

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BURÇAKTA (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) İN VİTRO
KOŞULLARDA POLİPLOİD BİTKİ ELDE ETME
ÇALIŞMALARI**

**Hazırlayan
Lokman KARAHASAN**

**Danışman
Prof. Dr. Satı UZUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BURÇAKTA (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) İN VİTRO
KOŞULLARDA POLİPLOİD BİTKİ ELDE ETME
ÇALIŞMALARI
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Lokman KARAHASAN**

**Danışman
Prof. Dr. Satı UZUN**

**Ocak 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Lokman KARAHASAN



“Burçakta (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) İn Vitro Koşullarda Poliploid Bitki Elde Etme Çalışmaları” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Lokman KARAHASAN

Danışman

Prof. Dr. Satı UZUN

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Satı UZUN

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, bu tezin yapılmasının bütün aşamalarında yol gösteren, her türlü konuda desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Satı UZUN (Erciyes Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı)'a ve çalışmalarımda yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Onur OKUMUŞ (Erciyes Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı)' a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen, gerek maddi gerek manevi konularda yardımcı olan, kendilerine ayırmam gereken zamandan bu çalışma için feragat eden sevgili eşim Afife'ye, kızlarım Ecrin ve Elif'e, oğlum Abdulhamid'e teşekkürlerimi sunarım.

Lokman KARAHASAN

Ocak 2022, KAYSERİ

BURÇAKTA (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) İN VİTRO KOŞULLARDA POLİPLOİD BİTKİ ELDE ETME ÇALIŞMALARI

Lokman KARAHASAN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak, 2022
Danışman: Prof. Dr. Satı UZUN

ÖZET

Bu çalışmada burçak (*Vicia ervilia* (L.) Willd) bitkisinde in vitro bitki rejenerasyonu ve kolşisin uygulaması ile poliploidi amaçlanmıştır. İn vitro bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla burçakta kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları farklı oranlarda 6-benzilaminopurin (BAP), thidiazuron (TDZ) veya meta-Topolin (mT) ile 0.25 mg/L α -naftalenasetik asit (NAA) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 7-8 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna özellikleri belirlenmiştir. Sürgün ucu eksplantında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %75-100, kotiledon boğum eksplantında ise %57.14-95.85 arasında saptanmıştır. Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında en yüksek eksplant başına sürgün sayıları sırasıyla 9.75 ve 15.51 adet 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren ortamlarda saptanmıştır. En yüksek sürgün uzunluğu değerleri ise sürgün ucunda mT içeren ortamlarda elde edilirken, kotiledon boğum eksplantında sadece 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortamlarda ölçülmüştür. Elde edilen sürgünlerde en yüksek köklenme %9.7 ile 1 mg/l Indole-3 bütirik asit (IBA) içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Kolşisin uygulamaları ise katı (%0.01 ve 0.02 Kolşisin; 3 ve 10 gün) ve sıvı besin (%0.001 ve 0.01 Kolşisin 1, 3 ve 6 gün) ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Artan kolşisin dozları ve uygulama süreleri sürgün oluşturan eksplant sayısını düşürmüştür. Elde edilen sürgünler köklendirilemediği için dış koşullara aktarılamamıştır.

Anahtar Kelimeler: *in vitro* rejenerasyon, kolşisin, kotiledon boğum, oksin, sitokinin, *Vicia ervilia*,

INVESTIGATIONS ON OBTAINING POLYPLOID PLANTS IN BITTER VETCH (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) UNDER IN VITRO CULTURE CONDITIONS

Lokman KARAHASAN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, January 2022

Supervisor: Prof. Dr. Sati UZUN

ABSTRACT

This study was conducted to obtain in vitro plant regeneration and polyploidy with in vitro colchicine treatments in bitter vetch (*Vicia ervilia* L. Willd). For in vitro regeneration in bitter vetch, cotyledon node and shoot tip explants were cultured in MS medium containing different concentration of 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ) or meta-topoline (mT) with 0.25 mg/L α -naphthalene acetic acid (NAA). Shoot regeneration frequency, the number of shoots per explant and shoot length were determined 7-8 weeks after the initiation of culture processes. The shoot regeneration frequency in the shoot tip explant was between 75-100% and between 57.14-95.85% in the cotyledon node explant. The highest shoot numbers per explant were determined in media containing 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA with 9.75 and 15.51 in shoot tip and cotyledon node explants respectively. While the highest shoot lengths were obtained in media containing mT at the shoot tips, it was measured in media containing only 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA in the cotyledon node explants. The highest rooting rate was obtained from MS medium containing 1 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) with 9.7%. Colchicine treatments were carried out in solid (0.01 and 0.02% colchicine; 3 and 10 days) and liquid media (0.001% and 0.01 colchicine; 1, 3 and 6 days). Increasing colchicine doses and application times decreased the rate of shoot regeneration. Since the shoots could not be rooted, they could not be transferred to external conditions.

Keywords: auxin, colchicine, cotyledon node, cytokinin, in vitro regeneration, *Vicia ervilia*

İÇİNDEKİLER

BURÇAKTA (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) İN VİTRO KOŞULLARDA POLİPLOİD BİTKİ ELDE ETME ÇALIŞMALARI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. İn Vitro Bitki Rejenerasyonu	5
1.2. İn Vitro Kolşisin Uygulamaları	7

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali	10
2.2. Çalışmada Kullanılan Besin Ortamları ve Bitki Büyüme Düzenleyiciler	10
2.3. Genel Doku Kültürü Şartları	10
2.4. Tohumların Sterilizasyonu	12
2.5. İn vitro Kültürlerin Oluşturulması	12
2.6. Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	13
2.7. Eksplantlara Katı Ortamda Kolşisin Uygulaması	14
2.8. Eksplantlara Sıvı Ortamda Kolşisin Uygulaması	15
2.9.Verilerin Değerlendirilmesi.....	15

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. İn Vitro Sürgün Rejenerasyonu.....	16
3.1.1. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	16
3.1.2. Eksplant başına sürgün sayısı.....	19
3.1.3. Sürgün uzunluğu	20
3.2. İn Vitro Köklendirme	21
3.3. Katı Ortamda Kolşisin Uygulamaları	23
3.4. Sıvı Ortamda Kolşisin Uygulamaları	24

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA	30
ÖZGEÇMİŞ.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

μM	: Mikro Molar
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid/ 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
BAP	: 6-Benzylaminopurine / 6-Benzilaminopurin
dak	: Dakika
F	: F değeri
IAA	: Indole-3-acetic acid/ Indole-3-asetik asit
IBA	: Indole-3-Butyric acid /Indol-3-bütirik asit
MS	: Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
mT	: Meta-topolin
NAA	: α-Naphtaleneacetic acid / α-Naftalin asetik asit
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
TDZ	: Thidiazuron

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	MS besin ortamının içeriği	11
Tablo 2.2.	BBD saklanma koşulları ve çözücüleri.....	11
Tablo 3.1.	Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi tablosu	17
Tablo 3.2.	Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarında sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilen sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalama değerler (%)	17
Tablo 3.3.	Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi tablosu	19
Tablo 3.4.	Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarında sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilen eksplant başına sürgün sayısına ait ortalama değerler (adet)	20
Tablo 3.5.	Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi tablosu.....	20
Tablo 3.6.	Burçakta farklı sitokin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarında sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilen sürgün uzunluğuna ait ortalama değerler (cm).....	21
Tablo 3.7.	Farklı IBA dozlarının burçakta kök oluşturan sürgün yüzdesi üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu	22
Tablo 3.8.	Farklı köklendirme ortamlarının burçakta kök oluşturan sürgün yüzdesi üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu	22
Tablo 3.9.	Burçakta farklı IBA dozlarında elde edilen kök oluşturan ekplant yüzdesine ait ortalama değerler (%)	22

Tablo 3.10. Burçakta farklı köklendirme ortamlarında elde edilen kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalama değerler (%)	23
Tablo 3.11. Burçakta sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarına katı besin ortamında farklı sürelerde uygulanan kolşisin dozlarında elde edilen sürgün sayıları (adet)	23
Tablo 3.12. Burçakta sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarına farklı sürelerde sıvı besin ortamında uygulanan kolşisin dozlarında elde edilen sürgün sayıları (adet).....	24



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Çimlenen <i>Vicia ervilia</i> tohumları	12
Şekil 2.2.	IBA uygulamasında köklenen <i>Vicia ervilia</i>	13
Şekil 2.3.	IBA ve aktif karbon uygulamasında köklenen <i>Vicia ervilia</i>	13
Şekil 2.4.	Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında %0.01 kolşisin uygulaması	14
Şekil 2.5.	Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında % 0.02 kolşisin uygulaması	14
Şekil 2.6.	Kolşisine uygulaması sonrasında eksplantlar	15
Şekil 3.1.	Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu	18
Şekil 3.2.	Katı ortamda 10 gün Kolşisin uygulaması.....	25

GİRİŞ

Burçak bitkisi kurak şartlarda başarıyla yetiştirilen önemli tek yıllık baklagil yem bitkilerinden biridir. Burçak $2n=14$ kromozom sayısına sahip diploid kendine döllen bir türdür (Livanios vd., 2018). Burçak tanesinde %21-28, kuru otunda ise %14.6-17.8 ham protein bulunmaktadır (Larbi vd., 2011). Burçak metabolik enerji (13.57 MJ/kg), protein (%24), demir, bakır, potasyum, fosfor ve klor gibi mineraller bakımından iyi bir kaynaktır (Ayaşan, 2010). Aminoasit profili, lizin bakımından soya küspesine yakındır, enerji ve proteince iyi ve ucuz bir yem hammaddesidir (Ayaşan, 2010). Burçak kurağa oldukça dayanıklı olup, diğer kültür bitkilerinin ekonomik olarak tarımının yapılamadığı alanlarda, kireççe fakir topraklarda, taşlı, yamaç alanlarda tarımı yapılabilmektedir (Balabanlı, 1998). Ülkemizde Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde çiftçilerin elinde yerel çeşit niteliğindeki popülasyonlar kullanılarak, geleneksel usullerle tarımı yürütülmektedir (Serin vd., 1997). Burçağın özellikle hasadı ve harmanı oldukça zordur. Bitki kısa boyludur ve makinalı hasada uygun değildir. Bitkinin veriminin düşük olması ve makinalı hasada uygun olmaması nedeniyle tarımı gün geçtikçe azalmaktadır (Serin ve Tan, 2001; Elçi, 2005). Marjinal alanların değerlendirilmesi için önemli bir yem bitkisi olan burçak, kurağa dayanıklılığı yüksek olması nedeniyle nadas alanları için de bir umut olabilir (Serin vd., 1997). Çevre ve gıda güvenliğinin gün geçtikçe daha önem kazanması ekstrem iklim ve toprak özelliklerinde yetiştirilebilecek burçak bitkisini daha da önemli kılmaktadır (Arslan, 2019). Burçak bitkisi ihmal edilmiş ve çeşit geliştirme çalışmaları maalesef çok sınırlı sayıda kalmış ve ülkemizde tescilli bir çeşit henüz bulunmamaktadır.

