

**MEMELİ CİNSİYET HORMONLARININ
GAZALBOYNUZU (*Lotus corniculatus* L.) BİTKİSİNİN
İN VİTRO REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Pınar UYSAL

Doktora Tezi

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Çayır Mera ve Yem Bitkileri Bilim Dalı

Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

Prof. Dr. Mustafa TAN

2014

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MEMELİ CİNSİYET HORMONLARININ GAZALBOYNUZU
(*Lotus corniculatus* L.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO* REJENERASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ

Pınar UYSAL

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
Çayır Mera ve Yem Bitkileri Bilim Dalı

ERZURUM

2014

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

MEMELİ CİNSİYET HORMONLARININ GAZAL BOYNUZU (*Lotus corniculatus*) BİTKİSİNİN *IN VITRO* REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU yöneticiliğinde ve Prof. Dr. Mustafa TAN ortak danışmanlığında, Pınar UYSAL tarafından hazırlanan bu çalışma 31.12.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Çayır Mera ve Yem Bitkileri Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Cengiz SANCAK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mustafa TAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Binali ÇOMAKLI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Metin TOSUN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 22 / 01 / 2015 tarih ve 03 / 84... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

MEMELİ CİNSİYET HORMONLARININ GAZALBOYNUZU (*Lotus corniculatus* L.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO* REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Pınar UYSAL
Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Çayır Mera ve Yem Bitkileri Bilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU
Ortak Danışman: Prof. Dr. Mustafa TAN

Yüksek besleme değerine sahip, şişme yapmayan, çok yıllık, baklagil yem bitkisi olan *Lotus corniculatus* L. baklagillerdeki transformasyon çalışmaları için model bitki olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı *Lotus corniculatus* bitkisinin kök meristemlerinin ve kotiledon yapraklarının *in vitro* rejenerasyonu üzerine memeli cinsiyet hormonlarından 17 β -estradiol, estron, progesteron ve testosteronun etkisini belirlemektir. Yapılan çalışmada 4 farklı memeli cinsiyet hormonunun 0, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶mM dozları ve bu hormonların ikili kombinasyonları denenmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda denenilen tekli hormon doz ve konsantrasyonlarında kotiledon yapraklarının tamamen öldüğü 6B5T, 4T6P, 5T5P, 5T6P ve 6T6P ikili hormon kombinasyonlarında ise çok az bir kısmının rejenere olduğu görülmüştür.

Kök meristemleri ile denenilen memeli cinsiyet hormonlarının etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Tekli hormon uygulamalarında KSOE, TSOE, EBKSS bakımından en iyi sonucu kontrol grubu vermiş olup bunu 17 β -estradiol'ün 10⁻⁵ mM dozu takip etmiştir. EBSS bakımından en iyi hormon grubu estron olup 10⁻⁶ mM dozu öne çıkmıştır. KZSOE bakımından en iyi sonucu testosteronun 10⁻⁶mM dozu vermiştir. SKOE bakımından 17 β -estradiol'ün 10⁻⁴ mM dozu öne çıkmıştır. EBKZSS bakımından en iyi hormon grubunun estron olduğu ve bunu progesteronun takip ettiği bulunmuştur. RE bakımından uygulamalar arasındaki farkın önemli olmadığı gözlemlenmiştir.

Kök meristemlerinin hormon kombinasyonlarına tepkileri incelendiğinde rejenerasyon kapasitesi üzerine önemli etkisi olan KSOE, EBSS, EBKSS VE TSOE parametreler bakımından genel olarak en iyi karışımın progesteron+estron karışımı olduğu ve bu kombinasyonun en etkili bileşiminin ise 10⁻⁶mM progesteron+10⁻⁴mM estron olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla 10⁻⁴ mM progesteron+10⁻⁶mM estron ve 10⁻⁵mM progesteron+10⁻⁴mM estron izlemiştir. Kontrol ise 10⁻⁵mM progesteron+10⁻⁵mM estron ve 10⁻⁵mM progesteron+10⁻⁶mM estron kombinasyonları hariç hepsinin gerisinde kalmıştır.

2014, 171 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus*), doku kültürü, 17 β -estradiol, estron, progesteron, testosteron

ABSTRACT

P.h.D Dissertation

THE EFFECT OF MAMMALIAN SEX HORMONES ON THE *IN VITRO* REGENERATION OF BIRDSFOOT TREFOIL (*Lotus corniculatus* L.)

Pınar UYSAL

Atatürk University
Schools of Applied and Natural Sciences
Department of Field Crops
Meadow, Rangeland and Forage Crops
Advisor: Prof. Dr.Kamil HALILOĞLU
Co-advisor: Prof. Dr. Mustafa TAN

Perennial legume crop birdsfoot trefoil having a high-nutritive value does not cause rumen distensions and used as a model plant for the transformation studies in legumes. The aim of this study was to determine the effect of four different mammalian sex hormones, 17 β -estradiol, estron, progesterone and testosterone, on in-vitro regeneration of root meristem tissues and cotyledons of *Lotus corniculatus*. In this study, 0, 10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶ mM rates and binary combinations of these hormones were tested. It was observed that all cotyledon leaves were dead in single hormone doses and concentrations as a small proportion of cotyledons were managed to regenerate at binary hormone combinations of 6B5T, 4T6P, 5T5P, 5T6P and 6T6P.

It was also observed that tested mammalian sex hormones were interacted with root meristems. In single hormone applications, the best results were obtained from control group regarding KSOE, TSOE and EBKSS. It was followed by 10⁻⁵ mM rate of 17 β -estradiol. Considering EBSS, the best hormone group was estron and it was outshined with its 10⁻⁶ mM rate. On the other hand, testosterone yielded the best result with the rate of 10⁻⁶ mM with regard to KZSOE. Moreover, 10⁻⁴ mM rate of 17 β -estradiol was prominent considering SKOE. Also, the best hormone group was estron as followed by progesteron for EBKZSS. However, the difference between the applications was not significant for RE.

When examined the responses of the root meristems to the hormone combinations, it was determined that the best combination was progesteron+estron combination on the regeneration capacity regarding the KSOE, EBSS, EBKSS and TSOE parameters with the best effective mixture of progesteron+estron hormones with a 10⁻⁶ mM progesteron+10⁻⁴ mM estron dose. It was followed by 10⁻⁴ mM progesteron+10⁻⁶ mM estron and 10⁻⁵ mM progesteron+10⁻⁴ mM estron in respective order. In general, excluding 10⁻⁵ mM progesteron+10⁻⁵ mM estron and 10⁻⁵ mM progesteron+10⁻⁶ mM estron combinations and rates, control group, on the other hand, was left behind the all hormone combinations.

2014, 171 pages

Keywords: Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.), tissue culture, 17 β -estradiol, estron, progesteron, testosterone

TEŞEKKÜR

Gerek doktora ders ve tez aşamasında, gerekse Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde yürütmekte olduğum projelerde bilgi ve görüşleriyle çalışmalarına yön veren Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. Mustafa TAN'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bilimsel hazırlık aşamasında Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden lisans düzeyinde on dört ders almama vesile olarak bu bölümü bana sevdiren, çalışmalarım esnasında teşvik ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocalarım, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma sonuçlarının istatistiki yönden değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Armağan HAYIRLI'ya çok teşekkür ederim.

Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğündeki işlerimde büyük desteğini gördüğüm çok kıymetli arkadaşım Sayın Kadir TERZİOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı geceleri yapmak zorunda kaldığım için yanımda kalarak bana manevi destek veren anneme, doktora çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babama, ablama ve abime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Pınar UYSAL

Aralık, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Tohumların çimlendirilmesi.....	26
3.1.2. Bitkilerden eksplantların alımı.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Sterilizasyon yöntemleri	28
3.2.1.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu	28
3.2.1.b. Tohumların yüzey sterilizasyonu	29
3.2.1.c. Besi ortamının ve diğer bileşenlerinin sterilizasyonu	29
3.2.1.d. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı.....	29
3.2.2. MS temel besi ortamı ve vitaminleri.....	29
3.2.2.a. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı MS için stok solüsyonların hazırlanışı	30
3.2.2.b. MS vitamin stok solüsyonlarının hazırlanışı.....	32
3.2.3. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar	33
3.2.4. MS ortamlarının hazırlanması.....	35
3.2.5. Araştırmada incelenen konular	36
3.2.5.a. Birinci ayın sonunda alınan gözlemler.....	36
3.2.5.b. İkinci ayın sonunda alınan gözlemler	37
3.2.5.c. Üçüncü ayın sonunda alınan gözlemler	37
3.2.6. Verilerin istatistiksel analizi	39

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1. Ana Etkiler	40
4.1.1. Kotiledon yaprakları	40
4.1.2. Kök eksplantları	44
4.1.2.a. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	44
4.1.2.b. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	53
4.1.2.c. Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	60
4.1.2.d. Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi.....	68
4.1.2.e. Rejenerasyon etkinliği.....	76
4.1.2.f. Eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS)	77
4.1.2.g. Eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)	80
4.1.2.h. Eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)	82
4.2. Kombinasyonlar	92
4.2.1. Kotiledon yaprakları	92
4.2.2. Dozları dikkate alınmaksızın memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarının kök eksplantları üzerine etkisi	94
4.2.2.a. Dozları dikkate alınmaksızın ikili hormon kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)	95
4.2.2.b. Hormon kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE).....	97
4.2.2.c. Hormon kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) üzerine etkisi.....	99
4.2.2.d. Hormon kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) üzerine etkisi	101
4.2.2.e. Hormon kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliği (RE) üzerine etkisi ...	103
4.2.2.f. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS)'na etkileri	104
4.2.2.g. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na etkileri.....	105
4.2.2.h. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)'na etkileri	107

4.2.3. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının kök eksplantları üzerine etkisi	118
4.2.3.a. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	118
4.2.3.b. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	122
4.2.3.c. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi.....	125
4.2.3.d. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine etkisi.....	128
4.2.3.e. Rejenerasyon etkinliği.....	133
4.2.3.f. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS)'na etkileri.....	134
4.2.3.g. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na etkileri	136
4.2.3.h. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)'na etkileri	137
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	143
5.1. Ana Etkiler	143
5.2. Kombinasyonlar	159
5.3. Sonuç ve Öneriler	162
5.3.1. Sonuçlar	163
5.3.2. Öneriler	165
KAYNAKLAR	166
ÖZGEÇMİŞ	172

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
g	Gram
kPa	Kilo paskal
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
M	Molar
mM	Milimolar
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

BAP	6- Benzil amino pürin
MS	Temel besi ortamı, Murashige and Skoog (1962)
MES	2-(N-morpholino) ethansülfonik asit
UV	Ultraviyole
SS	Standart sapma
KT	Kareler toplamı
KO	Kareler ortalaması
SD	Serbestlik derecesi
MCH	Memeli cinsiyet hormonu
B	17- β Estradiol
E	Estron
P	Progesteron
T	Testosteron
B+T	17β-estradiol+testosteron
4B+4T	10 ⁻⁴ mM 17β-estradiol+10 ⁻⁴ mM testosteron

4B+5T	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM testosterone
4B+6T	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM testosterone
5B+4T	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM testosterone
5B+5T	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM testosterone
5B+6T	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM testosterone
6B+4T	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM testosterone
6B+5T	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM testosterone
6B+6T	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM testosterone
B+E	17 β -estradiol+ estron
4B+4E	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM estron
4B+5E	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM estron
4B+6E	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM estron
5B+4E	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM estron
5B+5E	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM estron
5B+6E	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM estron
6B+4E	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM estron
6B+5E	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM estron
6B+6E	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM estron
B+P	17 β -estradiol+progesteron
4B+4P	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM progesteron
4B+5P	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM progesteron
4B+6P	10^{-4} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM progesteron
5B+4P	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM progesteron
5B+5P	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM progesteron
5B+6P	10^{-5} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM progesteron
6B+4P	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-4} mM progesteron
6B+5P	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-5} mM progesteron
6B+6P	10^{-6} mM 17 β -estradiol+ 10^{-6} mM progesteron
P+E	Progesteron+ estron
4P+4E	10^{-4} mM progesteron+ 10^{-4} mM estron
4P+5E	10^{-4} mM progesteron+ 10^{-5} mM estron
4P+6E	10^{-4} mM progesteron+ 10^{-6} mM estron

5P+4E	10^{-5} mM progesteron+ 10^{-4} mM estron
5P+5E	10^{-5} mM progesteron+ 10^{-5} mM estron
5P+6E	10^{-5} mM progesteron+ 10^{-6} mM estron
6P+4E	10^{-6} mM progesteron+ 10^{-4} mM estron
6P+5E	10^{-6} mM progesteron+ 10^{-5} mM estron
6P+6E	10^{-6} mM progesteron+ 10^{-6} mM estron
KSOE (%)	Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi
SKOE (%)	Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi
KZSOE (%)	Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi
TSOEO (%)	Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi
EBSS (adet)	Eksplant başına sürgün sayısı
EBKSS (adet)	Eksplant başına köklü sürgün sayısı
EBKZSS (adet)	Eksplant başına köksüz sürgün sayısı
RE (adet)	Rejenerasyon etkinliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kotiledon yapraklarının kesim yerleri	26
Şekil 3.2. Kullanılan memeli cinsiyet hormonlarının açık formülleri	34
Şekil 4.1. Kısa bir süre büyüme gözlenen kotiledon yaprakları	41
Şekil 4.2. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri ..	41
Şekil 4.3. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri .	42
Şekil 4.4. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri.	43
Şekil 4.5. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri.	44
Şekil 4.6. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının kullanıldığı ortamlarda ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)	46
Şekil 4.7. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)	46
Şekil 4.8. Hormonlara ve dozlara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)	47
Şekil 4.9. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi.....	48
Şekil 4.10. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları...	50
Şekil 4.11. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar	51
Şekil 4.12. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)	52
Şekil 4.13. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE)	54
Şekil 4.14. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE).....	55
Şekil 4.15. Hormonlara ve dozlara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE).....	55
Şekil 4.16. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi.....	57
Şekil 4.17. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları.	58
Şekil 4.18. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar	59
Şekil 4.19. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO)	61

Şekil 4.20. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre ortalama toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO).....	62
Şekil 4.21. Hormonlara ve dozlara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO)	62
Şekil 4.22. Sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi	64
Şekil 4.23. Sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları .	65
Şekil 4.24. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesine sürenin etkisi	66
Şekil 4.25. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO).....	67
Şekil 4.26. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE).....	69
Şekil 4.27. Hormonlara ve dozlara göre sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE)	71
Şekil 4.28. Sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) hormon dozlarının etkisi	72
Şekil 4.29. Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları	73
Şekil 4.30. Sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar.....	74
Şekil 4.31. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi	75
Şekil 4.32. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama eksplant başına köksüz sürgün sayısı	78
Şekil 4.33. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre eksplant başına köksüz sürgün sayısı.....	79
Şekil 4.34. Eksplant başına köksüz sürgün sayısına (EBKZSS) hormon dozlarının etkisi	79
Şekil 4.35. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının eksplant başına sürgün sayısı.....	80
Şekil 4.36. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre eksplant başına sürgün sayısı.....	81
Şekil 4.37. Eksplant başına sürgün sayısına (EBSS) hormon dozlarının etkisi.....	82
Şekil 4.38. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı .	83
Şekil 4.39. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre ortalama eksplant başına köklü sürgün sayısı	84
Şekil 4.40. Hormonlara ve dozlara göre eksplant başına köklü sürgün sayısı.....	85

Şekil 4.41. Eksplant başına köklü sürgün sayısına hormon dozlarının etkisi.....	86
Şekil 4.42. Eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından hormon ve dozları.....	87
Şekil 4.43. Testosteron içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü	88
Şekil 4.44. Estron içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	89
Şekil 4.45. Progesteron içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	90
Şekil 4.46. 17 β -estradiol içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	91
Şekil 4.47. Hormon içermeyen kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	92
Şekil 4.48. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarının kotiledon yaprak eksplantları üzerine 30. günde etkisi	93
Şekil 4.49. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarında bir ay süreyle kültüre alınan ve bu süre sonunda canlı kalan kotiledon yaprak eksplantlarının sadece BAP içeren ortamda bir ay kültüre edildikten sonraki görünümleri	94
Şekil 4.50. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	96
Şekil 4.51. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının köksüz sürgün	98
Şekil 4.52. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO).....	100
Şekil 4.53. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE).....	102
Şekil 4.54. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliği.....	103
Şekil 4.55. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı.....	106
Şekil 4.56. Eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS).....	107
Şekil 4.57. 17 β -Estradiol+testosteron(B+T) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	109

Şekil 4.58. 17 β -Estradiol+testosteron (B+T) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.	110
Şekil 4.59. 17 β -Estradiol+testosteron (B+T) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.....	111
Şekil 4.60. 17 β -estradiol+estron (B+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.....	112
Şekil 4.61. 17 β -estradiol+estron (B+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.....	113
Şekil 4.62. 17 β -estradiol+estron (B+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.	114
Şekil 4.63. 17 β -estradiol+progesteron (B+P) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.	115
Şekil 4.64. 17 β -estradiol+progesteron (B+P) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.....	116
Şekil 4.65. 17 β -estradiol+progesteron (B+P) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.....	117
Şekil 4.66. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE).....	119
Şekil 4.67. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE) bakımından aylar	120
Şekil 4.68. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	121
Şekil 4.69. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE).....	123
Şekil 4.70. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) bakımından aylar.....	124
Şekil 4.71. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının aylara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	124
Şekil 4.72. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO).....	126
Şekil 4.73. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%TSOEO) sürenin etkisi	127

Şekil 4.74. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının aylara göre sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi	127
Şekil 4.75. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi	129
Şekil 4.76. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) bakımından ayların etkisi	130
Şekil 4.77. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE)'na ayların etkisi	130
Şekil 4.78. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarında sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE)'nın aylara göre değişimi	132
Şekil 4.79. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliği	131
Şekil 4.80. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısı	135
Şekil 4.81. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı	137
Şekil 4.82. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı	138
Şekil 4.83. Progesteron+estron(P+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	139
Şekil 4.84. Progesteron+estron (P+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü	140
Şekil 4.85. Progesteron+estron (P+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.	141
Şekil 4.86. Tüm rejenere bitkilerin büyütülmesi	142

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları	30
Çizelge 3.2. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan standart kimyasallar ..	33
Çizelge 3.3. Kullanılan memeli cinsiyet hormonları, kombinasyonları ve dozları	33
Çizelge 3.4. Askorbik Asit ve BAP (6-Benzil amino pürin) stok solusyonun hazırlanışı.....	34
Çizelge 3.5. Memeli cinsiyet hormonlarının stok solusyonlarının hazırlanışı.....	34
Çizelge 4.1. Farklı memeli cinsiyet hormon tipleri ve dozlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	45
Çizelge 4.2. Farklı memeli cinsiyet hormon tipleri ve dozlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	45
Çizelge 4.3. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KSOE) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	51
Çizelge 4.4. Memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamalar	53
Çizelge 4.5. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KZSOE) ait varyans analiz sonuçları.....	53
Çizelge 4.6. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KZSOE) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	54
Çizelge 4.7. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) ait ortalamalar.....	59
Çizelge 4.8. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KZSOE) ait ortalamalar	60
Çizelge 4.9. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	60

Çizelge 4.10. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	61
Çizelge 4.11. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%TSOES) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	66
Çizelge 4.12. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamalar	67
Çizelge 4.13. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	68
Çizelge 4.14. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	69
Çizelge 4.15. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	74
Çizelge 4.16. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamalar	76
Çizelge 4.17. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının rejenerasyon etkinliğine ait varyans analiz sonuçları.....	76
Çizelge 4.18. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının rejenerasyon etkinliğine ait ortalamaları	77
Çizelge 4.19. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları	77
Çizelge 4.20. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	78
Çizelge 4.21. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları.....	80
Çizelge 4.22. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	81

Çizelge 4.23. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)'na ait varyans analiz sonuçları	82
Çizelge 4.24. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	83
Çizelge 4.25. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları.....	95
Çizelge 4.26. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon kombinasyonları (%KSOE) yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	97
Çizelge 4.27. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları.....	97
Çizelge 4.28. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) bakımından hormon kombinasyonlarına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	99
Çizelge 4.29. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları.....	99
Çizelge 4.30. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	101
Çizelge 4.31. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) ait varyans analiz sonuçları	101
Çizelge 4.32. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	102
Çizelge 4.33. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait varyans analiz sonuçları.....	103
Çizelge 4.34. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	104
Çizelge 4.35. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları.....	104
Çizelge 4.36. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait ortalamaları.	105

Çizelge 4.37. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na ait varyans analiz sonuçları.....	105
Çizelge 4.38. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na ait ortalamalara ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	106
Çizelge 4.39. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları.....	107
Çizelge 4.40. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	108
Çizelge 4.41. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	118
Çizelge 4.42. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	119
Çizelge 4.43. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	122
Çizelge 4.44. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	123
Çizelge 4.45. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	125
Çizelge 4.46. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	126
Çizelge 4.47. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları	128
Çizelge 4.48. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	128
Çizelge 4.49. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait varyans analiz sonuçları.....	133
Çizelge 4.50. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	133

Çizelge 4.51. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları.....	134
Çizelge 4.52. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	135
Çizelge 4.53. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları	136
Çizelge 4.54. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	136
Çizelge 4.55. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları	137
Çizelge 4.56. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları	138

1. GİRİŞ

Fitohormonlar bitkilerdeki büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olayları yönlendiren, bir dokuda sentezlenerek, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınabilen, oluşturuldukları dokularda etkin olabildikleri gibi gittiği doku ve organlarda büyüme ve farklılaşmaya neden olan, çok düşük konsantrasyonlarda dahi etkisini gösteren endojen organik bileşiklerdir (Babaoğlu vd 2001; Aydoğdu ve Boyraz 2005; Kılıç 2007; Kumlay ve Eryiğit 2011).

Bu bileşikler bitki hormonları veya bitki büyüme düzenleyicileri olarak da bilinirler. Bitkinin kendi yapısındaki bu maddeler “hormon” olarak isimlendirilirken bitki doku kültürü ortamlarına sonradan eklendiklerinde dışardan eklendiklerini belirtmek için “bitki büyüme düzenleyicileri (BBD)” olarak da isimlendirilirler (Acemi 2011). Bitki büyüme düzenleyicileri kavramı; bitki büyümesini etkilediği belirlenen hem tabii hem de sentetik maddeler için kullanılır (Aydoğdu ve Boyraz 2005).

Bitki büyüme düzenleyicilerinin (BBD) önemi ilk kez 1930’lu yıllarda anlaşılmış, bu tarihten itibaren bunların tarımsal ürünlerdeki fonksiyonu araştırılmaya çalışılmıştır. Bitki fizyolojisi konularında yapılan çalışmalar, BBD’nin bitki büyüme ve gelişmesindeki rollerini ortaya koymuş ve zamanla bitki bünyesinde sadece büyümeyi teşvik eden maddelerin değil, aynı zamanda büyümeyi engelleyen maddelerin de sentezlendiği anlaşılmıştır. Bu nedenle, hormonları sadece “teşvik edici kimyasallar” olarak değerlendirmekten ziyade, “kimyasal düzenleyiciler” olarak adlandırmak daha doğrudur (Kumlay ve Eryiğit 2011).

Son zamanlara kadar bitki gelişiminin, sitokininler, oksinler, giberellinler, etilen, absisik asit olarak isimlendirilen beş tip hormon tarafından düzenlendiği biliniyordu bunun yanı sıra günümüzde jasmonik asit, salisilik asit ve polipeptit sistemi dahil, patojenlere direnç ve bitki zararlılarına karşı savunmada rol oynayan başka sinyal moleküllerinin de olduğu artık bilinmektedir (Taiz and Zeiger 2008). Steroid gruplarının büyük bir kısmı

hormonal özelliklere (brassinosteroidler, ecdysteroidler, progesteron, östrojenler) sahiptir. Fitosteroller pek çok bitki türünde sentezlenmektedir (Sarin 2005; Milanesi and Boland 2004). Devam eden araştırmalar, bitki ve hayvanlardaki steroidlerin rolü ve meydana gelmesi ile ilgili mevcut bilgilerin yeniden gözden geçirilmesine ve yeni keşiflere yol açmıştır (Janeczko *et al.* 2011). Dolayısıyla bitkilerde pek çok sayı ve tipte hormon ve hormon benzeri sinyal ajanlarının sayısı artmaya devam etmektedir (Taiz and Zeiger 2008).

En çok kullanılanlar oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir. Oksinler, fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus oluşumunu, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunu; sitokininlerle birlikte uygulandıklarında ise kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunu uyarabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Temel hormon formu IAA'dir (indol-3-asetik asit). Sentetik oksinler arasında NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve pikloram sayılabilir. Sentetik oksinler ticari uygulamalarda meyve dökümünün engellenmesi ve çeliklerin köklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu vd 2001).

En çok kullanılan sitokininler ise adenin (aminopürin) türevleridir. Bunlar içinde de BAP (benzil amino pürin) en çok kullanılanıdır. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyo genesisi engellerler. Özellikle son yıllarda çok sık kullanılan ve güçlü bir sitokinin aktivitesi TDZ ve CPPU'nun doku kültürlerinde kullanımı ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur. Fakat sentetik olarak elde edilen sitokinin benzeri bu iki maddenin kullanımı ile elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi oldukça zor olmaktadır. Doğal sitokinin formları, zeatin ve zeatin riboziddir (Babaoğlu vd 2001).

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesi ve adventif kök oluşumunu engellerler. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi artırır (Babaoğlu vd 2001).

Absisik asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunur. Absisik asitin doku kültüründeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte halen somatik embriyoların olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca yaprak ve meyve dökümü (absisyon) ve dormanside etkili olup, stomaların kapanmasını düzenlemesi diğer etkileri arasında sayılabilir (Babaoğlu vd 2001).

Etilen gaz halinde bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Bitkilerin gelişme evresine bağlı olarak farklı organlarda sentezlenen etilen; kök, gövde, yaprak, yumru, meyve ve tohum başta olmak üzere bitkinin tüm organlarında sentezlenir. Etilen temel olarak, strese cevap olarak sentezlenir ve daha çok olgun ve yaşlanmış dokularda bulunur. Sentezlendiği yerden kolayca difüze olabilen etilenin büyüme ve gelişmedeki rolünü belirlemek oldukça güçtür. Etilen sucul ve yarı sucul bitkilerin gövde, petiyol, kök ve çiçek yapılarının uzamasını sağlar. Fakat bezelyede gövde uzamasını inhibe eder. Etilen bir çok bitkide çiçeklenmeyi engellerken mango, ananas ve bazı süs bitkilerinde çiçeklenmeyi uyarır aynı zamanda çiçeklerin senesensinden de sorumludur. Etilen zamanından önce toplanan meyvelerin olgunlaştırılmasında da kullanılır (Özen ve Onay 2007).

Steroller bitki literatüründe sıkla tartışılan steroidlerdir. Steroller doymuş veya doymamış olabilen ve bir alkol grubu içeren kristal steroidlerdir (Sarin 2005). Steroller orjinlerine bağlı olarak zoosteroller (hayvanlarda), fitosteroller (bitkilerden), mycosteroller (funguslardan) ve marine steroller (deniz organizmalarından örneğin süngerler) diye adlandırılırlar (Sarin 2005).

Fitosteroller hem pek çok bitki türünden hemde pek çok bitki türünün doku kültüründen izole edilmiştir. Bu bitkilere örnek olarak, *Datura metel*, *Digitalis lanata*, *Dioscorea*

tokora, Helipterum roseum, Lindera strychnifolia, Momordica charantia, sesamumindicum, Stephania cepharantha, Tephrosia purpurea, Tobacco, Yucca glauca, Uncaria tomentosa verilebilir (Sarin 2005).

Farklı bitki türlerinde sentezlenen steroid hormonların hücre gelişimi, doku farklılaşması ve çimlenmeyi düzenleyebileceği rapor edilmiştir (Milanesi and Boland 2004).

Bitki sterolleri tüm ökaryotik organizmalarda hücre zarının temel bileşenleridir (Piironen *et al.* 2000). Diğer steroller gibi hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini düzenlerler, yüksek bitkilerdeki steroller serbest steroller olarak bulunurlar. Bitki sterolleri mantarlarda veya hayvanlarda olmayan birçok önemli moleküler türün karışımı olarak dokularda bulunur (Schaller 2003).

Bu bileşiklerden bazıları diğer steroidlerin ön maddeleri veya hücre zarı bileşenleri olarak hizmet görürler. Hem bitkiler hemde hayvanlar aleminde yaygın olarak bulunan steroller bunlara örnek olarak verilebilir (Janeczko 2012).

Steroid grubunun çok büyük bir kısmı düzenleyici (hormonal) özelliklere sahiptir. Brassinosteroidler bitki hormonları olarak biliniyorken, ecdysteroidler böcek hormonları olarak bilinirler (Janeczko 2012). Bitki ve hayvansal kaynaklardan türevlenen çeşitli steroidler vasküler bitki sistemleri ve alglerde *in vitro* hücre gelişimi ve doku farklılaşmasını etkilediği görülmüştür (Milanesi *et al.* 2001).

Steroidler bitkiler aleminde geniş bir şekilde yayılmışlardır (Milanesi *et al.* 2001).

Steroidler, canlılarda en temel bileşen gruplarından birisidir ve yapısal olarak sterane iskeletinden türemişlerdir. Günümüzde steroid grubu içerisindeki sınıflar: brassinosteroidler, ecdysteroidler, cucurbitacinler, cardenolidler, steroller, bufadienolidler, withanolidler, steroid alkaloidler, sapogeninler ve memeli steroid hormonlardır (Janeczko 2012). Memeli üremesi ve hücre metabolizması için çok önemli

olan, memeli steroid hormonları (kortikoidler, östrojenler, androjenler ve progesteron) (Janeczko 2012), pek çok bitki tarafından da sentezlenmektedir (Milanesi *et al.* 2001).

Memeli cinsiyet hormonlarının (MCH) bitkilerdeki varlığı 20. yüz yıl başlarında kabul edilmiştir. MSH'nın varlığında bitki fizyolojik proseslerini etkilenebilir ancak onların bitkilerdeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bitkilerdeki MCH üzerine literatür verileri oldukça azdır (Janeczko *et al.* 2012).

Memeli cinsiyet hormonlarından olan, progesteron, estron, testesteron, androsterone, β -estroidal ve 17β -estradiol hem bitkilerde hem de hayvanlarda doğal olarak meydana gelen steroidal bileşiklerdir. (Milanesi and Boland 2004; Janeczko *et al.* 2008; Erdal *et al.* 2012; Erdal 2012). Özellikle androsterone ve progesterone incelenen bitki türlerinin %80'ninden daha fazlasında bulunurken testesteron ve östrojenler (estron ve 17β -estradiol) sırasıyla %70 ve %50'sinde bulunmuştur. Memeli cinsiyet hormonlarının çeşitli vejetatif ve üreme organlarında meydana gelmesi, gelişme periyodu boyunca değişimleri, çevrim ve biyosentezi için enzimler pek çok bitkide tanımlanmıştır (Speranza 2010).

Khripach *et al.* (2000) bazı cinsiyet hormonlarının hücre seviyesinde uzama ve bölünmeyi uyardığı, hormonal denge, enzim aktivitesi, protein ve nükleik asit sentezinin aktivasyonu, proteinlerin amino asit kompozisyonuna ve protein spektrumuna etkili olduğu, hücre zarının ve yağ asidi kompozisyonları özellikleri üzerine ve fotosentetik aktivitenin artması üzerine etkili olduğu birçok araştırma sonucunda belirlenmiştir. Ayrıca bitki seviyesinde büyüme teşviki, vejetatif gelişim periyodunun kısaltılması, meyve büyüklüğü ve kalitesinin artırılması, besleyiciliği üzerine etkisi, stres, hastalık, olumsuz çevre şartlarına direncin artırılması ve bunlara bağlı olarak bitki verimini artırdığı gözlemlenmiş olduğunu belirtmişlerdir.

Dışardan uygulanan steroid hormonları, bitkilerde hücre bölünmesini, kök ve sürgün büyümesini, embryo gelişimini, polen çimlenmesini, bitkinin çiçeklenmesini ve gelişmesini uyarırlar (Janeczko *et al.* 2008; Speranza 2010; Janeczko *et al.* 2012). Bitki

gelişimi üzerine MCH'nın etkisi ile ilgili çalışmalara ilaveten bu bileşenlerin antistres aktivitesinin araştırılması ile ilgili yeni çalışmalar da vardır (Janeczko *et al.* 2012). Steroidal cinsiyet hormonları fitohormon olarak kabul edilmemesine rağmen onların bitki büyüme ve gelişmesi üzerindeki etkileri inkar edilemez (Speranza 2010).

Fitoöstrojenler östradiolün aktivitesini taklit ederler ancak onların etkileri aynı değildir Östrojenik aktivite gösteren ve fitoöstrojen olarak tanımlanan bileşiklerin 300'den fazla bitkide bulunduğu bilinmektedir (Adams 1995). Özellikle Leguminosae familyasındaki pek çok türün fitoöstrojen içerdiği bildirilmiştir (Yoo *et al.* 2005). Bitkilerdeki fito östrojen içeriği bir dizi faktöre bağlı olarak değişmektedir. Yonca, tek yıllık medikler (*Medicago spp*), ak üçgül (*Trifolium repens*), yeraltı üçgülü (*Trifolium subterraneum*), çayır üçgülü (*Trifolium pratense*), soya (*Glycine sp*) östrojenik mera bitkileridir. *Vicia americana*, *Astragalus serotinus*, *Lotus corniculatus* (Gazalboynuzu) gibi mera bitkilerinde östrojenik aktiviteye sahiptir (Adams 1995).

Gazalboynuzu ekstrem sıcaklığa, soğuğa, nemli şartlara, fakir ve asidik, eğimli topraklara yüksek tolerans gösterir. Kötü çevresel şartlara toleransının yüksek olması ve parazitik *Cuscuta* bitkilerinin saldırılarına yüksek direncinden dolayı pek çok alanda yoncaya tercih edilen (Ahuja *et al.* 1983; Nicolich *et al.* 1997; Nicolich *et al.* 2006; Nicolich *et al.* 2007; Raikar *et al.* 2008), iklim ve toprak istekleri bakımından geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip, yapay tohumlamaya iyi uyum gösteren, dipten dallanan, kendi kendini tohumlayarak varlığını uzun süre koruyan, yatık ve yarı-yatık gelişmesinden dolayı erozyonu önlemede büyük öneme sahip bir yem bitkisidir. Aynı zamanda pek çok araştırmacı *Lotus corniculatus*'un, doku kültürü tekniklerine uyumlu olduğunu bildirmiştir. Doku kültürü çalışmaları, gerek pratiğe yönelik uygulamalarda gerekse bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal olaylarını ortaya çıkarılmasını amaçlayan temel araştırmalarda kullanılmaktadır. Bitkilerin rejenerasyonu, transformasyonu ve *in vitro* çoğaltımı için etkili metotlar hem temel hem de uygulamalı araştırmalar için önemlidir (Ahmadabadi *et al.* 2007). Doku kültürü çalışmalarının bir sonucu olarak rejenerantların pek çoğunda morfolojik ve sitolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Webb and Watson 1991). Özellikle gen aktarımı ve *in vitro* mutasyon çalışmalarında

istenilen özelliğe sahip bireylerin elde edilebilmesi için öncelikle doku kültürü yöntemleriyle düzenli bir sürgün rejenerasyonunun elde edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda geliştirilen doku kültürü teknikleriyle kültür bitkilerinin özelliklerinin değiştirilmesinde ve geliştirilmesinde ilerlemeler sağlanmıştır.

Tüm bitki türlerinde evrensel olarak kabul edilen bitki doku kültürü ve rejenerasyon metodu bulunmamaktadır. Farklı kaynaklardan alınan dokular doku kültürüne farklı cevaplar vermektedir.

Her bitki dokusu farklı içsel hormon seviyelerine sahip oldukları için kullanılan eksplantın kaynağı transformasyon üzerinde kritik bir etkiye sahiptir. Dediferensiye (farklılaşmalarından kaynaklanan özelliklerini yitirmeleri) ve rediferensiye (yeniden farklılaşma) oranını belirleyen dış hormon seviyeleri gibi iç hormon seviyeleride eşit şekilde önemlidir. Dediferensiye ve rediferensiye süreçleri hem direk hem indirek sürgün organogenesi için gereklidir (Bhat *et al.* 2012).

Başarılı bir *in vitro* gen aktarma sisteminin oluşturulabilmesindeki kritik noktalardan bir tanesi kullanılan eksplantın (başlangıç materyalinin) gen aktarımına uygun bir doku oluşturabilme ve gen aktarılmış dokunun da tüm bir bitki rejenere etme yeteneğidir. Bu anlamda, doku ve hücre kültürlerinde etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Baklagillerdeki transformasyon çalışmaları için model bitki olarak kullanılan *Lotus corniculatus* (Akashi *et al.* 1998a)'un köklerinden de kolaylıkla rejenere edilebildiği pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Öyleki dışarıdan herhangi bir gelişim düzenleyici olmaksızın, uzun yıllar alt kültüre alınarak canlılığı muhafaza edilen kökler başlangıçtaki gibi yüksek oranda gelişmeye devam etmişler ve ikincil uçlardan yeniden klonlanıp ışığa transfer edildiklerinde direkt embriyogenesis ile kolayca bitki rejenerasyonunu gerçekleştiren süper gelişen köklere sahip oldukları vurgulanmıştır (Akashi *et al.* 1998b; Akashi *et al.* 2003; Tanakaa *et al.* 2008). Ayrıca *Lotus corniculatus* L.sp. sürgünleri, bitkinin çeşitli kısımlarından kolaylıkla elde edilebilir.

Bitkiler doğrudan kök veya yaprak eksplantlarından ve internotlardan üretilen canlı kalluslardan rejenere edilebilir. Aynı zamanda bitkiler, yapraklar, kotiledonlar, hipokotiller ve sürgün köklerinden elde edilen protoplastlardan rejenere olurlar (Webb and Watson 1991). Bir çok dikotiledon yaprak materyalinden rejenere edilebilmektedir. Yaprak taslağı segmentleri eksplant olarak kullanıldığında, yaprak segmentleri için gerekli olgun tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadırlar. Ayrıca yaprakların süren filizlerden hızlıca üretilip büyük miktarlarda elde edilebilmesi, rejenerasyon ve çoklu seleksiyona imkan tanınması gibi bir çok sebepten dolayı yaprak materyali, transgenik denemeler için kaynak materyal olarak tercih edilmektedir (Ahmadabadi *et al.* 2007).

Bu çalışma kapsamında *in vitro* çalışmalarda model bitki olarak kullanılabilecek gazalboynuzu (*Lotus corniculatus*) bitkisinde denenen memeli cinsiyet hormonlarının ve konsantrasyonlarının kotiledon yaprak ve kök eksplantlarında kullanımının bitki morfogenezine, rejenerasyonuna ve gelişimine etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lotus corniculatus bir yem bitkisi olarak, değerli özellikleri olan bir baklagil türüdür. Bitki eğimli, kurak, orta verimli topraklarda da üretimini sürdürür ve yüksek dayanıklılık gösterir (Raikar *et al.* 2008). Her türlü ekstrem hava ve toprak şartlarına adaptasyon kabiliyetinin yüksek olması nedeniyle dünya üzerinde geniş çapta yetiştiriciliği yapılan bitki aynı zamanda transformasyon çalışmaları için model bitki olarak kullanılmaktadır (Akashi *et al.* 1998, Nicolici *et al.* 1997).

Bilindiği gibi bitkilerin transformasyonu, rejenerasyonu ve *in vitro* çoğaltımı için etkili metotlar hem temel hem de uygulamalı araştırmalar için önemlidir. Tek bir hücreden tüm bitkinin üretimine olanak sağlayan güvenilir *in vitro* rejenerasyon teknikleri bitkilerin klonal çoğaltımı ve başarılı genetik mühendisliği uygulamaları için merkezi bir önem taşır (Ahmadabadi *et al.* 2007).

Bitki özelliklerinin iyileştirilmesi için yapılan genetik değişiklikler, hücre ve doku kültürü uygulamaları büyük oranda kültüre alınan kallus, hücre ve protoplastların bitki rejenerasyon kabiliyetine bağlıdır. Kültüre alınan hücre ve dokuların bitki rejenerasyon kabiliyeti *Trifolium*, *Cajanus*, *Coronilla* ve *Lotus* gibi baklagilleri de içeren pek çok türde genotipe bağlıdır (Niizeki and Saito 1987).

Hücre ve doku kültürlerinden bitkilerin rejenerasyonu *Lotus*, *Vicia*, *Cajanus*, *Coronilla*, *Arachis*, *Glycine*, *Melilotus*, *Trifolium*, *Phaseolus*, *Stylosanthes* ve *Medicago* gibi pek çok baklagil türünde rapor edilmiştir (Cho *et al.* 1995).

Baklagil yem bitkileri içerisinde, *Lotus corniculatus* L. sürgünleri, *in vitro* şartlarda bitkinin çeşitli kısımlarından kolaylıkla elde edilebilir. Bitkiler direk olarak kök veya yaprak eksplantlarından ve internodlardan üretilen canlı kalluslardan rejenerere olur. Aynı zamanda bitkiler, yapraklar, kotiledonlar, hipokotiller ve filiz köklerinden elde edilen protoplastlardan rejenerere olurlar (Webb and Watson 1991).

Lotus corniculatus'un *in vitro* rejenerasyonu üzerine Miller (1963), Niizeki and Grant (1971), Tomes (1979), Swanson and Tomes (1980), Ahuja *et al.* (1983), Petit *et al.* (1987), Rybczynski and Badzian (1987), Tabaeizadeh (1989), Badzian and Rybczynski (1994), Vessabutr and Grant (1995) gibi pek çok araştırmacı çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmaların sonucunda bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilen eksplantlardan, protoplaslardan ve kalluslardan rejenere edilebileceği belirlenmiştir.

Aynı şekilde Gibbs (1991)'de, *L. corniculatus*'un yaprak, hipokotil ve kotiledon gibi dokularından alınan çeşitli eksplantların, tam bir rejenerasyonu sağlayan iyi bir rejenerasyon sistemi geliştirdikleri ve bu yüzden bitki biyoteknolojisi için model bir sistem tesiseden uygun bir baklagil yem bitkisi olduğunu bildirmiştir.

Sayırsız araştırmacı *Lotus* türlerinin doku kültürü tekniğiyle uyumlu olduğunu bildirmiş (Nicolic and Mitic 2005; Nicolic *et al.* 2006) ve *L. corniculatus*'un baklagillerdeki transformasyon çalışmaları için model bitki olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Akashi *et al.* 1998)

In vitro kültürünü, temel besiyerinin bileşimi, PH, şeker içeriği ve bitki hormonları gibi pek çok dışsal faktörler etkiler. Bu parametrelerin tümünde veya bazılarındaki değişiklik kültüre alınan bitkinin rejenerasyon sekansını ve/veya nihai ürünü değiştirebilir (Gibbs 1991).

Aynı hormon, bir bitkinin farklı dokularında değişik tepkiler verebilir veya aynı dokunun farklı gelişme devrelerinde etkili olabilirler (Kumlay ve Eryiğit 2011).

Bitkilerin iyileştirilmesi için yapılan gen aktarımları, hücre ve doku kültürü uygulamaları büyük oranda kültüre alınan kallus, hücre ve protoplastların bitki rejenerasyon kabiliyetine bağlıdır (Niizeki and Saito 1987).

L. corniculatus'un *in vitro* kültürü üzerine pek çok araştırmacı çalışma yapmıştır. *L. corniculatus*'un yaprak, hipokotil ve kotiledon gibi dokularından alınan çeşitli

eksplantlar tam bir rejenerasyonu oluşturan iyi bir rejenerasyon sistemi kurulmasını sağlar ve bu yüzden bitki biyoteknolojisi için model bir sistem tesis eden uygun bir baklagil yem bitkisidir. *L. corniculatus*'un rejenerasyon tepkisini besiyerindeki sitokinin:oksin oranı değiştirir. Oksin seviyesi sitokinin seviyesinden daha yüksek ise kök primordiasının oluşumu teşvik edilir. Sitokinin seviyeleri oksin konsantrasyonundan daha yüksek olduğu zaman denge sürgün primordiasının üretimine doğru yönlendirilir. *L. corniculatus*'un yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için kültür ortamında sitokininlerin bulunması gereklidir (Gibbs 1991).

Akashii *et al.* (1998a)'ı *Lotus corniculatus*'da transgenik bitkilerin *A. rhizogenes* enfeksiyonunu takiben saçak köklerden üretildiğini bunun nedenin ise saçak köklerden elde edilen bitkilerin fitohormon dengesizliğinin sıkla sebep olduğu istenmeyen DNA tümörlerinin daha az miktarını içermesinden kaynaklandığını Klee *et al.* (1987)'nin belirtmiş olduğunu bildirmişlerdir.

Nicolik *et al.* (1997)'nin yapmış olduğu bir çalışmada apikal tomurcuklar, kotiledon yaprakları, yaprak ve petioller eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve BM (Blaydes 1966) ortamı ve çeşitli gelişim düzenleyicilerin kullanıldığı bu çalışmada kallus oluşumu için 2,7 μ M NAA, 18 μ M 2,4-D ve 18 μ M kinetin kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kallus oluşum ortamı üzerinde eksplantların %72-90'nın kallus oluşturduğu organogenik kapasitenin eksplant tipine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kültür ortamında bulunan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonu morfogenez ve büyüme için önemli bir etkiye sahiptir. Akashi *et al.* (1998b), gazalboynuzu bitkisinde kök kültürü kullanarak yaptıkları rejenerasyon çalışmasında BAP içeren ortamda kültüre alınan eksplantların hem kesim bölgelerinden hem de dokuların yaralanma bölgelerinden kallusların oluştuğu ve bu kalluslardan embriyoların rejenere olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 0,01 ve 0,05 mg/l BAP konsantrasyonlarının embriyonik kallus oluşumunda etkili olmadığını 0,5 mg/l'lik BAP konsantrasyonun maksimum miktarda embriyonik kallus ürettiğini belirtmişlerdir.

Janeczko and Skoczowski (2005), memeli cinsiyet hormonlarından östrojenlerin ilk kez 1926 yılında ve daha sonrada 1930 yılında yapılan çalışmalar sonucunda bitkilerde saptanmış olduğunu belirtmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada memeli cinsiyet hormonlarının meydana gelmesi ve onların bitkilerdeki fizyolojik rollerini gözden geçirmişlerdir. Bu hormonlar örneğin 17 β -estradiol, adrosterone, testesteron veya progesteron araştırılan bitkilerin %60-80 var olduğunu ve bu hormonların biyosentezi ve çevriminden sorumlu enzimlerin bitkilerde mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Cinsiyet hormonları ve bunların ön maddeleri ile bitkiler muamele edildiğinde, hücre bölünmesi, kök ve sürgün gelişimi, embryo gelişimi, polen tüp gelişimi, çiçeklenme ve kalus oluşumunun etkilendiği vurgulanmıştır.

Steroidler, yaşayan organizmalarda çok önemli bileşen gruplarından. Steroid gruplarının büyük bir kısmı hormonal özelliklere (brassinosteroidler, ecdysteroidler, progesteron, östrojenler) sahiptir (Janeczko *et al.* 2011).

Bitkiler hormon olarak fonksiyon gösteren pek çok steroidleri sentezleme kabiliyetine sahiptirler. Yapılan araştırmalar sonucunda bazı cinsiyet hormonlarının hücre seviyesinde uzama ve bölünmeyi uyardığı, hormonal denge, enzim aktivitesi, protein ve nükleik asit sentezinin aktivasyonu, proteinlerin amino asit kompozisyonuna ve protein spektrumuna etkili olduğu, hücre zarının ve yağ asidi kompozisyonları özellikleri üzerine ve fotosentetik aktivitenin artması üzerine etkili olduğu tespit edilmiş ve bitki seviyesinde büyüme teşviki, vejetatif gelişim peryodunun kısaltılması, meyve büyüklüğü ve kalitesinin artırılması, besleyiciliği üzerine etkisi, stres hastalık olumsuz çevre şartlarına direncin artırılması ve bunlara bağlı olarak bitki verimini artırdığı belirlenmiştir (Khripach *et al.* 2000) .

Bitkilerdeki progesteronun varlığı ilk olarak 1960'ların sonuna doğru kaydedilmiştir. progesterone buğdayın generatif gelişmesini uyarır. Bu bitkinin sitoplazma fraksiyonlarında ve hücre zarında bu steroidlerin reseptörleri bulunmuştur (Janeczko and Filek 2002, Janeczko *et al.* 2008).

