

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***CryI*Ac ve *Bar* GENLERİNİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA
YEM BEZELYESİNE (*Pisum arvense* L.) AKTARILMASI**

DOKTORA TEZİ

NİLAY KAYIN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ALEV AKPINAR BORAZAN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. FERZAT TURAN

BİLECİK, 2025

10738773

T.C.
BİLECİKŞEHİDEBALİÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***CryI*Ac ve *Bar* GENLERİNİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA
YEM BEZELYESİNE (*Pisum arvense* L.) AKTARILMASI**

DOKTORA TEZİ

NİLAY KAYIN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ALEV AKPINAR BORAZAN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. FERZAT TURAN

BİLECİK, 2025

10738773

BEYAN

“*CryI*Ac ve *Bar* Genlerinin *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Yem Bezelyesine (*Pisum arvense* L.) Aktarılması” adlı doktora tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum; Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1-BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)		173-2023	
2-TÜBİTAK			
Diğer;			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:			

Nilay KAYIN

.../.../.....

İmza

ÖN SÖZ

“*CryIAc* ve *Bar* Genlerinin *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Yem Bezelyesine (*Pisum arvense* L.) Aktarılması” isimli tez çalışmam, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Doktora tez danışmanlarım, Sayın Doç. Dr. Alev AKPINAR BORAZAN ve Doç. Dr. Ferzat TURAN’a öncelikle teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda destek sağlayan Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi; Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve Tarla ve Bahçe Bitkileri laboratuvarlarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan Ziraat Fakültesi Dekanlığına teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam için *CryIAc* ve *Bar* genlerinin temininde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin moleküler ve PCR testlerinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Aysun ÖRÇÜN’e (Türkiye Milli Botanik Bahçesi Müdürlüğü) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince, desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Neslihan BABALI, Arş. Gör. Melike KÖSE ve Ülkü ŞANTAFLIOĞLU TÜRK’e teşekkürlerimi sunarım.

Başarılarımdaki en büyük pay sahibi canım ailem; sevgili annem Nurhan KAYIN ve babam Mustafa KAYIN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nilay KAYIN

2025

ÖZET

*CryI*Ac ve *Bar* GENLERİNİN *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA

YEM BEZELYESİNE (*Pisum arvense* L.) AKTARILMASI

Bu çalışmada, yem bezelyesinde *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla genetik transformasyon protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, adventif sürgün rejenerasyonu, gen aktarımının optimizasyonu ve böceklerle karşı dirençli transgenik aday bitkilerin PCR ile gen doğrulanmasına yönelik deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, yem bezelyesinin Ateş genotipine ait kotiledon ve kök boğum eksplantlarının adventif sürgün rejenerasyon kapasiteleri, çeşitli oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamlarında değerlendirilmiştir. Çalışmada, 6-Benzil Amino Pürin (BAP) ve Naftalin Asetik Asit (NAA) hormonlarıyla desteklenmiş altı farklı kombinasyon kullanılmıştır. Uygulanan hormon konsantrasyonları sırasıyla şu şekildedir: (1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 ve 6.00) mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ NAA. Elde edilen rejenerasyon sonuçlarına göre hem kotiledon boğum hem de kök boğum eksplantları için en iyi doğrudan sürgün rejenerasyonu için 3 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ NAA içeren ortam tespit edilmiştir. Çalışmada rejenerasyonu başarıyla tamamlayan sürgünlerin köklenmesini sağlamak amacıyla, 1.00 mg l⁻¹ İndol Asetik Asit (IAA) içeren besin ortamı kullanılmış ve bu ortamda kök oluşumunun etkili bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Bakteri ile muamele görmüş eksplantların seçiminde kullanılan herbisitlerin dozlarının belirlenmesi amacıyla çalışmada 4 farklı konsantrasyonda 2.00, 4.00, 6.00 ve 8.00 mg l⁻¹ fosfotrisin içeren MS ortamı kullanılmıştır. Sonuç olarak; 2.00 mg l⁻¹ PPT dozu, seleksiyon ortamında başarılı transformantların seçilmesini mümkün kılmıştır. Genetik transformasyonun optimizasyonu için, 35S-cryI_{Ac}-NosT gen kaseti ile birlikte *A. transformans* vektörlerine klonlanmış seçici işaret geni olarak *npt-II* geni ve *Bar* geni için LBA-PGG-*Bar* kaseti kullanılmıştır. Transformasyon çalışmaları sonucunda, toplam 175 adet *CryI*Ac ve *Bar* genlerini taşıyan transgenik aday bitki elde edilmiştir. Aday bitkilerde yapılan PCR sonuçlarına göre *CryI*Ac ve *Bar* genlerinde sırasıyla % 36.66 ve % 17.65 oranlar tespit edilmiştir. Bu çalışma, yem bezelyesi ve benzer bitkilerde zararlı böceklerle karşı direnç geliştirme açısından etkili bir genetik transformasyon sistemi kurulabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, *CryI*Ac, *Bar*, PCR

ABSTRACT

TRANSFORMATION OF THE *CryIAc* AND *Bar* GENES TO FORAGE PEA (*Pisum arvense* L.) VIA *Agrobacterium tumefaciens*

The objective of this study was to develop a genetic transformation protocol for forage pea (*Pisum arvense* L.) using the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. The scope of this study included experiments on three main areas: the regeneration of adventitious shoots, the optimisation of gene transfer, and the PCR-based confirmation of transgenic candidate plants that are resistant to insect pests. In the first stage of the study, the adventitious shoot regeneration capacities of cotyledonary node and root node explants of the Ateş genotype of forage pea were assessed on Murashige and Skoog (MS) media, with the explants being supplemented with various concentrations of plant growth regulators. Six different combinations were tested, supported by 6-Benzyl Amino Purine (BAP) and Naphthalene Acetic Acid (NAA) hormones. The following concentrations of hormones were applied: 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, and 6.00 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ NAA. Based on the regeneration results, the highest direct shoot regeneration for both cotyledonary node and root node explants was achieved using the medium with 3 mg l⁻¹ BAP + 0.2 mg l⁻¹ NAA. To induce rooting of shoots that successfully completed regeneration, MS medium supplemented with 1.00 mg l⁻¹ Indole-3-Acetic Acid (IAA) was used, and effective root formation was observed in this medium. The appropriate herbicide doses for the selection of explants treated with *Agrobacterium* were determined by testing MS media containing four different concentrations (2.00, 4.00, 6.00, and 8.00 mg l⁻¹) of phosphinothricin. Consequently, a concentration of 2.00 mg l⁻¹ PPT was determined to be the optimal setting for the effective selection of transformants in the designated selection medium. To optimise genetic transformation, the 35S-cry1Ac-NosT gene cassette was used alongside the NPT-II selectable marker gene, which was cloned into *Agrobacterium* for transformation. vectors, while the *Bar* gene was introduced using the LBA-PGG-*Bar* cassette. A total of 175 transgenic candidate plants carrying the *CryIAc* and *Bar* genes were obtained at the end of the transformation studies. PCR analysis revealed transformation frequencies of 36.66% and 17.65%, respectively, for the *CryIAc* and *Bar* genes. This study demonstrates that an effective genetic transformation system can be established in forage peas and similar crops to develop resistance against insect pests.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *CryIAc*, *Bar*, PCR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	lix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yem Bezelyesi (<i>Pisum arvense</i> L.).....	4
2.2. Yem Bezelyesinin Besin ve Kimyasal Bileşimi	5
2.3. Yem Bezelyesinin Morfolojik Özellikleri ve Ekim Alanları	7
2.4. Bitki Islahı ve Gen Aktarımı Yöntemleri	8
2.5. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tarımsal Uygulamaları	9
2.6. Gen Transferi Teknikleri	11
2.6.1. Vektör Aracılı Gen Transferi: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
2.6.2. Vektörsüz Yöntemler (Elektroporasyon, Bombardıman, vb.)	13
2.7. Baklagillerde ve Yem Bezelyesinde Genetik Transformasyon Çalışmaları	14
2.8. <i>Bar</i> Genleriyle Herbisit Direnci	14
2.9. <i>Cry</i> Genleriyle Böcek Direnci.....	15
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Ortam Hazırlığı.....	18
3.1.2. Bakteri Suşu	18
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Doku Kültürü Protokolünün Geliştirilmesi	18
3.2.2. Gen Transformasyonu Protokolü	23
3.2.3. Moleküler Doğrulama: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	27
3.3. İstatistik Analizler	30
4. BULGULAR	31
4.1. Doku Kültürü Çalışmaları	31
4.2. Gen Aktarım Çalışmaları	35
4.2.1. Fosfinotrisin (PPT) Miktarının Belirlenmesi.....	35
4.2.2. Gen Transfer Aşaması	37

4.2.3. Transgenik Aday Bitkilerin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Doğrulanması	40
5. TARTIŞMA	45
6. ÖNERİLER	52
KAYNAKÇA	54



TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Yem bezelyesi kuru ot ve tanesindeki kimyasal kompozisyon (%).....	5
Tablo 3. 1. MS ortamının içerdiği maddeler ve konsantrasyonları	21
Tablo 3. 2. Araştırmada kullanılan besi ortamına ilave edilen BAP ve NAA konsantrasyonları	21
Tablo 3. 3. Gelişen sürgünlerin kök gelişimini sağlamak amacıyla kullanılan farklı köklendirme ortamları	27
Tablo 3. 4. Hedef genlerin baz dizilişleri ve büyüklükleri.....	28
Tablo 3. 5. PCR reaksiyon karışımı tablosu (20 µl)	29
Tablo 3. 6. <i>Bar</i> ve <i>CryIAC</i> genlerinin çoğaltılması için uygulanacak PCR koşulları	29
Tablo 4. 1. Ateş çeşidine ait tohum çimlenmesi ve fide gelişim parametreleri.	31
Tablo 4. 2. Kültüre alınan kotiledon ve kök boğum eksplantlarından elde edilen direkt rejenerasyon gösteren eksplant sayıları, başarı oranları (%), eksplant başına düşen ortalama sürgün uzunluğu (mm), eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet).....	34
Tablo 4. 3. Farklı dozlardaki fosfinotrisin miktarının çeşitli bitki büyüme parametreleri üzerindeki etkisini inceleyen istatistiksel verileri	35
Tablo 4. 4. Farklı dozlardaki fosfinotrisin miktarının çeşitli bitki büyüme parametreleri üzerindeki etkisinin ortalama Duncan analiz sonuçları.	36
Tablo 4. 5. Farklı <i>Agrobacterium</i> suşlarının, farklı eksplantlarının genetik transformasyon verimliliğinin karşılaştırılması.	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. Rekombinant DNA teknolojisi uygulaması	10
Şekil 2. 2. <i>Agrobacterium</i> bakterisinin Ti plazmid yapısı.....	12
Şekil 2. 3. <i>Bar</i> geninin ekspresyon kaseti.....	15
Şekil 2. 4. <i>Cry</i> toksinlerinin etkisi.....	16
Şekil 3. 1. Çimlenmiş tohumların 7 gün sonraki görüntüsü	19
Şekil 3. 2. Tohumların yüzey sterilizasyonu	20
Şekil 3. 3. <i>In vitro</i> olarak ekilen tohumların görüntüsü.....	22
Şekil 3. 4. Gen transferi aşamaları	26
Şekil 4. 1. Kotiledon boğum, kök boğum ve çimlendirilmiş tohumları görüntüsü	32
Şekil 4. 2. Eksplantların 4 hafta sonrasındaki sürgün oluşumu görüntüsü.....	32
Şekil 4. 3. Eksplantlardan elde edilen kök oluşumu	33
Şekil 4. 4. Eksplantlardan elde edilen kök oluşumu	47
Şekil 4. 5. Transgenik aday bitki sürgünlerinin kök gelişimi görüntüleri.....	37
Şekil 4. 6. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>CryI</i> Ac genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	41
Şekil 4. 7. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>CryI</i> Ac genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	41
Şekil 4. 8. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>CryI</i> Ac genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	42
Şekil 4. 9. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>CryI</i> Ac genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	42
Şekil 4. 10. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>Bar</i> genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 310 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	43
Şekil 4. 11. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>Bar</i> genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 310 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	43
Şekil 4. 12. Transgenik aday yem bezelyesinin, <i>Bar</i> genine özgü primerlerle yapılan PCR	

sonucunda elde edilen 310 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü	44
--	----



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
FAOSTAT	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü Veri Kaynağı
ISAAA	: Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarını Edinme Hizmeti
PCI	: Ürün Karmaşıklık Endeksi
OECD	: Genel Değerlendirme Kriteri
CO₂	: Karbondioksit
N₂O	: Azot oksit
mm	: Mili metre
g	: Gram
Kg	: Kilogram
kDa	: Kilo Dalton
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu negatif logaritması
eGI	: Sindirim İndeksi
RDS	: Hızlı Sindirilebilir Nişasta
SDS	: Yavaş Sindirilebilir Nişasta
RS	: Dirençli Nişasta
PDF	: Diyet Lifi
SDF	: Çözünür Diyet Lifi
IDF	: Çözünmez Diyet Lifi
GAE	: Gallik Asit Eşdeğer

TPC	:	Toplam Fenolik İçeriği
TFC	:	Toplam Flavonoid İçeriği
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CRISPR-Cas	:	Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri
DNA	:	Deoksi riboz nükleik asit



1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışıyla birlikte, tarımsal verimliliğin ve kalitenin artırılmasına yönelik talep de hızla artmaktadır. Küresel ölçekte gıda güvenliği ve beslenme yetersizliği, özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) en güncel verilerine göre, bu ülkelerde yaşayan nüfusun yaklaşık % 9'u yetersiz beslenme ile karşı karşıyadır. Bu durum, hem bireysel sağlık hem de sosyoekonomik kalkınma açısından ciddi riskler oluşturmaktadır (FAOSTAT, 2023). Özellikle, hayvansal protein ve hayvansal ürünlere yönelik talep de bir artış yaşanmıştır. Asya'da, özellikle yüksek gelirli demografik gruplar arasında günlük hayvansal protein alımı son elli yılda üç kattan fazla artmıştır. Bu artan talep, modern tarımı tekniklerini zorunlu olarak değiştirmiştir (Zhang vd., 2024). Bunun yanında, mevcut hayvanların yeterli ve dengeli beslenebilmeleri için meraların doğru yönetimi ve ıslah çalışmaları ile yem bitkileri ekim alanlarının artırılmasına yeterli önem verilmemiştir. Oysa hayvancılık, ülkelerin kalkınmasında, ihraç potansiyelinin artırılmasında, sanayiye hammadde tedarikinde, kırsal bölgelerde işsizliğin önlenmesinde, yeni istihdam sağlaması açısından da son derece önemlidir (Öztürk vd., 2019).

2023 yılında küresel olarak yem bitkileri ticareti 3.65 milyar dolara ulaşmıştır, ticaretin 4.36 milyar dolar olduğu 2022 yılına göre % 16.1'lik bir düşüş göstermiştir. Son beş yıllık dönemde, bu ürün kategorisindeki ticaret hacmi yıllık ortalama % 3.95 oranında artış göstermiştir. 2023 yılı itibarıyla uluslararası ticarete konu olan 1.217 ürün arasında yem bitkileri, küresel ticaretin yalnızca % 0.016'sını oluşturarak ticaret değeri açısından 622. sırada yer almıştır. Ürün Karmaşıklık Endeksi (Product Complexity Index, PCI) dikkate alındığında ise, -0.63'lük PCI değeriyle 1.044 ürün arasında 755. sırada yer almış ve bu yönüyle düşük karmaşıklığa sahip bir ürün olarak sınıflandırılmıştır (OEC, 2023).

Yem bitkileri, gelişmekte olan ülkelerde geniş getiren hayvanların başlıca besin kaynağını oluşturmaktadır. Bu bitkiler, et ve süt gibi besin açısından yoğun gıdaların yanı sıra, deri ve yün gibi hayvansal yan ürünlerin üretimine de dolaylı olarak katkı sağlamaktadır. Hayvan yetiştirmede meraların yanı sıra yem bitkileri de kullanılmaktadır. Son yıllarda, bitki ıslahçıları biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanıklı, yüksek verimli yem bitkisi çeşitleri geliştirmek suretiyle hayvancılık sektörünün verimliliğine kayda değer katkılarda bulunmuştur (Fuglie vd., 2021).

Hayvancılık sektörünün gelişmiş olduğu ülkelerde, yem bitkilerinin ekiliş alanları toplam tarım arazisinin önemli bir bölümünü teşkil etmektedir. Örneğin, İngiltere’de % 25, İtalya’da % 30, Hollanda’da % 31 ve Almanya’da % 36 oranında yem bitkisi yetiştirilmektedir (Özkan, 2020). Türkiye’de ise % 14’ünü oluşturmaktadır ve ülkedeki kaba yem açığını kapatmak için bu oranın artırılmasına ihtiyaç vardır (Demirkol vd., 2019; Özkan, 2020). Bu nedenle beslenme değeri yönünden yüksek ve hayvanlar tarafından tüketimi tercih edilen yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.) bu açığın kapatılması noktasında önemli bir yem bitkisidir. Yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.), dünya çapında yetiştirilen en önemli bakliyat ürünlerinden biridir. Yem bezelyesi, evcil hayvanlar ve çiftlik hayvanları için iyi bir bitkisel protein kaynağıdır (Sangjan vd., 2023). Protein içeriğinden dolayı süt veriminde de oldukça önemlidir (Sharma ve Sharma, 2022). Bunun yanı sıra, yem bitkileri yüksek oranda karbonhidrat ve sindirilebilir madde içeriğine (% 86-87) sahip olması nedeniyle çiftlik hayvanlarının beslenmesinde ideal bir yem kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Ouafi vd., 2016). Bezelye tanesi % 20-27 ham protein (CP) içermektedir ve bunun % 78-94’ü rumende parçalanabilir proteini oluşturmaktadır. Bunun yanında arpa, buğday ve yulaf gibi tahıl tanelerine kıyasla yem bezelyesinin nişastasının parçalanma oranı düşüktür. Bu durum yem bezelyesinin lif kaynağı olarak kullanılmasına olanak tanımaktadır (Sangjan vd., 2023).

Yem bezelyesi azot fiksasyonu ile toprakta organik karbon ve azot seviyelerini artırmaktadır. Bunun sonucunda ekilebilir alanlarda gübre ve enerji kullanımını azaltarak sera gazı (karbondioksit/CO₂ ve azot oksit/N₂O) emisyonlarının azaltılmasına katkı sağlamaktadır (Sangjan vd., 2023).

Fakat yem bitkileri yetiştiriciliğinde, kaliteyi olumsuz etkileyen yabancı ot ve zararlı organizmalarla mücadele gerekmektedir. Yabancı ot ve zararlılara karşı farklı mücadele yöntemlerinden biri olan ve aktif olarak kullanılmakta olan kimyasal mücadele % 95’lik paya sahiptir. Bu amaçla kullanılan kimyasalların ekim alanına uygulanmadığı durumlarda mahsulde % 60 oranlarında kalite ve verim kaybı meydana geldiği belirlenmiştir. Bu nedenle, ürün kaybının kontrolü amacıyla tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bitki koruma ürünleri kullanılmaktadır (Tiryaki, 2018). Kullanılan ürünler yabancı otların gelişimini önlemenin yanında bitki gelişimini de desteklemektedir. Bu nedenle, yabancı otların yönlendirilmesinin yanı sıra, mahsul verimini artırabilecek ve herbisit direncini geliştirecek uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkilerde bu direnç doğal olarak oluşabilmekte veya genetik mühendisliği veya doku kültürü teknikleriyle farklı biçimlerde geliştirilebilmektedir (Hussain vd., 2021). Islah için CRISPR/Cas9 gen düzenlemesinden verimi artırmak için mikrobiyomdan

yararlanmaya kadar tarım teknolojilerinde kaydedilen önemli ilerlemeler de modern tarımda devrim yaratmıştır.

Gen çalışmalarıyla, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak ilgili genlerin bulunması, karakterize edilmesi, izolasyonu ve hedef hücreye aktarılması sağlanmakta ve ilgili geni taşıyan bir DNA parçasının doku içindeki hücrelerin kromozomlarına yerleştirilmesi, daha sonra bu hücrelerden transgenik bitki elde edilmesi sağlanmaktadır (Daneshvar Rouyandezagh, 2011; Hussain vd., 2021). Buradaki amaç bitki türlerinde doğal olarak bulunmayan yeni bir özellik kazandırmaktır. Kazandırılan bu yeni özelliklerle birlikte hedef, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı raf ömrünün iyileştirilmesi, daha yüksek ürün verimi, iyileştirilmiş ürün kalitesi, haşereye karşı direnç, yüksek sıcaklık derecelerine karşı tolerans, soğuğa ve kuraklığa dayanıklılık gibi avantajlar sağlayarak bitkiyi daha faydalı ve verimli hale getirmektir (Jhansi Rani ve Usha, 2013). Bu bağlamda, genetik modifikasyon (GM) teknolojisi, zararlılara, hastalıklara ve çevresel stres faktörlerine karşı dirençli bitki türlerinin geliştirilmesinde önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır. 2023 yılı verilerine göre, genetik modifiye organizma (GDO) teknolojisi, dünya genelinde 76 ülke ve bölgede uygulanmakta olup, bunların 27'sinde toplam 206.3 milyon hektarlık alanda transgenik bitki yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu alan, bir önceki yıla göre % 1.9 oranında artış göstermiştir. GM bitkilerin ekim alanı, 1996 yılından bu yana 121 kat artarak dikkat çekici bir yayılım göstermiş ve dünya tarım alanlarının yaklaşık % 13.38'ini oluşturan bir düzeye ulaşmıştır. Bu süreçte toplam ekim alanı 3.4 milyar hektarı aşmış durumdadır. Bu veriler, genetik mühendisliği uygulamalarının modern tarımda ne denli yaygınlaştığını ve gelecekte bu alana yönelik çalışmaların artarak devam edeceğini göstermektedir (Cheng vd., 2024).

