

T. C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***M. truncatula*'da TOHUM KOMPOZİSYONUNUN GENOMİK, PROTEOMİK,
METABOLOMİK VE MORFOLOJİK ANALİZLERİ**

ORHAN ULUÇAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışmanlar

Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

R. S. Dr. Jerome VERDIER

HAZİRAN-2013

KARS

T. C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***M. truncatula*'da TOHUM KOMPOZİSYONUNUN GENOMİK, PROTEOMİK,
METABOLOMİK VE MORFOLOJİK ANALİZLERİ**

ORHAN ULUÇAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışmanlar
Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU
R. S. Dr. Jerome VERDIER

HAZİRAN-2013
KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Orhan ULUÇAY'ın Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU ve R. S. Dr. Jerome VERDIER danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**M. Truncatula'da Tohum Kompozisyonunun Genomik, Proteomik, Metabolomik ve Morfolojik Analizleri**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **bırdığı** ile kabul edilmiştir.

07.../06/2013


Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Üye : R. S. Dr. Jerome VERDIER

Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Kemal ALTUNOĞLU



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../ 2013 gün ve/.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muzaffer ALKAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada ABD Tarım Bakanlığı Ulusal Bitki Genetik Kaynaklar Sistemi (USDA-GRIN) koleksiyonundan dört farklı ekotipten alınan *M. truncatula* tohumlarında gözlenen tohum boyutları ve kompozisyonları arasındaki farklılıklara neden olan etmenlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışmamda büyük emeği geçen, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak bilimsel katkı ve önerileri ile yol gösteren, çalışmamı yürütme ve sonuçlandırma konusunda olanakları en iyi şekilde kullanmamı sağlayan değerli danışmanlarım Yrd. Doç. Dr. Muhammet Şakiroğlu'na, Dr. Jerome Verdier'e ve Dr. Kaustav Bandyopadhyay'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca gerek yurt içinde gerekse yurt dışında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve bu çalışmayı 2013MMF-70 nolu BAP projesi ile destekleyen Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmanın yürütülmesine destek sağlayan The Samuel Roberts Noble Foundation'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Baklagiller (<i>Fabaceae s.l.</i> ya da <i>Leguminosae</i>)	1
1.2 Model Canlı Olarak <i>Medicago truncatula</i>.....	4
1.3 Tohum Gelişimi	7
1.3.1 Tohum Gelişim Aşamaları	8
1.4 <i>Medicago truncatula</i> HapMap Projesi.....	10
1.5 <i>Medicago</i> Gen Ekspresyon Profili.....	10
1.6 <i>Medicago</i> Gen Atlası (MtGEA) ve Tohum Gelişimi	12
1.6.1 <i>Medicago</i> Tohum Gelişim Sistemi	13
1.6.2 Embriyo Gelişimi	15
1.6.2.1 Embriyogenez	15
1.6.2.2 Tohum Dolum Safhası	16
1.6.2.3 Kuruma Safhası.....	17
1.6.3 Tohum Kabuğu ve Endosperm Gelişimi.....	18
1.6.3.1 Tohum Kabuğu	18
1.6.3.2 Endosperm.....	19
1.7 Tohum Gelişiminin Genomik Analizi	19
2. AMAÇ	21
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1 Materyal.....	22

3.2 Metot	23
3.2.1 Tohumların Çimlendirilmesi İçin Uygulanan Aşamalar	23
3.2.1.1 Tohumun Olgun Pod İçerisinden Ögütülüp Çıkarılması	24
3.2.1.2 Tohumların Kimyasallar ile Muamele Edilmesi	25
3.2.2 Çimlenmeye Başlayan Tohumların Toprağa Ekilmesi	27
3.2.3 Sera Koşulları	31
3.2.4 Çiçeklerin Polünasyondan (Dap) Sonra Etiketlenmesi	33
3.2.5 Enzim Solüsyonu ile Kotiledonda Hücre Sayısının Belirlenmesi	35
3.2.6 Polünasyona Uğramış Olan Çiçekte Ovul Sayımı	38
3.2.7 Nomarski (DIC) Görüntüleme için Tohumlara Uygulanan Aşamalar	40
3.2.8 Ağırlık Ölçümü ile Tohum Boyutunun Belirlenmesi	42
3.2.9 Hücre Boyutlarının Belirlenmesi	45
3.2.10 Hücre Kültür Dokularının Metabolomik Analizi Aşamaları	47
3.2.10.1 Non-Polar Metabolitlerin Hazırlanması ve Analizi	50
3.2.11 Hormonal Analiz Hazırlama Aşamaları	50
3.2.12 Proteomik Aşamalar ve Toplam Protein Ekstraksiyonunun Hazırlanması	51
3.2.13 Yapraklardaki Stoma Hücreleri Düzeyinin Belirlenmesi	52
4. BULGULAR	53
4.1 Çiçeklerde Ovul Sayılarının Belirlenmesi	53
4.2 Bekçi Hücrelerin (Stoma) Boyutunun Hesaplanması	56
4.3 Tohum Ağırlığı ve Büyüme Eğrisi Hesaplanması	62
4.4 DIC Görüntüleme ile Tohum Gelişim Aşamalarının Analizi	74
4.5 Ekotiplerde Hücre Boyutu ve Şeklinin Analizi	75
4.6 Ekotip Tohumlarının Enzim Solüsyonu İçerisinde Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi	78
4.7 Proteomik Veri Sonuçları ve Analizi (1D Jel Elektroforez)	81
4.8 Non-Polar Metabolitlerin Analizi ve Sonuçlandırılması	83
4.9 Hormonal Aşamaların Analizi ve Sonuçlandırılması	83

5. TARTIŞMA.....	88
KAYNAKLAR	89

ÖZET

Buğdaygillerden sonra insanlığın besin ihtiyacını karşılamada ikinci sırada gelen baklagiller, bugün yaklaşık olarak dünyamızın üçte birinin birincil tahıl ihtiyacını karşılamaktadır. Baklagiller endüstri için ham madde kaynağı olmasının yanında, hayvan yemi ve insan diyetinin nitelikli bir parçasıdır. Baklagiller simbiyoz ile kendi azot gereksinimlerini karşılayabildikleri için sentetik azot gübrelerine ihtiyaç duymazlar ve bu sayede sürdürülebilir tarım için kritik bir rol oynamaktadır. Bu karakteristik özellikler baklagilleri tükettiğimiz besinler için değerli bitkisel protein kaynakları haline getirmiştir. Baklagillerin üretiminin ve veriminin artırılması bu yüzden oldukça önemli bir tarımsal hedefdir. Tohum büyüklüğünün moleküler ve fizyolojik temellerinin anlaşılması ise bu tarımsal hedeflerin yakalanması için etkin bir stratejidir.

Bu çalışmada *Medicago* ABD Tarım Bakanlığı (USDA) bitki koleksiyonundan tohum boyutu ve tohum içeriği birbirinden farklı olan 4 ekotip seçilmiş bu ekotipler arasında görülen tohum kompozisyonu ve verim farklılıklarını belirleyen faktörlerin belirlenmesini amaçlamıştır. Bu amaçla her bir ekotipte morfolojik, metabolomik, proteomik ve hormonal seviyeler belirlenmiştir. Çalışma;

- (i) her bir ekotipin yukarıda sayılan analizlerle karakterizasyonunu
- (ii) bu sayede tohum büyüklüğü ve kompozisyonuna etki eden faktörlerin belirlenmesi
- (iii) bu faktörlerin bütüncül olarak değerlendirilmesi ve *Medicago* doğal aksesyonlarında tohum boyutunun ve tohum içeriğinin nasıl farklılaştığı ve baklagil tohumlarında protein depolanmasının miktarı ile birlikte hububat ve diğer baklagil türlerinde tohum verimini arttırmak için çıkarımda bulunulması hedeflenmiştir.

2013, 96 Sayfa.

Anahtar Kelimeler: Tohum, Baklagiller, Verim, Tohum Depo Proteinleri, Ekotipler, *Medicago*

ABSTRACT

Food security is one of the major issues of in the global agricultural ajanda he 21st century. Legumes rank second important plant family agricultural production following the cereal grasses owing to its role as a source of food, feed for livestock, and raw materials for industry. In a very dinamic global agricultural, legumes have a crucial role in sustainable agriculture because they supply their own nitrogen via symbiosis. Legume seeds have been important targets for classical and modern plant breeding programs that aim to optimise the amount and type of compounds produced and stored in the seed.

We have recently selected four ecotypes contrasted in seed size and protein content from the USDA *Medicago* collection. The goal of this thesis was to identify factors controlling legume seed composition and yield via characterisation each ecotype at physiological, transcriptomic, metabolomics, proteomic and hormonal levels in order to;

- (i) characterize each ecotype,
- (ii) integrate multiple data to deduce the factors that effect seed composition and content
- (iii) to infer the starategies for breeding of legumes for higher seed content and composition

2013, 96 Pages.

Keywords: Seed, Legumes, Yield, Seed Storage Proteins, Ecotypes, Medicago

SİMGELER VE KISALTMALAR

IAA	: İndolasetik asit.
PG	: Poligalakturonaz.
DAP	: Day After Polination(Polünasyondan sonraki gün).
FUN	: Fanikular doku.
KOT	: Kotiledon.
PD	: Pod duvarı.
SKL	: Sklerenkima.
TK	: Tohum kabuğu.
VT	: Vasküler Tabaka.
MtGEA	: <i>Medicago truncatula</i> gen ekspresyon profili.
LEA	: Legümin A
KEGG	: Kyoto gen ve genom ansiklopedisi.
QTL	: Quantitative trait locus.
mM	: Mikromolar
ml	: Mililitre.
μ l	: Mikrolitre.
μ g	: Mikrogram.
mg	: Miligram.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Medicago truncatula</i> 'da polünasyondan 20 gün sonraki (20 DAP) tohum kısımları.	8
Şekil 1.3.1.1	<i>Medicago</i> tohumunun gelişimi esnasında oluşan moleküler ve hücrel olaylar zinciri	9
Şekil 1.5.1	<i>Medicago</i> mikroarray çipi.	11
Şekil 1.6.1.1	Tohum gelişimi esnasındaki farklı açılardan ifade edilen 15,786 genin K-ortalamlar kümelemesi analizi	14
Şekil 1.6.1.2	K-ortalamlar kümelemesi analizine göre tohum gelişim aşamalarında genlerin aktif olarak rol aldığı süreçler	15
Şekil 3.1.1	Amerika Birleşik Devletleri USDA GRIN tohum depo kaynaklarından alınan örnekleri ve boyutları.	23
Şekil 3.2.1.1	Olgun <i>Medicago truncatula</i> pod'unun görünümü.	24
Şekil 3.2.1.1.1	Pod öğütülmesi için gerekli olan malzemeler.	25
Şekil 3.2.1.2.1	Olgun tohumların dış sert kabuğunun H ₂ SO ₄ ve sonrasında çamaşır suyu ile steril edilmesi aşamaları.	26
Şekil 3.2.1.2.2	Karanlık ortamda çimlendirme için bekletilen <i>Medicago truncatula</i> tohumlarının 3 gün sonraki görünümü.	27
Şekil 3.2.2.1	Tohum ekimi için laboratuvarında gerekli olan malzemeler.	28
Şekil 3.2.2.2	Ekim laboratuvarında, filizlenen tohumların toprağa ekim aşamaları ve seraya taşınması	29
Şekil 3.2.2.3	Ekim sonrası yaklaşık 1 hafta içerisinde topraktan filizlenip çıkan W6 4980 ekotipine ait <i>Medicago truncatula</i>	30
Şekil 3.2.3.1	The Samuel Roberts Vakfı serasının dışarıdan görünümü ve çalışma bitkilerinin bulunduğu sera ortamı.	31
Şekil 3.2.3.2	Seradaki tablalar arasındaki özel kanallar ile zeminden sulanması ve fazla suyun geri çekilmesi.	32
Şekil 3.2.4.1	Etiketlenen ekotiplerin, bilgisayar kayıtlarının tutulması.	34

Şekil 3.2.4.2	Ekotiplerden seçilen rastgele çiçeklerin günlük etiketlenmesi.	35
Şekil 3.2.5.1	Olympus, BX41 floresan mikroskop	37
Şekil 3.2.5.2	Hemositometre görünümü ve karşılıklı olarak bulundurmış olduğu lobları.	37
Şekil 3.2.6.1	W6 6018 ekotipine ait polüsyona uğramış çiçekteki ovüllerin aydınlatma mikroskobu ile sayımı.	38
Şekil 3.2.6.2	VanGuard 1100ZL analog aydınlatma mikroskobu.	39
Şekil 3.2.7.1	DIC görüntüleme için podların toplanması ve tohumların podlardan çıkarılıp hazırlanması.	41
Şekil 3.2.7.2	DIC (Nikon DXM1200, Japon) mikroskobu.	41
Şekil 3.2.8.1	Ekotiplerin henüz olgunlaşmamış pod (8 dap) görünümleri	43
Şekil 3.2.8.2	Ekotiplere ait podların farklı dap'lerdeki görünümü	43
Şekil 3.2.8.3	W6 6016 ekotipine ait <i>M. truncatula</i> podunun açılması ve tohumların tartımı.	44
Şekil 3.2.8.4	W6 6016 ekotipe ait 14 dap' lik tohumların podlardan çıkarılması.	44
Şekil 3.2.8.5	Podların toplanışı, tohumların eldesi ve tartım işlemi	45
Şekil 3.2.9.1	Kriyostat, LEICAI CM1850 mikrotom.	46
Şekil 3.2.9.2	Japon, Olympus BX41 floresan mikroskop ve hücrelerin monitör gözlemi ile sayımı.	47
Şekil 3.2.10.1	Liyafilizatör VIRTIS Freezemobile serisi Sentry 2.0 soğuk kurutma.	48
Şekil 3.2.10.2	Non polar olan süspansiyondan çözücülerin Nitrojen uygulaması ile uzaklaştırılması.	49
Şekil 3.2.10.3	Polar süspansiyonlar için Savant SPD121P SpeedVac ve buhar kapanı.	49
Şekil 3.2.13.1	Ekotiplere ait bitki yaprakları	52

Şekil 4.1.1	Ekotiplere ait çiçeklerdeki ortalama ovul sayıları grafiği.	55
Şekil 4.2.1	Ekotiplere ait bitkilerin yapraklarının fotoğraflanması.	57
Şekil 4.2.1.2	Ekotiplere ait bitkilerin yapraklarındaki stoma boyutları.	62
Şekil 4.3.1	8 dap ile 36 dap arası taze tohum ağırlık grafiği.	72
Şekil 4.3.2	8 dap ile 36 dap arası kuru tohum ağırlık grafiği.	73
Şekil 4.4.1	Farklı dap'lardaki ekotiplerin DIC görüntüleme ile embriyo gelişim aşamalarının gözlenmesi.	75
Şekil 4.5.1	Ekotiplere ait olgun tohumlarda Olympus BX41 floresan mikroskop ile hücrelerin görünümü.	76
Şekil 4.5.2	Ekotip tohumlarının birim alanda içermiş oldukları ortalama hücre sayıları grafiği.	78
Şekil 4.6.1	1.5 ml enzim solüsyonunda çözünen 3 adet tohum örneklerinin hemositometre ile sayılarının belirlenmesi ve t testi analizi ile sonuçlandırılması.	81
Şekil 4.7.1	Proteomik analiz, 1 D jel elektroforez grafiği	82
Şekil 4.8.1	Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında ABA hormon grafiği.	84
Şekil 4.8.2	Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında IAA hormon grafiği.	85
Şekil 4.8.3	Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında IAA-Asp hormon grafiği.	86
Şekil 4.8.4	Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında trans-Zeatin riboside hormon grafiği.	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.1	Bazı baklagil tohumlarında protein, yağ ve karbonhidrat kompozisyonu (Ortalama değere göre tohum ağırlığının yüzdesi)	4
Çizelge 1.2.1	Moleküler çalışmalarda kullanılan nemli baklagil ve diğer angiospermilerin nükleer DNA içeriğinin 1C (Haploit) değeri kullanılarak karşılaştırılması.	7
Çizelge 3.1.1	Amerika Birleşik Devletleri USDA GRIN tohum depo kaynaklarından alınan örnekler.	22
Çizelge 4.1.1	Ekotiplere ait bitkilerden, polünasyondan sonra alınan çiçek örneklerindeki ovul sayılarının belirlenmesi ve istatistiksel olarak anlamlandırılması.	53
Çizelge 4.2.1	Ekotiplere ait bitki yapraklarındaki stoma sayıları ve alanlarının t testi istatistik analizi ile yapılması.	58
Çizelge 4.3.1	8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları	64
Çizelge 4.3.2	Ekotiplere ait 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze tohum ağırlıklarının istatistik (t-testi) sonucu.	70
Çizelge 4.3.3	Ekotiplere ait 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta kuru tohum ağırlıklarının istatistik (t-testi) sonucu.	71
Çizelge 4.5.1	Ekotiplere ait tohumların birim alanda içermiş oldukları hücre sayıları	77
Çizelge 4.6.1	Ekotip olgun tohum örneklerinin 0.1 µl enzim solüsyonundaki hücre sayıları.	79
Çizelge 4.6.2	1.5 ml enzim solüsyonu içinde çözünen 3 tohum örneği için hücre sayılarının dağılımı.	80
Çizelge 4.8.1	Non polar bileşiklerin ekotipler arasındaki ilişkisi.	83

1. GİRİŞ

1.1 Baklagiller (*Fabaceae s.l. ya da Leguminosae*)

Baklagiller ya da bakliyat Fabaceae ailesine ait bitkilerden elde edilmektedir ve tahıllardan sonra dünyanın en büyük ikinci mahsul ürünleridirler. Petrol türevi sentetik gübrelerin maliyetleri ve çevresel sorunları araştırıldıkça baklagillerin önemi daha da artmaktadır. Global değere sahip olan bazı baklagil türleri *Phaseolus vulgaris* (fasulye), *Glycine max* (soya), *Pisum sativum* (bezelye), *Cicer arietinum* (nohut), *Vicia faba* (etli fasulye), *Vigna unguiculata* (börülce), *Lens esculenta* (mercimek), *Lupinus spp.* (acı bakla), *Arachis hypogaea* (fıstık) ve *Vicia radiata* (mas fasulyesi) bunlardan sadece bir kaç tanesidir. Yonca olarak bilinen *Medicago sativa*, Üç gül olarak bilinen *Trifolium spp.*, Burçak olarak bilinen *Vicia spp.*, *Leucaena spp.* ise baklagiller familyasından önemli değere sahip hayvansal yem ürünleri olarak kullanılmakta ve bunun yanı sıra toprak koruma, dekoratif çevre düzenlemelerinde ve diğer bazı besinler için katkı maddesi yapımında da kullanılabilirler[1].

Baklagillerin önemli cinslerinden biri olan *Medicago*[2] Kanarya adaları ve İspanya'dan Çin Halk Cumhuriyeti; Sibirya'dan Yemen'e kadar oldukça geniş bir alana yayılmıştır ve orijin merkezi olarak İran, Türkiye ve Güney Kafkaslar önerilmiştir[3]. Baklagiller *Rhizobia* ile simbiyotik ilişkileri sayesinde NH_3 'u (Amonyak) N_2 'ye (Nitrojen) indirgeyebilmektedirler[4]. Güçlü kök gelişimi ile toprak koruma özelliği ve ürettikleri organik azot sayesinde verimsiz toprakların ve mera alanlarının ıslahı çalışmalarında da önemli bir yer tutarlar[5]. Bu yüzden yeryüzünün besin üretiminde ve sürdürülebilir tarımda çok önemli bir konumda yer almaktadır[6]. Ayrıca bakteriler sayesinde tarım sistemine azot katkısı ile toprağın besin maddesindeki kimyasal ve fiziksel etmenlerin iyileşmesine katkıda bulunmaktadır[7]. Amerika Birleşik devletlerinde yıllık yaklaşık olarak 40-60 milyon ton azot, baklagiller tarafından fikse edildiği hesaplanmıştır ve bu da yaklaşık olarak 10 milyar dolarlık ekonomik girdi olarak yansımaktadır[8].

Baklagillerde simbiyotik azot bağlanması (SNF) köklerde kortikal hücrelerden gelişen ve toprakta bitki kökü ve *rhizobia* arasındaki sinyal değişimlerini takip edip ayırt eden nodul

adı verilen özel yapılar sayesinde olmaktadır[9]. Diğer yem bitkilerine göre kök, gövde ve yaprakları ile toprağın havalanmasını sağlarken öteki taraftan da derine inebilen kökleri ile derin topraklardaki besin maddelerini alabilmektedirler[10]. Baklagiller azot ihtiyaçlarını *rhizobium* aracılığıyla sağladıkları için ayrıca sentetik azot gübresi gerektirmemektedirler. Baklagil köklerinde nodul oluşumu sırasında bitki ile bakteri arasında bazı etkileşimler gerçekleşir. İlk aşamada bitki kökünden *triptofan* maddesi salgılanmaya başlar, bu salınan triptofan rizosferde bakteri çoğalmasını uyarır ve bakteriler *indolasetik asit* (IAA) üretmeye başlarlar. IAA bir kök gelişim hormonu olup bitki kökünün hızlı bir şekilde gelişmesinde ve aynı zamanda kılcal köklerin özel bir şekil almasına yardımcı olur. Sonrasında ise bakteri tarafından kök hücrelerini esnek duruma getiren *poligalakturonaz* (PG) enzimi salgılanır. Bakterinin kök hücrelerine girmesi ile birlikte kılcal köklerde korteks hücrelerine ulaşan enfeksiyon şeridi denen küçük bir borucuk oluşur. Bu borucuk sayesinde kök meristem hücrelerindeki bakterileri korteks hücrelerine taşınır ve bu arada bakterilerin hızla çoğalması nodul oluşumunu başlatır[11]. Baklagillerin havadaki gaz azotu bitkilerin kullanabileceği formata dönüştürmesi sırasında herhangi bir ekonomik girdiye ihtiyaç duymaması, buna karşın halen üretilen sentetik azot gübrelerin ekonomik maliyeti ile karşılaştırıldığında baklagillerin bu özelliğinin tarım sistemleri için çok kritik bir duruma getirmektedir[11]. Baklagiller bazı durumlarda sadece kendileri için değil kendinden sonra ekilecek bir başka baklagil olmayan ürün için de toprağa yeteri derecede azot bırakarak tarım sisteminin sentetik azot gübresi bağımlılığını azaltmaktadır[12]. İnsanoğlu özellikle proteinler, karbonhidratlar ve yağları besin kaynağı olarak görmekte ve bu üç besinin ögesini de bulunduran baklagil tohumlarına bel bağlamaktadır. Bundan dolayı baklagil tohum üretimi gıda tedarik garantisi olarak büyük bir öneme sahiptir. Önümüzdeki 30-40 yıl içinde dünya çapında hızla artan insan nüfusuna bağlı olarak besin tüketimi de aynı oranda artmaya devam edecektir[12]. Dolayısıyla, tarım için en önemli sorun artan nüfusun sürdürülebilir global yiyecek güvenliğinin iklim değişikliği, mevcut kullanılabilir arazilerin istismarı, verimli toprakların yok olması, suyun azalması, petrole bağımlı sentetik gübrelerin petroldeki olası azalmalara bağımlı olarak azalması gibi temel etkenlerden korunmasıdır[13].

Besin içeriği açısından kritik değere sahip olan baklagiller (Sülfür amino asit metiyonin miktarını az içermelerine karşın genellikle lizin içerikleri tahıl ürünlerine göre oldukça yüksektir.) doymamış yağları, yüksek lifli yapıları, amiloz nişastasını, ve özellikle de mineralleri (çoğunluğu demir) yüksek oranda içermektedir[14]. Bunun yanında sekonder bileşiklerin de geniş bir yelpazesi olan tokoferol, izoflavon ve diğer flavonoidleri kapsayan sağlık destekleyici özellikleri olan antioksidanları da içermektedir[15]. Gelişen ülkelerde hayvansal proteinlere ulaşımın zor ve maliyetinin yüksek olmasından dolayı baklagiller insan diyet proteinlerinin yaklaşık olarak %80'ini karşılamaktadırlar[16]. Hububatların besin değerleri baklagil türleri arasında ve aynı türün bile genotipleri arasında çeşitli kompozisyonlar gösterebilmektedir.

Farklı baklagil tohumlarında bu oranlar değişmektedir (Çizelge 1.1.1)[17]. Örneğin yer fıstığının tohumlarında protein içeriğinden daha çok yağ bulunmaktayken (Yer fıstığı tipik olarak %50 yağ %25 protein içerir.), diğer bazı baklagil türlerinde ise yüksek protein ve nişasta içermekte, daha düşük yağ miktarı bulunmaktadır (Fasulye %29 protein, %44 nişasta, %21 lif ve sadece %2 yağ içerirken; Sarı acı baklanın tohumları %48 protein ile az miktarda yağ içerir; Bezelye tohumları %50 nişasta, %25 protein, %15 lif ve az miktarda yağdan oluşmaktadır.). Olgun *Medicago truncatula* tohumunda kuru ağırlığın %32-42 arasında protein, %8-10 yağ asitleri, %6-10 çözülebilir şeker ve yaklaşık olarak kalan %35'lik kısmını ise polisakkaritler oluşturmaktadır[18].

Çizelge 1.1.1 Bazı baklagil tohumlarında protein, yağ ve karbonhidrat kompozisyonu (Ortalama değere göre tohum ağırlığının yüzdesi)[19].

Ortak isim	Türler	Protein	Yağ	Karbonhidrat
Nohut	<i>Cicer arietinum</i>	%22	%5	%65
Bahçe Bezelyesi	<i>Pisum sativum</i>	%25	%3	%65
Mercimek	<i>Lens culinaris</i>	%27	%1	%64
Maş Fasulyesi	<i>Vigna radiate</i>	%23	%1	%60
Soya	<i>Glycine max</i>	%38	%20	%32
Bakla	<i>Vicia faba</i>	%29	%2	%60
Fasulye	<i>Phaseolus vulgaris</i>	%23	%2	%61
Güvercin Bezelye	<i>Cajanus cajan</i>	%21	%3	%65
Börülce	<i>Vigna unguiculata</i>	%24	%1	%60
Acı Bakla	<i>Lupinus albus</i>	%48	%11	%36
Yer Fıstığı	<i>Arachis hypogaea</i>	%25	%50	%18
Yonca (Fıçı yoncası)	<i>Medicago truncatula</i>	%32	%10	%35

1.2 Model Canlı Olarak *Medicago truncatula*

Medicago truncatula'nın da içinde bulunmuş olduğu baklagiller familyası 400 cins ve yaklaşık 10.000 tür içermektedir. Ülkemizde bilinen yaklaşık 61 cins ve 900'den fazla türü bulunmaktadır[23]. Baklagillerde yapılan genetik çalışmalar diğer muadillerine göre genellikle zayıftırlar. Bunun için bir çok sebep vardır ve bunlardan önemli bazıları önemli roller oynamaktadır. Bazı kültür baklagilleri tetraploiddirler (Yer fıstığı ve soya gibi). Poliploididen dolayı büyük genomlu olanlar (Bezelye ve fasulye gibi) *in vitro* ortamda yeniden üretilmeye ve genetik transformasyonlara karşı dirençlidirler (Fasulye, bezelye ve soya). Bununla birlikte büyük genomik boyutu, bol tekrarlı DNA yapısı, karmaşık ploidi ve transgenik bitkilerin rejenerasyonu ile yaşanan zorluklar yem bitkilerinde moleküler analizlerde birçok sınırlamalara sebep olmaktadır[24]. Bu yüzden araştırmacılar son yıllarda legüm biyolojisinde özellikle nitrojen fiksasyonundan sorumlu model moleküler genetik sisteme hizmet edebilecek türler aramaya ve çalışmaya başladılar. *Melilotus alba*, bezelye ve soya gibi diğer baklagil türleri model olarak öne sürülmelerine rağmen[25]

araştırmacılar *Medicago truncatula* ve *Lotus japonicus*, iki legüm türüne yoğunlaştılar[26]. *Medicago truncatula* genomik ve genetik/fonksiyonel genomik araştırmalar için model bir baklagil türü olarak ele alınmaktadır[20]. *Medicago truncatula* sahip olduğu genom sayısı ve özellikleri bakımından diğer baklagiller arasında önemli bir yere sahiptir. Fabaceae alt familyasının üçüncü en büyük üyesi olan Papilionoideae (Sinonim Faboideae)'nin bir üyesidirler ve *Medicago* baklagillerin büyük çoğunluğuyla genetik olarak yakındır[21] ve yüksek protein verimine sahip olan önemli bir bitkidir[22]. Bitki büyümesi ve gelişmesinde model bitki olarak *Arabidopsis* sisteminin başarısı da belirgin bir şekilde ortadadır. Baklagillerden bir model bitkinin *Arabidopsis* gibi etkin transformasyon metotlarına açık olması ile ayrıntılı analizleri baklagil genetiğinde hızlı bir süreç sağlayabilecektir. Böylelikle baklagil türleri içinde belirlenen aşamalar işlevsel, yapısal, genomik ve özellikle de türler arasında bilgi bütünleşmesine büyük bir katkı sağlayacaktır. Halen dünyanın birçok bölgesinde *Medicago truncatula* üzerindeki çalışmalarını hızla devam ettirmektedir[27].