Janeczko *et al.* (2011)'nın buğday yapraklarındaki progesterone oluşumunu göstermek için yapmış oldukları çalışmada progesterone seviyesinin değişimini, su noksanlığına maruz bıraktıkları hassas ve kuraklığa dayanıklı olan buğday çeşitlerinde çalışmışlardır. progesteronun buğday yapraklarındaki miktarını 1,16-1,82 ng/g aralığında bulmuşlardır. Sonuçta, bitkinin su eksikliğine maruz kalmasının bir sonucu olarak kuraklığa hassas çeşitlerde progesterone seviyesinin üçte bir artmış olduğunu, daha toleranslı çeşitlerde, kontrollü sulamadaki ve kuraklık stresindeki bitkilerde progesterone miktarının benzer kaldığını gözlemlemişlerdir. Buğdayda serbest progesterone ve şekere bağlı progesterone bulmuşlardır (Janeczko *et al.* 2011).

Steroidler hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de temel bir hormon olarak rol oynar. Bitkiler sayısız steroidleri ve sterolleri sentezlerler ki bunlar içerisinde bazıları hayvan hormonları olarakta tanınırlar (Bishop and Koncz, 2002).

Steroidler hücre duvarının bileşiminde ve biyoregülatör olarak çeşitli şekillerde bulunan yaygın oluşumlardır. Birçok bakteri, fungus ve fotosentetik damarlı bitkiler tarafından sentezlenen steroidler, hormonal açıdan hayvanlar dünyasında aktiftirler. Mevcut bilgiler steroid etkinin botanik bir kol içerisinde hayvanlarda olduğu gibi reseptörler aracılığıyla düzenli bir davranış içerisinde olduğunu göstermektedir (Agarwal 1993).

Bilindiği gibi bitki gelişiminin hormonlar tarafından düzenlenmesi protein sentezini kontrol etmelerinden kaynaklanır. Gelişim olgusunun temeli protein miktarındaki artıştır ve yaşayan organizmanın farklılaşması onun organlarında, dokularında ve hücrelerindeki protein kompozisyonlarının farklılaşmasıyla yakından ilgilidir. Protein sentezinin kontrolü yaşamsal olguların gelişiminde anahtardır. Bitkilerde dahili ve harici pek çok faktör protein sentezinin kontrolüne karıştığı bilinir (Szweykowska 1987).

Ylstra *et al.* (1995), *in vitro* şartlarda olgun tütün polenlerinin çimlenmesi ve polen tüpü büyümesi üzerine farklı steroidlerin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, memeli cinsiyet hormonlarının (testesteron, progesteron ve estradiol) polen çimlenmesi ve polen

tüpü uzamasını uyardığını belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar çimlenme ortamında steroid ve flavonların her ikisinde bulunmasının erkek gametofitlerin büyümesini güçlü bir şekilde artırdığını bildirmişlerdir.

Bitkilerin memeli cinsiyet hormonları ve bunların ön maddeleri ile muamelesinin, kullanılan konsantrasyonları ve bitki türüne bağlı olarak hücre bölünmesi, çiçeklenme, kallusların üremesi, kök, filiz, embryo ve polen tüp gelişimini etkilemektedir. Bitkilerdeki memeli cinsiyet hormonlarının düzenleme kabiliyeti onların pratikte kullanılmalarını özellikle bitki *in vitro* kültürlerinde kullanımlarını mümkün kılmıştır (Janeczko and Skoczowski 2005).

Bitkisel östrojenler (fitoöstrojen), farklı kimyasal formları olan ve östrojen reseptörlerine bağlanarak etki gösteren maddelerdir (Aşkın 2009). Fitoöstrojenler; yapısal veya fonksiyonel olarak memeli östrojenleri gibi davranan, memelilerde östrojenik hareketi uyaran, 17- β östradiole benzeyen bileşiklerdir ve insan vücudundaki doğal östrojenler gibi davranan kimyasal maddelere fitoöstrojenler denilmektedir. Diğer bir tanımı da; östrojen benzeri özellikleri olan bitkisel kaynaklı polifenolik nonsteroidal bileşiklerdir (Özer 2006).

Fitoöstrojenler östrojen reseptörü için bağlanma afinitesine ve östrojen benzeri biyolojik aktiviteye sahip bitki bileşikleridir. Fitoöstrojenler insanlarda fizyolojik etkilere sahiptir. Fitoöstrojenlerin insanlarda yararlı etkisini destekleyen en önemli veri, soya proteinlerinin lipitler, lipit profilleri ve kan basıncı üzerindeki etkileridir (Murkies and Frydenberg 2000).

Bitkilerde östrojenik aktivite gösteren ve fitoöstrojenler olarak tanımlanan bileşikler 300'den fazla bitkide mevcuttur (Adams 1995). Baklagil familyasında pek çok bitki östrojenik aktiviteye sahiptir ve bu nedenle baklagil bitkileri doğal östrojenlerin iyi kaynakları olabilir (Yoo *et al.* 2005) çoğu baklagillerde fitoöstrojenlerin olduğu rapor edilmiştir. Fito östrojen içeriği bir dizi faktöre bağlı olarak değişir. Yonca, tek yıllık Medikler (*Medicago spp*), ak üçgül, yeraltı üçgülü (*Trifolium subterraneum*), çayır

üçgülü (*Trifolium pratense*), soya (*Glycine sp*) östrojenik mera bitkileridir. *Vicia americana*, *Astragalus serotinus*, *Lotus corniculatus* (gazalboynuzu) gibi mera bitkileri de östrojenik aktiviteye sahiptir (Adams 1995). Cook (1960), Gazalboynuzunun bazı durumlarda östrojenik aktiviteye sahip olduğunu pek çok araştırmacının kaydettiğini bildirmiştir.

İnsan ve hayvanların beslenmesinde kullanılan doğal ve kültür bitkileri ile tohumlarda biyolojik etkileri birbirine benzeyen çok sayıda doğal bitkisel kökenli östrojenik madde bulunmaktadır. Yaklaşık 300 farklı bitkiden elde edilen ve içerisinde bitkisel östrojenlerin de bulunduğu 20 farklı maddeyi bildirmişlerdir. Bu bitki ve tohumlar; keten, balkabağı, susam, ayçiçeği tohumu ile sert kabuklu yemişler (badem, fındık, yerfıstığı, ceviz ve bunların yağı), rafine edilmemiş tahıllar (özellikle de mısır, karabuğday, darı, yulaf, arpa, çavdar, buğday), taze meyveler (elma, muz, kivi), kurutulmuş meyveler (özellikle kalsiyumca zengin olan hurma, incir, erik, üzüm), sebzeler (brokoli ve ıspanak gibi koyu yeşil yapraklı sebzeler, kereviz, rezene), baklagillerden soya fasulyesi ve mercimek, pişirmelik otlardır (özellikle sarımsak, zencefil, maydanoz, biberiye, adaçayı, ısırgan otu) (Aşkın 2009).

Pek çok hayvansal hormonların ve onların bitkilerde meydana gelen farmako-biyolojik taklitleri memelisteroid hormonları özellikle östrojenler yapısal veya fonksiyonel olarak bitkilerde görülür. Bitkiler gerçek steroidal östrojenlere ilaveten gestagen ve androjenleri hemde çeşitli nonsteroidal fitoöstrojenleri içerirler. Bitkilerde meydana gelen çeşitli fitoöstrojenler bazen hayvan üremesi için önemli olabilecek konsantrasyonlarda meydana gelir. Bu fitoöstrojenlerin yem bitkilerindeki varlığı evcil hayvanlarda infertilite veya azalmış et ve süt üretimi ile sonuçlanan hiperöstrojenik sendromlara sebep olabilir. Belirli bazı hayvan hormonları ve onların analogları da bitki büyüme ve gelişmesini etkiler (Slama 1980).

Estron ve 17β -estradiol farklı bitki türlerinde saptanmış ve bu hormonların vejetatif doku gelişimi ve çiçeklenmenin uyarılması, gelişim ve cinsiyet saptanmasında etkili olabileceğine dair verilerin mevcut olduğunu bildirmiştir (Milanesi *et al.* 2001).

Buğdaygiller ve baklagiller grubuna ait bir çok yem bitkisi östrojenik aktiviteye sahiptir. Buğdaygiller içerisinde çayırotu ve mısır silajı, baklagillerden ise yonca ve çeşitli üçgül türleri (başta yeraltı üçgülü, ak üçgül ve çayır üçgülü) en fazla östrojenik aktiviteyi gösterirler. Korungada ise östrojenli bileşiklerin bulunmadığı saptanmıştır. Genelde tüm bitkilerde çiçeklenme devresine kadar östrojenik aktivitede bir artış söz konusudur. Yoncada en yüksek östrojenik aktivite 3. ya da 4. biçimde çiçeklenmeden hemen sonra tesbit edilmiştir. Yine ilkbaharda ve yaz aylarının son günlerinde diğer mevsimlere göre daha yüksek östrojenik aktivite vardır (Baran ve Kocabağlı 2000).

Kopcewicz (1972) yaptığı çalışmada *Hycoscyamus niger* L. ve *Salvia splendens* Sellow bitkilerinin çiçeklerinin ekstraksiyonu ile üç adet östrojen benzeri madde tespit etmiştir. Araştırmacı bulunan 3 maddenin ikisinin diğerinden ve standarttan farklı olduğunu belirlemiştir.

Kopcewicz and Porazinski (1974), normal şartlarda çiçeklenme başlangıcı ve gelişim için uzun gün şartlarına ihtiyaç duyan *Salvia splendens* sellow ile yapmış oldukları çalışmalarında adaçayı bitkilerinden izole edilen östrojen fraksiyonlarının yalnız başlarına ve gibberellin ve sitokininlerle kombinasyonlarının harici olarak uygulanması ile çiçeklenmenin kısa gün şartlarında teşvik edilebildiğini göstermişlerdir.

Guan and Roddick (1988), domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Best of All) köklerinde yapmış oldukları çalışmalarında, oluşan sürgünlerde steroidal östrojenler, estrone ve estradiol (sulphate türevleri gibi)'ün 1.0 μ M aşan konsantrasyonlarda sürgünlerdeki toplam kök uzunluğunu (ortalama değil), kök sayısını ve kök gelişimini azalttığını vurgulamışlardır. Sürgünlerdeki kök gelişiminin estroidal tarafından engellendiği ama östrojenin engellemediğini tespit etmişlerdir.

Shore *et al.* (1992) yoncanın vejetatif gelişimi üzerine estrone ve 17 β -estradiol'ün etkisini araştırdıkları çalışmalarında bitkiler bu steroidal hormonların varlığında ve yokluğunda çeşitli şartlarda yetiştirmişlerdir. Yetiştirdikleri bu bitkileri; bitki ağırlığı, östrojen içeriği, fitoestrogen içeriği, nodülasyon derecesi ve nitrojen fiksasyon aktivitesi

bakımından analiz etmişlerdir. Araştırmacılar kontrollü sera şartları altında; 1) östrojenlerin 0,005 µg/l'den -0,5µg/l konsantrasyonlarına kadar hem kök hem de sürgün kuru ağırlığını artırdığı 50 µg/l'den-500 µg/l konsantrasyonlarına kadar bitki gelişiminin azaldığını 2) östrojenin gelişim üzerindeki etkisi nitrojen yokluğunda çok belirgin olduğunu 3) estrone gelişimi artırmada 17β-estradiolden çok daha etkili olduğunu 4) gelişimleri östrojenle uyarılan bitkilerde nitrojen fiksasyon aktivitesinde ve nodül sayısında önemli artışın olmadığını, 5) Vejetatif gelişimi artırıcı konsantrasyonlarda (0,005 µg/l -0,5µg/l) bitki içeriğindeki östrojen miktarının artmadığını 6) vejetatif gelişimi ve nodül ağırlığını inhibe edici östrojen konsantrasyonlarında (50 µg/l-500 µg/l) bitkideki dahili östrojen miktarını artırdığını bulmuşlardır.

Janeczko and Filek (2002), Grana kışlık buğday çeşidinde memeli cinsiyet hormonlarının etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar 63 günlük soğuklamaya ihtiyaç duyan Grana çeşidinden izole edilen embriyoları 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonda farklı memeli cinsiyet hormonları içeren *in vitro* ortamda denemeye alarak sapa kalkma oranı ve hızındaki artışlar ile steroid uyarılarını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda 21 ve 28 günlük vernalizasyon boyunca steroid ile muamele edilen bitkilerde en güçlü etkinin olduğunu, 28 günlük vernalizasyon sonunda hormon uygulamalarından %100 sapa kalkma sağlandığını tespit eden araştırmacılar kontrol grubundaki bitkilerde %8'lik sapa kalkma sağlandığını ortaya koymuşlardır.

Janeczko *et al.* (2002), kışlık buğdaydan izole edilen olgunlaşmamış embriyolar ve kallusların gelişimi üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisi araştırmışlardır. Embriyoları polinasyondan 14 gün sonra izole etmişler ve 0,1 ve 1 µmol/dm³ konsantrasyonda 17β-estradiol, estron, estriol (estrogens) and progesterone, androsterone, androstenedione içeren MS (Murashige-Skoog 1962) besi ortamında kültüre alınmışlardır. Bu çalışmada izole ettikleri olgunlaşmamış buğday embriyolarından ilk yaprağın gelişimi ve çimlenmesini erkek cinsiyet hormone androsterone ve testosterone'un öncü maddesi androstenedione tarafından güçlü bir şekilde uyarılmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu proseslerin kallus oluşumuna sebep

olmalarıyla ilişkili olduğu fakat onların üremeleri ve gelişimlerinin kontrol ile benzer olduğunu, estriol ve 17 β -estradiolün olgunlaşmamış embriyoların çimlenmesini etkilemediğini belirtmişlerdir. Memeli cinsiyet hormonları veya onların öncülerinin bitki gelişimini etkilediğini (hücre bölünmesi, çimlenme ve tüp gelişimi, kök ve sürgünlerin gelişimi, çiçeklenme, kallusların çoğalması) bildirmişlerdir. *In vitro* metotlar kullanılarak bitkilerdeki steroid etkinliğinin gösterimi, memeli cinsiyet hormonlarının veya onların öncü maddelerinin *in vitro* şartlarda bitki gelişimini modifiye etmek için kullanılmasına şans tanıyacağını ifade etmişlerdir.

Tanino *et al.* (2002), kavun ve balkabağında absisik asit ve östrojenin fenotipik özellikler ve çiçeklenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Her iki türde tutarlı bir etki göstermeyen estradiol uygulamasının ilk testlerde toplam çiçek sayısını %260 artırdığını tespit eden araştırmacılar yinede estradiolün diğer birkaç dalda indirgenmiş çiçek sayısını önemli derecede uyardığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar absisik asidin erkek çiçek sayısını artırmak suretiyle toplam çiçek sayısını artırdığını tespit etmiş, bunun yanı sıra yan dal oluşumunu da önemli derecede artırdığını vurgulamışlardır.

Janeczko *et al.* (2003), *Arbidopsis thaliana*'nın *in vitro* şartlarda generatif gelişmesi üzerine seçilmiş steroidlerin etkisini araştırmışlardır. Memeli cinsiyet hormonlarının aktivitesi ile brassinosteroid familyasından düzenleyici olarak bilinen 24-epibrassinolide ile karşılaştırma yapılan çalışmada erkeklik hormonlarının dişilik hormonlarına göre *A. thaliana*'nın çiçeklenmesinin uyartımında daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Araştırmacı Androsteronun 0,1 mM konsantrasyonunun generatif bitki oranını (%96), kontrole (%41) göre artırdığını, östrojenin ise aynı konsantrasyonda generatif bitki sayısını azalttığını belirlemişlerdir. Bunun dışında araştırmacılar 24-epibrassinolide'nin de *A. thaliana*'nın generatif gelişmesini uyarmadığını bildirmektedir.

Hakk *et al.* (2005) pek çok çalışmanın, gübreleme uygulamalarının bir sonucu olarak cinsiyet hormonlarının toprakta, yüzey sularında ve yer altısularındaki mevcudiyetinin gösterilmiş olduğunu belirtmişlerdir. 17- β estradiol mikroorganizmaların çevrimi sonucu

östrojene dönüşür. Araştırmacılar Colucci *et al.* (2001) kumlu tınlı, siltli tınlı ve tınlı topraklarda 17- β estridol hızlı bir şekilde oksidasyona uğrayarak östrojene dönüştüğünü gösterdiklerini bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar 17- β estraidolun östrojene dönüştüğü Ternes *et al.* 1999; Raman *et al.* 2001 tarafından da gözlemlenmiş olduğunu belirtmişlerdir. Hakk *et al.* (2005)'ı 17 β estraidol'un bitki gelişimini etkilediğini ve yine bazı araştırmacıların 17 β estraidol'un 5,4 – 54,4 ng/l konsantrasyonda yoncanın gelişimini artırırken 54,4-544 μ g/l bu konsantrasyon aralığında ise yoncanın gelişimini azalttığını belirtmişlerdir.

Lino *et al.* (2007) *Arabidopsis* filizlerinin, vejetatif gelişimi üzerine progesteronun etkisini araştırdıkları çalışmalarında, vejetatif büyümenin progesteronun düşük konsantrasyonunda arttığını, hem karanlık hem de ışık koşullarında yüksek konsantrasyonun ise büyümeyi baskı altına aldığını gözlemlemişlerdir.

Kiasalari *et al.* (2009), diyabetik erkek farelerin cinsiyet hormonu seviyelerine *Withania somnifera* bitkisinin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada serumdaki testosteron, progesteron, östrojen, FSH ve LH seviyelerini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar *Withania somnifera* bitkisinin erkek farelerde cinsiyet hormonlarının seviyesindeki değişimlerle (özellikle progesteron) diyabeti azaltıcı etkisiyle düzenleyici rol alabileceğini önermişlerdir.

Erdal (2010) yaptığı bir çalışmada memeli cinsiyet hormonları (MCH) olan progesteron, β -östradiol ve androsteronun, kontrol şartlarında büyütülen arpa ve nohut bitkilerinin büyüme (kök ve gövde uzunlukları, kuru ve yaş ağırlıklar) ve biyokimyasal (protein ve şeker içerikleri, süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu seviyesi, H₂O₂ içeriği ve inorganik element içerikleri) parametreleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Sonuç olarak bitkilerde uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının, bazı metabolik parametreleri etkilemek suretiyle bitki büyüme ve gelişmesinde etkili olduklarını bildirmiştir.

Dumlupınar *et al.* (2011), memeli cinsiyet hormonlarının (MCH) arpa yapraklarının

inorganik element içeriğine etkisini araştırdıkları çalışmalarında ekimden sonra 7.günde arapa yapraklarına progesteron, β -estradiol ve androsteronun 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} M konsantrasyonları ile sprey etmişlerdir. Bu uygulamadan 18 gün sonra bitkileri hasat etmişlerdir. İnorganik element konsantrasyonlarının belirlenmesinde geniş dalgaboyu dağılımlı X-ışını floresans spektroskopisi tekniğini (wavelength dispersive X-ray fluorescence spectroscopy technique) kullanmışlardır. Tüm MCH konsantrasyonları arpa yapraklarının kalsiyum, magnezyum, fosfor, sülfür, bakır, manganez, alüminyum, çinko, demir, potasyum, klor konsantrasyonlarını önemli derecede ($P<0.05$) artırmasına rağmen sodyum konsantrasyonunu azalttığını saptamışlardır. Element konsantrasyonlarındaki maksimum değişiklik 10^{-9} M progesteron, 10^{-6} M β -estradiol and androsterone uygulamasından elde etmişlerdir. Sonuç olarak yapmış oldukları çalışma ile MCH'nın arpa yapraklarının inorganik element içeriğini önemli derecede etkilemiş olduğunu ortaya koymuşlardır.

Erdal (2012a) tuz stresi altındaki mısır tohumlarının sentez reaksiyonları, antioksidan aktiviteleri ve fide gelişimleri üzerine memeli cinsiyet hormonlarının muhtemel olumlu etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada memeli cinsiyet hormonlarının değişik dozları (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} ve 10^{-12} mol L⁻¹) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda tuzluluğun (100 mmol L⁻¹ NaCl) kök uzunluğu ve fide ağırlığını önemli derecede azaltmasına rağmen, memeli cinsiyet hormonu uygulamalarının kök uzunluğu ve fide ağırlığını önemli derecede iyileştirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacı hormon uygulamalarının superoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz enzim aktivitelerini artırırken, superoksit üretimi ve yağ peroksidasyonu seviyesini azalttığını belirlemiştir. Araştırmacı uygulamalardaki en önemli konsantrasyonların progesteron ve β -östradiol için 10^{-8} mol L⁻¹ ve androsteron için ise 10^{-10} mol L⁻¹ olduğunu bildirmektedir.

Erdal (2012b), MCH'nın buğday filizlerinde tuz stresinin yıkıcı etkisinin azaltıp azaltamayacağını belirlemek amacıyla yürütmüş olduğu çalışmada, ekimden sonra 9. günde buğday yapraklarına 10^{-6} , 10^{-8} ve 10^{-10} mol L⁻¹ progesteron, β -estradiol ve androsterone uygulamıştır. İncelenen tüm konsantrasyonlarda MSH'ı uygulamalarının buğday filizlerinde tuz stresinin zararlı etkilerine karşı önemli bir koruma sağladığını

tespit etmiştir. En yüksek tuz toleransı 10^{-6} mol L⁻¹ progesterone, 10^{-8} mol L⁻¹ β -estradiol ve androsterone uygulamalarında tespit ettiğini bildirmiştir.

Erdal ve Dumlupinar (2011a) Memeli cinsiyet hormonlarının nohut bitkilerinin büyümesini artırması ve antioksidant sistemini uyartımı üzerine bir çalışma yapmışlardır. 7 günlük bitkilerin yapraklarına farklı konsantrasyonlardaki (10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-9} M, 10^{-12} M ve 10^{-15} M) hormon (progesteron, β -östradiol ve androsteron) solusyonlarını sprey şeklinde bir kez uygulayan araştırmacılar 18 gün sonra bitkileri hasad ederek ölçümler yapmışlardır. Değerlendirmeler sonucunda araştırmacılar teste tabi tutulan bütün hormon konsantrasyonlarının bitki büyümesini, çözülebilir proteinleri, şeker içeriğini ve antioksidan enzim aktivitesini önemli ölçüde artırmasına rağmen H₂O₂ içeriği ve yağ peroksidasyonu seviyesini kontrole göre azalttığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar memeli cinsiyet hormonlarının bitki büyümesi ve gelişmesini bazı biyokimyasal parametreleri etkileyerek artırdığını bildirmişlerdir.

Pekşen (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, domates (*Lycopersicon esculentum* L.) H-2274 çeşidinde farklı memeli cinsiyet hormon (estron, testosteron) ve dozları (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M)'nın 4 ve 6 saatlik uygulanmasının çimlenme karakterleri, bitki gelişimi, antioksidan enzim aktivitesi ve çiçeklenme ve çiçekteki cinsiyet organları üzerine etkisini araştırmıştır. Aynı şekilde Hacıbektaşoğlu (2011) farklı hıyar genotiplerinde (Beith alpha-BeA, Hasankale-HK, Gordion F1-GF1) memeli cinsiyet hormonları (estron ve testosteron)'nın farklı dozlarını (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M) uygulayarak ile çimlenme karakterleri, bitki gelişimi, çiçekte cinsiyet oluşumu ve antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Her iki araştırmacıda, bitkiler üzerine uyguladıkları memeli cinsiyet hormonunun tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak inceledikleri parametrelerde farklılıklar gözlemlemişlerdir.

Zayed *et al.* (2011) MS temel ortamında *in vitro* koşullarda *Hippeastrum vittatum* soğanlarının büyümesi ve hızlı çoğaltımını sağlamak için metil jasmonate, spermine, casein hydrolysate ve progesteron ile birleştirilen (NAA) 16mg/l 2 iP+4mg/l NAA'in etkilerini araştıran araştırmacılar en yüksek çoğalma oranının (8,2 soğan/explant) spermin

uygulamasında olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek soğan taze ağırlığını (1,23 g/soğan) 4mg/l methyl jasmonate uygulamasından elde eden araştırmacılar en yüksek yaprak uzunluğunu ise 20mg/l progesteron ve 20 g/l casein hydrolysate uygulamasında tespit etmişlerdir.

Erdal (2012a) androsteron uygulamasının üşüme stresi altındaki mısır fidelerindeki moleküler ve fizyolojik değişimler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptığı bir çalışmada 11 günlük mısır fidelerine yapraktan 10^{-9} mol L⁻¹ dozunda androsteron uygulayarak 3 gün süre ile 10/7°C (gündüz/gece) sıcaklık şartlarındaki odada denemeye almıştır. Çalışma sonucunda araştırmacı Androsteron uygulamasının üşümenin sebep olduğu zararlanmayı önemli derecede hafiflettiğini belirlemiştir. Yine androsteron uygulamasının antioksidan bileşiklerin yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artırdığını tespit eden araştırmacı sonuç olarak androsteronun üşüme stresi altındaki mısır bitkilerinin zararının hafifletilmesinde kullanılabileceğini belirtmiştir.

Genisel *et al.* (2012)'nin nohut filizlerinin yapraklarına dışardan uygulanan progesteronun soğuga toleranslılığı artırıp artırmadığını gözlemlemek için yürütmüş oldukları çalışmalarında, progesteronun antioksidan enzim aktivitesini ve antioksidan seviyesinin artırmasına katkıda bulunarak nohut bitkisinin soğuga toleransının artırabileceğini göstermişlerdir.

Shemesh and Shore (2012) çeşitli araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalarında baklagillerin,kök bölgelerindeki *Rhizobium* bakterileri üzerindeki nod D genini aktive etmek için kendi fitoöstrojenlerini üretikleri ve bu şekilde nodulasyonu artırdıklarını belirtmiş olduklarını ayrıca her baklagilin kendi özel fitoöstrojenini ürettiğini örneğin soyanın genisteini kullandığı, yoncadaki temel fitoöstrojenin ise coumestrol olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca atık sulardaki etken maddenin steroidal östrojen olduğu ve bu sularla sulanan yoncanın vejetatif gelişimi üzerine estronun teşvik edici etkisinin 17-β estradolden daha fazla olduğunu söylemişlerdir.

Ancak memeli steroid hormonlarının bitkilerdeki fizyolojik rolü tartışmalıdır. Bu steroidlerin hayvan hücrelerindeki gibi reseptör moleküllerinin varlığı muhtemelen steroid eylem mekanizması için ip uçları sağlayabilir (Milanesi *et al.* 2001). *Solanum glaucophyllum* kallus kültürleri 17 β - estradiol, estrone ve bol miktarda östrojen bağlama bölgelerini içermektedir (Milanesi *et al.* 2001).

Memelilerdeki biyolojik etkisi klinik olarak harici östrojenlere benzerlik gösteren fitokimyasalların seçkin bir grubu olarak fitoestrogenler gösterilmektedir. Fitoestrogenler memeli organizmalarının normal fizyolojik fonksiyonları için temel olan düzenleme işlerini estojen reseptörleri ile direkt olarak engelleyebilir. Memelilerdeki fito estrojenlerin direk olarak estrojen reseptörleri ile etkileşime girdikleri ve böylece memelilerde dominant etki gösterdiklerini mevcut bütün veriler teyit etmiştir. Araştırmacılar estrojen reseptörlerinin (ER) ER α ve ER β olmak üzere iki izoformunun olduğunu belirtmişlerdir. Memeli östrojen reseptörüne, Steroid hormonların bağlanma gücü tipik bir sıra göstermiş olup testosterone veya cortisol'ün önemli etkisi olmaksızın estradiol> estrone> estriol sırasını takip etmiştir (Snochowski and Romanowicz 2003).

Kuiper *et al.* (1997) yapmış oldukları bu çalışmalarında RT-PCR ile sıçan dokularındaki her iki östrojen alt tipinin messenger RNA ekspresyonunu araştırmışlar ve ER alt tiplerinin ligand bağlama spesifikliğini karşılaştırmışlardır. *In vitro* şartlarda sentez edilen insan ER α ve sıçan ER β proteinin Saturasyon Ligand bağlama analizi 16 α -iodo-17 β -estradiol içinyüksek afinite iletek bir bağlanma bileşeni olduğunu gözler önüne sermişlerdir. En östrojenik maddeler veya östrojenik antagonistler çok benzer bir tercih ve derecede her iki östrojen alt tipine bağlanmak için 16 α -[125I]iodo-17 β -estradiol ile yarışıklarını belirtmişlerdir. Şöyleki ER α proteini için diethylstilbestrol>hexestrol>dienestrol>4-OH-tamoxifen >17 β -estradiol> coumestrol, ICI-164384>estrone, 17 α -estradiol>nafoxidine, moxestrol>clomifene>estriol, 4-OH-estradiol>tamoxifen, 2-OH-estradiol, 5-androstene-3 β ,17 β -diol, genistein sırasını takip ettiklerini ve ER β protein için dienestrol>4-OH-tamoxifen>diethylstilbestrol> hexestrol>coumestrol, ICI-164384>17 β -estradiol> estrone, genistein>estriol >nafoxidine, 5-androstene-3 β ,17 β -

diol>17 α -estradiol, clomifene, 2-OH-estradiol>4-OH-estradiol, tamoxifen, moxestrol sırasını takip ettiğini belirtmişlerdir.

Kuiper *et al.* (1998), β östrojen reseptörü ile fitoöstrojenlerin ve östrojenik kimyasalların etkileşimini araştırdıkları bir diğer çalışmalarında Sıçan, fare ve insan östrojen reseptörü (ER)'nün, ER α ve ER β olmak üzere iki alt tipi olduğunu belirtmişlerdir. Her iki östrojen reseptör alt tipi için fitoöstrojenlerin östrojenik potansiyellerinin sıralaması farklıdır. Bu sıralama, ER α reseptörü için, [3 H]-17 β -estradiol (E2)>>zearalenone=coumestrol>. Genistein>daidzein>apigenin=phloretin>biochaninA=kaempferol=naringenin>formononetin=ipriflavone=quercetin=chrysin.

ER β reseptörü için ise E2 >> genistein = coumestrol >zearalenone>daidzein>biochanin A=apigenin=kaempferol=naringenin>phloretin=quercetin=ipriflavone=formononetin=Chrysin sıralaması mevcuttur. Sonuçta özet olarak, endüstriyel kaynaklı östrojenik kimyasalların östrojenik potansiyeli çok sınırlı iken, özellikle ER β için fitoöstrojenlerin östrojenik potansiyeli önemlidir. Fizyolojik östrojenler tarafından uyarılan biyolojik tepkilerin pek çoğu fitoöstrojenler tarafından tetiklenebileceğini belirtmişlerdir (Kuiper *et al.*1998).

Milanesi and Boland (2004) Farklı bitki türlerinde steroid hormonların sentezi ve bu moleküllerin hücre gelişimi, çimlenme ve doku farklılaşmasını düzenleyebilecekleri bildirilmiştir. Ancak bitki hücrelerindeki bu dahili steroidlerin eylem mekanizmaları anlaşılamamış olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar etiketlenmemiş 17 β -estradiol'e ilişkin bir fazlalığın varlığında ve yokluğunda [3 H]17 β -estradiol ile bağlanma deneyleri ile *Lycopersicon esculentum* ve *Solanum glaucophyllum*'un organlarının östrojen bağlanma bölgelerini içerdiğini göstermişlerdir. *S. glaucophyllum*'un kallus dokularında da doyurulabilir [3 H]17 β -estradiol bağlanma bölgeleri tespit etmişlerdir *S. glaucophyllum* and *L. Esculentum* 'un, lipid ekstraktlarında östrojen benzeri bileşikler tespit etmişlerdir. Dahası lipit fraksiyonları, her iki bitki türünde de bulunan östrojen bağlanma bölgeleri hemde MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinden gelenöstrojen reseptörlerine bağlanmak için [3 H]17 β -estradiol ile yarışabildiğini göstermişlerdir. Araştırmacıların yapmış oldukları

Çalışmanın sonucunda Solanaceae'da östrojen bağlama proteinlerinin ve dahili ligandların varlığı belirlenmiştir.

Janeczko *et al.* (2008) *Triticum aestivum* L. hücrelerinde progesteron ve 17 ̢ estradiolün bağlanma noktası ile ilgili yaptėı bir çalışmada buğday hücrelerinde progesteron ve 17 ̢ estradiolün özel bağlantı noktaları olduğunu tespit etmiştir. Bu bağlanmanın membranda ve sitozollarda meydana geldiğini vurgulayan araştırmacılar 17 ̢ estradiolün membranlardaki özel bağlarının sitozollerden daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Bitkilerdeki memeli cinsiyet hormonlarının eylem mekanizmaları hakkındaki bilgiler hala çok sınırlıdır. İnsan ve hayvanlarda memeli cinsiyet hormonlarından biri olan androstenedione, östrojenlerin ve testosteronun biyosentezinde bir aracıdır. Androstenedione *Nicotiana tabacum* L. ve *Inula helenium* L.'de bulunmuştur (Janeczko *et al.* 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

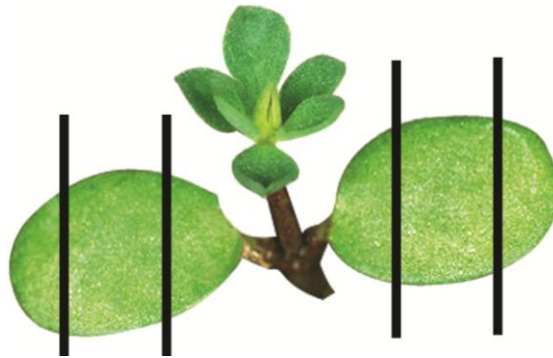
3.1. Materyal

3.1.1. Tohumların çimlendirilmesi

Araştırmamızda, gazalboynuzunun (*Lotus corniculatus* L.) Leo çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan tohumlar MS temel besi ortamını ve vitaminleri içeren petrilere aseptik şartlarda ekilmiştir. 25 °C'sıcaklıkta, 16 saat gün / 8 saat karanlık periyoda ayarlanmış ortamda çimlendirilmişlerdir. Ekimden 10 gün sonra eksplantlar alınmıştır.

3.1.2. Bitkilerden eksplantların alımı

Çalışmada eksplant olarak kotiledon yaprakları ve kök uçları kullanılmıştır. Leo çeşidine ait gazalboynuzu tohumları sterilize edildikten sonra hormon içermeyen MS ortamında çimlendirilmiştir. Daha sonra kotiledon yaprakları uç kısımlarından ve yaprak sapına yakın kısımlardan kesilerek atılmış, arada kalan kısım eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1). Kök eksplantı olarak, kök ucu kullanılmıştır. Her bitkiden 0,5-1 cm uzunluğunda kök ucu kesilmiştir. Her bir petriye 20 adet eksplant konulmuştur. Çalışma her petri bir tekerrür olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Kotiledon yapraklarının kesim yerleri

3.2. Yöntem

Bu çalışma iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada 4 farklı memeli cinsiyet hormonu (17β -estradiol, estron, progesteron, testosteron) ve 4 farklı dozunu (0, 10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) içeren toplam 16 farklı kültür ortamının bazı rejenerasyon parametreleri üzerine, ana etkileri belirlenmiştir. İkinci aşamada memeli cinsiyet hormonlarının ikili kombinasyonlarını (17β -estradiol + progesteron, 17β -estradiol + testosteron, 17β -estradiol + estron, progesteron + testosteron, progesteron + estron, testosteron+estron) içeren 6 farklı hormon karışımı ve 3 farklı dozunun (10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) kombine edildiği ve biri kontrol (0 mM) olmak üzere toplam 55 farklı hormon kombinasyon ortamı denenmiştir. Eksplantlar memeli cinsiyet hormonlarını içeren standart MS ortamında, bir ay süre ile kültüre alınmışlardır.

Eksplantlar birinci ayın sonunda kallus oluşumu, köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE), sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE), köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE), toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından incelenmiştir.

Birinci ayın sonunda kök eksplantları standart MS ortamına, yaprak eksplantları ise (birinci ayın sonunda canlı kalanlar) 0,5 mg/l BAP içeren MS rejenerasyon ortamına aktarılarak 30 gün süre ile kültüre alınmışlardır. İkinci ayın sonunda eksplantlar kallus oluşumu, köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE), sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE), köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE), toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından incelenmiştir.

İkinci ayın sonunda kök eksplantları standart MS ortamına, yaprak eksplantları ise (rejenere olmayıp ikinci ayın sonunda canlı kalanlar) 0,5 mg/l BAP içeren MS rejenerasyon ortamına, ikinci ayın sonunda rejenere olanlar MS ortamına aktarılarak 30 gün süre ile kültüre alınmıştır. Sürenin dolumunu müteakip (3. ayın sonunda) kallus oluşumu, köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE), sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE), köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE),

toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO), eksplant başına sürgün sayısı (EBSS), eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS), eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS), rejenerasyon etkinliği (RE) gözlemleri alınarak toprağa aktarılmıştır. Toplamda kök ve yaprak eksplantları 3 ay süre ile kültüre alınmıştır.

Tohumların çimlendirilmesinde besi ortamı olarak, MS tuz ve vitaminleri (Murashige and Skoog 1962), 7 g/l agar, 1,95 g/l MES ve karbonhidrat kaynağı olarak 20 g/l sakkaroz kullanılmıştır.

Standart rejenerasyon ortamı olarak, MS tuz ve vitaminleri, 50 mg/l askorbik asit, 7 gr/l agar, karbonhidrat kaynağı olarak 20 g/l sakkaroz ve yapraklarda bunlara ilaveten Tanakaa *et al.* (2008) gibi sürgün oluşumunu teşvik etmek için 0,5 mg/L 6-Benzil amino pürin (BAP) kullanılmıştır.

Tüm çalışma boyunca kullanılan büyütme kabinin sıcaklığı $25\pm1^{\circ}\text{C}$ olup, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperyot kullanılmıştır. Büyütme kabinindeki floresans lambaların oluşturduğu aydınlatma şiddeti 1500 lüx'tür.

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır.

3.2.1. Sterilizasyon yöntemleri

3.2.1.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılan yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan en az 10–15 dakika önce %70'lik etil alkolle silinmiş ve UV lambası açılmıştır. Kültüre alma işlemi başlamadan önce UV lambası kapatılmıştır. Kullanılan aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasında alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Eksplantların kesimi alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş 10x15 cm boyutlarındaki kurutma kağıtları üzerinde yapılmıştır.

3.2.1.b. Tohumların yüzey sterilizasyonu

Tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 3 dakika karıştırılarak steril kabin içersinde 3 defa steril saf suyla çalkalanıp daha sonra oda sıcaklığındaki %1'lik sodyum hipokloritte (%20'lik ticari çamaşır suyu) 15 dakika karıştırılmış ve 3 kez steril saf su ile durulanmıştır.

3.2.1.c. Besi ortamının ve diğer bileşenlerinin sterilizasyonu

Besi ortamları 105 kPa basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sıcakta bozulan vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri ve memeli cinsiyet hormonlarını sterilize etmek için 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır.

3.2.1.d. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70'lik Etil alkolün hazırlanışı: %96'lık etil alkolden 700 ml alınarak hacim saf su ile 960 ml'ye tamamlanmıştır.

%1'lik Sodyum hipoklorit solusyonunun hazırlanışı: %5 NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari ACE marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmış, amber renkli şişeye doldurulmuş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. MS temel besi ortamı ve vitaminleri

Eksplantların elde edilmesi ve diğer tüm çalışmalarda Murashige ve Skoog (MS) (1962) tuzları ve vitaminleri içeren temel besi ortamı kullanılmıştır. MS majör, minör ve demir şelat stok solüsyonları hazırlanmış ve bu stoklardan uygun miktarlarda alınarak temel MS ortamı hazırlanmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktarı (mg/l)
İnorganikler	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O veya CaCl ₂	439,6 veya 332,2
MgSO ₄ .7 H ₂ O veya MgSO ₄	370 veya 180,7
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O veya Na ₂ EDTA	40,946 veya 37,26
Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O veya MnSO ₄	16,9 veya 15,1
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Organikler	
Glisin	2
Myo-inositol	100
Nikotonik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Tiamin-HCl	0,1

3.2.2.a. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı MS için stok solüsyonların hazırlanışı

MS makro (20X), mikro (100X) elementler ile demir şelat (100X) ve vitaminler (100X) için stok solüsyon hazırlanmıştır.

MS makro elementler için stok solüsyonunun hazırlanışı: MS makro elementler (20X) için stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Çizelge 3.1’de verilen, bir litrede bulunması gereken makro element miktarlarının 20’şer katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

2) 2 litrelik bir erlenmayer kabına yaklaşık olarak 700 ml saf su konulmuş içerisine manyetik balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Tartılan makro elementler tek tek eridikçe ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen erimesi sağlanmıştır. İlave edilen makro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi saf su ile bir litreye tamamlanmış ve amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine stoğun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

MS mikro elementler için stok solüsyonunun hazırlanışı: MS mikro elementler (100X) için stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Çizelge 3.1’de mikro elementler başlığında belirtilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ haricindeki diğer bileşiklerin 100’er katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

2) 2 litrelik bir erlenmayer kabına yaklaşık olarak 700 ml saf su konulmuş içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Tartılan mikro elementler tek tek eridikçe ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen erimesi sağlanmıştır. İlave edilen mikro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi saf su ile bir litreye tamamlanmış ve amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine stoğun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

MS demir şelat stok solüsyonunun hazırlanışı: MS demir şelat (100X) stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Çizelge 3.1’de mikro elementler başlığında belirtilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ miktarlarının 100 katı hassas terazide tartılmıştır.

2) Yarım litrelik cam erlenmayer içerisinde 300 ml saf su konulmuş içerisinde balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine oturtulmuş, ısıtıcı ve karıştırıcı açılmıştır. Tartılan 3,726 gram $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ilave edilmiş ve tamamen erimesi sağlanmıştır. Erime işlemi tamamlanır tamamlanmaz ısıtıcı kapatılmış karıştırma işlemi devam ederken hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 400 ml'ye tamamlanmıştır.

3) Farklı cam bir erlenmayere 300 ml saf su konulmuş içerisinde balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine oturtulmuş, ısıtıcı ve karıştırıcı açılmıştır. Tartılan 2,78 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilave edilmiş ve tamamen erimesi sağlanmıştır. Erime işlemi tamamlanır tamamlanmaz ısıtıcı kapatılmış karıştırma işlemi devam ederken hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 400 ml'ye tamamlanmıştır.

4) Bu iki ayrı çözelti birleştirilerek toplam hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Bu birleştirme işleminden sonra açık sarı rengi alan stok amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine stoğun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

3.2.2.b. MS vitamin stok solüsyonunun hazırlanışı

MS vitamin stok (100X) solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Çizelge 3.1'de organikler başlığında belirtilen bileşiklerin 10 katı tartılmıştır.

2) Hacmi 250 ml olan bir erlenmayere 70 ml saf su konulmuş içerisinde balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Tartılan vitaminler tek tek eridikçe ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen erimesi sağlanmıştır. İlave edilen vitaminler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine vitamin stoğunun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken

hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

3.2.3. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar

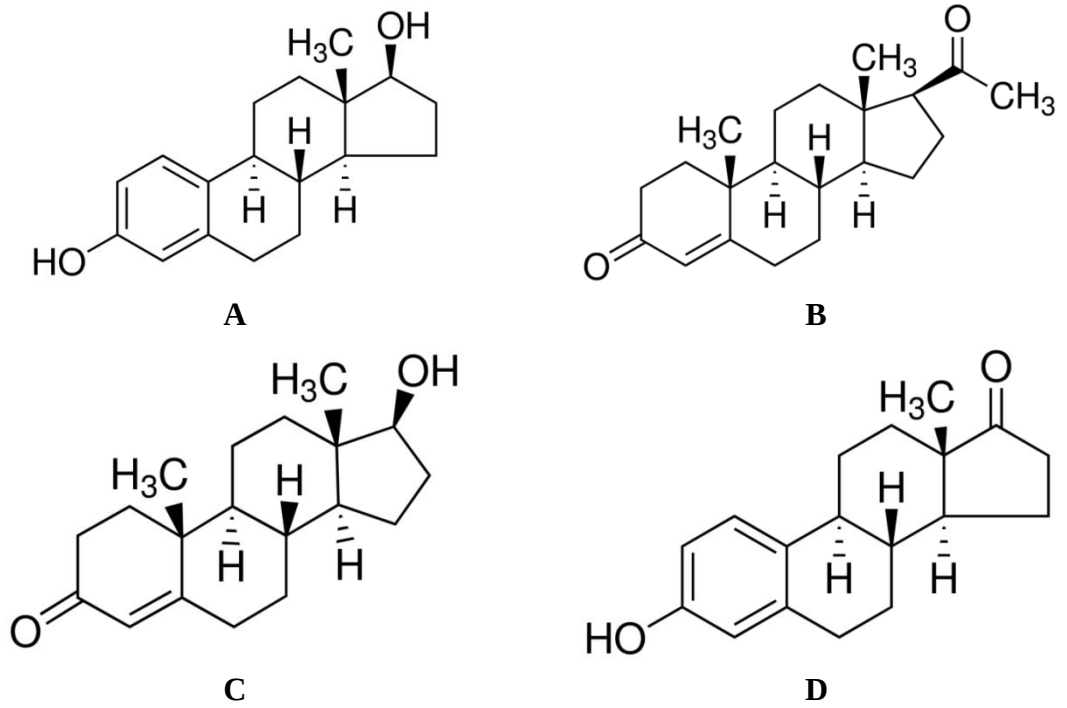
MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan standart kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2’te kullanılan memeli cinsiyet hormonları, kombinasyonları ve dozları Çizelge 3.3.’te, kullanılan memeli cinsiyet hormonlarının açık formülleri Şekil 3.2.’de, askorbik asit ve BAP (6-Benzil amino pürin) stok solusyonun hazırlanışı Çizelge 3.4.’te, memeli cinsiyet hormonlarının stok solusyonlarının hazırlanışı Çizelge 3.5.’te verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan standart kimyasallar

Kullanılan kimyasallar	Miktarı
Sakkaroz	20 g/l
MES	1,95 g/l
Askorbik Asit (Çimlendirme ortamında kullanılmamıştır)	50 mg/l
Agar	7g/l

Çizelge 3.3. Kullanılan memeli cinsiyet hormonları, kombinasyonları ve dozları

Kullanılan memeli cinsiyet hormonları	Dozları (Mm/ l)
17- β Estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$: 272,38 g/mol)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Progesteron ($C_{21}H_{30}O_2$: 314,46 g/mol)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Testosteron ($C_{19}H_{28}O_2$: 288,42 g/mol)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Estron ($C_{18}H_{22}O_2$: 270,37 g/mol)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
17- β Estradiol+progesteron (BP)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
17- β Estradiol+testosteron (BT)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
17- β Estradiol+estron (BE)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Progesteron+testosteron (PT)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Progesteron+estron (PE)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Testosteron+estron (TE)	10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM
Kontrol	0



Şekil 3.2. Kullanılan memeli cinsiyet hormonlarının açık formülleri

*: **A)** 17-β Estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$) **B)** Progesteron ($C_{21}H_{30}O_2$) **C)** Testosteron ($C_{19}H_{28}O_2$) **D)** Estron ($C_{18}H_{22}O_2$)

Çizelge 3.4. Askorbik Asit ve BAP (6-Benzil amino pürin) stok solusyonun hazırlanışı

Sitokinin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonu
Askorbik Asit	Su	-	+4°C / Karanlık	50 mg/ml
BAP	1N NaOH	su	+4°C / Karanlık	1 mg/ml

Çizelge 3.5. Memeli cinsiyet hormonlarının stok solusyonlarının hazırlanışı

Hormonlar	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonları
17-βestradiol	Etil alkol	-	+25°C / Karanlık	0,05, 0,5 ve 5 mM
Progesteron	Kloroform	-	+4°C / Karanlık	0,05, 0,5 ve 5 mM
Testosteron	Etil alkol	-	+4°C / Karanlık	0,05, 0,5 ve 5 mM
Estron	Dioxan	-	+25°C / Karanlık	0,05, 0,5 ve 5 mM

3.2.4. MS ortamlarının hazırlanması

1. 1 litrelik behere 600 ml bidistile su konulmuş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya başlanmıştır.
2. MS makro element stok solüsyonundan (20X) 50 ml, mikro element stok solüsyonundan ve demir şelattan (100X) 10'ar ml eklenmiştir.
3. Bunun üzerine 20 g sakaroz ve 1,95 g MES tartılıp eklenmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Hacim 950 ml'ye tamamlanmış ve 1N NaOH gerektiğinde de 0,1 N HCl çözeltisinden faydalanılarak pH=5,8'e ayarlanmıştır.
4. Son hacim saf su ile 985 ml'ye tamamlanmıştır.
5. 7 g Agar Agar içeren erlene boşaltılıp otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.
6. Isı ile bozulabilen vitamin ve hormonlar otoklavdan sonra ilave edilmiştir. Bunun için 50 ml beher içersine MS vitamin stok solüsyonundan (100X) 10 ml, askorbik asit (50 mg/l) solüsyonundan 1 ml, memeli cinsiyet hormonlarının uygun miktarları ilave edilmiş ve son hacim saf su yardımı ile 15ml'ye ayarlanmıştır.
7. Otoklavlanan besi yerinin sıcaklığı 40-45°C'ye düşüncü 0,22 µm porotizeteli selüloz nitrat filtrelerden geçirilerek steril edilen vitamin ve hormonlar besiyerine ilave edilmiştir.