Bu çalışmanın temel amacı, *CryIAc* ve *Bar* genlerinin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.) bitkisine aktarımını sağlamak ve söz konusu genlerin bitki genomuna başarılı bir şekilde entegre edilip edilmediğini PCR analizi ile moleküler düzeyde doğrulamaktır. Bu kapsamda çalışma; yem bezelyesinin kotiledon ve kök boğum eksplantlarından *Agrobacterium*-aracılı transformasyon protokolünün uygulanması, transformantların seçiminde herbisit (fosfinotrisin) dayanıklılığına dayalı seleksiyon yönteminin kullanılması, transformant bitkilerde *CryIAc* ve *Bar* genlerinin varlığının PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile doğrulanması, elde edilen verilerin, genetik transformasyonun yem bezelyesi üzerine uygulanabilirliğini ortaya koyacak şekilde değerlendirilmesi hedeflerini içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yem Bezelyesi (*Pisum arvense* L.)

Yem bezelyesi *Pisum arvense* L., baklagiller (Fabaceae) familyasının Papilionoideae alt familyasında yer alan, tek yıllık, diploid ($2n = 14$) ve kendine döllen (kleistogamik) bir bitki türüdür. Tarımsal üretimde özellikle kaba yem kaynağı ve yeşil gübre bitkisi olarak önemli bir yere sahiptir. Yüksek protein içeriği ve atmosferdeki azotu biyolojik olarak bağlama yeteneği sayesinde sürdürülebilir tarım sistemlerinde değerli bir bileşen olarak kabul edilmektedir (Ratnayake vd., 2002; Ambrose vd., 2023).

Yem bezelyesinin haploid genom büyüklüğü (1C) yaklaşık 4.28-4.5 Gb (yaklaşık 4.4-4.8 pg DNA) arasında değişmektedir (Coyne vd., 2020; Ludvíková ve Griga, 2022). Liu vd. (2023) tarafından Çin menşeli 'ZW6' çeşidinde yapılan akış sitometrisi analizlerinde bu değer 4.28 Gb olarak belirlenmiştir.

Pisum arvense L. türü Birleşik Krallık ve Kuzey Amerika'da bezelye, kuru bezelye ve yem bezelyesi, Hindistan'da "Batani", Almanya'da "Erbse", Etiyopya'da "Ater", Fransa'da 'Pois', Macaristan'da "Takarmany borso" ve İtalya'da "Pisello" olarak bilinmektedir (Ratnayake vd., 2002).

Yem bezelyesi; tane, yeşil ot, kuru ot veya silaj üretiminde kullanılabildiği gibi, mera ve yeşil gübre bitkisi olarak da değerlendirilmektedir. İçeriğindeki ham selüloz, fosfor, kalsiyum, potasyum ve magnezyum gibi elementler, tüm çiftlik hayvanlarının beslenmesi açısından önemli katkılar sağlamaktadır (Açıkgöz, 2001; Keskin vd., 2021).

Rhizobium cinsi simbiyotik bakteriler aracılığıyla atmosferik azotu bağlayabilen yem bezelyesi, toprağın fiziksel özelliklerini iyileştirerek verimliliğini artırmaktadır. Ayrıca, makro ve mikro besin elementlerini toprakta tutma kapasitesi ile bitki beslenmesine katkı sağlamaktadır (Ludvíková ve Griga, 2022; Kara ve Sürmen, 2023). Bu yönüyle hem azot kaynağı hem de bol yeşil aksam üretmesi sayesinde yeşil gübre bitkisi olarak kullanılmaktadır (Sayar, 2021; Özeroğlu, 2021).

Kısa vejetasyon süresi sayesinde hem kışlık hem yazlık olarak yetiştirilebilen yem bezelyesi, tahıl türleriyle karışık ekime de uygundur. Tohumlarında dormansi görülmemesi nedeniyle çimlenmesi kolay ve çıkışı uniformdur. Ayrıca, hassas tohum yatağı gerektirmemesi ve devlet desteklerinden faydalanması, üreticiler için tercih sebebidir (Sayar, 2021).

2.2. Yem Bezelyesinin Besin ve Kimyasal Bileşimi

Yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.), besin öğeleri ve fonksiyonel bileşenler açısından zengin içeriğiyle dikkat çeken bir baklagil türüdür. Kuru ağırlığının yaklaşık % 59.32-69.59'unu karbonhidratlar oluşturmakta olup, nişasta oranı % 39.44-46.23, toplam diyet lifi ise % 23.23-30.72 arasında değişmektedir. Liflerin % 3.91-8.01'i çözünür, % 19.32-23.1'i ise çözünmez formdadır (Wu vd., 2023). Tablo 2.1.'de görüldüğü gibi yem bezelyesinin protein içeriği % 22.5-26.5 aralığında olup, bezelye proteini başlıca globulin, albümin, prolamin ve glutenin fraksiyonlarından oluşmaktadır. Özellikle globulin fraksiyonu toplam proteinin % 55-65'ini oluşturmakta, bezelye proteini lizin açısından zengin olmasıyla dikkat çekmektedir. Ayrıca metiyonin ve sistein gibi sülfür içeren amino asitleri de içermektedir (Wu vd., 2023). Ham yağ içeriği % 1.7-3.3, ham selüloz içeriği % 7.3-21.8 ve azot içermeyen madde içeriği ise % 39.3-59.8'dir (Tablo 2.1.).

Bezelye proteinleri, soya fasulyesi ile benzer izoelektrik noktaya (pH 4-5) sahiptir. Köpürme stabilitesi yaklaşık % 89.74, jelleşme konsantrasyonu % 14 ve su adsorpsiyon kapasitesi 3.389 g g⁻¹ olarak rapor edilmiştir (Wu vd., 2023). Bezelye tanelerinde % 20-30, kuru otunda ise % 20 civarında ham protein bulunmakta ve bu nedenle Avrupa'da soya fasulyesine alternatif bir kesif yem kaynağı olarak önerilmektedir (Açıkgöz, 2001; Keskin vd., 2021).

Tablo 2. 1.Yem bezelyesi kuru ot ve tanesindeki kimyasal kompozisyon (%)

	Ham protein	Ham yağ	Ham Selüloz	N-siz Öz Madde
Kuru ot	22.5	3.3	21.8	39.3
Tane	26.5	1.7	7.3	59.8

Kaynak: (Açıkgöz, 2001)

Nişasta içeriği % 35-40 arasında değişmekte olup, amiloz oranı % 17.2-42.6 aralığında bulunmuştur. Yüksek amiloz içeriği nedeniyle bezelye nişastası, düşük glisemik indeksli (69.8-70.7) ve sindirime dirençli bir karbonhidrat kaynağıdır (Wu vd., 2023; Ratnayake vd., 2002). Alfa-amilaz enzimine karşı doğal direnç gösterdiği için sağlık açısından işlevsel nişastalar arasında yer almaktadır (Soral-Smietana vd., 2003; Shi vd., 2018).

Diyet lifi açısından zengin olan bezelye, özellikle çözünmeyen lif bakımından önemli bir potansiyele sahiptir. Bu lifler başlıca selüloz, hemiselüloz, pektin ve ligninden oluşmakta,

bağırsak sağlığını destekleyen ve glikoz metabolizmasını düzenleyen etkiler göstermektedir (Li vd., 2024; Kumari ve Deka, 2021). Bezelye tohumlarında % 3.91-8.01 oranında çözünür, % 19.32-23.1 oranında çözünmez lif bulunmakta ve bu lifler antioksidan aktivite ile kan şekeri düşürücü özellik göstermektedir (Wu vd., 2023). Hayvan sağlığı açısından güvenilirdir, proteinlerin ve başta fosfor olmak üzere bazı minerallerin sindirilebilirliğini sınırlayan tripsin inhibitörleri ve fitik asit gibi antinutrisyonel maddelerin azaltılmasını sağlamaktadır (Ludvíková ve Griga, 2022).

Lipid içeriği düşük olan yem bezelyesi, düşük yağlı bir besin alternatifi sunar. Lipidlerin % 42.01-60.68'i çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşurken, doymuş yağ asidi oranı % 17.46- 24.95'tir. İçeriğinde bulunan en yaygın yağ asitleri; palmitik asit (% 12.39-19.24), linoleik asit (% 34.56-47.74) ve linolenik asit (% 7.37-12.55) tir (Wu vd., 2023).

Mineral içeriği yönünden de zengin olan yem bezelyesi, azot, fosfor ve potasyum gibi makro besin elementlerinin yanı sıra demir, çinko, bakır ve manganez gibi mikroelementleri de yüksek düzeyde içermektedir. Bu minerallerin düzeyleri genotipe göre değişkenlik göstermekte olup, tohumlarında ayrıca az miktarda selenyum da tespit edilmiştir (Wu vd., 2023).

Vitamin içeriği bakımından, özellikle tokoferoller (vitamin E) açısından zengin olan bezelye, α -tokoferol içeriği bakımından 46.14–54.17 g g⁻¹ aralığında değer göstermektedir. Bu değerler, bezelye genotipleri arasında farklılık göstermektedir (Wu vd., 2023).

Bezelye aynı zamanda flavonoidler, polifenoller ve tanenler gibi biyoaktif bileşenler yönünden de zengin bir kaynaktır. Başlıca fenolik bileşikler arasında hidroksisinnamik asitler (kumarik, ferulik, vanilik), benzoik asit türevleri ve protokateşuik asit gibi maddeler yer almaktadır (Kumari ve Deka, 2021).

Toplam fenolik içerik (TPC), 12.6– 128.6 mg GAE 100 g⁻¹ arasında değişmekte olup, koyu renkli kabuklara sahip tohumlarda daha yüksek düzeyler gözlenmiştir (Wu vd., 2023). Flavonoid içerikleri de genotip ve kabuk rengine bağlı olarak farklılık göstermekte, koyu renkli tohumlarda daha yüksek bulunmaktadır. Daidzein, genistein, apigenin, kaempferol, quercetin, myricetin gibi flavonoidlerin yanı sıra antosiyaninler de bezelye tohumlarında belirlenmiştir (Kumari ve Deka, 2021; Wu vd., 2023). Bu bileşikler, bezelyenin fonksiyonel gıda olarak kullanım potansiyelini güçlendirmektedir.

2.3. Yem Bezelyesinin Morfolojik Özellikleri ve Ekim Alanları

Yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.), M.Ö. 7000–6000 yıllarına kadar uzanan tarihsel kökeniyle, Güneybatı Asya'dan başlayarak dünya genelinde yayılmıştır. Ilıman iklim koşullarına uyum sağlayan yem bezelyesi, özellikle yıllık ortalama 7–24°C sıcaklık ve 800–1000 mm yağış alan bölgelerde yetiştirilmektedir. Ekvatorial bölgelerde 1000 m, Etiyopya'da ise 3000 m yüksekliğe kadar ekilebilmektedir. Toprak pH'sı 5.5–6.5 arasında olan kumlu tınılıdan killiye kadar çeşitli toprak tiplerinde yetiştirilmektedir (Heuze vd., 2015; Ludvíková ve Griga, 2022).

Morfolojik olarak yem bezelyesi, 1-1.5 m'ye kadar uzayan ince, mumsu örtülü saplara sahiptir. Yapraklar 1-4 çift oval yaprakçıktan oluşmakta ve sülükle sonlanmaktadır. Çiçekler 1-3'lü gruplar halinde yaprak koltuklarında yer alır ve çoğunlukla beyaz renklidir. Meyveler fasulye şekilli olup 3-10 tohum içermektedir. Tohum renkleri sarı, yeşil ve kahverengi arasında değişmektedir. Avrupa'da yetiştirilen yem bezelyesi çeşitleri genellikle beyaz çiçekli ve sarı veya yeşil tohumludur. 1000 tane ağırlığı 100-300 g arasındadır (Açıkgöz, 2001; Karayel ve Bozoğlu, 2012).

Yem bezelyesi verimi, kıraç koşullarda dekara 250-300 kg kuru ot iken, sulanan veya kıyı bölgelerde 2-4 ton yeşil ot verimine ulaşabilmektedir. Türkiye'de tohum verimi kıraç alanlarda 100-150 kg, iyi koşullarda ise 150-300 kg arasında değişmektedir (Açıkgöz, 2001).

Türkiye'de yem bezelyesi ekim alanı 2008'de 1365 ha iken, 2020 TÜİK verilerine göre 243.191 da'ya yükselmiş ve toplam tarım alanı içindeki payı % 0.10'a ulaşmıştır. Bu durum, yem bezelyesi ekim alanlarının arttığını göstermektedir (Karayel ve Bozoğlu, 2012; Keskin vd., 2021).

2023 yılı verilerine göre, dünya genelinde toplam kuru bezelye üretimi yaklaşık 10.5 milyon ton olarak belirlenmiştir. Bu alanda en büyük üretici ülke, yaklaşık 2.6 milyon tonluk üretimiyle Kanada olmuştur. Kanada'yı sırasıyla Rusya Federasyonu (yaklaşık 2.05 milyon ve Çin (yaklaşık 1.1 milyon ton) takip etmektedir. Diğer önemli üretici ülkeler arasında Ukrayna, Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri ve Fransa yer almaktadır. Kuru bezelye, özellikle hayvan yemi ve endüstriyel kullanım açısından önemli bir tarımsal ürün olarak öne çıkmaktadır. Bu veriler, yem bezelyesi üretiminde Kanada ve Rusya'nın lider konumlarını sürdürdüğünü göstermektedir (FAO, 2023; Our World in Data, 2024).

2.4. Bitki Islahı ve Gen Aktarımı Yöntemleri

Hayvancılıkta kullanılan yem bitkilerinin verim ve kalitesi, bitki ıslahı yoluyla geliştirilebilmektedir (Bradshaw, 2017). Bitki ıslahı, verim artışı, hastalıklara ve abiyotik streslere dayanıklılık ile eşzamanlı olgunluk gibi üstün fenotiplerin geliştirilmesi süreci olarak tanımlanmaktadır (Anand vd., 2023). Yem bezelyesi, yüksek kendi kendine tozlaşma oranı nedeniyle diğer kendine tozlaşan mahsullerle benzer ıslah stratejileriyle geliştirilmektedir (Smykal vd., 2018). Bu stratejiler arasında melezleme, soyağacı analizi, toplu ve geri çaprazlama ile tek tohum soyu seçimi gibi yöntemlerin kombinasyonları yer almaktadır.

Yem bezelyesinde ıslah çalışmaları, öncelikle ebeveyn genotiplerin çaprazlanması yoluyla başlamış; 1950'lerden itibaren ise mutageniz teknikleri (kemomutageniz, radyomutageniz) ve seleksiyon süreçleri uygulanmıştır. Islahın hedefi, vejetasyon döneminde (bitki mimarisi, çiçeklenme, tohum özellikleri, erkencilik, stres toleransı) ve hasat sonrası (tohum bileşenleri) ortaya çıkan fenotipler olarak belirlenmektedir. Bu özelliklerin kalıtımlılığı ve genetik kararlılığı, kendileme ve gerektiğinde geri melezleme ile test edilmektedir. Geri melezleme, istenmeyen ebeveyn özelliklerinin eliminasyonu için kullanılmaktadır. Yem bezelyesi ıslah süreci uzun ve zahmetlidir; yeni çeşit geliştirme ve tescil işlemi genellikle 10-15 yıl sürmektedir (Ludvíková ve Griga, 2022).

DNA'nın genetik materyal olduğunun keşfi ile bitki ıslahı alanında moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler, Mendel yasaları ile birleşerek bitki ıslahını hızlandırmış ve genom dizilimi ile düzenleme gibi yöntemlerle daha etkin hale getirmiştir (Anand vd., 2023).

1960'lardan itibaren *in vitro* biyoteknoloji ve doku kültürü teknikleri geliştirilmiş; bunlar özellikle baklagillerin ıslahında uygulanmıştır. Amaç, ıslah sürecinin laboratuvar ortamında hızlandırılmasıdır. Mikroçoğaltım, kallus kültürleri, *in vitro* stres tolerans seçimi, protoplast füzyonu, double-haploid ve somaklonal varyasyon gibi teknikler kullanılmıştır. Bu tekniklerin temelinde, bitkinin çeşitli dokularından tüm bitkilerin yeniden üretilebilmesi yer almaktadır.

Genetik transformasyon yöntemleri, özellikle *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı ve parçacık bombardımanı, bitki biyoteknolojisinde önemli bir dönüm noktası oluşturmuş; yem bezelyesi de dahil olmak üzere birçok baklagilde başarıyla uygulanmıştır (Ludvíková ve Griga, 2022).

2.5. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tarımsal Uygulamaları

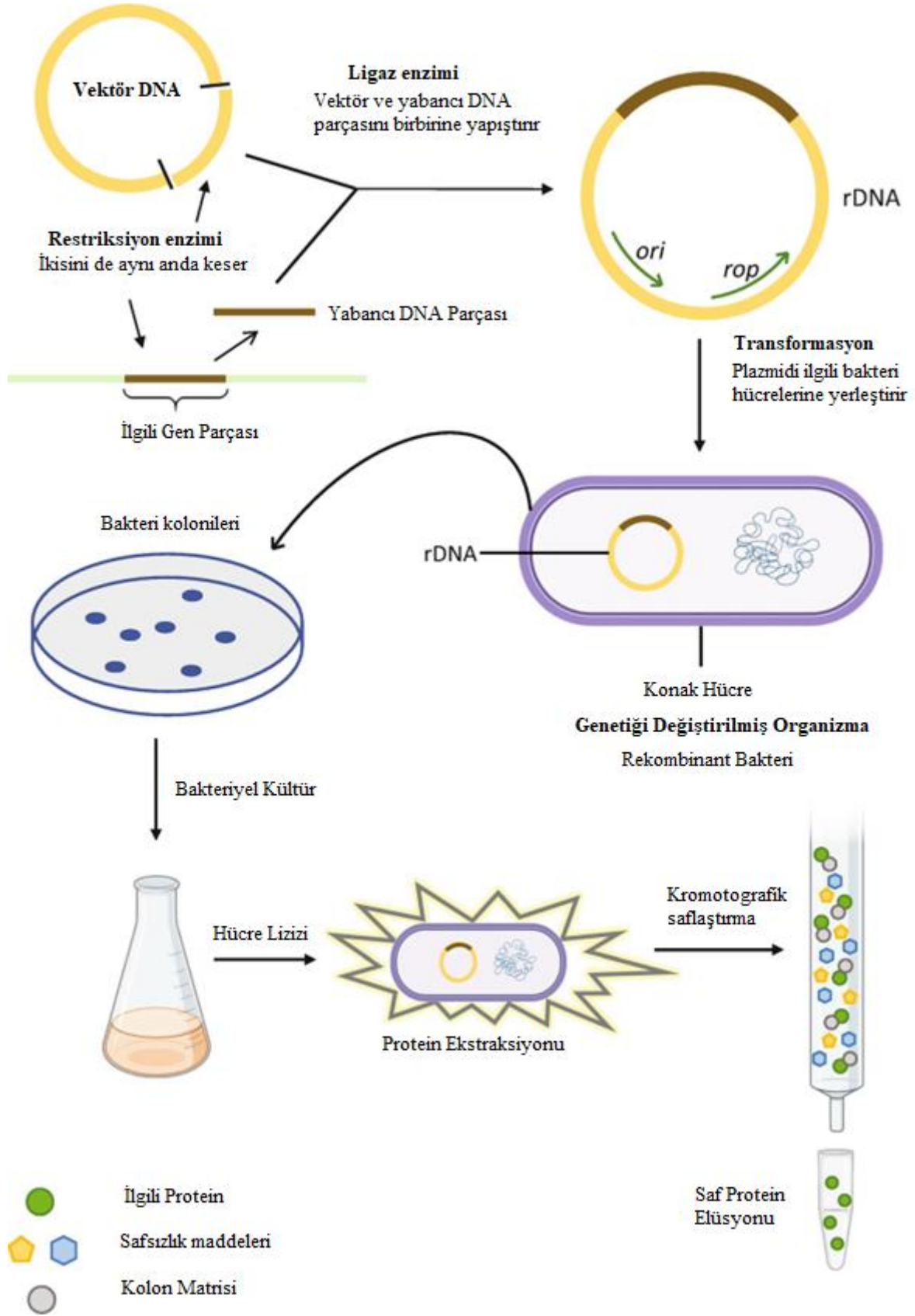
Rekombinant DNA teknolojisi, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA parçalarının laboratuvar ortamında birleştirilerek hedef organizmaya aktarılması yöntemidir. Bu teknoloji, belirli genlerin kesilip yapıştırılması için restriksiyon enzimleri ve DNA ligaz gibi moleküler araçlar kullanılarak, genetik materyalin kontrollü şekilde modifiye edilmesini sağlamaktadır (Begna ve Okonkwo, 2020; Purkait ve Yousuf, 2024).

