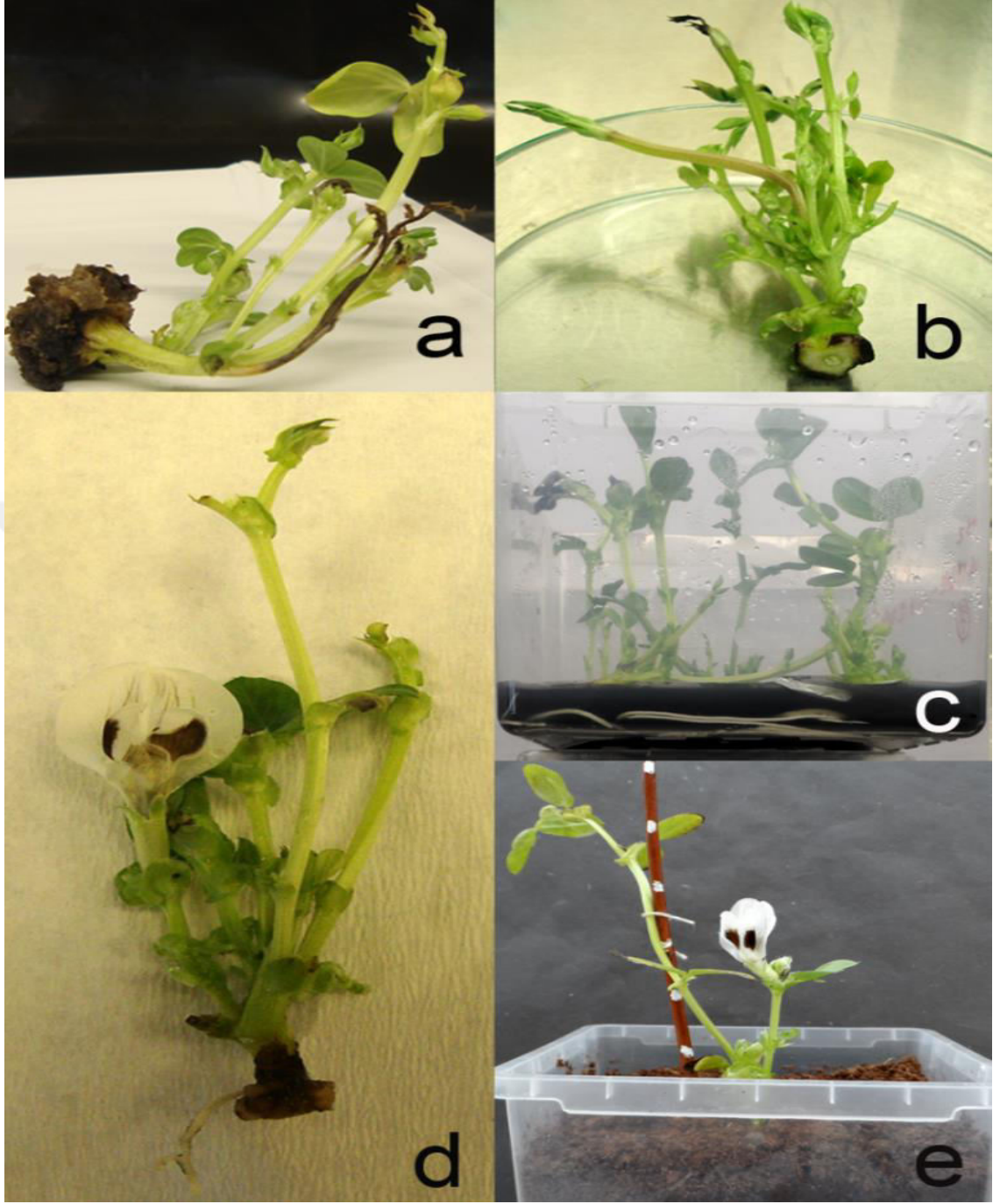
Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu her iki çeşitte sırasıyla 1.33 - 4.00 adet ve 2.94 - 9.83 cm arasında değişmektedir (Şekil 4.4.a). Rejenerasyon ortamda bulunan hormon etkisinden dolayı ortaya çıkan siyah ve ölmüş dokular sürgünlerden uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.4.a,b) ve daha sonra bitkileri köklendirmek amacıyla 1mg/l IAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamına kültüre alınmıştır (Şekil 4.4 c). Üç hafta sonra köklenen bitkiler ve ayrıca, köklenme ortamında çiçeklenen bitkiler doğrudan 1:1 oranda torf ile toprak karışımı içeren saksılara şaşırtılmıştır (Şekil 4.4. d,e).

Eksplant başına yan sürgün sayısı Filiz 99 çeşidinde 0.00 – 2.66 adet arasında değişmekteyken Eresen 87 çeşidinde 0.00 - 1.33 adet arasında değişmiştir. En fazla yan sürgün sayısı Filiz 99 çeşidine ait 0.20 mg/l TDZ içeren MS ortamında raslanmıştır.

Çizelge 4.8 Priming yapmadan (kontrol) farklı konsantrasyonda TDZ İçeren MS ortamına kültüre alınması sonucu iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunu

TDZ (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)*	
	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
0.10	100.00	100.00	2.33	1.66	7.11	6.00	0.66 c	0.33 c
0.20	100.00	100.00	2.33	2.66	8.11	6.55	2.66 a	1.33 abc
0.30	100.00	100.00	4.00	2.30	3.12	6.26	0.00 c	0.66 bc
0.40	100.00	100.00	2.30	3.30	4.22	5.71	1.33 abc	0.33 c
0.50	100.00	93.33	3.33	4.00	2.94	3.33	2.33 a	0.33 c
0.60	100.00	80.00	2.33	3.00	5.00	4.60	2.00 ab	0.00 c
kontrol	100.00	100.00	1.33	1.66	1.83	3.83	2.33 a	0.00 c

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.



Şekil 4.4 Baklanın Eresen 87 kültür çeşidinin BAP hormonu ile priming yapmadan ve TDZ içeren MS ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Bakla zigotik embriyo eksplantından elde edilen sürgünler ve rejenerasyon ortamında taban kısmında bulunan hormon etkisinden dolayı ortaya çıkan siyah ve ölmüş dokular/kitleri, b. Rejenerasyon esnasında sürgünlerin taban kısmında bulunan siyah ve ölmüş dokuların/kitlerin sürgünlerden uzaklaştırması, c. 1mg/l IAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamında köklenmiş bitkiler, d. Köklenme ortamında hem kök ve hem çiçeklenen bitki, e. Köklenmiş ve çiçek oluşturmuş bitkilerin doğrudan saksılara şaşırtılması

Sıvı 100 mg/l BAP Hormonu İle 12 Saat Priming Yaptıktan Sonra Farklı Oranda TDZ İçeren MS Ortamında Kültüre Alınması

İkinci uygulamada Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin embriyo eksplantı sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu Süspansiyonuyla 12 saat priming yaptıktan sonra farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınmıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu, eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde farklılık izlenirken, eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu, eksplant başına yan sürgün sayısı ile Ortamlar × Çeşitler interaksyonlarında herhangi bir etkileşim görülmemiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP Hormonu süspansiyonu ile 12 saat priming yaptıktan sonra farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	6	1.82	1.56	5.08	1.19	1.48	1.03
Çeşitler	1	6.09	5.22*	4.27	1.00	1.52	1.06
Ortamlar×Çeşitler	6	1.65	1.41	5.75	1.35	1.24	0.88
Hata	28	1.16		4.24		1.42	
Genel Toplam	41						

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Çizelge 4.10. sonuçlarına göre, eksplant başına sürgün sayısı açısından Eresen 87 çeşidinde en fazla 3.47 adet sürgün ve Filiz 99 çeşidinde 2.71 sürgün elde etmiştir.

Her iki çeşidinde %100 sürgün oluşum izlenmiştir.

Ayrıca Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde sırasıyla eksplant başına 2.71 ve 3.47 adet sürgün, ortalama eksplant başına 4.32 ve 3.68 cm sürgün uzunluğu, eksplant başına 1.19 ve 1.57 adet yan sürgün elde edilmiştir.

Çizelge 4.10 Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile embriyo eksplantların 12 saat priming yaptıktan sonra farklı oranda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınan iki bakla kültür çeşidinin sürgün rejenerasyonunun etkisine ait T testi analizi sonuçları

Çeşitler	Sürgün oluşum yüzdesi (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)
Filiz 99	100	2.71	4.32	1.19
Eresen 87	100	3.47*	3.68	1.57

Aynı sütünde * işaretle gösterilen ortalamalar arasında t testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.

Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile 24 saat priming yaptıktan sonra farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması

Sıvı olarak 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile 24 saat priming yaptıktan sonra, her iki (Filiz 99 ve Eresen 87) çeşidinin farklı parametrelerinden elde edilen verilerin varyans analizi yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Benzer şekilde eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu, eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından çeşitler arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu parametreleri bakımından ortamlar × çeşitler interaksiyonu arasında herhangi bir etkileşim

izlenmezken, eksplant başına yan sürgün sayısı ile ortamlar × çeşitler interaksyonu arasında 0.05 düzeyinde farklılık görülmüştür (Çizelge 4. 11).

Çizelge 4.11 Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile 24 saat priming yaptıktan sonra iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantların farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması ile sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	6	2.22	2.77	2.27	0.51	0.15	0.09
Çeşitler	1	0.01	0.01	0.16	0.03	2.38	1.44
Ortamlar×Çeşitler	6	0.67	0.83	3.21	0.73	4.38	2.66*
Hata	28	0.80		4.40		1.64	
Genel Toplam	41						

* $P < 0.05$

Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmıştır. Parametrelere ait ortalmaları ve Duncan testi sonuçları çizelge 4.12 de verilmiştir.

Filiz 99 hemde Eresen 87 çeşidinin zigotik embriyo eksplantından % 100 oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Ayrıca her iki Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde sırasıyla eksplant başına ortalama 2.00 ve 4.50 adet sürgün ve ortalama 2.11 ve 5.47 cm sürgün uzunluğu elde edilmiştir.

Filiz 99 çeşidinde eksplant başına yan sürgün sayısı 0.66 – 3.33 adet arasında ve Eresen 87 çeşidinde ise 0.30 – 3.00 adet arasında değişmiştir. Filiz 99 çeşidinde en fazla sürgün oluşum 0.60 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Eresen 87 çeşidinde ise en fazla sürgün sayısı kontrol ortamında izlenmiştir.

Çizelge 4.12 Sıvı olarak hazırlanmış 100 mg/l BAP hormonu süspansiyon ile 24 saat priming yaptıktan sonra iki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantların farklı oranda TDZ içeren MS ortamına kültüre alınması ile sürgün rejenerasyonunun etkisine ait Duncan testi sonuçları

TDZ (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün (adet)*	
	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
0.10	100.00	100.00	4.00	4.00	3.19	2.32	0.66 bc	2.66 abc
0.20	100.00	100.00	3.00	3.00	2.99	4.33	2.00 bc	1.60 abc
0.30	100.00	100.00	3.00	3.66	2.11	2.30	1.30abc	2.30 abc
0.40	100.00	100.00	3.00	3.00	5.47	2.44	1.30 bc	2.60 abc
0.50	100.00	100.00	2.66	3.66	3.21	4.18	1.60 bc	2.30 abc
0.60	100.00	100.00	4.50	4.00	2.87	3.38	3.30 a	0.30 c
Kontro 1	100.00	100.00	3.00	2.00	3.49	3.50	1.33 bc	3.00 ab

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.

4.1.5 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriying yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması

Her iki çeşidinden 24 saat steril saf su ile priming yapılmış ardından bistüri yardımıyla baklalardan kotiledonlar uzaklaştırılmış ve zigotik embriyoları izole edilmiştir. Daha sonra Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı konsantrasyonda BAP içeren MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyon için 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00 mg/l BAP (9 konsantrasyonun) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Üç hafta sonra gelişen sürgünler ana gövdeden bistüri yardımıyla steril kabin içinde ayrılıp 1mg/l IAA içeren MS ortamına köklendirmek için aktarılmıştır (şekil 4.5c,d).

Eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ile ilgili verilerinin varyans analizi sonuçları çizelge 4.13'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre, eksplant başına sürgün sayısı ile ortamlar arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılık izlenmiştir. Ancak, eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu ile çeşitler arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant başına sürgün uzunluğu bakımından ortamlar × çeşitler interaksyonu arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Çizelge 4.13 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınmasının sürgün rejenerasyonuna etkisi ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	8	9.33	2.21*	2.06	0.93
Çeşitler	1	7.40	1.75	6.73	3.06
Ortamlar×Çeşitler	8	7.65	1.81	3.63	1.65
Hata	36	4.22		2.20	
Genel Toplam	53				

* $P < 0.05$

Eksplant başına sürgün sayısı 5.50 – 10.00 adet arasında değişmektedir. En fazla sürgün oluşum 5.00 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmişken en az sürgün sayısı ise 1.00 mg/l BAP içeren ortamda izlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması sonucu sürgün rejenerasyonuna ait Duncan testi sonuçları

Bap (mg/l)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)
1.00	5.50 cd
2.00	7.66 abc
3.00	8.66 abc
4.00	6.50 bc
5.00	10.00 a
6.00	9.16 ab
7.00	8.33 abc
8.00	8.16 abc
9.00	6.00 c

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür

Çizelge 4.15 verilerine göre, her iki çeşidinde %100 sürgün oluşum izlenmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitleri arasında 5.70- 10.33 adet arasında değişmiştir (Şekil 4.5.a).

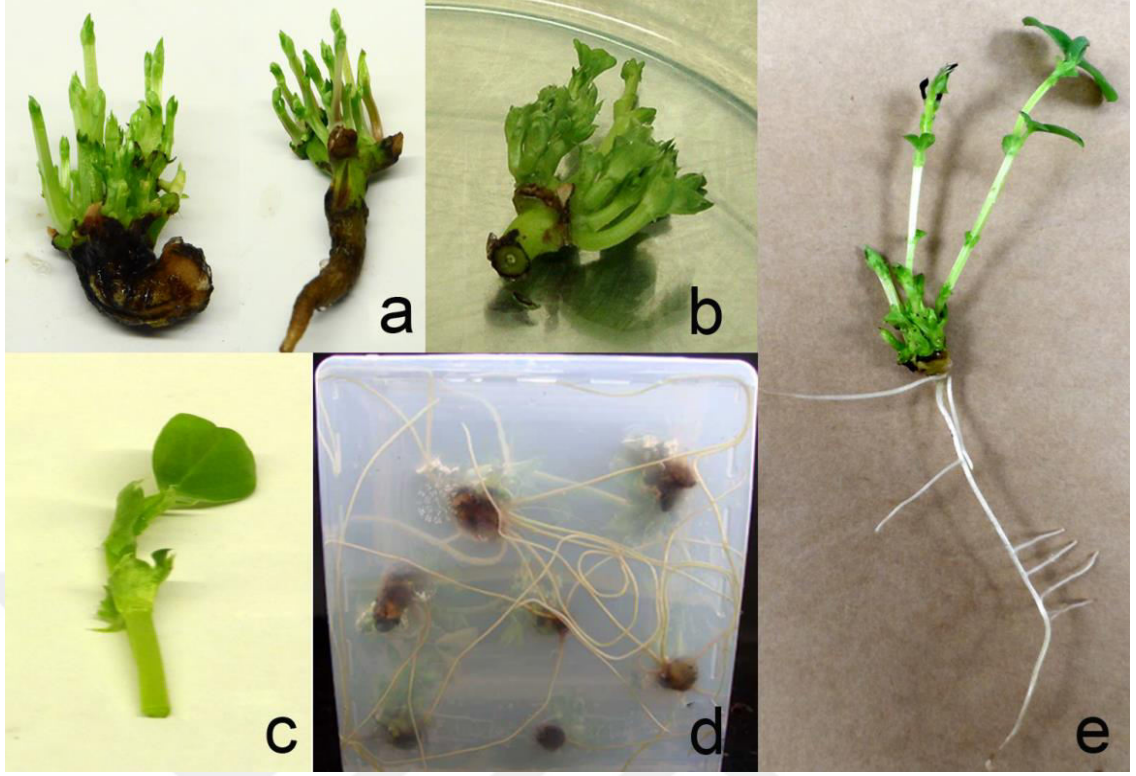
Ayrıca, eksplant başına sürgün uzunluğu her iki çeşitte 1.60- 5.95 cm arasında izlenmiştir.

