

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



***VACCARIA HISPANICA* (Mill.) RAUSCHERT'DE SOMATİK
EMBRİYOGENESİS İÇİN EMBRİYOJENİK KALLUS ELDE ETME
ÇALIŞMALARI**

Hilal BEDİR

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



***VACCARIA HISPANICA* (Mill.) RAUSCHERT'DE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS İÇİN
EMBRİYOJENİK KALLUS ELDE ETME ÇALIŞMALARI**

Hilal BEDİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***VACCARIA HISPANICA* (Mill.) RAUSCHERT'DE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS İÇİN
EMBRİYOJENİK KALLUS ELDE ETME ÇALIŞMALARI**

Hilal BEDİR
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
Tarafından FYL-2016-1719 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***VACCARIA HISPANICA* (MİLL.) RAUSCHERT'DE SOMATİK
EMBRYOGENESİS İÇİN EMBRİYOJENİK KALLUS ELDE ETME
ÇALIŞMALARI**

Hilal BEDİR
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 24/06/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esin ARI (Danışman)
Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU
Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR

[.....]
[.....]
[.....]

ÖZET

VACCARIA HISPANICA (Mill.) RAUSCHERT'DE SOMATİK EMBRİYOGENESİS İÇİN EMBRİYOJENİK KALLUS ELDE ETME ÇALIŞMALARI

Hilal BEDİR

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esin ARI

Haziran 2019; 85 sayfa

Vaccaria hispanica (Mill.) Rauschert (Caryophyllaceae) doğada yaygın şekilde yetişen, özellikle triterpenoid saponin ve kaliteli nişasta içeriği çok zengin bir doğal bitkidir. Bu tez çalışmasında literatürde henüz ele alınmamış bir konu olan *V. hispanica*'da somatik embriyogenesis ile ilgili olarak somatik embriyogenesisin ilk basamağı olan embriyojenik kallusların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla biri nişasta (Genotip A), diğeri saponin (Genotip B) içeriği yüksek iki *V. hispanica* genotipinin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları, iki grup denemede çok sayıda besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu ortamların bazal besin ortamları I. grup kallus denemelerinde MS ve NN ortamları, II. grup kallus denemelerinde ise sadece MS ortamı olup, bazal besin ortamlarına oksin olarak 2,4-D veya NAA'nın 0, 1 ve 2 mg/L ile sitokinin olarak da BA veya TDZ'nin 0, 0.5, 1 ve 2 mg/L'lik konsantrasyonlarından oluşan bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) çeşitli kombinasyonlarda ilave edilmiştir. Çalışmada bu ortamların iki *V. hispanica* genotipine ait farklı eksplant tiplerinde; kallus (%) ve embriyojenik kallus oluşturma (%) ile çeşitli kallus özellikleri ve ayrıca kalluslardan meydana gelebilecek farklı morfolojik yapıları oluşturma üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmanın sonuçlarına göre *V. hispanica*'nın kallus, embriyojenik kallus ve çeşitli morfolojik yapıları oluşturma yönünden çok yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu kapasite; hiçbir hormonun kullanılmadığı kontrol ortamlarında bile çok yüksek oranda kallus, yoğun kök yapıları ve sürgün oluşması nedeniyle, büyük ölçüde *V. hispanica*'nın yüksek olduğu tahmin edilen içsel hormon seviyelerinden kaynaklanmaktadır. Çeşitli BGD'lerin kullanıldığı tüm ortamlarda ise *V. hispanica*'nın hem A hem de B genotiplerinde içsel oksin düzeyinin de yüksek olması nedeniyle her iki genotipin bütün eksplantlarında oldukça yüksek oranlarda kallus meydana gelmiştir. Bu nedenle *V. hispanica*'da sadece kallus oluşturma yönünden belirli bir ortam önerisinde bulunmak mümkün değildir. Ancak bu kalluslara embriyojenik özellik kazandırılabilmesi için, hazırlanacak ortamlara oksin olarak 2,4-D ve sitokinin olarak TDZ'nin belirli kombinasyonlarda ilave edilmesinin gerekli olduğu belirlenmiştir. Genotip A ve Genotip B'nin tüm eksplantlarında aynı anda en yüksek oranda embriyojenik kallus oluşturabilmek için önerilebilecek en etkili ortamın, MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ içeriğine sahip ortam olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen morfolojik yapılar gelince; çoğunluğu globular aşamada en yüksek embriyo oluşumu her iki genotipte MS + 2 mg/L 2,4-D içeren ortamda meydana gelmiştir. En fazla embriyo oluşumu miktar olarak Genotip A da yaprak, Genotip B de ise kotiledon ve onu takiben yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. En fazla sürgün oluşumu Genotip A da hem I., hem de II. grup denemelerde BGD içermeyen kontrol ortamında kültüre alınan boğum arası eksplantlarında, Genotip B de ise yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir. Farklı yapıdaki köklenmeler yönünden Genotip A ve Genotip B’de; en yüksek orandaki kısa kök oluşumlarının genel olarak sitokininsiz 2,4-D içeren ortamlarda, uzun ve gerçek kök oluşumlarının ise oksinsiz NAA içeren ortamlarda olduğu dikkat çekmiştir. Bu çalışmada elde edilen özellikle köklenmelere ait detaylı bulguların, içerik yönünden zengin *V. hispanica*’da ileride yapılabilek *in vitro* sekonder metabolit çalışmaları için de faydalı olması umulmaktadır.

ANAHTAR KELİME: Kallus, Nişasta, Saponin, Somatik Embriyogenesis, Embriyojenik Kallus, *Vaccaria hispanica*

JÜRİ: Doç. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR

ABSTRACT

OBTAINING EMBRYOGENIC CALLUS FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *VACCARIA HISPANICA* (Mill.) RAUSCHERT

Hilal BEDİR

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Esin ARI

June 2019; 85 pages

Vaccaria hispanica (Mill.) Rauschert (Caryophyllaceae) is a natural plant that grows widely in nature, especially rich in triterpenoid saponin and quality starch. In this thesis, it is aimed to obtain embryogenic calluses which is the first step of somatic embryogenesis related to somatic embryogenesis in *V. hispanica* which has not been yet studied in the literature. For this purpose hypocotyl, cotyledon, internodal and leaf explants of two *V. hispanica* genotypes with high content of starch (Genotype A) and saponin (Genotype B) were cultured in several culture media in two groups of trials. The basal nutrient media of these media were MS and NN media in I. group of callus experiments and only MS medium in II. group callus experiments. Plant growth regulators (BGDs) consisting of 2,4-D or NAA as auxin at 0, 1 and 2 mg/L and BA or TDZ as cytokinin at 0, 0.5, 1 and 2 mg/L of were added to the basal nutrient media in various combinations. The effects of these media on the formation of callus (%), embryogenic callus (%), different callus characteristics and morphological structures that may occur from callus were investigated in different explant types of two *V. hispanica* genotypes.

According to the results of the study, *V. hispanica* has a very high regeneration capacity in terms of forming callus, embryogenic callus and various morphological structures. This capacity is largely due to internal hormone levels, which are estimated to be high in *V. hispanica*, due to the high rate of callus, dense root structures and shoot formation formed even in control cultures in which no hormone was used. In all cultures containing various BGDs, very high rates of callus formed in all explants of both genotypes due to the high internal auxin level of both A and B genotypes of *V. hispanica*. Therefore, it is not possible to propose a specific culture content in *V. hispanica* only in terms of callus formation. However, in order to give embryogenic properties to these calluses, it has been determined that 2,4-D as auxin and TDZ as cytokinin should be added in certain combinations. It was specified that the most effective medium was MS + 2 mg / L 2,4-D + 0.5 mg / L TDZ to produce high level of embryogenic callus in all explants of Genotype A and Genotype B.

As for the morphological structures obtained in the study, the highest embryo formation mostly in the globular stage occurred in medium containing MS + 2 mg / L 2,4-D in both genotypes. The maximum embryo formation was obtained from the leaf explant in Genotype A and from the cotyledons followed by leaf explants in Genotype B. The highest shoot formation took place in the internodal explants cultured in the control cultures of both I. and II. group of experiments in Genotype A while in the leaf explants in Genotype B. In regard of different types of rooting in Genotype A and Genotype B, it was noted that the highest rate of short root formation occurred mostly in the media

containing 2,4-D without cytokinin while the highest long and true root formation in the media containing NAA without auxin. It is hoped that the detailed findings especially on rooting obtained in this study will be useful for *in vitro* secondary metabolite studies in *V. hispanica*, which has rich content.

KEYWORDS: Callus, Embryogenic Callus, Saponin, Somatic Embryogenesis, Starch, *Vaccaria hispanica*

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR

ÖNSÖZ

Tıbbi aromatik bitkilerin giderek önem kazanması, bu bitkilerin kısa sürede çoğaltımı, içeriğindeki bileşenlerin artırılması gibi çalışmaların hız kazanmasını sağlamıştır. Biyoteknoloji yöntemlerinin gelişmesi bu çalışmalara ivme kazandırmaktadır. *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert doğada yaygın şekilde yetişen saponin ve nişasta açısından zengin bir doğal bitkidir. İçerik açısından zengin bu bitki türünün klonal üretimine yönelik somatik embriyogenesis çalışmalarına şimdiye kadar literatürde rastlanmadığı için bu tezde somatik embriyogenesisin ilk basamağı olan embriyogenik kallusların elde edilmesi hedeflenmiştir.

Bu tezin tamamlanmasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, doğru kaynaklara ulaşmamı sağlayan, laboratuvar çalışmalarında bütün imkanları sunarak beni destekleyen, başarısını ve azmini örnek aldığım çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Esin ARI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli yorum ve tavsiyeleriyle tezimin son şeklini verilmesini sağlayan, tez savunma jürimde bulunan Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU'na ve Prof. Dr. Serpil GÖK TANGOLAR'a teşekkür ederim.

Değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan tüm Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar ve arazi çalışmalarımda bana maddi manevi destek olan Cansu BÜLBÜL, Yeliz YILMAZ, Özge ÖZEN ve diğer bütün bölüm arkadaşlarıma ve bana her zaman ablalık yapan ve yol gösteren Selcen Yıldırım DOĞAN'a ve her zaman yanımda olan canım arkadaşım Emine TOPARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın istatistiksel analizleri konusunda katkılarını ve yorumlarını benden esirgemeyen Gülsün Elif VURAL'a çok teşekkür ederim.

Bana karşı gösterdikleri sabır ve anlayış için değerli mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve son olarak bana olan inançlarını asla kaybetmeyen ve her zaman destekleyen aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER	xi
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK TARAMASI.....	6
2.1. Somatik Embriyogenesis ile İlgili Daha Önce Yapılan Çalışmalar.....	6
2.2. Caryophyllaceae Familyasında Daha Önce Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları	12
3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Metot.....	15
3.2.1. <i>In vitro</i> stok bitkilerin yetiştirilmesi	15
3.2.2. Kallus denemeleri.....	16
3.2.2.1. I. grup kallus denemeleri.....	16
3.2.2.2. II. grup kallus denemeleri.....	19
3.2.2.3. Embriyojenik kallus elde etme amaçlı denemeler.....	22
3.2.3. İncelenen özellikler.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
4.1. I. Grup Kallus Denemelerinden Elde Edilen Bulgular.....	25
4.2. II. Grup Kallus Denemelerinden Elde Edilen Bulgular.....	35
5. SONUÇLAR.....	74
6. KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert’de Somatik Embriyogenesis İçin Embriyojenik Kallus Elde Etme Çalışmaları” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

24/06/2019

Hilal BEDİR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
g/ L	: gram/litre
mg/L	: Miligram/litre
µL/L	: Mikrolitre/litre
g/L	: Gram/litre
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
µM	: Mikromol

Kısaltmalar

2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
NAA	: Naphthaleneacetic acid
BA	: Benzil Adenin
TDZ	: Thidiazuron
MS	: Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı
NN	: Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı
BGD	: Bitki Gelişim Düzenleyicisi
BO	: Besin Ortamı
BBO	: Bazal Besin Ortamı
AKO	: Alt Kültür Ortamı
EKO	: Embriyojenik Kallus Oluşumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Vaccaria hispanica</i> (Mill.) Rauschert'in a) çiçeklenme; b) kapsül ve tohum görüntüleri.....	3
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan iki <i>Vaccaria hispanica</i> (Mill.) Rauschert genotipi. a) Genotip A; b) Genotip B	15
Şekil 3.2. Bitkilerin yetiştirilmesi ve eksplantların ayrılması	19
Şekil 3.3. Kalluslarda incelenen özelliklerden bazı görüntüler; a ve b) embriyojenik kallus görüntüsü; c) kısa kök gelişimi; d) meristemoid oluşumlar ve bu bölgelerden gelişen çoklu sürgünler; e) öbeklenme.....	24
Şekil 4.1. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarında meydana gelen kallus ve bazı morfolojik gelişimlere ait görün-tüler; a) ve b) MS besin ortamında 5. ortamda hipokotil eksplantından embriyojenik kallus gelişimi; c) NN'in 6. besin ortamında hipokotil eksplantından embriyojenik kallus gelişimi; d) MS'in 2. besin ortamında yaprak eksplantından saçsı köklerle karışık kök gelişimi	31
Şekil 4.2. I. grup kallus denemelerinde yaprak eksplantında meydana gelen bazı kallus ve morfolojik gelişimlere ait görüntüler; a) 1. ortamda kısa kök gelişimi; b) 21. ortamda kısa kök ve öbeklenme oluşumu; c) 5. ortamda öbeklenme oluşumu.....	34
Şekil 4.3. Genotip A'da oluşan globular embriyo gelişimleri: a) 3. ortamın (MS + 2 mg/L 2,4-D) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantında meydana gelen globular embriyoların gelişimi; b) 18. ortamın (MS + 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BA) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında meydana gelen kotiledon aşamasındaki embriyoların gelişimi.....	48
Şekil 4.4. II. grup denemelerde Genotip A'da meydana gelen bazı kök gelişimleri-ne ait görüntüler; a) 7. ortamda kotiledon eksplantında kısa (saçsı) kök gelişimi; b) 5. ortamda yaprak eksplantında uzun ve gerçek kök gelişimi; c) 2. ortamda yaprak eksplantında yoğun kısa (saçsı) kök gelişiminin görüntüsü	52
Şekil 4.5. Yaprak ve hipokotil eksplantlarında meristemoid ve öbeklenme görüntüleri; a) yaprak eksplantında gelişen meristemoid oluşumlar ve bu bölgelerden gelişen çoklu sürgünler; b) hipokotil eksplantında öbeklenme görüntüsü.....	56
Şekil 4.6. Genotip B'de oluşan embriyo gelişimleri: a) 12. ortamın (MS + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BA) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantında meydana gelen embriyoların gelişimleri; b) 28. ortamın (MS + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında meydana gelen globular embriyoların gelişimi	65
Şekil 4.7. Genotip B'de herhangi bir BGD içermeyen kontrol ortamında oluşan kallus ve saçsı kök gelişimleri.....	69

Şekil 4.8. Genotip B’de hipokotil eksplantından elde edilen öbekli yapı görüntüleri.....	70
---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı MS ve NN ortamı uygulamalarının BGD içerikleri.....	16
Çizelge 3.2. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait tohum ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortamı uygulamalarının BGD içerikleri.....	17
Çizelge 3.3. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait tohum ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortam uygulamalarının BGD içeriklerinin farklı bir gösterimi.....	18
Çizelge 3.4. II. grup kallus denemelerinde Genotip A ve B'ye ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortamlarının BGD içerikleri	19
Çizelge 3.5. II. grup kallus denemelerinde Genotip A ve Genotip B'ye ait hipo- kotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortam uygulamalarının BGD içerikleri	20
Çizelge 3.6. Tohum çimlendirme, I. ve II. grup kallus denemelerinde kullanılan MS ve NN besin ortamlarının içerik ve konsantrasyonları.....	21
Çizelge 4.1. <i>V. hispanica</i> 'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A da hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarıyla 8 besin ortamında yapılan denemelere ait verilerin varyans analiz sonuçları	26
Çizelge 4.2. <i>V. hispanica</i> 'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A da hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı 8 besin ortamından elde edilen kallusların oluşum miktarı ve karakteristik ve morfolojik özellikleri üzerine bazal besin ortamları, eksplant ve besin ortamlarının bağımsız etkileri	27
Çizelge 4.3. <i>V. hispanica</i> 'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A da hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı 8 besin ortamından elde edilen kallusların oluşum miktarı, karakteristik ve morfolojik özellikleri üzerine bazal besin ortamı*eksplant*besin ortamından oluşan interaksiyonlarının etkileri	28
Çizelge 4.4. <i>Vaccaria hispanica</i> 'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın yaprak eksplantlarıyla 29 besin ortamında yapılan denemelere ait sonuçlar	32
Çizelge 4.5. <i>Vaccaria hispanica</i> 'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B'ye ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamı ile kurulan denemelerde elde edilen kallusların karakteristik özellikleri üzerine etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları	35

Çizelge 4.6. <i>Vaccaria hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B’de hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarıyla 35 besin ortamında kurulan denemelerde elde edilen kallusların çeşitli özellikleri üzerine genotip, eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin etkileri.....	37
Çizelge 4.7. <i>Vaccaria hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B’nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamının toplam ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine genotip*eksplant*besin ortamından oluşan üçlü interaksiyonların etkisi.....	39
Çizelge 4.8. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A’nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine etki eden faktörlerin varyans analiz sonuçları.....	45
Çizelge 4.9. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A’nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine eksplant, besin ortamları ve alt kültür ortamından oluşan bağımsız tekli değişkenlerin etkileri	46
Çizelge 4.10. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A’nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların embriyo ve sürgün oluşumları üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri.....	49
Çizelge 4.11. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A’nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların kısa kök, uzun kök ve gerçek kök oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri	53
Çizelge 4.12. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A’nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kalluslardan meristemoïd ve öbeklenme oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkisi	57
Çizelge 4.13. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B’nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine etki eden faktörlerin varyans analiz sonuçları	59
Çizelge 4.14. <i>V. hispanica</i> ’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B’nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamında elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine eksplant. Besin ortamları, AKO ve bağımsız tekli değişken olarak etkileri	60

Çizelge 4.15. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamında elde edilen kalluslardan embriyo ve sürgün oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*uygulama*alt kültür ortamı) etkileri 63

Çizelge 4.16. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların kısa kök, uzun kök ve gerçek kök oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri.....66

Çizelge 4.17. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların meristemoid ve öbeklenme oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların(eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri.....71

1.GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde doğal olarak yetişen ve çoğunlukla yabancı ot olarak nitelendirilen birçok bitki aslında keşfedilmeyi bekleyen mucizelerle doludur. Bu bitkiler gıda, baharat, yem, boya, süs bitkisi gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olmakla birlikte içerdikleri değerli bileşikler nedeniyle özellikle farmasötik ve nutrasötik alanlarında eczacılıkta önemli ham madde kaynakları olarak kullanılmaktadır. Sanayileşme devri ile birlikte tıbbi ilaç üretiminde bir dönem sentetik ham maddelere yönelim artmış, fakat günümüzde artan sağlık bilinciyle sentetik ham madde yerine yeniden doğal özellikte etken maddelerin kullanımına ağırlık verilmeye başlanmıştır. Bu eğilim doğal tıbbi-aromatik bitkilere olan ilginin ve bu bitkilerdeki çalışmaların artmasına neden olmuştur. Son zamanlarda farklı özellikleri nedeniyle üzerinde durulan doğal bitkilerden birisi Caryophyllaceae familyasına bağlı *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert türüdür.

V. hispanica; tohumlarının içermiş olduğu önemli bileşikler sebebiyle, eczacılıktan kozmetiğe kadar birçok sektörde yararlanılabilecek önemli bir endüstri bitkisi ve aynı zamanda dış görünüşü nedeni ile de süs bitkisi potansiyeli taşıyan bir bitkidir. Önceleri tüm dünyada mücadelesi yapılan önemli bir yabancı ot olarak bilinmekle birlikte, özellikle Kanada’da yapılan çeşitli araştırmalar *V. hispanica*’ya olan ilginin her geçen gün daha da artmasına neden olmaktadır. Ülkemizde ise bu türün önemi bilinmemekte olup çok yakın zamana kadar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ancak özellikle yaygın olarak yayılış gösterdiği ekin tarlaları ve civarındaki alanlarda yabancı ot mücadelesinin yapılması, *V. hispanica*’nın doğal yayılış alanlarını kısıtlamakta ve doğadaki popülasyonlarının giderek azalmasına neden olmaktadır.

Caryophyllaceae (karanfilgiller) familyası başta Akdeniz iklimli ılıman bölgelerde yayılış gösteren, yaklaşık 89 cins ve 2200 türü bulunan büyük bir çiçekli bitkiler familyasıdır (Fidan vd., 2016). *V. hispanica* (Mill.) Rauschert bu familyanın *Vaccaria* cinsine aittir. *Vaccaria*, Caryophyllaceae’nin tek türü *V. hispanica* olan monotipik bir cinsidir (Shahid vd. 2014). *V. hispanica* çeşitli sinonimlere sahip olup, bunlar; *Saponaria vaccaria* L., *Vaccaria pyramidata* Medik., *Vaccaria segetalis* Garcke ex Asch, *Vaccaria vulgaris* Host, *Gypsophila vaccaria* (Clarke ex Towns) sayılabilir (Bittrich 1993; Heywood 1993; Hickey ve King 1997).

V. hispanica özellikle Asya ve Avrupa kıtası ile dünyanın birçok yerinde doğal yayılış göstermektedir (Meesapyodsuk vd. 2007). Türkiye’de ise hemen hemen tüm bölgelerde doğal olarak yetişmektedir. *V. hispanica* dünyanın birçok bölgesinde ve Türkiye’de özellikle tahıl tarlalarında, açık alanlarda ve yol kenarlarında doğal yayılış göstermektedir. Ülkemizin kırsal alanlarında Ekinebesi ismiyle tanınır (Koçyiğit ve Alp 2018). Dünyada ve Ülkemizde çok uzun bir süre yabancı ot sınıfında kabul edilmesine rağmen, Goering vd. (1966)’nin bu türün tohumlarındaki nişastanın önemini ve değerini fark etmesiyle, *V. hispanica* üzerindeki araştırmalar bitkinin özellikle tohumları üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü bu türün tohumları yüksek oranda nişasta tanecikleri içermektedir ve bu nişastalar yaklaşık 1 µ çapındadır (Goering vd. 1966). *V. hispanica*’nın bu küçük nişasta tanecikleri üstün özellikli yapıya sahip olduğundan özellikle kozmetik başta olmak üzere, eczacılık ve gıda gibi diğer alanlarda da kullanım olanağı sağlamaktadır.

V. hispanica içerdiği nişasta tanecikleri kadar saponin bakımından da zengindir. Bitkinin yine tohumları çok değerli saponin türevlerine sahiptir. Bu çeşitli saponinler kanser tedavisinin yanı sıra deterjan ve köpürtücü özelliği nedeniyle kozmetik, yangın söndürücü, kuru temizleme, maden ayrıştırma, köpüklü içecek imalatı, yem katkı maddesi gibi çok çeşitli endüstriyel kullanım potansiyeli taşımaktadır (Ferrie vd. 2009).

Saponinler biyoaktifliğe sahip önemli nutrasötiklerdir (Sharma vd. 2012). Saponinlerin bitkiler tarafından patojenlere ve zararlılara karşı geliştirilen bir savunma mekanizması olduğu bilinmektedir. Hayvanlar için toksik olmasına rağmen, insanlara zararsızdırlar çünkü sindirim sistemi tarafından az emilmektedirler (Duddu 2014). Saponinlerin memelilerde anti-inflamatuar ve balgam söktürücü özelliği ve plazma kolesterol düzeylerini düşürdüğü Price vd. (1987) tarafından bildirilmiştir.

Saponinler uygun doz ve miktarda kullanım şartıyla insan sağlığı için sentetik antibiyotikler yerine doğal bir alternatif kaynak olabilir. Çeşitli endüstri ve sanayi alanlarında kullanılarak doğal ham madde kaynağı olarak sağlıklı ürünler ortaya çıkabilir. Ancak saponinlerin tam ticari potansiyellerinin gerçekleşmesi, karmaşık yapılarından kaynaklanan işleme zorluklarını nedeniyle işleme stratejilerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (Güçlü-Üstündağ vd. 2007).

Tarih boyunca insanlar tedavi için ya doğrudan ya da ekstrakt olarak bitkilerden faydalanmışlardır. *V. hispanica*, Çin'de geleneksel tedavide Wang Bu Liu Xing adıyla bilinen tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Duddu 2014). *V. hispanica* tohumlarının kan dolaşımını düzenleyici, idrar söktürücü, doğum yapan kadınlarda süt salınımına artırıcı yaraları iyileştirici ve anti- kanserojen olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Duke vd. 1985; Huang 1994; Balsevich vd. 2012). *V. hispanica*'nın terapötik özellikleri, triterpenoid saponinlerini içermesinden kaynaklanmaktadır (Efthimiadou vd. 2012). Zhou vd. (2016) *V. hispanica* tohumlarının, sekonder metabolit olarak saponinlerin yanı sıra triterpenoid, polifenoller, flavonoidler, ksantonlar ve alkaloidler içerdiğini bildirmişlerdir. Saponinler; genellikle triterpenoid veya steroidal bir aglikona sahip, sulu çözeltileri çalkalandığında kalıcı köpük veren, alyuvarları hemoliz edebilen glikozitlerdir (Küçükkurt vd. 2008). Bu toksik saponinler kanser tedavilerinde etkili iken köpürtücü etkisi nedeniyle de saponinler kozmetik sanayisinden yangın söndürme tüplerinde kullanımına kadar birçok alanda etken madde olarak kullanılabilir (Ferrie vd. 2009).

V. hispanica'nın morfolojik özelliklerine gelince; dikkat çeken pembe küçük renkli bol çiçekli, genellikle kompakt formu, tek yıllık bir bitkidir. Yaprakları mızrak şeklinde, karşılıklı, tüysüz ve mavimsi yeşil renktedir. Çiçekler 5 adetta yaprak ve çanak yaprakтан oluşmaktadır. Doğada yetişen bitkiler daha az dal, yaprak ve çiçeklere sahipken, kültüre alındığı zaman dengeli bir gübreleme ve bakımla daha canlı, gür ve verimli bitki ve tohum verimi elde edilebilmektedir (Şekil 1.1).

V. hispanica doğada farklı lokasyonlarda kültüre alındığında yaklaşık 30-40 cm kadar boylanıp, kompakt formda büyümektedir. Doğadaki çiçeklenme bitkinin yetiştiği bölgeye göre Mayıs ayından Temmuz ayına kadardır. Kanola tohumlarına benzeyen tohumları kapsüller içinde yer alır. Bir kapsülde yaklaşık 10-20 adet, siyah, 1-2 mm çapında, yuvarlak şekilli tohumlar bulunur. *V. hispanica* tohumları turuncu - siyah renklidir. Tohum hasadı dikimden 90-100 gün sonra yapılmaktadır. Tohumları %60'dan fazla nişasta ve %15-16 protein içerir (Mazza vd. 1992).



(a)

(b)

Şekil 1.1. *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert'in a) çiçeklenme; b) kapsül ve tohum görüntüleri

Yukarıda belirtildiği gibi *V. hispanica* başlangıçta yabancı ot olarak kabul edilse de artık bugün bir cevhere benzetilmektedir (Anonymous 2008). Bu nedenle *V. hispanica*'da yapılan kültüre alma ve ıslah çalışmaları çoğunlukla tohum içeriğini ve özellikle saponin miktarını daha da arttırabilmek için yapılmaktadır (Efthimiadou vd. 2012).

Tohum ıslah çalışmalarında günümüzde biyoteknolojinin önemi giderek artmaktadır. Biyoteknolojinin bitki ıslahındaki en önemli yardımcıları çeşitli bitki doku kültürü teknikleridir. Diğer bitkilerde olduğu gibi Dünyada ve ülkemizde önemi gün geçtikçe artan tıbbi aromatik bitkilerin de mikroçoğaltımı, ıslahı, sekonder metabolit üretimi, sentetik tohum üretimi ve *in vitro* şartlarda kriyomuhafazası için biyoteknolojik olarak çeşitli bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. 1838 yılında Schwann ve Schleiden'in (1838) "*totipotensi teorisi*" ile bitki doku kültürünün temeli atılmıştır. Tek bir hücrenin bölünme ve farklılaşma yoluyla organ veya tam bitkiye dönüşebilme potansiyeline "*totipotensi*" adı verilmiştir. Bitki hücrelerinin sahip olduğu bu özellikten yararlanılarak steril *in vitro* kültür şartlarında bitkilerin hücre, doku veya organlarından çeşitli tekniklerle bitki veya bitkisel ürünler elde edilebilmektedir.

Bitki biyoteknolojisinde ıslah sürecini kısaltmada kullanılan çok büyük öneme sahip tekniklerden birisi haploidi tekniğidir. Bu teknik sayesinde tek generasyonda % 100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Elde edilen bu hatlar doğrudan F₁ hibrit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilceği gibi, bu saf hatların içeriklerindeki bileşiklerin miktarları da arttırılabilmektedir. *V. hispanica*da bu amaçla Kernan ve Ferrie (2006) Kanada'da yaptıkları çalışmada, doubled haploid bitki elde etmek için mikrospor kültürü yöntemini kullanmışlar ve geliştirdikleri protokol için patent (Ferrie vd. 2009) almışlardır. Bu teknik sayesinde "Prairie Carnation" adı verilen ve içeriğindeki bileşiklere üstün özellik kazandırılan ticari bir çeşit geliştirilmiştir (Balsevich 2008; Oelck 2008; Ferrie vd. 2009).

Haploidi yönteminin dışında diğer önemli bir biyoteknoloji yöntemi somatik embriyogenesis tekniğidir. Bitki hücrelerinin "*totipotensi*" özelliğinden yararlanılarak *in*

vitro kültür şartlarında bitkilerin somatik hücre, doku veya organından tam bitki elde edilebilmektedir. Somatik hücrelerden meydana gelen embriyolar ise “somatik embriyo” olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyolar ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir (Babaoğlu vd. 2001).

Somatik embriyogenesis *in vitro* şartlarda gerçekleştirildiği gibi doğada kendiliğinden de meydana gelebilmektedir (Onay vd. 2012). De Jong vd. (1993) tarafından zigotik embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerinde somatik embriyolarının globular, kalp, torpido ve kotiledon oluşum safhalarını geçirdikleri belirtilmiştir (Babaoğlu vd. 2001). Winkelmann vd. (2006) yaptıkları detaylı çalışmada somatik ve zigotik embriyoların protein kompozisyonlarına bakmışlar ve somatik embriyoların morfolojik ve gelişimsel açıdan zigotik embriyolara benzediğini bildirmişlerdir. Bu iki tip embriyo arasındaki asıl farklılık, elde edilme yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyolar döllenmiş zigottan geliştikleri için elde edilen bitkiler açılım gösterirken, somatik embriyolardan elde edilen bitkiler ise genetik olarak klon oluşturmaktadır (Erişen 2001). Bu nedenle elde edilen bitkilerde açılım görülmemektedir.

Somatik embriyolar laboratuvarında doğrudan veya dolaylı somatik embriyogenesis yöntemleriyle iki yolla elde edilirler. Doğrudan somatik embriyogenesis yönteminde kallus oluşumu olmadan embriyolar eksplantlardan direkt olarak gelişir. Bu yöntemde eksplant olarak genellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolar kullanılmaktadır.

Dolaylı yoldan somatik embriyogenesisde ise oksinin tek başına veya daha az miktarda sitokininle birlikte kullanıldığı ortamlarda eksplantlardan öncelikle embriyojenik kalluslar meydana getirilmektedir. Bu kallusların üzerinde oluşan embriyolar daha sonra genellikle hiç hormon içermeyen ortama aktarılarak kök ve sürgün gelişimi oluşturlar.

