

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Vigna caracalla L. Verdc. BİTKİSİNİN *IN VITRO*
KLONAL MİKROÇOĞALTIMI

Halide Hande GÜNGÖR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 03.08.2018

Bornova-İZMİR

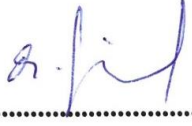
2018

Halide Hande GÜNGÖR tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak sunulan “*Vigna caracalla L. Verde. Bitkisinin In Vitro Klonal Mikroçoğaltımı*” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

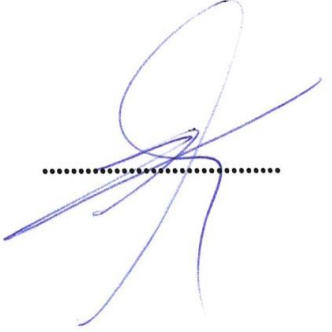
İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL




.....

Raportör Üye : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ



.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Meltem BAYRAKTAR



.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Vigna caracalla* L.Verde Bitkisinin *In vitro* klonal mikroçoğaltımı” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03/08/2018



Halide Hande GÜNGÖR

ÖZET***Vigna caracalla* L. Verdc. BİTKİSİNDE *IN VITRO* KLONAL
MİKROÇOĞALTIM**

GÜNGÖR, H. Hande

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ağustos 2018, 117 sayfa

Bu çalışmanın amacı, *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisinde tohum kökenli *in vitro* klonal mikroçoğaltım için gerekli tüm basamakları gerçekleştirmek ve etkili bir protokol oluşturmaktır.

Ticari bir firmadan temin edilen tohumlar, farklı sterilizasyon yöntemlerine maruz bırakıldıktan sonra çatlatılarak MS besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. En yüksek sterilizasyon başarı yüzdesi (%93.33) ve en yüksek çimlenme yüzdesi (%93.33); 1 dk %70 etil alkol, 4dk %0.1 HgCl₂ uygulamasının ardından 7 saat suda bekletilen tohumlarda elde edilmiştir.

Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında kültüre alınan tohumlardan, en yüksek çimlenme yüzdesi (%95.24), N₆ besin ortamı ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişe kombinasyonunda belirlenmiştir. Gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde kültüre alınan tohumlarda agara göre daha yüksek çimlenme yüzdesi (%85.71) saptanmıştır. Işık şiddetinin çimlenmeye etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı ışık şiddetlerinde WPM besin ortamında kültüre alınan tohumlarda, 3500 lüks ışık şiddetinde daha yüksek çimlenme yüzdesi (%80.00) tespit edilmiştir.

In vitro fideciklere ait sürgün ucu ve nod eksplantları, gelrite içeren MS, WPM ve N₆ temelli besin ortamlarında sürgün rejenerasyonu için kültüre alındıklarında, en yüksek çoğaltım katsayısı (1.62), WPM besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tipinin sürgün rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde, en yüksek çoğaltım katsayısı (1,48)

1IBA+0,5BAP ile desteklenen MS besin ortamında (HS4) kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir.

Jelleştirici ajan, ışık şiddeti ve eksplant tipinin sürgün rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi için yapılan denemelerde ise en yüksek çoğaltım katsayısı (1.71), Duchefa agar ile katılaştırılmış N₆ (N-21) besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir. Bu çalışma kapsamında, fazla hiperhidrisite göstermeyen ve çoğaltım oranı daha yüksek olan 16 adet klonun mikroçoğaltım denemelerinde uygun reaksiyon verdiği belirlenmiştir.

En yüksek kök rejenerasyonu (%85.71), Fluka agar ile katılaştırılmış N₆ besin ortamındaki (N-26) 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün eksplantlarında saptanmıştır. Köklü sürgünler, %70 başarı yüzdesi ile aklimatize edilmişlerdir.

Anahtar kelimeler: *Vigna caracalla* L. Verdc., *in vitro*, klonal mikroçoğaltım, çoğaltım katsayısı

ABSTRACT***IN VITRO* CLONAL MICROPROPAGATION OF *Vigna caracalla* L. Verdc.**

GÜNGÖR, H. Hande

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

August 2018, 117 pages

The aim of this study is to accomplish all the necessary steps and design a protocol for seed based in vitro clonal micropropagation of *Vigna caracalla* L. Verdc.

The seeds provided from a commercial firm are incised and cultured in MS medium after exposed to different sterilization methods. The highest percentage of sterilization (%93.33) and germination (%93.33) are achieved when the seeds are soaked in %70 ethyl alcohol for 1 min, 0.1 % HgCl₂ for 4 min and sterile distilled water for 7 hours.

The seeds are cultured in different media compositions and culture vessels, the highest percentage of germination (%95.24) is determined in combinations of N₆ medium and 250 mL Erlenmeyer flasks. Higher germination percentage (%85.71) was determined in MS medium solidified with gelrite compared to agar. Higher germination percentage (%80.00) was detected at 3500 lux light intensity in seeds cultured in WPM nutrient medium at different light intensities.

When the shoot tips and node explants of *in vitro* seedlings are cultured for shoot regeneration in MS, WPM and N₆ based medium including gelrite, the highest propagation coefficient (1.71) is achieved from shoot tip explants cultured in WPM medium. The highest propagation coefficient (1.48) is achieved in shoot tip explants cultured in MS medium including 1IBA+0,5BAP (HS4).

In the experiments carried out to determine the effect of gelling agent, light intensity and explant type on shoot regeneration, the highest propagation coefficient (1.71) is achieved in node explants cultured in N₆ (N-21) medium solidified with Duchefa agar and exposed to 4200 lux light intensity. Within the scope of this study, it was determined 16 clones that higher multiplication rate and

without high hyperhydricity showed appropriate reactions in micropropagation experiments.

The highest root regeneration (85.71%) is achieved from shoot explants cultured in N₆ medium solidified with Fluka agar and exposed to 4200 lux light intensity. The rooted plantlets are acclimatized with 70% success percentage.

Keywords: *Vigna caracalla* L. Verdc., *in vitro*, clonal micropropagation, propagation coefficient



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca;

Bu tez çalışmasını hazırlarken gerek bilgisiyle, gerekse tecrübeleriyle emeği geçen tez danışmanım Prof. Dr. Aynur GÜREL'e,

Hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Meltem BAYRAKTAR'a,

Her zaman yanımda olan, Begüm GÜLER, Merve SEZEN ve Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı öğrencilerine,

Lisans eğitimim boyunca ilimlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım tüm değerli Hocalarıma,

Bugüne kadar maddi ve manevi her zaman yanımda olan AİLEME ve

Tez çalışmamı destekleyen ALİYE ÜSTER VAKFI'na

teşekkürlerimi sunarım...

Halide Hande GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	VII
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXVI
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	3
2.1 Fabaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2 Fabaceae Familyasının Morfolojik Özellikleri	4
2.3 Fabaceae Familyasının Taksonomik Sınıflandırılması	6
2.4 <i>Vigna caracalla</i> Bitkisinin Morfolojik Özellikleri	7
2.5 Süs Bitkiciliğinde Fabaceae Familyası	9
2.6 <i>Vigna caracalla</i> Bitkisinin Genel Özellikleri	12
2.7 <i>Vigna caracalla</i> Bitkisinin Morfolojik Özellikleri	13
2.8 Bitki Doku Kültürü Teknikleri	15
2.9 <i>Vigna</i> Cinsinde Gerçekleştirilen Çeşitli Doku Kültürü Uygulamaları	20
3.MATERYAL METOT	24
3.1 Materyal	24
3.2 Metot	24

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

3.2.1	Tohum, sürgün ucu ve nod eksplantlarının kültüre alınacağı besin ortamlarının hazırlanması	24
3.2.2	Yüzeysel tohum sterilizasyonu ve dormansinin kırılması	29
3.2.3	Çimlenme denemelerinin kurulması	32
3.2.4	Mikroçoğaltım denemeleri.....	33
3.2.5	Aklimatizasyon denemeleri	36
3.3	Verilerin Değerlendirilmesi	36
4.	BULGULAR.....	37
4.1	Sterilizasyon Denemeleri	37
4.1.1	Sterilizasyon başarısı	37
4.1.2	Sterilizasyon uygulamalarının çimlenmeye etkisi	38
4.1.3	Sterilizasyon uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi..	40
4.2	Çimlendirme Denemeleri.....	41
4.2.1	Kültür kabı tipi ve besin ortamının çimlenme üzerine etkisi	41
4.2.2	Kültür kabı tipi ve besin ortamının kararma üzerine etkisi.....	49
4.2.3	Jelleştirici ajan ve kültür kabının çimlenme üzerine etkisi	52
4.2.4	Jelleştirici ajan ve kültür kabının kararma üzerine etkisi.....	58
4.2.5	Işığın çimlenme yüzdesi üzerine etkisi	61
4.3	Sürgün Rejenerasyonu	63
4.3.1	Besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama sürgün uzunluğuna etkisi	63
4.3.2	Besin ortamı ve eksplant tipinin çoğaltım katsayısına etkisi	67
4.3.3	Besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama yaprak boyuna etkisi	68

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.3.4 Besin ortamı ve eksplant tipinin hiperhidrisite yüzdesine etkisi	71
4.3.5 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının ortalama sürgün uzunluğuna etkisi	72
4.3.6 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının çoğaltım katsayısına etkisi	76
4.3.7 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının ortalama yaprak boyuna etkisi	77
4.3.8 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının hiperhidrisiteye etkisi.....	79
4.3.9 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların ortalama sürgün uzunluğuna etkisi	81
4.3.10 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların çoğaltım katsayısına etkisi.....	83
4.3.11 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların ortalama yaprak boyuna etkisi.....	85
4.3.12 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların hiperhidrisite yüzdesine etkisi.....	87
4.4 Köklenme.....	89
4.4.1 Kök rejenerasyonu	89
4.4.2 Eksplant başına elde edilen kök sayısı	93
4.4.3 Eksplant başına elde edilen ortalama kök uzunluğu.....	95
4.5 Aklimatizasyon	98

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	101
6.ÖNERİLER.....	108
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	112
ÖZGEÇMİŞ	117



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Fabaceae familyasına ait bazı türlerin tohumları.....	4
Şekil 2.2. Fabaceae familyasına ait <i>Vigna caracalla</i> tohumları.....	5
Şekil 2.3. Fabaceae familyası çiçeklerinin morfolojik yapısı.....	5
Şekil 2.4. Süs bitkiciliğinde öneme sahip Fabaceae familyasında yer alan bazı bitkilerin çiçekleri.....	11
Şekil 2.5. Süs bitkiciliğinde öneme sahip Fabaceae familyasında yer alan <i>Vigna caracalla</i> bitkisi çiçekleri	12
Şekil 2.6. <i>Vigna caracalla</i> çiçek morfolojisi	14
Şekil 2.7. <i>Vigna caracalla</i> bitkisinin tozlayıcıları	15
Şekil 2.8. Sürgün ucu kültürünün şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.9. Nod kültürünün şematik gösterimi	20
Şekil 3.1. <i>Vigna caracalla</i> tohumu	24
Şekil 3.2. Tohumların kültüre alınması	31
Şekil 3.3. Çimlendirme denemesinde kullanılan farklı kültür kapları	33
Şekil 3.4. Çimlenen tohumlardan elde edilen sürgün ucu ve nod eksplantlarının kültüre alınması	34
Şekil 4.1. <i>Vigna caracalla</i> tohumlarına yapılan 4 farklı sterilizasyon uygulamasından elde edilen steril tohum sayısı (adet).....	38
Şekil 4.2. <i>Vigna caracalla</i> tohumlarına yapılan 4 farklı sterilizasyon uygulamasından elde edilen steril tohum yüzdesi (%)	38
Şekil 4.3. <i>Vigna caracalla</i> tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre çimlenen tohum sayıları (adet)	39
Şekil 4.4. <i>Vigna caracalla</i> tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre çimlenen tohum yüzdeleri (%)	40
Şekil 4.5. <i>Vigna caracalla</i> tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre kararan besin ortamı içeren cam tüp sayısı (adet)	41
Şekil 4.6. <i>Vigna caracalla</i> tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre kararan besin ortamı içeren cam tüp yüzdesi (%).....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

Şekil 4.7. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohum sayısı (adet)	43
Şekil 4.8. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohum yüzdesi (%)	43
Şekil 4.9. Farklı besin ortamları içeren cam tüplerde çimlenen tohumlar	44
Şekil 4.10. Farklı besin ortamları içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlenen tohumlar.....	44
Şekil 4.11. Farklı besin ortamları içeren cam tüplerde çimlendirilen ve çoklu sürgün veren tohumlar	45
Şekil 4.12. Farklı besin ortamları içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen ve çoklu sürgün veren tohumlar	45
Şekil 4.13. Farklı besin ortamı ve kültür kaplarında çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet)	46
Şekil 4.14. Farklı besin ortamı ve kültür kaplarında çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%)	47
Şekil 4.15. Farklı besin ortamı ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayısı	48
Şekil 4.16. Farklı besin ortamı ve kültür kabı uygulamaları sonucunda kararın besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet)	50
Şekil 4.17. Farklı besin ortamı ve kültür kabı uygulamaları sonucunda kararın besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe yüzdesi (%).....	50
Şekil 4.18. Farklı besin ortamları içeren cam tüplerde meydana gelen kararmalar	51
Şekil 4.19. Farklı besin ortamları içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde meydana gelen kararmalar	51
Şekil 4.20. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlenen tohum sayıları (adet)	53
Şekil 4.21. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlenen tohum yüzdeleri (%).....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

Şekil 4.22. Gelrite ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişede çimlendirilen tohumlar	54
Şekil 4.23. Agar ve gelrite ile katılaştırılmış besin ortamları içeren cam tüplerde çimlendirilen çoklu sürgün vermiş tohumlar	55
Şekil 4.24. Agar ve gelrite ile katılaştırılmış besin ortamları içeren Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen çoklu sürgün vermiş tohumlar	55
Şekil 4.25. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamaları sonucunda çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet)	56
Şekil 4.26. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamaları sonucunda çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%)	57
Şekil 4.27. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayıları	58
Şekil 4.28. Jelleştirici ajan ve kültür kaplarında kararın besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayıları (adet)	59
Şekil 4.29. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında kararın besin ortamı yüzdeleri (%)	60
Şekil 4.30. Gelrite ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamlarında meydana gelen kararmalar	61
Şekil 4.31. Farklı ışık şiddetlerinde çimlenen tohum sayıları (adet)	62
Şekil 4.32. Farklı ışık şiddetlerinde çimlenen tohum yüzdeleri (%)	62
Şekil 4.33. Sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)	65
Şekil 4.34. 9 farklı besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarının 2 haftalık gelişimleri	66
Şekil 4.35. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından, kültüre alındıktan 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları	68
Şekil 4.36. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyları (cm)	70

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

Şekil 4.37. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%).....	72
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm).....	74
Şekil 4.39. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlardan gelişen bitkicikler:	75
Şekil 4.40. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları	77
Şekil 4.41. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)	79
Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen hiperhidrisite yüzdesi (%).....	81
Şekil 4.43. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)	83
Şekil 4.44. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama çoğaltım katsayıları	85
Şekil 4.45. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)	87
Şekil 4.46. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%)	89

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)Sayfa

Şekil 4.47. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından kök oluşturan eksplant sayısı (adet).....	91
Şekil 4.48. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen kök rejenerasyon yüzdeleri (%)......	93
Şekil 4.49. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök sayıları (adet).....	95
Şekil 4.50. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları (cm)	97
Şekil 4.51. Köklenme denemelerinde elde edilen farklı uzunluktaki kökler.....	97
Şekil 4.52. 7 günün sonunda üzerlerindeki poşetleri çıkarılan bitkicikler	99
Şekil 4.53. 20. günün sonunda aklimatize edilmiş bitkiler.....	100
Şekil 4.54. Saksılara aktarılmış bitkiler.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Fabaceae familyasına ait bazı bitkilerin kullanım alanları	8
Çizelge 2.2. Fabaceae familyasına ait bazı süs bitkilerinin listesi ve süs potansiyelleri*	10
Çizelge 2.3. <i>Vigna caracalla</i> bitkisinin taksonomik sınıflandırılması.....	13
Çizelge 3.1. MS besin ortamı bileşenleri, stok çözeltilerin grupları ve miktarları	25
Çizelge 3.2. WPM besin ortamı bileşenleri, stok çözeltilerin grupları ve miktarları	26
Çizelge 3.3. N ₆ besin ortamı bileşenleri ve miktarları	27
Çizelge 3.4. Tohum sterilizasyonu ve dormansinin kırılması için gerçekleştirilen için uygulamalar.....	30
Çizelge 3.5. Çimlenme denemeleri için kullanılan besin ortamları	32
Çizelge 3.6. Sürgün rejenerasyonu için kullanılan besin ortamları	35
Çizelge 4.1. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarından elde edilen steril tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	37
Çizelge 4.2. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarının çimlenmeye etkisi: çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	39
Çizelge 4.3. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi: kararlı besin ortamı içeren cam tüp sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	40
Çizelge 4.4. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumların çimlenme başarısı üzerine etkisi: çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	42
Çizelge 4.5. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumların çoklu sürgün oluşturma üzerine etkisi: Çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	45

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

Çizelge 4.6. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumların çoklu sürgün oluşturma üzerine etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları.....	47
Çizelge 4.7. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayıları	48
Çizelge 4.8. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi: kararın besin ortamı sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	49
Çizelge 4.9. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları	51
Çizelge 4.10. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumların çimlenme başarısı üzerine etkisi: çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	52
Çizelge 4.11. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının çoklu sürgün oluşumu üzerine etkisi: Çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	56
Çizelge 4.12. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayıları	57
Çizelge 4.13. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi: kararın besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	59
Çizelge 4.14. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları	60
Çizelge 4.15. <i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. bitkisinde ait farklı ışık şiddeti uygulamalarından elde edilen çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*	62

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

Çizelge 4.16. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu(cm) *	64
Çizelge 4.17. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu ile ilgili varyans analiz sonuçları.....	64
Çizelge 4.18. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları	67
Çizelge 4.19. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)	69
Çizelge 4.20. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyuna ait varyans analiz sonuçları	69
Çizelge 4.21. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%).....	71
Çizelge 4.22. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm).....	73
Çizelge 4.23. Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının ortalama sürgün uzunluğuna etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları	74
Çizelge 4.24. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen çoğaltım katsayıları.....	76
Çizelge 4.25. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyu (cm).....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Sayfa

Çizelge 4.26. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen hiperhidrisite yüzdesi (%).....	80
Çizelge 4.27. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm).....	82
Çizelge 4.28. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları ile ilgili varyans analiz tablosu	82
Çizelge 4.29. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları	84
Çizelge 4.30. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen çoğaltım katsayıları ile ilgili varyans analiz tablosu.....	84
Çizelge 4.31. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyu (cm).....	86
Çizelge 4.32. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyuna ait varyans analiz tablosu	87
Çizelge 4.33. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%)	88
Çizelge 4.34. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 16 gün sonra elde edilen kök oluşturan eksplant sayısı (adet)	90
Çizelge 4.35. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 16 gün sonra elde edilen kök rejenerasyon yüzdeleri (%).....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)Sayfa

Çizelge 4.36. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen kök rejenerasyon yüzdeleri ile ilgili varyans analiz tablosu.....	93
Çizelge 4.37. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök sayıları (adet)	94
Çizelge 4.38. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök sayıları ile ilgili varyans analiz tablosu	95
Çizelge 4.39. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları (cm)	96
Çizelge 4.40. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları ile ilgili varyans analiz tablosu	98
Çizelge 4.41. Kullanılan besin ortamı açısından klonlara ait iyi gelişim gösteren sürgünlerin aklimatizasyon durumu.....	99

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİSimgeler

M

Açıklama

Mikro

M

Molar

g/L

gram/l

mg/L

miligram/l

°C

Santigrad derece

Kısaltmalar

MS

Murashige & Skoog (1962)

WPM

Lloyd and McCown (1981)

N₆

Chu et al. (1975)

NAA

Naftelen Asetik Asit

BAP

6-Benzilaminopürin

TDZ

Thidiazuron

Ads

Adenin sülfat

IAA

İndol-3-Asetik Asit

2,4-D

2,4-Diklorofenoksiasetikasit

IBA

İndol Bütirik Asit

KIN

Kinetin

1. GİRİŞ

Genellikle bakla, bezelye veya fasulye familyası olarak bilinen Fabaceae, diğer adıyla Leguminosae üyeleri, önemli besin elementlerinin çoğunu içermesi nedeniyle, zengin bir lif kaynağı olarak kullanılmaktadır. Atmosferik azotu biyolojik olarak tutma kabiliyetleri sayesinde de toprak verimliliğini önemli ölçüde arttırmaktadırlar (Dewir et al., 2016).

Vigna caracalla (Yerel isimleri: İzmir sarmaşığı, selluka) bitkisi, Fabaceae familyasına ait olan ve “Salyangoz asması”, “Salyangoz çiçeği”, “Tirbuşon sarmaşığı”, “Zülf-ü Aruz” olarak da bilinen, ülkemizde Akdeniz ve Ege bölgelerinde rastlanılan, çok hoş koku ve çeşitli renkli çiçeklere sahip oldukça güzel görünüşlü bir sarmaşık bitkisidir. “Cennet kokusu” olarak adlandırılan güzel kokusu ve rengarenk çiçekleri sebebiyle süs bitkiciliğinde; zengin besin içeriği sebebiyle de yem endüstrisinde büyük öneme sahiptir. Albenili çiçeklere sahip olan *Vigna caracalla* sarılcı bir bitki olması sebebiyle parmaklık, pergola ve çardaklarda kullanılmaktadır (Orman Bölge Müdürlüğü, 2013).

Orijini Güney Afrika ile Güney Amerika olan ve kaybolmaya yüz tutmuş olan *V. caracalla* türü, geçmiş yıllarda İzmir’de ve özellikle de Karşıyaka’daki bahçelerde yetiştirilmiş bir bitkidir. Rengarenk çiçekleri, cennet kokusu ve eşsiz güzelliğinden dolayı bu bitki türü, İzmir’in tadı, rengi ve kokusu olarak kabul edilmiştir. Bir zamanlar İzmir-Karşıyaka’nın simgesi haline gelmiş olan *V. caracalla* bitkisinin tohumlarının pahalı olması, düşük çimlenme oranı (Suleiman, 2010), ve çiçeklerindeki tozlaşma zorluğu gibi nedenlerle üretimi sekteye uğramış ve alternatif üretim tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Tozlaşmanın zorluğu nedeniyle tohum veriminin düşüklüğü ve çelikleme yoluyla üretimin kısıtlı olması bu bitki türünün *in vitro* mikroçoğaltımını zorunlu kılmıştır.

Geleneksel çoğaltım tekniklerinin yanı sıra, modern *in vitro* teknolojik yöntemler bitkilerin hızlı ve kontrollü koşullar altında çoğaltılması için yeni imkanlar sunmaktadır. İstikrarlı ve yeniden üretilebilir rejenerasyon protokollerinin oluşturulması, Fabaceae familyasına ait bazı türlerin ticari olarak başarılı bir şekilde çoğaltılmasına olanak sağlamıştır (Dewir et al., 2016). Bitki hücre ve doku kültürü teknikleri kullanılarak; tozlaşmanın zor olduğu *Vigna caracalla* bitkisinin klonal mikroçoğaltımı ile kısa sürede çok sayıda bitkiciğin elde edilmesi önemlidir. *V. caracalla* ile bugüne kadar gerçekleştirilmiş bir doku

kültürü çalışmasına rastlanılmaması nedeniyle, gerçekleştirilen tez, öncü ve yol gösterici bir çalışma niteliği taşımaktadır.

Bu tez kapsamında, *Vigna caracalla* bitki türüne ait tohumların öncelikle yüzeysel sterilizasyonunu gerçekleştirmek ve mevcut dormansiyi kırmak amacıyla, 4 farklı sterilizasyon uygulaması yapılarak, en uygun yöntemin belirlenmesi hedeflenmiştir. Daha sonra, gelrite ile katılaştırılmış 5 farklı besin ortamı (MS, ½ MS, WPM, ½ WPM ve N₆) ve 2 farklı kültür kabı (23/24*140 mm'lik cam tüpler ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişeler) kullanılarak çimlenmeyle ilişkili en uygun besin ortamı ve kültür kabı kombinasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada jelleştirici ajan tiplerinin ve farklı kültür kaplarının yanı sıra, iki farklı ışık şiddetinin (3500 ve 4200 lüks) de kararma, hiperhidrisite ve çimlenme üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Ayrıca *in vitro* fideciklere ait sürgün ucu ve nod eksplantları, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS, ½ MS, WPM, ½ WPM ve N₆ yarı katı besin ortamlarında kültüre alınarak; en yüksek çoğaltım katsayısı belirlenmeye çalışılmıştır. 5 farklı jelleştirici ajan ile katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün uçları iki farklı ışık şiddetine maruz bırakılarak, jelleştirici ajan ve ışık şiddetinin sürgün rejenerasyonu ve klonal mikroçoğaltıma olan etkileri de araştırılmıştır. Köklendirilen bitkiciklerin aklimatize edilerek dış ortam koşullarına alıştırılması da çalışma kapsamında ele alınmıştır. Bu şekilde, *V. caracalla* türünde tohum kökenli klonların mikroçoğaltımına yönelik tüm aşamalar netleştirilmeye çalışılarak protokollerin oluşturulması esas alınmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Fabaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Genellikle bakla, bezelye veya fasulye familyası olarak bilinen Fabaceae veya diğer adıyla Leguminosae, Orchidaceae ve Asteraceae familyalarından sonra gelen tarımsal ve ekonomik olarak üçüncü en önemli çiçekli bitki familyasıdır (Wojciecowski et al., 2006; Molares and Ladio., 2011).

Fabaceae familyası, tür sayısı açısından Orchidaceae ve Asteraceae familyalarının ardından 730 cins ve 19.400 tür ile en yaygın dağılışı gösteren üçüncü familya olma özelliğindedir (Molares and Ladio, 2011). Fabaceae familyasına ait olan bitkiler, Amerika ve Afrika'nın tropik yağmur ormanları ve kuru ormanlarında geniş bir yayılım göstermektedir (Mahbubur Rahman and Ismot Ara Parvin, 2014). Fabaceae familyasına ait 16 cinsin her biri en az 200 tür içermektedir: *Astragalus* cinsi 2000, *Acacia* cinsi 1000, *Indigofera* cinsi, *Crotalaria* cinsi 600, *Mimosa* cinsi 500, *Desmodium* cinsi 400, *Tephrosia* cinsi 400, *Trifolium* cinsi 300, *Chamaecrista* cinsi 260, *Bauhinia* cinsi 250, *Senna* cinsi 250, *Inga* cinsi 250, *Dalbergia* cinsi 200, *Lupinus* cinsi 200, *Phaseolus* cinsi 200, ve *Pithecellobium* cinsi 200 tür içermektedir (Bennet, 2018). Fabaceae familyası, bu yüksek tür zenginliği sebebiyle çiçekli bitkilerin %9.4' ünü oluşturmaktadır (Ahmad et al., 2016).

Fabaceae familyası (baklagiller); İran'da mercimeklerin (*Lens esculenta*) yetiştirildiği 9,500 ila 8,000 yıl öncesine uzanan tarihlerden başlayarak, Kuzey ve Güney Amerika'da besin kaynağı ve Roma İmparatorluğu'nda bir gıda kaynağı ve toprak iyileştirme aracı olarak kullanılmasıyla binlerce yıl boyunca tarımsal önemini korumuştur (Graham and Vance, 2003).

Günümüzde baklagiller, dünyanın birincil ekin üretiminin %27'sini sağlayarak, sadece insanlar için değil, aynı zamanda çiftlik hayvanları için de paha biçilmez bir besin kaynağıdır. Baklagiller, 2004 yılında dünyada ekili tarım arazilerinin %13' ünden fazla olan alanlarda yetiştirilmiştir (Graham and Vance, 2003).

Bu familyada çok veya tek yıllık olmak üzere ağaçlar, çalılar ve otsu bitkiler bulunmaktadır. Fabaceae familyası, bütün fasulye (yeşil fasulye, siyah fasulye, kuru fasulye vb.), mercimek, bezelye, demir hindi, yer fıstığı ve nohut türlerini içermektedir (Mahbubur Rahman and Ismot Ara Parvin, 2014).

Tahıl tanelerinin ortalama protein içeriği, kuru ağırlıklarının %10-15'i, Fabaceae tohumlarının da %20-25'idir (Şahinoğlu, 2011). Fabaceae familyası tohumları zengin protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mikro element içermelerinden dolayı, beslenme uzmanları için besleyici gıda olarak kabul edilmektedir (Gulewicz et al., 2014).

Fabaceae familyası üyeleri; atmosferik azotu, bitkinin büyümesi için kullanılan yararlı azotlu bileşiklere dönüştürebilmektedirler. Bu işlem kök nodüllerinde bulunan *Rhizobium* bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bakteriler ve Fabaceae familyası arasında simbiyotik bir ilişki mevcuttur (Ahmad et al., 2016). Bakteriler, bitki için serbest azotu sabitlerken; buna karşılık bitkiler de bakterileri fotosentez ile üretilen sabit bir karbon kaynağıyla beslerler (Patel et al., 2013).

2.2 Fabaceae Familyasının Morfolojik Özellikleri

Tohumların morfolojik ve karakteristik özellikleri bitki taksonomisi için en önemli kriterlerden biridir. Tohumların şekli ve büyüklüğü bitkilerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. Fabaceae familyasına ait bitkilerin tohumları büyüklük, şekil ve renk açısından geniş bir yelpazede yer alırlar; özellikle tohumların büyüklük ve ağırlıkları açısından önemli farklılıklar mevcuttur (Şekil 2.1; Şekil 2.2). Genel olarak, yeni hasat edilen tohumlar canlı ve parlak renkte oldukları halde, yaşlanan tohumlarda rengin koyulaşıp matlaştığı gözlemlenmiştir (Şahinoğlu, 2011).

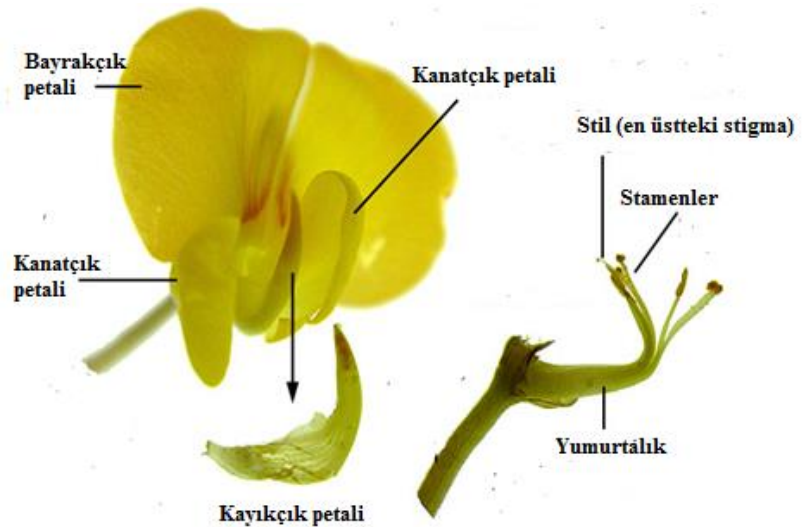


Şekil 2.1. Fabaceae familyasına ait bazı türlerin tohumları: A. *Entada phaseoloides* B. *Merremia discoidesperma* C. *Entada rheedei* D. *Erythrina variegata* E. *Mucuna holtonii* F. *Oxyrhynchus trinervius* G. *Dioclea reflexa* H. *Mucuna sloanei* I. *Mucuna urens* J. *Caesalpinia ciliata* K. *Canavalia rosea* L. *Entada gigas* M. *Caesalpinia majör* N. *Mucuna sloanei* O. *Caesalpinia bonduc* P. *Dioclea wilsonii* Q. *Mucuna gigantea* R. *Gigasiphon macrosiphon* S. *Mucuna fawcettii* T. *Canavalia nitida* (Armstrong, 2018a)



Şekil 2.2. Fabaceae familyasına ait *Vigna caracalla* tohumları

Fabaceae familyası üyelerinin çiçekleri; 5 petal ve sepal bulunduran aktinomorfik (radyal olarak simetrik) veya zigomorfik (bilateral olarak simetrik) şekillere sahip kompleks yapılardır (Şekil 2.3). Çiçekler; hem polen, hem de ovül içerirler. Sepaller, çoğunlukla farklı uzunluklarda loblu bir tüp yapısı oluştururlar. Petaller ise genellikle; diğerlerinden daha büyük olan üst petal (bayrakçık petali), alttaki 2 petalin (kanatçık petalleri) arkasında olacak şekilde sıralanmıştır. En iç kısımdaki petaller kaynaşarak kayıkçık petalini meydana getirirler. Bunlar da stamenleri ve stili çevrelerler. Fabaceae familyası çiçekleri, 10 stamen (genellikle 9 kaynaşmış ve 1 ayrı) ile tek bir stile ve stigmaya sahip 1 yumurtalık içerirler (Armstrong, 2018b)



Şekil 2.3. Fabaceae familyası çiçeklerinin morfolojik yapısı (Armstrong, 2009)

2.3 Fabaceae Familyasının Taksonomik Sınıflandırılması

Polhill ve Raven (1981), Fabaceae familyasına bağlı olan 3 altfamilya bulunduğunu bildirmiştir: Caesalpinioideae, Mimosoideae ve Papilionoideae. Ayrıca Fabaceae familyasının; Connaraceae ve Sapindaceae ile, anatomi, morfoloji ve biyocoğrafik dağılımları bakımından yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu üç altfamilyanın tanımlanması çiçeğin; büyüklük, simetri, taç yapraklarının dizilişi, çanak yapraklar (birleşik veya serbest), stamen sayısı ve heteromorfi, polen gibi özelliklerinin yanında, aynı zamanda bitkide embriyo radikül şekli, yaprak karmaşıklığı ve kök nodüllerinin varlığı dahil olmak üzere farklı niteliklere göre de yapılmaktadır (Wojciecowski et al., 2006).

Caesalpinioideae ve Mimosoideae altfamilyası çoğunlukla tropik ve subtropik bölgelerde yetişen ağacimsi bitkileri içermektedir. Papilionoideae altfamilyasına bağlı olan 10000 kadar tür ise tarımsal açıdan oldukça önemlidir. Türkiye’de yem bitkisi olarak kullanılan baklagillerin tümü Papilionoideae altfamilyasına bağlıdır (Doyle, 2001).

Caesalpinioideae altfamilyası, bir grup ayrı evrimsel soy grubunu içermektedir. Bu nedenle bu altfamilya, morfolojik ve ekolojik olarak çok heterojendir. Ayrıca Mimosoideae ve Papilionoideae altfamilyalarının sahip oldukları özellikleri içermemelerinden dolayı kolay şekilde karakterize edilebilmektedirler. Caesalpinioideae altfamilyasına ait yaklaşık 150 cins ve 2500 tür çoğunlukla tropikal alanlarda yaygın olarak dağılım göstermektedir. Bu altfamilyaya ait çok sayıda tür, süs bitkiciliğinde büyük bir öneme sahiptir (Doyle, 2001).

Mimosoideae, Caesalpinioideae altfamilyasına göre daha az cinse (65 civarında) sahipken; Caesalpinioideae’ den biraz daha fazla tür (3000 civarında) içermektedir. Mimosoideae altfamilyasındaki 3000 civarındaki türün yaklaşık olarak 2/3’ü *Acacia* (Akasya) ve *Mimosa* (Mimoza) cinsine aittir. Mimosoideae altfamilyası, Caesalpinioideae olarak sınıflandırılan bazı çok yakın akrabalara sahiptir (Doyle, 2001).

Papilionoideae, bu üç altfamilyanın en büyük ve ekolojik olarak en çok çeşitliliğe sahip olanıdır. Yaklaşık olarak 450 cins ve 12000 tür içermektedir. (Doyle, 2001). Papilionoideae altfamilyasının üyeleri, hayvansal olmayan önemli

protein kaynaklarıdır. Papilionoideae altfamilyasına ait olan ve besin kaynağı olarak oldukça önemli kabul edilen türler olarak; fasulye (*P. acutifolius*, *P. coccineus*, *P. lunatus* ve *P. vulgaris*), bakla (*Vicia faba*), börülce (*Vigna unguiculata*), mercimek (*Lens culinaris*), bezelye (*Pisum sativum*), yerfıstığı (*Arachis hypogaea*), soya (*Glisin max*) sayılabilmektedir (Bennet, 2018). Süs bitkiciliğinde ve hayvan yemi endüstrisinde kullanılan *Vigna caracalla*, Papilionoideae altfamilyasındaki en kompleks çiçeklere sahip olan bitki türüdür (Etcheverry et al., 2008).

2.4 Fabaceae Familyasının Ticari Kullanım Alanları

Fabaceae familyasının tür zenginliği, çok çeşitli alanlarda kullanımını mümkün kılmaktadır. Fabaceae familyasının üyelerinin gıda, yağ, iplik, kereste, boya ve medikal alanlarda kullanımının yanı sıra, süs bitkisi olarak da kullanım alanları bulunması nedeniyle ticari önemi oldukça fazladır (Molares and Ladio., 2011; Ahmad et al., 2016) (Çizelge 2.1).

Fabaceae familyasına ait birçok türün yaprak, kök, meyve, tohum, çiçek ve kabuk gibi kısımları eski zamanlardan beri tıbbi amaçla kullanılmaktadır (Mahbubur Rahman and Ismot Ara Parvin, 2014; Chanda et al., 2010; Ahmed et al., 2012). Fabaceae familyasının geleneksel olarak halk ilaçlarında kullanılmalarının yanı sıra; aynı zamanda modern tıpta da önemi oldukça fazladır. Fabaceae familyası üyeleri, tüketildiği zaman hipoglisemik etki gösterirler; bu da onları şeker hastaları için tavsiye edilen bir besin haline getirmektedir (Wojciecjowski et al., 2006).