Şekil 2.1.'deki gibi, rekombinant DNA teknolojisi süreci, DNA'yı ilgilenilen çeşitli parçalara enzimatik olarak ayırmak için restriksiyon endonükleazları içermektedir (Purkait ve Yousuf, 2024). Bu parçalar daha sonra DNA ligaz enzimleri kullanılarak birleştirilmekte ve istenen gen vektöre eklenmektedir. Konak organizma daha sonra ilgilenilen geni içeren vektörle muamele edilir ve entegre DNA parçası, spesifik DNA segmentini barındıran klonlar oluşturmak için kültür boyunca yayılmaktadır (Purkait ve Yousuf, 2024). Rekombinant DNA teknolojisi, farklı biyolojik kaynaklardan gelen DNA dizilerinin bir araya getirilmesiyle laboratuvar ortamında oluşturulabilmektedir. Bu tür rekombinant DNA molekülleri laboratuvar şartlarında oluşturulmakta ve doğada bulunmamaktadır (Begna ve Okonkwo, 2020).

Rekombinant DNA teknolojisi, modern tarımda genetik kaynakların etkin kullanımı ve ürünlerin özelliklerinin hedeflenmiş şekilde geliştirilmesinde kritik bir araç olarak benimsenmiştir. Bu teknoloji tarımda özellikle verim artışı ve zararlılara karşı dayanıklılık gibi avantajlar sağlamak amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, 1994'te geliştirilen 'FlavrSavr' domatesi, raf ömrünün uzatılması hedefiyle geliştirilen ve ticari olarak piyasaya sürülen genetik mühendislik ürünü olmuştur. Günümüzde ABD'de soya fasulyesinin % 93'ü ve mısırın % 88'i genetik modifikasyona sahiptir (Verma vd., 2022). Ayrıca *Bacillus thuringiensis* (Bt) genleri içeren pamuk, mısır ve patlıcan gibi ürünler, haşere direnci için genetik olarak geliştirilmiştir.

Genetik modifikasyon çalışmaları, özellikle fosfor eksikliğine dayanıklı pirinç gibi önemli tarım ürünlerinde yeni genlerin keşfiyle ürün verimliliğini artırmıştır. Örneğin, *PSTOL1* geni, kök gelişimini teşvik ederek fosfor alımını iyileştirmektedir (Purkait ve Yousuf, 2024). Kloroplast genomundan çekirdeğe aktarılan genlerin fonksiyonları ve transgen kloroplast genomuna entegrasyonu, genetik mühendisliğin etkinliğini daha da artırmaktadır.

Gen ekspresyonu ve transkriptom analizleri, bitkilerin streslere verdiği tepkileri anlamada etkilidir. Bu sayede rekombinant DNA teknolojisi tarımda yeni çözümler sunmaktadır.



Şekil 2. 1. Rekombinant DNA teknolojisi uygulaması

Kaynak:(Bose ve Bose, 2022)

2.6. Gen Transferi Teknikleri

Gen transferi teknikleri, genetik materyalin bir organizmadan diğerine aktarılması sürecinde kullanılan çeşitli yöntemleri kapsamaktadır. Gen aktarım yöntemleri, vektör aracılı gen transferi (dolaylı yöntem) ile vektörsüz gen transferi (doğrudan yöntem) olarak iki grupta toplanmaktadır.

2.6.1. Vektör Aracılı Gen Transferi: *Agrobacterium tumefaciens*

Vektör aracılı gen transferi, genellikle *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi veya bitki virüsleri gibi vektörler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde, hedef gen uygun bir vektör aracılığıyla bitki hücrelerine aktarılmaktadır. Bitki gen vektörleri, genetik materyalin bitkilere taşınmasında kritik rol oynamakta ve genellikle bitkinin rejenerasyon kapasitesi ile doğrudan ilişkilendirilmektedir (Rahangdale vd., 2020).

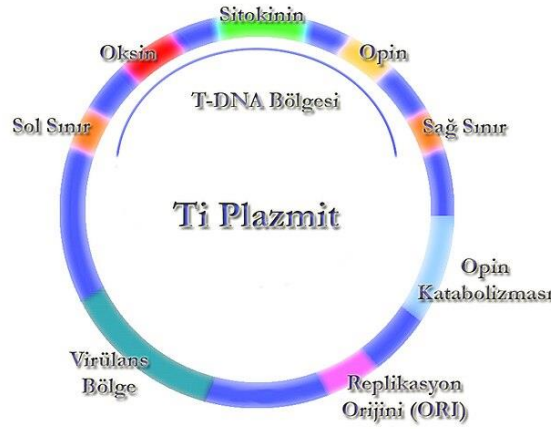
Agrobacterium aracılı gen transferi, bitki genetik mühendisliğinde ilk başarılı yöntem olarak 1983'te kullanılmaya başlanmış ve halen yaygın şekilde tercih edilmektedir (Bradshaw vd., 2017). *Agrobacterium*, doğada birçok bitki türünde bulunan gram-negatif toprak bakterisi olarak bilinmektedir. En yaygın türleri *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes*, doğal gen aktarım yetenekleri nedeniyle “doğal gen mühendisleri” olarak nitelendirilmektedir. *A. tumefaciens*, bitkilerde taç tümörü (ur), *A. rhizogenes* ise tüylü kök hastalığına neden olmaktadır. Bu bakteriler, tümör indükleyici (Ti) ve kök indükleyici (Ri) plazmidlere sahiptirler (Rahangdale vd., 2020).

Agrobacterium tumefaciens bakterisinin Ti plazmidi Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi, iki temel genetik bölgeden oluşmaktadır: T-DNA bölgesi ve virülans (*vir*) genleri bölgesi. T-DNA, *Agrobacterium* tarafından bitki hücresine aktarılan ve bitki nükleer genomuna entegre edilen kısımdır. Virülans genleri ise bu transfer sürecini yöneten genlerdir. Ti plazmidinde ayrıca plazmid replikasyonu, konjugatif transfer, opin kullanımı ve sinyal algılama gibi işlevleri kodlayan genler yer almaktadır (Hwang vd., 2017).

Ti plazmidinde yer alan T-DNA bölgesi, sağ ve sol sınır dizileri (border sequences) ile çevrelenmiş olup, bu sınırlar T-DNA'nın bitki genomuna aktarılacak kısmını belirlemektedir. Transfer sürecinde *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* ve *virG* gibi virülans genleri protein sentezinden sorumlu olarak T-DNA'nın bitki hücresine işlenmesi, aktarımı ve entegrasyonunda görev almaktadır (Hwang vd., 2017).

Ti plazmidine bağlı olarak bitki hücrelerinde opin sentezi için genler taşınmakta ve bu opinler bakterinin besin kaynağı olarak kullanılması için katabolize edilmektedir. Böylece

Agrobacterium, bitki hücresinde hem kendi beslenmesini sağlamakta hem de gen transferini gerçekleştirmektedir.



Şekil 2. 2. *Agrobacterium* bakterisinin Ti plazmid yapısı

Kaynak: (Alkuddsi vd., 2014)

Agrobacterium tumefaciens, Ti plazmidindeki T-DNA'yı virülans proteinleri yardımıyla bitki hücrelerine aktarmakta ve bu DNA bitki nükleer genomuna entegre olmaktadır (Yan vd., 2022). Ti plazmidinde T-DNA bölgesi, bitkiye aktarılan ve entegre edilen genetik materyali içerirken; virülans (*vir*) genleri bu aktarımı sağlamaktadır. Genetik mühendisliğinde kullanılan modifiye Ti plazmidlerinde, doğal plazmidde bulunan hastalıkla ilişkili genler çıkarılıp yerine hedef genler eklenerek kullanılmaktadır.

Agrobacterium aracılı transformasyon sürecinde; *Agrobacterium* suşunun hazırlanması, uygun eksplantların seçimi, bakteriyel muamele, antibiyotik ile *Agrobacterium* eliminasyonu, seçim ve rejenerasyon aşamaları uygulanmaktadır. Başarılı transformasyon için genotip, eksplant türü ve *Agrobacterium* suşunun optimizasyonu büyük önem taşımaktadır (Ludvíková ve Griga, 2022).

Agrobacterium aracılı transformasyon, genellikle dikotiledon bitkilerde başarıyla uygulanmakta olup, monokotiledonlarda ise sınırlı başarı sağlanmaktadır (Rahangdale vd., 2020). Bu yöntemin, düşük transgen kopya sayısı, minimal DNA yeniden düzenlemesi, yüksek gen stabilitesi ve nispeten düşük maliyet gibi avantajları bulunmaktadır (Hwang vd., 2017).

Agrobacterium aracılı gen transferi, dünya genelinde transgenik bitki üretiminde yaygın şekilde kullanılmakta olup, özellikle dikotiledonlarda % 85'e varan oranlarda tercih edilmektedir (Yan vd., 2022).

2.6.2. Vektörsüz Yöntemler (Elektroporasyon, Bombardıman, vb.)

Vektörsüz gen transferi, DNA'nın *Agrobacterium* gibi biyolojik vektörler kullanılmaksızın bitki hücrelerine doğrudan aktarılmasıdır. Bu yöntemler, çıplak DNA'nın fiziksel veya kimyasal yollarla hücre içine alınmasına dayanmakta olup, özellikle monokotiller ve *Agrobacterium*-aracılı transformasyona dirençli türlerde etkili alternatifler sunmaktadır (Rahangdale vd., 2020).

Bu kapsamda, elektroporasyon, parçacık bombardımanı, mikroenjeksiyon, lipozom füzyonu ve PEG (polietilen glikol) aracılı yöntemler gibi çeşitli doğrudan DNA aktarım teknikleri geliştirilmiştir ve farklı bitki türlerinde başarıyla uygulanmaktadır.

Elektroporasyon, hücre zarında geçici gözenekler oluşturarak DNA'nın hücre içine girişini sağlamaktadır. Genellikle protoplastlarla uygulanmakta ve uygun kültür koşullarında bu hücrelerden rejenerasyon yoluyla transgenik bitkiler elde edilmektedir. Hızlı ve düşük maliyetli bir yöntem olmasına rağmen, DNA hasarı, düşük transformasyon verimi ve sınırlı bitki türlerinde uygulanabilirlik gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Yan vd., 2022; Rahangdale vd., 2020).

Parçacık bombardımanı (biyolistik yöntem), DNA ile kaplanmış mikropartiküllerin yüksek basınçla bitki hücrelerine fırlatılması esasına dayanmaktadır. Kallus, embriyo, süspansiyon hücresi gibi farklı doku türlerinde uygulanabilmektedir. Özellikle mısır, buğday ve pirinç gibi tahıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak pahalı ekipman ihtiyacı, doku hasarı ve DNA entegrasyonundaki düzensizlik gibi dezavantajları bulunmaktadır (Rahangdale vd., 2020; Yan vd., 2022; Ludvíková ve Griga, 2022).

Mikroenjeksiyon, DNA'nın mikropipet yardımıyla doğrudan hücre içine verilmesini içermektedir. Genellikle protoplastlar tercih edilmekte, çünkü hücre duvarı enjeksiyonu zorlaştırmaktadır. Teknik olarak zahmetli, zaman alıcı ve düşük verimli bir yöntem olması nedeniyle kullanım alanı sınırlı kalmaktadır (Rahangdale vd., 2020).

Lipozom aracılı gen transferinde, fosfolipid zar yapısına sahip veziküller içinde taşınan DNA, protoplastlarla füzyon yoluyla hücreye alınmaktadır. Polietilen glikol (PEG) ile birlikte uygulandığında transformasyon verimliliği artmaktadır. Ancak lipozom üretimindeki zorluklar ve protoplast rejenerasyonundaki sınırlamalar nedeniyle yaygın kullanımda değildir (Rahangdale vd., 2020).

PEG aracılı gen aktarımı ise, DNA'nın protoplastlara PEG yardımıyla alınmasını sağlamaktadır. Zar geçirgenliği geçici olarak artırılmakta ve DNA hücreye alınmaktadır.

Yöntem yüksek verim sağlamakla beraber, birçok bitki türünde protoplastlardan rejenerasyonun zor olması nedeniyle uygulama alanı sınırlı kalmaktadır (Yan vd., 2022).

2.7. Baklagillerde ve Yem Bezelyesinde Genetik Transformasyon Çalışmaları

1980’lerde yem bezelyesinde rejenerasyon ve transformasyon verimliliğini artırmaya yönelik deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Yem bezelyesi dokusunun rejenerasyon kapasitesi doku ve genotipe bağlı olup, farklı genetik formların kallus oluşturma, sürgün ve kök gelişimi bakımından farklılık gösterdiği tespit edilmektedir. Yem bezelyesinde organogenez ve somatik embriyogenezle rejenerantlar elde edilmektedir. *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* ile yem bezelyesinde genetik transformasyon çalışmaları 1990’lı yıllarda başlamış ve düşük verimle de olsa başarılı sonuçlar alınmaktadır (Ludvíková ve Griga, 2022).

Baklagiller genelinde genetik transformasyon alanında önemli ilerlemeler sağlanmaktadır. Örneğin, soya fasulyesinde *Agrobacterium* aracılı transformasyon protokolleri optimize edilerek, herbisit direnci (glifosat ve glufosinata karşı) sağlayan *EPSPS*, *Bar* ve *Pat* genleri aktarılmaktadır. Bu sayede yabancı ot kontrolü kolaylaşmaktadır (Li vd., 2017). Mısırdaki ise çoklu transgenik yapılar geliştirilmiş, hem farklı herbisitlere hem de böcek zararlılara karşı dirençli genler birleştirilmektedir (Bradshaw, 2017).

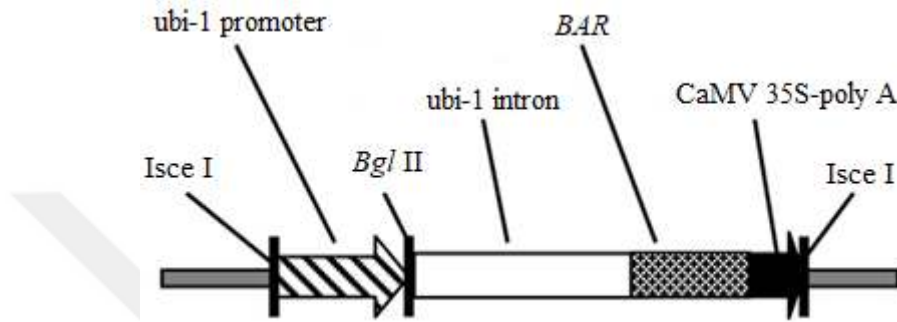
Diğer baklagillerde, fasulye, bakla, nohut, güvercin bezelyesi ve börülce gibi türlerde de transformasyon çalışmaları yapılmakta olup, bunlarda özellikle dayanıklılık ve verim artışı hedeflenmektedir (Ludvíková ve Griga, 2022). Bu ürünlerde herbisit toleransı ve *Bt* türevi böcek direnci ayrı ayrı veya kombinasyon halinde kullanılmıştır (Bradshaw, 2017). Yem bezelyesinde genetik transformasyon halen zorluklar içermekle birlikte, parçacık bombardımanı gibi alternatif yöntemlerle çözümler araştırılmaktadır.

2.8. Bar Genleriyle Herbisit Direnci

Fosfinotrisin, *Streptomyces* toprak bakterisi türleri tarafından üretilen tripeptid antibiyotik bialafos’tan üretilen doğal bir herbisittir. Glutamatın yapısal bir analogu olan fosfinotrisin, bitkilerde glutamin sentezi ve amonyak detoksifikasyonu için gerekli enzim glutamin sentetazı inhibitör etkisi göstererek herbisidal aktivite göstermektedir. 1980’lerde, bialafos direnç geni (*Bar*) ve yakın homologu fosfinotrisin asetiltransferaz (*Pat*) geni sırasıyla *Streptomyces hygroscopicus* ve *Streptomyces viridochromogenes*’ten izole edilmiştir. Bu genler, mısır, soya fasulyesi, kanola ve pamuk gibi genetiği değiştirilmiş önemli bitkilerde herbisit direnci sağlamak amacıyla transgen olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca *Bar* ve *Pat* genleri, transgenik bitki üretiminde seçim belirteci olarak temel araştırmalarda da

önemli katkılar sağlamaktadır. Bu nedenle *Bar* ve *Pat* genleri, herbisite dirençli transgenik bitkilerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Christ vd., 2017).

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi, p35S-int-nptII plazmidi, konstitütif CaMV 35S promotörünün transkripsiyonel kontrolü altında bulunan seçilebilir markör geni nptII'yi, HSP70 intronu ve CaMV 35S 3' UTR ile taşımaktadır. pJFbar plazmidi ise, konstitütif mısır ubikitin promotörü, ilk intron ve CaMV 35S 3' UTR kontrolü altında fosfinotrisin asetiltransferazı kodlayan *Bar* genini içermektedir (Sandhu vd., 2007).



Şekil 2. 3. *Bar* geninin ekspresyon kaseti

Kaynak:(Sandhu vd., 2007).

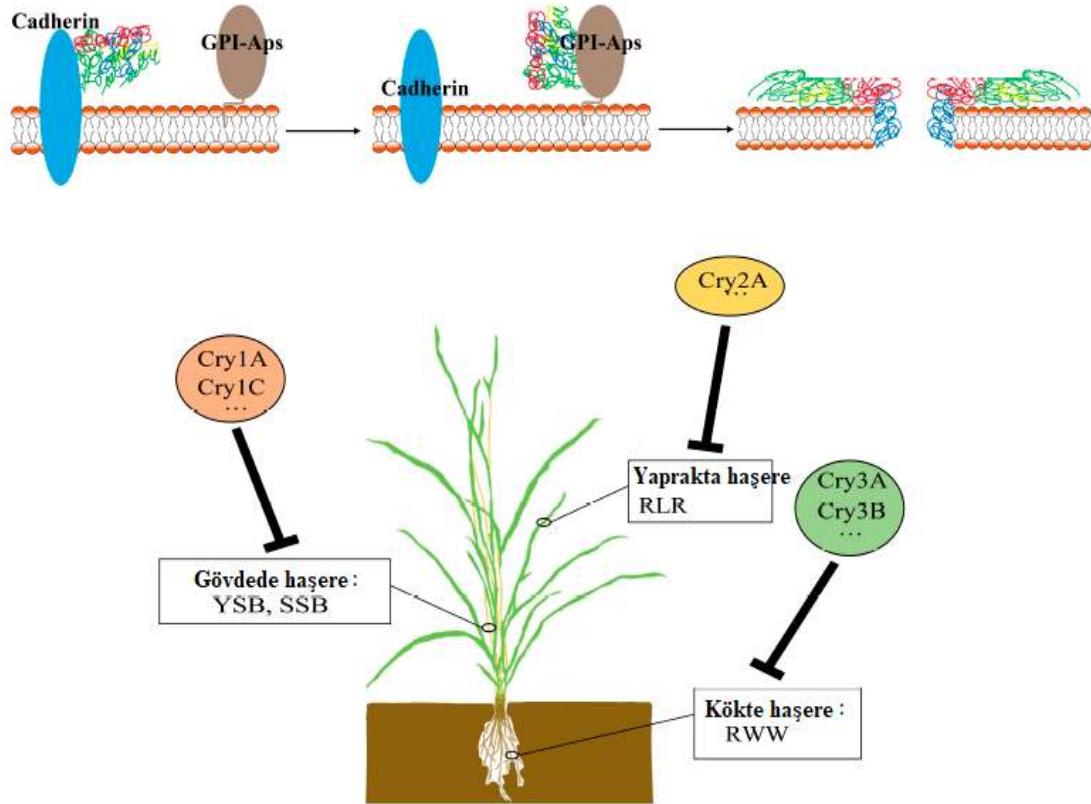
2.9. Cry Genleriyle Böcek Direnci

Bacillus thuringiensis (*Bt*), toprakta yaygın olarak bulunan gram-pozitif bir bakteridir (Wang vd., 2018). Spor oluşturma sürecinde çok sayıda parasporal kristal protein üretmektedir. Bu kristaller, yüksek özgülüğe sahip böcek öldürücü proteinlerden oluşmakta olup, böcek öldürücü kristal proteinler (ICP) olarak adlandırılmaktadır (Li vd., 2023). *Bt*'den elde edilen *Cry* genleri, böceklerle karşı dirençli bitkilerin geliştirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Bakhsh vd., 2015).

1989 yılında yapılan bir çalışmada, *Bt* proteinlerinin yapısal özellikleri ve böcek öldürücü özgülüklerine göre beş gruba ayrıldığı öne sürülmüştür: *Cry I* (*Lepidoptera* türlerine özgü toksisite), *Cry II* (*Lepidoptera* ve *Diptera* türlerine toksisite), *Cry III* (*Coleoptera* türlerine toksisite), *Cry IV* (*Diptera* türlerine toksisite) ve sitolitik özellikteki *Cyt* proteinleri (Li vd., 2023). *Bt* genlerinin sınıflandırılması, ilk olarak proteinlerin amino asit dizilimlerine dayanmakta olup, 1981 yılında keşfedilen ilk *Bt* geninden sonra yeni genler keşfedilmeye devam etmektedir. Eylül 2016 itibarıyla, klonlanmış toplam 825 *Bt* geni (787 *Cry* ve 38 *Cyt* geni) 77 kategoriye ayrılmıştır. *Bt* proteinlerinin sadece *Lepidoptera*, *Diptera*

ve *Coleoptera* gibi böcek gruplarına değil, aynı zamanda nematodlara karşı da etkili olduğu düşünülmektedir (Li vd., 2023).

Şekil 2.4'e göre, *Lepidoptera* zararlıları çeltik bitkisinin farklı organlarına zarar vermekte; sarı çeltik kurdu (YSB) ve şeker kamışı kurdu (SSB) sapları, yaprak bitleri (RLR) yaprakları, çeltik kök kurdu (RWW) ise kökleri hedef almaktadır. Bu zararlılar bitkinin fizyolojik gelişimini olumsuz etkilemektedir (Li vd., 2023).