Her iki çeşidine ait köklenmiş sürgünleri (bitkileri) dış koşullarına alıştırmak amacıyla 1:1 toprak ve torf içeren saksılara şaşırtılarak Materyal & Yöntemde anlatıldığı gibi seraya şaşırtılmıştır (Şekil 4.5.e)

Çizelge 4.15 İki bakla kültür çeşidinin embriyo eksplantın 24 saat hidropriming yaptıktan sonra farklı oranda BAP içeren MS ortamına kültüre alınması sonucu sürgün rejenerasyonuna etkisi ait Duncan testi sonuçları

Bap (mg/l)	Sürgün oluşum yüzdesi (%) ^{ös}		Eksplant başına sürgün sayısı (adet) ^{ös}		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm) ^{ös}	
	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
1	100.00	100.00	6.66	5.30	2.63	1.75
2	100.00	100.00	8.66	6.70	2.55	3.24
3	100.00	100.00	10.33	7.00	2.44	2.12
4	100.00	100.00	7.00	6.00	2.61	2.30
5	100.00	100.00	9.70	10.30	1.75	2.58
6	100.00	100.00	9.30	9.00	1.70	1.64
7	100.00	100.00	9.00	7.70	2.12	2.54
8	100.00	100.00	10.00	6.30	1.74	3.37
9	100.00	100.00	5.70	6.30	1.60	5.95

^{ös} Aynı sütündeki veriler arasında önemsiz farklılık görülmüştür



Şekil 4.5 Baklanın Eresen 87 kültür çeşidinin BAP içeren MS ortamlarında zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Bakla zigotik embriyo eksplantından elde edilen sürgünler, b. ve c. Sürgün rejenerasyon ortamlarından ortaya çıkan siyah ve ölü dokuların sürgünlerden uzaklaştırılması ve ayrılması, d. Tek sürgünlerin 1mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirmeye alınması, e. Köklenen ve ayrıca tekrardan sürgün oluşturan bitkileri

4.1.6 Farklı BAP + 0.01 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP – NAA içeren agar ile katılaştırılmış MS ortamı kullanılmıştır. Her iki çeşidinde zigotik embriyoları steril kabin içerisinde izole edilip, sürgün rejenerasyon için 0.01 mg/l NAA – 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00 mg/l BAP (6 kombinasyon) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı ile ilgili verilerinin varyans analizi sonuçları (Çizelge 4.16)'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre her her iki çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı parametreleri bakımından ortamlar arasında her hangi farklılığına rastlanamamıştır.

Aynı şekilde eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından varyans analizi sonucu ortamlar × çeşitler etkileşimi bulunmamıştır.

Çizelge 4.16 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	5	3.22	0.98	2.39	0.96	3.31	0.82
Çeşitler	1	3.36	1.02	1.34	0.54	1.00	0.25
Ortamlar×Çeşitler	5	1.36	0.41	1.28	0.51	2.80	0.70
Hata	24	3.27		2.49		4.00	
Genel Toplam	35						

Ortalamalarla ilgili Duncan analizi sonuçları çizelge 4.17 de verilmiştir.

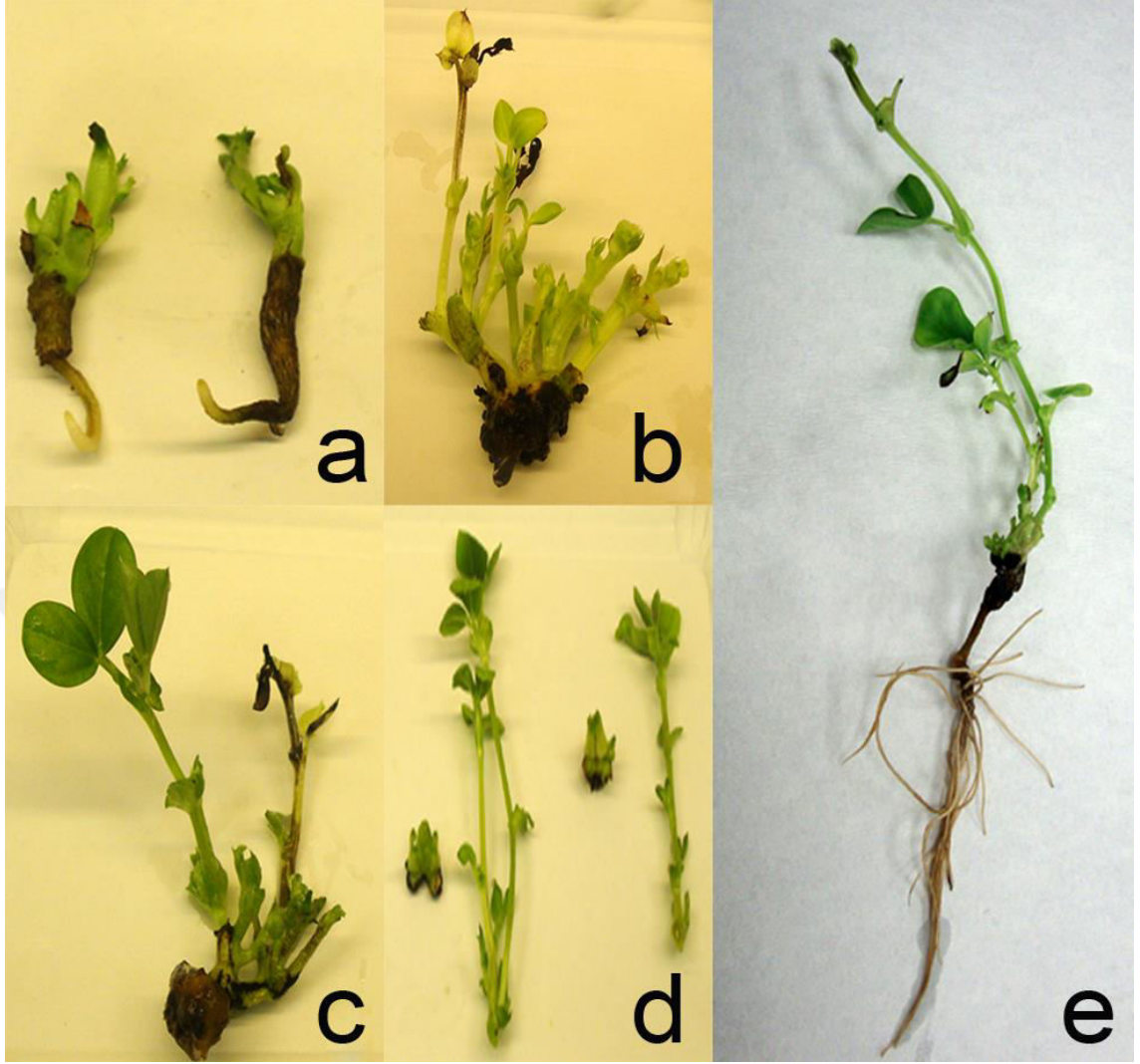
Çizelge’de gösterdiği gibi her iki çeşidinde % 100 sürgün oluşum izlenmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı her iki Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde 3.33- 5.66 adet arasında değişmiştir (Şekil 4.6.a,b). Her iki çeşidin zigotik embriyo eksplantları bulunduğu rejenerasyon ortamlarında radikula bölgelerinde belirgin kararmış kallus/kitle oluşumu izlenmiştir (Şekil 4.6.b,c). Kallus ve nekroz olmuş dokular sürgünlerden uzaklaştırılmış ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirmeye alınmıştır (Şekil 4.6.d,e).

Sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı sırasıyla 2.47 - 4.95 cm arasında ve 0.33- 4.00 adet arasında değişmiştir.

Çizelge 4.17 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait ortalama çizelgesi

Hormon dozları (mg/l)		Sürgün oluşum yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)	
BAP	NA A	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
1.00	0.01	100.00	100.00	5.33	5.66	3.18	3.81	1.66	0.33
2.00	0.01	100.00	100.00	5.00	5.00	3.44	2.87	4.00	2.33
3.00	0.01	100.00	100.00	3.33	5.33	2.47	3.10	1.66	2.33
4.00	0.01	100.00	100.00	4.00	4.66	3.05	4.75	3.33	1.66
5.00	0.01	100.00	100.00	3.66	3.00	4.30	3.50	2.00	2.66
6.00	0.01	100.00	100.00	3.66	5.00	4.21	4.94	1.00	2.33



Şekil 4.6 Baklanın iki kültür çeşidinin zigotik embriyo eksplantından BAP - NAA içeren ortamda bitki rejenerasyonuna etkileri

a. Filiz 99 çeşidine ait rejenerasyon olan sürgünler, b. Eresen 87 çeşidine ait rejenerasyon olan sürgünler, c. Radikula bölgesinde oluşan kallus ve şişkinlikler, d. Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidine ait Rejenerasyon olmuş sürgünlerin köklendirmek için oluşan kallus ve şişkinliklerin uzaklaştırılmış görünümü, e. 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklenmiş bitki

4.1.7 Farklı BAP + 0.02 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu için farklı dozda BAP – NAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Zigotik embriyolardan kotiledonlar izole ettikten sonra, sürgün rejenerasyon için 0.02 mg/l NAA – 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00 mg/l BAP (6 kombinasyon) içeren MS

ortamına kültüre alınmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı ile ilgili verilerinin varyans analizi sonuçları (Çizelge 4.18)'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlarına göre eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından ortamlar arasında farklılık rastlanamamıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından çeşitler arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir.

Aynı şekilde denemede kullanılan her iki çeşitte, eksplant başına sürgün sayısı, eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün sayısı bakımından ortamlar × çeşitler interaksiyonunda da herhangi bir farklılığı görülmemiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi tüm ortamlarda % 100 olduğu için varyans analizi yapılmamıştır.

Çizelge 4.18 Farklı BAP + 0.02 mg/l NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D.	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Ortamlar	5	4.80	2.50*	2.17	1.54	2.64	0.78
Çeşitler	1	2.77	1.44	0.15	0.11	1.00	0.29
Ortamlar×Çeşitler	5	0.44	0.23	0.89	0.63	3.73	1.10
Hata	24	1.91		1.40		3.38	
Genel Toplam	35						

* $P < 0.05$

Her iki çeşite ait eksplant başına sürgün sayısı ortalama 3.16 – 5.50 adet arasında değişmektedir (Şekil 4.7.a). En fazla sürgün oluşum 1.00 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA

içeren ortamdan elde edilmişken en az sürgün sayısı ise 6.00 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA içeren ortamda izlenmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Farklı BAP ve NAA içeren MS ortamında iki bakla kültür çeşidinin eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan testi analizi sonuçları

Hormon dozları (mg/l)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*	
BAP	NAA		
1.00	0.02	5.50	a
2.00	0.02	4.00	abc
3.00	0.02	3.66	bc
4.00	0.02	3.66	bc
5.00	0.02	5.00	ab
6.00	0.02	3.16	c

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür

Ortamlar ile ilgili sonuçlar çizelge 4.20 de verilmiştir.

Filiz 99 hemde Eresen 87 çeşidinin zigotik embriyo eksplantından %100 oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı her iki çeşitte 3.00- 5.66 adet arasında değişmektedir (Şekil 4.7.a).

Sürgünler bulunduğu rejenerasyon ortamlarında ve köklendirme ortamına aktarmadan radikula bölgesinde şişme görülmüş ve daha sonra kökler ortaya çıkmıştır (Şekil 4.7.b).

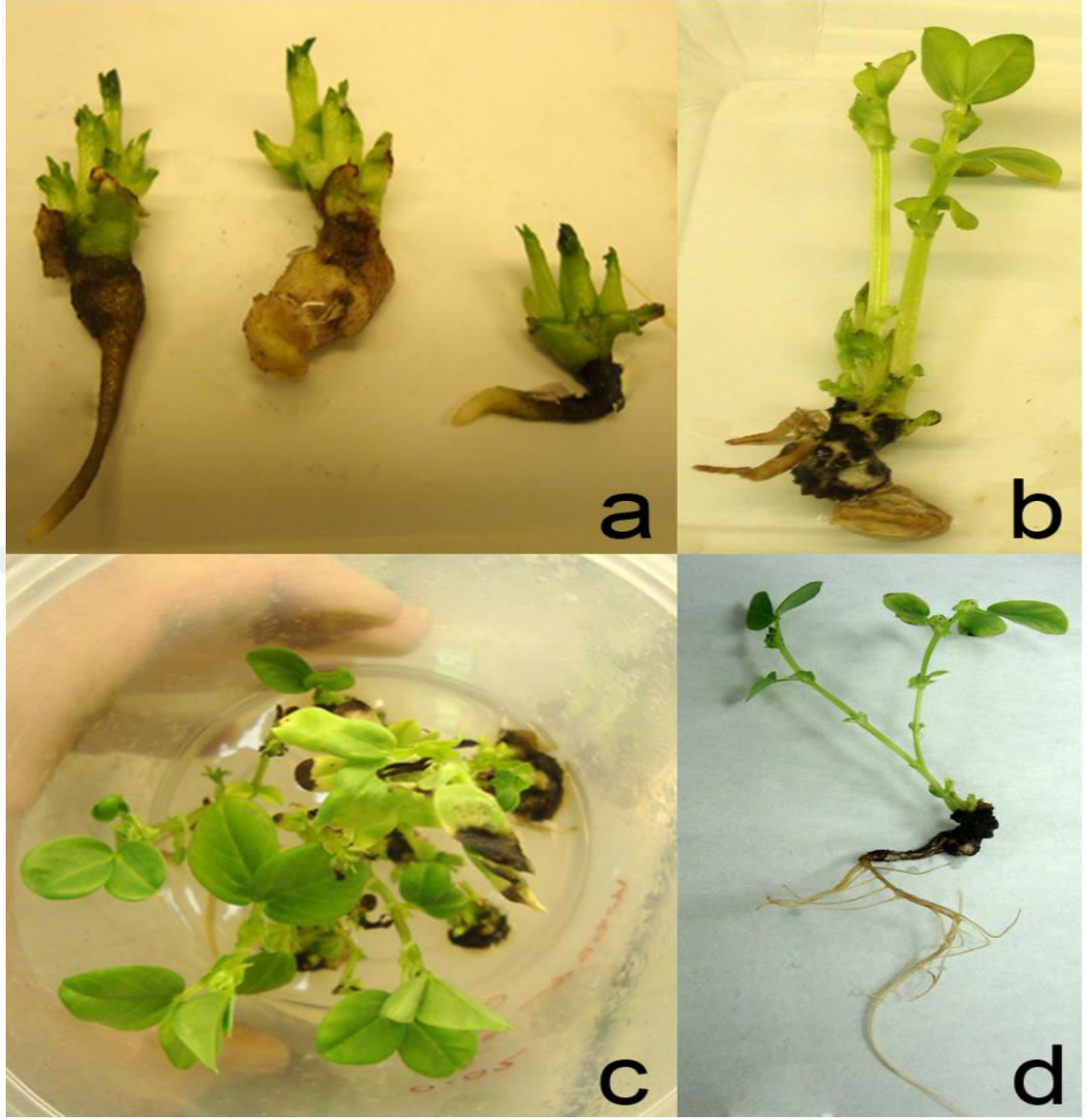
Ayrıca eksplant başına sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün açısından sırasıyla, 1.82 - 3.88 cm ve 0.33 - 3.67 adet arasında her iki Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde değişmiştir.