Fabaceae familyasının tohumları, zengin bir protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mikro element kaynağı olarak kabul edildiği için beslenme uzmanları tarafından özellikle ilgi çekicidir (Gulewicz et al., 2014).

Brezilya ve Hindistan'da yetişen Fabaceae familyası üyesi olan *Dalbergia nigra* (gül ağacı) özellikle gitar olmak üzere müzik enstrümanlarının yapımı için en çok değer verilen türler arasında yer almaktadır (Bennet, 2018).

Endüstriyel olarak Fabaceae familyası; biyobozunur plastikler ve biyodizel yakıt yapımında da kullanılmaktadır (Wojciecjowski et al., 2006).

Tüm bu kullanımlarına ek olarak Fabaceae familyası tarım ve ormancılık için kullanılan aletlerin yapımında da değerlendirilirler. Bitkilerin kendileri veya yaprak ve tohumların bulunduğu kapsül şeklindeki bitki kısımları, azot kaynağı olarak toprağa karıştırılarak, toprağın verimini arttırabilirler. Fabaceae familyasının bazı türlerinin (*Trifolium* ve *Medicago* spp.) toprak verimini arttırmak için kullanımı, çiftçilerin milyarlarca dolar değerinde azotlu gübrelerin kullanımı sonucu ortaya çıkan yüksek maliyetleri engelleyebilmektedir (Wojciecjowski et al., 2006).

Çit ve pergolalarda kullanılan sarılıcı türler arasında ise; *Acacia* spp., *Lespedeza* spp., *Cytisus* spp., *Securigera varia*, *Gleditsia* spp., *Indigofera* spp., *Pueraria montana*, *Prosopis* spp., *Mimosa* spp., *Abrus precatorius*, *Mimosa pudica* ve *Albizia* spp. bulunmaktadır (Petruzzello, 2015).

Çizelge 2.1. Fabaceae familyasına ait bazı bitkilerin kullanım alanları

Gıda endüstrisi	Boya endüstrisi	Hayvan yemi endüstrisi	Kereste ve ahşap endüstrisi	Süs bitkiciliği
<i>Phaseolus acutifolius</i> , <i>Phaseolus coccineus</i> , <i>Phaseolus lunatus</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Glisin max.</i> , <i>Inga</i> spp. (Bennet, 2018)	<i>Indigo feratinctoria</i> , <i>Haematoxylum campechianum</i> , <i>Senna</i> spp. (Petruzzello, 2015)	<i>Medicago sativa</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lespedeza</i> spp., <i>Trifolium</i> spp., <i>Lablab purpureus</i> , <i>Lupinus</i> spp., <i>Albizia</i> spp., <i>Crotalaria juncea</i> (Petruzzello, 2015), <i>Trifolium</i> spp., <i>Medicago</i> spp. (Bennet, 2018)	<i>Dipteryx oleifera</i> , <i>Prosopis</i> spp., <i>Pterocarpus</i> spp., <i>Abrus precatorius</i> , <i>Albizia</i> spp., <i>Crotalaria juncea</i> , <i>Tamarindus indica</i> (Petruzzello, 2015), <i>Robinia pseudoacacia</i> (Bennet, 2018)	<i>Acacia</i> spp., <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lespedeza</i> spp., <i>Cytisus</i> spp., <i>Ceratonia siliqua</i> , <i>Lablab purpureus</i> , <i>Gymnocladus dioica</i> , <i>Anthyllis vulneraria</i> , <i>Mimosa pudica</i> , <i>Styphnolobium japonicu</i> , <i>Delonix regia</i> , <i>Phaseolus coccineus</i> , <i>Senna</i> spp., <i>Albizia</i> spp., <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Tamarindus indica</i> , <i>Wisteria</i> spp. (Petruzzello, 2015)

2.5 Ss Bitkiciliğinde Fabaceae Familyası

Genellikle evreyi gzelleştirmesi, byleyici yaprakları, çiçekleri ve hoş kokuları için yetiştirilen ss bitkilerinin birçoğu hem iç mekan, hem de dış mekan için kullanılmaktadır. Süs bitkileri; kentsel ve kırsal alanların evre kirliliğinin azaltılması, sosyal ve kırsal ormancılık, atık alanların geliştirilmesi, ağaçlandırma ve açık ve kapalı alanların evre düzenlemesi için önemli rol oynarlar. Ss bitkilerinin, insan davranışları üzerinde de güçlü ve olumlu bir etki yaptığı belirlenmiştir (Farsana and Thomas, 2016) (izelge 2.2; şekil 2.4; şekil 2.5).

Doğada bol miktarda yabani iek ve süs bitkisi mevcuttur; ancak ne yazık ki birçoğunun, neslinin tükenmesi tehlikesiyle karşı karşıya kalınmiştir. 1970'lerden itibaren ss bitkilerinde dünya çapında ilgi çekici bir yeniden canlanma olmuştur ve bu da yeni ss bitkilerini aramak ve geliştirmek için yeni arayışlara yol amiştir (Farsana and Thomas, 2016).

Çizelge 2.2. Fabaceae familyasına ait bazı süs bitkilerinin listesi ve süs potansiyelleri*

Botanik isim	Familiya	Süs potansiyeli
<i>Abrus precatorius</i> L.	Fabaceae	Çekici çiçekleri ve kırmızı renkli tohumlarıyla çok güzel bir görünüme sahiptir.
<i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) DC	Fabaceae	Çekici çiçeklere sarılıcı bir bitkidir.
<i>Arachis glabrata</i> Benth.	Fabaceae	Güzel parlak sarı çiçekleri ile yayılıcı özelliğe sahiptir.
<i>Clitoria ternatea</i> L.	Fabaceae	Güzel görünümlü mavi ya da beyaz görünümlü tırmanıcı bir bitkidir.
<i>Crotalaria heyneana</i> Graham ex Wight & Arn.	Fabaceae	Çiçek salkımı üzerinde güzel mavi renkli çiçeklere sahiptir.
<i>Crotalaria pallida</i> Dryand.	Fabaceae	Muhteşem görünümlü sarı çiçeklere sahiptir.
<i>Vigna caracalla</i> L. Verdc.	Fabaceae	Rengarenk çiçeklere ve çok hoş bir kokuya sahiptir.
<i>Bauhinia acuminata</i> L.	Caesalpiniaceae	Güzel beyaz çiçeklere ve iki loblu yapraklara sahiptirler.
<i>Bauhinia purpurea</i> L.	Caesalpiniaceae	Dikkat çekici yapraklara ve mor renkli çiçeklere sahiptirler.
<i>Bauhinia variegata</i> L.	Caesalpiniaceae	Çekici yapraklara ve mor renkli çiçeklere sahiptirler.
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) SW.	Caesalpiniaceae	Salkım şeklinde çiçek açarlar.
<i>Cassia fistula</i> L.	Caesalpiniaceae	Çarpıcı parlak sarı renkte çiçek açarlar.
<i>Cassia javanica</i> L.	Caesalpiniaceae	Güzel pembe çiçeklere sahiptirler.
<i>Delonix regia</i> (Boj. ex Hook.) Rafin.	Caesalpiniaceae	Çekici kırmızı çiçeklere sahiptirler.
<i>Peltophorum pterocarpum</i> (DC.) Backer ex Heyne	Caesalpiniaceae	Sarı çiçeklere sahiptirler.
<i>Saraca asoca</i> (Roxb.) de Wilde	Caesalpiniaceae	Kokulu sarı, kırmızı veya turuncu çiçeklere sahiptirler.
<i>Senna polyphylla</i> (Jacq.) H.S. Irwin & Barneby	Caesalpiniaceae	İlgi çekici sarı çiçeklere sahiptirler.
<i>Adenanthera pavonina</i> L.	Caesalpiniaceae	Parlak sarı tohumlara sahiptirler.
<i>Calliandra emarginata</i> Benth.	Mimosaceae	Çekici kırmızı çiçeklere sahiptir.
<i>Calliandra haematocephala</i> Hassk.	Mimosaceae	Çok güzel kırmızı bir başa sahiptir.
<i>Racosperma auriculiforme</i> (Benth.) Pedley	Mimosaceae	Çekici sarı çiçeklere sahiptirler.

*: Farsana and Thomas, 2016; Etcheverry et al., 2008



Abrus precatorius L.



Alysicarpus vaginalis (L.) DC



Arachis glabrata Benth.



Bauhinia acuminata L.



Bauhinia purpurea L.



Cassia javanica L.



Saraca asoca (Roxb.) de Wilde



Senna polyphylla (Jacq.) H.S.

Şekil 2.4. Süs bitkiciliğinde öneme sahip Fabaceae familyasında yer alan bazı bitkilerin çiçekleri (Farsana and Thomas, 2016)



Şekil 2.5. Süs bitkiciliğinde öneme sahip Fabaceae familyasında yer alan *Vigna caracalla* bitkisi çiçekleri

2.6 *Vigna caracalla* Bitkisinin Genel Özellikleri

Fabaceae familyasındaki *Vigna* cinsi, 100'den fazla yabancı tür içermektedir. Börülce (*Vigna unguiculata* L. Walpers), maş fasulyesi (*Vigna radiata* L. Wilczek) ve azuki fasulyesi (*Vigna angularis* Willd. Ohwi) gibi 10 kültür türünü içeren, tarımsal açıdan önemli bir taksondur. Bunların bazı yabancı akrabaları; kurak topraklar, kumsal sahiller ve kireçtaşı çorak alanlar gibi ekstrem ortamlarda yaşadıkları için, tarımsal olarak uygun olmayan arazilerde yetiştirilmek ve strese dayanıklı ürünler geliştirmek üzere kullanılabilir adaptif genleri barındırırlar. Dahası, bu aşırı ortamlara da adapte olan ve azot fiksasyonuna katkıda bulunan kök yumrusu bakterileriyle simbiyotik bir ilişki geliştirdikleri için, bu baklagillerin düşük girdili sürdürülebilir tarıma katkıda bulunma potansiyelleri yüksektir (Takahashi et al., 2016).

V. caracalla, Fabaceae familyasına ait “Salyangoz asması”, Salyangoz çiçeği, Tirbuşon sarmaşığı, Zülf-ü Aruz ya da “İzmir sarmaşığı” olarak da bilinen, ülkemizde Akdeniz ve Ege Bölgelerinde rastlanılan, çok hoş koku ve çeşitli renkli çiçeklere sahip oldukça güzel görünümlü bir sarmaşık bitkisidir (Çizelge 2.3). *V. caracalla*, bitkisinin sinonim isimleri, *Phaseolus caracalla* L. ve *Cochlianthus caracalla* L.’dir (Natural Sources Conservation Service, 2018).

Çizelge 2.3. *Vigna caracalla* bitkisinin taksonomik sınıflandırılması (Natural Sources Conservation Service, 2018)

Kingdom (Alem)	Plantae (Bitkiler)
Subkingdom (Altalem)	Tracheobionta (Damarlı bitkiler)
Superdivision (Üstbölüm)	Spermatophyta (Tohumlu bitkiler)
Division (Bölüm)	Magnoliophyta (Çiçekli bitkiler)
Class (Sınıf)	Magnoliopsida (Çift çenekliler)
Subclass (Altsınıf)	Rosidae
Order (Takım)	Fabales
Family (Familya)	Fabaceae/Leguminosae (Baklagiller)
Subfamily (Altfamilya)	Papilionoideae
Genus (Cins)	<i>Vigna savi</i> (Börülce)
Species (Tür)	<i>Vigna caracalla</i> L. Verdc. (Salyangoz çiçeği)

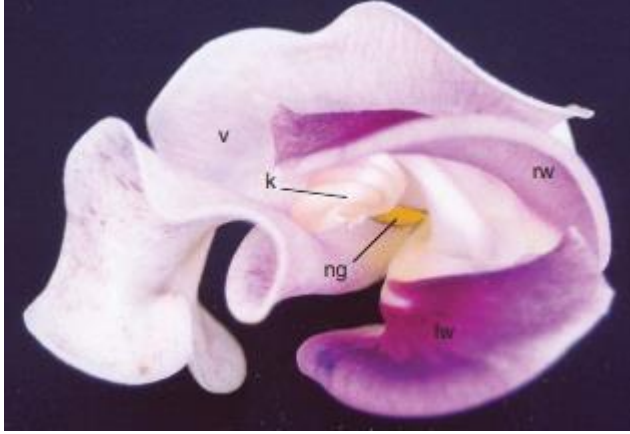
Vigna caracalla, Güney Amerika (Brezilya, Bolivya, Paraguay, Arjantin, Peru, Ekvator ve Kolombiya) ve Orta Amerika (Guatemala, Nikaragua, Kosta Rika, Meksika ve Panama) bölgelerine özgü, yumrulu, kavisli, çok yıllık yerli bir bitkidir. Bu bitki, bir süs türü olarak yaygın olarak yetiştirilmektedir ve zengin besin içeriğinden dolayı yem olarak da kullanılabilir (Etcheverry et al., 2008).

Boy 6 metreye kadar çıkabilen; nemli, bol güneşli ya da az gölgeli ve bazı organik maddelerle iyi drene edilmiş topraklarda daha iyi yetişebilen *V. caracalla* bitkisi; tohum, çelik ya da aşılama ile üretilmektedir. Bu bitkinin önemi, kokusu *Stephanotis* (Madagaskar yasemini)'e rakip olacak kadar güzel olan orkide benzeri çiçeklerinden kaynaklanmaktadır (Anderson and Ascher, 1994). Haziran-Eylül ayları arasında açan çiçekleri pembe, eflatun, soluk sarı ve beyaz renklidir. Limon ve yasemin arası bir kokuya sahiptir (Orman Genel Müdürlüğü, 2013).

2.7 *Vigna caracalla* Bitkisinin Morfolojik Özellikleri

Vigna caracalla çiçeği (Şekil 2.6), kaliksi belirgin bir şekilde zigomorfik bir yapıya sahiptir. Diğer yapılar ise asimetriktir. Çiçeklerin uzunluğu 4–7 cm arasında değişmektedir. Çiçeklerin ve pediküllerin (çiçek sapları) toplam

uzunluğu sırasıyla 4–7 cm ile 5–15 mm arasında değişmektedir (Etcheverry et al., 2008).



Şekil 2.6. *Vigna caracalla* çiçek morfolojisi (v:veksillum-bayrakçık, k:kayıkçık, lw:sol kanatçık, rw:sağ kanatçık, ng: nektar özü) (Etcheverry et al., 2008)

Sepallerin alt kısmında oluşturduğu tüp şeklindeki yapı kaliks olarak isimlendirilir ve böceklerin uğramaları sırasında petal kaideleri sıkıca kapanır. Korolla, uzun boru şekilli kaliks tarafından çevrelenen ve fonksiyonel bir tüp yapısı oluşturan beş petalden oluşmaktadır. Tüm popülasyonlar, benzer petal renkleri göstermektedir. Üst kısımdaki bir adet büyük damarlı petale bayrakçık (veksillum) soluk mor renktedir. Bunlar, serbest haldeki stameni sıkıca sararlar ve nektar girişini kapatan iki belirgin çıkıntıya sahiptirler. Kanatçıklar, onları çapraz yönde konumlandıran bir eğrilik gösterirler. Genellikle en dıştakiler mor, içtekiler ise beyaz renktedir. Sol kanatçık, çiçeğin alt tarafına doğru uzanarak böcekler için bir iniş platformu işlevi görmektedir. Kayıkçık, iki adet beyaz renkli petalden oluşur. Kayıkçık petallerinin distal kısmı aniden daralarak, stilin distal kısmını çevreler. Bu kısım sarmal şeklindedir ve omurgayı oluşturur. Ortalama sarmal sayısı, popülasyonlar arasında önemli ölçüde farklılaşma göstermektedir. Böceklerin ziyaretleri sırasında, arılar sol kanadı aşağı doğru eğerek, stigmanın açığa çıkmasını sağlar ve böylece stiller polenle dolar (Etcheverry et al., 2008).

Bombus morio, *Xylocopa eximia* ve *Centris bicolor*, *Vigna caracalla* bitkisinin polinasyon mekanizmasını aktive eden ve polenini taşıyan ziyaretçiler olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.7). Bu ziyaretçiler, *V. caracalla*'nın polenlerin bulaştığı kısımlarıyla stigmaya dokundukları için tozlayıcı olarak kabul edilmişlerdir. *Xylocopa eximia*'nın, *B. morio*'ya kıyasla çok daha fazla miktarda polen tanecikleri taşıdığı (sırasıyla 78125 ± 6467 adet ve 11458 ± 1577 adet) belirlenmiştir ve tozlayıcı etkinlikleri arasında da farklılıklar bulunmuştur (Etcheverry et al., 2008).



Şekil 2.7. *Vigna caracalla* bitkisinin tozlayıcıları A: *Bombus morio*, B: *Xylocopa eximia*, C: *Centris bicolor* (Etcheverry et al., 2008)

2.8 Bitki Doku Kültürü Teknikleri

V. caracalla tohumlarının pahalı olması, düşük çimlenme oranı (Suleiman, 2010), ve çiçeklerindeki tozlaşma zorluğu gibi nedenlerle üretimi sekteye uğramıştır. Tozlaşmanın zorluğu, tohum veriminin düşüklüğü ve çelikleme yoluyla üretimin kısıtlı olması sebebiyle bu bitkinin üretimi için alternatif üretim tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır.

Geleneksel çoğaltım tekniklerinin yanı sıra, modern *in vitro* teknolojik yöntemler bitkilerin hızlı ve kontrollü koşullar altında çoğaltılması için yeni imkanlar sunmaktadır. İstikrarlı ve yeniden üretilebilir rejenerasyon protokollerinin oluşturulması ile, süs bitkiciliği ve yem endüstrisi için önemli olan *V. caracalla* bitkisinin ticari olarak başarılı bir şekilde çoğaltılması mümkün olabilecektir.

Bitki doku kültürünün temeli bilimsel olarak, başlangıçta hücre keşfini takip eden hücre teorisi kavramından başlamaktadır. Haberlandt tarafından 1902 yılında totipotensi özelliğinden yararlanılarak bir bitkinin tamamının üretilebilmesine yönelik ilk çabalar; dokuya uygun olmayan kültür seçimi, besin kaynağı ve kültür koşulları nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bitki doku kültürlerinde ilk önemli atılım, 1930 yılında embriyoların ve köklerin kültürünün başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesiyle başarılmıştır. Bitki doku kültüründeki en önemli başarı, tanımlanmış bir kültür ortamının formülasyonudur. Günümüzde

Murashige ve Skoog (MS) ortamı, bitki türlerinin çoğunda en etkili kültür ortamı olarak kullanılmaktadır (Shahzad et al., 2017).

Bitki doku kültürü teknikleri, bütün bitkileri yeniden üretmek ve çoğaltmak için, izole edilmiş bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının, aseptik koşullar altında büyümeye ve gelişmeye devam ettikleri yapay besin ortamlarına aktarılmasına dayanmaktadır. 'Doku kültürü' yaygın olarak tüm bitki hücrelerini; diğer bir ifade ile kallus, protoplast, anter, meristem, embriyo ve organ kültürlerini tanımlamak üzere kullanılan geniş kapsamlı bir terimdir. Bitki doku kültürü teknikleri, bitki hücrelerinin totipotensi özelliği temeline dayanmaktadır. Totipotensi, tek hücrelerin bölünme kapasitesine dayanarak, organların tüm farklılaşmış hücrelerini üretme ve bütün bir bitkiye dönüşme yeteneğidir (Iliev et al., 2018). Doku kültürü uygulamaları, genetik değişimlere uğrayan yeni bitkilerin yetiştirilmesi gibi amaçlarla da bitki araştırmalarında kullanılmaktadır (Anderson, 2010).

Bitki doku kültürünün farklı teknikleri, geleneksel çoğaltma yöntemlerine göre belirli avantajlar sunmaktadır. Kontrollü bir ortamda *in vitro* bitkilerin yetiştirilmesi; kültür koşulları ve bitki materyalinin yapısı hakkında derinlemesine bilgi sahibi olmayı ve ekonomik olarak önemli bitkilerde genetik olarak üstün genotiplerin klonal çoğaltımını sağlar. Doku kültürleri, bitki genetik mühendisliği için kullanılan başlıca deneysel sistemleri temsil eder, ayrıca gelişimsel süreçlerin altında yatan yapısal, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler temellerin incelenmesi yoluyla büyüme ve gelişmenin düzenlenmesini inceler (Iliev et al., 2018).

Bitki doku kültürü teknikleri, genellikle 8 ana başlık altında incelenebilmektedir: tohum kültürü, embriyo kültürü, meristem kültürü, nod kültürü, kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, anter kültürü ve protoplast kültürü (Raj, 2018).

Bu tez çalışması kapsamında klonal mikroçoğaltıma esas olmak üzere tohum kültürü, sürgün ucu kültürü, ve nod kültürü kullanıldığı için özellikle bu teknikler açıklanmıştır.

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullarda genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltma amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir (Gürel vd., 2013). Klonal mikroçoğaltım ise, bitkilerin genetik olarak aynı kopyalarının çoğaltılmasını ifade etmektedir. Tomurcuklanma, çelikleme ve aşılama, *in vivo* klonal çoğaltımda kullanılan genel teknikler olarak bilinirler. *In vivo* klonal çoğaltımlar çoğunlukla pahalı, zor ve başarısızdır. Bu sebeple, *in vitro* klonal çoğaltım iyi bir alternatif yaklaşımdır (Bhatia and Sharma, 2015). Mikroçoğaltımda yaygın olarak kullanılan eksplant türleri; meristemler, apikal sürgün uçları, aksiler (koltukaltı)

tomurcuklar, adventif sürgünler, somatik embriyolar ve yumru gözleridir. (Gürel vd., 2013). Mikroçoğaltım yöntemleri, büyük ölçekte bitki üretimi için ilk defa 1960 yılında George Morel tarafından orkide bitkisinde uygulanmıştır. Mikroçoğaltımda yaygın olarak kültürün başlangıcı için kullanılan eksplantlar; meristem, sürgün ucu ve aksiler tomurcuklardır. Sürgün ucu ve meristem, ilk defa 1965 yılında Cutter tarafından tanımlanmıştır (Bhatia and Sharma, 2015). Günümüzde, ticari kitlesel üretimi için en sık kullanılan mikroçoğaltım yöntemi, nispeten yüksek bir sitokinin konsantrasyonunun etkisi altında izole apikal veya aksiler tomurcuklardan kaynaklanan aksiler sürgün proliferasyonuna dayanmaktadır (Iliev et al., 2018).

Geleneksel yöntemlere kıyasla mikroçoğaltım tekniği; kısa sürede çok sayıda bitki üretimi, istenilen özelliklere sahip özel bir genotipin ya da çeşidin yüksek miktarda üretimi, yeni çeşitlerin geliştirilme sürecinin kısılması, mevsimsel değişikliklerden etkilenilmemesi, tehlike altındaki türlerin korunması, germplazm muhafazası, hastalık içermeyen bitki üretimi ve sentetik yapay tohumların somatik embriyogenez yoluyla üretimi gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Bhatia and Sharma, 2015).

Mikroçoğaltımın dört aşaması (Aşama 1, Aşama 2, Aşama 3 ve Aşama 4) 1978'de Murashige tarafından belirlenmiştir. Aşama 0, 1981 yılında Debergh ve Mane tarafından mikroçoğaltım sistemine dahil edilmiştir (Bhatia and Sharma, 2015).

Aşama 0: Mikroçoğaltımın bu aşamasında, kültür için kaliteli ve uygun eksplant alınabilen hastalıktan arı donör bitkinin seçimi yapılmaktadır. Donör materyalin sera gibi korunaklı yerlerden alınması önerilmektedir. Daha önceden *in vitro* da yetiştirilen stok bitkiler de donör bitki olarak kullanılabilir (Gürel vd., 2013).

Aşama 1: Bu aşama, Aşama 0'da seçilen eksplantların yüzey sterilizasyonu, uygun besin ortamının belirlenmesi ve eksplantların kültüre alınmasını içermektedir (Bhatia and Sharma, 2015). Ticari ölçekte mikroçoğaltım için genellikle sürgün uçları ve aksiler tomurcuklar tercih edilmektedir; ancak farklı organlar da eksplant kaynağı olarak kullanılmaktadır (Gürel vd., 2013; Babaoğlu vd., 2001). Bu aşamada kültüre alınan bitkilerin kontaminasyondan arı olması ve yüksek derecede büyüme ve gelişme sergilemesi oldukça önemlidir (Gürel vd., 2013).

Aşama 2: Bu aşamada rejenere olan sürgünler kitlesel çoğaltım amacıyla, belirlenmiş taze besin ortamlarında belirli aralıklarıyla kültüre alınır (Gürel vd., 2013). Sürgün rejenerasyonu amacıyla besin ortamına her bitkinin kendi ihtiyacına uygun olacak miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri eklenmelidir (Bhatia and Sharma, 2015). Besin ortamına eklenecek bitki büyüme düzenleyicisi tipi ve miktarı deneysel olarak belirlenmelidir. Altkültür sayısı ise bitkinin türüne ve çeşidine göre değişiklik göstermektedir (Gürel vd., 2013).

Aşama 3: Aşama 3'de, aşama 2'de rejenere edilen sürgünler *in vitro*'da ya da bazı durumlarda *in vivo*'da köklendirilirler. Bazı durumlarda sürgünler mikroçelik olarak hazırlanırlar ve köklenme için direkt toprağa transfer edilirler; ancak bu durum bazı bitki türleri için geçerlidir. Birçok bitki türü *in vitro*'da kolaylıkla çimlenebilmektedir (Gürel vd., 2013.)

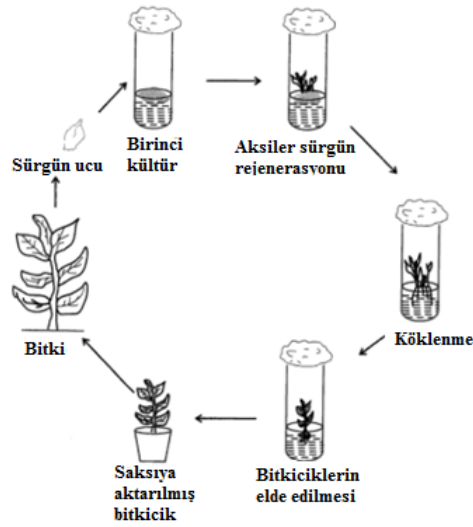
Aşama 4: *In vitro*'da yetiştirilen bitkicikler; aseptik, düşük ışık yoğunluğu, yeterli miktarda şeker ve besin maddelerine sahip, yüksek nem içeriği altında heterotrofik büyüme gerçekleştirmesine izin verecek şekilde hazırlanmış besin ortamlarında kültüre alındıkları için, *ex vitro*'ya transfer edildiklerinde birçok olumsuz durumun üstesinden gelmek zorundadırlar. Bu nedenle, *ex vitro*'ya transplantasyondan sonra, bitkicikler genellikle birkaç haftalık aklimatizasyon süresine ihtiyaç duyarlar ve dış çevreye uyum sağlamak için adaptasyon gerçekleştirirler (Shahzad et al., 2017). Bir mikroçoğaltım protokolünün başarısı, köklendirilmiş bitkiciklerin dış ortamda, düşük maliyetle ve yüksek sağkalım oranına sahip bir şekilde aklimatize edilmelerine bağlıdır. Aklimatizasyon aşamasında gerekli özen gösterilmezse çok fazla bitki kaybı meydana gelmektedir (Bhatia and Sharma, 2015). Başarılı aklimatizasyon sonrasında, bitkicikler uygun bir kompost karışım içeren saksılarda seraya aktarılırlar (Gürel vd., 2013). Bu bitkiler, kontrol bitkileriyle karşılaştırıldıklarında morfolojik veya büyüme özelliklerinde saptanabilir herhangi bir farklılık göstermemektedirler (Shahzad et al., 2017).

Mikroçoğaltımda karşılaşılan en önemli sorunlardan biri hiperhidrisitedir. Elde edilen sürgünlerin çoğaltımı için altkültür yapılmaktadır; ancak her biki için uygun olan bir altkültür sayısı vardır. Alt kültürlerin sayısına veya kültür süresine bağlı olarak eksplantlarda hiperhidrisite (camsılaşma) gözlenebilmektedir. Hiperhidrisite altkültür esnasında karşılaşılan en önemli fizyolojik problemlerden biridir. Besin ortamındaki bitki büyüme düzenleyisi, mineral madde, şeker ve agar miktarı hiperhidrisitenin nedenleri arasındadır (Babaoğlu vd., 2001).

Tohum kültürü, olgun veya olgunlaşmamış tohumların yapay besin ortamlarında kültüre alınmasıyla oluşturulur. Tohum oluşturmada sıkıntı olan ender bitkilerin çoğaltımı ve tam bitkilerin elde edilmesi bu yolla sağlanabilmektedir. Tohum çimlenmesi; normal bir bitki oluşturabilme yeteneğindeki tohum embriyosunda bulunan temel yapıların optimum koşullar sağlandığında tohum kabuğunu aşarak dışarı çıkması ve gelişimini ifade etmektedir. Embriyonun çimlenme yeteneğinin yanı sıra; çimlenme için ışık, sıcaklık, oksijen ve nem gibi parametrelerin optimum koşullarda olması ve tohumdaki dinlenme evresinin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bazı durumlarda optimum koşullar sağlansa bile bazı tohumlarda çimlenme gerçekleşmemektedir. Tohum dormansisi olarak adlandırılan bu durumu ortadan kaldırmak için bazı uygulamalar yapılabilmektedir: skarifikasyon (mekanik aşındırma), stratifikasyon (katlama), ve tohumları ışıktaki, suda, ozmotik çözeltide ve katı materyallerde bekletme (Gürel vd., 2013). Tohum kültürlerinde; doğrudan

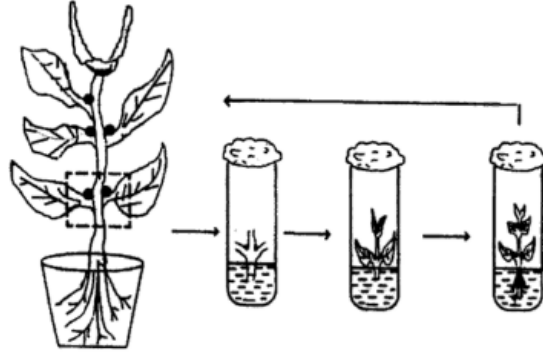
bir bitki materyali kullanıldığından, doku hasarını önlemek ve optimum rejenerasyon sağlamak amacıyla tohumlar yüzeysel sterilize edilmelidir (Raj, 2018).

Sürgün ucu kültürü, hızlı klonal çoğaltım için tercih edilen bu teknikte eksplant tipi olarak sürgün uçları kullanılmaktadır. Bunlar sürgün apikal meristeminden, çeşitli gelişim aşamalarındaki genişlememiş yapraklardan ve yaprak primordiasından oluşmaktadır (Bhatia and Sharma, 2015). Sürgün ucu kültürü, Georges Morel (1965) tarafından orkide cinsi *Cymbidium* türünün mikroçoğaltım için ilk defa kullanılmıştır. Bu teknik, otsu bitki türlerinde zayıf apikal dominansı ve güçlü kök rejenerasyon kapasitesi sebebiyle odunsu bitki türlerine göre daha başarılı sonuçlar vermektedir. Sürgün ucunun büyüklüğü kültürün başarısını etkileyen parametrelerden biridir. Genellikle çok küçük eksplant alındığı zaman bitkicik gelişim kapasitesi azalırken; daha büyük eksplantların yaşama şansları artmaktadır. *In vitro* mikroçoğaltım için yaklaşık olarak 2 cm'lik sürgünler seçilmelidir. Ancak eğer amaç, virüsten arı mikroçoğaltım yapmak ise 0,2-0,5 mm'lik yaprak primordiasına sahip meristem uçları kullanılmalıdır. Buna da meristem ucu kültürü denir (Chawla, 2004). Bu teknikte, yeni oluşan sürgünler, tekrarlanan çoğaltma işlemleri için eksplant olarak işlev görmektedir (George et al., 2007). Daha sonra çoğaltılan sürgünler, bitkiciklerin geliştirilmesi için köklendirme ortamına aktarılırlar (Bhatia and Sharma, 2015). Sürgün ucu kültürünün şematik gösterimi Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. Sürgün ucu kültürünün şematik gösterimi (Chawla, 2004)

Nod kültürü, olgun bitki yada bitkiciklere ait tek veya çoklu nodlar *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu sağlayabilen aksiler tomurcuklar içerdikleri için eksplant olarak kullanılabilir. Bu teknikte nod eksplantları izole edilir ve sürgün rejenerasyonu için besin ortamına aktarılırlar (Şekil 2.9) (Chawla, 2004). Oluşan sürgünler, köklendirme ortamında kök oluşturarak bitkicik eldesi sağlanır (Bhatia and Sharma, 2015). Nodlar, mikroçoğaltım için kullanılan en güvenilir eksplantlar arasındadır (Iliev et al., 2018).



Şekil 2.9. Nod kültürünün şematik gösterimi (Chawla, 2004)

2.9 Vigna Cinsinde Gerçekleştirilen Çeşitli Doku Kültürü Uygulamaları

Yapılan literatür incelemelerinde çalışma materyalini oluşturan *Vigna caracalla* ile ilgili olarak yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için bu kısımda *Vigna* cinsine dahil bazı türlerle ilişkili çeşitli doku kültürü çalışmaları hakkında bilgi verilmiştir.

Vigna unguiculata L. (Türk börülcesi cv. Akkız) sürgün meristemleri kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* mikroçoğaltım çalışmasında Ege Üniversitesi'nden elde edilen *Vigna unguiculata* L. tohumları %70'lik ticari ağartıcı ile sterilize edildikten sonra 2 kere steril suda 3-5 dk boyunca durulanmıştır. Steril edilen tohumlar çimlenme için %3 sükröz içeren MS besin ortamında (0.65% Duchefa agar) kültüre alınmıştır. Yapılan sterilizasyon denemeleri sonucunda, tohumları endojenik latent bakteriyel kontaminasyona karşı sterilize etmenin mümkün olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, besin ortamı kültür kaplarına dökülmeden önce, otoklavlama sonrası tohum çimlenme ortamına 500 mg/L Augmentin (Smith-Klein-Beecham) eklenerek bakteriyel kontaminasyon giderilmiştir. 3- 4 günlük *in vitro* fidelerden sürgün ucu eksplantları kesilmiş, %3 sükröz ve 2 mg/L maya özütü içeren ve 0.5 mg/L BAP ve 0, 0.10, 0.30 - 0.50 mg/L NAA ile desteklenmiş bazal MS besin ortamında (%0.65 agar) kültüre alınmıştır. Bu besin ortamlarına eklenen eksplantlarda fenoliklerin varlığına bağlı olarak farklı derecelerde kararma gözlemlendiğinden 5 g/L aktif kömür besin ortamına ilave edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi (%) ve eksplant başına en yüksek ortalama sürgün sayısı 0,5 mg/L BAP içeren MS besin ortamında kaydedilmiştir. Herhangi bir konsantrasyonda NAA ilavesinde sürgün rejenerasyon yüzdesi (%) ve eksplant başına ortalama sürgün sayısında azalmalar gözlenmiştir. Eksplant başına ortalama maksimum sürgün sayısı (2.60 adet/eksplant) NAA içermeyen MS besin ortamında kaydedilmiştir. Rejenere edilen sürgünler 0.5 mg/L IBA içeren besin ortamında köklendirildikten sonra aklimatize edilmiştir (Aasim et al., 2008).

Vigna subterranea (L.) Verdc. bitkisinde gerçekleştirilen *in vitro* sürgün ucu rejenerasyon çalışmasında öncelikle tohumlar steril edilmiştir. Sterilizasyon için, tohumlar %70'lik etanolde 1 dk boyunca, %7'lik kalsiyum hipokloritte 30 dk boyunca bekletildikten sonra 4 kere steril su ile durulanmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar tohum kabuğunun yumuşaması ve suyu emmesi için 24 saat boyunca suyun içinde karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra çimlendirilmeleri için MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. *In vitro* çimlendirilen tohumlardan kesilen sürgün uçları Gamborg vitaminleri ve farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (TDZ, BAP, KIN, Ads) içeren MS bazal ortamda kültüre alınmışlardır. 0.45 μM TDZ içeren besin ortamında en iyi ortalama sürgün çoğaltımı (11 sürgün/eksplant) sağlanmıştır. Yapılan karbon kaynağı denemeleri (%3 sükroz, glukoz, fruktoz ve maltoz içeren besin ortamları) sonucunda, eksplant başına en yüksek sürgün sayısı veren karbon kaynağı olarak sükroz belirlenmiştir. Rejenere edilen sürgünler 2 mg/L IBA ve 1.75 mg/L NAA ile desteklenmiş köklendirme ortamında kültüre alınmışlardır. 2 haftanın sonunda yapılan gözlemler sonucunda 2 mg/L IBA ile desteklenmiş besin ortamının köklenme üzerine daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Köklenmiş sürgünler, %70-80 başarı oranıyla aklimatize edilmiştir (Silue et al., 2016).