Şekil 2. 4. Cry toksinlerinin etkisi

Kaynak: (Li vd., 2023)

Cry toksinlerinin böcek üzerindeki etkisi, toksinin böceğin bağırsağında çözünmesi ile başlamaktadır. Çözünen toksin, bağırsak proteazları tarafından aktif forma dönüşmekte olup, bu aktivasyon toksinin biyolojik etkinliğini artırmaktadır. Aktif toksin, primer reseptör olan kadherinle spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma toksinin heliks a-1 bölgesinde yapısal değişikliklere yol açmakta ve toksinin oligomerleşmesini başlatmaktadır. Oligomerleşen toksinler, ikinci reseptörler olan glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlı proteinler, özellikle GPI-ankorlanmış aminopeptidazlar veya alkalın fosfatazlarla etkileşime girmektedir. Bu etkileşim toksinin hücre zarına girişini sağlamakta ve zar üzerinde delikler oluşturarak hedef hücreleri öldürmektedir (Li vd., 2023).

Cry genleri bazen kombinasyon halinde de kullanılmaktadır. Örneğin, *Bt* genleri proteinaz inhibitörü genleri ile birlikte kavakta zararlılara karşı dayanıklılık sağlamak amacıyla aktarılmıştır. *CryIAc* ve proteinaz inhibitörü (*API*) genlerinin kombinasyonu kavak türlerine başarıyla aktarılmıştır (Wang vd., 2018).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada; materyal olarak Ateş çeşidi yem bezelyesi kullanılmıştır. Bu çeşit Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilmiştir. Tohumlar temin edilirken özellikle sağlıklı ve yeni tohumların temin edilmesine özen gösterilmiştir. Çalışma, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri ve Bahçe Bitkileri laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.1. Ortam Hazırlığı

Çalışmada; petri, magenta, pens, bistüri, beher, saf su ve besin ortamlarının sterilizasyonunda otoklav kullanılmıştır. Otoklavda sterilizasyon işlemi 1.2 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmıştır. Araştırmada temel besin ortamı MS (Murashige ve Skoog ortamı) (Tablo 3.1.) ve sükrozdan elde edilmiştir. Besi ortamının pH’sı 1N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.6 ile 5.8 arasında ayarlanmış ve ortamı katılaştırmak için agar ilave edilmiştir. Sürgün oluşumu için BAP (Benzil Amino Pürin), köklenmeyi teşvik etmek amacıyla ise NAA (Naftalen Asetik Asit), IAA (Indol-3-Asetik Asit) ve IBA (Indol-3-Butirik Asit) bitki hormonları kullanılmıştır. Tüm kültürler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta, 22±2°C’de ve 3000 lüks ışık yoğunluğundaki iklim odası içerisinde bekletilmiştir.

3.1.2. Bakteri Suşu

Gen aktarımında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilen *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 suşu kullanılmıştır.

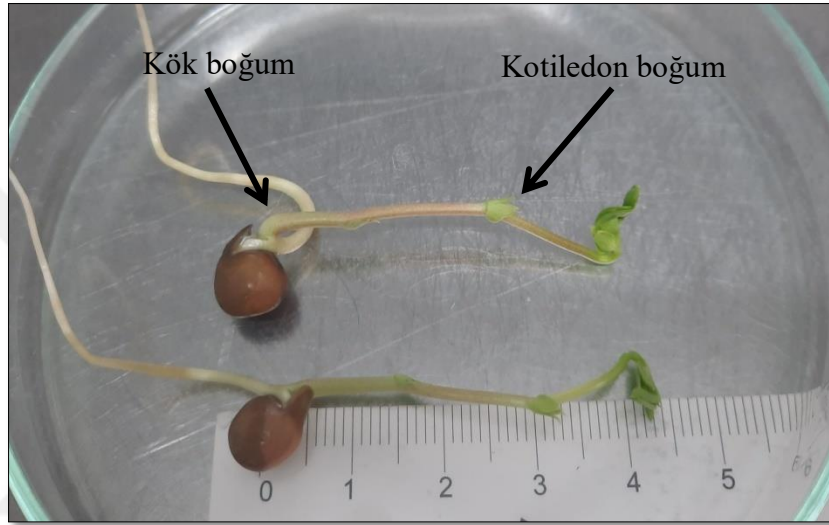
3.2. Metot

Çalışma doku kültürü protokolünün geliştirilmesi ve uygulanması, gen transformasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır.

3.2.1. Doku Kültürü Protokolünün Geliştirilmesi

Doku kültürü optimizasyonu, başarılı bir bitki rejenerasyonu için kritik olan çeşitli aşamaları kapsamaktadır. Bu aşamalar; uygun eksplant seçimi, sterilizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi, rejenerasyon ve köklenme protokollerinin uygulanması ile besi ortamı içeriklerinin ve hormon uygulamalarının titizlikle düzenlenmesini içermektedir.

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan eksplantların seçimi, rejenerasyon başarısını doğrudan etkileyen önemli bir faktördür. Bu araştırmada, tohumlar yüzey sterilizasyonu işleminden sonra hormon içermeyen MS besî ortamında kültüre alınmıştır. Bir hafta çimlenen tohumlardan, steril kabin altında bistüri ve pens yardımıyla eksplant ayrımı gerçekleştirilmiştir. Eksplant kaynağı olarak yem bezelyesi tohumlarından elde edilen kotiledon boğum ve kök boğumları tercih edilmiştir (Şekil 3.1). Eksplantların genç, sağlıklı ve kontaminasyondan arındırılmış olması, kültürlerde yüksek verim sağlamak açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle sterilizasyon aşaması oldukça önemlidir.



Şekil 3. 1. Çimlenmiş tohumların 7 gün sonraki görüntüsü

Sterilizasyon, doku kültürü süreçlerinde kontaminasyonun önlenmesi ve sağlıklı bitki gelişiminin sağlanması için kritik bir adımdır. Bu çalışmada, tohumlar Şekil 3.2’de gösterildiği üzere steril kabin altında % 5’lik ticari çamaşır suyu çözeltisi ile 15 dakika muamele edilmiştir. Ardından, tohumlar steril saf suda üç kez, her seferinde beş dakika süreyle yıkanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu işlemlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla Ateş çeşidi yem bezelyesi tohumlarında bir dizi ön değerlendirme yapılmıştır. Sterilizasyonun çimlenme üzerindeki etkileri, tohumların çimlenme hızı ve gücü ile birlikte, gelişen fidelerin kök ve fide uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığı, fide yaş ve kuru ağırlığı gibi morfolojik ve fizyolojik parametreler üzerinden analiz edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, hem kontaminasyonu en aza indiren hem de tohumların fizyolojik gelişimini olumsuz yönde etkilemeyen optimal sterilizasyon protokolü belirlenmiş ve sonraki aşamalarda kullanılmıştır.



Şekil 3. 2. Tohumların yüzey sterilizasyonu

Sterilizasyon işleminin etkinliğini ve çimlenme üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Ateş çeşidi yem bezelyesi tohumlarının çimlenme hızı (5. gün sonunda) ve çimlenme gücü (8. gün sonunda) hesaplanmıştır. Ortalama çimlenme hızı ve gücü aşağıda belirtilen Ellis ve Roberts (1980) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$[\text{Çimlenme Hızı/Gücü (\%)} = (\text{Çimlenen tohum sayısı} / \text{Toplam tohum sayısı}) \times 100]$$

Sekizinci günün sonunda çimlenen tohumlardan elde edilen kök ve fideler steril bistüri yardımıyla kesilmiş ve kök ile fide uzunlukları kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Aynı zamanda her bir kök ve fide taze olarak hassas terazide tartılmış, ardından 65 °C’de 48 saat boyunca etüvde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları da aynı terazide ölçülerek kaydedilmiştir.

Sterilizasyon optimizasyonu aşamasının ardından, kontaminasyon riski minimize edilmiş tohumlardan eksplant hazırlığı yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar, uygun besi ortamında 1 hafta çimlendikten sonra, steril kabin altında bistüri ve pens yardımıyla kotiledon boğum ve kök boğumları eksplant olarak ayrılmıştır (Şekil 3.1). Eksplantların boyutları yaklaşık 0.5-1 cm arasında olacak şekilde kesilerek doğrudan uygun besi ortamlarına transfer edilmiştir. Bu süreçte, kontaminasyon riskinin önlenmesi amacıyla kullanılan tüm aletler ve çalışma alanı titizlikle sterilize edilmiş, kültür ortamına aktarılan eksplantların sağlıklı gelişimi için koşullar sıkı bir şekilde kontrol edilmiştir.

Tohumların *in vitro* çimlendirilmesinde, % 0.44 MS mineral tuzları ve vitaminleri (Tablo 3.1), % 3 sükroz ve % 0.8 agar içeren temel besi ortamı kullanılmıştır. Ortamın pH’sı 1 N NaOH ve 1 N HCl ile 5.6-5.8 arasında ayarlanmıştır.

Tablo 3. 1. MS ortamının içerdği maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler		Konsantrasyonu (mg l ⁻¹)
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	KI	0.83
	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
Vitaminler	Inositol	100
	Nikotinik Asit	0.5
	Piridoksin Hidroklorür	0.5
	Tiamin Hidroklorür	0.1
	Glisin	2.0

Steril edilen tohumlar, ekim sonrası Şekil 3.3’de gösterildiği gibi kavanozlara yerleştirilmiş ve 25 °C sıcaklık ile 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyoda sahip iklimlendirme odasında kültüre alınmıştır.



Şekil 3. 3. *İn vitro* olarak ekilen tohumların görüntüsü

Rejenerasyon protokolü kapsamında, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 ve 6.00 mg l⁻¹ BAP ile 0.20 mg l⁻¹ NAA içeren MS temel besi ortamları kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3. 2. Araştırmada kullanılan besi ortamına ilave edilen BAP ve NAA konsantrasyonları

BAP (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)
1.00	0.20
2.00	0.20
3.00	0.20
4.00	0.20
5.00	0.20
6.00	0.20

Besi ortamları % 0.8 agar ile katılaştırılmış ve 121 °C’de, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edilmiştir. Kotiledon boğum ve kök boğum eksplantları, belirtilen farklı hormon konsantrasyonlarında kültüre alınmış, her kavanozda 15 eksplant olacak şekilde düzenlenmiş ve 25 °C’de, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyoda sahip iklimlendirme odasında gelişime bırakılmıştır. Deneyde, her ortam ve eksplant için üç tekerrür yapılmış; toplamda 90 eksplant değerlendirilmiştir. Gelişim süreci, 4 haftalık kültür dönemi sonunda değerlendirilmiştir.

Gelişen eksplantlar, köklenme sürecini desteklemek amacıyla 1 mg l⁻¹ Indol-3-asetik asit (IAA) içeren besi ortamına aktarılmıştır. Gelişen sürgünler, yaprak altı meristem dokusundan steril şekilde kesilerek köklendirme ortamlarına aktarılmış ve yaklaşık 4 hafta boyunca gelişimleri gözlenmiştir.

3.2.2. Gen Transformasyonu Protokolü

Bu çalışmada, yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.) bitkisine *CryI*Ac ve *Bar* genlerinin aktarımı amacıyla geliştirilen gen transformasyonu protokolü, bir dizi optimize edilmiş aşamadan oluşmaktadır. Transformasyon süreci, öncelikle uygun vektörlerin ve genetik yapıların belirlenmesiyle başlamış; ardından *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin uygun kültür koşullarında çoğaltılması ile sürdürülmüştür. Gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için, kullanılacak seleksiyon ajanı olan fosfinotrisinin (PPT) doz optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve non-transgenik bitkiler üzerindeki öldürücü etkisi dikkate alınarak uygun konsantrasyon belirlenmiştir. Daha sonra, seçilen yem bezelyesi eksplantları *Agrobacterium* süspansiyonları ile enfekte edilmiş sonra seçici ortamlarda kültüre alınarak transformasyonun ilk adımı tamamlanmıştır. Seçici ortamda gelişim gösteren bitkiler, alt kültür ortamlarına aktarılmış ve burada sağlıklı sürgünler ayrılarak köklendirme aşamasına hazırlanmıştır. Köklendirme ortamlarında gelişim gösteren bitkiler moleküler analizlere tabi tutulmuş; gen aktarımının başarılı olup olmadığı PCR ile doğrulanmıştır. Bu aşamaların her biri aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Genetik transformasyon çalışmaları kapsamında, yem bezelyesi bitkisine hedef genlerin aktarılmasında *Agrobacterium tumefaciens* aracılı vektör sistemleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan vektörler, 35S-CryIAc-NosT gen kasetini taşıyan yapı ile birlikte, seçici işaret geni olarak *nptII* (neomisin fosfotransferaz) ve ayrıca *Bar* geni içeren LBA-PGG-*Bar* binari plazmidlerini içermektedir. Her iki plazmidin T-DNA bölgesinde *Bar* geninin bulunması, fosfinotrisin (PPT) herbisidine karşı bitkisel direnç kazandırmayı mümkün kılmıştır.

Hedef gen olarak kullanılan *CryI*Ac, bakteriyel kökenli bir endotoksin geni olup, bitkilerde lepidopteran zararlılara karşı direnç sağlamaktadır. Bu gen, güçlü ve sürekli ekspresyon sağlamak amacıyla, bitki genlerinde yaygın olarak kullanılan CaMV 35S promotörü altında düzenlenmiştir. Genetik ifadenin doğru bir şekilde sonlandırılması için Nos terminatör dizisi (NosT) kullanılmıştır. Ayrıca çoklu klonlama bölgesi (MCS) sayesinde, hem *CryI*Ac hem de *Bar* genlerinin aynı T-DNA segmentinde bitki genomuna aktarımı

sağlanmıştır. Bu yapı, transgenik bitkilerde hem hedef genin hem de seçici işaret geninin aynı anda ve etkin biçimde ifade edilmesine olanak tanımıştır.

Agrobacterium tumefaciens aracılı vektör sistemleri başarılı transformasyonu için *Agrobacterium tumefaciens* kültürlerinin uygun şartlarda hazırlanması ve çoğaltılması gerekmektedir. Aşağıda, bu kültürlerin hazırlanması ve muhafazası ile ilgili prosedür detaylandırılmıştır.

Derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 bakterisinden pipet yardımıyla örnekler alınarak öncelikle içerdiği plazmitte bulunan genlerin sağladığı dirence göre 50 mg l⁻¹ rifamisin, 50 mg l⁻¹ kanamisin ve 100 mg l⁻¹ spektinomisin ile birlikte LBAPGGBar için 50 mg l⁻¹ rifamisin, 50 mg l⁻¹ kanamisin seçici antibiyotikleri içeren sıvı NB (Nutrient Broth) besin ortamında bir gece süresince 23-25°C sıcaklıkta orbital çalkalayıcıya bakterilerin büyümesi için bırakılmış ve hazır hale getirilmiştir. Bu aşama, bakterilerin sağlıklı ve aktif büyüme fazında olmalarını sağlayarak transformasyon verimliliğinin artırılmasında kritik bir rol oynamaktadır.

Gen transformasyonu sürecinde, sadece gen aktarımına uğrayan hücrelerin seçilmesi amacıyla seleksiyon ajanı olarak fosfinotrisin (PPT) kullanılmıştır. Etkili bir seleksiyon sağlanabilmesi için fosfinotrisin konsantrasyonunun, transgenik hücrelere zarar vermeyecek fakat non-transgenik hücreleri elimine edecek düzeyde optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, farklı dozlarda (2.00, 4.00, 6.00 ve 8.00 mg l⁻¹) fosfinotrisin içeren temel besi ortamları hazırlanmış ve yüzey sterilizasyonu yapılmış yem bezelyesi tohumları bu ortamlara ekilmiştir. Her bir deney grubu, 25 °C sıcaklıkta, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Tohumların günlük olarak gözlenmesiyle, 2 mm kökçük uzunluğuna ulaşanlar gelişmiş olarak kabul edilmiştir. Deney sonuçlarına göre, seçici ortamda kullanılacak en uygun PPT dozu belirlenmiş ve bu konsantrasyon, transformasyon sonrası seleksiyon aşamasında uygulanmıştır.

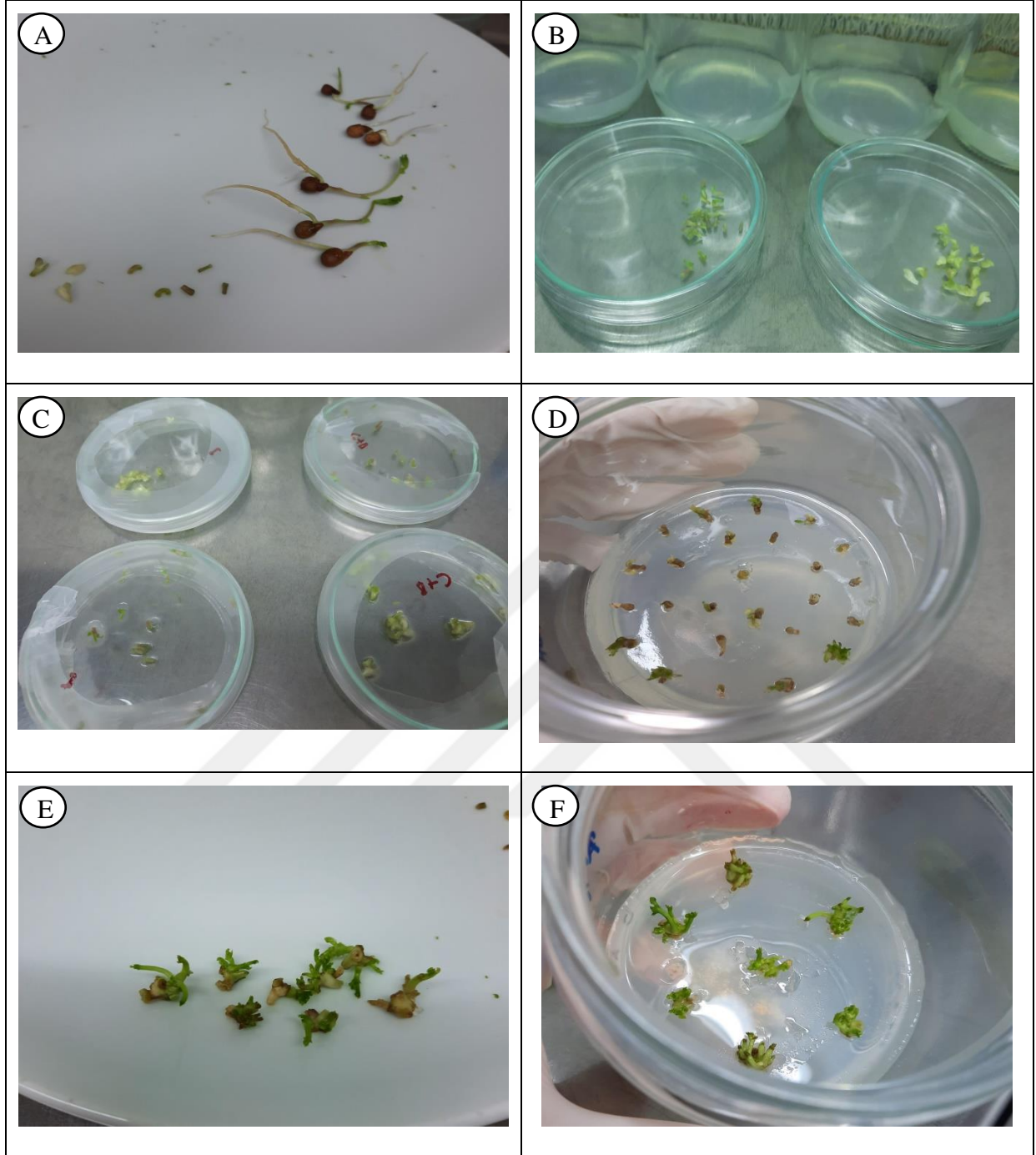
Ön çalışmalardan elde edilen rejenerasyon sonuçları doğrultusunda, yüzey sterilizasyonu uygulanmış ve *in vitro* çimlendirilmiş yem bezelyesi tohumlarından gelişen sürgünlere ait kotiledon ve kök boğum eksplantları, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen transferinde kullanılmıştır. *A. tumefaciens* bakteri hatları, içerdikleri binari vektörlere bağlı olarak uygun antibiyotikler içeren 10 ml NB (Nutrient Broth) besi ortamında bir gece boyunca çoğaltılmıştır. Rejenerasyon ortamı olarak, daha önce doku kültürü çalışmalarında en

yüksek verim elde edilen besi ortamları tercih edilmiştir. İnokülasyon aşamasında sıvı, seleksiyon aşamasında ise katı rejenerasyon ortamları kullanılmış olup, seleksiyon ortamlarına binari vektörlere bağlı olarak 400 mg l⁻¹ ampisilin ve 2.00 mg l⁻¹ fosfinotrisin ilave edilmiştir.

Şekil 3.4'te gösterildiği gibi, *in vitro* çimlenmiş yem bezelyesi fidelerinden elde edilen kotiledon ve kök boğum eksplantları, 30 dakika süreyle bakteriyel inokülasyona tabi tutulmuştur. İnoküle edilen eksplantlar, seleksiyon ortamına aktarılmış ve kültür odasında muhafaza edilmiştir. Dört hafta sonra, fosfinotrisine dayanıklı sürgün sayımı yapılmış ve gelişen bitkiler alt kültüre alınmıştır.