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda *Medicago truncatula* genom düzeyinde oldukça iyi analiz edilmiş ve tarımsal açıdan değerli bir çok karakterin moleküler temellerinin anlaşılmasında nitelikli veriler elde edilmiştir. *Medicago truncatula*'da elde edilen bu başarılı sonuçların elde edilmesini sağlayan temel faktörlerinin başında, bitkinin küçük bir genoma sahip olmasının ve genom içerisinde tekrar eden dizilerin ve duplikasyonların az olması ayrıca gen aktarımının kolayca gerçekleştirilebilmesi gelmektedir[26]. Bu özelliklere ilaveten *Medicago truncatula* diploid genom yapısına (Çizelge 1.2.2.1), otogam (kendi kendini dölleyebilme) üreme şekline,[28] üretken tohum üretime kabiliyetine ve hızlı nesil yetiştirebilme özelliğine sahiptir[29]. Özellikle de küçük diploid genom yapısından dolayı hem genomik hem de genetik çalışmalarda kullanımı oldukça kolay ve rasyoneldir[30]. *Medicago truncatula* küçük bir baklagil türü olmasına rağmen tarımda yüksek verimliliğe ve uyumluluğuuna, kendi kendini dölleyebilme özelliğinden dolayı da çok sayıda tohum üretme yeteneğine sahiptir[26]. Toplamda 8 temel (baz) kromozoma ve bu kromozomlar üzerine dağılmış olarak bulunan yaklaşık 800-900 milyon baz çiftine (800-900 Mbp) sahip olan *Medicago truncatula* tamamı sekanslandığı için model bitki

olarak kullanılmaktadır[31]. Özellikle mantar ve bakteri simbiyozunda, mikrobiyal ve patojenik çalışmalarda da bu üstün yapısından dolayı model olarak kullanılmaktadır[32]. 8 kromozumlu *Medicago truncatula*'nin her bir kromozomu benzer ölçülere ve küçük boyutlara sahiptir.

Sitometrik çalışmalar diploid *Medicago truncatula* DNA içeriğinin yaklaşık olarak 1.8×10^9 bp, olduğunun yanı sıra tetraploid alfalfa'nın yaklaşık olarak yarısına denk geldiğini göstermektedir (Çizelge 1.2.1)[33]. Model canlı olarak kabul görmesinden sonra *Medicago truncatula*, genetik araştırmalarda yüksek yoğunluklu genetik ve fiziksel haritalamalar[35], bir çok mutant popülasyonda EMS-indirgeme nokta mutasyonları[17], hızlı nötron bombardıman delesyonu[36] ve geniş popülasyonlarda *Tnt1* retrotranspozon eklenmesi[37] gibi genetik araçlar sayesinde *Medicago* artık moleküler çalışmalarda oldukça önemli bir bitkidir. Transkriptomik, proteomik ve metabolomik analizler için protokol ve araçları bulunmaktadır[38]. Bu kaynaklar depo protein biyosentezi ve tohum gelişimini de içeren birçok araştırma alanında uygulanabilmektedirler[18]. Bunlara ek olarak *Medicago* fonksiyonel genomik kitleleri, Gen Ekspresyon Atlas'ı, bitkinin tüm önemli organları ve tohum dahil olmak üzere gelişimsel dizileri için gen ekspresyonu verileri sağlamaktadır[40]. Son olarak *Medicago Truncatula* modeli reverz genetik deneylerde oldukça kolay bir şekilde kullanılmaktadır[41].

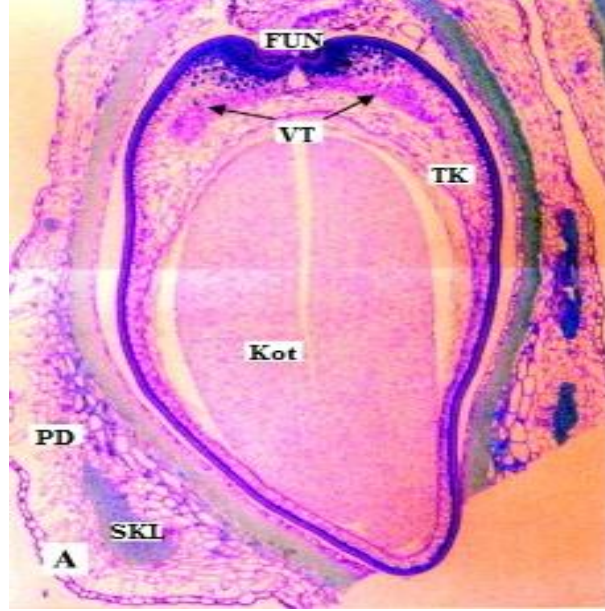
Çizelge 1.2.1 Moleküler çalışmalarda kullanılan nemli baklagil ve diğer angiospermilerin nükleer DNA içeriğinin 1C (Haploit) değeri kullanılarak karşılaştırılması. Yıldız (*) işareti baklagilleri ifade etmektedir[33,43,44,45].

Bitki	Ortak isim	Ploidi seviyesi (x)	DNA Miktarı (pg/1C)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tere	2	0.07-0.2
* <i>Medicago truncatula</i>	Yonca (Fıçı yoncası)	2	0.9
* <i>Glycine max</i>	Soya	4	0.9
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Domates	2	1.0-2.6
* <i>Phaseolus vulgaris</i>	Fransız fasulyesi	2	1.3-1.8
* <i>Medicago sativa</i>	Yonca	4	1.7
<i>Solanum tuberosum</i>	Patates	4	2.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tütün	4	3.9
* <i>Pisum sativum</i>	Bezelye	2	5.2
<i>Triticum aestivum</i>	Buğday	6	15.7

1.3 Tohum Gelişimi

Tohum gelişimi, yumurta ve merkezi hücrenin çifte döllenmesiyle başlar, tohum ana dokuları olan embriyo, endosperm ve tohum kabuğunun farklılaşması ve gelişmesi ile devam eder[46]. Tohum kabuğu ana dokudur ve gelişen embriyo için besin transferini ve koruma görevini yapar. Endosperm, merkezi hücreden oluşmuş ve besinlerle dolu triploid bir dokudur. Bitkinin fotosentez yapmaya başlamasına kadar yetecek kadar besin içerir. Embriyodan daha hızlı büyüyen ve tanede asıl besin maddelerinin depo edildiği bir organ olan endosperm, ağırlık ve hacim bakımından tohumun en büyük bölümünü oluşturur (tane ağırlığını %82-86'sini) ve homojen değildir. Embriyo (kotiledon, radikula ve hipokotil) döllenmiş yumurtadan yani zigottan oluşur ve diploittir (Şekil 2.1). Bitkinin kök, gövde, yaprak gibi kısımlarının oluşmasını sağlayan bitki taslağıdır ve embriyonik kök ve gövde taşır. Embriyonik kök meristemi, sürgün ve iki kotiledondan oluşan gelişmiş tohumun sahip olduğu besin maddeleri (protein, yağlar, nişasta ve mineraller), tohumun gelişiminin ilk

aşamalarında ve çimlenme süresince kullanılır. Tohumda bulunan protein, yağlar ve nişasta sentezinin tohum içerisinde sorumlu olduğu metabolik yolların henüz tam olarak nasıl ve hangi yolları izlediği tam olarak bilinmemektedir[47].

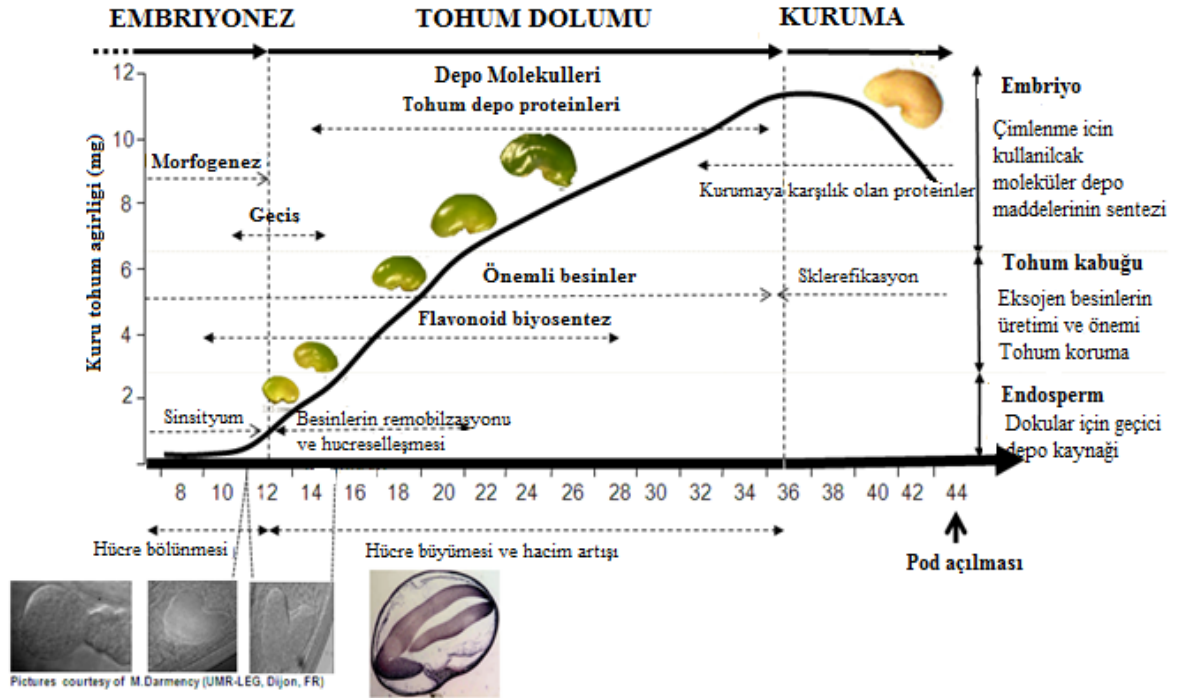


Şekil 2.1 *Medicago truncatula*'da polinasyondan 20 gün sonraki (20 DAP) tohum kısımları: Tohum kabuğu, pod duvarı ve kotiledonu (x35) içeren tohumun boyunuta kesitinin ışık mikroskobunda görünümü. FUN, Funicular dokü; Kot, Kotiledon; PD, Pod duvarı; SKL, Sklerenkima; TK, Tohum kabuğu; VT, Vasküler tabaka[48].

1.3.1 Tohum Gelişim Aşamaları

Tohum gelişimi, oldukça komplekstir ve bir çok organın ve dokunun oluşumunu ifade eden koordineli bir fenomendir. Bu yüzden farklı hücre ve doku türlerindeki binlerce genin ekspresyonun düzenlenmesi bu sürecin tamamlanmasında etkin bir şekilde rol almaktadır. Tohum ağırlığındaki değişimlere göre üç ana aşamadan geçmektedir. (Şekil 1.3.1.1) Gelişimin ilk fazı olan embriyogenezde bir çok hücre bölünmesi gerçekleşir fakat gerçekleşen çok sayıdaki hücre bölünmesine rağmen tohum ağırlığındaki artış az miktardadır. Bu faz zigotun bölünmesi ve döllenmesi ile başlar, ve angiospermiler arasında benzerlik gösterir. Embriyodan orjinlenen ve erken safhalarda oluşup embriyonun embriyo kesesine tutunmasını sağlayan suspensor ve apikal hücrelerin içinde gelişen bazal hücreler

ile oluşmaktadır[49]. Embriyogenez sırasında embriyo globular, kalp, torpedo ve kotiledon gibi birçok aşama boyunca hücre bölünmelerine ve farklılaşmalarına devam eder. Tohum ağırlığında gözlenen en fazla artış, tohum dolumu olarak bildiğimiz ikinci safha esnasında gerçekleşmektedir. Bu safhadaki kütle artışı, embriyonun kotiledonlarındaki bileşiklerin birikiminden dolayı özellikle de *Medicago*'daki depo proteinlerinin kazanılması ile oluşmaktadır. Son faz olan kuruma, fizyolojik olgunlaşma ile başlar ve tohumun su kaybetmesinden dolayı ağırlığındaki azalışa neden olur. Bu fazın sonunda tohum çimlenme süresine dek uykuya (*dormacy*) geçer[50].



Şekil 1.3.1.1 *Medicago* tohumunun gelişimi esnasında oluşan moleküler ve hücresel olaylar zinciri[51].

1.4 *Medicago truncatula* HapMap Projesi

Medicago Hapmap projesi aynı soydan gelen 384 *Medicago* çeşidini kapsayan hattan, Next Generation teknolojisini kullanılarak sekans edilmesi ve bu bireylerin saf hatlarının farklı çalışmalarda kullanılması olarak özetlenebilir. *Medicago* Hapmap projesi uluslararası işbirlikçiler ise Minnesota Üniversitesi, Ulusal Genom Araştırma Merkezi, Boyce Thompson Enstitüsü, Hamline Üniversitesi J. Craig Venter Enstitüsü, Güney Kaliforniya Üniversitesi, INRA-Montpellier Üniversitesi, ENSAT-Toulouse Üniversitesi ve Samuel Roberts Noble Vakfı'dır. Bu sekans verileri *Medicago* hatları arasındaki yüksek çözünürlükteki varyantların kopya sayısını, insersiyon/delesyon ve tek nükleotid polimorfizminin gözlemlenmesine imkan sağlamaktadır. Dolayısıyla bu süreçte oluşan moleküler veriler gen ve genom haritalama ile bu bireyler arasındaki benzerlik ilişkisinin anlaşılmasına fırsat tanınmıştır.

1.5 *Medicago* Gen Ekspresyon Profili

Medicago truncatula için gen ekspresyon profili Affymetrix GeneChip® *Medicago* Genom dizisi temeline dayanmaktadır[53]. Bu array, genom sekansından beklenen gen modellerini ve *Medicago truncatula* transkriptlerinin 50,900 prob setini, yonca (*Medicago sativa*) transkriptlerinden 1,896 prob seti ve nitrojen fikse eden simbiyotik bakteri olan *Sinorhizobium meliloti*'nin önceden tahmin edilen gen modellerinin de 8,305 prob setinin dahil olduğu toplamda 61,101 prob setinden meydana gelmiştir (Şekil 1.5.1).



Şekil 1.5.1 *Medicago* mikroarray çipi.

Mevcut *Medicago* Affimetrix gen çipi kullanılarak elde edilen etkin veriler olan çeşitli dokulara, hücre türlerine, büyüme durumlarına ve stres etkenlerin mevcut olduğu koşullarda ayrı ayrı incelenerek oldukça detaylı bir veri havuzu oluşturmuştur. Ancak tüm bu verileri hızlı ve güvenilir bir şekilde anlamlandırabilmek için, baklagil araştırmacıları için fonksiyonel genomikte veri depolamak ve eldeki verileri daha önceki çalışmalar ile karşılaştırmak için etkili ve erişilebilir bir biyoinformatik sistemine ihtiyaç duyulmaktadır[53]. Bu amaçla *Medicago truncatula* gen ekspresyon profili (MtGEA) web sunucusu geliştirilmiştir[54]. Bu sistem *Medicago* transkriptomik analizleri için oldukça değerli bir sistemdir. Genom sekanslarında farklı türlerin arasında gen benzerlikleri ile aynı türde aynı anda ifade edilen genleri izleme ve bu sayede genler arasında fonksiyon benzerlikleri konusunda çıkarımda bulunulmasına yardımcı olan sistem aynı zamanda genler hakkında daha sağlıklı bilgi edinilmesine, çoklu gen transkripsiyon veri analizlerinde kullanıcılara gen fonksiyonlarını formüle etmelerine yardımcı olan son derece gelişmiş bir sistemdir. MtGEA, yeni gen ekspresyonu verileri ve genom bilgileri ile düzenli bir şekilde <http://mtgea.noble.org/v2> ağ yapısında güncelleştirilmektedir. Bu web sunucusunun ilk

versiyonu optimal koşullar altında büyüyen bitkilerdeki olgun organların iki farklı gelişim aşaması olan kök nodülleri ve tohumlarda 20 farklı deneysel çalışmayla ilişkili 60 mikroarray ile 2008 yılında başlatıldı. Bu web tarayıcısının ikinci versiyonu farklı genetiksel alanlarda (Ekotipler, mutantlar ve transform edilmiş hatlarda) geniş bir alanı kapsayan deneysel durumlarda 64 farklı deneyde 156 mikroarray'den meydana gelen gen ekspresyon verilerine sahiptir. Gen atlasının üçüncü versiyonu deneysel aşamaların sayısının artması, gelişmiş analizler ve görüntüleme araçlarının gelişimi altında başlamış olacak. Tohum gelişimi ile ilgili olarak MtGEA (*Medicago* Gen Ekspresyon Atlas) tohumun embriyogenezden fizyolojik olgunluğuna kadar olan altı aşama içermektedir.

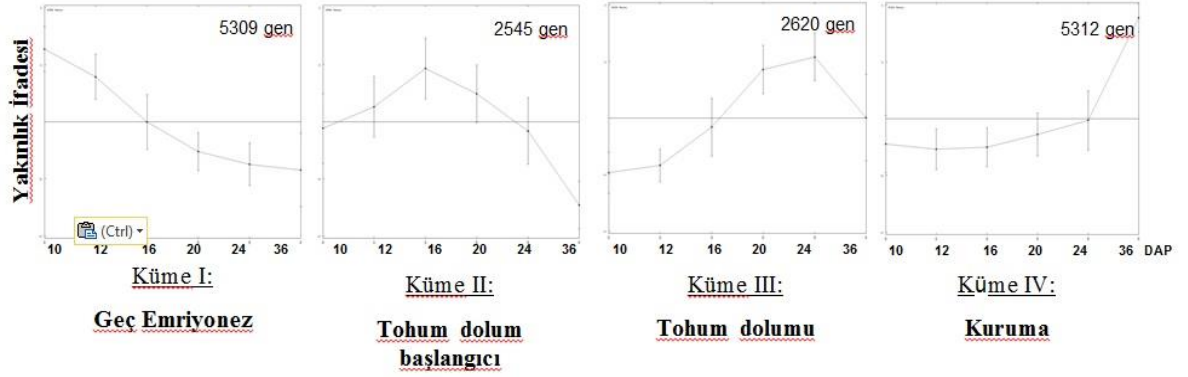
1.6 *Medicago* Gen Atlası (MtGEA) ve Tohum Gelişimi

Medicago gen ekspresyon atlası, tohum ve diğer organlar arasındaki ana fazlarda tohum gelişimi esnasında meydana gelen gen ifadesinde oluşan değişimleri kapsamlı bir şekilde ve sayısal değerlerle karşılaştırma olanağı sunmaktadır[53]. Kararlı halde bulunan mRNA seviyesindeki değişimler her zaman protein sentezi ve protein aktivitesindeki değişimleri ima etmiyor olsa da transkripsiyon faktörü herhangi bir organda birincil aşamada düzenleyici faktördür ve transkript düzeyindeki genel değişimlerin biyolojik aktiviteyi genel anlamda değiştirdiği gözlemlenmiştir. Tohum gelişiminde ve olgunlaşmasında genetik mekanizmaların düzenlenmesini sağlayan ve *Medicago* gen modellerinin ifadesini belirlemek için transkriptomik ve proteomik veriler temelinde MtGEA için altı önemli tohum gelişim evresi seçilmiştir[55]. Polünasyondan 10 gün sonraki (10 dap) örneklerde geç embriyonez uyumu gözlenmektedir. 12 dap'lık tohumlarda embriyonegezden tohum dolumuna geçiş görülmekte ve embriyonegezin hücre bölünmeleri ve depo proteinlerinin sentezinin duraksadığı ifade edilmektedir. 16, 20 ve 24 dap'lık tohumlarda aktif protein sentezi özellikle de globulinler 7S (visilin ve konvisilin) ve 11S (legümin) gerçekleşmekte, bu aktif protein sentezi aşamaları bu dap'larda tohum dolum aşamaları ile uyumlu olduğunu belirtmektedir. Son olarak 36 dap'lık olan tohumlarda, tohumun ağırlığını kaybederek kuruma fazına ve fizyolojik olgunluğa ulaşmış olduğu zaman olarak kabul edilmiştir. Tohum gelişimdeki tüm aşamalarda tohumda ifade edilen genlerin yarısından fazlası aktiftir. Bu sonuçlar aslında tohum gelişiminin genlerin büyük çoğunluğunu içeren,

metabolik ve ontolojik yolların kompleks bir karışımı olduğunu göstermektedir. Tohumlarda transkript seviyesinin diğer örneklerden 10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir[56]. Gelişmiş tohumlardaki genler arasında, yani olgun tohumlarda örneğin tohum depo proteinleri (visilin geni, Mtr.26812.1.S1_at; legüminA geni, Mtr.26812.1.S1_at; legüminJ geni, Mtr.8458.1.S1_at) ve tohum kuruması esnasındaki (örneğin, LEA, e.g. Mtr.2930.1.S1_at, Mtr.5956.1.S1_at) bazı protein kodlayan genler belirlenebilmiştir[50].

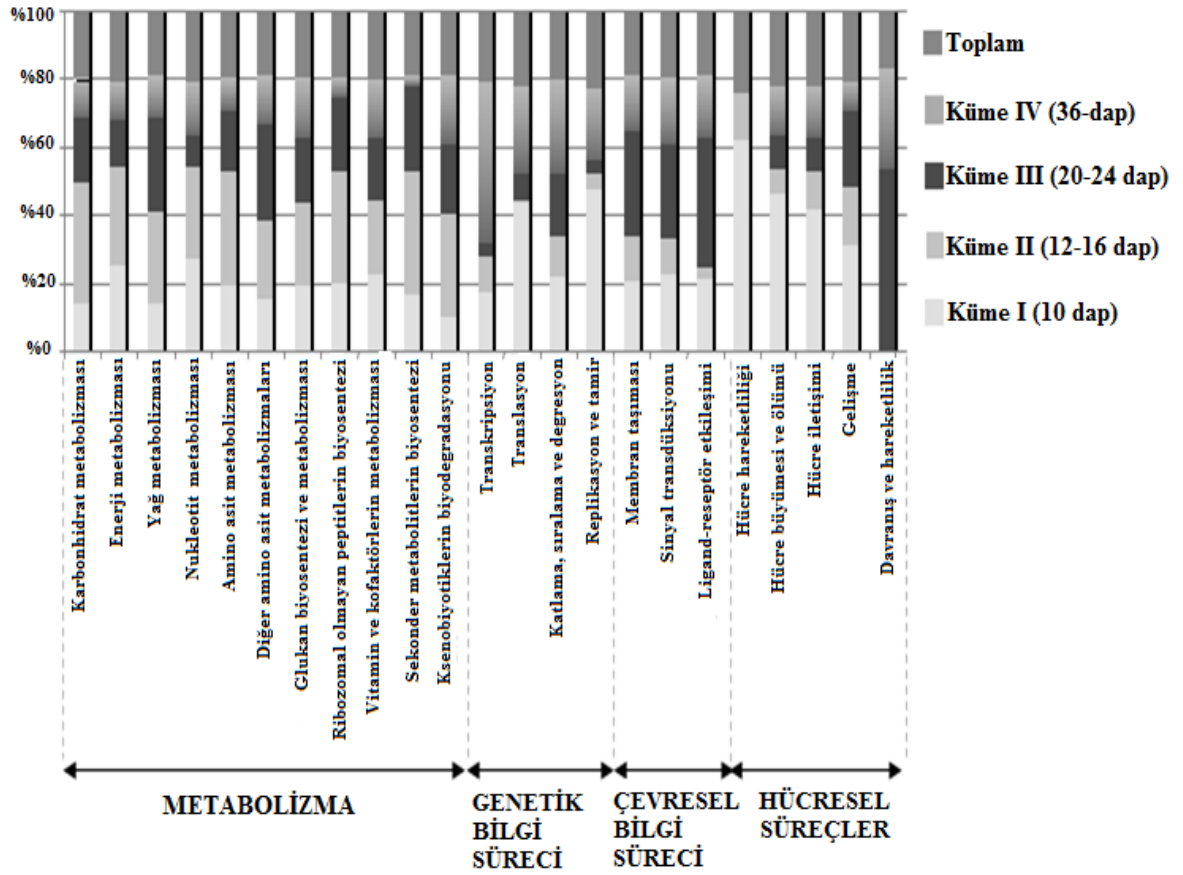
1.6.1 *Medicago* Tohum Gelişim Sistemi

Tohum olgunlaşması esnasında farklı açılardan ifade edilen genlerden 15,786 tanesi belirlenmiştir. Belirlenen altı gelişim zaman noktasında ifade edilen verilerin K-ortalamlar kümesi analizinde dört büyük küme belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 1.6.1.1). İlk küme olan (Küme I) 10 dap'ta geç embiyogenez ile ilişkili olarak ifade edilen genlerin 5,309'unun göstermiş olduğu en üst seviyeyi içermektedir. Küme II ve Küme III tohum dolumu ile ilgili olan genlerden oluşmuştur. Küme II, 16 dap'ta 2,545 genin dahil olduğu en üst seviyeyi göstermektedir. Bu küme tohumdaki depo protein ifadelerinin (14 dap visilin ve 16 dap legmin için) başlangıcı olan genlerle uygun olduğu düşünülmektedir. Küme III 20 ya da 24 dap'ta tohum depo proteinleriyle ilişkili olan 2,620 genin en üst seviyede olduğu kısmı göstermektedir[50]. Son olarak Küme IV 36 dap'ta kuruma ile ilgili olan süreci de kapsayan, transkript seviyesinin maksimum seviyeye ulaştığı 5,312 genin yapmış olduğu aşamayı belirtmektedir (Şekil 5.1.1). Tohum gelişiminin farklı aşamalarındaki metabolik ve diğer süreçlerin global bir gen ekspresyon profilini elde etmek için ve tohum gelişim aşamasında rol alan her bir genin KEGG'e (Kyoto gen ve genom ansiklopedisi) göre fonksiyonel görevini bilmek için GeneBins[57] (gen ifade verilerini sınıflandırmak için bir veri tabanı) kullanıldı. Bu sistem altı esas kısımdan oluşmaktadır; bunların dört tanesi, metabolik aşamalar, genetik bilgi süreci, çevresel bilgi süreci ve hücrel süreç bitkiler için uygun olarak görülmektedir[58].



Şekil 1.6.1.1 Tohum gelişimi esnasındaki farklı açılardan ifade edilen 15,786 genin K-ortalamalar kümelemesi analizi

Fonksiyonel olarak tohum oluşumunda etkin olan genlerin %45'inden fazlasının karbonhidrat, amino asit, yağ, enerji ve sekonder metabolitlerin sentezi için gerekli metabolik yolları kontrol ettiği bulunmuştur. Metabolik genlerin büyük çoğunluğunun da aynı şekilde tohum dolum fazındaki gelişim esnasında aktif oldukları kaydedilmiştir (Şekil 5.1.2). Genetik bilgi aktarımından sorumlu olan genlerin çoğunlukla embriyogenezde ve kuruma fazında daha belirgin olmaları hücrel farklılaşmanın oranının oldukça belirgin olduğu bu evrelerde hücrel farklılaşmada rol aldıklarını düşündürmüştür. Son olarak ise çevresel bilgi ve hücrel süreçlerde görev alan genler, 10 dap ve 10-24 dap'ta daha aktif bir konumdadırlar ve muhtemelen depo ürünlerinin parçalanması ve hücrel farklılaşmada destekleyici rol oynamaktadırlar.



Şekil 1.6.1.2 K-ortalamalar kümeleme analizine göre tohum gelişim aşamalarında genlerin aktif olarak rol aldığı süreçler[59].

1.6.2 Embriyo Gelişimi

1.6.2.1 Embriyogenez

Embriyo çok sayıda hücre bölünmesi ile döllenmiş yumurta ya da zigottan meydana gelir. Embriyo, protein, yağ, nişasta ve mineralleri içeren ve çimlenmeden sonra fidenin büyüüp gelişmesini sağlayan besinleri muhafaza eden iki tane kotiledondan; kök meristemi ve sürgünden oluşmaktadır. Embriyonegeze embriyoda globular, kalp ve torpedo olmak üzere üç ana morfolojik safha gözlemlenmektedir. Son olarak da kotiledon evresinde kıvrılmış bir yapı halini almaktadır. Bu süreç boyunca gelişmekte olan embriyo, meristemler ve aksis sürgün-kökleri boyunca bir yoğunlaşma kazanır ve daha kararlı ve

yoğun bir yapı oluşturur. MtGEA verileri kullanılarak, geç embriyonezle uyumlu olarak 10 dap'ta maksimum miktarda ifade edilen genlerin kümelemesi belirlenmiştir (Şekil 1.6.1.2). Bu kümede hücre hareketliliği, replikasyon/tamir ve hücre büyümesi ile ilişkili fonksiyonel bir gen gurubunun olduğu gözlemlenmiştir. Tüm bu süreçler yoğun bir şekilde olan hücre bölünmeleri ile bağdaştırılmıştır (Şekil 1.6.1.2).