Poliploidi, somatik hücrelerde ikiden fazla kromozom takımının bulunmasıdır. Bir tür içerisinde genom sayısının katlanarak artması otopoliploidi, farklı türlerin genomlarının bir araya gelerek katlanması allopoliploidi olarak tanımlanmaktadır. Doğada poliploidizasyon olayları birçok kültürü yapılan bitki türünün ortaya çıkmasına neden

olmuştur. Buğday, pamuk, patates, yonca gibi bitkiler buna örnek olarak verilebilir. Dünyadaki tahıl türlerinin %70'inin, haç çiçeklilerin %42'sinin ve baklagillerin ise %23'ünün poliploid olduğu bildirilmektedir (Şehirali ve Özgen, 2010). Poliploidler doğal olarak ortaya çıkabildiği gibi yapay indüksiyonun bir sonucu da oluşabilmektedir. Doğal poliploidler doğada çeşitli etkilerle kendiliğinden meydana gelmiştir ve yüzyıllar boyunca evrimi ve türleşmeyi yönlendiren yavaş ve kademeli bir süreç olmuştur. Poliploidleşme sonucunda angiospermelerde türlerin %15'inin oluştuğu tahmin edilmektedir (Eng ve Ho, 2019'un Wood ve ark., 2009'dan aktarımı).

Ploidi seviyesi arttıkça bitkilerde genellikle hücre ve organlarda bir büyüme ve bunun sonucu olarak kuru madde veriminde artış olmaktadır. Bu fenomen, kromozomun ikiye katlanması sonucunda hücrelerin büyüklüğünün arttığı "giga" etkileri olarak adlandırılmaktadır (Sattler ve vd., 2016). Poliploid bitkilerin genel olarak hücreleri, hücre çekirdekleri ve bitki organları diploidlerine oranla daha büyük olmaktadır. Poliploid bitkilerin ayrıca biyotik ve abiyotik stres koşullarına tolerans, ürün kalitesinin artması gibi özellikleri de bildirilmektedir (Dhooghe vd., 2011; Sattler vd., 2016; Manzoor vd., 2019). Poliploid türlerin olumlu özellikleri nedeniyle ekonomik açıdan önemli bitkilerde yapay poliploidlerin teşviki ıslahçılar tarafından oldukça arzulanan bir husus olmuştur (Dhooghe vd., 2011). Eng ve Ho, (2019)' un bildirdiğine göre 2018 yılı itibariyle 3281 adet kaydedilmiş mutant çeşit bulunmakta ve bunların 46 tanesi kolşisin ile oluşturulmuş poliploid çeşitlerdir. Poliploidler mitotik poliploidizasyon veya mayotik poliploidizasyon mekanizmaları ile oluşabilmektedir (Dhooghe vd., 2011). Mitotik poliploidizasyonda kromozom katlanması somatik hücrelerde yapılmaktadır. Bitkilerin somatik kromozom sayıları fiziksel (ısı şokları gibi) veya kimyasal uygulamalar (kolşisin, orizalin, trifluralin, pronamid ve amiproposmetil) ile katlanabilmektedir (Sattler vd. 2016; Dabkeviciene vd. 2017).

Poliploidizasyon çalışmasına başlamadan önce poliploidinin indüksiyonu, poliploid bitki eldesi, poliploidlerin tanımlanması ve poliploidlerin değerlendirilmesi ile ilgili sistemlerin belirlenmesi gerekmektedir. Eng ve Ho (2019), üç poliploidizasyon yöntemi bildirmektedir: İn vitro, ex vitro ve in vivo sistemler. İn vitro poliploidizasyon sınırlı (küçük), steril ve kontrol edilebilir bir alanda hızlı poliploid elde etme kapasitesine sahip olduğundan en fazla kullanılan yöntemdir (Niazian ve Nalousi, 2020). Ayrıca farklı eksplant kaynaklarına (in vitro sürgünler, tomurcuklar, doku ve hücreler gibi)

uygulanabilme, düşük ölüm oranı, yüksek katlanma oranı ve miksoploid/kimera yüzdesinin düşük olması gibi avantajları da bulunmaktadır (Fu vd., 2019). İlk in vitro poliploidizasyon 1966'da Murashige ve Nakano tarafından tütün bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Özellikle 1990'lardan sonra bitki doku ve hücre kültürü çalışmaları geliştikçe, daha kontrollü ve standart bir ortam sunduğu için in vitro poliploidizasyon oldukça fazla kullanılmaktadır (Sattler vd., 2016). Bir in vitro poliploidizasyon protokolü birkaç alt işlemden oluşur. İlk işlem, bitki materyaline anti-mitotik ajan uygulamasıdır. Daha sonra bir veya birden fazla çoğaltım döngüsünden sonra, poliploidizasyonun etkinliği belirlenmesidir.

İn vitro poliploidizasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan antimitotik ajan kolşisin'dir. Kolşisin güz çiğdemi (*Colchicum autumnale*) bitkisinden elde edilen doğal bir alkaloiddir. Kolşisin α - ve β -tubulin dimerlerine bağlanarak hücre döngüsünde mikrotübül polimerizasyonunu inhibe etmekte ve böylelikle anafazda kromozom/kromatid taşınmasını önlemektedir. Sitokinezde iki katına çıkan kromozom sayısına sahip hücrelerin oluşumuna yol açmaktadır (Eng ve Ho, 2019). Antimitotik ajan tipi kadar konsantrasyonu ve uygulama süresi poliploidizasyon çalışmalarında önemlidir. Düşük konsantrasyon ve uygulama süresi etkisiz kalırken yüksek olması bitkiler için öldürücü olabilmektedir.

İn vitro poliploidi çalışmaları için başarılı etkili in vitro rejenerasyon sistemlerinin bulunması oldukça önemlidir. Bu nedenle tek bir bitki hücresinden organogenesis veya somatik embriyogenesis ile rejenerasyon yöntemleri önem kazanmıştır. Bu yöntemler homojen poliploid bitkilerin gelişimini ve sitokimera olasılığını en aza indirebilmektedir (Touchel vd., 2020). Organogenesis ve somatik embriyogenesis gibi rejenerasyon sistemleri birçok türde poliploid bitki elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Eeckhaut vd., 2004; Heping vd., 2008; Sakhanokho vd., 2009; Cai ve Kang 2011; Zhang vd., 2019). Nodal segmentler ve sürgün uçları in vitro poliploidizasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan dokular olarak bildirilmekle birlikte sürgünler, fidecikler, tomurcuklar, somatik ve zigotik embriyolar tohumlar ve yumru parçaları da eksplant kaynağı olarak kullanılmaktadır (Dhooghe vd., 2011; Touchel vd., 2020).

Yonca, ak üçgül ve çayır üçgülü gibi doğal olarak oluşan tetraploid yem bitkisi türlerinde, diploid atalarına göre artan biyokütle ve yaprak boyutu gözlemlenmektedir.

Tetraploidlerdeki özelliklerin bu doğal artışı, gelecek nesiller boyunca genetik stabilitenin sürdürülmesi koşuluyla, ploid manipülasyonunun bitki ıslahında yararlı bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Birçok yem bitkisi türünde ototetraploidlerden başarılı sonuçlar alınmıştır. Yapay otopoliploidlere çim türleri ve çayır üçgülü örnek olarak verilebilir (Açıkgöz; 2001; İnnis vd., 2020). Pusa Giant Berseem ve Blundell Berseem-3 İskenderiye üçgülü çeşitleri Hindistan'da geliştirilmiş ve diploid çeşitlerinden daha yüksek ot verimine sahip olduğu (Singh vd., 2019); *Medicago truncatula* tek yıllık yonca çeşidi SULTAN-SU'dan geliştirilen tetraploid hatların biomas verimlerinin ve yaprak alanlarının diploid çeşitten daha yüksek olduğu (İnnis vd., 2020); *Trifolium pratense*'de yeni geliştirilen bazı tetraploid populasyonlarda verimin ve bitki boyunun daha uzun olduğu (Dabkeviciene vd., 2016) bildirilmektedir.

Daha önce birçok türde poliploidi optimizasyon protokolleri geliştirilmesine rağmen genellikle geliştirilen yöntemlerin oldukça türe özgü olduğu görülmektedir (Nair, 2004; Dabkeviciene vd., 2017; Juliao vd., 2020). Poliploidizasyon için uygun bir yöntemin geliştirilmesi kolşisin konsantrasyonunun, uygulama süresinin, eksplant tipinin, uygulama yönteminin ve kullanılan rejenerasyon metodunun en uygun kombinasyonunu elde etmeyi gerektirir (Juliao vd., 2020). Bu nedenle, indüksiyonun başarısı, her prosedürün her bir aşamada gerçekleştirilme şekline ve her bir adımın doğru etkileşimine bağlıdır. Bu çalışma kapsamında burçak bitkisinde in vitro bitki rejenerasyonu ve farklı eksplantlara kolşisine dozları, uygulama süreleri ve yöntemleri kullanılarak poliploid bitkilerin elde edilmesine yönelik çalışmaların yürütülmesi amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. İn Vitro Bitki Rejenerasyonu

Sancak (1999) koca fiğde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenı eksplantlarında değişik oranlarda BAP ve NAA dozlarının sürgün rejenerasyonuna etkisini incelemiştir. Çalışmada olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonu 1 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilirken, olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde 2 mg/L BAP ve 2 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Genel olarak, olgunlaşmamış kotiledonların sürgün rejenerasyon kapasitesi olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden daha yüksek bulunmuştur.

Sancak vd. (2000) macar fiğinde (*Vicia pannonica*) olgunlaşmamış embriyo eksplantlarının BAP ve NAA içeren MS besin ortamında rejenerasyon kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda elde edilen sonuçlara göre olgunlaşmamış kotiledonlarda en yüksek sürgün rejenerasyonu oluşumu 20 µM BAP ve 2.5 µM NAA içeren ortamdan elde edilirken, olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde 5 µM BAP ve 5 µM NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Eksplantlar arasında olgunlaşmamış embriyo eksenlerinin sürgün rejenerasyon kapasitesi olgunlaşmamış kotiledonlardan yüksek bulunmuştur. Gelişen sürgünler 1/2 MS ve 5 µM IBA içeren ortamda başarılı bir şekilde köklendirilmiştir.

Çöçü vd. (2003) sekiz farklı yaygın fiğ çeşidinde olgunlaşmamış embriyo eksenlerinde en yüksek sürgün rejenerasyonunu %95 ile Kubilay çeşidinden 4 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren besin ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. En yüksek rejenerasyon Kubilay çeşidinden elde edilirken en düşük Karaelçi çeşidinden elde edilmiştir. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında ise hiç sürgün rejenerasyonu elde

edememişlerdir. Kubilay çeşidinde elde edilen sürgünleri 2.5 mg/L IBA içeren MSO besin ortamında köklendirmişlerdir.

Erdoğan vd. (2004) burçak bitkisinde kotiledon boğum eksplantlarını farklı oranlarda TDZ veya BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısında büyüme düzenleyici $\times$ hat interaksyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %25.30-100; eksplant başına sürgün sayısı ise 1-15.7 adet arasında değişim göstermiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısını hat 7'de 15.7 adet ile 4 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren besin ortamından elde etmişlerdir. Yedi numaralı hatta elde edilen sürgünler köklendirmeye alınmış ve en yüksek köklenme oranını (%100) ve sürgün başına ortalama kök sayısını (6 adet) 2 mg/L IBA içeren ortamda belirlenmiştir.

Erdoğan vd. (2005) altı farklı burçak hattında olgunlaşmamış embriyo eksplantlarını (kotiledon ve embriyo eksen) değişik oranlarda TDZ içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. En yüksek eksplant başına en fazla sürgün sayısı olgunlaşmamış embriyo eksplantında 22 adet ile 12 numaralı hatta 1.25 mg/L TDZ; olgunlaşmamış kotiledon eksplantında ise 21.33 adet ile 8 numaralı hatta belirlenmiştir. Gelişen sürgünleri daha sonra, 2 mg/L IBA içeren MSO ortamında köklendirilmiştir.