2014 yılında Rao ve Patil tarafından, *Vigna radiata* L. Wilczek. (Maş fasulyesi) bitkilerinde tuza toleranslı kallus hatlarının *in vitro* seleksiyonu ve tuza toleranslı bitkiciklerin rejenerasyonu ile ilgili doku kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, *Vigna radiata* L. Wilczek tohumları iyice yıkandıktan sonra 6 saat boyunca steril su içinde tohumların suyu emmesi için bekletilmiştir. Daha sonra 4 dk boyunca %70'lik etil alkol çözeltisine batırılmış ve 1 dk boyunca %0.1'lik HgCl_2 çözeltisinde sterilize edilmiştir. Tohumlar steril suda durulandıktan sonra kültüre alınmışlardır ve $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta 24 ± 2 °C'de 5 gün boyunca çimlendirilmişlerdir. Kallus indüksiyonu için 5 günlük bitkiciklerden elde edilen kotiledon eksplantları kullanılmıştır. Kotiledonlar, steril bi bisturi ile dört tarafı (diğer bir ifade ile, her iki tarafın yaprak apeksi, yaprak sapı ve yaprak kenarı) boyunca kesildikten sonra $9.09 \mu\text{M}$ 2,4-D ve $5.76 \mu\text{M}$ kinetin ile desteklenmiş, katılaştırıcı ajan olarak %8 agar kullanılan MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. 16saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta 4 hafta boyunca bekletilmiştir. 2,4-D ve kinetin içeren MS ortamı üzerinde yetiştirilen kallus dokusu farklı NaCl konsantrasyonlarına (50, 100, 150 ve 200 mM) maruz bırakılmış ve büyümenin tamamen inhibe olduğu konsantrasyon belirlenmiştir. Canlı hücreler 200 mM NaCl'de saptanmamıştır. Sonuç olarak, seleksiyon için 150 mM'lik bir konsantrasyon kullanılmıştır ve bu konsantrasyonda geliştirilen kallus yığınları aynı konsantrasyonda (150mM) NaCl içeren taze MS ortamında altkültüre alınmış ve 8 hafta boyunca büyümeye bırakılmıştır. Daha sonra kalluslar, tuza toleransın stabilitesini test etmek için NaCl içermeyen MS besin ortamında kültüre alınmıştır ve 4 hafta süreyle bekletilmiştir. NaCl içermeyen MS besin ortamında sağlıklı bir şekilde gelişim gösteren kalluslar 4 haftanın sonunda

tekrar 150 mM NaCl içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 4 haftanın sonunda iyi bir büyüme gösteren kallus hatları, NaCl'ye karşı toleranslı hatlar olarak kabul edilmiştir. Tuza toleranslı bitkicik rejenerasyonu için 300 mg kallus, sadece 0.5-2 mg/L BAP ve 0.5 ve 1 mg/L NAA ile kombinasyonu ile desteklenmiş MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 3-4 cm'lik bir uzunluğa ulaştığı zaman sürgünler kesilerek, 0.5 ve 1 mg/L IBA ile desteklenmiş MS ortamı içeren köklendirme ortamına aktarılmışlardır. En yüksek sürgün indüksiyonu (40.13 ± 1.8), eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (14.80 ± 0.64 adet) ve en yüksek ortalama bitkicik boyunun (8.6 ± 0.68 cm) elde edildiği besin ortamının 2 mg/L BAP ve 0.5 mg/L NAA'lı ile desteklenmiş MS besin ortamı olduğu ifade edilmiştir (Rao and Patil, 2014).

Vigna mungo L. Hepper (siyah mercimek) bitkisinde bitki rejenerasyonu çalışması yapılmıştır. Bitki tohumları, %70'lik etik alkol ile 1 dk muamele edildikten sonra 2-3 dk boyunca 2 kere steril suda durulanmıştır. Ardından tohumlar %0.2'lik HgCl₂ çözeltisiyle 3 dk boyunca muamele edilmiş ve 4-5 dk boyunca steril suda durulandıktan sonra steril filtre kağıtlarında kurutulmuşlardır. Sterilize edilen tohumlar, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamında çimlenme için kültüre alınmıştır. 4 günlük bitkiciklerden kotiledon kısımlar ayrılmış ve farklı konsantrasyonlarda BAP yada KIN içeren NAA veya IAA yada Ads ile desteklenmiş MS besin ortamı içeren cam tüplerde sürgün rejenerasyonu ve kallus indüksiyonu için kültüre alınmışlardır. Kültürler, 2 hafta boyunca 16 saat aydınlık/8 saat karanlık $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Ortam pH'sı 5.7'ye ayarlandıktan sonra agar-agar eklenmiştir. Altkültürler aynı besin ortamında 4 haftada bir yapılmıştır. Her 2-3 haftada bir gözlemlerin yapıldığı çalışmada; kallus oluşum yüzdesi, rejenerasyon frekansı, kültür başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verileri toplanmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı (72.4 ± 1.0) ve kültür başına sürgün sayısı (8.75 ± 1.0 adet) 2 mg/L BAP 1.5 mg/L NAA ve 25 mg/L Ads ile desteklenmiş MS besin ortamında belirlenmiştir. Uzayan sürgünler (3-4 cm) IAA, IBA veya NAA tek başına ya da IBA ve NAA kombinasyonu ile desteklenmiş %2 sükröz içeren köklendirme ortamlarında kültüre alınmışlardır. Tüm kültürler, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat aydınlık/8saat karanlık fotoperiyotta 3000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Köklenen bitkiler, daha sonra saksıya aktararak serada bekletilmişlerdir (Adlinge et al., 2014).

Vigna mungo L. (siyah mercimek) bitkisinde yapılan bir diğer çalışmada ise kallus indüksiyonu ve rejenerasyon denemeleri yapılmıştır. Bitki tohumları %70'lik etil alkol çözeltisinde 2 dakika boyunca bekletildikten sonra 2 kere steril suda 4 dk durulanmıştır. Tohumlar % 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80'lik Clorox (%1 Sodium Hypochlorite) ile 15-45 dk aralığında muamele edilmiştir. Clorox'un etkisini arttırmak için birkaç damla Tween 20 eklenmiştir. Tohumlar, daha sonra steril distile su ile 3-4 kez durulanmışlardır. %50 Chlorox ile 5 damla Tween 20'de 30 dk bekletme en uygun sterilizasyon prosedürü olarak belirlenmiştir.

Sterilize edilmiş tohumlar, steril kavanozlarda büyüme düzenleyicileri içermeyen agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında kültüre alınmıştır ve karanlık odada bekletilmiştir. Sterilize tohumlar, karanlık odada 2-3 gün içinde çimlenerek ve 5-6 gün içinde 7-8 cm uzunluğa ulaşmışlardır. Genç yapraklar ve hipokotiller kallus indüksiyonu ve rejenerasyon denemeleri için kullanılmıştır. Kallus indüksiyonu için farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve NAA ile desteklenmiş MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Maksimum kallus indüksiyonu 31.66 μM 2,4-D ilaveli MS besin ortamında; en düşük kallus indüksiyonu 2.26 μM 2, 4-D ile desteklenmiş MS besin ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında gözlemlenmiştir. Sürgün rejenerasyonu için farklı konsantrasyonlarda BAP tek başına ve farklı kombinasyonlarda BAP ve NAA ile desteklenmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Maksimum kallus başına sürgün oluşum yüzdesi (%60), 17.75 μM BAP ile desteklenmiş MS besin ortamında kaydedilmiştir. Köklendirme için farklı konsantrasyonlarda IBA ve NAA ile desteklenmiş $\frac{1}{2}$ MS besin ortamı kullanılmıştır. Maksimum köklenme yüzdesi (%55) 7.38 μM IBA ile desteklenmiş $\frac{1}{2}$ MS besin ortamında elde edilmiştir (Saha et al., 2017).

3. MATERYAL METOT

3.1 Materyal

Tez çalışmasında materyal olarak ticari bir firmadan temin edilen *Vigna caracalla* bitkisine ait tohumlar kullanılmıştır. Tohum göbeği de denilen hilumdan itibaren ortalama çapları 0,64 cm olan koyu kahverengindeki sert kabuklu *Vigna caracalla* tohumları (Şekil 3.1), yüzeysel steril edildikten sonra laboratuvarında hazırlanan besin ortamlarında çimlendirilerek elde edilen fidelerin sürgün ucu ve nod eksplantları çalışma materyalini oluşturmuştur.



Şekil 3.1. *Vigna caracalla* tohumu

3.2 Metot

3.2.1 Tohum, sürgün ucu ve nod eksplantlarının kültüre alınacağı besin ortamlarının hazırlanması

Çalışmada, MS (Murashige and Skoog,1962) ve ½ MS, WPM (Lloyd ve McCown, 1981) ve ½ WPM, N₆ (Chu et al., 1975) besin ortamları farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.2.1.1 Stok çözeltilerin hazırlanması

MS ve WPM besin ortamları hazırlanırken kolaylık olması açısından bazı kimyasallar gruplandırılarak stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler “1 litre besin ortamı için 5 mL stok çözelti” prensibine göre hesaplanmıştır (Çizelge 3.1; Çizelge 3.2).

Temel besin ortamında bulunan bileşikler dışında, kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin de stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiler, 5 mL stok çözeltisi içerisinde 1 mg/L bitki büyüme düzenleyicisi içerecek şekilde oluşturulmuştur.

N₆ (Chu et al., 1975) besin ortamı hazırlanırken stok çözelti hazırlanmamıştır. Gereken miktarlar tartılarak besin ortamına eklenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. MS besin ortamı bileşenleri, stok çözeltilerin grupları ve miktarları (Murashige and Skoog, 1962)

MS ortamı bileşenleri	1 Litre için gereken miktarlar (mg/L)	100 mL stok çözeltide bulunması gereken miktar (mg/100 mL)	Stok Grupları
KNO ₃	1900	*	*
NH ₄ NO ₃	1650	33000	1.Stok
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7400	2.Stok
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	338	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,5	
ZnSO ₄ .5H ₂ O	8,6	172	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	8800	3.Stok
KI	0,83	16,6	4.Stok
Myo-inositol	100	*	*
Na ₂ EDTA	37,3	746	5.Stok
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	556	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	5	6.Stok
H ₃ BO ₃	6,2	124	
KH ₂ PO ₄	170	3400	
Glisin	2	40	7.Stok
Nikotinik Asit	0,5	10	8.Stok
Tiamin HCl	0,1	2	
Pridoksin HCl	0,5	10	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,5	9.Stok

*Besin ortamlarına tartılarak eklenmiştir.

Çizelge 3.2. WPM besin ortamı bileşenleri, stok çözeltilerin grupları ve miktarları (Lloyd and McCown, 1981)

WPM besin ortamı bileşenleri	1 L Besin Ortamı (mg/L)	100 mL stokta bulunması gereken miktar (g/100 mL)	Stok No
NH_4NO_3	400	8	Stok 1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		11,028	Stok 2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		1,92	Stok 3
KH_2PO_4	170	3,4	Stok 4
K_2SO_4	999	*	*
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	368,5	7,4	Stok 5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,3	0,338	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	0,172	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,005	
H_3BO_3	6,2	0,124	Stok 6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,005	
Na_2EDTA	37,3	0,746	Stok 7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,9	0,558	
Tiamin-HCl	1	0,02	Stok 8
Nikotinik Asit	0,5	0,01	
Pridoksin-HCl	0,5	0,01	
Myo-inositol	100	*	*
Sakkaroz	30000	*	*

*Besin ortamlarına tartılarak eklenmiştir.

Çizelge 3.3. N₆ besin ortamı bileşenleri ve miktarları (Chu et al., 1975)

N ₆ besin ortamı bileşenleri	Ortamdaki miktarları (mg/L)
KNO ₃	2830
(NH ₄)SO ₄	463
KH ₂ PO ₄	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	166
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
Fe-EDDHA	5
MnSO ₄ .4H ₂ O	185
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
KI	0,8
Myo-inositol	100
Glisin	2
Tiamin-HCl	1
Pridoksin-HCl	0,5
Nikotinic Asit	0,5
Sükroz	20000

3.2.1.2 Besin ortamı hazırlığı

MS besin ortamı hazırlığı için ilk olarak önceden hazırlanmış stok çözeltilerden 1 litre için gerekli olan 5 mL, pipet yardımı ile çekilerek behere aktarılmıştır. Ardından, tartılarak ilave edilmesi gereken bileşikler (KNO₃, myo-inositol) ve karbon kaynağı (30 g/L sükroz) eklenip iyice çözdürülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicisi ile desteklenmiş MS besin ortamı hazırlanırken gerekli miktardaki bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Son olarak hacim saf su ile 1 litreye tamamlanmış, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı da pH'sı 1N NaOH (sodyum hidroksit) ve 1 N HCl (hidrojen klorür) kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Besin ortamında kullanılacak jelleştirici ajanlar tartılarak besin ortamına eklendikten sonra ortamlar devamlı karıştırılarak berraklaşmaya kadar kaynatılmış ve eksplantların kültüre alınacağı kültür kaplarına (23/24*140 mm'lik cam tüpler ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişeleri) paylaştırılmıştır. Kültür kabı olarak cam tüp kullanımında 10 mL besin ortamı; 250 mL'lik Erlenmeyer şişe kullanımında 50 mL besin ortamı konulmuştur. Ağızları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süreyle steril edilmişlerdir.

Otoklavdan çıkarılan steril besin ortamları kullanılana kadar kapakları açılmadan kuru ve serin bir ortamda saklanmıştır.

WPM besin ortamı hazırlığı için önceden hazırlanmış stok çözeltilerden 1 litre için gerekli olan 5 mL, pipet yardımı ile çekilerek behere aktarılmıştır. Ardından, tartılarak ilave edilmesi gereken bileşikler (KH_2PO_4 , myo-inositol) ve karbon kaynağı (30 g/L sükroz) eklenip iyice çözüldürülmüştür ve son olarak hacim saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Isıtıcı manyetik karıştırıcı da iyice karıştırılan ortamın pH'sı 1N NaOH (sodyum hidroksit) ve HCl (hidrojen klorür) kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Besin ortamı, 3 g/L gelrite (Duchefa) ilave edildikten sonra devamlı karıştırılarak berraklaşmaya kadar kaynatılmış ve eksplantların kültüre alınacağı cam kültür kaplarına (cam tüp ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişe) paylaştırılmıştır. Kültür kabı olarak cam tüp kullanımında 10 mL besin ortamı; 250 mL'lik Erlenmeyer şişe kullanımında 50 mL besin ortamı konulmuştur. Ağızları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. Otoklavdan çıkarılan steril besin ortamları kullanılana kadar kapakları açılmadan kuru ve serin bir ortamda saklanmıştır.

Yarı güçteki besin ortamları ($\frac{1}{2}$ MS ve $\frac{1}{2}$ WPM) için, 1L besin ortamı hazırlandıktan sonra hacim 2L'ye saf su ile tamamlanmıştır. Jelleştirici ajan miktarı ise her 1L'lik ortam için aynı bırakılmıştır (gelrite 3g/L; agar 7 g/L).

Yarı katı N_6 besin ortamı hazırlığıda da Çizelge 3.3' de belirtilen kimyasalların 1 L için gerekli olan miktarları tartılarak behere eklenmiştir ve bir miktar suda çözdürülmüştür. Eklenen tüm kimyasallar tamamen çözdürüldükten sonra hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Isıtıcı manyetik karıştırıcı da iyice karıştırılan ortamın pH'sı 1 N NaOH (sodyum hidroksit) ve HCl (hidrojen klorür) kullanılarak 5.8' e ayarlanmıştır. Besin ortamı, 3 g/L gelrite ilave edildikten sonra devamlı karıştırılarak berraklaşmaya kadar kaynatılmış ve eksplantların kültüre alınacağı cam kültür kaplarına (cam tüp ve 250 ml'lik Erlenmeyer şişe) paylaştırılmıştır. Her cam tüpe 10 mL besin ortamı; 250 mL'lik Erlenmeyer şişeye ise 50 mL besin ortamı konulmuştur. Ağızları kapatılan kültür kapları, otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. Otoklavdan

çıkarılan steril besin ortamları kullanılana kadar kapakları açılmadan kuru ve serin bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Yüzeysel tohum sterilizasyonu ve dormansinin kırılması

3.2.2.1 Hazırlık aşaması

Kabin içine alınacak olan pens, peçete, fayans, destek gibi materyaller alüminyum folyo ile sarılıp 170°C'de 1 saat boyunca etüvde steril edilmiştir. Durulama amacıyla kullanılan steril sular 220 cc'lik kavanozlara 200 mL distile su doldurulup 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlanarak hazırlanmıştır. Ticari olarak temin edilen %96'lık etil alkolden 70 birim etil alkolün üzerine 26 birim saf su eklenerek %70'lik etil alkol hazırlanmıştır. Laminar hava akışlı kabinin havalandırması açılarak yüzeyi etil alkol sıkılarak silinmiştir. Sterilizasyon için kullanılacak olan tüm materyal ve ekipmanlar, üzerlerine %70'lik etil alkol çözeltisi sıkıldıktan sonra kabin içine alınmıştır. Kabinde sterilizasyonu sağlamak amacıyla, UV ışığı 15 dk süreyle açık bırakılmıştır.

3.2.2.2 Sterilizasyon aşaması

Kabinde UV sterilizasyon bittikten sonra kabinin kapağı açılmış ve kabin çalışmasına geçilmiştir. Kabinin içindeki ekipmanlar en rahat çalışılacak şekilde düzenlenmiştir. %70'lik etil alkol, %0,1'lik HgCl₂ ve 3 adet steril su içeren cam kavanozlar sırayla dizilmiştir. Alev ocağı yakılmış ve alüminyum folyoyla sarılı ekipmanlar açılmıştır. Sert kabuklu tohumların sterilizasyonu ve dormansinin kırılması için 4 farklı uygulama denenmiştir (Çizelge 3.4).

Birinci uygulama için; tohumlar ilk olarak %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Kuruyan tohumlar %0,1'lik HgCl₂ çözeltisinde 3 dk bekletildikten sonra 2 kere steril su içeren cam kavanozlarda 1'er dk bekletilmiştir. Son olarak tohumlar, steril su içeren kavanozda tohum dormansisini kırmak için yaklaşık 7 saat süreyle bekletilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra tohumlar çimlendirilmek üzere hazırlanan MS besin ortamında kültüre alınmışlardır.

İkinci uygulamada; tohumlar %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Kuruyan tohumlar %0,1'lik HgCl₂ çözeltisinde 4 dk bekletildikten sonra 2 kere steril su içeren kavanozlarda 1'er dk bekletilmiştir. Son olarak tohumlar, steril su

içeren kavanozda tohum dormansisini kırmak için yaklaşık 7 saat bekletilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra tohumlar çimlendirilmek üzere hazırlanan MS besin ortamında kültüre alınmışlardır.

Üçüncü uygulamada ise; tohumlar %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Kuruyan tohumlar %0,1'lik HgCl₂ çözeltisinde 3 dk bekletildikten sonra 2 kere steril su içeren kavanozlarda durulama amacıyla 1'er dk bekletilmiştir. Son olarak tohumlar, steril su içeren kavanozda tohum dormansisini kırmak için yaklaşık 3 saat bekletilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra tohumlar çimlendirilmek üzere hazırlanan MS besin ortamında kültüre alınmışlardır.

Son uygulamada; tohumlar %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Kuruyan tohumlar %0,1'lik HgCl₂ çözeltisinde 4 dk bekletildikten sonra 2 kere steril su içeren kavanozlarda 1'er dk bekletilerek durulanmıştır. Son olarak tohumlar, steril su içeren kavanozda tohum dormansisini kırmak için yaklaşık 3 saat bekletilmiştir.

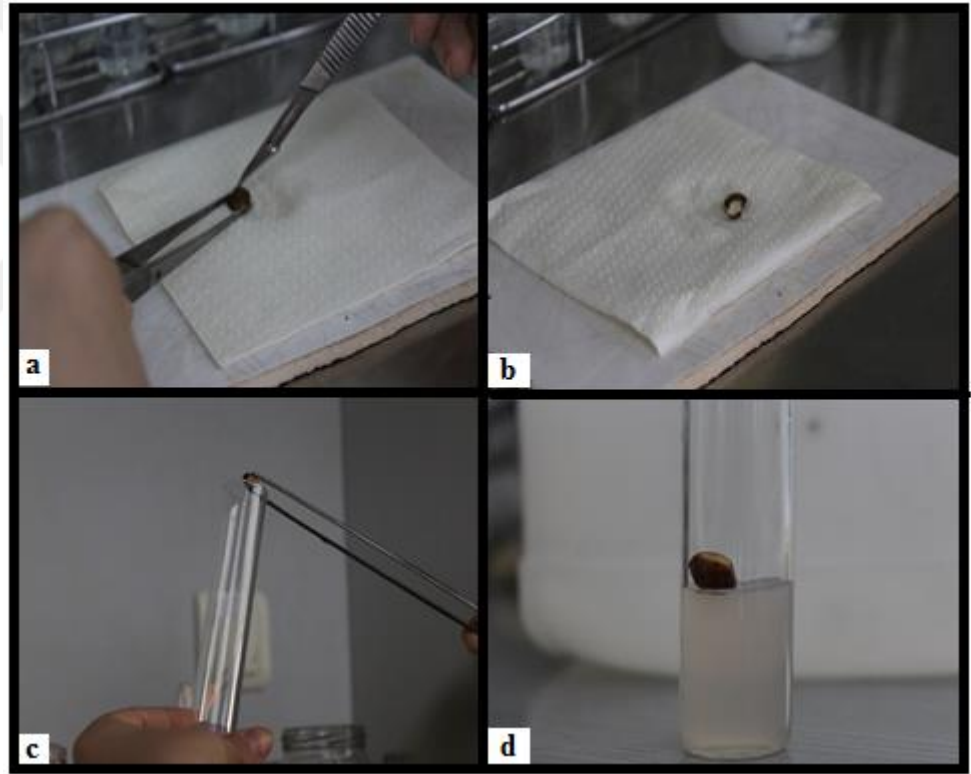
Sterilizasyon ve dormansinin kırılması için gerçekleştirilen denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü, her tekerrürde 5 tohum olacak şekilde kurulmuştur.

Çizelge 3.4. Tohum sterilizasyonu ve dormansinin kırılması için gerçekleştirilen için uygulamalar

1. Uygulama	2. Uygulama	3. Uygulama	4. Uygulama
•1 dk % 70'lik etil alkol uygulaması •3 dk %0.1'lik HgCl ₂ uygulaması •3 adet steril suda durulama •7saat steril suda bekletme	•1 dk % 70'lik etil alkol uygulaması •4 dk %0.1'lik HgCl ₂ uygulaması •3 adet steril suda durulama •7saat steril suda bekletme	•1 dk % 70'lik etil alkol uygulaması •3 dk %0.1'lik HgCl ₂ uygulaması •3 adet steril suda durulama •3saat steril suda bekletme	•1 dk % 70'lik etil alkol uygulaması •3 dk %0.1'lik HgCl ₂ uygulaması •3 adet steril suda durulama •3saat steril suda bekletme

3.2.2.3 Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumların kültüre alınması

Sterilizasyon işleminin ardından dormansinin kırılması amacıyla tohumlar çatlatılmıştır. Pens ile tutulan tohumlar bisturi yardımıyla kenarından çatlatılmıştır (Şekil 3.2). Tohumlar çok sert kabuklu olduğundan çatlatma esnasında dikkatli olunması gerekmektedir. Çatlatılan tohumlar, içinde MS besin ortam bulunan cam tüp kültür kaplarına aktarılmıştır. Cam tüpün kapağı açılarak ağzı alevden geçirilmiş, pens yardımıyla cam tüpün içine bir tohum bırakılarak ağzı ve kapağı tekrar alevden geçirilerek kapatılmıştır. Bu işlem tohumlar bitene kadar tek tek bütün tüplere uygulanmıştır. İşlem bitince kültüre alınan tohumlar kabinden çıkarılmıştır ve gerekli etiketlemeleri yapılarak kapakları streç filmle sarılmıştır. Kültürler, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C sıcaklıkta ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.2. Tohumların kültüre alınması a) Pens ve bisturi yardımıyla tohumun çatlatılması b) çatlatılan tohum c) Çatlatılan tohumların kültüre alınması d) Kültüre alınan tohum

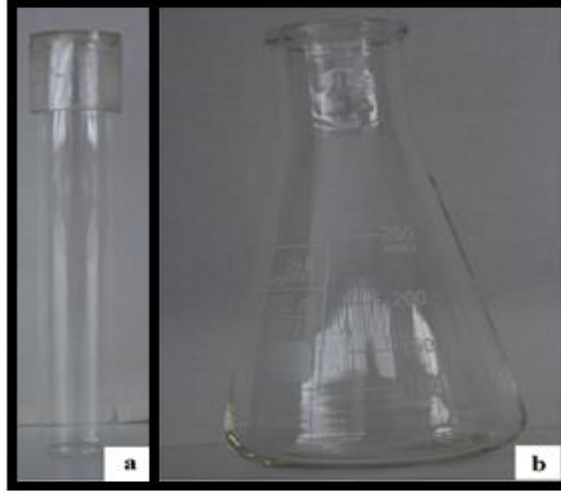
3.2.3 Çimlenme denemelerinin kurulması

3.2.3.1 Besin ortamı ve kültür kabının çimlenmeye etkisinin belirlenmesi

En uygun sterilizasyon uygulamasının belirlenmesinin ardından, en yüksek çimlenme yüzdesi veren besin ortamı ve kültür kabının belirlenebilmesi için farklı besin ortamları (Çizelge 3.5) ve kültür kapları (Şekil 3.3) kullanılarak çimlendirme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Kültürler 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C'de ve 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Her besin ortamı ve kültür kabı için tekerrür başına 7 tohum kültüre alınmıştır. Çimlenme denemelerinde, 12. günde çimlenme yüzdesi (%) ve besin ortamında kararma yüzdesi (%) parametreleri incelenmiştir.

Çizelge 3.5. Çimlenme denemeleri için kullanılan besin ortamları

Besin ortamı kodu	Temel besin ortamı	Sükroz miktarları (g/L)	Bitki büyüme düzenleyicileri mg/L	Kullanılan agar ve miktarı (g/L)
MS	MS	30 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
WPM	WPM	30 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
½ MS	MS	15 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
½ WPM	WPM	15g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
MS-A	MS	30 g/L sükroz	-	7 g/L Duchefa agar (Lot. no:B010856.10)
N ₆	N ₆	20 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite



Şekil 3.3. Çimlendirme denemesinde kullanılan farklı kültür kapları
a) 23/24*140 mm'lik cam tüp b) 250 mL'lik Erlenmeyer şişesi

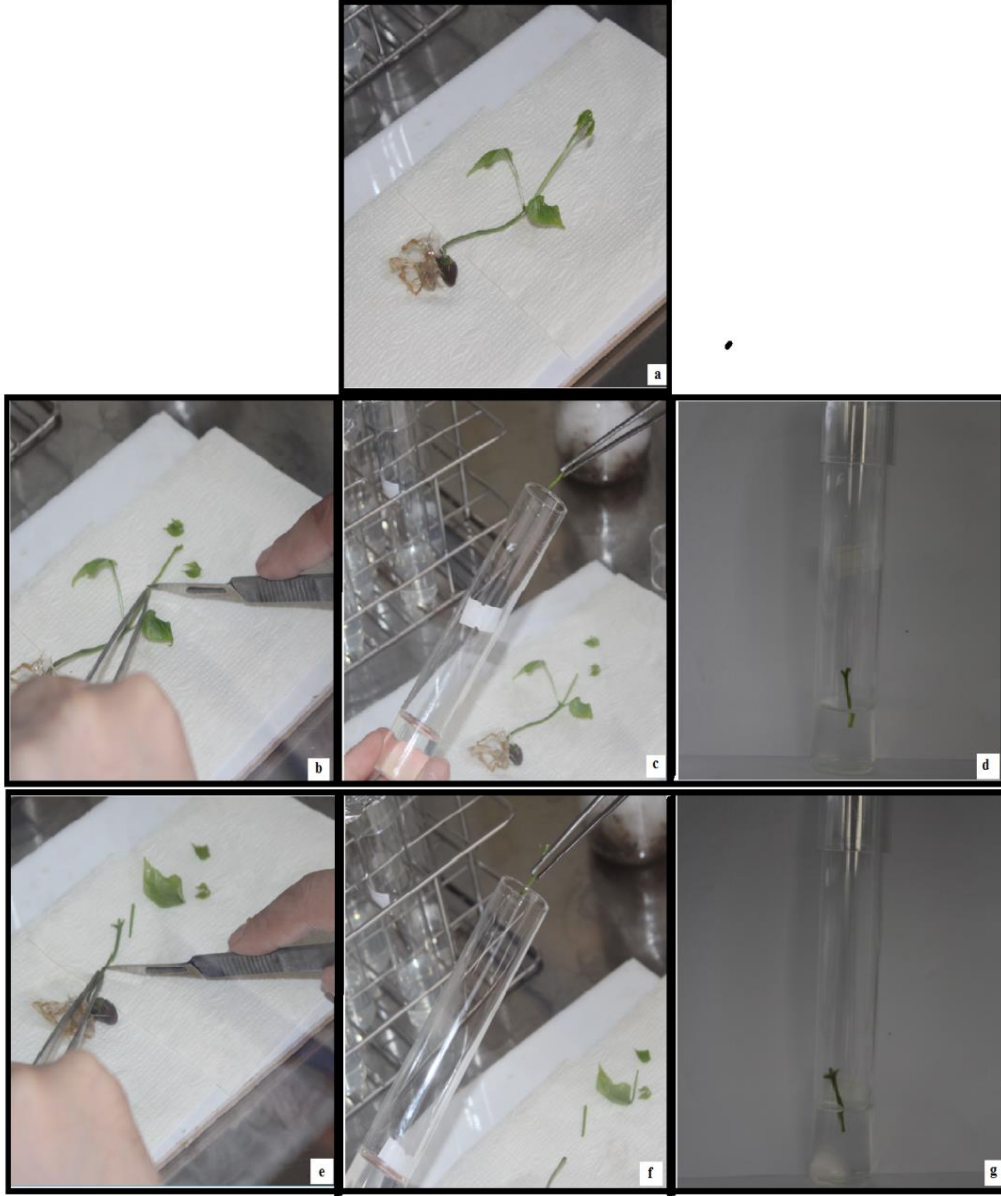
3.2.3.2 Tohum çimlenmesine ışığın etkisi

Steril edilmiş tohumlar WPM besin ortamlarında kültüre alındıktan sonra farklı ışık şiddetlerine maruz bırakılarak ışığın çimlenme üzerine etkisi incelenmiştir. Işığın çimlenme üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla; kültürler 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C'de, 3500 ve 4200 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Denemeler, 3 tekerrürlü olarak her tekerrürde 7 tohum olacak şekilde kurulmuştur.

3.2.4 Mikroçoğaltım denemeleri

3.2.4.1 Sürgün rejenerasyonu

Çimlenen bitkilerin bulunduğu kültür kaplarının kapakları açılmış ve peçete üzerinde bitkinin sürgün ucu ve nod kısımları pens ve bisturi yardımıyla kesilmiştir (Şekil 3.4). Sürgün ucu ve nod eksplantları; sürgün rejenerasyonu için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM, $\frac{1}{2}$ WPM ve N_6 temelli besin ortamları ve ayrıca bitki büyüme düzenleyicisi ilave edilmiş MS temelli besin ortamları (Çizelge 3.6) içeren cam kültür tüplerinde kültüre alınmışlardır.



Şekil 3.4. Çimlenen tohumlardan elde edilen sürgün ucu ve nod eksplantlarının kültüre alınması a) Çimlenen tohumun peçetenin üzerine çıkarılması b) Pens ve bisturi yardımıyla yaklaşık 2 cm uzunluğunda sürgün ucu eksplantının kesilmesi c) Kesilen sürgün ucu eksplantının kültüre alınması d) Kültüre alınan sürgün ucu eksplantı e) Pens ve bisturi yardımıyla yaklaşık 2 cm uzunluğunda nod eksplantının kesilmesi f) Kesilen nod eksplantının kültüre alınması g) Kültüre alınan nod eksplantı

Işık şiddeti ve jelleştirici ajanın sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla 5 farklı jelleştirici ajan kullanılarak katılaştırılmış N_6 temelli besin ortamlarında (Çizelge 3.6) sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alınmıştır. Kültürler 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C'de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ve 4200 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. 14. günde sürgün uzunluğu (cm), ortalama yaprak boyu (cm), hiperhidrisite yüzdesi (%) ve çoğaltım katsayısı parametreleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Sürgün rejenerasyonu için kullanılan besin ortamları

Besin ortamı kodu	Temel besin ortamı	Sükroz miktarları (g/L)	Bitki büyüme düzenleyicileri mg/L	Kullanılan agar ve miktarı (g/L)
MS	MS	30 g/L Sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
WPM	WPM	30 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
½ MS	MS	15 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
½ WPM	WPM	15g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
N ₆	N ₆	20 g/L sükroz	-	3 g/L Duchefa gelrite
N-21	N ₆	20 g/L sükroz	-	7g/L Duchefa agar (Lot. no:B010856.10)
N-22	N ₆	20 g/L sükroz	-	7 g/L Duchefa agar (Lot. no:01209.01)
N-25	N ₆	20 g/L sükroz	-	7 g/L Merck agar-agar
N-26	N ₆	20 g/L sükroz	+	7 g/L Fluka agar
HS1	MS	30 g/L sükroz	0,5 IBA+0,5 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
HS2	MS	30 g/L sükroz	0,5 IBA+1 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
HS3	MS	30 g/L sükroz	0,5 IBA+ 2 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
HS4	MS	30 g/L sükroz	1IBA+ 0,5 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
HS5	MS	30 g/L sükroz	1IBA+ 1 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
HS6	MS	30 g/L sükroz	1 IBA+ 2 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
BS1	MS	30 g/L sükroz	0,5 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
BS2	MS	30 g/L sükroz	1 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
BS3	MS	30 g/L sükroz	2 BAP	3 g/L Duchefa gelrite
BS4	MS	30 g/L sükroz	0,25 BAP	3 g/L Duchefa gelrite

3.2.4.2 Köklendirme

Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları 3500 ve 4200 lüks ışık şiddetlerine maruz bırakılarak elde edilen köklenme yüzdeleri ve kök uzunlukları incelenmiştir. Kültürler 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C'de ve 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Köklendirme denemelerinde 16. günde kök uzunluğu (cm) parametresi belirlenmiştir.

3.2.5 Aklimatizasyon denemeleri

In vitro koşullarda elde edilen 20 adet köklü bitkicik seçilerek aklimatize edilmiştir. Sürgünler dikkatli bir şekilde kültür kaplarından çıkarılmış ve kökler üzerindeki agarlı ortam kalıntıları su ile yıkanarak temizlenmiştir. Bu sürgünler, altları iğne ile delinmiş ve içerisinde torf bulunan 7 cm çapındaki küçük plastik bardaklara aktarıldıktan sonra can suyu verilerek, üzerleri delikli poşetlerle örtülmüştür. Bu şekilde sürgünler, 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyot, 3500 lüks ışık şiddeti ve 24 ± 2 °C sıcaklık koşullarında muhafaza edilmişlerdir.

Aklimatizasyon işleminden 3 gün sonra, günde bir defa olacak şekilde pet bardakların üzerlerine geçirilen şeffaf poşetler 5 dk boyunca açılmış ve bitkiler hafif sulanmıştır, aklimatizasyon başlangıcından 5 gün sonra şeffaf poşetler 10 dk boyunca açılmış ve bitkiler hafif sulanmıştır, aklimatizasyon başlangıcından itibaren 7 gün sonra şeffaf poşetler 30 dk. süreyle çıkarılarak tekrar bitkiler sulanmıştır. Yedinci gün sonunda bu poşetler tamamen çıkarılarak 13 gün boyunca sürgünler laboratuvar ortamında açık bir şekilde 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyot, 3500 lüks ışık şiddeti ve 24 ± 2 °C sıcaklık koşullarında muhafaza edilmişlerdir. Toplam 20 günün ardından aklimatize olan sürgünler içinde torf bulunan daha büyük saksılara aktarılmışlardır.

3.3 Verilerin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında yapılan *in vitro* uygulamalar tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Uygulamalardan elde edilen veriler, SPSS 16.0 istatistik programı (SPSS Inc., Chicago, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Sterilizasyon Denemeleri

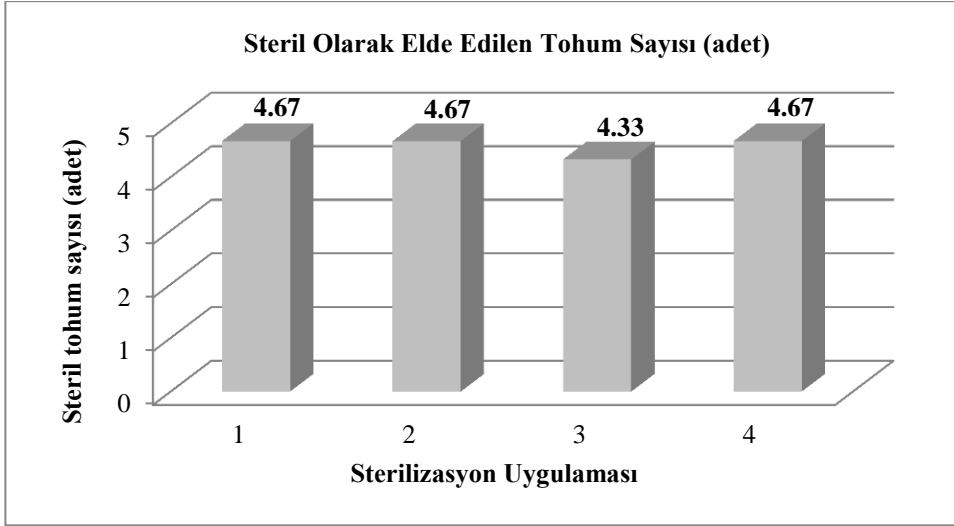
4.1.1 Sterilizasyon başarısı

Ticari bir firmadan temin edilen tohumlar, sterilizasyon prosedürünün belirlenmesi ve tohum dormansisinin kırılması amacıyla 4 farklı uygulama (Çizelge 3.4) ile steril edilmişlerdir. Yapılan sterilizasyon uygulamaları sonucunda, elde edilen steril tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%) Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir. Gözlemler, tohumlar kültüre alındıktan 9 gün sonra yapılmıştır. 1., 2. ve 4. uygulamada %93.33 oranında steril tohum elde edilirken; 3. uygulamada % 86.67 oranında steril tohum elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Sterilizasyon başarısı ile ilgili olarak yapılan varyans analiz sonucunda, farklı sterilizasyon uygulamaları arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır.