Yapılan çalışmalara göre 10 dap'daki embriyo gözlemlenmesinde tohumun küçük bir kısmını kapsayan yapının kalp ya da torpedo şekli olduğu belirtilmiştir[60]. 12-14 dap'larda embriyodaki hücre bölünmeleri hücrenin büyüüp son halini almasına kadar yoğun bir şekilde devam ettiğini belirtmişlerdir[61]. Bezelyede tohum büyüklüğü ile kotiledon hücre sayıları arasında pozitif bir ilişki kurulmuştur[62]. Tohum dolum aşamasından önceki fazda gerçekleşen hücre bölünmeleri esnasında tohum büyüme potansiyeli kazanmaktadır. Bu yüzden Küme I'deki genler tohum boyutunu ve büyüme potansiyelini belirlemede önemli olduğu düşünülmektedir. 10 dap'da nukleotit biyosentez enzimleri ile deoksiribonukleotitlerin (Adenozin kinaz, Mtr.30425.1.S1_at, Mtr.17483.1.S1_at ya da ribonukleotit reduktazlar, Mtr.45868.1.S1_s_at, Mtr.11322.1.S1_at) replikasyon ve enerji metabolizması için maksimum olarak ifade edildiği zaman olarak kayıt altına alınmıştır. Son olarak hücre hareketliliği ve çevrenmesini sağlayan genler, (Mtr.1106.1.S1_at, Mtr.10599.1.S1_at) hücrenin şeklini belirler ve düzenler[61,62].

1.6.2.2 Tohum Dolum Safhası

Bu fazda, proteinler, yağlar ve karbonhidratların da dahil olduğu makromoleküllerin tohumda birikimi gözlemlenmektedir. MtGEA kullanılarak iki farklı tabakada genlerin maksimum ifade edildiği belirtilmiştir; Küme II'de 16 dap'da erken tohum dolumunda, Küme III'de ise geç tohum dolumunda (20-24 dap) ifade edilen genlerin maksimum seviyeye geldiğini belirlenmiştir[57]. PathExpress aracılığı ile (<http://bioinfoserver.rsbs.anu.edu.au/utills/PathExpress>) dört büyük (Karbonhidrat, amino asit, yağ ve sekonder metabolitler) metabolik yolun Küme II 16 dap ile ilişkili olarak bu safhaları düzenlediği belirlenmiştir (Şekil 5.1.2). Karbonhidrat metabolizması erken tohum gelişiminde merkezi bir konumdadır. Fakat *M. truncatula* olgun tohumlarında çözülebilir

şeker sadece %6-%10 arasında ve nişasta < %1 oranındadır[18]. Karbonhidratlar tohum gelişimi esnasında gelişim için büyük bir karbon ve enerji kaynağı sunmaktadır. Sükrozun hücrede iki önemli rolü vardır. Karbonhidrat metabolizmasında görev almasının yanında sinyal molekülü olarak da görev yapmaktadır[63]. Sükroz ve hekzoz dengesi metabolizmanın anabolizma ya da katabolizma yönünü belirler[64]. Örneğin yüksek orandaki sükroz depo proteinlerinin koordineli şekilde sentezi için sinyal olarak etki ettiği zaman hekzoz/sükroz oranı embriyo gelişimi esnasında yüksek seviyede olur fakat tohum dolmuş evresinde düşüktür[65]. Tohum dolmuş fazının sonlarında 12 dap'ta sükroz sentezi genlerinin (e.g. Mtr.22018.1.S1_s_at) aktivitesinin ve ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir[53]. *Medicago* kuru tohum ağırlığının %30'undan fazlasını oluşturan depo proteinleri ise embriyoda biriktirilir. Bu proteinler çoğunlukta globulin familyasından üç büyük tür olan legümin, visilin ve konvisilinden oluşmaktadır[18]. Bu oluşum diğer bir model canlı olan *Arabidopsis*'den farklıdır[66]. *Medicago*'da visilin genleri 14 dap'da, legüminler 16 dap'da ifade edilmektedir. Visilin için 20 dap'da, legümin K için 24 dap ve Legümin A için ise 36 dap'da maksimum şekilde ifade edildiği gözlemlenmiştir[56].

1.6.2.3 Kuruma Safhası

Bu faz tohum gelişiminde kuruma için tohumda gerçekleşen son hazırlıktır. Yaklaşık olarak 40 dap'da tohum dormansiye girer ve su kaybetmesiyle karakterize olan evredir ve pod'un açılmasıyla koordine edilir. 36 dap'tan itibaren tohum olgunlaşması için gereken proteinlerin gen ifadeleri gitgide zayıflar ve durur. (Şekil 5.1.2) Tohum içinde metabolik genlerin birçoğu fizyolojik olgunlukla beraber metabolik bir sessizlik içine girmeye başlar. Aynı zamanda MtGEA verileri bu mekanizmada var olan transkripsiyonel gen aktivitelerini, çoğu RNA polimeraz ifadeleri, transkripsiyon başlatma faktörleri ve transkripsiyon gen faktörlerinin de dahil olduğu bir çok bilgiyi içermektedir. Bu mekanizma olgun tohumdaki mRNA miktarını belirleyebilir ve bununla birlikte bu da çimlenme esnasında hızlı protein sentezini kolaylaştırabilmektedir[66].

1.6.3 Tohum Kabuğu ve Endosperm Gelişimi

MtGEA, tohum kabuğu ve endosperm ile ilgili olarak çok fazla bir bilgi içermemesine rağmen transkriptomik analizler için bu dokular ekspresyon atlasında birleştirici bir çatı görevini üstlenmektedirler.

1.6.3.1 Tohum Kabuğu

Tohum kabuğu (Testa), gelişen embriyonun etrafını saran ana dokudur (Şekil 2.1)[67]. Bu doku dış etkenlere karşı embriyoyu güvenli bir şekilde korumasına ve büyümesine yardım etmektedir[68]. *Medicago*'da tohum kabuğunun kapsamlı morfolojik bir tanımı yapılmıştır[60]. Tohum gelişimi esnasında kabuk, amino asit ve flavonoidler gibi besinlerin sentezini ve geçişini içeren ana bir yapıdır. Olgunlaştığında *Medicago*'da tohum dormansisine ve kuruma toleransına katkıda bulunmak için fiziksel bir bariyer görevi de üstlenmektedir[69]. Bazı enzimleri, transkripsiyon faktörü ve transportları kodlayan genler, bu aşamalarda fonksiyonel bir karakteristik yol göstermekte[70] ve bu yüzden MtGEA bu bakımdan temel rol oynamaktadır[71]. Erken başlayan tohum dolularında (KumeII) sekonder metabolizmanın özellikle flavonoid biyosentezindeki güçlü bir şekilde gelişimi, *Medicago* tohum gelişiminde pigment biyosenteziyle uyumlu bir şekildedir[72]. Tohum kabuğunda cereyan eden diğer önemli bir faktör ise ana dokudan embriyoya besin taşınmasıdır. Tohum kabuğu bazı besinlerin metabolizmasına dahildir, örneğin amino asit sentezlerini[73] ve erken tohum gelişimi esnasındaki minerallerin geçişini sağlamaktadır[74]. Tohum kabuğu aynı zamanda floemden çıkan sükroz için geçici bir depo kaynağıdır ve tohum dolununun başlangıcında, 13 dap'tan sonra bu depo önce sükrozu endosperme daha sonra da embriyoya taşır[61,18]. Tohum kabuğunun invertaz ile hekzoz/sükroz oranını etkileyerek embriyodaki sükrozun konsantrasyonunu belirlediği düşünülmektedir. Yani embriyogenez ve tohum dolumu arasında geçiş kontrolü sağlamaktadır[65].

1.6.3.2 Endosperm

Endosperm, embrioyu besleyen bir dokudur ve sitolojik olarak triploit (3n) yapıdadır. Bu triploit yapı iki tane polar çekirdek ile sperm nükleusunun üçlü füzyonundan meydana gelmektedir. Bu doku, olgun tohum ve fonksiyonlarının büyük bir parçası olarak gelişir. *Arabidopsis* ve *Medicago*'nun da dahil olduğu çift çeneklilerde, embriyo oluşumu sırasında besleyici bir rol oynar. Fakat kotiledonlar olgun tohumlarda depolama rezervlerinin rolünü devraldıkları zaman tohum gelişiminin sonraki safhalarında tüketilir. *Medicago*'da endosperm gelişimi *Arabidopsis*'e göre daha zayıf bir şekilde çalışıldığı vurgulanmıştır[75]. *Arabidopsis*'te endospermin gelişimi daha kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır. Bu gelişim iki faza ayrılmaktadır: Sinsityal faz, hücreleşme olmaksızın yoğun ve eş zamanlı olarak bölünmelerin gerçekleştiği evredir. Diğer bir faz ise hücreleşme fazı, endospermin polarite kazanması ve farklılaşmasını izler[76]. Mikroskopik gözlemlerine göre, 10 dap'da yüksek ploidi seviyesiyle bağlantılı olarak yaklaşık olarak 12 dap'ta *Medicago* endosperminin hücreleştiği kaydedilmiştir[60]. Tohum dolumu sırasında endospermden gelen besinler embriyodaki yerlerini değiştirirler, sonuç olarak *Medicago* endosperlerinin azalması 20 dap'tan tohum olgunlaşmasına kadar sadece az sayıda hücre tabakalarında görülmektedir[61].

1.7 Tohum Gelişiminin Genomik Analizi

Medicago truncatula ve *Pisum sativum*'da tohum gelişimi sırasında, endospermelerinde subtilaz genlerinin (SBT1.1) QTL haritalamalarında tohum ağırlığı ile ilişkili olduğunu ve kromozal pozisyonlara denk geldiğini bildirilmiştir. Tohum ağırlıkları, lokuslarda ilgili alanlarla SBT1.1 genleri arasındaki bağlantı eşitsizliği (linkage disequilibrium), gelecek ekotipler için SBT1.1 gen polimorfizmini ve tohum ağırlığı arasındaki bağlantının önemini belirtmişlerdir[77].

Medicago truncatula tohum kabuğunun, hormonal düzenleme, tohum permabilitesi, tohum kompozisyonu ve tohum boyutu gibi etmenlerin tohum kalitesinin belirlenmesinde rol oynadığını gözlemlenmiştir. *M. truncatula* tohum kabuğunun gelişimi esnasında hücrel ve moleküler olayları histolojik ve transkriptomik veri analizlerinin kombinasyonları ile tohumun en son halinde (olgun) tohum kabuğunun içermiş olduğu özellikleri fonksiyonel

ve hedef genleri araştırmışlardır. Genel olarak bu genlerin büyük çoğunluğunun tohum kabuğunda ifade edildiği belirtilmiştir[78].

Medicago truncatula'da tohum gelişiminin diğer legmlerle hemen hemen benzer özellikler göstermekle beraber sadece *Medicago truncatula*'da embriyogenezin erken safhalarında ve olgunlaşmanın ortalarına kadar nişastanın geçici olarak depolanmasının tohum kabuğu ve embriyoda oluştuğu belirlenmiştir. Bu özelliğin sebebi olarak da embriyonun erken gelişimine ve bazı reverz sentezlere katkıda buldukları önerilmiştir[18].

Tohum boyutu ve tohum ağırlığının bitkinin içinde bulunmuş olduğu çevreye göre farklılık gösterip göstermediğini araştırma amacıyla bezelyenin iki genotipi tarla, sera ve büyüme çemberi olmak üzere üç farklı ortamda yetiştirilmiş ve tohum boyutu ve ağırlığının farklılık gösterebileceği gözlemlenmiştir. Tohum büyüme oranlarını ve tohum dolununun başlangıcındaki kotiledonlardaki hücre sayıları arasındaki farkın ilişkisini de tanımlanmiştir. Kotiledonlarındaki hücre sayılarının farklı ortamlarda farklılık gösterdiği de aynı çalışmada kaydedilmiştir[79].

Farklı bitkilerde yapılan post-genomik analizlerin sonucunda tohum dolum sürecinde (LEC1, LEC2, ABI3 ve FUS3) düzenleyici protein ve genlerin tohum yapısını düzenlediği ve bunların bitkiden bitkiye değişiklik göstermenin yanında farklı çevresel koşullardan etkilendiği bulunmuştur. Buradan yola çıkılarak dikotiledonlularda tohum dolumu esnasında depo protein sentezinin transkripsiyonel kontrolü, metabolitler ve bitki hormonlarının aktivitesinin yanı sıra fizyolojik ve çevresel şartlardan da etkilendiği tespit edilmiştir[80].

2. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, baklagillerin model bitkisi olan *Medicago truncatula* kullanılarak doğal varyasyon gösteren tohum büyüklüğüne ve tohum kompozisyonuna etki eden morfolojik, genomik, proteomik, metabolomik ve hormonal faktörleri bütüncül olarak ele almak; buradan yola çıkarak baklagillerde ekonomik ve zirai açıdan çok önemli olan bu iki karakterin oluşum mekanizmaları hakkında çıkarımda bulunmaktır.

3. MATERYAL VE METOT

Farklı ekotipler kullanılarak *Medicago truncatula* tohumlarının içermiş oldukları tohum kompozisyonlarını ve boyutlarını etkileyen etmenleri belirleyebilmek amacıyla yapılan bu çalışma Eylül 2012 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Oklahoma eyaletinde bulunan The Samuel Roberts Noble Vakfı, Bitki Biyolojisi bölümünde yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Araştırmada tohum büyüklüğü ve tohum kompozisyonu farklılık gösteren çeşitli ekotiplere ait (Çizelge 3.1.1) *Medicago truncatula* tohumlarındaki bu farklılığın temellerini belirlemek amacıyla 4 farklı ekotipteki bitki tohumlarını (Şekil 3.1.1), Amerika Birleşik Devletleri Tarım bölümü olan *Medicago* USDA bitki koleksiyonundan 2012 yılında temin edilmiştir.

Çizelge 3.1.1 Amerika Birleşik Devletleri USDA GRIN tohum depo kaynaklarından alınan örnekler.

Aksesyon adı	Aksesyon	Tür adı	Ekotip/Bölge	Belirleyen
A17	W6 33951	<i>Medicago truncatula</i>	ABD	Belli değil
W6 6016	PI 660404	<i>Medicago truncatula</i>	Kıbrıs	K.A. ve I. Lesisns
W6 6018	PI 660406	<i>Medicago truncatula</i>	Almanya	K.A. ve I. Lesisns
W6 4980	PI 660360	<i>Medicago truncatula</i>	Fransa	K.A. ve I. Lesisns



Şekil 3.1.1 Amerika Birleşik Devletleri USDA GRIN tohum depo kaynaklarından alınan örnekleri ve boyutları.

3.2 Metot

3.2.1 Tohumların Çimlendirilmesi İçin Uygulanan Aşamalar

Medicago truncatula tohumları, bitkinin oluşturmuş olduğu podların (Meyve) içerisinde yer almaktadır. Bu podların dış yüzeyleri koruma amaçlı olarak diken şeklindeki bobinlerle kaplıdır (Şekil 3.2.1.1). Podlar olgunlaşmalarını tamamladıktan sonra normal koşullarda kısa bir süreç içerisinde sert dış yapılarından dolayı kendi kendilerine açılmazlar. Doğal koşullarda pod toprağa düştüğü zaman uygun çevre şartları, nemli toprak gibi etmenlerin varlığı oluşuncaya kadar podlar, içinde barındırmış oldukları tohumları korumaktadırlar[81]. Uygun şartlar oluştuğu zaman pod kabuğu yumuşamaya başlar ve tohumlar salınmış olur. Olumlu çevre şartının oluşmaması veya mekanik bir etkinin uygulanmaması durumunda tohum yıllar boyunca kendini koruyabilmektedir[82]. Bu yüzden laboratuvar ortamında muhafaza ettiğimiz kuru podlarımızdan mekanik yollar aracılığıyla kabuğunu kırarak tohumlarımızı elde etmekteyiz.



Şekil 3.2.1.1 Olgun *Medicago truncatula* pod'unun görünümü.

Medicago truncatula'da podlarımızdan tohumlarımızı mekanik yollarda laboratuvar ortamında elde ettikten sonra (Şekil 3.2.1.1), tohumların da dış taraflarındaki tohum kabuğunun oldukça sert bir yapıya sahip olduğunu ve çimlenme süreci için elimizde bulunan tohumlara bazı kimyasal yollar uygulayarak kabuğun yumuşamasını ve çimlenmenin kolaylaştırılmasını sağlamalıyız.

3.2.1.1 Tohumun Olgun Pod İçerisinden Ögütülüp Çıkarılması

Materyal olarak kullanılan alet tabanında yaklaşık olarak 3 mm kalınlığında kıvrımlı bir kauçuk kaplaması olan ve el ile rahatlıkla kavranabilecek bir tutacağa sahip 10 cm boyunda silgi biçiminde ağaçtan yapılmış ezici alet ve yine aynı şekilde tabanında kıvrımları ve oyukları bulunan (35 cm genişliğinde, 60 cm uzunluğunda ve 8.5 cm yüksekliğinde) ağaçtan yapılmış yuvarlak tepsi şeklindeki alet ile podları (Meyve), yavaş bir şekilde içerisinden çıkacak olan tohumlara zarar vermeden bu özel tepsinin içerisinde ezerek salınmasını sağlandı. Podlardan çıkan tohumları pod kabuklarından ayırmak için ise toplamda üç katmandan oluşan metal bir elek kullanıldı. Bu metal eleğin en üst tabakası geniş porlara, orta tabakası üst seviyeye göre biraz daha küçük porlara ve en alt tabaka ise podların ezilmesinden dolayı çıkan tozların ve tohumlardan daha küçük olan parçaların

tohumlardan ayrılmasını sağlar ve bu materyalleri taban boşluğuna ulaştırır. *Medicago truncatula* tohumları genel olarak ilk aşamayı geçmekte fakat orta aşamada kalmaktadır. Pod parçaları ise genel olarak ilk aşamada kalmaktadır. (Şekil 3.2.1.1.1)

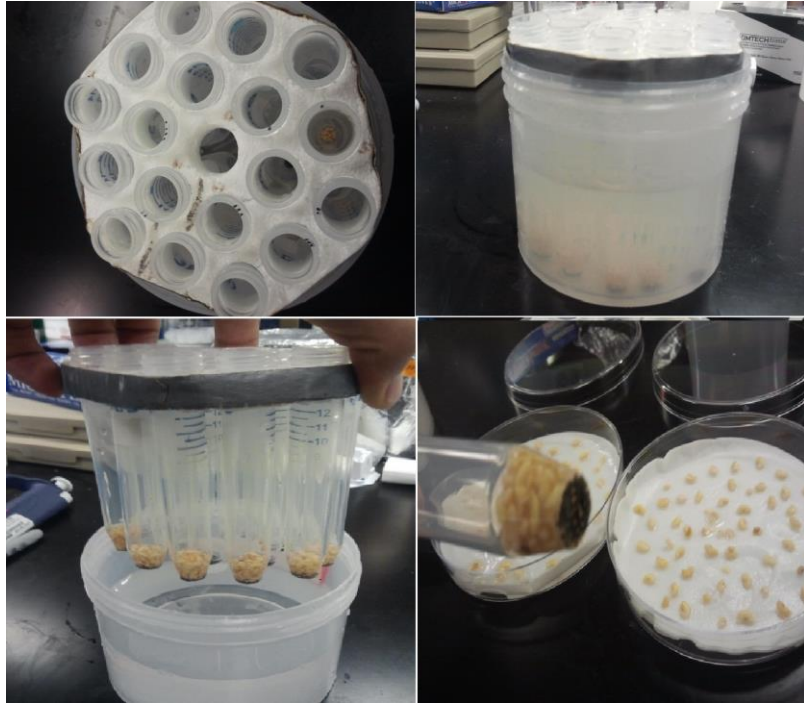


Şekil 3.2.1.1.1 Pod öğütülmesi için gerekli olan malzemeler.

3.2.1.2 Tohumların Kimyasallar ile Muamele Edilmesi

Medicago truncatula tohum kabuğu hidrofobik bir yapıya sahiptir ve dış yüzeyi mumsu bir yapı ile çevrilidir. Çimlenmenin başlaması için oksijen ve suyun tohumun içerisine nüfus etmesi gerekmektedir normal şartlarda herhangi bir işlem yapmadan tohumun toprak yüzeyince çimlenmesi için geçen süre bir haftayı aşkın olmaktadır. Çalışmamızda sert yapıya sahip olan tohumlarımızı çimlendirmek için öncelikle tohumları ekotip numaralarına göre, taban kısımları süzgeç şeklinde delikli olan falkon tüplerine her tüpe 10-12 adet tohum koyularak yerleştirildi ve yuvarlak plastik bir kutunun içine sülfürik asit ile temas edebileceği şekilde 10 dk. boyunca hafifçe temas sağlanacak şekilde karıştırıldı. Sülfürik asit ile muamele edilen tohumlar 10 dakikanın sonunda asitten çıkarıldı ve distile sudan 3-4

kez geçirildi. Daha sonra tohumları yüzey temizliğinden dolayı asitten iyice arındırılması için hazırlanmış olan %30'luk çamaşır suyu + 2 damla tween20 karışımının içerisine 4 dk. boyunca bırakıldı ve bu sürenin sonunda tohumlar 8-10 kez distile sudan geçirilip +4 derecede soğuk odada 36 saat boyunca muhafaza edildi. Bu 36 saatin sonunda tohumlar soğuk odadan çıkarıldı ve çimlenme süreci olan bir sonraki asama için ayrı ayrı petri kapları hazırlandı. Hazırlanan petri kaplarının tabanlarına iki kat olacak şekilde filtre kâğıdı yerleştirildi ve iyonsuz su ile filtre kâğıtları iyice nemlendirildi, daha sonra tohumları bu filtre kâğıdının üzerine yaydıktan sonra kapağını kapatıp oda sıcaklığında karanlık ortamda çimlenmenin sağlanması için 2-3 gün boyunca saklandı (Şekil 3.2.1.2.1). Oda sıcaklığında geçen bu süreç sonunda petrilere bulunan tohumların %80-%90'nin çimlenmeye başladığını ve yaklaşık olarak 5 mm ile 10 mm arasında sürgünlerin oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.2.1.2.2).



Şekil 3.2.1.2.1 Olgun tohumların dış sert kabuğunun H_2SO_4 ve sonrasında çamaşır suyu ile steril edilmesi aşamaları.



Şekil 3.2.1.2.2 Karanlık ortamda çimlendirme için bekletilen *Medicago truncatula* tohumlarının 3 gün sonraki görünümü.

3.2.2 Çimlenmeye Başlayan Tohumların Toprağa Ekilmesi

Çimlenmeye başlayan tohumlar Samuel Roberts vakfının tohum ekim laboratuvarında ekim için hazır konuma getirildikten sonra laboratuvarında bulunan ekim malzemeleri ile ekime başlandı. Öncelikle ekotiplerden beşer adet çimlenmeye başlamış filiz seçildi daha sonra çalışma için kullanılacak 36'lık viyol (her biri 4.5 cm x 3 cm), delikli çimlendirme tepsisi, normal deliksiz çimlendirme tepsisi, plastik şeffaf kubbe ve plastik etiketleme malzemeleri hazır konuma getirildi (Şekil 3.2.2.1).



Şekil 3.2.2.1 Tohum ekimi için laboratuvarında gerekli olan malzemeler, **a**; delikli olmayan tepsi, delikli tepsi ve viyol. **b**; şeffaf kubbe. **c**; kullanılacak bitkiye, seraya ve toprak koşuluna göre etiketler. **d**; etiketler için ekim laboratuvarında sera kurallarını belirten tablo. Turuncu, transgenik bitkiler; sarı, transgeniklerle aynı ortamı paylaşan fakat transgenik olmayan bitkiler; kırmızı, herhangi patojenle bitkinin kontrollü olduğunu; beyaz, transgenik olmayan ve aynı ortamı paylaşmayan bitki etiketleridir.

Öncelikle taban kısımda deliksiz çimlendirme tepsi onun içerisine ise delikli çimlendirme tepsi yerleştirildi bunun amacı ilk aşamalarda çimlenme sürecinde bol şekilde gerekli olan suyun, tepsi içerisinde bulunan delikli tepside gitmemesidir. Viyolun içerisine herhangi bir organizma içermeyen steril edilmiş topraktan (Metro-Mix 830 toprak karışımı) her bir karenin içerisini dolduracak kadar yerleştirildi (Şekil 3.2.2.2).



Şekil 3.2.2.2 Ekim laboratuvarında, filizlenen tohumların toprağa ekim aşamaları ve seraya taşınması

Bu aşamayı takiben toprak, bol bir şekilde sulandı bir kaç dakikanın sonunda çimlenmeye başlamış filizler belli bir sıra ile ekotiplere göre toprağa ekildi daha sonra üzerleri toprakla kapatıldı. Bitkiler transgenik olmadıkları ve toprak herhangi bir organizma içermediği için viyoller bunun göstergesi olan sari (Sari etiket, bitkinin transgenik olmadığını, fakat farklı tablalarda olmak şartı ile transgeniklerle aynı sera koşulunda olduğunu göstermektedir.) renkli plastik etiketlerle ve üzerlerinde çimlenmeye başlayan tohumun viyollere ekim tarihi, çalışma laboratuvarının bilgisi ve ekotip isimleri yazılarak viyollere eklendi. İçerisinde bulundurmuş olduğu suyun buharlaşma ile kaybını engellemek için viyolun üzeri özel plastik şeffaf bir kubbe ile filizlenmenin başlangıcına kadar kapatıldı (Şekil 3.2.2.3). Hazırlanan çimlendirme tepsisi, laboratuvardan uygun koşulların bulunduğu seraya taşıma aracı ile taşındı. İlerleyen günlerde bitkinin büyümesi ile birlikte uzayan kök ve gövdelerin daha fazla topraktan faydalanması için bitkiler viyollerden alınıp daha büyük olan saksılara aktarıldı.



Şekil 3.2.2.3 Ekim sonrası yaklaşık 1 hafta içerisinde topraktan filizlenip çıkan W6 4980 ekotipine ait *Medicago truncatula*

3.2.3 Sera Koşulları

Medicago truncatula için uygun çevre şartlarının oluşması için seradaki sıcaklık, nem, ışık, yansıma, havalandırma ve sulama gibi durumların son derece hassas olması gerekmektedir. Bu yüzden sadece *Medicago truncatula* türünün bulunduğu W14 kapı numaralı sera bu tür için en iyi şartların oluşturulduğu kısımdır (Şekil 3.2.3.1).



Şekil 3.2.3.1 The Samuel Roberts Vakfi serasının dışarıdan görünümü ve çalışma bitkilerinin bulunduğu sera ortamı.

Seradaki gündüz sıcaklık değeri 20 ile 25 °C, gece sıcaklık değeri ise 15 ile 22 °C arasındadır. Bu sıcaklık değerleri seranın dış ortamdan çok iyi ve düzenli bir şekilde izole

edilmesi ile sürekli aynı değerlerde korunmaktadır. Foto periyodu (16/8) gün boyunca gündüz 16 saat, toplam karanlık gecen süre ise 8 saattir. Bağıl nem oranı %70 ve ışık yoğunluğu $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olan serada düzenli olarak haftalık pestisit kontrolü yapılmaktadır. Seradaki sulama işlemi otomatik olarak yapılmaktadır. Bitkilerin üzerinde bulunduğu tabla zeminden günde bir kez sabit bir düzeyde su ile dolmaktadır. Bu tablayı geçmeyecek şekilde dolan su 20 dakika boyunca bitki saksılarının altındaki deliklerden toprak aracılığı ile alınmaktadır. 20 dakikanın sonunda sistem otomatik olarak vermiş olduğu fazla suyu özel kanalları ile geri çekmektedir (şekil 3.2.3.2).



şekil 3.2.3.2 Seradaki tablalar arasındaki özel kanallar ile zeminden sulanması ve fazla suyun geri çekilmesi.

3.2.4 Çiçeklerin Polünasyondan (Dap) Sonra Etiketlenmesi

Çiçeklenmenin gözlemlendiği bitkilerde çalışmanın belirli aşamalarının takibi için bitkilerin oluşturacakları podların (meyve) kaç günlük olduğunun bilinmesi gerekmektedir. Bunun için serada gözlemlenen çiçekler polünasyondan sonraki gün (dap) rastgele bir şekilde seçildi ve üzerinde etiketlemenin yapıldığı tarih yazılarak çiçeklere zarar vermeyecek şekilde bağlandı. Etiketlenen çiçeklerin tarihleri ve dap'ları bilgisayar ortamında sürekli güncellenerek kaydedilmektedir (Şekil 3.2.4.1). Etiketin ilk bağlandığı gün o çiçek için 1 dap olarak öngörülmektedir. Sürekli ve tekrarlı bir şekilde yapılan bu etiketleme işleminde bitkinin daha fazla meyve vermesini sağlamak için etiketlenmemiş olan meyvelerin toplanması gerekmektedir. Bunun amacı bitkinin koparılan meyvenin yerinde olan boşluğun doldurulmasıdır. Serada yapılan bu işlemde ortalama olarak her iki günde bir, dört ekotip için her ekotipten 50 çiçeğin etiketlenmesi yani toplamda 200 çiçeğin etiketlenmesi yapılmıştır. Farklı zamanlarda yapılan bu etiketlemeler, yapılan bir çalışmada birbirinden farklı zamanlarda etiketlenmiş bitkilerinin podlarının aynı anda karşılaştırılmasına ya da aynı anda farklı dap'ların çalışılmasını olanak kazandırmaktadır. Örneğin yapılacak olan bir tohum ağırlık çalışması için her ekotipten 8 dap, 10 dap ve 12 dap'lık podların tohumlarının aynı zamanda çalışılmasına ve zaman kazanılmasına olanak sağlamaktadır. Çalışma sürekli tekrarlı bir şekilde yapıldığından dolayı yaklaşık olarak dört ekotip için 7500 adet çiçek etiketlenmiştir (Şekil 3.2.4.2).