Kendir vd. (2009) koca fiğ (*Vicia narbonensis* L.)'de kotiledon boğum, sürgün ucu ve zigotik embriyo eksplantlarında 0.25-1 mg/L BAP içeren MS besin ortamında mikroçoğaltım amaçlamışlardır. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı 4.42 ile kotiledon nod eksplantından elde edilirken bunu 3.40 ve 3.54 ile sürgün ucu ve zigotik embriyo eksplantları takip etmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu 3.17-4.61 cm arasında değişim göstermiş olup en yüksek 0.25 mg/L BAP içeren besin ortamından elde edilmiştir. 0.5 mg/L MS besin ortamında %65 oranında köklenme elde edilmiştir.

Aasim vd. (2011) tüylü fiğ (*Vicia villosa* Roth) bitkisinde tohum eksplantları TDZ ve IBA içeren besin ortamlarında kültüre almışlar. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 28.6 adet ile 0.20 mg/l TDZ-0.10 mg/l IBA içeren ortamda saptanmıştır. Sürgün rejenerasyon frekansı %45.83-75.00 arasında belirlenmiştir. Besin ortamından TDZ miktarının artması ile sürgün uzunluğunda bir azalış kaydedilmiştir. Gelişen sürgünler köklendirme için 50 mg/l IBA içeren ortamda 5, 10 ve 20 dak bekletilmiş ancak köklenme gerçekleşmemiştir.

Aasim (2012) adi fiğde (*Vicia sativa*) in vitro bitki rejenerasyonu amacıyla olgunlaşmamış kotiledonları kullanmışlardır. Eksplantlar 0.05-0.80 mg/l TDZ-0.10 mg/l IBA içeren ortamda kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyon frekansı (%) ve eksplant başına sürgün sayısı sırasıyla %25.0-58.33 ve 8.33-19.33 adet olarak belirlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu %58.33, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 19.33 adet ile 0.20 mg/l TDZ-0.10 mg/l IBA içeren MS ortamında kaydedilmiştir. En yüksek sürgün uzunluğu değeri 5 cm ile eşit miktardaki TDZ-IBA içeren ortamda belirlenmiştir. Sürgünlerin büyük kısmı rejenerasyon ortamında köklenmiştir köklenmeyen sürgünler ise 1 mg/L IBA içeren besin ortamında %50 oranında köklenmiştir.

Kumari vd. (2018) nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisinde TDZ uygulamalarının bitki rejenerasyonuna etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla iki farklı deneme yürütmüşlerdir. İlk denemede tohumlar 15, 20 ve 25 μ M TDZ ile ön uygulamaya alınmış, ikinci denemede ise TDZ ön uygulaması yapılmamıştır. TDZ uygulanmış ve uygulanmamış tohumlardan aksiller meristemler sürgün oluşumu amacıyla 4 μ M TDZ içeren/içermeyen ortamlarda kültüre alınmıştır. En yüksek bitki rejenerasyonu (%69), eksplant başına sürgün sayısı (20.66 adet) ve köklenme 20 μ M TDZ ön muamelesinden sonra sürgün oluşturma ortamında TDZ içermeyen uygulamalardan elde edilmiştir. Sonuç olarak nohut bitkisinde sadece TDZ ön uygulaması sonucunda etkili bir sürgün rejenerasyonu ve köklenme saptanmıştır.

Kumari vd. (2021) nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisinin aksiller meristem, plumular sürgün ucu ve hipokotil eksplantlarından 0 ve 20 μ M TDZ ön uygulamaları ile sürgün oluşturma ortamında 4 μ M TDZ içeren ve içermeyen ortamlarda rejenerasyonunu incelemişlerdir. En yüksek sürgün rejenerasyonu %71.33 ile tohuma 20 μ M TDZ uygulaması sonucu TDZ içermeyen ortamda sürgün rejenerasyonuna alınan aksiller meristem eksplantında elde edilmiştir. Aynı uygulamada plumular sürgün ucunda %54.33 sürgün rejenerasyonu belirlenmiştir. Hipokotillerde ise hiç rejenerasyon saptanmamıştır.

1.2. İn Vitro Kolşisin Uygulamaları

Heping vd. (2008) *Dioscorea zingiberensis*'ten elde ettikleri kallusları ilk yöntemde 0.5 mg/L BAP, 10, 20, 40 ve 80 mg/L kolşisin içeren katı MS ortamında 25 gün 25 °C'de

16 saat fotoperyotta 1200 lüks ışık şiddetinde bekletmişlerdir. İkinci yöntemde ise %0.3 kolşisin solüsyonunda 4, 8, 12, 16, 20, 24 veya 30 saat bekletilen kallusları 0.2 mg/L BAP içeren katı MS besin ortamında rejenerasyona bırakmışlardır. En fazla sayıda tetraploid bitki %0.3 Kolşisin solüsyonunda 16 saat bekletilen kalluslardan elde edilmiştir.

Cai ve Kang (2011) *Populus pseudo-simonii*'nin yaprak eksplantlarını, 0, 6 ve 12 gün boyunca 1.78 μ M BA ve 1.08 μ M NAA içeren MS besin ortamında kültüre aldıktan sonra 1, 2 ve 3 gün 25, 50 ve 75 μ M Kolşisin içeren sıvı MS ortamında bekletmişlerdir. En fazla tetraploid indüksiyon etkinliği, 6 gün boyunca ön kültüre edilmiş ve daha sonra 3 gün boyunca 50 μ M Kolşisin içeren sıvı besin ortamında bekletilmiş yaprak eksplantından elde edilmiştir.

Dhooghe vd. (2011) in vitro poliploid bitki indüksiyonunda bitkicik, sürgün, tomurcuklar, sürgün uçları, boğumlar, tohum, embriyo, kallus, somatik embriyo ve hücre süspansiyon kültürleri gibi farklı eksplantların kullanılabildiği yapılan farklı çalışmalardan derlenmiştir.

Germana (2012) yapay poliploidizasyon, kolşisin, orizalin, trifluralin, pronamid ve amiproposmetil (APM) gibi antimitotik ajanlarla indüklenebileceğini bildirmektedir.

Dabkeviciene vd. (2016) *Trifolium pratense* ve *Trifolium hybridum*'da farklı antimitotik ajanlarının ve poliploidizasyon yöntemlerinin etkisini incelemişlerdir. Çimlenen tohumlarının kolşisin çözeltisinde geleneksel ıslatılmasının etkisi, in vitro kültürde embriyoların kolşisin ile muamelesi ile karşılaştırılmıştır. *T. pratense*'de embriyolara kolşisin uygulamasında, fidelere kolşisin uygulamasına oranla 3.3 kat daha fazla tetraploid bitki elde edilmiştir. *T. pratense*'de kolşisin, amiproshos-metil ve oryzalin aynı sonuçları verirken, *T. hybridum*'da kolşisin daha iyi sonuçlar vermiştir.

Dabkeviciene vd. (2017) *Lolium multiflorum*, *L. perenne* ve *Festuca pratensis*'te yürüttükleri denemede in vitro da çimlendirdikleri embriyolara kolşisin, amiproshos-metil, trifluralin ve oryzalin uygulamışlardır. En etkili anti-mitotik ajanın kolşisin olduğunu ve elde edilen autotetraploid *F. pratensis* bitkilerinin yüksek kuru madde ve tohum verimi ile yeni çeşit geliştirmede kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Talebi vd. (2017) *Agastache foeniculum*'da 5000, 12500 ve 17500 μ M kolşisin; 10, 50, ve 100 μ M orizalin ve trifluralinin poliploid indüksiyonu üzerine etkilerini incelemiştir. Apikal meristemler, tohumlar ya da fideler 6, 12, ve 24 saat süreyle antimitotik ajanlarla muamele edilmiştir. Farklı antimitotik ajanların canlılık oranı üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Artan antimitotik ajan miktarında canlılık oranı düşmüştür. Tohum uygulamalarında maksimum tetraploid oranı 100 μ M orizalin uygulamasından elde edilirken apikal meristem ve fidelerde 17500 μ M Kolşisin ve 50 μ M trifluralin uygulamalarında elde edilmiştir.

Grosso vd. (2018) *Dendrobium* hibritlerinde protokorm benzeri yapıları %0, 0.025, 0.05 ve 0.075 kolşisin içeren sıvı besi ortamında 3, 10 ve 21 gün süreyle bekletmişlerdir. Araştırma sonucunda %0.075 kolşisin içeren ortamda 3 günlük uygulama sonucunda %80 tetraploid bitki oranı elde etmişlerdir.

Eng ve Ho (2019) poliploidi indüksiyonunda kolşisin konsantrasyonu ve uygulama süresinin oldukça önemli olduğunu ve genellikle kolşisinin %0.05-1 aralığında uygulama metoduna göre değişmekle birlikte 1 saatten birkaç haftaya kadar uygulanabileceğini, indüksiyon aşamasında önemli olan kolşisinin hücre çekirdeğine girmesi ve tubulinlere bağlanması olduğunu ifade etmişlerdir. Eng ve Ho (2019) Kolşisin bitkilerde kromozom katlaması amacıyla en yaygın kullanılan antimitotik mutagen olduğunu, kolşisinin α - ve β -tubulin dimerlerine bağlanarak hücre döngüsünde mikrotubul polimerizasyonunu inhibe ettiğini ve böylelikle anafazda kromozom/kromatid taşınmasını önlediğini ve böylelikle sitokinezde iki katına çıkan kromozom sayısına sahip hücrelerin oluşumuna yol açtığını bildirmektedir.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Çalışmada Uşak yöresinde yaygın olarak tarımı yapılan yerel popülasyon materyal olarak kullanılmıştır. Rejenerasyon denemesinde kotiledon boğum ve sürgün uçları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.2. Çalışmada Kullanılan Besin Ortamları ve Bitki Büyüme Düzenleyiciler

MSO besin ortamı: Murashige ve Skoog (1962) makro-mikro elementleri ve vitaminlerini içeren 30 g/L sukroz ilaveli 7 g/L agar ile katılaştırılmış ortam (Duchefa M0222; Tablo 2.1.).

Bitki Büyüme Düzenleyiciler (BBD) ve Saklanma Koşulları: Çalışmada sitokinin olarak TDZ (Thidiazuron), BAP (6- Benzilaminopurin) ve mT (meta-Topolin); oksin olarak ise NAA (α -naftalinasetik asit) ve IBA (Indole-3 bütirik asit) kullanılmıştır. Bu büyüme düzenleyiciler uygun solüsyonlarda çözüldükten sonra uygun sıcaklık koşullarında saklanmıştır (Tablo 2.2.).

2.3. Genel Doku Kültürü Şartları

Ortamlar bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır. Steril kabinin dezenfeksiyon işlemleri %70'lik teknik etil alkol, kullanılan pens ve bisturinin sterilizasyonu %70'lik teknik etil alkol ve bunzen beki alevi kullanılmıştır. Saf su, besin ortamların ve çalışmada kullanılan alet ekipmanın sterilizasyonu otoklav kullanılarak 1.5 atmosfer basınç altında, 121 °C'de 20 dakika sürede yapılmıştır. Isıya dayanıklı olmayan bitki büyüme düzenleyiciler ise filtre sterilizasyonu yapılmıştır. Tüm steril çalışmalar hepa filtreli steril kabin (Nüve L120) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tüm besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.5 ile 5.8 arasında ayarlanmıştır. Çalışmada kültürler

16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyotta, $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve 5000 lüks ışık yoğunluğunda büyütülmüştür.