Somatik embriyogenesisde embriyo elde edilebilmesi için embriyojenik özellikte orijin hücrelerin olması gerekmektedir. Embriyojenik hücreler küçük yapıda, yoğun sitoplazma içeren ve küçük vakuollere sahiptir (Babaoğlu vd. 2001).

Somatik embriyo elde edebilmek için bitkinin birçok yerinden eksplant alınabilmektedir. *In vitro* koşullarda somatik embriyo elde etmek için eksplantlar çoğunlukla oksin (genellikle 2,4-D) veya belirli oranda oksin + sitokinin kombinasyonu içeren besin ortamlarında kültüre alınır. Daha sonra oluşan kallus veya embriyolar hormonsuz ortama aktarılarak embriyoların sağlıklı şekilde gelişmesine olanak sağlanır. Embriyolar globular, kalp, torpedo ve kotiledon aşamalarından geçerek bitki rejenerasyonu yolunda ilerlerler. Somatik embriyo elde edebilmek için kalluslar, genotipe bağlı olarak genellikle 4-8 haftada bir ya hiç hormon içermeyen ya da bitki gelişim düzenleyiciler (BGD) içermeyen besin ortamlarına aktarılırlar. Bu işlem alt kültüre alma olarak da adlandırılmaktadır. Eksplantın yaşı, genotip, bitki gelişim düzenleyiciler, kullanılan besin ortamı, alt kültür gibi birçok etmen somatik embriyogenesisi etkileyen faktörlerdir.

Somatik embriyoların oluşum süreci olan somatik embriyogenesisin kullanım alanlarına gelince; klonal çoğaltımda özellikle meyve ve orman ağaçlarının çoğaltılmasında önemli bir yere sahiptir. Bu teknik tohumdan çoğaltılması zor olan bitkilerde, tek bir eksplant kaynağından çok sayıda embriyo ve ardından bitki elde edilerek, hızlı çoğaltıma olanak sağlar. Ayrıca sentetik tohum üretimi ve gen aktarma

çalışmaları, somatik embriyoların diğer kullanım alanları arasındadır (Babaoğlu vd. 2001).

Somatik embriyoların tohuma dönüştürüldüğü sentetik tohum teknolojisinde; çoğunlukla kotiledon aşamasındaki somatik embriyolar (genellikle sodyum aljinat) ile kaplanarak sentetik tohumlar elde edilir (Babaoğlu vd. 2001). Sentetik tohumlar, bitkinin somatik hücrelerinden orijinlendiği ve ebeveyn bitkinin tüm özelliklerini taşıdıkları için açılım göstermemektedir. Bu nedenle somatik embriyogenesis etkin bir klonal çoğaltım yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bitki genetik kaynaklarının muhafazası için elde edilen embriyojenik kalluslar ve embriyolar önem taşımaktadır. Bunların dışında, gen aktarım çalışmaları için istenilen geni taşıyan DNA parçasının, bitki hücrelerine aktarılmasından sonra buradan somatik embriyogenesis yoluyla elde edilen embriyoların, bitki rejenerasyonu sayesinde bitkiye aktarılması somatik embriyogenesis tekniğinin diğer kullanım alanıdır. Somatik embriyogenesis, somatik hibridizasyon ve gen aktarma çalışmalarında ara ürün olarak embriyojenik kallusların elde edilmesi çok önemlidir. Çünkü embriyojenik kalluslar tek hücre kaynaklı olduğundan özellikle gen aktarma çalışmalarında amaca ulaşmada önemli rol oynar. Bunların yanında hücre süspansiyonu hazırlama ve protoplast füzyonunda kaynak olarak yine embriyojenik kalluslar kullanılır (Babaoğlu vd. 2001).

Ancak somatik embriyogenesis yöntemi özellikle odunsu bitkilerin çoğaltılmasında, endemik ve nesli tehlikede olan bitkilerin korunmasında, tıbbi-aromatik bitkilerin hızlı çoğaltımında ve kimyasal içeriklerini fazla miktarda elde etme amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

V. hispanica da şimdiye kadar literatürde herhangi bir somatik embriyogenesis çalışmasına rastlanmamıştır. Bu türde geliştirilecek somatik embriyogenesis protokolleri önemli bir tıbbi bitki ve potansiyel bir süs bitkisi olan *V. hispanica* 'nın hızlı çoğaltımına ve değerli kimyasal bileşiklerinin çok daha yüksek miktarda üretilmesine hizmet edecektir. Bu tezde *V. hispanica* 'da için somatik embriyogenesisin ön basamağı olan embriyojenik kallus elde etme aşaması için etkili bir protokol geliştirebilmek amacıyla kapsamlı denemeler kurulmuştur. Bu denemelerde, çeşitli bitki büyüme düzenleyici tip ve konsantrasyonlarının kombinasyonlarından oluşturulan 35 farklı besin ortamının iki genotipin farklı eksplantları üzerinde embriyojenik kallus oluşturabilme etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

V. hispanica'da somatik embriyogenesis üzerine yapılmış bir çalışmaya literatürde henüz rastlanılmamıştır. Bu nedenle kaynak taraması bölümünde öncelikle somatik embriyogenesis ile ilgili bazı çalışmalara, daha sonrada *V. hispanica*'nın bağlı olduğu Caryophyllaceae familyasında yapılan çalışmalara yer verilmiştir.

2.1. Somatik Embriyogenesis ile İlgili Daha Önce Yapılan Çalışmalar

Somatik embriyogenesis çalışması ilk defa Steward vd. (1958) ile Reinert (1959) tarafından rapor edilmiş ve bu çalışmalarda havuç bitkisinde süspansiyon kültüründeki kalluslardan ilk kez somatik embriyolar elde edilmiştir.

Tisserat vd. (1977) yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında, Queen Anne Lace havuç çeşidinden elde edilen kallusların alt kültüründe, besin ortamına eklenen etefon, etilen ve 2,4-D'nin embriyo oluşumu üzerine etkilerini incelemişler; 5 mg/L etilen uygulamasının somatik embriyo oluşumunu azalttığını, 2,4- D'nin ise engellediğini bildirmişlerdir.

Chang ve Hsing (1980), 2,4-D ekledikleri MS besin ortamında ginseng bitkisinin yaprak, kök ve anterinden kallus elde etmişlerdir. Kallusları alt kültüre alırken ½ MS ve Gamborg B5 ortamına BA ve GA3 ilave ederek bitki rejenerasyonunu artırmışlardır.

Ozias vd. (1981), 8 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyo ve yeni filizlenen başaklarından kallus ve bu kalluslardan bitki elde etmişlerdir. 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kompakt ve ayrılabilir kalluslar geliştiği ve bu kompakt, sarımsı, nodüler kallusların embriyonun epitel ve alt epitel hücrelerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Çalışmada bitki rejenerasyonunun ise sadece kompakt kalluslardan geliştiği bildirilmiştir.

Litvay vd. (1985), daha önce Wetherell (1969) tarafından yabancı havuç hücre süspansiyon kültürü için geliştirilen protokolü *Pinus taeda* L. türünde modifiye etmişlerdir. Yenilenen ortamda orijinal olana göre düşük Ca^{2+} , çok yüksek Mg^{2+} , PO_4^{3-} ve zenginleştirilmiş mikro element kullanılmıştır. Bu yenilenen ortam havuç kültürlerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, *P. Taeda*'da büyüme ve embriyogenesis gerçekleşmiştir.

Conger ve Novak (1987) SH (Schenk ve Hildebrandt 1972) ortamında kültüre aldıkları CHI31, S615 ve S7 mısır çeşitlerinin yapraklarından embriyo elde etmişlerdir. Embriyoları 1 μ M NAA, 1 μ M IAA, 2 μ M 2iP içeren MS ortamına transfer ederek burada çimlenmelerini sağlamışlardır. Çalışmada yaprak eksplantından en iyi embriyo veriminin S615 hattından elde ettiği bildirilmiştir.

Trolinder ve Goodin (1987), pamukda (*Gossypium hirsutum* L.) gen manipulasyonu ve strese dayanıklı hat seçimi için hücre süspansiyon denemesi yapmışlardır. *G. hirsutum* da C312, G5110, T25, T169, P303, P784, ST213, RQX-1-1 genotiplerinin kullanıldığı denemede somatik embriyogenesis için en iyi tepkiyi Coker 312 çeşidinin verdiğini rapor edilmiştir. Kültüre alındıktan 6 hafta sonra globular embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Oluşan globular embriyolar hormon içermeyen MS ortamına aktarıldıktan 4-6 hafta sonra kalp şeklindeki embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar yarı katı ortama aktarılıp çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen embriyoları sıvı ortam ile

doğurulan vermikulit üzerine aktararak, bitkiciklerin gerçek yaprak ve kök sistemi oluştuktan sonra saksıya aktarmışlardır.

Kamada vd. (1989) nın Japonya'da yaptıkları çalışmaya göre havucun apikal meristemi hormonsuz % 0.7 sukroz ve 0.25 l mM kadmiyum iyonu içeren MS ortamında kültüre alınmış, kültürler 1-3 hafta sonra hormonsuz % 0.1 sukroz içeren MS ortamına aktarılmıştır. Somatik embriyolar kallus oluşmadan direkt yoldan elde edilmiştir. Aynı eksplant 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmış, bu ortamda elde edilen embriyolar % 3 sodyum aljinat ile 100 mM CaCl₂ solüsyonunda kapsüllenmiştir. Tek bir embriyo içeren sentetik tohumlarda kök ve yeşil aksam geliştiren embriyolardan, kadmiyum iyonu ile işleme tabi tutulanların 2,4-D'li olanlara göre % 30-50 daha büyük olduğu rapor edilmiştir. 2,4-D içeren ortamdan gelen embriyolar kapsüllenip ekildiğinde, ikincil ya da üçüncül embriyolar oluşmuş fakat bunlar bitkiye dönüşmemiştir.

Kumar (1992), Apocynaceae familyasına ait tıbbi bir ağaç türü olan *Thevetia peruviana*'da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonunu sağlamıştır. Bunun için öncelikle 9µM 2,4-D ve 4,6µM K içeren MS besiyerinde genç yaprak disklerinin kültüründen kalluslar elde etmiştir ve bunu takiben yüksek oranda sitokinin muamelesi aracılığıyla çok miktarda somatik embriyo üretmiştir. Çalışmada, 50 mg embriyogenik kallustan ortalama 40-50 bitkicik elde edildiği bildirilmiştir.

Michalczuk vd. (1992), oksinin somatik embriyogenesisdeki etkisini araştırmak için *Daucus carota* süspansiyon kallus hücrelerinden IAA ve 2,4-D oksin hormonlarını kullanarak embriyo elde etmişlerdir. Embriyojenik olan ve olmayan kalluslar IAA ve 2,4-D varlığında benzer büyüme oranı göstermiştir. Kalluslar 2,4-D olmayan ortama transfer edildikten sonra her iki hormonun embriyo oluşumu üzerindeki etkisinin azaldığı görülmüştür. Embriyojenik olmayan kalluslar 2,4-D seviyelerini korumuş, embriyojenik olan kalluslar ise yüksek IAA seviyelerini korumuştur. Araştırmacılar bu sonuçlara göre yüksek IAA düzeylerinin gerekli olabileceğini, ancak bitki embriyogenesisindeki başlangıç olayları için yeterli olmadığını, düşük IAA düzeylerinin ise havuç süspansiyon kültürleri için embriyo gelişiminden

sonraki aşamalarıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Raharjo ve Punja (1993) yaptıkları denemede turşuluk hıyarda süspansiyon kültürleri ile bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Yaprak sapı eksplantından oluşturulan embriyojenik kalluslar 5 µM 2,4-D ve 5 µM BAP ilave edilmiş MS ortamında embriyojenik süspansiyon kültürlerine aktarılmıştır. Daha sonra bu süspansiyon kültürlerini 1 µM 2,4-D ve 1 µM BAP eklenmiş MS ortamına almışlardır. Oluşan sarı kırılğan kalluslar daha sonra alt kültürlerle alınarak, bunlarda çeşitli konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin etkileri araştırılmıştır. En yüksek sürgün ve bitki rejenerasyonu 2/1 ve 1/1 oranında NAA/BAP ile desteklenmiş MS ortamında elde edilmiştir.

Somatik embriyogenesis yönteminde embriyolar somatik hücrelerden meydana geldiği için buradan gelişen bitkiler ana bitkinin klonu olmaktadır. Ishii vd. (1998) klonlama amacıyla yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında Santa Cruz orkide (*Phalaenopsis*) çeşidini Vacin ve Went (1949) ortamında çeşitli 2,4-D ve BA kombinasyonlarını kullanarak her iki ayda bir alt kültüre almışlardır. Elde edilen bitkiler aklimatizasyon işlemi sonrasında seraya transfer edilmiş ve bitkiler iki yılın sonunda çiçek açmışlardır. Açan çiçekler arasında morfolojik bir farklılık ortaya çıkmamış, böylece

somatik embriyogenesinin orkidenin klonal çoğaltımında kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Yine orkidede yapılan bir çalışmada Chen ve Chang (2000), ticari öneme sahip *Oncidium X Gower Ramsey* melezi olan bir orkide genotipi için bitki rejenerasyonunu amaçlamışlardır. Elde ettikleri kompakt sarı- beyaz kallusları ½ MS, 0.1 – 3 mg/L TDZ ve 3 – 10 mg/L 2,4-D ihtiva eden çeşitli ortamlarda kültüre alarak, kök ve yaprak eksplantlarından embriyo geliştirmişlerdir. Bu embriyolar olgunlaştırılarak aklimatize edilmiş ve bitkilerin hemen hemen tümü dış koşullara aktarılmıştır.

Nishiwaki ve Fujino (2000), havuç bitkisinde sadece abscisic asidin (ABA) etkisini araştırmışlardır. ABA'nın farklı konsantrasyonlarını denemişler ve en fazla embriyoyu 1×10^{-4} M ABA varlığında elde etmişlerdir. Eksplant yaşının da önemli olduğu yine bu çalışmada ortaya konmuştur ve 3 cm üzerindeki hipokotillerden embriyo elde edilemediği bildirilmiştir.

Ricci vd. (2001), *Citrus sinensis* çeşitleri için ortam optimizasyonu yapmak amacıyla farklı karbonhidratların tepkisini araştırmışlardır. Karbonhidrat kaynağı olarak sukroz, galaktoz, glukoz, maltoz ve laktoz kullanmışlardır. Sırasıyla bunların 18, 37, 75, 110 ve 150 mM konsantrasyonları karbonhidrat kaynağı olarak eklenmiştir. Genel olarak laktoz ve galaktoz ortamında embriyo elde edilmiş ve sukroz denenen ortamlardaki embriyoların bitkiye dönüştüğü gözlemlenmiştir.

Miah vd. (2002) *Citrus macroptera* da yaptıkları çalışmada, olgunlaşmamış meyvelerin gelişmemiş ovullerinden alınan nusellusta kallus kültürüyle somatik embriyo ve bitki elde etmişlerdir. Hazırlanan dört farklı modifiye MS ortamında yürütülen çalışmada en iyi sonucu malt eklenmiş ortamda gözlemlenmişlerdir. Yine aynı ortamda oluşan embriyojenik kallus, hormonsuz MS ortamına aktarılarak somatik embriyo gelişimi sağlanmıştır. Aynı ortamın alt kültürlerinden gelişen somatik embriyolar beş hafta sonra aklimatize edilmiş ve bitkilerin gelişmesi sağlanmıştır.

Kim vd. (2004), *Catharanthus roseus* da yaptıkları çalışmada hücre süspansiyon kültürü ile olgunlaşmamış zigotik embriyolardan embriyogenik kallus elde etmiş ve bunlardan bitki rejenerasyonu geliştirmişlerdir. 4,2 µM 2,4-D eklenmiş MS ortamında kültüre aldıkları olgunlaşmamış zigotik embriyolardan 8 hafta sonra % 20 oranında kırılğan kallus elde etmişlerdir. MS ortamında alt kültüre aldıkları kalluslardan sarımsı, kompakt embriyojenik kallusları gözlemlenmişler ve 4 haftada aynı besi ortamında bir alt kültüre aldıkları embriyojenik kalluslardan çok miktarda somatik embriyo elde etmişlerdir. 4,52 µM 2,4-D ilave edilmiş sıvı MS ortamında embriyojenik kalluslarla hücre süspansiyon kültürlerini kurmuşlardır. Hücre süspansiyon kültürlerinden MS ortamına aktardıkları embriyolardan % 56.7 oranında bitki gelişimi sağlamışlardır.

Houl ve Jia (2004), Çin, Rusya, Moğolistan ve Rusya için ekonomik önemi olan bir yem bitkisi olan *Astragalus melilotoides* Pall. türünde rejenerasyon çalışması yapmışlardır. Yapılan çalışmada *A. Melilotoides*'in hipokotil eksplantı ya da kök kaynaklı bitki rejenerasyonu için protokol oluşturulmuştur. 5 hafta içinde 2.69 µM NAA ve 4.44 µM BA içeren MS besin ortamında hipokotillerden direkt yolla en yüksek somatik embriyo oluşumu sağlanmıştır. 9.05 µM 2,4-D ve 2.22 – 4.44 µM BA içeren MS ortamında 3 tip kallus oluşumu gözlemlenmişlerdir. 2.69 µM NAA ve 4.44 – 8.89 µM BA'lı ortamlardan elde edilen kalluslarda hem somatik embriyo hem de adventif sürgün gelişimi oluştuğunu bildirilmiştir. Somatik embriyolar veya adventif sürgünler 3 hafta

içinde önce hormonsuz MS ortamına alınmış, daha sonra 14.78µM IBA lı ortama transfer edilmiştir. Bitkilerin aklimatize edildikten sonra dış ortamda sağlıklı şekilde büyüme gösterdikleri bildirilmiştir. Bu şekilde ekonomik öneme sahip bitkiler için hızlı bir çoğaltım tekniği olarak somatik embriyogenesisin kullanılabileceği belirtilmiştir.

Somatik embriyogenesis çoğaltılması uzun yıllar alan ya da zor olan özellikle odunsu bitkilerde klonal çoğaltım amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla benzer bir çalışma İpekçi ve Gözükırmızı (2004) tarafından *Paulownia elongata* bitkisinde yapılmıştır. *P. elongata* nın çoğaltma işlemi tohumdan çimlendirme ya da kökten çelik ayırma işlemi ile yapılmaktadır. Ancak kökten ayırmak her zaman kolay olmayıp köklere zarar vererek bitki kaybedilebilmektedir. Bu yüzden hızlı ve klonal çoğaltmak için somatik embriyogenesis yöntemi kullanılmış ve sonuçta hedeflenen bitki rejenerasyonu sağlanmıştır.

Wu vd. (2004) nin Çin pamuğu (*Gossypium hirsutum* L.) üzerinde yaptığı çalışmada çimlendirme ve büyüme yönünden sorunlu olan genotipler için somatik embriyogenesis yönteminde çeşitli faktörlerin etkisi araştırılmıştır. Kallus oluşumu için 2.46 mM IBA ve 2.32 mM kinetin ortama ilave edilmiştir. Alt kültür işlemi sırasında hormonsuz ortama iki kat KNO₃ eklenmiştir. Buradan oluşan embriyolar L-asparagine (7.6 mM) ve L-glutamine (13.6mM) ilave edilen ortama aktararak çimlenmeleri sağlanmıştır.

Junaid vd. (2007) *Catharanthus roseus*'da yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında öncelikle 1 ve 2 mg/12,4-D ya da klorofenoksiasetik asit (CPA) ilave edilmiş MS ortamında hipokotil eksplantından embriyojenik kallus elde etmişlerdir. Daha sonra NAA eklenen MS ortamında 2 hafta içinde primer kalluslardan çok sayıda somatik embriyo indüklendiğini gözlemlemişlerdir. Embriyo çoğaltımının BAP eklenmiş besiyerinde daha hızlı olduğu bildirilmiştir. Olgun, yeşil embriyolar 1 mg/l GA₃ ile hazırlanmış ortama transfer edildiğinde gelişmiş ve çimlenmiştir. Kotiledon yapraklı embriyolar kök gelişimleri için farklı oksinlerle muamele edilmiştir. Bitkicikler %3 sukroz ve 0.5 mg/L BAP içeren ½ MS ortamında 2 hafta süreyle kültüre alındıktan sonra aklimatize edilmiştir.

Ali vd. (2007) eksplant kullanımı arasındaki farklılığı ortaya koymak için şeker kamışının (*Saccharum officinarum*) sürgün ucu ve yaprak eksplantlarını kullanmışlardır. Direkt somatik embriyogenesis yoluyla yaprak eksplantından % 90, sürgün ucu eksplantından ise % 70 embriyo elde etmişlerdir. Ayrıca yaprak eksplantından indirekt somatik embriyogenesis ile de embriyo oluşumu sağlamışlardır.

Tangolar vd. (2008) nin asmada (*Vitis vinifera* L.) yaptıkları çalışmada, eksplant olarak 41B ve Yalova İncisi çeşitlerinin olgunlaşmamış zigotik embriyoları kullanılmıştır. 0.5, 1, 2 ve 4 mg/L 2,4-D eklenmiş MS, NN, B5 ortamlarında kültüre alınan eksplantlar 16-8 saat fotoperiyod veya tamamen karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. 41B çeşidi için en yüksek somatik embriyo oluşumu % 30 ve % 28 oranlarıyla 0.5 ve 1 mg/L 2,4-D içeren B5 ortamlarında karanlık koşullardan elde edilmiştir. Yalova İncisinden ise 1 mg/L 2,4-D içeren MS ortamında 16/8 fotoperiyod koşullarında kültürlerden sadece %5 oranında embriyo elde edilmiştir. 8 aylık alt kültüre alma işlemlerinden sonra B5 + 1 mg/L 2,4-D içeren ortamda ve karanlıkta kültüre alınan 41B çeşidinden 559 embriyo, NN + 0.5 mg/L 2,4-D içeren ve aydınlıkta kültüre alınan Yalova İncisinden ise 912 embriyo geliştirilmiştir. En yüksek çimlenme 41B çeşidinde NN

ortamında (sırasıyla % 58 ve % 75), Yalova İncisi çeşidinde ise MS (sırasıyla % 77 ve % 45) ortamında gerçekleşmiştir. Rejenere olan embriyoların % 91.9'u başarıyla aklimatize edilmiştir.

Singh vd. 2009, tıbbi bir bitki olan *Rauwolfia serpentina*'da somatik embriyogenesis ve *in vitro* rejenerasyon çalışmışlardır. Genç yaprak eksplantları farklı büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. BAP (1.0, 3.0 mg/L) ve IAA (0.1 - 0.5 mg/L) in çeşitli kombinasyonları arasında en yüksek kallus oluşturma BAP (2.5 mg/L) + IAA (2 mg/L) ve BAP (1 mg/L) + IAA (0.5 mg/L) ortamlarında gerçekleşmiştir. BAP ve IAA'ın çeşitli kombinasyonları arasında sürgün rejenerasyonu sıklığı ise en yüksek %75 oranında BAP (2.5 mg/L + IAA (0.4 mg/L) ortamında bulunmuştur. Elde edilen sürgünler kök rejenerasyonu için farklı BGD kombinasyonları (2.5 mg/L BAP + 0.3 - 0.5 mg/L IAA + 0.3 - 0.5 mg/L NAA) içeren MS ortamlarına transfer edilmiştir. % 100 kök rejenerasyonu 2.5 mg/l BAP + 0.5 mg/L IAA + 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında gözlemlenmiştir. Köklenen bitkicikler aklimatizasyon için steril toprağa aktarılmıştır ve bu bitkiciklerden % 67 oranında bitki elde edilmiştir.

Keskin ve Kunter (2010), asmada (*Vitis vinifera* L.) kallus elde etmek için eksplant tipi ve ortam içeriğinin etkisini araştırmışlardır. MS ve Gamborg B5 ortamında sürgünlerin orta bölümünden alınan yaprak ayası ve boğum aralarını eksplant olarak kullanmışlardır. İki ortamda da her iki eksplanttan da kallus elde etmişlerdir. Sağlıklı olarak nitelendirilen I. tip kallusların B5 ortamında MS ortamına göre daha iyi performans gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada eksplantlardan yaprak ayalarının boğum aralarına göre I. tip kallus oluşumu bakımından daha başarılı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

Tıbbi aromatik bitkilerde sekonder metabolitlerin fazla üretilmesi amacıyla bitkilerin sayıca fazla ve hızlıca çoğaltılması için *in vitro* yöntemlerden yararlanılmaktadır. Lin vd. (2010) nin *Pulsatilla koreana* Nakai'de yaptıkları çalışmada 6 haftalık büyüme süresi boyunca IAA, Zn ve BA içeren MS ortamında yaprak, yaprak sapı ve pedisel eksplantlarından çoklu sürgünler elde edilmiştir. 0.5 – 2.0 mg/L Zn, and 0.5 mg/L IAA ilave edilen MS ortamında ise eksplantlardan somatik embriyo elde edilmiştir. Kalp ve torpedo aşamasındaki embriyolar 1.5 mg/L Zn ve 0.05 mg/L IAA ya da 1.0 mg/L BA ve 0.05 mg/L IAA eklenen MS ortamına aktarılmış ve burada bitkiye dönüştükleri bildirilmiştir.

Sharifi vd. (2010) nin *Crocus sativus* L. da yaptıkları çalışmada eksplant olarak safran soğanları kullanılarak sitokininlerin (BA ve TDZ) etkileri araştırılmıştır. MS ve B5 ortamlarının kullanıldığı çalışmada kallus oluşumu için her iki ortama da 1.13, 4.54, 9.08 µM TDZ ve 2.22, 8.87, 17.75 µM BA ilave edilmiştir. Kallusların çoğaltımı için ortama % 0.05 oranında aktif kömür ile NAA ve BA'nın çeşitli kombinasyonları eklenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda TDZ bulunan B5 ortamındaki gelişimin MS ortamındakine göre daha fazla olduğu ve TDZ'nin organogenesis ve somatik embriyogenesis oluşumunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir.

Endüstriyel alanda orman ürünlerinden fazlaca yararlanılmaktadır. Ancak orman ağaçlarının uzun yıllar süren vejetatif büyüme süreleri nedeniyle talep karşılanamadığından, ormanların hızlıca azalmasına sebep olmaktadır. Klonal çoğaltım tekniği ile hem bu süre azaltılabilir, hem de çok sayıda bitki kısa sürede

üretilebilir. Bu amaçla Corredoira vd. (2011), ak meşede (*Quercus alba*) sürgün ucu ve yaprak eksplantlarını kullanarak somatik embriyogenesis denemesi kurmuşlardır. Yaprak eksplantından meydana gelen kalluslarda yüksek oranda embriyojenik yapılar gözlemlenmiştir. Oluşan embriyoların % 30'u çimlendirilmiş, bunlardan % 16.6'sı bitkiye dönüştürülmüştür.

Corredoira vd. (2015), *Eucalyptus globulus* türü için sürekli kullanılabilir bir somatik embriyogenesis protokolünü ilk kez *E. saligna* × *E. Maidenii* hibridinde geliştirmişlerdir. Genotip, tür, oksin ve eksplant tipine göre embriyo verimi farklılık göstermiş, fakat bütün genotiplerden embriyo elde edilmiştir. MS ortamında pikloram ve NAA'nın kullanıldığı çalışmada, pikloramın sürgün ucu eksplantında % 64, yaprak eksplantında ise %68 oranında embriyo verimi oluşturarak, NAA ya göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Alt kültür için hormonsuz ortamlar kullanılmış, 4-5 haftalık süre sonunda globular, kalp ve torpedo oluşumu sağlanmıştır. Yapılan çalışmada pikloramın NAA ya göre embriyo indüksiyonu için daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada embriyoların tam bitkiye dönüşme kabiliyetleri zayıf bulunsa da, sıvı çimlendirme ortamında bitkiye dönüşüm sağlanmıştır.

Venkataiah vd. (2016), *Capsicum baccatum* L.'da kotiledon ve yaprak eksplantlarından somatik embriyolar elde etmiştir. MS ortamına oksin olarak 0.5–5.0 mg/L oranlarında IAA, NAA, 2,4-D ve 5-trichlorophenoxy asetik asit (2,4,5-T) tek başına ya da çeşitli kombinasyonlarla, sitokin olarak da BA ve Kinetin 0.5 - 1.0 mg/L oranlarında ilave edilmiştir. Elde edilen embriyolar alt kültüre alınarak tam bitkiye dönüşümleri sağlanmıştır. En fazla başarının BA varlığında olduğu bildirilmiştir.

Kumar vd. (2016), Güney Afrika'da yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitki olan *Hypoxis hemerocallidea* için somatik embriyogenesis yoluyla *in vitro* bitki rejenerasyonunu amaçlamışlardır. Yapılan çalışmada 15 µM 2,4-D ve 2.5 µM BA içeren MS ortamında embriyojenik kallus oluşmuştur. Kalluslar aynı ortamda alt kültüre alınarak globular, kalp ve torpedo embriyolar elde edilmiştir. Olgun somatik embriyolar 4 hafta sonunda ½ MS ortamında çimlendirmişlerdir. Ortama ilave edilen 1.44 µM GA₃ çimlenme oranını % 88.9'a çıkartmıştır. Çalışmada, doğal popülasyonları azalan germplazmaların korunması için geliştirilecek somatik embriyogenesis protokollerinin, bu bitkilerin ticari üretimleri için klonal üretimlerinin yapılması, genetik transformasyon çalışmalarında kullanılması ve biyoaktif bileşiklerin analizleri için uygun bir sistem sağlaması açısından yararlı olacağı bildirilmiştir.

Sapindus trifolius ağacı saponin ve bitkisel sabun endüstrisinde kullanılmaktadır. Asthana vd. (2017) bu bitkide somatik embriyogenesis ile kalluslarından tam bitkiye dönüşüm sağladıklarını bildirmiştir. Embriyojenik kalluslar en fazla 5.0 mg/L 2, 4-D ve 0.1 mg/L Kin içeren MS ortamında uyartılmıştır. Kalluslar L-glutaminli MS basal ortamına aktarıldığında, beyazımsı-yeşil embriyojenik yapılara dönüşmüştür. Bu yapılar daha sonra bitkiciğe dönüştürülerek, başarıyla aklimitize edilmiştir.

Malvaceae familyasına ait *Althaea digitata* (Boiss.) dünyada önemli bir tıbbi bitki olarak bilinmektedir. Hosseini vd. (2017) yaptıkları çalışmada bu bitkinin kök, sürgün ve yaprak eksplantlarından kallusu teşvik edip, bunlardan sürgün rejenerasyonu sağlamaya çalışmıştır. Eksplantların 10 - 15 günlük fidelerden temin edildiği çalışmada kallus uyartımı için bazal besin ortamı olarak MS kullanılmış, BAP (0, 1, 3 ve 5 mg/L), Kinetin

(0.1 mg/L), NAA (0.1 mg/L) ve 2,4-D (0, 2, 5 ve 10 mg/L) konsantrasyonları ortama ilave edilmiştir. Oluşan kalluslar BAP ve NAA içeren MS ortamlarına transfer edilmiştir. En iyi kallus indüksiyonu % 82.93 lük oran ile MS + 5.0 mg/L 2, 4-D + 0.1 mg/L KIN ortamından elde edilmiştir. İnkübasyon süresi olarak kültürler 10-12 hafta boyunca aynı ortam içinde bırakılmıştır. Maksimum rejenerasyon yeteneği 0.1 mg/L NAA ve 1.0 mg/L BAP içeren MS ortamında gözlemlenmiştir.

2.2. Caryophyllaceae Familyasında Daha Önce Yapılan Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

Bu familyada yapılan somatik embriyogenesis çalışmaları daha çok karanfilde (*Dianthus caryophyllus* L.) gerçekleştirilmiştir. Bu türdeki ilk dolaylı somatik embriyogenesis çalışmaları Frey vd. (1992) ile Sankhla vd. (1995), direkt somatik embriyo oluşumu ise Nakano ve Mii (1993) tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışmaları takiben Choudhary ve Chin (1995)'in somatik embriyogenesis çalışmasında, 60 - 75 günlük hücre kültürleri 2,4-D ilave edilmiş MS bazal ortamına aktararak kallus üretilmiştir. Alt kültüre alma sırasında ortamdan 2,4-D çıkartılarak embriyo elde edilmiş ve bu embriyoların bir kısmı bitkiye dönüştürülmüştür.