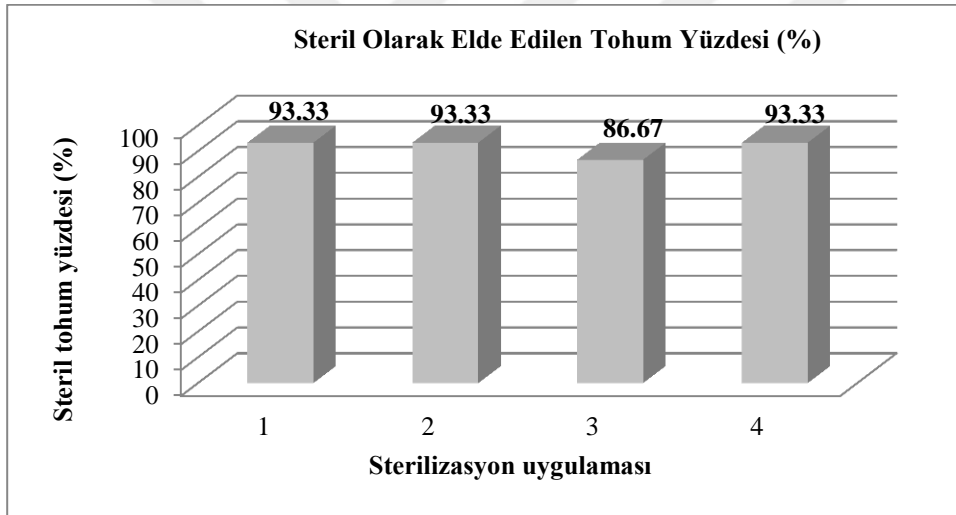
Çizelge 4.1. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarından elde edilen steril tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Sterilizasyon Uygulaması	Steril tohum sayısı (adet)				Steril tohum yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	5	5	4	4.67	100	100	80	93.33
2	4	5	5	4.67	80	100	100	93.33
3	5	5	3	4.33	100	100	60	86.67
4	4	5	5	4.67	80	100	100	93.33

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 5 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *Vigna caracalla* tohumlarına yapılan 4 farklı sterilizasyon uygulamasından elde edilen steril tohum sayısı (adet)



Şekil 4.2. *Vigna caracalla* tohumlarına yapılan 4 farklı sterilizasyon uygulamasından elde edilen steril tohum yüzdesi (%).

4.1.2 Sterilizasyon uygulamalarının çimlenmeye etkisi

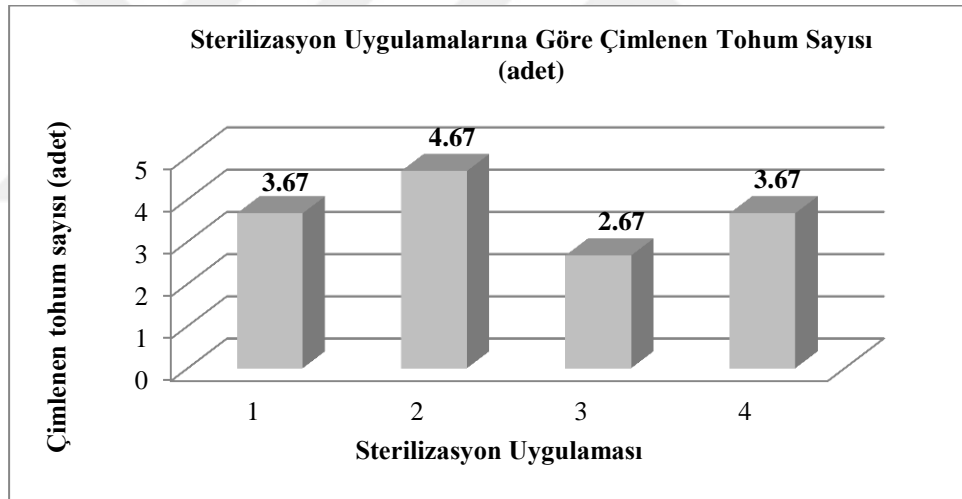
Tez çalışmasında 4 farklı uygulama (Çizelge 3.4) kullanılarak steril edilen tohumlar çatlatılarak MS besin ortamı içeren cam tüplerde kültüre alınmıştır. Tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamaları sonucunda çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%) Çizelge 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Çimlenme gözlemi, tohumlar kültüre alındıktan 12 gün sonra yapılmıştır. 2. uygulama ile steril edilen tohumlarda en yüksek çimlenme yüzdesi (%93.33) elde edilmiştir. En düşük çimlenme yüzdesi ise %53.3 oranında 3. uygulama

kullanılarak steril edilen tohumlarda belirlenmiştir. Sterilizasyon uygulamalarının çimlenmeye etkileri ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistiki farklılık bulunmamıştır.

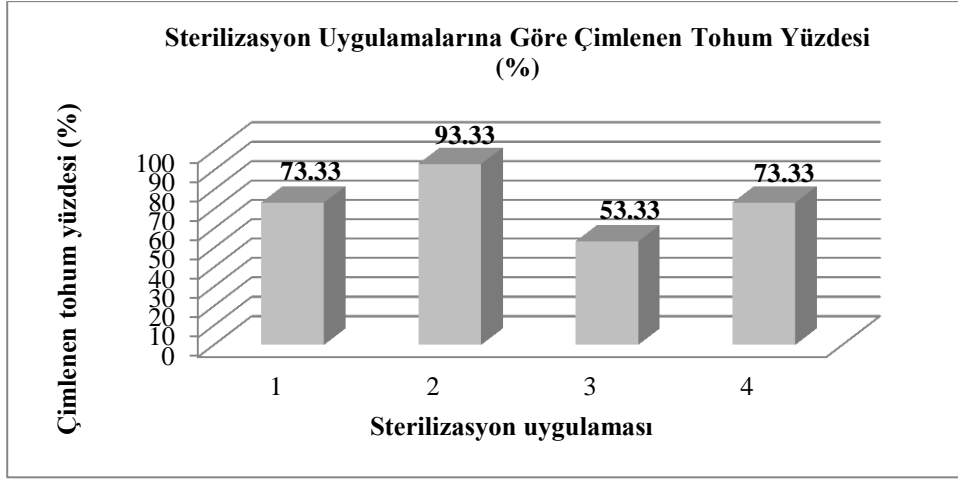
Çizelge 4.2. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarının çimlenmeye etkisi: çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Sterilizasyon uygulaması	Çimlenen tohum sayısı (adet)				Çimlenen tohum yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	3	4	4	3.67	60	80	80	73.33
2	5	4	5	4.67	100	80	100	93.33
3	4	2	2	2.67	80	40	40	53.33
4	3	3	5	3.67	60	60	100	73.33

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 5 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.3. *Vigna caracalla* tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre çimlenen tohum sayıları (adet)



Şekil 4.4. *Vigna caracalla* tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre çimlenen tohum yüzdeleri (%)

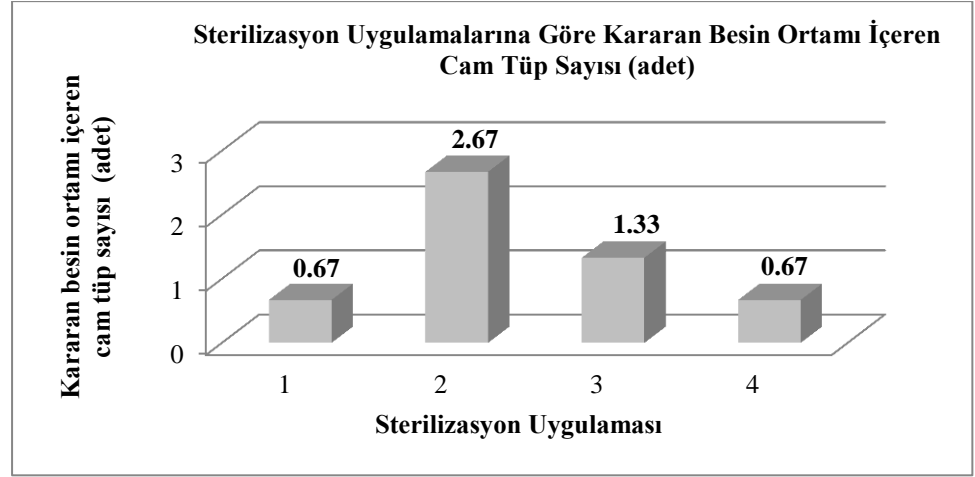
4.1.3 Sterilizasyon uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi

Vigna caracalla L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamaları sonucunda besin ortamları kararan cam tüp sayısı (adet) ve yüzdesi (%) Çizelge 4.3, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Besin ortamındaki kararma ile ilgili gözlemler tohumlar kültüre alındıktan 12 gün sonra gerçekleştirilmiştir. En düşük kararma yüzdesi 1. ve 4. uygulamalarda (%13.33) belirlenmiştir. En yüksek kararma yüzdesi ise 2. uygulamada (%53.33) saptanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda uygulanan sterilizasyon uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkileri açısından önemli bir istatistiksel farklılık bulunmamıştır.

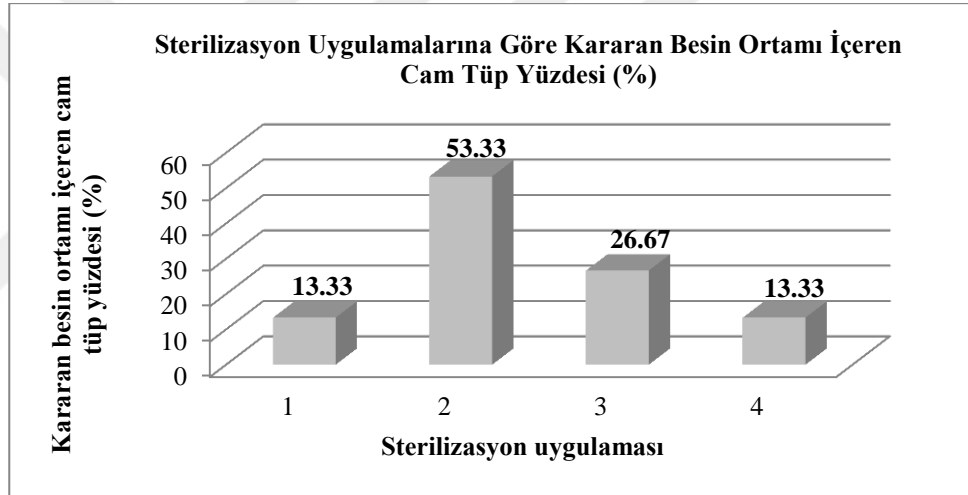
Çizelge 4.3. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi: kararan besin ortamı içeren cam tüp sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Sterilizasyon uygulaması	Kararan besin ortamı içeren cam tüp sayısı (adet)				Kararan besin ortamı içeren cam tüp yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
1	1	0	1	0.67	20	0	20	13.33
2	3	4	1	2.67	60	80	20	53.33
3	2	1	1	1.33	40	20	20	26.67
4	1	0	1	0.67	20	0	20	13.33

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 5 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.5. *Vigna caracalla* tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre kararan besin ortamı içeren cam tüp sayısı (adet)



Şekil 4.6. *Vigna caracalla* tohumlarına yapılan farklı sterilizasyon uygulamalarına göre kararan besin ortamı içeren cam tüp yüzdesi (%)

4.2 Çimlendirme Denemeleri

4.2.1 Kültür kabı tipi ve besin ortamının çimlenme üzerine etkisi

Steril tohumlar, 2 farklı kültür kabı (Şekil 3.3) ve 5 farklı besin ortamında (Çizelge 3.5) çatlatılarak kültüre alınmışlardır. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamaları sonucunda çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%) Çizelge 4.4, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Tohumların çimlenme gözlemleri kültüre alındıktan 12 gün sonra yapılmıştır. En yüksek çimlenme oranı (%95.24), N₆ besin ortamı içeren 250 mL’lik Erlenmeyer şişelerde kültüre alınan tohumlardan

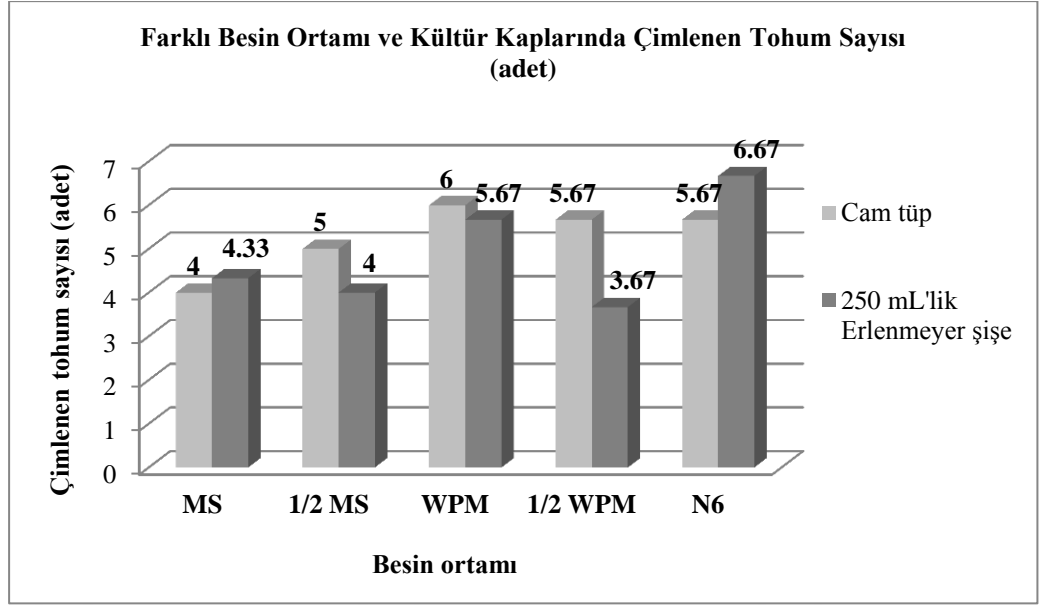
elde edilmiştir. En düşük çimlenme yüzdesi (52.38) ise ½ WPM besin ortamı içeren Erlenmeyer şişelerde kültüre alınan tohumlardan elde edilmiştir. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohumlar Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Erlenmeyer şişelerde çimlenen tohumlarda cam tüpte çimlenenlere göre daha büyük yaprak boyları gözlemlenmiştir.

Her iki kültür kabında ve farklı besin ortamlarında, tohumların minimum çimlenme süresi 3 gün, maksimum çimlenme süresi ise 30 gün olarak belirlenmiştir.

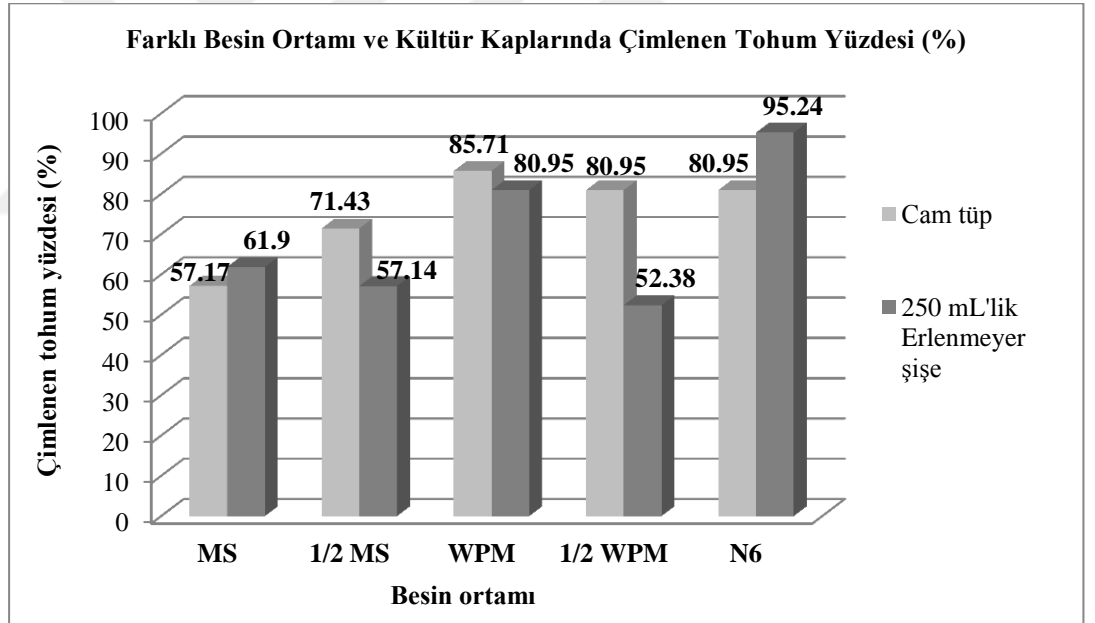
Çizelge 4.4. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumların çimlenme başarısı üzerine etkisi: çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Besin Ortamı	Kültür Kabı	Çimlenen tohum sayısı (adet)				Çimlenen tohum yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
MS	Cam Tüp	4	6	2	4	57,14	85,71	28,57	57.14
	Erlenmeyer şişe	4	3	6	4.33	57,14	42,86	85,71	61.9
1/2 MS	Cam Tüp	5	4	6	5	71,43	57,14	85,71	71.43
	Erlenmeyer şişe	5	2	5	4	71,43	28,57	71,43	57.14
WPM	Cam Tüp	6	5	7	6	85,71	71,43	100	85.71
	Erlenmeyer şişe	7	5	5	5.67	100	71,43	71,43	80.95
1/2 WPM	Cam Tüp	6	5	6	5.67	85,71	71,43	85,71	80.95
	Erlenmeyer şişe	2	3	6	3.67	28,57	42,86	85,71	52.38
N ₆	Cam Tüp	6	5	6	5.67	85,71	71,43	85,71	80.95
	Erlenmeyer şişe	6	7	7	6.67	85,71	100	100	95.24

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 tohum kullanılmıştır.



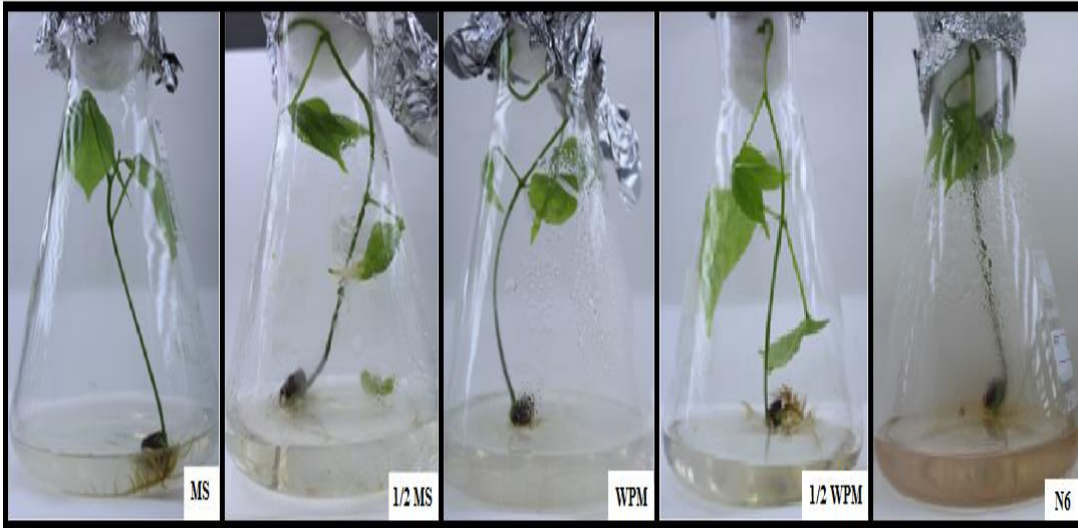
Şekil 4.7. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohum sayısı (adet)



Şekil 4.8. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohum yüzdesi (%)



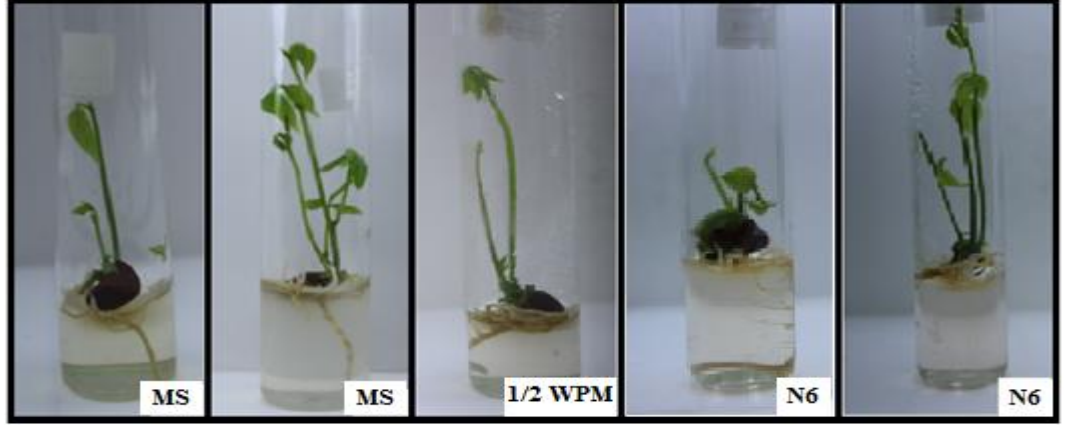
Şekil 4.9. Farklı besin ortamları içeren cam tüplerde çimlenen tohumlar



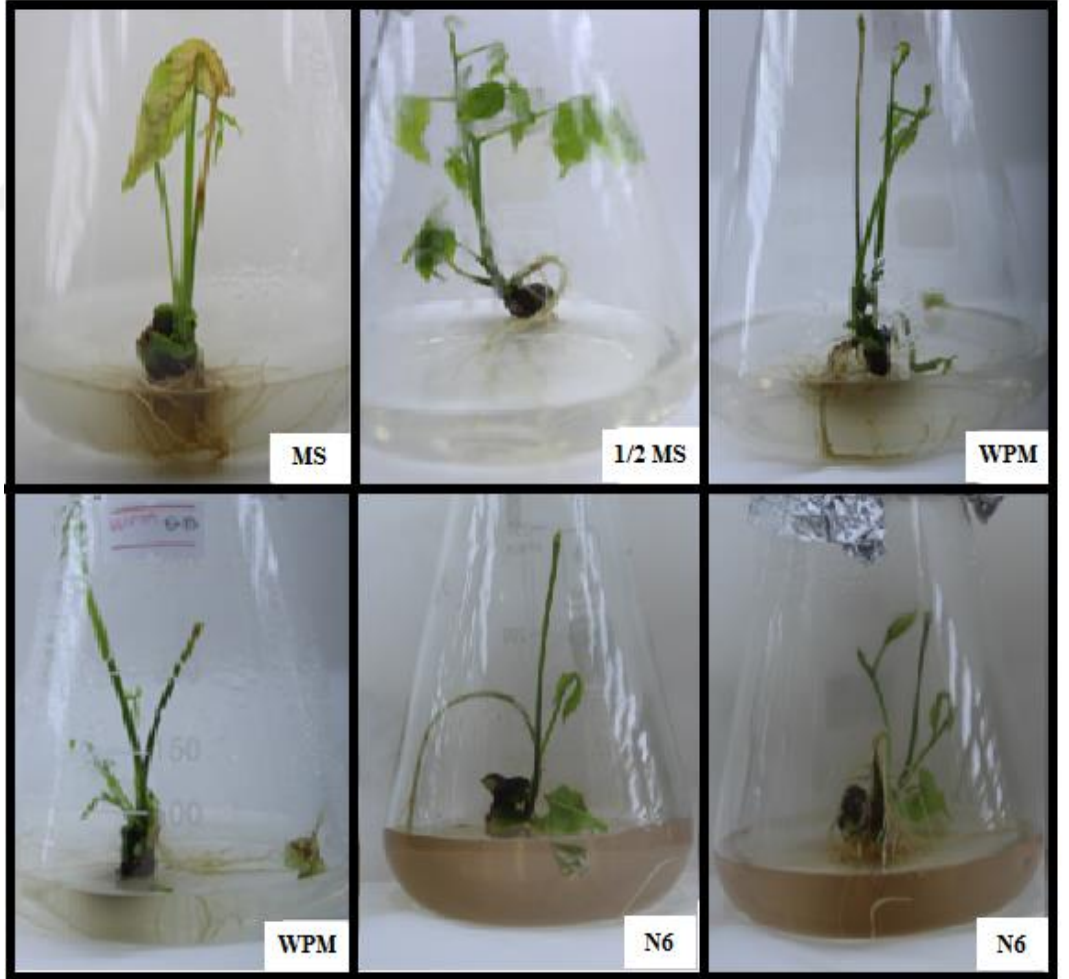
Şekil 4.10. Farklı besin ortamları içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlenen tohumlar

5 farklı besin ortamı ve 2 farklı kültür kabında çimlendirilen tohumlardan çoklu sürgün verenler Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının sonucunda 2'li ve 3'lü çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet) ve tohum yüzdesi (%) Çizelge 4.5, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Çimlenen tohumlardan gelişen çoklu sürgünlerin hepsi tohumun dip kısmından kardeş sürgün şeklinde gelişmiştir. Çoklu sürgün oluşumunda besin ortamı ve kültür kabı %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Duncan

çoklu karşılaştırma testine göre; en yüksek çoklu sürgün yüzdesinin (% 38.10) elde edildiği N₆ besin ortamı*250 mL'lik Erlenmeyer şişe kombinasyonu 1. grupta yer almıştır.



Şekil 4.11. Farklı besin ortamları içeren cam tüplerde çimlendirilen ve çoklu sürgün veren tohumlar

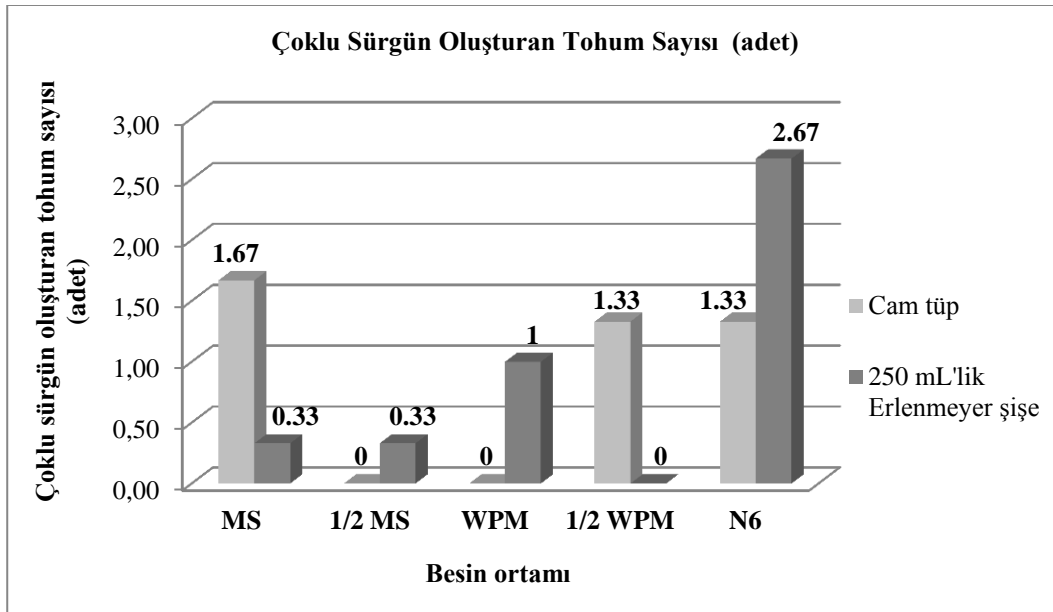


Şekil 4.12. Farklı besin ortamları içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen ve çoklu sürgün veren tohumlar

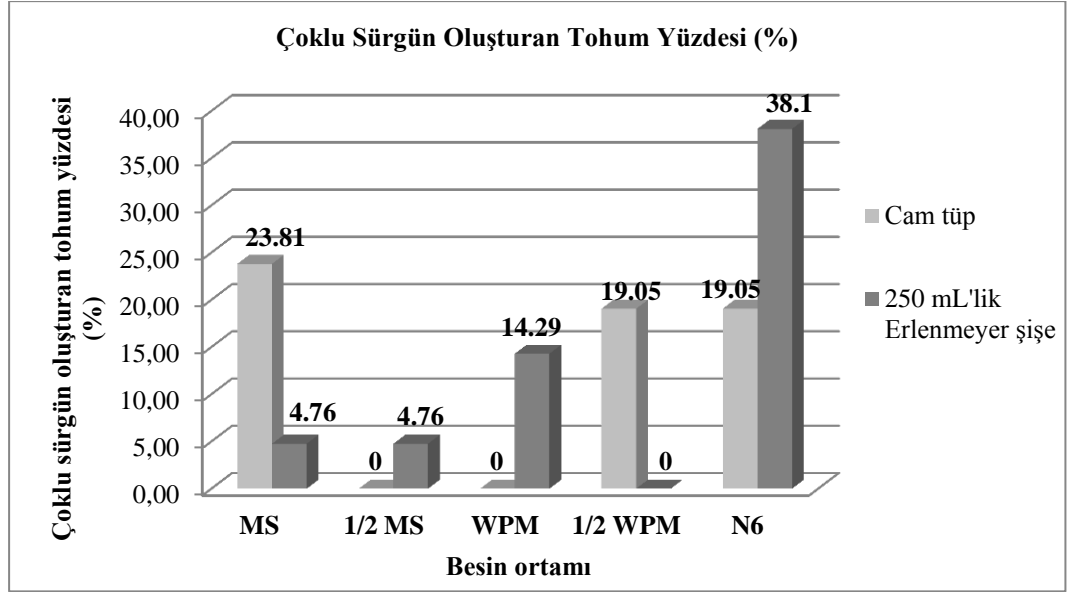
Çizelge 4.5. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumların çoklu sürgün oluşturma üzerine etkisi: Çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Besin Ortamı	Kültür Kabı	Çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet)				Çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
MS	Cam Tüp	2	2	1	1.67	28,57	28,57	14,29	23.81 ab
	Erlenmeyer şişe	1	0	0	0.33	14,29	0	0	4.76 bc
1/2 MS	Cam Tüp	0	0	0	0	0	0	0	0.00 c
	Erlenmeyer şişe	0	1	0	0.33	0	14,29	0	4.76 bc
WPM	Cam Tüp	0	0	0	0	0	0	0	0.00 c
	Erlenmeyer şişe	0	2	1	1	0	28,57	14,29	14.29 bc
1/2 WPM	Cam Tüp	1	3	0	1.33	14,29	42,86	0	19.05 abc
	Erlenmeyer şişe	0	0	0	0	0	0	0	0.00 c
N ₆	Cam Tüp	2	1	1	1.33	28,57	14,29	14,29	19.05 abc
	Erlenmeyer şişe	2	2	4	2.67	28,57	28,57	57,14	38.10 a

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 tohum kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.



Şekil 4.13. Farklı besin ortamı ve kültür kaplarında çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet)



Şekil 4.14. Farklı besin ortamı ve kültür kaplarında çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%)

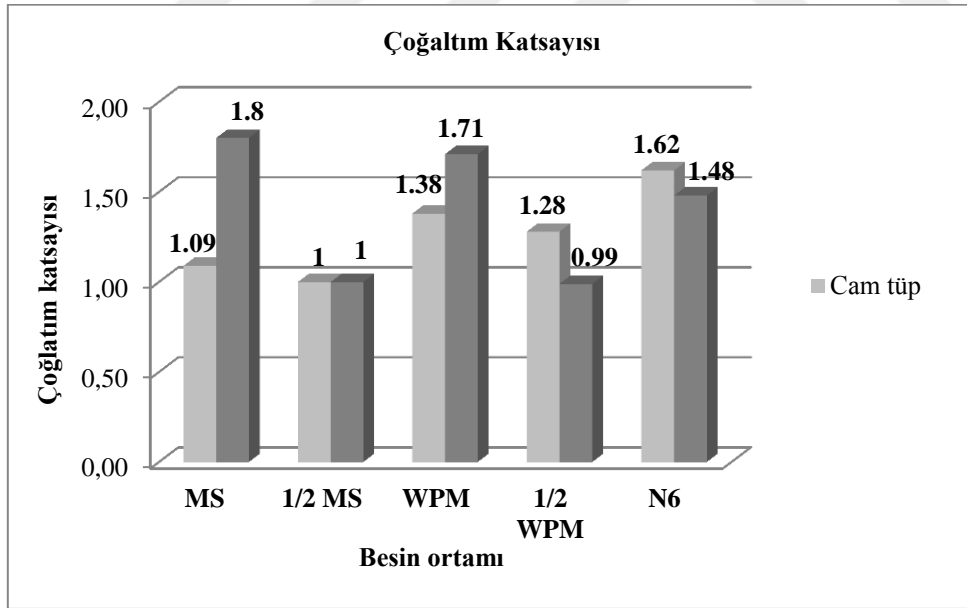
Çizelge 4.6. Farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumların çoklu sürgün oluşturma üzerine etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı-Kültür Kabı)	9	4380.762	486.751	3.975	0.005
Hata	20	2448.925	122.446		
Genel	29	6829.687			

Çimlenen tohumlardan elde edilen çoklu sürgünler dikkate alınarak bu materyallerden sağlanan sürgün ucu ve nod eksplantlarının toplamı üzerinden hesaplanan çoğaltım katsayıları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.15'de verilmiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.8), MS besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde elde edilmiştir. En düşük çoğaltım katsayısı (0.99) ise ½ WPM besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayıları

Besin Ortamı	Kültür Kabı	Çoğaltım katsayısı			
		T1	T2	T3	Ort.
MS	Cam tüp	1.14	1.71	0.43	1.09
	Erlenmeyer şişe	1.57	0.86	2	1.8
1/2 MS	Cam tüp	1	0.86	1.14	1
	Erlenmeyer şişe	1	0.86	1.14	1
WPM	Cam tüp	1.28	1	1.86	1.38
	Erlenmeyer şişe	1.71	1.71	1.71	1.71
1/2 WPM	Cam tüp	1.43	1.14	1.28	1.28
	Erlenmeyer şişe	0.57	0.71	1.71	0.99
N ₆	Cam tüp	1.43	1.57	1.86	1.62
	Erlenmeyer şişe	1	2	1.43	1.48



Şekil 4.15. Farklı besin ortamı ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayısı

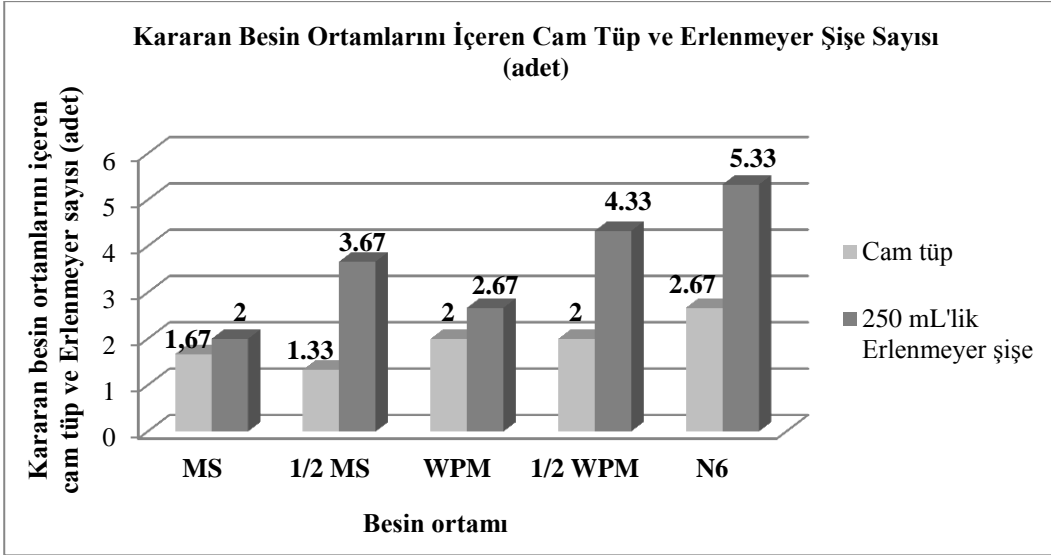
4.2.2 Kültür kabı tipi ve besin ortamının kararma üzerine etkisi

Vigna caracalla L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamaları sonucunda kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet) ve yüzdesi Çizelge 4.8, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’da verilmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre en fazla (%76.19) kararan besin ortamı yüzdesinin elde edildiği N₆ besin ortamını içeren 250 mL’lik Erlenmeyer şişedeki tohumlar 1. grupta yer almıştır. En düşük kararma yüzdesi (%19.05), ½ MS besin ortamı içeren cam tüplerde belirlenmiştir. Besin ortamında kararmada besin ortamı ve kültür kabı %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.9). Besin ortamlarının kararmasına sebep olan kültür kaplarındaki tohumlar Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

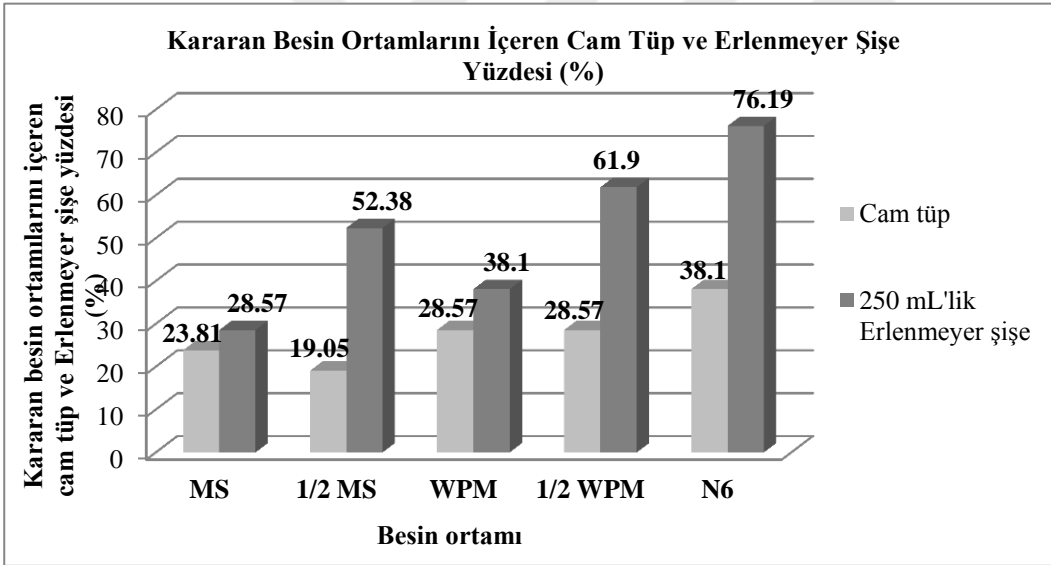
Çizelge 4.8. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi: kararan besin ortamı sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Besin Ortamı	Kültür Kabı	Kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet)				Kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
MS	Cam tüp	1	2	2	1.67	14.29	28.57	28.57	23.81 d
	Erlenmeyer şişe	1	3	2	2	14.29	42.86	28.57	28.57 cd
1/2 MS	Cam tüp	1	1	2	1.33	14.29	14.29	28.57	19.05 d
	Erlenmeyer şişe	5	3	3	3.67	71.43	42.86	42.86	52.38 bc
WPM	Cam tüp	2	2	2	2	28.57	28.57	28.57	28.57 cd
	Erlenmeyer şişe	3	1	4	2.67	42.86	14.29	57.14	38.10 bcd
1/2 WPM	Cam tüp	3	1	2	2	42.86	14.29	28.57	28.57 cd
	Erlenmeyer şişe	5	3	5	4.33	71.43	42.86	71.43	61.90 ab
N ₆	Cam tüp	3	2	3	2.67	42.86	28.57	42.86	38.10 bcd
	Erlenmeyer şişe	5	6	5	5.33	71.43	85.71	71.43	76.19 a

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.