Her iki çeşide ait olan bitkiler bulunduğu rejenerasyon ortamlarında büyüyerek kökleri geliştirilmiştir (Şekil 4.7.c,d).

Çizelge 4.20 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait ortalama çizelgesi

Hormon dozları (mg/l)		Sürgün oluşum üzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)*		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)	
BAP	NAA	Filiz 99	Eresen87	Filiz99	Eresen87	Filiz99	Eresen87	Filiz 99	Eresen87
1.00	0.02	100.00	100.00	5.33	5.66	3.39	3.81	1.66	0.333
2.00	0.02	100.00	100.00	4.33	3.66	3.71	2.20	2.00	3.33
3.00	0.02	100.00	100.00	4.00	3.33	1.82	2.26	3.33	1.33
4.00	0.02	100.00	100.00	4.33	3.00	3.11	2.55	3.67	2.00
5.00	0.02	100.00	100.00	5.33	4.66	2.94	3.00	1.66	3.33
6.00	0.02	100.00	100.00	3.33	3.00	3.54	3.88	2.00	2.00

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen veriler arasında Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür



Şekil 4.7 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 kültür çeşidinin BAP- NAA içeren MS ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerine ait embriyo ekseninden elde edilen sürgünler, b. Sürgün rejenerasyonunda bulunan sürgünlerin taban kısmında oluşan kallus ve kökler, c. Rejenerasyon ortamında gelişen ve kök oluşturan bitkiler, d. Köklenmiş ve olgun bitki

4.1.8 Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate konsantrasyonlarının Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin embriyoları embriyoları izole ettikten sonra 1.00 mg/l BAP + 0.10 NAA ve 100 mg/l L-Glutamine ile 200 mg/l kasein Hidrolizat (KH)

içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Üç hafta sonra sürgünleri 1 mg/l NAA + 2g/l aktif kömür içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Daha sonra köklenen bitkileri dış koşullara alıştırmak amacıyla 1:1 torf ile toprak karışım içeren saksılara aktarılmış kontrollü sera koşullarda adaptasyon sağlanmıştır. Dış şartlara alışan bitkilerde çiçek ve tohum bağlanması görülmüştür.

Eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, eksplant başına yan sürgün sayısı ve kök uzunluğu ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları çizelge 4.21’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre eksplant başına yan sürgün sayısı ile eksplant başına kök uzunluğu karakterleri bakımından çeşitler arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılık izlenmiştir.

Her iki Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu açısından önemli bir farklılık görülmemiştir raslanmamıştır.

Çizelge 4.21 Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate dozlarında iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu etkisine ait varyans analizi sonuçları

V. K.	S.D	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)		Eksplant başına yan sürgün sayısı (adet)		Bitki başına kök uzunluğu (cm)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Çeşitler	1	0.88	1.69	0.17	1.71	0.88	10.79*	4.50	8.16*
Hata	4	0.52		0.09		0.08		0.55	
Genel Toplam	5								

* $P < 0.05$

Etkileşim düzeyini tespit etmek amacıyla T testi yapılmıştır. T testi sonuçları çizelge 4.22 de verilmiştir.

Filiz 99 hemde Eresen 87 çeşidinin zigotik embriyo eksplantından % 100 oranda sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Filiz 99 çeşidinde en fazla 6.00 adet ve Eresen 87 çeşidinde 5.03 adet sürgün sayılmıştır (şekil 4.8a). kök bölgesinde oluşan siyah dokular ve kitleler uzaklaştırılmış, sürgünleri 1 mg/l NAA + 2g/l aktif kömür içeren MS ortamına köklendirme amacıyla kültüre alınmıştır (Şekil 4.8.b,c).

Çeşitler arasında en fazla 4.20 adet yan sürgün Filiz 99 çeşidine aitken bu sayı Eresen 87 çeşidinde 3.43 adet olarak sayılmıştır.

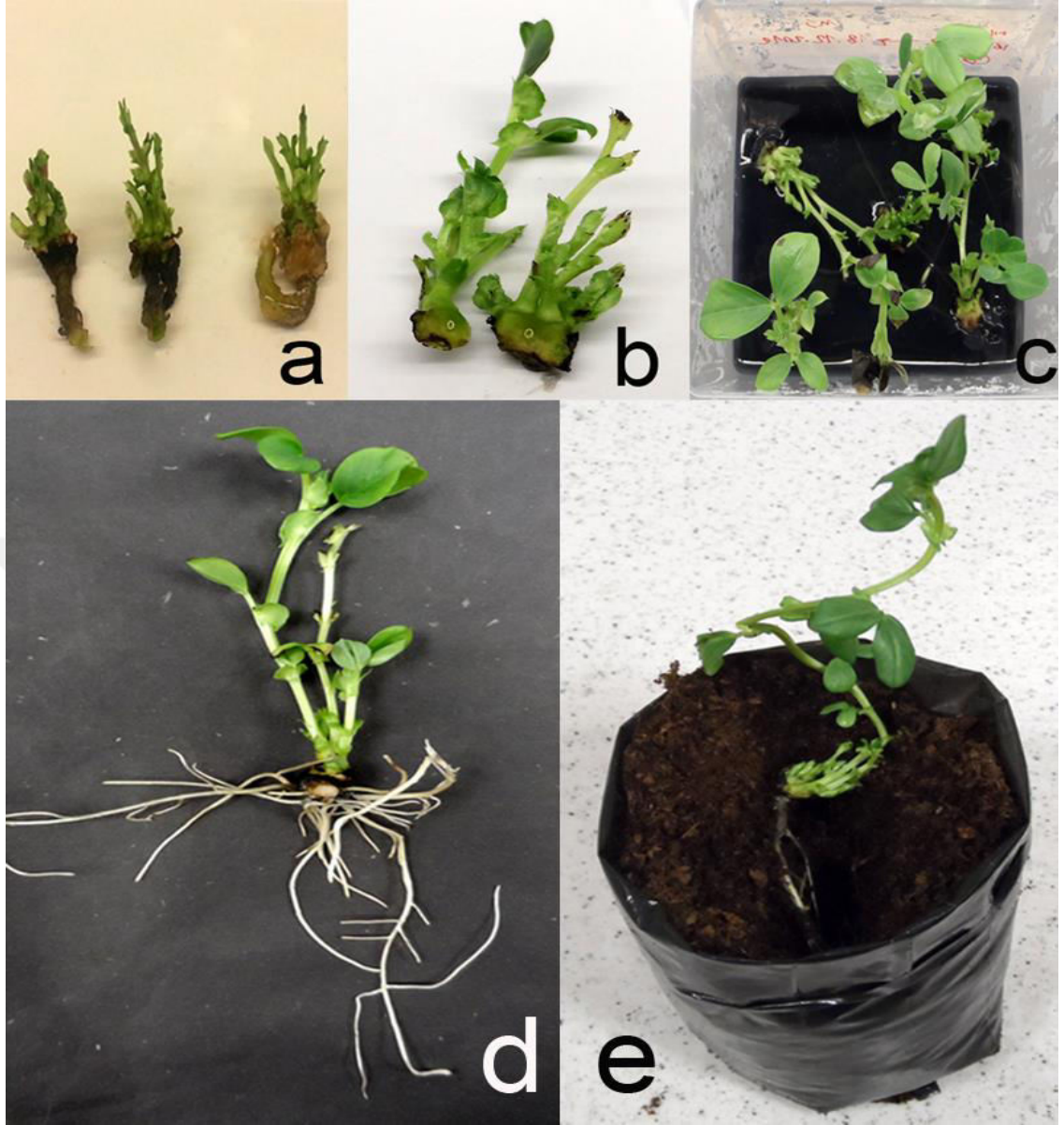
Eresen 87 çeşidinde en uzun kök 14.63 cm bulunurken bu rakam Filiz 99 çeşidinde 12.90 cm'e düşmektedir. Köklendirme ortamlarının olumlu etkisinden dolayı köklenen bitkiler üzerinde tekrar sürgün oluşum da izlenmiştir (Şekil 4.8.d).

Filiz 99 çeşidinde en uzun sürgün 2.63 ve Eresen 87 çeşidinde ise 3.00 cm olarak sayılmıştır. Her iki çeşide ait olan köklendirilmiş sürgünler Materyel ve Yöntemde anlatıldığı gibi saksılara şaşırtılmış ve seraya aktarılmıştır (Şekil 4.8.e).

Çizelge 4.22 Farklı BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate dozlarında iki kültür çeşidinin embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu etkisine ait T test analizi sonuçları

Çeşitler	Sürgün oluşum yüzdesi (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)	Eksplant başına sürgün uzunluğu (cm)	Eksplant başına yan sürgün (adet)*	Bitki başına kök uzunluğu (cm)*
Filiz 99	100	6.00	2.63	4.20 *	12.90
Eresen 87	100	5.03	3.00	3.43	14.63 *

Aynı sütünde * işaretle gösterilen ortalamalar arasında t testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde farklılığı görülmüştür.



Şekil 4.8 Filiz 99 ve Eresen 87 bakla kültür bakla çeşitlerinin BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate içeren ortamda zigotik embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu

a. Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin zigotik embriyo eksplantından elde edilen sürgünler, b. Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin kök bölgesinde oluşan nekrozlu kitleleri ve şişmelerin uzaklaştırılması, c. 1 mg/l NAA + 2g/l aktif kömür içeren MS köklendirme ortamında, d. köklenen bitkiler üzerinde tekrar sürgün oluşmu, e. Köklenen bitkilerin 1:1 oranda torf ile toprak karışım içeren saksılara şaşırtılması

4.2 *In vitro*'da Geliştirilen Bitkiciklerin Dış Şartlarına Alıştırılması

Doku kültüründe yetişen ve köklenen bitkilerin dış şartlara alıştıırılması amacıyla, ilk önce Magentalarda bulunan bitkiler dikkatlice alınıp, musluk suyu altında yıkanarak köklerinde bulunan agar ile katılaştırılmış besin ortamı uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.9.a). Daha sonra, yüksek nemli ortamda gelişen bitkilerin dış koşullarında beklenen transpirasyon nedeniyle oluşan şoku önlemek amacıyla, bitkileri 20 - 30 dk saf su içerisinde bekletilmiştir (Şekil 4.9b). Köklendirilen ve boyları 10-15 cm arasında değişen bitkiler birer adet olacak şekilde (1) Tarla Toprağı (% 53.00 su ile doyma noktası, EC 1.24 ds/m, toplam tuz % 0.04, su ile doymuş toprakta pH 7.56, kireç % 5.18, fosfor 13.73 kg/da, potasyum 174.67 kg/da, organik madde % 1.34, toplam azot % 0.07 ve organik karbon % 0.78), (2) Torf (pH 6.00'de 6.00, mikro elementler olarak 2190 mg/kg demir, 14 mg/kg bakır, 40 mg/kg manganez, 35 mg/kg çinko ve makro elementler olarak % 1.186 azot, % 0.215 fosfor, 1810 mg/kg potasyum, 2819 mg/kg kalsiyum, 1605 mg/kg magnezyum, 215 mg/kg sodyum) ve (3) tarla toprağı ile Torf (1:1) oranda içeren 13×20 cm'lik $0,910 \text{ g/cm}^3$ yoğunlukta olan alt taraf delikli siyah fide tüplerine ve gerekir ise 14.5×13 cm'lik saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.9.c). Yukarda belirtilmiş her3 toprak karışımında 250 adet bitki olmak üzere; 3 farklı karışıma bitkiler şaşırtılmıştır.

Aktarılan bitkilerin büyümelerini ölçmek amacıyla, üzerleri 2 cm aralıklar ile işaretlenmiş çubuklarda dikilmiştir. (Çubuklar meşe ağacından 30 cm'lik dalları keserek, $\frac{1}{2}$ saat etüvde 80°C de tutularak hazırlanmıştır). Saksılara aktarılabacak olan, doku kültürü ile elde edilmiş bitkilerin nemini muhafaza etmeleri için, üzerlerine örtülecek olan şeffaf polietilen poşetlerin (10×25 cm'lik $0,81 \text{ g/cm}^3$ yoğunlukta) içine 25 - 30 ml saf su sprey ile sıkılmıştır (Şekil 4.9.d).

Uygulanan denemelerde, bitkilere verilen su miktarları düzenlenerek her iki gün de bir kez olmak üzere 50 ml su verilmiştir. Her saksı ve fide tüpü örten poşetleri her 5 günde bir olacak şekilde delinerek toplam 25 gün sonra tamamen kaldırarak bitkileri yavaş yavaş dış koşullarına adapted edilmiştir (Şekil 4.9.e).

Daha sonraki aşamalarda bitkiler, iyice gelişmesi ve tohum elde edilmesi için; nem (nispi nem oranı % 69 ± 2), sıcaklık ($16 \pm 2^\circ\text{C}$) ve 16 saat ışık fotoperiyodu (20000 luks) altında kontrol edilen seralara aktarılmıştır (şekil 4.9f).

Sonuçlara incelediğinde, tarla toprağında olan bitkiler bir hafta sonra kararıp ölmüşlerdir. Tarla toprağının yüksek su ile doyma (% 53.00), EC değeri (1.24 ds/m), kireç (% 5.18), fosfor (13.73 kg/da), potasyum (174.67 kg/da), alakalı olması (pH 7.56), düşük oranda organik madde içermesi (% 1.34), azot (% 0.07) ve organik karbon (% 0.78)'nun az miktarda bulunması, bakla bitkilerinin kök geliştirilmesini engellenmiştir. Ayrıca, kullandığı toprak fazla miktarda su tutup, bitki gelişmelerine engel olarak bitki köklerinin çürümesine sebep olmuştur. Netice olarak bitki köklerinde başlayan nekroz artarak bitkilerin çürümesine neden olmuştur.

Torf içeren saksılara aktarılan bitkilerde ilk 7 – 10 gün arası iyi gelişim izlenmiştir. Ancak, asidik torf (pH 6.00) ve su tutma kapasitesinin fazla olması, köklerin gelişmesini engellenmiştir. Bakla bitkisinin kök bölgesinde bulunan parenchyma (parenkima) hücreleri, hidroozmos sonucu bitki solunum sistemini engellenmiştir. Hidroozmos sonucu hücrelerin patlaması ile bitki ölümleri meydana gelmektedir. Dolayısıyla, bitki kök hücreleri torfta bulunan bitki besin elementlerini alamayarak, bitkinin büyümesini durdurmasına ve köklerde kararmalara neden olmuştur. Köklerin kararması ile besin maddesi iletiminin gerçekleşmemesi sonucu bitkinin çürümesine neden olmuştur.

Bitkilerin 1:1 oranında tarla toprağı ile torf karışım içeren saksılara aktarılması, çok iyi gelişim göstermelerine neden olmuştur (Şekil 4.9.g). Bu durum yukarıda belirtilmiş sorunları ortadan kaldırarak, köklerin gerekli besin maddeleri ile su iletimini kolay bir şekilde gerçekleştirmesinin yanı sıra, köklerin havalanmasını da sağlayarak bitki gelişmesine olumlu etkiler sağlanmıştır.