Tablo 2.1. MS besin ortamının içeriği

İçerik	Miktar (mg/L)
Makro elementler	
CaCl_2	332.02
KH_2PO_4	170.00
KNO_3	1900.00
MgSO_4	180.54
NH_4NO_3	1650.00
NaH_2PO_4	--
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	--
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	--
Mikro elementler	
$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0.025
FeNaEDTA	36.70
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$	16.90
$\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	8.60
Vitaminler	
Glycine	2.00
Myo-inositol	100.00
Nikotinik asit	0.50
Pyridoksin HCL	0.50
Thiamine HCL	0.1

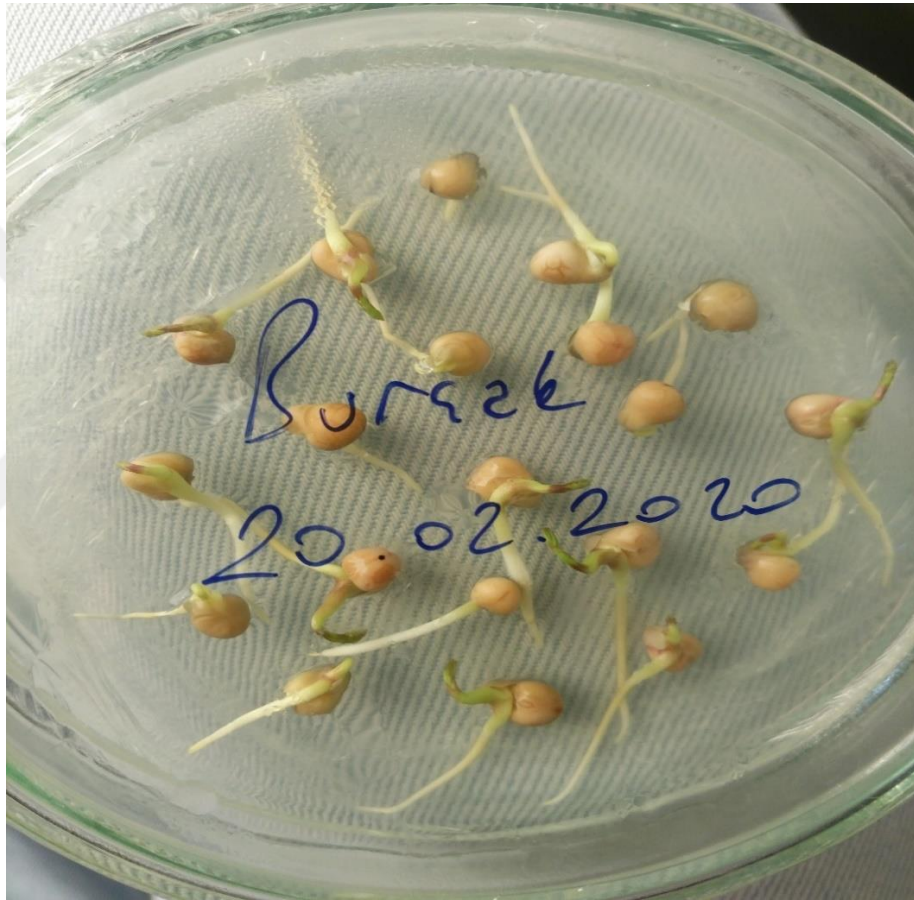
<https://www.duchefa-biochemie.com/product/category/id/16/name/plant-tissue-culture-media>, Murashige ve Skoog, 1962

Tablo 2.2. BBD saklanma koşulları ve çözücüler

Bitki Büyüme Düzenleyici		Saklama koşulları	Çözücüler/Sterilizasyon
Sitokininler	BAP	+4	1N NaOH/otoklav
	TDZ	-20	DMSO/filtre sterilizasyonu
	<i>mT</i>	-20	1N NaOH/filtre sterilizasyonu
Oksinler	NAA	+4	1N NaOH/otoklav
	IBA	+4	1N NaOH/otoklav

2.4. Tohumların Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan burçak tohumları ayıklandıktan sonra %50 ticari çamaşır suyu çözeltisinde 15 dakika süreyle manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak steril edilmiştir. Tohumlar sterilize işleminden sonra 3 kez ilki 5 dakika olmak üzere saf su ile durulanmıştır. Steril edilen tohumlar MSO besin ortamına her petri kabına 20 adet olarak ekilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çimlenen *Vicia ervilia* tohumları

2.5. İn vitro Kültürlerin Oluşturulması

İn vitro sürgün rejenerasyonu amacıyla MSO besin ortamlarına ekilen tohumların 5-7 gün sonunda oluşan fidelerin sürgün ucu ve kotiledon boğum kısımları eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantlar BAP (0.5, 1, ve 2 mg/L), TDZ (0.25, 0.5, 1 ve 1.5 mg/L), mT (1, 2 ve 4 mg/L) sitokininlerinin farklı konsantrasyonlarını veya 0.25 mg/L ile kombinasyonlarını içeren MSO besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcında 7-8 hafta sonra sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sürgün

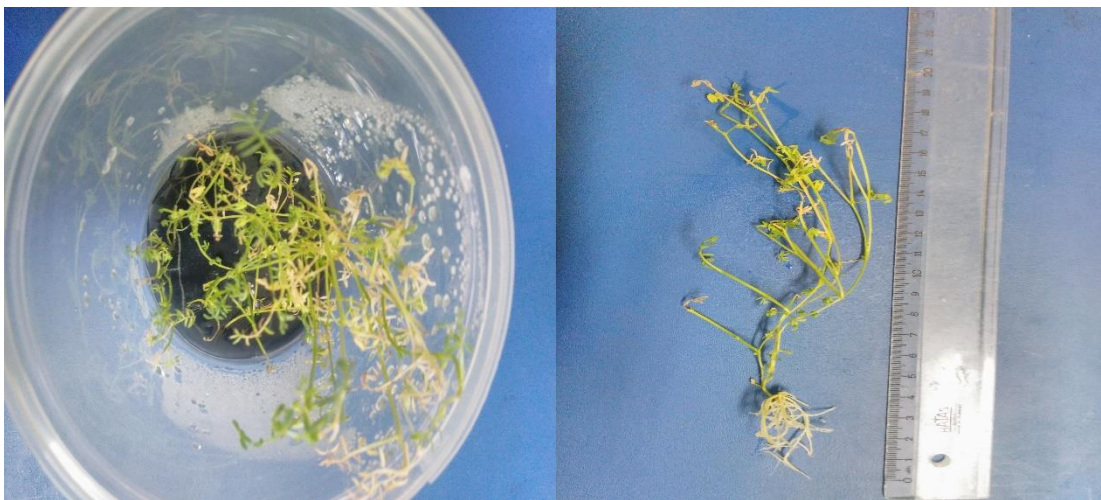
oluşturan eksplant sayısı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu belirlenmiştir.

2.6. Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenerasyon sonucunda elde edilen sürgünlerin ölçüm işlemlerinin sonrasında köklendirme işlemi için iki farklı uygulama yapılmıştır. Birinci uygulamada 0.5, 1 ve 2 mg/L IBA, 30 g/L şeker, 7.5 g/L agar içeren MS ortamında köklendirme işlemi gerçekleştirilirken, ikinci uygulamada 1 mg /L IBA oksin kaynağı olarak belirlenmiş, tam MS, yarım MS ve 1 g/L aktif karbon uygulaması yapılmıştır. Kök oluşturan sürgünler sayılarak kök oluşturan sürgün yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 2.2 ve 2.3).



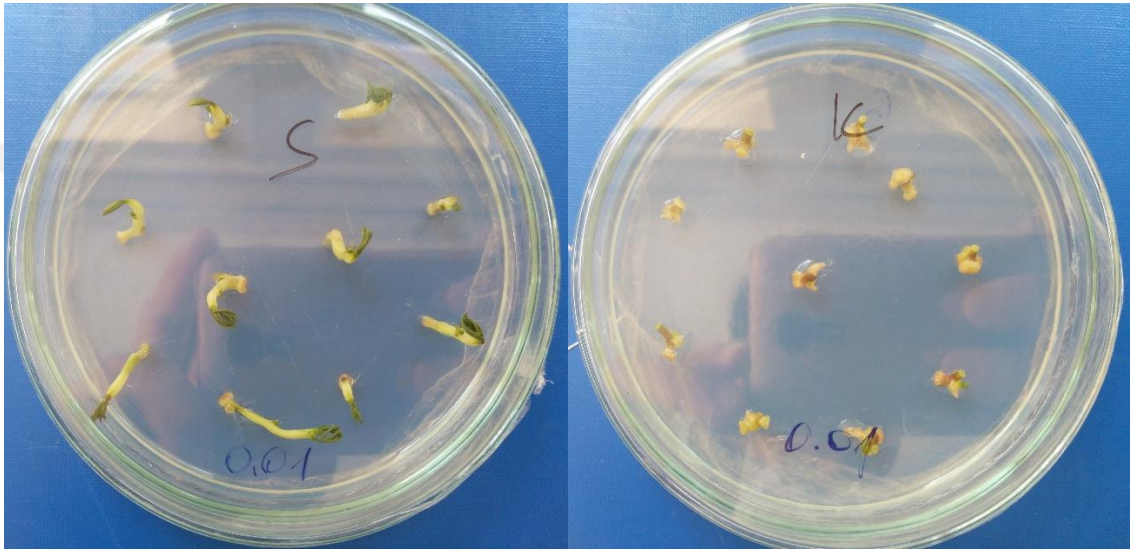
Şekil 2.2. IBA uygulamasında köklenen *Vicia ervilia*



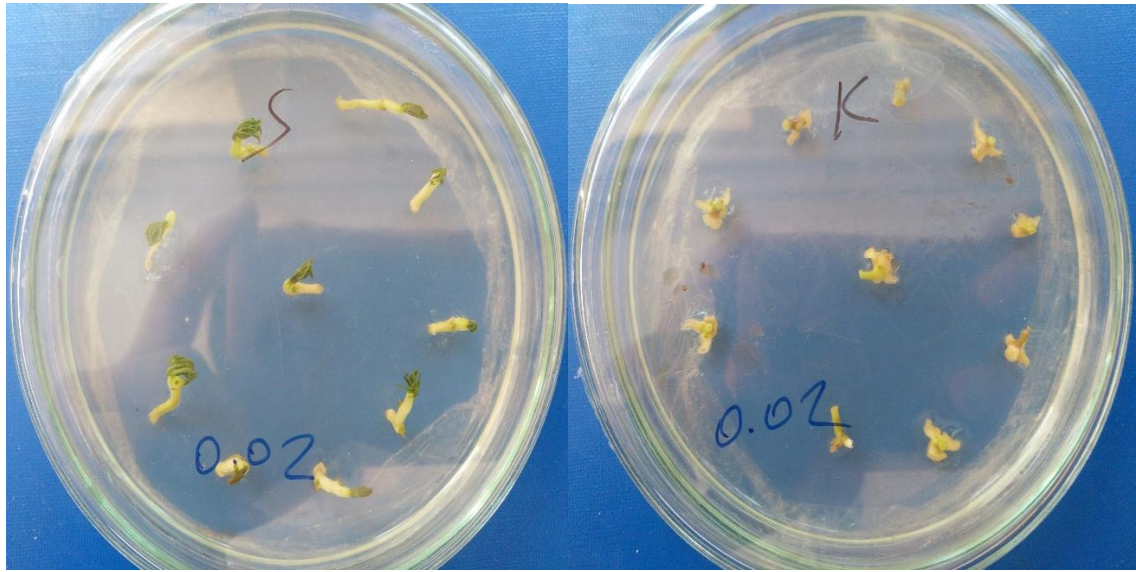
Şekil 2.3. IBA ve aktif karbon uygulamasında köklenen *Vicia ervilia*

2.7. Eksplantlara Katı Ortamda Kolşisin Uygulaması

MSO besin ortamlarına ekilen tohumlardan 7 gün sonunda elde edilen bitkilerden poliploid bitki elde etmek amacıyla kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları %0.01 ve 0.02 kolşisin ve 1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren katı MSO besin ortamlarında 3 ve 10 gün süreyle kültüre alındıktan sonra kolşisin içermeyen katı besin (1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren MSO ortamı) ortamına aktarılmıştır (Şekil 2.4 ve 2.5).