DAYS AFTER POLLINATION (DAP)

Etiket günü	Polusyon	2	4	6	7	8	9	10	11	12	14	16	18	20	22
8-Oct	7-Oct	9-Oct	11-Oct	13-Oct	14-Oct	15-Oct	16-Oct	17-Oct	18-Oct	19-Oct	21-Oct	23-Oct	25-Oct	27-Oct	29-Oct
9-Oct	8-Oct	10-Oct	12-Oct	14-Oct	15-Oct	16-Oct	17-Oct	18-Oct	19-Oct	20-Oct	22-Oct	24-Oct	26-Oct	28-Oct	30-Oct
10-Oct	9-Oct	11-Oct	13-Oct	15-Oct	16-Oct	17-Oct	18-Oct	19-Oct	20-Oct	21-Oct	23-Oct	25-Oct	27-Oct	29-Oct	31-Oct
11-Oct	10-Oct	12-Oct	14-Oct	16-Oct	17-Oct	18-Oct	19-Oct	20-Oct	21-Oct	22-Oct	24-Oct	26-Oct	28-Oct	30-Oct	1-Nov
13-Oct	12-Oct	14-Oct	16-Oct	18-Oct	19-Oct	20-Oct	21-Oct	22-Oct	23-Oct	24-Oct	26-Oct	28-Oct	30-Oct	1-Nov	3-Nov
15-Oct	14-Oct	16-Oct	18-Oct	20-Oct	21-Oct	22-Oct	23-Oct	24-Oct	25-Oct	26-Oct	28-Oct	30-Oct	1-Nov	3-Nov	5-Nov
16-Oct	15-Oct	17-Oct	19-Oct	21-Oct	22-Oct	23-Oct	24-Oct	25-Oct	26-Oct	27-Oct	29-Oct	31-Oct	2-Nov	4-Nov	6-Nov
18-Oct	17-Oct	19-Oct	21-Oct	23-Oct	24-Oct	25-Oct	26-Oct	27-Oct	28-Oct	29-Oct	31-Oct	2-Nov	4-Nov	6-Nov	8-Nov
19-Oct	18-Oct	20-Oct	22-Oct	24-Oct	25-Oct	26-Oct	27-Oct	28-Oct	29-Oct	30-Oct	1-Nov	3-Nov	5-Nov	7-Nov	9-Nov
24-Oct	23-Oct	25-Oct	27-Oct	29-Oct	30-Oct	31-Oct	1-Nov	2-Nov	3-Nov	4-Nov	6-Nov	8-Nov	10-Nov	12-Nov	14-Nov
29-Oct	28-Oct	30-Oct	1-Nov	3-Nov	4-Nov	5-Nov	6-Nov	7-Nov	8-Nov	9-Nov	11-Nov	13-Nov	15-Nov	17-Nov	19-Nov
31-Oct	30-Oct	1-Nov	3-Nov	5-Nov	6-Nov	7-Nov	8-Nov	9-Nov	10-Nov	11-Nov	13-Nov	15-Nov	17-Nov	19-Nov	21-Nov
2-Nov	1-Nov	3-Nov	5-Nov	7-Nov	8-Nov	9-Nov	10-Nov	11-Nov	12-Nov	13-Nov	15-Nov	17-Nov	19-Nov	21-Nov	23-Nov
5-Nov	4-Nov	6-Nov	8-Nov	10-Nov	11-Nov	12-Nov	13-Nov	14-Nov	15-Nov	16-Nov	18-Nov	20-Nov	22-Nov	24-Nov	26-Nov
6-Nov	5-Nov	7-Nov	9-Nov	11-Nov	12-Nov	13-Nov	14-Nov	15-Nov	16-Nov	17-Nov	19-Nov	21-Nov	23-Nov	25-Nov	27-Nov
8-Nov	7-Nov	9-Nov	11-Nov	13-Nov	14-Nov	15-Nov	16-Nov	17-Nov	18-Nov	19-Nov	21-Nov	23-Nov	25-Nov	27-Nov	29-Nov
15-Nov	14-Nov	16-Nov	18-Nov	20-Nov	21-Nov	22-Nov	23-Nov	24-Nov	25-Nov	26-Nov	28-Nov	30-Nov	2-Dec	4-Dec	6-Dec
19-Nov	18-Nov	20-Nov	22-Nov	24-Nov	25-Nov	26-Nov	27-Nov	28-Nov	29-Nov	30-Nov	2-Dec	4-Dec	6-Dec	8-Dec	10-Dec
3-Dec	2-Dec	4-Dec	6-Dec	8-Dec	9-Dec	10-Dec	11-Dec	12-Dec	13-Dec	14-Dec	16-Dec	18-Dec	20-Dec	22-Dec	24-Dec
9-Dec	8-Dec	10-Dec	12-Dec	14-Dec	15-Dec	16-Dec	17-Dec	18-Dec	19-Dec	20-Dec	22-Dec	24-Dec	26-Dec	28-Dec	30-Dec
14-Dec	13-Dec	15-Dec	17-Dec	19-Dec	20-Dec	21-Dec	22-Dec	23-Dec	24-Dec	25-Dec	27-Dec	29-Dec	31-Dec	2-Jan	4-Jan
19-Dec	18-Dec	20-Dec	22-Dec	24-Dec	25-Dec	26-Dec	27-Dec	28-Dec	29-Dec	30-Dec	1-Jan	3-Jan	5-Jan	7-Jan	9-Jan
12-Dec	11-Dec	13-Dec	15-Dec	17-Dec	18-Dec	19-Dec	20-Dec	21-Dec	22-Dec	23-Dec	25-Dec	27-Dec	29-Dec	31-Dec	2-Jan

Şekil 3.2.4.1 Etiketlenen ekotiplerin, bilgisayar ortamında kayıtlarının tutulması



Şekil 3.2.4.2 Ekotiplerden seçilen rastgele çiçeklerin günlük etiketlenmesi ve etiketleme gününün belirtilmesi.

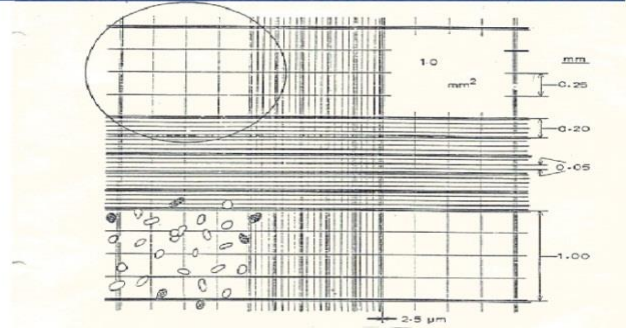
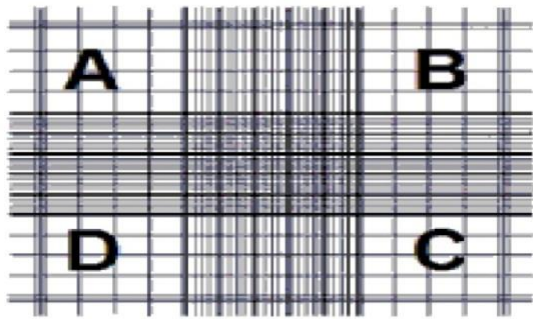
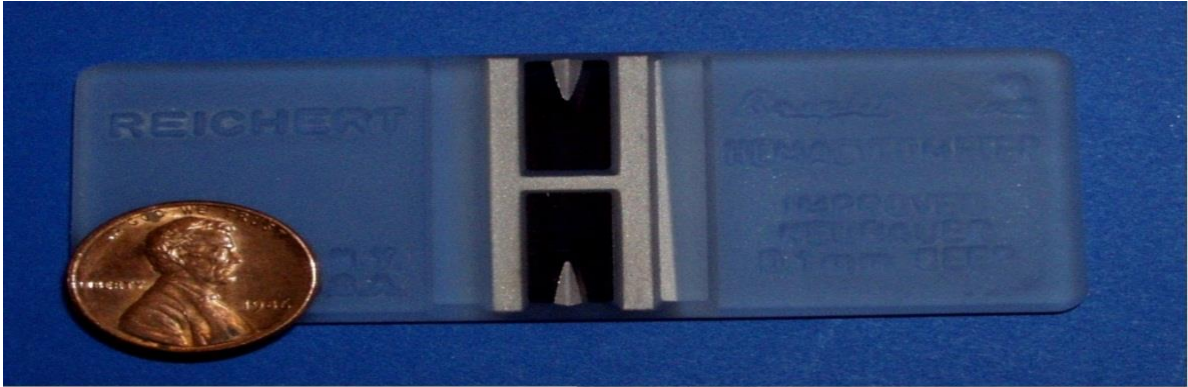
3.2.5 Enzim Solüsyonu ile Kotiledonda Hücre Sayısının Belirlenmesi

Olgun tohumların kotiledonlarındaki hücre sayısının belirlenmesi için öncelikle ekotiplerden rastgele bir şekilde üçer adet alınan tohumlar, enzim solüsyonuna alınmadan bir gün önce tohum kabuğunun kolaylıkla açılabilir bir hale gelmesi için sülfürik asitle (H_2SO_4) ile 10 dk. boyunca vortekste karıştırıldı. Daha sonra 5-6 kez distile sudan geçirilen tohumlar bir gece için distile suyun içinde +4 derecede bekletildi. Bekletilen bir günün sonunda tohumlar, laboratuvarda yumuşamış olan tohum kabukları ve kotiledonlar birbirlerinden ayırt edildi. Kotiledonlar bisturi ile çok küçük parçalar olacak şekilde kesildi ve sonrasında içerisinde bulunan suyu tamamen çekmesi için ependorfların kapakları acık

olacak şekilde 24 saat boyunca 104°C'de muhafaza edildi. Bu çalışma sonunda kotiledon örnekleri (0.45 M sorbitol; 10 mM MgCl₂; 1 mM KH₂PO₄; 20 mM MES; %1 Macerozyme® R-10; pH 5.6) enzim solüsyona daldırıldı ve 3 dk. boyunca örneklerin içerisine solüsyonun nüfuz etmesi için vakum edildi. Daha sonra nünuneler 72 saat boyunca 37 °C de bırakıldı. İyice yumuşamaya ve dağılmaya başlayan örneklerin son olarak 1.5 ml'lik enzim solüsyonunda 24 saat boyunca karıştırıcı üzerinde bekletilmesiyle örnekler sayım için hazırlandı. 100 ml'lik kotiledon hücre süspansiyonu elde etmek için 300 µm yumuşamış ve dağılmış hücre elde edildi. Hücre süspansiyonunda 20 ml boş bir endorf tüpüne transfer edildi ve sayım için her biri 1 µl'lik olacak şekilde, karşılıklı iki tarafı ızgara biçiminde olan ve her tarafı dört bölmeye ayrılmış karşılıklı olarak toplamda sekiz bölmeli bir yapıya sahip olan hemositometre üzerine damlatıldı ve üzeri lam ile kapatıldı. Hemositometrenin her bir karesine lamel ile kapatıldıktan sonra toplam 0.1 µl örnek yerleşmektedir. Hücreler 60'lik büyütmede (Olympus, BX41 floresan, Japon) mikroskop altında yapıldı (Şekil 3.2.5.1). Hemositometrenin mikroskoptaki incelenmesinde karşılıklı olarak aktarılan örneklerden toplamda dört adet bölge rastgele bir biçimde seçildi. Hücre sayıları, hemositometrenin her iki tarafında bulunan eşit dörtlü odalarda (her biri 1 mm²) her örnek için toplamda dört defa sayım yapıldı ve kayıt edildi. Mikroskoptan bilgisayara aktarılan görüntüler bilgisayar ortamında paint programında açıldı ve her bir hücre tek tek işaretlenerek sayıldı (Şekil 3.2.5.2).



Şekil 3.2.5.1 Olympus, BX41 floresan mikroskop



Şekil 3.2.5.2 Hemositometre görünümü ve karşılıklı olarak bulundurmış olduğu lobları.

3.2.6 Polünasyona Uğramış Olan Çiçekte Ovul Sayımı

Ekotiplere ait bitkilerin polüsyona başlamış fakat pod oluşumuna henüz başlamamış olan çiçeklerinden (Şekil 3.2.6.1) her ekotipten rastgele 10 tane olmak kaydı ile çiçekler ependorf tüplerinin içerisine çiçeğe zarar vermeyecek şekilde nazikçe alındı. Laboratuvarda ovul sayımı için (VanGuard 1100ZL analog aydınlatma) mikroskop (Şekil 3.2.6.2) altında her bir yaprak gözlemlenerek yavaş bir şekilde öncelikle petaller 0.75X ile 3.4X arasında zoom yapabilen mikroskopla bakılarak iki pens yardımıyla çiçekten ayrıldı, aynı şekilde bunu takiben çanak yaprak ve erkek organlar olan stamenler çiçekten ayırt edildi son aşamada kalacak olan pistil yine mikroskop gözlemi ile içerisinde bulundurmuş olduğu ovüllerin parçalanıp sayılmasını güçleştirmeyecek şekilde bisturi ile yarılarak ovaryum içerisinden ovüllerin çıkarılıp sayılması ile yapıldı.



Şekil 3.2.6.1 W6 6018 ekotipine ait polüsyona uğramış çiçekteki ovüllerin aydınlatma mikroskobu ile sayımı.

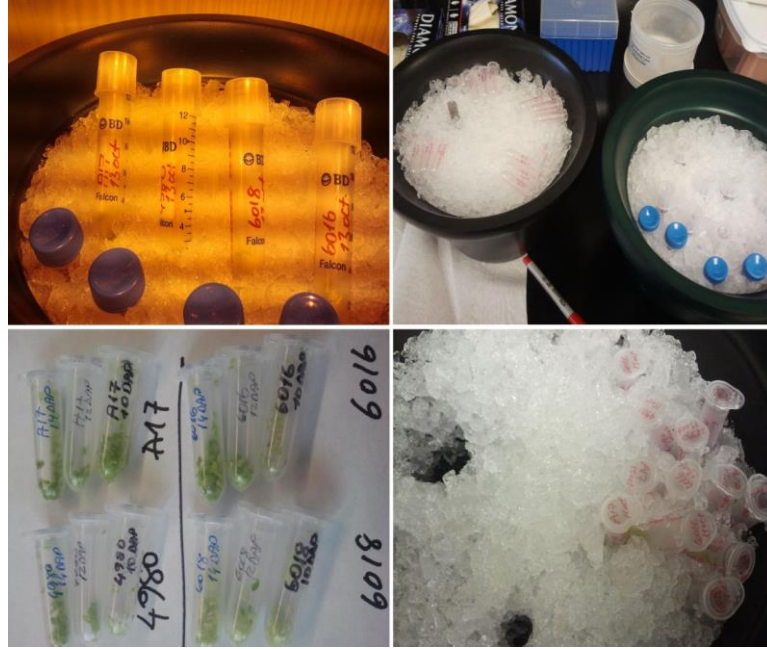


Şekil 3.2.6.2 VanGuard 1100ZL analog aydınlatma mikroskobu.

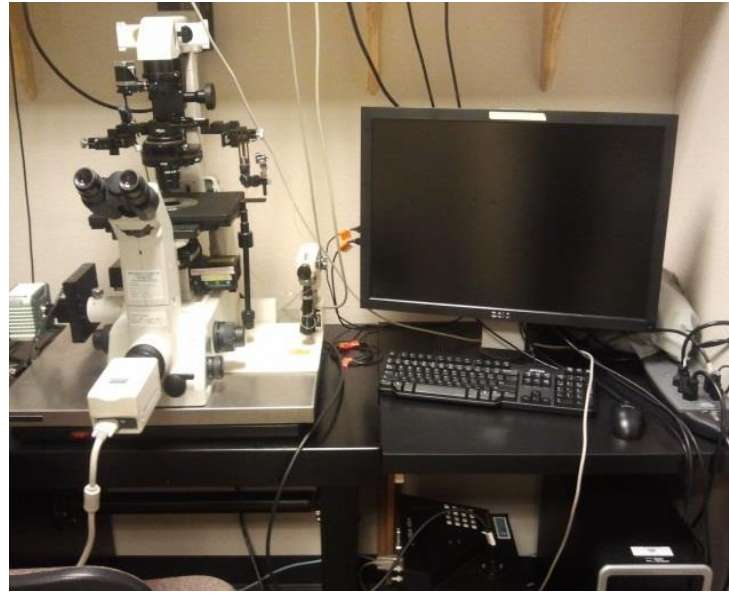
3.2.7 Nomarski (DIC) Görüntüleme için Tohumlara Uygulanan Aşamalar

DIC mikroskobunda (Nikon DXM1200, Japon) yapılacak gözlemlerde tohum içerisinde embriyo gelişimi sırasında var olan globular, kalp ve torpedo evrelerinin yanı sıra bazı tohumlarda bu evrelerin bazılarının ilerlemiş olan diğer evrelere benzer haller almaya başladıklarını ya da henüz tam olarak bulunmuş olduğu dap'taki şeklini göstermediği erken globuler, erken kalp ve erken torpedo hallerini de aldığı gözlemlendi. Dört ekotipten alınan 8 dap, 10 dap ve 12 dap zamanlı podlar, seradan ekotiplere ait bitkilerden falkon tüpleri içerisine her ekotipten 10 tane pod olacak şekilde buz içerisinde nazik bir şekilde alındı ve laboratuvara getirildi. Dört ekotipten, 8, 10 ve 12 dap için toplamda 12 falkon tüp kullanıldı. Podlar buzun içinde muhafaza edilirken, diğer taraftan da aynı sayıda ependorf tüpler hazırlandı ve üzerlerine ekotip ismi, toplandıkları tarih ve dap yazıldı (Şekil 3.2.7.1). Buzun içerisinden sıra ile falkon tüpler alındı ve podlar tohumlara zarar verilmeyecek şekilde açılmaya başlandı. 8 dap olan tohumlar diğer dap'lere göre biraz daha küçük olduğu için bu podları açarken tohumların zarar görmemesine özellikle dikkat edildi. Tüm podlar açılıp içerilerinden tohumlar çıkarıldıktan sonra tekrar buz içerisinde muhafaza edildi. Tohumlar daha sonra üzerlerinde ekotiplerin ve dap'ların yazılı olduğu 30 cc'lik cam şişelere aktarıldı. DIC gözleminde tohumların fiksasyonu için elde edilen tohumlar DIC mikroskobunda gözlemlenmeden önce, büyük olan tohumların yani 10 dap ve 12 dap'likler (3:1) etanol / asetik asit karışımında 1 saat süre ile 8 dap'lik tohumlar ise daha küçük oldukları ve fiksasyonun daha iyi sağlanması ve gelişim aşamasının gözlemlenmesi için etanol / asetik asit (8:1) oranında 30 dakika süre ile bekletildi. Bu aşamadan sonra tohumlar her biri 10 dakika boyunca, öncelikle %100, %70, %50 ve %30'luk bir dizi etanol aşamalarından geçirildi. Bu aşamadan sonra tohumlar +4 °C'de %30'luk etanolde bir gece bekletildi. Daha sonra +4 °C'den çıkarılan tohum örnekleri daha iyi bir görüntü elde edebilmek için, kloral hidrat: distile su: gliserol (80:30:10g) karışımı olan Hoyer's solüsyonunun içerisinde 24 saat boyunca karıştırıcının üzerinde bekletildi. Bu süreçlerin bitiminde DIC mikroskobu için tohum evrelerinin gözlemlenmesi için örneklerden her defasında beşer tohum lam üzerine bırakıldı ve mikroskopta iyi bir gözlem sonucu alabilmek için örneklerin üzerine gliserol döküldü ve lamel ile kapatıldıktan sonra ters bir

şekilde mikroskop tablasına yerleştirildi. Gözlemlenen evreler DIC mikroskobunun bağlantılı olduğu bilgisayarda fotoğraflandı (Şekil 3.2.7.2).



Şekil 3.2.7.1 DIC görüntüleme için podların toplanması ve tohumların podlardan çıkarılıp hazırlanması.



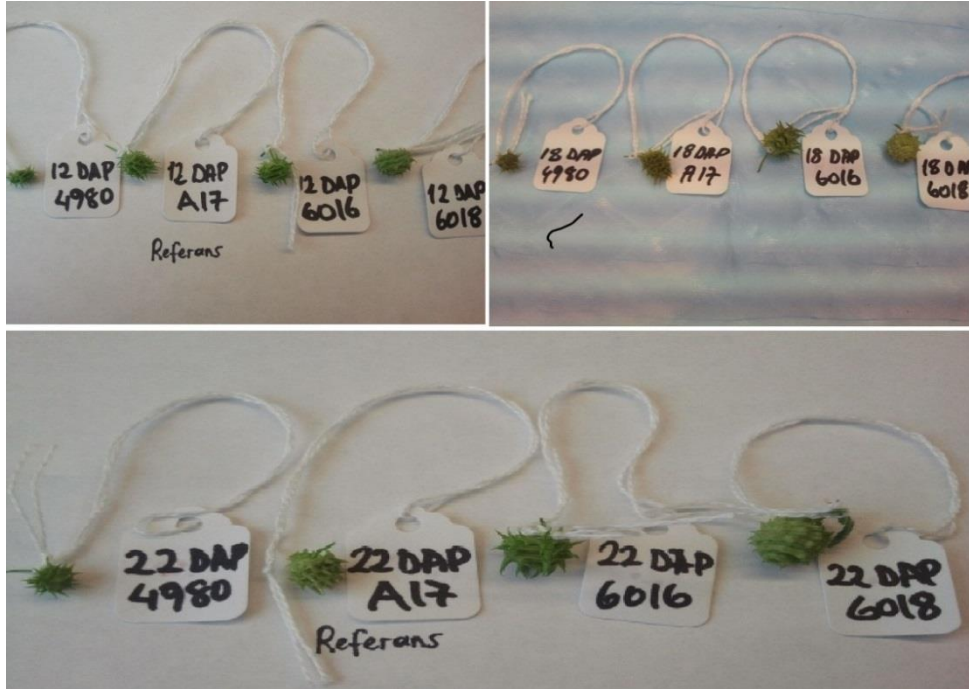
Şekil 3.2.7.2 DIC (Nikon DXM1200, Japon) mikroskobu.

3.2.8 Ağırlık Ölçümü ile Tohum Boyutunun Belirlenmesi

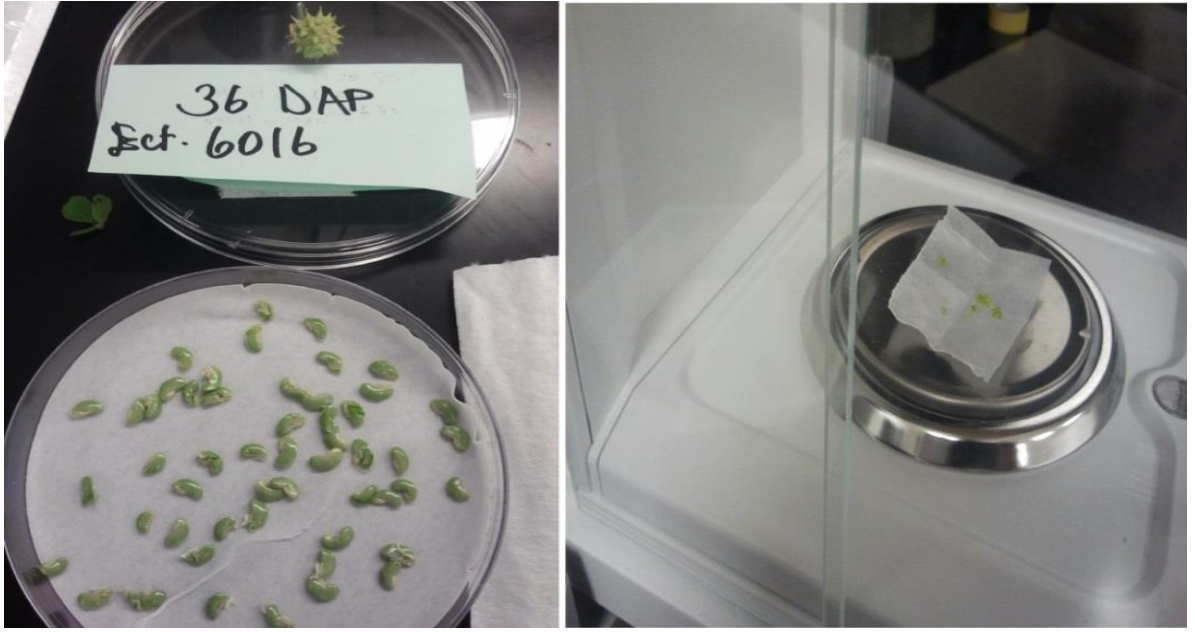
Uygun sera ortamında yetiştirilen dört farklı *Medicago truncatula* ekotiplerine ait bitkilerin tohum boyutlarındaki farklılıkların belirlenmesi için, daha önceden etiketlenen bitkilerin (Şekil 3.2.8.1) belirli günlerindeki podlar (8,10,12,14,16,18,20,24 ve 36 dap), üzerlerinde ekotip isimleri, toplandıkları gün (Şekil 3.2.8.2) ve dap zamanlarının yazılı olduğu falkon tüpleri ile buzun içerisinde muhafaza edilerek her ekotip için belirlenen dap'lardan 10' ar adet pod toplandı. Toplanan podlar laboratuvarında yine buz içerisinde bekletilirken sırayla buz içerisinden alınan podlar içindeki tohumlara zarar vermeyecek şekilde pensler aracılığıyla açıldı (Şekil 3.2.8.3). İçerisinden tohumlar dikkatle tek tek çıkarıldı ve üzerinde dap zamanı ve ekotip isminin yazılı olduğu zemininde hafif nemli filtre kâğıdı olan boş petri kabına aktarıldı (Şekil 3.2.8.4). Her bir ekotipte her bir dap için aynı işlemler uygulandı. Boyut hesaplanmasının ölçümü için ekotiplerden farklı zamanlarda alınan podların içerisinden çıkan tohumların taze ve kuru ağırlıklarının hesabının yapılması için, podlardan çıkarılıp petri kaplarına alınan tohumların öncelikle taze ağırlıklarının belirlenmesi için, podlardan çıkarılan tohumların tartımı hassas terazide tohumlardan belirli sayılarda alınıp tartılarak genel bir ortalama verisinin elde edilmesiyle yapıldı (Şekil 3.2.8.5). Bu aşamadan sonra tartım işlemi biten tohumlar aynen petri kaplarına yerleştirilip, kuru ağırlıklarının tartımları için +37 °C'de 4 gün süre ile bekletildi. Bu 4 günlük sürenin sonunda yaş ağırlık tartımında ne kadar sayıda tohum tartıldıysa kuru ağırlık tartımında da aynı sayıda tohum tartımı yapıldı ve genel bir ortalama verisi elde edildi.