Yantcheva vd. (1998) nin Bulgaristan'da yaptıkları çalışmada, Lena, Nasslada, Yanita, Regina karanfil çeşitlerinden somatik embriyo elde etmek için yaprak eksplantı kullanılmıştır. 1 mg /L 2,4-D ve 0.2 mg /L 6-BA ilave edilmiş sıvı MS kültür ortamı kallus evresi olmadan embriyo üretmek için kullanılmıştır. İlk globular yapılar 20 gün sonra görülmeye başlamıştır. PEG varlığında daha fazla torpedo aşamasında embriyo gelişimi gözlenmiştir. Somatik embriyo olgunlaşmasını sıvı MS ortamına kazein hidrolizat (1000 mg/L) ekleyerek arttırmışlardır.

Pareek ve Kothari (2003), *Dianthus* cinsinin ekonomik açıdan önemli türlerinde (*D. caryophyllus*, *D. barbatus* ve *D. chinensis*) yaprak eksplantlarından doğrudan somatik embriyogenesis için protokol geliştirmeye çalışmışlardır. 2,4-D (1 mg/L) ilaveli MS sıvı ortamını, kallus evresi olmadan doğrudan somatik embriyogenesis indüksiyonu için kullanmışlardır. Globular embriyoları sıvı ortamda 21 gün sonra gözlemlenmişlerdir. Kalp ve torpedo safhalarında embriyo geliştirilmesi, % 2.5'luk konsantrasyondaki polietilen glikolün (PEG 6000) sıvı ortama eklenmesiyle başarılmıştır. Embriyo olgunlaştırılması, MS sıvı ortamına eklenen kazein hidrolizat (CH) (200 mg /L) ile sağlanmıştır. Elde edilen embriyolar GA3 (1 mg/l) eklenmiş katı MS ortamında çimlendirilmiştir.

Karami vd. (2006a) dört karanfil çeşidinin (Nelson, Sagres, Spirit ve Impulse) petal eksplantlarından ürettikleri embriyojenik kalluslar üzerinde sukroz konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. 9 mM 2,4- D ve 0.8 mM 0.8 BA ilave edilmiş MS ortamına yedi farklı sukroz konsantrasyonu (% 1.5, 3, 6, 9, 12, 15 ve 18) eklemişlerdir. Embriyojenik kallusun maksimum frekansını % 9 ve % 12 sukroz içeren ortamlardan elde ederek yüksek sukroz konsantrasyonunun somatik embriyo olgunlaşmasını arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Karami vd. (2006b) yaptıkları başka bir çalışmada iki karanfil çeşidiyle (Sagres ve Impulse) ortama pikloram ilave ederek sekonder somatik embriyogenesis çalışması yapmışlardır. İkincil yani sekonder somatik embriyogenesis, önceden oluşmuş somatik embriyolardan yeni somatik embriyoların oluşmasıdır. İki aşamada yaptıkları çalışmanın birinci aşamasında % 9 sukroz, 9 µM 2,4-D ve 0.8 µM BA içeren MS ortamında petal

eksplantlarını kültüre almışlardır. Elde edilen embriyojenik dokular ikinci aşamada, birincil somatik embriyoları üretmek üzere farklı konsantrasyonlarda pikloram (0.8, 2, 4, 8 ve 16 μM) ile desteklenmiş % 3 sukroz içeren MS ortamına aktarılmıştır. Kotiledon embriyoları ise ikincil somatik embriyolar oluşturmak için ikinci aşamada aynı ortam üzerinde alt kültüre alınmıştır. Bu çalışmayla 2 ve 4 μM pikloram içeren ortamlarda dolaylı somatik embriyo oluşumunun yüksek frekans gösterdiği ortaya koyulmuştur.

Karami ve Kordestani (2007), 2,4-D, pikloram ve NAA'nin embriyojenik kallus üzerindeki etkisini iki karanfil çeşidinde (Impulse ve Sagres) araştırmışlardır. MS bazal ortamına farklı pikloram (0.8, 2, 4, 8, 16 ve 24 μM), 2,4-D (1.12, 2.25 4.5, 9, 18, 27 μM) ve NAA (1, 2.7, 5.3, 10.6, 21 26,3 μM) konsantrasyonları ilave edilmiştir. Pikloram, 2,4-D ve NAA içeren ortamlarda, embriyojenik kalluslar somatik embriyolara dönüştürülmüştür. Yapılan çalışmada embriyojenik kallusların sadece 8 ve 16 μM pikloram takviyeli ortamda çoğaldığı tespit edilmiştir.

Sekonder somatik embriyogenesis eldesi için Karami vd. (2008) nin Nelson ve Spirit karanfil çeşitlerinde yaptıkları çalışmada, ilk aşamada petal eksplantlarından elde edilen kalluslardan primer somatik embriyolar geliştirilmiştir. İkinci aşamada kotiledon embriyoları izole edilerek 2,4-D, BA, sukroz ve mannitolün farklı konsantrasyonlarını içeren MS bazal ortamında kültüre alınmıştır. İkincil somatik embriyoların en yüksek oluşumunun mannitol içeren ortamda elde edildiği raporlanmıştır.

Fu vd. (2008), Çin pambesi (*Dianthus chinensis* L.) olarak bilinen türde anter kültüründen elde edilecek somatik embriyoları indükleyen faktörleri araştırmışlardır. Genotipin başarıyı etkileyen önemli bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Anter kültürü sırasında uygulanan koşullar ve ön işlemlerin (soğuk, ısı ve mannitol inkübasyonu) de somatik embriyo indüksiyonunu etkilediğini bildirmişlerdir. Embriyojenik kallus indüksiyonunun en yüksek seviyelerinin donör tomurcukların soğuk ön-muamelesi gördüğü ve daha sonra yapılan anter kültürlerinin karanlıkta muhafaza edildiği koşullarda elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca genotip ile kültür koşulları arasında bir etkileşim olduğunu da rapor edilmiştir.

Meratan vd. (2009), Caryophyllaceae familyasının diğer bir türü olan *Acanthophyllum sordidum* Bunge ex Boiss türünde somatik embriyogenesis çalışması yapmışlardır. Yaprak eksplantlarını kullandıkları çalışmada, çeşitli BGD konsantrasyonlarının oluşturduğu protein ve antioksidan enzim aktivitesinin kallus gelişimi, sürgün ve kök oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada en fazla kallus büyümesi ile kök ve sürgün rejenerasyonu 2.69 μM NAA, 2.69 μM NAA + 4.54 μM tidiazuron (TDZ) ve 2.46 μM indol-3-bütirik asit (IBA) ihtiva eden MS ortamında gerçekleşmiştir. Protein içeriğinin kallus sırasında azalıp, sürgün rejenerasyonunda ise artış gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, sürgün rejenerasyonunda yüksek katalaz aktivitesi, kallus ve kök rejenerasyonunda ise yüksek peroksidaz aktivitesi tespit etmişlerdir.

Radojević vd. (2010) Avrupa'da yetişen *Dianthus ciliatus* ssp. *dalmaticus* ve *Dianthus giganteus* ssp. *croaticus* türlerinin farklı eksplantlarından mikro çoğaltım yoluyla bitki üretmişlerdir. Araştırmacılar hormonsuz MS kontrol ortamı dahil (MS0) çeşitli konsantrasyonlarda BGD ilave ettikleri farklı ortamlarda (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6 ve MS7) bitki rejenerasyonu elde etmeyi başarmışlardır. Araştırmacılar eksplant olarak boğum arası, tepe tomurcuğu ve aksiler tomurcuk kullanmışlardır. Boğum arası

eksplantından *D.dalmaticus* da 7.86, *D. giganteus* da 0.68, tepe tomurcuğu eksplantından *D. Dalmaticus* 'da 6.94, *D. croaticus* da 0.50 olarak elde edilen çoğaltma katsayısı sonuçları, her bir tür için farklı eksplantlardan farklı sonuçların elde edildiğini ortaya koymuştur. Her iki türün MS0, MS3 (MS0+ 0.5 mg/L IBA) ve MS4 (MS0+ 1 mg/L IBA) ortamında sürgün geliştirdiği bildirilmiştir. Sarı-yeşil renkli kalluslardan elde edilen somatik embriyo benzeri yapılar ise MS5 (MS0+5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA) ve MS6 (MS0+ 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP + 0.1mg/L NAA) ortamlarına transfer edilerek bitkicikler elde edilmiş ve daha sonra bunlar başarıyla aklimatize edilmiştir. Bu çalışmayla endemik bitkilerin mikro çoğaltım yoluyla hızlı ve fazla sayıda üretimi için somatik embriyogenesis yönteminin bir araç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

3.MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 2017 yılı Yaz- Sonbahar döneminde Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerin orijinini, 2013 - 2017 yılları arasında yürütülen 112O136 nolu TÜBİTAK-1001 projesi kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 66 adet *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert genotipi (Şekil 3.1) içerisinde nişasta (Genotip A) ve saponin (Genotip B) içeriği en yüksek olarak seçilen iki genotipin tohumları oluşturmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan iki *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert genotipi. **a)** Genotip A; **b)** Genotip B

3.2. Metot

3.2.1. *In vitro* stok bitkilerin yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan çeşitli eksplantları steril şekilde temin edebilmek amacıyla Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde bulunan Doku Kültürü Laboratuvarında *in vitro* şartlarda tohumla üretim yoluyla stok bitkiler yetiştirilmiştir. Tohumla üretiminin ön deneme amaçlı iki farklı çimlendirme ortamı hazırlanmıştır. Bunlar;

1. Klasik MS (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamı ve
2. MS tuzları ile NN (Nitsch ve Nitsch 1969) vitaminlerinden oluşturulan besin ortamıdır.

Bu ortamlardan 2 nolu ortam hem çimlenme oranı hem de çimlenen fide kalitesi yönünden daha başarılı bulunduğu için stok bitki yetiştirme çalışmalarına 2 nolu çimlenme ortamı ile devam edilmiştir. Çimlendirme ortamlarında karbondioksit kaynağı olarak 45 g/L sukroz ve ortamları katılaştırmak için 7 g/L agar kullanılmıştır. Herhangi bir bitki gelişim düzenleyicisi (BGD) eklenmeden hazırlanan çimlendirme ortamları steril cam kavanoz ve tüplere dökülmüş ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Tohumlar %70 lik ethanolde 1 dk ve %20'lik hipo çözeltisinde 15 dk sterilize edildikten sonra 3 kez 5'er dk durulamadan geçirilmiştir. Tohum ekimleri her bir kavanoza 4'er tohum veya her bir tüpe 2'ser adet olacak şekilde yapılmıştır. Bu şekilde kültüre alınan tohumlar ilk iki gün 24°C±1 karanlıkta bekletilmiş, daha sonra 16/8 saat ışık/karanlık fotoperiyoduna sahip yine oda sıcaklığındaki iklim odasına transfer edilmiştir. Çimlendirilen bitkicikler gruplar halinde farklı eksplantlarına ayrılarak (Şekil 3.2.) aşağıda belirtilen kallus denemelerindeki ortamlarda kültüre alınmıştır.

3.2.2.Kallus denemeleri

Çalışmada iki ana grupta kallus denemesi kurulmuştur. Bunlardan birincisi ön deneme niteliğinde olup, bu denemelerdeki eksplantların gelişimine göre daha kapsamlı ikinci grup deneme kurulmuştur.

3.2.2.1. I. Grup kallus denemeleri

I. grup kallus denemelerinde genotip olarak sadece Genotip A kullanılmıştır. Bu genotipin çimlendirilen bitkiciklerine ait tohum, hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları farklı BGD içerisine sahip ortamlarda kültüre alınmıştır. Bu denemelerin baz besin ortamı olarak hazır MS ve NN ortamları kullanılmış, bu ortamlara farklı BGD tip ve konsantrasyonları eklenerek çeşitli besin ortamı uygulamaları oluşturulmuştur. Hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantları MS ve NN ortamlarının her birisinde oluşturulan 8 uygulamada (Çizelge 3.1.) tohum ve yaprak eksplantları ise MS ortamında oluşturulan 29 uygulamada (Çizelge 3.2.) kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.1. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı MS ve NN ortamı uygulamalarının BGD içerikleri

Ortam (Uygulama No)	OKSİN	SİTOKİNİN
	2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)
1 (Kontrol)	0	0
2	1	0.5
3	1	1
4	1	2
5	2	0
6	2	0.5
7	2	1
8	2	2

I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait tohum ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortamında oluşturulan uygulamaların BGD içerikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait tohum ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortamı uygulamalarının BGD içerikleri

Ortam (Uygulama No)	SİTOKİNİN		OKSİN	
	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)
Kontrol	-	-	-	-
1	-	-	1	-
2	-	-	2	-
3	-	-	-	1
4	-	-	-	2
5	0.5	-	1	-
6	0.5	-	2	-
7	0.5	-	-	1
8	0.5	-	-	2
9	1	-	1	-
10	1	-	2	-
11	1	-	-	1
12	1	-	-	2
13	2	-	1	-
14	2	-	2	-
15	2	-	-	1
16	2	-	-	2
17	-	0.5	1	-
18	-	0.5	2	-
19	-	0.5	-	1
20	-	0.5	-	2
21	-	1	1	-
22	-	1	2	-
23	-	1	-	1
24	-	1	-	2
25	-	2	1	-
26	-	2	2	-
27	-	2	-	1
28	-	2	-	2

Tohum ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı uygulamalara ait BGD içeriklerinin daha kolay anlaşılması için Çizelge 3.2. özetlenerek Çizelge 3.3. oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'ya ait tohum ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortam uygulamalarının BGD içeriklerinin farklı bir gösterimi

I. Grup Ortamların (Uygulamaların) BGD İçerikleri			SİTOKİNİN						
			0	BA			TDZ		
				0.5 (mg/L)	1 (mg/L)	2 (mg/L)	0.5 (mg/L)	1 (mg/L)	2 (mg/L)
OKSİN	2,4 D	1 (mg/L)	1	5	9	13	17	21	25
		2 (mg/L)	2	6	10	14	18	22	26
	NAA	1 (mg/L)	3	7	11	15	19	23	27
		2 (mg/L)	4	8	12	16	20	24	28

Çizelge 3.3. de BGD içerikleri belirtilen uygulamaların yanında, hiçbir BGD nin ilave edilmediği kontrol ortamı da uygulamalara dahil edilmiş, böylece tohum ve yaprak eksplantları toplam 29 ortamda kültüre alınmıştır.

I. grup kallus denemelerinde kullanılan tüm eksplantlar için hazırlanan besin ortamlarına 30 g/L sukroz ve katılaştırıcı olarak 2.5 g/L gelrite ilave edilmiş, ortamlar daha sonra otoklavda sterilize edilmiştir. Çizelge 3.1. ve 3.2. de belirtilen uygulamaları hazırlayabilmek için otoklavdan çıkartılan MS veya NN baz besin ortamına steril laminar flow kabin içerisinde oksin olarak kullanılan 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) veya NAA (naftalen asetik asit)'in 0, 1 ve 2 mg/L ile sitokinin olarak kullanılan BA (benzyladenin) veya TDZ (thidiazuron)'nin 0, 0.5, 1 ve 2 mg/L lik konsantrasyonlarından oluşan BGD'ler ilave edilmiştir.

Genotip A'nın tohum, hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının her birisi için her uygulamada 4'er petri ve her petride 4'er eksplant kültüre alınmıştır (Şekil 3.2.). Petriler ağızları streçlendikten sonra 24°C±1 sıcaklık ve tam karanlık koşullardaki iklim odasına taşınmıştır.

Hipokotil kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarında kallus gelişimini teşvik etmek için eksplantların kenarları bisturi ile kesilerek kültüre alınmıştır. Petrilerin etrafı hava geçirmeyecek şekilde streçlenerek iklim odasında 24°C sıcaklıkta karanlık ortamda alınmıştır. Petriler içerisindeki eksplantların gelişimi ve kallus oluşumları binoküler mikroskop altında düzenli olarak takip edilmiştir.



Şekil 3.2. Bitkilerin yetiştirilmesi ve eksplantların ayrılması

3.2.2.2. II. Grup kallus denemeleri

II. grup kallus denemelerinde genotip olarak Genotip A ve Genotip B ile bu genotiplerin çimlendirilen bitkiciklerine ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları kültüre alınmıştır. Bu denemelerin baz besin ortamı olarak sadece hazır MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortama da 30 g/L sukroz ve 2.5 g/L gelrite ilave edilmiş ve otoklavda sterilize edilmiştir. Çizelge 3.5’de belirtilen II. grup kallus denemelerindeki ortam uygulamalarını hazırlayabilmek için otoklavdan çıkartılan baz besin ortamına steril laminar flow kabin içerisinde yine oksin olarak 2,4-D veya NAA’nın 0, 1 ve 2 mg/L ile sitokinin olarak da BA veya TDZ’nin 0, 0.5, 1 ve 2 mg/L’lik konsantrasyonlarından oluşan BGD’ler çeşitli kombinasyonlarda ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan II. grup kallus deneme ortamlarının numaraları ve içerisindeki BGD’lerin konsantrasyonları şematize edilmiş halde Çizelge 3.4’de ve bunun daha ayrıntılı hali ise Çizelge 3.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. II. grup kallus denemelerinde Genotip A ve Genotip B’ye ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortam uygulamalarının BGD içeriklerinin farklı bir gösterimi

II.Grup Ortamların (Uygulamaların) BGD İçerikleri			SİTOKİNİN						
			0	BA			TDZ		
				0.5 (mg/L)	1 (mg/L)	2 (mg/L)	0.5 (mg/L)	1 (mg/L)	2 (mg/L)
OKSİN	0		1	6	11	16	21	26	31
	2.4 D	1 (mg/L)	2	7	12	17	22	27	32
		2 (mg/L)	3	8	13	18	23	28	33
	NAA	1 (mg/L)	4	9	14	19	24	29	34
		2 (mg/L)	5	10	15	20	25	30	35

Çizelge 3.5. II. grup kallus denemelerinde Genotip A ve B'ye ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı MS ortamlarının BGD içerikleri

OrtamUygulama No	SİTOKİNİN		OKSİN	
	BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)
1 (Kontrol)	-	-	-	-
2	-	-	1	-
3	-	-	2	-
4	-	-	-	1
5	-	-	-	2
6	0.5	-	-	-
7	0.5	-	1	-
8	0.5	-	2	-
9	0.5	-	-	1
10	0.5	-	-	2
11	1	-	-	-
12	1	-	1	-
13	1	-	2	-
14	1	-	-	1
15	1	-	-	2
16	2	-	-	-
17	2	-	1	-
18	2	-	2	-
19	2	-	-	1
20	2	-	-	2
21	-	0.5	-	-
22	-	0.5	1	-
23	-	0.5	2	-
24	-	0.5	-	1
25	-	0.5	-	2
26	-	1	-	-
27	-	1	1	-
28	-	1	2	-
29	-	1	-	1
30	-	1	-	2
31	-	2	-	-
32	-	2	1	-
33	-	2	2	-
34	-	2	-	1
35	-	2	-	2

Çalışmadaki tüm denemelerde hazırlanan bütün ortamların baz ortamları olarak, toz halinde satılan hazır ortamlar (Duchefa Biochemie) kullanılmıştır. Tohum çimlendirme, I. ve II. grup kallus denemelerinde kullanılan MS ve NN besin ortamlarının içerik ve konsantrasyonları Çizelge 3.6'da belirtilmiştir. Ortamların pH'sı 1N KOH veya 1N HCl kullanılarak 5.9'a ayarlanmıştır. Ortam sterilizasyonu 121°C'de 1 atmosfer basınç altındaki otoklavda 20 dakikada yapılmıştır. Kallus denemeleri için kullanılan ortamların BGD'leri DMSO (dimethyl sulfoxide) ve saf su ile çözündürülerek soğuk filtrasyon ile sterilize edilmiş ve otoklavlanan baz ortamlara steril kabin içerisinde eklenmiş, ardından petrilere ortam dağıtımı yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Tohum çimlendirme, I. ve II. grup kallus denemelerinde kullanılan MS ve NN besin ortamlarının içerik ve konsantrasyonları

ORTAMLARDAKİ KİMYASALLAR	ORTAMDAKİ KONSANTRASYON (mg/L)	
	MS	NN
MAKRO ELEMENTLER		
KNO ₃	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	720
MgSO ₄	180	90.27
CaCl ₂	332	166
KH ₂ PO ₄	170	68
MİKRO ELEMENTLER		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	16.90	18.94
H ₃ BO ₃	6.20	10.00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.60	10.00
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025
KI	0.83	-
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	-
DEMİR BİLEŞİĞİ		
FeNa ₂ EDTA	36.70	36.70

Çizelge 3.6'nın devamı

VİTAMİNLER		
Glycine	2.00	2.00
Nicotinic Acid	0.50	5.00
Thiamine-HCl	0.10	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50	0.50
Myo-İnositol	100	100
Folic Acid	-	0.50
Biotin	-	0.05

3.2.2.3. Embriyojenik kallus elde etme amaçlı denemeler

V. hispanica'da somatik embriyogenesis konusunda yapılan herhangi bir literatür bulunmadığı için I. grup kallus denemelerinde kültüre alınan eksplantlar herhangi bir alt kültüre alınmamıştır. Çizelge 3.2'de belirtilen II. grup kallus ortamlarında kültüre alınan eksplantlar ise 6 hafta sonra 2 tip ortama transfer edilmiştir. Bunlar;

- tuzları $\frac{3}{4}$ oranındaki hormonsuz MS ortamı ve
- tuzları $\frac{3}{4}$ oranında ve BGD leri $\frac{1}{2}$ oranındaki MS ortamıdır.

3.2.3. İncelenen özellikler

Petrilerde eksplantlardan gelişen kallusların her birinde gözlem yapılmıştır. Gözlemler genel olarak 2 gruba ayrılabilir. Bunlardan birinci grup; kallus oluşturma (%) ve embriyojenik kallus oluşturma (%) ile kallus özelliklerini ortaya koyan ve tartılı derecelendirme yöntemine göre belirlenen kallus yoğunluğu, kallus rengi ve kallus derecesi gözlemleridir. İkinci grup gözlemler ise kalluslardan meydana gelen farklı morfolojik oluşumlara ait gözlemler olup, bunlar; embriyo oluşumu (%), sürgün oluşumu (%), meristemoid oluşumu (%), öbekenme (%) ve *V. hispanica*'nın karakteristik özelliği olan farklı, yoğun köklenme özelliği ile ilgili kısa kök oluşumu (%), uzun kök oluşumu (%) ve gerçek kök oluşumu (%) gözlemlerinden oluşturulmuştur. Bu gözlemlerin alınışına ait bilgiler şunlardır:

Kallus yoğunluğu: Her bir eksplantdaki kallus gelişimi için 0 ile 5 arasında rakamsal bir değerlendirme yapılmıştır.

- Kallus yok 0
- Çok az 1
- Az 2
- Orta 3
- Yoğun 4
- Çok yoğun 5

Kallus rengi: Her bir eksplantdaki kallus rengi için 1 ile 5 arasında rakamsal bir değerlendirme yapılmıştır.

- Beyaz 1
- Krem 2
- Sarı 3
- Kahverengi 4
- Yeşil 5

Kallus derecesi: Her bir eksplantdaki kallus derecesi için 1 ile 5 arasında rakamsal bir değerlendirme yapılmıştır.

- Kararmış 1
- Canlı, hiç kallus yok 2
- Yalnızca kesim yüzeyinde 3
- Eksplantın diğer yüzeyinde 4
- Tamamen kallus kaplı 5

Kallus oluşturma (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

Embriyojenik kallus oluşturma(%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan embriyojenik kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınmıştır.

Embriyo oluşumu (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan embriyo oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir (bu tez çalışmasında elde edilen embriyolar globular aşamadaki embriyolar olarak değerlendirilmiştir. Bu embriyoların gelişiminin takibi kısıtlı süre nedeniyle yapılamamıştır).

Sürgün oluşumu (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan sürgün oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

Kısa kök oluşumu (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan kısa kök [bilinen saçaklı kök yapısından farklı olarak sadece kısa saçsı (hairy) kök] oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

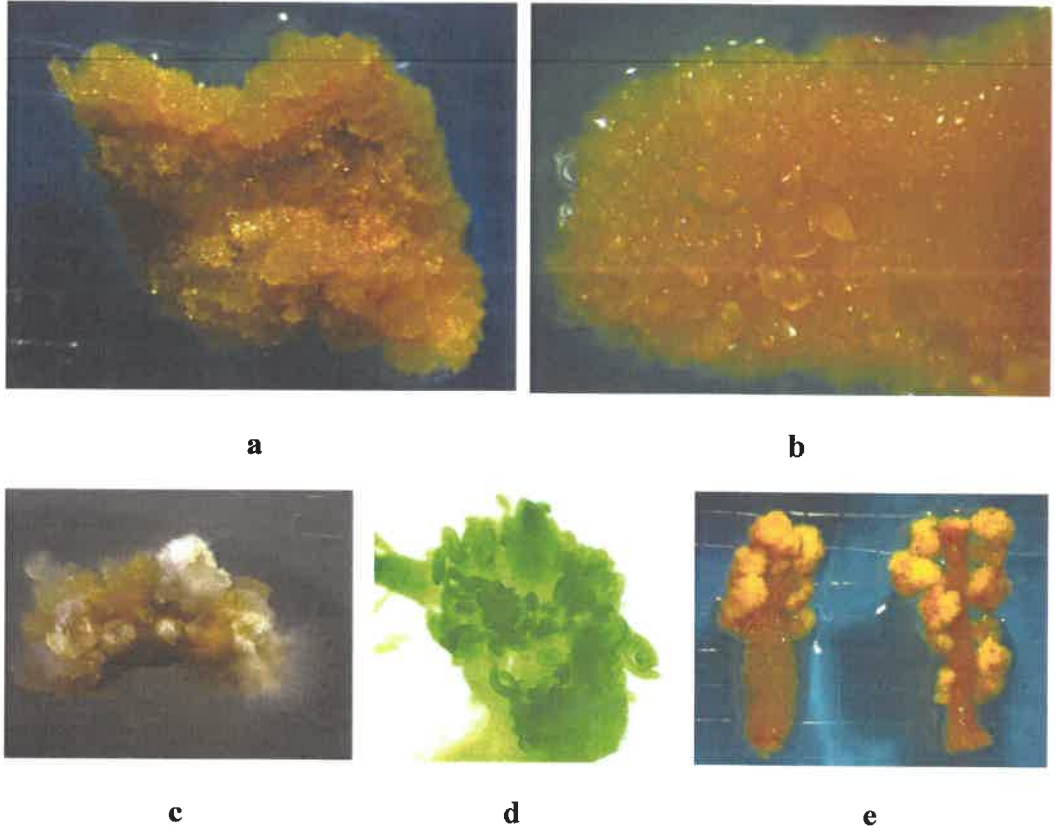
Uzun kök oluşumu (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan uzun kök (bilinen saçaklı kök yapısından farklı olarak saçak oluşturmada uzayıp giden kök)oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

Gerçek kök oluşumu (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan gerçek (saçaklı) kök oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

Meristemoid oluşumu (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan meristemoid oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

Öbeklenme (%): Her bir petride kültüre alınan eksplantlardan öbekli kallus yapısı oluşturanların, petrideki eksplant sayısına göre yüzdesi alınarak ifade edilmiştir.

İncelenen özelliklere ait bazı görüntüler Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Kalluslarda incelenen özelliklerden bazı görüntüler; a) ve b) embriyojenik kallus görüntüsü; c) kısa kök gelişimi; d) meristemoid oluşumlar ve bu bölgelerden gelişen çoklu sürgünler; e) öbeklenme

Gözlem verilerine dayalı olarak elde edilen deneme verilerinin varyans analizleri ve interaksiyonları SAS istatistik programında yapılmış, genotipler ve uygulamalar arasındaki farklılıkların tespiti için Tukey testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. I. Grup Kallus Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

Genotip olarak sadece Genotip-A da yürütülen I. grup kallus denemelerinde *in vitro* koşullarda yetiştirilen stok bitkilerden alınan hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları farklı besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bunlardan hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantları MS ve NN bazal besin ortamlarının her birisi için çeşitli BGD ilaveleri ile oluşturulan 8'er ortamda, yaprak eksplantı ise MS bazal besin ortamı için modifiye edilen 29 besin ortamında kallus oluşturmaları yönünden incelenmiştir.

Hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarından elde edilen bulgular

Hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarında kurulan kallus kültürü denemelerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bazal besin ortamı (BBO), eksplant (E) ve besin ortamı (BO) şeklindeki 3 bağımsız değişken ve bunların kendi aralarındaki ikili varyans analizleri ve interaksyonlarına ait sonuçlar Çizelge 4.2.'de BBO*E*BO'den oluşan üçlü interaksiyon sonuçları ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1'e göre BBO incelenen eksplant ve BO'nun etkisinden bağımsız olarak 12 özellik bakımından; kallus yoğunluğu, kallus rengi, kısa kök ve öbeklenme üzerinde $p < 0.001$ düzeyinde çok önemli farklılıklar oluştururken, kallus oluşturma yönünden $p < 0.05$ seviyesinde farklılık meydana getirmiştir. Kallus derecesi, embriyojenik kallus oluşturma (EKO), embriyo, uzun kök, gerçek kök ve meristemoid oluşturma üzerine ise BBO'nun önemli bir etkisi ortaya çıkmamıştır. BBO'lardan MS ortamı (% 99.48) kallus oluşturma yönünden NN ortamına (% 95.31) göre daha başarılı bulunmuştur (Çizelge 4.2). Çalışmanın ana hedefi olan EKO yönünden ise anlamlı bir fark olmasa da MS ortamı (% 52.60) daha başarılı sonuç ortaya koymuştur. Sürgün oluşumu sadece MS ortamında meydana gelmiştir. Bu MS ortamı ayrıca *V. hispanica* da karakteristik olarak yaygın şekilde görülen kısa kök (saçsı kök) (% 10.94) özelliği yönünden 3.5 kat, öbeklenme özelliği (%44.79) yönünden ise 2.5 kat daha fazla oranda NN ortamından daha etkili bulunmuştur. Genel olarak MS ortamı NN ortamına göre kallus özellikleri üzerinde daha yüksek ortalamalar oluşturmuştur (Çizelge 4.2). Bu nedenle II. grup kallus denemelerine MS ortamı ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi eksplant tipleri BBO ve BO'dan bağımsız olarak; kallus özellikleri üzerinde, kallus rengi ve globular embriyo oluşturma özelliği hariç, diğer tüm özellikler üzerinde farklı önem seviyelerinde, özellikle EKO üzerinde $p < 0.001$ düzeyinde farklılık oluşturmuştur. Çizelge 4.2'ye göre eksplantlardan hipokotil, kallus oluşturma (%100), EKO (% 62.50), uzun kök (%9.38) gerçek kök (% 8.59) ve meristemoid (%7.81) oluşturma yönünden diğer eksplantlardan daha yüksek ortalamalar oluşturmuştur. Boğum arası eksplantı ise tüm eksplant tipleri arasında % 2.34 oranında sürgün oluşumu sağlayan tek eksplant olmuştur. Kotiledon eksplantı ise % 16.41 oranında kısa kök ve % 43.75 oranında öbeklenme oluşumu yönünden diğer eksplantlardan yaklaşık 2 kat daha başarılı bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. *V. hispanica*'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A da hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarıyla 8 besin ortamında yapılan denemelere ait verilerin analiz sonuçları

Faktörler	S.D.	İncelenen Özellikler											
		Kallus Oluşturma (%)	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Kallus Derecesi	Embriyojenik Kallus Oluşturma (%)	Globular Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemoid (%)	Öbeklenme (%)
Bazal Besin Ortamı (BBO)	1	0.0107 *	0.0002 ***	<.0001 ***	0.2588 öd	0.2957 öd	öd	0.0412 *	<.0001 ***	1 öd	0.743 öd	0.406 öd	<.0001 ***
Eksplant Tipi (E)	2	0.0051 **	0.0001 ***	0.5367 öd	<.0001 ***	0.0002 ***	öd	0.0158 *	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0241 *	<.0001 ***
Besin Ortamları (BO)	7	0.3514 öd	0.0014 **	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	öd	0.0002 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0024 **	<.0001 ***
BBO*E	2	0.0574 öd	<.0001 ***	0.0001 ***	<.0001 ***	0.3633 öd	öd	0.0158 *	0.0011 **	1 öd	0.4713 öd	<.0001 ***	0.5487 öd
BBO*BO	7	0.9764 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0255 *	0.0002 ***	öd	0.0002 ***	<.0001 ***	0.0003 ***	0.0251 *	0.2061 öd	<.0001 ***
E*BO	14	0.7074 öd	<.0001 ***	0.0004 ***	<.0001 ***	0.0003 ***	öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0081 **	<.0001 ***
BBO*E*BO	14	0.9709 öd	0.0004 ***	0.0003 ***	0.0038 **	0.3221 öd	öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0067 **	0.0001 ***	0.0105 ***
Varyans Katsayısı		0,1633	0.3143	0.3273	0.2124	0.8725	0	9.5612	2.5479	4.2761	4.5933	4.1561	1.1144

Çizelge 4.2. *V. hispanica*'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A da hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı 8 besin ortamından elde edilen kallusların oluşum miktarı, karakteristik ve morfolojik özellikleri üzerine bazal besin ortamları, eksplant ve besin ortamlarının bağımsız etkileri

Faktörler	Kallus Oluşturma a (%)	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Kallus Derecesi	Emb. Kallus Oluşturma (%)	Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemo id (%)	Öbektlenme (%)
Bazal Besin Ortamı (BBO)												
1-MS	99.48 a	2.59 b	2.82 a	4.08	52.60	0.00	1.56 a	10.94 a	3.13	3.65	3.65	44.79 a
2-NN	95.31 b	2.92 a	2.22 b	3.98	47.92	0.00	0.00 b	3.13 b	3.13	3.13	5.21	17.71 b
<i>p</i>	0.0107 **	0.0002 ***	<.0001 ***	0.2588	0.2957	öd	0.0412 *	<.0001 ***	1	0.743	0.406	<.0001 ***
Eksplant (E.)												
Hipokotil	100 a	2.99 a	2.50	4.39 a	62.50 a	0.00	0.00 b	3.13 b	9.38 a	8.59 a	7.81 a	26.56 b
Kotiledon	93.75 b	2.53 b	2.59	3.52 b	48.44 b	0.00	0.00 b	16.41 a	0.00 b	1.56 b	3.91 ab	43.75 a
Boğum arası	98.44 a	2.74 b	2.48	4.20 a	39.84 b	0.00	2.34 a	0.78 b	0.00 b	0.00 b	1.56 b	23.44 b
<i>p</i>	0.0051 **	0.0001 ***	0.5367	<.0001 ***	0.0002 ***	öd	0.0158 *	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0241 *	<.0001 ***
Besin Ortamı (BO)												
1 (Kontrol)	91.67	2.44 d	1.71 c	3.40 b	8.33 c	0.00	6.25 a	0.00 c	16.67 a	14.58 a	4.17 bc	0.00 e
2	97.92	3.04 a	2.46 b	4.29 a	52.08 ab	0.00	0.00 b	6.25 bc	0.00 b	0.00 b	0.00 c	45.83 bc
3	97.92	2.69 b-d	2.71 b	4.06 a	54.17 ab	0.00	0.00 b	10.42 b	0.00 b	2.08 b	0.00 c	14.58 d
4	100.00	2.75 a-d	3.23 a	4.02 a	45.83 b	0.00	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.00 c	10.42 de
5	97.92	2.50 d	2.58 b	4.00 a	64.58 a	0.00	0.00 b	27.08 a	0.00 b	0.00 b	10.42 ab	60.42 a
6	97.92	2.65 cd	2.54 b	4.27 a	62.50 ab	0.00	0.00 b	10.42 b	0.00 b	2.08 b	12.50 a	56.25 ab
7	97.92	2.96 a-c	2.52 b	4.06 a	54.17 ab	0.00	0.00 b	0.00 c	0.00 b	4.17 b	4.17 bc	22.92 d
8	97.92	3.02 ab	2.42 b	4.17 a	60.42 ab	0.00	0.00 b	0.00 c	4.17 b	4.17 b	4.17 bc	39.58 c
<i>p</i>	0.3514	0.0014 **	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	öd	0.0002 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0024 **	<.0001 ***

Çizelge 4.3. *V. hispanica*'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A da hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı 8 besin ortamından elde edilen kallusların oluşum miktarı, karakteristik ve morfolojik özellikleri üzerine bazal besin ortamı*eksplant*besin ortamından oluşan interaksyonlarının etkileri

Faktörler	Kallus Oluşturma (%)	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Kallus Derecesi	Emb. Kallus Oluşturma (%)	Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemo id (%)	Öbekenme (%)
Bazal Besin Ortamları (BBO) (1-MS, 2-NN)*Eksplant (1-Hipokotil, 2-Kotiledon, 3- Boğum arası *Besin Ortamı												
1*1*1	100.00	4.25 a	2.00 1-n	4.58 a-f	0.00	0.00	0.00 b	0.00 d	75.00 a	62.50 a	0.00 c	0.00 f
1*1*2	100.00	3.00 c-g	2.00 1-n	4.21 a-1	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	50.00 cd
1*1*3	100.00	2.50 e-j	2.50 f-k	4.71 a-c	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
1*1*4	100.00	2.50 e-j	3.00 c-g	4.21 a-1	100.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
1*1*5	100.00	2.00 1-l	2.50 f-k	4.21 a-1	100.00	0.00	0.00 b	50.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c	100.00 a
1*1*6	100.00	2.00 1-l	2.50 f-k	4.21 a-1	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	50.00 cd
1*1*7	100.00	3.00 c-g	3.00 c-g	4.71 a-c	100.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
1*1*8	100.00	3.00 c-g	3.00 c-g	4.71 a-c	100.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	100.00 a
1*2*1	87.50	1.25 lm	1.38 n	2.32 n	0.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
1*2*2	100.00	2.25 g-k	3.75 a-c	3.82 d-1	75.00	0.00	0.00 b	25.00 cd	0.00 c	0.00 c	0.00 c	87.50 ab
1*2*3	100.00	2.38 f-k	4.25 a	2.94 j-n	25.00	0.00	0.00 b	12.50 cd	0.00 c	12.50 bc	0.00 c	37.50 c-e
1*2*4	100.00	2.50 e-j	4.13 ab	3.69 g-k	0.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	50.00 cd
1*2*5	100.00	3.25 b-e	1.75 k-n	3.69 g-k	87.50	0.00	0.00 b	100.0 a	0.00 c	0.00 c	37.50 ab	100.00 a
1*2*6	100.00	3.13 c-f	2.75 e-1	3.82 d-1	50.00	0.00	0.00 b	62.50 b	0.00 c	12.50 bc	25.00 b	100.00 a
1*2*7	100.00	3.25 b-e	3.63 a-d	4.07 a-1	62.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	50.00 cd
1*2*8	100.00	3.25 b-e	3.13 c-f	4.19 a-1	75.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
1*3*1	100.00	2.88 d-h	1.38 n	3.98 b-1	25.00	0.00	37.50 a	0.00 d	0.00 c	0.00 c	25.00 b	0.00 f
1*3*2	100.00	2.38 f-k	2.63 e-j	4.48 a-g	25.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
1*3*3	100.00	2.13 h-k	2.50 f-k	4.60 a-f	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	50.00 cd
1*3*4	100.00	2.00 1-l	3.38 b-e	4.35 a-h	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 ef
1*3*5	100.00	1.63 kl	3.63 a-d	3.85 d-1	62.50	0.00	0.00 b	12.50 cd	0.00 c	0.00 c	0.00 c	100.00 a
1*3*6	100.00	1.88 j-1	3.00 c-g	4.10 a-1	37.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
1*3*7	100.00	2.75 d-1	3.00 c-g	4.23 a-1	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
1*3*8	100.00	3.00 c-g	2.88 d-h	4.35 a-h	37.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
2*1*1	100.00	3.38 b-d	2.13 h-n	3.79 f-j	0.00	0.00	0.00 b	0.00 d	25.00 b	25.00 b	0.00 c	0.00 f
2*1*2	100.00	4.00 ab	2.50 f-k	4.79 ab	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*1*3	100.00	3.00 c-g	2.50 f-k	3.79 f-j	100.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*1*4	100.00	2.50 e-j	3.00 c-g	4.29 a-h	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f

Çizelge 4.3.'ün devamı.

2*1*5	100.00	3.00 c-g	2.38 f-l	3.92 c-i	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	25.00 b	25.00 d-f
2*1*6	100.00	3.00 c-g	2.50 f-k	4.79 ab	100.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	50.00 a	50.00 cd
2*1*7	100.00	3.38 b-d	2.25 g-m	4.67 a-d	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	25.00 b	25.00 b	25.00 b	25.00 d-f
2*1*8	100.00	3.38 b-d	2.25 g-m	4.67 a-d	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	25.00 b	25.00 b	25.00 b	25.00 d-f
2*2*1	75.00	0.75 m	1.88 j-n	2.81 l-n	12.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*2*2	87.50	2.88 d-h	1.63 l-n	3.68 g-k	87.50	0.00	0.00 b	12.50 cd	0.00 c	0.00 c	0.00 c	62.50 bc
2*2*3	87.50	2.13 h-k	2.00 i-n	3.43 i-m	62.50	0.00	0.00 b	50.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*2*4	100.00	3.25 b-e	3.13 c-f	2.68 m-n	12.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*2*5	87.50	1.88 j-l	2.50 f-k	3.68 g-k	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	25.00 d-f
2*2*6	87.50	2.63 d-j	1.88 j-n	4.06 a-i	75.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	87.50 ab
2*2*7	100.00	3.25 b-e	1.75 k-n	3.81 e-i	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	25.00 d-f
2*2*8	87.50	2.50 e-j	1.88 j-n	3.56 h-l	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
2*3*1	87.50	2.13 h-k	1.50 mn	2.90 k-n	12.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*3*2	100.00	3.75 a-c	2.25 g-m	4.77 ab	25.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	37.50 c-e
2*3*3	100.00	4.00 ab	2.50 f-k	4.90 a	37.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*3*4	100.00	3.75 a-c	2.75 e-i	4.90 a	62.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*3*5	100.00	3.25 b-e	2.75 e-i	4.65 a-e	37.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 ef
2*3*6	100.00	3.25 b-e	2.63 e-j	4.65 a-e	62.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 ef
2*3*7	87.50	2.13 h-k	1.50 mn	2.90 k-n	12.50	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
2*3*8	100.00	3.00 c-g	1.38 n	3.52 h-m	50.00	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 f
P	0.9709 öd	0.0004 ***	0.0003 ***	0.0038 **	0.3221 öd	öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0067 **	0.0001 ***	0.0105 ***

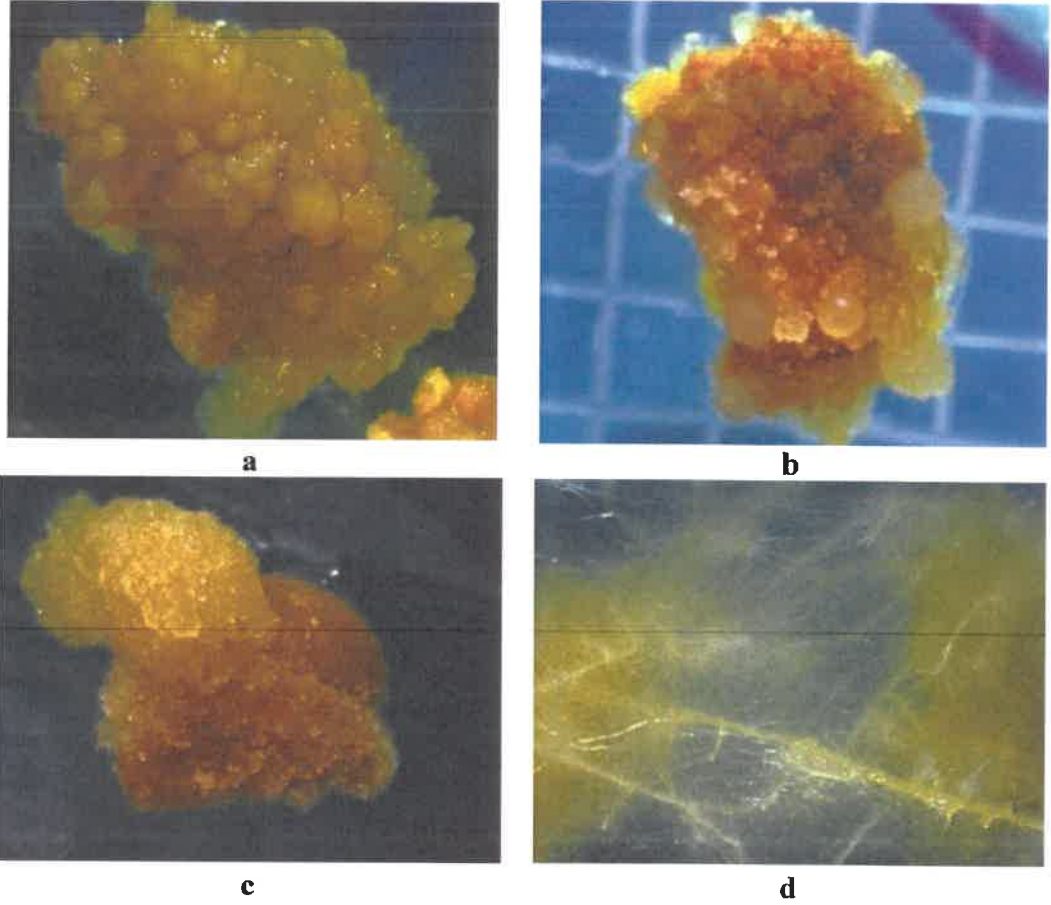
BBO ve eksplant tipinden bağımsız olarak besin ortamları (BO); kallus ve embriyo oluşturma özelliği hariç, diğer tüm özellikler üzerinde farklı düzeylerde, özellikle EKO üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılık oluşturmuştur. (Çizelge 4.1). BO'lardan 5. ortam EKO (% 64.58), kısa kök oluşturma (% 27.08) ve öbeklenme (% 60.42) oluşturma yönünden diğer besin ortamlarından daha yüksek sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.2). 5. ortam içeriği MS + 2 mg/L 2,4-D'den oluşmuştur. I grup denemelerinde tek sürgün oluşumu (% 6.25) ilginç şekilde sadece hiçbir BGD'nin eklenmediği kontrol ortamında gerçekleşmiştir. Bu durum *V. hispanica*'nın içsel sitokinin içeriğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Kontrol ortamında ayrıca hem % 91.67 oranında kallus hem de % 8.33 oranında EKO oluşmuştur. Bunların dışında bu denemelerdeki en yüksek uzun kök (% 16.67) ve gerçek kök (% 14.58) oranları da yine kontrol ortamında meydana gelmiştir. Bu durum ise *V. hispanica*'nın içsel oksin düzeyinin de yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla *V. hispanica*'nın içsel hormon düzeyinin genel olarak yüksek olduğu söylenebilir.

Çalışmada incelenen 12 özelliğin tümü yönünden çok fazla varyans ve interaksiyon analiz sonuçları olduğu ve hepsini burada vermek mümkün olmadığı için bundan sonra genellikle EKO yönünden ve gerekli durumlarda da önemli bazı morfolojik özellikler yönünden, etkili faktörlerin tekli ve üçlü interaksiyonlarına değinilecektir.

Buna göre üçlü interaksiyon sonuçlarının yer aldığı Çizelge 4.1'de BBO*eksplant tipi*BO interaksiyonları kallus oluşturma, EKO ve embriyo oluşturma üzerinde önemli bir farklılığa neden olmazken, EKO dahil diğer tüm kallus özellikleri üzerinde farklı önem seviyelerinde etkiler oluşturmuştur. 1*1*4, 1*1*5, 1*1*7, 1*1*8, 2*1*3, 2*1*6 dan oluşan 6 farklı BBO*eksplant tipi*BO interaksiyonu % 100 EKO oluşturmıştır (Çizelge 4.3). Bu interaksiyonları daha açık bir şekilde ifade etmek gerekirse; MS bazal besin ortamı içerisinde yer alan 4., 5., 7. ve 8. ortamlarda kültüre alınan hipokotil ekplantları ile NN ortamı içerisindeki 3. ve 6. ortamlarda kültüre alınan yine hipokotillerden % 100 oranında EKO meydana gelmiştir.

Üçlü interaksiyonlarda embriyo oluşmazken, bu denemedeki tek sürgün oluşumu 1*3*1 interaksiyonunda yani MS bazal besin ortamı içerisindeki kontrol ortamında ise kültüre alınan hipokotil ekplantlarından % 37.50 oranında oluşmuştur.

I. grup kallus denemelerinde meydana gelen kallus ve bazı morfolojik gelişimlere ait bazı görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. I. grup kallus denemelerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarındameydana gelen kallusve bazı morfolojik bazı morfolojik gelişimlere ait görüntüler; a) ve b) MS besin ortamında 5. ortamda hipokotil eksplantından embriyojenik kallus gelişimi; c) NN'in 6. besin ortamında hipokotil eksplantından embriyojenik kallus gelişimi; d) MS'in 2. besin ortamında yaprak eksplantından saçsı köklerle karışık kök gelişimi

Yaprak ve tohum eksplantlarından elde edilen bulgular:

I. grup kallus denemelerinde tohum eksplantında yapılan denemelerde tohumların tepkileri geç ve karasız olduğu için sonuçlar dikkate alınmamış ve burada yer verilmemiştir.

I. grup kallus denemelerinde yaprak eksplantlarında yapılan kallus kültürleri sadece A genotipi eksplantlarında, bazal besin ortamı MS olan kontrolden başka 28 farklı besin ortamında yapılmıştır. Besin ortamından elde edilen kallus miktarları, özellikleri ve oluşan bazı morfolojik yapılara ait sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Vaccaria hispanica*'da I. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın yaprak eksplantlarıyla 29 besin ortamında yapılan denemelere ait sonuçlar

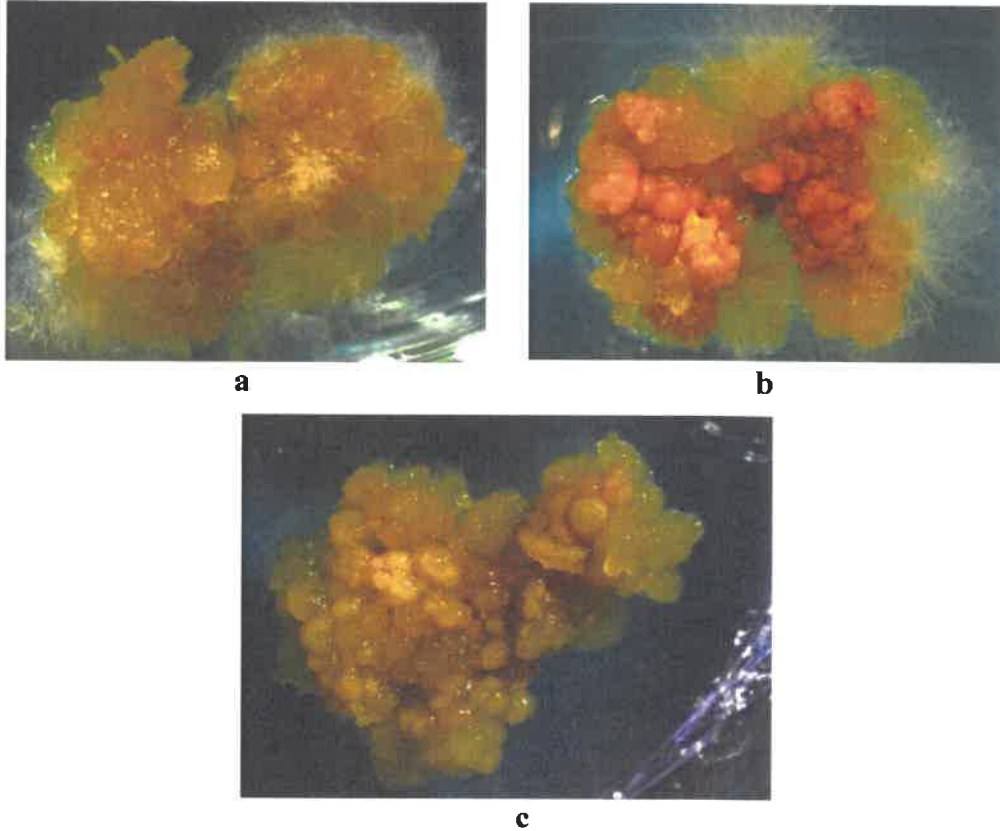
İncelenen Özellikler											
Besin Ortamları	Kallus Oluşturma (%)	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Kallus Derecesi	Emb. Kallus Oluşturma (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemoid (%)	Öbeklenme (%)
Besin Ortamları											
0 (kontrol)	100.00	2.50 a-d	1.50 ı	3.25 g-j	25.00 f-h	0.00	12.50 c	6.25 bc	12.50 d	0.00 e	0.00 e
1	100.00	2.94 a	1.75 hi	3.94 b-d	100.00 a	0.00	100.00 a	0.00 c	68.75 b	93.75 a	100.00 a
2	100.00	2.38 b-e	1.88 hi	3.81 de	100.00 a	0.00	93.75 a	0.00 c	31.25 c	62.50 b	100.00 a
3	100.00	1.56 h-l	2.06 gh	3.56 d-h	0.00 ı	0.00	0.00 d	93.75 a	81.25 a	0.00 e	0.00 e
4	94.00	1.38 j-m	1.50 ı	3.06 ij	0.00 ı	0.00	6.25 cd	87.50 a	87.50 a	0.00 e	0.00 e
5	100.00	1.25 k-m	2.69 de	3.19 h-j	93.75 a	0.00	25.00 b	0.00 c	0.00 e	18.75 c	87.50 ab
6	100.00	1.13 lm	2.81 c-e	2.94 j	68.75 b	0.00	0.00 d	0.00 c	0.00 e	12.50 cd	100.00 a
7	100.00	1.50 l-m	1.88 hi	3.63 d-g	12.50 g-i	0.00	25.00 b	12.50 b	0.00 e	0.00 e	6.25 e
8	100.00	1.81 f-j	2.75 c-e	3.63 d-g	6.25 hi	0.00	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
9	100.00	1.19 k-m	2.38 e-g	3.06 ij	68.75 b	0.00	6.25 cd	0.00 c	0.00 e	6.25 de	87.50 ab
10	100.00	1.38 j-m	2.19 f-h	3.13 ij	37.50 d-f	0.00	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	50.00 cd
11	94.00	1.44 l-m	1.88 hi	3.25 g-j	12.50 g-i	0.00	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
12	100.00	2.25 c-f	2.50 e-g	3.75 d-f	0.00 ı	0.00	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
13	100.00	1.25 k-m	3.06 b-d	3.19 h-j	43.75 c-f	0.00	6.25 cd	0.00 c	0.00 e	6.25 de	75.00 b
14	100.00	1.63 g-k	2.13 f-h	3.19 h-j	50.00 b-e	0.00	6.25 cd	0.00 c	0.00 e	0.00 e	68.75 bc

Çizelge 4.4'ün devamı.

15	100.00	1.06 m	2.38 e-g	3.56 d-h	0.00 i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c	0.00 e	0.00 e
16	100.00	2.06 d-g	3.13 b-d	3.63 d-g	0.00 i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
17	94.00	1.25 k-m	2.69 de	2.94 j	68.75 b	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	37.50 d
18	100.00	1.44 i-m	3.75 a	3.44 e-i	93.75 a	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	31.25 d
19	100.00	2.63 a-c	2.81 c-e	4.25 bc	0.00 i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
20	100.00	2.75 ab	2.50 e-g	4.75 a	0.00 i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 c	0.00 e
21	100.00	1.50 i-m	3.13 b-d	3.38 f-i	56.25 b-d	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	31.25 d
22	100.00	1.19 k-m	3.38 ab	3.38 f-i	93.75 a	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	31.25 d
23	100.00	2.00 e-h	3.06 b-d	3.44 e-i	0.00 i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
24	100.00	2.50 a-d	2.13 f-h	4.31 b	31.25 e-g	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	12.50 cd	0.00 e
25	100.00	1.50 i-m	2.75 c-e	3.69 d-f	62.50 bc	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	43.75 d
26	100.00	1.38 j-m	3.19 bc	3.56 d-h	68.75 b	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	31.25 d
27	100.00	1.56 h-l	2.75 c-e	3.88 cd	0.00 i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
28	100.00	1.88 f-i	2.56 ef	3.94 b-d	12.50 e-i	0.00	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e
P	0.5731 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	öd	0.4677 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Varyasyon Katsayısı	0.0809	0.3638	0.2741	0.1585	0.8697	0	21.5424	1.7435	1.6117	1.7696	2.3133	0.9507

Çizelge 4.4'e göre, besin ortamları; kallus, embriyo ve sürgün oluşturma hariç, incelenen diğer tüm özellikler bakımından $p<0.001$ seviyesinde önemli farklılıklar oluşturmıştır. Kallus oluşturma yönünden, kontrol dahil 25 besin ortamında % 100 oranında kallus meydana gelmiştir. EKO yönünden yaprak eksplantlarında farklı oranlarda sonuç alınmakla birlikte 1. ve 2. ortamdan % 100 oranında en yüksek sonuç alınırken, bunu 5. ve 18. ortam (% 93.75) izlemiştir. 1. ve 2. ortamlar sitokinin içermeyen ortamlar olup, aynı zamanda % 100 oranında en yüksek öbekenme yapıları oluşturan 1. ortama 1 mg/L 2,4-D, 5. ortama ise 2 mg/L 2,4-D ilave edilmiştir. Besin ortamlarından BGD içeren 10 ortamda hiç EKO oluşmamış, kontrol ortamında ise % 25 oranında EKO ve % 22.51 kısa, uzun ve gerçek kök oluşmuştur. Bu durum *V. hispanica*'nın BGD içermeyen kontrol ortamında bile % 100 oranında kallus oluşturuken, bunların ¼'ünün embriyojenik kallusa dönüştüğünü, dolayısıyla yaprak eksplantında yüksek oranda içsel oksin olduğunu ortaya koymaktadır.

EKO oluşturan ortamların hiç birisinden embriyo oluşumu gerçekleşmemiş, 11. (MS + 2 mg/L NAA + 1 mg/L BA) ortamda ise % 6.25 oranında sürgün oluşmuştur. 1. ortamda % 100 oranında kısa kök ve % 93.75 oranında meristemoid, 3. ortamda % 93.75 ve 4. ortamda % 87.50 oranında uzun kök, 3. % oranında % 81.25 ve 4. ortamda % 87.50 oranında en yüksek gerçek kök ile 1.ve 2. ortamlarda ise % 100 oranında en yüksek öbekenme oluşumu meydana gelmiştir. I. grup kallus denemelerinde yaprak eksplantlarından oluşan bazı kallus ve morfolojik oluşumlara ait görüntüler Şekil 4.2. de verilmiştir.



Şekil 4.2. I. grup kallus denemelerinde yaprak eksplantında meydana gelen bazı kallus ve morfolojik gelişimlere ait görüntüler; a) 1. ortamda kısa kök gelişimi; b) 21. ortamda kısa kök ve öbekenme oluşumu; c) 5. ortamda öbekenme oluşumu

4.2. II. Grup Kallus Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

Genotip A ve Genotip B’de yürütülen II. grup kallus denemelerinde *in vitro* koşullarda yetiştirilen stok bitkilerden alınan hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları kontrolden ayrı 34 besin ortamında kültüre alınmıştır. Böylece eksplantlar MS bazal besin ortamı için modifiye edilen 35 besin ortamında kallus ve çeşitli morfolojik oluşumlar yönünden incelenmiştir. Bu ortamlarda kalluslar oluştuktan sonra kalluslar ikiye bölünerek yarısı BGD içermeyen (0 nolu alt kültür ortamında), yarısı ise BGD’li (1 nolu alt kültür ortamında), (oranları başlangıç ortamlarına göre ½ azaltılmış) alt kültür ortamlarında kültüre alınarak, bu ortamların morfolojik oluşumlar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları ile kurulan II. grup kallus kültürlerinin, genotip (G), eksplant (E), besin ortamı (BO) ve alt kültür ortamı (AKO) ile bunların bağımsız tekli, ikili ve üçlü varyans analiz sonuçları Çizelge 4.5’tedir.

Çizelge 4.5. *Vaccaria hispanica*’da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B’ye ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamı ile kurulan denemelerde elde edilen kallusların karakteristik özellikleri üzerine etkili faktörlerin varyans analiz sonuçları

Faktörler	S.D.	İncelenen özellikler				
		Kallus Oluşturma (%)	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Kallus Derecesi	Embriyojenik Kallus Oluşturma (%)
Genotip (G)	1	0.0475 *	<.0001 ***	0.5096 öd	0.8893 öd	<.0001 ***
Eksplant (E)	3	0.0127 *	<.0001 ***	0.0010 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Besin Ortamları (BO)	34	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0000 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
G*E	1	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
G*BO	34	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
E*BO	102	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
G*E*BO	102	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Varyasyon Katsayısı		0.20	0.3669	0.3527	0.2416	0.9972

Çizelge 4.5’e göre genotip; eksplant ve BO’larından bağımsız olarak, incelenen kallus özelliklerinden kallus yoğunluğu ve embriyojenik kallus oluşumu (EKO) üzerinde $p<0.001$ düzeyinde çok önemli farklılıklar oluştururken, kallus oluşturma üzerinde $p<0.05$ düzeyinde farklılık oluşturmuş, kallus rengi ve kallus derecesi üzerinde bir farklılık meydana getirmemiştir.

Eksplant tipi; genotip ve BO'lardan bağımsız olarak, kallus yoğunluğu, kallus rengi, kallus derecesi ve EKO üzerinde $p<0.001$ düzeyinde, kallus oluşturma yönünden $p<0.05$ düzeyinde farklılık oluşturmuştur.

Besin ortamları (BO); genotip ve eksplant tipinden bağımsız şekilde, kallus oluşturma, kallus yoğunluğu, kallus rengi, kallus derecesi ve EKO üzerinde $p<0.001$ seviyesinde çok önemli farklılıklara neden olmuştur.

Çalışmada incelenen 12 özelliğin tümünün varyans ve interaksiyon sonuçlarını burada vermek mümkün olmadığı için bundan sonra genotip, eksplant, BO'dan oluşan kallus oluşturma ve EKO ile bunlardan meydana gelen morfolojik özellikler yönünden faktörlerin tekli ve üçlü interaksiyonlar sonuçlarına yer verilecektir. Genotip A ve Genotip B'nin eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların toplam ve embriyojenik kallus oluşum miktarları ve bunların kallusların özellikleri üzerine genotip, eksplant ve besin ortamlarının bağımsız tekli değişken olarak etkileri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6'ya göre genotipler kallus oluşturma ($p<0.05$) ile kallus yoğunluğu ve EKO ($p<0.01$) üzerinde önemli farklılıklar meydana getirmiştir. Somatik embriyo için kallus oluşturmada genotipin çok etkili bir faktör olduğu bir çok araştırmacı (Rajasekaran ve Mullins, 1983; Stamp ve Meredith, 1988a; Clog ve ark., 1990; Mozsar ve Viczian, 1996) tarafından da belirtilmiştir. Bu çalışmada da Genotip A (% 95.63)'nın kallus oluşturma bakımından Genotip B'ye (% 94.51) göre daha başarılı olduğu görülmüştür. EKO yönünden yine Genotip A (% 40.27), Genotip B'den (% 35.27) daha başarılıdır. Kallus yoğunluğu açısından ise Genotip B (% 2.73), Genotip A'ya (% 2.58) göre daha yüksek sonuç vermiştir. Bu nedenle II. grup kallus denemesinden kallus oluşturma ve EKO yönünden değerlendirildiğinde Genotip A daha başarılı bulunmuştur.