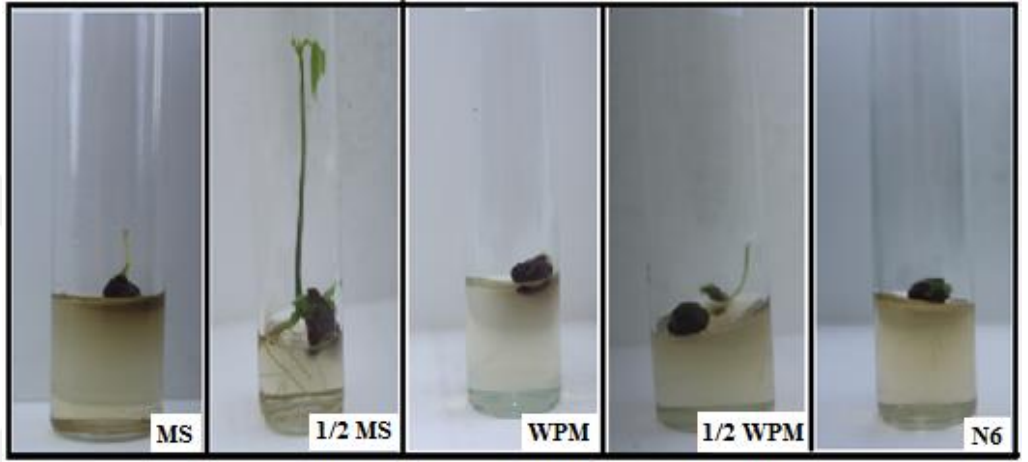
Şekil 4.16. Farklı besin ortamı ve kültür kabı uygulamaları sonucunda kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet)



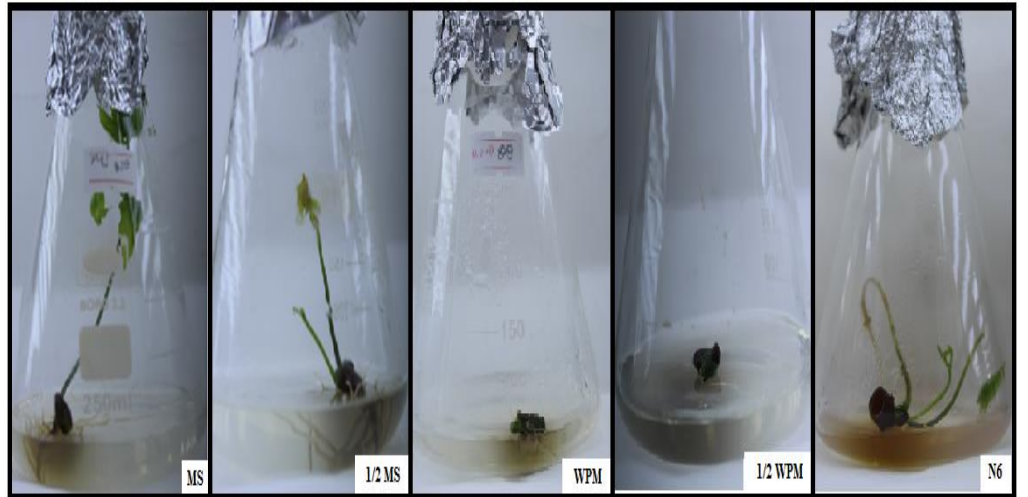
Şekil 4.17. Farklı besin ortamı ve kültür kabı uygulamaları sonucunda kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe yüzdesi (%)

Çizelge 4.9. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve besin ortamı uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı-Kültür Kabı)	9	9122.265	1013.585	5.961	0.005
Hata	20	3400.64	170.032		
Genel	29	12522.905			



Şekil 4.18. Farklı besin ortamları içeren cam tüplerde meydana gelen kararmalar



Şekil 4.19. Farklı besin ortamları içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde meydana gelen kararmalar

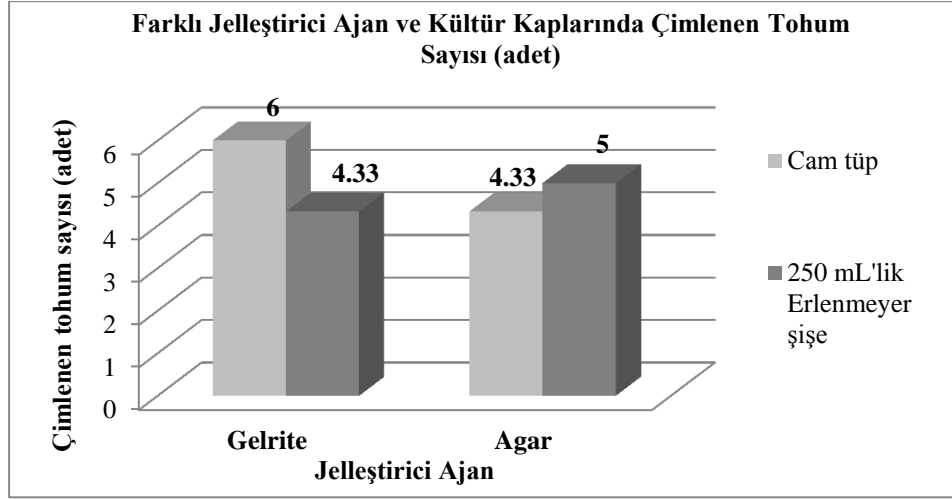
4.2.3 Jelleştirici ajan ve kültür kabının çimlenme üzerine etkisi

Jelleştirici ajan ve kültür kabının çimlenmeye etkisini belirleyebilmek amacıyla; steril tohumlar çatlatılarak gelrite (3 g/L) ve agar (7g/L) ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde kültüre alınmışlardır. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlenen tohum sayıları (adet) ve çimlenen tohum yüzdeleri (%) Çizelge 4.10, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi (%85,71), gelrite*cam tüp kombinasyonunda elde edilmiştir. Jelleştirici ajan ve kültür kabının çimlenme yüzdesi ile ilgili yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir farklılık bulunamamıştır. 2 farklı jelleştirici ajan ve 2 farklı kültür kabında çimlendirilen tohumlar Şekil 4.22'de verilmiştir.

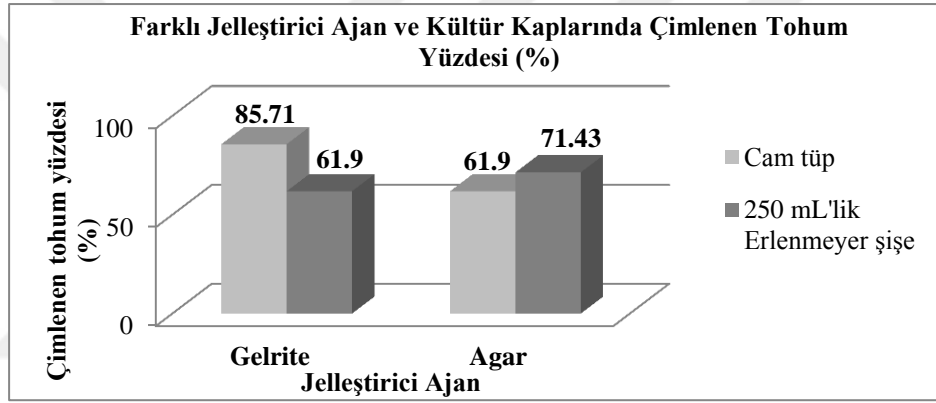
Çizelge 4.10. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumların çimlenme başarısı üzerine etkisi: çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Jelleştirici ajan tipi	Kültür Kabı	Çimlenen tohum sayısı (adet)				Çimlenen tohum yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Gelrite	Cam tüp	6	7	5	6	85,71	100	71,43	85,71
	Erlenmeyer şişe	4	4	5	4,33	57,14	57,14	71,43	61,9
Agar	Cam tüp	5	4	4	4,33	71,43	57,14	57,14	61,9
	Erlenmeyer şişe	4	5	6	5	57,14	71,43	85,71	71,43

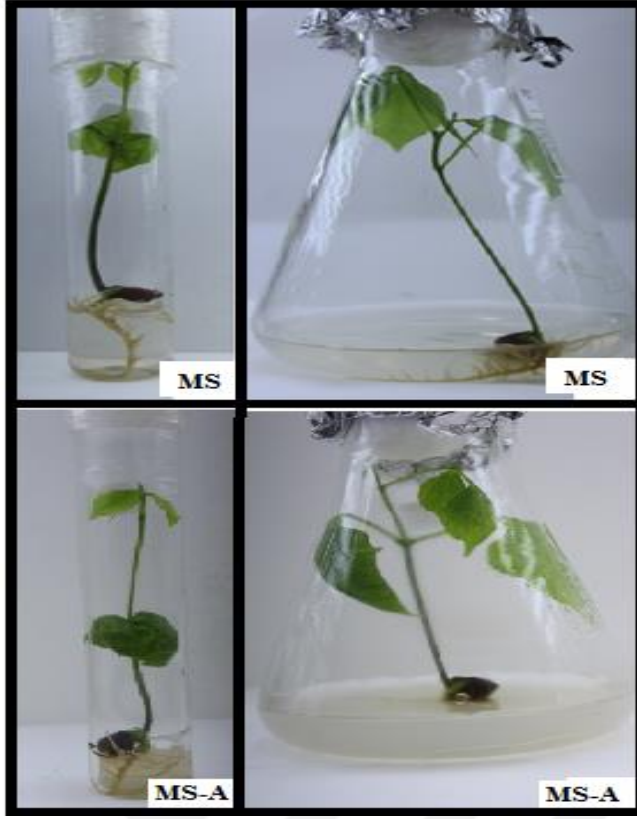
* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.20. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlenen tohum sayıları (adet)



Şekil 4.21. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlenen tohum yüzdeleri (%)



Şekil 4.22. Gelrite ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişede çimlendirilen tohumlar

Farklı jelleştirici ajanlar (gelrite ve agar) ile katılaştırılmış MS besin ortamları içeren cam tüplerde ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen tohumlardan çoklu sürgün verenler Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de gösterilmiştir. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamaları sonucunda çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%) Çizelge 4,11, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişelerde oluşan çoklu sürgünler ile agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde oluşan çoklu sürgünler tohumun dip kısmından kardeş sürgün şeklinde oluşmuşlardır. Agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren Erlenmeyer şişelerde oluşan çoklu sürgünlerin bir kısmı kardeş sürgün; bir kısmı tek bir sürgün uzadıktan sonra üst kısımdan ikinci bir sürgün oluşumu şeklinde meydana gelmiştir. En yüksek çoklu sürgün oluşum yüzdesi (%23.81) gelrite*cam tüp kombinasyonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.11). Ayrıca jelleştirici ajan kültür kabının çoklu sürgün oluşumu üzerine yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir farklılık bulunamamıştır.



Şekil 4.23. Agar ve gelrite ile katılaştırılmış besin ortamları içeren cam tüplerde çimlendirilen çoklu sürgün vermiş tohumlar

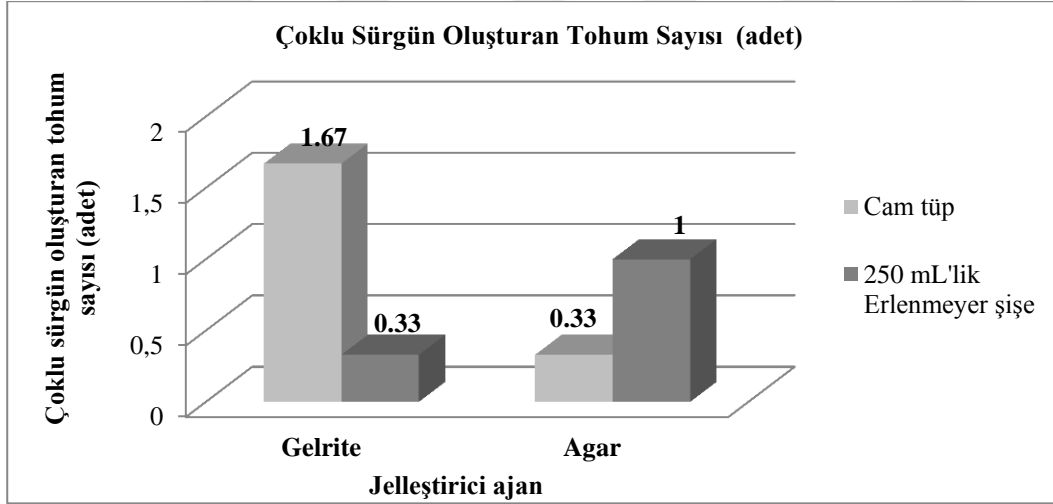


Şekil 4.24. Agar ve gelrite ile katılaştırılmış besin ortamları içeren Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen çoklu sürgün vermiş tohumlar

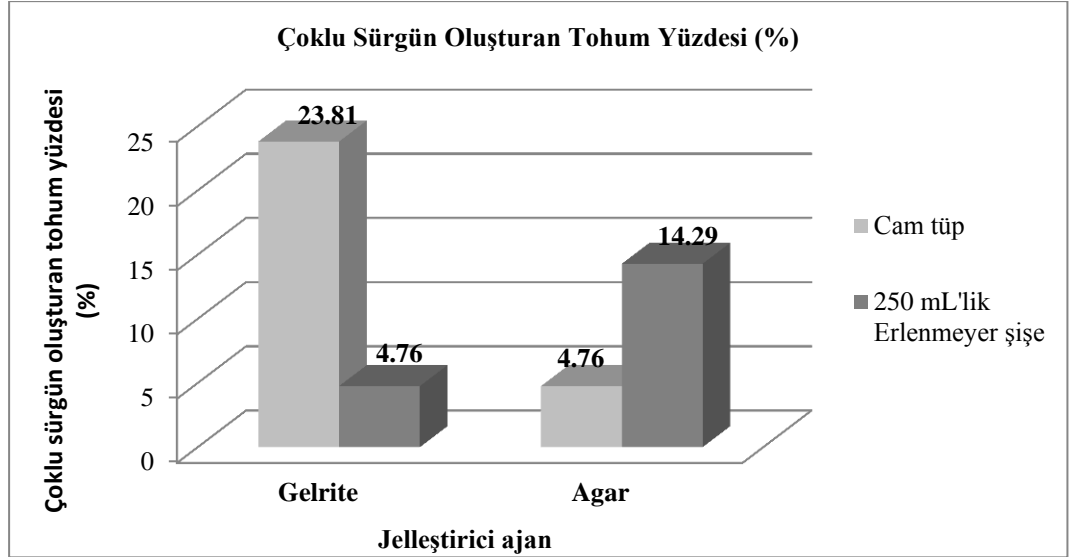
Çizelge 4.11. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının çoklu sürgün oluşumu üzerine etkisi: Çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Jelleştirici ajan tipi	Kültür Kabı	Çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet)				Çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Gelrite	Cam tüp	2	2	1	1.67	28.57	28.57	14.29	23.81
	Erlenmeyer şişe	1	0	0	0.33	14.29	0	0	4.76
Agar	Cam tüp	0	1	0	0.33	0	14.29	0	4.76
	Erlenmeyer şişe	0	1	2	1	0	14.29	28.57	14.29

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.25. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamaları sonucunda çoklu sürgün oluşturan tohum sayısı (adet)



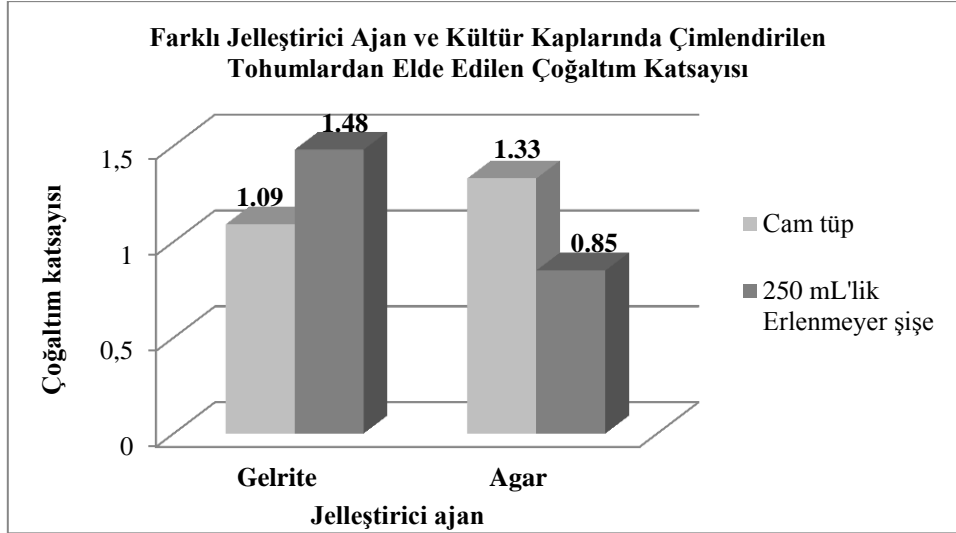
Şekil 4.26. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamaları sonucunda çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%)

Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen fidelere ait sürgün ucu ve nod eksplantlarının toplam sayısı üzerinden hesaplanan çoğaltım katsayıları Çizelge 4.12 ve Şekil 4.27’de verilmiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.48), gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren En düşük çoğaltım katsayısı (0.85), ise agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen tohumlarda elde edilmiştir. Jelleştirici ajan ve kültür kabının çoğaltım katsayısı ile ilgili yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir farklılık bulunamamıştır.

Çizelge 4.12. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayıları

Besin Ortamı	Kültür Kabı	Çoğaltım Katsayısı			
		T1	T2	T3	Ort.
Gelrite	Cam Tüp	1.14	1.71	0.43	1.09
	Erlenmeyer şişe	1.57	0.86	2	1.48
Agar	Cam Tüp	1.14	1	0.86	1.33
	Erlenmeyer şişe	0.57	0.71	1.28	0.85

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.27. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında çimlendirilen tohumlardan elde edilen çoğaltım katsayıları

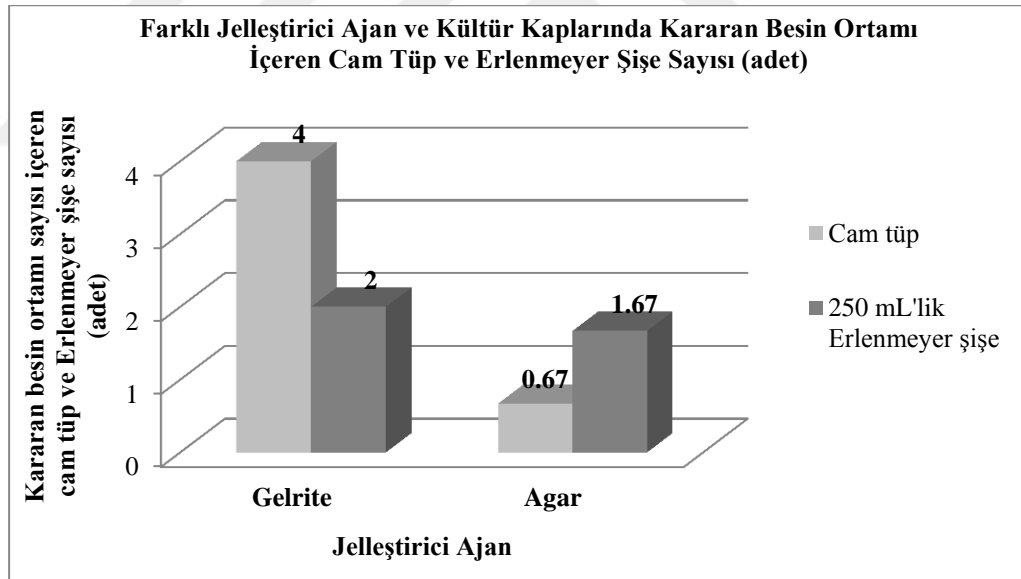
4.2.4 Jelleştirici ajan ve kültür kabının kararına üzerine etkisi

Kullanılan farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarına göre kararın besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayıları (adet) ve kararın besin ortamı yüzdeleri (%) Çizelge 4.13 Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'de verilmiştir. En yüksek kararın yüzdesi (%57.14), gelrite*cam tüp kombinasyonunda elde edilmiştir. Yapılan varyans analiz sonucuna göre jelleştirici ajan ve kültür kabı besin ortamındaki kararın üzerinde %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.14). Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kararın besin ortamı yüzdesinin en fazla (%57.14) olduğu gelrite*cam tüp kombinasyonu 1. grupta yer almıştır. Kararın bakımından en düşük değer ise agar*cam tüp kombinasyonunda %9.52 olarak belirlenmiştir. Cam tüp ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişede bulunan 2 farklı jelleştirici ajanla katılaştırılmış MS besin ortamlarındaki kararın Şekil 4.29'de gösterilmiştir.

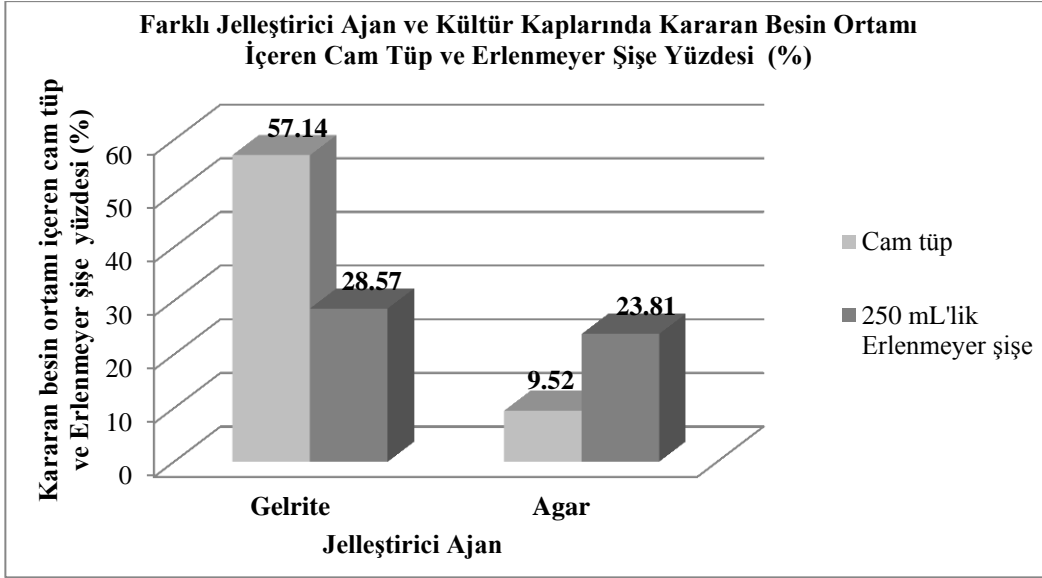
Çizelge 4.13. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi: kararar besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Jelleştirici ajan tipi	Kültür Kabı	Kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayısı (adet)				Kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Gelrite	Cam tüp	4	5	3	4	57,14	71,43	42,86	57.14 a
	Erlenmeyer şişe	1	4	1	2	14,29	57,14	14,29	28.57 ab
Agar	Cam tüp	0	0	2	0.67	0	0	28,57	9.52 b
	Erlenmeyer şişe	1	2	2	1.67	14,29	28,57	28,57	23.81 ab

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.



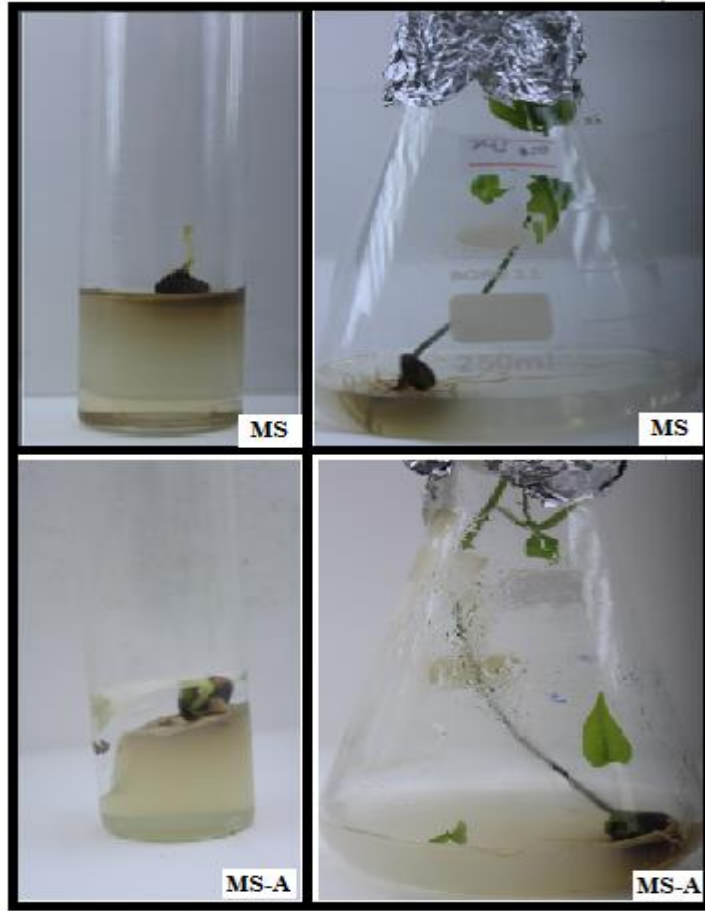
Şekil 4.28. Jelleştirici ajan ve kültür kaplarında kararar besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe sayıları (adet)



Şekil 4.29. Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarında kararan besin ortamı yüzdeleri (%)

Çizelge 4.14. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisine ait tohumlara yapılan farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamalarının besin ortamındaki kararmaya etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Jelleştirici Ajan-Kültür Kabı)	3	3588.541	1196.18	4.138	0.048
Hata	8	2312.313	289.039		
Genel	11	5900.854			



Şekil 4.30. Gelrite ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamlarında meydana gelen kararmalar

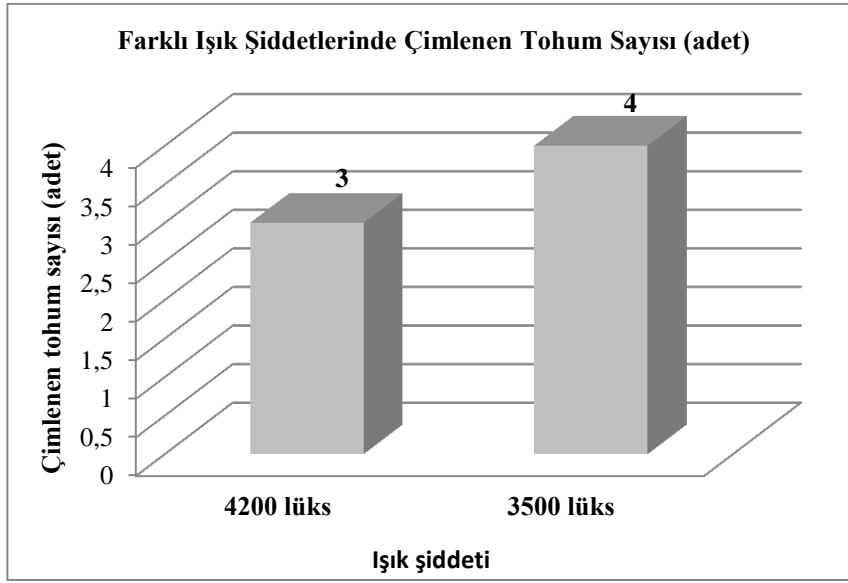
4.2.5 Işığın çimlenme yüzdesi üzerine etkisi

Steril tohumlar 2 farklı ışık şiddetine (3500 lüks ve 4200 lüks) maruz bırakılarak, ışık şiddetinin çimlenme yüzdesi üzerine etkisini incelemek amacıyla WPM besin ortamı içeren cam tüplerde çatlatılarak kültüre alınmışlardır. Farklı ışık şiddetlerinde çimlenen tohum sayıları (adet) ve çimlenen tohum yüzdeleri (%) Çizelge 4.15, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de verilmiştir. 3500 lüks ışık şiddetinde; 4200 lüks ışık şiddetine (%60) göre daha yüksek çimlenme yüzdesi (%80) elde edilmiştir. Işık şiddetinin çimlenme yüzdesi üzerine etkisi ile ilgili yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir farklılık bulunamamıştır.

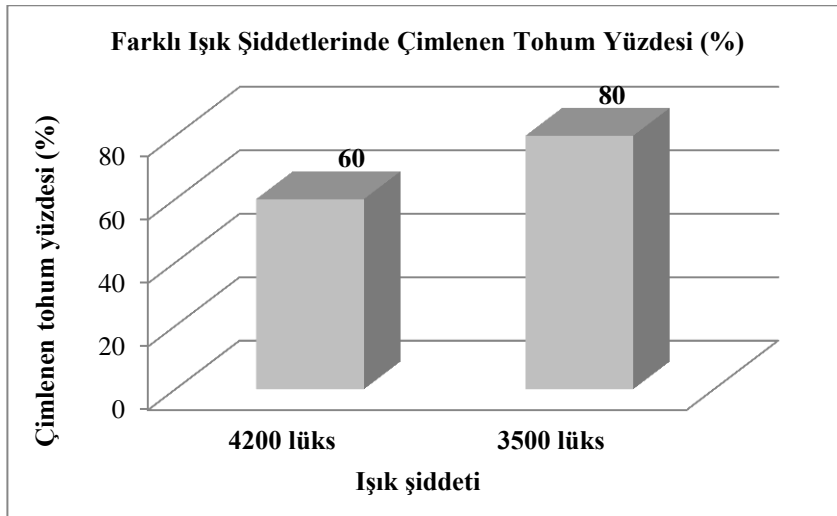
Çizelge 4.15. *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisinde ait farklı ışık şiddeti uygulamalarından elde edilen çimlenen tohum sayısı (adet) ve yüzdesi (%)*

Işık şiddeti (lüks)	Çimlenen tohum sayısı (adet)				Çimlenen tohum yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
4200	4	2	3	3	80	40	60	60
3500	3	4	5	4	60	80	100	80

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 5 tohum kullanılmıştır.



Şekil 4.31. Farklı ışık şiddetlerinde çimlenen tohum sayıları (adet)



Şekil 4.32. Farklı ışık şiddetlerinde çimlenen tohum yüzdeleri (%)

4.3 Sürgün Rejenerasyonu

4.3.1 Besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama sürgün uzunluğuna etkisi

Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlardan elde edilen fidelere ait sürgün ucu ve nod eksplantları sürgün rejenerasyonu için MS, WPM ve N₆ temelli besin ortamları (Çizelge 3.6) içeren cam tüplerde kültüre alınmışlardır. Denemelerde kullanılan besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama sürgün uzunluğu üzerine etkisi ile ilgili yapılan incelemeler Çizelge 4.16'da ifade edilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmede, besin ortamı ve eksplant tipinin sürgün uzunluğu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.17). Veriler incelendiğinde; en yüksek eksplant başına ortalama sürgün uzunluğu, sırasıyla sürgün ucu*WPM besin ortamı (4.52cm) ve ½ MS*sürgün ucu (4.36cm) kombinasyonlarında saptanmıştır ve bu kombinasyonlardan elde edilen sonuçlar birinci grupta yer almıştır. Eksplant başına elde edilen en düşük sürgün uzunluğu (1,24cm) ise N-25*sürgün ucu kombinasyonunda belirlenmiştir. (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.33). Kültüre alınan eksplantların 2 hafta sonundaki gelişimleri Şekil 4.34'de gösterilmiştir.