Dış koşullara alıştırmış bitkilerinde yaklaşık 45 gün sonra bitkilerin generatif evreye geçerek çiçeklenme, 52 - 55 gün sonra bakla oluşumu ve daha sonra tohum bağlanması izlenmiştir (Şekil 4.9.h). Kültür koşullarında ve direk tohumdan elde edilen bitkilerde,

yaprak koltuklarından çıkan çiçeklerin sayısı 2 - 12 adet, bakladaki tohum sayısı ise 2 - 7 adet arasında değişmiştir. Alıştırılmış olgun bitkilerde ise toplam 1 - 5 adet arasında çiçek elde edilmiştir. Bazı saksılarda çiçekler tamamen dökülmüş ve bazılarında maksimum 1 veya 2 çiçek dölleniþ bakla vermiştir. Döllenen her baklada 1 - 3 adet arasında tohum bulunmuştur (Şekil 4.9.i,j).

Dolayısıyla, bundan sonraki denemelerinden elde edilen bitkilerin dış koşullarına alıştırmak amacıyla bu yöntemi kullanılmıştır.

Bitkilerin adaptasyonunun sağlanmasını takiben, vejetatif döneminden sonra (yaklaşık 45 gün), başlangıcı sağlanmıştır.

Bakla bitkisi kısa gün (11-13 saat karanlık isteyen bitki) bitkisidir. Bitki uzun gün bitki koşullarına (8 saat karanlık) göre alıştırmıştır. Dolayısıyla, çiçeklenmeye geçebilmesi için bitkilerin fotoperiyot ihtiyaçlarında eksiklik görülmüş olup, bitkileri vejetatif olarak daha fazla büyümüşür. Fotoperiyodun uygun olmaması bitki çiçeklerinin hem dölleniþ hem de bakla dönüşümüne engel olmuştur. Büyük oranda çiçeklerin dökülmesinin sebebi fotoperiyot uyumsuzluğu (ekolojik koşullar) ile birlikte fizyolojik stresten kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4. 9 *In vitro*'da Geliştirilen Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinden elde edilen bitkilrinin dış şartlara alıştırılması

a. Bitki köklerinden agar ile katılmış ortamın arındırılması, b. Agardan temizlenen bitkilerin 20 - 30 dk saf su da bekletilmesi, c. 1:1 oranda Torf ile tarla toprağı karışımı içeren fide tüplerine şaşırtılması, d. Şeffaf polietilen poşetler ile bitkilerin örtülmesi, e. Bitkiler üzerinden şeffaf polietilen poşetlerin alınması, f. Bitkilerin sera koşullarına alışması, g. Alışan bitkilerin köklerinin gelişmesi, h. Sera şartlarında çiçek ve bakla bağlanması, i. Baklaların gelişmesi, j. Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerin tamamen dış şartlara alışması

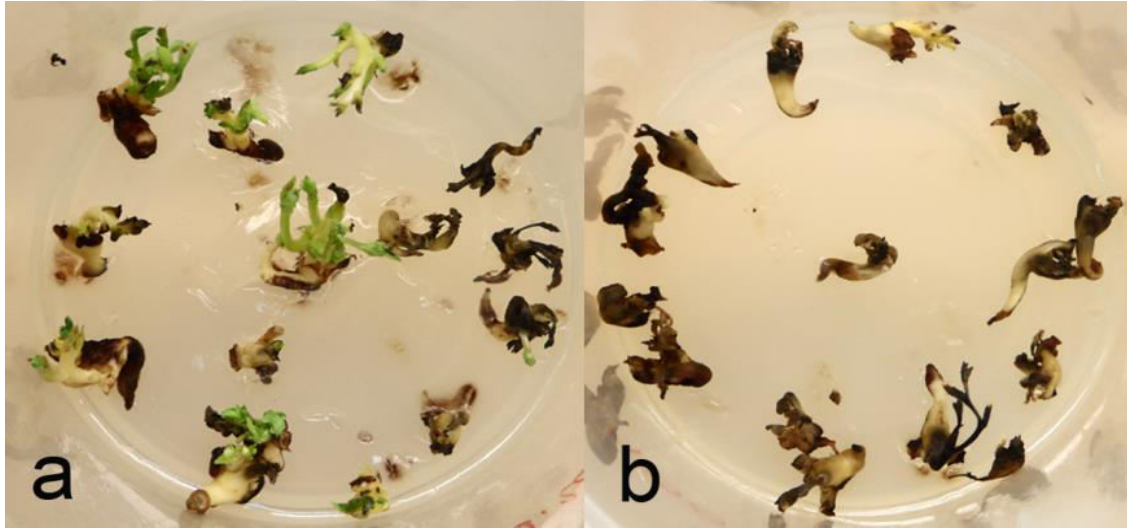
4.3 Baklada Gen Aktarım Çalışmaları

4.3.1 Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin kanamisin monosülfat seleksiyon ortamında LD₁₀₀ dozunu belirlenmesi

Genetik transformasyon çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens*'in GV2260:: p35S GUS INT hattı kullanılmıştır. GV2260:: p35S GUS INT hem *gus* geni (*uidA*) hemde *npt II* geni (kanamisine karşı direnç kazandıran geni) bulunmaktadır. Dolayısıyla, transformasyon çalışmaları yapılmadan önce ilk aşamada baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin kanamisine karşı dirençliliğı (LD₁₀₀) belirlemek amacıyla her iki çeşidine ait embriyo eksplantları 50.00, 100.00, 150.00, 200.00, 250.00, 300.00, 350.00 ile 400.00

mg/l kanamisin monosülfat içeren MS ortamına kültüre alınarak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde 50.00 mg/l kanamisin monosülfat içeren MS ortamında 48 adet zigotik embriyo eksplantından sırasıyla 8.00 ve 15.00 adet yaşıyan bitki elde edilmiştir (Cizelge 4.23). Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde sırasıyla yaşıyan bitki oranı %16.67 – 31.25 olarak izlenmiştir (Şekil 4.10a). Her iki çeşidinde geri kalan eksplantlarda gelişen sürgünleri beyazlaşarak kararmış olup, ölmüşlerdir. LD₁₀₀ dozu belirlenmesinde en düşük ve etkili dozu 100 mg/l Kanmisin monosülfat içeren ortamı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10b). Dolayısıyla, *A. tumefaciens*'in GV2260:: p35S GUS INT hattıyla tüm trasgenik çalışmaları yapılırken 100 mg/l kanmisin monosülfat bitki seleksiyon ortamlarında kullanılmıştır.



Şekil 4.10 Filiz 99 ve Eresen 87 bakla kültür çeşitlerine ait eksplantların kanamisin monosülfat içeren seleksiyon ortamında LD₁₀₀ dozunu belirlenmesi

a. Filiz 99 bakla çeşitlerin 50 mg/l kanamisin monosülfat içeren MS ortamlarda yaşayan bakla bitkiler, b. Eresen 87 bakla çeşitlerin 100 mg/l kanamisin monosülfat içeren MS ortamlarda ölmüş bakla bitkiler

Çizelge 4.23 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde kanamisin monosülfat bitki seleksiyon ortamında LD₁₀₀ ve *nptII* gen'ine dirençli olan transgenik bitkilerin seleksiyon yapabilmesi için kanamycin monosülfat dozlarının belirlenmesi

Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin embriyo eksplantından LD ₁₀₀ dozunu belirlemek amacıyla kullanılan Kanamycin Monosülfat miktarları (mg/l)	Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin kullanılan toplam embriyo sayısı (adet)	Filiz 99		Eresen 87	
		Yaşayan bitki sayısı (adet)	Yaşayan bitki oranı (%)	Yaşayan bitki sayısı (adet)	Yaşayan bitki oranı (%)
50.00	48.00	8.00	16.67	15.00	31.25
100.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
150.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
200.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
250.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
300.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
350.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
400.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00

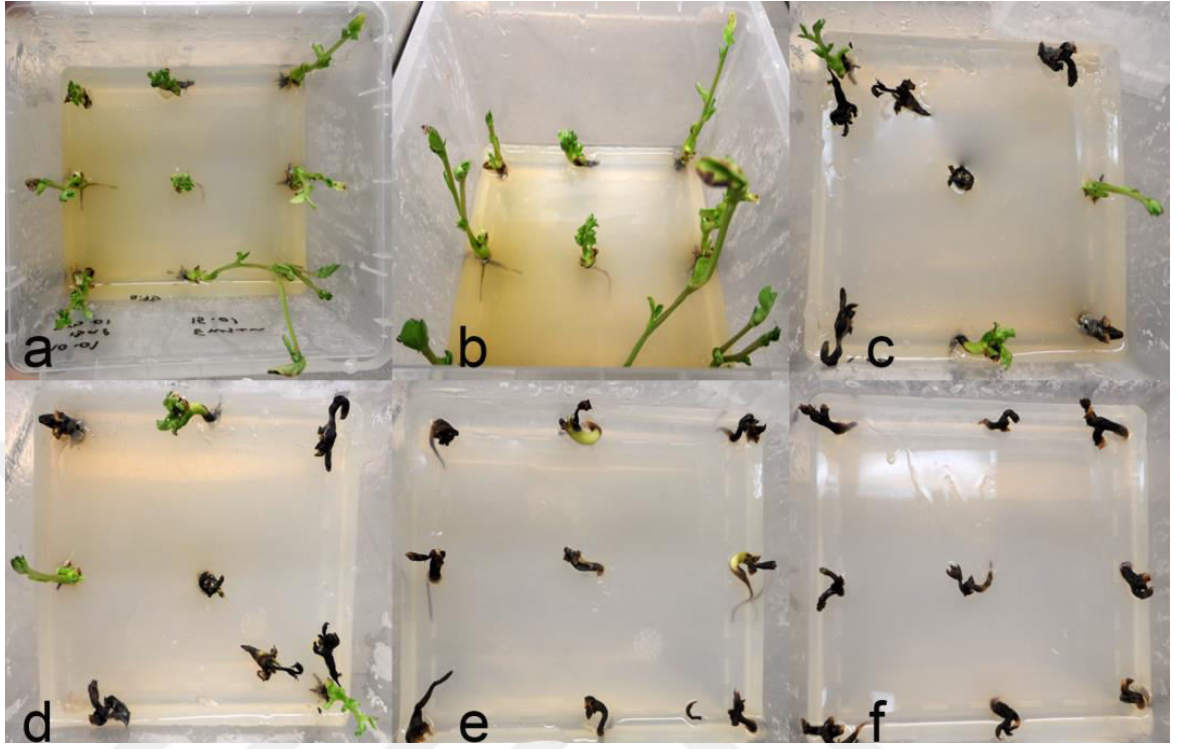
4.3.2 Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin fosfinotrisin bitki seleksiyon ortamında LD₁₀₀ dozunu belirlenmesi

Genetik transformasyon çalışmalarında EHA 105:: pTF101.1 kullanılmıştır. EHA 105:: pTF101.1 hattı *bar* geni (fosfinotrisine karşı direnç kazandıran geni) taşımaktadır. Dolayısıyla, transformasyon çalışmaları yapılmadan önce ilk aşamada baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin fosfinotrisine karşı dirençliliği (LD₁₀₀) belirlemek amacıyla her iki çeşidine ait embriyo eksplantları 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00 mg/l fosfinotrisin içeren MS ortamına kültüre alınarak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde 0.75 mg/l fosfinotrisin içeren MS ortamında 48er adet zigotik embriyo eksplantından 48er adet yaşayan bitki elde edilmiştir (Cizelge 4.24). Her iki çeşidinde yaşayan bitki oranı % 100 olarak izlenmiştir (Şekil 4.11.a,b).

Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde 1.00 mg/l fosfinotrisin içeren MS ortamında 48er adet zigotik embriyo eksplantından sırasıyla 15.00 ve 3.00 adet yaşayan bitki elde edilmiştir. Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde sırasıyla yaşayan bitki oranı % 31.25 – 6.25 olarak izlenmiştir. Her iki çeşidinde geri kalan eksplantlarda gelişen sürgünleri kararmış olup, ölmüşlerdir (Şekil 4.11.c,d).

LD₁₀₀ dozu belirlenmesinde en düşük ve etkili dozu 1.50 mg/l fosfinotrisin içeren ortamı olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, *A. tumefaciens*'nin EHA 105:: pTF101.1 hattıyla tüm transgenik çalışmaları yapılırken 1.50 mg/l fosfinotrisin bitki seleksiyon ortamlarında kullanılmıştır (Şekil 4.11.e,f).



Şekil 4.11 Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin eksplantlarının fosfotrisin seleksiyon ortamında LD₁₀₀ dozunu belirlenmesi

a. 0.75 mg/l fosfotrisin içeren MS ortamında yaşayan Filiz 99 çeşidine embriyolar, b. 0.75 mg/l fosfotrisin içeren MS ortamında yaşayan Eresen 87 çeşidine ait embriyolar, c. 1.00 mg/l fosfotrisin içeren MS ortamında yaşayan Filiz 99 çeşidine ait embriyolar, d. 1.00 mg/l fosfotrisin içeren MS ortamında yaşayan Eresen 87 çeşidine ait embriyolar, e. 1.50 mg/l fosfotrisin içeren MS ortamında kararmış/ölmüş olan Filiz 99 çeşidine ait embriyolar, f. 1.50 mg/l fosfotrisin içeren MS ortamında kararmış/ölmüş olan Eresen 87 çeşidine ait embriyolar

Çizelge 4. 24 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde fosfinotrisin seleksiyon ortamında LD₁₀₀ ve *bar* gen'ine dirençli olan transgenik bitkilerin seleksiyon yapabilmesi için fosfonitrisin dozlarının belirlenmesi

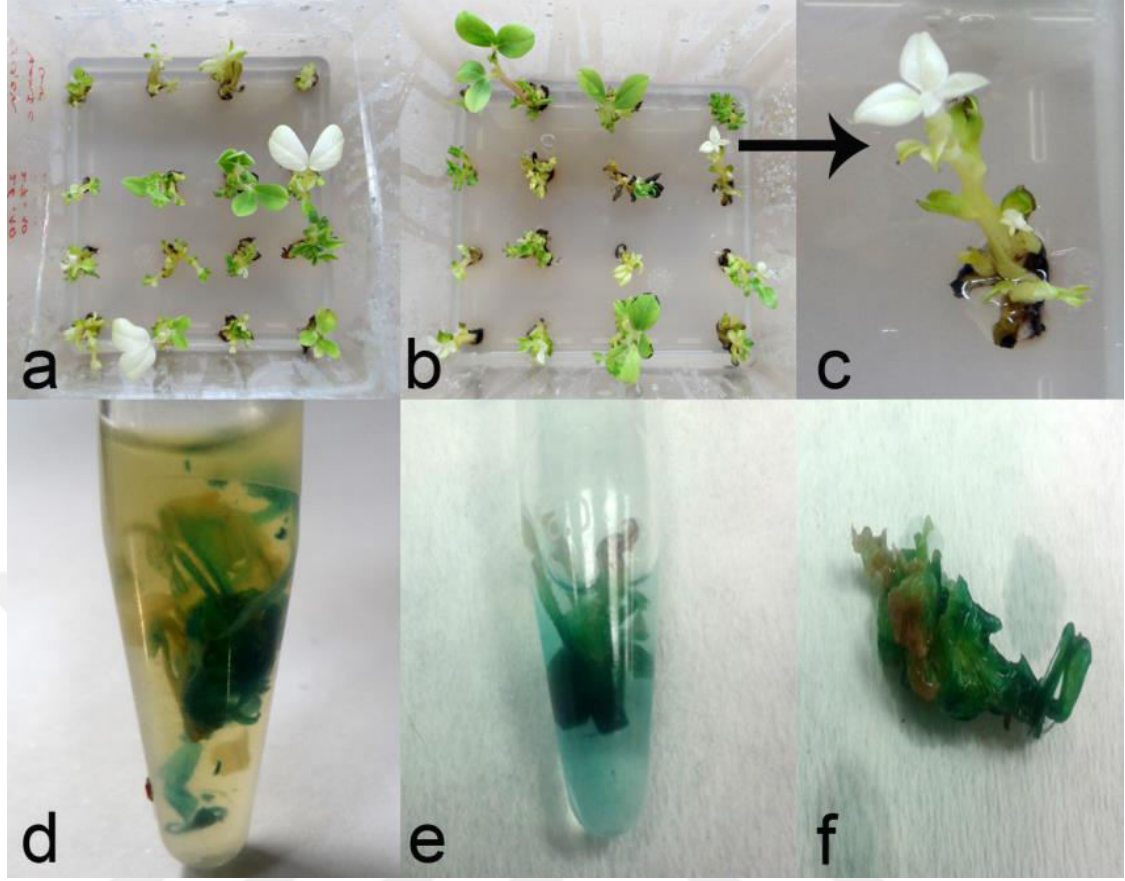
Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin embriyo eksplantından LD ₁₀₀ dozunu belirlemek amacıyla kullanılan fosfinotrisin miktarları (mg/l)	Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin kullanılan toplam embriyo sayısı (adet)	Filiz 99		Eresen 87	
		Yaşayan bitki sayısı (adet)	Yaşayan bitki oranı (%)	Yaşayan bitki sayısı (adet)	Yaşayan bitki oranı (%)
0.75	48.00	48.00	100.00	48.00	100.00
1.00	48.00	15.00	31.25	3.00	6.25
1.50	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.50	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.50	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4.00	48.00	0.00	0.00	0.00	0.00

4.3.3 *A. tumefaciens* GV2260 p35S GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

Her iki bakla çeşidin 500'er adet zigotik embriyo eksplantları *A. tumefaciens*'in GV2260 ::p35S GUS INT hattıyla 35 dk süre ile inokulasyon/muamele edilmiş ve bir gün kokültüvasyon ortamına alınmıştır.