3.2.5. Araştırmada incelenen konular

3.2.5.a. Birinci ayın sonunda alınan gözlemler

1) Kallus oluşumu: Eksplantlarda kallus oluşup oluşmadığına bakılmıştır.

2) Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%KSOE = (\text{Köklü sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı}(20)) \times 100$$

3) Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%SKOE = (\text{Sadece kök oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı} (20)) \times 100$$

4) Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%KZSOE = (\text{Köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı} (20)) \times 100$$

5) Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$TSOEO (\%) = (\text{Köklü veya köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{Toplam eksplant sayısı} (20)) \times 100$$

3.2.5.b. İkinci ayın sonunda alınan gözlemler

1) Kallus oluşumu: Eksplantlarda kallus oluşup oluşmadığına bakılmıştır.

2) Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%KSOE = (\text{Köklü sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı}(20)) \times 100$$

3) Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%SKOE = (\text{Sadece kök oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı} (20)) \times 100$$

4) Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%KZSOE = (\text{Köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı} (20)) \times 100$$

5) Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$TSOEO (\%) = (\text{Köklü veya köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{Toplam eksplant sayısı} (20)) \times 100$$

3.2.5.c. Üçüncü ayın sonunda alınan gözlemler

1) Kallus oluşumu: Eksplantlarda kallus oluşup oluşmadığına bakılmıştır.

2) Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%KSOE = (\text{Köklü sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı (20)}) \times 100$$

3) Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%SKOE = (\text{Sadece kök oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı (20)}) \times 100$$

4) Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%KZSOE = (\text{Köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{toplam eksplant sayısı (20)}) \times 100$$

5) Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$TSOEO (\%) = (\text{Köklü veya köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısı} / \text{Toplam eksplant sayısı (20)}) \times 100$$

6) Eksplant başına sürgün sayısı (EBSS) (adet): Kültürün sadece 3. ayında ve aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$EBSS (\text{adet}) = (\text{Toplam sürgün sayısı (Köklü ve köksüz sürgün sayısı)} / \text{Toplam eksplant sayısı (20)})$$

7) Eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS) (adet): Kültürün sadece 3. ayında ve aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

EBKSS (adet)= Kök ve sürgüne sahip rejenere bitki sayısı (köklü sürgün sayısı) /
Toplam eksplant sayısı (20)

8) Eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS) (adet): Kültürün sadece 3. ayında ve aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

EBKZSS (adet)= Köksüz sürgün sayısı / Toplam eksplant sayısı (20)

9) Rejenerasyon etkinliği (RE): Kültürün sadece 3. ayında ve aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

RE (adet)= Köklü sürgün sayısı / Toplam sürgün oluşturan eksplant sayısı

3.2.6. Verilerin istatistiksel analizi

Tam şansa bağlı faktöriyel deneme desenine göre, analiz 4 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Her bir petri tek bir tekerrür olarak değerlendirilmiştir. Her bir petriye 20 adet eksplant konulmuştur.

Tam şansa bağlı deneme planına göre Genel Linear modelde varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Konulara ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Analizler SAS (2004) paket programı ile yapılmıştır.

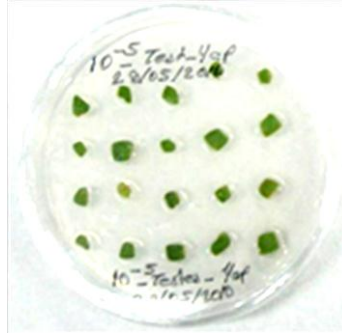
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu araştırmada, kotiledon yaprakları ve kök uçları olmak üzere iki farklı eksplant kaynağı kullanılmıştır. Çalışma iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada 4 farklı memeli cinsiyet hormonu (17β -estradiol, estron, progesteron ve testosteron) ve bunların 4 farklı dozunu (0, 10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) içeren toplam 16 farklı kültür ortamının bazı rejenerasyon parametreleri üzerine, ana etkileri belirlenmiştir. İkinci aşamada memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonları üzerinde çalışmalar yürütülmüştür.

4.1. Ana Etkiler

4.1.1. Kotiledon yaprakları

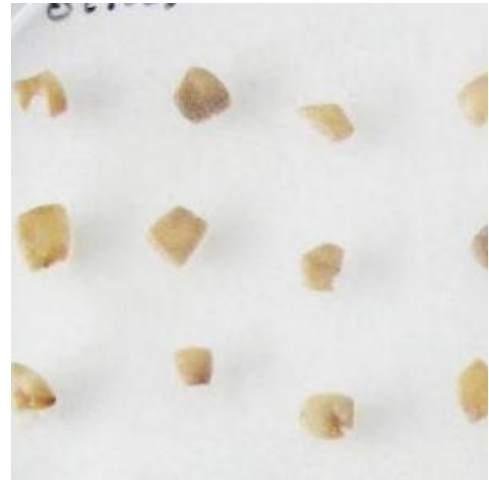
Kotiledon yaprak eksplantları farklı memeli cinsiyet hormonlarını ve dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 30 gün süre ile kültüre alınan bu eksplantlarda kısa bir süre büyüme gözlenmiş (Şekil 4.1) ancak daha sonra tamamına yakın kısmı ölmüştür. Canlı kalmayı başaran çok az sayıdaki eksplantların rejenerasyonunu sağlamak için 30. günün sonunda 0,5 mg/l BAP içeren standart MS (MS tuz ve vitaminlerine ilave olarak 50mg/l vitamin C ortamında 30 gün süre ile kültüre alınmışlardır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5). . Ancak bu ortamda da eksplantlar rejenere olamamışlardır. Sonuç olarak, denemeye alınan eksplantların tamamına yakın bir kısmı ilk 30 gün içerisinde ölmüş, geri kalanlar ise 0,5mg/l BAP içeren kültür ortamına aktarılmışlar, ancak daha sonra bunların tamamı ölmüştür (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.1. Kısa bir süre büyüme gözlenen kotiledon yaprakları



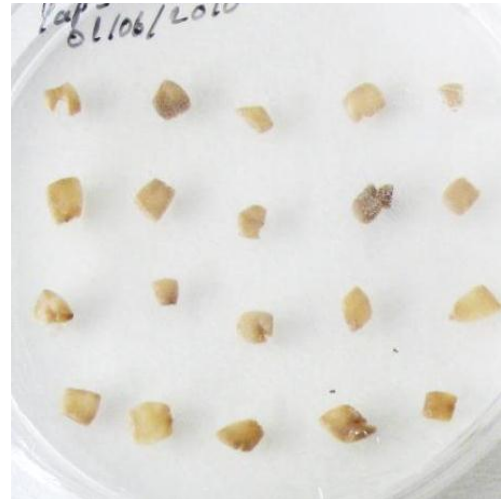
A



B



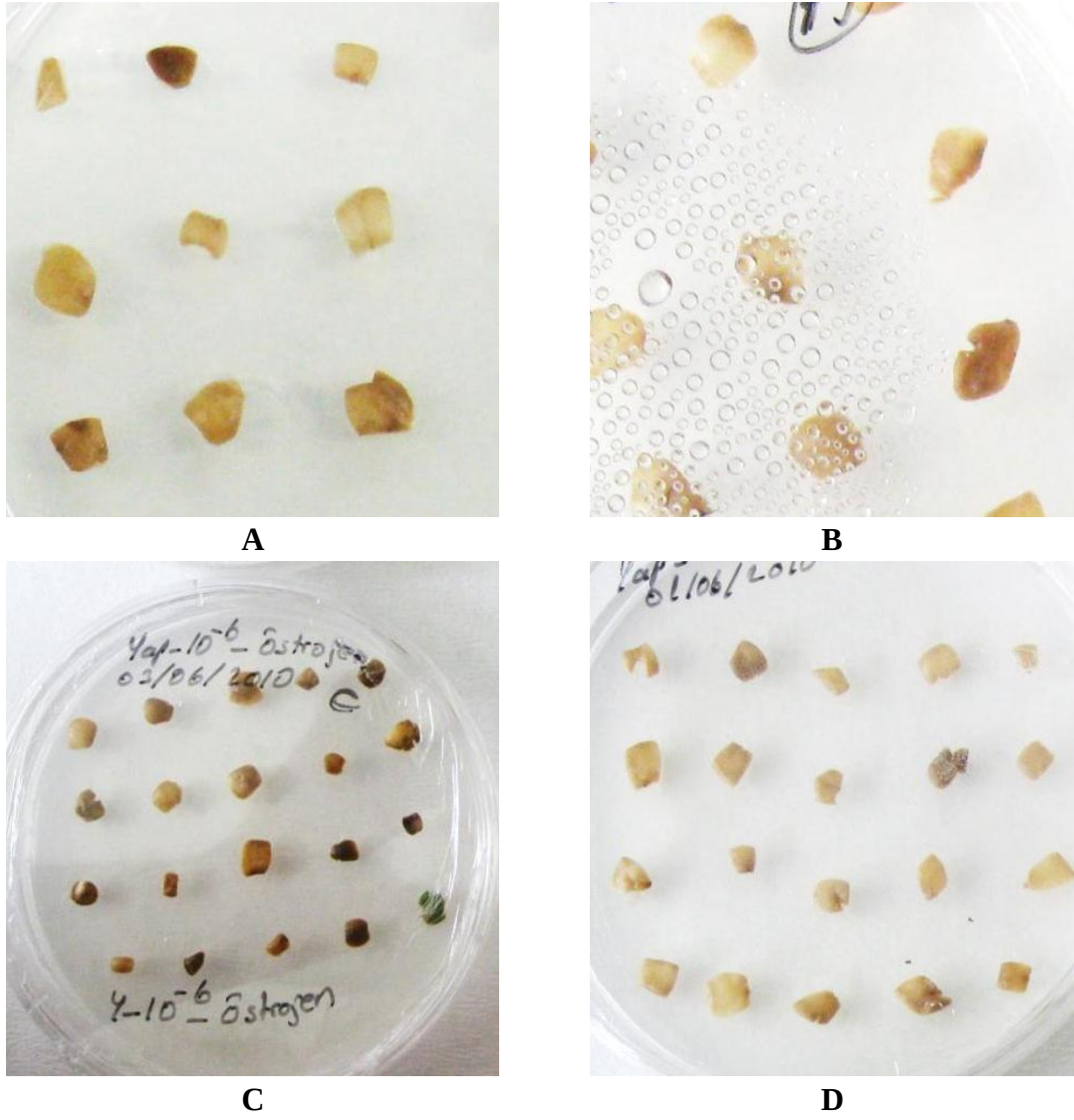
C



D

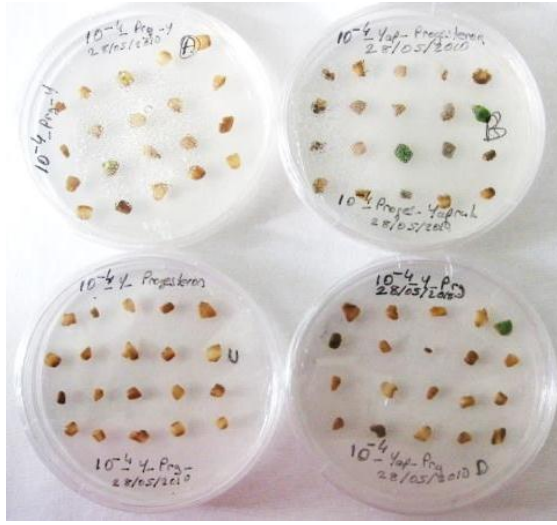
Şekil 4.2. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri

*: A) 10^{-4} mM 17β -estradiol içeren ortamdaki görünümü. B) 10^{-5} mM 17β -estradiol içeren ortamda ki görünümü. C) 10^{-6} mM 17β -estradiol içeren ortamdaki görünümü. D) 0 mM 17β -estradiol içeren ortamdaki görünümü.

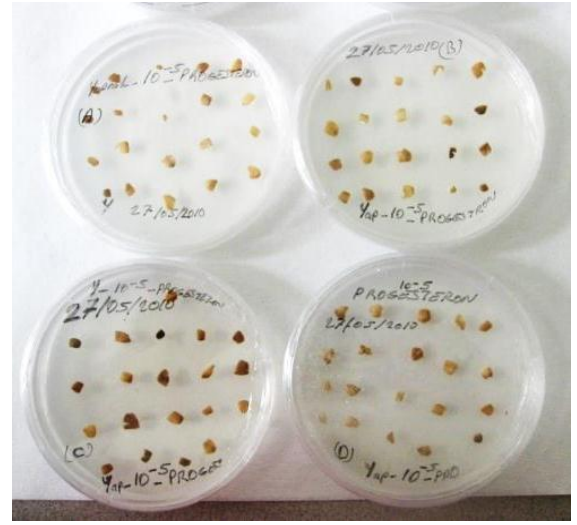


Şekil 4.3. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri.

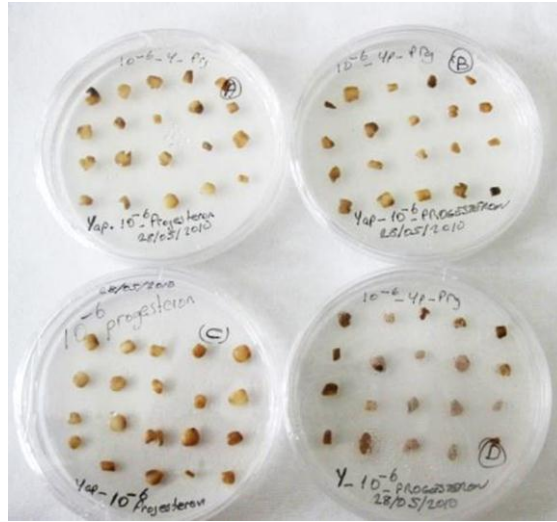
*: A) 10^{-4} mM estron içeren ortamdaki görünümü. B) 10^{-5} mM estron içeren ortamdaki görünümü. C) 10^{-6} mM estron içeren ortamdaki görünümü. D) 0 mM estron içeren ortamdaki görünümü.



A



B



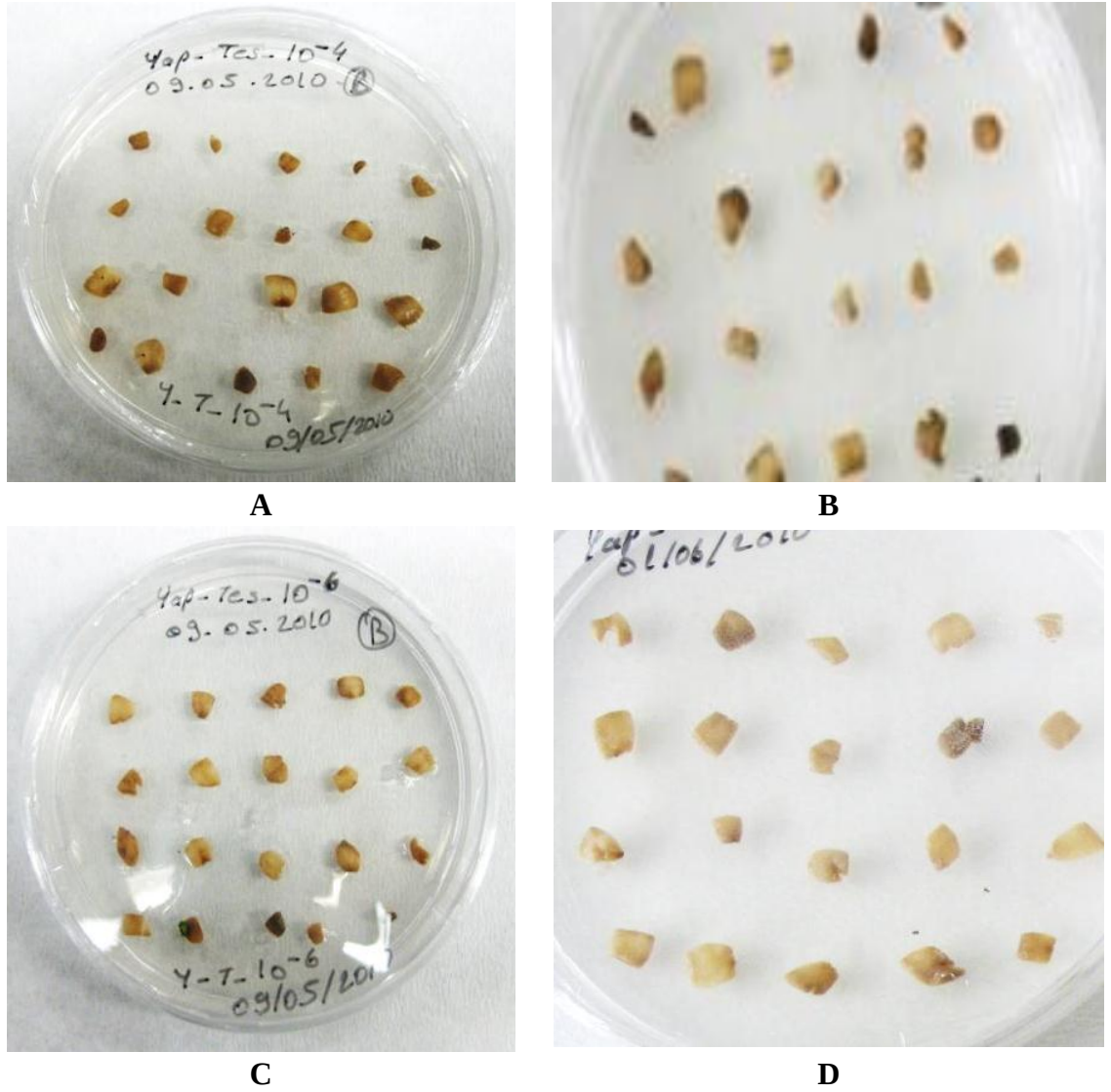
C



D

Şekil 4.4. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri.

*: A) 10^{-4} mM progesteron, içeren ortamdaki görünümü. B) 10^{-5} mM progesteron, içeren ortamda ki görünümü. C) 10^{-6} mM progesteron içeren ortamdaki görünümü. D) 0 mM progesteron içeren ortamdaki görünümü.



Şekil 4.5. Kültür ortamına alınan kotiledon eksplantlarının 30. gündeki görünüşleri.

*: A) 10^{-4} mM testosteroniçeren ortamdaki görünümü. B) 10^{-5} mM testosteron içeren ortamdaki görünümü. C) 10^{-6} mM testosteron içeren ortamdaki görünümü. D) 0 mM testosteron içeren ortamdaki görünümü.

4.1.2. Kök eksplantları

4.1.2.a. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE) bakımından hormon tipleri arasındaki farklılıklar çok önemli ($P < 0,01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Üç ayın ortalamasına

bakıldığında köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %41,25 ile 17 β -estradiol alırken, bunu %36,88 ile estron, %35,94 ile progesteron, %26,67 ile testosteron izlemiştir. Bu özellik bakımından estron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmamış aynı grupta yer almış,ancak diğer hormonlarla aralarındaki farklılıklar önemli olmuştur. 17 β -estradiol ile testosteron arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6).

Çizelge 4.1. Farklı memeli cinsiyet hormon tipleri ve dozlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	47	113766,37	2420,56	23,51	0,0001**
Hormon	3	4876,82	1625,61	15,79	0,0001**
Doz	3	66206,23	22068,74	214,38	0,0001**
Süre	2	30262,10	15131,05	146,99	0,0001**
Hormon*Doz	9	8194,23	910,47	8,84	0,0001**
Doz* Süre	6	1725,45	287,57	2,79	0,01*
Hormon* Süre	6	1003,27	167,21	1,62	0,14 ^{ns}
Hormon*Doz* Süre	18	1306,98	72,61	0,71	0,80 ^{ns}
Hata	141	14514,58	102,94		
Düzeltilmiş Toplam	188	128280,95			

** : Çok önemli (P<0,01)

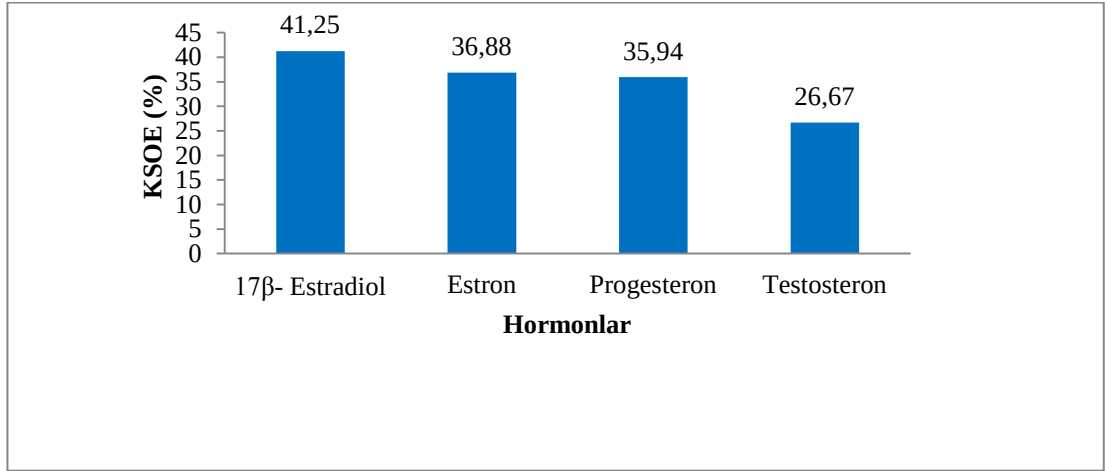
* : Önemli (P<0,05)

ns : Önemsiz (P>0,05)

Çizelge 4.2. Farklı memeli cinsiyet hormon tipleri ve dozlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

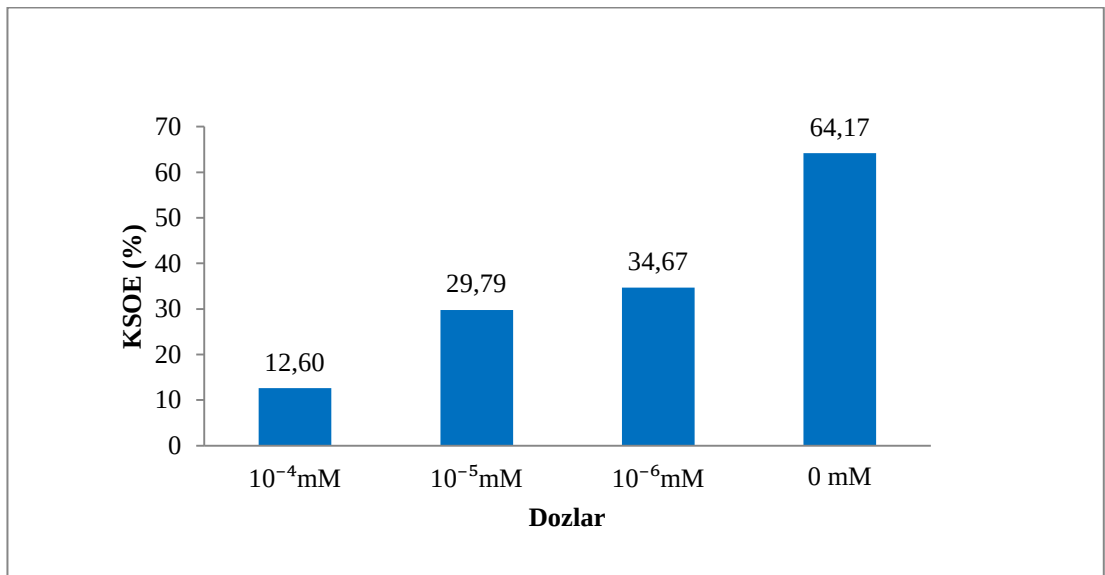
Doz	Hormonlar					Ort $\pm$ SS
	17 β -Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron		
0 mM	64,17 $\pm$ 16,21 Aa	64,17 $\pm$ 16,21 Aa	64,17 $\pm$ 16,21 Aa	64,17 $\pm$ 16,21 Aa		64,17 $\pm$ 15,69A
10 ⁻⁴ mM	8,75 $\pm$ 8,01 Cab	20,00 $\pm$ 21,32 Ba	19,17 $\pm$ 18,69 Ba	2,50 $\pm$ 3,99C b		12,60 $\pm$ 16,18D
10 ⁻⁵ mM	49,58 $\pm$ 18,27 Ba	30,42 $\pm$ 15,14 Bb	30,00 $\pm$ 21,53 Bb	9,17 $\pm$ 8,48Cc		29,79 $\pm$ 21,59C
10 ⁻⁶ mM	42,50 $\pm$ 12,70 Ba	32,92 $\pm$ 20,17 Ba	30,42 $\pm$ 21,69 Ba	32,22 $\pm$ 21,95Ba		34,67 $\pm$ 19,26B
Ort $\pm$ SS	41,25 $\pm$ 24,79 a	36,88 $\pm$ 24,38 b	35,94 $\pm$ 25,57 b	26,67 $\pm$ 28,42 c		

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



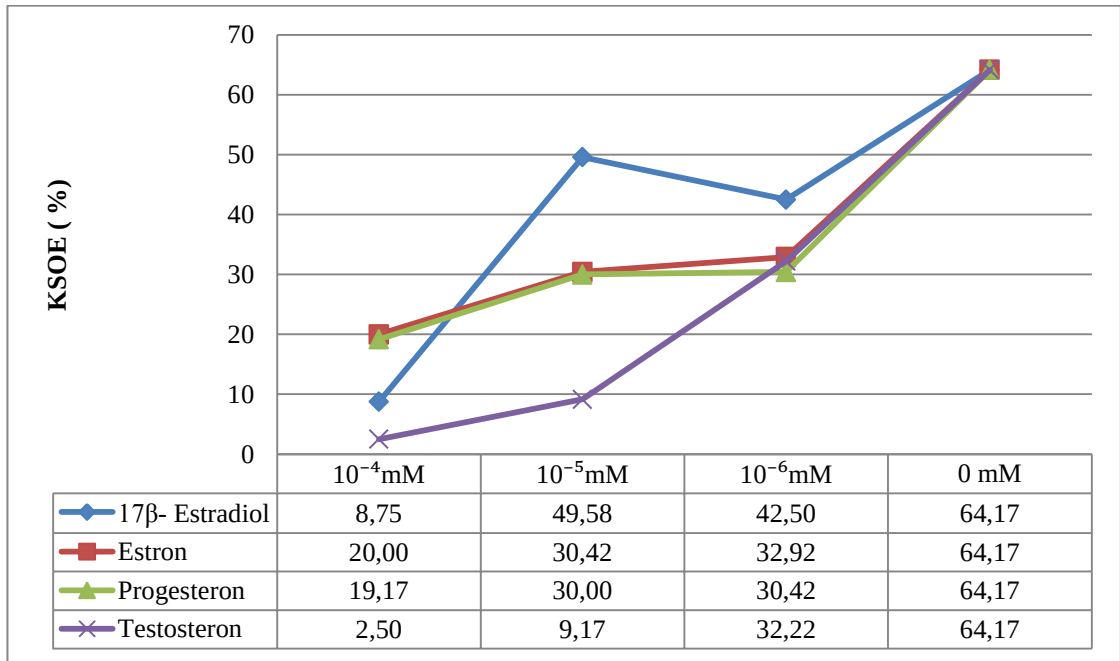
Şekil 4.6. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının kullanıldığı ortamlarda ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından dozlar arasındaki farklılığın çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1). Üç ayın ortalamasına bakıldığında ilk sırayı ortalama %64,17 ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla %34,67 ile 10^{-6} mM, %29,79 ile 10^{-5} mM ve %12,6 ile 10^{-4} mM konsantrasyonu izlemiş ve her biri farklı grupta yer almıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormonxdoz interaksyonu istatistiksel anlamda çok önemli ($P<0,01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'den görüldüğü üzere tüm memeli cinsiyet hormonlarında 10^{-4} mM dozu en düşük köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesini verirken doz azaldıkça bu değer artmış ve 0 (kontrol) dozunda en yüksek değere ulaşmıştır.



Şekil 4.8. Hormonlara ve dozlara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)

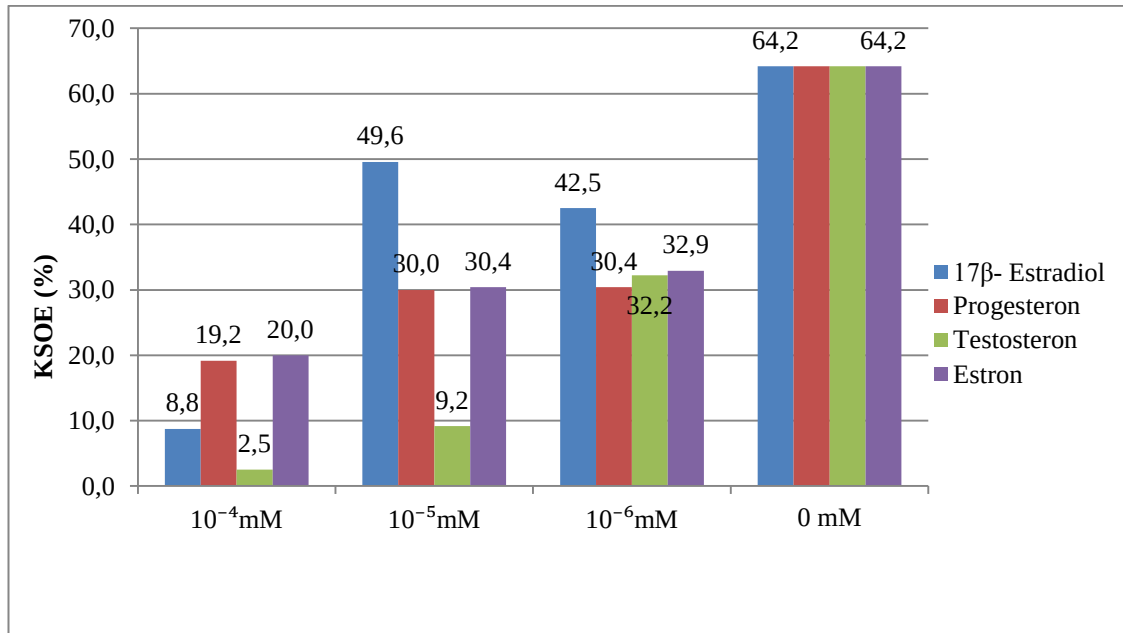
Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %41,25 ile 17β -estradiol hormonu almış, bunu %36,88 ile estron, %35,94 ile progesteron ve %26,67 ile testosteron izlemiştir (Çizelge 4.2). Ancak progesteron ve estron hormonları arasındaki farklılık önemsiz, diğerleri arasındaki farklılıklar ise önemli olmuştur (Çizelge 4.2).

10^{-4} mM konsantrasyonda köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı %20 ile estron, %19,17 ile progesteron ve %8,75 ile 17β -estradiol almış olup son sırayı %2,5 ile testosteron izlemiştir. 17β -estradiol , estron, progesteron aynı gruba girmiş olup testosteron ile aralarındaki fark önemli olmuştur (Çizelge 4.2).

10^{-5} mM konsantrasyonda köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı %49,58 ile 17β -estradiol almış olup bunu sırasıyla %30,42 estron, %30 ile progesteron ve %9,17 ile testosteron izlemiştir. Progesteron ve estron arasındaki fark önemli olmayıp diğer hormonlarla aralarındaki farklar önemli olmuştur. 17β -estradiol ile testosteron arasındaki fark önemlidir (Çizelge 4.2).

10^{-6} mM konsantrasyonda %42,5 ile ilk sırayı 17β -estradiol almış olup bunu %32,92 ile estron, %32,22 ile testosteron, %30,42 ile progesteron izlemiştir. 10^{-6} mM konsantrasyonunda hormonlar arasındaki fark önemsiz ($P > 0,05$) çıkmıştır (Çizelge 4.2).

Kök oluşumuna dozlara göre memeli cinsiyet hormonlarının etkisini inceleyecek olursak, 10^{-4} mM dozunda hormon uygulamaları %KSOE bakımından en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla estron, progesteron ve 17β -estradiol olup aralarındaki fark önemli değildir. 10^{-5} mM dozunda 17β -estradiol, 10^{-6} mM konsantrasyonda ise diğer hormonlarla arasındaki fark önemli olmamasına rağmen 17β -estradiol öne çıkmıştır (Şekil 4.9).



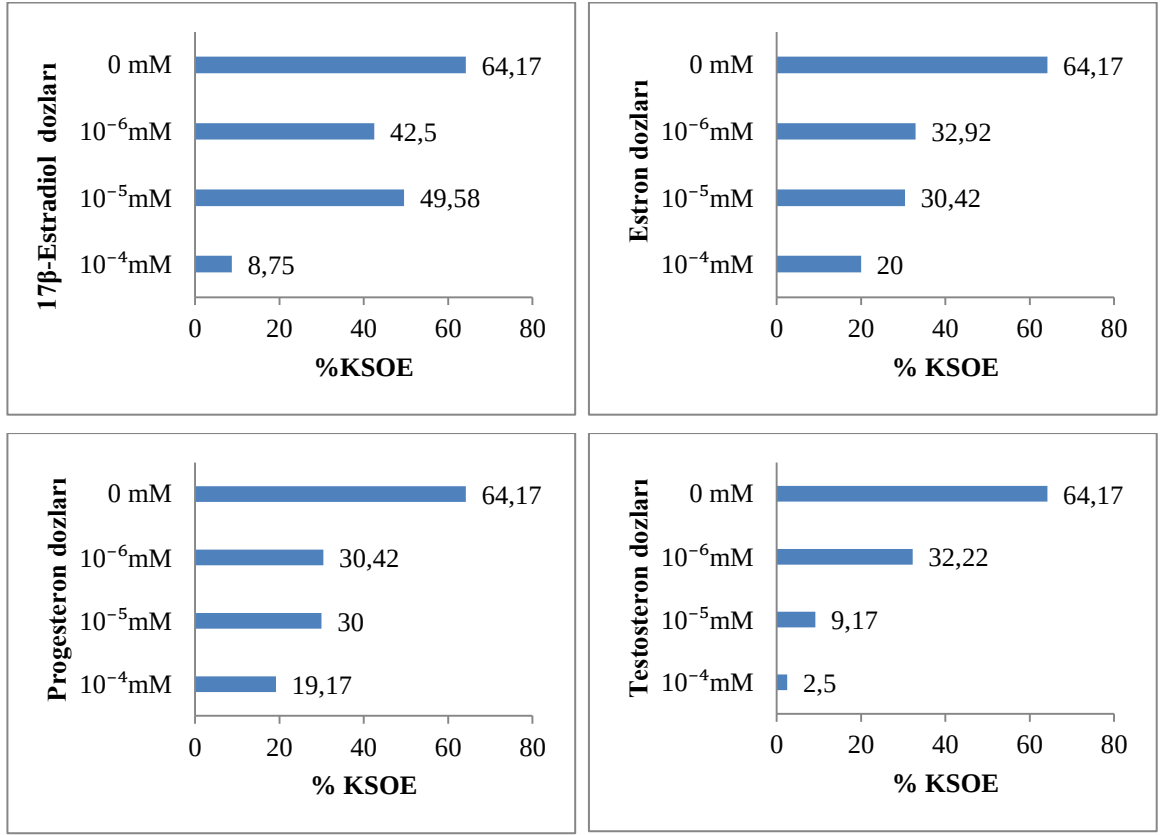
Şekil 4.9. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE) bakımından hormonların kendi içlerinde hangi doza daha iyi cevap verdiklerini inceleyecek olursak; 17β -estradiol hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KSOE yüzdesine bakıldığında kontrol grubunun en yüksek (%64,17), 10^{-4} mM dozu %8,75 ile en düşük değeri almıştır. Aralarındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur. 10^{-5} mM dozu (%49,58) ve 10^{-6} mM dozu (%42,50) arasındaki fark önemsiz olup diğer dozlarla aralarındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.10).

Estron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KSOE bakıldığında kontrol grubunun en yüksek %64,17 değeri almış olup diğer dozlarla arasındaki fark önemli bulunmuştur. Ancak 10^{-4} mM dozu %20, 10^{-5} mM dozu %30,42 ve 10^{-6} mM dozu %32,92 değerlerini almış olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.10).

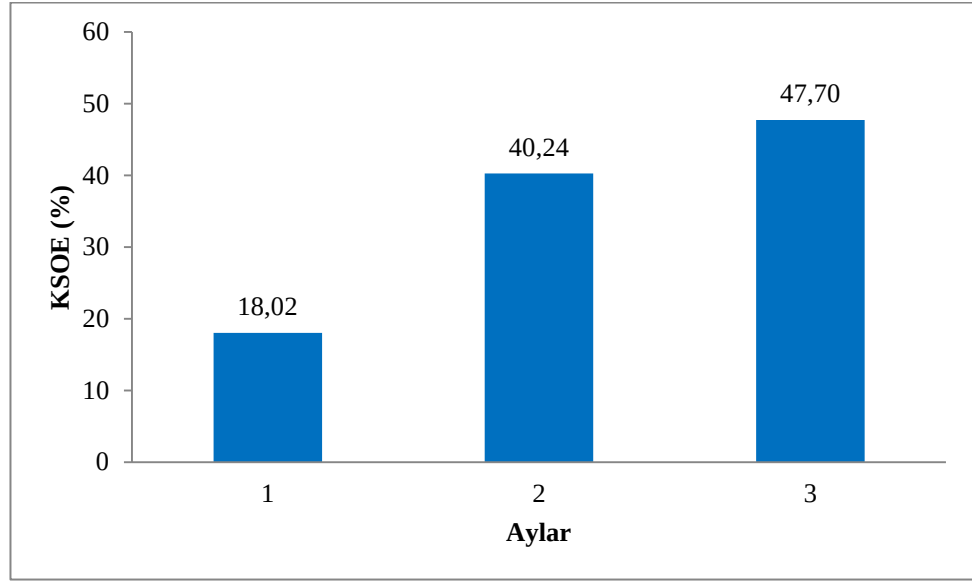
Progesteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KSOE bakıldığında kontrol grubunun en yüksek %64,17 değeri almış olup diğer dozlarla arasındaki fark önemli bulunmuştur. Ancak 10^{-4} mM dozu %19,17, 10^{-5} mM dozu %30 ve 10^{-6} mM dozu %30,42 değerlerini almış olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.10)

Testosteron hormonunun köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE) yönünden dozlar karşılaştırdığında, kontrol %64,17 ile ilk sırada yer almış, bunu sırasıyla 10^{-6} mM dozu (%32,22), 10^{-5} mM dozu (%9,17) ve 10^{-4} mM (%2,5) dozu izlemiştir. 10^{-4} mM dozu ve 10^{-5} mM dozu aynı grupta yer almış, diğerleri farklı grupta yer almıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından kültüre alınma süresi arasındaki farklılığın çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek ortalama %47,70 ile 3. ay olurken bunu %40,24 ortalama ile 2. ay, %18,2 ile 1. ay takip etmiş ve her biri farklı grupta yer almıştır (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.3).



Şekil 4.11. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar

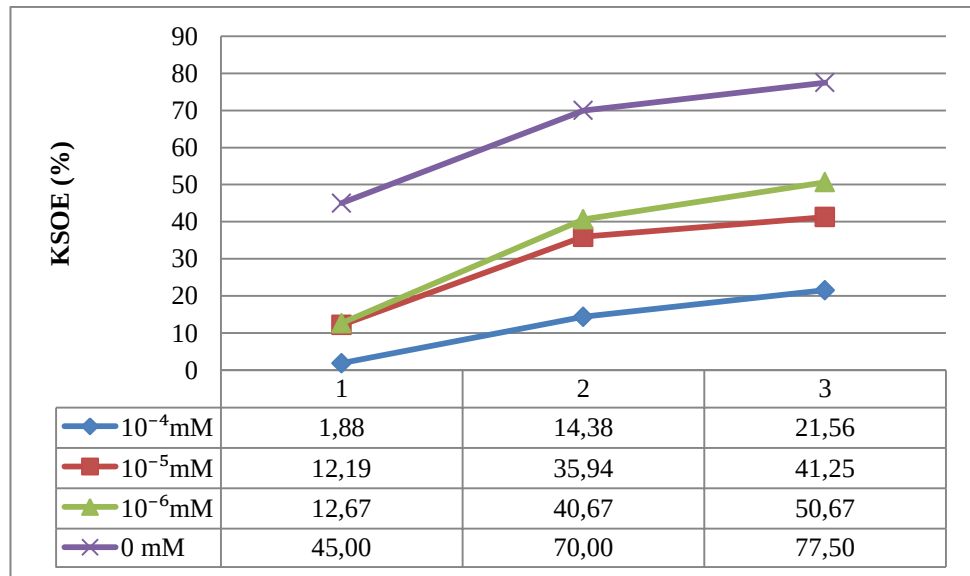
Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından doz x ay etkileşiminin çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1). Memeli cinsiyet hormonlarının, farklı dozlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisi Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KSOE) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Ay	Doz				Ort ± SS
	0 mM	10^{-4} mM	10^{-5} mM	10^{-6} mM	
1	45.00 ± 11.55	Ca 1.88 ± 4.03	Bc 12.19 ± 12.51	Bb 12.67 ± 11.78	Cb 18.02 ± 19.40C
2	70.00 ± 3.65	Ba 14.38 ± 16.11	Ac 35.94 ± 18.99	Ab 40.67 ± 8.84	Bb 40.24 ± 24.02B
3	77.50 ± 2.58	Aa 21.56 ± 18.23	Ac 41.25 ± 20.78	Ab 50.67 ± 10.83	Ab 47.70 ± 25.13A
Ort ± SS	64,17 ± 15,69a	12,60 ± 16,18d	29,79 ± 21,59c	34,67 ± 19,26b	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P < 0,05$).

Tüm memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre konsantrasyon ortalamalarından da görüldüğü gibi (Şekil 4.12) kullanılan 10^{-4} mM dozu tüm aylarda endüşük, 0 dozu en yüksek %KSOE'sini vermiştir. 3. ayın sonuna gelindiğinde en düşükten yükseğe doğru sırasıyla 10^{-4} mM dozu (%21,56), 10^{-5} mM dozu (%41,25), 10^{-6} mM dozu (%50,67) ve 0 dozu (%77,5) vermiştir. Şekil 4.12'den görüldüğü üzere üçüncü ayın sonunda 2. ve 3. aylarda hormon kullanılmamasına rağmen hiçbir doz kontrole (%77,50) ulaşamamıştır. Yine 10^{-4} mM dozu en düşük (%21,56) gruba girerken 0 dozu (%77,50) en yüksek gruba girmiş olup 10^{-5} mM (%41,25) ve 10^{-6} mM (%50,67) grubu diğer iki dozun arasında olup aynı gruba düşmüşlerdir (Çizelge 4.3). Üç ayın ortalaması dikkate alındığında ise her bir doz grubu arasındaki fark önemli olup her biri farklı bir gruba düşmüştür (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.12. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Hormonxay ve hormonxdoxay interaksyonu önemsiz ($P>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Hormonxay interaksyonunun önemsiz çıkması hormonxdoxay interaksyonunda önemsiz çıkmasına neden olmuştur. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının % KSOE yüzdesi bakımından aylara göre ortalamaları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamalar

Ay	Hormonlar				Ort ± SS
	17β-Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron	
1	25,63 ± 18.79	18.13 ± 17.97	14.06 ± 19.60	14.00 ± 20.72	18.02 ± 19.40C
2	44.38 ± 24.07	43.13 ± 20.89	43.44 ± 19.98	29.33 ± 29.51	40.24 ± 24.02B
3	53.75 ± 23.56	49.38 ± 22.79	50.31 ± 21.79	36.67 ± 30.86	47.70 ± 25.13A
ort ± ss	41,25 ± 24,79 a	36,88 ± 24,38 b	35,94 ± 25,57 b	26,67 ± 28,42 c	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.1.2.b. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) bakımından hormonlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). Üç ayın ortalamasına bakıldığında köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %8,54 ile estron alırken, bunu %5,56 ile testosteron, %4,9 ile progesteron %3,13 ile 17β-estradiol izlemiştir. Bu özellik bakımından testosteron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmamış aynı grupta yer almıştır. 17β-estradiol ile estron arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.13).