Eksplantlar arasından kotiledon eksplantı kallus oluşturma (% 96.34) açısından $p<0.05$ seviyesinde, kallus yoğunluğu (3.19), kallus rengi (2.68), kallus derecesi (4.09) ve EKO (% 53.39) yönünden ise $p<0.001$ düzeyinde çok önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde eksplantlar arasında kotiledon eksplantının tüm kallus özellikleri üzerinde yüksek ortalama oluşturdıkları belirlenmiştir.

Besin ortamları (BO); incelenen tüm kallus özellikler bakımından $p<0.001$ seviyesinde çok önemli farklılıklar oluşturmuştur. Kallus oluşturma yönünden bakıldığında kontrol dahil bütün ortamlarda kallus oluşumu görülmüştür. En başarılı kallus oluşumu % 100 ortalama ile 8., 18., 28. ve 32. ortamlarda gerçekleşmiştir. Bu ortamların ortak özelliğine bakıldığında (Çizelge 3.4) oksin olarak genellikle 2 mg/L konsantrasyonda 2,4-D'nin kullanıldığı ortamlar olduğu görülmektedir. Ho vd. (1983), şeker kamışından embriyojenik kallusları MS + 0.5 mg/L 2,4-D'li ortamdan elde ettiğini bildirmiştir. Öte yandan, hiçbir BGD'nin kullanılmadığı kontrol grubunda ise % 95.31 gibi çok yüksek oranda kallus gelişiminin olması *V. hispanica*'nın içsel oksin seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.6. *Vaccaria hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B'de hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarıyla 35 besin ortamında kurulan denemelerde elde edilen kallusların çeşitli özellikleri üzerine genotip, eksplant ve besin ortamından oluşan tekli bağımsız değişkenlerin etkileri

Faktörler	Kallus Oluşturma (%)	Kallus Yoğunluğu	Kallus Rengi	Kallus Derecesi	Embriyojenik Kallus Oluşturma (%)
Genotip					
Genotip A	95.63 a	2.58 b	2.59	3.95	40.27 a
Genotip B	94.51 b	2.73 a	2.61	3.95	35.27 b
<i>P</i>	0.0475 *	<.0001 ***	0.5096 öd	0.8893 öd	<.0001 ***
Eksplant					
Hipokotil	95.54 ab	2.55 b	2.58 bc	3.83 b	43.39 b
Kotiledon	96.34 a	3.19 a	2.68 a	4.09 a	53.39 a
Boğum Arası	93.93 c	2.50 b	2.52 c	3.85 b	31.52 c
Yaprak	94.46 bc	2.39 c	2.61 ab	4.03 a	22.77 d
<i>P</i>	0.0127 *	<.0001 ***	0.0010 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Besin Ortamları					
1 (Kontrol)	95.31 b-e	2.46 m-o	1.44 o	3.27 no	7.03 n
2	96.09 a-e	2.77 h-k	2.26 m	3.69 klm	65.63 ab
3	96.88 a-d	2.39 op	2.30 lm	3.66 m	66.41 ab
4	88.28 fg	1.76 r	1.59 no	3.18 o	19.53 m
5	94.53 c-e	1.65 r	1.71 n	2.76 q	23.44 lm
6	78.13 i	1.62 r	1.46 o	2.87 pq	0.00 n
7	96.88 a-d	2.17 pq	3.01 f-h	4.16 f-j	39.84 h-j
8	100.00 a	2.63 k-n	3.35 b-d	4.26 c-h	42.97 f-i
9	98.44 a-c	2.94 f-i	2.67 i-k	4.16 f-j	44.53 e-h
10	95.31 b-e	2.89 f-j	2.49 kl	4.04 h-k	50.00 d-g
11	83.59 gh	1.65 r	1.56 no	3.20 o	0.00 n
12	97.66 a-d	2.46 m-o	3.05 e-g	4.30 b-g	39.06 h-j
13	97.66 a-d	2.79 g-k	3.47 ab	4.18 e-i	53.13 de
14	97.66 a-d	2.93 f-j	2.73 ij	4.10 g-k	43.75 f-h
15	96.88 a-d	3.10 c-f	2.75 ij	4.24 c-i	53.13 de
16	88.28 fg	1.52 r	1.55 no	3.10 op	0.00 n
17	96.88 a-d	2.52 l-o	3.04 fg	4.26 c-h	39.06 h-j
18	100.00 a	2.93 f-j	3.61 a	4.34 b-f	51.56 d-f
19	96.09 a-e	2.52 l-o	2.73 ij	3.95 jk	31.25 j-l
20	96.88 a-d	3.20 b-e	2.80 h-j	4.41 b-d	56.25 cd
21	92.19 ef	2.32 op	1.48 o	3.50 mn	0.00 n
22	99.22 ab	3.05 d-g	3.42 a-c	4.41 b-e	53.13 de
23	98.44 a-c	3.38 ab	3.27 b-e	4.52 b	73.44 a
24	92.19 ef	2.71 i-l	2.63 jk	3.91 kl	41.41 g-i

Çizelge 4.6. 'nın devamı.

25	95.31 b-e	3.09 c-f	2.87 g-i	4.13 f-k	37.50 h-j
26	96.88 a-d	2.44 no	1.77 n	3.95 jk	0.00 n
27	96.09 a-e	3.00 e-h	3.02 f-h	4.32 b-g	51.56 d-f
28	100.00 a	3.54 a	3.20 c-f	4.77 a	73.44 a
29	93.75 de	2.84 f-j	2.72 ij	4.02 i-k	28.13 k-m
30	96.09 a-e	3.20 b-e	2.80 h-j	4.23 d-i	35.94 h-k
31	81.25 hi	2.08 q	1.75 n	3.19 o	0.00 n
32	100.00 a	3.24 b-d	3.08 e-g	4.40 b-e	66.41 ab
33	99.22 ab	3.18 b-e	3.34 b-d	4.47 bc	62.50 bc
34	96.09 a-e	2.70 j-m	2.77 ij	4.15 f-j	37.50 h-j
35	99.22 ab	3.30 a-c	3.19 d-f	4.16 f-j	34.38 i-k
<i>p</i>	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0000 ***	<.0001 ***	<.0001 ***

Kallus yoğunluğu (3.54), kallus derecesi (4.77) ve EKO (% 73.44) özellikleri yönünden de yine 28. ortam (MS + 2 mg/l 2.4- D+1 mg/l TDZ) en yüksek ortalamaları vermiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5'teki ikili interaksiyonlar incelendiğinde; G*E, G*BO ve E*BO interaksiyonlarının tümü kallus oluşturma ve diğer kallus özellikleri üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılıklar ortaya çıkartmıştır.

Çalışmanın ana hedefi olan EKO yönünden ise 23. ortam (% 73.44) ve 28. ortam (% 73.44) en yüksek ortalamaları oluşturmuştur. Bu ortamların ortak özellikleri 2 mg/L 2,4- D içeren ortamlarda 1 veya 2 mg/L TDZ ilave edilmiş olmalarıdır. Hiçbir BGD'nin kullanılmadığı kontrol ortamında ise % 7 oranında EKO oluşmuştur. 6., 11., 16., 21., 26. ve 31. ortamlarda ise hiç EKO oluşmamıştır. Bu ortamların ortak özellikleri ise oksin eklenmeyen sadece sitokinin içeren ortamlar olmalarıdır (Çizelge 3.4). Bu durumda oksin olmayan ortamda sadece sitokinin varlığının EKO'yu olumsuz etkilediği söylenebilir.

Çizelge 4.6 genel olarak değerlendirildiğinde; 28. ortamın (2 mg/L 2.4- D+1 mg/L TDZ) kallus oluşturma (% 100), kallus yoğunluğu (3.54), kallus derecesi (4.77) ve EKO (% 73.44) yönünden en başarılı ortam olduğu ortaya konmuştur. Kallusların embriyojenik yapı kazanmasında, oksin olarak 2,4-D'nin kullanıldığı ortamlara ½ oranında TDZ ilave edilmesinin etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca yüksek değerler ortaya koyan diğer ortamların içeriklerine bakıldığında, hepsinin 2,4-D içerdiği görülmektedir (Çizelge 3.4).

V. hispanica'da II.grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen toplam ve embriyojenik kallus oluşumları üzerine genotip*eksplant*besin ortamı şeklindeki üçlü interaksiyonları etkileri genel olarak daha önce Çizelge 4.5'te verilmişti. Ayrıntılı etkileri ise Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Vaccaria hispanica* 'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A ve Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamının toplam ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine genotip*ekspant*besin ortamından oluşan üçlü etkileşimlerin etkisi

Genotip	Besin Ortam No	İncelenen Özellik							
		Kallus Oluşturma (%)				Embriyojenik Kallus Oluşturma (%)			
		Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
A	1 (Kontrol)	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	100.00 a	0.00 m	0.00 m	12.50 k-m	25.00 i-m
	2	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	81.25 a-d	68.75 b-f	68.75 b-f
	3	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	68.75 b-f	87.50 a-c	81.25 a-d
	4	100.00 a	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	75.00 a-e	0.00 m	37.50 g-k	12.50 k-m
	5	100.00 a	100.00 a	68.75 d-f	100.00 a	25.00 i-m	6.25 lm	12.50 k-m	0.00 m
	6	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0.00 i	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
	7	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	25.00 i-m	37.50 g-k	31.25 h-l	25.00 i-m
	8	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	37.50 g-k	62.50 c-g	31.25 h-l	25.00 i-m
	9	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	56.25 d-h	62.50 c-g	0.00 m
	10	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	37.50 g-k	43.75 f-j
	11	100.00 a	50.00 f-h	100.00 a	100.00 a	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
	12	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	62.50 c-g	37.50 g-k	25.00 i-m	31.25 h-l
	13	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	50 e-i	62.50 c-g	31.25 h-l	25.00 i-m
	14	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	62.50 c-g	62.50 c-g	62.50 c-g	6.25 lm
	15	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	75.00 a-e	12.50 k-m
	16	75.00 c-e	100.00 a	100.00 a	50.00 gh	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
	17	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	62.50 c-g	56.25 d-h	25.00 i-m	12.50 k-m
	18	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	56.25 d-h	56.25 d-h	25.00 i-m
	19	100.00 a	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	37.50 g-k	62.50 c-g	31.25 h-l	0.00 m
	20	100.00 a	100.00 a	100.00 a	81.25 b-d	100.00 a	93.75 ab	68.75 b-f	0.00 m
	21	100.00 a	100.00 a	100.00 a	50.00 gh	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
	22	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	50.00 e-i	31.25 h-l	37.50 g-k
	23	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100 a	87.50 a-c	75.00 a-e

Çizelge 4.7.'nin devamı.

Besin Ortam No	İncelenen Özellik									
	Kallus Oluşturma (%)					Embriyojenik Kallus Oluşturma (%)				
	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak		
A	24	75.00 c-e	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	75.00 a-e	62.50 c-g	43.75 f-j	0.00 m	
	25	100.00 a	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	62.50 c-g	43.75 f-j	50.00 e-i	6.25 lm	
	26	75.00 c-e	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m	
	27	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	87.50 a-c	100.00 a	68.75 b-f	31.25 h-l	37.50 g-k	
	28	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	87.50 a-c	31.25 h-l	
	29	100.00 a	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	25.00 i-m	62.50 c-g	31.25 h-l	12.50 k-m	
	30	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	50.00 e-i	37.50 g-k	31.25 h-l	0.00 m	
	31	50.00 gh	100.00 a	100.00 a	50.00 gh	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m	
	32	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	75.00 a-e	62.50 c-g	56.25 d-h	
	33	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	100.00 a	50.00 e-i	68.75 b-f	81.25 a-d	68.75 b-f	
	34	100.00 a	100.00 a	100.00 a	68.75 d-f	50.00 e-i	62.50 c-g	43.75 f-j	12.50 k-m	
	35	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	0.00 m	50.00 e-i	6.25 lm	18.75 j-m	
	1 (kontrol)	100.00 a	75.00 c-e	100.00 a	100.00 a	0.00 m	0.00 m	12.50 k-m	6.25 lm	
	B	2	87.5 a-c	100.00 a	81.25 b-d	100.00 a	12.50 k-m	87.50 a-c	50.00 e-i	56.25 d-h
3		87.5 a-c	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	25.00 i-m	62.50 c-g	37.50 g-k	68.75 b-f	
4		75.00 c-e	100.00 a	43.75 h	100.00 a	25.00 i-m	6.25 lm	0.00 m	25.00 i-m	
5		100.00 a	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	50.00 e-i	50.00 e-i	25.00 i-m	18.75 j-m	
6		100.00 a	62.50 e-g	81.25 b-d	81.25 b-d	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m	
7		100.00 a	75.00 c-e	100.00 a	100.00 a	50.00 e-i	75.00 a-e	43.75 f-j	31.25 h-l	
8		100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	37.50 g-k	62.50 c-g	43.75 f-j	43.75 f-j	
9		100.00 a	100.00 a	87.5 a-c	100.00 a	12.50 k-m	75.00 a-e	6.25 lm	43.75 f-j	
10		87.50 a-c	100.00 a	75.00 c-e	100.00 a	12.50 k-m	100.00 a	6.25 lm	25.00 i-m	
11		75.00 c-e	75.00 c-e	87.50 a-c	81.25 b-d	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m	
12		87.50 a-c	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	25.00 i-m	87.50 a-c	37.50 g-k	6.25 lm	
13		87.50 a-c	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	62.50 c-g	100.00 a	50.00 e-i	43.75 f-j	
14		100.00 a	100.00 a	81.25 b-d	100.00 a	100.00 a	100.00 a	25.00 i-m	50.00 e-i	

Çizelge 4.7.'nin devamı.

Besin Ortam No	İncelenen Özellik							
	Kallus Oluşturma (%)				Embriyjenik Kallus Oluşturma (%)			
	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
15	87.50 a-c	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	12.50 k-m	100.00 a	6.25 lm	43.75 f-j
16	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	93.75 ab	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
17	87.50 a-c	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	25.00 i-m	87.50 a-c	18.75 j-m	25.00 i-m
18	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	50.00 e-i	75.00 a-e	50.00 e-i	25.00 i-m
19	87.50 a-c	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	75.00 a-e	87.50 a-c	18.75 j-m	12.50 k-m
20	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	37.50 g-k	100.00 a	31.25 h-l	18.75 j-m
21	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	100.00 a	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
22	100.00 a	100.00 a	93.75 ab	100.00 a	75.00 a-e	75.00 a-e	37.50 g-k	43.75 f-j
23	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	100.00 a	87.50 a-c	62.50 c-g	75.00 a-e	0.00 m
24	100.00 a	100.00 a	75.00 c-e	100.00 a	50.00 e-i	87.50 a-c	12.50 k-m	0.00 m
25	75.00 c-e	100.00 a	100.00 a	100.00 a	50.00 e-i	43.75 f-j	25.00 i-m	18.75 j-m
26	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
27	100.00 a	100.00 a	87.50 a-c	100.00 a	62.50 c-g	75.00 a-e	12.50 k-m	25.00 i-m
28	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	100.00 a	25.00 i-m	75.00 a-e
29	87.50 a-c	100.00 a	68.75 d-f	100.00 a	50.00 e-i	62.50 c-g	6.25 lm	12.50 k-m
30	100.00 a	100.00 a	75.00 c-e	100.00 a	75.00 a-e	37.50 g-k	37.50 g-k	18.75 j-m
31	100.00 a	62.50 e-g	100.00 a	87.50 a-c	0.00 m	0.00 m	0.00 m	0.00 m
32	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	87.50 a-c	87.50 a-c	50.00 e-i	37.50 g-k
33	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	62.50 c-g	75.00 a-e	50.00 e-i	43.75 f-j
34	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	37.50 g-k	62.50 c-g	18.75 j-m	12.50 k-m
35	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	75.00 a-e	50.00 e-i	62.50 c-g	12.50 k-m
P	<.0001 ***				<.0001 ***			

Çizelge 4.7'e göre kallus oluşturma ve EKO yönünden incelendiğinde, Genotip A ve Genotip B'nin eksplantlarının kültüre alındığı bütün ortamlarda $p<0.001$ seviyesinde farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlara göre *V. hispanica*'nın kallus oluşturma yönünden tüm eksplantlarının son derece rejeneratif olduğu kabul edilebilir.

Hiçbir BGD içermeyen kontrol ortamlarında Genotip A ve B'nin tüm eksplantlarından neredeyse % 100'e yakın kallus oluşmuş, ancak bunlardan çok azı özellikle de boğum arası ve yaprak eksplantlarından embriyojenik kallusa dönüşmüştür. Hem Genotip A, hem de Genotip B'de boğum arası eksplantları% 12.50 oranında EKO oluşturmaya, yaprak eksplantında ise Genotip A'da % 25, Genotip B'de ise % 6.25 oranında EKO meydana getirmiştir. Hipokotil ve kotiledon eksplantlarından ve kontrol ortamında EKO oluşmamıştır. Buna karşılık kallus oluşturduğu halde Genotip A ve Genotip B'de hiç EKO oluşturmamayan ortamlar 6., 11., 16., 21., 26. ve 35. ortamlar incelendiğinde bunların oksin içermeyen sadece sitokininli ortamlar olduğu görülmektedir. Bu durumda *V.hispanica*'nın içsel oksin seviyesinin kallus oluşturmaya yeterli olduğu ancak oluşan kalluslardan embriyojenik kallusa dönüşebilmeleri için dışarıdan mutlaka BGD ilavesine ihtiyacı olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5 değerlendirildiğinde EKO yönünden $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel yönden farklı sonuçlar elde edilmiştir. BGD'li ortamlara bakıldığında Genotip A 10 farklı ortamda, Genotip B ise 6 farklı ortamda en yüksek EKO (% 100) oranını vermiştir. Genotip A'nın hipokotil eksplantında 2., 3., 9., 10., 15., 20., 23., 27. ve 28. ortamlarda kotiledon eksplantında ise 23. ortamda % 100 oranında elde edilmiştir. Her iki eksplantta birden % 100 EKO oluşumu sadece Genotip A'da 23. ortamda (2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ) meydana gelmiştir. Bu durum I. grup denemelerinden yaprak eksplantında elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Yine Çizelge 4.7'ye göre Genotip B incelendiğinde; 10., 13., 14., 15., 20. ve 28. ortamlarda % 100 oranında EKO kotiledon eksplantlarından meydana gelmiştir. Genotip B'de 28. ortam hariç diğer ortamlar; oksin olarak genellikle 2 mg NAA içeren ortam gruplarına sitokinin olarak BA ilave edilen ortamlardır. Buradan yola çıkarak Genotip B'nin sitokinin olarak BA ve oksin olarak NAA içeren ortamlarda en yüksek oranda EKO ortaya koyduğu görülmektedir

Çizelge 4.7'den elde edilen ilginç bir ortak sonuç olarak; Genotip A'nın hipokotil eksplantları ile Genotip B'nin kotiledon eksplantları 10., 15., 20. ve 28. ortamlarda % 100 oranında EKO oluşturmıştır. Bu ortamların içeriklerine bakıldığında 10. 15. ve 20. ortamların oksin olarak 2 mg/L NAA sitokinin olarak ise sırasıyla 0.5 mg/L, 1 mg/L ve 2 mg/L BA içerdikleri; 28. ortamın ise BGD olarak 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ içeriğine sahip oldukları görülecektir (Çizelge 3.4). Genotip A'da hem hipokotil, hem de kotiledon eksplantlarından en yüksek EKO'yu (% 100) oluşturan ortak ortam ise 23. ortam (MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ) olarak belirlenmiştir.

EKO yönünden Genotip A'da en başarılı eksplantın hipokotil olduğu onu kotiledonun takip ettiği görülmektedir. Genotip B'de ise en başarılı eksplant kotiledon olmuştur (Çizelge 4.7). Bhansal (1990)'ın çalışmasında da narın kotiledon eksplantının somatik embriyogenesis için en etkili eksplant olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.7'ye göre hipokotil ve kotiledon eksplantları gibi % 100 oranında gerçekleşmese de boğum arası ve yaprak eksplantlarından da oldukça yüksek

sayılabilecek oranlarda EKO meydana gelmiştir. Boğum arası eksplantlarından Genotip A'da 3., 23. ve 28. ortamlardan % 87 oranında, Genotip B'de ise 23. ortamdan % 75 oranında EKO oluşmuştur. Yaprak eksplantlarına gelince; Genotip A'dan 3. ve 23. Ortamlardan sırasıyla % 81.25 ve % 75, Genotip B'de ise 28. ortamdan %75 oranında EKO gerçekleşmiştir.

Zhang vd. (2016) *Lilium pumilum*'daki somatik embriyogenesis çalışmasında, pikloram ve NAA'dan oluşan kombinasyonun, eksplant başına 11 somatik embriyo verdiğini ve bu kombinasyonun tüm eksplantların maksimum % 90.7'sinde embriyojenik kallus miktarını arttırdığını bildirmişlerdir. Çizelge 4.7 tüm eksplantlarında yüksek oranda EKO oluşturan ortak bir ortam belirlenmesi yönünden değerlendirildiğinde; Genotip A için 23. ortamı, hipokotil (% 100), kotiledon (% 100), boğum arası (% 87.50) ve yaprak (% 75) eksplantlarının tümünde en yüksek EKO oluşturan tek ortam olarak en başarılı ortam seçilmiştir. Bu ortamı 28 ve 3 nolu ortamlar izlemektedir. Genotip B'de tüm eksplantlarda aynı zamanda yüksek EKO oluşturan ortam seçiminde Genotip A'daki gibi ilk bakışta tek bir ortam ön plana çıkmasa da, özellikle kotiledon (% 100), hipokotil (% 75) ve yaprak (% 75) eksplantlarından aynı anda yüksek EKO'yu 28. ortam sağlamaktadır. Bu ortamı 23. ortamın takip ettiği söylenebilir. Dolayısıyla tüm II. grup kallus denemeleri içinde hem Genotip A, hem de Genotip B'nin tüm eksplantları üzerinde EKO yönünden aynı anda etkili en başarılı ortamların öncelikle 23. daha sonra da 28. ortam olduğu ortaya çıkmıştır. Bu iki ortamın içeriğini hatırlatmak gerekirse; 23. ortam MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ, 28. ortam ise MS + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ'den oluşmaktadır. Embriyojenik kallus eldesi için ortama oksin yanında belli oranda sitokinin eklenmesinin yararı daha önce farklı bitki türlerinde yapılan çok sayıdaki çalışmada ortaya konmuştur. Örneğin Murthy vd. (1996) nohutta yaptıkları bir çalışmada ortama eklenen TDZ'nin BAP'a kıyasla daha somatik embriyo oluşumunda daha başarılı olduğu belirtmişlerdir.

Bu tez çalışmasında kurulan tüm I. ve II. grup kallus denemeleri içerisinde yüksek EKO eldesi yönünden ortak başarılı ortam veya ortamları belirleme noktasında ise; her iki grup için ortak bir baz ortamı, Genotip ve eksplantların kültüre alındığı ortamların sonuçlarını kıyaslamak gerekmektedir. Buna göre her iki grupta MS bazal ortamı ve Genotip A ortak bağımsız değişkenlerdir. Eksplant olarak ise her iki grup denemede farklı sayıda ortamlarda da olsa hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları kültüre alınmıştır. I. grup denemelerinde MS bazal besin ortamında, sadece Genotip A'nın hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı ortamlardaki üçlü interaksiyon sonuçlarının yer aldığı Çizelge 4.3 incelendiğinde; hipokotil eksplantının % 100 (1*1*5), kotiledonun % 87.50 (1*2*5) ve boğum arasının % 62.50 (1*3*5) oran ile en yüksek EKO'yu 5. ortamda oluşturduğu görülecektir. 5. ortam 2 mg/L 2,4-D'den oluşan BGD içeriğine sahiptir (Çizelge 3.1). Bu ortamın yani 5. ortamın I. grup denemelerde yaprak eksplantında da en yüksek EKO'yu oluşturan iki ortamdan birisi olduğu Çizelge 4.4' de görülmektedir. I. grup denemelerindeki bu sonuçları, II. grup deneme sonuçları ile kıyaslamak gerektiğinde, sadece Genotip A'nın dikkate alınması gerekir. Çizelge 4.7'den II. gruptaki Genotip A'ya ait eksplantların EKO sonuçları ise Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de yer alan I. gruptaki Genotip A'ya ait eksplantların ortak ortamlarda ortaya koydukları sonuçlar karşılaştırıldığında; hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantları açısından 3. ortam, yaprak eksplantı açısından ise 3. ve 23. ortamlar en başarılı ortamlardır. Çizelge 4.7'deki 3. ortamın, Çizelge 4.3'teki karşılığı 5. ortam olup bu ortam MS + 2 mg/L 2,4-D içeriğine sahiptir. Çizelge 4.7'deki 23. ortamın, Çizelge

4.4'deki karşılığı 18. ortam olup, bu ortam ise MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ içeriğinden oluşmaktadır.

II. grup kallus denemelerinde incelenen özellikler arasından, kallus özellikleri (kallus oluşturma ve EKO) bundan önceki bölümde detaylı olarak ele alındı. Elde edilen kalluslar alt kültüre alındıktan sonra oluşan morfolojik özellikler ise; embriyo, kısa kök, uzun kök, gerçek kök, meristemoid ve öbeklenme oluşumu yönünden bundan sonra Genotip A ve Genotip B bazında ayrı ayrı incelenmiştir.

Genotip A'nın morfolojik özellikleri bakımından elde edilen bulgular:

II. grup kallus denemelerinde Genotip A'da incelenen morfolojik özellikler üzerine etkide bulunan faktörlerin, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8'e göre eksplant (E), besin ortamları veya alt kültür ortamlarından bağımsız olarak; embriyo oluşumu hariç diğer bütün morfolojik özellikler üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde önemli sonuçlar ortaya koymuştur.

Besin ortamları (BO), eksplant veya alt kültür ortamından bağımsız olarak; embriyo, sürgün, kısa kök, uzun kök, gerçek kök, meristemoid ve öbeklenme üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılıklara neden olmuştur.

Alt kültür ortamı (AKO) ise eksplant veya BO'dan bağımsız olarak; kısa kök ve öbeklenme yönünden $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılık ortaya koyarken; embriyo, sürgün, uzun kök, gerçek kök ve meristemoid oluşumu yönünden farklılık oluşturmamıştır.

İkili interaksiyonlar incelendiğinde; E*BO interaksiyonunda embriyo oluşumu hariç diğer bütün morfolojik özelliklerde $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılıklar elde edilmiştir. E*AKO interaksiyonunda; embriyo, gerçek kök ve meristemoid oluşumunda önemli etki bulunmazken, sürgün ve uzun kök yönünden $p < 0.001$ seviyesinde, kısa kök ve öbeklenme yönünden ise $p < 0.05$ seviyesinde önemli farklılıklar bulunmuştur. BO*AKO interaksiyonunda embriyo ve gerçek kök oluşumu hariç diğer özellikler açısından $p < 0.001$ seviyesinde çok önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.8. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine etki eden faktörlerin varyans analiz sonuçları

İncelenen Özellikler								
Faktörler	S.D.	Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemoid (%)	Öbeklenme (%)
Eksplant (E)	3	0.5421 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Besin Ortamları (BO)	34	0.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0000 ***
Alt kültüre Ortamı (AKO)	1	0.7417 öd	0.6635 öd	<.0001 ***	0.1855 öd	0.8891 öd	0.4325 öd	0.0003 ***
E*BO	102	0.8104 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
E*AKO	3	0.2661 öd	<.0001 ***	0.0304 *	0.0003 ***	0.0534 öd	0.1241 öd	0.0117 *
BO*AKO	34	0.3949 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0010 ***	0.0639 öd	<.0001 ***	<.0001 ***
E*BO*AKO	102	0.0192 *	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Varyasyon Katsayısı		15.4523	9.5766	1.8273	3.8454	3.5356	5.3074	1.3032

II. grup kallus denemelerinde kalluslardan elde edilen morfolojik oluşumları genotipler bazında daha detaylı incelemek gerekirse; Genotip A'nın embriyo, kısa kök, uzun kök, gerçek kök, meristemoid ve öbeklenme oluşumu özellikleri üzerine bağımsız tekli değişkenlerin etkileri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9'a göre eksplantlardan hipokotil eksplantı kısa kök (% 31.79) ve öbeklenme (% 26.43) yönünden, boğum arası eksplantı sürgün oluşumu (% 1.25) yönünden ve yaprak eksplantı ise uzun kök (% 4.11), gerçek kök (% 6.79) ve meristemoid oluşumu (% 3.21) yönünde $p<0.001$ önem seviyesinde en yüksek ortalamaları ortaya çıkartmıştır. Çizelgeye göre kotiledon eksplantından bariz farklılıkta önemli bir sonuç elde edilememiştir.

Alt kültür uygulaması yönünden; hormon içermeyen ortamlar kısa kök (% 13.04) ve öbeklenme (% 16.34) açısından $p<0.001$ seviyesinde farklılık ortaya koyarak en yüksek ortalamayı vermiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine eksplant, besin ortamları ve alt kültür ortamından oluşan bağımsız tekli değişkenlerin etkileri

İncelenen Özellikler							
Faktörler	Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemoid (%)	Öbeklenme (%)
Eksplant							
Hipokotil	0.36	0.71 ab	31.79 a	2.86 b	5.71 ab	2.86 ab	26.43 a
Kotiledon	0.36	0.00 b	5.36 b	2.50 b	3.93 b	0.00 c	12.86 b
Boğum arası	0.18	1.25 a	1.43 c	0.18 c	0.18 c	1.89 b	8.39 c
Yaprak	0.71	0.00 b	5.54 b	4.11 a	6.79 a	3.21 a	11.61 b
<i>p</i>	0.5421 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Alt kültür uygulaması (AKO)							
0 (Hormonsuz)	0.45	0.54	13.04 a	2.14	4.11	2.05	16.34 a
1 (Hormonlu)	0.36	0.45	9.02 b	2.68	4.20	1.79	13.30 b
<i>p</i>	0.7417 öd	0.6635 öd	<.0001 ***	0.1855 öd	0.8891 öd	0.4325 öd	0.0003 ***
Besin Ortamları							
1 (Kontrol)	0.00 b	10.94 a	3.13 f	21.88 b	18.75 b	9.38 bc	0.00 j
2	1.56 b	0.00 c	45.31 a	0.00 c	15.63 b	12.50 ab	100 a
3	6.25 a	0.00 c	25.00 bc	0.00 c	14.06 b	15.63 a	96.88 a
4	0.00 b	6.25 b	28.13 b	29.69 a	43.75 a	6.25 c	6.25 h-j
5	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	32.81 a	39.06 a	9.38 bc	6.25 h-j
6	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
7	0.00 b	0.00 c	39.06 a	0.00 c	3.13 c	0.00 d	32.81 d
8	1.56 b	0.00 c	15.63 d	0.00 c	3.13 c	0.00 d	56.25 b
9	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	1.56 ij
10	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	6.25 c	0.00 j
11	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
12	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	1.56 c	0.00 d	20.31 f
13	1.56 b	0.00 c	14.06 d	0.00 c	0.00 c	0.00 d	48.44 c
14	0.00 b	0.00 c	12.50 de	0.00 c	3.13 c	0.00 d	0.00 j
15	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
16	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
17	0.00 b	0.00 c	18.75 cd	0.00 c	3.13 c	0.00 d	31.25 de
18	1.56 b	0.00 c	14.06 d	0.00 c	0.00 c	0.00 d	23.44 f
19	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
20	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
21	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j

Çizelge 4.9.'un devamı

22	0.00 b	0.00 c	18.75 cd	0.00 c	0.00 c	0.00 d	25.00 f
23	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
24	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
25	0.00 b	0.00 c	12.50 de	0.00 c	0.00 c	0.00 d	7.81 hı
26	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
27	0.00 b	0.00 c	25.00 bc	0.00 c	0.00 c	0.00 d	18.75 fg
28	0.00 b	0.00 c	12.50 de	0.00 c	0.00 c	0.00 d	12.50 gh
29	1.56 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
30	0.00 b	0.00 c	14.06 d	0.00 c	0.00 c	7.81 c	6.25 h-j
31	0.00 b	0.00 c	0.00 f	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
32	0.00 b	0.00 c	12.50 de	0.00 c	0.00 c	0.00 d	21.88 f
33	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
34	0.00 b	0.00 c	6.25 ef	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 j
35	0.00 b	0.00 c	12.50 de	0.00 c	0.00 c	1.56 d	3.13 ij
p	0.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0000 ***

Çizelge 4.9'a göre Genotip A'nın kültüre alındığı besin ortamları arasında en yüksek (% 6.25) embriyo oluşumu MS + 2 mg/L 2,4-D içeriğine sahip 3. ortamda meydana gelmiştir. Matsuta ve Hirabayashi (1989) besin ortamına 2,4-D yerine NAA ve IAA eklendiğinde *Vitis vinifera* hücre hatlarında somatik embriyo uyartımı olmadığını bildirmektedirler. Bu durumda 2,4-D'nin embriyo oluşumu üzerinde önemli bir etkisi olduğu söylenebilir. En yüksek (%10.94) sürgün oluşumu ilginç şekilde BGD içermeyen kontrol ortamında gerçekleşmiştir. En yüksek kısa kök oluşumu 2. (% 45.31) ortamda, en yüksek uzun kök ve gerçek kök oluşumları ise 4. ortamda (MS + 1 mg/l NAA) ve 5. ortamda (MS + 2 mg/l) meydana gelmiştir. Bu durum *V. hispanica*'da özellikle A genotipinde gerçek kök oluşumu üzerinde NAA'nın 2,4-D'den çok daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. En yüksek meristemoid oluşumu yine 3. ortamda (MS + 2 mg/l 2,4-D) %15.63 oranda vermiştir. Embriyojenik kallus oluşumundan etkili bir yapılanma olarak değerlendirilebilecek öbeklenme yönünden ise 2. (%100) ve 3. (% 96.88) ortamlardan en yüksek ortalamalar elde edilmiştir. Bu ortamlar sitokinin içermezken, sırasıyla 1 ve 2 mg/L 2,4-D konsantrasyonunda oksin içeriğine sahiptir.