Daha sonra Filiz 99 çeşidi için sürgün rejenerasyonunda optimize edilmiş 3.00 mg/l ve bitki seleksiyon için 100 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l bakteriyostatik Duocid - pfizer (geniş spektrumlu antibiyotigi) içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Filiz 99 çeşidinde seleksiyon ortamında 37 adet veya % 7.4 bitki elde edilmiştir (Çizelge 4.25).

Benzer şekilde Eresen 87 çeşidi için sürgün rejenerasyonunda optimize edilmiş 5.00 mg/l BAP ve bitki seleksiyon için 100 mg/l kanamisin monosülfat ile 500 mg/l bakteriyostatik Duocid - pfizer (geniş spektrumlu antibiyotigi) içeren MS seleksiyon ortamında 46/500 adet veya % 9.2 bitki elde edilmiştir. Ancak, bitki seleksiyon ortamından elde edilen bitkilere yapılan histokimyasal GUS analizi sonucu, Filiz 99 çeşidinde 1 ve Eresen 87 çeşidinde 2 adet yaprak ile gövde örneklerinde mavi bölgeler izlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Filiz 99 ve Eresen 87 bakla çeşitlerinin *A. tumefaciens* GV2260 p35_s GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

a. Filiz 99 çeşidine ait olan seleksiyon ortamında bulunan transgenik aday bitkiler, b. Eresen 87 çeşidine ait olan seleksiyon ortamında bulunan transgenik aday bitkiler, c. Kanamisine dayanıklı göstermeyen bitkilerde tespit edilen albinolaşma, d. Filiz 99 çeşidine ait histokimyasal gus testi ve % 96 alkolda yıkanması, e. Eresen 87 çeşidine ait histokimyasal gus testi ve % 96 alkolda yıkanması, f. Histokimyasal gus testi yapılmış bitki örneği ve üzerinde bulunan mavi bölgeler

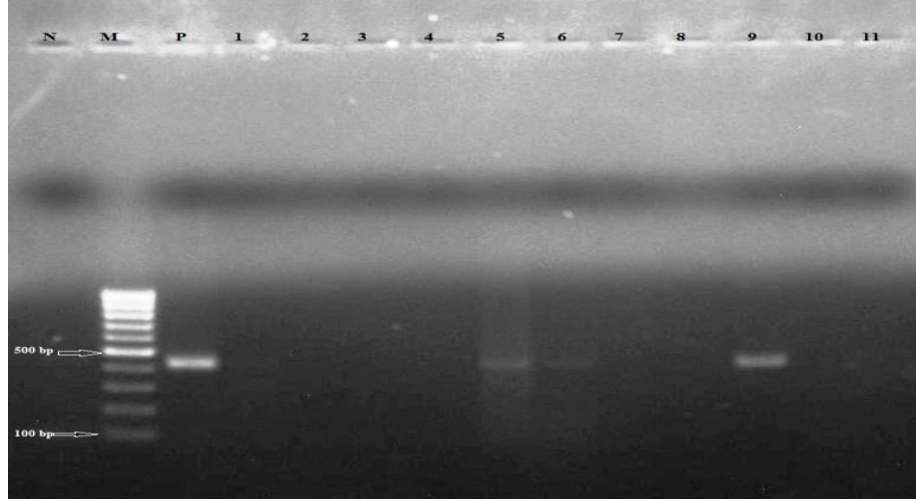
Ancak, seleksiyon için kullanılan npt II genin bitkilerde varlığının tespiti PCR ile yapılmıştır. Bitki seleksiyon ortamında Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerine ait sırasıyla 37 ve 46 bitki elde edilmiştir (Çizelge 4.25). Bunlardan Filiz 99 çeşidine ait rasgele seçilmiş 11 bitkide ve Eresen 87 çeşidine ait 6 bitkide pcr yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre Filiz 99 çeşidine ait 3 adet bitkide (% 27.27 oranıyla) ve Eresen çeşidinde 5 adet bitkide (% 83.33 oranda) pozitif sonuç izlenmiştir (şekil 4.13 ve 4.14).

Her iki çeşidinin kullanılmış olan toplam eksplant sayısına ve *nptII* gen'ini teyid eden PCR pozitif bitkileri arasında kıyaslama sonucu Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinden sırasıya % 0.6 ve % 1.00 oranında transgenik bitki elde edilmiştir (Çizelge 4.25).

Seleksiyon ortamlarından elde edilen bitkileri 1.00 mg/l IAA içeren MS ortamlarında köklendirilmiştir. Kökleri gelişen bitkileri 1:1 oranda torf ile tarla toprağı karışımı içeren saksılara dış koşullara adaptasyon sağlamak amacıyla aktarılmıştır; ancak, şaşırtılan her hangi bitkisinde adaptasyon sağlanamamıştır.

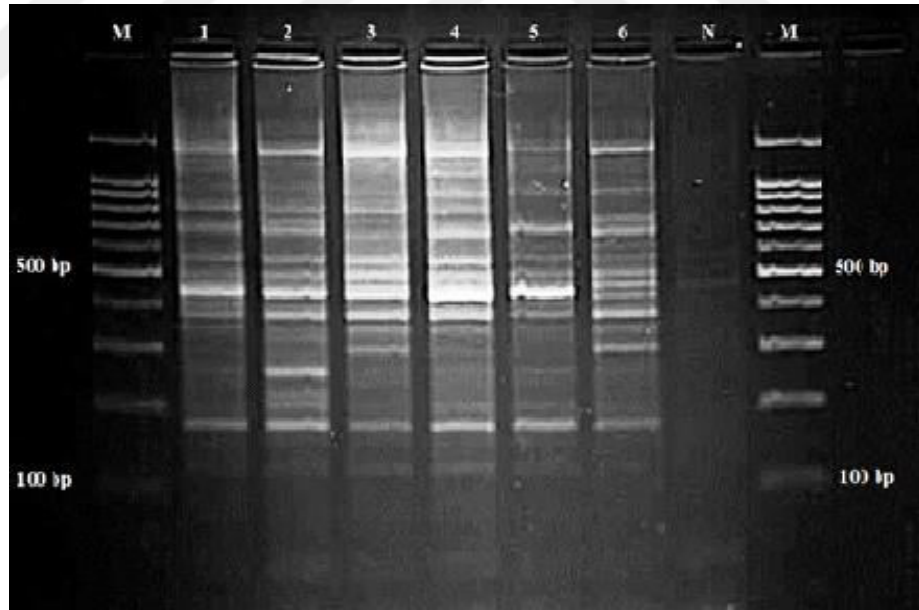
Çizelge 4.25 *A. tumefaciens* GV2260 p35S GUS INT bakteri hattı ile gen aktarımı

Açıklama	Bakla Çeşitleri	
Kullanılmış bakteri (GV2260::p35S GUS INT)	Filiz 99	Eresen 87
İnokulasyon süres (dk)	35	35
Kokütüvasyon süresi (gün)	1	1
Kullanılmış zigotik embriyo sayısı(adet)	500	500
Seleksiyon ortamda elde edilen bitki sayısı (adet)	37	46
Seleksiyon ortamda elde edilenlerin oranı (%)	7.4	9.2
Gus pozitif bitki sayısı(adet)	1	2
Gus pozitif bitkilerinin oranı (%)	0.2	0.4
<i>nptII</i> gen'ini teyid eden PCR pozitif bitkilerin sayısı (adet)	3	5
PCR sonucunun oranı(%)	27.27	83.33
Toplam transgenik bitki oranı(%)	0.6	1.00
Alıştırılmış bitkilerin sayısı	0.00	0.00
Kaç bitkiden tohum ede ettiniz	0.00	0.00



Şekil 4.13 Filiz 99 çeşidin *A. tumefaciens* GV2260::p35S GUS INT bakteri hattı ile elde edilen Kanamisin monosülfata dayanıklı ve *npt-II* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

N) Transgenik olmayan Filiz 99 çeşidi - negatif kontrol, M) Markör (1000 bp), P. Tütün samsun çeşidi - pozitif kontrol, 5- 6 ve 9. kulvarların 448 bp'da bulunan bantları transgenik Filiz 99 bitkisinde *npt-II* geni'ni teyid etmektedir, 1- 2- 3- 4- 7- 8- 10 ve 11 kulvarlar negatif transgenik aday Filiz 99 bitkileri temsil etmektedirler



Şekil 4.14 Eresen 87 çeşidin *A. tumefaciens* GV2260:: p35S GUS INT bakteri hattı ile elde edilen Kanamisin monosülfata dayanıklı ve *npt-II* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M) Markör (1000 bp), N) Transgenik olmayan Eresen 87 çeşidi- negatif kontrol, 1- 2- 3- 4 ve 5. Kulvarların 448 bp'da bulunan bantları transgenik Eresen87 bitkileri *npt-II* geni'ni teyid etmektedir, 6. kulvarda negatif transgenik aday Eresen87 bitkisi

4.3.4 A. *tumefaciens* EHA 105:: 35S SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı

Filiz 99 çeşidinden 1100 adet ve Eresen 87 çeşidinden 800 adet zigotik embriyo eksplantları *A. tumefaciens*'in EHA 105:: 35S SN19 hattıyla 45 dk süre ile inokulasyon edilmiş ve iki gün kokültüvasyon ortamına alınmıştır.

Daha sonra Filiz 99 çeşidi için sürgün rejenerasyonunda optimize edilmiş 3.00 mg/l ve bitki seleksiyon için 1.50 mg/l fosfinotrisin ile 500 mg/l bakteriyostatik Duocid - pfizer (geniş spektrumlu antibiyotigi) içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Filiz 99 çeşidinde seleksiyon ortamında 22/1100 adet (% 2.00) bitki elde edilmiştir (Çizelge 4.26).

Benzer şekilde Eresen 87 çeşidi için sürgün rejenerasyonunda optimize edilmiş 5.00 mg/l BAP ve bitki seleksiyon için 1.50 mg/l fosfinotrisin ile 500 mg/l bakteriyostatik Duocid - pfizer (geniş spektrumlu antibiyotigi) içeren MS seleksiyon ortamında 30/800 adet (% 3.75) bitki elde edilmiştir.

Seleksiyon ortamlarından elde edilen bitkileri 1.00 mg/l NAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamlarında köklendirilmiştir. Ancak, ortamda bulunan bitkilerin bir kısmının köklenmediği ve bir kısmının kökeri iyice gelişemediğinden dış koşullara adaptasyon sağlanamadı; dolayısıyla transgenik aday bitkilerin PCR analizi yapılamamıştır.

Çizelge 4.26 *A. tumefaciens* EHA 105:: 35S SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı

Açıklama	Bakla çeşitleri	
Kullanılmış bakteri (EHA 105:: 35S SN19)	Filiz 99	Eresen 87
İnokulasyon süresi (dk)	45.00	45.00
Kokültüvasyon süresi (gün)	2.00	2.00
Kullanılmış zigotik embriyo sayısı(adet)	1100.00	800.00
Seleksiyon ortamda elde edilen bitki sayısı (adet)	22.00	30.00
Seleksiyon ortamda elde edilenlerin oranı (%)	2.00	3.75
<i>Bar</i> gen'ini teyid eden PCR pozitif bitkilerin sayısı (adet)	0.00	0.00
Alıştırılmış bitkilerin sayısı	0.00	0.00
Kaç bitkiden tohum ede ettiniz	0.00	0.00

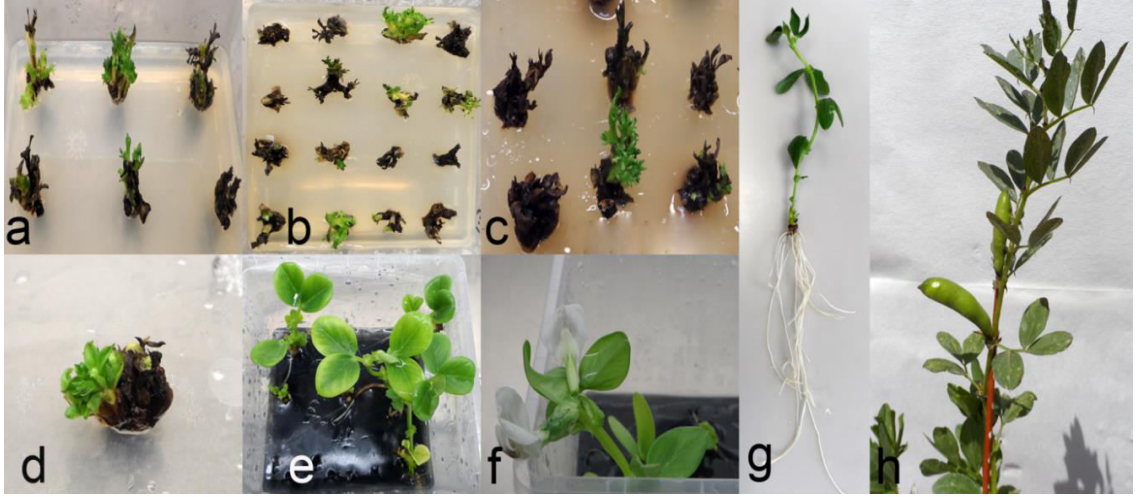
4.3.5 *A. tumefaciens* EHA 105::AoPR1 SN19 bakterisi hatti ile gen aktarımı

Filiz 99 çeşidinden 1120 adet ve Eresen 87 çeşidinden 960 adet zigotik embriyo eksplantları *A. tumefaciens*'in EHA 105::AoPR1 SN19 hattıyla 45 dk süre ile inokulasyon yapılmış ve iki gün kokütüvasyona alınmıştır.

Daha sonra Filiz 99 çeşidi için sürgün rejenerasyonunda optimize edilmiş 3.00 mg/l ve bitki seleksiyon için 1.50 mg/l fosfotrisin ile 500 mg/l bakteriyostatik Duocid - pfizer (geniş spektrumlu antibiyotik) içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Filiz 99 çeşidinde seleksiyon ortamında 78/1120 adet veya % 6.96 bitki elde edilmiştir (Çizelge 4.27).