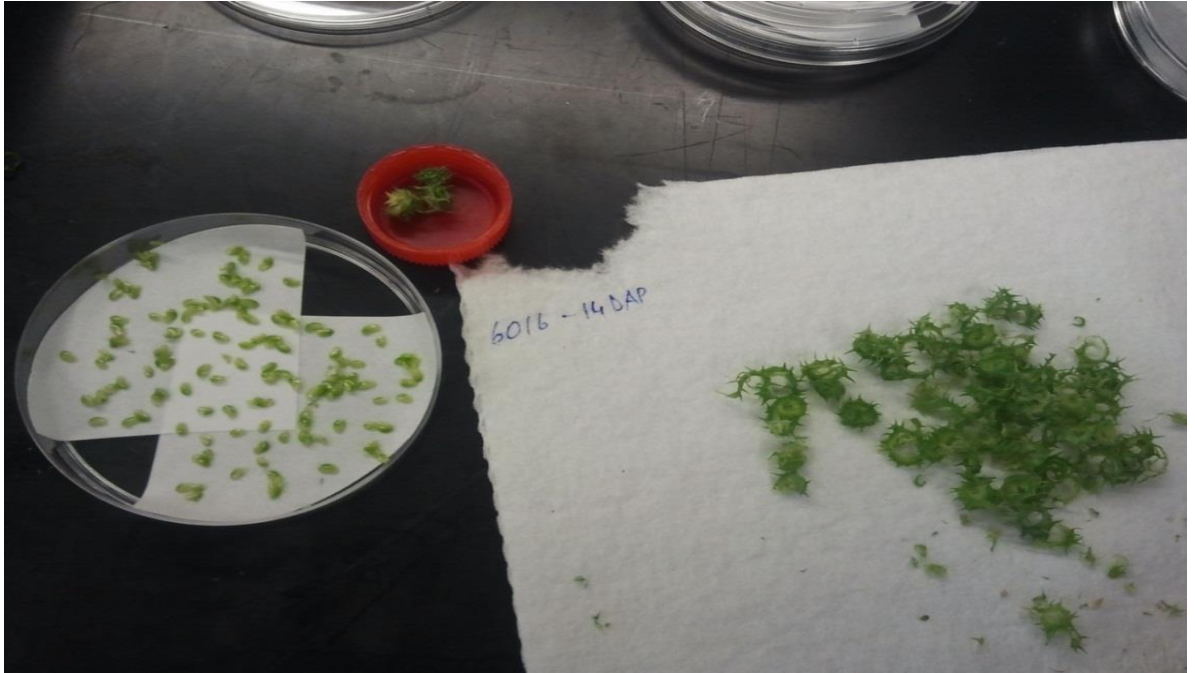
Şekil 3.2.8.1 Ekotiplerin henüz olgunlaşmamış pod (8 dap) görünüşleri



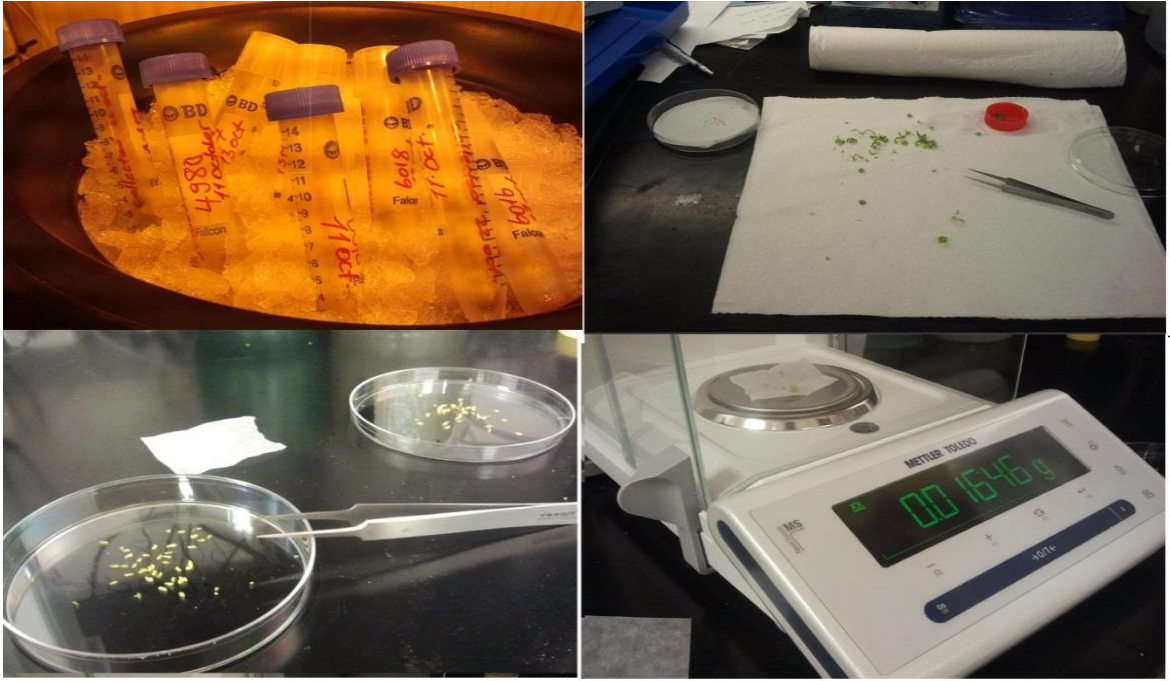
Şekil 3.2.8.2 Ekotiplere ait podların farklı dap'lardaki görünümü



Şekil 3.2.8.3 W6 6016 ekotipine ait *M. truncatula* podunun açılması ve tohumların tartımı.



Şekil 3.2.8.4 W6 6016 ekotipe ait 14 dap'lık tohumların podlardan çıkarılması.



Şekil 3.2.8.5 Podların toplanışı, tohumların eldesi ve tartım işlemi

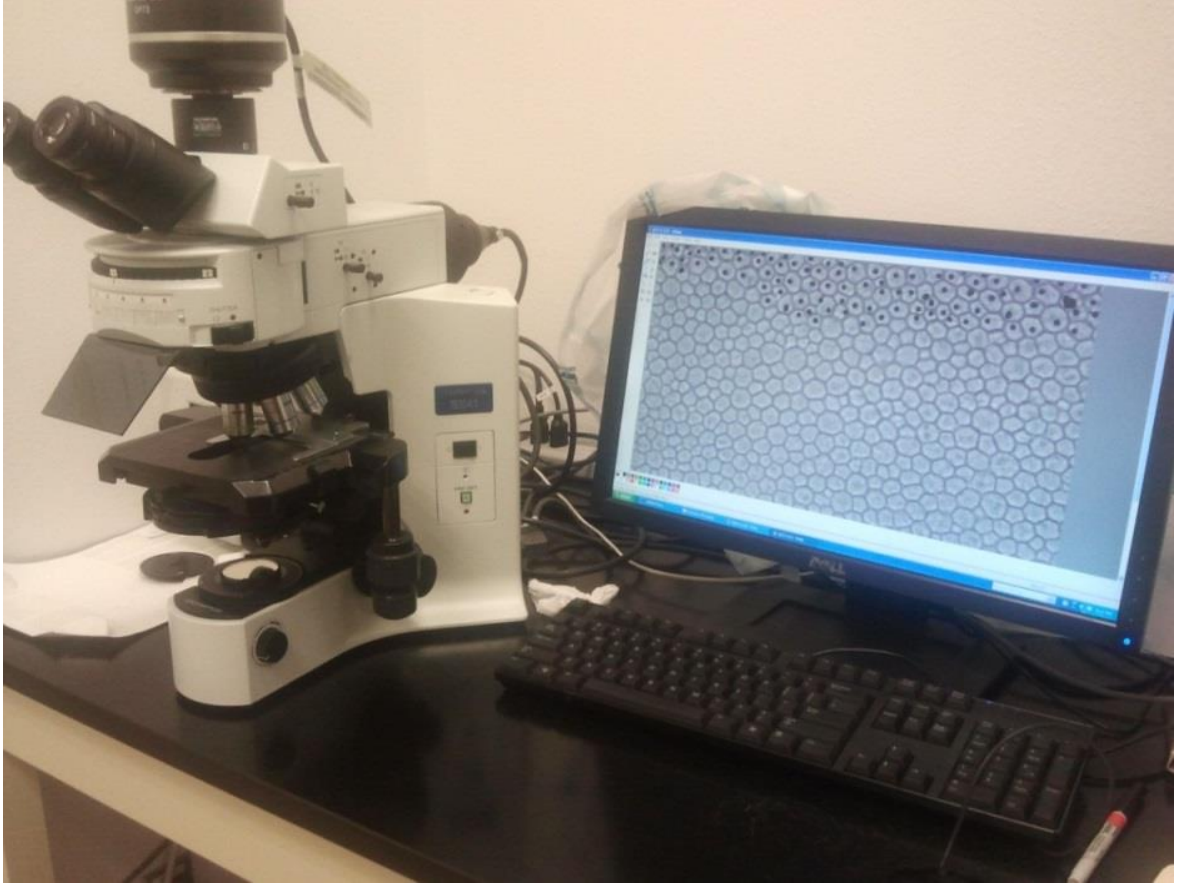
3.2.9 Hücre Boyutlarının Belirlenmesi

Hücre boyutlarının belirlenmesi için ekotiplere ait bitkilerin olgun tohumları, çalışma yapılmadan 1 gün önce H_2SO_4 içerisinde 10 dakika kadar bekletildi. Asit ile dış kabuklarının yumuşatılmasından sonra ekotiplere ait tohumlar 8-10 kez distile sudan geçirildi ve $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 1 gün boyunca muhafaza edildi. Daha sonra soğuk odadan alınan tohumlar küçük cam şişelere alındı ve her birinin içerisine 2 ml %10'luk Glutortaldehit, 1,5 ml %16'lık Paraformaldehit ve 2,5 ml iyonizer su olacak şekilde eklendi ve buz içerisinde muhafaza edildi. Buz içerisinde muhafaza edilen tohumlara içinde bulunmuş olduğu fiksatifin iyice nüfus etmesi için tohumlar buzun içerisinde olacak şekilde 10 dakika boyunca vakum edildi ve ardından 2 saat süre ile $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildi. Bu sürecin ardından daha iyi bir gözlem elde edebilmek için her bir ekotip bulunduğu cam şişelere düşük sıcaklıklarda hücrelerin yapısının korunmasını sağlamak için 10 ml %20'lik Sükroz uygulandı ve 1 gün boyunca karıştırıcı üzerinde çözeltinin iyice nüfus etmesi sağlandı. Bu işlemlerden sonra tohumlardan kesit almak ve mikroskop incelemesi yapmak için tohumlar öncelikle sıvı nitrojen içerisinde ekotiplere göre sırayla donduruldu ve kriyostat mikrotom

(LEICAI CM1850, Almanya) (Şekil 3.2.9.1) ile çok yavaş bir şekilde kesilip lamel üzerine yerleştirildi. Kesitlerin mikroskop (Olympus, BX41 floresan, Japon) (Şekil 3.2.9.2) incelemesinde daha iyi bir şekilde gözlemlenip hücrelerin birim alanda sayılmasını kolaylaştırmak için Touludione mavisi ile boyandı.



Şekil 3.2.9.1 Kriyostat, LEICAI CM1850 mikrotom.



Şekil 3.2.9.2 Japon, Olympus BX41 floresan mikroskop ve hücrelerin monitör gözlemi ile sayımı.

3.2.10 Hücre Kültür Dokularının Metabolomik Analizi Aşamaları

Ekotiplere ait olgun tohum örneklerinin metabolomik aşamalar için hazırlanması polar (Şeker, karbonhidrat vs.) ve non-polar (Lipid) aşamaların uygun hale getirilmesi ile sağlanmaktadır. Belirli miktardaki tohum örnekleri öncelikle likit nitrojen ile donduruldu. Dondurulmuş dokular içerisinde bulundurmış oldukları suyun kurummasına kadar 24 ile 48 saat arası bir süreç boyunca liyofilizatör ile $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Şekil 3.2.10.1). Daha sonra kurumuş olan doku örnekleri cam bir çubukla havan içerisinde iyice homojen bir şekilde ezildi ve küçük parçalara ayrıldı ve 4 ml'lik küçük cam şişelerin içine her bir örnekten 6 - 6.05 mg kurutulmuş doku eklendi. $10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ docosanol (non-polar) içeren 1.5 ml'lik kloroform kurutulmuş dokulara eklendi. Örnekler vakteks edildi ve sonrasında 50

°C’de 45 dakika boyunca inkube edildi. Örnekler oda sıcaklığı değerine eşitlendikten sonra $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ribitol ile 1.5 ml HPLC-grade suyu, kloroform üzerine eklendi ve ikinci kez aynı şekilde vorteks ve 50 °C’de 45 dakika boyunca inkube edildi. İki fazlı çözücü sistem tabakaları ayırmak için +4 °C’de 30 dakika süre ile 2900 xg de santrifüj edildi. Her tabakadan alınan 1 ml’lik örnekler 2 ml’lik küçük cam şişelere ayrı ayrı transfer edildi. Kloroform içeren tabaka (non-polar) nitrojen uygulaması altında kurutulurken (Şekil 3.2.10.2), sulu tabaka ise ortam sıcaklığında kurutma vakumunda santrifüj edilip kurutuldu (Şekil 3.2.10.3). Örnekler işlenme sürecine kadar -80 °C’de muhafaza edildi[83].



Şekil 3.2.10.1 Liyofilizatör VIRTIS Freezemobile serisi Sentry 2.0 soğuk kurutma.



Şekil 3.2.10.2 Non polar olan süspansiyondan çözücülerin Nitrojen uygulaması ile uzaklaştırılması.



Şekil 3.2.10.3 Polar süspansiyonlar için Savant SPD121P SpeedVac ve buhar kapaını.

3.2.10.1 Non-Polar Metabolitlerin Hazırlanması ve Analizi

Polar karışımın bulunduğu örneklere 15 mg/mL methoxyamine hidroklorid'ten 50 µL eklendi ve solüsyondaki metabolitler kristalleşinceye kadar kısa ultrasonik parçalanmaya maruz bırakıldı ve kalan tortular en az 1 saat süre ile 50 °C'de su banyosu kullanılıp çalkalanarak tekrar yeniden inkube edildi. Solüsyona 50 µL MSTFA + %1 TMCS eklendi ve tekrar 50 °C'de su banyosunda inkube edildi. Solüsyonun 1 µL'si 15:1 ayırma oranına sahip olan 60M DB-5-MS kolonu, HP 6890 GC ile HP 5973 MS'na enjekte edildi. Enjeksiyon dedektörü ve ayırma kolu 280 °C'de tutuldu, ayırma işlemi öncelikle 80 °C de 2 dakika sıcaklık programı ile sonrasında ise 12 dakika boyunca 5 °C dk⁻¹'den 315 °C'ye yükseltilmesiyle gerçekleştirildi. 60M DB-5-MS kolonu (J&W Scientific, 0.25 mm ID, 0.25 lm film kalınlığında) akış hızı 1 ml dk⁻¹. MS kaynağı kütle ağırlığını belirleme miktarı m/z 50-650 aralığındadır.

3.2.11 Hormonal Analiz Hazırlama Aşamaları

Seradan ekotiplerimize ait A17, 6016 ve 6018 ekotip numaralı bitkilerin 10, 12 ve 14 dap'lik podlarından belirli bir sayıda buz içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirildi. Podlar pensler aracılığıyla tek tek açılıp içerisinden tohumlar çıkarıldı ve yine buz üzerinde bulunan ve üzerinde ekotip ismi ve dap zamanı yazılı olan ependorf tüplerinin içerisine alındı. Elde edilen tohumlar sıvı nitrojen ile donduruldu ve sırasıyla ekotipler sıvı nitrojen içerisinden çıkarıldı ve porselen havan içerisine alınıp toz şeklini alıncaya kadar ezildi. Hızlı bir şekilde her kuru toz haline getirilmiş örnekten erimesi sağlanmayacak şekilde 50 mg alınıp 4 mL'lik küçük cam şişelere alındı. Her bir şişe içerisine ekstraksiyon çözücüsü olan 1 mL izopropanol: Su: HCl karışımı 2: 1: 0.002 oranında eklendi. Standart olarak profili istenilen hormonlara ait kalıplardan 50 pmol (d5-IIA) eklendi ve 4 °C'de 1 saat süre ile şişeler karıştırıcı üzerinde ekstraksiyon edildi. Bu sürecin sonunda her bir örneğe 0,5 mL diklorometan eklendi ve çalkalanıp +4 °C'de 30 dakika bekletildi. Örnekler 30 dakika 3000 rpm de santrifüj edildi ve sonrasında 2 faz oluşumu gözlemlendi bu iki faz arasında da örneklerin kalıntıları oluştu. Hormon içeren en alt kısımdaki tabaka 1 mL olacak şekilde 2 mL'lik cam bir şişeye alındı ve nitrojen uygulaması ile çözücülerden kurutularak arındırıldı. Örnekler uygun HLB kolonlarını seçilerek (Columns Waters Oasis

HLB 1cc WAT094225) aktarılmadan önce kolonlar öncelikle 1 mL asetonitril ile sonrasında 1 mL metanol ve ardından 2 mL %1'lik asetik asit yıkandı. Nitrojen uygulamasından geçirilen tohumlara 0,1 mL metanol ve %1'lik 1 mL asetik asit eklendi. Seçilen kolona örnek solüsyonları uygulandıktan sonra kolonlar 1 mL asetik asit ile durulandı ve durulan kalıntılar atıldı. IAA'yi ayırtırmak için kolonlara %1'lik asetik asit içeren 1.8 mL %80'lik metanol eklendi ve incelenecek örnekler kolondan 2 mL'lik cam şişeye aktarıldı. Daha sonra çözücüler, nitrojen uygulamasıyla arındırıldı ve 25 µL metanol içerisinde vorteks edilip yeniden çözüldü ve sonrasında %1'lik 25 µL asetik asit eklendi. Solüsyon 200 µL'lik cam pipet ile çekildi ve LC/MS için 10 µL enjekte edildikten sonra tekrar cam şişeye bırakıldı.

3.2.12 Proteomik Aşamalar ve Toplam Protein Eksraksiyonunun Hazırlanması

Birbirinden farklı olan ekotiplerimiz olan W6 6018, W6 6016, W6 4980 ve A 17 (referans) bitkilerinin içermiş oldukları protein içeriklerinin belirlenmesi amacı ile ekotiplerin olgun tohumlarından yeteri miktarda alındı. Tohumlar öncelikle sıvı nitrojen içerisinde en az 10 dakika kadar bekletildikten sonra havan içerisinde birbirlerinden bağımsız olarak toz halini alacak şekilde ezildi. Her bir örnekten 10 mg ependorf tüpünün içerisine tartılarak alındı. Ekstraksiyon tamponunun hazırlanması için 7.4 M üre, 2.1 M tiyo ure $CS(NH_2)_2$, 61 mM CHAPS, 8 mM DTT, % 1 amfolit, 21 mM Trizma hidroklorit, 16.5 mM Trizma, % 0.24 Triton X-100, 1X proteaz inhibitörü hazırlandı. Daha sonra hazırlanmış olan tampondan her bir ependorf tüpünün içerisine 500 µL eklendi. Tüpler karıştırıcı üzerinde 40 dakika boyunca iyice karışmasının sağlanması için bekletildi. Karıştırıcıdan alınan tüpler 14.000 g de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün sonunda supernatant (yüzen) kısmını yeni bir ependorf tüpe transfer edildi. Hazırlanan örnek kalıplarının MALDI-DOF MS ile protein analizlerinin yapılması için The Samuel Roberts Noble vakfının protein analizi araştırma merkezine gönderildi.

3.2.13 Yapraklardaki Stoma Hücreleri Düzeyinin Belirlenmesi

Ekotiplere ait bitki yapraklarından belirli bir miktar petri kabı içerisine alındı ve incelenmek üzere laboratuvara getirildi (Şekil 3.2.13.1). Petri kaplarının içerisine hücre boyutu belirlenecek stomaların açık kalmasını sağlamak için bir miktar su eklendi. Yapraklardaki stoma hücrelerinin mikroskofta görünür hale getirebilmek için bisturi ile yaprakların alt yüzeylerinden çok dikkatlice zar şeklindeki yapı alındı. Alınan örnekler lamel üzerine yerleştirildi ve daha sonra ekotiplerden belirli sayılarda alınan bu örnekler Olympus BX41 floresan mikroskop ile gözlemlenip fotoğraflandı (Şekil 3.2.5.1). Fotoğraflanan örneklerin alanları daha sonra imaje-j programı aracılığı ile ölçümlendi ve t testi ile birbirleri ile var olan ilişkileri belirlendi.



Şekil 3.2.13.1 Ekotiplere ait bitki yaprakları

4. BULGULAR

4.1 Çiçeklerde Ovul Sayılarının Belirlenmesi

Ekotiplere ait bitkilerden polünasyondan sonra alınan çiçek örnekleri laboratuvarında mikroskop aracılığıyla sayıldıktan sonra tohum boyutları ile arasındaki ilişkisinin olup olmadığını anlamak için istatistiksel olarak t-testi ile analiz edildi (Çizelge 4.1.1). Büyük tohum boyutuna sahip olan W6 6018 ekotipine ait bitki çiçeklerindeki ovul sayısının kendisinden daha küçük boyutlarda olan referans olarak ele alınan A 17 ekotipine göre daha az sayıda, ve yine kendisinden daha küçük tohum boyutuna sahip olan W6 4980 ekotipine göre ise benzer sayıda ovul içerdiği belirlenmiştir. Yine büyük tohum boyutuna sahip olan W6 6016 ekotipine ait çiçeklerin içerdiği oldukları ovul sayıları da yine referans ekotip olan A 17'ye göre düşük sayıda, W6 4980 ve W6 6018 ekotiplerine göre ise fazla sayıda ovul içerdiği gözlemlendi (Şekil 4.1.1). Bu sonuçlar tohum boyutu ve içeriğinin, bitkilerin içerdiği oldukları ovul sayıları ile doğrudan bir ilişki içerisinde olmadıklarını göstermektedir.

Çizelge 4.1.1 Ekotiplere ait bitkilerden, polünasyondan sonra alınan çiçek örneklerindeki ovul sayılarının belirlenmesi ve istatistiksel olarak anlamlandırılması.

Örnek sayısı	Ekotip	Ovul sayısı	Ort.	SD	P değeri
1	A17	11	9.55556	0.88192	
2	A17	8			
3	A17	10			
4	A17	9			
5	A17	10			
6	A17	10			
7	A17	9			
8	A17	9			
9	A17	10			

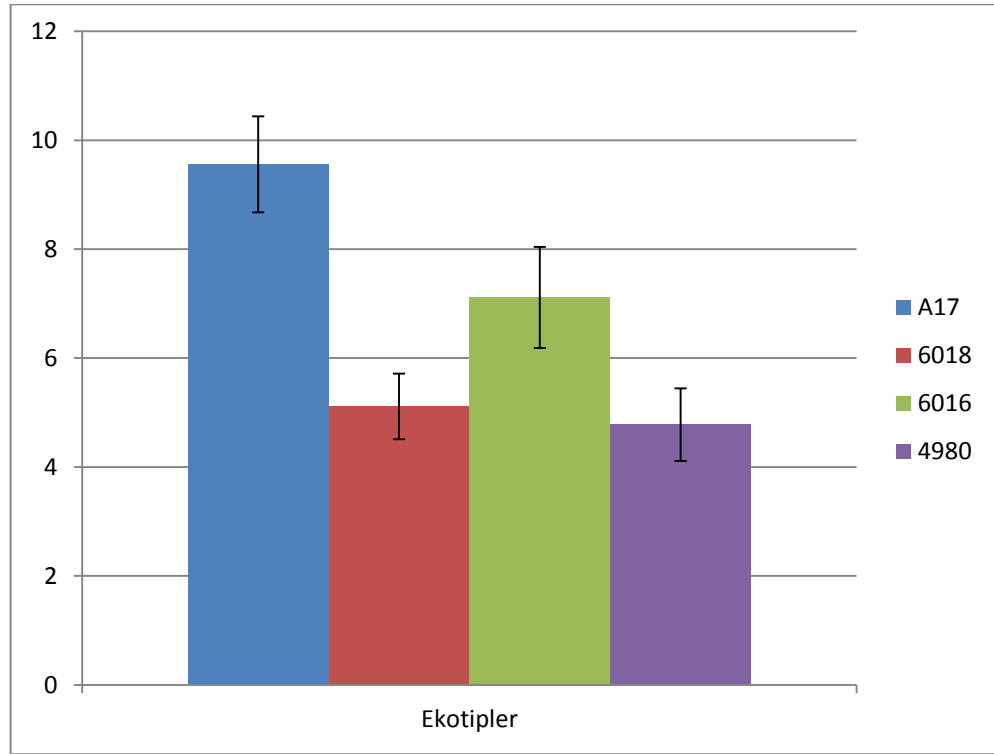
Çizelge 4.1.1 (Devam) Ekotiplere ait bitkilerden, polüsyondan sonra alınan çiçek örneklerindeki ovul sayılarının belirlenmesi ve istatistiksel olarak anlamlandırılması.

Örnek sayısı	Ekotip	Ovul sayısı	Ort.	SD	P değeri
1	6018	4	5.11111	0.60093	5.72239E-10
2	6018	6			
3	6018	5			
4	6018	5			
5	6018	5			
6	6018	6			
7	6018	5			
8	6018	5			
9	6018	5			

Örnek sayısı	Ekotip	Ovul sayısı	Ort.	SD	P değeri
1	6016	9	7.11111	0.92796	0.095601272
2	6016	7			
3	6016	6			
4	6016	7			
5	6016	7			
6	6016	6			
7	6016	8			
8	6016	7			
9	6016	7			

Çizelge 4.1.1 (Devam) Ekotiplere ait bitkilerden, polüsyondan sonra alınan çiçek örneklerindeki ovul sayılarının belirlenmesi ve istatistiksel olarak anlamlandırılması.

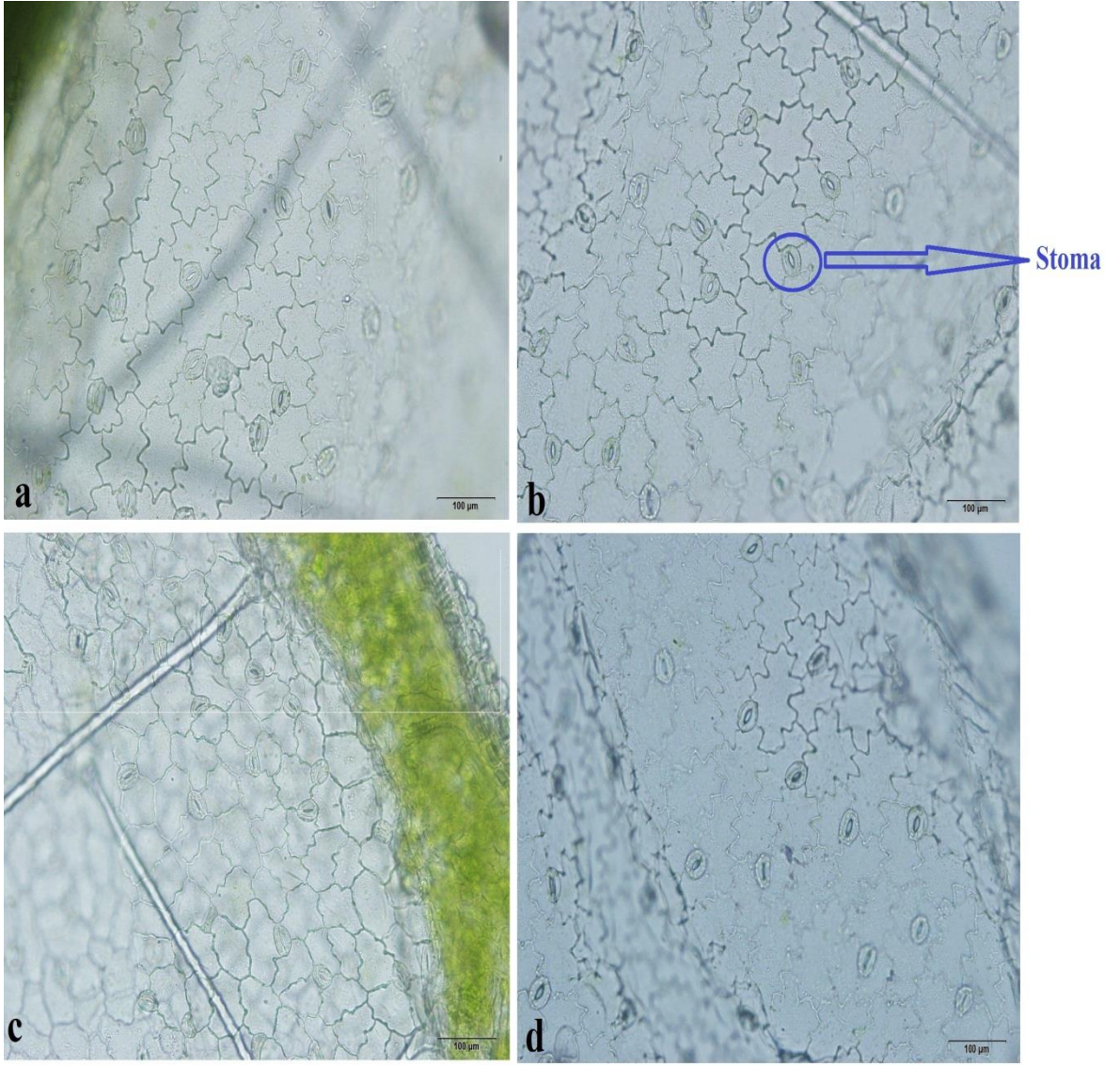
Örnek sayısı	Ekotip	Ovul sayısı	Ort.	SD	P değeri
1	4980	5	4.777778	0.666667	3.32846E-10
2	4980	5			
3	4980	5			
4	4980	6			
5	4980	4			
6	4980	4			
7	4980	5			
8	4980	5			
9	4980	4			



Şekil 4.1.1 Ekotiplere ait çiçeklerdeki ortalama ovul sayıları grafiği.

4.2 Bekçi Hücrelerin (Stoma) Boyutunun Hesaplanması

Ekotiplerden alınan yaprak örneklerinin Olympus BX41 floresan mikroskopik incelenmesinde gözlemlenen stoma hücreleri boyutu ve alanları bitkilerin ploidi seviyeleri hakkında ön bilgi verebilmektedir[84]. Yaptığımız çalışmada tohum boyutlarına ploidi seviyesinin birbirinden farklı değerlerde olup olmadığını araştırmak için ekotiplerden stoma hücrelerini içeren yaprak örneklerinin alt yüzeylerinden alınan ince zarımsı yapının incelenmesi ve fotoğraflanması yapıldı (Şekil 4.2.1). Stoma hücrelerinin birim alanda bulunan miktarının sayısı ve her bir hücrenin alan hesaplaması image-j alan hesaplama programı ile yapıldı. Alan hesaplaması yapılan ekotiplere ait yaprakların içermiş oldukları stoma sayıları ve alanlarının hesabının istatistiksel analizi için t-testi kullanıldı (Çizelge 4.2.1). Yapılan bu istatistikler sonucunda ekotipler arasında yapraklarının içermiş oldukları stoma sayıları ve boyutları arasında istatistiksel olarak farkın olmadığı gözlemlendi. T-testi sonucu elde ettiğimiz veri grafiğinde de ekotipler arasındaki istatistiksel açıdan önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2.1.2). Ekotipler arasındaki büyük ve küçük tohumlu bitkiler arasında DNA içeriği (Ploidi) seviyeleri bakımından farklılık belirtisi oluşmadığından bekçi hücreler olan stomaların tohum boyutuyla ilişkisi olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.2.1 Ekotiplere ait bitkilerin yapraklarının alt kısmından alınan örneklerde Olympus BX41 floresan mikroskop ile stoma bekçi hücrelerinin görünümü ve fotoğraflanması, **a**; W6 4980, **b**; W6 6016, **c**; W6 6018 ve **d**; A 17 referans.