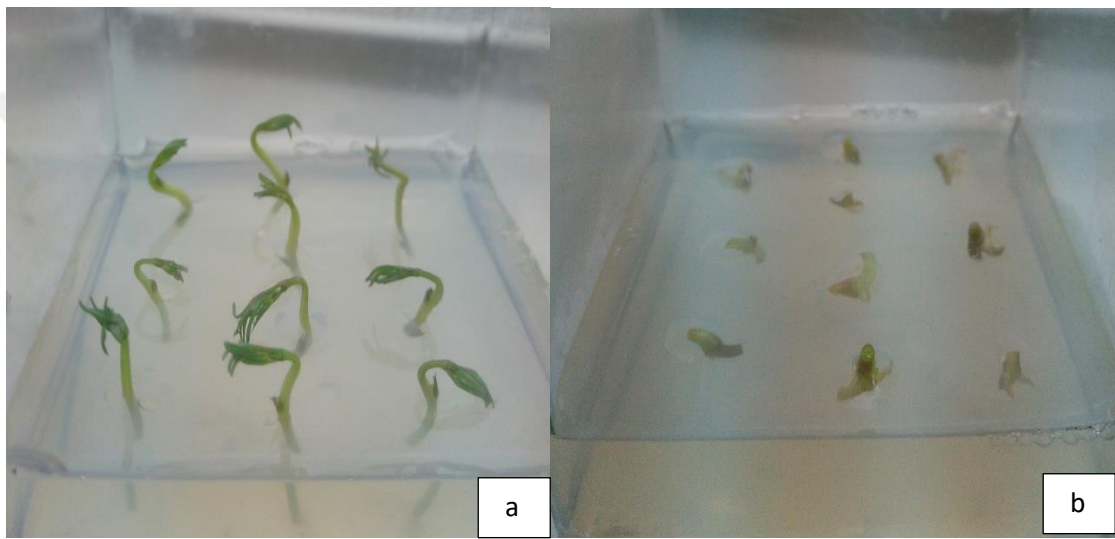
Şekil 2.4. Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında %0.01 kolşisin uygulaması



Şekil 2.5. Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında % 0.02 kolşisin uygulaması

2.8. Eksplantlara Sıvı Ortamda Kolşisin Uygulaması

MSO besin ortamlarına ekilen tohumlardan 7 gün sonunda elde bitkilerden poliploid bitki elde etmek amacıyla kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları %0.001 ve 0.01 kolşisin, 1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren sıvı MS besin ortamlarında 1, 3 ve 6 gün süreyle kültüre alındıktan sonra steril saf su ile durulanarak kolşisin içermeyen katı besin ortamına (1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren MSO ortamı) aktarılmıştır (Şekil 2.6a ve b).



Şekil 2.6. Kolşisine uygulaması sonrasında eksplantlar

a. Sürgün ucu eksplantı, b. Kotiledon boğum eksplantı

2.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Sürgün ucu ve kotiledon boğumların eksplant olarak kullanıldığı denemeler tesadüf parselleri deneme deseninde 2 faktörlü (10 farklı ortam ve 2 farklı eksplant) olarak kurulmuştur. Denemeler her tekerrürde 7 eksplant olacak şekilde 4 tekerrürlü yürütülmüştür. Köklendirme denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrür 28 eksplant içerecek şekilde yürütülmüştür. Yüzde olarak elde edilen verilere varyans analizinden önce “arcsin” transformasyon uygulanmıştır. Denemelerde elde edilen verilerin SPSS 16.0 paket programı yardımıyla bilgisayarda varyans analizleri yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklar %5 olasılık düzeyine göre Duncan çoklu karşılaştırma testi ile ortaya çıkarılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. İn Vitro Sürgün Rejenerasyonu

Burçakta sürgün rejenerasyonu başarısını belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada çimlendirilen burçak tohumlarından elde edilen fidelerden kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları BAP, TDZ ve mT içeren MSO besin ortamında 7-8 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Denemede sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluklarına ait ölçümler yapılmıştır (Şekil 3.1a, b, c, d, e, f).

3.1.1. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantlarında farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi sonuçları Tablo 3.1’de verilmiştir. Varyans analizi tablosu incelendiğinden sürgün oluşturan eksplant yüzdesi üzerine eksplant ve sitokinin $\times$ eksplant interaksyonunun etkisi %1 düzeyinde önemli bulunurken, sitokininlerin etkisi %5 düzeyinde önemli bulunmuştur.

En yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesi sürgün ucu eksplantında %100 ile 0.5 ve 1 mg/L BAP, 0.5 ve 1 mg/L TDZ, 1, 2 ve 4 mg/L mT içeren besin ortamlarından elde edilirken; en düşük %75 ile 0.25 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Kotiledon boğum eksplantında ise en yüksek sürgün rejenerasyonu % 92.85 ile 1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren ortamlardan, en düşük ise %57.14 ile 2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Sürgün ucu eksplantının sürgün rejenerasyonu ortalama %95.71, kotiledon boğum eksplantının ise %79.64 olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi tablosu

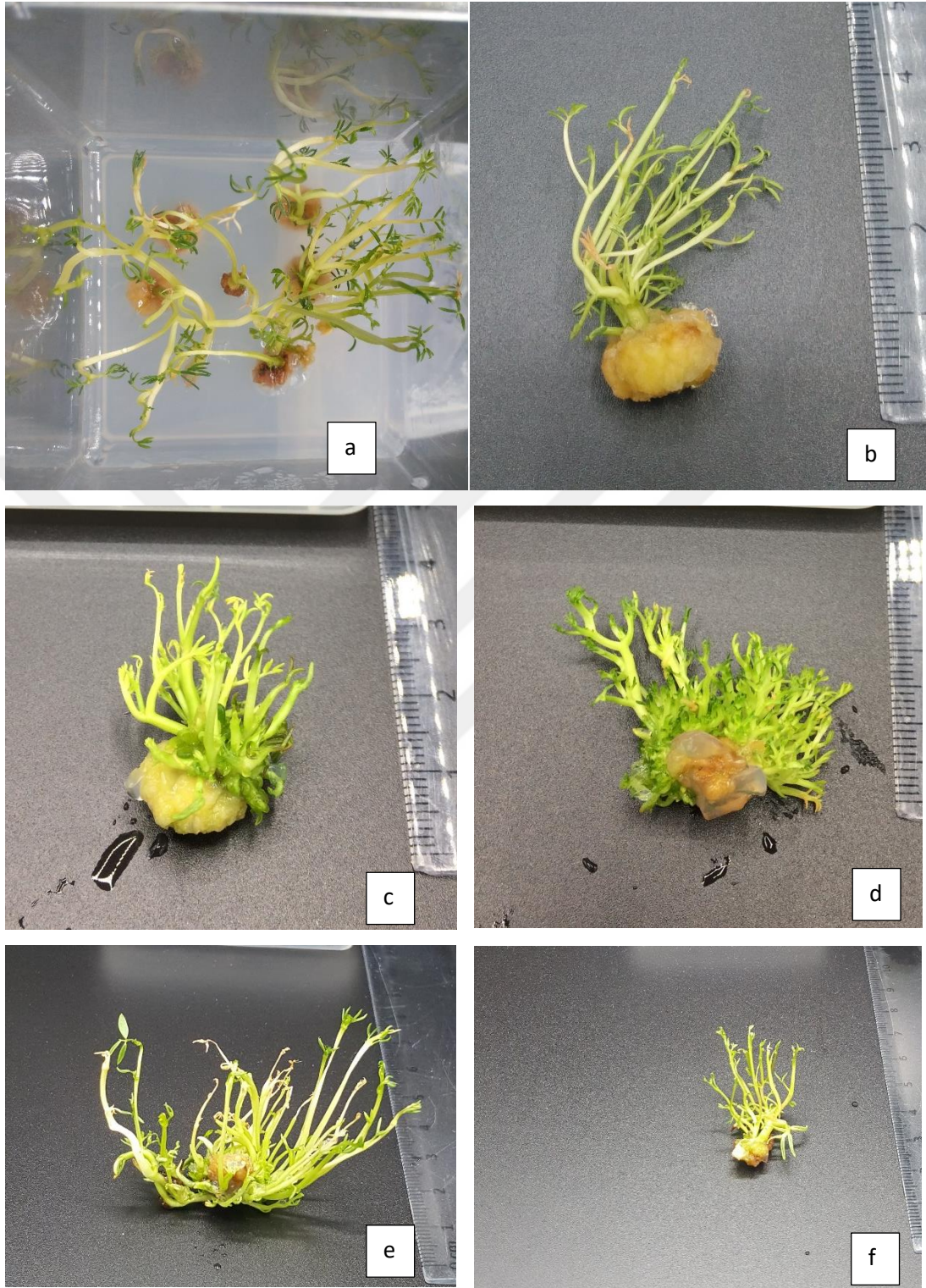
Varyasyon Kaynakları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Sitokinin	2774.867	9	308.319	2.274*
Eksplant	6240.141	1	6240.141	46.033**
Sitokinin × Eksplant	4305.855	9	478.428	3.529**
Hata	8133.555	60	135.559	
Genel	21454.417	79		

Transformasyon değerlerine yapılan varyans analizidir. * 0.05 düzeyinde, ** 0.01 düzeyinde önemlidir

Tablo 3.2. Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarında sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilen sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalama değerler (%)

Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Eksplantlar		Ortalamlar
	Sürgün ucu	Kotiledon Boğum	
0.5 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	85.71 (74.22) a	92.86 (82.11)
1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	92.85 (78.89) a	96.43 (84.45)
2 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	96.43 (84.45) a	82.14 (68.29) ab	89.28 (76.37)
0.25 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	75 (63.62) b	85.72 (63.62) abc	80.36 (68.73)
0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	85.71 (70.82) a	92.86 (80.41)
1 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	71.43 (61.48) abc	85.71 (75.74)
1.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	85.71 (70.82) ab	85.71 (67.79) ab	85.71 (69.30)
1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	89.29 (76.37) a	94.64 (83.19)
2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	57.14 (49.29) c	78.57 (69. 65)
4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	100 (90) a	60.71 (51.25) bc	80.36 (70.63)
Ortalamlar	95.71 (84.89)	79.64 (67.23)	

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 3.1. Sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu
 Kotiledon eksplantı 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortam, b. Sürgün ucu eksplantı 4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortam, c. Sürgün ucu eksplantı 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren ortam, d. Kotiledon eksplantı 1 mg/L TDZ+0.25 NAA içeren ortam, e. Kotiledon eksplantı 1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren ortam, f. Sürgün ucu 1 mg/L BAP+0.25 mg/l NAA içeren ortam.