Genotip A'dan kalluslardan gelişen morfolojik oluşumların en yüksek oranda gerçekleştiği oranlara bakıldığında; bunların neredeyse tümünün sitokinininsiz, sadece oksin içeren ortamlarda meydana geldiği dikkat çekmektedir (Çizelge 4.9).

Genotip A'da üçlü interaksiyonların (eksplant*BO*AKO) etkilerine gelince; bu etkiler 3 farklı grupta incelenmiştir. Embriyo ve sürgün oluşumu ayrı (Çizelge 4.10), köklenme (kısa, uzun, gerçek kök) oluşumu ayrı (Çizelge 4.11) ve meristemoid ile öbeklenme oluşumu üzerine üzerine üçlü interaksiyonların etkisi de yine ayrı (Çizelge 4.12) çizelgelerde incelenmiştir.

V. hispanica'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen

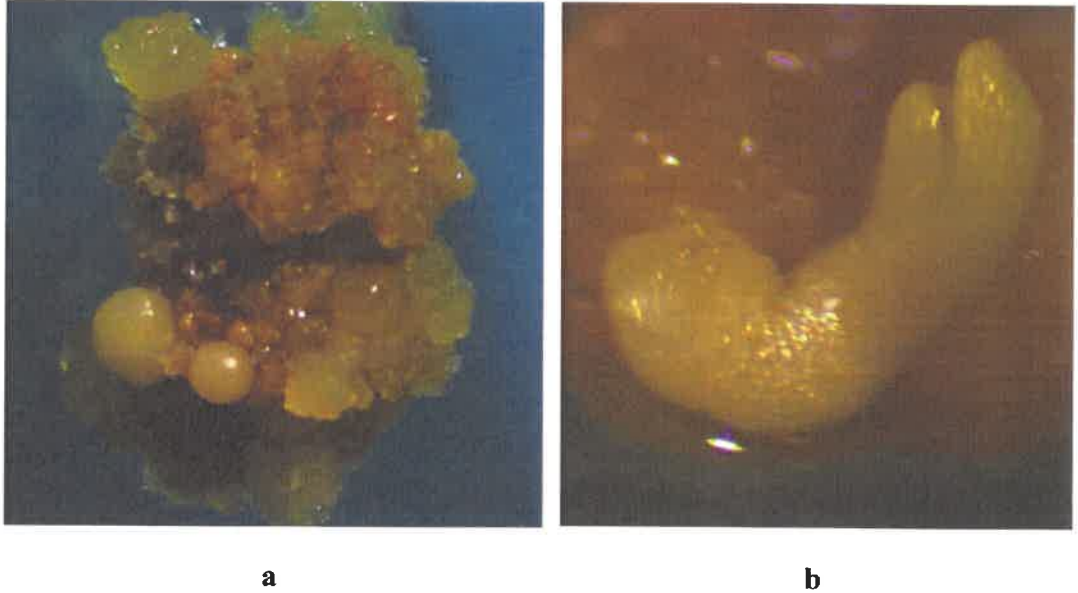
kallusların embriyo ve sürgün oluşumları üzerine üçlü interaksiyonların etkileri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10'a göre üçlü interaksiyon etkisi embriyo oluşumu yönünden önemli bir farklılık ortaya koymazken, sürgün oluşumu yönünden $p<0.001$ seviyesinde istatistiksel yönden önemli farklılıklar ortaya koymuştur. En yüksek embriyo oluşumu (% 25) hipokotil eksplantları önce 3. ortamda (MS + 2 mg/L 2,4-D), daha sonra hormon içermeyen alt kültür ortamında kültüre alındığı ortamda gerçekleşmiştir. Aynı ortamda kotiledon eksplantında % 12.5 oranında embriyo oluşmuştur.

En yüksek sürgün oluşumu (% 75) boğum arası eksplantların BGD içermeyen kontrol ortamına ait hormonsuz alt kültürlerinde kültüre alınan eksplantlarında meydana gelmiştir. Bu durum *V. hispanica*'nın içsel sitokinin düzeyinin de yüksek olduğuna işaret etmektedir. Hipokotil eksplantında ise 4. ortamın hormonlu alt kültür ortamında kültüre alınan eksplantlarda % 50 oranında sürgün meydana gelmiştir. Kotiledon ve yaprak eksplantlarında ise hiç sürgün oluşmamıştır.

Çizelge 4.10. incelendiğinde hem embriyo hem de sürgün gelişiminin kısıtlı ortamlarda gerçekleştiği görülmektedir. Burada önemli bir konuyu vurgulamak gerekirse bu tez çalışmasında elde edilen embriyolar globular aşamadaki embriyolardır. Bu embriyoların gelişiminin takibi kısıtlı süre nedeniyle yapılamamıştır.

Genotip A da hipokotil ve yaprak eksplantında oluşan embriyo gelişimlerini gösteren resimler Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Genotip A'da oluşan globular embriyo gelişimleri: **a)** 3.ortamın (MS + 2 mg/L 2,4-D) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantında meydana gelen globular embriyoların gelişimi; **b)** 18.ortamın (MS + 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BA) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında meydana gelen kotiledon aşamasındaki embriyonun gelişimi

Çizelge 4.10. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların embriyo ve sürgün oluşumları üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri

BO ^x	AKO ^y	İncelenen Özellikler							
		Embriyo Oluşumu (%)				Sürgün Oluşumu (%)			
		Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
1 (Kon- trol)	0 ^z	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	75.00 a	0.00 d
	1 ¹	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	12.50 c	0.00 d
2	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 b	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
3	0	25.00 a	12.50 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 b	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
4	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	50.00 b	0.00 d	0.00 d	0.00 d
5	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
6	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
7	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
8	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	12.50 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
9	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
10	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
11	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
12	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
13	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 b	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
14	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
15	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
16	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
17	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d

Çizelge 4.10.'un devamı.

18	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	12.50 b	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
19	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
20	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
21	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
22	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
23	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
24	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
25	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
26	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
27	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
28	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
29	0	0.00 c	0.00 c	12.50 b	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
30	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
31	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
32	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
33	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
34	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
35	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
<i>p</i>		0.0192 *				<.0001 ***			

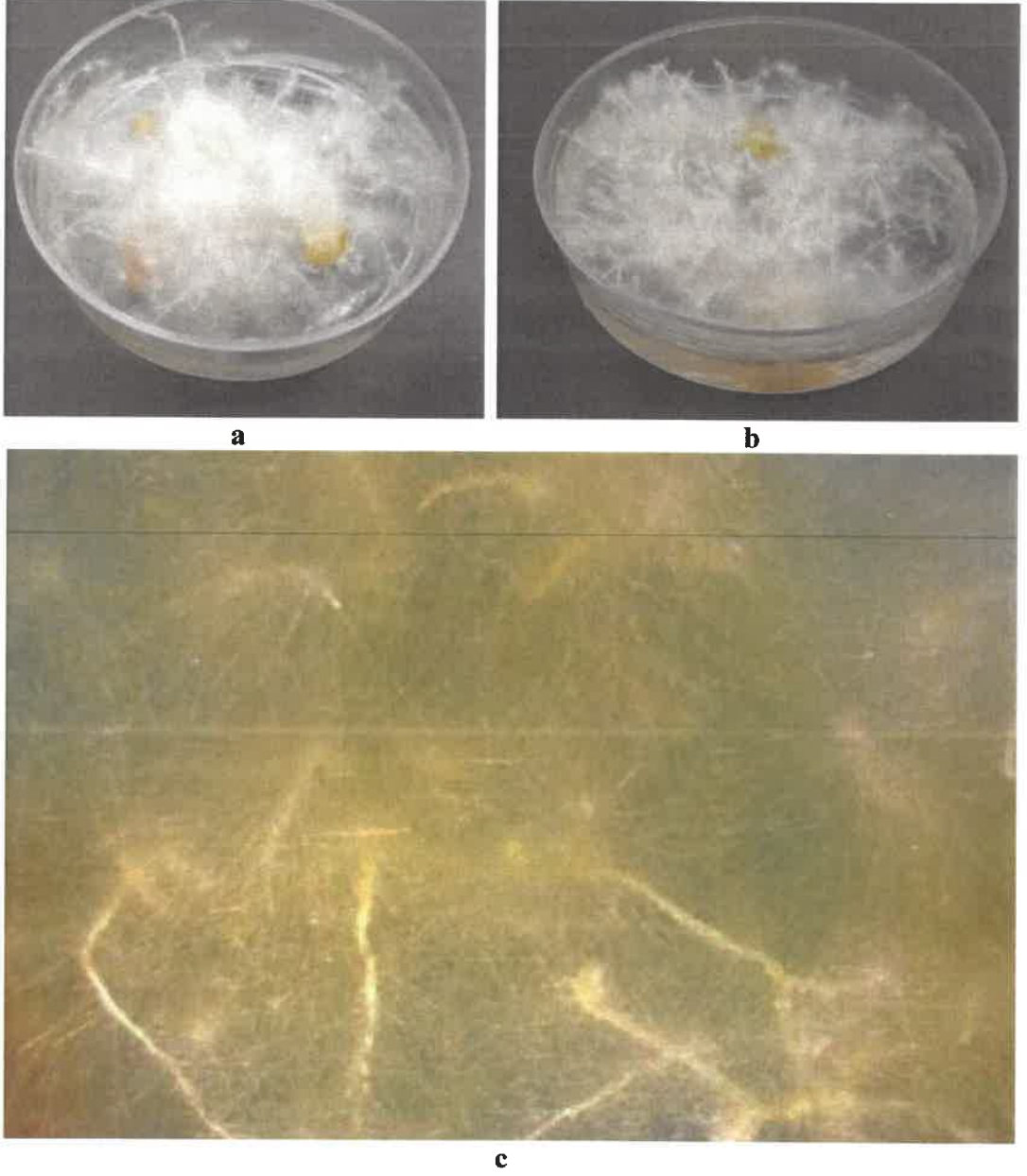
^x: BO= Besin Ortamı, ^y: AKO= Alt Kültür Ortamı, ^z: 0= Hormonsuz Alt Kültür Ortamı, ¹: 1= Hormonlu Alt Kültür Ortamı

Genotip A'da *V. hispanica*'nın karakteristik özelliği olan yoğun köklenme üzerine eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamından oluşan üçlü interaksiyonların etkisi Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11'e göre kısa (saçsı = hairy) kök oluşumu en yoğun şekilde hipokotil eksplantında gerçekleşmiştir. Hipokotillerden 8 farklı ortamdan % 100 oranında kısa kök oluşmuştur. Kotiledon eksplantında ise % 100 oranında kısa köklenme 7. ortamın (MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA) hormonsuz alt kültür ortamında meydana gelmiştir. Kısa kök oluşturma yönünden en aktif eksplantın hipokotil eksplantı, en az tepkili eksplantın ise boğum arası olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11). Uzun kök oluşumu yönünden ise en aktif eksplant yapraktır. En yüksek gerçek kök oluşumu yönünden ise kotiledon eksplantının 5. ortamın hormonsuz alt kültür ortamında ki eksplantlarda % 87.50 oranında gerçek kök meydana gelmiş olsa da gerçek kök oluşturma yönünden yaprak eksplantı ve kotiledon eksplantı yine en aktif eksplant olmuştur. Yakushiji vd., (2003) incirin (*Ficus carica* L.) 'Masui Dauphine' çeşidi üzerinde yaptıkları çalışmada 2,4-D ve TDZ kombinasyonunun phloroglisinol içeren MS ortamında kök oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.11 genel olarak değerlendirildiğinde; kısa kök oluşumunda tüm eksplantlar üzerinde en yüksek ortalamalarının genel olarak sitokininsiz, 2,4-D'li (özellikle MS + 1 mg/L 2,4-D içeren 2. ortamda) ortamlarda, uzun kök ve gerçek kök oluşumunda ise 2 mg/L NAA içeren ortamlarda gerçekleştiği dikkat çekmektedir. Ferreira vd., (2007), Woody plant medium (WPM) ortamına ilave edilen 2 mg/L NAA ve 8 mg/L GA₃ birlikte kullanıldığında, kök uzunluğu ve kök kuru madde ağırlığı üzerinde pozitif etkilerde bulunduğunu bildirmiştir. Boğum arası eksplantı ise en az gerçek kök oluşumunun meydana geldiği eksplant olmuştur. *V. hispanica*'da elde edilen köklenmelere ait bu bulguların ileride yapılabilecek *in vitro* sekonder metabolit çalışmalarında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Genotip A'da meydana gelen kök gelişimlerine ait bazı görüntüler Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. II. grup denemelerde Genotip A'da meydana gelen bazı kök gelişimlerine ait görüntüler; **a)** 7. ortamda kotiledon eksplantında kısa (saçsı) kök gelişimi; **b)** 5. ortamda yaprak eksplantında uzun ve gerçek kök gelişimi; **c)** 2. ortamda yaprak eksplantında yoğun kısa (saçsı) kök gelişiminin görüntüsü

Çizelge 4.11. *V. hispanica* 'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların kısa kök, uzun kök ve gerçek kök oluşumu üzerine üçlü interaksyonların (ekspant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri

BO*	AKO*	İncelenen Özellikler											
		Kısa Kök Oluşumu(%)						Uzun Kök Oluşumu (%)					
		Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
1	0 ²	0.00 h	0.00 h	0.00 h	25.00 fg	50.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	50.00 b	0.00 e	0.00 e	12.50 de
	1 ¹	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	100 a	0.00 g	12.50 f	12.50 f	51.00 b	0.00 e	0.00 e	12.50 de
2	0	100 a	87.50 ab	25.00 fg	62.50 cd	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	52.00 b	37.50 bc	12.50 de	50.00 b
	1	0.00 h	37.50 ef	12.50 gh	37.50 ef	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 cd
3	0	25.00 fg	62.50 cd	37.50 ef	50.00 de	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	50.00 b	0.00 e	0.00 e	12.50 de
	1	0.00 h	12.50 gh	0.00 h	12.50 gh	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	50.00 b
4	0	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	37.50 e	0.00 g	75.00 c	50.00 b	50.00 b	0.00 e	75.00 a
	1	100 a	0.00 h	25.00 fg	0.00 h	50.00 d	0.00 g	0.00 g	75.00 c	50.00 b	50.00 b	0.00 e	75.00 a
5	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	87.50 b	0.00 g	50.00 d	0.00 e	87.50 a	0.00 e	50.00 b
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	50.00 d	0.00 g	75.00 c	50.00 b	50.00 b	0.00 e	75.00 a
6	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
7	0	75.00 bc	100 a	0.00 h	62.50 cd	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 cd
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	25.00 fg	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
8	0	25.00 fg	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	75.00 bc	12.50 gh	0.00 h	12.50 gh	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	25.00 cd	0.00 e	0.00 e	0.00 e
9	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
10	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
11	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
12	0	25.00 fg	12.50 gh	0.00 h	12.50 gh	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	12.50 de
	1	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e

Çizelge 4.11.'in devamı.

13	0	0.00	h	12.50	gh	0.00	h	75.00	bc	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	25.00	fg	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
14	0	25.00	fg	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	75.00	bc	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	25.00	cd	0.00	e	0.00	e
15	0	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	50.00	de	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
16	0	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
17	0	75.00	bc	12.50	gh	0.00	h	12.50	gh	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	50.00	de	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	25.00	cd	0.00	e	0.00	e
18	0	75.00	bc	12.50	gh	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	25.00	fg	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
19	0	25.00	fg	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	25.00	fg	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
20	0	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
21	0	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
22	0	100	a	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	50.00	de	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
23	0	50.00	de	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
24	0	50.00	de	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
25	0	100	a	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
26	0	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	h	0.00	g	0.00	g	0.00	e	0.00	e	0.00	e

Çizelge 4.11.'in devamı.

	0	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 c	0.00 e	0.00 e
27	1	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
28	0	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
29	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
30	0	50.00 de	12.50 gh	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
31	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
32	0	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
33	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
34	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
35	0	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
<i>P</i>			<.0001	****				<.0001	****				<.0001	****

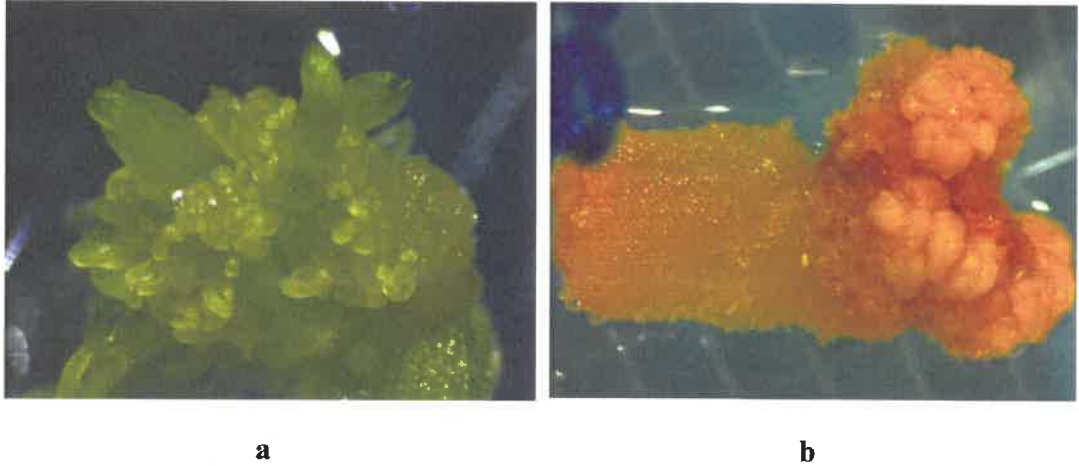
s: BO= Besin Ortamı, y: AKO= Alt Kültür Ortamı, z: 0= Hormonsuz Alt Kültür Ortamı, 1: 1= Hormonlu Alt Kültür Ortamı

Genotip A'da meristemoid ve öbekenme oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür) etkileri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Meristematik hücre bölgeleri olan meristemoidler, Çizelge 4.12'ye göre Genotip A'nın 3. ortamın hormonlu alt kültür ortamında kültüre alınan kalluslarından %75 ortalamayla en yüksek oranda yaprak eksplantından elde edilmiştir. 3. ortam 2 mg/l 2,4-D içeren ortamdır. Bu oranı boğum arası eksplantına ait kontrol ortamının hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan kalluslar % 62.50 ortalamayla takip etmiştir. Meristemoid özelliği yönünden Genotip A'da en rejeneratif eksplant yaprak eksplantı olup, bunu hipokotil ve boğum arası eksplantları izlemiştir. Kotiledonlarda ise hiç meristemoid oluşmamıştır.

Meristemoid oluşumunda farklı eksplantlar farklı oksinlere tepki vermiştir. Örneğin yaprak eksplantı sitokininsiz 2,4-D'li ortamlarda, hipokotil eksplantları genel olarak oksinsiz NAA'lı ortamlarda, boğum arası eksplantları ise hiçbir BGD içermeyen kontrol ortamında en yüksek meristemoidleri oluşturmuştur.

Öbekenme yönünden hipokotil eksplantı 9 ortamda, kotiledon eksplantı 5 ortamda, boğum arası eksplantı 3 ortamda ve yaprak eksplantı 4 ortamda % 100 oranında öbekenme oluşturmuştur. Öbekenme oluşumu yönünden en aktif eksplantın hipokotil olduğu görülmektedir. Çizelge 4.12'ye göre bütün eksplantların sitokinin içermeyen 2. (MS + 1 mg/L 2,4-D) ve 3. (MS + 2 mg/L 2,4-D) ortamlarda en yüksek öbekenme değerlerini oluşturduğu dikkat çekicidir. Dolayısıyla öbekenme oluşumunun büyük oranda sitokininsiz ancak oksin olarak 2,4-D'li ortamlarda meydana geldiği sonucu çıkartılabilir. Şekil 4.4'te Genotip A'da oluşan meristemoid ve öbekenme görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.5. Yaprak ve hipokotil eksplantlarında meristemoid ve öbekenme görüntüleri; **a)** yaprak eksplantında gelişen meristemoid oluşumları ve bu bölgelerden gelişen çoklu sürgünler; **b)** hipokotil eksplantında öbekenme görüntüsü

Çizelge 4.12. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip A'nın hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamında elde edilen kalluslardan meristemoid ve öbeklenme oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkisi

BO ^x	AKO ^y	İncelenen Özellikler							
		Meristemoid (%)				Öbeklenme (%)			
		Hipoko-til	Kotile-don	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
1 (Kon-trol)	0 ^z	0.00 f	0.00 f	62.50 b	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1 ^t	0.00 f	0.00 f	12.50 e	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
2	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 c	100 a	100 a	100 a	100 a
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 c	100 a	100 a	100 a	100 a
3	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 c	100 a	100 a	75.00 bc	100 a
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	75.00 a	100 a	100 a	100 a	100 a
4	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	50.00 c	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
5	0	25.00 d	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	50.00 c	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
6	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
7	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	75.00 bc	100 a	12.50 gh	12.50 gh
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	12.50 gh	50.00 de
8	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	75.00 bc	87.50 ab	12.50 gh	25.00 fg
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	75.00 bc	75.00 bc	37.50 ef	62.50 cd
9	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	12.50 gh	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
10	0	50.00 c	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
11	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
12	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	25.00 fg	12.50 gh	12.50 gh	12.50 gh
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	12.50 gh	12.50 gh	25.00 fg
13	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	75.00 bc	62.50 cd	0.00 h	100 a
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	75.00 bc	12.50 gh	0.00 h	62.50 cd
14	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
15	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
16	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
17	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	100 a	25.00 fg	37.50 ef	25.00 fg
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	12.50 gh	0.00 h

Çizelge 4.12.'nin devamı.

18	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	50.00 de	0.00 h	37.50 ef
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
19	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
20	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
21	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
22	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h
23	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
24	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
25	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	12.50 gh	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
26	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
27	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	100 a	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
28	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
29	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
30	0	0.00 f	0.00 f	37.50 d	0.00 f	0.00 h	25.00 fg	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	25.00 fg	0.00 h	0.00 h
31	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
32	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	100 a	0.00 h	25.00 fg	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	50.00 de	0.00 h	0.00 h	0.00 h
33	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
34	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 h	0.00 h
35	0	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 f	0.00 h	12.50 gh	0.00 h	0.00 h
	1	0.00 f	0.00 f	12.50 e	0.00 f	0.00 h	0.00 h	12.50 gh	0.00 h
<i>P</i>		<.0001***				<.0001***			

^x: BO= Besin Ortamı, ^y: AKO= Alt Kültür Ortamı, ^z: 0= Hormonsuz Alt Kültür Ortamı, ¹: 1= Hormonlu Alt Kültür Ortamı

Genotip B'nin morfolojik özellikleri bakımından elde edilen bulgular:

V. hispanica'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'de incelenen morfolojik özellikler üzerine etki eden faktörlerin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine etki eden faktörlerin varyans analiz sonuçları

Faktörler	S.D.	İncelenen Özellikler						
		Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemoid (%)	Öbeklenme (%)
Eksplant (E)	3	0.0296 *	0.3940 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0131 *	<.0001 ***
Besin Ortamları (BO)	34	<.0001 ***	0.4692 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
Alt Kültür Ortamı (AKO)	1	0.7518 öd	0.3209 öd	0.0007 ***	0.2902 öd	0.0085 **	0.2946 öd	0.0017 **
E*BO	102	0.0020 **	0.4831 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
E*AKO	3	0.3233 öd	0.3940 öd	0.6822 öd	0.0264 *	0.0319 *	0.0026 **	0.2603 öd
BO*AKO	34	<.0001 ***	0.4692 öd	<.0001 ***	0.6752 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***
E*BO*AKO	102	0.0007 ***	0.4831 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0131 *	<.0001 ***	<.0001 ***
Varyasyon Katsayısı		13.5085	47.3284	2.3046	3.7018	2.9252	7.2304	0.8775

Çizelge 4.13'e göre Genotip B'den elde edilen kalluslardan gelişen morfolojik yapılara ait sonuçlar incelendiğinde; BO ve AKO'dan bağımsız olarak eksplantlar (E) kısa, uzun ve gerçek kök ile öbeklenme oluşumunda $p < 0.001$ seviyesinde, embriyo ve meristemoid oluşumunda ise $p < 0.05$ seviyesinde farklılık ortaya koymuştur. Sürgün gelişiminde ise önemli bir fark oluşmamıştır.

Besin ortamları (BO) eksplant ve AKO'dan bağımsız olarak ve (E*BO*AKO) üçlü interaksiyonunda; sürgün oluşumu haricinde diğer tüm morfolojik özellikler yönünden $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılıklar ortaya koymuştur.

Alt kültür ortamı (AKO) ise eksplant ve BO'dan bağımsız şekilde; kısa kök oluşumu yönünden $p < 0.001$ seviyesinde, gerçek kök ve öbeklenme yönünden ise $p < 0.01$ seviyesinde önemli farklılıklar oluştururken diğer özellikler yönünden önemli bir farklılık meydana getirmemiştir.

İkili interaksiyonlardan E*BO interaksiyonu; kısa, uzun ve gerçek kök ile meristemoid ve öbeklenme özellikleri yönünden $p<0.001$ seviyesinde, embriyo oluşumu bakımından ise $p<0.01$ seviyesinde farklılık meydana getirmiş olup, sürgün oluşumunda önemli bir farklılık oluşturmamıştır.

E*AKO ikili interaksiyonunda meristemoid oluşumu yönünden $p<0.01$ seviyesinde, uzun ve gerçek kök oluşumu yönünden ise $p<0.05$ seviyesinde farklılık meydana gelmiş, diğer özellikler bakımından önemli bir fark oluşmamıştır.

BO*AKO ikili interaksiyonunda ise embriyo, kısa kök, gerçek kök, meristemoid ve öbeklenme oluşumu yönünden $p<0.001$ önemli farklar ortaya çıkarken, sürgün ve uzun kök oluşumu yönünden önemli bir farklılık meydana gelmemiştir.

Genotip B'de kalluslardan meydana gelen morfolojik yapılar üzerine eksplant, besin ortamları ve AKO'nun bağımsız etkileri Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamında elde edilen kallusların morfolojik özellikleri üzerine eksplant. Besin ortamları, AKO ve bağımsız tekli değişken olarak etkileri

Faktörler	İncelenen Özellikler						
	Embriyo (%)	Sürgün (%)	Kısa Kök (%)	Uzun Kök (%)	Gerçek Kök (%)	Meristemoid (%)	Öbeklenme (%)
Eksplant							
Hipokotil	0.00 b	0.00	21.43 a	4.29 a	7.14 ab	1.79 a	50.36 a
Kotiledon	1.07 a	0.00	6.79 b	2.86 b	5.71 b	1.79 a	48.33 a
Boğum arası	0.18 b	0.00	1.61 c	0.36 c	1.25 c	0.18 b	22.68 b
Yaprak	0.71 ab	0.18	6.61 b	5.36 a	7.68 a	1.79 a	22.68 b
<i>P</i>	0.0296 *	0.394 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	0.0131 *	<.0001 ***
Alt Kültür Ortamı (AKO)							
0 (Hormonsuz)	0.54	0.00	10.63 a	3.48	6.34 a	1.16	38.13 a
1 (Hormonlu)	0.45	0.09	7.59 b	2.95	4.55 b	1.61	33.90 b
<i>P</i>	0.7518 öd	0.3209 öd	0.0007 ***	0.2902 öd	0.0085 **	0.2946 öd	0.0017 **
Besin Ortamları (uyg)							
1 (kontrol)	0.00 d	0.00	0.00 g	37.50 a	37.50 c	0.00 e	0.00 o
2	4.69 ab	0.00	51.56 a	0.00 b	28.13 d	12.50 b	82.81 a
3	6.25 a	0.00	53.13 a	0.00 b	20.31 e	17.19 a	68.75 b-d
4	0.00 d	0.00	0.00 g	34.38 a	43.75 b	0.00 e	14.06 l-n
5	0.00 d	0.00	1.56 g	37.50 a	53.13 a	7.81 c	20.31 l-n
6	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	0.00 o
7	0.00 d	0.00	21.88 b	0.00 b	3.13 f	0.00 e	70.31 b-d
8	0.00 d	0.00	17.19 bc	0.00 b	0.00 f	0.00 e	78.13 ab
9	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	18.75 l-n
10	0.00 d	1.56	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	21.88 k-m
11	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	0.00 o
12	3.13 bc	0.00	3.13 fg	0.00 b	0.00 f	0.00 e	64.06 c-e

Çizelge 4.14.'ün devamı

13	0.00 d	0.00	20.31 b	0.00 b	1.56 f	0.00 e	71.88 a-c
14	0.00 d	0.00	18.75 bc	0.00 b	0.00 f	1.56 e	42.19 gh
15	0.00 d	0.00	3.13 fg	0.00 b	0.00 f	0.00 e	23.44 j-l
16	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	0.00 o
17	0.00 d	0.00	15.63 cd	0.00 b	0.00 f	0.00 e	54.69 ef
18	0.00 d	0.00	6.25 e-g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	70.31 b-d
19	0.00 d	0.00	0.00 g	3.13 b	3.13 f	0.00 e	32.81 h-k
20	0.00 d	0.00	6.25 e-g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	35.94 h-l
21	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	0.00 o
22	0.00 d	0.00	3.13 fg	0.00 b	0.00 f	0.00 e	64.06 c-e
23	0.00 d	0.00	6.25 e-g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	62.50 c-f
24	0.00 d	0.00	9.38 d-f	0.00 b	0.00 f	0.00 e	34.38 h-j
25	0.00 d	0.00	9.38 d-f	0.00 b	0.00 f	0.00 e	9.38 no
26	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	0.00 o
27	0.00 d	0.00	18.75 bc	0.00 b	0.00 f	0.00 e	59.38 d-f
28	1.56 cd	0.00	3.13 fg	0.00 b	0.00 f	3.13 de	51.56 fg
29	0.00 d	0.00	3.13 fg	0.00 b	0.00 f	0.00 e	10.94 m-o
30	1.56 cd	0.00	9.38 d-f	0.00 b	0.00 f	0.00 e	16.67 l-n
31	0.00 d	0.00	0.00 g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	0.00 o
32	0.00 d	0.00	12.50 c-e	0.00 b	0.00 f	0.00 e	67.19 b-d
33	0.00 d	0.00	6.25 e-g	0.00 b	0.00 f	0.00 e	73.44 a-c
34	0.00 d	0.00	12.50 c-e	0.00 b	0.00 f	0.00 e	15.63 l-n
35	0.00 d	0.00	6.25 e-g	0.00 b	0.00 f	6.25 cd	25.00 i-l
<i>P</i>	<.0001 ***	0.4692 öd	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***	<.0001 ***

Çizelge 4.14'e göre eksplantlardan hipokotil eksplantı, kısa kök (% 21.43) ve öbeklenme (% 50.36) oluşumu yönünden en yüksek ortalamaları oluşturmuştur. Kotiledon eksplantı özellikle embriyo (% 1.07) oluşumu, yaprak eksplantı ise bilhassa uzun kök (% 5.36) ve gerçek kök (% 7.68) oluşumunda en yüksek ortalamaları vermiştir. Boğum arası eksplantında dikkat çeken bir farklılık oluşmamıştır. Hipokotil, kotiledon ve yaprak eksplantları meristemoid oluşumu, yine hipokotil ve kotiledon eksplantları öbeklenme oluşumu yönünden daha başarılı bulunmuştur.