Benzer şekilde Eresen 87 çeşidi için sürgün rejenerasyonunda optimize edilmiş 5.00 mg/l BAP ve bitki seleksiyon için 1.50 mg/l fosfotrisin ile 500 mg/l bakteriyostatik Duocid - pfizer (geniş spektrumlu antibiyotik) içeren MS seleksiyon ortamında 94/960 adet veya % 9.79 bitki elde edilmiştir.

Seleksiyon için kullanılan *bar* geninin bitki kromozomlarına entegrasyonun tespiti PCR ile yapılmıştır. Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinde elde edilen 78 ve 94 bitkisinden sırasıyla rasgele seçilmiş 13 adet örnek'ten 11 adet bitkide (% 84.61 oranıyla) ve 3 adet bitkiyle (%23.07 oranda) *bar* geni pozitif sonuç izlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Filiz 99 ve Eresen 87 bakla kültür çeşitlerinin *A. tumefaciens* EHA 105::AoPR1 SN19 bakterisi hattı ile gen aktarımı

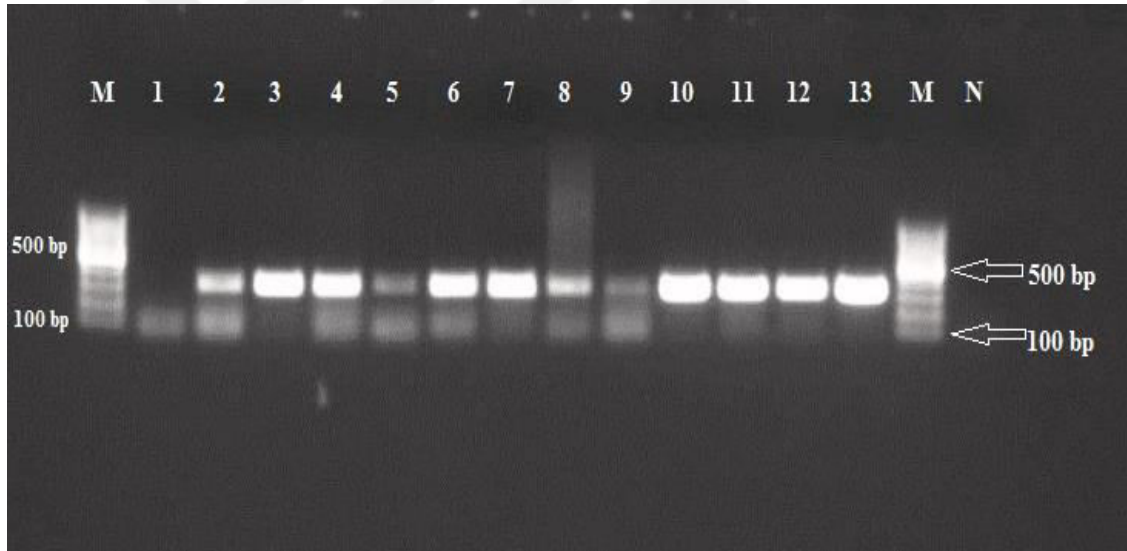
a. Filiz 99 çeşidine ait olan seleksiyon ortamında bulunan transgenik aday bitkiler, b. Eresen 87 çeşidine ait olan seleksiyon ortamında bulunan transgenik aday bitkiler, c. *Bar* genini taşıyan ve fosfinotrisine dayanıklı bulunan Filiz 99 çeşidi, d. *Bar* genini taşıyan ve fosfinotrisine dayanıklı bulunan Eresen 87 çeşidi, e. 1.00 mg/l NAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamında köklenen bitkiler, f. 1.00 mg/l NAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamında köklenen ve çiçeklenen bitki, g. Köklenen ortamında güçlü kök oluşturan transgenik aday bitkisi, h. Dış şartlarında adapte olup ve bakla bağlayan transgenik aday bitkisi

Her iki çeşidin kullanılmış olan toplam eksplant sayısına ve *bar* gen'ini teyid eden PCR pozitif bitkileri arasında kıyaslama sonucu Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinden sırasıyla % 0.98 ve % 0.31 oranında transgenik bitki elde edilmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

Seleksiyon ortamlarından elde edilen bitkiler 1.00 mg/l NAA + 2 g/l aktif kömür içeren MS ortamlarında köklendirilmiştir. Kökleri gelişen bitkileri 1:1 oranda torf ile tarla toprağı karışımı içeren saksılara şaşırtılmıştır. Filiz 99 çeşidine ait transgenik bitkilere adaptasyon sağlanamamıştır. Ancak Eresen 87 çeşidinden 2 bitki dış koşullarına adaptasyon sağlanarak yaşamlarına devam edip, çiçek ve bakla oluşturmuşlardır. Bir bakladan 2 adet tohum ve diğer üç bakladan ise 1'er adet tohum, toplam Eresen 87 çeşidinden 5 adet transgenik tohum elde edilmiştir.

Çizelge 4.27 *A. tumefaciens* EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile gen aktarımı

Kullanılmış bakteri (EHA 105::AoPR1 SN19)	Filiz 99	Eresen 87
İnokulasyon süresi(dk)	45	45
Kokütüvasyon süresi (gün)	2	2
Kullanılmış zigotik embriyo sayısı (adet)	1120	960
Seleksiyon ortamda elde edilen bitki sayısı	78	94
Seleksiyon ortamda elde edilenlerin oranı (%)	6.96	9.79
<i>Bar</i> gen'ini teyid eden PCR pozitif bitkilerin sayısı (adet)	11	3
PCR sonucunun oranı(%)	84.61	23.07
Toplam transgenik bitki oranı(%)	0.98	0.31
Alıştırılmış bitkilerin sayısı	0	2 adet
Elde edilen tohum sayısı	0	2 adet alıştırılmış bitkiden toplam 5 adet tohum elde edilmiştir.



Şekil 4.16 Filiz 99 çeşidin *A. tumefaciens* EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile elde edilen fosfinotrisine dayanıklı ve *Bar* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M) Markör (1000 bp), N) Transgenik olmayan Filiz 99 çeşidi - negatif kontrol, 2- 3- 4- 5- 6- 7- 8- 10- 11- 12 ve 13. kulvarların 380 bp'da bulunan bantar 11 adet transgenik Filiz 99 bitkisinde *Bar* geni'ni teyit etmektedir, 1 ve 9. kulvarlardaki 2 adet negatif (görülmeyen) bant transgenik Filiz 99 bitkisinde *Bar* geni'ni teyit etmemektedir



Şekil 4.17 Eresen 87 çeşidin *A. tumefaciens* EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı ile elde edilen fosfinotrisine dayanıklı ve *Bar* geninin varlığının PCR ile teyit edilmesi

M₁) Markör (1000 bp), M₂) Markör (2000 bp), 10-11ve 12. kulvarların 380 bp'da bulunan bantlar 3 adet transgenik Eresen 87 bitkisinde *Bar* geni'ni varlığını teyit etmektedir, 1- 2- 3- 4- 5- 6- 7- 8- 9 ve 13. kulvarlarında bant yokluğu negatif transgenik aday Eresen 87 bitkileri temsil etmektedir

5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Bakla (*Vicia faba* L.), Leguminosae familyasının tek yıllık otsu bir bitki olup, ana yurdu olan Avrupa ve Asya kıtalarında 5.000 yıldan beri yetiştirilmektedir. Türkiye’de bakla bitkisi yetiştiriciliği çok yeni ve gelecekte protein ihtiyacını karşılamak için önemli bir potansiyeline sahiptir. Baklada tane verimi stabil olmayıp, kararsızlık göstermektedir. Baklada tane veriminin düşük olmasının nedeni hastalıklar, zararlılar ve yabancı otlar olarak görülmektedir. Yıllardan beri bitkiler, hastalık ve zararlıların saldırılarına karşı kimyasal ilaçlarla korunmuş; ancak, kullanılan bu ilaçların ayrışmadan uzun süre kalabilmeleri insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından giderek artan bir endişe kaynağı olmuştur. Bu durum, diğer bitkiler gibi bakla bitkisinde de yabancı otlardan ve zararlılardan korumak için uzun sürmeyen alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesinin ihtiyacını göstermektedir.

Bu güne kadar bakla bitkisinde yapılan doku kültürü ve gen aktarım çalışmalarında başarı oranı oldukça düşük olup, *Agrobacterium* aracılığıyla transgenik bakla bitkisi elde edilmesinde kallus yoluyla ilerlediği için sonuçların tekrarlanabilirliği oldukça düşüktür. Bu tezde bu sorunlarla karşılaşmamak amacıyla Eresen 87 ve Filiz 99 bakla çeşitlerinde gen aktarımına uygun doğrudan sürgün rejenerasyon ve gen aktarım sisteminin geliştirilmesi olmuştur.

Tez kapsamında yapılan rejenerasyon çalışmalarında zigotik embriyo eksplantları farklı oranda BAP ile NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Filiz 99 çeşidinde en fazla sürgün oluşum 0.25mg/l BAP-0.00 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir Eresen 87 çeşidinde ise en fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP -1.00 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP -1.75 mg/l NAA içeren ortamda izlenmiştir. Başka bir denemede zigotik embriyolar TDZ içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 5.33 ve 3 adet sırasıyla Filiz99 ve Eresen87 çeşitlerinde, 0.15 mg/l TDZ içeren MS ortamından elde edilmiştir. Bir başka denemede BAP, NAA, L-Glutamin ve Casein Hydrolysate içeren MS ortamına kültüre alınan embriyolar, Filiz99 ve Eresen 87 çeşitlerinde eksplant başına en fazla sürgün sayısı sırasıyla 6.00 ve 5.03 adet olarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuçları Anwar vd. (2011), yaptıkları çalışmaları destek

vermektedir. Araştırcılar bakla üzerinde etkili rejenerasyon yöntemi geliştirmek amacıyla yarım kesilmiş embriyonik ekseni ile tek kotiledon eksplantı kullanmış olup, 6 µM TDZ ile 10 µM 2-iP ve 4 µM kinetin içeren MS ortamında 30-50 adventif tomurcuklar elde edilmiştir. Skrzypek vd. (2012), Dört Polonya kökenli Bronto, Dino, Tibo, Nadwiřlański bakla çeşitlerinde kallus elde etmek için 7- ve 14 günlük fidelerin epikotil parçaları ve olgunlaşmamış tohum kotiledon nodları kullanılmıştır. Kallus oluşumu eksplant kaynağına bağlı olarak % 81 - % 97 arasında değişmiştir. Sürgünler ise sadece test edilen tüm çeşitlerin kotiledon nodlarından elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan başka bir denemede farklı saatlerde BAP hormonu ile priming yapılan her iki çeşidin embriyoları daha sonra MS ortamına kültüre alınmıştır. En fazla sürgün sayısı 2 adet her iki çeşit için 4 saat süre ile 100mg/l sıvı BAP içeren sıvı MS ortamdanda elde edilmiştir. 100 mg/l sıvı BAP hormonu ile eksplantları farklı süreleriyle priming yapıldıktan sonra TDZ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Filiz 99 ve Eresen87 çeşitleri için eksplant başına en fazla sürgün sayısı sırasıyla 4.50 ve 4.00 adet; 100 mg/l BAP hormonu ile 24 saat süre ile priming ve 0.60 mg/l TDZ içeren MS ortamından elde edilmiştir. Priming çalışmaları rejenerasyonda olumlu etkileri yapmaktadır. Benzer şekilde Çetin (2010), Bakla (*Vicia faba L.*) bitkisinde Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin tohumları saf su, sukroz içermeyen sıvı MS ortamı, şekerli su ve şekerli sıvı MS içeren ortamlarda 24 saat süre ile ön muameleye tabi tutmuştur. Daha sonra plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları farklı oranda BAP ile NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu şekerli su ön muamelesinde 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besi ortamında plumula uçlarından elde edilmiştir. Araştırıcı, başka bir denemede her iki çeşidin embriyolarını 10 mg/l BAP içeren MS ortamlarında 6 gün bekletilmiştir. Daha sonra embriyolardan alınan plumula uçları farklı oranda BAP ve BAP ile NAA içeren MS besi ortamlarında rejenerasyona tabi tutmuştur. En fazla sürgün rejenerasyonu 10 mg/l BAP içeren ortam ile ön muamele yapılmış plumula uçları eksplantalardan 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamdanda elde edilmiştir. Bu tez kapsamında elde ettiğimiz sonuç gibi araştırıcı beş hafta sonra sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS besi ortamında köklendirilmiş olup, bitkiler çiçeklenmiş ve tohum tutma amacıyla seraya almıştır.

Başka denemelerde, farklı BAP içeren MS ortamlarında kültüre alınan embriyolardan en fazla sürgün sayısı 10.33 adet ve 3.00 mg/l BAP içeren MS ortamından Filiz99 çeşidi için ve Eresen 87 çeşidi ise 10.30 adet sürgün 5.00 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Farklı BAP ve NAA dozlarında kültüre alınan embriyolarda en fazla sürgün rejenerasyonu 1.00 mg/l BAP + 0.01 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Benzer şekilde, Bahgat vd. (2009), bakla bitkisinde rejenerasyon sistemini geliştirmek için yaptıkları çalışmada Mısır kökenli bakla "Giza 2 've '24 Hyto' çeşitlerinin epikotil ve sürgün uçlarından MS veya Gamborg ortam, % 3 sukroz ve % 0.025 askorbik ve sitrik asit ile % 0.8 agar içeren 10 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 2,4-D ve 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarında kallus elde etmişlerdir. Embriyonik kallus geliştirmek için en iyi ortam BAP + NAA + 2,4-D olarak belirlenmiştir. Daha sonra eksplantları somatik embriyoların gelişmesini sağlamak için B5 ortamına aktarılmıştır. Bu tez kapsamında üç hafta sonra sürgünleri 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir ve köklenen bitkileri dış koşullarına alıştırmak amacıyla torf içeren saksılara aktarılmış kontrollü koşullarda serada adaptasyon sağlanmıştır. Dış ortam şartlarına alışan bitkilerin çiçek ve tohum bağlandığı görülmüştür. Bakla bitkisinde köklendirmek amacıyla IAA kullanılmıştır. IAA'nın kök oluşumunda herhangi olumsuz etki görülmemiştir. Elde edilen sonuçları Çetin (2010) sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin zigotik embriyo eksplantlarından GV2260 p35S GUS INT bakteri hattı kullanılarak sırasıyla 3 ve 5 adet GUS pozitif bitki elde edilmiştir. Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin zigotik embriyo eksplantlarından EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattı kullanılarak sırasıyla 11 ve 3 adet *BAR* pozitif bitki elde edilmiştir. Transgenik olmayan bitkileri köklendirmek için IAA kullanılmıştır. Ancak, IAA içeren köklendirme ortamı transgenik bitkilerin köklendirmesinde yetersiz kalmıştır ve yerine NAA kullanılmıştır. Transgenik bitkilerin köklendirme yanıtlarında değişikliği çok ilgi ile rastlanmıştır olup, bakla bitkisinde ilk kez rastlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarında Aasim vd. (2009) başka baklagil bitkisi börülcenin köklendirilmesinde NAA kullanmışlardır.