3.1.2. Eksplant başına sürgün sayısı

Farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları Tablo 3.3'te verilmiştir. Varyans analizi tablosu incelendiğinde eksplant başına sürgün sayısı üzerine eksplant, sitokinin ve eksplant $\times$ sitokinin interaksiyonunun etkisi %1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

En yüksek eksplant başına sürgün sayısı sürgün ucu eksplantında 9.75 adet ile 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamından elde edilirken; 0.5 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA, 1 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA, 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA, 2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA ve 4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortamlardan elde edilen değerler istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. En düşük eksplant başına sürgün sayısı ise 4.91 adet ile 1.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Kotiledon boğum eksplantında ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 15.51 ve 14.97 adet ile sırasıyla 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA ve 0.25 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Kotiledon boğum eksplantında en düşük eksplant başına sürgün sayıları 3.69 adet ile 2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir.

Tablo 3.3. Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynakları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Sitokinin	346.358	9	38.484	16.518**
Eksplant	36.666	1	36.666	15.737**
Sitokinin $\times$ Eksplant	322.255	9	35.806	15.368**
Hata	139.794	60	2.330	
Genel	845.074	79		

* 0.05 düzeyinde, ** 0.01 düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.4. Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarında sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilen eksplant başına sürgün sayısına ait ortalama değerler (adet)

Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Eksplantlar		Ortalama
	Sürgün ucu	Kotiledon Boğum	
0.5 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	7.75 abcd	8.56 cd	8.16
1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	6.89 bcde	9.60 bc	8.25
2 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	5.79 de	7.48 cd	6.63
0.25 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	6.17 cde	14.97 a	10.57
0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	9.75 a	15.51 a	12.63
1 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	8.10 abcd	11.48 b	9.79
1.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	4.91 e	6.22 de	5.57
1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	8.96 ab	7.17 d	8.07
2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	8.25 abc	3.69 f	5.97
4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	9.39 a	4.84 ef	7.11
Ortalama	7.60	8.95	

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

3.1.3. Sürgün uzunluğu

Farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının burçakta sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi sonuçları Tablo 3.5'te verilmiştir. Varyans analiz tablosu incelendiğinde sürgün uzunluğu üzerine eksplant ve sitokininlerin etkisi %1 düzeyinde önemli bulunurken sitokinin × eksplant interaksyonu %5 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 3.5. Burçakta farklı sitokinin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarının sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynakları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Sitokinin	28.123	9	3.125	11.050**
Eksplant	2.720	1	2.720	9.617**
Sitokinin × Eksplant	6.752	9	0.750	2.653*
Hata	16.966	60	0.283	
Genel	54.562	79		

* 0.05 düzeyinde, ** 0.01 düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.6 incelendiğinde sürgün ucu eksplantında en yüksek sürgün uzunluğu değerleri sırasıyla 4.06, 4.01 ve 3.44 cm ile 2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA, 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA ve 4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. En düşük ise 1.75 cm ile 1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamında saptanmıştır. Kotiledon boğum eksplantında ise en yüksek sürgün uzunluğu 3.94 cm ile 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Genel olarak her iki eksplantta da sürgün uzunluğunda en etkili ortam 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.6. Burçakta farklı sitokin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonlarında sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarından elde edilen sürgün uzunluğuna ait ortalama değerler (cm)

Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Eksplantlar		Ortalama
	Sürgün ucu	Kotiledon Boğum	
0.5 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	2.63 c	2.71 b	2.67
1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	2.72 bc	2.27 bc	2.50
2 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA	1.75 d	2.16 bc	1.96
0.25 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	2.42 cd	2.35 bc	2.38
0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	2.56 cd	2.50 bc	2.53
1 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	2.50 cd	1.82 c	2.16
1.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA	2.19 cd	1.78 c	1.99
1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	4.01 a	3.94 a	3.98
2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	4.06 a	2.23 bc	3.15
4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA	3.44 ab	2.83 b	3.14
Ortalama	2.83	2.46	

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

3.2. İn Vitro Köklendirme

Doku kültürü rejenerasyonu sonucunda elde edilen sürgünlerin köklendirme çalışmalarında iki farklı protokol uygulanmıştır. Birinci protokolde sürgünler 0.5, 1 ve 2 mg/L IBA, 30 g/L şeker içeren 7.5 g/L agar ile katılaştırılan tam MS besin ortamında köklendirilirken; ikinci protokolde 1 mg/L IBA oksin kaynağı olarak kullanılmış, yarım ve tam MS ile 1 g/L aktif karbon uygulaması yapılmıştır. 6-7 haftalık kültür süresi sonucunda kök oluşturan eksplant yüzdeleri belirlenmiştir. Deneme sonucunda birinci

ve ikinci protokolde kök oluşturan sürgün yüzdesine uygulamaların etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 3.7 ve Tablo 3.8).

Tablo 3.7. Farklı IBA dozlarının burçakta kök oluşturan sürgün yüzdesi üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynakları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
IBA	328.613	2	164.306	2.297
Hata	429.203	6	71.534	
Genel	757.816	8		

Transformasyon değerlerine yapılan varyans analizidir

Tablo 3.8. Farklı köklendirme ortamlarının burçakta kök oluşturan sürgün yüzdesi üzerine etkisine ait varyans analizi tablosu

Varyasyon Kaynakları	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Ortam	218.540	3	72.847	1.415
Hata	411.952	8	51.494	
Genel	630.492	11		

Transformasyon değerlerine yapılan varyans analizidir

Birinci protokolde 0.5, 1 ve 2 mg/L IBA, 30 g/L şeker içeren 7.5 g/L agar ile katılaştırılan tam MS ortamında besin ortamında köklendirilen sürgünlerde köklenme %1.333 ile 9.713 arasında değişim göstermiştir. En yüksek köklenme 1mg/l IBA içeren MSO besin ortamından elde edilmiştir. İkinci protokolde 1 mg/L IBA, yarım ve tam MS ile 1 g/L aktif karbon içeren ortamlarda ise köklenme %0 ile 5.952 arasında değişim göstermiştir.

Tablo 3.9. Burçakta farklı IBA dozlarında elde edilen kök oluşturan ekplant yüzdesine ait ortalama değerler (%)

IBA Konsantrasyonları	Kök Oluşturan Eksplant Yüzdesi
0.5 mg/L IBA	4.763
1 mg/L IBA	9.713
2 mg/L IBA	1.333

Tablo 3.10. Burçakta farklı köklendirme ortamlarında elde edilen kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalama değerler (%)

Ortamlar	Kök Oluşturan Eksplant Yüzdesi
1 mg/l IBA + tam MS	2.380
1 mg/L IBA + yarım MS	5.952
1 mg/L IBA + tam MS + 1g/L aktif karbon	3.573
1 mg/L IBA + yarım MS + 1 g/L aktif karbon	0

3.3. Katı Ortamda Kolşisin Uygulamaları

Otopoliploid bitki elde etmek amacıyla 7 gün çimlendirilen burçak tohumlarından kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları %0.01 ve 0.02 kolşisin içeren katı MS besin ortamında ortamlarında 3 ve 10 gün süreyle kültüre alındıktan sonra kolşisin içermeyen katı besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.2 a ve b). Tablo 3.11. incelendiğinde sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarında kolşisine içermeyen kontrol ortamında sırasıyla 48 ve 55 adet eksplantta sürgün oluşumu elde edilmiştir. Sürgün ucu eksplantında %0.01 kolşisinin 3 ve 10 gün süreyle uygulamalarında sırasıyla 48 ve 28; %0.02 kolşisinin 3 ve 10 gün süreyle uygulamalarında ise 51 ve 25 adet eksplant sürgün oluştururken kotiledon boğum eksplantlarında sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir. Sürgün ucu eksplantlarından elde edilen sürgünler 1 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA içeren MSO besin ortamında çoğaltıldıktan sonra 1 mg/L IBA içeren MSO besin ortamında köklenmeye alınmış ancak köklendirilememiştir (Şekil 3.2. c ve d).

Tablo 3.11. Burçakta sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarına katı besin ortamında farklı sürelerde uygulanan kolşisin dozlarında elde edilen sürgün sayıları (adet)

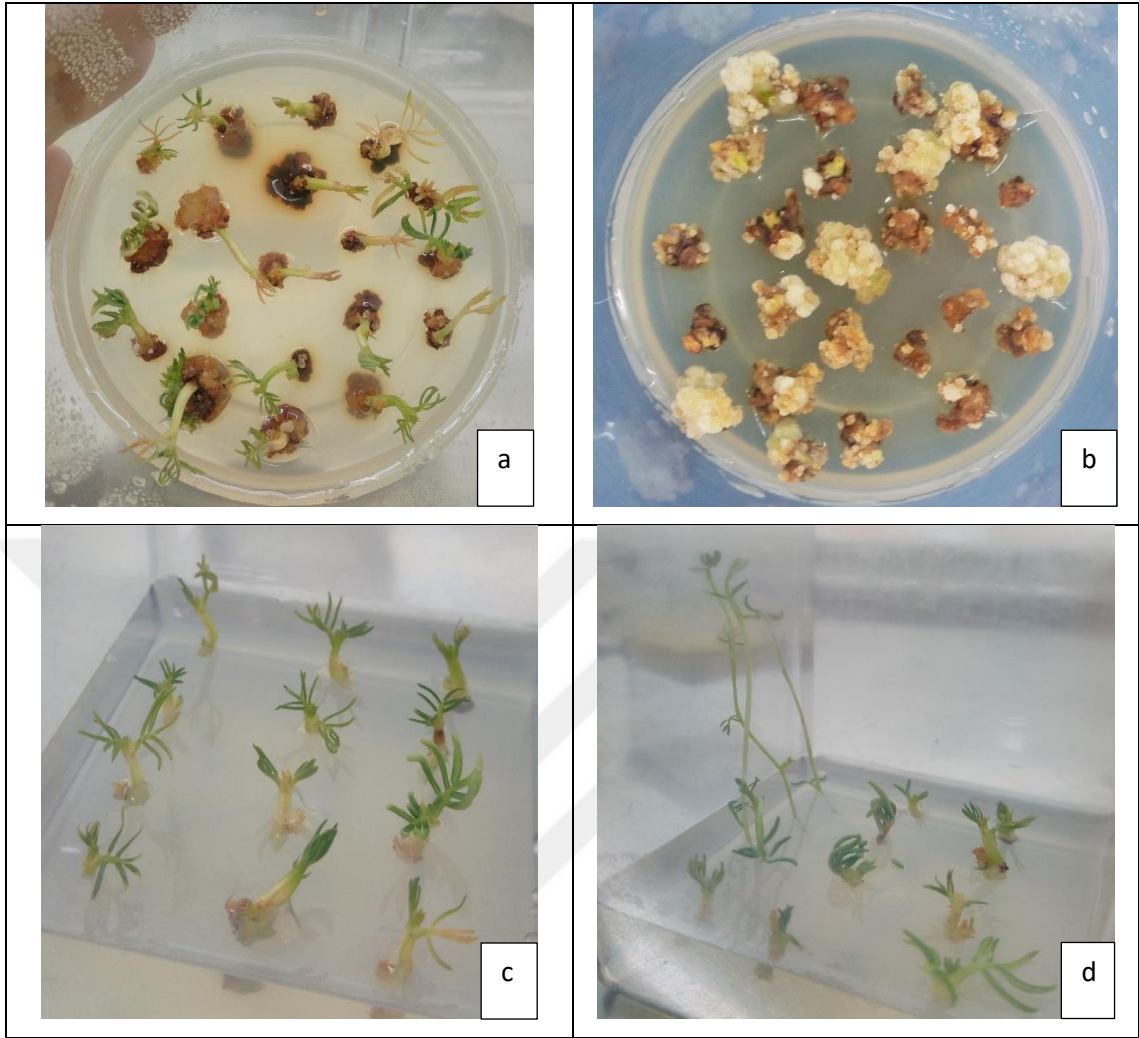
Kolşisin dozu	Uygulama zamanı	Eksplant tipi	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (Adet)	Sürgün Oluşturan Eksplant Sayısı (Adet)
Kontrol	Kontrol	Sürgün ucu	60	48
		Kotiledon boğum	60	55
% 0.01	3 gün	Sürgün ucu	60	48
		Kotiledon boğum	60	0
% 0.02	3 gün	Sürgün ucu	60	51
		Kotiledon boğum	60	0
% 0.01	10 gün	Sürgün ucu	60	28
		Kotiledon boğum	0	0
% 0.02	10 gün	Sürgün ucu	60	25
		Kotiledon boğum	0	0