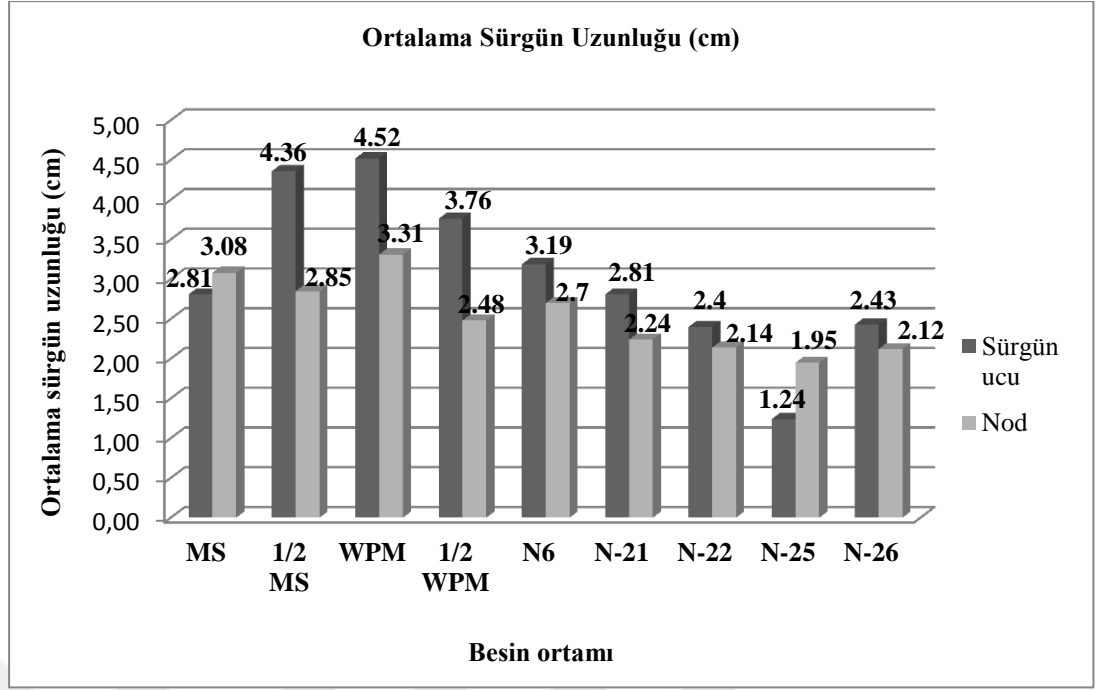
Çizelge 4.16. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu(cm) *

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm)			
		T1	T2	T3	Ort.
MS	Sürgün ucu	2.36	2.5	3.57	2.81 abc
	Nod	4.39	2.43	2.43	3.08 abc
½ MS	Sürgün ucu	5.29	4.5	3.29	4.36 a
	Nod	4.25	2.43	1.86	2.85 abc
WPM	Sürgün ucu	5.79	4.36	3.43	4.52 a
	Nod	4.57	2.57	2.79	3.31 ab
½ WPM	Sürgün ucu	5.36	3.07	2.86	3.76 ab
	Nod	2.57	2.43	2.43	2.48 bc
N ₆	Sürgün ucu	3.07	4.93	1.57	3.19 ab
	Nod	3.64	1.89	2.57	2.70 abc
N-21	Sürgün ucu	1.89	4.39	2.14	2.81 abc
	Nod	2.29	2.64	1.79	2.24 bc
N-22	Sürgün ucu	1.36	2.79	3.07	2.40 bc
	Nod	1.79	2.14	2.5	2.14 bc
N-25	Sürgün ucu	1.43	1.93	0.36	1.24 c
	Nod	2.5	1.64	1.71	1.95 bc
N-26	Sürgün ucu	3.11	2.04	2.14	2.43 bc
	Nod	1.86	2.21	2.29	2.12 bc

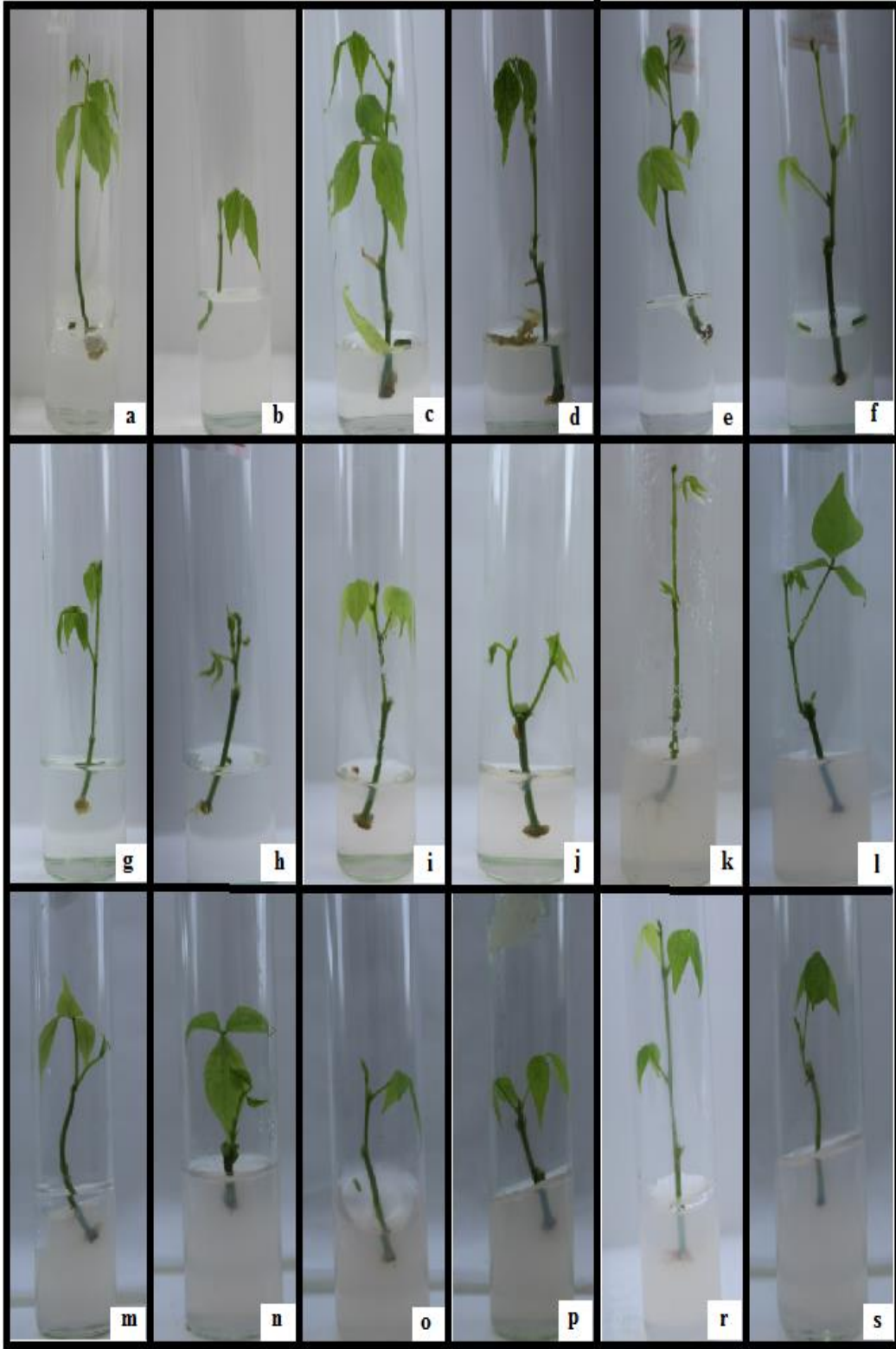
*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Çizelge 4.17. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı-Eksplant Tipi)	17	34.822	2.048	2.199	0.023
Hata	36	33.535	0.932		
Genel	53	68.356			



Şekil 4.33. Sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)



Şekil 4.34. 9 farklı besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarının 2 haftalık gelişimleri: a) MS besin ortamı-sürgün ucu b) MS besin ortamı-nod c) ½ MS besin ortamı-sürgün ucu d) ½ MS besin ortamı-nod e) WPM besin ortamı-sürgün ucu f) WPM besin ortamı-nod g) ½ WPM besin ortamı-sürgün ucu h) ½ WPM besin ortamı-nod i) N6 besin ortamı-sürgün ucu j) N6 besin ortamı-nod k) N-21 besin ortamı-sürgün ucu l) N-21 besin ortamı-nod m) N-22 besin ortamı-sürgün ucu n) N-22 besin ortamı-nod o) N-25 besin ortamı-sürgün ucu p) N-25 besin ortamı-nod r) N-26 besin ortamı-sürgün ucu s) N-26 besin ortamı-nod

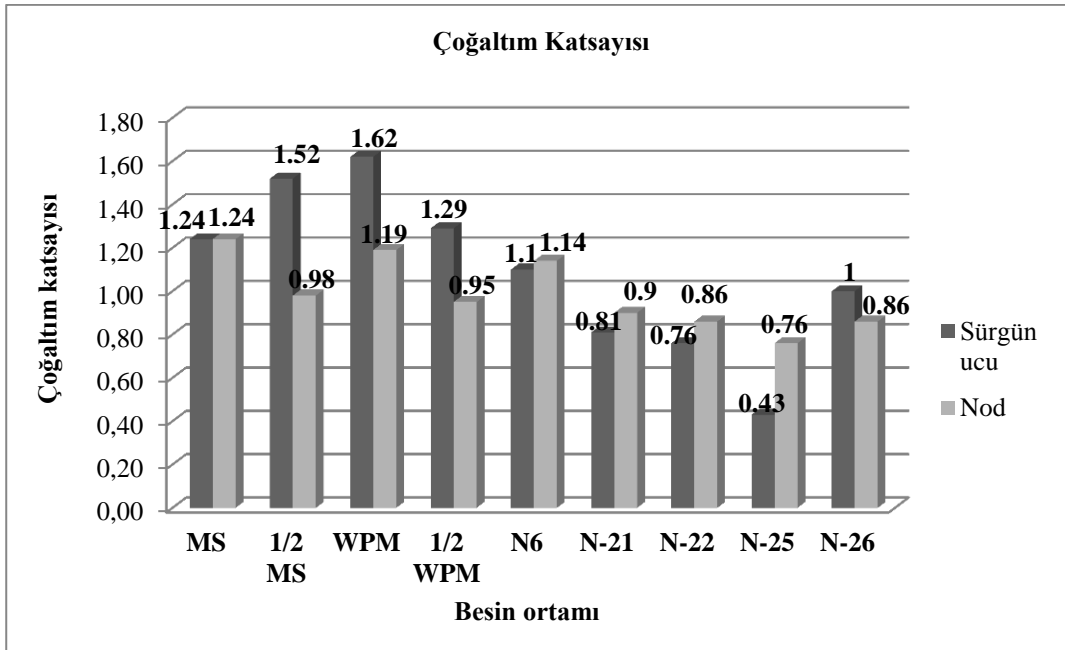
4.3.2 Besin ortamı ve eksplant tipinin çoğaltım katsayısına etkisi

Çalışmada 9 farklı besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen çoğaltım katsayıları Çizelge 4.18 ve Şekil 4.35’de gösterilmiştir. Kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarının 14 gün sonraki gözlemleri sonucunda; en yüksek çoğaltım katsayısı (1.62), WPM besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Besin ortamı ve eksplant tipinin çoğaltım katsayısı üzerine etkileri ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistiki farklılık bulunmamıştır. Nodlardan sürgünler genellikle tekli olarak gelişmekle birlikte, çok düşük oranda da bilateral sürdükları gözlenmiştir.

Çizelge 4.18. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Çoğaltım Katsayısı			
		T1	T2	T3	Ort.
MS	Sürgün	1.71	1	1	1.24
	Nod	1.86	1	0.86	1.24
½ MS	Sürgün	2.29	1.43	0.86	1.52
	Nod	1.5	0.86	0.57	0.98
WPM	Sürgün	2.29	1.43	1.14	1.62
	Nod	2	1	0.57	1.19
½ WPM	Sürgün	1.86	1.14	0.86	1.29
	Nod	1.14	0.86	0.86	0.95
N ₆	Sürgün	1	1.71	0.57	1.1
	Nod	1.29	1.14	1	1.14
N-21	Sürgün	0.71	1	0.71	0.81
	Nod	0.86	1.14	0.71	0.9
N-22	Sürgün	0.57	0.86	0.86	0.76
	Nod	0.86	0.86	0.86	0.86
N-25	Sürgün	0.57	0.57	0.14	0.43
	Nod	1	0.57	0.71	0.76
N-26	Sürgün	1.14	1	0.86	1
	Nod	0.71	1	0.86	0.86

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.



Şekil 4.35. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından, kültüre alındıktan 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları

4.3.3 Besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama yaprak boyuna etkisi

Denemelerde kullanılan besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama yaprak boyu üzerine etkisi ile ilgili yapılan incelemeler Çizelge 4.19’da ifade edilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmede, besin ortamı ve eksplant tipinin sürgün uzunluğu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.20). Veriler değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama yaprak boyu (0,80 cm) MS besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. En düşük ortalama yaprak boyu (0,05 cm) ise N-26 besin ortamında kültüre alınan nod eksplantlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.19 ve Şekil 4.36).

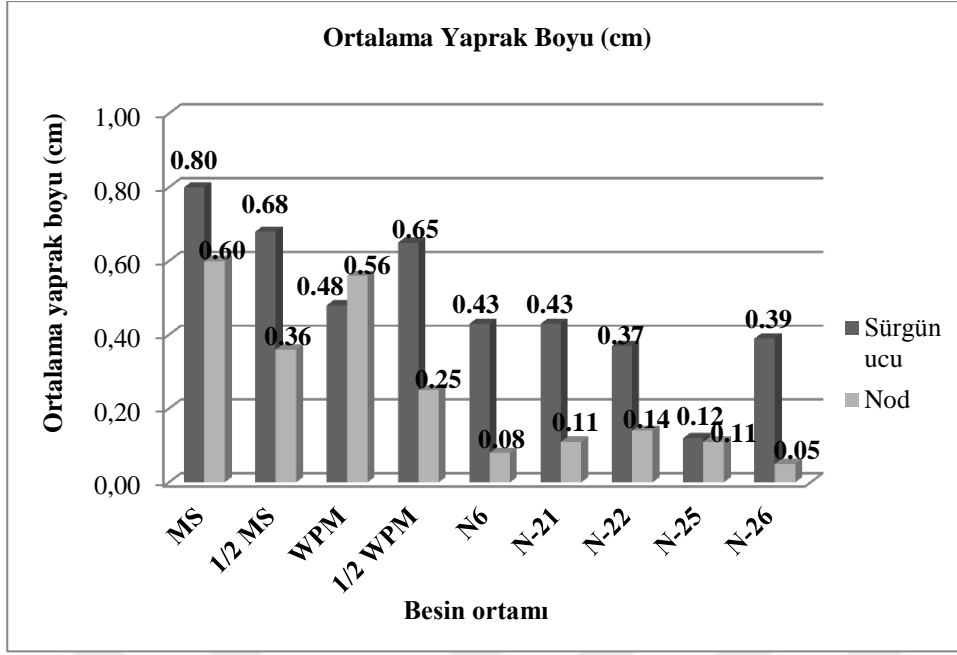
Çizelge 4.19. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alındıktan 14 gün sonra elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Ortalama Yaprak Boyu			
		T1	T2	T3	Ort.
MS	Sürgün ucu	1.39	0.75	0.25	0.80 a
	Nod	1.25	0.25	0.29	0.60 abcd
½ MS	Sürgün ucu	1.04	0.68	0.32	0.68 ab
	Nod	0.5	0.36	0.21	0.36 abcde
WPM	Sürgün ucu	0.64	0.43	0.36	0.48 abcde
	Nod	1.05	0.32	0.32	0.56 abcde
½ WPM	Sürgün ucu	1.04	0.46	0.46	0.65 abc
	Nod	0.25	0.11	0.39	0.25 bcde
N ₆	Sürgün ucu	0.36	0.79	0.14	0.43 abcde
	Nod	0.18	0	0.07	0.08 de
N-21	Sürgün ucu	0.32	0.29	0.68	0.43 abcde
	Nod	0.14	0.11	0.07	0.11 de
N-22	Sürgün ucu	0.29	0.39	0.43	0.37 abcde
	Nod	0.07	0.07	0.29	0.14 bcde
N-25	Sürgün ucu	0.04	0.32	0	0.12 cde
	Nod	0.18	0.07	0.07	0.11 de
N-26	Sürgün ucu	0.36	0.54	0.29	0.39 abcde
	Nod	0.07	0.04	0.04	0.05 e

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Çizelge 4.20. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyuna ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı-Eksplant Tipi)	17	2.754	0.162	2.133	0.028
Hata	36	2.734	0.076		
Genel	53	5.488			



Şekil 4.36. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyları (cm)

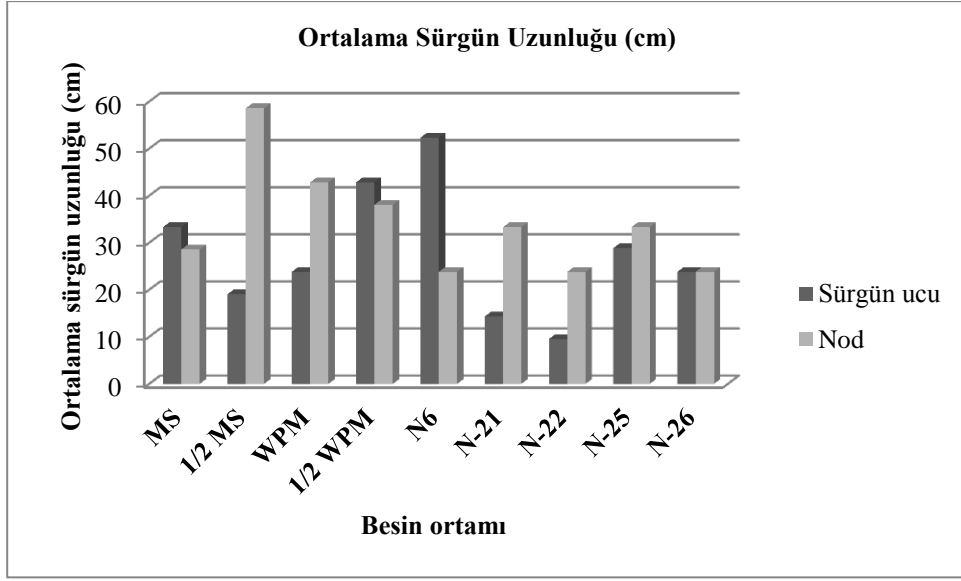
4.3.4 Besin ortamı ve eksplant tipinin hiperhidrisite yüzdesine etkisi

Farklı besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarında gözlemlenen hiperhidrisite yüzdesi Çizelge 4.21 ve Şekil 4.37'de gösterilmiştir. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%52.33), N₆ besin ortamı*sürgün ucu kombinasyonunda elde edilirken; en düşük hiperhidrisite yüzdesi ise %9.53 ile N-22 besin ortamı*sürgün ucu kombinasyonunda belirlenmiştir. Besin ortamı ve eksplant tipinin hiperhidrisite yüzdesi üzerine etkileri ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistiksel farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.21. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Hiperhidrisite Yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.
MS	Sürgün ucu	14.3	42.8	42.8	33.3
	Nod	14.3	42.8	28.6	28.57
½ MS	Sürgün ucu	0	14.3	42.8	19.03
	Nod	14.3	42.8	28.6	28.57
WPM	Sürgün ucu	28.6	42.8	0	23.8
	Nod	57.1	28.6	42.8	42.83
½ WPM	Sürgün ucu	42.8	28.6	57.1	42.83
	Nod	42.8	42.8	28.6	38.07
N ₆	Sürgün ucu	57.1	57.1	42.8	52.33
	Nod	42.8	0	28.6	23.8
N-21	Sürgün ucu	28.6	0	14.3	14.3
	Nod	42.8	14.3	42.8	33.3
N-22	Sürgün ucu	14.3	14.3	0	9.53
	Nod	0	28.6	42.8	23.8
N-25	Sürgün ucu	28.6	28.6	14.3	23.83
	Nod	42.8	28.6	28.6	33.33
N-26	Sürgün ucu	57.1	14.3	0	23.8
	Nod	28.6	28.6	14.3	23.83

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.



Şekil 4.37. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%)

4.3.5 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının ortalama sürgün uzunluğuna etkisi

Sürgün ucu ve nod eksplantları, sürgün rejenerasyonu için farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, BAP+IBA) içeren MS temelli besin ortamlarında (Çizelge 3.6) kültüre alınmışlardır. Denemelerde kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi ve eksplant tipinin ortalama sürgün uzunluğu üzerine etkisi ile ilgili kültüre alındıktan 2 hafta sonra yapılan incelemeler Çizelge 4.22’de ifade edilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda bitki büyüme düzenleyicisi ve eksplant tipinin sürgün uzunluğu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.23). Veriler değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (5.05 cm), HS4 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. En düşük ortalama sürgün uzunluğu (1,33 cm), HS6 besin ortamında kültüre alınan nod eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.38). Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından gelişen bitkicikler Şekil 4.39’ da verilmiştir.

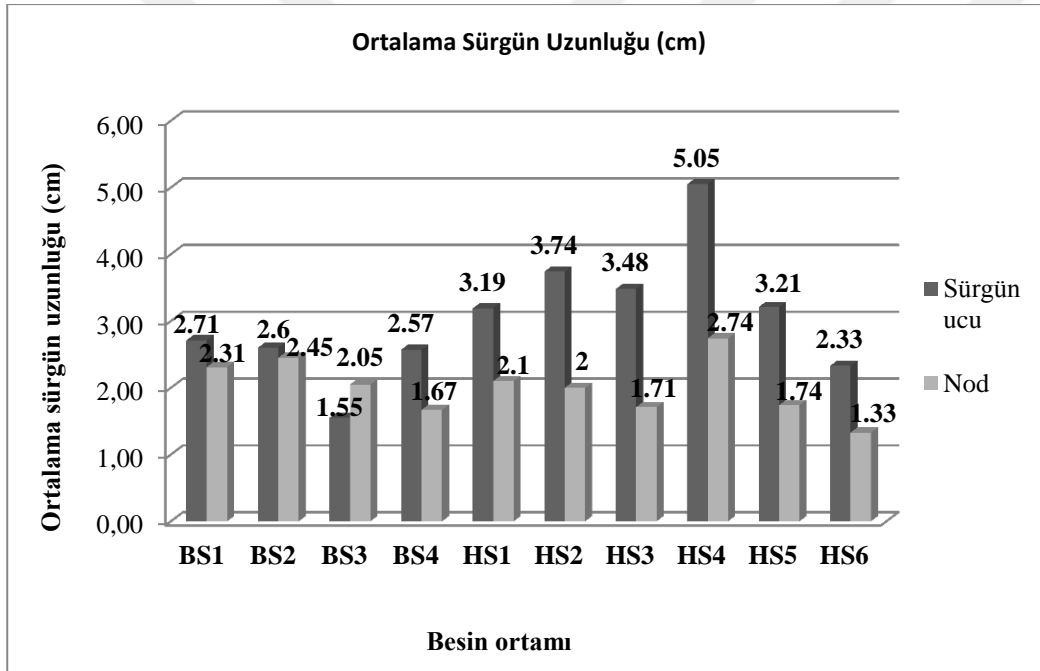
Çizelge 4.22. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Ortama Sürgün Uzunluğu (cm)			
		T1	T2	T3	Ort.
BS1	Sürgün ucu	3.86	1.93	2.36	2.71 bcd
	Nod	1.86	2.86	2.21	2.31 bcd
BS2	Sürgün ucu	4.14	2.07	1.57	2.60 bcd
	Nod	3	2	2.36	2.45 bcd
BS3	Sürgün ucu	1.29	1.79	1.57	1.55 cd
	Nod	2.86	1.5	1.79	2.05 bcd
BS4	Sürgün ucu	3.5	2.5	1.71	2.57 bcd
	Nod	1.57	1.79	1.64	1.67 cd
HS1	Sürgün ucu	4.36	2.36	2.86	3.19 bcd
	Nod	2.14	2.21	1.93	2.10 bcd
HS2	Sürgün ucu	4.86	3.71	2.64	3.74 ab
	Nod	1.64	2.21	2.14	2.00 bcd
HS3	Sürgün ucu	4.36	3.64	2.43	3.48 abc
	Nod	1.57	1.5	2.07	1.71 cd
HS4	Sürgün ucu	8.36	3.71	3.07	5.05 a
	Nod	4	2.14	2,07	2.74 bcd
HS5	Sürgün ucu	4.71	3	1.93	3.21 bcd
	Nod	1.93	1.86	1.43	1.74 cd
HS6	Sürgün ucu	2.93	2.29	1.79	2.33 bcd
	Nod	0.93	1.43	1.64	1.33 d

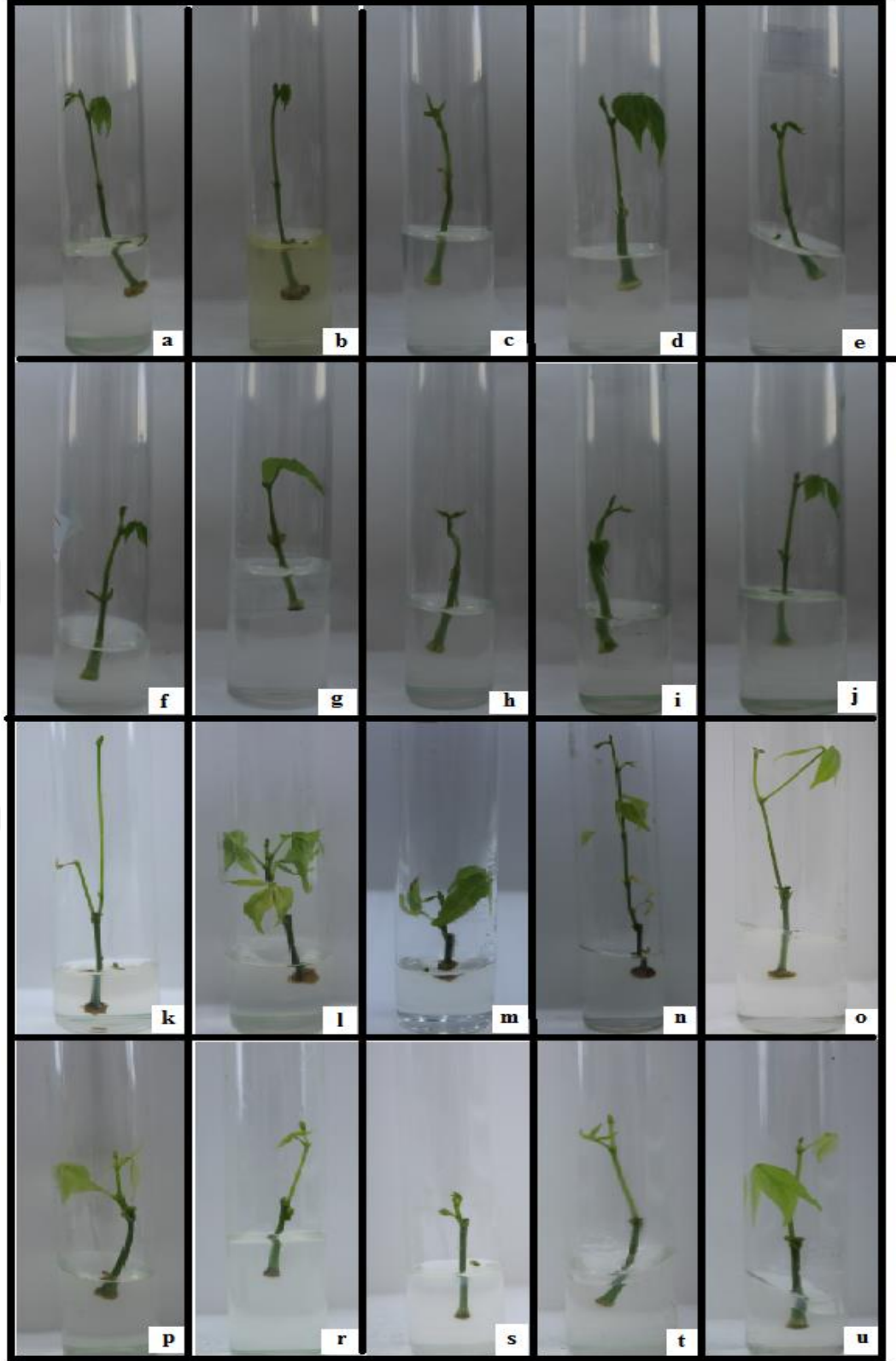
* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Çizelge 4.23. Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının ortalama sürgün uzunluğuna etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı-Eksplant Tipi)	19	44.705	2.353	2.317	0.013
Hata	40	40.611	1.015		
Genel	59	85.316			



Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)



Şekil 4.39. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlardan gelişen bitkicikler: a) HS1 besin ortamı-sürgün ucu b) HS2 besin ortamı-sürgün ucu c) HS3 besin ortamı sürgün ucu d) HS4 besin ortamı-sürgün ucu e) HS5 besin ortamı-sürgün ucu f) HS6 besin ortamı-sürgün ucu g) BS1 besin ortamı-sürgün ucu h) BS2 besin ortamı-sürgün ucu i) BS3 besin ortamı-sürgün ucu j)BS4 besin ortamı-sürgün ucu k) HS1 besin ortamı-nod l) HS2 besin ortamı-nod m) HS3 besin ortamı-nod n) HS4 besin ortamı-nod o) HS5 besin ortamı-nod p) HS6 besin ortamı-nod r) BS1 besin ortamı-nod s) BS2 besin ortamı-nod t) BS3 besin ortamı-nod u) BS4 besin ortamı-nod

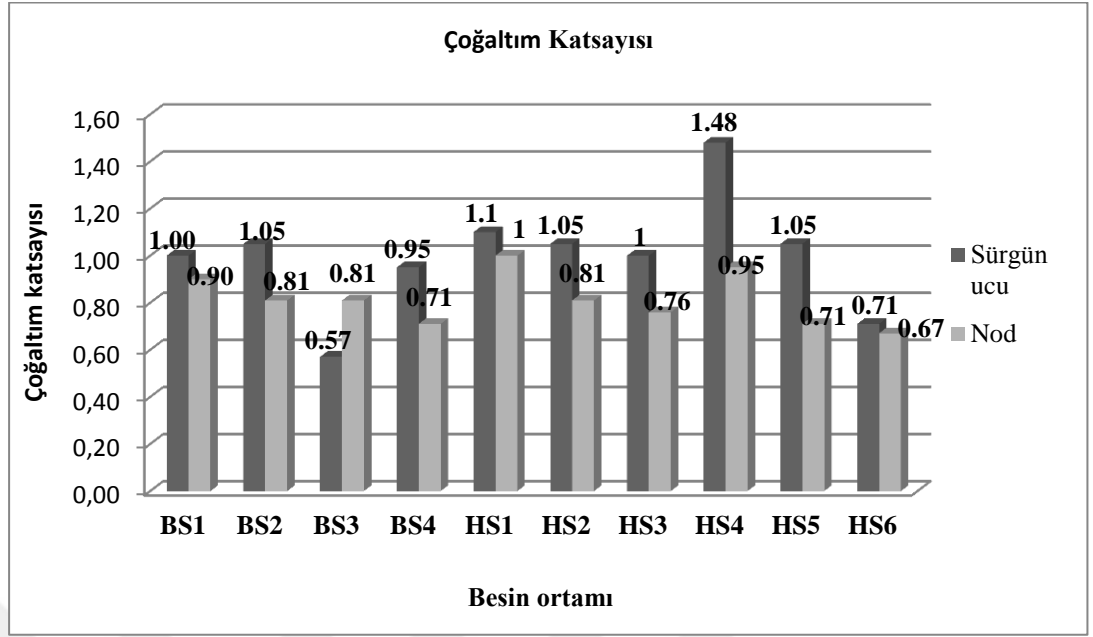
4.3.6 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının çoğaltım katsayısına etkisi

Denemelerde kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi ve eksplant tipinin çoğaltım katsayısı üzerine etkisi ile ilgili eksplantlar kültüre alındıktan 2 hafta sonra yapılan incelemeler Çizelge 4.24'de verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tipinin çoğaltım katsayısı üzerine etkileri ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistiki farklılık bulunmamıştır. En yüksek çoğaltım katsayısı (1,48), HS4 besin ortamı *sürgün ucu kombinasyonunda elde edilmiştir. En düşük çoğaltım katsayısı (0,57) ise BS3 besin ortamı*sürgün ucu kombinasyonunda belirlenmiştir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.40).

Çizelge 4.24. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen çoğaltım katsayıları

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Çoğaltım Katsayısı			
		T1	T2	T3	Ort.
BS1	Sürgün ucu	1	0.86	1.14	1
	Nod	0.86	1.14	0.71	0.9
BS2	Sürgün ucu	1.57	0.86	0.71	1.05
	Nod	0.86	0.86	0.71	0.81
BS3	Sürgün ucu	0.43	0.71	0.57	0.57
	Nod	1.14	0.71	0.57	0.81
BS4	Sürgün ucu	1.29	0.86	0.71	0.95
	Nod	0.71	0.71	0.71	0.71
HS1	Sürgün ucu	1.57	0.71	1	1.1
	Nod	1.43	0.86	0.71	1
HS2	Sürgün ucu	1.43	1	0.71	1.05
	Nod	0.71	0.86	0.86	0.81
HS3	Sürgün ucu	1.29	1	0.71	1
	Nod	0.71	0.71	0.86	0.76
HS4	Sürgün ucu	2.43	1	1	1.48
	Nod	1.29	0.71	0.86	0.95
HS5	Sürgün ucu	1.43	1	0.71	1.05
	Nod	0.86	0.71	0.57	0.71
HS6	Sürgün ucu	0.71	0.86	0.57	0.71
	Nod	0.43	0.86	0.71	0.67

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.



Şekil 4.40. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları

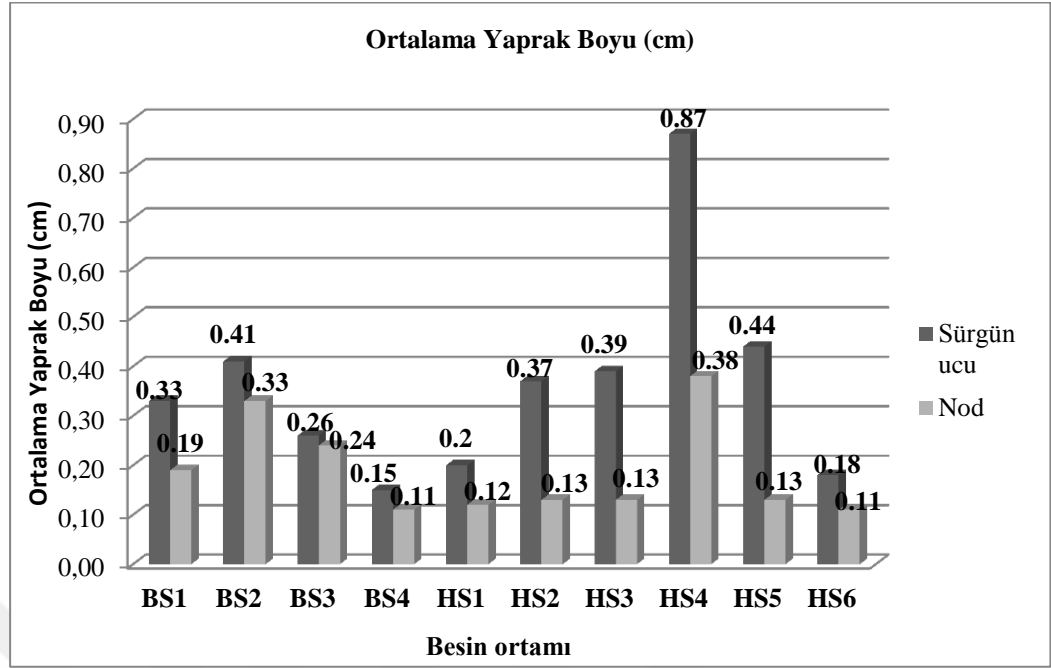
4.3.7 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının ortalama yaprak boyuna etkisi

Denemelerde kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi ve eksplant tipinin ortalama yaprak boyu üzerine etkisi ile ilgili eksplantlar kültüre alındıktan 2 hafta sonra yapılan incelemeler Çizelge 4.25’de verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tipinin ortalama yaprak boyuna etkileri ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistiki farklılık bulunmamıştır. En yüksek ortalama yaprak boyu (0,87 cm), HS4 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir. En düşük ortalama yaprak boyu (0,11cm) ise BS4 ve HS6 besin ortamlarında kültüre alınan nod eksplantlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.25 ve Şekil 4.41).

Çizelge 4.25. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Ortalama Yaprak Boyu (cm)			
		T1	T2	T3	Ort.
BS1	Sürgün ucu	0.45	0.21	0.32	0.33
	Nod	0.07	0.36	0.14	0.19
BS2	Sürgün ucu	0.42	0.75	0.07	0.41
	Nod	0.64	0.07	0.29	0.33
BS3	Sürgün ucu	0.18	0.43	0.18	0.26
	Nod	0.5	0.07	0.14	0.24
BS4	Sürgün ucu	0.18	0.21	0.07	0.15
	Nod	0.04	0.11	0.18	0.11
HS1	Sürgün ucu	0.25	0.14	0.21	0.2
	Nod	0.11	0.11	0.14	0.12
HS2	Sürgün ucu	0.64	0.21	0.25	0.37
	Nod	0.11	0.14	0.14	0.13
HS3	Sürgün ucu	0.74	0.21	0.21	0.39
	Nod	0.18	0.04	0.18	0.13
HS4	Sürgün ucu	1.71	0.46	0.43	0.87
	Nod	0.68	0.31	0.14	0.38
HS5	Sürgün ucu	0.61	0.46	0.25	0.44
	Nod	0.07	0.21	0.11	0.13
HS6	Sürgün ucu	0.25	0.29	0	0.18
	Nod	0.04	0.29	0	0.11

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.



Şekil 4.41. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)

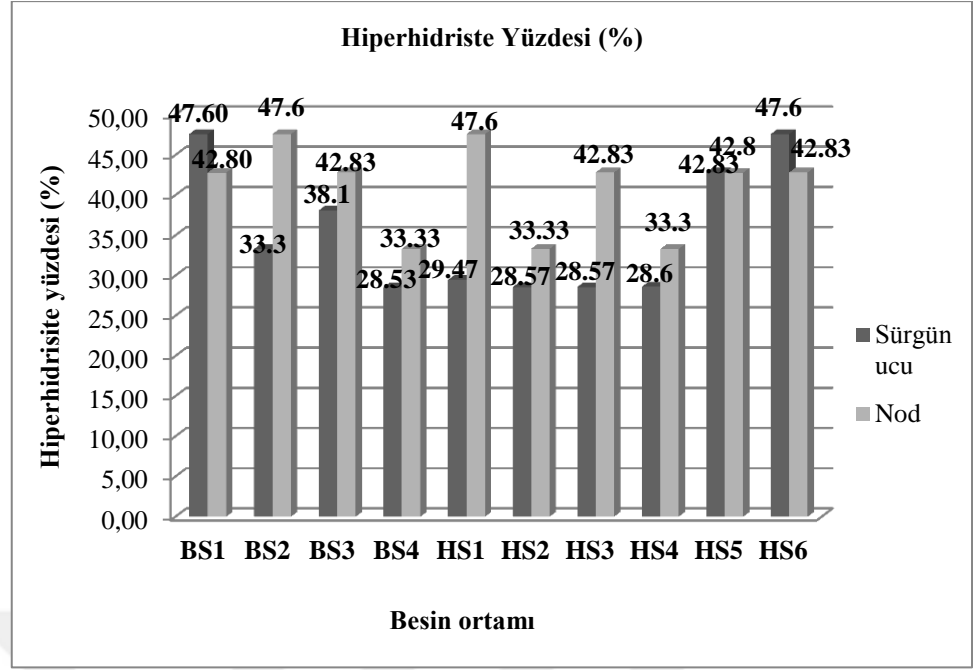
4.3.8 Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarının hiperhidrisiteye etkisi

Çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, BAP+IBA) içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarında gözlemlenen hiperhidrisite yüzdeleri Çizelge 4.26'da verilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tipinin hiperhidrisite yüzdesine etkisi ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistik farklılık bulunmamıştır. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi %47.60 olarak; BS1*sürgün ucu, BS2*nod, HS1*nod, HS6*sürgün ucu kombinasyonlarında belirlenmiştir. En düşük hiperhidrisite yüzdesi (%28,53), BS4*sürgün ucu kombinasyonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.42).

Çizelge 4.26. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen hiperhidrisite yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Eksplant Tipi	Hiperhidrisite yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.
BS1	Sürgün ucu	57.1	28.6	57.1	47.6
	Nod	42.8	42.8	42.8	42.8
BS2	Sürgün ucu	42.8	42.8	14.3	33.3
	Nod	71.4	28.6	42.8	47.6
BS3	Sürgün ucu	57.1	28.6	28.6	38.1
	Nod	71.4	14.3	42.8	42.83
BS4	Sürgün ucu	42.8	28.5	14.3	28.53
	Nod	42.8	28.6	28.6	33.33
HS1	Sürgün ucu	42.8	2.8	42.8	29.47
	Nod	57.1	28.6	57.1	47.6
HS2	Sürgün ucu	28.6	42.8	14.3	28.57
	Nod	28.6	28.6	42.8	33.33
HS3	Sürgün ucu	42.8	14.3	28.6	28.57
	Nod	57.1	14.3	57.1	42.83
HS4	Sürgün ucu	28.6	28.6	28.6	28.6
	Nod	42.8	42.8	14.3	33.3
HS5	Sürgün ucu	42.8	57.1	28.6	42.83
	Nod	42.8	42.8	42.8	42.8
HS6	Sürgün ucu	71.4	42.8	28.6	47.6
	Nod	28.6	42.8	5.1	42.83

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.



Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen hiperhidrisite yüzdesi (%)

4.3.9 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların ortalama sürgün uzunluğuna etkisi

Sürgün ucu ve nod eksplantları, 2 farklı ışık şiddetinde (3500 lüks ve 4200 lüks) farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış N₆ temelli (Çizelge 3.6) besin ortamları içeren cam tüplerde sürgün rejenerasyonu için kültüre alınmışlardır. Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alındıktan sonra farklı ışık şiddetlerine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.26 ve Şekil 4.43'de gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda ışık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların sürgün uzunluğu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.27). Veriler incelendiğinde, en yüksek ortalama sürgün uzunluğu veren (3.58 ve 3.57 cm) sırasıyla N-26 ve N6 besin ortamlarında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almışlardır. En düşük ortalama sürgün uzunluğu (1.24 cm), N-25 besin ortamında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir (Çizelge 4.26 ve Şekil 4.43).