Çizelge 4.5. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KZSOE) ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	47	4528,34	96,35	3,15	0,0001**
Hormon	3	741,48	247,16	8,07	0,0001**
Doz	3	1628,15	542,72	17,72	0,0001**
Süre	2	938,52	469,26	15,32	0,0001**
Hormon*Doz	9	689,09	76,57	2,50	0,01*
Doz* Süre	6	339,13	56,52	1,85	0,09 ^{ns}
Hormon* Süre	6	143,26	23,88	0,78	0,59 ^{ns}
Hormon*Doz* Süre	18	147,04	8,17	0,27	1,00 ^{ns}
Hata	141	4318,75	30,63		
Düzeltilmiş Toplam	188	8847,09			

** : Çok önemli (P<0,01)

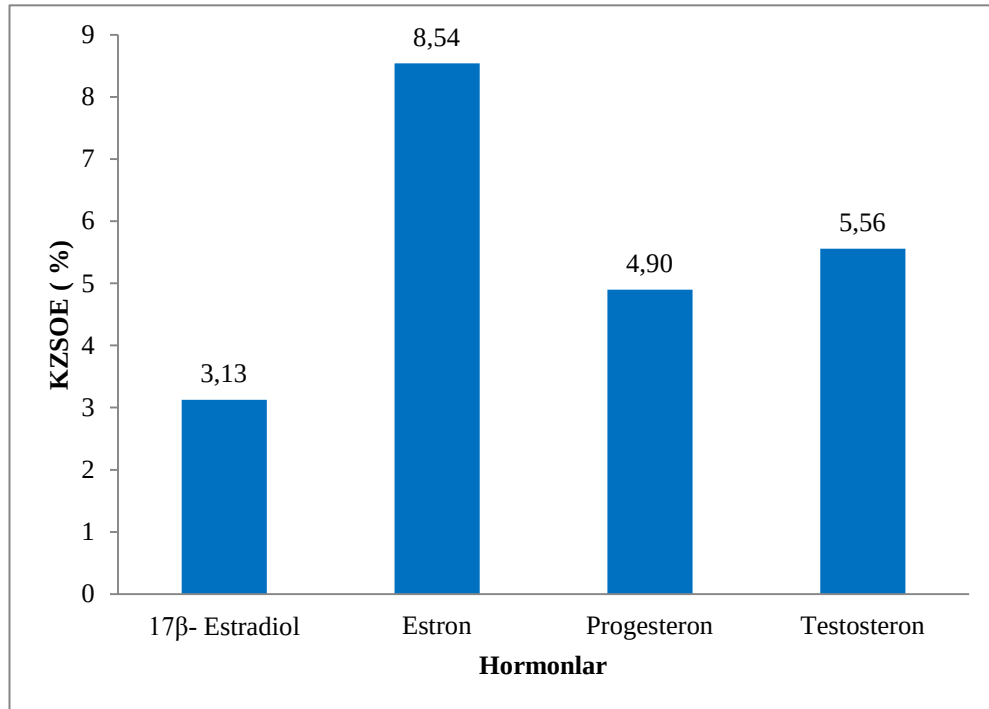
* : Önemli (P<0,05)

ns: Önemsiz (P>0,05)

Çizelge 4.6. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KZSOE) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

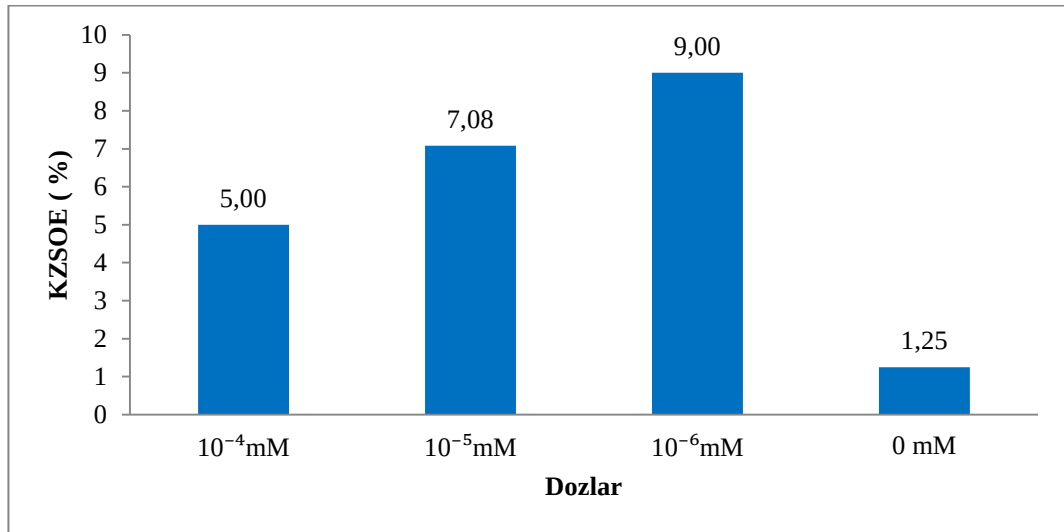
	Hormonlar								
Doz	17β-Estradiol		Estron		Progesteron		Testosteron		Ort ± SS
0 mM	1,25 ± 2,26	Ba	1,25 ± 2,26	Ba	1,25 ± 2,26	Ba	1,25 ± 2,26	Ca	1,25 ± 2,19C
10 ⁻⁴ mM	0,42 ± 1,44	Bc	8,75 ± 7,11	Aa	7,08 ± 5,42	Aab	3,75 ± 4,33	BC bc	5,00 ± 5,83B
10 ⁻⁵ mM	5,00 ± 3,02	Ab	11,67 ± 6,85	Aa	5,83 ± 4,69	Ab	5,83 ± 5,15	Bb	7,08 ± 5,63AB
10 ⁻⁶ mM	5,83 ± 4,17	Aab	12,50 ± 14,54	Aab	5,42 ± 4,98	Ab	13,33 ± 8,66	Aa	9,00 ± 9,51A
ort ± ss	3,13 ± 3,66 c		8,54 ± 9,67 a		4,90 ± 4,89 bc		5,56 ± 6,68 b		

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



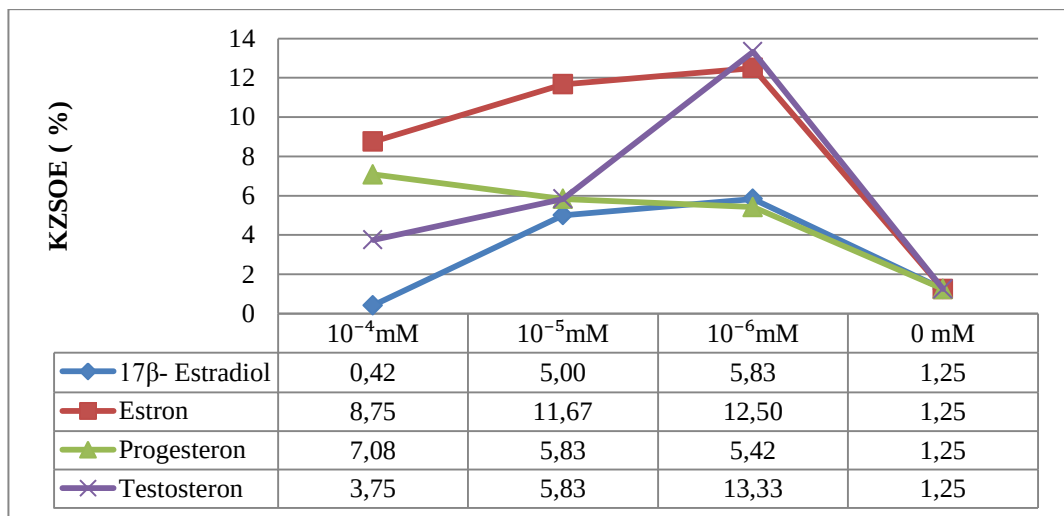
Şekil 4.13. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından dozlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). Üç ayın ortalamasına bakıldığında ilk sırayı ortalama %9 ile 10⁻⁶ mM dozu almış olup bunu sırasıyla ile %7,08 ile 10⁻⁵ mM dozu, %5 ile 10⁻⁴ mM dozu ve %1,25 ile kontrol grubu izlemiştir. 10⁻⁶ mM dozu ve 10⁻⁵ mM dozu aynı, 10⁻⁴ mM dozu ve kontrol farklı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE)

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormonxdoz interaksyonu istatistiksel anlamda önemli ($P < 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.5). Şekil 4.15’den görüldüğü üzere KZSOE bakımından 17β -estradiolün 10^{-4} mM dozu hariç tüm memeli cinsiyet hormonlarında kontrol grubu en düşük değeri almıştır. Progesteron hormonu hariç tüm memeli cinsiyet hormonlarında 10^{-6} mM dozundan 10^{-4} mM dozuna doğru gidildikçe köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi azalmıştır. Progesteron hormonunda ise durum tersi olmuştur (Çizelge 4.6).



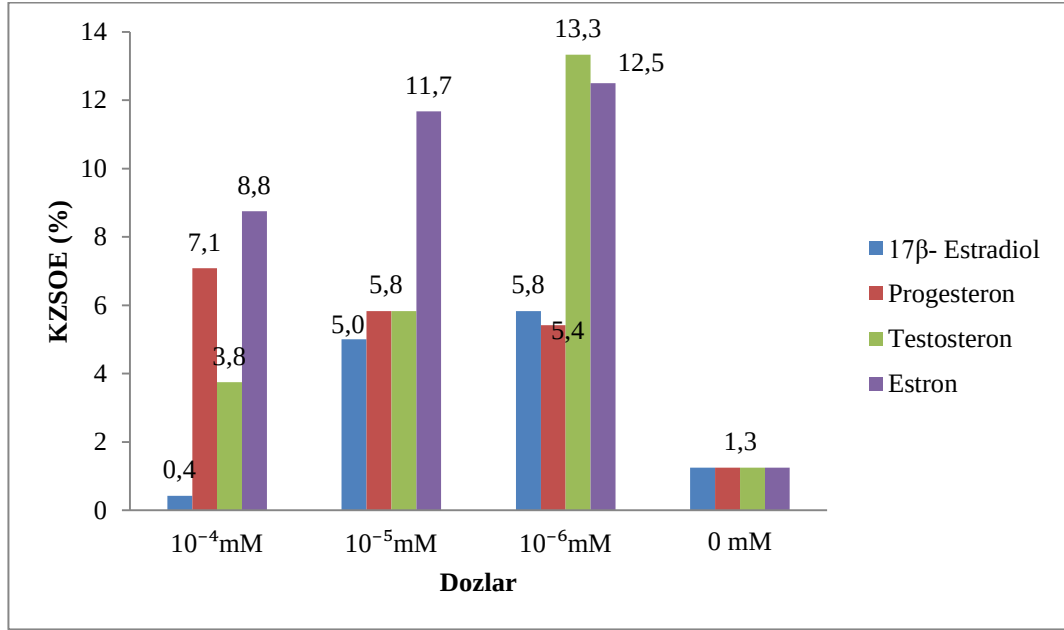
Şekil 4.15. Hormonlara ve dozlara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

10^{-4} mM konsantrasyonda köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı %8,75 ile estron, %7,08 ile progesteron ve %3,75 ile testosteron almış olup son sırayı %0,42 ile 17β -estradiol hormonu izlemiştir. estron ve progesteron aynı gruba girmiş olup 17β -estradiol , testosteron ile aralarındaki fark önemli olmuştur (Çizelge 4.6).

10^{-5} mM konsantrasyonda köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı %11,67 ile estron almış olup bunu sırasıyla %5,83 ile progesteron ve Testesteron izlemiş olup son sırayı %5 ile 17β -estradiol almıştır. Progesteron, testosteron ve 17β -estradiol arasında fark önemli olmayıp estronla aralarındaki fark önemlidir (Çizelge 4.6).

10^{-6} mM konsantrasyonda %13,33 ile ilk sırayı testosteron almış olup bunu sırasıyla %12,50 ile estron, %5,83 ile 17β -estradiol ve %5,42 ile progesteron izlemiştir. 10^{-6} mM konsantrasyonunda estron ve 17β -estradiol hormonları aynı gruba girmiş diğer hormonlar farklı gruplara girmiş olup aralarındaki fark önemlidir.(Çizelge 4.6).

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine dozların etkisini inceleyecek olursak, 10^{-4} mM dozunda hormon uygulamaları %KZSOE bakımından en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla estron ve progesteron olup aralarındaki fark önemli değildir. 10^{-5} mM dozunda estron, 10^{-6} mM konsantrasyonda ise sırasıyla testosteron, estron ve 17β -estradiol olup aralarındaki fark önemli olmamasına rağmen testosteron öne çıkmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi

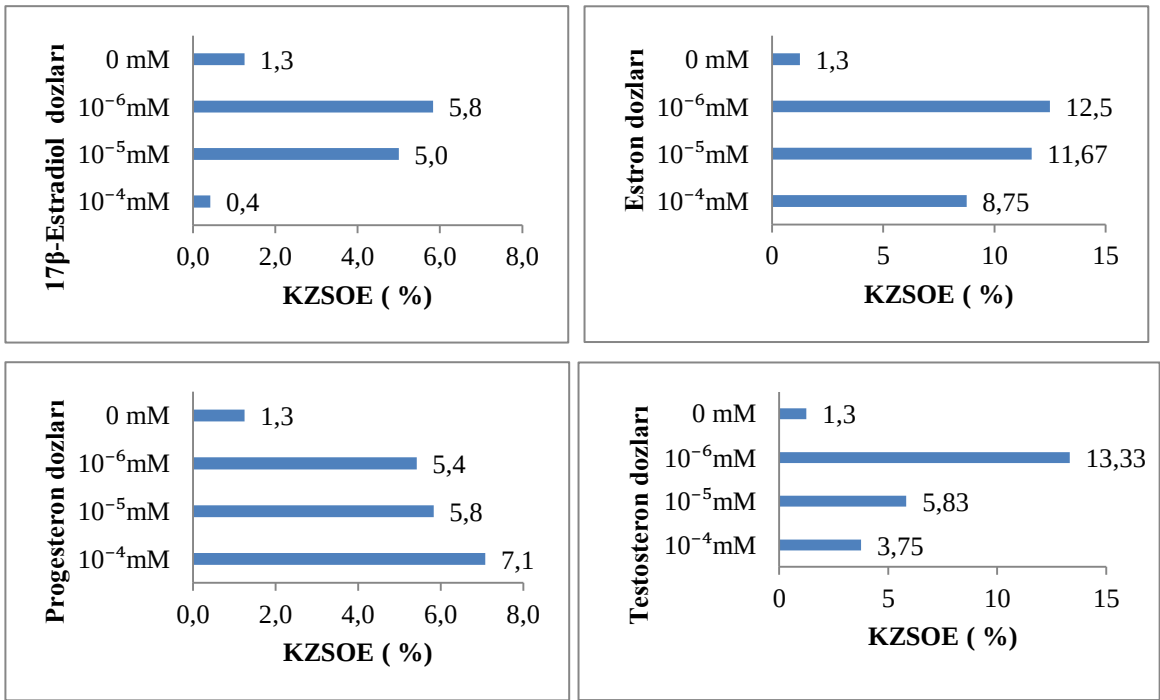
Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormonların kendi içlerinde hangi doza daha iyi cevap verdiklerini inceleyecek olursak; 17β-estradiol hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KZSOE bakıldığında 10^{-6} mM (%5,83) ve 10^{-5} mM dozları (%5,0) en yüksek değerleri vermiş olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur. Kontrol grubu (%1,25) ve 10^{-4} mM dozu (%0,42) en düşük değeri almış ve aralarındaki fark önemsizdir ancak diğer dozlarla aralarındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.17).

Estron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KZSOE bakıldığında en yüksek değerleri sırasıyla 10^{-6} mM (%12,50), 10^{-5} mM (%11,67) ve 10^{-4} mM (%8,75) dozları almış olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur. Kontrol grubu (0 mM) en düşük değeri (%1,245) değeri almış olup diğer dozlarla arasındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.17).

Progesteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KZSOE bakıldığında kontrol grubunun en düşük (%1,25) değeri almış olduğu ve diğer dozlarla arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur. Ancak 10^{-4} mM dozu %7,08, 10^{-5} mM dozu %5,83 ve 10^{-6}

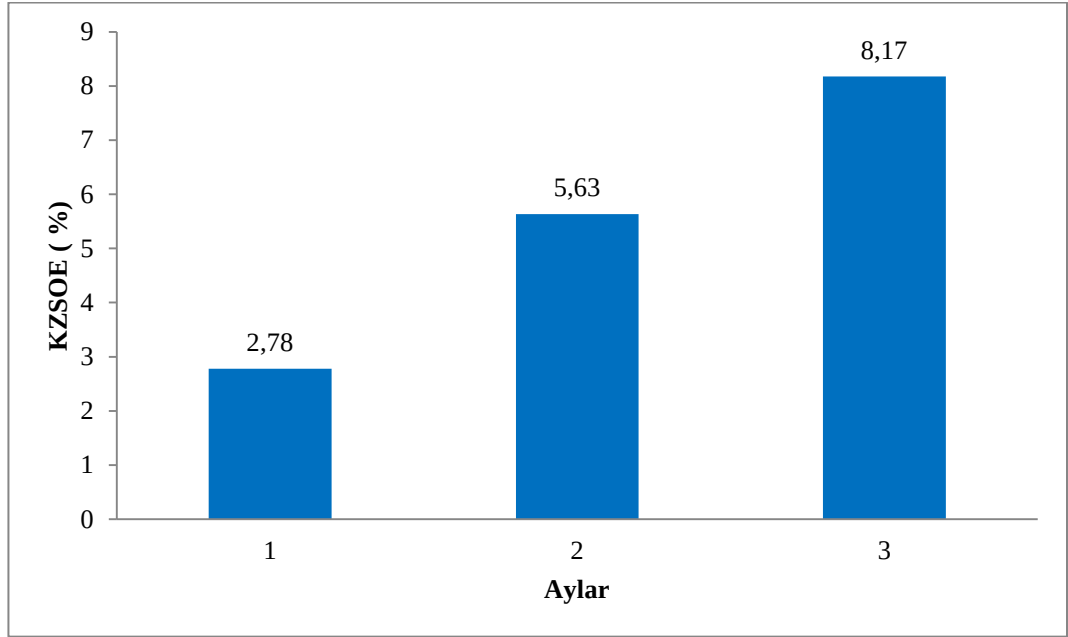
mM dozu %5,42 değerlerini almış olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.17).

Testosteron hormonunun köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) yönünden dozları karşılaştırdığında, 10^{-6} mM dozu (%13,33) ilk sırada yer almış, bunu sırasıyla 10^{-5} mM dozu (%5,83), 10^{-4} mM dozu (%3,75) ve kontrol grubu (%1,25) izlemiştir. 10^{-4} mM dozu ve 10^{-5} mM dozu aynı grupta yer almış, diğerleri farklı grupta yer almıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından kültüre alınma süreleri arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5). En yüksek ortalama %8,17 ile 3. ay olurken bunu %5,63 ortalama ile 2. ay, %2,78 ile 1. ay takip etmiş ve her biri farklı grupta yer almıştır (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8).



Şekil 4.18. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar

Doz $\times$ ay, hormon $\times$ ay ve hormon $\times$ doz $\times$ ay interaksyonu önemsiz ($P>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.5). Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ve dozlarının %KZSOE yüzdesi bakımından aylara göre ortalamaları Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) ait ortalamalar.

Ay	Doz				Ort $\pm$ SS
	0 mM	10^{-4} mM	10^{-5} mM	10^{-6} mM	
1	$1,25 \pm 2,24$	$2,50 \pm 4,83$	$3,44 \pm 3,97$	$4,00 \pm 4,31$	$2,78 \pm 3,99C$
2	$0,00 \pm 0,00$	$5,63 \pm 5,12$	$7,50 \pm 3,65$	$9,67 \pm 10,26$	$5,63 \pm 6,81B$
3	$2,50 \pm 2,58$	$6,88 \pm 6,80$	$10,31 \pm 6,70$	$13,33 \pm 10,63$	$8,17 \pm 8,10A$
ort $\pm$ ss	$1,25 \pm 2,19$ c	$5,00 \pm 5,83$ b	$7,08 \pm 5,63$ ab	$9,00 \pm 9,51$ a	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P<0,05$).

Çizelge 4.8. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%KZSOE) ait ortalamalar

Ay	Hormonlar				Ort ± SS
	17β-Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron	
1	1,88 ± 2,50	4,69 ± 4,99	1,88 ± 3,10	2,67 ± 4,58	2,78 ± 3,99C
2	2,50 ± 3,16	8,13 ± 9,98	5,31 ± 4,64	6,67 ± 6,73	5,63 ± 6,81B
3	5,00 ± 4,47	12,81 ± 11,54	7,50 ± 5,16	7,33 ± 7,76	8,17 ± 8,10A
ort ± ss	3,13 ± 3,66 c	8,54 ± 9,67 a	4,90 ± 4,89 bc	5,56 ± 6,68 b	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.1.2.c. Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından hormonlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.9). Üç ayın ortalamasına bakıldığında, toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %45,42 ile estron alırken, bunu %44,38 ile 17β-estradiol, %40,83 ile progesteron, %32,22 ile testosteron izlemiştir. Bu özellik bakımından estron, 17β-estradiol ve progesteron hormonları arasındaki farklılık önemli olmamış ve aynı grup içerisinde yer almışlardır. Ancak testosteron ile aralarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.19).

Çizelge 4.9. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	47	118152,05	2513,87	18,84	0,0001**
Hormon	3	4279,82	1426,61	10,69	0,0001**
Doz	3	56046,71	18682,24	140,02	0,0001**
Süre	2	41538,46	20769,23	155,67	0,0001**
Hormon*Doz	9	10883,97	1209,33	9,06	0,0001**
Doz* Süre	6	2433,93	405,65	3,04	0,01**
Hormon* Süre	6	1311,97	218,66	1,64	0,14
Hormon*Doz* Süre	18	1480,61	82,26	0,62	0,88
Hata	141	18812,50	133,42		
Düzeltilmiş Toplam	188	136964,55			

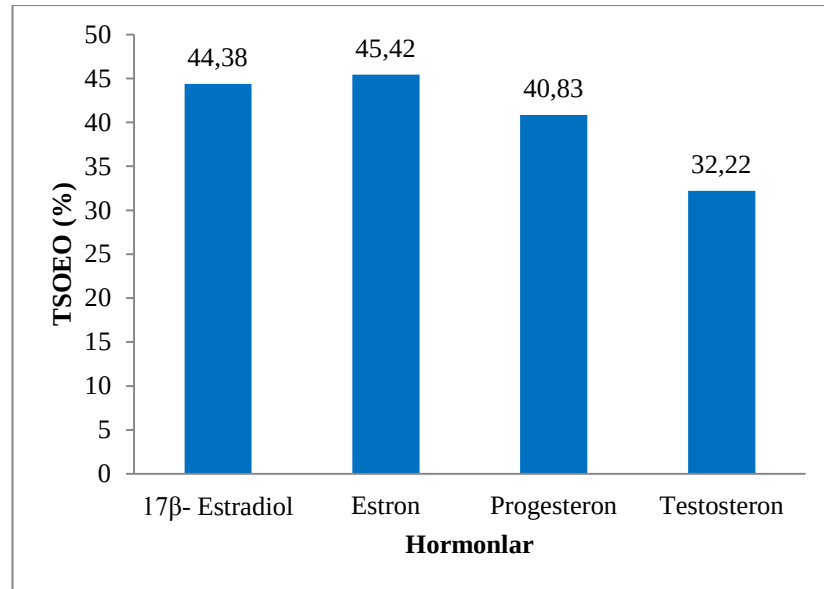
** : çok önemli (P<0,01)

ns: önemsiz (P>0,05)

Çizelge 4.10. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

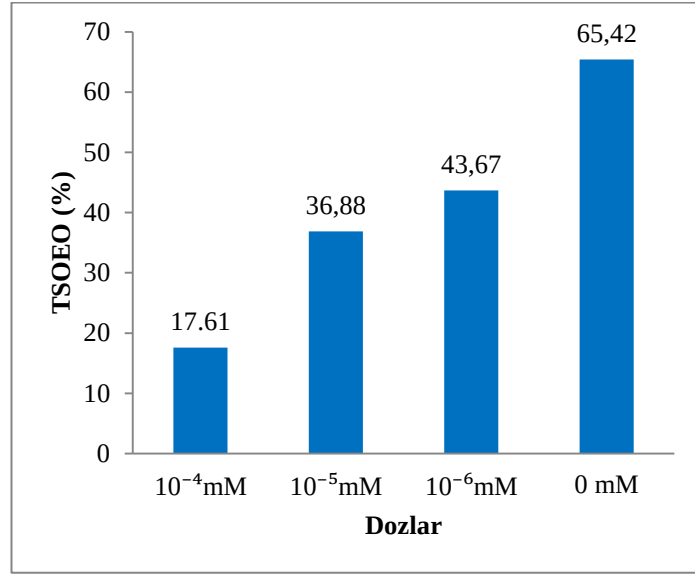
Doz	Hormonlar								Ort ± SS
	17β-Estradiol		Estron		Progesteron		Testosteron		
0 mM	65.42 ± 16.30	Aa	65.42 ± 16.30	Aa	65.42 ± 16.30	Aa	65.42 ± 16.30	Aa	65.42 ± 15.77A
10 ⁻⁴ mM	9.17 ± 8.48	Cb	28.75 ± 26.72	Ba	26.25 ± 18.84	Ba	6.25 ± 6.08	Cb	17.61 ± 19.43D
10 ⁻⁵ mM	54.58 ± 19.94	ABa	42.08 ± 20.61	Bab	35.83 ± 25.03	Bb	15.00 ± 11.08	Cc	36.88 ± 24.03C
10 ⁻⁶ mM	48.33 ± 16.14	Ba	45.42 ± 26.50	Ba	35.83 ± 25.92	Ba	45.56 ± 25.79	Ba	43.67 ± 23.53B
Ort ± SS	44,38 ± 26,33a		45,42 ± 25,86a		40,83 ± 25,90a		32,22 ± 28,79b		

Not: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



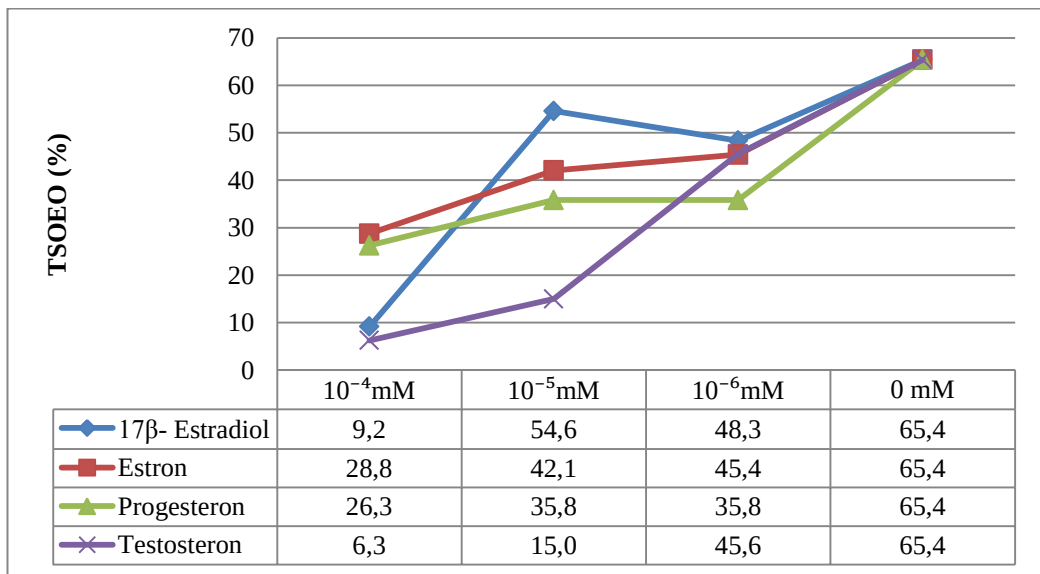
Şekil 4.19. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Toplam köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından dozlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.9). Üç ayın ortalamasına bakıldığında ilk sırayı ortalama %65,42 ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla %43,67 ile 10⁻⁶ mM, %36,88 ile 10⁻⁵ mM ve %17,61 ile 10⁻⁴ mM konsantrasyonu izlemiş ve her biri farklı grupta yer almıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre ortalama toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından Hormon $\times$ doz interaksyonu istatistiksel anlamda çok önemli ($P < 0,01$) bulunmuştur (Çizelge 4.9). Şekil 4.21'den görüldüğü üzere genel olarak tüm memeli cinsiyet hormonlarında (17 β -estradiol hariç) 10^{-4} mM dozu en düşük sürgün oluşturan eksplant yüzdesini verirken doz azaldıkça bu değer artmış ve 0 (kontrol) dozunda maksimum değerine ulaşmıştır.



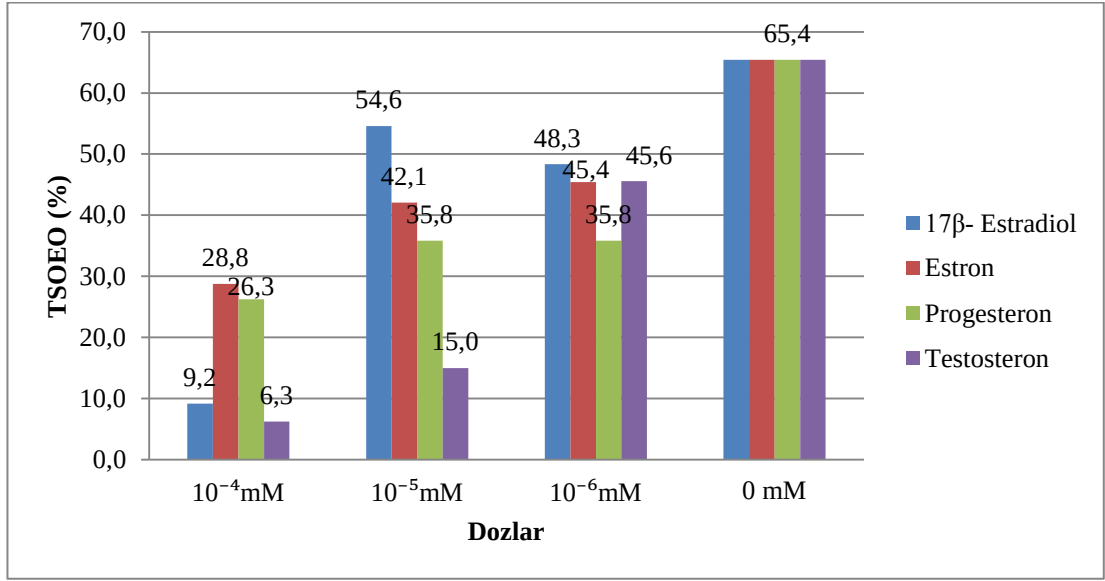
Şekil 4.21. Hormonlara ve dozlara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

10^{-4} mM konsantrasyonda sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %28,75 ile estron, %26,25 ile progesteron, %9,17 ile 17β -estradiol almış olup son sırayı %6,25 ile testosteron almıştır. estron ile progesteron aynı gruba girmiş olup aralarındaki fark önemli değildir. 17β -estradiol ve testosteron da bir gruba girmiştir. İki grup arasındaki fark önemlidir (Çizelge 4.10).

10^{-5} mM dozunda sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı %54,58 ile 17β -estradiol bunu sırasıyla %42,08 ile estron %35,83 ile progesteron ve %15,0 ile testosteron izlemiştir. 17β -estradiol, progesteron ve testosteron hormon uygulamaları arasındaki fark önemli olmuştur (Çizelge 4.10).

10^{-6} mM konsantrasyonda sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi bakımından memeli cinsiyet hormonları arasındaki fark önemsiz çıkmıştır (Çizelge 4.10).

Sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesine dozların etkisini özetleyecek olursak, 10^{-4} mM dozunda estron ve progesteron öne çıkmış olup aralarındaki fark önemli değildir. 10^{-5} mM dozunda %TSOEO bakımından yüksekten düşüğe doğru sırasıyla 17β -estradiol, estron ve progesterondur ve 17β -Estradiol ile progesteron arasındaki fark önemlidir. 10^{-6} mM konsantrasyonda hormon grupları arasındaki fark önemli olmamıştır (Şekil 4.22).



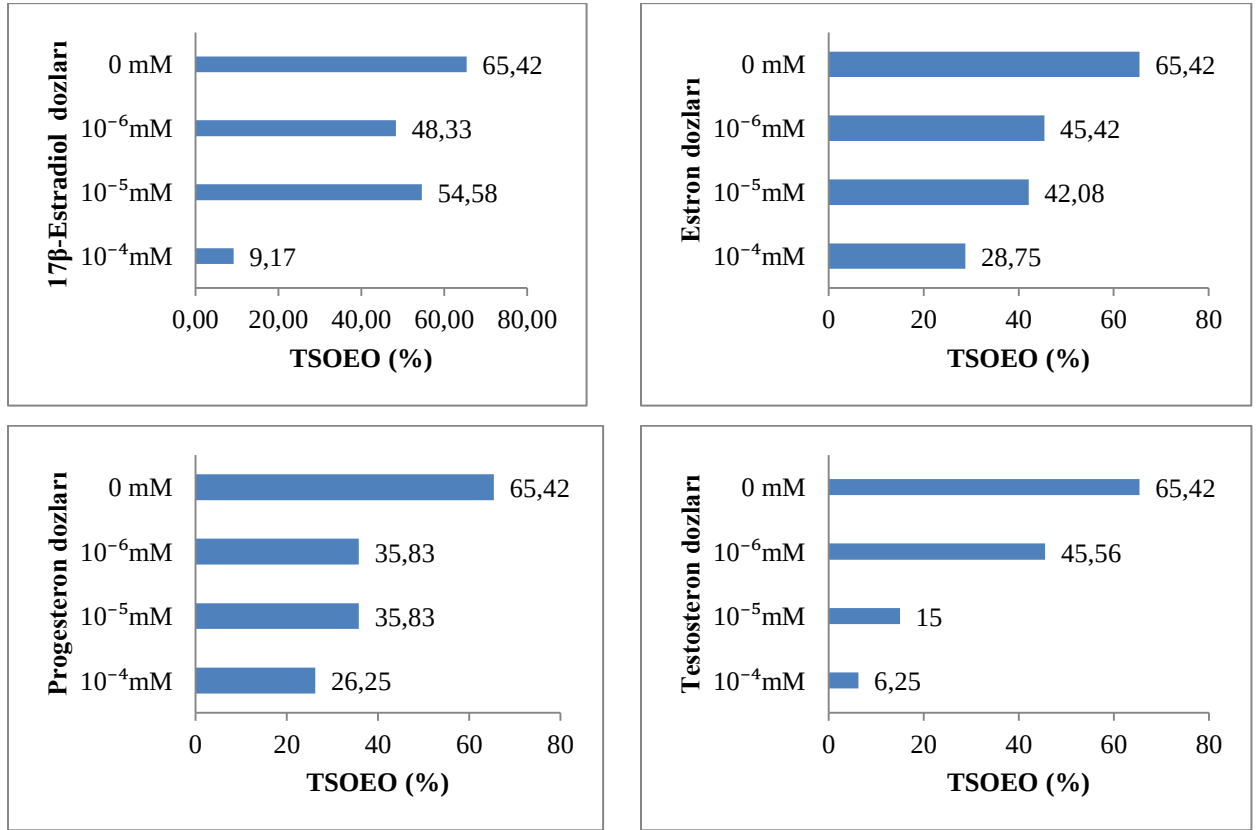
Şekil 4.22. Sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi

Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından hormonların kendi içlerinde hangi doza daha iyi cevap verdiklerini inceleyecek olursak; 17β-estradiol hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %TSOEO bakıldığında kontrol grubu en yüksek (%65,42) değeri almış olup bunu sırasıyla 10⁻⁵mM dozu (%54,58) ve 10⁻⁶ mM dozu (%48,33) izlemiş olup endüşük değeri 10⁻⁴ mM dozu (%9,17) vermiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.23).

Estron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %TSOEO bakıldığında %65,42 ile kontrol grubu en yüksek değeri almış olup, bunu sırasıyla %45,42 ile 10⁻⁶ mM dozu, %42,08 ile 10⁻⁵mM dozu ve %28,75 ile 10⁻⁴ mM dozu izlemiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.23).

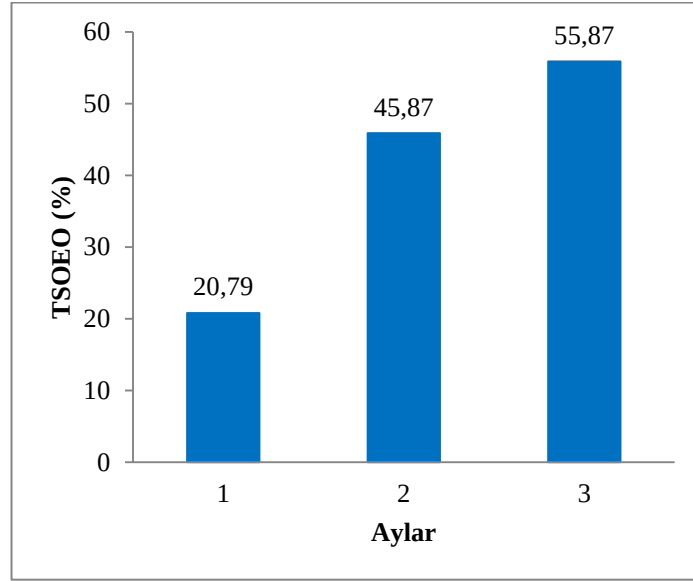
Progesteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %TSOEO bakıldığında %65,42 ile kontrol grubu en yüksek değeri almış olup bunu %35,83 ile 10⁻⁵mM ve 10⁻⁶ mM dozları izlemiş olup en son sırayı %26,25 ile 10⁻⁴ mM dozu izlemiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.23).

Testosteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %TSOEO bakıldığında %65,42 ile kontrol grubu en yüksek değeri almış olup bunu sırasıyla %45,56 ile 10^{-6} mM dozu, %15 ile 10^{-5} mM dozu ve %6,25 ile 10^{-4} mM dozu izlemiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları

Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından kültüre alınma süreleri arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.9). En yüksek ortalama %55,87 ile 3. ay olurken bunu %45,87 ortalama ile 2. ay, %20,79 ile 1.ay takip etmiş ve her biri farklı grupta yer almıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesine sürenin etkisi

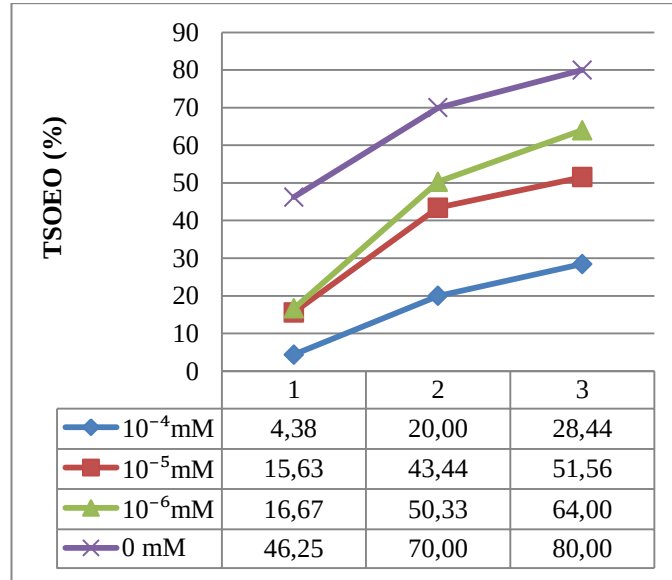
Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından doz x ay interaksyonunun çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.9). Memeli cinsiyet hormonlarının, farklı dozlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisi Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesine (%TSOES) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Ay	Doz							
	0 mM		10^{-4} mM		10^{-5} mM		10^{-6} mM	Ort $\pm$ SS
1	46,25 $\pm$ 11,18	Ca	4,38 $\pm$ 8,34	Bc	15,63 $\pm$ 14,59	Bb	16,67 $\pm$ 12,91Cb	20,79 $\pm$ 19,60C
2	70,00 $\pm$ 3,65	Ba	20,00 $\pm$ 18,53	Ac	43,44 $\pm$ 18,68	Ab	50,33 $\pm$ 13,16 Bb	45,87 $\pm$ 23,22B
3	80,00 $\pm$ 0,00	Aa	28,44 $\pm$ 21,27	Ad	51,56 $\pm$ 22,11	Ac	64,00 $\pm$ 11,37 Ab	55,87 $\pm$ 24,94A
ort $\pm$ ss	65.42 $\pm$ 15.77a		17.61 $\pm$ 19.43d		36.88 $\pm$ 24.03c		43.67 $\pm$ 23.53b	

Tüm memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre konsantrasyon ortalamaları Şekil 4.25 ve Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Tüm aylarda 10^{-4} mM dozu en az %TSOEO verirken bunu sırasıyla, 10^{-5} mM dozu, 10^{-6} mM dozu izlemiş ve en yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesini 0 dozu (kontrol) vermiştir. Üçüncü ayın sonuna gelindiğinde bu durum değişmemiş olup en düşükten yükseğe doğru sırasıyla 10^{-4} mM dozu (%28,44),

10^{-5} mM dozu (%51,56), 10^{-6} mM dozu (%64,0) ve 0 dozu (%80,0) izlemiş olup her biri farklı gruba düşmüşlerdir. Şekil 4.25'ten de görüldüğü üzere üçüncü ayın sonunda 2. ve 3. aylarda hormon kullanılmamasına rağmen hiçbir doz kontrole ulaşamamıştır.



Şekil 4.25. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO)

Hormonxay ve hormonxdoxay interaksyonu önemsiz ($P>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.9). Hormonxay interaksyonunun önemsiz çıkması HormonxDozxAy interaksyonunda önemsiz çıkmasına neden olmuştur. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının %TSOEO yüzdesi bakımından aylara göre ortalamaları Çizelge 4. 12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamalar

Ay	Hormonlar				Ort ± SS
	17β-Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron	
1	27,50 ± 19,83	22,81 ± 17,51	15,94 ± 19,43	16,67 ± 21,10	20,79 ± 19,60C
2	46,88 ± 24,89	51,25 ± 20,62	48,75 ± 17,94	36,00 ± 27,85	45,87 ± 23,22B
3	58,75 ± 25,07	62,19 ± 21,98	57,81 ± 19,15	44,00 ± 31,01	55,87 ± 24,94A
ort ± ss	44,38 ± 26,33a	45,42 ± 25,86a	40,83 ± 25,90a	32,22 ± 28,79b	

4.1.2.d. Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi

Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) bakımından hormonlar arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.13). Üç ayın ortalamasına bakıldığında sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %21,98 ile 17β -estradiol alırken, bunu %17,60 ile estron, %16,46 ile progesteron, %10,78 ile testosteron izlemiştir (Çizelge 4.14). Aynı sıralama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ile aynıdır. Bu durum her iki parametre içinde testosteronun kök oluşumunu inhibe etkisinin dişi cinsiyet hormonlarından daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu özellik bakımından estron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmamış aynı grupta yer almış, ancak diğer hormonlarla aralarındaki farklılıklar önemli olmuştur. 17β -estradiol ile testosteron arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve farklı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.26).

Çizelge 4.13. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	SS	MS	F	P>F
Model	47	26115,44	555,65	7,98	0,0001**
Hormon	3	2703,21	901,07	12,93	0,0001**
Doz	3	546,55	182,18	2,62	0,05 ^{ns}
Süre	2	15636,59	7818,30	112,23	<,0001**
Hormon*Doz	9	3804,71	422,75	6,07	<,0001**
Doz* Süre	6	1960,38	326,73	4,69	0,00**
Hormon* Süre	6	297,96	49,66	0,71	0,64 ^{ns}
Hormon*Doz* Süre	18	992,11	55,12	0,79	0,71 ^{ns}
Hata	141	9822,92	69,67		
Düzeltilmiş Toplam	188	35938,36			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

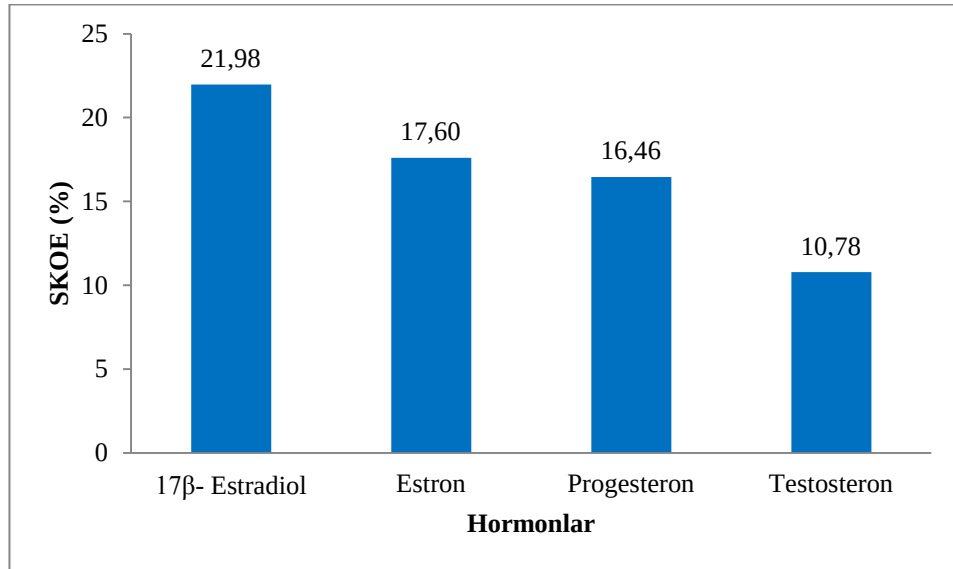
* : Önemli ($P<0,05$)

ns : Önemsiz ($P>0,05$)

Çizelge 4.14. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Doz	Hormonlar							
	17 β -Estradiol		Estron		Progesteron		Testosteron	Ort $\pm$ SS
0 mM	18.75 $\pm$ 15.97	Aa	18.75 $\pm$ 15.97	ABa	18.75 $\pm$ 15.97	Aa	18.75 $\pm$ 15.97	Aa 18.75 $\pm$ 15.45
10 ⁻⁴ mM	26.25 $\pm$ 7.11	Aa	11.67 $\pm$ 8.62	Bc	18.75 $\pm$ 10.25	Ab	0.00 $\pm$ 0.00	Cd 14.17 $\pm$ 12.22
10 ⁻⁵ mM	24.17 $\pm$ 18.93	Aa	23.75 $\pm$ 10.47	Aa	14.17 $\pm$ 14.28	Aab	8.33 $\pm$ 7.18	BCb 17.60 $\pm$ 14.66
10 ⁻⁶ mM	18.75 $\pm$ 9.56	Aa	16.25 $\pm$ 14.94	ABa	14.17 $\pm$ 11.65	Aa	17.78 $\pm$ 15.63	ABa 16.67 $\pm$ 12.66
Ort $\pm$ SS	21.98 $\pm$ 13.71a		17.60 $\pm$ 13.21b		16.46 $\pm$ 13.0 b		10.78 $\pm$ 13.48c	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



Şekil 4.26. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi

Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından dozlar arasındaki farklılığın önemsiz (P<0,05) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.13). Üç ayın ortalamasına bakıldığında ilk sırayı ortalama %18,75 ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla %17,6 ile 10⁻⁵ mM, %16,67 ile 10⁻⁶ mM ve %14,17 ile 10⁻⁴ mM konsantrasyonu izlemiştir (Çizelge 4.14).

Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından Hormon $\times$ doz interaksyonu istatistiksel anlamda çok önemli (P<0,01) bulunmuştur (Çizelge 4.13).

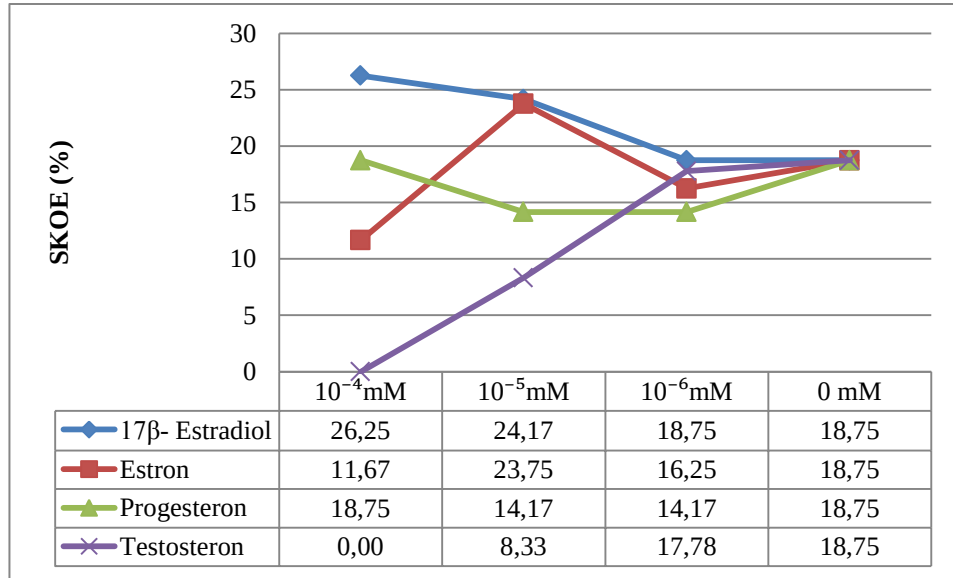
Şekil 4.27'den görüldüğü üzere testosteronun 10^{-4} mM dozu tüm memeli cinsiyet hormonları içerisinde en düşük, sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE)'ni verirken konsantrasyon azaldıkça bu değer artmıştır. Bunun nedeni olarak testosteron hormonunun 10^{-4} mM dozunda kültüre alınan eksplantların çok büyük bir kısmının ölmesinden kaynaklanmaktadır. testosteron hormonunun konsantrasyonu azaldıkça, %KSOE, %TSOEO ve %SKOE parametreleri üzerindeki inhibe edici etkisinin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.10, Şekil 4.23, Şekil 4.29) %KZSOE bakımından da yine doz azaldıkça inhibe edici etkinin azaldığı görülmektedir. Ancak Şekil 4.17'de görüldüğü üzere kontrol dozunun %KZSOE parametresi bakımından minimum değeri almasının nedeni kontrol grubunun kök oluşumuna inhibe edici etkisinin olmaması aksine kök gelişimini teşvik etmesinden kaynaklanmaktadır.

17β -estradiol hormonunun 10^{-4} mM dozu kendi içinde diğer konsantrasyonlarına göre en düşük %KSOE, %KZSOE ve %TSOEO vermiştir (Çizelge 4.2, Çizelge 4.6 ve 4.10). Ancak 17β -estradiol hormonunun 10^{-4} mM dozu, aynı dozdaki diğer hormonlara göre %SKOE bakımından maksimum değeri almış olup kök gelişimini önemli oranda teşvik ettiği görülmüştür (Çizelge 4.14). 17β -estradiol hormonunun bütün dozlarının %SKOE bakımından aralarındaki fark önemli olmamıştır. 17β -estradiol hormonu kök gelişimini diğer hormonlara göre daha fazla teşvik ettiği Çizelge 4.2, Çizelge 4.6, Çizelge 4.14 ve Şekil 4.27'de açıkça görülmektedir.

Tüm dişi memeli cinsiyet hormonları (17β -estradiol , estron ve progesteron) testosterona göre sürgün oluşumunu ve kök oluşumunu teşvik etmiş, testosteron ise inhibe etmiştir.

Estronda doz azaldıkça köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi artmıştır (Çizelge 4.2, Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.10). Genel olarak estron hormonu diğer iki dişi cinsiyet hormonu (progesteron ve 17β -estradiol) gibi sürgün oluşturan eksplant yüzdesini teşvik etmiş olmakla birlikte bunlardan farkı köksüz sürgün oluşumunu diğer dişi cinsiyet hormonlarından daha fazla teşvik etmiş olmasıdır.

Şekil 4.27'den görüldüğü üzere progesteron hormonunda %SKOE bakımından dozlar arasında fark olmamasına rağmen maksimum değeri 10^{-4} mM ve 0 dozu vermiştir.