Bu tez kapsamında yapılmış çalışmaları daha önce yapılmış çalışmalarına çok benzerlik göstermektedir. Baklada başarılı gen aktarım çalışmaları olumlu yönde bilgiler vererek Pounti-Kaerlas vd. (1990)'nin bezelye bitkisine *A. tumefaciens* aracılığıyla bazı markör genleri (*NPT-II*, *HPT-II*) aktarılması ve higromsin ve kanamisin antibiyotiğine dayanlı transgenik bitkiler elde edilmesine, Warkentin ve Mchughen (1992)'nin ve Mahmoudian (2000), Khawar (2001)'in mercimekte transformasyon çalışmasına, Yan vd. (2000)'nin soya fasulyesinde transgenik bitkilerin eldesine, Barik vd. (2005) *Lathyrus sativus* bitkisine, Metry vd. (2007) 10 adet Mısır kökenli bakla çeşitlerin embriyo eksplantından %30 - 92 ve sürgün ucu explantından %12 - 57 sürgün rejenerasyonu, izlenmiştir. Embriyo eksplantını kültüre alarak 1 mg/l B5 vitamin, 4,5 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA ve sürgün ucu eksplantı için 5 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA MS ortamına kültüre alınmıştır. Fenolik bileşikler engellemen için kültürleri bir hafta karanlıkta tutmuşlardır. Rejenerasyon ortamına aktif kömür ilavesinin rejenerasyon frekansı üzerinde olumsuz etkiler tespit edilmiştir. Daha sonra *microprojectile* bombardıman ile iki *pCGP1258* (herbisitlere dayanıklı) ve β - *glucuronidase*(*GUS*) genleri ile transformasyon yapılmıştır. Transgeniklerin belirlenmesi Southern blot, PCR ve histokimyasal GUS testleri ile yapılmıştır. Transformasyon frekansı Giza 40 çeşidinde % 2 gibi olarak tespit edilmiştir.

Sağlam (2009),da Fasulye Akman – 98 çeşidinin apikal meristem eksplantlarını kullanarak *A. tumefaciens* aracılığıyla böceklere dayanıklı bitkiler elde etmiştir. Hanafy vd. (2013), ilk defa bakla (*Vicia faba*) bitkisinde kuraklık ve tuzluluğa toleranslı patates pR10a geninin aktarıldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, Abdelwahd vd. (2014), Orobanş bitkisine karşı transgenik toleransı artırmak için kotiledonar boğum eksplantları kullanmışlardır. Dolayısıyla Hygromycin antibiyotiğine en yüksek dirençli sürgünler %38,3 frekansı ile AGL1 hattıyla muamele edilen Aguadulce çeşidinde elde edilmiştir.

Sonuçlar

1. Filiz 99 çeşidinde eksplant başına en fazla sürgün sayısı 10.33 adet olarak 3.00 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir.

2. Eresen 87 çeşidinde ise eksplant başına en fazla sürgün sayısı 10.30 adet olarak 5.00 mg/l BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir.
3. Gus pozitif bitkilerinin oranı Filiz 99 çeşidinde %0.2, Eresen 87 çeşidinde ise %0.4 olarak tespit edilmiştir.
4. *nptII* geni PCR sonucunun oranı Filiz 99 çeşidinde %27.27 ve Eresen 87'de ise %83.33 olmuştur.
5. Kullanılan *A. tumefaciens* GV2260 p35S GUS INT bakteri hattında toplam elde edilen transgenik bitki oranı Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde sırası ile % 0.60 ve %1.00 olarak elde edilmiştir.
6. *bar* geni PCR sonucunun oranı Filiz 99 çeşidinde %84.61 ve Eresen 87'de ise %23.07 olmuştur.
7. Kullanılan *A. tumefaciens* EHA 105::AoPR1 SN19 bakteri hattında toplam elde edilen transgenik bitki oranı Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde sırası ile % 0.98 ve %0.31 olarak elde edilmiştir.

Öneriler

Bu çalışmanın devamında kesin bir karara varabilmek için, elde edilen tohumlarını sera koşullarında tekrar ekilip çoğaltılması ve T₁, T₂ ve T₃ tohumların elde edilmesi hedeflenmektedir. Yapılması gereken fenotipik ve genotipik analizler ile istenilen genlerin aktarılmış olduğunun teyit edilmesi de sonraki çalışmaların amaçlardan birisidir. T₂ ve sonraki jenerasyonlarda genotip olarak Mendel açılımının olup olmadığını belirlenmesi de yapılması gereken önemli testlerden birisidir. Bu hedeflerle, çalışmaya devam edilmesi, sonuçların daha güvenilebilirliğinin ortaya konulmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aasim, M., Khawar, K.M. and Ozcan, S. 2009. *In vitro* micropropagation from plumula uçları apices of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Akkiz. *Scientia Horticulturae*, 122, 468–471.
- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M and Udupa, M. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (8), 997-1002.
- Abdelwahd, R., Udupa, M.S., Gaboun, F., Diria, G., Mentag, R., Ibriz, M and Iraqi, D. 2014. Agrobacterium-Mediated Transformation of Cotyledonary Node of *Vicia faba* L. *Romanian Agricultural Research, Nardi Fundulea, ROMANIA*, 31, 2014 DII 2067-5720 RAR 2014-406
- Akçin, A. 1988. Yemelik Tane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi. Zir. Fak. Yayınları, 8, Konya.
- Almaghrabi, O.A. 2014. Effect of Growth Hormone 2,4-D on Some Callus Traits of Different Faba Bean (*Vicia faba* L.) Cultivars. *Life Science Journal* 2014, 11(11), 98 – 102.
- Anonim. 2015a. Web Sitesi: www.tr.wikipedia.org/wiki/Dünya_nüfusu (Erişim 10.11.2015).
- Anonim. 2015b. Web Sitesi: (Erişim 28.11. 2015).
- Anonim. 2015c. Web Sitesi: <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim 28.11.2015).
- Anonymous. 2015d. Web Sitesi: <http://ndb.nal.usda.gov/> (Erişim 28.11.2015).
- Anonim. 2016. Web Sitesi: <http://faostat3.fao.org> (Erişim 15.01.2016)
- Anwar, F., Alghamdi, S.S., Ammar, M. H and Siddique, K. H. M. 2011. An efficient *in vitro* regeneration protocol for faba bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Medicinal Plants Research* 5(28), 6460-6467.
- Babaoglu, M., McCabe, M.S., Power, J.B. and Davey, M.R. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of *Lupinus mutabilis* L. using shoot apical explants *Acta Physiologiae Plantarum*. 22 (2), 111-119.

- Bahgat, S., Shabban, A.O., El-Shihy, O., Lightfoot, A.D and El-Shemyi, A.H. 2009. Establishment of the Regeneration System for *Vicia faba* L. Current Issues in Molecular Biology. 11 (Suppl. 1), 47–54 (2008).
- Barik, D.P., Mohapatra, U. and Chand, P.K. 2005. Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.):factors influencing *Agrobacterium-mediated* transformation and regeneration, Plant Cell Reports, 24, 523-531.
- Bozoğlu, H. ve Topal, N. 2005. Ülkemiz İçin Yeni Yemeklik Tane Baklagil Türleri. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005. Cilt 1, S.557-562, Antalya.
- Böttinger, P., Steinmetz, A., Schieder, O. and Pickardt, T.2001. *Agrobacterium-mediated* transformation of *Vicia faba*. Molecular Breeding, 8(3), 243-254.
- Chen, H., Tang, W., Xu, C, Li, X., Lin, Y. and Zhang, Q. 2005. transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A* gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against Lepidopteran rice pests. Theoretical Applied Genetics, 111, 1432-2242.
- Chishti, N., Kaloo, Z.A., Shawl, A.S and Phalirsteen, S. 2006. Rapid *in vitro* clonal propagation of *Lavandula officinalis* chaix a multipurpose plant of industrial importance. Pakistan Journal of Biological Science, 9, 514-518.
- Chowrira, G.M. 1995. Elektroporation mediated gene transfer into intact nodal meristems *in planta*: Generating Transgenic plants vithout *in vitro* tissue culture. Molecular Biotechnology, 3, 17–23.
- Çetin, G. 2010. BAKLA (*Vicia faba* L.) bitkisinde doku kültürü çalışmaları. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Tarla Bitkileri Anabilim dalı.
- Çöçü, S. 2002. Bazı fiğ (*vida sativa l.*) Çeşitlerinde doku kültürü yöntemleriyle bitki çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Ankara, Türkiye
- Çöçü, S., Uranbey, S. ve Sancak, C. 2003. Bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 9 (4), 445-449.

Dita, M. A., Rispaill, N., Prats, E., Rubiales, D. and Singh, K. B. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, 147, 1-24.

Dörtbudak, N., Erdoğan, P. ve Aydemir, M. 1999. Orta Anadolu Bölgesi'nde depolanan mercimek ve fasulyede zararlı olan baklagil tohum böceklerinin yayılışı, bulasma oranı, yoğunlukları ve meydana getirdikleri ürün kayıpları üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 39, 1–2.

Dyke, G. V. ve Prew, R. D. 1983. Beans in Crop Rotations. (In: *Faba Bean (Vicia faba L., A Basis for Improvement*, Ed: Hebblethwaite, P.D.), 263-269, Butterworths, London. *faba. Mol. Breed.* 8, 243–254.

Erişen, S. 2003. Yonca (*Medicago sativa L.*)'da doku kültürü çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı. Ankara, Türkiye

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M. and Sánchez, F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *phaseolus* spp.: A tool for functional genomics. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19 (12), 1385–93.

Fakhrai, H., Fakhrai, F. and Evans, P.K. 1989. *In vitro* culture and plant regeneration in *Vicia faba* subsp. *Equina* (var. Spring Blaze), *Journal of Experimental Botany*, 40, 216, 813-817.

Firschbeck, G., Heyland, K. and N. Knauer. 1975. *Pflanzenbau*, Ulmer Verlag, s:166-167.

Fontana, G., Santini L., Caretto S., Frugis, G. and Mariotti, D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). *Plant Cell Reports*, 12, 194-198.

- Gamborg, O.L., Constabel, F. and Shyluk, J.P. 1974. Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum* L. *Physiol. Plantarum*, 30; 125-128.
- Gates, P., Smith, E. R. and Boulter, D. 1983. Reproductive physiology of *Vicia faba* L. (In: *Faba Bean (Vicia faba L., A Basis for Improvement*, Ed: Hebblethwaite, P.D.), 133-142, Butterworths, London.
- Gelvin, S.B. 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 227-232.
- Ghanem, S.A. 1995. *In vitro* embryo genesis of lentil under saline conditions. *Buletin of Faculty of Agriculture University of Cairo*, 46, (1),113-125.
- Grant, J.E., Pauline, A. C., McAra, A.E. and Frew, T.J. 1995. Transformation of peas (*Pisum sativum* L) using immature cotyledons. *Plant Cell Reports*, 15; 254-258.
- Hamdy, M.A.A and Hattori, K. 2006. *In Vitro* Micropropagation of *Vicia faba* Cultivars Waza Soramame and Cario 241 by Nodal Explants Proliferation and Somatic Embriyogenesis. *Biotechnology*, ISSN 1682-296X. 5 (1), 32-37,2006.
- Hamilton, D. 2005. Broadbean. Available from [http:// www. Self sufficientdsh. com](http://www.Selfsufficientdsh.com).
- Hanafy, M. S., Banna, A. El., Schumacher, H. M., Jacobsen, H.J. and Hassan, F. S. 2013. Enhanced tolerance to drought and salt stresses in transgenic faba bean (*Vicia faba* L.) plants by heterologous expression of the PR10a gene from potato. *Plant Cell Reports*, 32,663–674.
- Hanafy, M., Thomas, P., Heiko, K. and Jacobsen, H.J. 2005. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Faba bean (*Vicia faba* L.) using embriyo axes. *Euphytica*. 142, 227- 236.
- Hobbs, S.L.A., Jackson, J.A. and Mahon , J.D. 1989. Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell. Reports*. 8, 274-277.

- Hussey, G. and Gunn, H.V. 1984. Plant production in pea (*Pisum sativum* L. cv. Peugeot and Upton)) from long term callus with superficial meristems. Plant Science Letters, 37;143-148.
- Ismail, R. M., El-Domaity F.M., Nasr El-Din T.M., Sadik, A.S and Abdel-Salam, A.Z. 2006. Establishment of Regeneration System Via Organogenesis in Some Egyptian Cultivars of *Vicia faba*. Pakistan Journal of Biotechnology, 3 (1-2), 83-92.
- Jacobson, H.J. and Kysely, W. 1984. Induction of somatic embriyos in pea *Pisum sativum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3, 319-324.
- Jeleni, S., Mitrikeski, P.T., Pape, D. and Jelaska1, S. 2000. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Broad Bean *Vicia faba* L. Food Technology and Biotechnology. 38 (3) 167–172 (2000)
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology and. Reproduction. 5; 387-405.
- Keskin, Prof. Dr. H.: “BesinKimyası”, İstanbul ÜniversitesiYayımlarıSıra: 2888. KimyaFak. No : 47 FatihYayınevi Matbaası İST. (1981)
- Khalafalla, M. M and Hattori, K. 2000. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. Plant Growth Regulation, 32, 59–63, 2000.
- Khawar, K. M., Sancak, C., Uranbey, S. and Özcan, S. 2004. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. Turkish Journal of Botany, 28, 421–426.
- Khawar, K.M. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik)’te doku kültürü çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı 144, Ankara.
- Khawar, KM. and Özcan, S. 2002. Effect of Indole-3-Butyric Acid on *on Vitro* Root Development in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). Turkish Journal of Botany, 26,109-111.

- Klenotičova, H., Smykalova, I., Švabova, L and Griga, M. 2013. Resolving Browning During The Establishment of Explant Cultures in *Vicia faba* L. for Genetic Transformation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LXI (5), 1279–1288.
- Lawes, D. A., Bond, D. A. ve Poulsen, M. H. 1983. Classification, origin, breeding methods and objectives. (In: *FabaBean (Vicia faba*L., A Basis for Improvement, Ed: Hebbleth waite, P.D.), Butter worths, London.
- Lehminger-Merten, R. and Jacobsen, H-J.,1989. Plant regeneration from pea protoplastsvia somatic embriyogenesis. *Plant Cell Reports*, 8, 379-382.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D and Douglas, G.C.1998. Morfolojical traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (Q.Robur L.) at Tuallynally, Ireland. *Silvae Genetica* 47, 5-6.
- Mahmoudian, M. 2000. Mercimekte Doku Kültürü Şartlarının Optimizasyonu ve Gen Transfer Çalışmaları, Doktora tezi. Biyoteknoloji Bölümü Orta Doğu Teknik Üniversitesi. 100. Ankara.
- Manga, İ., Acar, Z. ve Ayan, İ. 1995. Baklagil Yem Bitkileri, 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Notu:7, Samsun, 342s. New York, Toronto.p. 324.
- Metry, E.A., Ismail, R.M., Hussien, G.M., Nasr El-Din, T.M and El-Itriby, H.A. 2007. Regeneration and Microprojectile -Mediated Transformation in *Vicia faba* L. *Arab Journal of Biotechnology*, 10 (1), 23-36.
- Mroginski, L.A. and Kartha , K.K. 1981. Regeneration of pea *Pisum sativum* L cv. Century) plants by *in vitro* culture of immature leaflets. *Plant Cell Reports*, 1; 64-66.
- Musallam, I.W., Al-Karaki, G.N. and Ereifej, K.I. 2004. Chemical Composition of Faba Bean Genotypes Under Rainfed and Irrigation Conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, 359-362.
- Mutasim, M., Khalafalla, H. A., El-Shemy, Rahman, S. M., Masayoshi, T., Masayoshi, T. and Masao, I. 2005. Recovery of herbicide-resistant Azuki Bean [*Vigna*

- angularis*(Wild.), Ohwi & Ohashi] plants via *Agrobacterium-mediated* transformation. African Journal of Biotechnology, 4, 61–67.
- Naimov, S., Dukiandjiev, S., and De Maagd, R. 2003. A hybrid *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin gives resistance against a Coleopteran and a Lepidopteran pest in transgenic potato. Plant Biotechnology Journal, 1,51-57.
- Natali, L. and Cavallini, A. 1987. Regeneration of pea *Pisum sativum* L plantlets by *invitro* culture of immature embriyos.Plant Breeding, 99, 172-176.
- Orman Fak. Yayınları İ.Ü. Yayın No: 3198, O. F. Yayın No: 358, (1984)Demiriz, H.“ Bitki Sistematiği II (Tohumlu Bitkiler) Ders Notları ” İstanbul (1965).
- Özbek, S. 14-15 Ocak, 1988. Uluslararası Nohut ve Mercimek Sempozyumu.Side Antalya. Mattur Ltd. Ştı 230 30 30. Ankara.pp 121-134.
- Özcan, S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation. Doktora Tezi, Leicester Üniversitesi, 166. İngiltere.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki genetik mühendisliği. Kükem dergisi,1; 69-95.
- Puonti-Kaerlas, J., Eriksson, T. and Engstrom, P. 1990. Production of transgenic pea(*Pisum sativum*) plants by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Theoretical and Applied Genetics, 80, 246-252.
- Rajesh, P.N., Muehlbaue, F.R. and Mcphee, K. 2005. Agrobacterium mediated transformation of a large genomic iInsert in chickpea. Plant & Animal Genomes XIII. Conference January 15-19, Town & Country A Convention Center San Diego, CA. Regenerated on medium containing thidiazuron. Plant Growth Regulations. 32, 59–63.
- Rehm, S. and Espig, G. 1991. The cultivated plants of the tropics and subtropics. Wikersheim, Verlag Josef Marlag, [SB 111.R4313 On reserve in the Library].
- Rezmer, Schlichting, C. R., Wächter, R. and Cornelia, I. U. 1999. Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens* induced plant tumors. Planta. 209 , 399-405.