3.4. Sıvı Ortamda Kolşisin Uygulamaları

Otopoliploid bitki elde etmek amacıyla 7 gün çimlendirilen burçak tohumlarından kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları %0.001 ve 0.01 kolşisine içeren sıvı MS besin ortamında ortamlarında 1, 3 ve 6 gün süreyle kültüre alındıktan sonra kolşisin içermeyen katı besin ortamına aktarılmıştır. Deneme sonucunda %0.001 kolşisinde 1, 3 ve 6 gün bekletilen kotiledon boğum eksplantlarından sırasıyla 18, 14 ve 14 adet, sürgün ucu eksplantlarından ise 60, 44 ve 36 adet; %0.01 kolşisine içeren sıvı ortamda bekletilen kotiledon boğum eksplantlarından 2, 6 ve 11 adet, sürgün ucu eksplantlarından ise 60, 18 ve 12 adet sürgün elde edilmiştir. Gelişen sürgünlerde daha sonra köklenme kaydedilmemiştir.

Tablo 3.12. Burçakta sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplantlarına farklı sürelerde sıvı besin ortamında uygulanan kolşisin dozlarında elde edilen sürgün sayıları (adet)

Kolşisin dozu	Uygulama zamanı	Eksplant Tipi	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (adet)	Sürgün Oluşturan Eksplant Sayısı (adet)
Kontrol	Kontrol	Sürgün ucu	60	60
		Kotiledon boğum	60	56
% 0.001	1 gün	Sürgün ucu	60	60
		Kotiledon boğum	60	18
% 0.01	1 gün	Sürgün ucu	60	60
		Kotiledon boğum	60	2
% 0.001	3 gün	Sürgün ucu	60	44
		Kotiledon boğum	60	14
% 0.01	3 gün	Sürgün ucu	60	18
		Kotiledon boğum	60	6
% 0.001	6 gün	Sürgün ucu	60	36
		Kotiledon boğum	60	14
% 0.01	6 gün	Sürgün ucu	60	12
		Kotiledon boğum	60	11



Şekil 3.2. Katı ortamda 10 gün Kolşisin uygulaması

- a. Sürgün uçlarına %0.01 kolşisin uygulaması
- b. Kotiledon boğumlara %0.01 kolşisin uygulaması
- c, d. %0.01 kolşisin uygulanan sürgün uçlarından elde edilen sürgünlerin çoğaltımı

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında burçak (*Vicia ervilia* L. Wild.) bitkisinde in vitro bitki rejenerasyonu ve in vitro ortamda kolşisine uygulaması ile poliploid bitki elde etme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Öncelikli olarak bitki rejenerasyonu çalışmaları yürütülmüştür. Rejenerasyon denemesinde çimlendirilen burçak tohumlarından elde edilen fidelerden kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları farklı dozlarda BAP, TDZ ve mT içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 7-8 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna özellikleri belirlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde sitokininler, eksplantlar ve sitokinin $\times$ eksplant interaksyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sürgün ucu eksplantının sürgün rejenerasyonu %75-100, kotiledon boğum eksplantının ise %57.14-92.85 arasında değişim göstermiştir. Genel olarak sürgün ucu eksplantının sürgün rejenerasyonu frekansı kotiledon boğum eksplantlarında daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde Sancak (1999) koca fiğde, Sancak vd. (2000) Macar fiğinde, Çöçü vd. (2013) adi fiğde ve Erdoğan vd. (2005) burçakta yaptıkları çalışmalarda eksplantların rejenerasyon frekanslarının farklılık gösterdiğini bildirmektedirler.

Eksplant başına sürgün sayıları incelendiğinde varyasyon kaynaklarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En fazla eksplant başına sürgün sayısı sürgün ucu eksplantında 9.75 ile 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren MS besin ortamından elde edilirken bu ortam ile 0.5 mg/L BAP+0.25 mg/L NAA, 1 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA, 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA, 2 mg/L mT+0.25 mg/L NAA ve 4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortamlar istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. Kotiledon boğum eksplantında ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı 15.51 ve 14.97 adet ile sırasıyla 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA ve 0.25 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren

MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Eksplant tipine göre eksplant başına en yüksek sürgün rejenerasyonu elde edilen ortamlar birbirinden farklılık göstermiştir. Daha önce Erdoğan vd. (2005) tarafından 6 farklı burçak hattında yürütülen araştırmada da olgunlaşmamış embriyo ve kotiledon eksplantları eksplantlarında ortamların sitokinin içeriğine göre en yüksek sürgün sayıları farklılık göstermiştir (Erdoğan vd., 2005). Macar fiğinde Sancak vd. (2000) tarafından yürütülen çalışmada en yüksek eksplant başına sürgün sayısı olgunlaşmamış kotiledon eksplantında 7.5 adet ile 20 µm BAP ve 2.5 µM NAA içeren ortamdan elde edilirken, olgunlaşmamış embriyo eksplantında 15.9 adet 10 µM BAP ve 2.5 µM NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Nitekim Magyar-Tabori vd. (2010) elmada organogenesis üzerine sitokininlerin önemi üzerine yaptıkları derleme besin ortamına eklenen sitokininlerin bölünme ve organogenesis indüklemeleri ve diğer fizyolojik ve gelişimsel süreçleri etkilemeleri nedeniyle önemli olduğunu bildirmektedir. Ayrıca sitokinin türü ve konsantrasyonunun doku kültürünün başarısını etkilediğini çünkü sitokininlerin alımlarının, taşınımalarının ve metabolizmalarının çeşitler arasında değişim gösterdiğini ve bir eksplantın endojen sitokininleri ile etkileşime girebildiğini ifade etmişlerdir.

Pürin olmayan bir fenilüre bileşiği olan TDZ, pürin tipi sitokininlerden daha etkili ve sürgün çoğaltımını uyarma konusunda oldukça başarılıdır (Kumari vd.,2018). Ancak bitki rejenerasyonu üzerine sürgün çoğaltımının ve uzamasının engellenmesi ile birleşmiş sürgün gibi zararlı etkilerde gösterebilir (Dewir vd., 2018; Kumari vd., 2018). Çünkü TDZ, sitokinin oksidaz enzimleri tarafından parçalanmadığından ve uygulanan dokularda kalır ve bu durumda ortama doğrudan eklenen yüksek konsantrasyonlarda TDZ bitkilerde zararlı etkiye neden olabilir (Dewir vd., 2018; Kumari vd., 2018; Kumari vd., 2021). Bu nedenle TDZ konsantrasyonunun optimizasyonu ve uygulama şekli oldukça önemlidir. Her iki eksplanta da 0.5 mg/L TDZ’de en yüksek eksplant başına sürgün sayısı elde edilirken TDZ konsantrasyonunu artmasıyla eksplant başına sürgün sayısında bir azalma meydana gelmiştir. Benzer şekilde TDZ konsantrasyonlarında artışa bağlı olarak eksplant başına sürgün sayısında azalma tüylü fiğde Aasim vd. (2011) tarafından da bildirilmektedir.

Sürgün uzunluğu incelendiğinde en yüksek değerler sürgün ucu eksplantında 1, 2 ve 4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA, kotiledon boğum eksplantında ise 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Her iki eksplanta da mT sürgün uzunluğunun

artmasına neden olmuştur. Benzer şekilde mT içeren ortamlarda daha yüksek sürgün uzunluğu değerleri farklı araştırmacılar tarafından *Allamanda carhartica*, *Salvia sclarea* ve *Withania somnifera* ile yürütülen araştırmalarda da belirlenmiştir (Khanam vd. 2020, Erişen vd. 2020, Kaur vd. 2021).

Elde edilen sürgünlerde köklendirme çalışmalarında iki farklı protokol uygulanmıştır. Birinci protokolde sürgünler 0.5, 1 ve 2 mg/L IBA, 30 g/L şeker içeren 7.5 g/L agar ile katılaştırılan tam MS ortamında besin ortamında köklendirilirken; ikinci protokolde 1 mg/L IBA oksin kaynağı olarak kullanılmış, yarım-tam MS ve 1 g/L aktif karbon içeren ortamda köklendirilmiştir. Burçakta köklenme %0-9.713 arasında değişim göstermiş olup daha önce burçak bitkisinde yapılan çalışmalardan çok düşük bulunmuştur. Daha önce Erdoğan vd. (2004)'te yürütülen çalışmada 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında %100 köklenme elde edilmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların genotiplerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Gianguzzi vd. (2020) *Capparis spinosa*'da köklenme üzerine genotipin çok etkili olduğunu ifade etmektedir. Hnatuszko-Konka vd. (2019) fasulyede çeşitlere göre köklenme oranını %22-66 arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Poliploidi çalışmalarında bitki elde etmek amacıyla 7 gün çimlendirilen burçak tohumlarından izole edilen kotiledon boğum ve sürgün ucu eksplantları %0.01 ve 0.02 kolşisin içeren katı MS besin ortamında ortamlarında 3 ve 10 gün süreyle; %0.001 ve 0.01 kolşisin içeren sıvı MS besin ortamında ise 1, 3 ve 6 gün süreyle kültüre alındıktan sonra kolşisin içermeyen katı besin ortamına aktarılmıştır. Katı ortamda yürütülen denemelerde sürgün ucu eksplantında %0.01 kolşisinin 3 ve 10 gün süreyle uygulamalarında sırasıyla 48 ve 28; %0.02 kolşisini 3 ve 10 gün süreyle uygulamalarında ise 51 ve 25 adet eksplant sürgün oluştururken kotiledon boğum eksplantlarında sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir. Sıvı ortamda yürütülen denemelerde ise %0.001 kolşisinde 1, 3 ve 6 gün bekletilen kotiledon boğum eksplantlarından sırasıyla 18, 14 ve 14 adet, sürgün ucu eksplantlarından ise 60, 44 ve 36 adet; %0.01 kolşisin içeren sıvı ortamda bekletilen kotiledon boğum eksplantlarından 2, 6 ve 11 adet, sürgün ucu eksplantlarından ise 60, 18 ve 12 adet sürgün elde edilmiştir. Sürgün ucu eksplantının kotiledon boğumlara göre daha başarılı sonuç verdiği tespit edilmiştir. Artan kolşisin dozları ve uygulama süreleri de sürgün oluşturan eksplant sayısını düşürmüştür. Touchel vd. (2020) başarılı bir poliploidi indüksiyonunun,

antimitotik ajanın etkili penetrasyonunun gerektirdiğini ve bu durumun uygulama süresine ve antimitotik ajanların konsantrasyonlarına, doku tiplerine ve temel besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri ile etkileşimlere bağlı olabileceğini ve in vitro koşulların, cinsler, türler ve hatta çeşitler arasında farklılık gösterdiğini ve genellikle in vitro poliploid indüksiyonunu için her bitki için farklı uygulamalar gerektirebileceğini ve bazı taksonlarda, poliploidi indüksiyonunun in vitro büyüme, gelişme ve kök oluşumunu etkileyebileceğini belirtmektedir.