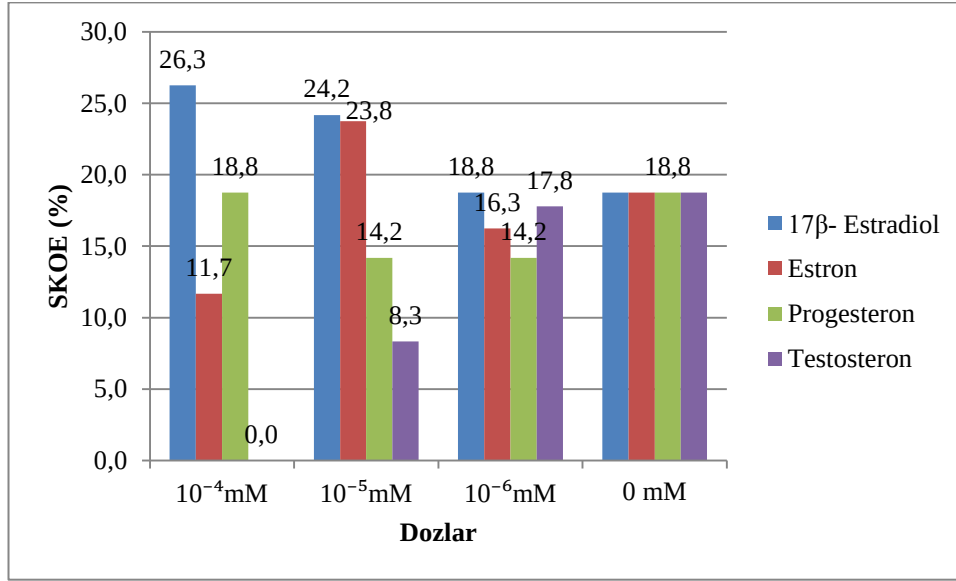
Şekil 4.27. Hormonlara ve dozlara göre sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesi

Hormonxdoz interaksyonu, 10^{-4} mM konsantrasyonda sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı %26,25 ile 17β-estradiol almış olup bunu sırasıyla %18,75 ile progesteron, %11,67 ile estron ve %0 ile testosteron izlemiştir. Hormonlar arasındaki fark önemli olup her biri farklı bir grupta yer almıştır (Çizelge 4.14).

10^{-5} mM konsantrasyonda %SKOE bakımından bakımından ilk sırayı %24,17 ile 17β-estradiol almış olup bunu sırasıyla %23,75 ile estron, %14,17 ile progesteron ve %8,33 ile Tetesteron izlemiştir (Çizelge 4.14).

10^{-6} mM konsantrasyonda %SKOE bakımından ilk sırayı %18,75 ile 17β-estradiol almış olup bunu %17,78 ile testosteron, %16,25 ile estron, %14,17 ile progesteron izlemiştir. 10^{-6} mM konsantrasyonunda hormonlar arasındaki fark önemsiz ($P > 0,05$) çıkmıştır (Çizelge 4.14).

%SKOE'ne dozlara göre hormonların etkisini inceleyecek olursak, 10^{-4} mM dozunda 17β -estradiol, 10^{-5} mM dozunda 17β -estradiol ve estron, 10^{-6} mM konsantrasyonda ise diğer hormonlarla aynı gruba düşmesine rağmen 17β -estradiol öne çıkmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesine hormon dozlarının etkisi

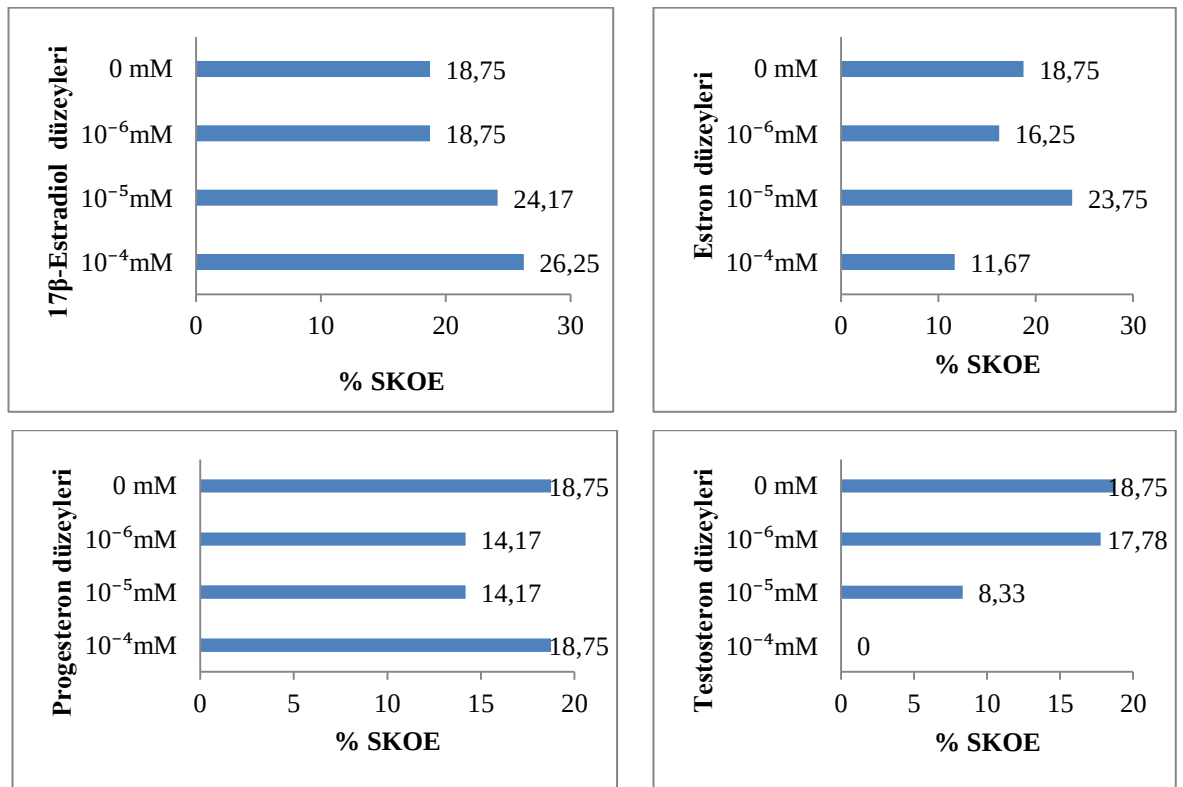
Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) bakımından hormonların kendi içlerinde hangi doza daha iyi cevap verdiklerini inceleyecek olursak; 17β -estradiol hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %SKOE bakıldığında 10^{-4} mM dozu en yüksek (%26,25), 10^{-6} mM dozu ve kontrol grubu %18,75 ile en düşük değeri almış olup konsantrasyonlar arasındaki fark önemli olmamıştır (Çizelge 4.14, Şekil 4.29).

estron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %KSOE bakıldığında 10^{-5} mM dozu %23,75 ile en yüksek değeri almış olup bunu sırasıyla %18,75 ile kontrol grubu, %16,25 ile 10^{-6} mM dozu ve %11,67 ile 10^{-4} mM dozu izlemiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.29).

Progesteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %SKOE bakıldığında kontrol grubu ve 10^{-4} mM dozu en yüksek %18,75 değerini 10^{-5} mM dozu ve 10^{-6} mM dozu ise

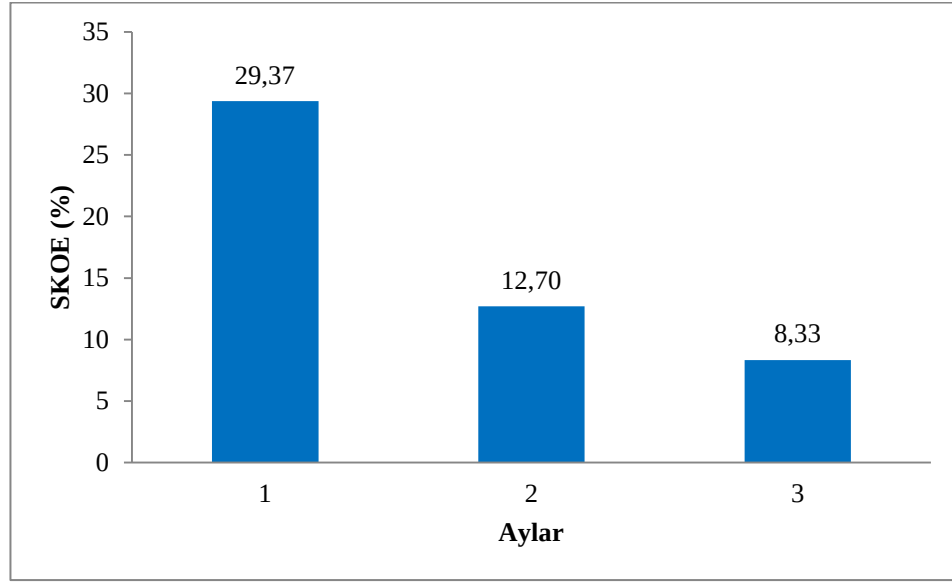
%14,17 değerlerini almış olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.14, Şekil 4.29).

Testosteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu %SKOE bakıldığında kontrol grubu %18,75 en yüksek değeri almış olup bunu sırasıyla %17,78 ile 10^{-6} mM dozu, %8,33 ile 10^{-5} mM dozu ve %0 ile 10^{-4} mM dozu izlemiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon ve dozları

Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından kültüre alınma süresi arasındaki farklılığın çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.13). En yüksek ortalama %29,37 ile 1. ay olurken bunu %12,70 ortalama ile 2. ay, %8,33 ile 3. ay takip etmiş ve her biri farklı grupta yer almıştır (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar

Sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesi bakımından doz x ay interaksyonunun çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.13). Memeli cinsiyet hormonlarının, farklı dozlarının aylara göre %SKOE'ne etkisi Çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sadece kök oluşturan oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

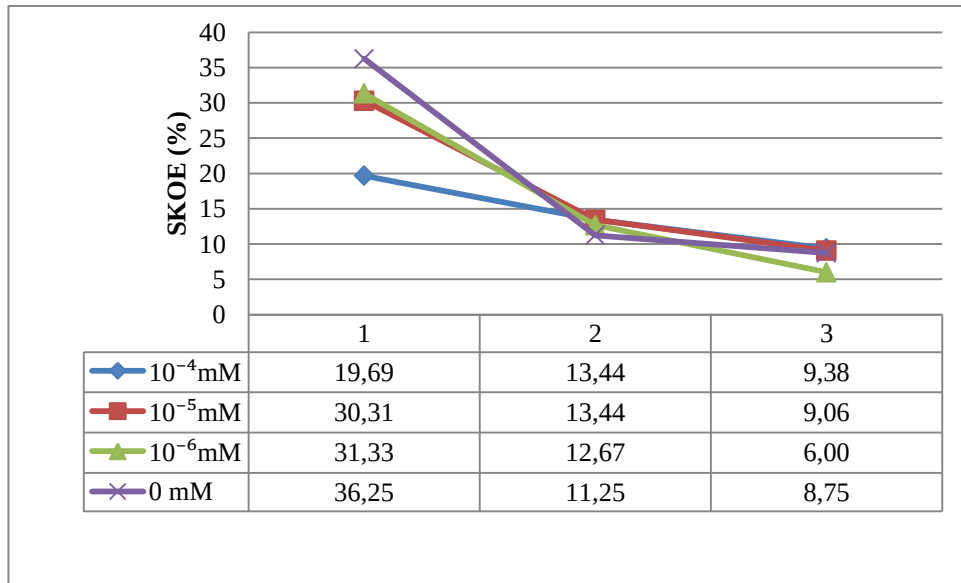
Ay	Doz								Ort ± SS
	0 mM		10^{-4} mM		10^{-5} mM		10^{-6} mM		
1	36,25 ± 12,85	Aa	19,69 ± 14,77	Ab	30,31 ± 14,55	Aa	31,33 ± 8,55	Aa	29,37 ± 14,07A
2	11,25 ± 7,64	Ba	13,44 ± 10,76	ABa	13,44 ± 10,76	Ba	12,67 ± 6,51	Ba	12,70 ± 8,97B
3	8,75 ± 5,63	Ba	9,38 ± 8,73	Ba	9,06 ± 8,80	Ba	6,00 ± 4,31	Ca	8,33 ± 7,13C
ort ± ss	18.75 ± 15.45a		14.17 ± 12.22b		17.60 ± 14.66a		16.67 ± 12.66ab		

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P < 0,05$).

Tüm memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre konsantrasyon ortalamalarından da görüldüğü gibi (Şekil 4.31, Çizelge 4.15) kullanılan 10^{-4} mM dozu en düşük, 0 dozu en

yüksek %SKOE'sini vermiştir. Yine, tüm dozlarda en yüksek %SKOE ilk ayda elde edilmiştir.

3. ayın sonuna gelindiğinde düşükten yükseğe doğru sırasıyla 10^{-6} mM dozu (%6), kontrol grubu (%8,75), 10^{-5} mM dozu (%9,06) ve 10^{-4} mM dozu (%9,38) olmuştur. Şekil 4.31'den de görüldüğü üzere zamanın ilerlemesine ve aynı zamanda da 2. ve 3. aylarda kültür ortamında hormon kullanılmamasına bağlı olarak sürgün gelişimi teşvik edildiği (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.3, Şekil 4.25 ve Çizelge 4.11) için sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi zamana bağlı olarak azalmıştır. Yine şekillerden (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.3, Şekil 4.25 ve Çizelge 4.11, Şekil 4.31) de görüldüğü üzere 10^{-4} mM dozu kültüre alınan eksplantlarda hem kök gelişimini hemde sürgün oluşumunu daha fazla inhibe ettiği sonucunu çıkarabiliriz.



Şekil 4.31. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarının aylara göre sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi

Hormonxay ve hormonxdozxy etkileşimi önemsiz ($P>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.13). Farklı memeli cinsiyet hormonlarının %SKOE yüzdesi bakımından aylara göre ortalamaları Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamalar

Ay	Hormonlar				Ort ± SS
	17β-Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron	
1	34,69 ± 12,04	30,31 ± 12,58	31,25 ± 10,08	20,67 ± 18,01	29,37 ± 14,07A
2	19,06 ± 10,36	13,44 ± 7,47	10,63 ± 6,29	7,33 ± 7,53	12,70 ± 8,97B
3	12,19 ± 7,30	9,06 ± 8,00	7,50 ± 5,77	4,33 ± 5,30	8,33 ± 7,13C
ort ± ss	21.98 ± 13.71a	17.60 ± 13.21b	16.46 ± 13.0 b	10.78 ± 13.48	±

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.1.2.e. Rejenerasyon etkinliği

Rejenerasyon etkinliğine ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup rejenerasyon etkinliği (RE) bakımından hormonlar arasındaki farklılığın ve hormonxdoz interaksyonu önemsiz (P>0,05) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının rejenerasyon etkinliğine ait varyans analiz sonuçları.

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	15	1,797276	0,119818	0,94	0,5315 ^{ns}
Hormon	3	0,741047	0,247016	1,93	0,1372 ^{ns}
Doz	3	0,277947	0,092649	0,72	0,5422 ^{ns}
Hormon*Doz	9	0,797814	0,088646	0,69	0,711 ^{ns}
Hata	47	6,006667	0,127801		
Düzeltilmiş Toplam	62	7,803943			

ns: Önemsiz (P>0,05)

Hormon ortalamalarına bakıldığında rejenerasyon etkinliği bakımından ilk sırayı ortalama 1,139 ile 17β-estradiol alırken, bunu 0,95 ile progesteron, 0,886 ile estron, 0,869 ile testosteron izlemiştir (Çizelge 4.18).

Dozlar bazında rejenerasyon etkinliği bakımından ilk sırayı 1,063 ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla 0,969 ile 10⁻⁴ mM dozu, 0,922 ile 10⁻⁵ mM dozu ve 0,892 ile 10⁻⁶ mM dozu takip etmiştir.

Çizelge 4.18. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının rejenerasyon etkinliğine ait ortalamaları

Doz	Hormonlar				Ort ± SS
	17β-Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron	
0 mM	1,063 ± 0,102	1,063 ± 0,102	1,063 ± 0,102	1,063 ± 0,102	1,063 ± 0,091
10 ⁻⁴ mM	1,438 ± 1,048	0,760 ± 0,536	0,803 ± 0,357	0,875 ± 0,368	0,969 ± 0,640
10 ⁻⁵ mM	1,050 ± 0,119	0,900 ± 0,288	0,988 ± 0,156	0,750 ± 0,300	0,922 ± 0,236
10 ⁻⁶ mM	1,005 ± 0,093	0,820 ± 0,256	0,948 ± 0,062	0,763 ± 0,185	0,892 ± 0,176
ort ± ss	1,139 ± 0,509	0,886 ± 0,321	0,950 ± 0,207	0,869 ± 0,269	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.1.2.f. Eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS)

Eksplant başına köksüz sürgün sayısına (EBKZSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormonlar arasındaki farklılığın önemli (P<0,05) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

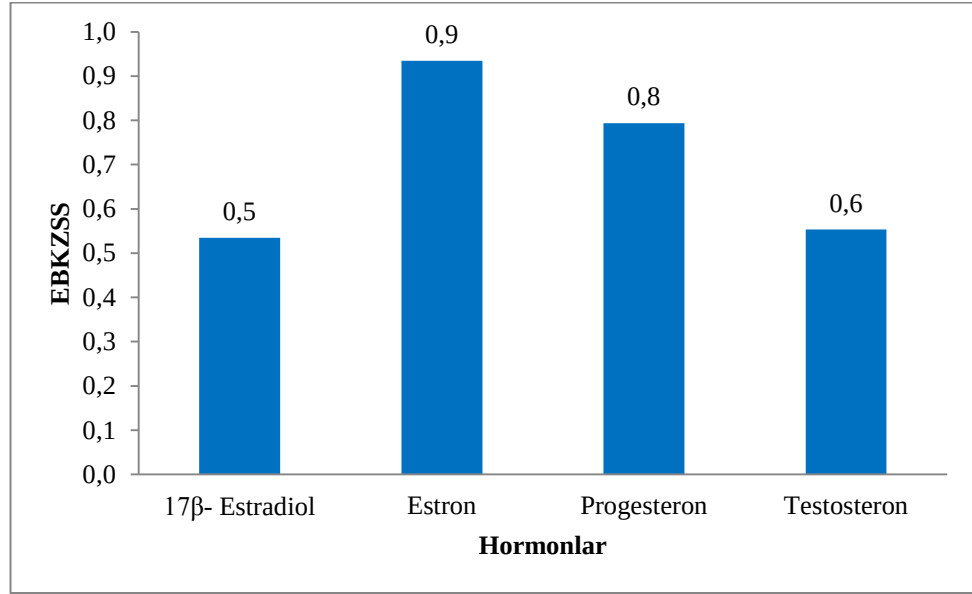
Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	15	5,405169	0,360345	2,31	0,0148*
Hormon	3	1,659381	0,553127	3,55	0,0214*
Doz	3	1,661262	0,553754	3,55	0,0213*
Hormon*Doz	9	2,036924	0,226325	1,45	0,1945 ^{ns}
Hata	47	7,332292	0,156006		
Düzeltilmiş Toplam	62	12,73746			

** : Çok önemli (P<0,01)

* : Önemli (P<0,05)

ns: Önemsiz (P>0,05)

Hormon ortalamalarına bakıldığında EBKZSS bakımından ilk sırayı ortalama 0,934 adet ile estron almış olup bunu sırasıyla 0,794 adet ile progesteron ve 0,553 adet ile testosteron ve 0,534 adet ile 17β-estradiol izlemiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.32).



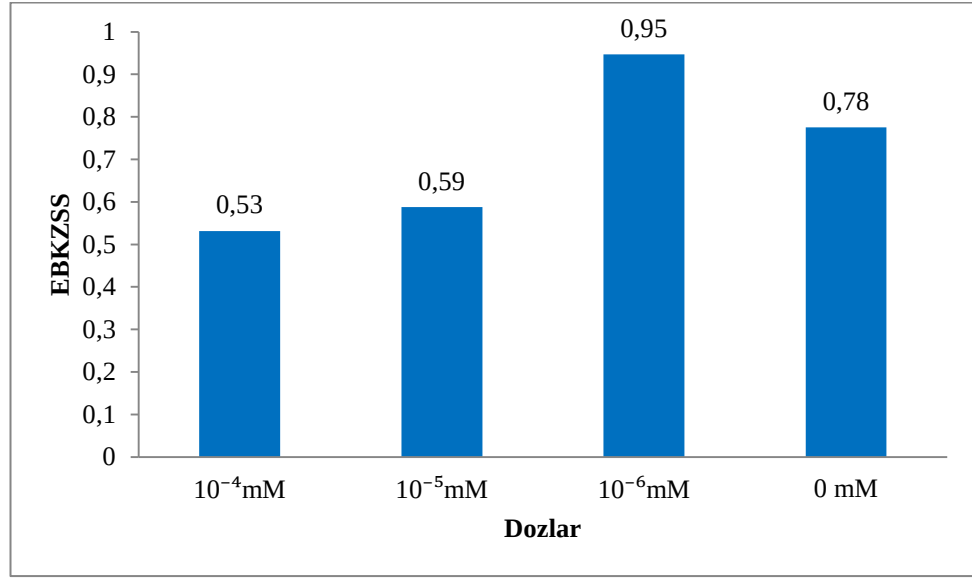
Şekil 4.32. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının ortalama eksplant başına köksüz sürgün sayısı

Çizelge 4.20. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar								
Doz	17β-Estradiol	Aa	Estron	Aa	Progesteron	Aa	Testosteron	Ort ± SS
0 mM	0,775 ± 0,222	Aa	0,775 ± 0,222	Aa	0,775 ± 0,222	Aa	0,775 ± 0,222Aa	0,775 ± 0,198AB
10 ⁻⁴ mM	0,088 ± 0,144	Bb	0,850 ± 0,689	Aa	0,963 ± 0,669	Aa	0,225 ± 0,065B ab	0,531 ± 0,586B
10 ⁻⁵ mM	0,663 ± 0,229	Aa	0,825 ± 0,574	Aa	0,525 ± 0,330	Aa	0,338 ± 0,229Ba	0,588 ± 0,378B
10 ⁻⁶ mM	0,613 ± 0,298	Aa	1,288 ± 0,750	Aa	0,913 ± 0,236	Aa	0,983 ± 0,275Aa	0,947 ± 0,478A
ort ± ss	0,534 ± 0,342b		0,934 ± 0,537a		0,794 ± 0,404ab		0,553 ± 0,362b	

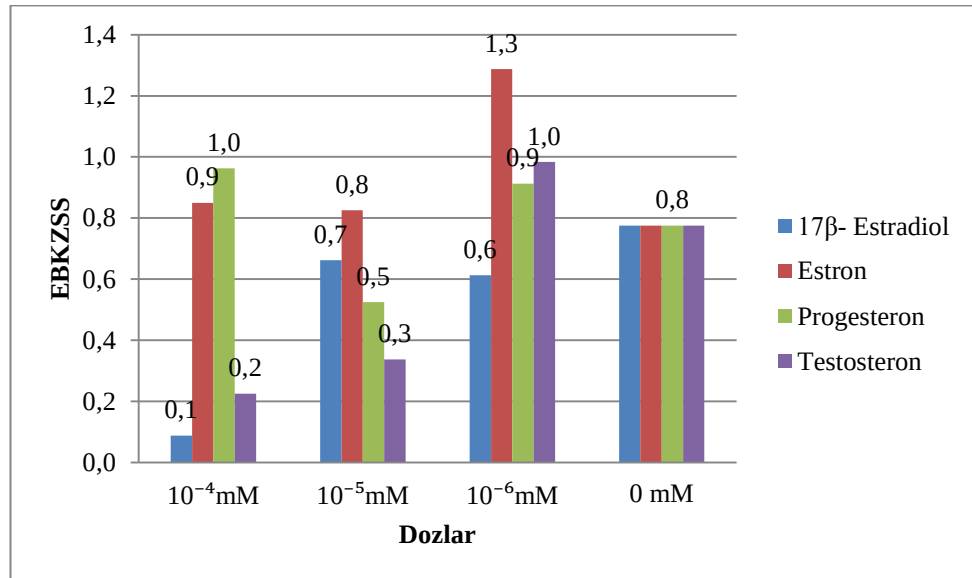
*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

EBKZSS bakımından dozlar arasındaki farklılığın önemli (P<0,05) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.19). Dozların ortalamasına bakıldığında ilk sırayı ortalama 0,947 ile 10⁻⁶ mM dozu almış olup bunu sırasıyla 0,775 kontrol grubu, 0,588 ile 10⁻⁵ mM ve 0,531 ile 10⁻⁴ mM konsantrasyonu izlemiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre eksplant başına köksüz sürgün sayısı

EBKZSS bakımından, hormonxdoz interaksyonu önemsiz ($P>0,05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.19). Şekil 4.34’de eksplant başına köksüz sürgün sayısına hormon dozlarının etkisi verilmiştir.



Şekil 4.34. Eksplant başına köksüz sürgün sayısına hormon dozlarının etkisi

4.1.2.g. Eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)

Eksplant başına sürgün sayısı (EBSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormonlar arasındaki farklılığın önemli ($P<0,05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.21)

Çizelge 4.21. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

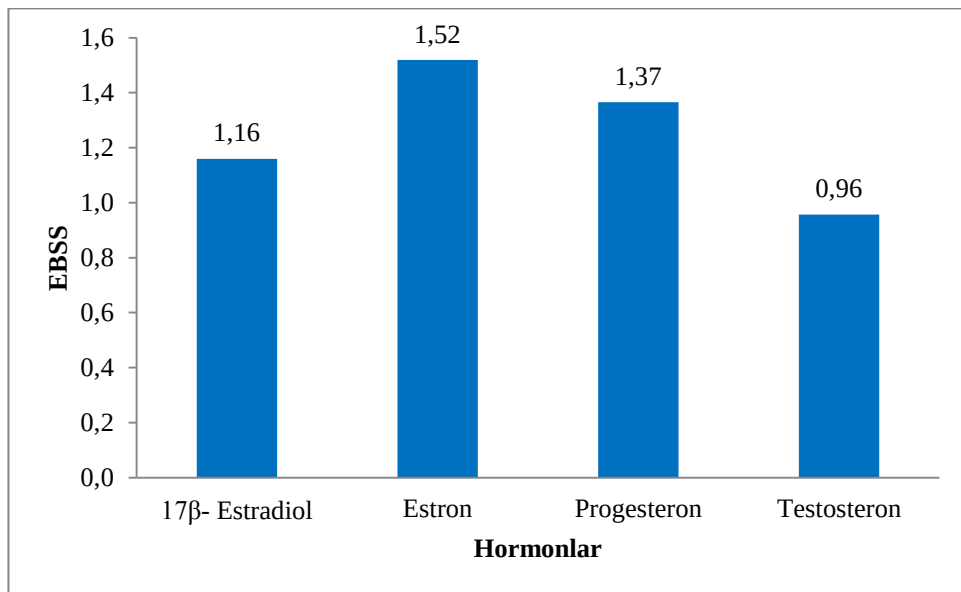
Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	15	13,26315	0,88421	3,79	0,0002**
Hormon	3	2,474112	0,824704	3,53	0,0217*
Doz	3	6,697506	2,232502	9,57	0,0001**
Hormon*Doz	9	3,906031	0,434003	1,86	0,082 ^{ns}
Hata	47	10,96542	0,233307		
Düzeltilmiş Toplam	62	24,22857			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

* : Önemli ($P<0,05$)

ns : Önemsiz ($P>0,05$)

Hormon ortalamalarına bakıldığında EBSS bakımından ilk sırayı ortalama 1,519 adet ile estron almış olup bunu sırasıyla 1,366 adet ile progesteron, 1,16 adet ile 17β -estradiol ve 0,957 adet ile testosteron izlemiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.35).



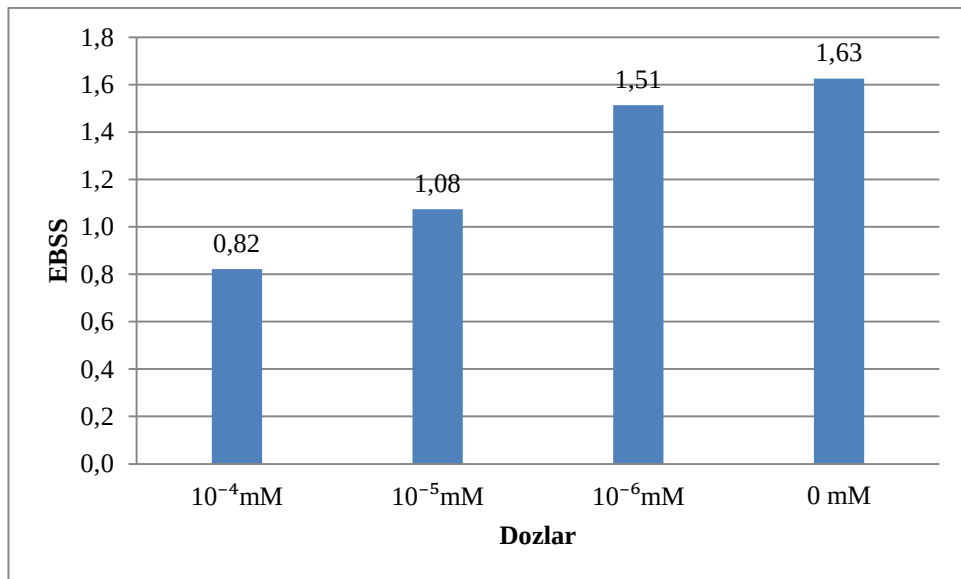
Şekil 435. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının eksplant başına sürgün sayısı

Çizelge 4.22. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

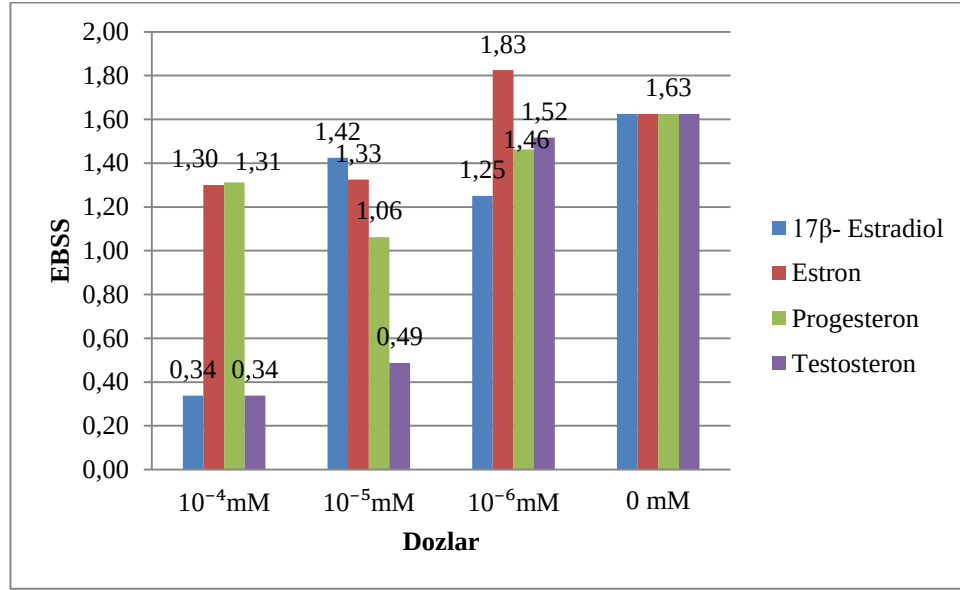
Doz	Hormonlar				Ort ± SS
	17β-Estradiol	Estron	Progesteron	Testosteron	
0 mM	1,63 ± 0,26 Aa	1,625 ± 0,26 Aa	1,625 ± 0,263 Aa	1,625 ± 0,263 Aa	1,625 ± 0,235A
10 ⁻⁴ mM	0,34 ± 0,19 Ca	1,300 ± 1,05 Aa	1,313 ± 0,817 Aa	0,338 ± 0,095 Ba	0,822 ± 0,784B
10 ⁻⁵ mM	1,43 ± 0,18 ABa	1,325 ± 0,65 Aa	1,063 ± 0,411 Aa	0,488 ± 0,278 Bb	1,075 ± 0,530B
10 ⁻⁶ mM	1,25 ± 0,29 Ba	1,825 ± 0,69 Aa	1,463 ± 0,403 Aa	1,517 ± 0,465 Aa	1,513 ± 0,483A
ort ± ss	1,16 ± 0,55bc	1,519 ± 0,682a	1,366 ± 0,509ab	0,957 ± 0,657c	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

EBSS bakımından dozlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.21). Dozların ortalamasına bakıldığında ilk sırayı 1,625 ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla 1,513 ile 10⁻⁶ mM dozu, 1,075 ile 10⁻⁵ mM ve 0,822 ile 10⁻⁴ mM konsantrasyonu izlemiştir. Kontrol grubu ile 10⁻⁶ mM dozu aynı gruba girmiş olup, 10⁻⁵ mM dozu ile de 10⁻⁴ mM dozu bir gruba girmiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.36). Şekil 4.37’de eksplant başına sürgün sayısına (EBSS) hormon dozlarının etkisi verilmiştir.



Şekil 4.36. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre eksplant başına sürgün sayısı



Şekil 4.37. Eksplant başına sürgün sayısına (EBSS) hormon dozlarının etkisi

EBSS bakımından hormonxdoz interaksyonu önemsiz ($P>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.21).

4.1.2.h. Eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)

Eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormonlar arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)'na ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	15	3,6288	0,24192	9,39	0,0001**
Hormon	3	0,399994	0,133331	5,17	0,0036**
Doz	3	2,581759	0,860586	33,4	0,0001**
Hormon*Doz	9	0,610987	0,067887	2,63	0,0148*
Hata	47	1,211042	0,025767		
Düzeltilmiş Toplam	62	4,839841			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

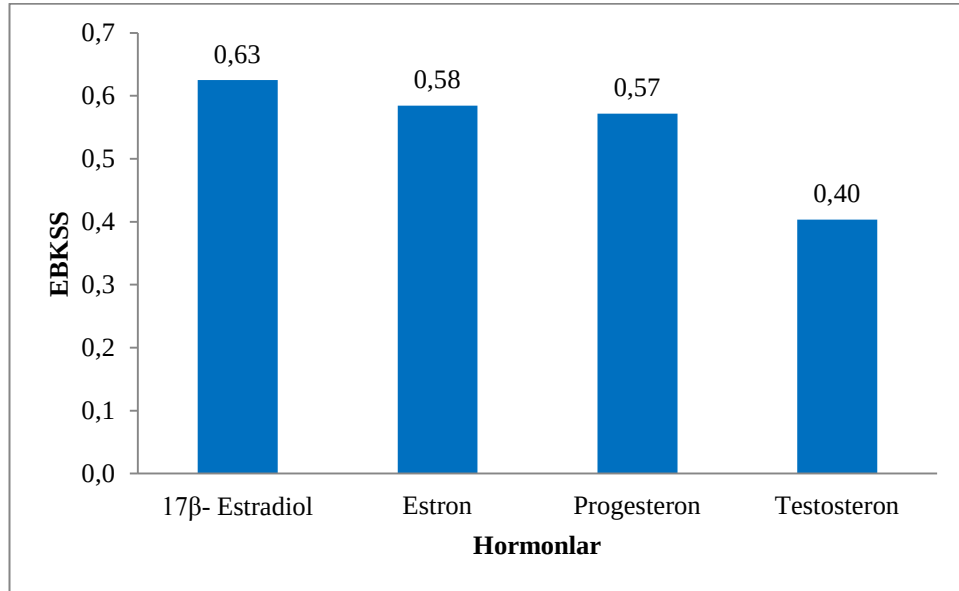
* : Önemli ($P<0,05$)

Hormon ortalamalarına bakıldığında EBKSS bakımından ilk sırayı 0,63 adet ile 17 β -estradiol, 0,58 adet ile estron, 0,57 adet ile progesteron ve 0,4 adet ile testosteron izlemiştir. 17 β -estradiol, estron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmayıp hepsi aynı gruba düşmüştür (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.38).

Çizelge 4.24. Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Doz	Hormonlar								Ort $\pm$ SS
	17 β -Estradiol		Estron		Progesteron		Testosteron		
0 mM	0,85 $\pm$ 0,08	Aa	0,85 $\pm$ 0,08	Aa	0,85 $\pm$ 0,08	Aa	0,85 $\pm$ 0,08	Aa	0,85 $\pm$ 0,07A
10 ⁻⁴ mM	0,25 $\pm$ 0,14	Ca	0,45 $\pm$ 0,36	Ba	0,35 $\pm$ 0,30	Ba	0,11 $\pm$ 0,06	Ca	0,291 $\pm$ 0,26C
10 ⁻⁵ mM	0,76 $\pm$ 0,10	ABa	0,50 $\pm$ 0,14	Bb	0,54 $\pm$ 0,12	Bb	0,15 $\pm$ 0,07	Cc	0,49 $\pm$ 0,25B
10 ⁻⁶ mM	0,64 $\pm$ 0,05	Ba	0,54 $\pm$ 0,13	ABa	0,55 $\pm$ 0,19	Ba	0,53 $\pm$ 0,20	Ba	0,57 $\pm$ 0,14B
ort $\pm$ ss	0,63 $\pm$ 0,63a		0,58 $\pm$ 0,58a		0,57 $\pm$ 0,57a		0,40 $\pm$ 0,40b		

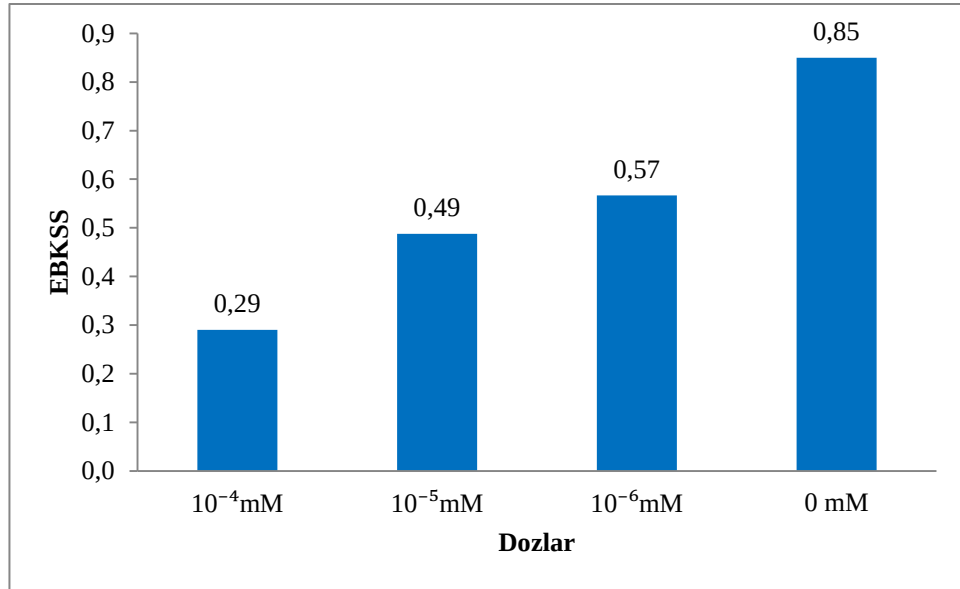
*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



Şekil 4.38. Farklı memeli cinsiyet hormonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı

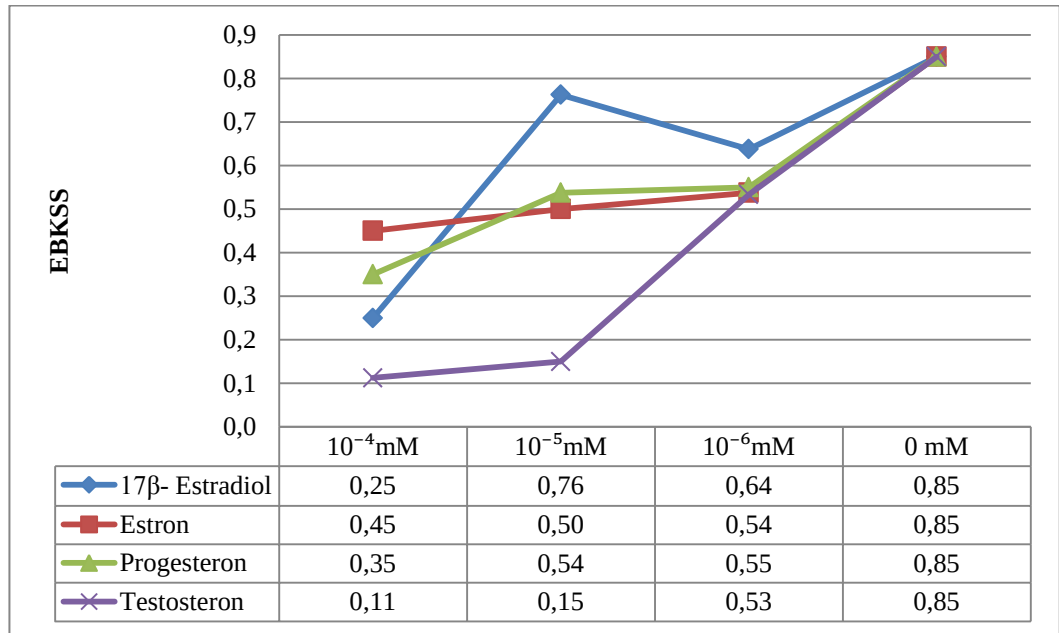
Eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından dozlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.23). Dozların ortalamalarına bakıldığında ilk sırayı ortalama 0,85 adet ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla 0,57 adet ile 10⁻⁶

mM, 0,49 adet ile 10^{-5} mM ve 0,291 adet ile 10^{-4} mM konsantrasyonu izlemiştir (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı dozlarına göre ortalama eksplant başına köklü sürgün sayısı

Eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından hormonxdoz interaksyonu istatistiksel anlamda önemli ($P < 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.23). Şekil 4.40'dan görüldüğü üzere estron, progesteron ve testosteron hormonlarında 10^{-4} mM dozu en düşük köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesini verirken doz azaldıkça bu değer artmış ve 0 (kontrol) dozunda maksimum değerine ulaşmıştır. 17β -estradiol hormonunun 10^{-4} mM dozu en düşük köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesini verirken ve 0 (kontrol) dozunda maksimum değerine ulaşmıştır. Ancak 17β -estradiol hormonunun 10^{-5} mM dozu, 10^{-6} mM dozundan daha fazla EBKSS'ni stimüle etmiştir (Şekil 4.40).



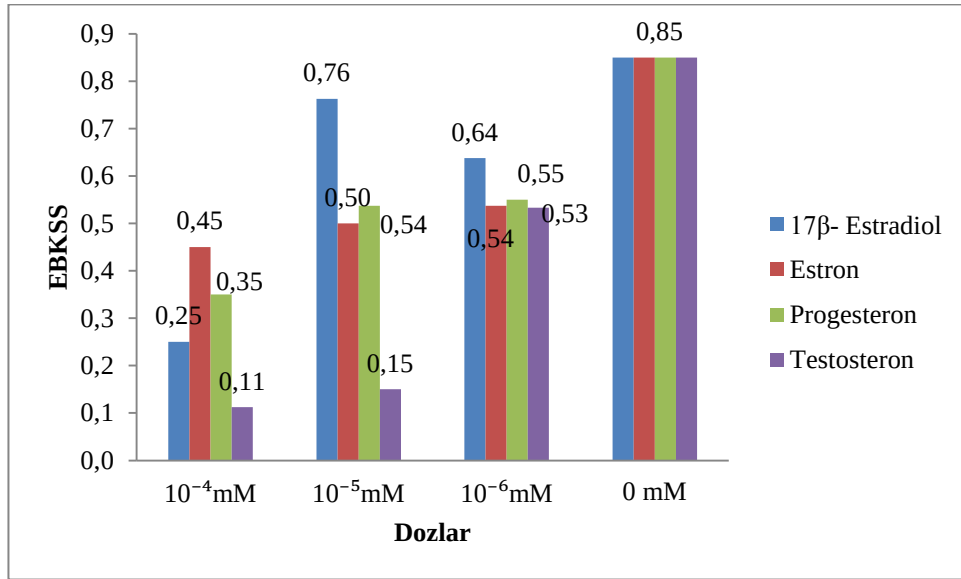
Şekil 4.40. Hormonlara ve dozlara göre eksplant başına köklü sürgün sayısı

10^{-4} mM konsantrasyonda eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından ilk sırayı 0,45 adet ile estron, 0,35 adet ile progesteron ve 0,25 adet ile 17β -estradiol almış olup son sırayı 0,11 adet ile testosteron izlemiştir. Bütün hormon grupları aynı gruba girmiş olup aralarındaki fark önemli olmamıştır (Çizelge 4.24).

10^{-5} mM konsantrasyonda eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından ilk sırayı 0,76 ile 17β -estradiol almış olup bunu sırasıyla 0,54 adet ile progesteron, 0,50 adet ile estron ve 0,15 adet ile Tetesteron izlemiştir. Progesteron ve estron arasındaki fark önemli olmayıp diğer hormonlarla aralarındaki farklar önemli olmuştur. 17β -estradiol ile testosteron arasındaki fark önemlidir (Çizelge 4.24). Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ile EBKSS parametresi paralel gitmiştir.

10^{-6} mm konsantrasyonda 0,64 adet ile ilk sırayı 17β -estradiol almış olup bunu 0,55 adet ile progesteron, 0,54 adet ile estron, 0,53 adet ile testosteron izlemiştir. 10^{-6} mM konsantrasyonda hormonlar arasındaki fark önemsiz ($P > 0,05$) çıkmıştır (Çizelge 4.24).

EBKSS'na dozların etkisini özetleyecek olursak, 10^{-4} mM dozunda hormon grupları arasındaki fark önemli değildir ve en yüksek değeri estron almıştır. 10^{-5} mM dozunda 17β -estradiol, 10^{-6} mM konsantrasyonda ise diğer hormonlarla arasındaki fark önemli olmamasına rağmen 17β -estradiol öne çıkmıştır (Şekil 4.41).



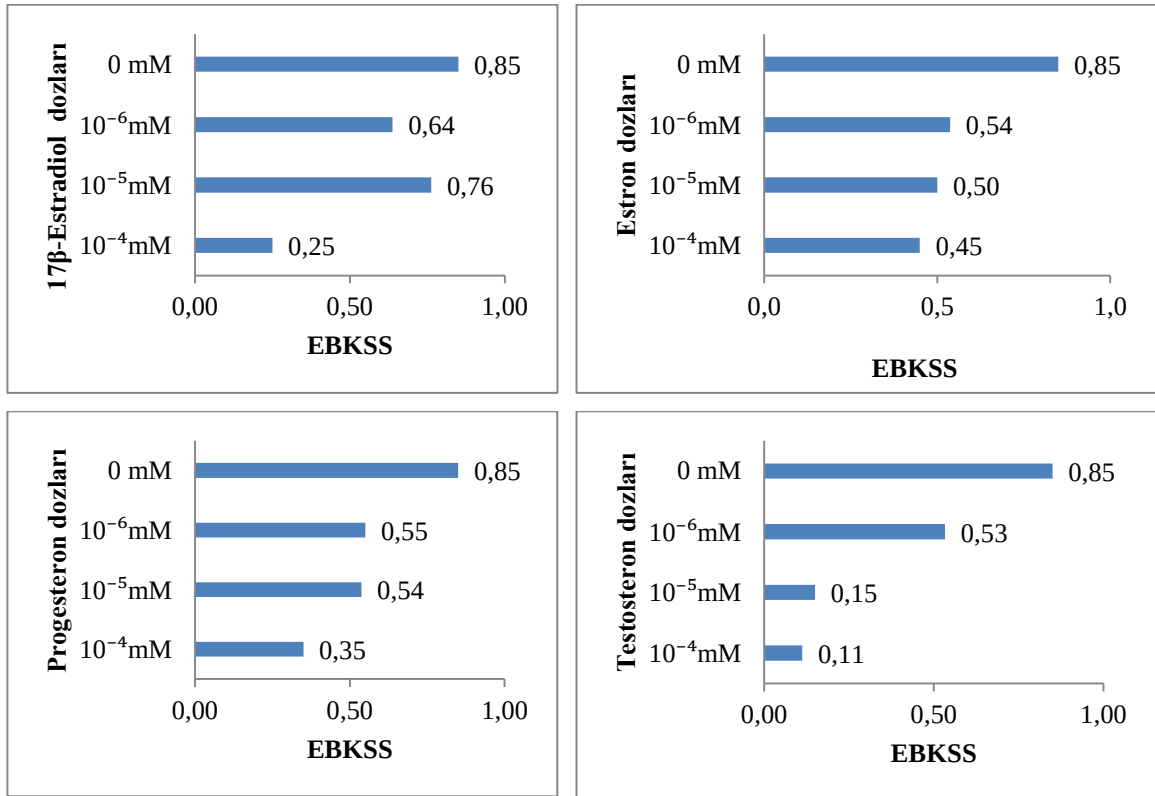
Şekil 4.41. Eksplant başına köklü sürgün sayısına hormon dozlarının etkisi

Farklı memeli cinsiyet hormon ve dozlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından hormonların kendi içlerinde hangi doza daha iyi cevap verdikleri incelendiğinde; 17β -estradiol hormonunun dozlara göre vermiş olduğu EBKSS'na bakıldığında 0,85 adet ile kontrol grubu en yüksek değeri almış olduğu bunu sırasıyla 0,76 adet ile 10^{-5} mM dozu, 0,64 adet ile 10^{-6} mM dozu ve 0,25 adet ile 10^{-4} mM dozunun izlemiş olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.24, Şekil 4.42).