Alt kültür işleminden önce, gelişen sürgünler gözle muayene edilerek değerlendirilmiş; nekrotik, kahverengileşmiş ya da deformasyona uğramış bölgeler bistüri yardımıyla dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Bu temizlik işlemi ile yalnızca sağlıklı dokuya sahip sürgünlerin alt kültür ortamına aktarılması sağlanmıştır. Temizlenen sürgünler, 200 mg L⁻¹ ampisilin içeren hormonsuz MS ortamına transfer edilmiş ve dört hafta süreyle kültüre alınmıştır. Alt kültür süreci, seçilen transgenik adayların sağlıklı gelişimini teşvik etmek, kontaminasyon riskini azaltmak ve sürdürülebilir sürgün oluşumunu sağlamak amacıyla uygulanmıştır. Bu süreçte gelişen sürgünlerin sağlıklı kısımları da düzenli olarak kontrol edilmiş; gerek görüldüğünde, yeni oluşan nekrotik veya bozulmuş dokular tekrar bistüri ile uzaklaştırılmış, ardından sağlıklı sürgünler köklendirme ortamına alınmıştır.

Köklendirme aşamasında, Tablo 3.3'te belirtilen on farklı ortam formülasyonu kullanılmıştır. Transgenik aday olarak seçilen sürgünler, yaprak altı meristem dokusundan steril koşullarda uygun uzunlukta kesilerek bu köklendirme ortamlarına aktarılmıştır. Bitkiler, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot altında dört hafta boyunca inkübe edilerek gelişimleri yakından takip edilmiştir. Bu süreçte, kök oluşumu ve sürgün sağlığı düzenli olarak değerlendirilmiş, başarılı köklenen bitkiler deneysel materyal olarak seçilmiştir. Köklenme döneminin sonunda, köklü bitkilerden alınan yaprak veya sürgün dokuları kullanılarak DNA izolasyonu yapılmış ve transgenik yapıların varlığı PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile doğrulanmıştır. Bu moleküler analiz, gen aktarımının etkinliğini ve genlerin bitki genomuna başarılı entegrasyonunu değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 4. Gen transferi aşamaları. (A) Çimlenen tohumlardan eksplant kesimi. (B) Kotiledon ve kök boğum eksplantların eldesi. (C) Eksplantların gen ile muamelesi. (D) Besi ortamında transgenik aday bitkilerin seçimi. (E) Transgenik aday bitkiler. (F) Aday bitkilerin alt kültüre alınması.

Tablo 3. 3. Gelişen sürgünlerin kök gelişimini sağlamak amacıyla kullanılan farklı köklendirme ortamları.

Ortamlar*	MS (g)	Sükroz (g)	Ampisilin (mg l ⁻¹)	IAA (mg l ⁻¹)	NAA (mg l ⁻¹)	IAA (mg l ⁻¹)
1.	4.4	30	200	1	-	-
2.	4.4	30	200	-	1	-
3.	4.4	30	200	-	1	-
4.	4.4	30	200	-	1	-
5.	2.2	15	200	-	1	-
6.	2.2	15	200	1	-	-
7.	2.2	15	200	-	-	1
8.	2.2	15	25	1	-	-
9.	2.2	15	20	1	-	-
10.	2.2	15	5	1	-	-

*Her bir köklendirme ortamı için 4 g agar, 1g aktif karbon kullanılmıştır ve pH 5,8'e ayarlanmıştır.

3.2.3. Moleküler Doğrulama: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Köklendirme sürecinde fenotipik olarak fosfinotrisine dayanıklılık gösteren gelişmiş sürgünlerden transgenik aday bitkiler belirlenmiştir. Bu bitkilerde *CryIAc* ve *Bar* genlerinin başarıyla aktarılıp aktarılmadığını moleküler düzeyde doğrulamak amacıyla genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) uygulanmıştır.

Bitki materyallerinden genomik DNA izolasyonu protokolü olarak elde edilen transgenik aday bitkilerden DNA izolasyonu için GeneAll Biotechnology üretici firmasından temin edilen Exgene™ Plant SV mini DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

DNA izolasyonu için 100 mg yaş ağırlığında bitki dokusu sıvı azot ile soğutulmuş havan ve tokmak kullanılarak tamamen toz haline getirilmiştir. Daha sonra öğütülmüş doku üzerine lizis tamponu eklendikten sonra 65°C’de 10–15 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında 2–3 kez ters çevrilerek veya vortex ile karıştırılmıştır.

PD (protein denatürasyonu) tamponu eklenmesi aşamasında; lizata 140 µl Buffer PD eklenmiş ve vortex ile karıştırılmıştır. Sonrasında 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir.

Transgenik adayı bitkilerin PCR ile teyit edilmesi aşamasında ise, *Bar* ve *CryIAc* genlerine yönelik Tablo 3.4.’deki DNA diziliminde dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır.

Tablo 3. 4. Hedef genlerin baz dizilişleri ve büyüklükleri

Hedef	Baz dizilişi	Hedefbüyüklüğü
<i>Bar</i> geni	Fw-TGCACCATCGTCAACCACTA Rv- ACAGCGACACGCTCTTGAA	310 bp
<i>CryIAc</i> geni	Fw- ATGGACAACCCAAACATC Rv- TCATGTCGTTGAATTGAATACG	412 bp

PCR analizleri için A.B.T.TM 2X PCR MasterMix üretici firmanın tavsiye ettiği protokol uygulanmıştır (Tablo 3.5.). Bu yöntemde reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır ardından 95°C’de önceden ısıtılmış PCR cihazına yerleştirilerek PCR reaksiyonları tamamlanmıştır (Tablo 3.6.).

PCR döngüsü tamamlandıktan sonra PCR ürünleri agaroz jelde molekül ağırlıklarına göre elektroforeze yüklenmiştir. PCR ürünleri 6X yükleme tamponu 71 (Ficoll 400 ve Bromofenol blue) ile karıştırıldıktan sonra 5 µl l⁻¹ Etidium Bromid (EtBr) içeren % 1.5’lik 100 ml 1X TBE (10.8 g l⁻¹ Trizma-base, 5.5g l⁻¹ Borik asit, 4 ml 0.5 M EDTA pH 8) agaroz jele yüklenmiştir. 1X TAE elektroforez tamponu kullanılarak hazırlanan elektroforez ortamında DNA amplifikasyon ürünleri 100 V altında 30 dakika yürütülmüştür.

Yükleme tamponundaki işaret boyası olan bromofenol mavi boya, agoroz jelin tabanına 2 cm yaklaştığında elektroforez işlemi tamamlanmış ve EtBr ile boyanan DNA örnekleri 260 nm dalga boyunda bir UV transillimünatör altında incelenerek poloroid ve dijital fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 3. 5. PCR reaksiyon karışımı tablosu (20 µl)

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
A.B.T.™ 2X PCR MasterMix	10 µl	1X
İleri Primer (10 µM)	0.2 – 2.0 µl	0.1 – 1.0 µM
Ters Primer (10 µM)	0.2 – 2.0 µl	0.1 – 1.0 µM
DNA Şablonu (template)	1.0 – 5.0 µl	< 250 ng toplam DNA
RNazsız Saf Su (dH ₂ O)	20 µl	-

Tablo 3. 6. *Bar* ve *CryIac* genlerinin çoğaltılması için uygulanacak PCR koşulları
(Anayol, 2014)

Gen	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
<i>Bar</i> geni	DNA'nın Denatürasyonu	98	5 dk	40
	DNA'nın Denatürasyonu	98	5 sn	
	Primerlerin yapışması	60	15 sn	
	Uzama	72	30 sn	
	Son uzama	72	3 dk	
<i>CryIac</i> geni	DNA'nın denatürasyonu	98	5 dk	40
	DNA'nın denatürasyonu	98	5 sn	
	Primerlerin yapışması	58	15 sn	
	Uzama	72	30 sn	
	Son uzama	72	3 dk	

3.3. İstatistik Analizler

Çalışmada elde edilen veriler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak mstat-c istatistik paket programına göre analiz edilmiştir (Düzgüneş vd., 1987). Doku kültürü çalışmalarında her tekerrürde 30 adet eksplant kullanılarak, toplam 90 adet eksplant incelenmiştir. Transgenik ve PCR çalışmalarında ise (%) oranı hesaplanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Doku Kùltürü Çalışmaları

Doku kùltürü çalışmalarında ilk aşama olarak yüzey sterilizasyonu uygulanmaktadır. Farklı bitki tohumları ve eksplantları için sterilizasyonun optimize edilmesi önem taşımaktadır. Yüzey sterilizasyonu aşamasında bitki dokusuna en az zarar veren ve kontaminasyonu engelleyen en düşük sterilizasyon ajanının dozunun belirlenmesi önemlidir. Tohum yüzey sterilizasyonunda % 5 lik ticari çamaşır suyu (% 5-15 oranında sodyum hipoklorit içeren) çözeltisinde 15 dakika muamele edilip 5'er dakika süreyle steril saf suda 3 kez durulanmıştır. Yüzey sterilizasyona tabi tutulan tohumlar Metot kısmında Tablo 3.1'de belirtilen besin ortamına aktarılmış ve 7 gün süre ile çimlenmeye bırakılmıştır.

Çalışmada kullanılan Ateş çeşidinin % 5 lik ticari çamaşır suyu ile birlikte sterilizasyona tabi tutulduktan sonra çimlenme hızı, gücü, kök ve fide uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığı, fide yaş ve kuru ağırlığı değerlendirilmiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4. 1. Ateş çeşidine ait tohum çimlenmesi ve fide gelişim parametreleri.

Parametreler	Değerler
Çimlenme hızı (%)	100.0
Çimlenme gücü (%)	100.0
Kök uzunluğu (cm)	5.833
Fide uzunluğu (cm)	5.233
Kök yaş ağırlığı (g)	0.07667
Kök kuru ağırlığı (g)	0.01000
Fide yaş ağırlığı (g)	0.08667
Fide kuru ağırlığı (g)	0.01000

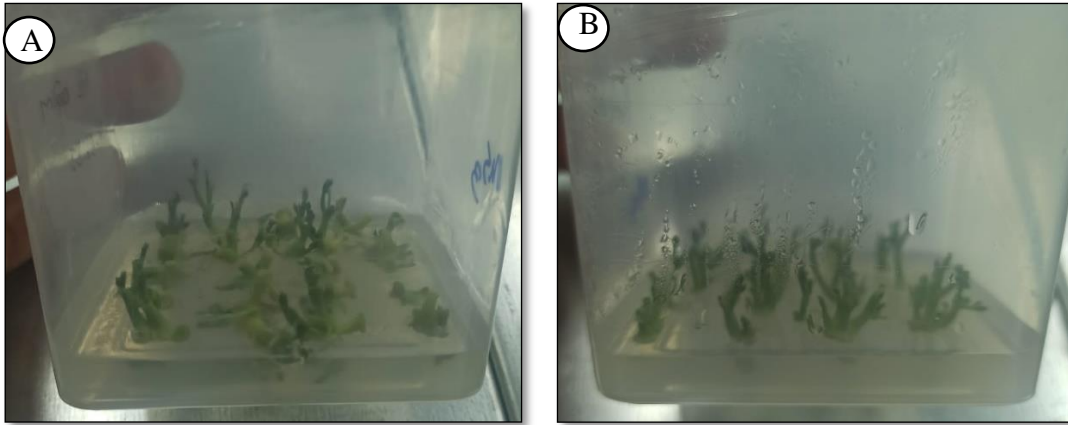
Yem bezelyesi bitkisinin, bitki türüyle karşılaştırıldığında, adventif sürgün rejenerasyonu son derece zordur. Literatürde bazı bezelye genotipleri ile protokoller

geliştirilmiş olsa da yapılan çalışmalar yetersizdir. Bu çalışma kapsamında ilk olarak; denemede kullanılacak olan çeşitlerin farklı eksplantları, farklı besin ortamlarında kültüre alınarak gen aktarımına uygun adventif sürgün rejenerasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Sürgün rejenerasyonu için *in vitro*'da gelişen bitkilere ait farklı eksplantlar kullanılmıştır.

Rejenerasyon optimizasyonu için yalnızca Ateş yem bezelyesi çeşidi kullanılmıştır. Öncelikle eksplant olarak kullanılan Şekil 4.1'te görülen kotiledon boğumu ve kök boğumları 6-7 günlük fidelerden izole edilerek steril kabin içerisinde aseptik ortamda farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre alınmış ve bu eksplantlar üzerinde 4 hafta sonrada kotiledon ve kök boğumundan sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4. 1. Kotiledon boğum, kök boğum ve çimlendirilmiş tohumları görüntüsü



Şekil 4. 2. Ateş çeşidine ait eksplantların 4 hafta sonrasındaki sürgün oluşumu görüntüsü;

(A) Kök boğum eksplantı, (B) Kotiledon boğum eksplantı

Sürgün rejenerasyonunun optimizasyonu için Ateş yem bezelyesi çeşidine ait *in vitro* çimlenen fidelerden alınan kotiledon boğum ve kök boğum eksplantları Tablo 3.1.'de

belirtildiği gibi farklı büyüme düzenleyiciler içeren besin ortamında kültüre alınmış ve kültür başlangıcından 8-10 hafta sonra rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı belirlenmiştir.

Ateş yem bezelyesi çeşidinden elde edilen rejenerasyon sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir. Köklendirme ortamı olarak 1.00 mg l^{-1} IAA kullanılmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 4. 3. Eksplantlardan elde edilen kök oluşumu

Tablo 4.2 incelendiğinde eksplant başına düşen ortalama sürgün uzunluğu kotiledon boğum eksplantı için, en uzun sürgün 2.13 mm olarak 3.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA ve en kısa sürgün ise 1.65 mm olarak 1.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA konsantrasyonunda görülmüştür. Kök boğum eksplantı açısından ise en uzun sürgün 3.26 mm 3.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA konsantrasyonunda görünürken en kısa sürgün uzunluğu 1.78 mm olarak 2.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı Tablo 4.2 verilerine göre, en fazla sürgün sayısı kotiledon boğum eksplantı için 3.30 adet 3.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. En düşük sürgün sayısı ise 1.50 adet olarak 2.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA karışımında elde edilmiştir. Kök boğum eksplantından elde edilen verilere göre en fazla sürgün sayısı söz konusu eksplant için 5.50 adet olarak 3.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA konsantrasyonunda ve en az sürgün sayısı 2.00 adet olarak 2.00 mg l^{-1} BAP + 0.20 mg l^{-1} NAA hormonlarında rastlanmıştır.

Tablo 4. 2.Kültüre alınan kotiledon ve kök boğum eksplantlarından elde edilen direkt rejenerasyon gösteren eksplant sayıları, başarı oranları (%), eksplant başına düşen ortalama sürgün uzunluğu (mm), eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (adet)

Büyüme Düzenleyicisi (mg l ⁻¹)	Eksplant Sayısı (Adet)	Direkt Rejenerasyon Gösteren Eksplant Sayısı		Başarı Oranı (%)		Eksplant Başına Düşen Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm)		Eksplant Başına Düşen Ortalama Sürgün Sayısı (Adet)	
		Kotiledon Boğum	Kök Boğum	Kotiledon Boğum	Kök Boğum	Kotiledon Boğum	Kök Boğum	Kotiledon Boğum	Kök Boğum
BAP(1) + NAA (0.2)	30	24	24	80	80	1.65 b*	2.26 b	1.6 c	2.0 cd
BAP(2) + NAA (0.2)	30	27	24	90	80	2.06 a	1.78 c	1.5 c	3.3 c
BAP(3) + NAA (0.2)	30	30	30	100	100	2.13 a	3.26 a	3.3 a	5.5 a
BAP(4) + NAA (0.2)	30	24	27	90	90	1.95 b	2.73 b	2.1 b	4.2 b
BAP(5) + NAA (0.2)	30	27	27	90	90	2.09 a	2.84 b	2.7 ab	4.1 b
BAP(6) + NAA (0.2)	30	24	24	80	80	1.76 b	2.43 b	2.8 ab	2.9 c

* Her sütunda ve her satırda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında 0.01 düzeyinde fark yoktur.

Genel olarak her iki eksplant için farklı konsantrasyonları incelemeye alındığında en uygun doz 3.00 mg l⁻¹ BAP + 0.20 mg l⁻¹ NAA olarak gözlemlenmiştir. Dolayısıyla her iki eksplant için benzer etkiler göstermiştir.

4.2. Gen Aktarım Çalışmaları

4.2.1. Fosfinotrisin (PPT) Miktarının Belirlenmesi

Bakteri ile muamele edilen eksplantların seçimi amacıyla kullanılan seleksiyon ortamında fosfinotrisin, 2.00, 4.00, 6.00 ve 8.00 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında uygulanmıştır. *In vitro* ortamda fosfinotrisin düzeyleri ile bitki büyüme parametreleri arasındaki ilişkiye ait varyans analiz sonuçları Tablo 4.3'te sunulmuştur. Elde edilen bulgulara göre, incelenen tüm özellikler bakımından fosfinotrisin dozlarının etkisi istatistiksel olarak % 1 düzeyinde anlamlı bulunmuştur (P < 0.01).

Tablo 4. 3. Farklı dozlardaki fosfinotrisin miktarının çeşitli bitki büyüme parametreleri üzerindeki etkisini inceleyen istatistiksel verileri

Gözlem değerleri	Varyasyon kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Çimlenme oranı	Dozlar	3	2041,667	98.000**
	Hata	12	20.833	
	Genel	15		
Kök uzunluğu	Dozlar	3	21.075	76.986**
	Hata	12	0.274	
	Genel	15		
Sürgün uzunluğu	Dozlar	3	24.038	613.507**
	Hata	12	0.039	
	Genel	15		
Kök yaş ağırlığı	Dozlar	3	0.002	54.608**
	Hata	12	0,000	
	Genel	15		
Sürgün yaş ağırlığı	Dozlar	3	0.006	462.251**
	Hata	12	0.000	
	Genel	15		

** P<0.01 seviyesinde önemli, * P<0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.

Farklı fosfinotrisin dozlarının (1.00, 2.00, 3.00 ve 4.00 mg l⁻¹) çeşitli bitki büyüme parametreleri üzerindeki etkilerine ait ortalama değerler Tablo 4.4'te verilmiştir. Yapılan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre, tüm parametreler bakımından dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (P < 0.01).

Tablo 4.4 incelendiğinde, en yüksek çimlenme oranı % 100.00 ile 1.00 mg l⁻¹ fosfinotrisin dozunda gözlemlenmiş olup bu değer “a” harfi ile istatistiksel olarak en üstün grup içerisinde yer almıştır. En düşük çimlenme oranı ise % 47.50 ile 4.00 mg l⁻¹ dozunda belirlenmiştir.

Kök uzunluğu bakımından da benzer bir eğilim gözlenmiş olup, en yüksek değer 6.80 mm ile 1.00 mg l⁻¹ dozunda elde edilirken, bu değeri sırasıyla 5.15 mm (2.00 mg l⁻¹) ve 4.62 mm (3.00 mg l⁻¹) takip etmiştir. En düşük kök uzunluğu ise 1.32 mm ile 4.00 mg l⁻¹ dozuna ait olup, istatistiksel olarak en düşük grup içerisinde yer almıştır.

Sürgün uzunluğu parametresi açısından da 1.00 mg l⁻¹ dozunun etkisi belirgin şekilde yüksek olmuş ve ortalama 5.65 mm sürgün uzunluğu sağlanmıştır. Artan fosfinotrisin dozları ile birlikte sürgün uzunluklarında belirgin bir azalma gözlenmiş, en düşük değer 0.35 mm ile 4.00 mg l⁻¹ dozunda ölçülmüştür.

Bitkilerin kök yaş ağırlığı açısından da 1.00 mg l⁻¹ dozu, 0.0673 g ile en yüksek değeri sağlamıştır. Bu değeri sırasıyla 0.0455 g (2.00 mg l⁻¹) ve 0.0363 g (3.00 mg l⁻¹) takip ederken, 4.00 mg l⁻¹ dozunda kök yaş ağırlığı 0.0150 g olarak ölçülmüştür.

Benzer şekilde, sürgün yaş ağırlığı da 1.00 mg l⁻¹ dozunda en yüksek seviyeye ulaşmış (0.1063 g), fosfinotrisin dozu arttıkça bu değerlerde anlamlı azalmalar görülmüştür. En düşük sürgün yaş ağırlığı ise 0.0170 g ile 4.00 mg l⁻¹ dozunda kaydedilmiştir.

Tüm bu sonuçlar, artan fosfinotrisin dozlarının bitki gelişimi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymakta olup, *in vitro* koşullarda en uygun seçici dozun belirlenmesinde bu parametrelerin dikkate alınmasının gerekliliğini göstermektedir.

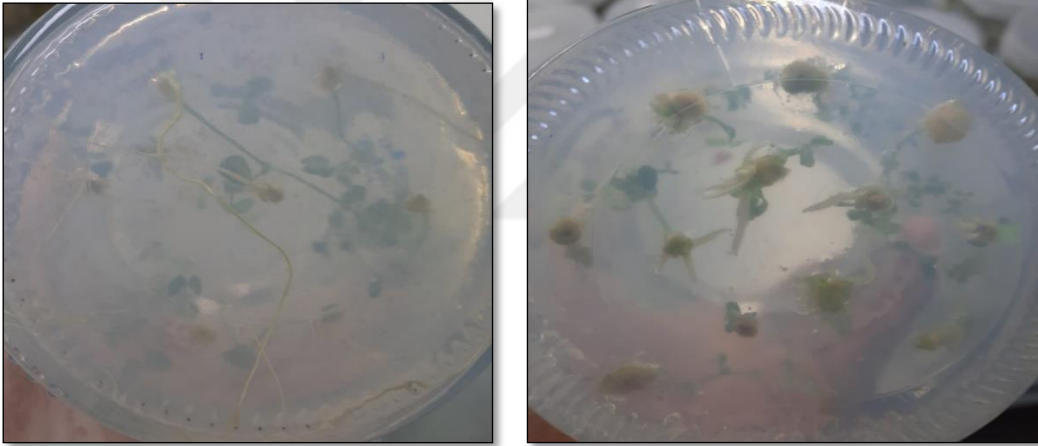
Tablo 4. 4. Farklı dozlardaki fosfinotrisin miktarının çeşitli bitki büyüme parametreleri üzerindeki etkilerine ait ortalama değerler ve Duncan grupları

Fosfinotrisin dozlarının (mg l ⁻¹)	Çimlenme oranı (%)	Kök uzunluğu (mm)	Sürgün uzunluğu (mm)	Kök yaş ağırlığı (g)	Sürgün yaş ağırlığı (g)
1.00	100.00 a*	6.80 a	5.6500 a	0.0673 a	0.1063 a
2.00	82.50 b	5.15 b	2.6750 b	0.0455 b	0.0600 b
3.00	65.00 c	4.62 b	0.6075 c	0.0363 b	0.0323 c
4.00	47.50 d	1.32 c	0.3500 c	0.0150 c	0.170 d

* Her sütunda ve her satırda aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında 0.01 düzeyinde fark yoktur.