Çizelge 4.4'e göre alt kültür ortamı (AKO) açısından hormonsuz alt kültürler kısa kök yönünden $p < 0.001$ seviyesinde, gerçek kök ve öbeklenme yönünden ise $p < 0.01$ seviyesinde önemli farklılık ortaya koymuştur. Hormon içermeyen alt kültür ortamlarında kültüre alınan kalluslar en yüksek kısa kök (% 10.63), gerçek kök (% 6.34) ve öbeklenme (% 38.13) ortalamalarını meydana getirmiştir.

Çizelge 4.14 besin ortamları yönünden incelendiğinde; sürgün gelişimi hariç diğer bütün özellikler üzerinde $p < 0.001$ seviyesinde çok önemli farklılık ortaya çıkmıştır. En yüksek embriyo oluşumu 3. ortamda (MS + 2 mg/L 2,4-D) % 6.25 ortalama ile gerçekleşmiştir. Tek sürgün gelişimi 10. ortamda (MS + 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA) % 1.56 ortalama ile meydana gelmiştir.

Çizelge 4.14'e göre en yüksek kısa kök oluşumu 2. ortamda ve 3. ortamda % 51.56 ve % 53.13 ortalama ile meydana gelmiştir. Bu ortamlar sırasıyla 2 ve 1 mg/L 2,4-D içeren ortamlardır. En yoğun uzun kök gelişimi BGD içermeyen kontrol ortamında %

37.50, 4. ortamda % 34.38 ve 5. ortamda % 37.50 ortalamaları ile elde edilmiştir. 4. ve 5. ortamların içeriğinde BGD olarak sırasıyla 1 ve 2 mg/L NAA yer almaktadır (Çizelge 3.4). En yüksek gerçek kök oluşumu 5. ortamda (MS + 2 mg/L NAA) %53.13 oranında gerçekleşmiştir. Meristemoid oluşumu 3. ortamda (MS + 2 mg/L 2,4-D) % 17.19 oranında, öbeklenme oluşumu ise 2. ortamda (MS + 1 mg/L 2,4-D) % 82.81 ortalama ile en yüksek ortalamayı oluşturmuştur.

Genotip B'den elde edilen kalluslardan meydana gelen morfolojik yapıların en yüksek oranlardan oluşturan ortamlar incelendiğinde bunların sitokinin içermeyen ortamlar olduğu ve BGD olarak sadece 2,4-D veya NAA'nın 1 veya 2 mg/L konsantrasyonunu içerdikleri görülmektedir.

Genotip B'de üçlü interaksiyonların morfolojik oluşumlar üzerine etkileri tıpkı Genotip A'da olduğu gibi 3 farklı grupta değerlendirilmiştir. Bunlar embriyo ve sürgün oluşumu (Çizelge 4.15), köklenme (kısa, uzun, gerçek kök) (Çizelge 4.16) ile meristemoid ve öbeklenme (Çizelge 4.17) olarak 3 farklı çizelgede incelenmiştir.

V. hispanica'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kalluslardan embriyo ve sürgün oluşumları üzerine üçlü interaksiyonların etkileri Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15'deki üçlü interaksiyonlar Genotip B'de embriyo oluşumu üzerine $p<0.001$ seviyesinde önemli farklılık oluştururken, sürgün oluşumları yönünden önemli farklılık meydana getirmemiştir. Ghazi vd. (1986), soya fasulyesinin olgunlaşmamış embriyolarından somatik embriyogenesinin denemesinde kotiledon eksplantından embriyoları elde etmişlerdir. Genotip B'de de en fazla embriyo oluşumu kotiledon eksplantında, daha sonra yaprak ve onu takiben de boğum arası eksplantında meydana gelmiştir. Hipokotilde hiç embriyo oluşmamıştır. En yüksek embriyo oluşumu kotiledon eksplantında 2. ve 12. ortamın hormonsuz alt kültürleri ile 3. ortamın hormonlu alt kültür ortamında % 25 oranında meydana gelmiştir. Yaprak eksplantında en yüksek embriyo oluşumu (% 25) da yine 3. ortamın hormonlu alt kültür ortamında gerçekleşmiştir. Boğum arasında ise en yüksek embriyo oluşumu oranı % 12.50 olup, 2. ortamın hormonsuz alt kültür ortamında meydana gelmiştir. Genotip B'deki embriyo oluşumunun genel olarak yine en fazla sitokinin içermeyen 2,4-D'li ortamlarda gerçekleştiği söylenebilir.

Çizelge 4.15. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamında elde edilen kalluslardan embriyo ve sürgün oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*uygulama*alt kültür ortamı) etkileri

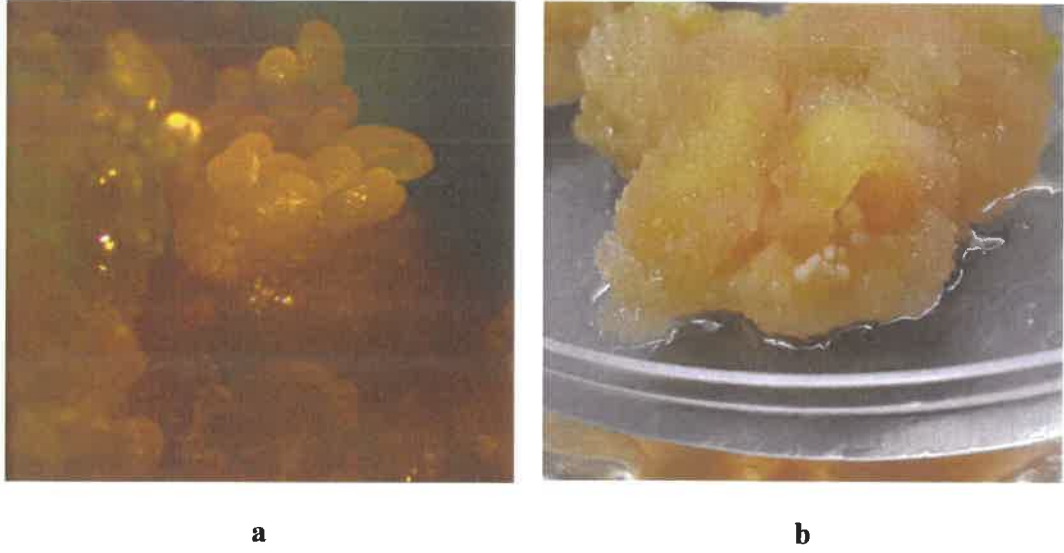
BO ^y	AKO ^y	İncelenen Özellikler							
		Embriyo (%)				Sürgün (%)			
		Hipoko-til	Kotile-don	Boğum Arası	Yaprak	Hipo-kotil	Kotile-don	Boğum Arası	Yaprak
1 (Kon-rol)	0 ^z	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1 ^t	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0	0.00 c	25 a	12.50 b	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	25 a	0.00 c	25 a	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	12.50
11	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0	0.00 c	25 a	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
13	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
16	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
17	0	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00	0.00	0.00

Çizelge 4.15'in devamı

18	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
21	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
22	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
23	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
26	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
27	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	12.50	b	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
29	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	12.50	b	0.00	0.00	0.00	0.00
31	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
32	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
33	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
34	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
35	0	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	c	0.00	0.00	0.00	0.00
P		0.0007 ***								0.4831 öd			

*: BO= Besin Ortamı, *: AKO= Alt Kültür Ortamı, 0= Hormonsuz Alt Kültür Ortamı, 1= Hormonlu Alt Kültür Ortamı

Sürgün gelişimi sadece yaprak eksplantında 10. (2 mg/L NAA+ 0.5 mg/L BA) ortamın hormonlu alt kültürüne alınan ortamda %12.50 oranında elde edilmiştir. Genotip B dekotiledon ve yaprak eksplantında oluşan embriyo gelişimlerini gösteren resimler Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Genotip B’deoluşan embriyo gelişimleri: **a)** 12.ortamın (MS + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BA) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantında meydana gelen embriyoların gelişimleri; **b)** 28.ortamın (MS + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ) hormonsuz alt kültür ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında meydana gelen globular embriyoların gelişimi

Genotip B’de farklı kök oluşumları üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkisi Çizelge 4.16’da verilmiştir

Çizelge 4.16’ya göre Genotip B’de kısa kök ve uzun kök oluşumları yönünden $p<0.001$ seviyesinde, gerçek kök oluşturma yönünden $p<0.05$ önem seviyesinde farklılık meydana gelmiştir.

Kısa kökün en yoğun olduğu eksplant tipi hipokotil olmuştur. Bunu sırasıyla kotiledon, yaprak ve boğum arası izlemiştir. Hipokotil eksplantında 2. ortamın hormonsuz alt kültüründe % 100, kotiledon eksplantında 3. ortamın her iki alt kültür ortamında % 100 ve yaprak eksplantında yine 2. ortamın hormonsuz alt kültür ortamında % 100 oranında kısa kök oluşmuştur. Boğum arası eksplantında önemli seviyede kısa kök oluşumu görülmemiştir. Genotip B’de kısa kök oluşumu, tıpkı Genotip A’da olduğu gibi sitokinin içermeyen, 2,4-D’li ortamlarda (1 veya 2 mg/L) tüm eksplant tiplerinde daha etkili gözükmemektedir.

Çizelge 4.16. *V. hispanica* 'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların kısa kök, uzun kök ve gerçek kök oluşumu üzerine üçlü interaksyonların (ekspant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri

BO*	AKO ^y	İncelenen Özellikler											
		Kısa Kök (%)				Uzun Kök (%)				Gerçek Kök (%)			
		Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
1	0 ^z	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	75.00 a	25.00 d	0.00 e	62.50 b	75.00 b	0.00 e	0.00 e	62.50 bc
	1 ^t	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	62.50 b	75.00 b	0.00 e	0.00 e	62.50 bc
2	0	100 a	50.00 cd	0.00 gh	100 a	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 d	50.00 c	12.50 de	50.00 c
	1	25.00 ef	75.00 b	0.00 gh	62.50 bc	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 d	0.00 e	62.50 bc
3	0	50.00 cd	100 a	25.00 ef	50.00 cd	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 d	25.00 d	25.00 d	12.50 de
	1	25.00 ef	100 a	0.00 gh	75.00 b	50.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 d	0.00 e	25.00 d	25.00 d
4	0	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	50.00 c	0.00 e	62.50 b	75.00 b	50.00 c	0.00 e	62.50 bc
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	75.00 a	50.00 c	0.00 e	62.50 b	50.00 c	50.00 c	0.00 e	62.50 bc
5	0	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	12.50 f-h	0.00 e	0.00 e	25.00 d	62.50 b	100 a	100 a	25.00 d	62.50 bc
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 c	75.00 a	0.00 e	62.50 b	0.00 e	75.00 b	0.00 e	62.50 bc
6	0	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
7	0	50.00 cd	25.00 ef	0.00 gh	75.00 b	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 d	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	25.00 ef	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
8	0	50.00 cd	25.00 ef	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	50.00 cd	0.00 gh	0.00 gh	12.50 f-h	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
9	0	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e	25.00 d	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
10	0	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
11	0	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
12	0	25.00 ef	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
	1	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 gh	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e

Çizelge 4.16.'nın devamı.

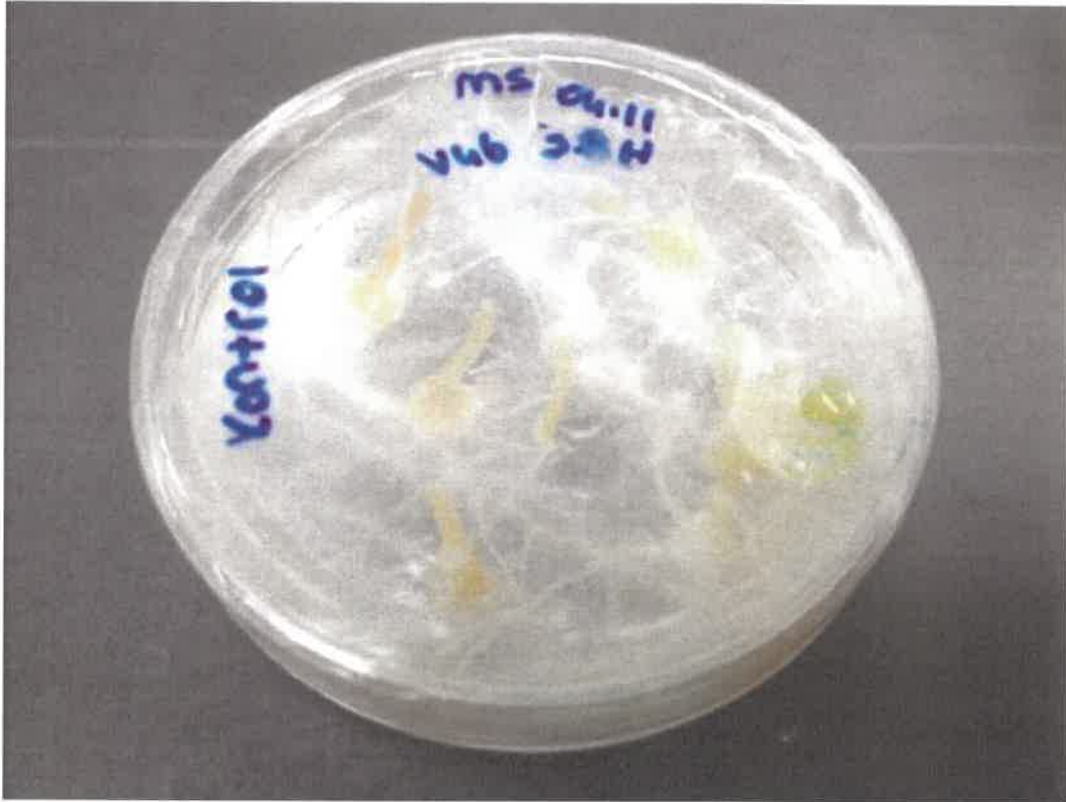
27	0	75.00	b	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	50.00	cd	25.00	ef	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
28	0	25.00	ef	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
29	0	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	25.00	ef	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
30	0	50.00	cd	25.00	ef	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
31	0	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
32	0	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	25.00	ef	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	75.00	b	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
33	0	50.00	cd	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
34	0	25.00	ef	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	75.00	b	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
35	0	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
	1	50.00	cd	0.00	gh	0.00	gh	0.00	gh	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e	0.00	e
P		<.0001 ***										<.0001 ***										0.0131 *	

s: BO= Besin Ortamı, y: AKO= Alt Kültür Ortamı, z: 0= Hormonsuz Alt Kültür Ortamı, t: 1= Hormonlu Alt Kültür Ortamı

Çizelge 4.16'ya göre en yüksek uzun kök oluşumu (% 75) hipokotil eksplantında BGD içermeyen kontrol ortamının hormonsuz alt kültür ortamında ve 4. ortamın (MS + 1 mg/LNAA) hormonlu alt kültür ortamında ve kotiledon eksplantının 5. ortamın hormonlu alt kültür ortamında gerçekleşmiştir. Oksinsiz NAA içeren ortamlarda uzun kök oluşumunun tüm eksplantlar üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Ancak uzun kök oluşumu miktar olarak en fazla yaprak eksplantında ve daha sonra da sırasıyla hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantından oluşmuştur.

Gerçek kök oluşumu hipokotil ve kotiledon eksplantlarında hormonsuz alt kültüre alınan 5. ortamda (MS + 2 mg/l NAA) %100 ortalama ile en yüksek sonucu vermiştir.

Çizelge 4.16'ya göre gerçek kök oluşumu yönünden de yine en fazla köklenme sırasıyla yaprak, hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarında gerçekleşmiştir. En yüksek (% 100) kök oluşumları hipokotil ve kotiledon eksplantlarının 5. ortamın hormonsuz alt kültür ortamlarında kültüre alınan gruplarda elde edilmiştir. Bu ortamın (MS + 2 mg/L NAA) tüm eksplant tiplerinde en yüksek gerçek köklenmeyi oluşturabildiği görülmektedir. Genotip B'de herhangi bir BGD içermeyen kontrol ortamında oluşan kallus ve saçsı kök gelişimlerine ait görüntü Şekil 4.7'de verilmiştir.



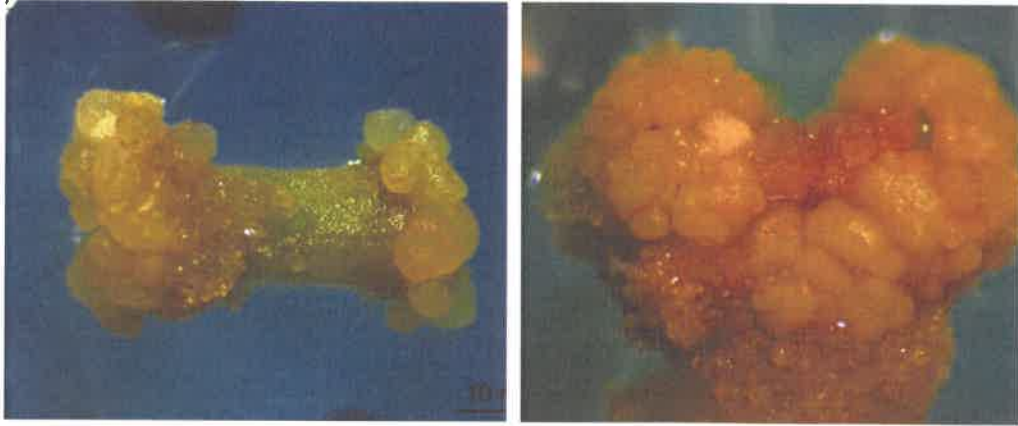
Şekil 4.7. Genotip B'de herhangi bir BGD içermeyen kontrol ortamında oluşan kallus ve saçsı kök gelişimleri

V. hispanica'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kalluslarından meristemoid ve öbeklenme oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların (eksplant*uygulama*alt kültür ortamı) etkileri Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17'ye göre üçlü interaksiyon Genotip B'de meristemoid ve öbeklenme oluşumu üzerine $p < 0.001$ seviyesinde önemli farklılık meydana getirmiştir. En yüksek meristemoid oluşumu % 50 olup hipokotil eksplantında 2, kotiledon ve yaprak eksplantlarında ise 1 ortamda oluşmuştur. Meristemoid oluşumu hipokotil, kotiledon ve yaprak eksplantlarında hemen hemen aynı yoğunlukta gerçekleşirken boğum arası eksplantında ise daha az miktarda meydana gelmiştir. Genel olarak Genotip B'de meristemoid oluşumu için sitokininsiz 2,4-D'li ortamların tüm eksplant tiplerinde aha etkili olduğu görülmektedir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17'deki öbeklenme oluşumu incelendiğinde; Genotip B'nin öbek yapısı oluşturma bakımından çok rejeneratif olduğu söylenebilir. Tüm eksplantlarda farklı sayıda ortamdan % 100 öbeklenme oluştuğu görülmektedir. Örneğin hipokotilde 20, kotiledon da 19, boğum arasında 1 ve yaprak eksplantında 5 ortamda %100 öbeklenme meydana gelmiştir. Bu farklı ortamlar için bir genelleme yapmak gerektiğinde; öbeklenmenin genel olarak 2,4-D'li ortamlarda daha yoğun oluştuğu, bu ortamlar arasından ise sitokininsiz 2,4-D'li ortamların tüm eksplant tiplerinde aynı anda daha fazla etkili olduğu söylenebilir.

Eksplantlar arasında hipokotil ve kotiledon eksplantı bazı eksplantlara göre daha başarılı bulunmuştur. Şekil 4.8'de Genotip B'de hipokotil eksplantlarından elde edilen bazı öbekli yapı görüntüleri verilmiştir



Şekil 4.8. Genotip B'de hipokotil eksplantlarından elde edilen bazı öbekli yapı görüntüleri

Çizelge 4.17. *V. hispanica*'da II. grup kallus kültürlerinde Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı 35 besin ortamından elde edilen kallusların meristemoid ve öbekenme oluşumu üzerine üçlü interaksiyonların(eksplant*besin ortamı*alt kültür ortamı) etkileri

BO*	AKO*	İncelenen Özellikler							
		Meristemoid (%)				Öbekenme (%)			
		Hipo-kotil	Koti-ledon	Boğum Arası	Yaprak	Hipokotil	Kotiledon	Boğum Arası	Yaprak
1 (Kon-trol)	0*	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1*	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
2	0	0.00 d	25.00 b	0.00 d	25.00 b	100 a	100 a	62.50 b-d	100 a
	1	0.00 d	25.00 b	0.00 d	25.00 b	75.00 a-c	100 a	25.00 e-g	100 a
3	0	25.00 b	50.00 a	0.00 d	12.50 c	50.00 c-e	100 a	50.00 c-e	100 a
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 a	50.00 c-e	100 a	0.00 g	100 a
4	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	25.00 e-g	0.00 g	25.00 e-g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	12.50 fg
5	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	50.00 c-e	0.00 g	37.50 d-f
	1	50.00 a	0.00 d	0.00 d	12.50 c	25.00 e-g	0.00 g	0.00 g	25.00 e-g
6	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
7	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	37.50 d-f	87.50 ab
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	50.00 c-e	50.00 c-e	87.50 ab
8	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	75.00 a-c	50.00 c-e	75.00 a-c	100 a
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	75.00 a-c	62.50 b-d	87.50 ab
9	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	25.00 e-g	12.50 fg	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	50.00 c-e	0.00 g	12.50 fg
10	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	50.00 c-e	0.00 g	25.00 e-g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	100 a	0.00 g	0.00 g
11	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
12	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	75.00 a-c	100 a	50.00 c-e	25.00 e-g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	75.00 a-c	100 a	25.00 e-g	62.50 b-d
13	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	75.00 a-c	100 a	62.50 b-d	50.00 c-e
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	50.00 c-e	62.50 b-d	75.00 a-c
14	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	25.00 e-g	25.00 e-g	37.50 d-f
	1	0.00 d	0.00 d	12.50 c	0.00 d	100 a	25.00 e-g	25.00 e-g	0.00 g
15	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	50.00 c-e	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	50.00 c-e	0.00 g	12.50 fg
16	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
17	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	12.50 fg	62.50 b-d
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	50.00 c-e	37.50 d-f	25.00 e-g

Çizelge 4.17.'nin devamı.

18	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	75.00 a-c	62.50 b-d
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	75.0 a-c	50.00 c-e	50.00 c-e
19	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	100 a	0.00 g	12.50 fg
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	75.0 a-c	0.00 g	0.00 g
20	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-c	100 a	12.50 fg	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	100 a	0.00 g	0.00 g
21	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
22	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	75.0 a-c	75.00 a-c	25.00 e-g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	75.00 a-c	75.0 a-c	50.00 c-e	37.50 d-f
23	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	75.00 a-c	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	75.0 a-c	50.00 c-e	0.00 g
24	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	75.0 a-c	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	75.00 a-c	75.0 a-c	0.00 g	0.00 g
25	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	0.00 g	25.00 e-g	0.00 g
26	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
27	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	50.00 c-e	12.50 fg
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	75.0 a-c	25.00 e-g	12.50 fg
28	0	0.00 d	25.0 b	0.00 d	0.00 d	100 a	50.0 c-e	25.00 e-g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	75.0 a-c	50.00 c-e	12.50 fg
29	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	0.00 g	0.00 g	12.50 fg
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	25.00 e-g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
30	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	33.3 ef	0.00 g	0.00 g
31	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	0.00 g	0.00 g	0.00 g
32	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	100 a	25.00 e-g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	75.0 a-c	0.00 g	37.50 d-f
33	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	75.00 a-c	12.50 fg
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	100 a	75.00 a-c	25.00 e-g
34	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	0.00 g	0.00 g	0.00 g
	1	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	50.00 c-e	0.00 g	25.00 e-g	0.00 g
35	0	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 g	25.0 d-g	50.00 c-e	0.00 g
	1	50.0 a	0.00 d	0.00 d	0.00 d	100 a	0.00 g	25.00 e-g	0.00 g
P		<.0001***				<.0001***			

*: BO= Besin Ortamı, †: AKO= Alt Kültür Ortamı, ‡: 0= Hormonsuz Alt Kültür Ortamı, §: 1= Hormonlu Alt Kültür Ortamı

Çalışmada *V. hispanica*'nın kallus, embriyogenik kallus ve çeşitli morfolojik yapıları oluşturma yönünden çok yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu türün son derece rejeneratif olduğu daha önce Arı ve Büyükalaca (2006) tarafından da bildirilmiştir. *V. hispanica*'nın yüksek rejenerasyon yeteneğinin bitkinin içerisindeki içsel hormon seviyesinin yüksekliğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, *in vitro* koşullarda *V. hispanica*'nın özellikle içsel oksin düzeyinin kallus oluşturma yönünden yüksek olmasına rağmen oluşacak kallusların embriyogenik karakter kazanabilmesi ve farklı morfolojik oluşumları meydana getirebilmesi için mutlaka dışsal hormon takviyesine ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bundan sonra farklı genotiplerde yapılacak çalışmalarda *V. hispanica*'nın fitokimyasal içeriklerine göre her genotipin, her bir eksplantının farklı tipte ve seviyede içsel hormon taşıdığı ve bunların her çeşit *in vitro* rejenerasyon çalışmasının sonuçları üzerinde önemli etkilerde bulunacağı dikkate alınmalıdır. Buna göre farklı genotiplerde farklı BGD kombinasyonlarının optimizasyonu gerekli olabilir.

Çalışmada alt kültür ortamları; hem Genotip A hem de Genotip B'de oluşan kalluslardan meydana gelen embriyogenik kallus ve morfolojik yapılar üzerinde istatistiksel olarak çok önemli farklılıklara neden olmamıştır. Genel olarak eksplantların ilk kültüre alındıkları ortamda oluşan kallusların daha sonra aktarıldıkları hormonsuz alt kültür ortamlarında nisbeten daha iyi sonuçların alındığı kabul edilebilir.

Sonuç olarak; birçok besin ortamında *V. hispanica*'nın tüm eksplantlarında yüksek oranda kallus oluşsa bile, tüm eksplantlarda bu kalluslara embriyogenik karakter kazandırabilmek için MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ içeriğine sahip ortamın kullanılmasının son derece etkili olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında literatürde henüz ele alınmamış bir konu olan *Vaccaria hispanica*'da somatik embriyogenesis ile ilgili olarak somatik embriyogenesisin ilk basamağı olan embriyojenik kallusların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla biri nişasta (Genotip A), diğeri saponin (genotip B) içeriği yönünden yüksek iki *V. hispanica* genotipinin *in vitro* koşullarda tohumdan yetiştirilen stok bitkilerine ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantları iki ayrı grup denemede öncelikle kallus oluşturmak üzere kültüre alınmıştır. I. grup denemelerde; Genotip A'nın hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantları MS ve NN bazal besin ortamında oluşturulan 8 besin ortamı uygulamasında kültüre alınırken, yine Genotip A'nın yaprak eksplantları bazal besin ortamı MS olan 29 ortamda kültüre alınmıştır. I. grup kallus denemelerinin bulguları ışığında II. grup kallus denemelerine yön verilmiş ve kapsamı genişletilerek, Genotip A ve Genotip B'nin hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarından her biri bazal besin ortamı MS olan 35 farklı besin ortamı uygulamasında kültüre alınmış, daha sonra bu ortamlarda oluşan kallusların yarısı hormonlu, yarısı hormonsuz alt kültür ortamlarına aktarılmıştır. Besin ortamlarının iki *V. hispanica* genotipinin farklı eksplantlarında meydana getirdiği kallus, embriyojenik kallus, farklı kallus özellikleri ve kallusların çeşitli morfolojik yapıları oluşturma üzerine etkileri gerek genotip, gerek eksplant, gerek besin ortamı ve gerekse alt kültür ortamı bazında araştırılmıştır. Tez çalışmasında kurulan tüm denemelere ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Genotip A'ya ait hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantlarının kültüre alındığı I. grup kallus denemelerinin 1.grubunda eksplant tipleri ve besin ortamlarından bağımsız şekilde, bazal besin ortamı olarak MS ve NN ortamlarının kullanıldığı denemelerde; MS ortamı hem toplam kallus (% 99.5) hem de embriyojenik kallus (% 52.60) oluşturma yönünden daha başarılı bulunmuştur. Sürgün oluşumu sadece MS ortamında meydana gelmiştir. MS ortamı ayrıca *V. hispanica* da karakteristik olarak yaygın şekilde görülen kısa kök (saçsı kök) özelliği yönünden 3.5 kat, öbeklenme özelliği yönünden ise 2.5 kat daha fazla oranda NN ortamından daha etkili bulunmuştur. Genel olarak MS ortamı kallus özellikleri üzerinde NN ortamına göre daha yüksek ortalamalar oluşturmıştır. Bu nedenle II. grup kallus denemelerine MS ortamı ile devam edilmiştir.
- I. grup kallus denemelerinin 1. grubunda bazal besin ortamı – eksplant – besin ortamından oluşan üçlü interaksiyonların etkisinde; 6 farklı interaksiyon koşulunda hipokotillerden % 100 oranında embriyojenik kallus oluşmuştur. En yüksek uzun ve gerçek kök oranları da yine hipokotil eksplantlarında, ancak MS in kontrol ortamında gerçekleşmiştir. Bu durum *V. hispanica*'nın A genotipinde hipokotil eksplantlarının içsel oksin düzeyinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan I. grup kallus denemelerinin 1. grubundaki tek sürgün oluşumu ilginç şekilde MS bazal besin ortamı içerisindeki kontrol ortamında kültüre alınan boğum arası eksplantlarından % 37.50 oranında gerçekleşmiştir. Bu durum ise *V. hispanica*'nın A genotipinde boğum arası eksplantının içsel sitokinin içeriğinin yüksek olduğunu göstermektedir.
- I. grup kallus denemelerinin 1. grubunda hem MS, hem NN baz ortamının hiçbir BGD ilave edilemeyen kontrol ortamlarında üç eksplant tipinden hemen hemen % 100'e yakın kallus oluşmuştur. Bu durum *V. hispanica*'nın içsel oksin seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak bu eksplantlardan boğum

arası hem MS li hem de NN li kontrol ortamında, kotiledon eksplantı ise sadece NN li kontrol ortamında en fazla % 25 oranında embriyojenik kallusa dönüşmüştür.