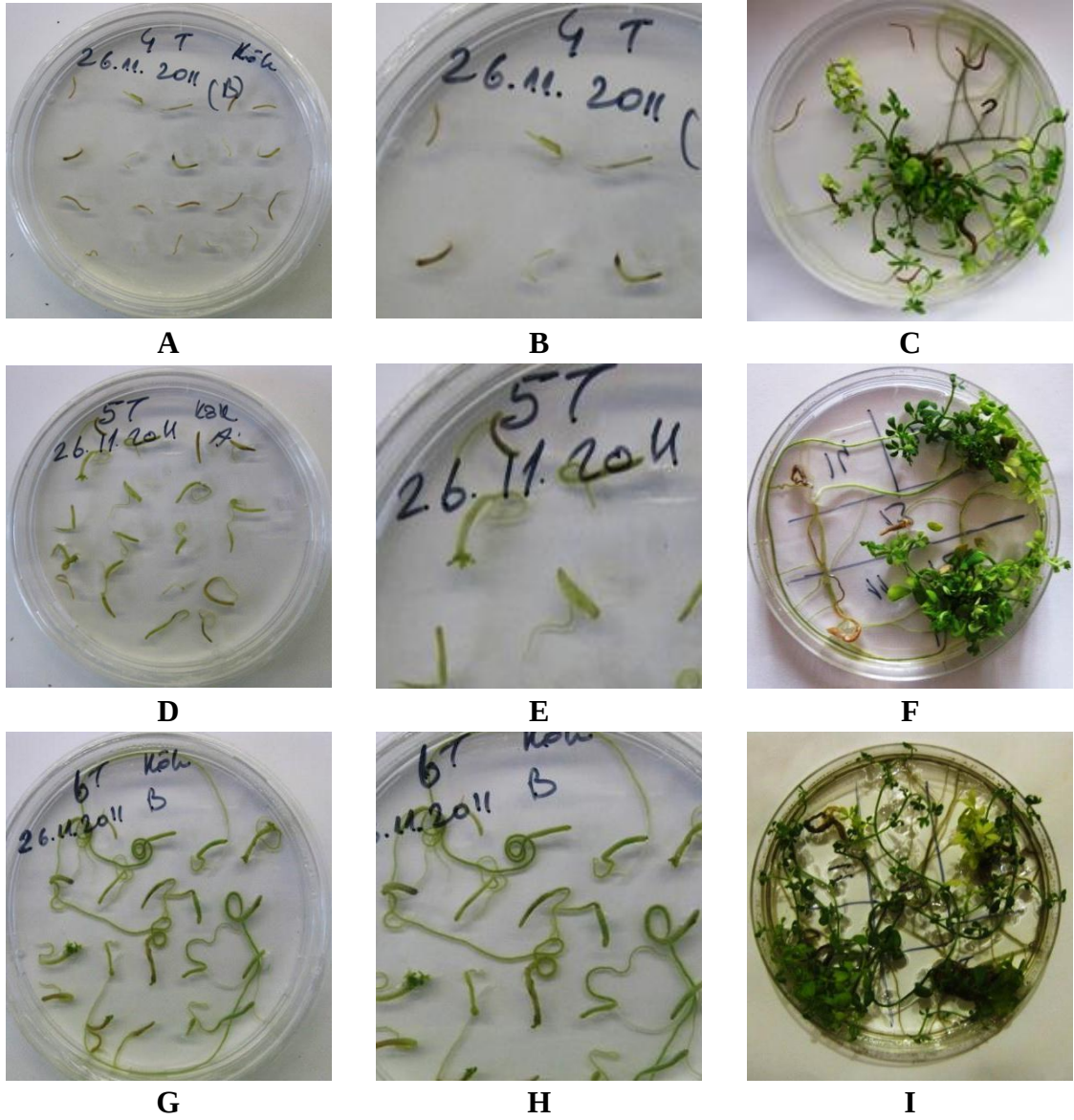
Estron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu EBKSS'na bakıldığında 0,85 ile kontrol grubunun en yüksek değeri almış olduğu bunu sırasıyla, 0,54 ile 10^{-6} mM dozu, 0,50 ile 10^{-5} mM dozu ve 0,45 ile 10^{-4} mM dozunun izlemiş olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.24, Şekil 4.42).

Progesteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu EBKSS'na bakıldığında 0,85 adet ile kontrol grubu en yüksek değeri almış olup diğer dozlarla arasındaki fark önemli bulunmuştur. Ancak 10^{-6} mM dozu 0,55 adet, 10^{-5} mM dozu 0,54 adet ve 10^{-4} mM dozu 0,35 adet değerlerini almış olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.24, Şekil 4.42).

Testosteron hormonunun dozlara göre vermiş olduğu EBKSS'na bakıldığında 0,85 adet ile kontrol grubu en yüksek değeri almış olup diğer dozlarla arasındaki fark önemli bulunmuştur. Kontrol grubunu sırasıyla 0,53 adet ile 10^{-6} mM dozu, 0,15 adet ile 10^{-5} mM dozu ve 0,11 adet ile 10^{-4} mM dozu izlemiştir. 10^{-5} mM dozu ile 10^{-4} mM dozu aynı gruba düşmüşlerdir.

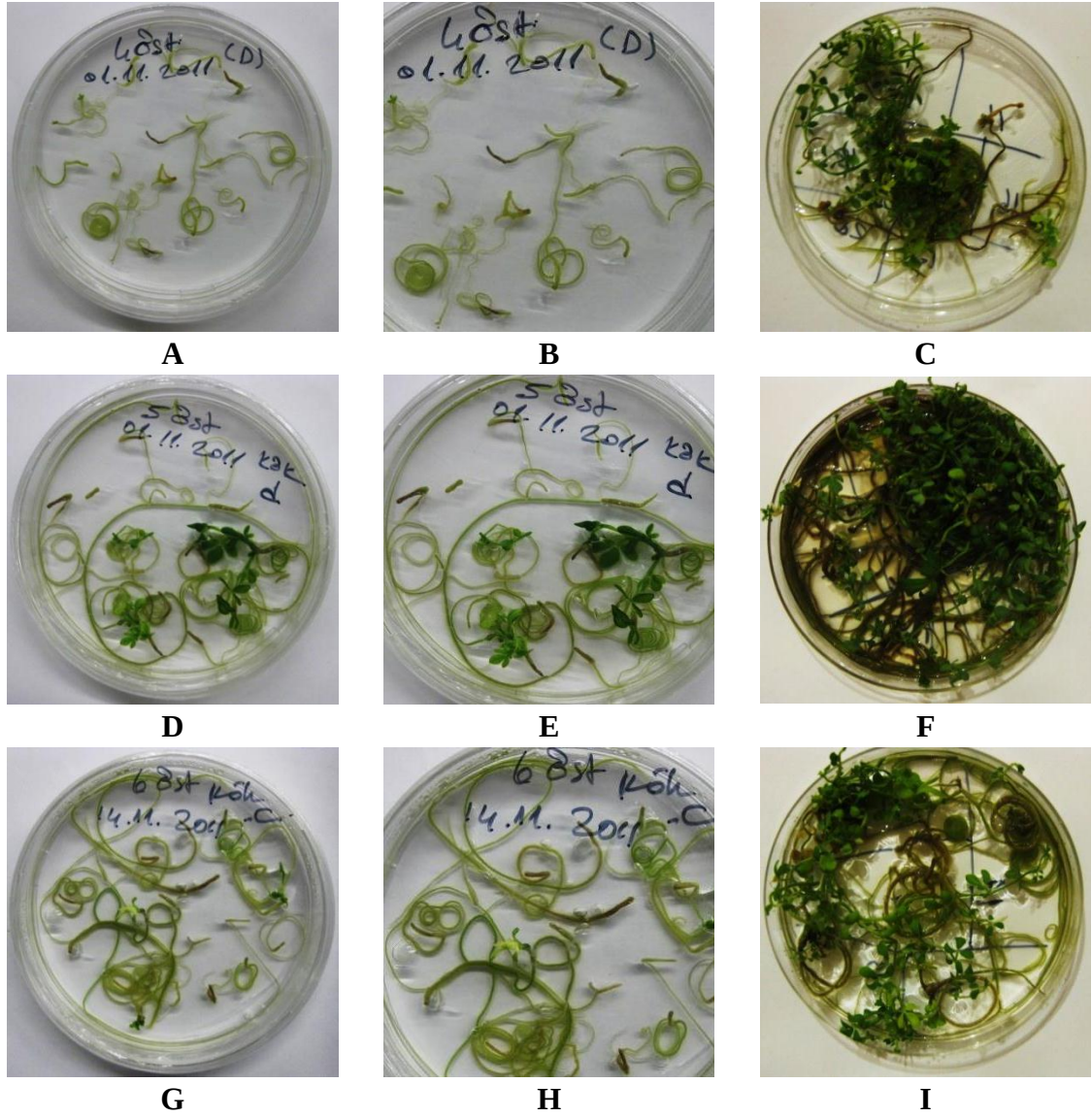


Şekil 4.42. Eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından hormon ve dozları



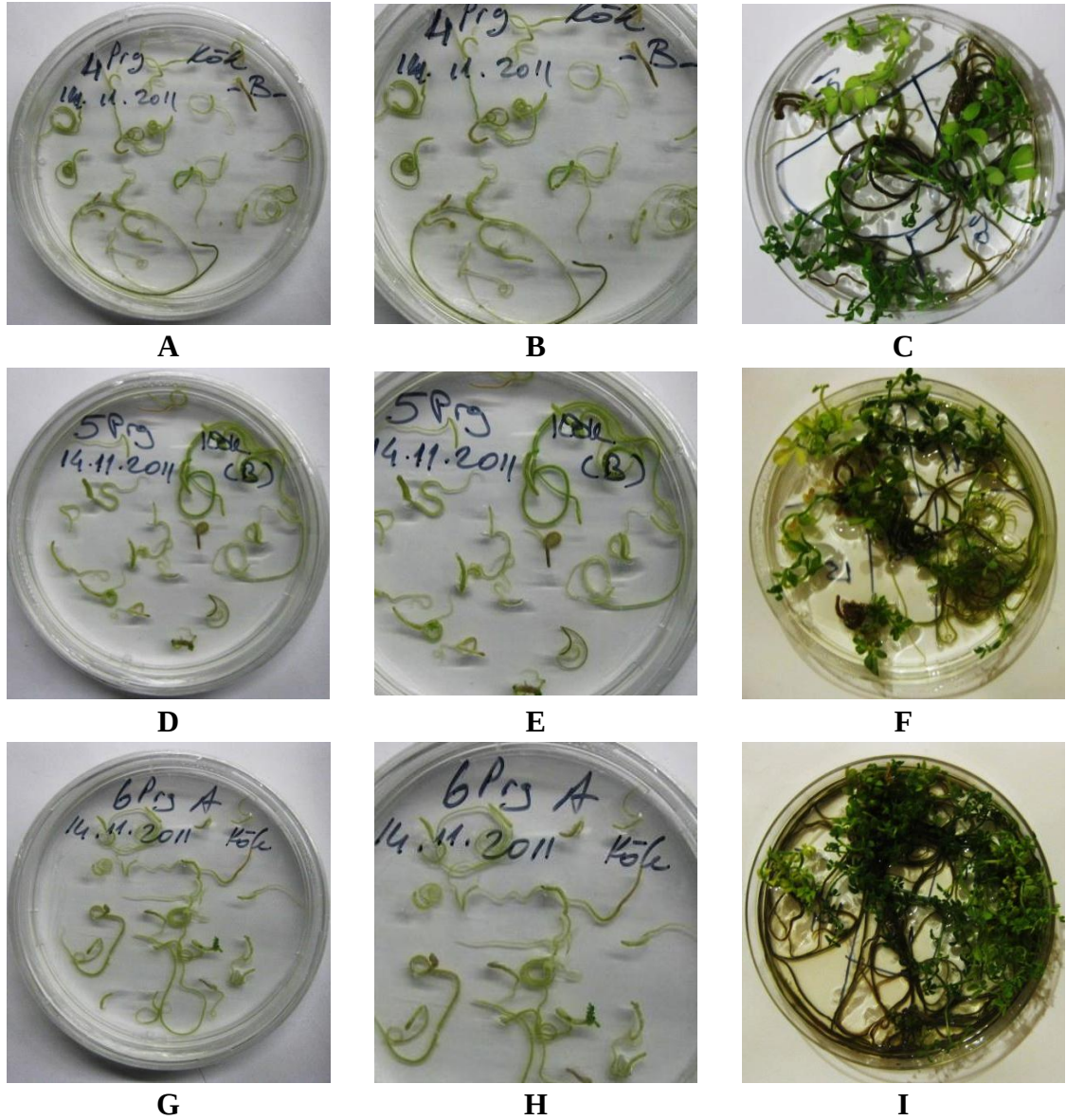
Şekil 4.43. Testosteron içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü

*: A) Kök eksplantlarının 10^{-4} mM testosteron içeren ortamda 30. günde görünümü. B) 10^{-4} mM testosteron içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. günde görünümü C) 10^{-4} mM testosteron içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü D) 10^{-5} mM testosteron içeren ortamda 30. günde görünümüleri. E) 10^{-5} mM testosteron içeren ortamda 30. günde görünümüleri. F) 10^{-5} mM testosteron içeren ortamda 90. günde görünümüleri. G) 10^{-6} mM testosteron içeren ortamda 30. günde görünümü H) 10^{-6} mM testosteron içeren ortamda 30. günde görünümü I) 10^{-6} mM testosteron içeren ortamda 90. günde görünümü



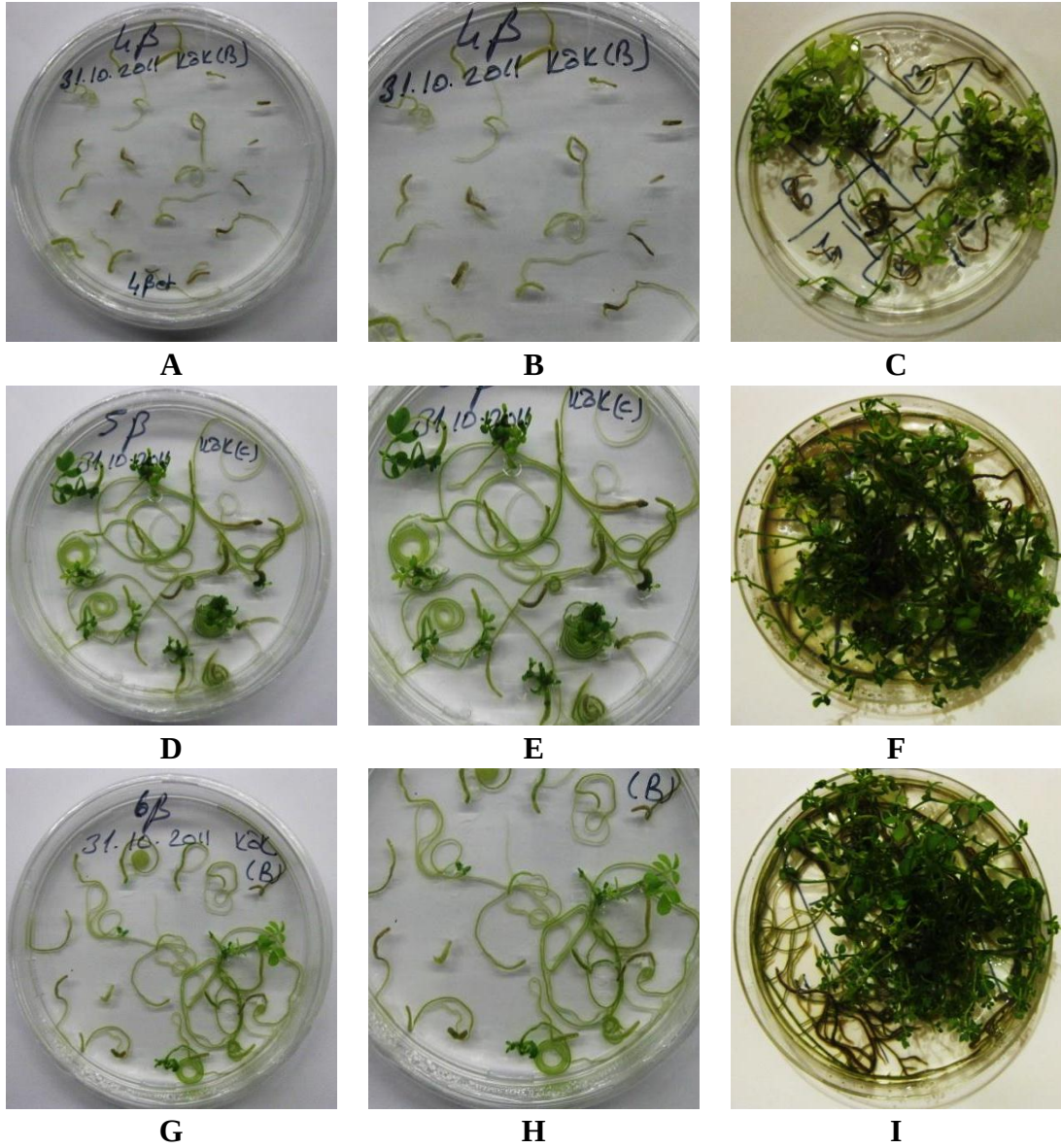
Şekil 4.44. Estron içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 10^{-4} mM estron içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 10^{-4} mM estron içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü C) 10^{-4} mM estron içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 10^{-5} mM estron içeren ortamda 30. gündeki görünümüleri. E) 10^{-5} mM estron içeren ortamda 30. gündeki görünümüleri. F) 10^{-5} mM estron içeren ortamda 90. gündeki görünümüleri. G) 10^{-6} mM estron içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 10^{-6} mM estron içeren ortamda 30. gündeki görünümü I) 10^{-6} mM estron içeren ortamda 90. gündeki görünümü



Şekil 4.45. Progesteron içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 10^{-4} mM progesteron içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 10^{-4} mM progesteron içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü C) 10^{-4} mM progesteron içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 10^{-5} mM progesteron içeren ortamda 30. gündeki görünümüleri. E) 10^{-5} mM progesteron içeren ortamda 30. gündeki görünümüleri. F) 10^{-5} mM progesteron içeren ortamda 90. gündeki görünümüleri. G) 10^{-6} mM progesteron içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 10^{-6} mM progesteron içeren ortamda 30. gündeki görünümü I) 10^{-6} mM progesteron içeren ortamda 90. gündeki görünümü



Şekil 4.46. 17β-estradiol içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 10^{-4} mM 17β-estradiol içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 10^{-4} mM 17β-estradiol içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü C) 10^{-4} mM 17β-estradiol içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 10^{-5} mM 17β-estradiol içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 10^{-5} mM 17β-estradiol içeren ortamda 30. gündeki görünümü F) 10^{-5} mM 17β-estradiol içeren ortamda 90. gündeki görünümü G) 10^{-6} mM 17β-estradiol içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 10^{-6} mM 17β-estradiol içeren ortamda 30. gündeki görünümü I) 10^{-6} mM 17β-Estradiol içeren ortamda 90. gündeki görünümü

**A****B**

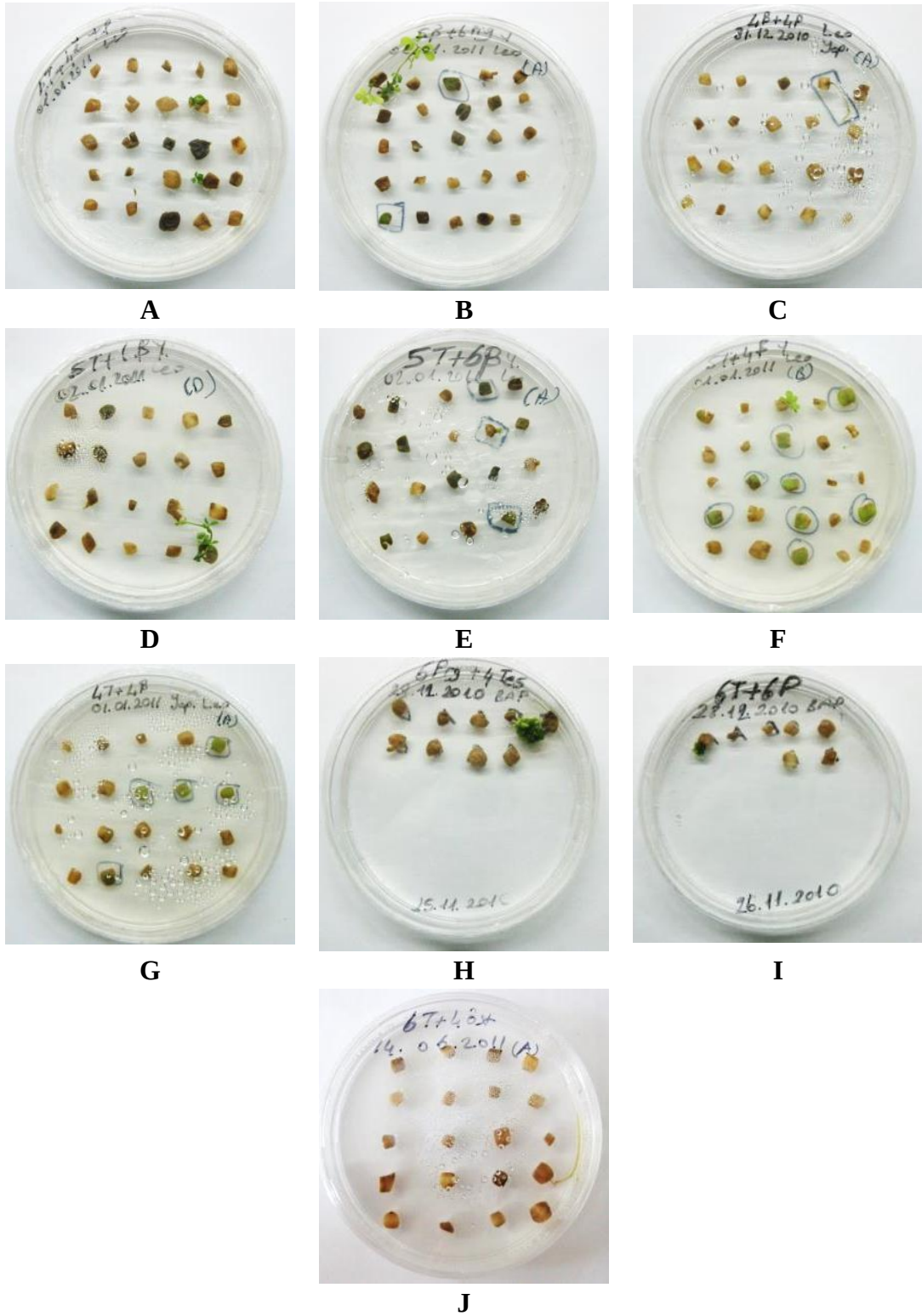
Şekil 4.47. Hormon içermeyen kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 30. günde görünümü B) 90. günde görünümü

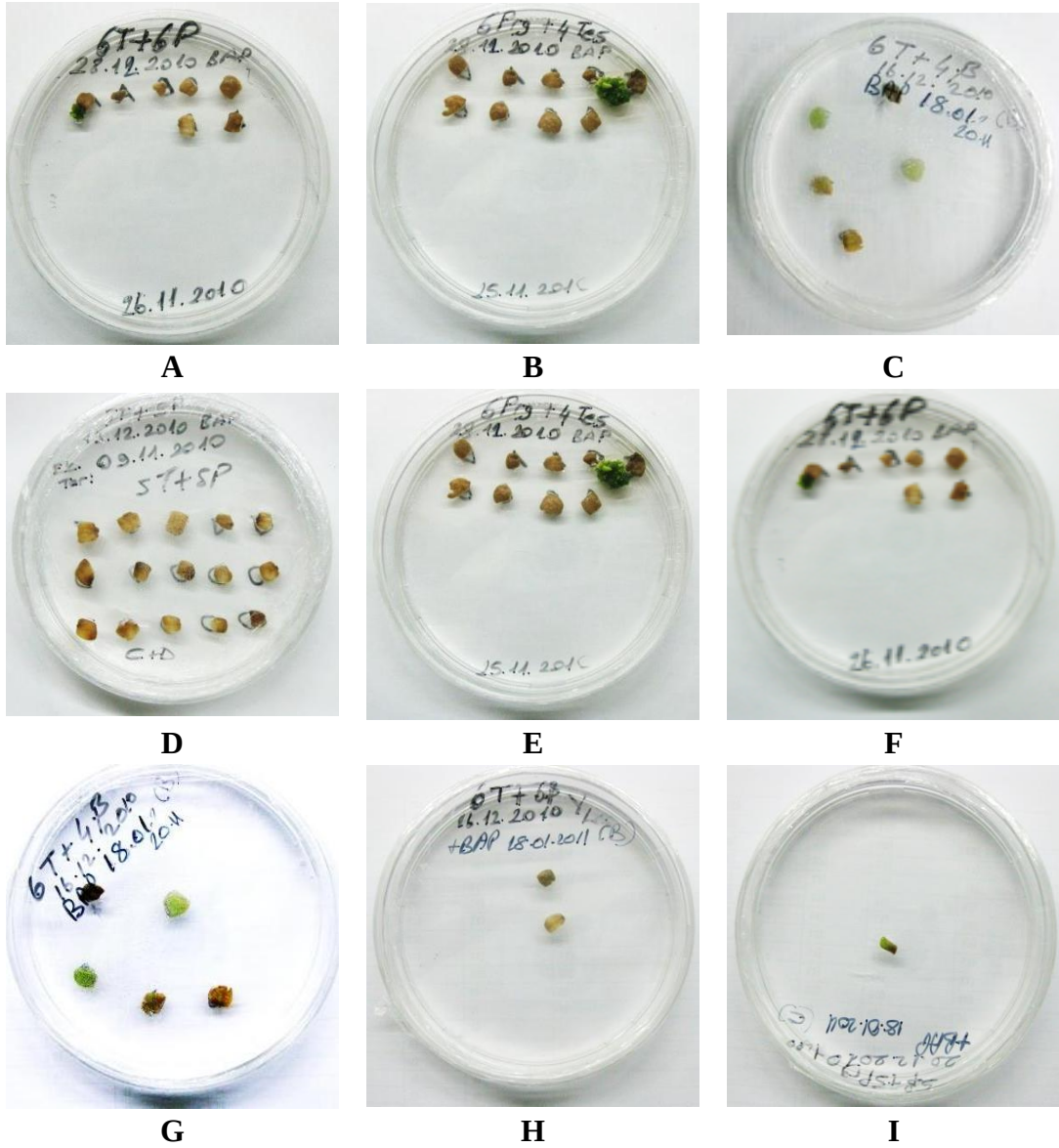
4.2. Kombinasyonlar

4.2.1. Kotiledon yaprakları

Leo çeşidine ait gazalboynuzu tohumları sterilize edildikten sonra MS ortamında çimlendirilmiştir. Daha sonra kotiledon yaprakları uç kısımlarından ve yaprak sapına yakın kısımlardan kesilerek (Şekil 3.1.) farklı memeli cinsiyet hormon doz ve konsantrasyonlarında kültüre alınmıştır. 30 gün kültüre alınan bu eksplantlar bir miktar büyüdüktan sonra hemen hemen tamamına yakın kısmı ölmüştür. Çok az sayıda canlı kalmayı başaran eksplantların rejenerasyonunu sağlamak için 30. günün sonunda 0,5 mg/l BAP içeren standart MS (MS tuz ve vitaminlerine ilave olarak 50 mg/l vitamin C içeren ortam) ortamında 30 gün süre ile kültüre alınmışlardır. Ancak bu ortamda da bir çok eksplant rejenere olamadan ölmüşlerdir. Çok az sayıda eksplant canlı kalmayı başarmış bunlardan bazılarıda rejenere olabilmışlerdir. Canlı kalabilen bu eksplantlar 3. kez kültüre alınmışlardır. Ancak 3. ortamda herhangi bir hormon kullanılmamış olup sadece standart MS ortamı kullanılmıştır. Denemeye alınan tüm eksplantların tamamına yakın bir kısmı 30 gün içerisinde öldüğü için her hangi bir istatistik uygulanmamış olup sadece canlı kalıp rejenere olabilen eksplantların ortalama değerleri verilmiştir. 6B5T, 4T6P, 5T5P, 5T6P ve 6T6P hormon kombinasyonlarında kültüre alınan kotiledon yapraklarından bazılarında sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. EBSS sırasıyla 0,1, 0,1, 0,2, 0,1 ve 0,05 adet olup EBKSS ise sırasıyla 0, 0, 0,2, 0 ve 0 olmuştur. %TSOEO sırasıyla %10, %10, %5, %10 ve %5 olup geri kalan eksplantlar ölmüştür. Canlı kalıp rejenere olabilen eksplantların 30. ve 60. günlerdeki görünümleri (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49).



Şekil 4.48. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarının kotiledon yaprak eksplantları üzerine 30. günde etkisi



Şekil 4.49. Memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarında bir ay süreyle kültüre alınan ve bu süre sonunda canlı kalan kotiledon yaprak eksplantlarının sadece BAP içeren ortamda bir ay kültüre edildikten sonraki görünimleri

4.2.2. Dozları dikkate alınmaksızın memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarının kök eksplantları üzerine etkisi

İkinci aşamada memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarını (17β - Estradiol+progesteron, 17β -estradiol+testosteron, 17β -estradiol+estron, progesteron+testosteron, progesteron+estron, testosteron+estron) içeren 6 farklı hormon

karışımının, 3 farklı doz (10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) kombinasyonu ve biri kontrol olmak üzere toplam 55 farklı kültür ortamı denenmiştir.

Memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonlarının dozları dikkate alınmaksızın (genel olarak) en iyi rejenerasyonu sağlayan ikili hormon kombinasyonu belirlenmiştir. En iyi hormon kombinasyonunun progesteron+estron kombinasyonu olduğu tespit edilmiş, daha sonra bu ikili hormon kombinasyonu için hangi dozların rejenerasyona ne tür bir etki yaptığı belirlenmiştir.

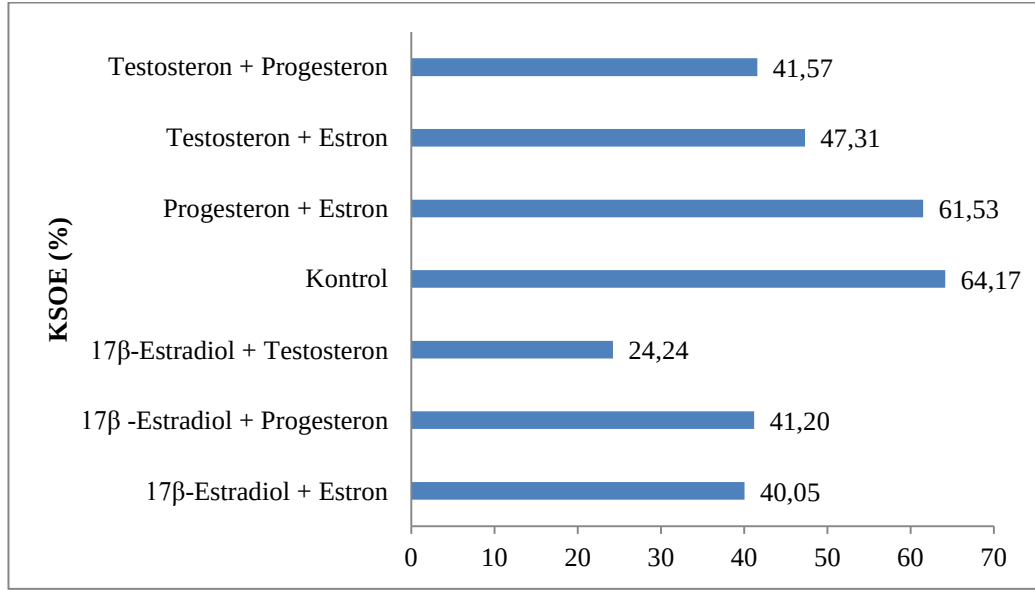
4.2.2.a. Dozları dikkate alınmaksızın ikili hormon kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE)

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon kombinasyonları (%KSOE) arasındaki farklılığın çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.25. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	82921,64	13820,27	20,89	0,0001
Hormon kombinasyonları	6	82921,64	13820,27	20,89	0,0001
Hata	650	430075,6	661,6548		
Düzeltilmiş Toplam	656	512997,3			

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon kombinasyonlarının ortalaması incelendiğinde ilk sırayı %64,17 ile kontrol grubu alırken bunu sırasıyla %61,53 ile progesteron+estron kombinasyonu, %47,31 ile testosteron+estron kombinasyonu, %41,57 ile testosteron+ progesteron hormonu, %41,2 ile 17β -estradiol + progesteron, %40,05 ile 17β -estradiol + estron kombinasyonu, %24,24 ile 17β -estradiol+testosteron hormon kombinasyonları izlemiştir (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Çizelge 4.26'den görüldüğü üzere kontrol grubu ve progesteron+estron kombinasyonları en yüksek %KSOE oranlarını vermiştir. Aralarındaki fark önemsiz olup birinci gruba girmişlerdir.

17β-estradiol + estron, 17β-estradiol + progesteron, testosteron + estron ve testosteron + progesteron kombinasyonlarında ikinci gruba girmiş olup aralarındaki fark önemli değildir (Çizelge 4.26).

17β-Estradiol+testosteron kombinasyonu en düşük %KSOE yüzdesi vermiş olup diğer kombinasyonlarla arasındaki farklılık önemlidir ve üçüncü gruba girmiştir (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26. Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon kombinasyonları (%KSOE) yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort $\pm$ SS
17 β -Estradiol+estron	40,05 $\pm$ 28,53B
17 β -Estradiol+progesteron	41,20 $\pm$ 28,07B
17 β -Estradiol+testosteron	24,24 $\pm$ 25,62C
Kontrol	64,17 $\pm$ 16,21A
Progesteron+estron	61,53 $\pm$ 21,48A
Testosteron+estron	47,31 $\pm$ 25,04B
Testosteron+progesteron	41,57 $\pm$ 25,78B

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

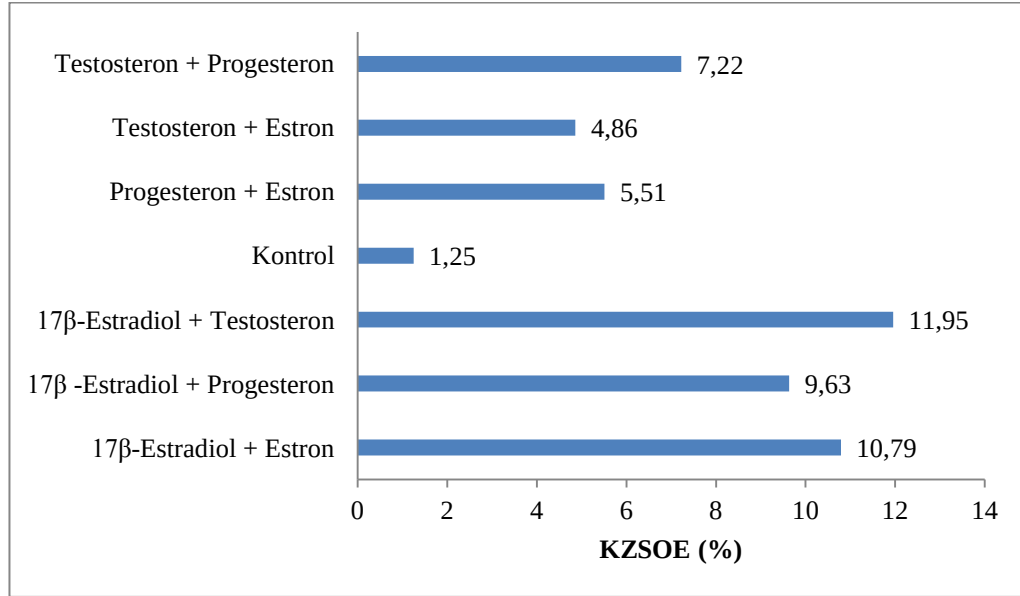
4.2.2.b. Hormon kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE)

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	5090,573	848,4288	11,33	0,0001**
Hormon kombinasyonları	6	5090,573	848,4288	11,33	0,0001**
Hata	650	48660,87	74,86288		
Düzeltilmiş Toplam	656	53751,45			

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormon kombinasyonlarının ortalaması incelendiğinde ilk sırayı %11,95 ile 17 β -estradiol + testosteron, almış olup bunu sırasıyla %10,79 ile 17 β -estradiol+estron, %9,63 ile 17 β -Estradiol + progesteron, %7,22 ile testosteron + progesteron, %5,51 ile progesteron + estron, %4,86 ile testosteron + estron ve %1,25 ile kontrol grubu izlemiştir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Çizelge 4.28’den görüldüğü üzere 17β-Estradiol+testosteron, 17β-estradiol+estron, 17β-estradiol+progesteron kombinasyonları en yüksek %KZSOE oranlarını vermiş olup aralarındaki fark önemsiz olmuş ve birinci gruba girmişlerdir (Çizelge 4.28).

Progesteron+estron, testosteron+estron kombinasyonları da ikinci gruba girmiş olup aralarındaki fark önemli değildir (Çizelge 4.28).

Kontrol grubu en düşük %KZSOE oranlarını vermiş olup diğer kombinasyonlarla arasındaki farklılık önemlidir ve üçüncü gruba girmiştir (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) bakımından hormon kombinasyonlarına ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort $\pm$ SS
17 β -Estradiol+estron	10,79 $\pm$ 10,12A
17 β -Estradiol+progesteron	9,63 $\pm$ 10,22AB
17 β -Estradiol+testosteron	11,95 $\pm$ 11,61A
Kontrol	1,25 $\pm$ 2,26D
Progesteron+estron	5,51 $\pm$ 6,07C
Testosteron+estron	4,86 $\pm$ 5,04C
Testosteron+progesteron	7,22 $\pm$ 7,34BC

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.2.2.c. Hormon kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) üzerine etkisi

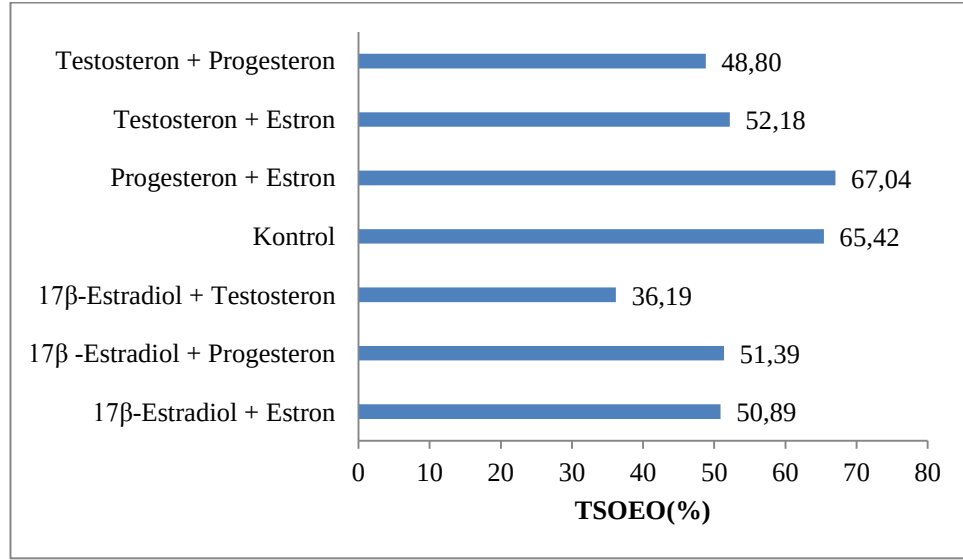
Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından hormonlar arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.29. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	53880,238	8980,0396	11,36	0,0001**
Hormon kombinasyonları	6	53880,238	8980,0396	11,36	0,0001**
Hata	649	512940,46	790,3551		
Düzeltilmiş Toplam	655	566820,69			

** : çok önemli (P<0,01)

Üç ayın ortalamasına bakıldığında, toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %67,04 ile progesteron+estron almış olup bunu sırasıyla %65,42 ile Kontrol, %52,18 ile testosteron + estron, %51,39 ile 17 β -estradiol + progesteron, %50,89 ile 17 β -estradiol+estron ve %36,19 ile 17 β -estradiol + testosteron izlemiştir (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Çizelge 4.30’de görüldüğü üzere progesteron+estron ve Kontrolnden yüksek %TSOEO oranlarını vermiş olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuş ve birinci gruba girmişlerdir.

Testosteron+estron, 17β-estradiol+progesteron, 17β-estradiol+estron ve testosteron + progesteron kombinasyonlarında ikinci gruba girmiş olup aralarındaki fark önemli değildir (Çizelge 4.30).

17β-estradiol+testosteron en düşük %TSOEO oranlarını vermiş olup diğer kombinasyonlarla arasındaki farklılık önemlidir ve üçüncü gruba girmiştir (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.30. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort $\pm$ SS
17 β -Estradiol+estron	50,89 $\pm$ 30,64 B
17 β -Estradiol+progesteron	51,39 $\pm$ 30,24 B
17 β -Estradiol+testosteron	36,19 $\pm$ 32,05 C
Kontrol	65,42 $\pm$ 16,30 A
progesteron+estron	67,04 $\pm$ 21,86 A
Testosteron+estron	52,18 $\pm$ 25,93 B
Testosteron+progesteron	48,80 $\pm$ 27,81 B

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.2.2.d. Hormon kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) üzerine etkisi

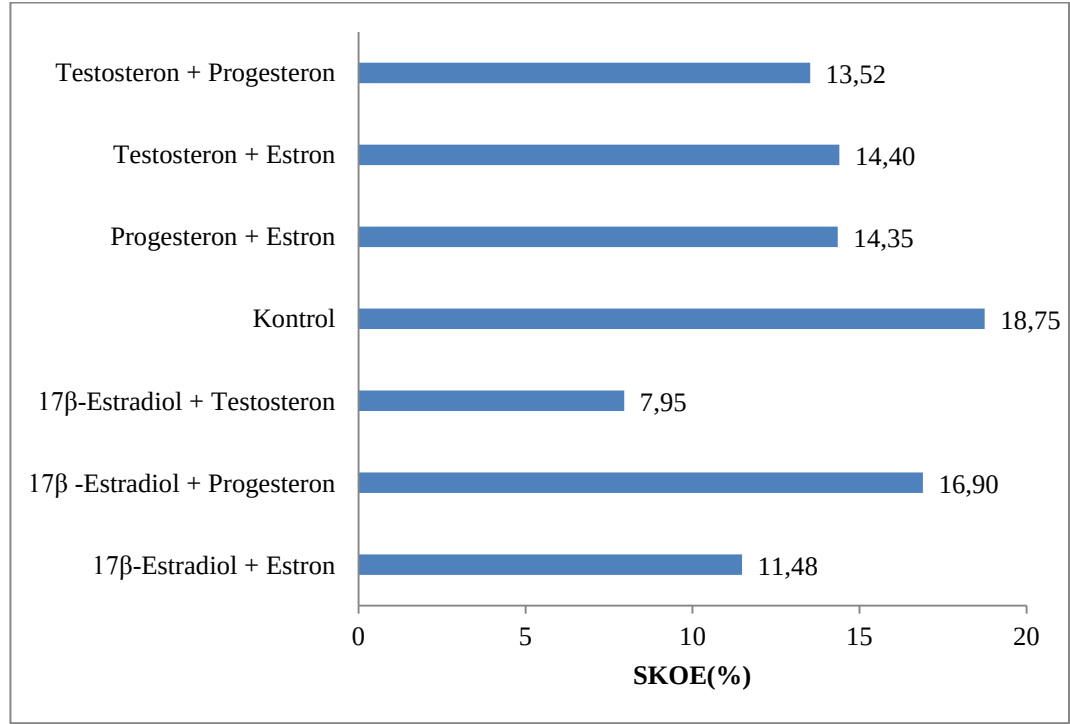
Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) bakımından hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	5365,8818	894,3136	4,13	0,0004**
Hormon	6	5365,8818	894,31363	4,13	0,0004**
Hata	650	140843,33	216,682		
Düzeltilmiş Toplam	656	146209,21			

** : çok önemli (P<0,01)

Şekil 4.53'de görüldüğü üzere %SKOE bakımından ilk sırayı ortalama %18,75 ile kontrol grubu alırken bunu sırasıyla %16,90 ile 17 β -estradiol+progesteron, %14,4 ile testosteron+estron, %14,35 ile progesteron+estron, %13,52 ile testosteron+progesteron, %11,48 ile 17 β -estradiol+estron ve %7,95 ile 17 β -estradiol+testosteron izlemiştir.



Şekil 4.53. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi

Çizelge 4.32’de görüldüğü üzere sırasıyla Kontrol, 17β-estradiol+progesteron, testosteron+estron, progesteron+estron ve testosteron+progesteron yüksek %SKOE’ni vermiş olup aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.32. Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine (%SKOE) ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort ± SS
17β-Estradiol+estron	11,48±13,35 BC
17β -Estradiol+progesteron	16,90±18,60 AB
17β-Estradiol+testosteron	7,95±13,15 C
Kontrol	18,75±15,97 A
Progesteron+estron	14,35±14,68 AB
Testosteron+estron	14,40±13,20 AB
Testosteron+progesteron	13,52±14,42 ABC

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.2.2.e. Hormon kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliği (RE) üzerine etkisi

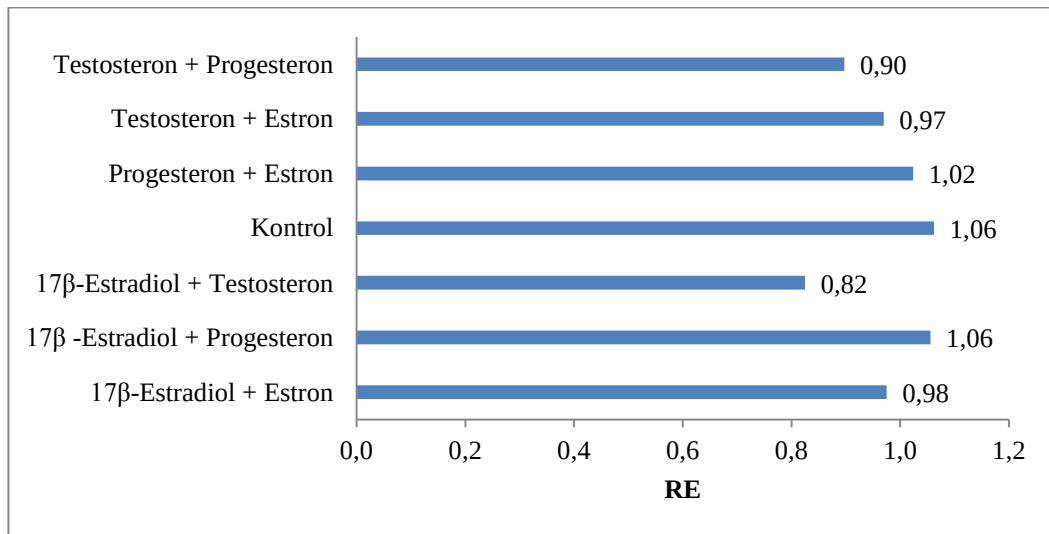
Rejenerasyon etkinliğine ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup, rejenerasyon etkinliği bakımından hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın önemli ($P<0,05$) olduğu (Çizelge 4.33) gözlenmiştir.

Çizelge 4.33. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	1,312115	0,2186858	2,68	0,0158*
Hormon	6	1,312115	0,2186858	2,68	0,0158*
Hata	211	17,212774	0,0815771		
Düzeltilmiş Toplam	217	18,524889			

*: Önemli ($P<0,05$)

RE bakımından ilk sırayı ortalama 1,06 ile 17β -estradiol + progesteron ve Kontrol almış olup bunu sırasıyla 1,02 progesteron + estron, 0,98 ile 17β -estradiol + estron, 0,97 ile testosteron + estron, 0,90 ile testosteron+progesteron ve 0,82 ile 17β -estradiol + testosteron izlemiştir (Şekil 4.54 ve Çizelge 4.34).



Şekil 4.54. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliği

Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.34. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort ± SS
17β-Estradiol+estron	0,98 ± 0,21 AB
17β -Estradiol+progesteron	1,06 ± 0,24 A
17β-Estradiol+testosteron	0,82 ± 0,49 B
Kontrol	1,06 ± 0,10 A
Progesteron+estron	1,02 ± 0,14 A
Testosteron+estron	0,97 ± 0,23 AB
Testosteron+progesteron	0,90 ± 0,28 AB

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.2.2.f. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS)’na etkileri

Eksplant başına köksüz sürgün sayısına (EBKZSS)ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormon kombinasyonları arasındaki farklılığınönemsiz (P>0,05) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.35. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	1,8791085	0,3131847	1,83	0,0955 ^{ns}
Hormon kombinasyonları	6	1,8791085	0,3131847	1,83	0,0955 ^{ns}
Hata	211	36,204607	0,1715858		
Düzeltilmiş Toplam	217	38,083716			

ns: Önemsiz (P>0,05)

Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait ortalamalar Çizelge 4.36’da verilmiştir.