4.2.2. Gen Transfer Aşaması

Ateş yem bezelyesi çeşidinde sürgün rejenerasyonunun ardından *Bar* ve *CryIAc* genlerinin transfer aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, *in vitro* koşullarda çimlendirilen Ateş yem bezelyesi fidelerinden elde edilen kotiledon ve kök boğum eksplantları, *Agrobacterium tumefaciens* suşları ile 30 dakika inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrası eksplantlar, 3 mg l⁻¹ BAP, 0.2 mg l⁻¹ NAA, 2 mg l⁻¹ PPT ve 500 mg l⁻¹ ampicilin içeren, % 0.8 agarla katılaştırılmış Murashige ve Skoog (MS) rejenerasyon ortamına aktarılmış ve 4 hafta boyunca seçici rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. Dört haftalık inkübasyonun ardından gelişen sürgünler, hormon içermeyen MS ortamına ve 200 mg l⁻¹ ampicilin içeren besi ortamına aktarılmıştır. Yaklaşık dört hafta sonra, gelişen sürgünler yaprak altı meristem dokusu bölgesinden kesilerek, 1 mg l⁻¹ İndol Asetik Asit (IAA), 5 mg l⁻¹ ampicilin, 2.2 g MS içeriği, 15 g süktroz ve % 0.8 agar içeren, pH 5.8 olarak ayarlanmış köklenme ortamına alınmıştır. Bu ortamda sürgünlerde etkili kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Transgenik aday bitki sürgünlerinin kök gelişimi görüntüleri

Tablo 4.5'te farklı *Agrobacterium tumefaciens* suşları ile taşınan *CryIAc* ve *Bar* genlerinin, farklı eksplant tiplerinde (kotiledon boğumu ve kök boğumu) oluşturduğu transformasyon verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Transformasyon başarıları, yeşil fide oluşumu üzerinden değerlendirilmiş ve yeşil fide oranları % 0.42 ile % 17.50 arasında değişmiştir.

CryIAc geninin aktarımında, kök boğumu eksplantlarından elde edilen yeşil fide oranı % 8.00-17.50 arasında gerçekleşirken, kotiledon boğumu eksplantlarında bu oran % 1.00-2.00 ile sınırlı kalmıştır. *Bar* geninin aktarımında ise kök boğumu eksplantlarında % 2.00-3.13 oranında yeşil fide oluşumu sağlanırken; kotiledon boğumu eksplantlarında bu oran % 0.42-1.09 arasında değişmiştir. Bu bulgular, genetik transformasyon başarısının

Tablo 4. 5. Farklı *Agrobacterium* suşlarının, farklı eksplantlarının genetik transformasyon verimliliğinin karşılaştırılması.

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Vektör	Antibiyotik	Gen	Eksplant	Eksplant sayısı (adet)	MS üzerindeki Fide sayısı (adet)	Fide Oranı (%)
LBA4404	pTF101.1	Ampisilin	<i>CryIAc</i>	Kotiledon boğum	4000-5000	50-80	1.00-2.00
		Ampisilin	<i>CryIAc</i>	Kök boğum	2000-2500	200-350	8.00-17.50
LBA4404	PGGBar	Ampisilin	<i>Bar</i>	Kotiledon boğum	3200-4800	20-35	0.42 - 1.09
		Ampisilin	<i>Bar</i>	Kök boğum	1600-2000	40-50	2.00 – 3.13

hem kullanılan gene hem de eksplant tipine bağılı olarak değıştığını göstermektedir. Genel olarak, kök boğumu eksplantlarıher iki gen için de daha yüksek transformasyon verimliliğı göstermiştir. Ayrıca, *CryIAc* geninin aktarımı, *Bar* genine kıyasla daha yüksek başarı oranlarıyla sonuçlanmıştır.

4.2.3. Transgenik Aday Bitkilerin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Doğrulanması

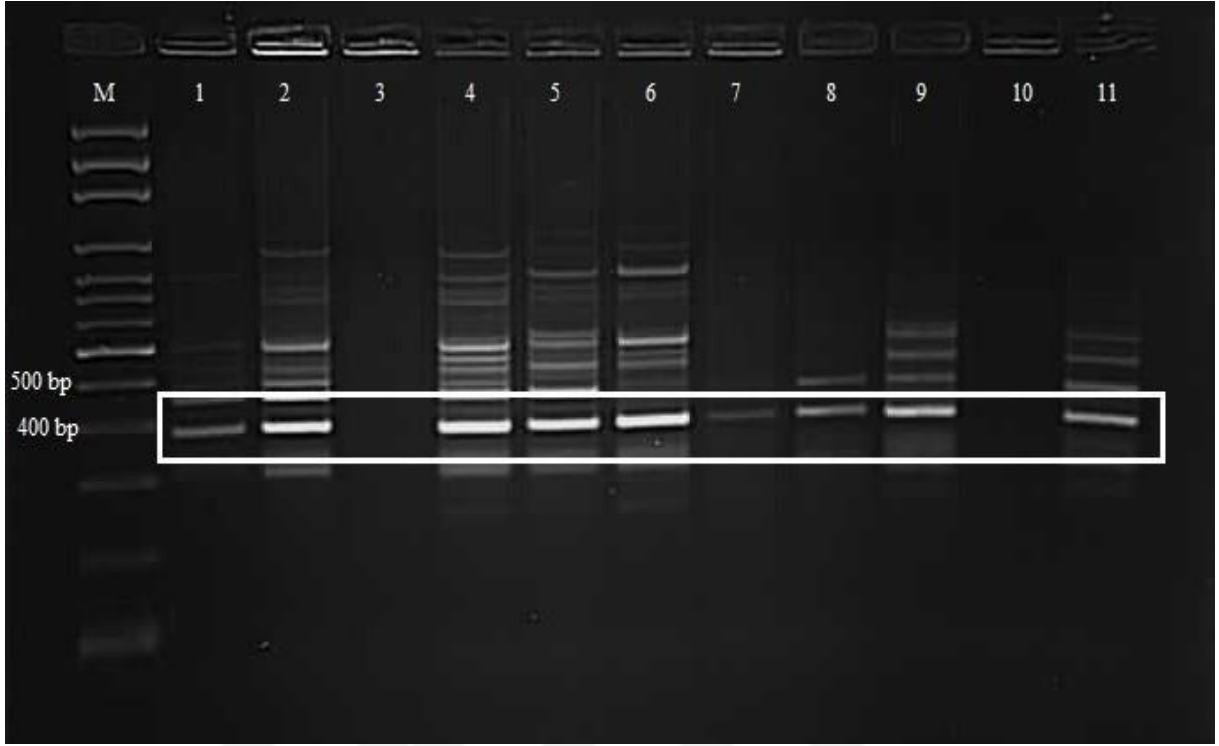
Gen aktarım çalışmalarıyla birçok transgenik adayı yem bezelyesi bitkisi elde edilmiştir. Elde edilen bu transgenik adayı bitkilerin transgenik olup olmadıkları PCR analizleriyle teyit edilmiştir. Transgenik adayı bitkilerin teyit edilmesinde *Bar* ve *CryIAc* genleri ile dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır (Tablo 3.4.). PCR analizi için DNA izolasyon kiti ve PCR kiti ile doğrudan bitkilere ait yaprak örnekleri kullanılarak yapılmıştır.

Transformasyon uygulaması sonrasında elde edilen yeşil fidelerden seçilen örnekler üzerinde, *CryIAc* ve *Bar* genlerinin varlığını doğrulamak amacıyla PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. *CryIAc* genine yönelik yapılan PCR analizinde, Şekil 4.6-4.9'da görüldüğü üzere, test edilen 44 bitki örneğinden 33'ünde hedef gene ait 412 bp uzunluğunda spesifik amplifikasyon bantları tespit edilmiştir. Bu bantlar, beklenen 400-500 bp aralığında yer almakta olup *CryIAc* geninin bitki genomuna başarılı şekilde entegre edildiğini göstermektedir.

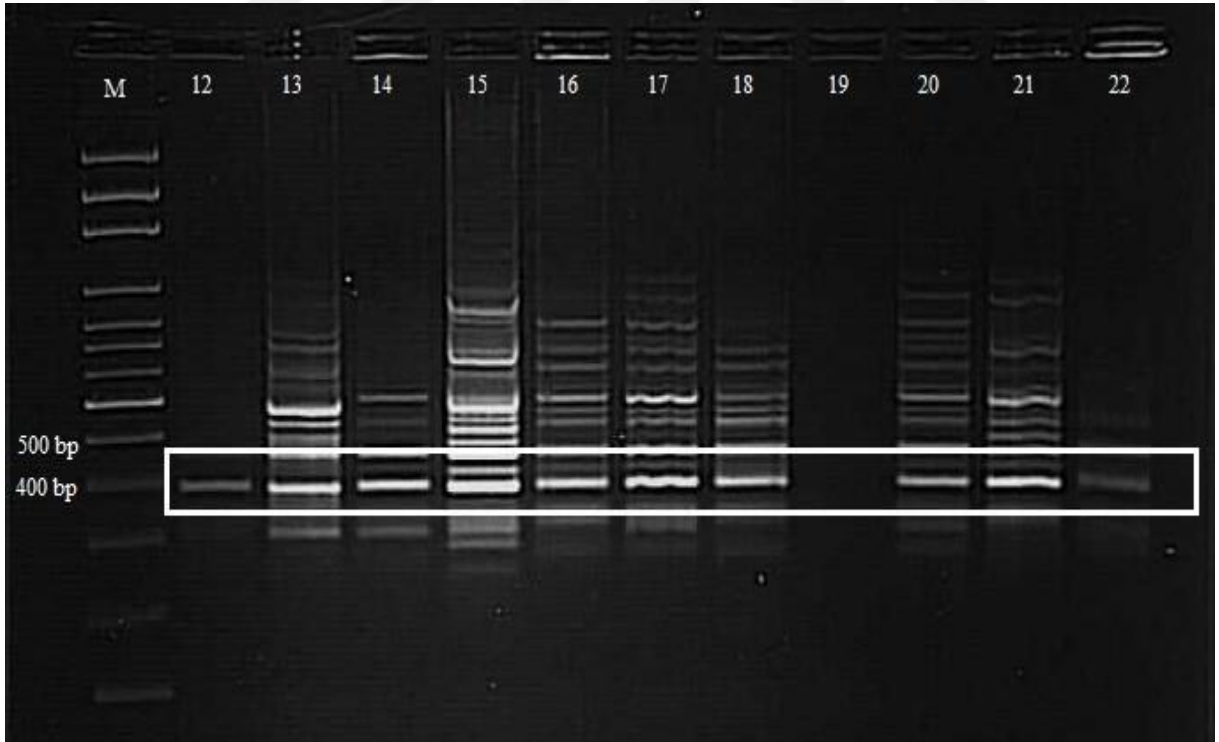
Bar genine yönelik PCR analizinde ise, Şekil 4.10-4.12'de sunulduğu üzere, analiz edilen 33 örnekten 15'inde yaklaşık 310 bp uzunluğunda ve beklenen 300-400 bp aralığında spesifik bant oluşumu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, transformasyon işleminin *Bar* geni açısından daha sınırlı başarı sağladığını göstermektedir.

Her iki analizde de pozitif kontrollerde hedef bantlar başarılı şekilde elde edilmiş, negatif kontrollerde ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Bu durum, PCR koşullarının güvenilirliğini ve elde edilen amplifikasyon ürünlerinin spesifikliğini teyit etmektedir.

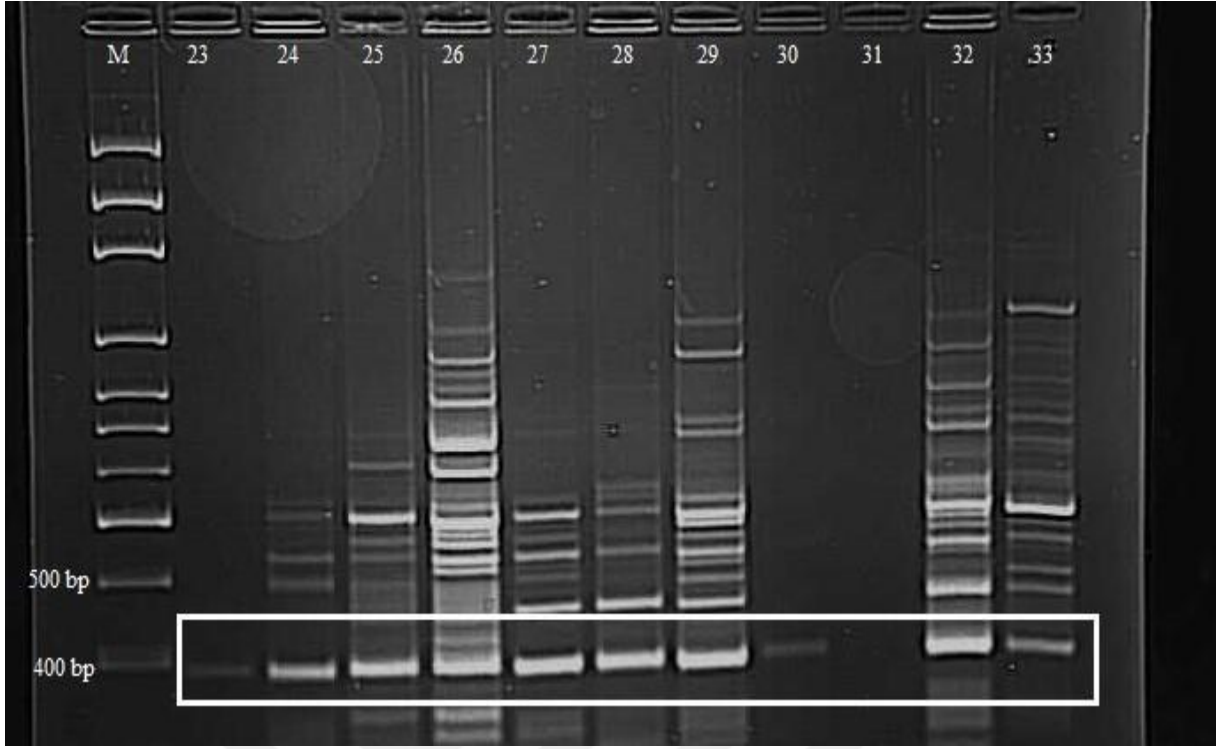
Elde edilen veriler, transformasyon sonrası elde edilen bitkilerin önemli bir kısmının transgenik nitelik taşıdığını ve genetik doğrulamanın PCR ile başarıyla gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır.



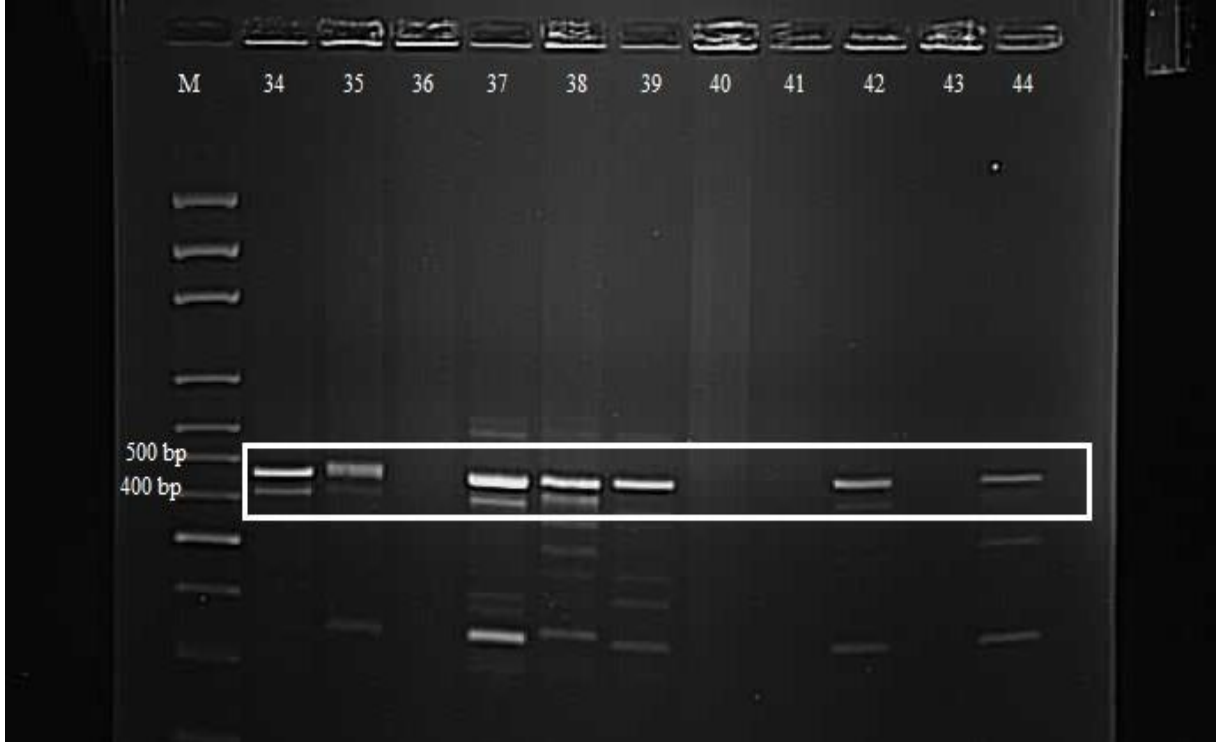
Şekil 4. 6. Transgenik aday yem bezelyesinin, *CryIAc* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü



Şekil 4. 7. Transgenik aday yem bezelyesinin, *CryIAc* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü



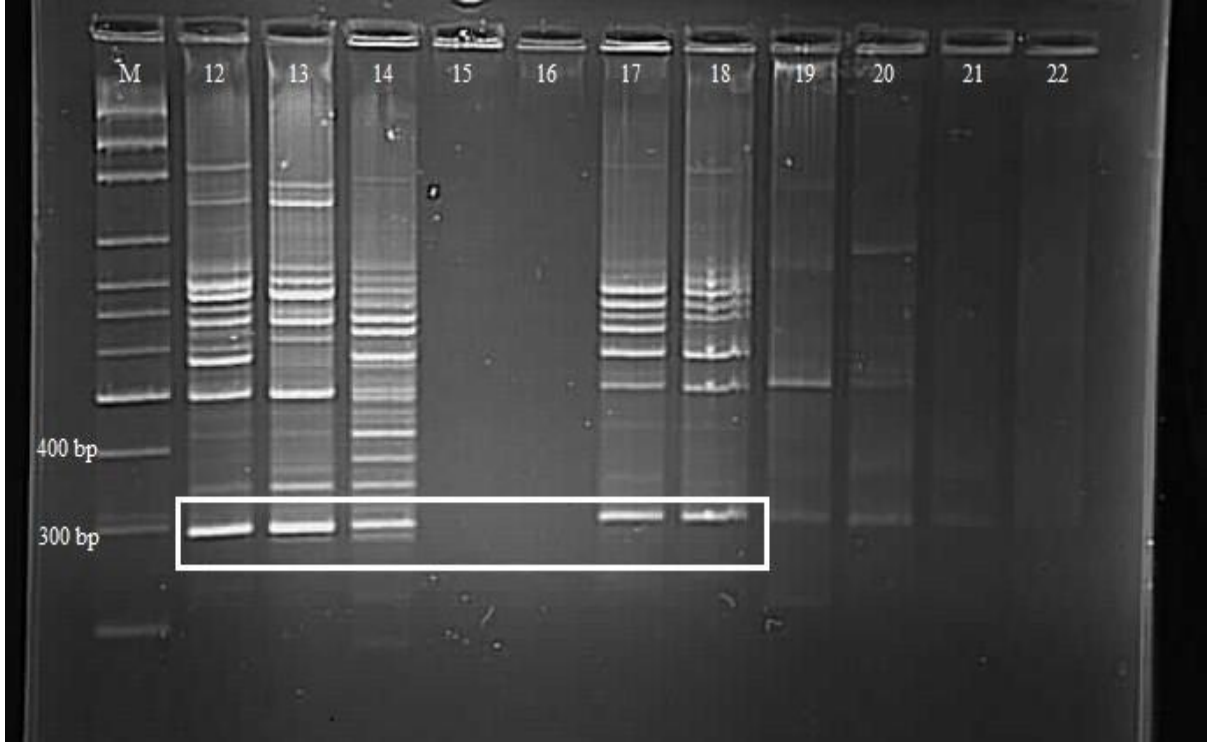
Şekil 4. 8. Transgenik aday yem bezelyesinin, *CryIAC* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü



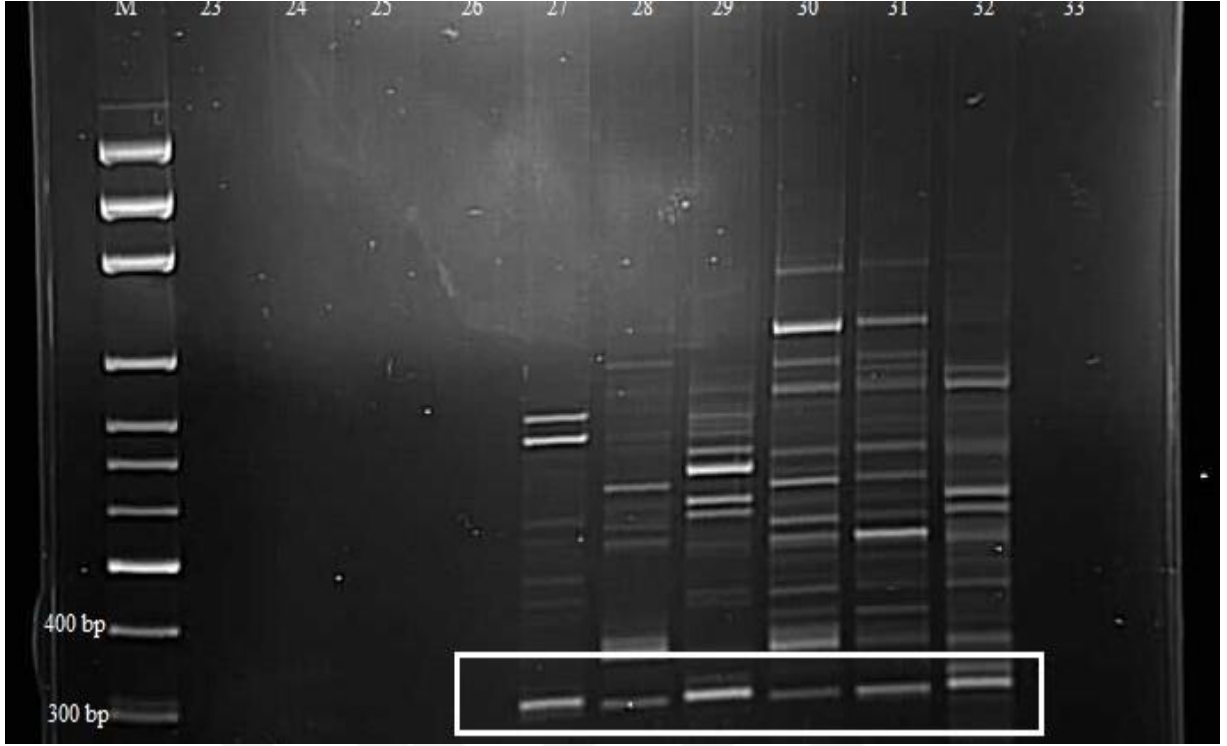
Şekil 4. 9. Transgenik aday yem bezelyesinin, *CryIAC* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 412 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü



Şekil 4. 10. Transgenik aday yem bezelyesinin, *Bar* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 310 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü



Şekil 4. 11. Transgenik aday yem bezelyesinin, *Bar* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 310 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü



Şekil 4. 12. Transgenik aday yem bezelyesinin, *Bar* genine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen 310 bp uzunluğundaki bantlarının görüntüsü

5. TARTIŞMA

Yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.) in vitro çalışmalarında uygulanan sterilizasyon protokolü, başarı oranı ve tohum canlılığını koruma açısından kritik bir adımdır. Bu çalışmada, % 5 oranında ticari çamaşır suyu çözeltisinin 15 dakika süreyle uygulanması sonucunda yüksek bir sterilizasyon başarısı elde edilmiştir. Literatürde bildirilen daha kısa süreli ve düşük konsantrasyonlu uygulamalarla karşılaştırıldığında, bu protokol daha uzun bir temas süresi içermekle birlikte, etkili bir sterilizasyon sağlamıştır. Örneğin, Kiani vd. (2017) % 2.5 sodyum hipokloriti 3 dakika süreyle önermekte, Younesikelahi vd. (2016) % 4'lük çözeltinin 5 dakikalık uygulamasının yeterli olduğunu belirtmektedir. Benzer şekilde, Ramandi vd. (2019) % 3'lük sodyum hipokloritin 5 dakikalık uygulamasını optimum olarak raporlamıştır. Bu çalışmada kullanılan 15 dakikalık süre, söz konusu uygulamalardan daha uzun olmakla birlikte, tohum yüzeyindeki mikroorganizmaların etkin biçimde elimine edilmesini sağlamış ve kontaminasyon riskini minimuma indirmiştir.

Ayrıca, elde edilen çimlenme ve fide gelişim verileri de bu protokolün tohum canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını desteklemektedir. "Ateş" yem bezelyesi çeşidine ait tohumlarda % 100 çimlenme hızı ve çimlenme gücü kaydedilmiştir. Bu yüksek performansa ek olarak, fide uzunluğu 5.233 cm, kök uzunluğu ise 5.833 cm olarak ölçülmüş; fide yaş ve kuru ağırlıkları sırasıyla 0.08667 g ve 0.01000 g bulunmuştur. Bu bulgular, sterilizasyon uygulamasının yalnızca kontaminasyonu önlemede değil, aynı zamanda fide gelişimini desteklemede de başarılı olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, kullanılan protokol hem yüksek sterilizasyon etkinliği hem de sağlıklı fide gelişimi açısından *in vitro* kültür ve genetik transformasyon çalışmaları için uygun ve güvenilir bir başlangıç noktası sunmaktadır.

Tohum kalitesi, bitki biyoteknolojisi uygulamalarında genetik transformasyonun başarısını etkileyen kritik bir faktördür. Özellikle *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan transformasyon çalışmalarında, güçlü fizyolojik yapıya sahip tohumların kullanılması; enfeksiyon sonrası bitkisel dokuların stresle başa çıkma yeteneğini artırmakta ve rejenerasyon sürecinin başarısını olumlu yönde etkilemektedir. Nitekim literatürde, düşük kaliteli tohumlardan elde edilen eksplantların transformasyon sonrası nekroz, büyüme durması ve düşük rejenerasyon oranı gibi sorunlara daha yatkın olduğu bildirilmektedir (Sandhya vd., 2022).

Tohum çimlenmesi ve fide gelişiminde Ateş çeşidi yem bezelyesinden elde edilen olumlu sonuçlar, yalnızca tarımsal performans açısından değil, aynı zamanda *in vitro* doku kültürü ve genetik transformasyon uygulamaları için de önemli avantajlar sunmuştur. Genetik

transformasyon sürecinde başarı, büyük ölçüde kullanılan eksplantın fizyolojik durumu ve rejenerasyon kapasitesine bağlıdır. Bu doğrultuda, Ateş çeşidinden elde edilen fidelerin kotiledon boğumu ve kök boğumu gibi meristematik bölgeleri eksplant olarak değerlendirilmiş ve bu dokuların doğrudan rejenerasyon yetenekleri farklı BAP + NAA kombinasyonları altında incelenmiştir.

Çalışmada, her iki eksplant tipi de çeşitli hormon kombinasyonları altında rejenerasyon göstermiş, ancak 3.00 mg l⁻¹ BAP + 0.20 mg l⁻¹ NAA içeren ortamda % 100 başarı oranı ve yüksek sürgün verimi elde edilmiştir. Özellikle kök boğumu eksplantları, bu kombinasyonda eksplant başına ortalama 5.5 sürgün ve 3.26 mm sürgün uzunluğu ile en yüksek performansı sergilemiştir. Bu sonuçlar, literatürde bildirilen bulgularla büyük ölçüde tutarlıdır. Örneğin, Das vd. (2014) bezelye bitkisinde 2.0 mg l⁻¹ BAP + 0.4 mg l⁻¹ NAA ile kotiledon boğumundan % 85 rejenerasyon oranı bildirmiştir. Bu çalışmadaki % 100 rejenerasyon başarısı, hem kullanılan eksplant tipinin uygunluğu hem de daha yüksek BAP konsantrasyonunun etkisini ortaya koymaktadır.

Benzer şekilde, Yıldız ve Ekiz (2014), korunga bitkisi hipokotil eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonunu, Murashige ve Skoog (MS) ortamına 0.5 mg l⁻¹ Benzilaminopurin (BAP) ve 0.2 mg l⁻¹ Naftalen asetik asit (NAA) ekleyerek elde etmişlerdir. Minaei Cheanar vd., (2019) yaptıkları çalışmada; baklagiller familyasından olan *Cicer arietinum* bitkisinden elde edilen kotiledon, hipokotil ve nod eksplantları için 0.5 mg l⁻¹ BAP+0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS ortamının en iyi yanıtı verdiğini belirtmişlerdir. Ancak bu düşük hormon dozlarının, yem bezelyesi gibi daha düşük rejenerasyon kapasitesine sahip türlerde yetersiz kalabileceği düşünülmektedir. Çalışmada, 1.00 mg l⁻¹ ve 2.00 mg l⁻¹ BAP içeren ortamlarda da rejenerasyon gerçekleşmiş olmakla birlikte, sürgün sayısı ve uzunluğu bakımından 3.00 mg l⁻¹ BAP seviyesine kıyasla daha düşük değerler kaydedilmiştir. 6.00 mg l⁻¹ BAP gibi yüksek konsantrasyonlarda ise hormonal dengenin bozulduğu ve sürgün başına düşen sayı ve uzunlukta düşüş yaşandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, aşırı sitokin uygulamasının fizyolojik strese neden olabileceği ve sürgün oluşumunu baskılayabileceği ihtimali ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan 3.00 mg l⁻¹ BAP + 0.20 mg l⁻¹ NAA hormon kombinasyonu, yem bezelyesi için hem kök boğumu hem de kotiledon boğumu eksplantlarında doğrudan rejenerasyonu maksimize eden optimal koşul olarak belirlenmiştir. Kök boğumu eksplantlarının daha yüksek sürgün sayısı ve uzunluğu göstermesi, bu dokunun genetik transformasyon ve mikroçoğaltım çalışmaları için daha uygun bir başlangıç materyali

olduğunu ortaya koymaktadır. Bu veriler, yem bezelyesinde etkili bir rejenerasyon protokolü oluşturulması açısından önemli katkılar sunmakta ve türün genetik iyileştirme çalışmalarında kullanılabilecek potansiyelini ortaya koymaktadır.

Başarılı sürgün rejenerasyonunun ardından köklenme aşamasında, 1.00 mg l⁻¹ İndol asetik asit (IAA) içeren ortam kullanılarak kök oluşumunun başarıyla gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Bu bulgu, IAA'nın yem bezelyesi gibi baklagil türlerinde adventif kök oluşumunu destekleyici etkisini ortaya koymaktadır. Literatürde, düşük konsantrasyonlardaki IAA uygulamalarının kök gelişimini teşvik ettiği, ancak yüksek düzeylerde inhibe edici etkiler gösterebildiği belirtilmektedir (Barpete vd., 2014; Bai vd., 2020). Ayrıca, Sağlam Yılmaz vd., (2022) tarafından yapılan *Agrobacterium* aracılı fasulye transformasyon çalışmalarında, uygun bitki büyüme düzenleyicilerinin transformasyon sonrası rejenerasyonda kritik rol oynadığı vurgulanmıştır. Bu bağlamda, *in vitro* kallus kültürü ve genetik mühendislik alanındaki diğer çalışmaları da bitkisel rejenerasyon süreçlerinin optimizasyonu için önemli bir referanslar oluşturabilmektedir (Sağlam Yılmaz vd., 2020; Sağlam Yılmaz, 2023).

Bu sonuçlar, çalışmada geliştirilen rejenerasyon protokolünün yalnızca sürgün oluşumuyla sınırlı kalmadığını, aynı zamanda tam bitki rejenerasyonu için gerekli olan kök oluşumunu da etkin şekilde sağladığını göstermektedir. Böylece, yem bezelyesinde genetik transformasyon veya klonal çoğaltım gibi ileri biyoteknolojik uygulamalara uygun, tam kapsamlı bir *in vitro* sistem geliştirilmiş olmaktadır.

Sterilizasyon, çimlenme ve rejenerasyon gibi ön hazırlık aşamaları, bitki biyoteknolojisi uygulamalarında genetik transformasyon süreçlerinin başarısı açısından kritik rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Ateş çeşidi yem bezelyesi tohumlarına uygulanan optimize sterilizasyon protokolü sayesinde, kontaminasyondan arındırılmış ve canlı fideler elde edilmiştir. Takip eden aşamalarda, yüksek canlı kalma oranına ve güçlü morfolojik gelişime sahip bu fidelerden alınan eksplantlar ile doku kültürü ve transformasyon uygulamaları yürütülmüştür. Ateş çeşidi yem bezelyesinin gösterdiği yüksek çimlenme oranı, sağlıklı fide gelişimi ve güçlü rejenerasyon kapasitesi, bu hattın genetik mühendisliği çalışmaları için uygun ve güvenilir bir biyolojik materyal olduğunu ortaya koymuştur.

Elde edilen güçlü sürgün yapısı ve etkili rejenerasyon sonucu, *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla yapılan gen aktarımı çalışmalarında enfeksiyona maruz kalan dokuların hem genetik modifikasyona uygunluk hem de doku kültürü streslerine dayanıklılık açısından yüksek başarı göstermesi açısından büyük önem taşımaktadır. Buna göre,

Çalışmanın sonraki aşamasında böcek ve herbisit direnci kazandırmak amacıyla seçilen *CryI*Ac ve *Bar* genlerinin yem bezelyesi genetik materyaline aktarımı gerçekleştirilmiş ve aktarım sonrası seleksiyon süreci başlatılmıştır. Seleksiyon ortamında kullanılacak fosfinotrisin miktarının belirlenmesi kritik bir aşama olup, uygun konsantrasyon tespit edildikten sonra bu doz seleksiyon ortamına eklenmiştir. Böylece yalnızca başarılı şekilde transforme olmuş bitkilerin gelişimi sağlanarak, istenilen transgenik hatların seçimi mümkün kılınmıştır. Tablo 4.3'te sunulan varyans analizine göre, yem bezelyesinde uygulanan farklı fosfinotrisin (PPT) dozlarının çimlenme oranı, kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, kök yaş ağırlığı ve sürgün yaş ağırlığı gibi büyüme parametreleri üzerinde istatistiki olarak ($P < 0.01$) nemli etkileri olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, PPT dozlarının bitki gelişimi üzerinde belirgin ve doz bağımlı bir inhibisyon oluşturduğunu desteklemektedir.

Duncan oklu karşılaştırma testi sonuçları (Tablo 4.4), 1.00 mg l⁻¹ PPT dozunun çimlenme oranı (% 100), kök uzunluğu (6.80 mm), sürgün uzunluğu (5.65 mm), kök yaş ağırlığı (0.0673 g) ve sürgün yaş ağırlığı (0.1063 g) gibi parametrelerde üstün performans sağladığını ortaya koymuştur. Fosfinotrisin dozunun artmasıyla birlikte, tüm bu parametrelerde anlamlı düşüşler gözlenmiş; özellikle 4.00 mg l⁻¹ dozunda çimlenme oranı %47.50'ye gerilemiş, kök ve sürgün uzunlukları ile yaş ağırlıkları ciddi lde azalmıştır. Bu durum, yüksek PPT dozlarının bitki gelişimini inhibe ettiğini açıkça göstermektedir.

Sonuç olarak, 2.00 mg l⁻¹ PPT dozu, hem seleksiyon ortamında yeterli toksik etkiyi sağlayarak başarılı transformantların ayıklanmasına olanak tanımakta, hem de bitkisel büyüme parametrelerinin aşır olumsuz etkilenmesini önleyerek optimal bir denge sunmaktadır. Bu nedenle, genetik transformasyon çalışmaları için 2.00 mg l⁻¹ fosfinotrisin dozunun ideal seleksiyon konsantrasyonu olarak kullanılması önerilmektedir.

Bu sonuçlar, yem bezelyesinde gen transferi uygulamalarında kullanılabilecek kritik PPT konsantrasyonunun 2.00 mg l⁻¹ olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, Prihatra vd. (2019) tarafından domates eksplantlarının PPT ortamında büyümesinin engellendiği ve Naing (2014) tarafından krizantem bitki eksplantlarının 0.30 mg l⁻¹ PPT konsantrasyonunda sürgün rejenerasyonunun önemli lde baskılandığı bulgularıyla uyumludur. Ayrıca, yüksek PPT dozlarının bitki gelişimini olumsuz etkileyebileceği literatürde sıkça belirtilmekte olup (Barpete vd., 2014), çalışmada da optimum dozun üzerinde uygulanan PPT'nin yem bezelyesinde kök ve sürgün gelişimini baskıladığı gözlenmiştir. Bu nedenle, PPT dozunun hassas bir şekilde ayarlanması, seleksiyon sürecinin etkinliği ve transgenik aday bitkilerin sağlıklı gelişimi açısından kritik öneme sahiptir.

Fosfinotrisin dozunun belirlenmesinin ardından, genetik transformasyon verimliliğini etkileyen diğer kritik faktörler olan *Agrobacterium tumefaciens* suşları, yem bezelyesi genotipleri ve kullanılan eksplant tiplerinin etkileri incelenmiştir. Şöyle ki transformasyon başarısı, sadece seleksiyon basamağındaki optimizasyonla sınırlı olmayıp, aynı zamanda *Agrobacterium* suşlarının enfeksiyon yeteneği, bitki genotipinin duyarlılığı ve eksplant kaynağının rejenerasyon potansiyeline bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir (Sağlam Yılmaz vd., 2020). Bu nedenle, farklı *Agrobacterium* suşlarının yem bezelyesi çeşitlerinde transformasyon verimliliği üzerine etkileri detaylı olarak araştırılmıştır.

Yem bezelyesinde genetik transformasyon verimliliği, *Agrobacterium tumefaciens* suşu, kullanılan vektör, bitki genotipi ve eksplant tipine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan LBA4404 suşu ile taşınan iki farklı plazmit, pTF101.1 (*CryI*Ac taşıyan) ve LBA-PGG-Bar (*Bar* selektör geni taşıyan), transformasyon etkinliğinde farklı sonuçlar vermiştir.

pTF101.1 plazmidi kullanılarak yapılan transformasyon çalışmalarında, Ateş çeşidi yem bezelyesi kök boğumu eksplantlarında % 7.5–15.63 arasında yeşil fide elde edilmiştir. Buna karşılık, aynı genotipin kotiledon boğumu eksplantlarında transformasyon verimi daha düşük olup % 0.62–1.25 aralığında sınırlı kalmıştır. LBA-PGG-Bar plazmidi ile yapılan transformasyonlarda ise Ateş çeşidi yem bezelyesi kök boğumu eksplantlarında % 2.0–3.13, kotiledon boğumu eksplantlarında ise % 0.42–1.09 oranlarında düşük verimlilik gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, pTF101.1 plazmidinin Ateş çeşidi yem bezelyesinde daha yüksek transformasyon verimi sunduğunu göstermektedir.

Literatürde de *Agrobacterium* suşları ve vektör çeşitleri arasındaki transformasyon verimliliği farklılıkları sıkça rapor edilmiştir. Örneğin, bir çalışmada, beş farklı *Agrobacterium* suşu kullanılarak yapılan transformasyon deneylerinde, LBA4404 suşu %20'lik bir transformasyon verimliliği ile en yüksek başarıyı göstermiştir. Bunu sırasıyla EHA105 (% 17), GV2260 (% 15), C58C1 (% 12) ve AGL1 (% 10) suşları takip etmiştir (Bakhsh vd., 2014). Benzer şekilde, baklagillerde yapılan araştırmalar da suş ve vektör seçiminin transformasyon verimliliği üzerinde önemli etkiler yarattığını göstermektedir. Örneğin, bir çalışmada, altı farklı nohut (*Cicer arietinum*) çeşidi kullanılarak yapılan transformasyon deneylerinde, JAKI9218 çeşidi % 8.6'lık bir transformasyon verimliliği ile en yüksek başarıyı göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan *Agrobacterium* suşu ve vektör kombinasyonları, transformasyon verimliliğini etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Sadhu vd., 2022). Bu bulgular, *Agrobacterium* suşu ve vektör çeşitlerinin

seçiminin, bitki türüne ve genotipe bağlı olarak transformasyon verimliliğini etkileyebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, yem bezelyesi gibi bitkilerde genetik transformasyon çalışmaları yaparken, uygun *Agrobacterium* suşu ve vektör kombinasyonlarının seçimi kritik öneme sahiptir.

Eksplant tipi de transformasyon sonuçlarını önemli ölçüde etkilemiştir. Kök boğum eksplantları, kotiledon boğumlara kıyasla çok daha yüksek oranlarda yeşil fide üretmiş, bu da kök boğum dokularının gen aktarımı ve rejenerasyon kapasitesi açısından daha uygun olduğunu ortaya koymuştur. Das vd., (2014), baklagillerde kotiledon boğum eksplantlarının transformasyon ve rejenerasyon performansında üstünlük sağladığını bildirmiştir.

Son olarak, çalışmada *CryIAc* geninin aktarımı, *Bar* genine kıyasla daha yüksek başarı oranlarıyla gerçekleştirilmiş olup, kullanılan vektör ve gen yapısının da transformasyon verimliliğinde etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu kapsamda, transformasyon protokollerinin gen, vektör, *Agrobacterium* suşu ve genotip gibi parametreler optimize edilerek geliştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Anayol vd., 2016).