Çizelge 4.2.1 Ekotiplere ait bitki yapraklarındaki stoma sayıları ve alanlarının t testi istatistik analizi ile yapılması.

Örnek sayısı	Ekotip	Alan	Ortalama	SD	P değeri
1	4980	3162	2994.7037	365.576	0.00076642
2	4980	2774			
3	4980	2817			
4	4980	3065			
5	4980	2968			
6	4980	2713			
7	4980	2901			
8	4980	2844			
9	4980	2703			
10	4980	3309			
11	4980	2978			
12	4980	2929			
13	4980	2673			
14	4980	2761			
15	4980	2337			
16	4980	3234			
17	4980	2605			
18	4980	3396			
19	4980	2945			
20	4980	3607			
21	4980	3623			
22	4980	3728			
23	4980	3716			
24	4980	2893			
25	4980	2865			
26	4980	2574			
27	4980	2737			

Çizelge 4.2.1 (Devam) Ekotiplere ait bitki yapraklarındaki stoma sayıları ve alanlarının t-testi istatistik analizi ile yapılması.

Örnek sayısı	Ekotip	Alan	Ortalama	SD	P değeri
1	6016	2776	2687.45	327.138	0.791829
2	6016	2669			
3	6016	2767			
4	6016	2728			
5	6016	2801			
6	6016	2199			
7	6016	3326			
8	6016	3545			
9	6016	2869			
10	6016	2902			
11	6016	2645			
12	6016	2671			
13	6016	2429			
14	6016	3143			
15	6016	3323			
16	6016	2550			
17	6016	2618			
18	6016	2209			
19	6016	2281			
20	6016	2430			
21	6016	2724			
22	6016	2475			
23	6016	2712			
24	6016	2358			
25	6016	2671			
26	6016	2445			
27	6016	3265			
28	6016	3139			
29	6016	2485			
30	6016	2765			
31	6016	2893			
32	6016	2936			
33	6016	2826			
34	6016	2276			
35	6016	2409			

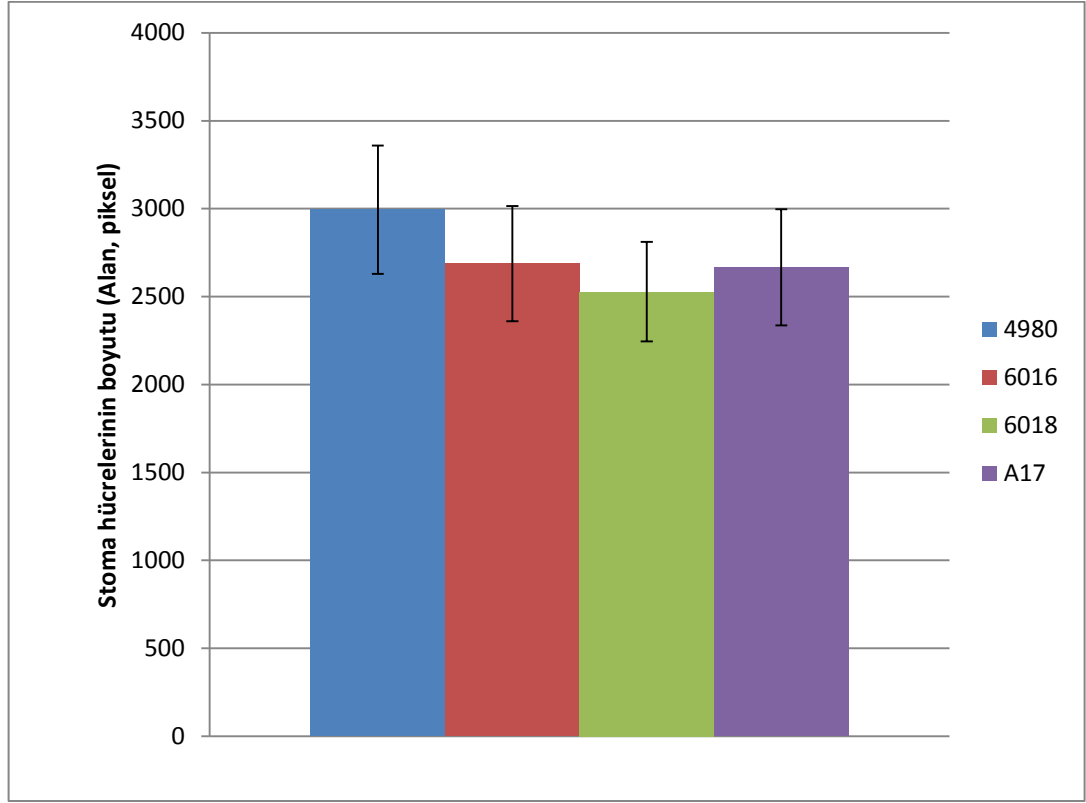
Çizelge 4.2.1 (Devam) Ekotiplere ait bitki yapraklarındaki stoma sayıları ve alanlarının t-testi istatistik analizi ile yapılması.

Örnek sayısı	Ekotip	Alan	Ortalama	SD	P değeri
36	6016	2514			
37	6016	2265			
38	6016	2376			
39	6016	2575			
40	6016	2508			

Örnek sayısı	Ekotip	Alan	Ortalama	SD	P değeri
1	6018	2310	2528.391	283.355	0.11519
2	6018	2410			
3	6018	2510			
4	6018	2151			
5	6018	2782			
6	6018	2669			
7	6018	2717			
8	6018	3218			
9	6018	3141			
10	6018	2541			
11	6018	2486			
12	6018	2134			
13	6018	2452			
14	6018	2346			
15	6018	2336			
16	6018	2436			
17	6018	2390			
18	6018	2259			
19	6018	2623			
20	6018	2589			
21	6018	2151			
22	6018	2792			
23	6018	2710			

Çizelge 4.2.1 (Devam) Ekotiplere ait bitki yapraklarındaki stoma sayıları ve alanlarının t-testi istatistik analizi ile yapılması.

Örnek sayısı	Ekotip	Alan	Ortalama	SD	P değeri
1	A 17	3144	2666.433	330.078	
2	A 17	2696			
3	A 17	2956			
4	A 17	2590			
5	A 17	3065			
6	A 17	2641			
7	A 17	2863			
8	A 17	2739			
9	A 17	2503			
10	A 17	2073			
11	A 17	2276			
12	A 17	2987			
13	A 17	2517			
14	A 17	2365			
15	A 17	2899			
16	A 17	2497			
17	A 17	3102			
18	A 17	2822			
19	A 17	2833			
20	A 17	2417			
21	A 17	2885			
22	A 17	2765			
23	A 17	2525			
24	A 17	2905			
25	A 17	2863			
26	A 17	2835			
27	A 17	2921			
28	A 17	2438			
29	A 17	1694			
30	A 17	2177			



Şekil 4.2.1.2 Ekotiplere ait bitkilerin yapraklarındaki stoma boyutlarının (Alan, piksel) dağılım grafiği.

4.3 Tohum Ağırlığı ve Büyüme Eğrisi Hesaplanması

Ekotiplerden 8 dap ile olgunlaşma zamanı olan 36 dap arasındaki farklı zamanlarda toplanan podlar, içermiş oldukları tohumların taze ve kuru ağırlıkları arasındaki farkın olup olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada farklı dap'larda incelenen tohumların belirli sayıda örnekleri öncelikle taze ağırlıklarının daha sonra ise aynı örneklerin 3 gün boyunca 37 °C'de kalmasından sonra kuru ağırlıklarının tartımı işlemi ve bu elde edilen sonuçların t-testi ile analizi sonucunda (Çizelge 4.3.2), (Çizelge 4.3.3) taze ve kuru tohum ağırlık büyüme grafiklerinin her ikisinde de W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerine ait olan tohumların diğer A 17 (referans) ve W6 4980'e göre farklı bir tohum yapısına sahip olduğu gözlemlenmektedir (Çizelge 4.3.1). Taze ve kuru tohum ağırlık grafiklerinde erken tohum gelişiminden başlamak üzere tüm dap'larda W6 6018 ekotipine ait olan tohumlarda grafiklerde de görüldüğü gibi her zaman diğer ekotiplere göre daha yüksek olduğu

gözlemlenmiştir. Fakat büyük tohum yapısına sahip olan W6 6016 ekotipi, normal boyutlardaki yani kendisinden küçük boyuttaki A 17 (referans) ekotipine göre 8 dap ve 12 dap arasında daha yavaş ve düşük bir gelişim aşaması göstermekte iken 12 dap'tan sonraki tüm aşamalarda çok hızlı gelişim göstererek 8 dap ve 12 dap aralığında kendisinden daha hızlı ve daha fazla ağırlık içeren A 17 (referans) ekotipini ilerleyen dap'larda grafiklerde de görüldüğü gibi farklı bir şekilde geçmiştir (Şekil 4.3.1), (Şekil 4.3.2).

Çizelge 4.3.1 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları

Ekotip	DAP	Tohum adet	Taze ağırlık	Aktüel taze ağırlık	Kuru ağırlık	Aktüel kuru ağırlık
A17	8	10	0.0037	0.00037	0.00062	0.000062
A17	8	10	0.0025	0.00025	0.00062	0.000062
A17	8	10	0.0099	0.00099	0.00071	0.000071
A17	8	10	0.0039	0.00039	0.00068	0.000068
A17	8	10	0.0031	0.00031	0.00071	0.000071
A17	8	10	0.0037	0.00037	0.00065	0.000065
A17	10	20	0.01752	0.000876	0.00323	0.0001615
A17	10	20	0.01831	0.0009155	0.00355	0.0001775
A17	10	20	0.01892	0.000946	0.00366	0.000183
A17	10	20	0.01965	0.0009825	0.00333	0.0001665
A17	10	20	0.01625	0.0008125	0.00349	0.0001745
A17	10	20	0.01811	0.0009055	0.00321	0.0001605
A17	10	20	0.01663	0.0008315	0.00314	0.000157
A17	10	20	0.01695	0.0008475	0.00282	0.000141
A17	10	20	0.01841	0.0009205	0.00297	0.0001485
A17	12	20	0.036	0.0018	0.0071	0.000355
A17	12	20	0.0399	0.001995	0.0071	0.000355
A17	12	20	0.0452	0.00226	0.007	0.00035
A17	12	20	0.04	0.002	0.0067	0.000335
A17	12	20	0.041	0.00205	0.0064	0.00032
A17	12	20	0.0466	0.00233	0.0072	0.00036
A17	12	20	0.0384	0.00192	0.0068	0.00034
A17	12	20	0.0457	0.002285	0.0084	0.00042
A17	12	20	0.0395	0.001975	0.0066	0.00033
A17	12	20	0.0397	0.001985	0.0068	0.00034
A17	14	20	0.074	0.0037	0.0143	0.000715
A17	14	20	0.0721	0.003605	0.0139	0.000695
A17	14	20	0.0794	0.00397	0.0144	0.00072
A17	14	20	0.0714	0.00357	0.0116	0.00058
A17	14	20	0.0715	0.003575	0.0137	0.000685
A17	14	20	0.0737	0.003685	0.0122	0.00061

Çizelge 4.3.1 (Devam) 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları

Ekotip	DAP	Tohum adet	Taze ağırlık	Aktüel taze ağırlık	Kuru ağırlık	Aktüel kuru ağırlık
A17	14	20	0.077	0.00385	0.0135	0.000675
A17	14	20	0.0836	0.00418	0.0134	0.00067
A17	14	20	0.0757	0.003785	0.0123	0.000615
A17	14	20	0.0776	0.00388	0.0127	0.000635
A17	16	20	0.1005	0.005025	0.0192	0.00096
A17	16	20	0.1086	0.00543	0.0233	0.001165
A17	16	20	0.0975	0.004875	0.0194	0.00097
A17	16	20	0.105	0.00525	0.0185	0.000925
A17	16	20	0.1049	0.005245	0.0195	0.000975
A17	16	20	0.1054	0.00527	0.0194	0.00097
A17	20	15	0.0702	0.00468	0.028	0.001866667
A17	20	15	0.0841	0.005606667	0.0269	0.001793333
A17	20	15	0.0831	0.00554	0.0271	0.001806667
A17	20	15	0.0832	0.005546667	0.0272	0.001813333
A17	20	15	0.0693	0.00462	0.0274	0.001826667
A17	24	10	0.0747	0.00747	0.0277	0.00277
A17	24	10	0.0841	0.00841	0.0309	0.00309
A17	24	10	0.0805	0.00805	0.0327	0.00327
A17	24	10	0.0698	0.00698	0.0275	0.00275
A17	24	10	0.0702	0.00702	0.0281	0.00281
A17	24	10	0.0723	0.00723	0.0291	0.00291
A17	24	10	0.0733	0.00733	0.0272	0.00272
A17	24	10	0.0776	0.00776	0.0275	0.00275
A17	36	10	0.0841	0.00841	0.0448	0.00448
A17	36	10	0.0855	0.00855	0.0463	0.00463
A17	36	10	0.0811	0.00811	0.0484	0.00484
A17	36	10	0.0825	0.00825	0.0448	0.00448
A17	36	10	0.0847	0.00847	0.0445	0.00445
A17	36	10	0.0871	0.00871	0.0474	0.00474
A17	36	10	0.1063	0.01063	0.0375	0.00375
A17	36	10	0.0925	0.00925	0.0438	0.00438

Çizelge 4.3.1 (Devam) 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları.

Ekotip	DAP	Tohum adet	Taze ağırlık	Aktüel taze ağırlık	Kuru ağırlık	Aktüel kuru ağırlık
4980	8	15	0.0023	0.000153333	0.00044	2.93333E-05
4980	8	15	0.0027	0.00018	0.00046	3.06667E-05
4980	8	15	0.0022	0.000146667	0.00048	0.000032
4980	8	15	0.0021	0.00014	0.00049	3.26667E-05
4980	8	15	0.0027	0.00018	0.00067	4.46667E-05
4980	8	15	0.0023	0.000153333	0.00055	3.66667E-05
4980	10	15	0.00666	0.000444	0.00098	6.53333E-05
4980	10	15	0.00605	0.000403333	0.0014	9.33333E-05
4980	10	15	0.0061	0.000406667	0.0012	0.00008
4980	10	15	0.00705	0.00047	0.0013	8.66667E-05
4980	10	15	0.00661	0.000440667	0.00097	6.46667E-05
4980	10	15	0.00695	0.000463333	0.0012	0.00008
4980	12	20	0.0175	0.000875	0.004	0.0002
4980	12	20	0.0186	0.00093	0.0033	0.000165
4980	12	20	0.018	0.0009	0.0034	0.00017
4980	12	20	0.0171	0.000855	0.0034	0.00017
4980	12	20	0.0152	0.00076	0.0037	0.000185
4980	12	20	0.0172	0.00086	0.0036	0.00018
4980	14	20	0.0319	0.001595	0.0068	0.00034
4980	14	20	0.0308	0.00154	0.007	0.00035
4980	14	20	0.0322	0.00161	0.0069	0.000345
4980	14	20	0.0345	0.001725	0.0067	0.000335
4980	14	20	0.0376	0.00188	0.0064	0.00032
4980	16	20	0.0526	0.00263	0.0121	0.000605
4980	16	20	0.0498	0.00249	0.0107	0.000535
4980	16	20	0.0462	0.00231	0.0119	0.000595
4980	16	20	0.0448	0.00224	0.011	0.00055
4980	16	20	0.0527	0.002635	0.0114	0.00057
4980	16	20	0.059	0.00295	0.012	0.00057
4980	20	10	0.0423	0.00423	0.013	0.0013
4980	20	10	0.0412	0.00412	0.0134	0.00134
4980	20	10	0.0375	0.00375	0.0128	0.00128

Çizelge 4.3.1 (Devam) 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları.

Ekotip	DAP	Tohum adet	Taze ağırlık	Aktüel taze ağırlık	Kuru ağırlık	Aktüel kuru ağırlık
4980	20	10	0.0416	0.00416	0.0122	0.00122
4980	24	10	0.0533	0.00533	0.0219	0.00219
4980	24	10	0.0522	0.00522	0.0223	0.00223
4980	24	10	0.0534	0.00534	0.0221	0.00221
4980	24	10	0.0496	0.00496	0.0234	0.00234
4980	24	10	0.0531	0.00531	0.0214	0.00214
4980	36	10	0.0565	0.00565	0.0356	0.00356
4980	36	10	0.0644	0.00644	0.0308	0.00308
4980	36	10	0.0654	0.00654	0.0297	0.00297
4980	36	10	0.0645	0.00645	0.0345	0.00345
4980	36	10	0.0631	0.00631	0.0357	0.00357
4980	36	10	0.0702	0.00702	0.0324	0.00324
6016	8	10	0.0028	0.00028	0.00031	0.000031
6016	8	10	0.0032	0.00032	0.00049	0.000049
6016	8	10	0.0034	0.00034	0.00064	0.000064
6016	8	10	0.0028	0.00028	0.00045	0.000045
6016	8	10	0.0025	0.00025	0.00044	0.000044
6016	10	15	0.0111	0.00074	0.0021	0.00014
6016	10	15	0.0128	0.000853333	0.0026	0.000173333
6016	10	15	0.0115	0.000766667	0.0023	0.000153333
6016	10	15	0.0133	0.000886667	0.0022	0.000146667
6016	10	15	0.0118	0.000786667	0.0022	0.000146667
6016	12	20	0.0425	0.002125	0.0063	0.000315
6016	12	20	0.0356	0.00178	0.0064	0.00032
6016	12	20	0.0372	0.00186	0.0063	0.000315
6016	12	20	0.0369	0.001845	0.0071	0.000355
6016	12	20	0.031	0.00155	0.006	0.0003
6016	12	20	0.0368	0.00184	0.007	0.00035
6016	12	20	0.034	0.0017	0.0053	0.000265
6016	14	20	0.0817	0.004085	0.0133	0.000665
6016	14	20	0.0827	0.004135	0.0156	0.00078
6016	14	20	0.0818	0.00409	0.0142	0.00071

Çizelge 4.3.1 (Devam) 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları.

Ekotip	DAP	Tohum adet	Taze ağırlık	Aktüel taze ağırlık	Kuru ağırlık	Aktüel kuru ağırlık
6016	14	20	0.0792	0.00396	0.0151	0.000755
6016	14	20	0.0773	0.003865	0.0143	0.000715
6016	14	20	0.0755	0.003775	0.0135	0.000675
6016	14	20	0.0925	0.004625	0.0167	0.000835
6016	16	20	0.1432	0.00716	0.0251	0.001255
6016	16	20	0.1381	0.006905	0.0242	0.00121
6016	16	20	0.1308	0.00654	0.0273	0.001365
6016	16	20	0.1292	0.00646	0.0246	0.00123
6016	16	20	0.1454	0.00727	0.0276	0.00138
6016	20	10	0.132	0.0132	0.0286	0.00286
6016	20	10	0.1222	0.01222	0.0285	0.00285
6016	20	10	0.0909	0.00909	0.0287	0.00287
6016	20	10	0.112	0.0112	0.0277	0.00277
6016	20	10	0.119	0.0119	0.0287	0.00287
6016	24	10	0.1476	0.01476	0.0574	0.00574
6016	24	10	0.1645	0.01645	0.0524	0.00524
6016	24	10	0.1462	0.01462	0.0528	0.00528
6016	24	10	0.1676	0.01676	0.0512	0.00512
6016	24	10	0.1496	0.01496	0.0526	0.00526
6016	24	10	0.1437	0.01437	0.0513	0.00513
6016	36	10	0.1936	0.01936	0.1106	0.01106
6016	36	10	0.2031	0.02031	0.0901	0.00901
6016	36	10	0.178	0.0178	0.0961	0.00961
6016	36	10	0.1824	0.01824	0.0881	0.00881
6016	36	10	0.1797	0.01797	0.1013	0.01013
6016	36	10	0.1935	0.01935	0.0961	0.00961
6018	8	10	0.00425	0.000425	0.00087	0.000087
6018	8	10	0.00449	0.000449	0.0007	0.00007
6018	8	10	0.00431	0.000431	0.00073	0.000073
6018	8	10	0.00555	0.000555	0.00076	0.000076
6018	8	10	0.0041	0.00041	0.00072	0.000072
6018	10	20	0.02432	0.001216	0.0041	0.000205
6018	10	20	0.0195	0.000975	0.0044	0.00022
6018	10	20	0.01915	0.0009575	0.004	0.0002

Çizelge 4.3.1 (Devam) 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze ve kuru tohum ağırlıkları.

Ekotip	DAP	Tohum adet	Taze ağırlık	Aktüel taze ağırlık	Kuru ağırlık	Aktüel kuru ağırlık
6018	10	20	0.0198	0.00099	0.0042	0.00021
6018	10	20	0.0171	0.000855	0.0045	0.000225
6018	12	10	0.0305	0.00305	0.0054	0.00054
6018	12	10	0.0279	0.00279	0.0045	0.00045
6018	12	10	0.0285	0.00285	0.0055	0.00055
6018	12	10	0.0329	0.00329	0.005	0.0005
6018	12	10	0.0286	0.00286	0.0049	0.00049
6018	12	10	0.0303	0.00303	0.0046	0.00046
6018	14	20	0.115	0.00575	0.0202	0.00101
6018	14	20	0.1374	0.00687	0.0221	0.001105
6018	14	20	0.1174	0.00587	0.0253	0.001265
6018	14	20	0.1202	0.00601	0.0215	0.001075
6018	14	20	0.1212	0.00606	0.0249	0.001245
6018	16	5	0.0515	0.0103	0.0102	0.00204
6018	16	5	0.0455	0.0091	0.0099	0.00198
6018	16	5	0.0664	0.01328	0.0104	0.00208
6018	16	5	0.0514	0.01028	0.0109	0.00218
6018	16	5	0.059	0.0118	0.0105	0.0021
6018	16	5	0.057	0.0114	0.0082	0.00164
6018	20	10	0.1431	0.01431	0.0291	0.00291
6018	20	10	0.1833	0.01833	0.0274	0.00274
6018	20	10	0.1632	0.01632	0.0281	0.00281
6018	20	10	0.118	0.0118	0.0311	0.00311
6018	24	5	0.1065	0.0213	0.0327	0.00654
6018	24	5	0.0925	0.0185	0.0326	0.00652
6018	24	5	0.1016	0.02032	0.029	0.0058
6018	24	5	0.0971	0.01942	0.0344	0.00688
6018	24	5	0.1144	0.02288	0.0292	0.00584
6018	36	5	0.1377	0.02754	0.0605	0.0121
6018	36	5	0.1198	0.02396	0.057	0.0114
6018	36	5	0.1101	0.02202	0.062	0.0124
6018	36	5	0.1387	0.02774	0.0554	0.01108
6018	36	5	0.1328	0.02656	0.065	0.013
6018	36	5	0.1189	0.02378	0.0548	0.01096
6018	36	5	0.1268	0.02536	0.0553	0.01106
6018	36	5	0.1171	0.02342	0.0505	0.0101
6018	36	5	0.1037	0.02074	0.0499	0.00998

Çizelge 4.3.2 Ekotiplere ait 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta taze tohum ağırlıklarının istatistik (t-testi) sonucu.

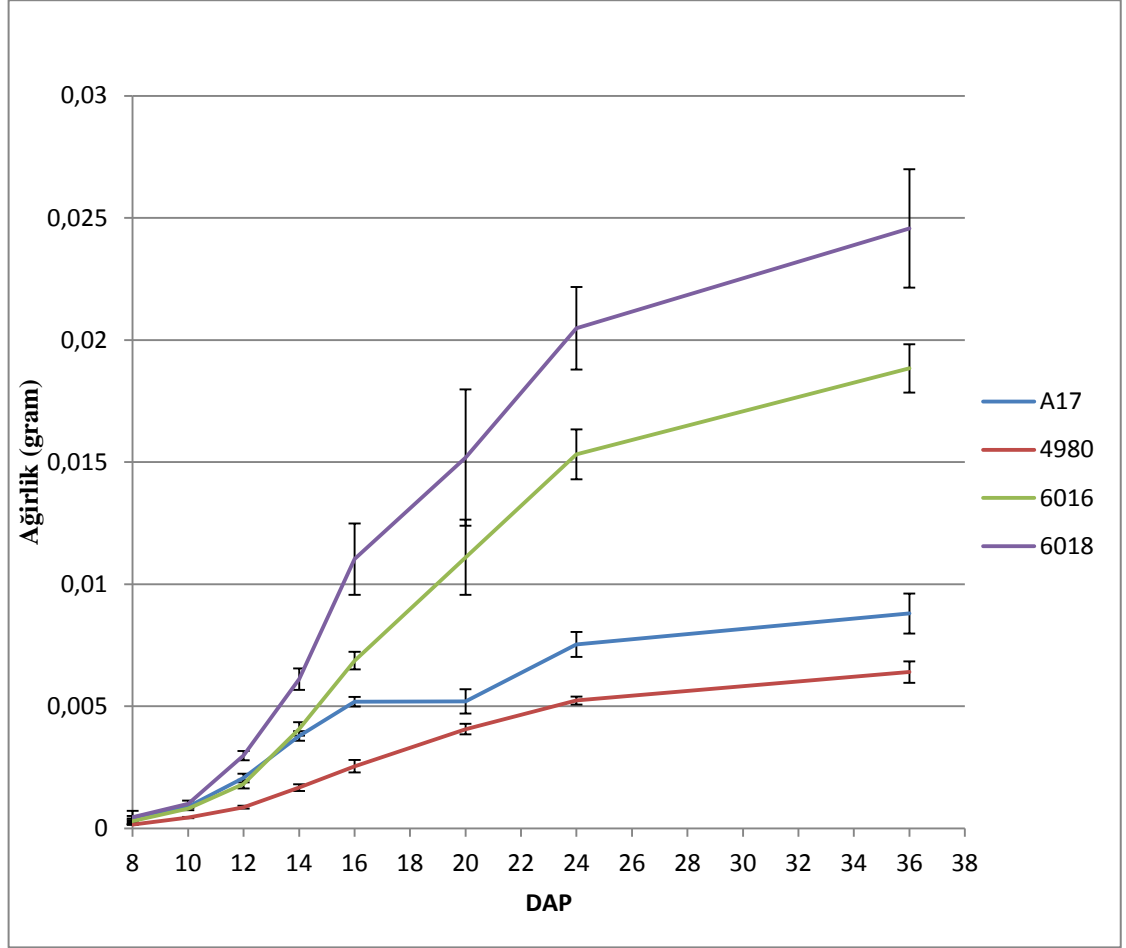
A17			4980	
DAP	Ağırlık (g)	SD	Ağırlık (g)	SD
8	0.000447	0.00027	0.0001589	1.70E-05
10	0.000893	5.60E-05	0.000438	2.80E-05
12	0.00206	0.00017	0.0008633	5.80E-05
14	0.00378	0.0002	0.00167	0.00014
16	0.005183	0.0002	0.0025425	0.00026
20	0.005199	0.0005	0.004065	0.00021
24	0.007531	0.00051	0.005232	0.00016
36	0.008798	0.00082	0.0064017	0.00044

6016			6018	
DAP	Ağırlık (g)	SD	Ağırlık (g)	SD
8	0.000294	3.60E-05	0.000454	5.80E-05
10	0.000807	6.10E-05	0.000999	0.00013
12	0.001814	0.00018	0.002978	0.00018
14	0.004076	0.00027	0.006112	0.00044
16	0.006867	0.00036	0.011027	0.00146
20	0.011103	0.00154	0.01519	0.00279
24	0.01532	0.00102	0.020484	0.0017
36	0.018838	0.00099	0.024569	0.00242

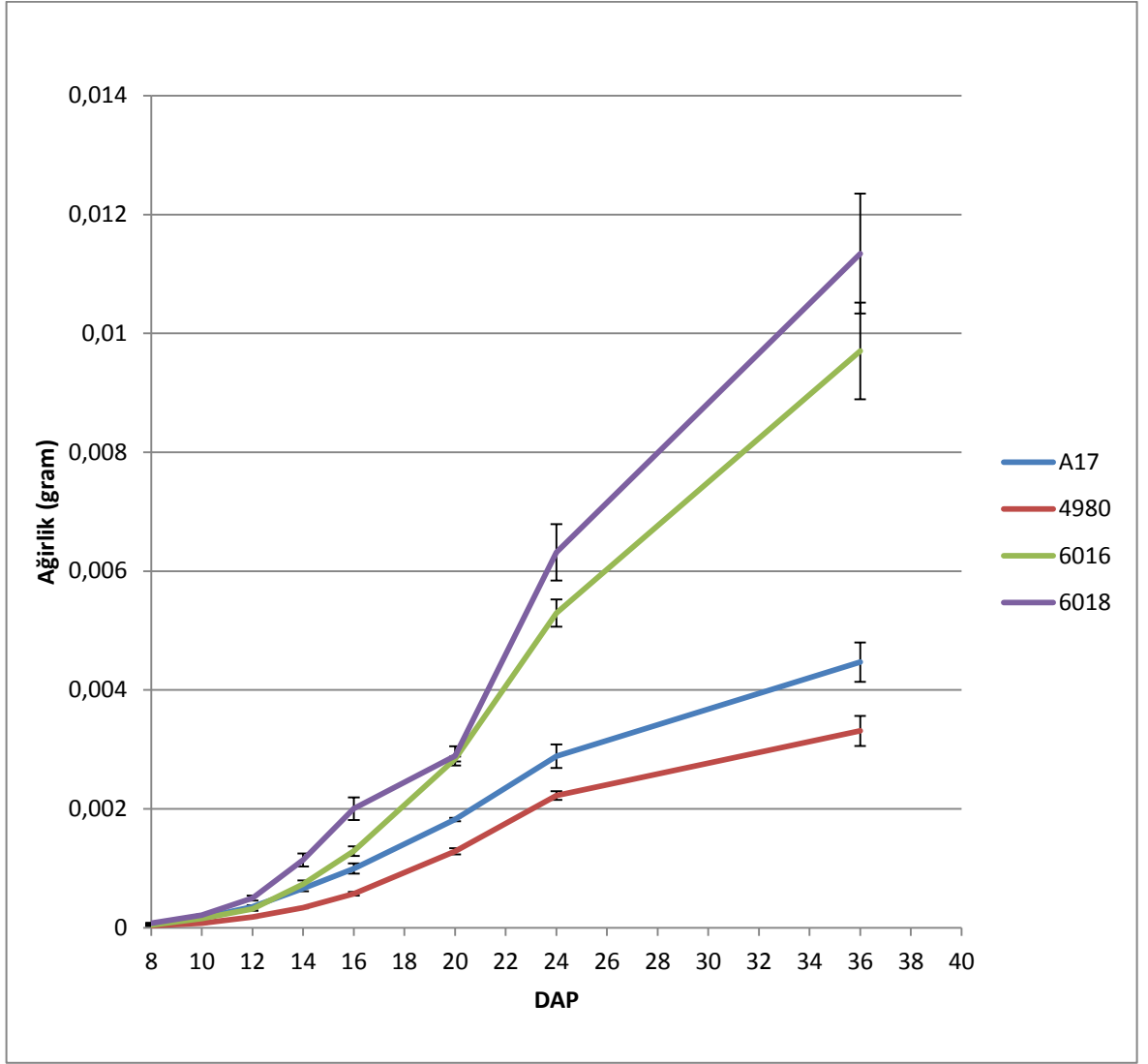
Çizelge 4.3.3 Ekotiplere ait 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 ve 36 dap'ta kuru tohum ağırlıklarının istatistik (t-testi) sonucu.