Çizelge 4.36. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait ortalamaları.

Hormonlar	Ort ± SS
17β-Estradiol+estron	0,55 ± 0,28 A
17β -Estradiol+progesteron	0,80 ± 0,36 A
17β-Estradiol+testosteron	0,64 ± 0,47 A
Kontrol	0,78 ± 0,22 A
Progesteron+estron	0,77 ± 0,50 A
Testosteron+estron	0,61 ± 0,43 A
Testosteron+progesteron	0,60 ± 0,42 A

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.2.2.g Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na etkileri

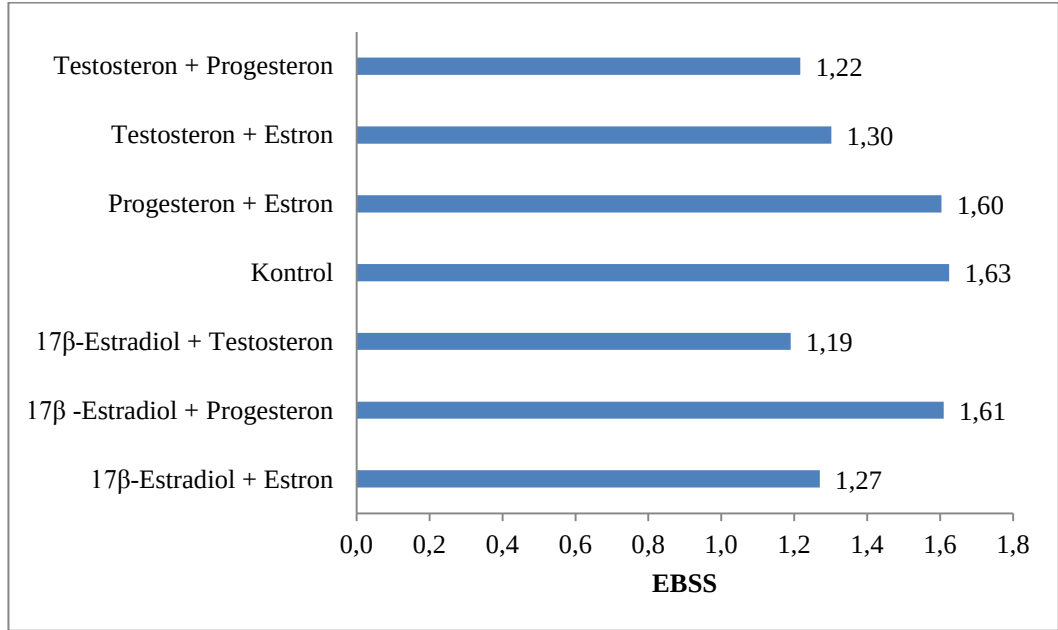
Eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01)olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.37).

Çizelge 4.37. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	6,8024114	1,1337352	3,7	0,0016**
Hormon kombinasyonları	6	6,8024114	1,1337352	3,7	0,0016**
Hata	211	64,695903	0,3066157		
Düzeltilmiş Toplam	217	71,498314	217		

** : Çok önemli (P<0,01)

Şekil 4.55'den görüldüğü üzere EBSS bakımından ilk sırayı ortalama 1,63 ile Kontrol almış bunu sırasıyla 1,61 ile 17β-estradiol + progesteron, 1,60 ile progesteron + estron, 1,30 ile testosteron + estron, 1,27 ile 17β-estradiol + estron ve 1,22 testosteron + progesteron izlemiştir.



Şekil 4.55. Memeli cinsiyet hormonları, farklı kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı

Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na ait ortalamalara ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.38'de verilmiştir.

Çizelge 4.38. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na ait ortalamalara ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort ± SS
17β-Estradiol+estron	1,27 ± 0,40 AB
17β -Estradiol+progesteron	1,61 ± 0,51 A
17β-Estradiol+testosteron	1,19 ± 0,77 B
Kontrol	1,63 ± 0,26 A
Progesteron+estron	1,60 ± 0,53 A
Testosteron+estron	1,30 ± 0,47 AB
Testosteron+progesteron	1,22 ± 0,59 B

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

4.2.2.h. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)'na etkileri

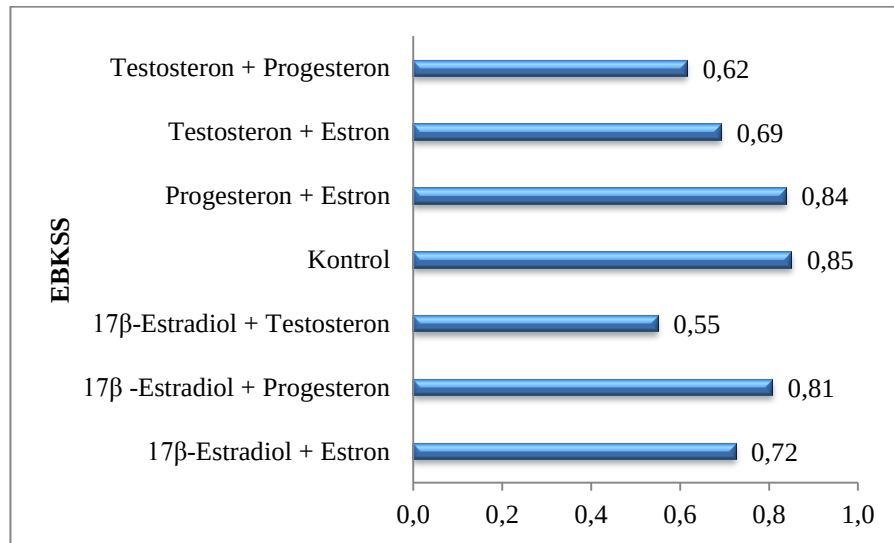
Eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.39).

Çizelge 4.39. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	6	2,2389182	0,373153	4,62	0,0002**
Hormon	6	2,2389182	0,373153	4,62	0,0002**
Hata	211	17,036093	0,0807398		
Düzeltilmiş Toplam	217	19,275011			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

Şekil 4.56'den görüldüğü üzere EBKSS bakımından ilk sırayı 0,85 ile Kontrol almış olup bunu sırasıyla 0,84 ile progesteron+estron, 0,81 ile 17 β -Estradiol+progesteron, 0,72 ile 17 β -Estradiol+estron, 0,69 ile testosteron+estron, 0,62 ile testosteron+progesteron, 0,55 ile 17 β -Estradiol+testosteron izlemiştir.



Şekil 4.56. Eksplant başına köklü sürgün sayısı

Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.40'da verilmiştir.

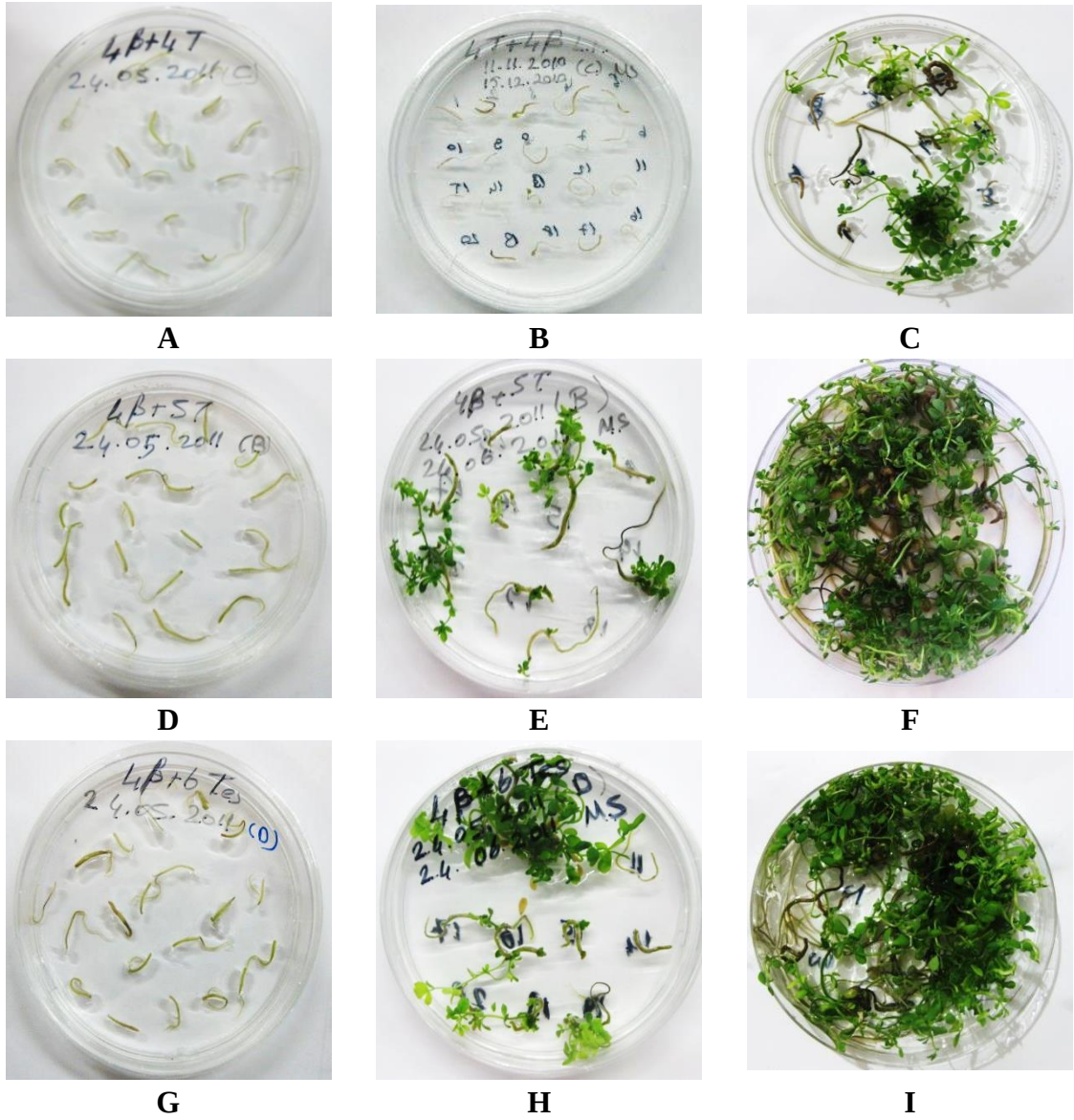
Çizelge 4.40. Hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	Ort ± SS
17β-Estradiol+estron	0,72 ± 0,27 ABC
17β -Estradiol+progesteron	0,81 ± 0,26 AB
17β-Estradiol+testosteron	0,55 ± 0,40 C
Kontrol	0,85 ± 0,08 A
Progesteron+estron	0,84 ± 0,19 A
Testosteron+estron	0,69 ± 0,25 ABC
Testosteron+progesteron	0,62 ± 0,29 BC

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

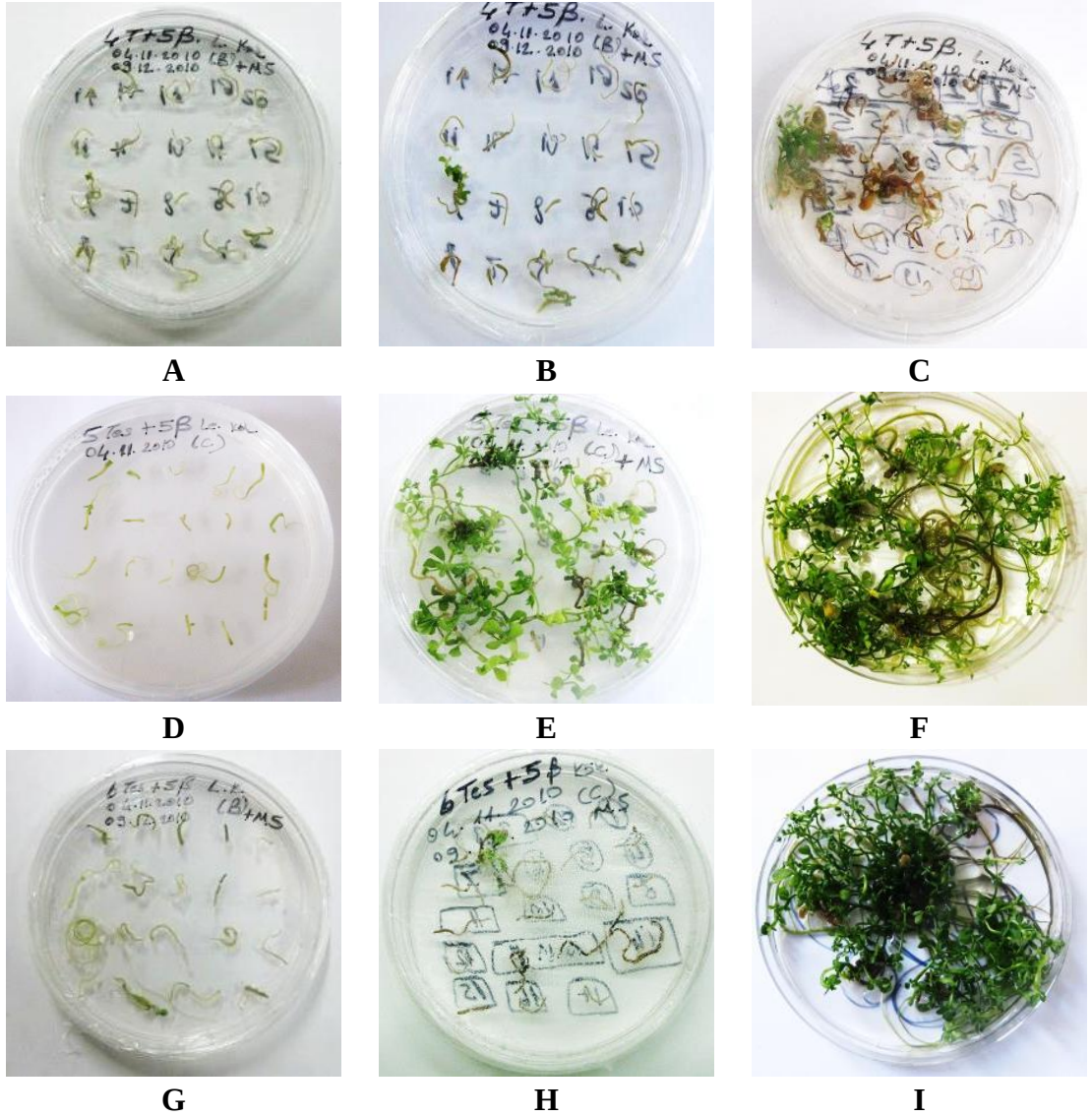
Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının dozları dikkate alınmaksızın kök meristemlerinin hormon kombinasyonlarına tepkileri incelendiğinde rejenerasyon kapasitesi üzerine önemli etkisi olan KSOE, EBSS, EBKSS VE TSOEO bakımından genel olarak en iyi karışımın progesteron+estron (PE) karışımı olduğu ve kontrolü geçtiği bulunmuştur. Daha sonra bu ikili hormon kombinasyonu için hangi dozların rejenerasyona ne tür bir etki yaptığı belirlenmiştir.

Gazalboynuzu kök eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonu üzerine memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının etkisi Şekil 4.57, Şekil 4.58, Şekil 4.59, Şekil 4.60, Şekil 4.61, Şekil 4.62, Şekil 4.63, Şekil 4.64, Şekil 4.65'te görülmektedir.



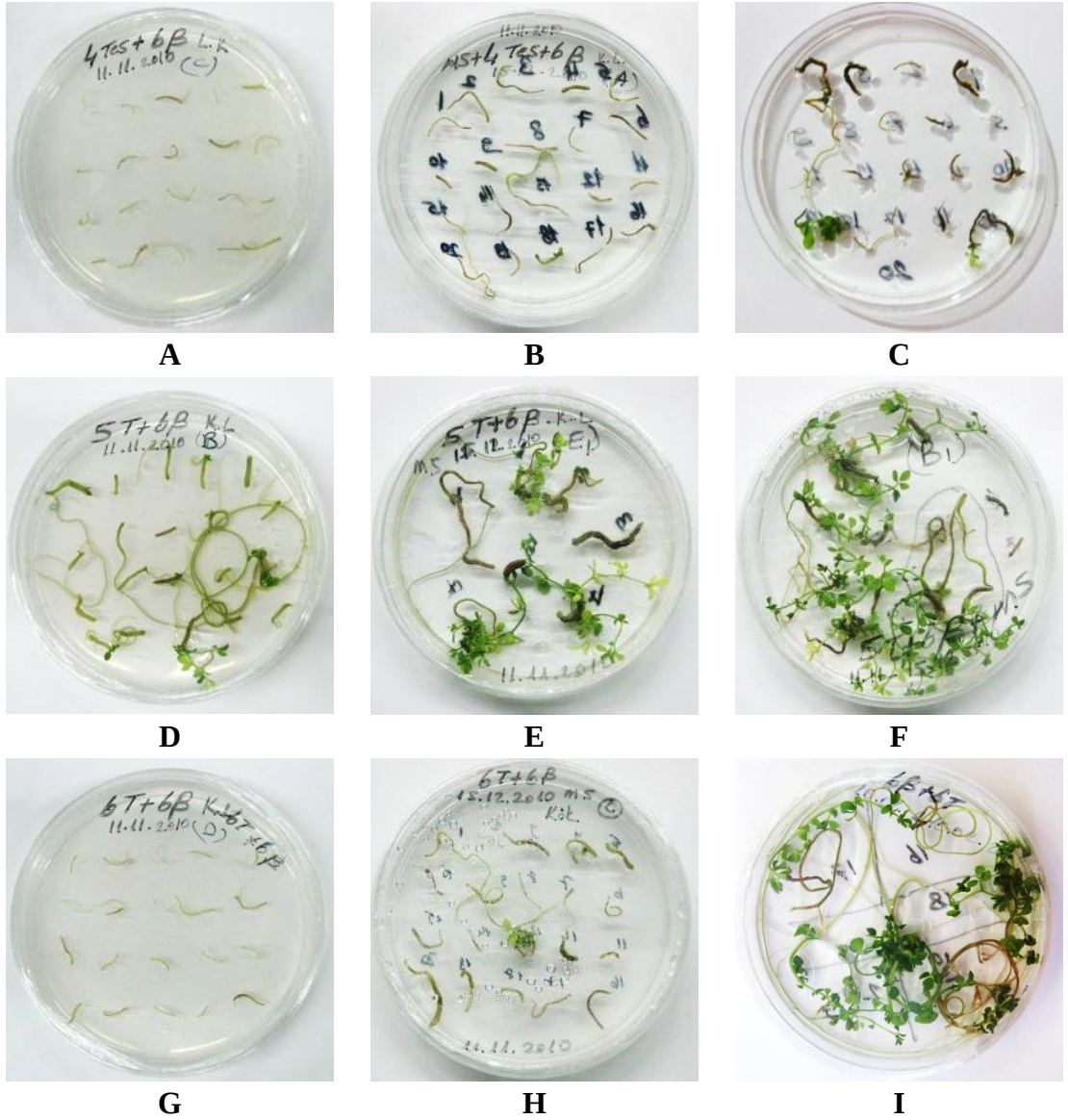
Şekil 4.57. 17β -Estradiol+testosteron(B+T) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 4B+4T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü. B) 4B+4T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü C) 4B+4T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü D) 4B+5T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü E) 4B+5T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü F) 4B+5T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü. G) 4B+6T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü H) 4B+6T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü I) 4B+6T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü



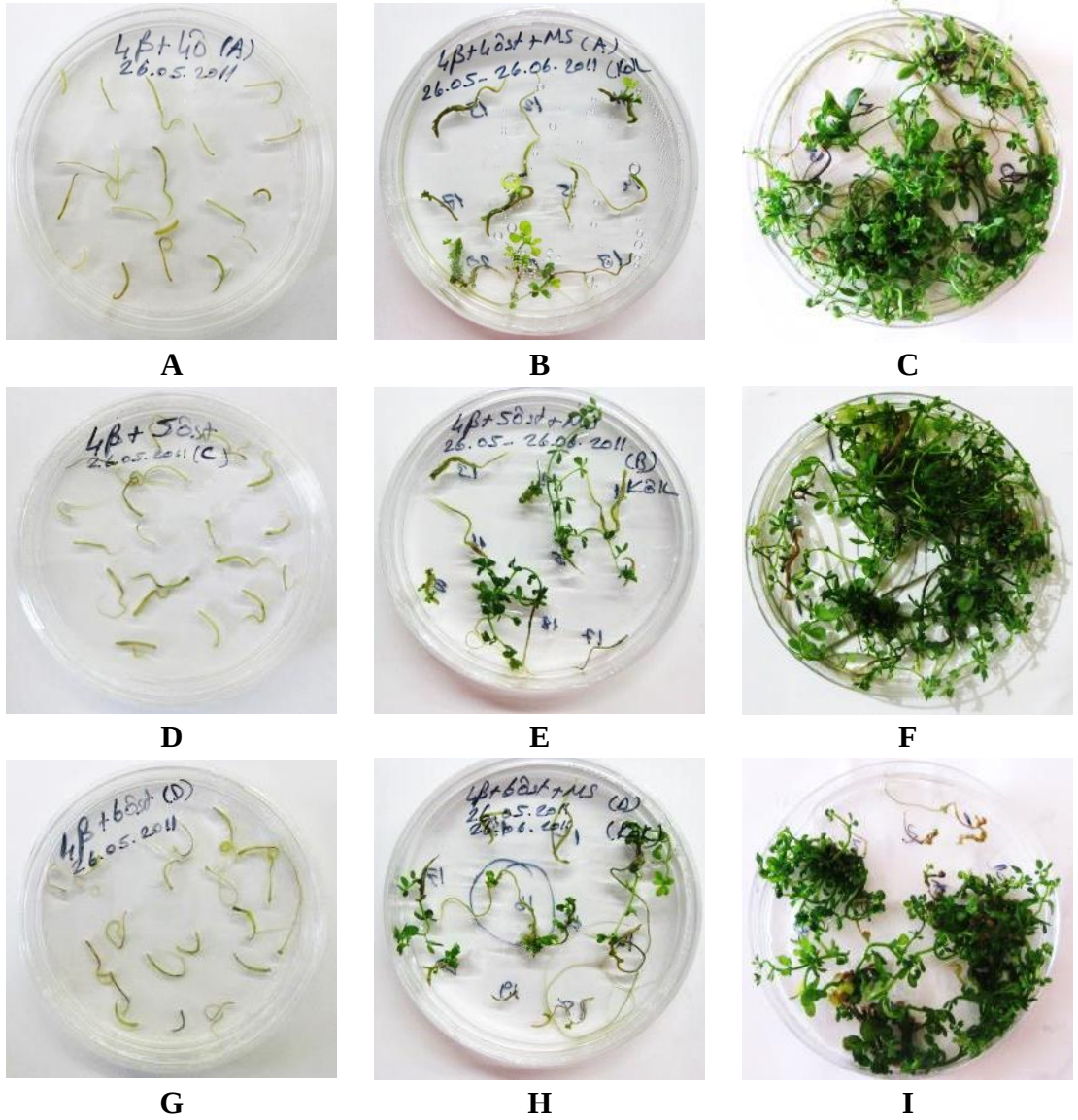
Şekil 4.58. 17 β -Estradiol+testosteron (B+T) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 5B+4T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü. B) 5B+4T kombinasyonunu içeren ortamda 60. günde görünümü C) 5B+4T kombinasyonunu içeren ortamda 90. günde görünümü D) 5B+5T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü E) 5B+5T kombinasyonunu içeren ortamda 60. günde görünümü F) 5B+5T kombinasyonunu içeren ortamda 90. günde görünümü. G) 5B+6T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü H) 5B+6T kombinasyonunu içeren ortamda 60. günde görünümü I) 5B+6T kombinasyonunu içeren ortamda 90. günde görünümü



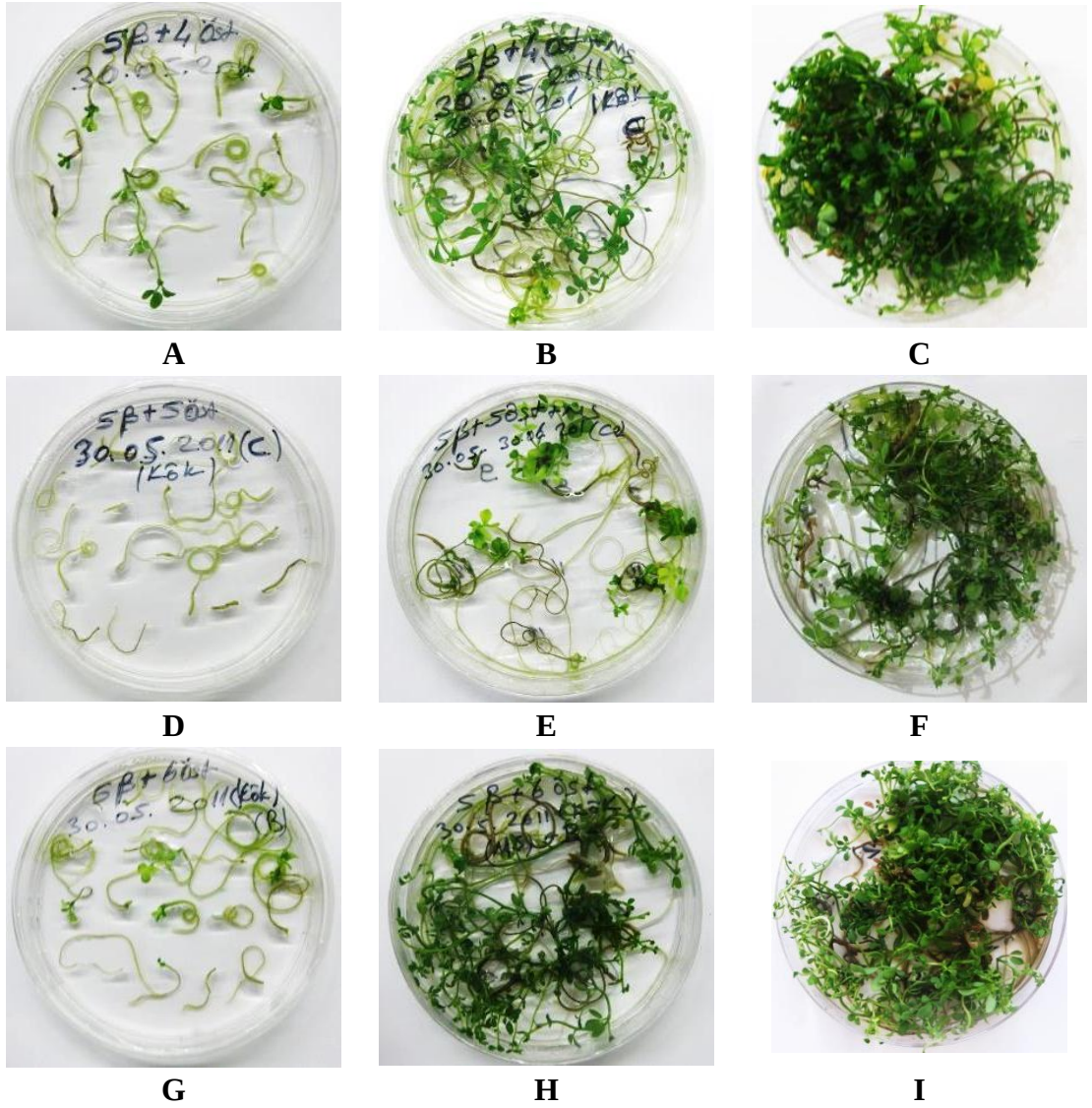
Şekil 4.59. 17β -Estradiol+testosteron (B+T) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 6B+4T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü. B) 6B+4T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü C) 6B+4T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü D) 6B+5T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü E) 6B+5T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü F) 6B+5T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü. G) 6B+6T kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü H) 6B+6T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü I) 6B+6T kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü



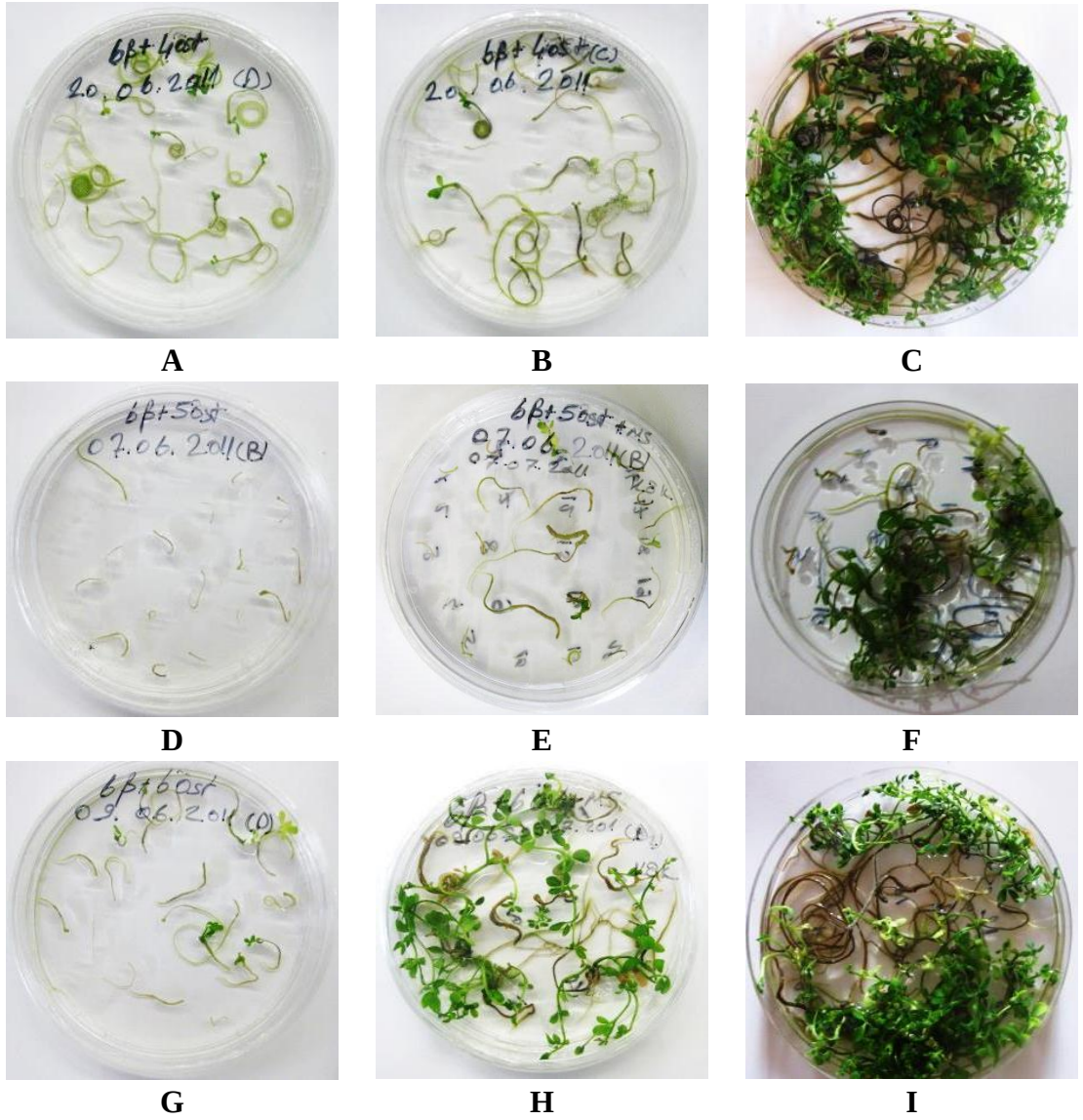
Şekil 4.60. 17β -estradiol+estron (B+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü

*: A) 4B+4E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 4B+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü C) 4B+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 4B+5E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 4B+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü F) 4B+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 4B+6E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 4B+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü I) 4B+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü



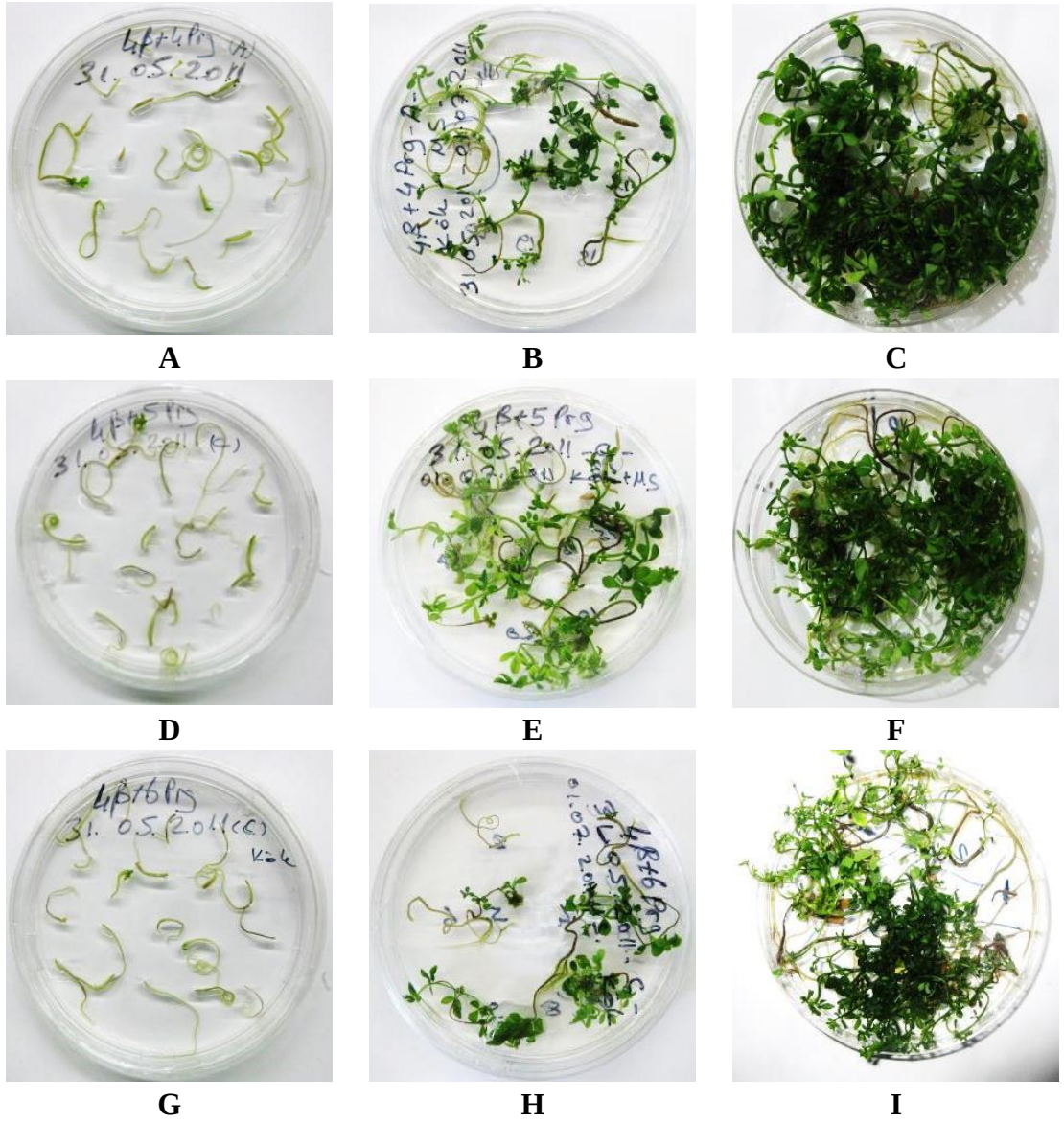
Şekil 4.61. 17β -estradiol+estron (B+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 5B+4E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 5B+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü C) 5B+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 5B+5E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 5B+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü F) 5B+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 5B+6E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 5B+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü I) 5B+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü



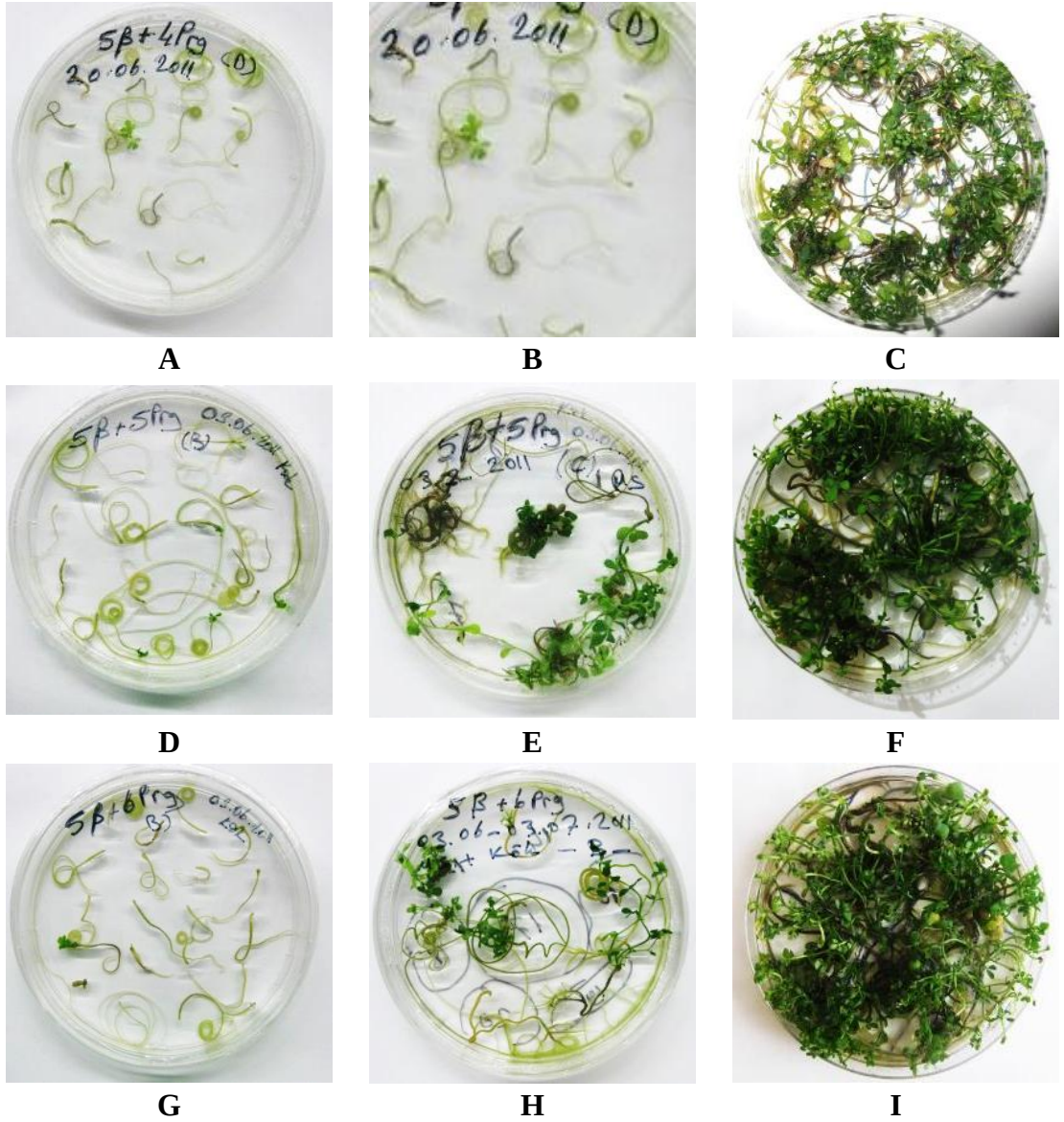
Şekil 4.62. 17 β -estradiol+estron (B+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 6B+4E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 6B+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü C) 6B+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 6B+5E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 6B+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü F) 6B+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 6B+6E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 6B+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü I) 6B+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü



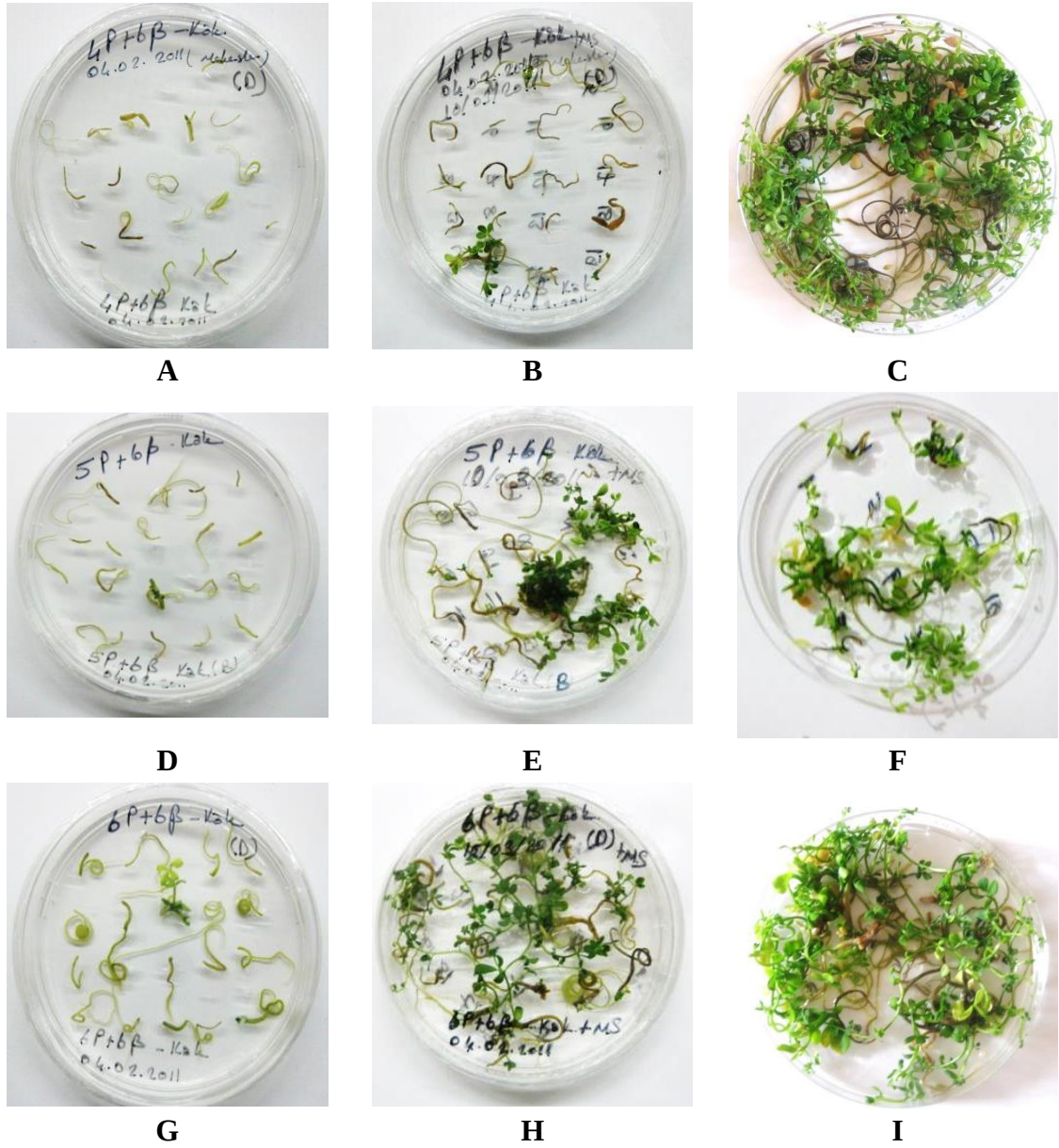
Şekil 4.63. 17β -estradiol+progesteron (B+P) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 4B+4P kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü. B) 4B+4P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü C) 4B+4P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü D) 4B+5P kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü E) 4B+5P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü F) 4B+5P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü. G) 4B+6P kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü H) 4B+6P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü I) 4B+6P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü



Şekil 4.64. 17 β -estradiol+progesteron (B+P) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 5B+4P kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü. B) 5B+4P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. günde görünümü C) 5B+4P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü D) 5B+5P kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü E) 5B+5P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü F) 5B+5P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü. G) 5B+6P kombinasyonunu içeren ortamda 30. günde görünümü H) 5B+6P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. günde görünümü I) 5B+6P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. günde görünümü



Şekil 4.65. 17 β -estradiol+progesteron (B+P) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30., 60. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 6B+4P kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 6B+4P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü C) 6B+4P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 6B+5P kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 6B+5P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü F) 6B+5P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 6B+6P kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 6B+6P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 60. gündeki görünümü I) 6B+6P kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü

4.2.3. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının kök eksplantları üzerine etkisi

Kombinasyon için en idealin progesteron ve estron hormonları olduğu anlaşılmıştır. Bundan sonraki kısım bu iki hormonunun dozları dikkate alınarak yapılmıştır.

4.2.3.a. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE) bakımından hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.41). Üç ayın ortalamasına bakıldığında köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi açısından ilk sırayı ortalama %71,67 ile 4P5E almış olup bunu sırasıyla %69,17 ile 4P6E ve 6P4E, %64,17 ile kontrol, %63,33 ile 5P4E, %60,42 ile 6P6E, %57,92 ile 4P4E, %55,42 ile 5P5E, %53,33 ile 5P6E ve 6P5E izlemiştir (Çizelge 4.42 ve Şekil 4.66).