- Russel, J. E. 1952. Soil condition and plant growth. Longmans Green and Co. London.
- Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defense against insects and pathogens. Annual Reviews in Pyhtopatology, 28,425-449.
- Sağlam, S. 2009. Tohum böceklerdne (bruchidae: coleoptera) dayanıklı transgenik fasulye (*phaseolus vulgaris* L.) Bitkilerinin elde edilmesine yönelik araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. 101. Ankara
- Sağlam, S., Çiftçi, C.Y., Khawar, K.M., Atak, M. ve Özcan, S. 2005. Fasulye bitkisinde *in planta* kosullarda gen aktarımı. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir.
- Saxena, P.K. and King , J. 1987. Morphogenesis in lentil. Plant regeneration from callus cultures of *Lens culinaris* Medik via somatic embriyogenesis. Plant Science, 52 (3); 223-227.
- Singh, R. K. and Raghuvansi, S.S. 1989. Plantlet regeneration from nodal segment and shoot tip derived Eksplants of lentil. *Lens* newsletter,16 (1); 33-35.
- Skrzypek, E., Mysza, I.C and Marcińska, I. 2012. Indirect Rganogenesis of Faba Bean (*Vicia faba* L. Minor). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 54/2, 102–108, 2012
- Snedecor, G. W. and Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods, The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Şehirali, S., 1988. Yemeklik Tane Baklagiller Ankara Üniv. Zir.Fak. Yayınları, Ders notları: 24, S: 262.
- Tsuro, M., Ikedo, H and Kato, H. 2009. Efficient genetic transformation in lavandin using *Agrobacterium rhizogenes* as vector. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science , 78, 236-241.
- Uluocak, Dr. N. “II Baklagiller. Toprak Korunması ve Yem Niteliği Bakımından Türkiye'nin Önemli Doğal Otlak Bitkileri”, İstanbul Üniv.
- Uranbey, S., Sevimay, C.S., Kaya, M.D., Dpek, A., Sancak, C., Basalma, D., Er, C. and Özcan, S. 2005. Influence of different co-cultivation temperatures, periods

- and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfer. *Biologia Plantarum*, 49 (1), 53-57.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ., 2000, Kültür Sebzeleri, Ege Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir, 196s.
- Wang, Z.Y., Sun, X.F., Wang, F., Tang, K.X. and Zhang, J.R. 2005. Enhanced Resistance of Snowdrop Lectin (*Galanthus nivalis* L. Agglutinin)-Expressing Maize to Asian Corn Borer (*Ostrinia furnacalis* Guenee). *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(7), 873-880.
- Warkentin, T.D. and McHughen, A . 1991. Crown gall transformation of lentil (*Lens culinaris* Medik.) with virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*. 10, 489- 493.
- Warkentin, T.D. and McHughen, A. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* mediated glucoronidase (GUS) gene expression in lentils (*Lens culinaris* Medik) tissues. *Plant Cell Reports*. 11(5-6), 274-278.
- Yan, B., Reddy, M.S., Collins, G.B. and Dinkins, R.D. 2000. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Reports*. 19,1090-1097.
- Yıldız E. 2008. Kanser Ve Beslenme. Hacettepe Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara (<https://www.google.com.tr/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=bakla++metabolitler+kanser+riskini+azalt+%C4%B1r+pdf>). Erişim 28.11. 2015).
- Yorgancılar, M., Babaoğlu, M., Hakki, E.E. and Atalay, E. 2009. Determination of the relationship among Old World Lupin (*Lupinus* sp.) species using RAPD and ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 8 (15), 3524-3530.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Farzad NOFOUZI

Doğum Yeri : İRAN-KHOY

Doğum Tarihi: 21/06/1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : Türkçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kouchari lisesi, Khoy-İran (1997)

Lisans : Khoy İslami Azad Üniversitesi Ziraat ve Bitki Islah -İran (1998-2002)

Yüksek Lisans: Tabriz İslami Azad Üniversitesi, Bitki Islahı -İran (2005-2007)

Hakemli Dergi

1. Gursoy, M., **Nofouzi, F** ve Başalma, D. 2015. Ankara Koşullarında Kışlık Kolzada Uygun Ekim Zamanının Belirlenmesi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2015, 24 (2):96-102

Ulusal Kongre Sunum

1. **Nofouzi, F.**, Oğuz, M.Ç., Khawar, K.M., Yüksel, C.Ö ve Ergül, A. 2015. İki Yerli Yonca Genotipinde Kotiledon Boğum eksplantlarından Bitki Rejenerasyonu. II. Ulusal Tarım kongresi, 29-31 Ekim, Afyon. Sayfa 110. Sözlü Bildiri.
2. **Nofouzi, F.**, Oğuz, M.Ç., Vaziri, P. A., Rezaei, F., Gürel, S ve Ergül, A. 2015. Şeker Pancarında (Beta vulgaris) Kotiledon Boğum Eksplantlarından Bitki Rejenerasyonu. II Ulusal Tarım kongresi, 29-31 Ekim, Afyon. Sayfa 187. Poster.

3. Hazrati, N., **Nofouzi, F.**, Khawar, K.M., Hsnzadeh, M., ÜNVER, S. İ ve Ergül, A. 2015. Bazı Arpa Genotiplerinde Soğuk Stresi Cevapına Yaprak Su Potansiyelinin (MPa) Etkisi. II. Ulusal Tarım kongresi. 29-31 Ekim, Afyon. Sayfa, 186. Poster.
4. Vaziri, P. A., Gürel, S., Yüksel, C.Ö Rezaei, F., Mutaf, F., **Nofouzi,F.**, Gürel, E., Kaya, R., Tan, A ve Ergül, A. 2015. Beta martima Yabani Pancar Gen Kaynaklarından Şeker Pancarı Nekrotik Sarı Damar Virüsüne Karşı Dayanıklı Genotiplerin Rz2 Genine Dayalı Seleksiyonu. II. Ulusal Tarım kongresi, 29-31 Ekim, Afyon. Sayfa 189.Poster.
5. **Nofouzi, F.**, YILDIRIM, M. U., ÖZDEMİR, F. A ve KHAWAR K.M. 2015. Farklı Bakla (*Vicia faba L.*) Çeşitlerinin Mikro Çoğaltımı Üzerine L-Glutamine ve Casein Hydrolysate'in Etkileri. 11. Tarla Bitkileri Kongresi 7-10 Eylül, Çanakkale. Poster.
6. **Nofouzi, F.**, GÜRSOY, M ve BAŞALMA D. 2015. Pamuk (*Gossypium hirsutum L.*) Çeşidine Uygulanan Farklı Priming İşlemleri ve Değişik Dozlarda Tuz Konsantrasyonlarının Çimlenme ve Erken Fide Gelişimine Etkisi. 11. Tarla Bitkileri Kongresi 7-10 Eylül, Çanakkale. Poster.
7. Yıldırım, M. U., Kahriz, P.P., Özdemir, F. A., **Nofouzi F** ve Khawar, K.M. 2015. Safran (*Crocus sativus L.*) Bitkisinde Farklı Hormon Ön Muamele ve Sürelerinin Korm Çoğaltımı Üzerine Etkileri. 11. Tarla Bitkileri Kongresi 7-10 Eylül, Çanakkale. Poster.
8. Gürsoy, M., **Nofouzi, F** ve Başalma D. 2015. Aspir (*Carthamus tinctorius L.*) Çeşitlerine Farklı Dozlarda Uygulanan PEG (Polietilenglikol)'in Çimlenme ve Erken Fide Gelişimine Etkisi. 11. Tarla Bitkileri Kongresi 7-10 Eylül, Çanakkale. Sözlü Bildiri.

9. Gürsoy, M., **Nofouzi, F** ve Başalma D. 2015.Humik Asit Uygulama Zamanı ve Dozlarının Kışlık Kolzada Verim ve Verim Öğelerine Etkileri. 11. Tarla Bitkileri Kongresi 7-10 Eylül, Çanakkale. Sözlü Bildiri.
10. **Nofouzi,F.**, Mirzapour, M., Valizadeh, N ve Khawar, K. M. 2013. Türkiye’de Yetiştirilen İki Önemli Bakla Çeşitlerinde Bap Ve Naa Büyüme Düzenleyici Maddelerin In Vitro Koşullarında Rejenerasyon Üzerinde Etkileri. 10. Tarla Bitkileri Kongresi 10-13 Eylül ,Konya. Poster.
11. Mirzapour, M., **Nofouzi, F.**, Valizadeh, N., KHAWAR, K. M ve KENDİR, H. 2013. Adi Fiğini Cumhuriyet Ve Kara Elçi Çeşidin Tohumlarından Gelişen Fideciklerin Morfolojik Özelleikleri Üzerine Sodyum Hipoklorit Muamelerin Etkileri. 10. Tarla Bitkileri Kongresi 10-13 Eylül ,Konya. Poster.
12. Valizadeh, N., **Nofouzi, F.**, Mirzapour, M., JANNAT, S. M ve JAVANI, M. 2013. Ekmeklik Buğday (triticum aestivum l.)’da Farklı Sulama Düzeyleri İle Mineral Ve Biyolojik Azotlu Gübrenin Verim ve Verim Üyeleri Üzerinde Etkisi. 10. Tarla Bitkileri Kongresi 10-13 Eylül ,Konya. Sözlü Bildiri.
13. **Nofouzi, F** ve Khawar K. M. 2011. Bitkilerde Gen Klonlanma Stratejileri ve Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin (GDB) Sorunlarını. 9. Tarla Bitkileri Kongresi 12-15 Eylül, BURSA. Sözlü Bildiri.
14. **Nofouzi, F.**, Rashidi, V ve Tarinejad, A.R. 2013. Kuraklık Stresi Altında Durum Buğdayın Tane Verimi ve Verim Üyelerinin Path Analizi. 9. Tarla Bitkileri Kongresi 12-15 Eylül, BURSA. Sözlü Bildiri.
15. Hajyzadeh, M., **Nofouzi, F.**, Mokhtarzadeh, S., Ahmed, H. A., Asim, M., KHAWAR, K.M ve ÖZCAN, S. 2013. Nohut bitkisinde(Cicer arietinum L.)

Embriyonik Eksen Eksplantlarından In Vitro Koşullarda Sürgün Rejenerasyonu.
9. Tarla Bitkileri Kongresi 12-15 Eylül, BURSA. Sözlü Bildiri.

16. **Nofouzi, F.**, Rashidi, V ve Tarinejad, A.R. 2009. Kuraklığa Dayanıklı Bazı İndekslerin Durum Buğday Hatlarında En İyi Grup Oluşturma ve Değerlendirmesi. 8. Tarla Bitkileri Kongresi 19-22 Ekim, HATAY. Sözlü Bildiri.

Uluslararası Kongre Sunum

1. Gürsoy, M., **Nofouzi, F** ve Başalma D. 2015. “Kışlık Kolza (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) Çeşitlerinin Ankara Koşullarında Verim ve Verim Öğeleri Yönünden Karşılaştırılması” 22-24 Ekim, III. Uluslararası KOP Bölgesel Kalkınma Sempozyumu, Bildiri Özetleri sf:37, Aksaray.
2. **Nofouzi, F.**, GÜRSOY, M ve BAŞALMA D. 2014. Susam (*Sesamum indicum* L.) Çeşitlerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkisi. Uluslararası Mezopotamya Tarım Kongresi 22-25 Eylül, Diyarbakır. Sözlü Bildiri. Sayı:1 Sayfa 89-94.
3. **Nofouzi, F** ve KHAWAR K. M. 2014.Farklı TDZ konsantrasyonların Bakla (*vicia faba* L.)’nın Filiz 99 ve Eresen 87da rejenerasyon üzerinde etkileri. Uluslararası Mezopotamya Tarım Kongresi 22-25 Eylül, Diyarbakır. Poster.
4. Rezaei, F., **Nofouzi, F.**, Kartal, Murat., Khawar, K. M ve Ünver, S. İ. 2014. çörek otu (*Nigella Sativa* l.)’nin mikro çoğaltım çalışmasında TDZ hormonunun etkisi. Uluslararası Mezopotamya Tarım Kongresi 22-25 Eylül, Diyarbakır. Poster.

5. Gürsoy, M., **Nofouzi, F** ve Başalma,D. 2014. “Bazı Kolza (*Brassica napus* ssp. Oleifera.L.) Çeşitlerinde Tuz Stresinin Çimlenme ve Erken Fide Gelişimine Etkisi”Uluslararası Katılımlı 5. Tohumculuk Kongresi 19-23 Ekim 2014, Tohumculuk Kongresi Bildiriler Kitabı 116-121s, Diyarbakır
6. **Nofouzi, F.**, Rashidi, V ve Tarinejad, A.R. 2013. Temel Bileşenler Analizi (PCA) İle Makarnalık Buğday Hatlarında Kuraklık İndekslerinin İncelenmesi. Uluslararası Bitki Islahı Kongresi 10-14 Kasım, Antalya. Sözlü Bildiri.
7. **Nofouzi, F** ve Khawar. K. M. 2013.İki Adet Türk Bakla Çeşidinde Islaha Yönelik Bitki Re jenerasyon Ve Mikro çoğaltım Çalışmaları. Uluslararası Bitki Islahı Kongresi 10-14 Kasım, Antalya. Poster.
8. **Nofouzi,F.**, Mirzapour, M., Mokhtarzadeh, S ve KHAWAR, K. M. 2013.In vitro mass proliferation of two commercially important Turkish broad bean (*Vicia faba* L.) cultivars. European Biotechnology Congress Slovakia on 16-18 May. Poster.
9. Mirzapour, M., **Nofouzi,F.**, Mokhtarzadeh, S., KHAWAR, K. M ve KENDIR, H. 2013. Effects of BAP-NAA on plant regeneration from half cotyledon explants of Turkish common vetch (*Vicia sativa* L.) cultivar Kubilay. European Biotechnology Congress Slovakia on 16-18 May. Poster.
10. Mokhtarzadeh, S., Niyazpour, F., **Nofouzi,F.**, Mirzapour, M., KHAWAR, K. M ve KIRIMER, N. 2013. Effect of BAP and NAA Plant Growth Regulators in in vitro Regeneration and Rooting of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. European Biotechnology Congress Slovakia on 16-18 May. Oral.