A17			W6 4980	
DAP	Ağırlık (g)	SD	Ağırlık (g)	SD
8	0.0000665	4.13521E-06	3.43333E-05	5.63718E-06
10	0.000163333	1.36588E-05	7.83333E-05	1.14523E-05
12	0.0003505	2.74317E-05	0.000178333	1.29099E-05
14	0.00066	4.75511E-05	0.000338	1.15109E-05
16	0.000994167	8.56397E-05	0.000571	2.94534E-05
20	0.001821333	2.80476E-05	0.001285	5E-05
24	0.00288375	0.000197624	0.002222	7.39594E-05
36	0.00446875	0.000330041	0.003311667	0.000254198

W6 6016			W6 6018	
DAP	Ağırlık (g)	SD	Ağırlık (g)	SD
8	0.0000466	1.18448E-05	0.0000756	6.73053E-06
10	0.000152	1.28236E-05	0.000212	1.03682E-05
12	0.000317143	3.03942E-05	0.000498333	4.07022E-05
14	0.000733571	6.04645E-05	0.00114	0.00011068
16	0.001288	7.89462E-05	0.002003333	0.000189912
20	0.00284	4.219E-05	0.0028925	0.000160909
24	0.005295	0.000228189	0.006316	0.000475058
36	0.009705	0.000814709	0.011342222	0.001008585



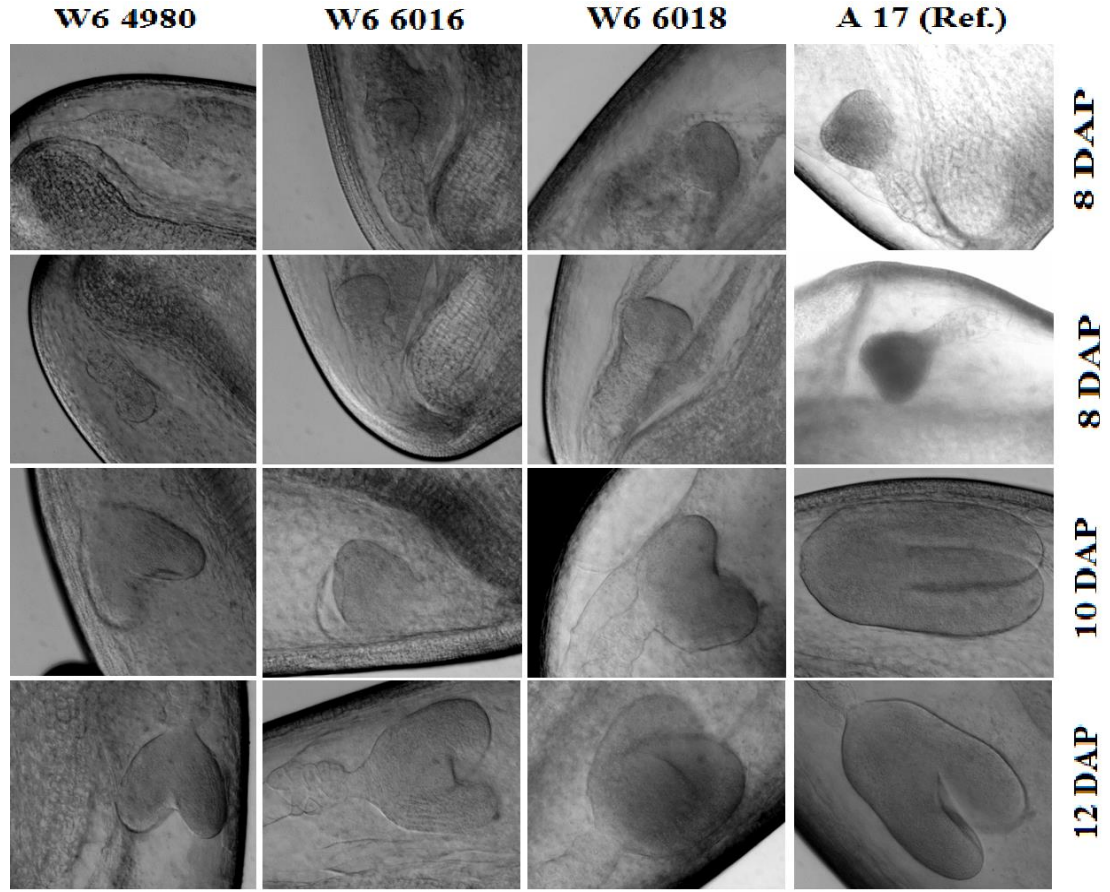
Şekil 4.3.1 8 dap ile 36 dap arası taze tohum ağırlık grafiği.



Şekil 4.3.2 8 dap ile 36 dap arası kuru tohum ağırlık grafiği.

4.4 DIC Görüntüleme ile Tohum Gelişim Aşamalarının Analizi

Tohumun gelişim aşamalarının incelenmesi amacıyla farklı dap'lar olan 8, 10 ve 12 dap zamanlı ekotiplerin DIC görüntülemesinde ekotipler arasında embriyoların gelişim aşamalarında çeşitli farklılıklar gözlemlenmektedir. A 17 (referans) ekotipine ait bitkinin 8 dap ile 10 dap arasındaki DIC gözleminde erken kalp oluşumu gözlenmekte iken W6 4980, W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerinin embriyo gelişimlerinin globular safhada olduğu görülmektedir. 10 dap'ta ise A 17 (referans) ekotipinin embriyo gelişimi torpedo aşamasında iken W6 6018 ve W6 4980 ekotiplerinde kalp, W6 6016 ekotipinde ise embriyonun erken torpedo aşamasında olduğu gözlemlendi. 12 dap'ta ise A 17 (referans), W6 6016 ve W6 6018 embriyolarının torpedo aşamasında olduğunu W6 4980 ekotipinin ise Kalp aşamasında olduğu DIC görüntülemesi ile orataya çıkarılmıştır. 12 dap'tan önce W6 6016, W6 6018, W6 4980 ekotiplerinin embriyo gelişimleri A17 (referans) ekotipinin embriyo gelişimine göre yavaş bir gelişim aşaması göstermekte iken 12 dap'tan sonra W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerinin embriyo boyutları artış göstermektedir (Şekil 4.4.1). A 17 (referans) ekotipine göre 8 ile 10 dap arasında geç embriyo gelişimi gösteren fakat 13 dap'tan sonra hızlı gelişim gösteren W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerinin farklılığa neden olan etmenleri öğrenebilmek için hormonal ve metabolomik çalışmaların bizim için kritik değeri olan bu 10, 12 ve 14 dap aralığındaki tohumlardaki sonuçları oldukça değerli olacaktır.

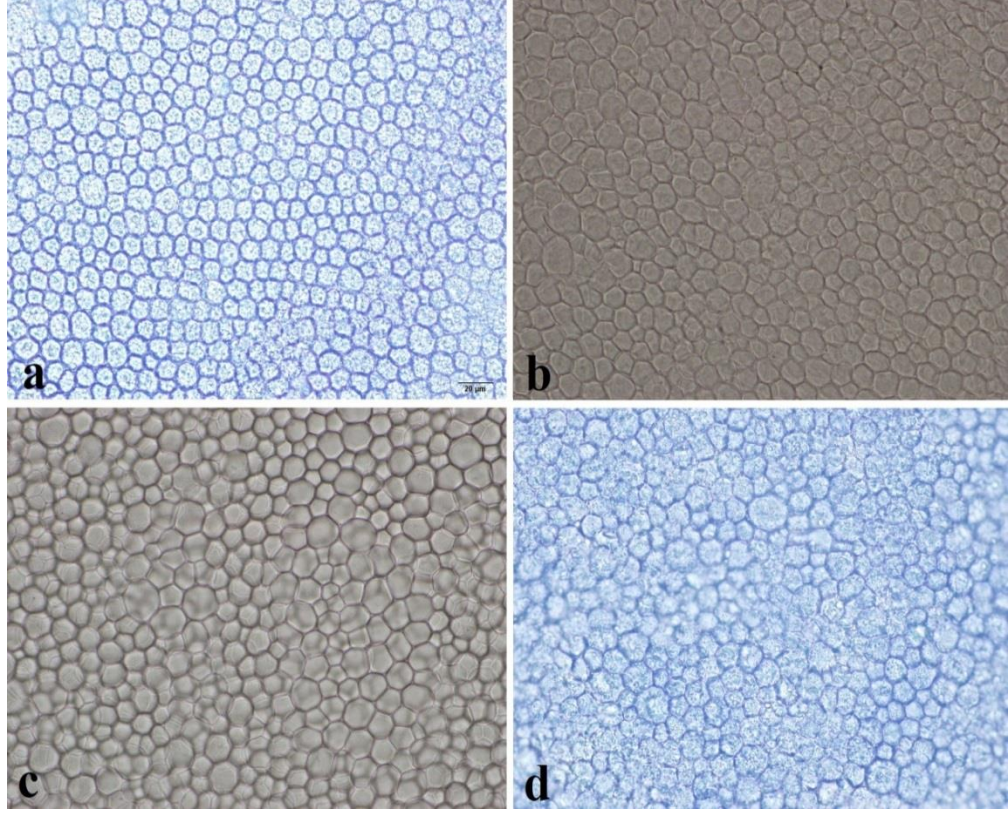


Şekil 4.4.1 Farklı dap'lardaki ekotiplerin DIC görüntüleme ile embriyo gelişim aşamalarının gözlenmesi.

4.5 Ekotiplerde Hücre Boyutu ve Şeklinin Analizi

Tohumda bulunan toplam hücre sayısı, şekli ve boyutunun tohumun boyutu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hücre sayısındaki toplam artış embriyonun gelişiminin erken dönemlerinde bazı avantajların ve tohumda daha fazla miktarda depo materyallerinin birikiminin göstergesidir. Bu yargının *Medicago* için doğru olup olmadığını ölçmek için ekotiplere ait olgun tohum örneklerinin incelenmesinde belirli bir alan baz alınarak tohumlardaki hücre boyutlarının incelenmesi için ekotiplerin tohumların tamamı mikroskopik olarak incelendi ve fotoğraflandı (Şekil 4.5.1). Daha sonra bilgisayar ortamında ekotiplerin tohumlarının içermiş oldukları ortalama hücre sayısı belirlendi

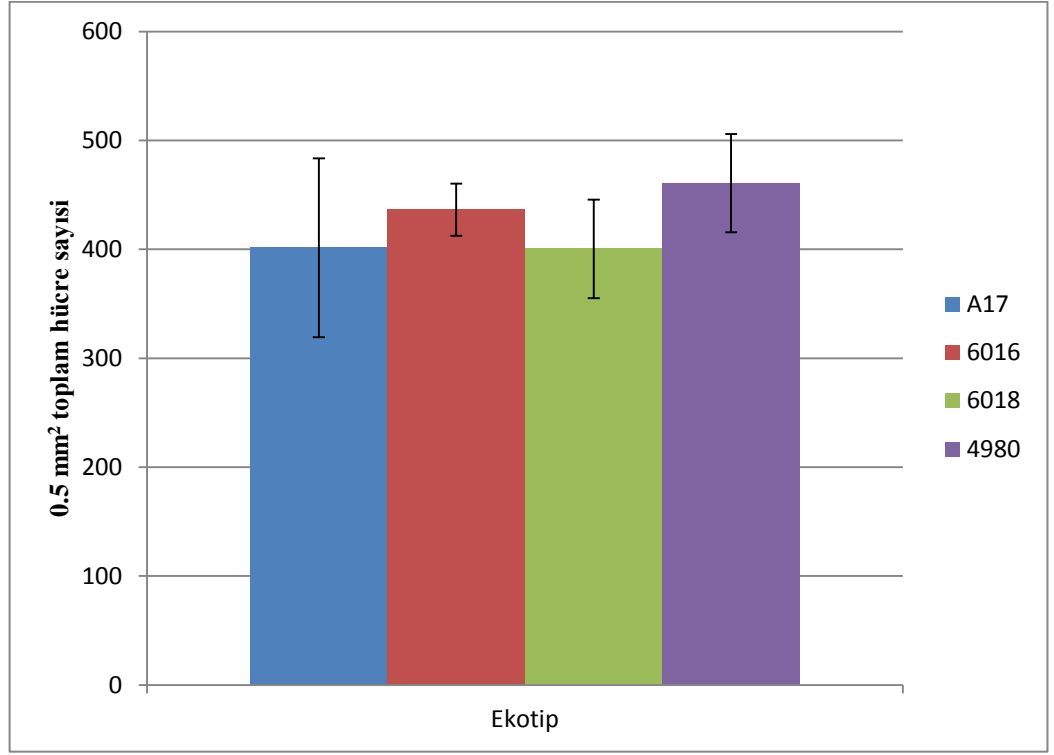
(Çizelge 4.5.1). Boyutsal ve sayısal olarak önemli bir farklılığın olmadığı gözlemler ve t-testi analizi sonucu belirlenmiş ve sonuçlar grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.5.2).



Şekil 4.5.1 Ekotiplere ait olgun tohumlarda Olympus BX41 floresan mikroskop ile hücrelerin görünümü. **a**; W6 4980, **b**; W6 6016, **c**; W6 6018, **d**; A 17 (referans) ekotipi.

Çizelge 4.5.1 Ekotiplere ait tohumların birim alanda içermiş oldukları hücre sayıları

Ekotipler	Hücre sayısı	Ortalama	SD	P değeri
6018	349	400.33333	45.299007	0.42284741
6018	348			
6018	356			
6018	371			
6018	472			
6018	439			
6018	415			
6018	427			
6018	426			
6016	419	436.33333	24.063804	0.1259419
6016	445			
6016	480			
6016	431			
6016	413			
6016	430			
4980	444	460.72727	45.177629	0.02221843
4980	521			
4980	469			
4980	387			
4980	553			
4980	427			
4980	460			
4980	425			
4980	456			
4980	459			
4980	467			
A17	466	401.4	82.154529	
A17	477			
A17	372			
A17	433			
A17	259			
A17	356			



Şekil 4.5.2 Ekotip tohumlarının birim alanda içermiş oldukları ortalama hücre sayıları grafiği.

4.6 Ekotip Tohumlarının Enzim Solüsyonu İçerisinde Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi

Ekotiplere ait olgun tohumların içermiş oldukları toplam hücre sayısının belirlenmesinde her ekotipten toplamda rastgele seçilmiş 3 tohumda hemositometre ile yapılan hücre sayısı ölçümünde tohumların içermiş oldukları hücre sayıları arasında farklılıklar gözlemlenmektedir. Büyük tohum yapısına sahip olan W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerinin hemositometrenin birim alanlarında daha fazla sayıda olduğu, küçük boyuttaki W6 4980 ve A 17 (referans) ekotiplerinin ise daha az sayıda hücre içerdiği mikroskobik incelemeler sonucunda gözlemlendi ve hücrelerin 0.1 µl enzim solüsyonundaki hücre sayıları sayımı yapıldı (Çizelge 4.6.1). Daha sonra elde edilen veri sonuçları kullandığımız 1.5 ml solüsyonda 3 tohum için eşleştirildi (Çizelge 4.6.2). Elde edilen sonuçlar t-testi istatistik analizi ile karşılaştırıldı ve grafik yardımı ile ekotipler arasındaki farklılık gözlemlendi (Şekil 4.6.1). Olgun tohumların daha önceki çalışmada birim alandaki boyutlarının ve

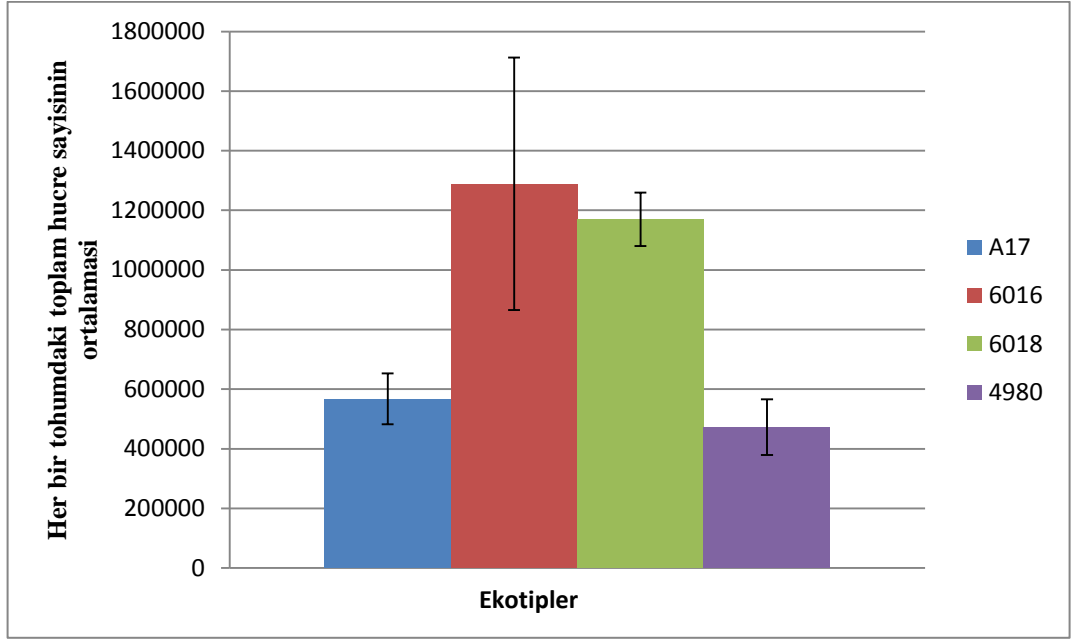
sayılarının benzer olduğunu gözlemiştik fakat enzim solüsyonu içerisinde ekotiplerin içerdiği oldukları toplam sayının farklı olmasının sebebinin büyük tohum yapısına sahip olan bitkilerin tohumlarında daha fazla sayıda hücre bölünmesi gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu verilerden yola çıkılarak şu sonuca ulaşmak mümkündür: Büyük tohumlara sahip ekotiplerde büyüklük hücre büyüklüğünden ziyade hücre sayısının fazlalığından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.6.1 Ekotip olgun tohum örneklerinin 0.1 µl enzim solüsyonundaki hücre sayıları.

Ekotip	Hücre sayısı	Ortalama	SD	p değeri
6018	222	1170000	89721.8	3.438E-05
6018	220			
6018	235			
6018	259			
6016	362	1288750	423524	0.0197853
6016	291			
6016	182			
6016	196			
4980	98	472500	93586	0.0923756
4980	100			
4980	112			
4980	68			
A 17	131	567500	85391.3	
A 17	121			
A 17	111			
A 17	91			

Çizelge 4.6.2 1.5 ml enzim solüsyonu içinde çözünen 3 tohum örneği için hücre sayılarının dağılımı.

Ekotip	Hücre sayısı
6018	1110000
6018	1100000
6018	1175000
6018	1295000
6016	1810000
6016	1455000
6016	910000
6016	980000
4980	490000
4980	500000
4980	560000
4980	340000
A 17	655000
A 17	605000
A 17	555000
A 17	455000

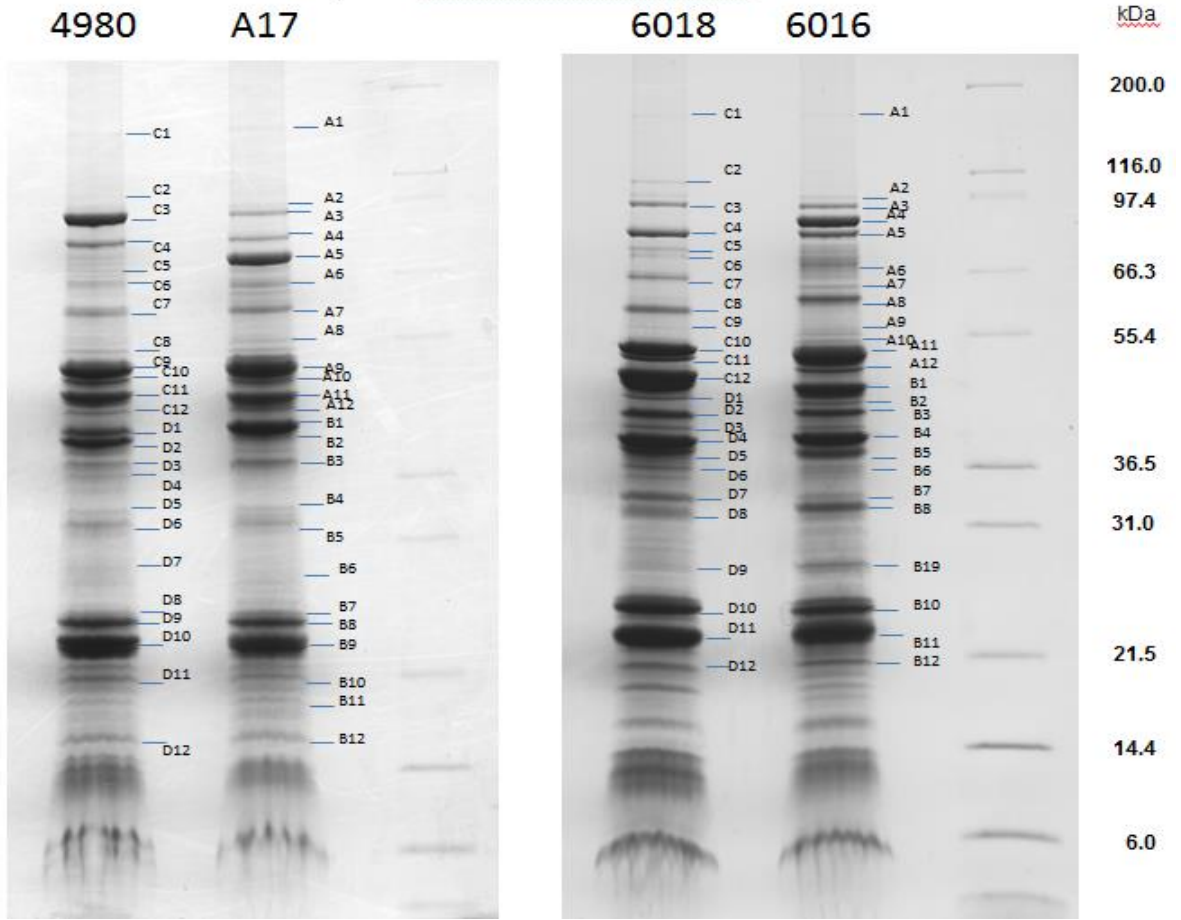


Şekil 4.6.1 1.5 ml enzim solüsyonunda çözünen 3 adet tohum örneklerinin hemositometre ile sayılarının belirlenmesi ve t testi analizi ile sonuçlandırılması.

4.7 Proteomik Veri Sonuçları ve Analizi (1D Jel Elektroforez)

Ekotiplere ait olgun tohum örneklerinin proteomik analiz verileri sonucunda elde edilen jel elektroforez görüntüsünde proteinler yoğunluğu arasında önemli bir fark gözlemlenemedi (Şekil 4.7.1). Büyük tohum yapısına sahip olan W6 6016 ekotipi ve W6 6018 ekotipi ile benzer yoğunluğa sahip fakat küçük tohum boyutuna sahip olan referans ekotip ve W6 4980 ekotipinde farklı şekilde yoğunluk gösteren herhangi bir jel görüntüsüne rastlanmadı. Bu sonuçlar ekotipler arasındaki büyüklük için bizim gözlem spektrumumuza giren proteinlerin hiçbirisinin belirgin bir fark yaratmadığını göstermektedir.

1D jel elektroforez



Şekil 4.7.1 Proteomik analiz, 1 D jel elektroforez grafiği

4.8 Non-Polar Metabolitlerin Analizi ve Sonuçlandırılması

Metabolomik verilerden elde edilen sonuçlara göre referans olan A17 ekotipinin diğer ekotiplerle kıyaslamasında 270 farklı non polar metabolit arasında önemli derecede ve sayıda farkın olmadığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.8.1).

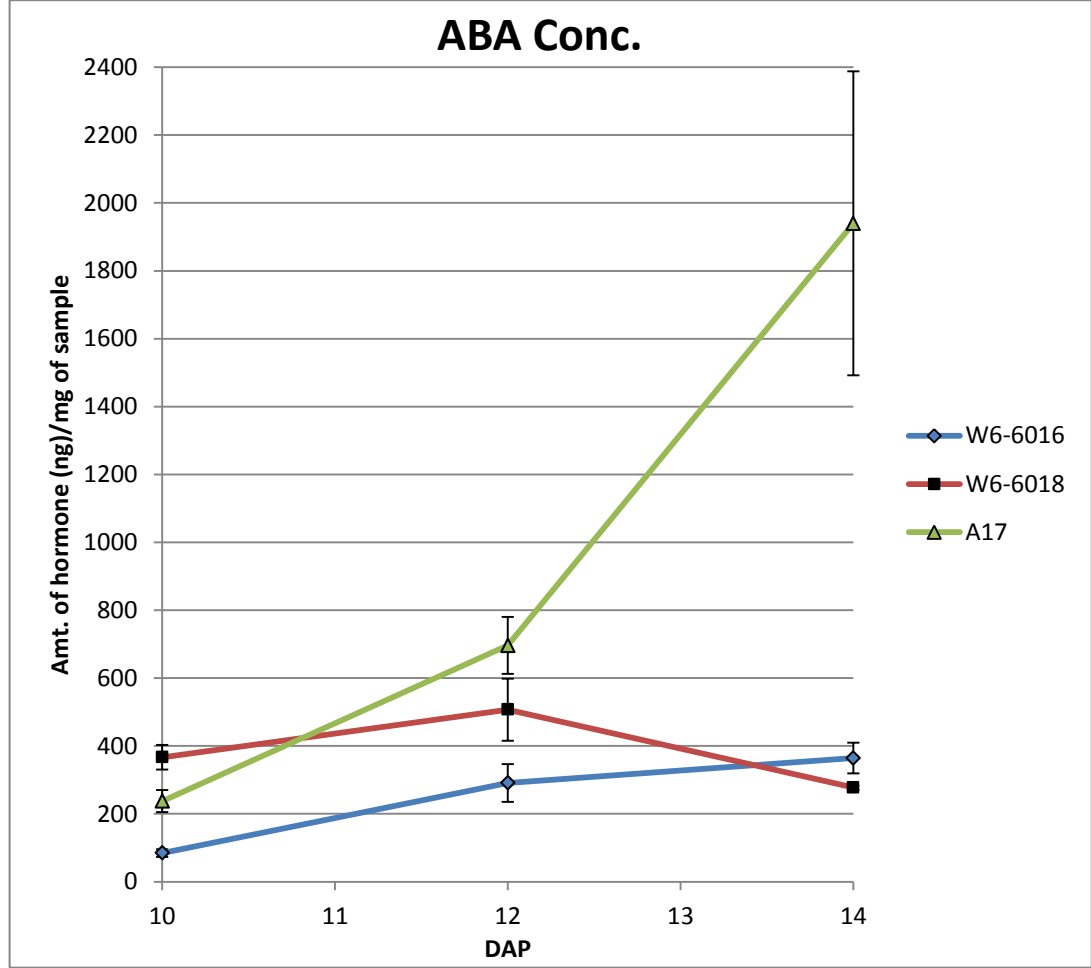
Çizelge 4.8.1 Non polar bileşiklerin ekotipler arasındaki ilişkisi.