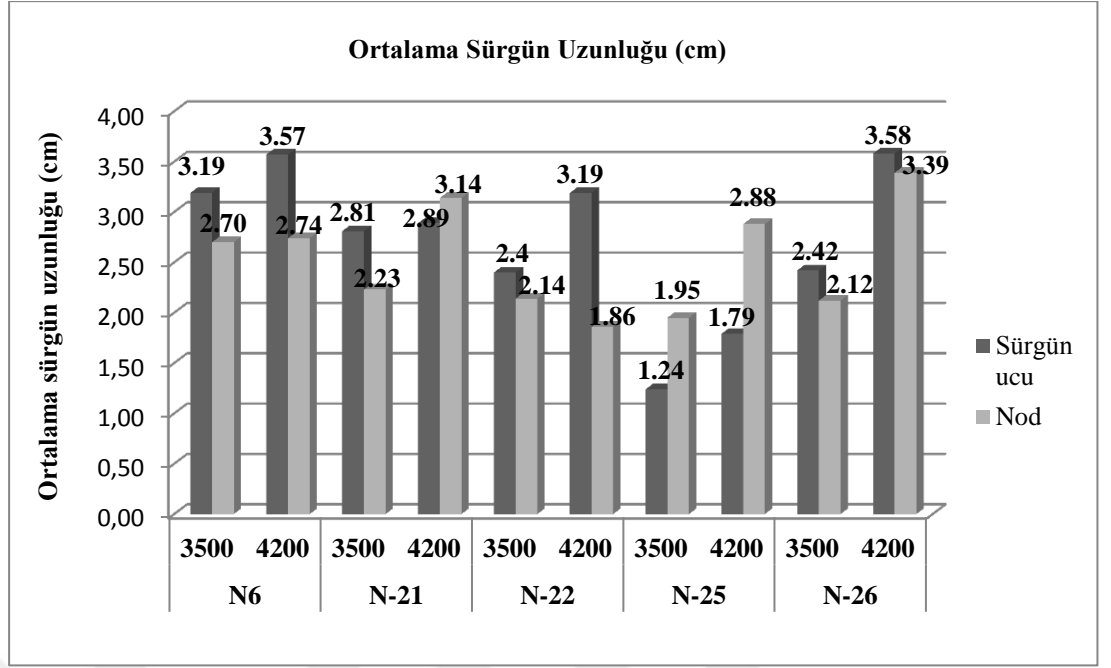
Çizelge 4.27. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lux)	Eksplant Tipi	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	3.07	4.93	1.57	3.19 ab
		Nod	3.64	1.89	2.57	2.70 abc
	4200	Sürgün ucu	2.78	3.5	4.43	3.57 a
		Nod	2.14	2.86	3.21	2.74 abc
N-21	3500	Sürgün ucu	1.89	4.39	2.14	2.81 abc
		Nod	2.28	2.64	1.78	2.23 abc
	4200	Sürgün ucu	4.36	1.57	2.75	2.89 ab
		Nod	3.36	3.32	2.75	3.14 ab
N-22	3500	Sürgün ucu	1.36	2.78	3.07	2.40 abc
		Nod	1.78	2.14	2.5	2.14 abc
	4200	Sürgün ucu	3.86	3.43	2.28	3.19 ab
		Nod	1.86	1.93	1.78	1.86 bc
N-25	3500	Sürgün ucu	1.43	1.93	0.35	1.24 c
		Nod	2.5	1.64	1.71	1.95 abc
	4200	Sürgün ucu	1.93	1.5	1.93	1.79 bc
		Nod	2.32	1.93	4.39	2.88 ab
N-26	3500	Sürgün ucu	3.1	2.03	2.14	2.42 abc
		Nod	1.86	2.21	2.28	2.12 abc
	4200	Sürgün ucu	3.07	3.82	3.86	3.58 a
		Nod	3.07	3.36	3.75	3.39 ab

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Çizelge 4.28. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları ile ilgili varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı- Işık Şiddeti- Eksplant Tipi)	19	0.948	0.05	2.079	0.026
Hata	40	0.96	0.024		
Genel	59	1.908			



Şekil 4.43. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunlukları (cm)

4.3.10 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların çoğaltım katsayısına etkisi

Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alındıktan sonra farklı ışık şiddetlerine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.28’de gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda ışık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların sürgün uzunluğu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.29). Veriler değerlendirildiğinde, en yüksek çoğaltım katsayısı (1.71), N-21 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. En düşük çoğaltım katsayısı (0,43) ise N-25 besin ortamında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.28 ve Şekil 4.44).

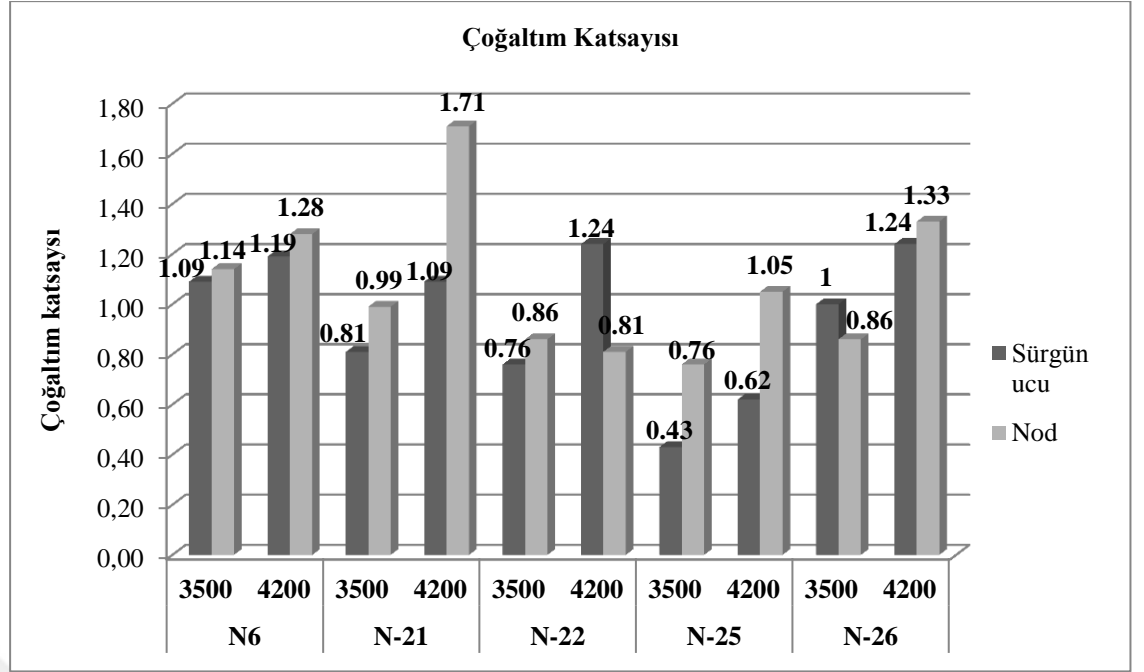
Çizelge 4.29. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 14 gün sonra elde edilen çoğaltım katsayıları

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lüks)	Eksplant Tipi	Çoğaltım Katsayısı			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	1	1.71	0.57	1.09 bc
		Nod	1.28	1.14	1	1.14 bc
	4200	Sürgün ucu	0.71	1.14	1.71	1.19 abc
		Nod	1	1.28	1.57	1.28 ab
N-21	3500	Sürgün ucu	0.71	1	0.71	0.81 bcd
		Nod	0.86	1.4	0.71	0.99 bcd
	4200	Sürgün ucu	1.71	0.57	1	1.09 bc
		Nod	2.14	1.71	1.28	1.71 a
N-22	3500	Sürgün ucu	0.57	0.86	0.86	0.76 bcd
		Nod	0.86	0.86	0.86	0.86 bcd
	4200	Sürgün ucu	1.43	1.28	1	1.24 ab
		Nod	0.86	0.86	0.71	0.81 bcd
N-25	3500	Sürgün ucu	0.57	0.57	0.14	0.43 d
		Nod	1	0.57	0.71	0.76 bcd
	4200	Sürgün ucu	0.71	0.43	0.71	0.62 cd
		Nod	1	1	1.14	1.05 bc
N-26	3500	Sürgün ucu	1.14	1	0.85	1.00 bc
		Nod	0.71	1	0.86	0.86 bcd
	4200	Sürgün ucu	1	1.28	1.43	1.24 ab
		Nod	1.14	1.28	1.57	1.33 ab

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Çizelge 4.30. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen çoğaltım katsayıları ile ilgili varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	p
Uygulama (Besin Ortamı-Işık Şiddeti-Eksplant Tipi)	19	4.738	0.249	2.894	0.002
Hata	40	3.447	0.086		
Genel	59	8.185			



Şekil 4.44. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama çoğaltım katsayıları

4.3.11 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların ortalama yaprak boyuna etkisi

Sürgün rejenerasyon ortamlarında kültüre alındıktan sonra farklı ışık şiddetlerine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyuna ait veriler Çizelge 4.31’de gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda ışık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların ortalama yaprak boyu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.32). Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama yaprak boyu (0.82 cm), N-21 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. En düşük ortalama yaprak boyları ise sırasıyla 0.04 ve 0.08 cm olarak N-26 ve N₆ besin ortamlarında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.31 ve Şekil 4.45).

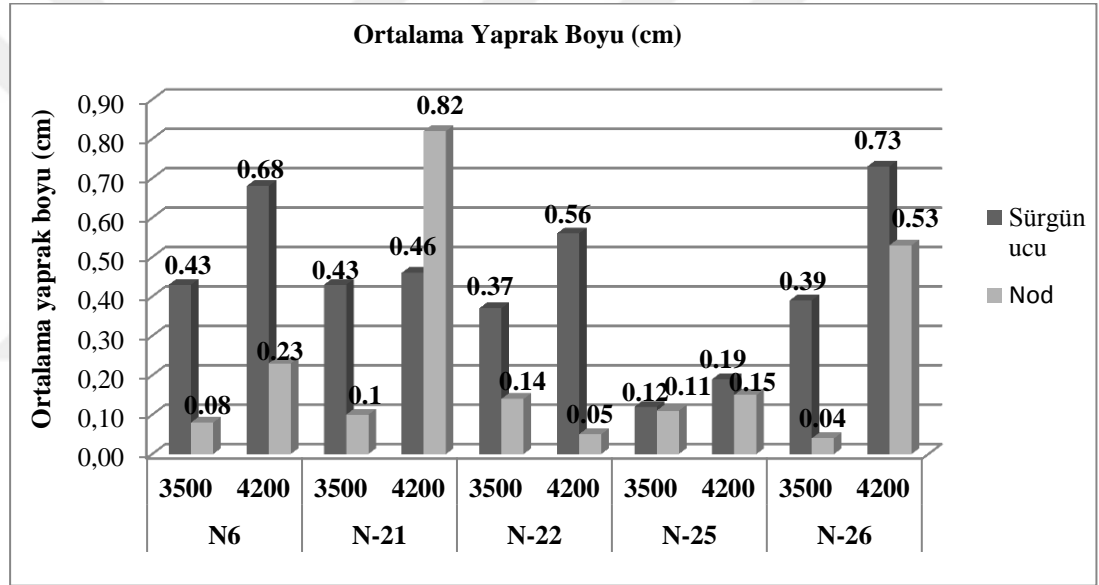
Çizelge 4.31. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lüks)	Eksplant Tipi	Ortalama Yaprak Boyu (cm)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	0.36	0.78	0.14	0.43 abcde
		Nod	0.18	0	0.07	0.08 e
	4200	Sürgün ucu	0.36	0.75	0.93	0.68 ab
		Nod	0	0.25	0.43	0.23 cde
N-21	3500	Sürgün ucu	0.32	0.28	0.68	0.43 abcde
		Nod	0.14	0.1	0.07	0.10 e
	4200	Sürgün ucu	0.96	0.07	0.36	0.46 abcde
		Nod	1.14	0.89	0.43	0.82 a
N-22	3500	Sürgün ucu	0.28	0.39	0.43	0.37 bcde
		Nod	0.07	0.07	0.28	0.14 cde
	4200	Sürgün ucu	0.78	0.39	0.5	0.56 abc
		Nod	0	0	0.14	0.05 e
N-25	3500	Sürgün ucu	0.03	0.32	0	0.12 de
		Nod	0.18	0.07	0.07	0.11 e
	4200	Sürgün ucu	0.14	0.14	0.28	0.19 cde
		Nod	0.28	0.03	0.14	0.15 cde
N-26	3500	Sürgün ucu	0.36	0.53	0.28	0.39 bcde
		Nod	0.07	0.03	0.03	0.04 e
	4200	Sürgün ucu	0.71	0.46	1.03	0.73 ab
		Nod	0.78	0.25	0.57	0.53 abcd

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Çizelge 4.32. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyuna ait varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı- Işık Şiddeti- Eksplant Tipi)	19	3.388	0.178	3.851	0
Hata	40	1.852	0.046		
Genel	59	5.239			



Şekil 4.45. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama yaprak boyu (cm)

4.3.12 Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların hiperhidrisite yüzdesine etkisi

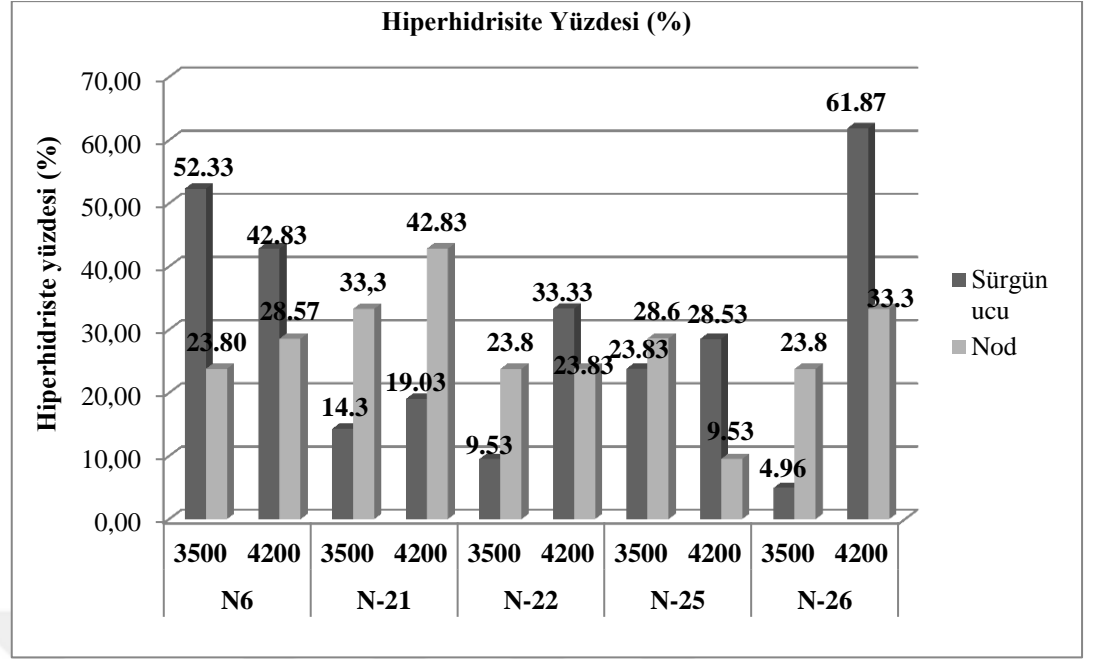
Besin ortamı, ışık şiddeti ve eksplant tipinin hiperhidrisite yüzdesine etkisi ile ilgili değerler Çizelge 4.33 ve Şekil 4.46'da gösterilmiştir. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%61.87), N-26 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarının 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir. En düşük hiperhidrisite yüzdesi (%4.96) ise N-26 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir.

Besin ortamı, ışık şiddeti ve eksplant tipinin hiperhidrisite yüzdesine etkisi ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistiksel farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.33. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lux)	Eksplant Tipi	Hiperhidrisite Yüzdesi (%)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	57.1	57.1	42.8	52.33
		Nod	42.8	0	28.6	23.8
	4200	Sürgün ucu	14.3	42.8	71.4	42.83
		Nod	14.3	57.1	14.3	28.57
N-21	3500	Sürgün ucu	28.6	0	14.3	14.3
		Nod	42.8	14.3	42.8	33.3
	4200	Sürgün ucu	42.8	0	14.3	19.03
		Nod	57.1	28.6	42.8	42.83
N-22	3500	Sürgün ucu	14.3	14.3	0	9.53
		Nod	0	28.6	42.8	23.8
	4200	Sürgün ucu	14.3	71.4	14.3	33.33
		Nod	28.6	28.6	14.3	23.83
N-25	3500	Sürgün ucu	28.6	28.6	14.3	23.83
		Nod	28.6	28.6	28.6	28.6
	4200	Sürgün ucu	0	42.8	42.8	28.53
		Nod	0	28.6	0	9.53
N-26	3500	Sürgün ucu	0.57	14.3	0	4.96
		Nod	28.6	28.6	14.3	23.83
	4200	Sürgün ucu	42.8	42.8	100	61.87
		Nod	0	57.1	42.8	33,3

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.



Şekil 4.46. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen hiperhidrisite yüzdeleri (%)

4.4 Köklenme

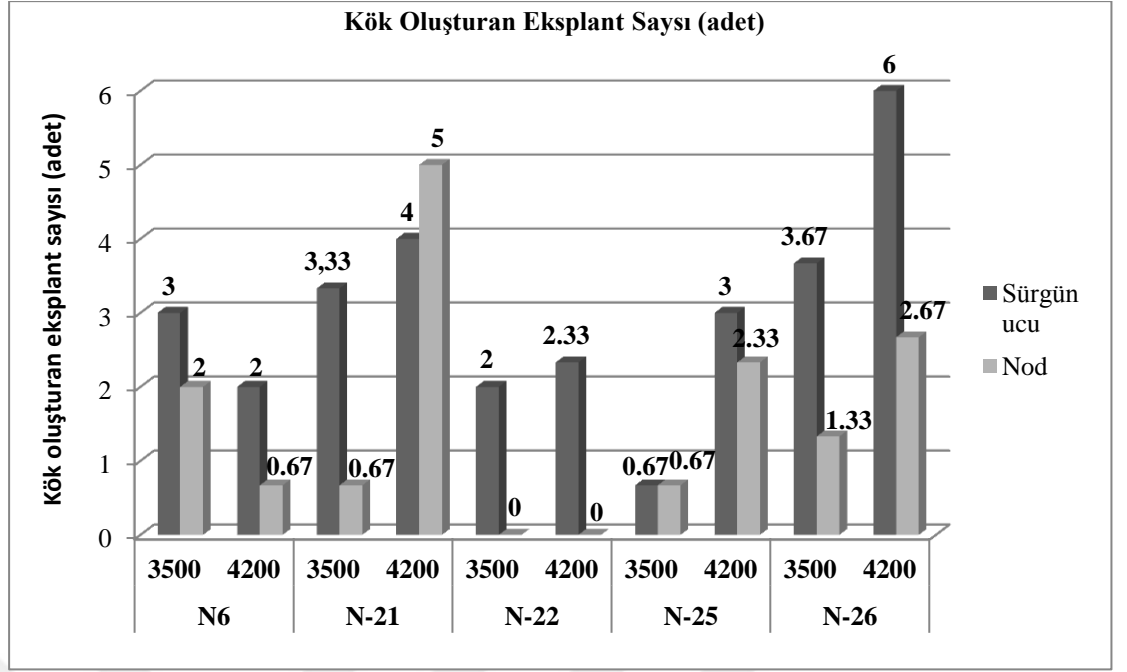
4.4.1 Kök rejenerasyonu

Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından kök oluşturan eksplant sayısı Çizelge 4.34 ve Şekil 4.47 'de gösterilmiştir. Jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetinin kök oluşturan eksplant sayısına etkisi ile ilgili olarak yapılan varyans analizi sonucunda önemli bir istatistik farklılık bulunmamıştır. Kök rejenerasyon yüzdesi Çizelge 4.35 ve Şekil 4.48'de gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda ışık şiddeti, eksplant tipi ve jelleştirici ajanların kök rejenerasyon yüzdesi üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.36). En yüksek kök rejenerasyonu (%85.71) N-26 besin ortamında kültüre alınıp 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. N-22 besin ortamında kültüre alınıp 3500 ve 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarında köklenme elde edilememiştir (Çizelge 4.34 ve Şekil 4.48).

Çizelge 4.34. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 16 gün sonra elde edilen kök oluşturan eksplant sayısı (adet)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lux)	Eksplant Tipi	Kök Oluşturan Eksplant Sayısı (adet)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	3	5	1	3
		Nod	2	1	3	2
	4200	Sürgün ucu	0	1	5	2
		Nod	0	2	0	0.67
N-21	3500	Sürgün ucu	4	4	2	3.33
		Nod	1	0	1	0.67
	4200	Sürgün ucu	5	3	4	4
		Nod	6	5	4	5
N-22	3500	Sürgün ucu	2	3	1	2
		Nod	0	0	0	0
	4200	Sürgün ucu	4	2	1	2.33
		Nod	0	0	0	0
N-25	3500	Sürgün ucu	0	2	0	0.67
		Nod	2	0	0	0.67
	4200	Sürgün ucu	3	3	3	3
		Nod	1	2	4	2.33
N-26	3500	Sürgün ucu	3	4	4	3.67
		Nod	1	1	2	1.33
	4200	Sürgün ucu	5	6	7	6
		Nod	1	2	5	2.67

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır.

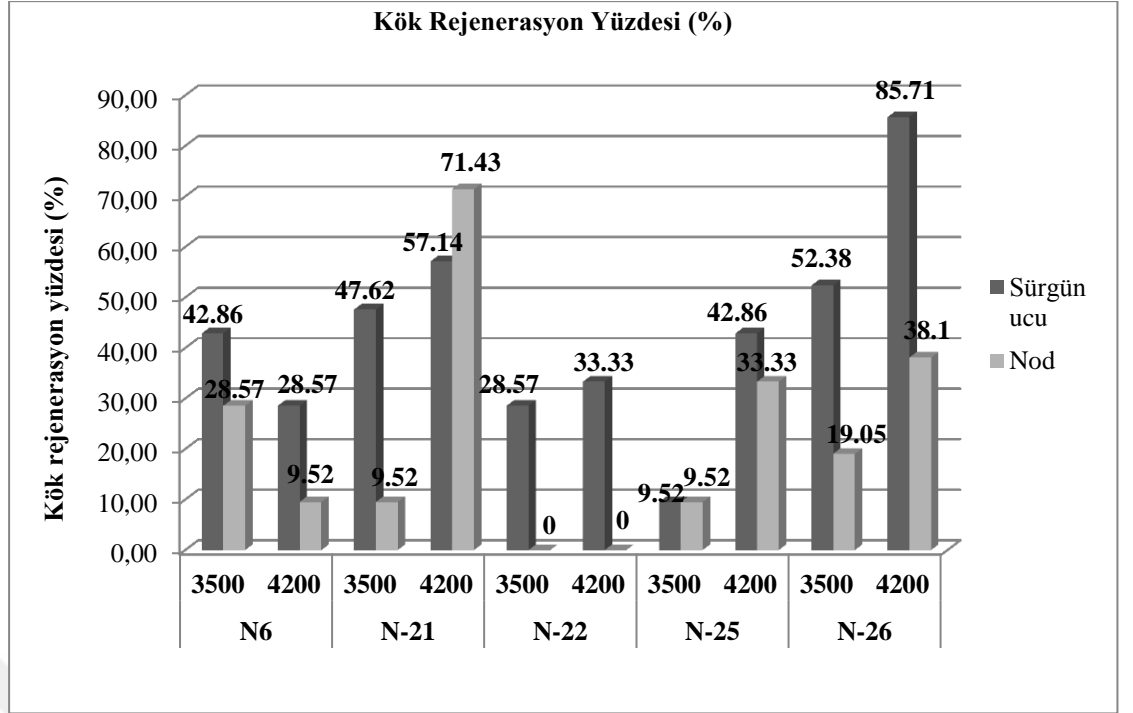


Şekil 4.47. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından kök oluşturan eksplant sayısı (adet)

Çizelge 4.35. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından 16 gün sonra elde edilen kök rejenerasyon yüzdeleri (%)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lux)	Eksplant Tipi	Kök Rejenerasyon Yüzdesi (%)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	42.86	71.43	14.29	42.86 bcde
		Nod	28.57	14.29	42.86	28.57 cdef
	4200	Sürgün ucu	0	14.29	71.43	28.57 cdef
		Nod	0	28.57	0	9.52 ef
N-21	3500	Sürgün ucu	57.14	57.14	28.57	47.62 bcd
		Nod	14.29	0	14.29	9.52 ef
	4200	Sürgün ucu	71.43	42.86	57.14	57.14 abc
		Nod	85.71	71.43	57.14	71.43 ab
N-22	3500	Sürgün ucu	28.57	42.86	14.29	28.57 cdef
		Nod	0	0	0	0.00 f
	4200	Sürgün ucu	57.14	28.57	14.29	33.33 cdef
		Nod	0	0	0	0.00 f
N-25	3500	Sürgün ucu	0	28.57	0	9.52 ef
		Nod	28.57	0	0	9.52 ef
	4200	Sürgün ucu	42.86	42.86	42.86	42.86 bcde
		Nod	14.29	28.57	57.14	33.33 cdef
N-26	3500	Sürgün ucu	42.86	57.14	57.14	52.38 bcd
		Nod	14.29	14.29	28.57	19.05 def
	4200	Sürgün ucu	71.43	85.71	100	85.71 a
		Nod	14.29	28.57	71.43	38.10 bcde

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.



Şekil 4.48. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen kök rejenerasyon yüzdeleri (%)

Çizelge 4.36. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen kök rejenerasyon yüzdeleri ile ilgili varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı- Işık Şiddeti- Eksplant Tipi)	19	30828.811	1622.569	5.075	0
Hata	40	12787.742	319.694		
Genel	59	43616.553			

4.4.2 Eksplant başına elde edilen kök sayısı

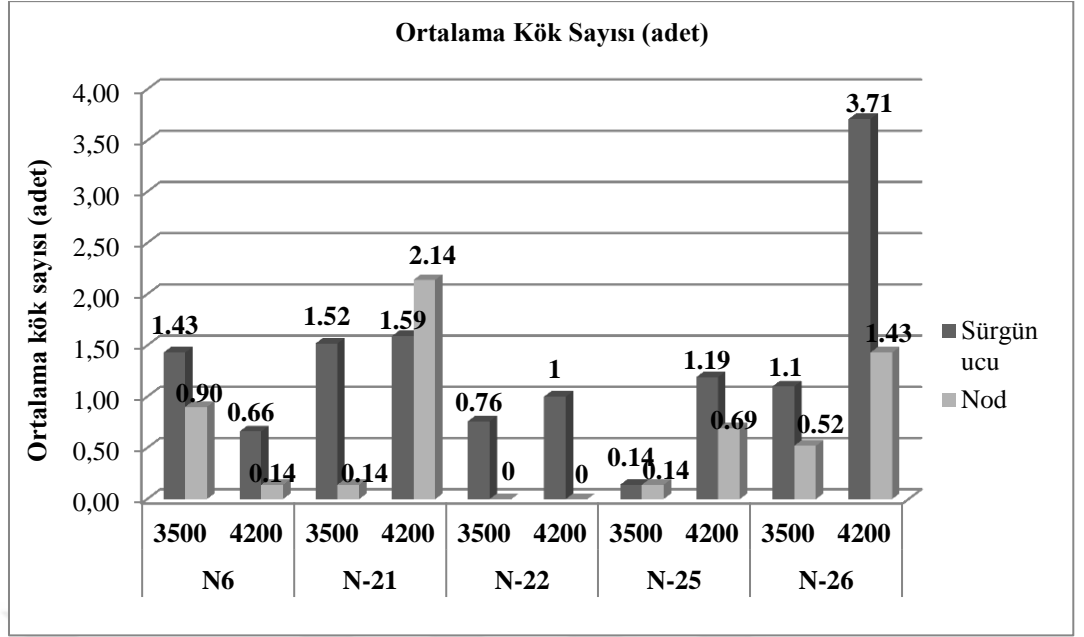
Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen eksplant başına ortalama kök sayısı Çizelge 4.37 ve Şekil 4.49'de gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda; jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetinin kök oluşturan eksplant sayısına etkisi %1 seviyesinde önemli

bulunmuştur (Çizelge 4.38). En yüksek eksplant başına ortalama kök sayısı (3.71 adet), N-26 besin ortamında kültüre alınıp 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. N-22 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarında ise köklenme meydana gelmemiştir (Çizelge 4.37 ve Şekil 4.49).

Çizelge 4.37. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök sayıları (adet)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lüks)	Eksplant Tipi	Ortalama Kök Sayısı (adet)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	1	3.14	0.14	1.43 bcd
		Nod	1	0.57	1.14	0.90 bcd
	4200	Sürgün ucu	0	0.71	1.28	0.66 bcd
		Nod	0	0.43	0	0.14 cd
N-21	3500	Sürgün ucu	2.43	1.86	0.28	1.52 bcd
		Nod	0.28	0	0.14	0.14 cd
	4200	Sürgün ucu	3.28	0.64	0.86	1.59 bc
		Nod	2.43	2.71	1.28	2.14 b
N-22	3500	Sürgün ucu	1	1	0.28	0.76 bcd
		Nod	0	0	0	0.00 d
	4200	Sürgün ucu	1.43	0.71	0.86	1.00 bcd
		Nod	0	0	0	0,00 d
N-25	3500	Sürgün ucu	0	0.43	0	0.14 cd
		Nod	0.43	0	0	0.14 cd
	4200	Sürgün ucu	0.86	1.14	1.57	1.19 bcd
		Nod	0.57	0.71	0.78	0.69 bcd
N-26	3500	Sürgün ucu	0.86	1	1.43	1.10 bcd
		Nod	0.28	0.43	0.86	0.52 cd
	4200	Sürgün ucu	2.71	3	5.43	3.71 a
		Nod	0.71	0.43	3.14	1.43 bcd

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.



Şekil 4.49. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök sayıları (adet)

Çizelge 4.38. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök sayıları ile ilgili varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	P
Uygulama (Besin Ortamı-Işık Şiddeti-Eksplant Tipi)	19	45,34	2,386	3,932	0
Hata	40	24,278	0,607		
Genel	59	69,618			

4.4.3 Eksplant başına elde edilen ortalama kök uzunluğu

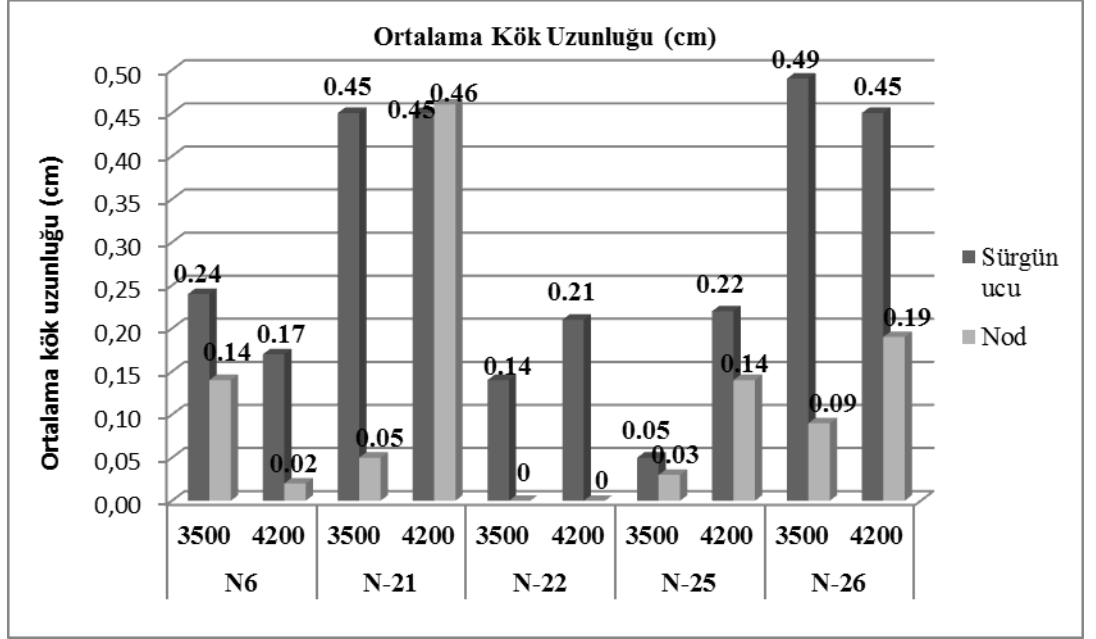
Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları Çizelge 4.39 ve Şekil 4.50'de gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetininin kök oluşturan eksplant sayısına etkisi %1 seviyesinde önemli

bulunmuştur (Çizelge 4.40). En yüksek ortalama kök uzunluğu (0.49 cm) N-26 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır (Çizelge 4.39 ve Şekil 4.50). Köklenme denemelerinden elde edilen farklı uzunluktaki kökler Şekil 4.51’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.39. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları (cm)

Besin Ortamı	Işık şiddeti (lüks)	Eksplant Tipi	Ortalama Kök Uzunluğu (cm)			
			T1	T2	T3	Ort.
N ₆	3500	Sürgün ucu	0.28	0.38	0.07	0.24 abc
		Nod	0.14	0.07	0.21	0.14 c
	4200	Sürgün ucu	0	0.08	0.42	0.17 bc
		Nod	0	0.07	0	0.02 c
N-21	3500	Sürgün ucu	0.36	0.86	0.14	0.45 ab
		Nod	0.07	0	0.07	0.05 c
	4200	Sürgün ucu	0.56	0.36	0.43	0.45 ab
		Nod	0.78	0.32	0.28	0.46 ab
N-22	3500	Sürgün ucu	0.15	0.21	0.07	0.14 c
		Nod	0	0	0	0.00 c
	4200	Sürgün ucu	0.36	0.14	0.14	0.21 abc
		Nod	0	0	0	0.00 c
N-25	3500	Sürgün ucu	0	0.14	0	0.05 c
		Nod	0.1	0	0	0.03 c
	4200	Sürgün ucu	0.25	0.25	0.17	0.22 abc
		Nod	0.07	0.14	0.21	0.14 c
N-26	3500	Sürgün ucu	0.28	0.86	0.32	0.49 a
		Nod	0.07	0.07	0.14	0.09 c
	4200	Sürgün ucu	0.32	0.38	0.64	0.45 ab
		Nod	0.07	0.18	0.31	0.19 abc

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Ortalama değerler arasındaki önemli farklılıklar SPSS programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P=0.05$ düzeyinde yapılmıştır.