Bu araştırmada burçak bitkisinde farklı sitokin konsantrasyonları ve oksin kombinasyonları uygulanarak sürgün ucu ve kotiledon boğum eksplanlarından sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı birlikte değerlendirildiğinde en başarılı sürgün rejenerasyonu sürgü ucu eksplantında 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA veya 4 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren, kotiledon boğum eksplantında ise 0.25 TDZ+0.25 mg/L NAA veya 0.5 mg/L TDZ+0.25 mg/L NAA içeren MSO besin ortamından elde edilmiştir. Ancak en yüksek sürgün uzunlukları her iki eksplant birlikte değerlendirildiğinde 1 mg/L mT+0.25 mg/L NAA içeren MSO besin ortamında belirlenmiştir. Elde edilen sürgünlerde en yüksek köklenme yüzdesi 1 mg/L IBA içeren MSO besin ortamında kaydedilmiştir. Kolşisine uygulamaları sonucunda sürgünler elde edilmiş ancak elde edilen sürgünler köklendirilememiş ve yaşatılamamıştır. Dolayısıyla in vitro poliploidizasyon çalışmalarında in vitro rejenerasyon, köklendirme ve dış koşullara alıştırma aşamalarında kullanılacak yöntemlerin çok iyi optimize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca sadece in vitro kültürler şartlarında değil dış koşullarda da farklı bitki organlarına yapılacak uygulamalarla poliploid bitki elde etme yönünde çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri (3. Baskı). Uludağ Üniversitesi, Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, Bursa, 584 s.
- Ayaşan, T. 2010. Burçağın (*Vicia ervilia* L.) hayvan beslemede kullanılması. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **16** (1): 167-171.
- Aasim, M., Sahin-Demirbag, N., Khawar, M.K., Kendir, H. ve Özcan, S. 2011. Direct axillary shoot regeneration from the mature seed explant of the hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). **Archives of Biological Sciences**, **63** (3): 757-762.
- Aasim, M. 2012. In vitro shoot regeneration of common vetch (*Vicia sativa* L.) using immature cotyledons. **Journal of Applied Biological Sciences**, **6**: 43-45.
- Arslan, M. 2019. Küresel iklim değişikliğinin olumsuz etkilerine karşı ümitvar baklagiller olarak mürdümük (*Lathyrus sativus* L.) ve burçak (*Vicia ervilia* L.)'ın önemi. **Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, **16** (1): 97-104.
- Balabanlı, C. 1998. Burçak hatların (*Vicia ervilia* (L.) Willd.)'da bazı tarımsal karakterlerin belirlenmesi üzerine bir araştırma. **Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi**, **7** (2): 45-50.
- Cai, X., Kang, X. Y. 2011. In vitro tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kita. **Plant Cell Reports**, **30** (9): 1771-1778.
- Çöçü, S., Uranbey, S., Sancak, C. 2003. Bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi**, **9** (4): 445-449.
- Dabkevičienė, G. Kemešytė, V., Statkevičiūtė, G., Lemežienė, N., Brazauskas, G. 2017. Autopolyploids in fodder grass breeding: induction and field performance. **Spanish Journal of Agricultural Research**, **15** (4): Issue 4, e0706.
- Dabkevičienė, G., Statkevičiūtė, G., Mikaliūnienė, J., Norkevičienė, E., Kemešytė V. 2016. Production of *Trifolium pratense* L. and *T. hybridum* L. tetraploid populations and assessment of their agrobiological characteristics. **Zemdirbyste-Agriculture**, **103** (4): 377-384.

- Dewir, Y. H., Nurmansyah, Naidoo, Y., Teixeira da Silva, J. A. 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant cell reports**, **37** (11): 1451–1470.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **104** (3): 359-373.
- Eeckhaut, T.G., Werbrouck, S.P., Leus, L.W., Van Bockstaele, E.J., Debergh, P.C. 2004. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **78** (3): 241-246.
- Elçi, Ş., 2005. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri, TC. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara, 486 s.
- Eng, W. H., Ho, W. S. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. **Scientia Horticulturae**, **246** (2): 604-617.
- Erdoğan Y., Çöçü S., Parmaksız İ., Sancak C. ve Arslan, O. 2004. Bazı burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) kotiledon boğum eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi**, **10** (2): 206-210.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksız, İ., Sancak, C., Arslan, O. 2005. Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Wild.) bitkisinin olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu ve hızlı çoğaltım. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi**, **11** (1): 60-64.
- Erişen, S., Kurt-Gür, G., Servi, H. 2020. In vitro propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants. **Industrial Crops and Products**, **157** (2): 112892.
- Fu, L., Zhu, Y., Li, M., Wang, C., Sun, H. 2019. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **139**(2): 237-248.

- Germana, M.A. 2012. Use of irradiated pollen to induce parthenogenesis and haploid production in fruit crops. In: Shu, Q.Y., Forester, B.P., Nakagawa, H. (Eds.), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CABI and FAO, pp. 411–421. <https://doi.org/10.1079/9781780640853.0000>.
- Gianguzzi, V., Barone, E., Sottile, F. 2020. In vitro rooting of *Capparis spinosa* L. as affected by genotype and by the proliferation method adopted during the multiplication phase. **Plants**, **9** (3): 398.
- Grosso, V., Farina, A., Giorgi, D., Nardi, L., Diretto, G., Lucretti, S. 2018. A high-throughput flow cytometry system for early screening of in vitro made polyploids in *Dendrobium hybrids*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **132** (1): 57-70.
- Heping, H., Shanlin, G., Lanlan, C., Xiaoke, J. 2008. In vitro induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, **44** (5): 448-455.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Glinska S., Grzegorzczak-Karolak, I. 2019. Regeneration of *Phaseolus vulgaris* from epicotyls and hypocotyls via direct organogenesis. **Scientific Reports**, **9**: 6248.
- İnnes, L. A., Denton, M.D., Dundas, I.S., Peck, D.M., Humphries, A.W. 2020. The effect of ploidy number on vigor, productivity and potential adaptation to climate change in annual *Medicago* species. **Crop Science**, 61:89-103.
- Julião, S.A., Ribeiro, C.dV., Lopes, J.M.L, Matos, E.Md, Reis, A.C., Peixoto, P.H.P., Machado, M.A., Azevedo, A.L.S., Grazul, R.M., Campos, J.M.Sd. Viccini, L.F. 2020. Induction of synthetic polyploids and assessment of genomic stability in *Lippia alba*. **Frontiers in Plant Science**. **11**: 292.
- Kendir, H., Sahin-Demirbag, N., Aasim, M. ve Khawar, K.kendM. 2009. In vitro plant regeneration from Turkish Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L. var. *narbonensis* L.). **African Journal of Biotechnology**, **8** (4): 614-618.
- Kaur, K., Kaur, K., Bhandawat, A., Pati, P. K. 2021. In vitro shoot multiplication using meta-Topolin and leaf-based regeneration of a withaferin A rich accession of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Industrial Crops and Products**, **171**: 113872.

- Khanam, M. N., Javed, S. B., Anis, M., Alatar, A. A. 2020. meta-Topolin induced in vitro regeneration and metabolic profiling in *Allamanda cathartica* L. **Industrial Crops and Products**, **145**: 111944.
- Kumari, P., Singh, S., Yadav, S., Tran, L.S.P. 2018. Pretreatment of seeds with thidiazuron delimits its negative effects on explants and promotes regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, **133**: 103–114
- Kumari, P., Singh, S., Yadav, S., Tran, L. S. P. 2021. Influence of different types of explants in chickpea regeneration using thidiazuron seed-priming. **Journal of Plant Research**, **134**:1149-1154.
- Larbi, A., El-Moneim, A. A., Nakkoul, H., Jammal, B., Hassan, S. 2011. Intra-species variations in yield and quality determinants in Vicia species: 1. Bitter vetch (*Vicia erviilia* L.). **Animal Feed Science and Technology**, **165** (3-4): 278-287.
- Livanios, I., Lazaridi, E., Bebeli, P.J. 2018. Assessment of phenotypic diversity in bitter vetch (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) populations. **Genetic Resources and Crop Evolution**, **65** (1): 355-371.
- Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J. A. T., Bulley, S. M., Hudák, I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **101**(3): 251-267.
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M. A., Hafiz, I. A., Silvestri, C. 2019. Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. **Plants**, **8** (7): 194.
- Murashige, T., Nakano, R. 1966. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. **Journal of Heredity**, **57**:114–118
- Murasnige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio agsays with tohaoco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**(3), 473-497.
- Nair, R.M. 2004. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, **47** (1): 45-49.

- Niazian, M., Nalousi, E., 2020. Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **142**: 447-469.
- Sancak, C., 1999. Koca fiğ (*Vicia narbonensis* L)'in olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün sürgün rejenerasyonu. **Gazi üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi** **19** (2): 25-33.
- Sancak, C., Mirici, S., Özcan, S. 2000. High frequency shoot regeneration from embriyo explants of Hungarian vetch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **61**: 231-235.
- Sakhanokho, H.F., Rajasekaran, K., Kelley, R.Y., Islam-Faridi, N. 2009. Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* RM Smith) using colchicine and oryzalin. **HortScience**, **44** (7): 1809-1814.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, **243** (2): 281-296.
- Serin , Y., Tan, M. 2001. Baklagil Yem Bitkileri, Erzurum: **Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları**.
- Serin, Y., Tan, M., Çelebi, H.B. 1997. Erzurum yöresine uygun burçak (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) hatlarının belirlenmesi. **Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi**, **6** (2): 13-22.
- Singh, T., Radhakrishna, A., Nayak, D. S., Malaviya, D. R. 2019. Genetic improvement of berseem (*Trifolium alexandrinum*) in India: **Current Status and Prospects. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, **8** (1): 3028-3036.
- Şehirali S., Özgen, M. 2010. Bitki Islahı. Ankara: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Yayın No: 1582.
- Talebi, S. F., Saharkhiz, M. J., Kermani, M. J., Sharafi, Y., Raouf Fard, F. 2017. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). **Caryologia**, **70** (2): 184-193.
- Touchell, D. H., Palmer, I. E., Ranney, T. G. 2020. In vitro ploidy manipulation for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, **11**:722.

- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., Rieseberg, L. H. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. **Proceedings of the national Academy of sciences**, **106** (33): 13875-13879.
- Zhang, L., Shivute, F. N., Shahid, M. Q., Kamara, N., Wu, J., Liu, X. 2019. In vitro induction of auto-allotetraploid in a newly developed wild rice line from *Oryza alta* Swallen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **139** (3): 577-587.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Lokman KARAHASAN
Uyruğu: Türkiye (TC)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor
Lisans	EÜ Tarla Bitkileri	2019
Önlisans	Anadolu Üniversitesi Tarım	2012
Lise	Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi, Çankırı	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012- Halen	Tarım ve Orman Bakanlığı	Tekniker

YABANCI DİL

İngilizce