Karşılaştırma	Aralarında Anlamlı Fark Bulunan Çiftler
A17 - W6 6016	7
A17 - W6 6018	73
A17 - W6 4980	93
A17 - (W6 6016-W6 6018)	0
(A17-W6 4980) - (W6 6016-W6 6018)	0

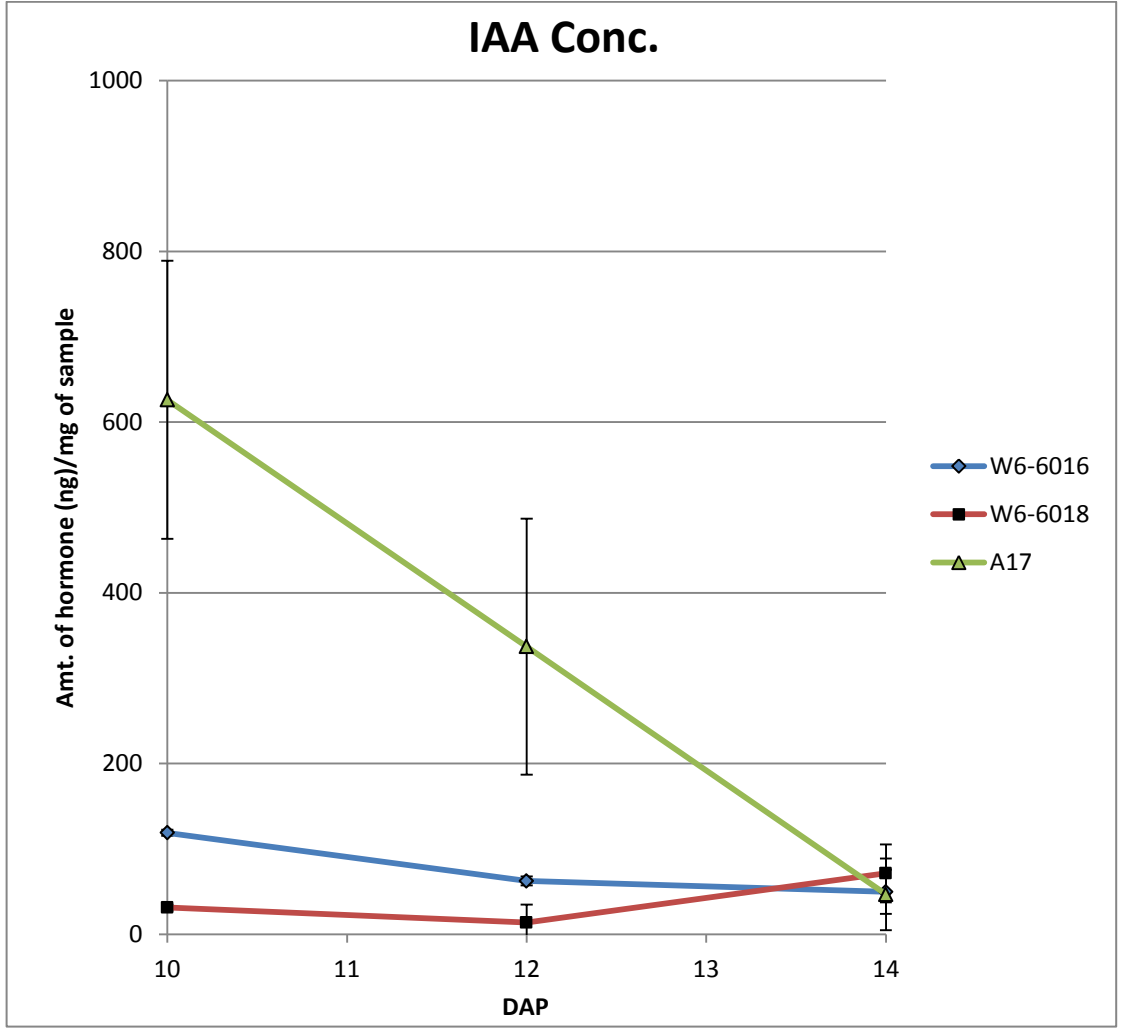
4.9 Hormonal Aşamaların Analizi ve Sonuçlandırılması

A17, W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerinin 10, 12 ve 14 dap'lık zamanlarından alınan tohum örneklerinin IAA, IAA-Asp, ABA ve trans-Zeatin riboside hormonal analizleri sonucunda elde edilen veri grafiklerinde ABA hormonal düzeyindeki analizinde referans olan A17 ekotipinin ABA'nın miktarının sürekli olarak arttığını ve özellikle de 12 dap'tan sonra daha yüksek ivmeli bir artış gösterdiği gözlemlenirken, diğer iki ekotip olan W6 6016 ve W6 6018 ekotiplerinin referans ekotipine göre daha az ABA artışı olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.9.1). ABA hormonunun bitki metabolizmasında artışının bitki de dormansiye neden olduğu ve bitkide hücre bölünmesini yavaşlattığı bilinmektedir[85]. Büyüme hormonu olan IAA konsantrasyonu ise referans olan A17 ekotipinde diğer iki ekotipe göre 10 dap'a kadar artış göstermekte iken 10 dap'dan sonra sert bir düşüş göstermektedir (Şekil 4.9.2). W6 6018 ekotipi ise 12 dap'dan sonra da artışına devam etmekteyken W6 6016 ekotipinde IAA seviyesi A17' ye göre biraz daha düşük seviyede kalmıştır. IAA-Asp konsantrasyonu ise her üç ekotipte 12 dap'dan sonra doğru orantılı bir şekilde azaldığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.9.3). Trans-Zeatin riboside hormon miktarı ise 10 dap' da W6

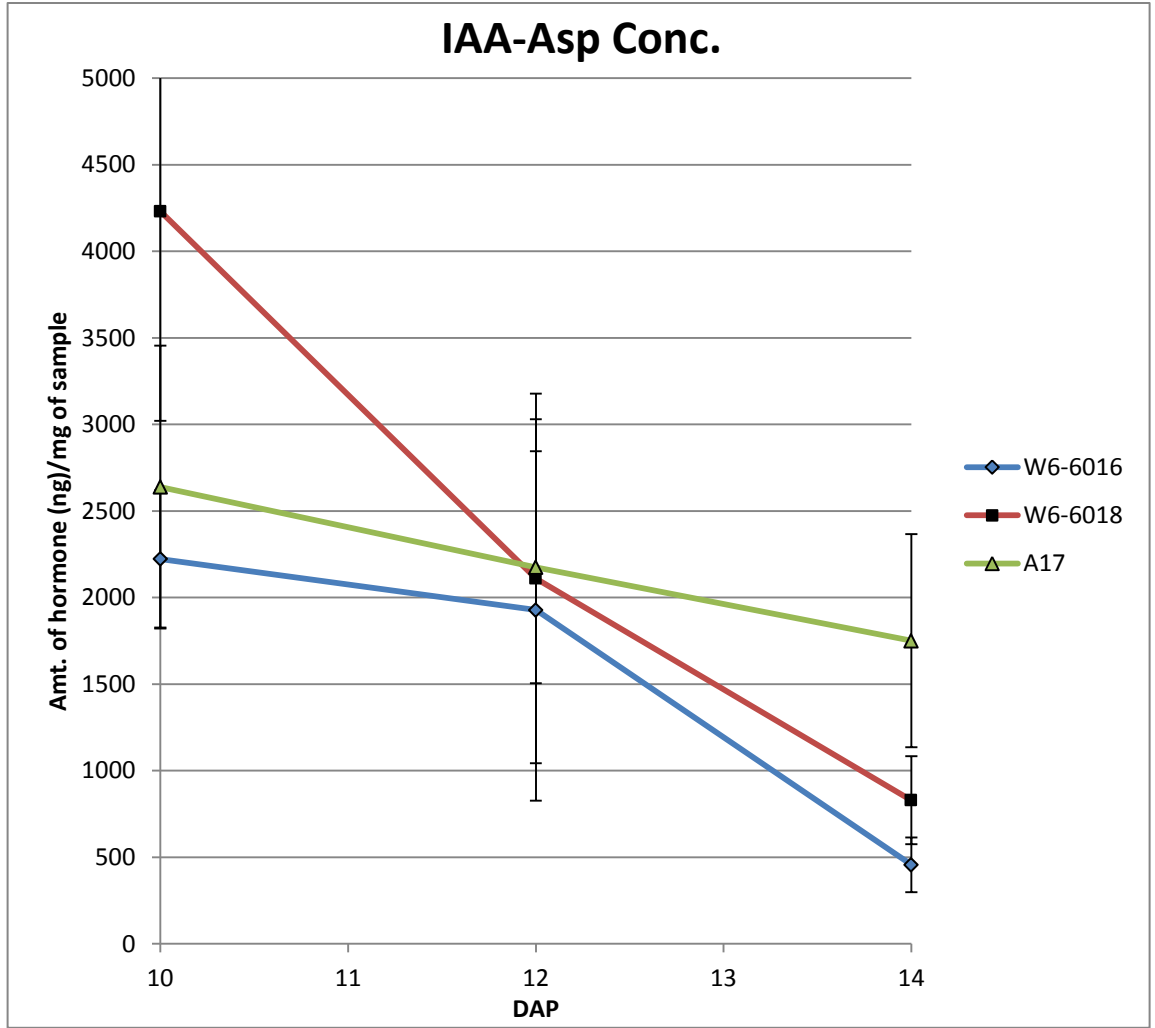
6018 ekotipinde yüksek bir seviyede iken 10 dap'dan sonra sert bir düşüş göstermekte ve 12 dap' da üç ekotipinde seviyeleri birbirine eşit olmaktadır (Şekil 4.9.4).



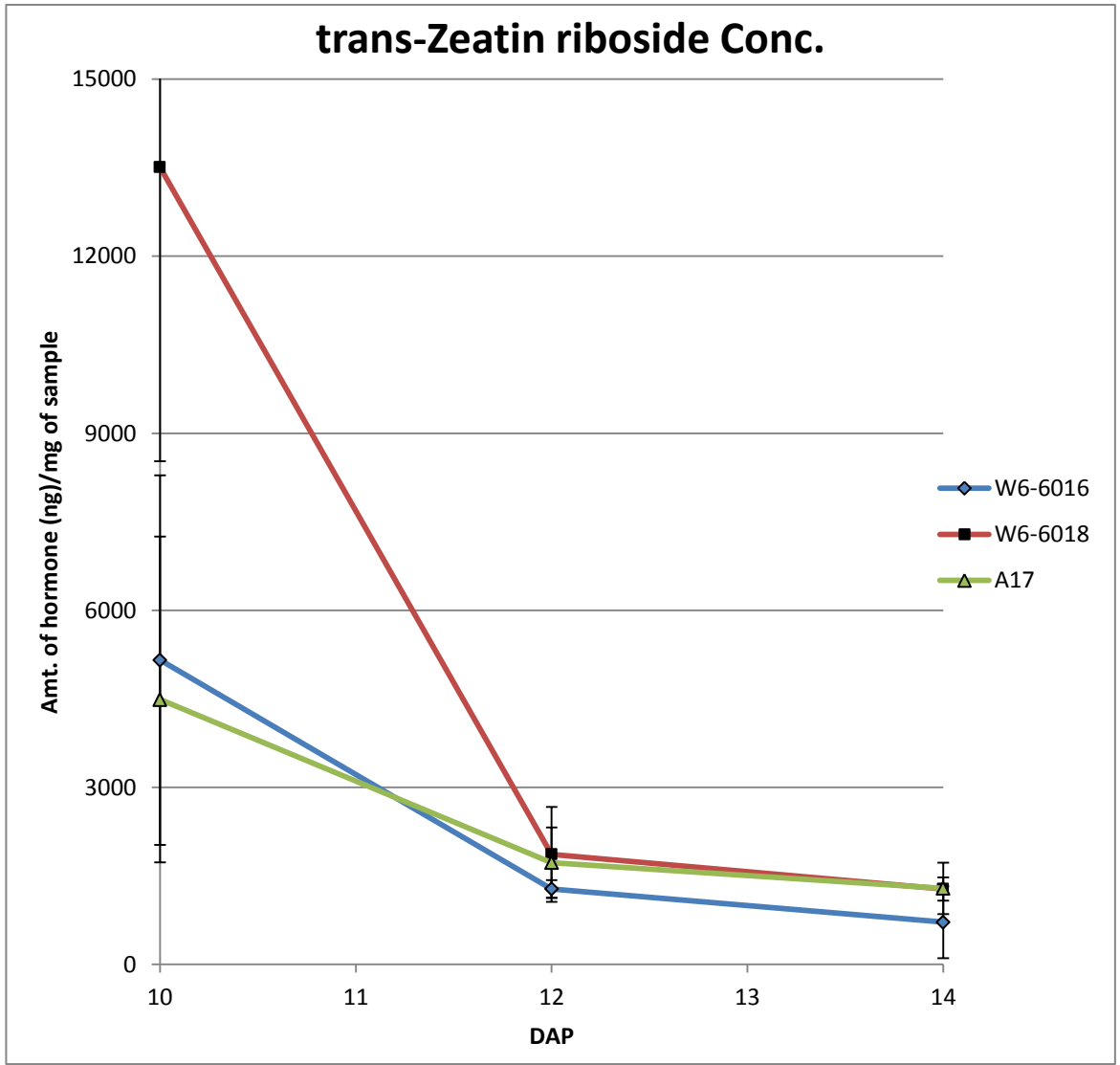
Şekil 4.9.1 Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında ABA hormon grafiği.



Şekil 4.9.2 Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında IAA hormon grafiği.



Şekil 4.9.3 Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında IAA-Asp hormon grafiği.



Şekil 4.9.4 Ekotiplerde 10, 12 ve 14 dap aralığında trans-Zeatin riboside hormon grafiği.

5. TARTIŞMA

İnsanlığın besin ihtiyacını karşılayan ve besini yılın farklı zaman dilimlerinde bozulmadan kullanılmasına imkan verdiği için tohum oldukça değerli bir tarımsal üründür[86]. Bitkilerde tohum büyüklüğü ve kompozisyonu verim ve besin kalitesini etkilediği için ekonomik tarımsal açıdan oldukça önemli iki faktördür[87]. Eldeki çalışmada model bitki olan *Medicago truncatula*'da doğal olarak varyasyon gösteren bu karakterlerin tohum gelişim aşamalarında nasıl ortaya çıktıklarını analiz etmek için farklı analiz yöntemlerini kullandık. Çalışmamızda yapılan değerlendirmelerin ilkinde tohum boyutu ve içeriğinin, bitki çiçeklerindeki ovul sayıları ile herhangi bir ilişkisinin bulunup bulunmadığının test edilmesidir. Yapılan analizler tohum boyutu ve içeriğinin, bitki çiçeklerindeki ovul sayıları ile doğrudan bir ilişki içerisinde olmadıklarını göstermektedir. Ovul sayısı ile tohum sayısı arasında doğrudan ilişki varolmakla beraber tohum büyüklüğü ile ovum sayısı arasında anlamlı bir ilişki diğer canlılarda da kurulamamıştır[88]. Tohum büyüklüğünün tür içerisinde farklı ekotipler arasında farklılık göstermesi ise yeryüzüne dağılım ile alakalı bir adaptasyon olarak kayda geçirilmiştir[89]. Yaptığımız bir diğer morfolojik analiz ise hücre sayısının mı yoksa boyutunun mu tohum büyüklüğüne etki ettiğinin tespit edilmesidir. Çalışmamızın sonuçları hücrelerin ebatları arasında farklılık olmadığını göstermiş ve tohum büyüklüğünün hücre sayısından kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bitkilerde yaygın görülen tür içi çekirdek DNA içeriği farklılığı ploidi değişimlerini ve dolayısıyla da hücre büyüklüğünü ve bitki morfolojik büyüklüğünü gerektirdiği önceki bir çok çalışmada rapor edilmiştir[90, 91].

Çalışmamızda ekotipler arasında proteomik ve iyonik değerler için bir fark gözlenmezken, hormonlardan ABA'nın 12-14 dap aralığında büyük bir ivme ile arttığını gözlemledik. Büyük tohumlarda görülen yüksek düzeyde ABA miktarı daha önce farklı bitki tohumlarında da rapor edilmiştir[92, 93]

KAYNAKLAR

- [1] Verdier J, Kakar K, Gallardo K, Le Signor C, Aubert G, Schlereth A, Town CD, Udvardi MK, Thompson RD (2008) Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Molecular Biology* 67(6): 567-580.
- [2] Lesins KA, Lesins I 1979. Genus *Medicago* (Legüminosae), a taxogenetic study. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- [3] Quiros CF, Bauchan GR 1988. The genus *Medicago* ve the origin of the *Medicago sativa* complex, p. 93-124, In A. A. Hanson, et al., eds. *Alfalfa ve alfalfa improvement*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- [4] Shultze M, Kondorosi A 1988. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet.* 32:33-37.
- [5] Graham, E.H., 1941, Legumes for erosion control and wildlife, U.S. Department of Agriculture, Miscellaneous publications, no: 412, Washington.
- [6] Graham, P.H. and Vance, C.P. (2003) Legümes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872–877.
- [7] Sprent, J.I., 1999, Nitrogen fixation and growth of non-crop legüme species in diverse environments, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, Urban & Fischer Verlag, Vol 2(2) p: 149-162.
- [8] Smil, V. (1999) Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles*, 13, 647–662.
- [9] Brewin, N.J. (1991) Development of the legüme root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 191–226.
- [10] USDA 1997, United States Department of Agriculture, *Agriculture Fact Book*.
- [11] Udvardi, M.K. and Day, D.A. (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legüme nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 48, 493–523.
- [12] Van der Mensbrugge D, Osorio Rodarte I, Burns A, Baffes J (2009) How to feed the World in 2050: macroeconomic environment, commodity markets – a longer term outlook. The World Bank & FAO, 12 October 2009 <http://mpr.ub.uni->

muenchen.de/19061.

- [13] Beddington J (2010) Food security: contributions from science to a new and greener revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 61-71.
- [14] Guillon F, Champ MM-J (2002) Carbohydrate fractions of legümes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition* 88: 293-306.
- [15] Veitch NC (2007) Isoflavonoids of the Legüminosae. *Natural Product Reports* 24(2): 417-464.
- [16] Açıköz, E., 2001. Yem bitkileri. III. Baskı, U.Ü. Güçlendirme Vakfı yay. No: 182, Bursa, 584 s.
- [17] Le Signor C, Gallardo K, Prosperi J, Salon C, Quillien L, Thompson R, Duc G (2005) Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. *Plant Genetic Resources* 3: 59-71.
- [18] Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prosperi JM, Rochat C and Boutin JP (2005) Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol Biochem* 43, 557-66.
- [19] Wang, T.L., Domoney, C., Hedley, C.L., Casey, R., Grusak, M.A., Centre, J.I., Nr, N.,and W, U.K.T.L. (2003). Update on Seed Quality Traits Can We Improve the Nutritional Quality of Legüme Seeds? *Plant Physiology* 131, 886-891.
- [20] Cannon SB, May GD, Jackson SA (2009) Three sequenced legüme genomes and many crop species: rich opportunities for translational genomics. *Plant Physiology* 151(3): 970-977.
- [21] Gepts P, Beavis W, Brummer E, Shoemaker R, Stalker H, Weeden N, Young N (2005) legümes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-Legüme Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137(4): 1228-1235.
- [22] Shultze M, Kondorosi A, 1998: Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet*, 32:33-37.
- [23] Seçmen Ö, vd, 2011. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova- İzmir pp. 228.
- [24] Cook DK, VandenBosch A, de Bruijn F, Huguet T: Model legümes get the nod.

Plant Cell 1997, 9:275-281.

[25] Kneen BE, LaRue TA: Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweetclover (*Melilotus alba annua*). Plant Sci 1988, 58:177-182.

[26] Barker DG, Bianchi S, London F, Dattee Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Genier G, Guy P et al.: *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Mol Biol 1990, 8:40-49

[27] Douglas R Cook : *Medicago truncatula* — a model in the making! Current Opinion in Plant Biology 1999, 2:301–304.

[28] Blondon F, Marie D, Brown S, Kondorosi A (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. Genome 37:264–275.

[29] Bonin I, Huguet T, Gherardi M, Prosperi JM, Olivieri I: High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species *Medicago truncatula* Gaertn. using RAPDs markers. Am J Bot 1996, 83:843-855.

[30] Young, N.D., Cannon, S.B., Sato, S., Kim, D., Cook, D.R., Town, C.D., Roe, B.A., and Tabata, S. (2005). Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. Plant Physiology 137, 1174-1181.

[31] Young N, Udvardi M (2009) Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. Current Opinion in Plant Biology 12(2): 193-201.

[32] Maria J H (2000) Molecular genetics of model legumes. *Trends in Plant Science* 5: 414-415.

[33] Essad S. 1987. Sur la relation possible d'une unit  de variation saltatoire de l'AND nucléaire, le nucl on, et des chromosomes B dans le genre *Medicago* L. C. R. Acad. Sci. Paris 305 série III:307-310. *liana and plant molecular genetics. Science* 229:1214-1218.

[34] Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker D (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. Plant Cell Reports 22(1): 46-51.

[35] Thoquet P, Gherardi M, Journet E-P, Kereszt A, Ane J-M, Prosperi J-M, Huguet (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. BMC Plant Biology 2: 1.

- [36] Rogers C, Wen J, Chen R, Oldroyd G (2009) Deletion-based reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 151(3): 1077-1086.
- [37] Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao P, Chabaud M (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Journal* 54(2): 335-347.
- [38] Gallardo K, Le Signor C, Vandekerckhove J, Thompson R, Burstin J (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* Seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology* 133(2): 664-682.
- [39] <http://www.medicagohapmap.org> 12/02/2013
- [40] <http://mtgea.noble.org/v2/> 12/02/2013
- [41] Chabaud, M., de Carvalho-Niebel, F., and Barker, D.G. (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports* 22, 46-51.
- [42] Meyerowitz, E.M. and R.E. Pruitt. 1985. *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* 229:1214-1218.
- [43] Essad S. 1988. Mise en évidence de variations saltatoire de l'ADN nucléaire dans et entre les espèces du genre *Medicago* L. *Genome* 30:825-834.
- [44] Bennett, M.D. and J.B. Smith. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* 274:224-274.
- [45] Bennett, M.D., J.B. Smith and J.S. Heslop-Harrison. 1982. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proc. R. Soc. London B* 216:179-199.
- [46] Goldberg R, de Paiva G, Yadegari R (1994) Plant Embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266(5185): 605-614.
- [47] Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L. (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 54(4): 608-620.
- [48] Wang H L , Grusak M A *Ann Bot* 2005;95:737-747.
- [49] Fahn, A. 1974. *Plant Anatomy*. Page Bros Ltd., Second Edition. Norwich, G.Britain, 611 p. Gerrath, J. M. and U. Posluszny, 1988. *Morphologic*.

- [50] Verdier J, Kakar K, Gallardo K, Le Signor C, Aubert G, Schlereth A, Town CD, Udvardi MK, Thompson RD (2008) Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Molecular Biology* 67(6): 567-580.
- [51] Verdier J, A. Benedito V, Udvardi MK. The *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA): a tool for legume seed biology and biotechnology.
- [52] <http://www.medicagohapmap.org/> 14/02/2013
- [53] Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray J, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK (2008) A gene expression atlas of the model legume, *Medicago truncatula*. *Plant Journal* 55(3): 504-513.
- [54] He J, Benedito VA, Wang M, Murray JD, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK (2009) The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* 10: 441.
- [55] Gallardo K, Kurt C, Thompson R, Ochatt S (2006a) *In vitro* culture of immature *M. truncatula* grains under conditions permitting embryo development comparable to that observed *in vivo*. *Plant Science* 170(6): 1052-1058.
- [56] Verdier J, Kakar K, Gallardo K, Le Signor C, Aubert G, Schlereth A, Town CD, Udvardi MK, Thompson RD (2008) Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. *Plant Molecular Biology* 67(6): 567-580.
- [57] Goffard N, Weiller G (2007) GeneBins: a database for classifying gene expression data, with application to plant genome arrays. *BMC Bioinformatics* 8: 87.
- [58] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research* 32: D277-D280.
- [59] Verdier J, A. Benedito V, Udvardi MK. The *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA): a tool for legume seed biology and biotechnology.
- [60] Wang H, Grusak M (2005) Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. *Annals of Botany* 95(5): 737.
- [61] Gallardo K, Lesignor C, Darmency M, Burstin J, Thompson R, Rochat C, Boutin J-P, Küster H, Buitink J, Leprince O, Limami A, Grusak MA (2006b) Seed biology of

Medicago truncatula. In: The *Medicago truncatula* Handbook.

- [62] Munier-Jolain NG, Munier-Jolain NM, Roche R, Ney B, Duthion C (1998) Seed growth rate in grain legumes I. Effect of photoassimilate availability on seed growth rate. *J Exp Bot* 49(329): 1963-1969.
- [63] Smeekens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology* 51: 49-81.
- [64] Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 235-246.
- [65] Weber H, Borisjuk L, Wobus U (1997) Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* 2(5): 169-174.
- [66] Rushton P, Bray C (1987) Stored and *de novo* synthesised polyadenylated RNA and loss of vigour and viability in wheat seed. *Plant Science* 51(1): 51-59.
- [67] Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York.
- [68] Baskin J, Nan X, Baskin C (1998) A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of *Senna* (Fabaceae). *Seed Science Research* 8: 501-512 M503 - 510.1017/S0960258500004475.
- [69] Faria J, Buitink J, van Lammeren A, Hilhorst H (2005) Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of Experimental Botany* 56(418): 2119.
- [70] Pang Y, Peel GJ, Sharma SB, Tang Y, Dixon RA (2008) A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(37): 14210-14215.
- [71] Zhao J, Dixon RA (2009) MATE Transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(8): 2323-2340.
- [72] Pang Y, Peel GJ, Wright E, Wang Z, Dixon RA (2007) Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 145(3): 601-615.

- [73] Van Dongen J, Ammerlaan A, Wouterlood M, vanAelst AE, Borstlap A (2003) Structure of the developing pea seed coat and the Post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany* 91(6): 729-737.
- [74] Barnabas AD, Arnott HJ (1990) Calcium oxalate crystal formation in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coat. *Botanical Gazette* 151: 331-341.
- [75] Berger F, Grini PE, Schnittger A (2006) Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* 9(6): 664-670.
- [76] Berger F (2003) Endosperm: the crossroad of seed development. *Current Opinion in Plant Biology* 6(1): 42-50.
- [77] I. D’Erfurth, C. Le Signor, G. Aubert, M. Sanchez, V. Vernoud, B. Darchy, J. Lherminier, V. Bourion, N. Bouteiller, A. Bendahmane, J. Buitink, J. M. Prosperi, R. Thompson, J. Burstin and K. Gallardo A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes *New Phytologist* (2012) doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04296.x.
- [78] Jerome Verdier, Fabrice Dessaint, Charles Schneider and Mona Abirached-Darmency A combined histology and transcriptome analysis unravels novel questions on *Medicago truncatula* seed coat *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, No. 2, pp. 695–709, 2012 doi:10.1093/jxb/err313.
- [79] Nathalie G. Munier-Jolain, and Bertrand Ney Seed growth rate in grain legumes II. Seed growth rate depends on cotyledon cell number *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, No. 329, pp. 1971–1976, December 1998.
- [80] Jerome Verdier and Richard D. Thompson Transcriptional Regulation of Storage Protein Synthesis During Dicotyledon Seed Filling *Plant Cell Physiol.* 49(9): 1263–1271 (2008).
- [81] Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066.
- [82] Crawford EJ, Lake AWH & Boyce KG (1989) Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in Southern Australia. *Adv Agron* 42:399-437.
- [83] Broeckling, C.D., Huhman, D.V., Farag, M., Smith, J.T., May, G.D., Mendres, P., Dixon, R.A. and Summer, L.W. (2005). Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Metabolomics*

Special issue of *Journal of Experimental Botany* 56 (410): 323-336.

[84] Ellialtıoğlu, Ő., Sarı, N., Abak, K. 2000. Haploid Bitki Üretimi. (Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, Ed: Babaoğlu, M., Özcan, S., Gürel, E.) 40 s.

[85] Gacio, M., Vazuquez M., and Matilla A., (2009). Seed dormancy and ABA signalling 4 (11) : 1035- 1048

[86] Kaspari, M. (1996). Worker size and seed size selection by harvester ants in a Neotropical forest. *Oecologia*, 105(3), 397-404

[87] Egli, D. B. (1998). *Seed biology and the yield of grain crops*. CAB international.

[88] Schaal, B. A. (1980). Reproductive capacity and seed size in *Lupinus texensis*. *American Journal of Botany*, 703-709.

[89] Hodgson, J. G., & Mackey, J. M. L. (1986). The ecological specialization of dicotyledonous families within a local flora: some factors constraining optimization of seed size and their possible evolutionary significance. *New Phytologist*, 104(3), 497-515.

[90] ŞAKİROğLU, M., & BRUMMER, E. C. (2011). Clarifying the ploidy of some accessions in the USDA alfalfa germplasm collection. *Turk J Bot*, 35, 509-519.

[91] Dewey, D. R. (1980). Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In *Polyploidy* (pp. 445-470). Springer US.

[92] Schussler, J. R., Brenner, M. L., & Brun, W. A. (1984). Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiology*, 76(2), 301-306.

[93] Frey, A., Godin, B., Bonnet, M., Sotta, B., & Marion-Poll, A. (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 218(6), 958-964.