Çalışmamızın sonucuna göre, yem bezelyesinde genetik transformasyonun etkinliği için LBA4404 suşu, Ateş genotipi ve kök boğumu eksplantlarının kullanılabileceği düşünülmektedir.

Genetik transformasyon sürecinin başarısı, yalnızca seleksiyon ortamında gelişim gösteren fidelerin elde edilmesi değil, selektif ajanlara direnç gösteren bitkilerin gerçekten transgenik olup olmadığının belirlenmesi yani moleküler düzeyde doğrulama yöntemleriyle mümkündür. Buna göre, çalışmada seleksiyon ortamında başarılı gelişim gösteren yem bezelyesi fidelerinin transgenik yapılar taşıyıp taşımadığı, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle analiz edilmiştir. PCR tekniği, hedef gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak ilgili gen sekanslarının genomik DNA'da varlığının ortaya konmasına olanak sağlamaktadır. Böylece, sadece fenotipik değil, genetik düzeyde de transformasyonun başarıya ulaşmış olup olmadığı doğrulanabilmektedir. Bu aşama, transgenik adayların tanımlanması, hatalı pozitiflerin elenmesi ve gerçek transgenik aday bitkilerin tespiti açısından kritik bir rol oynamaktadır.

Gerçekleştirilen transformasyon çalışmalarında, *CryIAc* ve *Bar* genlerinin yem bezelyesi genetik materyaline başarıyla aktarılıp aktarılmadığını belirlemek amacıyla moleküler düzeyde doğrulama yapılmıştır. Bu doğrultuda, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle gerçekleştirilen analizlerde, *CryIAc* genine özgü primerlerle yapılan

amplifikasyonlar sonucunda 412 baz çifti (bp) uzunluğunda spesifik bantlar elde edilmiştir. Şekil 4.6–4.9’da bu bantlara ait elektroforez görüntüleri sunulmakta olup, analiz edilen 44 bitki örneğinden 33’ünde *CryIAc* genine ait pozitif bant tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu durum, yaklaşık % 22.5 oranında başarılı gen aktarımı yapıldığını göstermektedir.

Benzer şekilde, *Bar* genine yönelik yapılan PCR analizlerinde, 310 bp uzunluğunda bantlar hedeflenmiş ve Şekil 4.10–4.12’de bu bantların elektroforez çıktıları gösterilmiştir. Analize dahil edilen 33 transgenik adayın 15’inde *Bar* genine özgü pozitif bantlar belirlenmiştir. Özellikle *CryIAc* genine ait spesifik bantların daha yüksek oranda ve net bir şekilde gözlemlenmesi, bu genin transformasyon sistemine daha iyi entegre olduğunu ve ekspresyonunun daha stabil gerçekleştiğini düşündürmektedir. Buna karşın, *Bar* geninin genoma entegrasyonunda ya da ekspresyonunda çeşitli biyolojik veya teknik sınırlılıklar bulunduğu anlaşılmaktadır. Nitekim literatürde de belirtildiği gibi, transformasyon etkinliği; kullanılan bitki türüne, genotipine ve vektör yapısına bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Aynı tür içerisindeki farklı çeşitlerin (genotiplerin) genetik yapılarında bulunan doğal farklılıklar, gen aktarımı sürecine verilen yanıtları doğrudan etkileyebilmektedir. Bu durum, “genotip-spesifik varyasyon” olarak adlandırılmakta olup, bazı genotiplerin *Agrobacterium* aracılı gen aktarımına daha duyarlı veya daha dirençli olmasına neden olabilmektedir. Dolayısıyla, transformasyon protokollerinin her genotip için özel olarak optimize edilmesi, başarı oranını artırmak açısından büyük önem taşımaktadır (Negawo vd., 2013; Anayol, 2014).

Elde edilen sonuçlara göre, genetik transformasyon sürecinin yalnızca teknik bir işlem olmanın ötesinde; genetik yapı, vektör tasarımı, eksplant türü ve seleksiyon koşullarıyla bütünleşik olarak optimize edilmesi gereken karmaşık bir biyoteknolojik süreç olduğu bir kez daha ortaya konmuştur. Ayrıca, transgenik aday bitkilerde gen entegrasyonunun varlığını tespit etmek için PCR analizlerinin yanında, ilerleyen çalışmalar için gen ekspresyonunu doğrulayan RT-PCR ve protein düzeyinde Western blot gibi tamamlayıcı analizlerin yapılması önem arz etmektedir.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, yem bezelyesinde genetik transformasyonun başarıya ulaşabilmesi için hem biyoteknolojik yöntemlerin hem de çevresel ve tarımsal uygulamaların birlikte ele alınması gerektiği ortaya konmuştur. Pozitif sonuçlar dikkate alınarak başarılı protokollerin yaygınlaştırılması; düşük başarı gösteren uygulamalara yönelik ise daha ileri çalışmaların planlanması önerilmektedir.

Öncelikle, laboratuvar ve sera koşullarında elde edilen başarılı rejenerasyon ve gen aktarımı sonuçlarının tarla ortamına taşınması gerekmektedir. Kontrollü koşullarda elde edilen veriler, gerçek çevre koşullarında karşılaşılabilecek biyotik ve abiyotik stres faktörlerini temsil etmekte yetersiz kalabilir. Bu nedenle, genetik olarak değiştirilmiş (GD) yem bezelyesi bitkilerinin tarla ortamındaki performanslarının değerlendirilmesi, biyogüvenlik açısından çevresel etkilerinin izlenmesi ve ürün verimliliğinin uzun vadeli olarak analiz edilmesi büyük önem taşımaktadır. Tarla denemeleri sayesinde, laboratuvar da umut vadeden genetik yapıların pratikteki etkinliği doğrulanabilir ve olası çevresel riskler önceden öngörülebilir.

İkinci olarak, bezelye gibi stratejik öneme sahip tarım ürünlerinde GD teknolojilerinin daha etkin kullanımı için genetik çeşitliliği artırmaya yönelik çalışmalar teşvik edilmelidir. Yem bezelyesinde mevcut genotiplerin sınırlı genetik tabanı, transformasyon verimliliği ve adaptasyon kapasitesini etkileyebilir. Bu bağlamda, yerel ve yabani bezelye varyeteleri de dahil olmak üzere daha geniş bir genetik havuz oluşturulmalı; genetik kaynakların korunması ve iyileştirilmesi için ileri düzey biyoteknolojik araçlardan yararlanılmalıdır. Genetik çeşitliliğin artırılması, sadece verimlilik açısından değil, aynı zamanda kuraklık, tuzluluk, hastalık ve zararlılar gibi stres koşullarına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi bakımından da kritik bir adımdır. Bu entegratif yaklaşım, gelecekteki iklim değişikliği ve tarımsal sürdürülebilirlik hedefleriyle de uyumlu olacaktır.

Son olarak, bu çalışmada kullanılan gen aktarım protokolünün daha da iyileştirilmesi adına eksplant tipi, genotip farklılıkları, vektör yapısı ve seleksiyon koşulları gibi parametrelerin ayrı ayrı optimize edildiği ileri düzey araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle transformasyonun genotip-eksplant bağımlı yapısı, protokollerin çeşitlere özgü olarak uyarlanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle, daha yüksek verim elde edilebilmesi için farklı yem bezelyesi genotiplerinde karşılaştırmalı transformasyon çalışmaları yürütülmeli; başarılı olan protokoller standardize edilerek yaygınlaştırılmalıdır. Ayrıca,

kullanılan genetik yapıların (örneğin *CryIAc*, *Bar* genleri) ekspresyon seviyeleri ve kalıcılıkları da sonraki nesillerde detaylı şekilde izlenmelidir.

Tüm bu öneriler doğrultusunda, yem bezelyesinde genetik transformasyonun sadece teknik başarı değil, aynı zamanda ekolojik sürdürülebilirlik, ekonomik uygulanabilirlik ve gıda güvenliği çerçevesinde çok boyutlu olarak değerlendirilmesi gerektiği açıktır.



KAYNAKÇA

- Açıkğöz, E.** (2001). *Yem Bitkileri (Yenilenmiş 3. Baskı)*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Vakfı Yayınevi.
- Alkuddsi, Y. A., Patil, S. S., Manjula, S. M., Pranesh, K. J., & Patil, B. C.** (2014). Standarizing in planta *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation protocol to develop new events by transforming *G. hirsutum* cotton based on *CryIAc-CryIEc* genes. *American Journal of Life Sciences*, 2(4), 190-199.
- Ambrose, M., Smýkal, P., Singh, N., Shehadeh, A., Marcos, T., Nóbrega, H., & Giovannini, P.** (2023). *Global strategy for the conservation and use of Pea (Pisum sativum L.) genetic resources*. Bonn, Germany: Global Crop Diversity Trust.
- Anand, A., Subramanian, M., & Kar, D.** (2023). Breeding techniques to dispense higher genetic gains. *Frontiers in Plant Science*, 13(1076094), 1-6.
- Anayol, E.** (2014). *Farklı pamuk çeşitlerinde in vitro sürgün rejenerasyonu ve Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla gen aktarımı (Doktora Tezi)*. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Anayol, E., Bakhsh, A., Karakoç, Ö. C., Onarıcı, S., Kom, D., Aasim, M., . . . Özcan, S.** (2016). Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton. *Plant Biotechnology Reports*, 10, 83–94.
- Bai, T., Dong, Z., Zheng, X., Song, S., Jiao, J., Wang, W., & Song, C.** (2020). Auxin and its interaction with ethylene control adventitious root formation and development in apple. *Frontiers in Plant Science*, 11 (574881), 1-14.
- Bakhsh, A., Khabbazi, S. D., Baloch, F. S., Demirel, U., Çalışkan, M. E., Hatipoğlu, R., . . . Özkan, H.** (2015). Insect-resistant transgenic crops: retrospect and challenges. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39, 531-548.
- Barpete, S., Khawar, K. M., & Özcan, S.** (2014). Differential competence for *in vitro* adventitious rooting of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1-13.
- Begna, T., & Okonkwo, J. C.** (2020). Role of recombinant DNA technology in agriculture. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 9(5), 254-259.

Bose, R., & Bose, K. (2022). A brief introduction to recombinant DNA technology. K. Bose içinde, *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins* (s. 1-12). Singapore: Springer.

Bradshaw, J. E. (2017). Plant breeding: past, present and future. *Euphytica*, 213(60), 1-12.

Cheng, X., Li, H., Tang, Q., Zhang, H., Liu, T., & Wang, Y. (2024). Trends in the global commercialization of genetically modified crops in 2023. *Journal of Integrative Agriculture*, 23(12), 3943–3952.

Christ, B., Hochstrasser, R., Guyer, L., Francisco, R., Aubry, S., Hörtensteiner, S., & Weng, J. K. (2017). Non-specific activities of the major herbicide resistance gene *BAR*. *Nature Plants*, 3, 937–945.

Coyne, C. J., Kumar, S., Wettberg, E. B., Marques, E., Berger, J. D., Redden, R. J., . . . Smýkal, P. (2020). Potential and limits of exploitation of crop wild relatives for pea, lentil, and chick pea improvement . *LegumeScience*, 2(e36), 1-25.

Daneshvar Rouyandezagh, S. (2011). *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla farklı haşhaş (*Papaver somniferum* L.) çeşitlerinde gen aktarımı. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Das, A., Kumar, S., Nandeesha, P., Singh Yadav, I., Saini, J., Chaturvedi, S. K., & Datta, S. (2014). An Efficient In vitro Regeneration System of Fieldpea (*Pisum sativum* L.) Via Shoot Organogenesis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23 (2), 184-189.

Data, O. W. (2024). *Our World Data*. Our world data. [Erişim: 25.06.2025, <https://ourworldindata.org>]

Demirkol, G., Yılmaz, N., & Önal Aşçı, Ö. (2019). Tuz Stresinin Yem Bezelyesi (*Pisum sativum ssp. arvense* L.) Seçilmiş Genotipinde Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi* 22 (3), 354-359.

Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., & Gürbüz, F. (1987). Araştırma ve deneme metotları (İstatistik metotlar II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1021 (s. 381), Ankara.

Ellis, R. H., & Roberts, E. H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45(1), 13-30.

Food and agriculture organization (FAO) (2023). Food and agriculture data. [Erişim: 20.04.2025, <https://www.fao.org/faostat/en/#home>].

- Fuglie, K., Peters, M., & Burkart, S.** (2021). The extent and economic significance of cultivated forage crops in developing countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(712136), 1-8.
- Heuzé, V., Tran, G., & Giger-Reverdin, S.** (2015). *Pea forage*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. [Erişim: 20.03.2025, <http://feedipedia.org/node/7047>]
- Hussain, A., Ding, X., Alariqi, M., Manghwar, H., Hui, F., & Li, Y.,** (2021). Herbicide Resistance: Another Hot Agronomic Trait for Plant Genome Editing. *Plants*, 621, 1-24.
- Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M.** (2017). *Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications*. Washington U.S.A.: The American Society of Plant Biologists.
- Jhansi Rani, S., & Usha, R.** (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6, 879 -883.
- Karayel, R., & Bozoğlu, H.** (2012). Yemlik yetiştiriciliğe uygun yerel bezelye (*Pisum sativum* L.) genotipleri. *Akademik Ziraat Dergisi*, 1(2), 83-90.
- Keskin, B., Temel, S., & Eren, B.** (2021). Bazı Yem bezelyesi (*Pisum sativum ssp. arvense* L.) çeşitlerinin farklı ekim zamanlarındaki tohum verimi ve verim öğelerine olan etkileri . *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24 (6), 1315-1326.
- Kiani, M., Younesikelaki, F. S., Ebrahimzadeh, M. H., Savitikadi, P., Jogam, P., & Sadanandam, A.** (2017). Studies on the effect of various seed surface sterilization and growing media on the *in vitro* germination of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Indian Journal of Science and Technology*, 10(3), 1-6.
- Kumari, T., & Deka, S. C.** (2021). Potential health benefits of garden pea seeds and pods: A review. *Legume Science*.3:e82., 1-13.
- Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., Gai, J., & Li, Y.** (2017). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8 (246), 1-15.
- Li, C., Wang, J., Ling, F., & You, A.** (2023). Application and development of *Bt* insect resistance genes in rice breeding. *Sustainability*, 15(9779), 1-13.
- Li, Y., Tian, Y., Deng, L., Dai, T., Liu, C., & Chen, J.** (2024). High energy media mill modified pea dietary fiber: Physicochemical property and its mechanism in stabilizing pea protein beverage. *Food Hydrocolloids* 147 (109392), 1-11.

- Ludvíková, M., & Griga, M.** (2022). Pea transformation: History, current status and challenges. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 58(3), 127–161.
- Minaei Chenar, H., Kahrizi, D., & Zebarjadia, A.** (2019). Effect of explant type and plant growth regulators upon callus induction and indirect regeneration of chickpea. *Peer Reviewed Journal of Forensic & Genetic Sciences* 4 (1), 261-267.
- Negawo, A. T., Aftabi, M., Jacobsen, H. J., Altosaar, I., & Hassan, F. S.** (2013). Insect resistant transgenic pea expressing *CryIAc* gene product from *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control*, 67, 293–300.
- Ouafi, L., Alane, F., Rahal-Bouziane, H., & Abdelguerfi, A.** (2016). Agro-morphological diversity within field pea (*Pisum sativum* L.) genotypes. *African Journal of Agricultural Research*, 11(40), 4039-4047.
- Özeroğlu, A.** (2021). *Aydın koşullarında farklı ekim ve hasat zamanlarının yem bezelyesi (Pisum sativum subsp. arvense L.)'nin ot verim ve kalitesi üzerine etkileri*. Aydın: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Özkan, U.** (2020). Türkiye yem bitkileri tarımına karşılaştırmalı genel bakış ve değerlendirme. *Türk Ziraat Mühendisliği Araştırmaları Dergisi*, 1(1), 29-43.
- Öztürk, O., Şen, C., & Aydın, B.** (2019). Hayvancılık işletmelerinin yem bitkileri yetiştiriciliği ve mera kullanım alışkanlıklarının karşılaştırmalı analizi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* 28(1), 29–38.
- Purkait, S., & Yousuf, P.** (2024). Recombinant dna technology and its applications. *Futuristic Trends in Biotechnology*, 3(5), 219-236.
- Rahangdale, S., Singh, Y., Katkani, D., & Surjaye, N.** (2020). Gene transfer methods in plants. Y. Sing içinde, *Advances in Biological Sciences and Biotechnology* (s. 19-42). New Delhi: Integrated Publications.
- Ramandi, A., Javan, I. Y., Tazehabadi, F. M., Asl, G. I., Khosravanian, R., & Ebrahimzadeh, M. H.** (2019). Improvement in seed surface sterilization and *in vitro* seed germination of ornamental and medicinal plant-*Catharanthus roseus* (L.). *Chiang Mai Journal of Science* 46(6), 1107-1112.
- Ratnayake, W. S., Hoover, R., & Warkentin, T.** (2002). Pea starch: composition, structure and properties– A review. *Starch/Stärke*, 54 , 217–234.

- Sadhu, S. K., Jogam, P., Gande, K., Banoth, R., Penna, S., & Peddaboina, V.** (2022). Optimization of different factors for an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system using embryo axis explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Plant Biotechnology*, 49, 61-73.
- Sağlam Yılmaz, S., Khawar, K., & Kole, C.** (2020). Tissue culture, genetic engineering, and nanotechnology in bitter melon. *In Bitter Melon Genome*, 83–89.
- Sağlam Yılmaz, S., Bhatti, K. M., & Çiftçi, C. Y.** (2022). Genetic transformation of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) through *Agrobacterium tumefaciens* carrying *Cry1Ab* gene. *Molecular Biology Reports*, 49(7), 7195–7203.
- Sağlam, Y.** (2023). Cemele biberinin (*Capsicum annuum* L.) in vitro klonal çoğaltımı üzerine farklı besin ortamı tipleri ve TDZ'nin etkisi . *Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1 (1), 10-20.
- Sandhu, S., Altpeter, F., & Blount, A. R.** (2007). Apomictic bahiagrass expressing the *Bar* gene is highly resistant to glufosinate under field conditions. *Crop Science*, 47, 1691-1697.
- Sandhya, D., Jogam, P., Kumar Venkatapuram, A., Savitikadi, P., Peddaboina, V., Rao Allini, V., & Abbagani, S.** (2022). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29 (103292),, 1-13.
- Sangjan, W., McGee, R. J., & Sankaran, S.** (2023). Evaluation of forage quality in a pea breeding program using a hyperspectral sensing system. *Computers and Electronics in Agriculture*, 212(108052), 1-17.
- Sayar, M. S.** (2021). Cultivation of Forage Pea and Important Agricultural Traits of GAP Pembesi Forage Pea Cultivar. *Dicle University Journal of the Institute of Natural and Applied Science*, 10 (1), 85-94.
- Sharma, M. K., & Sharma, H. K.** (2022). Review on nutritive value of fodder crops and their benefits in cattle and sheep. *Journal Of Pharmacy And Biological Sciences* 17(6), 45-47.
- Shi, M., Gao, Q., & Liu, Y.** (2018). Changes in the structure and digestibility of wrinkled pea starch with malic acid treatment. *Polymers*, 10 (1359), 1-12.
- Smýkal, P., Trněný, O., Brus, J., Hanaček, P., Rathore, A., Roma, R. D., . . . Toker, C.** (2018). Genetic structure of wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) populations in the

northern part of the Fertile Crescent reflects moderate cross-pollination and strong effect of geographic but not environmental distance. *PLoS ONE*, 13(3), 1-22.

Soral-Smietana, M., Wronkowska, M., & Lewandowicz, G. (2003). Pea starch as the basic material for physical modification by iterated syneresis. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12(53), 74–78.

The Observatory of Economic Complexity (OEC) (2023). Data availability. [Erişim: 01.07.2025, <https://oec.world/en/data-availability>].

Tiryaki, İ. (2018). Bazı tarla bitkilerinin tuz stresine gösterdikleri adaptasyon mekanizmaları . *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(5), 800-808.

Verma, R., Kumari, P., Megha, S., & Rani, L. (2022). Application of recombinant DNA technology in agriculture: A review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 9(3), 138-146.

Wang, G., Dong, Y., Liu, X., Yao, G., Yu, X., & Yang, M. (2018). The current status and development of insect-resistant genetically engineered poplar in China. *Frontiers in Plant Science*, 9 (1408), 1-15.

Wu, D. T., Li, W. X., Wan, J. J., Hu, Y. C., Gan, R. Y., & Zou, L. (2023). A Comprehensive Review of Pea (*Pisum sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications. *Foods*, 12 (2527), 1-40.

Yan, Y., Zhu, X., Yu, Y., Li, C., Zhang, Z., & Wang, F. (2022). Nanotechnology strategies for plant genetic engineering. *Advanced Materials* , 34(2106945), 1-26.

Yildiz, M., & Ekiz, H. (2014). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and regeneration capacity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hypocotyl explants. *Canadian Journal of Plant Science*, 94, 1161-1164.

Younesikelaki, S. F., Ebrahimzadeh, M. H., Desfardi, M. K., Banala, M., Marka, R., & Nanna, R. S. (2016). Optimization of seed surface sterilization method and *in vitro* seed germination in *Althaea oicinalis* (L.) - An important medicinal herb. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(28), 1-6.

Zhang, T., Nickerson, R., Zhang, W., Peng, X., Shang, Y., Zhou, Y., . . . Cheng, Z. (2024). The impacts of animal agriculture on one health—Bacterial zoonosis, antimicrobial resistance, and beyond. *One Health*, 18(100748), 1-17.