Şekil 4.50. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları (cm)



Şekil 4.51. Köklenme denemelerinde elde edilen farklı uzunluktaki kökler

Çizelge 4.40. Farklı jelleştirici ajanlar ile katılaştırılmış besin ortamlarında kültüre alınıp 2 farklı ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama kök uzunlukları ile ilgili varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	p
Uygulama (Besin Ortamı-Işık Şiddeti-Eksplant Tipi)	19	1.647	0.087	3.506	0
Hata	40	0.989	0.025		
Genel	59	2.636			

4.5 Aklimatizasyon

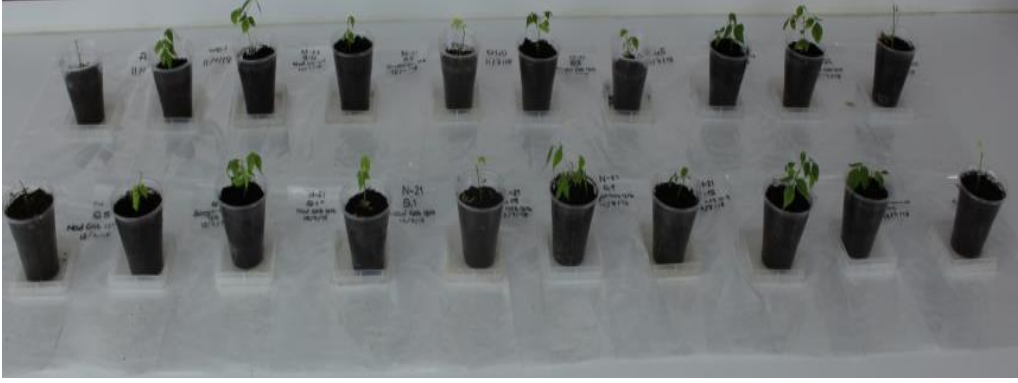
In vitro koşullarda elde edilen ve gelişimleri son derece iyi olan 20 adet köklü sürgün (11 adet sürgün ucu kökenli, 9 adet nod kökenli) seçilerek aklimatize edilmiştir. 7. günün sonunda üzerlerindeki poşetleri çıkarılan aklimatize edilmiş olan bitkicikler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot, 3500 lüks ışık şiddeti ve 24 ± 2 °C sıcaklık koşullarında 20 gün kadar muhafaza edilmişlerdir (Şekil 4.51). 20. günün sonunda 14 adet sürgünün aklimatizasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.41 ve Şekil 4.52). Bu şekilde % 70 oranında aklimatizasyon başarısı elde edilmiştir. Başarı ile aklimatize edilen bitkiler daha büyük saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.53). Sürgün ucu kökenli aklimatize edilen bitkilerde yaşama oranı %72.7 iken; nod kökenli aklimatize edilen bitkilerde yaşama oranı ise %66.7 olarak elde edilmiştir. Bu sebeple, klonal mikroçoğaltım amacıyla sürgün ucu kökenli klonların kullanımının biraz daha yüksek aklimatizasyon başarısı verdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.41. Kullanılan besin ortamı açısından klonlara ait iyi gelişim gösteren sürgünlerin aklimatizasyon durumu

Sıra	Klon no	Besin ortamı	Işık şiddeti	Köken aldığı eksplant tipi	Aklimatizasyon başarı durumu
1	Q19	N-21	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarılı
2	Q22	N-21	Çok ışık	Nod	Başarılı
		N-26	Çok ışık	Nod	Başarılı
		N-26	Normal ışık	Sürgün ucu	Başarılı
3	Q54	N ₆	Normal ışık	Sürgün ucu	Başarısız
4	Q15	N-21	Çok ışık	Nod	Başarılı
5	Q8	N-21	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarılı
6	Q3	N-21	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarılı
7	Q45	N-26	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarılı
8	A4	N-21	Normal ışık	Nod	Başarısız
9	Q40	N-26	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarısız
10	Q1	N-21	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarılı
		N-21	Çok ışık	Nod	Başarılı
		N-21	Çok ışık	Nod	Başarılı
11	Q18	N-21	Çok ışık	Nod	Başarılı
12	Q19	n-21	Çok ışık	Nod	Başarısız
13	Q61	N-26	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarılı
14	Q30	N ₆	Normal ışık	Sürgün ucu	Başarılı
15	Q5	N-21	Çok ışık	Nod	Başarısız
16	Q11	N-21	Çok ışık	Sürgün ucu	Başarısız



Şekil 4.52. 7 günün sonunda üzerlerindeki poşetleri çıkarılan bitkicikler



Şekil 4.53. 20. günün sonunda aklimatize edilmiş bitkiler



Şekil 4.54. Saksılara aktarılmış bitkiler

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fabaceae familyasına ait olan *Vigna caracalla* bitkisi, çok hoş kokulu ve değişik renkli çiçeklere sahip oldukça güzel görünümlü bir sarmaşık bitkisidir. Süs bitkiciliği ve yem endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. *Vigna caracalla* bitkisinin tohumlarının pahalı olması, düşük çimlenme oranı, çiçeklerindeki tozlaşma zorluğu ve çelikleme yoluyla üretimin kısıtlı olması gibi nedenlerden dolayı alternatif üretim tekniklerine ihtiyaç duyulması, bu bitki türünün *in vitro* mikroçoğaltımını gerektirmektedir. *In vitro* mikroçoğaltım tekniğiyle geleneksel çoğaltımda karşılaşılan bu dezavantajlar elimine edilebilmekte; kısa zamanda çok sayıda bitki eldesi mümkün olabilmektedir. Mikroçoğaltım tekniği kullanılarak, özellikle de sürgün ucu ve nod eksplantlarından bitkicik eldesi gerçekleştirilebilmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında; ticari bir firmadan elde edilen tohumlara uygun sterilizasyon prosedürünün belirlenmesi için 4 farklı sterilizasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Birinci uygulamada; 1dk boyunca %70'lik etil alkol, ardından 3 dk %0.1'lik HgCl₂ uygulanmıştır. HgCl₂ uygulamasından sonra tohumlar yaklaşık olarak 1 dk boyunca 2 kere steril suda durulanmıştır ve son steril suda tohumların suyu emerek yumuşaması ve tohum dormansisinin kırılması amacıyla 7 saat boyunca bekletilmiştir. İkinci uygulamada; 1dk boyunca %70'lik etil alkol ve sonra 4 dk %0.1'lik HgCl₂ uygulanmıştır. HgCl₂ uygulamasından sonra tohumlar yaklaşık olarak 1 dk boyunca 2 kere steril suda durulanmıştır ve son steril suda suyu emerek yumuşaması ve tohum dormansisinin kırılması amacıyla 7 saat boyunca suda bekletilmiştir. Birinci ve ikinci sterilizasyon uygulamaları arasındaki fark, tohumların HgCl₂ ile muamele edilme süreleridir. Üçüncü uygulamada; 1dk boyunca %70'lik etil alkolün ardından 3 dk %0.1'lik HgCl₂ uygulanmış, tohumlar 2 kere steril suda durulanmıştır ve son steril suda 3 saat bekletilmiştir. Son uygulamada ise, yine 1dk boyunca %70'lik etil alkol uygulamasını takiben 4 dk süreyle %0.1'lik HgCl₂'de çalkalanan tohumlar 2 kere steril suda durulanmıştır ve son steril suda 3 saat boyunca suda bekletilmiştir. İlk iki uygulama ile üçüncü ve dördüncü sterilizasyon uygulaması arasındaki fark; dormansinin kırılması için uygulanan suda bekletme süresidir. Sterilizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesinin ardından tohum dormansisini kırmak için, tohumlar çatlatılarak MS besin ortamı içeren cam tüplerde kültüre alınmışlardır. Sterilizasyon işlemlerinin ardından çatlatma işlemi esnasında 4 dk civa ile muamele edilen (2. ve 4. uygulamalar) tohumların çatlatılmasının daha kolay olduğu gözlenmiştir. 12.günün sonunda yapılan gözlemler sonucunda; 1., 2. ve 4. uygulamaların sterilizasyon başarılarının aynı (%93.33) oldukları belirlenmiştir. 3. sterilizasyon uygulamalarının başarısı ise %86.67 olarak belirlenmiştir. *Vigna caracalla* ile bugüne kadar hiçbir *in vitro* çalışmanın gerçekleştirilmemiş olması ve sera koşullarında düşük çimlenme oranının olduğunun bilinmesi elde edilen bu sonucun başarılı olduğunu göstermektedir. Dört uygulamanın sterilizasyon başarısı açısından belirgin bir farklılığı olmadığı saptanmıştır. Sterilizasyon başarısı %85'in üzerinde olduğundan bu 4 uygulamanın da sterilizasyon protokolü

için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. 4 farklı sterilizasyon uygulaması arasında sterilizasyon başarısı açısından bir fark gözlemlenmemesine rağmen; tez çalışması için bundan sonra yapılacak tohum sterilizasyonlarında ikinci uygulamanın kullanılmasına karar verilmiştir. Bunun sebebi, en yüksek çimlenme yüzdesinin (%93.33) 2. Uygulama ile steril edilen tohumlarda elde edilmesidir. En düşük çimlenme yüzdesi (%53.33) ise üçüncü uygulama ile steril edilen tohumlarda belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak; suda bekletme süresinin çimlenme yüzdesi üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde, *Vigna* türlerinin tohum sterilizasyonu amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar arasında; *Vigna unguiculata* L. türünde %70'lik ticari ağartıcı kullanımı (Aasim et al., 2008), *Vigna subterranea* L. Verdc. türünde %70'lik etil alkol uygulamasından sonra %7'lik kalsiyum hipoklorit uygulaması (Silue et al., 2017), *Vigna radiata* L. Wilczek. türünde %70'lik etil alkol uygulamasının ardından %0.1'lik HgCl₂ uygulaması (Rao and Patil., 2014), *Vigna mungo* L. türünde %1'lik sodyum hipoklorit uygulamasının ardından Tween 20 ilavesi (Saha et al., 2017) gibi çeşitli sterilant kullanımları mevcuttur. Tohumun yumuşaması ve dormansinin kırılması amacıyla ise *Vigna radiata* L. Wilczek türünde 6 saat (Rao and Patil., 2014) ya da *Vigna subterranea* L. Verdc. türünde 24 saatlik (Silue et al., 2017) sürelerde suda bekletme uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Çimlenmeyi etkileyen parametreleri belirleyebilmek amacıyla ilk olarak; 2 farklı kültür kabı (cam tüp ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişe) ve 5 farklı besin ortamında (MS, ½ MS, WPM, ½ WPM, N₆) tohumlar kültüre alınmıştır. En yüksek çimlenme oranı (%95.24), N₆ besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde kültüre alınan tohumlardan elde edilmiştir. Thorat ve ark. (2017) gerçekleştirdiği *Vigna unguiculata* L. Walp. tohumlarında gerçekleştirilen çimlenme ile ilgili çalışma sonucunda %97.50 oranda en yüksek çimlenme yüzdesi elde edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, elde edilen maksimum çimlenme yüzdesi bizim çalışmamızda elde edilen maksimum çimlenme yüzdesi ile benzerlik göstermektedir. En düşük çimlenme yüzdesi (52.38), ½ WPM besin ortamı içeren Erlenmeyer şişelerde kültüre alınan tohumlardan elde edilmiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.8), MS besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde elde edilmiştir. En düşük çoğaltım katsayısı (0.99) ise ½ WPM besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde belirlenmiştir. Tohum çimlenmesi esnasında besin ortamında meydana gelen kararma yüzdesine ise, besin ortamı ve kültür kabının bir etkisinin olup olmadığı da incelenmiştir. En düşük kararma yüzdesi (%19.05), ½ MS besin ortamı içeren cam tüplerde belirlenmiştir. Besin ortamında kararmada besin ortamı ve kültür kabı %1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çimlenmeyi etkileyen parametreleri belirleyebilmek amacıyla ikinci olarak; 2 farklı jelleştirici ajan (gelrite-%0.3- ve agar-%0.7-) ve 2 farklı kültür kabı (cam tüp ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişe) kombinasyonları kullanılmıştır. Gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde, en yüksek çimlenme yüzdesi (%85.71) ve en yüksek çoklu sürgün veren tohum yüzdesi (%23.81) elde edilmiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.48), gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde kültüre alınan tohumlardan elde edilmiştir. Ayrıca jelleştirici ajan ve kültür kabı kombinasyonu çimlenme yüzdesi, çoğaltım katsayısı ve çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi üzerinde önemli bulunmamıştır. Literatürde, *Vigna* cinslerinde tohum çimlenmesi için gelrite (%0.65) ve agar (%0.8 ve 0.65) kullanılan çalışmalar mevcuttur (Aasim et al., 2008; Mundhara and Rashid., 2006; Aasim et al., 2011).

En yüksek kararan besin ortamı içeren cam tüp ve Erlenmeyer şişe yüzdesi (%57,14) olduğu gelrite*cam tüp kombinasyonundan elde edilmiştir. En düşük kararma yüzdesi (%9.52) agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde elde edilmiştir. Jelleştirici ajan ve kültür kabının kararma yüzdesi üzerinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ancak, besin ortamında meydana gelen kararmanın tohumun büyümesi ve gelişimini etkilemediği göz önünde bulundurulur; çalışmada daha sonra kurulacak olan tohum kültürleri için jelleştirici ajan olarak daha yüksek çimlenme yüzdesi, çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi ve çoğaltım katsayısı elde edilen gelrite kullanılmasına karar verilmiştir.

Çimlenmeyi etkileyen parametreleri belirlemek için cam tüplerde WPM besin ortamında kültüre alınan tohumlar 2 farklı ışık şiddetine (3500 ve 4200 lüks) maruz bırakılarak, ışığın çimlenme üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Veriler incelendiğinde, 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan tohumlarda 4200 lükse maruz bırakılan tohumlara göre daha yüksek bir çimlenme yüzdesi (%71.333) elde edilmiştir. Bu sebeple, bundan sonra kurulacak tohum kültürleri için 3500 lüks ışık şiddeti tercih edilmiştir. Literatürde, Saha ve ark. (2017) sterilizasyonu gerçekleştirilen *Vigna mungo* L. tohumları MS besin ortamında kültüre aldıktan sonra karanlık koşullarda muhafaza edilerek çimlendirmişlerdir.

Ortalama sürgün uzunluğunu etkileyen parametreleri belirleyebilmek amacıyla ilk olarak; MS, WPM ve N₆ temelli farklı besin ortamları içeren kültür kaplarında sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alınmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda; en yüksek eksplant başına ortalama sürgün uzunluğu, sırasıyla sürgün

ucu*WPM besin ortamı (4.52 cm) ve ½ MS*sürgün ucu (4.36cm) kombinasyonlarında belirlenmiştir. Ayrıca, besin ortamı ve eksplant tipinin sürgün uzunluğu üzerine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. Gulati ve Jaiwal (1992) tarafından *Vigna radiata* (L.) Wilczek türünde gerçekleştirilen sürgün rejenerasyon çalışmasında; bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 vitaminli MS besin ortamında elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (5.5 cm), bu tez çalışması kapsamında elde edilen en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (4.52 cm) ile benzerlik göstermektedir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.62), WPM besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Diallo ve ark. (2008) tarafından *Vigna unguiculata* türünde gerçekleştirilen bir çalışmada, MS besin ortamında sürgün rejenerasyonu sonucunda elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (4.21cm) ve çoğaltım katsayısı (1.81), bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir. Gulati ve Jaiwal (1994) tarafından gerçekleştirilen *Vigna radiata* (L.) Wilczek sürgün rejenerasyon çalışmasında B5 vitaminleri içeren MS besin ortamında en düşük çoğaltım katsayısı (1) elde edilmiştir. Bu sonuç, *Vigna caracalla*'da elde edilen sürgün çoğaltım katsayılarından düşüktür. Ancak bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesiyle ($5 \cdot 10^{-6}$ M BA) *Vigna radiata* (L.) Wilczek bitkisinde çoğaltım katsayısı 4.2 ± 2 kat arttırılmıştır.

Ortalama sürgün uzunluğunu etkileyen parametreleri belirleyebilmek amacıyla ikinci olarak; farklı konsantrasyonlarda BAP ve BAP+IBA içeren MS temelli besin ortamlarında sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alınmışlardır. Veriler değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (5.05 cm) 1IBA+0.5BAP ile desteklenmiş MS besin ortamında (HS4) kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. En düşük ortalama sürgün uzunluğu (1,33 cm) ise 1IBA+2BAP ile desteklenmiş MS besin ortamında (HS6) kültüre alınan nod eksplantlarından belirlenmiştir. Gulati and Jaival (1994)'ın *Vigna radiata*'da farklı BAP konsantrasyonlarında elde ettikleri ortalama sürgün uzunluğu (1 cm), bu çalışmada elde edilen en düşük sürgün uzunluğu (1.33cm) ile benzerlik göstermiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1,48), HS4 besin ortamı *sürgün ucu kombinasyonunda elde edilmiştir. En düşük çoğaltım katsayısı (0,57), BS3 besin ortamı*sürgün ucu kombinasyonunda saptanmıştır.

Işık şiddeti, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanların sürgün rejenerasyonu ve çoğaltımına etkisi de bu çalışma kapsamında incelenmiştir. 2 farklı ışık şiddeti (3500 ve 4200 lüks), 2 farklı eksplant tipi (sürgün ucu ve nod) ve 5 farklı jelleştirici ajan kombinasyonları denenmiştir. *In vitro*'da çimlendirilen

tohumlardan elde edilen sürgün ucu ve nod eksplantları farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamında kültüre alınmışlardır. En yüksek ortalama sürgün uzunluğu (3.58 ve 3.57 cm) sırasıyla N-26 ve N₆ besin ortamlarında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. En düşük ortalama sürgün uzunluğu (1.24 cm), N-25 besin ortamlarında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarında belirlenmiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.71), N-21 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. En düşük çoğaltım katsayısı (0,43) N-25 besin ortamında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Işık şiddet, eksplant tipi ve farklı jelleştirici ajanlar %1 seviyesinde ortalama sürgün uzunluğu ve çoğaltım katsayısı üzerinde önemli bulunmuştur. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%61.87), N-26 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarının 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir. En düşük hiperhidrisite yüzdesi (%4.96) N-26 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Adlinge ve ark. (2014)'nın *Vigna mungo* L. Hepper türünde gerçekleştirdikleri çalışmada, sürgün rejenerasyonu ve köklendirme için kültüre alınan eksplantlar 3000 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmiştir. Ayrıca, sürgün rejenerasyonu ve köklendirme için *Vigna unguiculata* L. Walp türünde gelrite (Aasim et al., 2008), *Vigna radiata* L. Wilczek. türünde agar (Rao and Patil., 2014) ve *Vigna mungo* L. Hepper türünde agar-agar (Adlinge et al., 2014)'ın katılaştırıcı ajan olarak kullandıkları çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur.

Vigna caracalla bitkisinin sürgün rejenerasyonu esnasında gözlemlenen en büyük problemlerden biri hiperhidrisitedir. Hiperhidrisite sorununa etki eden faktörleri belirlemek ve çözüm bulabilmek için hiperhidrisiteyi etkileyen parametreler ele alınmıştır. İlk olarak; MS, WPM, ve N₆ temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarında hiperhidrisite yüzdeleri incelenmiştir. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%52.33), N₆ besin ortamı*sürgün ucu kombinasyonunda; en düşük hiperhidrisite yüzdesi (%9.53), N-22 besin ortamı*sürgün ucu kombinasyonunda elde edilmiştir. İkinci olarak; bitki büyüme düzenleyicilerinin ve eksplant tipinin hiperhidrisiteye etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda BAP, BAP+IBA ile desteklenmiş MS besin ortamlarında sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alınmıştır. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%47.60) BS1*sürgün ucu, BS2*nod, HS1*nod, HS6*sürgün ucu kombinasyonlarında belirlenmiştir. En düşük hiperhidrisite yüzdesi (%28,53) ise BS4*sürgün ucu kombinasyonunda elde edilmiştir. *Vigna*

radiata türünde 1.0 µM TDZ (Thidiazuron), hiperhidrisiteyi engellemek için kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri arasındadır (Mundara and Rashid, 2006). Bunun yanı sıra, NAA'in besin ortamına eklenmesinin hiperhidrisiteyi azalttığı, BA'in ise arttırdığı belirlenmiştir (Aasim et al., 2011). Farklı jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetinin hiperhidrisiteye etkisinin belirlenmesi amacıyla 5 farklı jelleştirici ajan ile katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantları 3500 lüks ve 4200 lüks ışık şiddetlerine maruz bırakılmıştır. En yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%61.87) N-26 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarının 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir. En düşük hiperhidrisite yüzdesi (%4.96) ise N-26 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından belirlenmiştir.

En yüksek kök rejenerasyonu (%85.71), N-26 besin ortamında kültüre alınıp 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün eksplantlarından elde edilmiştir. 3500 ve 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplant kökenli sürgünlerde köklenme olmamıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda Jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetinin kök rejenerasyon yüzdesine etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. En yüksek eksplant başına ortalama kök sayısı (3.71 adet) N-26 besin ortamında kültüre alınıp 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir ve birinci grupta yer almıştır. N-22 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarında kök oluşumu elde edilmemiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetinin kök oluşturan eksplant sayısına etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. En yüksek ortalama kök uzunluğu (0.49 cm), N-26 besin ortamında kültüre alınıp 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda jelleştirici ajan, eksplant tipi ve ışık şiddetinin kök uzunluğuna etkisi %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. Adlinge ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamlarında köklenme elde edilememiştir. 0.1-0.25 mg/L NAA veya IBA ile desteklenmiş yarı güçte MS besin ortamlarında kültüre alınan ve 3000 lüks ışık şiddetinde kültüre alınan eksplantlarda en yüksek köklenme yüzdesi %76.6 olarak elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen N₆ temelli besin ortamlarında 4200 lüks ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında, Adlinge ve ark. (2014) gerçekleştirdiği *Vigna mungo* L. Hepper bitkisinde elde edilenden daha yüksek köklenme yüzdesi (%85.71) elde edilmiştir. Diallo ve ark. (2008) tarafından *Vigna unguiculata* L. Walp. türünde

gerçekleştirilen çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı güçte MS besin ortamında %41.60 oranında köklenme elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen N₆ ve N-25 besin ortamlarında besin ortamlarında elde edilen köklenme yüzdesi (%42.86) ile benzerlik göstermektedir.

2 *Vigna* türü arasında yapılan geniş bir melezleme sonucunda elde edilen *Vigna radiata* L. Wilczek**V. mungo* L. Hepper'in türler arası F1 hibritlerinin klonal vejetatif çoğaltımı MS temelli besin ortamlarında elde edilmiştir (Avenido et al., 1991).

In vitro koşullarda elde edilen 20 adet köklü sürgün seçilerek aklimatize edilmiştir ve % 70 oranında aklimatizasyon başarısı elde edilmiştir. Başarı ile aklimatize edilen bitkiler saksılara aktarılmıştır. Silue ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Vigna subterranea* L. Verdc. bitkisi %70 başarı oranıyla aklimatize edilmişlerdir. Adlinge ve ark. (2014) gerçekleştirdiği *Vigna mungo* L. Hepper bitkisi %70-75 başarı oranıyla aklimatize edilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen aklimatizasyon başarısı bu araştırmacıların bulgularıyla uyum içindedir.

Ayrıca bu çalışma kapsamında, hiperhidrisite problemi gözlemlenen klonların aklimatizasyonu sonrasında, bu problemin elimine edildiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında, yüksek hiperhidrisite göstermeyen ve çoğaltım katsayısı daha yüksek olan 16 adet klonun (Q19, Q22, Q54, Q15, Q8, Q3, Q45, A4, Q40, Q1, Q18, Q19, Q61, Q30, Q5 ve Q11) mikroçoğaltım denemelerinde uygun reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Bugüne kadar *Vigna caracalla* ile ilgili henüz hiçbir çalışmanın yapılmamış olması elde edilen bu verilerin son derece anlamlı ve değerli olduklarını göstermektedir.

6. ÖNERİLER

Çalışmamızda ilk olarak *Vigna caracalla* bitkisi tohumlarına uygulanan sterilizasyon uygulamaları incelendiğinde, uygun aseptik koşulların sağlanmış olduğu belirtilebilir. Sterilizasyon için kullanılan 4 farklı uygulamada da yüksek sterilizasyon başarısı sağlanmıştır. Ancak %93.33 oranında çimlenme yüzdesi elde edilen 2.uygulamanın tohum dormansisinin kırılmasında daha başarılı olduğu belirlendiğinden; sterilizasyon için en uygun uygulamanın 1dk boyunca %70'lik etil alkol uygulaması, 4 dk %0.1'lik HgCl₂ uygulaması ve ardından yaklaşık olarak 1 dk boyunca 2 kere suda durulama gerçekleştirildikten sonra 7 saat boyunca tohumların steril suda bekletilmesi olduğu önerilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken husus, civanın toksik özelliklere sahip olması nedeniyle %0.1'lik civa çözeltisi hazırlanırken dikkatli olunması gerektiğidir. Civa çözeltisi mutlaka çeker ocakta hazırlanmalıdır. Hazırlayan ve kullananlar eldiven ve maske takmalıdır.

Vigna caracalla bitkisi tohumları çok sert kabuklu olduğu için çatlatma uygulaması dikkatli şekilde gerçekleştirilmelidir. Daha uzun sürelerde suda bekletme ya da sülfürik asit gibi uygulamalar yapılarak tohumların çatlatılmasının biraz daha kolaylaştırılması açısından denemeler yapılmalıdır.

En uygun çimlenme ortamının ve kültür kabının belirlenmesi için 5 farklı besin ortamı (WPM, ½ WPM, MS, ½ MS ve N₆) ve 2 farklı kültür kabında (cam tüp ve 250 mL'lik Erlenmeyer) denemesi yapılmıştır. Bunlar arasında %95.24 oranla en yüksek çimlenme yüzdesi ve %38.10 oranla çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi, N₆ besin ortamı*250 mL'lik Erlenmeyer kombinasyonundan elde edilmiştir. Çimlenmeye dayalı en yüksek çoğaltım katsayısı (1.8), MS besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlenen tohumlarda elde edilmiştir. Daha yüksek çimlenme yüzdelerinin, çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdelerinin ve çoğaltım katsayılarının elde edilmesi için farklı besin ortamı kompozisyonları ve farklı kültür kabı tiplerinin denenmesi önerilmektedir.

Jelleştirici ajan ve kültür kabının çimlenmeye etkisinin belirlenmesi amacıyla; 2 farklı jelleştirici ajanla katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüp ve 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde kültüre alınan tohumlarda en yüksek çimlenme yüzdesi (%85.71) ve en yüksek çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%23.81) gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde elde edilmiştir. En yüksek çoğaltım oranı (1.48) ise gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde elde edilmiştir. Bu bilgilerden yola

çıkarak, gelrite ile katılaştırılmış farklı besin ortamı kombinasyonları ve farklı kültür kabı tipleri; bu çalışma kapsamında elde edilen çimlenme yüzdesi, çoğaltım katsayısı ve çoklu sürgün veren tohum yüzdesi değerlerinden daha yüksek değerlere ulaşılması amacıyla denenmesinde fayda bulunmaktadır.

Işık şiddetinin çimlenme yüzdesi üzerine etkisi incelendiğinde 3500 lüks ışık şiddetindeki çimlenme yüzdesi 4200 lüks ışık şiddetindeki çimlenme yüzdesinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiden hareketle yine farklı ışık şiddetleri, çimlenmenin artırılması için denenebilecek yöntemler arasındadır.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda, apikal dominansinin kırılması amacıyla MS besin ortamı içeren 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerde çimlendirilen tohumlardan gelişen sürgünler üstten budama şeklinde kesilmiştir. Yaklaşık 1 hafta sonra kesilen yerlerden çoklu sürgünlerin oluşumunun yanı sıra, tohumların dip kısımlarından da sürgün oluşumlarının meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, *V. caracalla* türünde çoklu sürgün oluşumu için apikal dominansinin kırılması ile ilgili çalışmaların gerçekleştirilmesi gerektiği önerilmektedir.

Çalışmada, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS, WPM ve N6 temelli besin ortamlarında sürgün ucu ve nod eksplantları kullanılarak sürgün rejenerasyon denemeleri kurulmuştur. En yüksek ortalama sürgün uzunluğu (4.52cm) ve en yüksek çoğaltım katsayısı (1.62), sürgün ucu*WPM besin ortamı kombinasyonunda saptanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamı ve eksplant tipinin ortalama sürgün uzunluğu üzerinde %1 oranında önemli olduğu belirlendiğinden, bu çalışmada kullanılmayan farklı temelli besin ortamları denenerek elde edilen ortalama sürgün uzunluğunun artırılması önerilebilir. Ayrıca çalışmada hiperhidrisite parametresinin incelenmesi sonucunda da; en düşük değer %9.53 oranıyla N-22 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir. Çalışmada vitrifikasyon problemi tam olarak çözülemediği için farklı besin ortamları ve jelleştirici ajanlar kullanılarak vitrifikasyon denemeleri yapılması önerilmektedir.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün rejenerasyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla çalışmada, farklı konsantrasyonlarda BAP ve BAP+IBA ile desteklenmiş MS besin ortamlarında sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alınmışlardır. Veriler değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (5.05 cm) ve en yüksek çoğaltım katsayısı (1,48), HS4 besin ortamında kültüre

alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Ayrıca bitki büyüme düzenleyicileri ve eksplant tipi ortalama sürgün uzunluğu üzerinde %1 seviyesinde önemli bulunduğundan; özellikle diğer *Vigna* türlerinde sıklıkla kullanılan TDZ gibi farklı bitki büyüme düzenleyicileri de denenebilir. Ayrıca çoğaltım katsayısını arttırıcı diğer tip besin ortamları ve kültür koşulları da araştırılması gereken faktörlerdir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin hiperhidrisiteye etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen denemeler sonucunda, en düşük hiperhidrisite yüzdesi (%28,53), 0.25 mg/L BAP ile desteklenmiş (BS4) besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir. Hiperhidrisite yüzdesinin azaltılması için farklı konsantrasyonlarda BAP ve diğer hormon denemeleri gerçekleştirilebilir.

Işık şiddeti, eksplant tipi ve jelleştirici ajanların sürgün rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla N₆ temelli besin ortamlarında kurulan denemeler sonucunda; en yüksek ortalama sürgün uzunluğu veren (3.58 ve 3.57 cm) sırasıyla N-26 ve N₆ besin ortamlarında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarında belirlenmiştir. En yüksek çoğaltım katsayısı (1.71) N-21 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir. Işık şiddeti, eksplant tipi ve jelleştirici ajanın ortalama sürgün uzunluğu ve çoğaltım katsayısı üzerinde %1 oranında önemli bulunduğu için çalışmada kullanılmayan farklı temelli besin ortamları, farklı jelleştirici ajanları ve farklı ışık şiddetleri kullanılarak ortalama sürgün uzunluğunun arttırılması için çeşitli denemeler yapılabilir. Işık şiddeti, eksplant tipi ve jelleştirici ajanların hiperhidrisite yüzdesi üzerine etkileri incelendiğinde, en düşük hiperhidrisite yüzdesi (%4.96), N-26 besin ortamında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir. Hiperhidrisite yüzdesinin azaltılması için farklı ışık şiddeti ve jelleştirici ajanlarda sürgün ucu ve nod eksplantları kültüre alınarak yeni denemeler gerçekleştirilebilir.

Nekroz bu çalışmada karşılaşılan ana problemlerden biridir. Çalışmada karşılaşılan en büyük problemlerden biri olan nekroz; bitki büyüme düzenleyicileri, kalsiyum, boron, bitkinin tabanında gelişen kallus benzeri yapı, besin ortamında kullanılan karbon kaynağı, besin ortamı tipi ve tuz konsantrasyonu, azot, kükürt, havalandırma, aktif karbon, jelleştirici ajan, pH gibi çok çeşitli sebeplerden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Bairu et al., 2009). *Vigna caracalla* bitkisinde gözlemlenen sürgün ucu nekrozunun engellenmesi için; karbon kaynağı, pH, havalandırma ve aktif karbon gibi denemelerin gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen 5 farklı jelleştirici ajanla katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarının farklı ışık şiddetlerine maruz bırakılması sonucunda kök oluşumları elde edilmiştir. En yüksek kök rejenerasyon yüzdesi (%85.71) ve en yüksek ortalama kök sayısı (3.71), N-26 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. En yüksek ortalama kök uzunluğu (0.49 cm) ise yine N-26 besin ortamında 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Işık şiddeti, eksplant tipi ve jelleştirici ajanın kök rejenerasyon yüzdesi, ortalama kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu üzerinde %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. Daha yüksek kök rejenerasyon yüzdesi, ortalama kök sayısı ve ortalama kök uzunluğu elde edilmesi amacıyla; köklendirme için kullanılan IBA ve IAA başta olmak üzere çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamlarında ve farklı ışık şiddetlerinde sürgünlerin kültüre alınması önerilebilir.

Yapılan çalışma, *Vigna caracalla* bitkisinde gerçekleştirilen ilk *in vitro* çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bu sebeple elde edilen veriler bundan sonra yapılacak çalışmalara yol gösterici olacaktır. Çalışma sonucunda ulaşılan veriler ışığında *Vigna caracalla*'nın ticari üretimi, biyoreaktörlerde kitlesel üretimi, sekonder metabolit çalışmaları, yeni çeşitlerin eldesine yönelik biyoteknolojik çalışmalar gibi çok farklı alanlarda çalışmalar gerçekleştirilebilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aasim, M., Khawar, K., Özcan, S.**, 2008, *In vitro* micropropagation from shoot meristems of turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkiz, Bangladesh J. Bot., 37(2), 149-154 p.
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., Hajyzadeh, M., Mahmud, S. T., Ozcan. S.**, 2011, *In vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce, African Journal of Biotechnology Vol. 10(11), pp. 2020-2023
- Adlinge, P. M., Samal, K. C., Kumara Swamy, R. V., Ranjan Rout, G. R.**, 2014, Rapid *in vitro* plant regeneration of black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) var. sarala, an important legume crop, Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci., 84(3), 823–827 p.
- Ahmad, F., Anwar, F., Hira, S.**, 2016, Review on medicinal importance of fabaceae family, PhOL vol.3, 151-156 p.
- Ahmed, T., Uddin Imam, K. M. S., Rahman, S., Moin Mou, S., Choudhury, M. S., Mahal, M. J., Jahan, S., Hossain, M. S., Rahmatullah, M.**, 2012, Antihyperglycemic and antinociceptive activity of Fabaceae family plants – an evaluation of *Mimosa pigra* L. stems, Advances in Natural and Applied Sciences, 6(8), 1490-1495 p.
- Anderson, H.** “Tissue culture types, techniques and process” <https://www.microscopemaster.com/tissue-culture.html> (2010) (Erişim tarihi: 01.07.2018)
- Anderson, N. O., Asche, P. D.**, 1994, Breakup of linkages for diagnostic traits in three-species congruity backcross (cbc) Phaseolus hybrids, HortScience, vol. 29 ,no. 5, 496 p.
- Armstrong, W. P.** “Legume family (Fabaceae)”, <http://www2.palomar.edu/users/warmstrong/legume1.htm> (Erişim tarihi:01.07.2018b)
- Armstrong, W. P.** “The Fabulous nickernuts”, <http://www2.palomar.edu/users/warmstrong/nicker.htm> (Erişim tarihi:01.07.2018a)
- Armstrong, W. P.** “The Peanut: A Subterranean Legume” <http://www2.palomar.edu/users/warmstrong/ecoph8b.htm> (2009) (Erişim tarihi: 01.07.2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Avenido, R. A., Hautea, D. M., Mendoza, C. J., Carandang, S.L. 1991.** Clonal propagation of F1 hybrids of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) x blackgram (*V. mungo* L. Hepper) by tissue culture. International Information System For The Agricultural Science And Technology
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2001,** Bitki Biyoteknolojisi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları
- Bennet, B. C.** “Twenty-five economically important plant families”, <http://www.eolss.net/sample-chapters/c09/e6-118-03.pdf> (Erişim tarihi:01.07.2018)
- Bhatia, S. and Sharma, K., 2015,** Micropropagation, Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, 361-368 p.
- Chanda, S., Dudhatra, S., Kaneria, M., 2010,** Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the Fabaceae family, *Food Funct.*, 1, 308–315 p.
- Chawla, H. S., 2004,** Introduction to Plant Biotechnology, Science Publisher, Inc.
- Chu, C. C., Wang, C.C., Sun, C.S., Msu, C., Yin K. C., Chu, C. Y., Bi, C. Y., 1975,** Establishment of an efficient medium for anther cultures of rice through comparative experiments on nitrogen sources, *Sci Sinica* 18, 659-668 p.
- Dewir, Y. H., Murthy, H. N., Ammar, M. H., Alghamdi, S. S., Al-Suhaibani, N. A., Alsadon, A. A., Paek, K. Y., 2016,** *In vitro* rooting of leguminous plants: difficulties, alternatives, and strategies for improvement, *Hortic. Environ. Biotechnol.* 57(4):311-322 p.
- Diallo, M.S., Ndiaye, A., Sagna, M. and Gassama-Dia, Y.K. 2008.** Plant regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.) *African Journal of Biotechnology.* Vol 7(16):2828-2833 pp.
- Doyle, J., J., 2001,** Encyclopedia of Genetics, 1081-1085 p.
- Etcheverry, A.V., Aleman, M. M., Fleming T. F., 2008,** Flower morphology, pollination biology and mating system of the complex flower of *Vigna caracalla* (Fabaceae: Papilionoideae), *Annals of Botany* 102, 305–316 p.
- Farsana, K., Thomas B., 2016,** Eye-catching ornamental members of Fabaceae, Caesalpiniaceae and Mimosaceae, *International Journal of Botany Studies*, Volume 1, Issue 4, 39-42 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. D.**, 2007, Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background, Springer Science & Business Media
- Graham, P. H., Vance C. P.**, 2003, Legumes: importance and constraints to greater use, *Plant Physiol.*, 131(3), 872-877.
- Gulati, A. and Jaiwal, P.K.** 1992. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 199-205 pp.
- Gulati, A. and Jaiwal, P.K.** 1994. Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna Radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell Report.* 13:523-527 pp.
- Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Kasprowicz-Potocka, M., Frias J.**, 2014, Non-nutritive compounds in fabaceae family seeds and the improvement of Their Nutritional Quality by Traditional Processing – a Review, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 64, No. 2, 75–89 p.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M., Fedakar, S. O.**, 2013. Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Uygulamaları, Ege Üniversitesi Yayınları Mühendislik Fakültesi Yayın No: 58
- Iliev, I., Gajdosova, A., Libiakova, G., Jain, S. M.**, 2018, Plant Micropropagation, Doi: 10.1002/9780470686522.ch1
- Mahbubur Rahman, A. H. M. and Ismot Ara Parvin, M.**, 2014, Study of medicinal uses on fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh, *Research in Plant Sciences* Vol. 2, No. 1, 6-8 p.
- Molares, S. and Ladio, A.**, 2011, The usefulness of edible and medicinal fabaceae in argentine and chilean patagonia: environmental availability and other sources of supply, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2012, 12 p.
- Mundhara, R. and Rashid, A.**, 2006, Recalcitrante grain legume *Vigna radiata*, öümng bean, made to regenerate on change of hormonal and cultural conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85:265-270 pp.
- Murashige, T., and Skoog, F.**, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Natural Sources Conservation Service.** 2018.
<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VICA83> (Erişim tarihi: 20.07.2018)
- Patel, S., Panchal, H., Smart, J., Anjaria, K.,** 2013, Distribution of Leguminosae family members in Gujarat State of India: Bioinformatics Approach, International Journal of Computer Science and Management Research, Vol 2 Issue 4
- Petruzzello, M. 2015.** “List of economically important members of the family Fabaceae”, <https://www.britannica.com/topic/list-of-economically-important-members-of-the-family-Fabaceae-2021802> (erişim tarihi: 01.08.2018)
- Polhill, R., M. and P. H. Raven,** 1981, Advances in legume systematics, parts 1 and 2. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Raj, A.,** “Top 8 Types of Tissue Culture | Biotechnology” <http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-tissue-culture/top-8-types-of-tissue-culture-biotechnology/61267> (Erişim tarihi:01.07.2018)
- Rao, S., Patil, P.,** 2014, *In vitro* selection of salt tolerant calli lines and regeneration of salt tolerant plantlets in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek), Indian Journal of Biotechnology, 197-212 p.
- Saha, P., Afrin, M., Mohiuddin, A. K. M., Shohael, A. M.** 2017. Development of an effective *in vitro* Regeneration protocol for BARI Mash 2 (*Vigna mungo* L.) an important legume crop in Bangladesh. Jahangirnagar University J. Biol. Sci. 6(1): 23-33
- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., Yadav, V., Upadhyay, A., Ahmad, Z.,** 2017, Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture, Plant Biotechnology: Principles and Applications, Doi:10.1007/978-981-10-2961-5_1
- Silue, N., Kone, T., Soumahoro, A. B., Kone, M.,** 2016, *In vitro* shoot tip multiplication of bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.], Plant Cell Tiss Organ Cult,127, 603–611 p.
- Suleiman, M. K.,** 2010, Seed germination of ornamental plants: A greenery plan contribution, Archives of Agronomy and Soil Science, Volume 49, 37-44 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Şahinoğlu, S., 2011, Lathyrus cinsinin Cicercula seksiyonundan bazı türlerin tohum kabuğu yapısı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 54 s.

Takahashi, Y., Somta, P., Muto, C., Iseki, K., Naito, K., Pandiyan, M., Natesan, S., Tomooka, N., 2016, Novel genetic resources in the genus *Vigna* unveiled from gene bank accessions, Plos one, | Doi:10.1371/journal.pone.0147568

Thorat, B. S., Patil, R. R., Kamble A.R., 2017, Effect of growth regulators on germination and vigour of cow pea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seeds, International Journal of Chemical Studies; 5(6): 766-769

Orman Bölge Müdürlüğü.
<https://izmirobm.ogm.gov.tr/SitePages/OGM/OGMBiliyormuydunuz.aspx?l=64cb0954-5394-4fcc-83e9-dc545a01a899&i=1> (Erişim tarihi: 01.07.2018)

Wojciecjowski, M. F., Mahn, J., Jones, B. “Fabaceae”, <http://www.tolweb.org/Fabaceae> (2006) (Erişim tarihi: 01.07.2018)

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Aydın'da doğdu. Lise öğrenimini Balıkesir'in Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2010 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü'nü kazandı. 2016 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyomühendis ünvanını aldı. Aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