- Genotip A'ya ait yaprak eksplantının 29 besin ortamında kültüre alındığı I. grup kallus denemelerinin 2. grubunda; kallus oluşturma yönünden kontrol dahil 25 ortamda % 100 oranında kallus meydana gelmiştir. Embriyojenik kallus yönünden ise bu ortamlar arasında en yüksek oran (% 100) hem 1. ortamda (MS + 1 mg/L 2,4-D) hem de 2. ortamda (MS + 2 mg/L 2,4-D) gerçekleşmiştir. Bu iki ortamda ayrıca en yüksek oranda kısa kök, meristemoid ve öbeklenme oluşumları da meydana gelmiş olup, dolayısıyla sitokininsiz 2,4-D içeren ortamların yaprak eksplantında embriyojenik kallus, kısa kök, meristemoid ve öbeklenme yapısı oluşturmada maksimum etkiye sahip olduğu kabul edilebilir. Besin ortamlarından 10 ortamda hiç embriyojenik kallus oluşmamış, kontrol ortamında ise hem % 25 oranında embriyojenik kallus hem de % 12.5 oranlarında kısa, uzun ve gerçek kökler oluşmuştur. Bu durum *V. hispanica*'nın BGD içermeyen kontrol ortamında bile % 100 kallus oluşturuken, bunların ¼'ünün embriyojenik kallusa dönüştüğünü, dolayısıyla *V. hispanica*'nın A genotipinde yaprak eksplantının kallus, oluşumunu teşvik edecek düzeyde içsel oksin düzeyine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan, embriyojenik kallus oluşturan ortamların hiç birisinden embriyo oluşumu gerçekleşmezken, 11. ortamda (MS + 2 mg/L NAA + 1 mg/L BA) % 6.25 oranında sürgün oluşmuştur.
- Genotip A ve Genotip B'ye ait hipokotil, kotiledon, boğum arası ve yaprak eksplantlarının kültüre alındığı II. grup kallus denemelerinde; genotipler eksplant tipleri ve besin ortamlarından, eksplant tipleri genotipler ve besin ortamlarından, besin ortamları ise genotipler ve eksplantlardan bağımsız olarak embriyojenik kallus oluşturma yönünden $p < 0.001$ düzeyinde önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Genotipler arasından Genotip A Genotip B'den, eksplantlar arasından kotiledon diğer eksplantlardan embriyojenik kallus oluşturma yönünden daha başarılı bulunmuştur. 35 besin ortamı arasından 8., 18., 28. ve 32. ortamlar, toplam kallus oluşturma yönünden en yüksek oranda (% 100) kallus meydana getirmiştir. Bu ortamların ortak özellikleri; içeriklerinde çoğunlukla 2 mg/L konsantrasyonda 2,4-D'nin bulunmasıdır. Embriyojenik kallus oluşturma yönünden ise 23. ortam ve 28. ortam en yüksek ortalamaları oluşturmıştır.
- Genotip A ve Genotip B'nin eksplantlarının kültüre alındığı II. grup kallus denemelerinde genotip – eksplant - besin ortamından oluşan üçlü interaksiyonların etkileri toplam kallus ve embriyojenik kallus oluşturma yönünden $p < 0.001$ seviyesinde önemli sonuçlar ortaya koymuştur. Sonuçlara göre *V. hispanica*'nın kallus oluşturma yönünden tüm eksplantlarının son derece rejeneratif olduğu belirlenmiştir. Embriyojenik kallus oluşturma yönünden en başarılı eksplant Genotip A'da hipokotil, Genotip B'de ise kotiledon olmuştur. Genotip A 10 besin ortamında (9 ortamda hipokotil, 1 ortamda kotiledon eksplantı) Genotip B ise 6 ortamda (tümü kotiledon eksplantı) en yüksek embriyojenik kallus oranını (% 100) oluşturmıştır. Her iki eksplantta birden % 100 embriyojenik kallus oluşumu sadece Genotip A'da 23. ortamda (MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ) meydana gelmiştir. Bu sonuç I. grup denemelerinde yaprak eksplantında elde edilen sonuçlarla da uyumludur.

- II. grup kallus denemelerinde yine üçlü interaksiyonların $p < 0.001$ düzeyindeki bir etkisi olarak; hiçbir BGD'nin kullanılmadığı kontrol grubunda ise tıpkı I. grup kallus denemelerinde olduğu gibi tüm eksplant tiplerinde % 100'e yakın kallus oluşurken, bunlardan yine sadece boğum arası ve yaprak eksplantlarından belli oranlarda embriyojenik kallus oluşmuştur. Dolayısıyla *V. hispanica*'nın hem A hem de B genotiplerinde içsel oksin düzeyinin kallus oluşturma yönünden yüksek olduğu, ancak bu kallusların embriyojenik karakter kazanabilmesi için dışsal hormon takviyesine ihtiyaç duyduğu ifade edilebilir.
- II. grup kallus denemelerinde genotiplerin tüm eksplantlarında en yüksek oranda embriyojenik kallus oluşturan ortak bir ortam belirlenmesi yönünden; Genotip A için 23. ortam hipokotil (% 100), kotiledon (% 100), boğum arası (% 87.50) ve yaprak (% 75) eksplantlarının tümünde en yüksek embriyojenik kallus oluşumunu teşvik eden tek ortam olarak belirlenmiştir. Genotip B'de kotiledon (% 100), hipokotil (% 75) ve yaprak (% 75) eksplantlarından aynı anda en yüksek embriyojenik kallusu 28. ortam, boğum arası (% 75) eksplantında ise 23. ortam sağlamaktadır. Dolayısıyla hem Genotip A, hem de Genotip B'nin tüm eksplantları üzerinde embriyojenik kallus yönünden aynı anda etkili en başarılı ortamların öncelikle 23. ortam (MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ) daha sonra da 28. ortam (MS + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L TDZ) olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle *V. hispanica*'da kültüre alınan her iki genotipin tüm eksplantlarından oluşturulacak kalluslara embriyojenik özellik kazandırılması için hazırlanacak ortamlarda oksin olarak 2,4-D ve sitokinin olarak TDZ nin belirli kombinasyonlarda kullanılmasının etkili olduğu ortaya çıkmıştır.
- II. grup kallus denemelerinde ilginç bir sonuç olarak; hem Genotip A'da hem de Genotip B'nin tüm eksplantlarında 6., 11., 16., 21., 26. ve 31. ortamlarda oldukça yüksek oranlarda kallus oluşmasına rağmen bunların hiçbirisi embriyojenik kallusa ve herhangi bir morfolojik yapıya dönüşmemiştir ($p < 0.001$). Bu ortamların ortak özellikleri ise oksinin hiç eklenmediği, sadece sitokinin içeren ortamlar olmalarıdır. Bu nedenle oksin olmaksızın ortama sadece sitokinin eklenmesinin; *V. hispanica*'da muhtemelen içsel oksin seviyesinin yüksekliğinden kaynaklanan sebeple kallusları oluşturabildiği, ancak bu kallusların embriyojenik kallusa dönüşmeleri ve herhangi bir morfolojik yapı oluşturmaları üzerinde olumsuz etkide bulunduğu ifade edilebilir.
- I. grup denemeleri ile II. grup deneme sonuçlarını en yüksek embriyojenik kallusu oluşturan ortak ortamı belirleme yönünden kıyaslamak gerektiğinde ve bunun için sadece Genotip A'nın sonuçları dikkate alındığında; hipokotil, kotiledon ve boğum arası eksplantları açısından I. grupta 5. ortam ile II. grupta 3. ortam aynı içeriğe sahip olup, bu içerik MS + 2 mg/L 2,4-D den oluşmaktadır. Yaprak eksplantı açısından ise I. grupta 18. ortam, II. grupta 3. ve 23. ortam en yüksek embriyojenik kallusları oluşturmuştur. 3. ortamın içeriği yukarıda belirtilmiş olup, 18. veya eşdeğeri olan 23. ortamın içeriği ise MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ içeriğinden oluşmaktadır.
- II. grup denemelerde meydana gelen morfolojik yapılara gelince; en yüksek embriyo ve meristemoid oluşumu hem Genotip A hem de Genotip B'de 3. ortamda (MS + 2 mg/L 2,4-D) meydana gelmiştir. En fazla embriyo oluşumu miktar olarak Genotip A da yaprak, Genotip B de ise kotiledon ve onu takiben

yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. En fazla meristemoid ise her iki genotipte ortak olarak yaprak eksplantlarında oluşmuştur.

- En fazla sürgün oluşumu Genotip A da BGD içermeyen kontrol ortamında kültüre alınan boğum arası eksplantlarında, Genotip B de ise 10. ortamda (MS + 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA) kültüre alınan yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir. Sürgün oluşumu ile ilgili Genotip A'da elde edilen benzer bir sonucu hatırlatmak gerekirse; I. grup kallus denemelerinin 1. grubunda da yine Genotip A'da boğum arası eksplantlarından sürgün elde edilmiştir.
- Kısa (saçsı = hairy) kök oluşumu ve öbeklenme yapısı her iki genotipte en yoğun şekilde 2. ortamda (MS + 1 mg/L 2,4-D) kültüre alınan hipokotil eksplantlarında gerçekleşmiştir. Kısa kök oluşturma yönünden en aktif eksplant hipokotil iken en az tepkili eksplant her iki genotipte de boğum arası olmuştur. Uzun ve gerçek kök oluşumu yönünden en aktif eksplant her iki genotipte de 4. ortamda (MS + 1 mg/L NAA) ve 5. ortamda (MS + 2 mg/L NAA) kültüre alınan yaprak eksplantları olarak belirlenirken, boğum arası eksplantları her iki genotipte en az tepkili eksplantlardır. Kök gelişimleri ile ilgili olarak; hem Genotip A hem de Genotip B'de kısa kök oluşumunda tüm eksplantlar üzerinde en yüksek ortalamaların genel olarak sitokininsiz 2,4-D'li ortamlarda, uzun ve gerçek kök oluşumlarının ise oksinsiz NAA içeren ortamlarda olduğu dikkat çekmektedir. Bu çalışmada elde edilen köklenmelere ait bulguların, içerik yönünden zengin *V. hispanica*'da ileride yapılabilecek *in vitro* sekonder metabolit çalışmalarında faydalı olabileceği düşünülmektedir. Öbeklenme oluşumunun da her iki genotipte büyük oranda sitokininsiz ancak oksin olarak 2,4-D içeren ortamlarda meydana geldiği sonucu çıkartılabilir.
- Alt kültür ortamları; hem Genotip A hem de Genotip B'de oluşan kalluslardan meydana gelen embriyojenik kallus ve morfolojik yapılar üzerinde çok önemli farklılıklara neden olmamıştır. Genellikle eksplantların ilk kültüre alındıkları ortamda oluşan kallusların sonradan aktarıldıkları hormonsuz alt kültür ortamlarında nisbeten daha iyi sonuçların alındığı ifade edilebilir.
- Sonuç olarak; *V. hispanica*'nın kallus, embriyojenik kallus ve çeşitli morfolojik yapıları oluşturma yönünden çok yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu kapasite; hiçbir hormonun kullanılmadığı kontrol ortamlarında bile çok yüksek kallus ve özellikle kök yapılarının oluşması nedeniyle, büyük ölçüde *V. hispanica*'nın yüksek olduğu tahmin edilen içsel hormon seviyelerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, birçok besin ortamında *V. hispanica*'nın tüm eksplantlarında yüksek oranda kallus oluşsa bile, tüm eksplantlarda bu kalluslara embriyojenik karakter kazandırabilmek için MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L TDZ içeriğine sahip ortamın kullanılmasının son derece etkili olduğu tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Ali, A. Naz, S. H. A. G. U. F. T. A. and Iqbal, J. 2007. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal of Botany Pak J Bot.* 39(6). 1961-1977.
- Anonymous. 2008. Plant research company gets federal funding. http://www.canada.com/story_print.html?id=2e59af11-e6f8-4331-8f5c-62ac7e14f93d&sponsor (Son Erişim Tarihi: 01.05.2019).
- Arı, E., Gürbüz, E. and Ay. S. T. 2014. Seed Germination of 20 Wild Species Growing In Antalya (Turkey) With Outdoor Ornamental Plant Potential. Fifth International Scientific Agricultural Symposium, Agrosym 2014. ss. 439-445.
- Ari, E., Büyükalaca, S. 2006. In Vitro Regeneration of *Vaccaria pyramidata*. 22nd International Eucarpia Symposium- Section Ornamentals- Breeding for Beauty.. pp.29-29. 11-15 Eylül September.2006.pp.29-29. Sanremo, Italya.
- Asthana, P., Rai, M., K., and Jaiswal, U. 2017. Somatic embryogenesis from sepal explants in *Sapindus trifoliatus*. a plant valuable in herbal soap industry. *Industrial crops and products*. 100: 228-235.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. Ve Özcan, S. 2001. Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. Cilt: I. Konya. 51 s.s: 138-189. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*. Konya.
- Balsevich, J. 2008. Prairie Carnation (*Saponaria vaccaria*) – A Potential New Industrial/Medicinal Crop for the Prairies. <http://www.ssca.ca/conference/conference2008/Balsevich.pdf>
- Balsevic, J., J., Ramirez-Erosa, I., Hickie, R. A., Dunlop, D. M., Bishop, G. G. and Deibert, L. K. 2012. Antiproliferative activity of *Saponaria vaccaria* constituents and related compounds. *Fitoterapia*. 83(1): 170-181.
- Bhansali, R. R. 1990. Somatic Embryogenesis and Regeneration of in Plantles in Pomegranate. *Annals of Botany*, 66 (3). 249-253.
- Bittrich, V. 1993. Caryophyllaceae. In *Flowering Plants: Dicotyledons* (pp. 206-236). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chen, J. T. and Chang, W. C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Science*. 160(1): 87-93.
- Choudhary, M. L. and Chin, C. K. 1995. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant growth regulation*. 16(1): 1-4.
- Clog, E., Bass, P., Walter, B., 1990. Plant Regeneration by Organogenesis in *Vitis* Rootstock Species. *Plant Cell Reports*, 8: 726-728
- Conger, B. V., Novak, F. J., Afza, R. and Erdelsky, K. 1987. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Reports*. 6(5): 345-347.

- Corredoira, E., Ballester, A., Ibarra, M., and Vieitez, A. M. 2015. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. *Tree physiology*. 35(6): 678-690.
- Corredoira, E., San-José, M. C. and Vieite, A. M. 2012. Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. *Trees*. 26(3): 881-891.
- De Jong, A. J., Heidstra, R., Spaijk, H. P., Hartog, M. V., Meijer, E. A., Hendriks, T. & De Vries, S. C. 1993. Rhizobium lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *The Plant Cell*, 5(6), 615-620.
- Dinçer, D., Bekçi, B. and Bekiryazıcı, F. 2016. Türkiye'deki Doğal Bitki Türlerinin Üretiminde Doku Kültürü Tekniklerinin Kullanımı. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 295-302.
- Duddu, H. 2014. Evaluation of the Domestication Status Of Cow Cockle (*Vaccaria hispanica* [P. Mill.] Rauschert) Population. (Doctoral dissertation. University of Saskatchewan, Saskaton, pp. 142).
- Duke, J. A., Ayensu, E. S. 1985. Medicinal Plants of China (Medicinal Plants of the World). Algonac. Mich: Reference Publications.
- Efthimiadou, A., Karkanis, A., Bilalis, D., and Katsenios, N. 2012. Cultivation of cow cockle (*Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert): An industrial–medicinal weed. *Industrial Crops and Products*. 40: 307-311.
- Erişen, S., Atalay, E., & Yorgancılar, M. 2011. The effect of thidiazuron on the in vitro shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 35(5), 521-526.
- Ferreira, E. A., Pasqual, M., & Rezende, J. C. (2007). 2, 4-D and kinetin in callogenesis of *Ficus carica* L. *Acta horticulturae*.
- Ferrie, A.M.R., Balsevich, J., Ehlert, Z., 2009. Method For Production of Saponaria from Microspores. United States Patent Application Publication. Pub.No.: US 2009/0210959 A1. <https://patentimages.storage.googleapis.com/59/14/41/a399c9e733d60e/US20090210959A1.pdf> (Son Erişim Tarihi: 01.05.2019)
- Fidan, M. and Özgökçe, F. 2011. Revision of *Hagenia* A. Braun. Section Belonging to Genus *Gypsophila* L.(Caryophyllaceae) in Turkey. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*. 1(2): 75-85.
- Frey, L., Saranga, Y. and Janick, J. 1992. Somatic embryogenesis in carnation. *HortScience*. 27(1): 63-65.
- F, X., Yang, S. and Bao, M. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 44(3): 194-202.
- Georgia, A. 1933. Cow cockle, *Saponaria vaccaria* L. In: Bailey. L. H. (Ed.). A Manual of Weeds Bailey. L. H.. Ed. MacMillan. New York. pp. 151-152.
- Ghazi, T. D., Cheema, H. V., & Nabors, M. W. 198). Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. *Plant cell reports*, 5(6), 452-456.

- Goering, K. J., Eslick, R.F., Watson, C. A. and Keng, J. 1966. Utilization and agronomic studies of cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Economic Botany*. 20(4): 429-433.
- Güçlü-Üstündağ, Ö. and Mazza, G. 2007. Saponins: properties. applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47(3): 231-258.
- Heywood, V. H., Moore, D. M., Dunkley, J. and King, C. 1978. Flowering plants of the World. Oxford University Press. Oxford. Heywood, V. H. 1993. Flowering Plants of the World. Oxford University Press. New York.
- Hickey, M., King, C. 1997. Common Families of Flowering Plants. Cambridge University Press. UK.
- Ho, W. J., & Vasil, I. K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118(3), 169-180.
- Hosseini, Z., Ghasempour, H. R., Kahrizi, D. and Akbari, L. 2017. In vitro Callus Induction and Shoot Regeneration in Hollyhocks (*Althaea digitata*). *Biological. Environmental and Agricultural Sciences*. 2(1): 34-40.
- Hou, S. W. and Jia, J. F. 2004. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 79(1). 95-100.
- Huang, K. C. 1994. The pharmacology of Chinese herbs. CRC press. Londra. pp. 254.
- Ipekci, Z. and Gozukirmizi, N. 2004. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 79(3):. 341-345.
- Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*. 17(6). 446-450.
- Junaid, A., Mujib, A., Bhat, M. A., & Sharma, M. P. (2006). Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 84(3), 325-332.
- Kalpna, T., Kamlesh, K. 2016. In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation. *Dianthus caryophyllus* L. cv 'Master. Proc. Natl. Acad. Sci. India. Sect. B Biol. Sci. DOI 10.1007/s40011-017-0851-2
- Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T. and Harada, H. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In vitro cellular & developmental biology*. 25(12): 1163-1166.
- Karami, O. and Kordestani, G. K. 2007a. Proliferation. shoot organogenesis and somatic embryogenesis in embryogenic callus of carnation. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 15: 167.
- Karami, O., Deljou, A. and Pour, A. M. 2007b. Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. *Plant growth regulation*. 51(1):. 33-39.
- Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M. and Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia horticultrae*. 110(4): 340-344.

- Karamian, R., 2007. Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration from Protoplast Culture of *Crocus pallasii* subs.haussknechtii. *Pakistan Journal of Biological Science*. 10(-4): 659-663.
- Kernan, Z., Ferrie, A. M. R. 2006. Microspore embryogenesis and the development of a double haploidy protocol for cow cockle (*Saponaria vaccaria*). *Plant cell reports*. 25(4): 274-280.
- Keskin, N. and Kunter, B. 2010. Asmada (*Vitis vinifera* L.) in vitro I. Tip Kallus Eldesi Üzerine Çeşit. Besin Ortamı ve Eksplant Tipinin Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 20(2): 100-106.
- Koçyiğit, M., Alp, Ş., 2018. Seed Morphology. Leaf Anatomy and Karyotype Analysis of the medicinal and ornamental plant; *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 28(1): 10-18.
- Kumar, V., Moyo, M. and Van Staden, J. 2017. Somatic embryogenesis in *Hypoxis hemerocallidea*: An important African medicinal plant. *South African Journal of Botany*. 108: 331-336.
- Küçük Kurt, İ. and Fidan, A. F. 2008. Saponinler ve bazı biyolojik etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*. 1(1): 89-96.
- Lin, G. Z., Zhao, X. M., Hong, S. K. and Lian, Y. J. 2011. Somatic embryogenesis and shoot organogenesis in the medicinal plant *Pulsatilla koreana* Nakai. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 106(1): 93-103.
- Litvay, J. D., Verma, D. C. and Johnson, M. A. 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*. 4(6): 325-328.
- Lu, C., Vasil, V. and Vasil, I. K. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 66(3): 285-289.
- Matsuta, N., Hirabayashi, T., 1989. Embryogenic Cell Lines from Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 7: 684-687.
- Mazza, G., Biliaderis, C. G., Przybylski, R. and Oomah, B. D. 1992. Compositional and morphological characteristics of cow cockle (*Saponaria vaccaria*) seed. a potential alternative crop. *Journal of agricultural and food chemistry*. 40(9): 1520-1523.
- Meesapyodsuk, D., Balsevich, J., Reed, D. W., Covello, P. S. 2007. Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNA encoding β -amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiology*. 143(2): 959-969.
- Memon, R. A., Bhatti, G. R. and Khalid, S. 2003. Weed diversity of wheat crop in Khairpur District. Sindh. *Pakistan Journal of Weed Science Research Pak*. 9(1-2). 99-103.
- Meratan, A. A., Ghaffari, S. M., & Niknam, V. 2009. In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biologia plantarum*, 53(1), 5-10.

- Miah, M. N., Islam, S., Hadiuzzaman, S. 2002. Regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from nusellar tissue of *Citrus macroptera* Mont. var. *anammensis* („Sat Kara“). *Plant Tissue Culture*. 12(2): 167-172.
- Michalczuk, L., Cooke, T. J. and Cohen, J. D. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry*. 31(4). 1097-1103.
- Mozsar, J., Viczian, O., 1996. Genotype Effect on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Vitis spp.* *Vitis*, 35 (4): 155-157.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15(3): 473-497.
- Murthy, B. N. S., Victor, J., Singh, R. P., Fletcher, R. A., & Saxena, P. K. 1996. In vitro regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. *Plant growth regulation*, 19(3), 233-240.
- Nakano, M., Mii, M. 1993. Antibiotics stimulate somatic embryogenesis without plant growth regulators in several *Dianthus* cultivars. *J Plant Physiol* 14:721–725.
- Nishiwaki, M., Fujino, K., Koda, Y., Masuda, K. and Kikuta, Y. 2000. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta*. 211(5): 756-759.
- Nitsc, J., Nitse, C. 1969. Haploid Plants From Pollen Grains. *Science*. 163:85-87.
- Oelck, M.M. 2008. Saponin Inc. – The Prairie Carnation. <http://www.slideshare.net/MOelck/saponin-at-abic-2008-cork-ireland>
- Onay, A., Yıldırım, H., Piriç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H. ve Kılınç, F. M. 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut Ve Gelecekteki Durum. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*. 1(2): 11-28.
- Ozias-Akins, P. and Vasil, I. K. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.(wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*. 110(2): 95-105.
- Pareek, A. and Kothari, S. L. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae*. 98(4): 449-459.
- Price, K. R., Johnson, I. T., Fenwick, G. R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. *CRC Critical Reviews Food Science Nutrition*. volume26: 27-118.
- Radojević, L., Calić-Dragosavac, D., Špirić, J., Stevanović, B. And Stevanović, V. 2010. In vitro propagation of *Dianthus ciliatus* ssp. *dalmaticus* and *D. giganteus* ssp. *croaticus* (Caryophyllaceae) from stem segment cultures. *Botanica Serbica*. 34(2).
- Raharjo, S. H. T., Punja, Z. K. 1993. Regeneration of plantlets from embryogenic suspension – cultures of pickling cucumber (*Cucumis sativus* L. Cv Endeavor). *In vitro Cellular And Developmental Biology-Plant*. 30(1): 16-20.
- Rajasekaran, K., Mullins, M.G., 1983. Influence of Genotype and Sex-expression on Formation of Plantlets by Cultured Anthers of Grapevines. *Agronomie*, 3(3): 233-238.

- Reinert, J. 1959. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gew- ebekulturen aus karotten. *Planta*. 53:318–333.
- Ricci, A. P., Mourão Filho, F. D. A. A., Mendes, B. M. J. and Piedade, S. M. D. S. 2002. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*. *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. *Scientia Agricola*. 59(1): 41-46.
- Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N., Upadhyaya, A., 1995. In vitro regeneration of heat-tolerant “German Red” carnation through organogenesis and somatic embryogenesis. *Gartenbauwissenschaft*. 60: 228–233.
- Seabrook, J. and Douglass, L. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Reports*. 20(3): 175-182.
- Shahid, M. and Rao, N. K. 2014. New records of two species of Caryophyllaceae in the flora of the United Arab Emirates. *Tribulus*. 22: 66-68.
- Shahid, M., Rao, N. K. 2014. New records of two species of Caryophyllaceae in the flora of the United Arab Emirates. *Tribulus*. 22: 66-68.
- Shamso, E. M. and Toshiyuki, F. 2017. The Pollen Flora of Faiyum. Egypt I-Archichlamydeae.
- Sharifi, G., Ebahimzadeh, H., Ghareyazie, B., Karimi, M. 2010. Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 46:274-280.
- Sharma, O. P., Kumar, N., Singh, B., Bhat, T. K. 2012. An improved method for thin layerchromatographic analysis of saponins. *Food chemistry*. 132(1): 671-674.
- Schenk, RU. Hildebrandt AC 1972 Can. J. Bot. 50:199–204.
- Schleiden, MJ. 1838. Beiträge zur Phytogenesis. Arch Anat Physiol Wiss Med (J Müller) pp 137–176
- Schwann, T. 1839. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen. W Engelmann: Leipzig No 176
- Singh, P., Singh, A., Shukla, A. K., Singh, L., Pande, V., & Nailwal, T. K. 2009. Somatic embryogenesis and in vitro regeneration of an endangered medicinal plant sarpgandha (*Rauvolfia serpentina* L.).
- Stamp, J.A., Meredith, C.P., 1988. Proliferative Somatic Embryogenesis from Zygotic Embryos of Grapevine. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113(6): 941-945.
- Steward, F. C., Mapes, M.O. and Smlth, J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany*. 45: 693-703.
- Sun, Y., Zhang, X., Huang, C., Nie, Y. and Guo, X. 2005. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six explants in Coker 201 (*Gossypium hirsutum*). *Plant cell. tissue and organ culture*. 82(3): 309-315.
- Tangolar, S. G., Ergenoğlu, F., & Büyükalaca, S. 2007. Asma (*Vitis* spp.) Anterlerinden Embriyojenik Kallus ve Embriyo Uyarımı Üzerine Farklı Uygulamaların Etkisi. *alatarım*, 35.

- Tangolar, S. G., Büyükalaca, S. and Ergenoğlu, F. 2008. High efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: the effect of genotype, media, 2, 4-D, and incubation conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 32(4): 311-317.
- Thakur, K. and Kanwar, K. 2018. In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation. *Dianthus caryophyllus* L. cv. 'Master'. Proceedings of the National Academy of Sciences. India Section B: Biological Sciences. 1-9.
- Thakur, K. and Kanwar, K. 2018. In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation. *Dianthus caryophyllus* L. cv. 'Master'. *Proceedings of the National Academy of Sciences. India Section B: Biological Sciences*. 1-9.
- Tisserat, B., Burashige, T. 1977. Repression of asexual embryogenesis in vitro by some plant growth regulators. *In Vitro* 13, 799–805
- Trolinder, N. L. and Goodin, J. R. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*. 6(3): 231-234.
- Vacin, EF. & Went, FW. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605–613
- Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Kalyan, S. S. and Subhash, K. 2016. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 14(1): 55-60.
- Voo, K. S., Rugh, C. L. and Kamalay, J. C. 1991. Indirect somatic embryogenesis and plant recovery from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 27(3): 117-124.
- Wetherell, DF. 1969. *Pl Physiol* 44: 1734–1737.
- Winkelmann, T., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Serek, M., & Braun, H. P. 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, 224(3), 508-519.
- Wong, K. H., Tan, W. L., Kini, S. G., Xiao, T., Serra, A., Sze, S. K. and Tam, J. P. 2017. Vaccatides: Antifungal Glutamine-Rich Hevein-Like Peptides from *Vaccaria hispanica*. *Frontiers in plant science*. 8. 1100.
- Wu, J., Zhang. X., Nie, Y., Jin, S. and Liang, S. 2004. Factors Affecting Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration From a Range of Recalcitrant Genotypes of Chinese Cottons (*Gossypium hirsutum*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 40(4): 371-375.
- Yakushiji, H., Mase, N., & Sato, Y. 2003. Adventitious bud formation and plantlet regeneration from leaves of fig (*Ficus carica* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(6), 874-878.
- Yantcheva, A., Vlahova, M., and Atanassov, A. 1998. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*. 18(1-2): 148-153. Yantcheva. A. Vlahova. M. Atanassov. A. 1998. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)
- Yumbla-Orbes, M., da Cruz, A. C. F., Pinheiro, M. V. M., Rocha, D. I., Batista, D. S., Koehler, A. D. and Otoni, W. C. 2017. Somatic embryogenesis and de novo shoot

- organogenesis can be alternatively induced by reactivating pericycle cells in *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) root explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 1-10.
- Zhang, J., Gai, M., Li, X., Li, T., & Sun, H. 2016. Somatic embryogenesis and direct as well as indirect organogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch., an endangered ornamental and medicinal plant. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(10), 1898-1906.
- Zhou, G., Tang, L., Wang, T., Zhou, X., Kou, Z., Wu, J. and Wang, Z. 2016. Phytochemistry and pharmacological activities of *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert: a review. *Phytochemistry reviews*. 15(5): 813-827.
- Zhou, G., Wu, H., Wang, T., Guo, R., Xu, J., Zhang, Q. and Wang, Z. 2017. C-glycosylflavone with rotational isomers from *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert seeds. *Phytochemistry Letters*. 19: 241-247.

ÖZGEÇMİŞ

Hilal BEDİR

hilal.hb.bedir@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2014-2019	Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2009-2013	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Samsun

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Ziraat Mühendisi 2018- Devam Ediyor	Argeto Sebze Tohumları Antalya
Ziraat Mühendisi 2017- 2018	Argeera Bilimsel Araştırma Geliştirme Üretim Dan. San. ve Tic. LTD.ŞTİ. Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makale

1- Ari E, Bedir H, Yildirim S, Yildirim T. (2016). Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in autumn season. *Turkish Journal of Biology*, 40, 706-717. Doi: 10.3906/biy-1505-41.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Bedir H, Ari E. (2018). "Studies on Obtaining Embryogenic Callus in *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert for Somatic Embryogenesis", International Agricultural Science Congress, pp.36-36 (Sözel Bildiri).
- 2- Bedir H, Ari E. (2018). Isolated Microspore Culture Studies in *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. (Brassicaceae). International Agricultural Science Congress, pp.30-30 (Poster Bildiri).
- 3- Ari E, Bedir H. (2018) The Importance of Using DAPI Staining for Androgenesis Studies in The Example of *Anemone coronaria* L. International Agricultural Science Congress, pp.4-4 (Sözel Bildiri).
- 4- Ari E, Bedir H, Mutlu N. (2018). Isolated Microspore Cultures of Ornamental Cabbages (*Brassica oleracea* var. *acephala*). International Agricultural Science Congress, pp.26-26 (Poster Bildiri).
- 5- Ari E, Bedir H, Şimşek C, Mutlu N, Kula N. (2018). Doubled Haploid Plant Regeneration from Microspore Cultures of *Brassica napus* L. Grown in Greenhouse Conditions in Antalya. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, pp.530-530 (Sözel Bildiri).
- 6- Ari E, Bedir H, Mutlu N. (2017). Microspore Culture Studies on Endemic *Conringia grandiflora* Boiss et Heldr. (Brassicaceae)", The Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, pp.168-168 (Özet Bildiri)
- 7-Ari E, Yildirim S, Bedir H, Bankoğlu M, Gökmen Ü, Genç İ, et al. (2014). Preselection In *Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert For Ornamental Plant Breeding. Balkan Agriculture Congress, pp.194-194 (Sözel Bildiri).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiri

- 1- Ari E, Gokmen U, Yildirim T, Mutlu N, Isbilen Y, Akman E, Bedir H, Yildirim S, Bankoğlu M, Kula N.(2015). Biyoteknoloji Destekli Süs Biberi (*Capsicum annuum* L.) Islahı. VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, ss.56-56 (Sözel Bildiri).