Çizelge 4.41. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	29	37758,542	1302,0187	8,04	0,0001**
Hormon	9	4979,375	553,26389	3,41	0,0012**
Süre	2	29842,917	14921,458	92,1	0,0001**
Hormon*Süre	18	2936,25	163,125	1,01	0,4601 ^{ns}
Hata	90	14581,25	162,01389		
Düzeltilmiş Toplam	119	52339,792			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

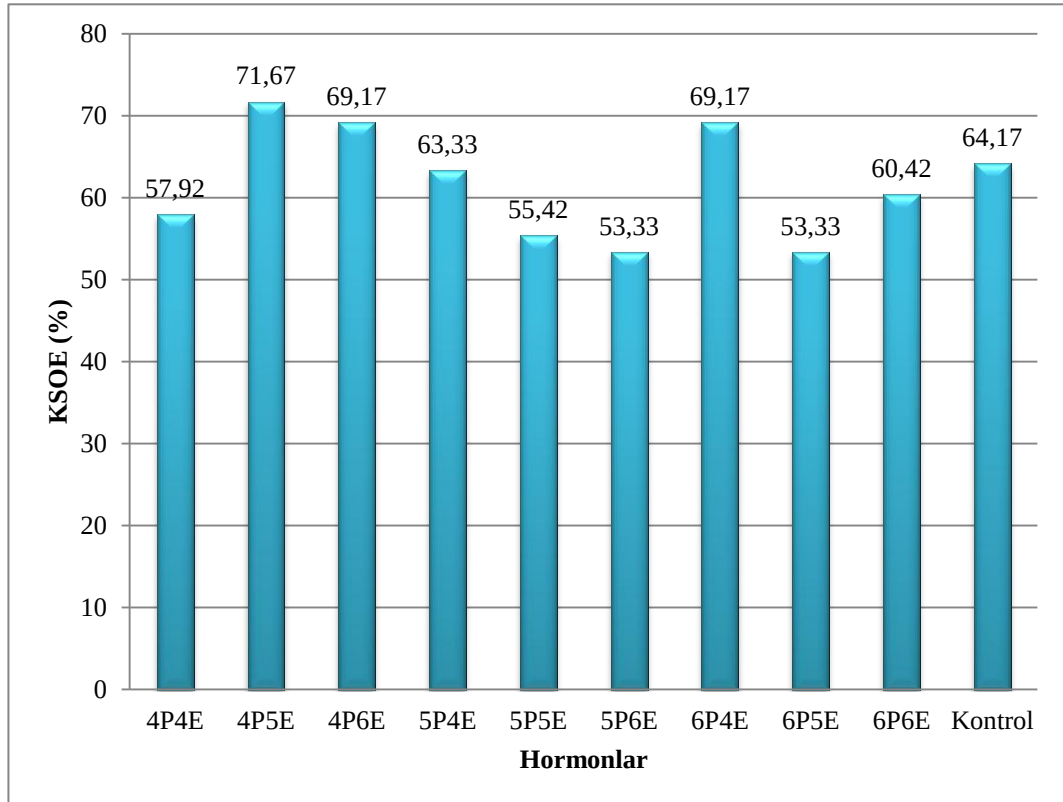
* : Önemli ($P<0,05$)

ns : Önemsiz ($P>0,05$)

Çizelge 4.42. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

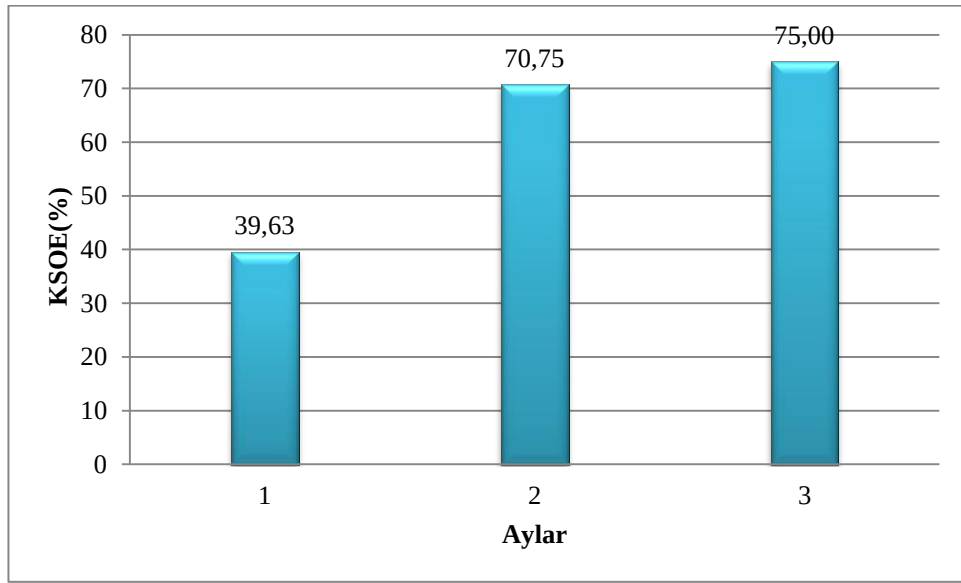
Doz	Hormonlar						Ort ± SS
	1.	Ay	2.	Ay	3.	Ay	
4P4E	23,75 ± 13,77	Bb	72,50 ± 9,57	ABa	77,50 ± 11,90	ABCa	57,92 ± 27,51 CD
4P5E	45,00 ± 29,72	Ab	83,75 ± 13,15	Aa	86,25 ± 8,54	Aa	71,67 ± 26,40 A
4P6E	48,75 ± 9,46	Ab	75,00 ± 10,80	ABa	83,75 ± 10,31	ABa	69,17 ± 18,07 AB
5P4E	33,75 ± 12,50	ABb	75,00 ± 11,55	ABa	81,25 ± 11,81	ABa	63,33 ± 24,53 ABCD
5P5E	41,25 ± 7,50	ABb	62,50 ± 8,66	Ba	62,50 ± 8,66	Ca	55,42 ± 12,87 CD
5P6E	28,75 ± 17,50	ABb	63,75 ± 20,97	Ba	67,50 ± 18,48	BCa	53,33 ± 25,08 D
6P4E	45,00 ± 4,08	Ab	82,50 ± 8,66	Aa	80,00 ± 10,80	ABa	69,17 ± 19,40 AB
6P5E	36,25 ± 11,81	ABb	61,25 ± 15,48	Ba	62,50 ± 15,55	Ca	53,33 ± 18,13 D
6P6E	48,75 ± 4,79	Ab	61,25 ± 8,54	Bab	71,25 ± 12,50	ABCa	60,42 ± 12,70 BCD
Kontrol	45,00 ± 12,91	Ab	70,00 ± 4,08	ABa	77,50 ± 2,89	ABCa	64,17 ± 16,21 ABC
Ort ± SS	39,63 ± 15,00	b	70,75 ± 13,28	a	75,00 ± 13,25	a	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



Şekil 4.66. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

KSOE (%) bakımından kültüre alınma süreleri arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.41). En yüksek ortalama %75 ile 3. ay olurken bunu %70,75 ile 2. ay, %39,63 ile 1. ay takip etmiştir. KSOE (%) bakımından 2. ve 3 ay arasındaki fark önemli olmayıp aynı grup içerisinde yer almışlardır. Ancak 1. ayla aralarındaki fark önemlidir (Çizelge 4.42 ve Şekil 4.67).

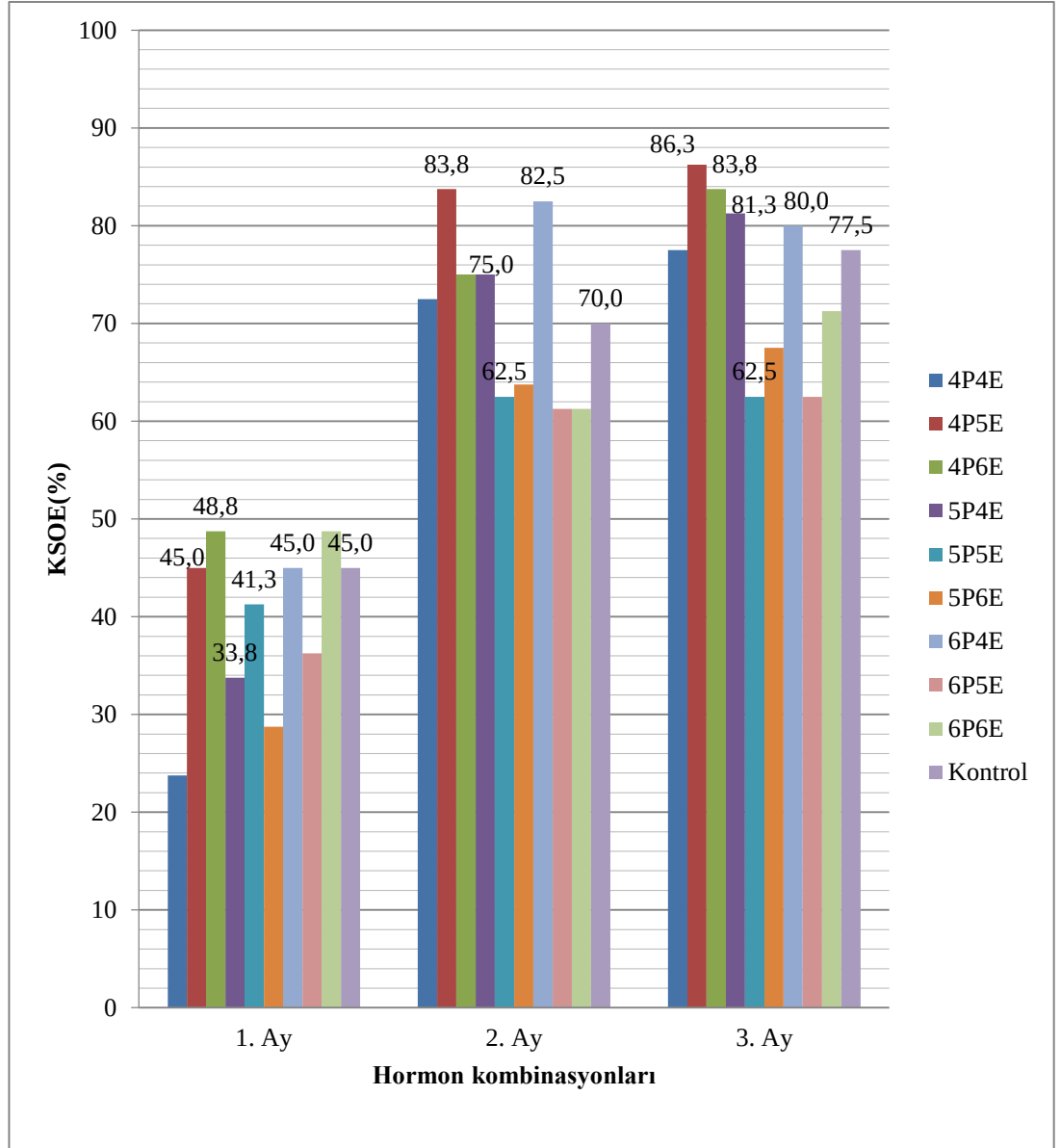


Şekil 4.67. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar

Şekil 4.67’de görüldüğü gibi kültüre alınma süresi ilerledikçe %KSOE yüzdesi artmıştır. Bunun nedeni ilk ay köklü sürgün oluşturmeyen eksplantların ilerleyen aylarda kök oluşturmalarından ve zamanla rejenere eksplant sayısının artmasından ve bunlarında kök oluşturmalarından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.42’te koyu renkle belirtilen ve Şekil 4.68 üzerinde de görülen 4P5E, 4P6E, 5P4E ve 6P4E ikili kombinasyonları %KSOE bakımından her 3 ay da ileri çıkmıştır. Ancak 5P4E ikili kombinasyonu diğer öne çıkan ikili kombinasyonlara göre ilk ay daha düşük KSOE%’ni verdiği için Şekil 4.66’da görülen 3 aylık ortalama sonuçlarda kontrolden daha düşük gözükmemektedir. İlk ay KSOE%’ni 5P4E bu kombinasyon düşürürken diğer aylarda kültür ortamında hormon kullanılmadığı için hormon

kombinasyonunun konsantrasyonu giderek azalmış ve gelişim 2. ve 3. aylarda sitümüle edilmiştir.



Şekil 4.68. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının aylara göre köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

4.2.3.b. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) bakımından hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.43).

Çizelge 4.43. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	29	2199,1667	75,833333	3,41	0,0001**
Hormon	9	1524,1667	169,35185	7,62	0,0001**
Süre	2	201,66667	100,83333	4,54	0,0133*
Hormon*Süre	18	473,33333	26,296296	1,18	0,2918 ^{ns}
Hata	90	2000	22,222222		
Düzeltilmiş Toplam	119	4199,1667			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

* : Önemli ($P<0,05$)

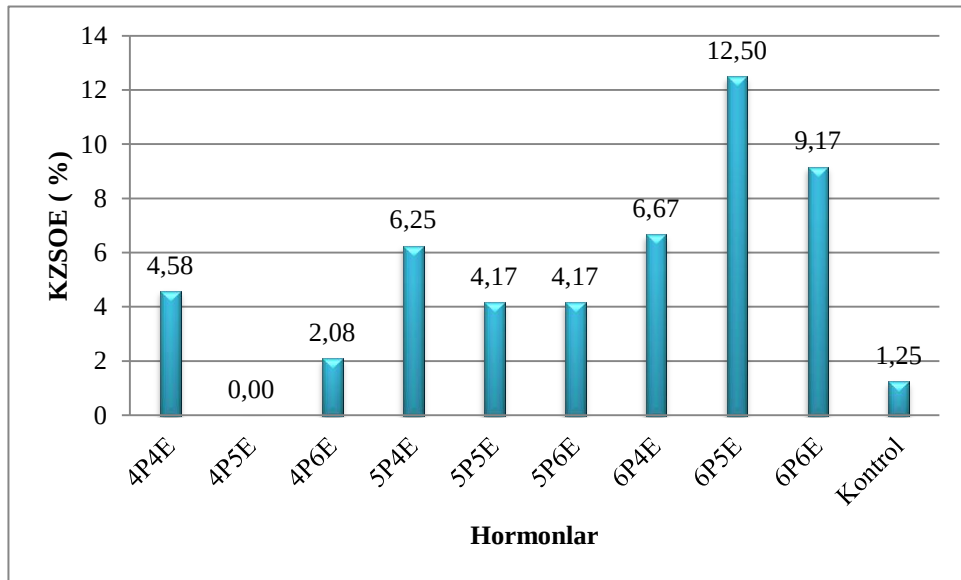
ns : Önemsiz ($P>0,05$)

Üç ayın ortalamasına bakıldığında köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %12,50 ile 6P5E almış olup bunu sırasıyla %9,17 ile 6P6E, %6,67 ile 6P4E, %6,25 ile 5P4E, %4,58 ile 4P4E, %4,17 ile 5P5E ve 5P6E, %2,08 ile 4P6E, %1,25 ile kontrol, %0,00 ile 4P5E izlemiştir (Çizelge 4.44, Şekil 4.69).

Çizelge 4.44. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Doz	Hormonlar			
	1.Ay	2.Ay	3.Ay	Ort ± SS
4P4E	1,25 ± 2,50	6,25 ± 2,50	6,25 ± 6,29	4,58 ± 4,50 CD
4P5E	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 E
4P6E	1,25 ± 2,50	2,50 ± 2,89	2,50 ± 2,89	2,08 ± 2,57 DE
5P4E	10,00 ± 4,08	6,25 ± 2,50	2,50 ± 2,89	6,25 ± 4,33 BC
5P5E	0,00 ± 0,00	6,25 ± 4,79	6,25 ± 4,79	4,17 ± 4,69 CD
5P6E	1,25 ± 2,50	7,50 ± 6,45	3,75 ± 4,79	4,17 ± 5,15 CD
6P4E	5,00 ± 4,08	6,25 ± 6,29	8,75 ± 8,54	6,67 ± 6,15 BC
6P5E	7,50 ± 5,00	13,75 ± 4,79	16,25 ± 4,79	12,50 ± 5,84 A
6P6E	5,00 ± 4,08	11,25 ± 11,09	11,25 ± 9,46	9,17 ± 8,48 AB
Kontrol	1,25 ± 2,50	0,00 ± 0,00	2,50 ± 2,89	1,25 ± 2,26 DE
Ort ± SS	3,25 ± 4,32b	6,00 ± 6,22a	6,00 ± 6,72a	

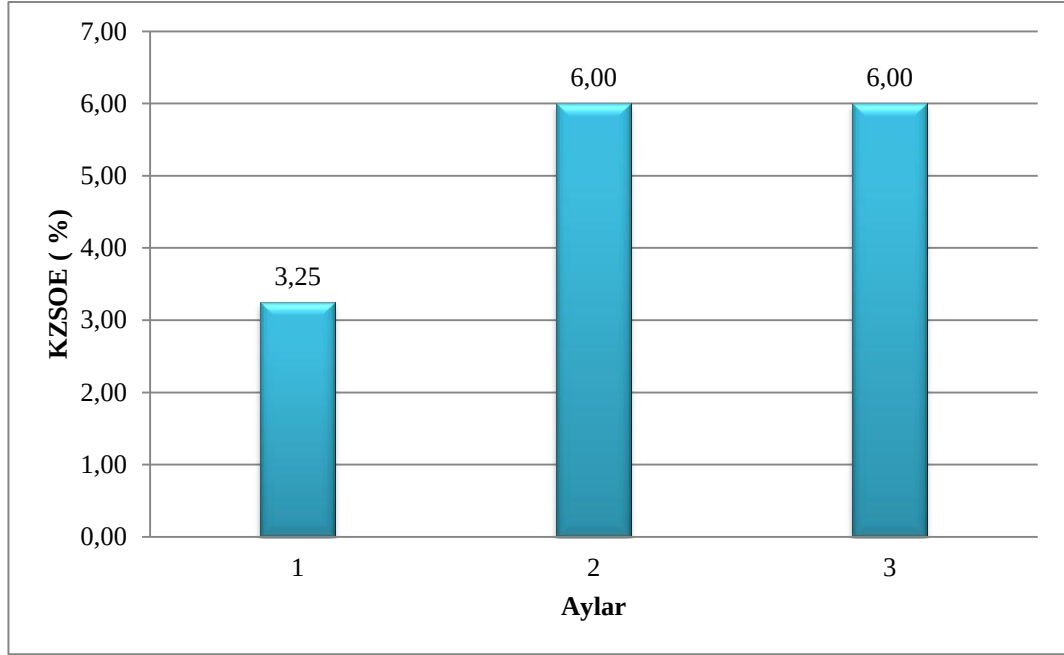
*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).



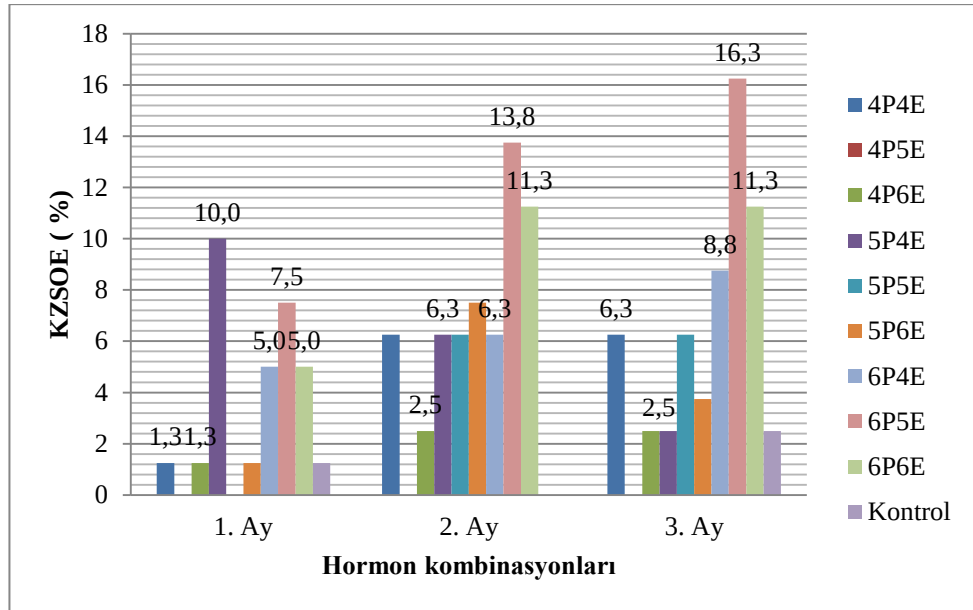
Şekil 4.69. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama kösüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

%KZSOE bakımından alınma süreleri arasındaki farklılığın önemli (P<0,05) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.43). En yüksek ortalama %6 ile 2. ve 3. ay olup bunları %3,25 ile 1. ay izlemiştir. %KZSOE bakımından 2. ve 3 ay arasında fark olmayıp aynı gruba

girmişlerdir. Ancak 1. ayla aralarındaki fark önemlidir (Çizelge 4.44, Şekil 4.70 ve Şekil 4.71.).



Şekil 4.70. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından aylar



Şekil 4.71. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının aylara göre köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

4.2.3.c. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Çizelge 4.45’da görüldüğü üzere toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.45. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	29	40871,875	1409,375	9,59	0,0001**
Hormon	9	3605,2083	400,5787	2,72	0,0074**
Süre	2	34921,25	17460,625	118,77	0,0001**
Hormon*Süre	18	2345,4167	130,30093	0,89	0,5958 ^{ns}
Hata	90	13231,25	147,01389		
Düzeltilmiş Toplam	119	54103,125			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

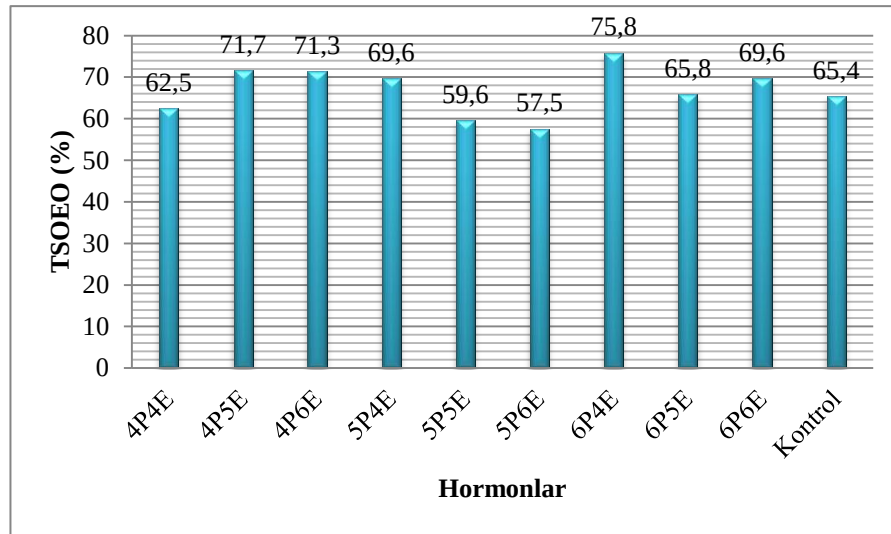
ns: Önemsiz ($P>0,05$)

Üç ayın ortalamasına bakıldığında toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %75,83 ile 6P4E almış olup bunu sırasıyla %71,67 ile 4P5E, %71,25 ile 4P6E, %69,58 ile 5P4E ve 6P6E, %65,83 ile 6P5E, %65,42 ile kontrol, %62,50 ile 4P4E, %59,58 ile 5P5E, %57,50 ile 5P6E izlemiştir (Çizelge 4.46 ve Şekil 4.72).

Çizelge 4.46. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

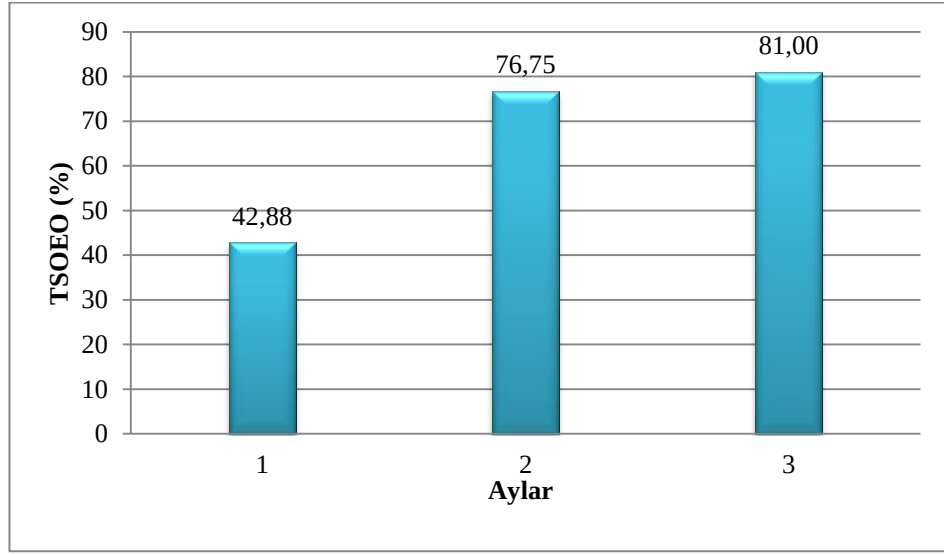
Doz	Hormonlar			Ort ± SS
	1. Ay	2. Ay	3. Ay	
4P4E	25,00 ± 14,72	78,75 ± 7,50	83,75 ± 7,50	62,50 ± 29,35 BC
4P5E	45,00 ± 29,72	83,75 ± 13,15	86,25 ± 8,54	71,67 ± 26,40 AB
4P6E	50,00 ± 10,80	77,50 ± 9,57	86,25 ± 8,54	71,25 ± 18,36 AB
5P4E	43,75 ± 15,48	81,25 ± 13,15	83,75 ± 11,09	69,58 ± 22,61 AB
5P5E	41,25 ± 7,50	68,75 ± 7,50	68,75 ± 7,50	59,58 ± 15,14 C
5P6E	30,00 ± 18,26	71,25 ± 16,52	71,25 ± 16,52	57,50 ± 25,54 C
6P4E	50,00 ± 5,77	88,75 ± 4,79	88,75 ± 4,79	75,83 ± 19,64 A
6P5E	43,75 ± 16,52	75,00 ± 17,32	78,75 ± 13,15	65,83 ± 21,72 BC
6P6E	53,75 ± 6,29	72,50 ± 2,89	82,50 ± 6,45	69,58 ± 13,39 AB
Kontrol	46,25 ± 12,50	70,00 ± 4,08	80,00 ± 0,00	65,42 ± 16,30 BC
Ort ± SS	42,88 ± 15,97 b	76,75 ± 11,35 a	81,00 ± 10,39 a	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

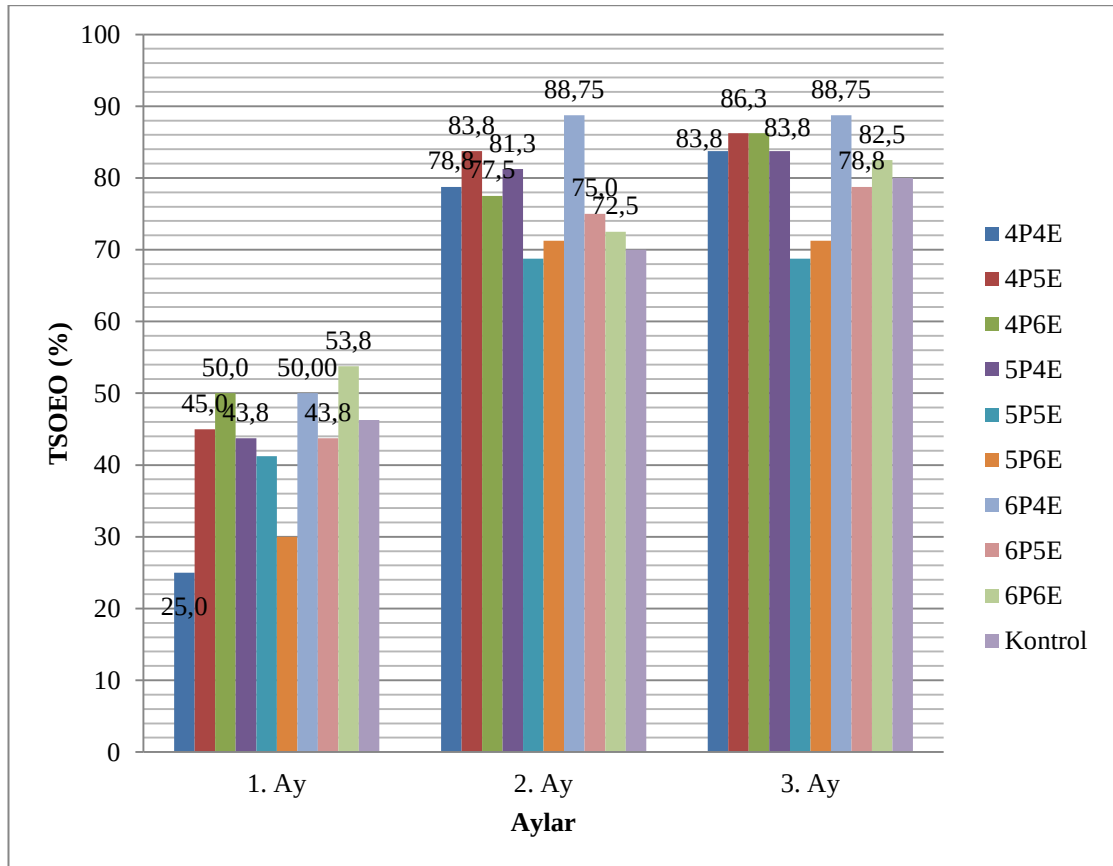


Şekil 4.72. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

%TSOEO bakımından kültüre alınma süreleri arasındaki farklılığın çok önemli (P<0,01) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.45). En yüksek ortalama %81 ile 3. ay olurken bunu %76,75 ile 2. ay, %42,88 ile 1. ay izlemiştir. %TSOEO bakımından 2. ve 3. ay arasındaki fark önemli olmayıp aynı gruba girmişlerdir. Ancak 1. ayla aralarındaki fark önemlidir (Çizelge 4.46 ve Şekil 4.74).



Şekil 4.73. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama sürgün oluşturan eksplant yüzdesine sürenin etkisi



Şekil 4.74. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının aylara göre sürgün oluşturan toplam eksplant yüzdesi

4.2.3.d. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine etkisi

Çizelge 4.47’de görüldüğü üzere sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) bakımından progesteron ve estron ikili kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.47. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	29	21126,042	728,4842	13,26	0,0001**
Hormon	9	2705,2083	300,5787	5,47	0,0001**
Süre	2	16157,917	8078,9583	147,08	0,0001**
Hormon*Süre	18	2262,9167	125,71759	2,29	0,0056**
Hata	90	4943,75	54,93056		
Düzeltilmiş Toplam	119	26069,792			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.48’de verilmiştir.

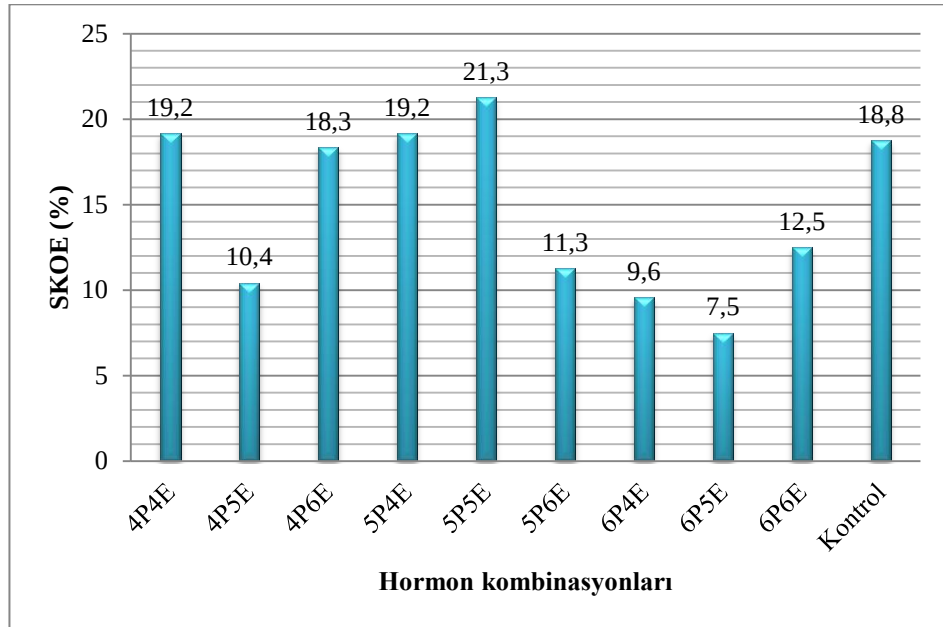
Çizelge 4.48. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Doz	Hormonlar			Ort ± SS
	1.Ay	2.Ay	3.Ay	
4P4E	50.00 ± 13.54Aa	6.25 ± 4.79BCDb	1.25 ± 2.50Cb	19.17 ± 24.11A
4P5E	28.75 ± 9.46BCDa	2.50 ± 5.00Db	0.00 ± 0.00Cb	10.42 ± 14.69 C
4P6E	36.25 ± 4.79ABCa	13.75 ± 2.50ABb	5.00 ± 4.08 BCc	18.33 ± 14.20 AB
5P4E	37.50 ± 13.23ABa	11.25 ± 11.09ABCb	8.75 ± 7.50 Bb	19.17 ± 16.76 A
5P5E	31.25 ± 13.15BCDa	16.25 ± 4.79Ab	16.25 ± 4.79 Ab	21.25 ± 10.69 A
5P6E	23.75 ± 8.54BCDa	5.00 ± 0.00CDb	5.00 ± 0.00 BCb	11.25 ± 10.25 C
6P4E	26.25 ± 10.31BCDa	1.25 ± 2.50Db	1.25 ± 2.50Cb	9.58 ± 13.56 C
6P5E	20.00 ± 8.16Da	1.25 ± 2.50 Db	1.25 ± 2.50Cb	7.50 ± 10.34 C
6P6E	21.25 ± 4.79CDa	11.25 ± 6.29ABCb	5.00 ± 7.07BCb	12.50 ± 8.92 BC
Kontrol	36.25 ± 14.36ABCa	11.25 ± 8.54ABCb	8.75 ± 6.29 Bb	18.75 ± 15.97 A
Ort ± SS	31.13 ± 12.78a	8.00 ± 7.23b	5.25 ± 6.20b	

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar ve aynı satırda küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P<0,05$).

Hormon kombinasyonlarının üç aylık ortalamasına bakıldığında %SKOE bakımından ilk sırayı ortalama %21,25 ile 5P5E almış olup bunu sırasıyla %19,17 ile 5P4E ve 4P4E, %18,75 ile kontrol, %18,33 ile 4P6E, %12,50 ile 6P6E, %11,25 ile 5P6E, %10,42 ile 4P5E, %9,58 ile 6P4E ve %7,50 ile 6P5E izlemiştir (Çizelge 4.48 ve Şekil 4.75).

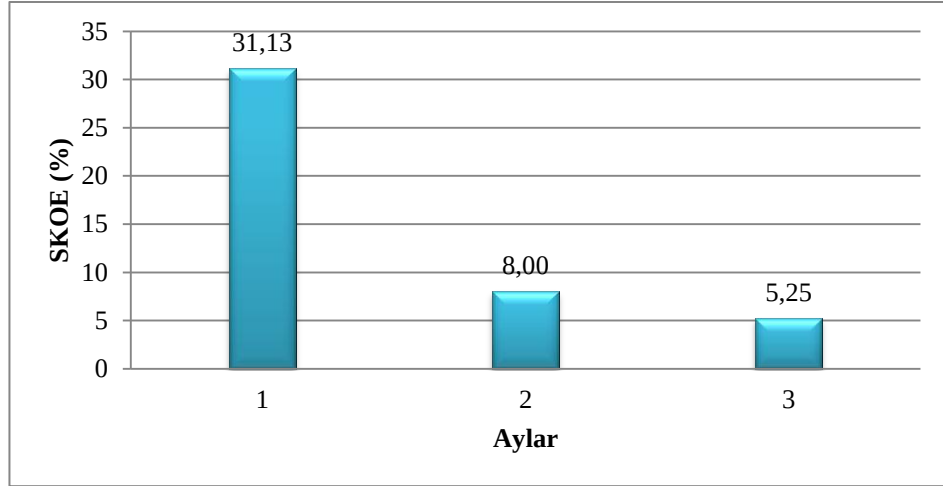
%SKOE bakımından üç aylık ortalama dikkate alındığında 5P5E, 5P4E, 4P4E, kontrol ve 4P6E kombinasyonları arasındaki fark önemli olmamış ilk gruba girmişlerdir. 6P6E, 5P6E, 6P4E, 6P5E ve 4P5E kombinasyonları arasındaki fark da önemli değildir (Çizelge 4.48).



Şekil 4.75. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi

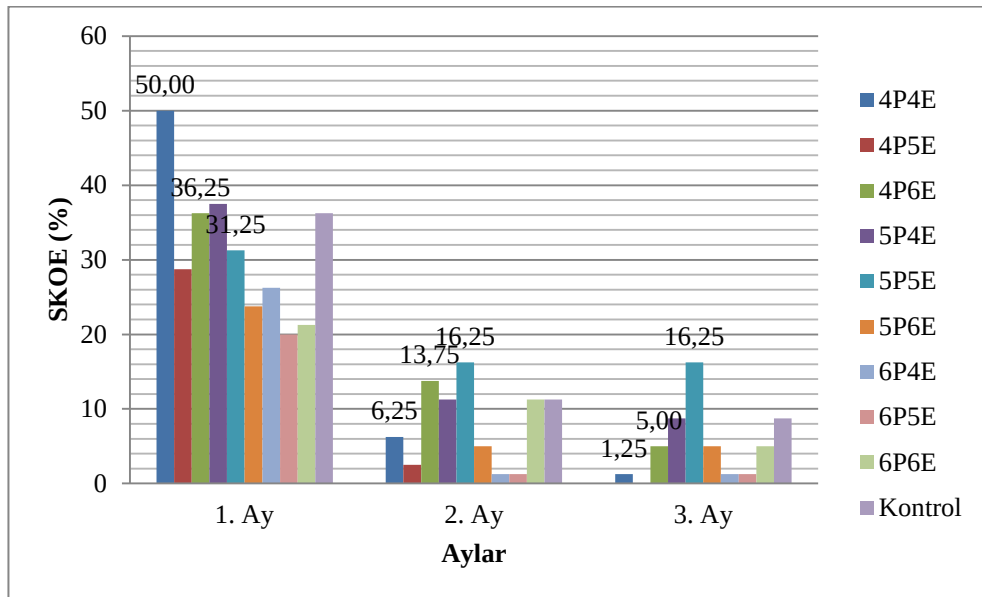
%SKOE bakımından kültüre alınma süreleri arasındaki farklılığın çok önemli ($P < 0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.48). En yüksek ortalama %31,13 ile 1. ay olurken bunu %8 ile 2. ay ve %5,25 ile 3. ay izlemiştir. %SKOE bakımından 2. ve 3 ay arasındaki fark önemli olmayıp aynı gruba girmişlerdir. Ancak 1. ayla aralarındaki fark önemlidir (Çizelge 4.48 ve Şekil 4.76).

Genel olarak %SKOE ile TSOE %'nin birbiriyle ters orantılı olarak değiştiği Şekil 4.76 ve Şekil 4.73, Şekil 4.74 ile Şekil 4.77'den görülmektedir.



Şekil 4.76. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının ortalama sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ayların etkisi

Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının %SKOE'ne ayların etkisi Şekil 4.77'de verilmiştir.



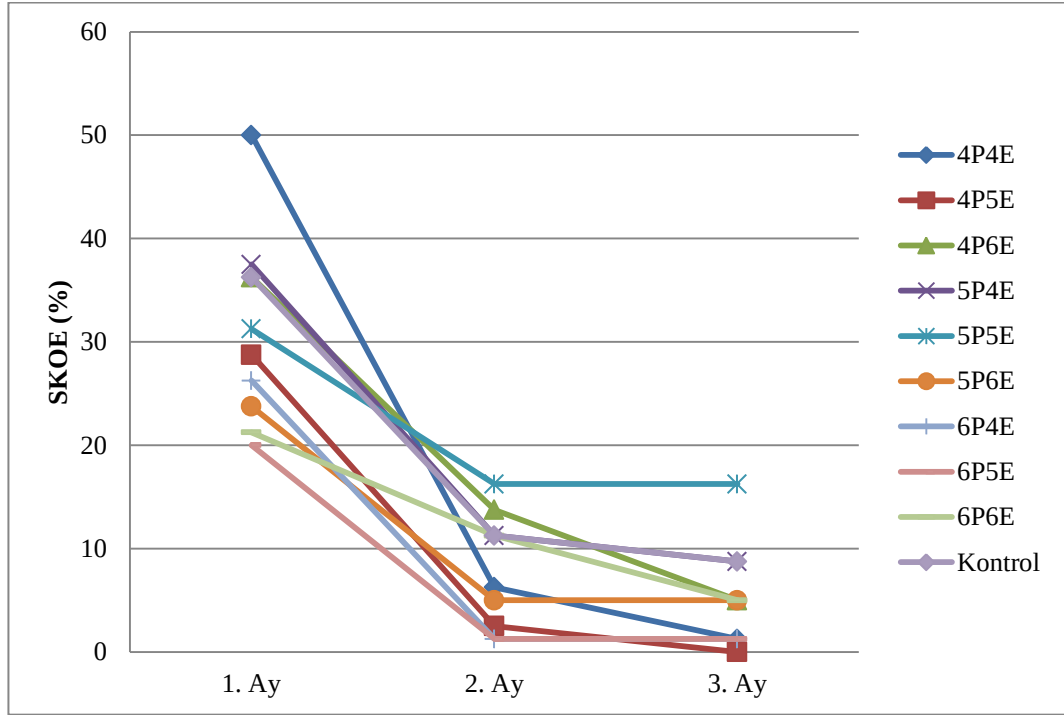
Şekil 4.77. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesine ayların etkisi

1. ayda %SKOE bakımından ilk sırayı %50 ile 4P4E kombinasyonu almış olup bunu sırasıyla %37,5 ile 5P4E, %36,25 ile 4P6E ve kontrol grubu izlemiştir. Bu hormon kombinasyonları arasındaki fark önemli olmamış hepsi aynı gruba girmişlerdir. SKOE (%) bakımından en son sırayı %20 ile 6P5E almış olup bunu sırasıyla %21,25 ile 6P6E, %23,75 ile 5P6E, %26,25 ile 6P4E, %28,75 ile 4P5E, %31,25 ile 5P5E izlemiştir (Şekil 4,77 ve Çizelge 4.48).

2. ayda %SKOE bakımından ilk sırayı %16,25 ile 5P5E almış olup bunu sırasıyla %13,75 ile 4P6E, %11,25 ile 5P4E, 6P6E ve kontrol, %6,25 ile 4P4E, %5 ile 5P6E, %2,5 ile 4P5E, %1,25 ile 6P4E ve 6P5E izlemiştir (Şekil 4.77 ve Çizelge 4.48).

3. ayda %SKOE bakımından ilk sırayı %16,25 ile 5P5E almış olup bunu sırasıyla %8,75 ile kontrol, 5P4E, %5 ile 4P6E, 5P6E, 6P6E, %1,25 ile 6P4E, 6P5E, %0 ile 4P5E izlemiştir (Şekil 4.77 ve Çizelge 4.48).

Çizelge 4.47’de görüldüğü üzere progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) bakımından hormonxay interaksiyonunun çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarınınaylara göre %SKOE etkisi Çizelge 4.48’da ve Şekil 4.78’de verilmiştir.



Şekil 4.78. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarında sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi aylara göre değişimi

Şekil 4.68, Şekil 4.74 ve Şekil 4.77'den görüldüğü üzere 4P4E kombinasyonu 1. ay en yüksek %SKOE'ni verirken en düşük KSOE'ni ve TSOE vermiştir. Zaman ilerledikçe 4P4E kombinasyonunun TSOE ve KSOE'i genel olarak artarken SKOE'i giderek azalmıştır. Aynı durum diğer kombinasyonlar içinde gözlemlenmiştir. Ancak SKOE'i bakımından 5P5E kombinasyonunda 1. aydan düşüş göstermesine rağmen 2. ve 3. aylarda SKOE'i sabit kalmıştır. Yine 5P5E kombinasyonunda KSOE'i bakımından 1 aydan itibaren zaman ilerledikçe artış göstermiş ancak 2. ve 3. aylarda bu değer sabit kalmıştır. Şekil 4.78'den de görüldüğü gibi SKOE'i bakımından en hızlı düşüş 4P4E kombinasyonunda gözlemlenmiştir. 4P4E kombinasyonundaki SKOE'i bakımından bu hızlı değişikliklerin nedeni 2. ve 3. aylarda hormon kullanılmaması nedeniyle bu aylarda aşırı dozun sağlamış olduğu sürgünlenmeyi inhibe edici dozun azalması ile sürgün oluşumunu teşvik eden hormon konsantrasyonuna daha çabuk ulaşması ve bu sitümüle edici etkinin diğer kombinasyonlara göre daha uzun sürmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.2.3.e. Rejenerasyon etkinliği

Rejenerasyon etkinliğine ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup rejenerasyon etkinliği (RE) bakımından progesteron ve estron ikili kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.49).

Çizelge 4.49. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait varyans analiz sonuçları.

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	9	0,4310725	0,0478969	4,64	0,0007**
Hormon	9	0,4310725	0,0478969	4,64	0,0007**
Hata	30	0,309625	0,0103208		
Düzeltilmiş Toplam	39	0,7406975			

** : Çok önemli ($P<0,01$)

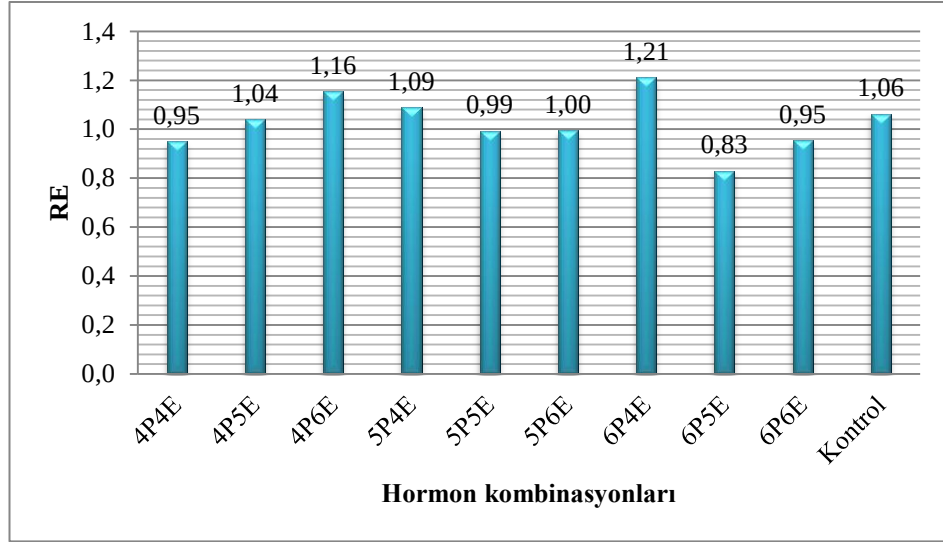
Çizelge 4.50. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliğine ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Hormonlar	
Doz	Ort $\pm$ SS
4P4E	0.95 $\pm$ 0.11 CD
4P5E	1.04 $\pm$ 0.08 BC
4P6E	1.16 $\pm$ 0.16 AB
5P4E	1.09 $\pm$ 0.04 ABC
5P5E	0.99 $\pm$ 0.14 C
5P6E	1.00 $\pm$ 0.05 C
6P4E	1.21 $\pm$ 0.12 A
6P5E	0.83 $\pm$ 0.11 D
6P6E	0.95 $\pm$ 0.06 CD
Kontrol	1.06 $\pm$ 0.10 BC

* : Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P<0,05$).

Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının ortalamalarına bakıldığında ilk sırayı ortalama 1,21 ile 6P4E alırken bunu sırasıyla 1,16 ile 4P6E, 1,09 ile 5P4E, 1,06

ile kontrol, 1,04 ile 4P5E, 1,0 ile 5P6E, 0,99 ile 5P5E, 0,95 ile 6P6E, 0,95 ile 4P4E, 0,83 ile 6P5E izlemiştir (Çizelge 4.50 ve Şekil 4.79).



Şekil 4.79. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının rejenerasyon etkinliği

4.2.3.f. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısı (EBKZSS)'na etkileri

Eksplant başına köksüz sürgün sayısına (EBKZSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.51).

Çizelge 4.51. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	9	5,00525	0,5561389	4,28	0,0012**
Hormon	9	5,00525	0,5561389	4,28	0,0012**
Hata	30	3,9025	0,1300833		
Düzeltilmiş Toplam	39	8,90775			

**: Çok önemli ($P<0,01$)

*: Önemli ($P<0,05$)

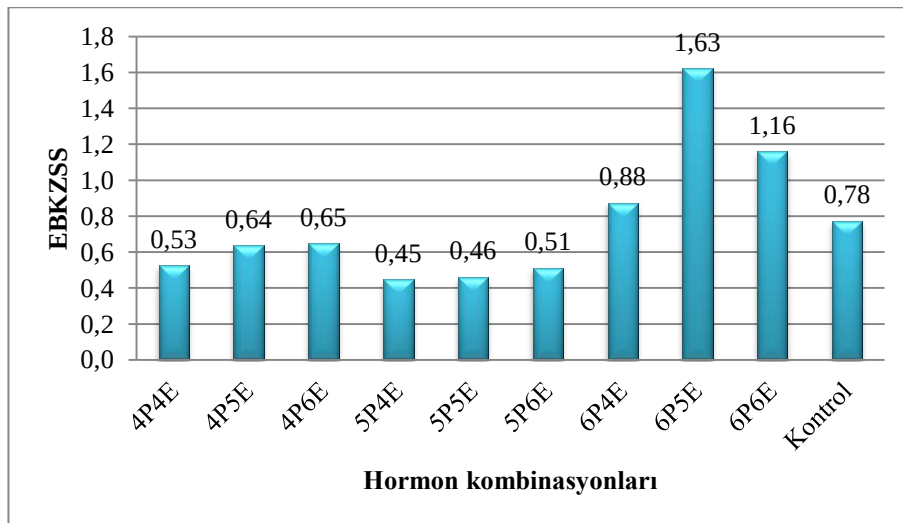
Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.52’te verilmiştir.

Çizelge 4.52. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Doz	EBKZSS
	Ort ± SS
4P4E	0.53 ± 0.06 C
4P5E	0.64 ± 0.36 C
4P6E	0.65 ± 0.13 BC
5P4E	0.45 ± 0.25 C
5P5E	0.46 ± 0.23 C
5P6E	0.51 ± 0.34 C
6P4E	0.88 ± 0.49 BC
6P5E	1.63 ± 0.34 A
6P6E	1.16 ± 0.72 CAB
Kontrol	0.78 ± 0.22 BC

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının ortalamalarına bakıldığında ilk sırayı ortalama 1,63 ile 6P5E, 1,16 ile 6P6E, 0,88 ile 6P4E, 0,78 ile kontrol, 0,65 ile 4P6E, 0,64 ile 4P5E, 0,53 ile 4P4E, 0,51 ile 5P6E, 0,46 ile 5P5E, 0,45 ile 5P4E izlemiştir (Çizelge 4.52, Şekil 4.80).



Şekil 4.80. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının eksplant başına köksüz sürgün sayısı

4.2.3.g. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı (EBSS)'na etkileri

Eksplant başına sürgün sayısına (EBSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın önemli ($P<0,05$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.53).

Çizelge 4.53. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	9	4,7978125	0,5330903	3,04	0,0106*
Hormon	9	4,7978125	0,5330903	3,04	0,0106*
Hata	30	5,268125	0,1756042		
Düzeltilmiş Toplam	39	10,065938			

*: Önemli ($P<0,05$)

Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.54'de verilmiştir.

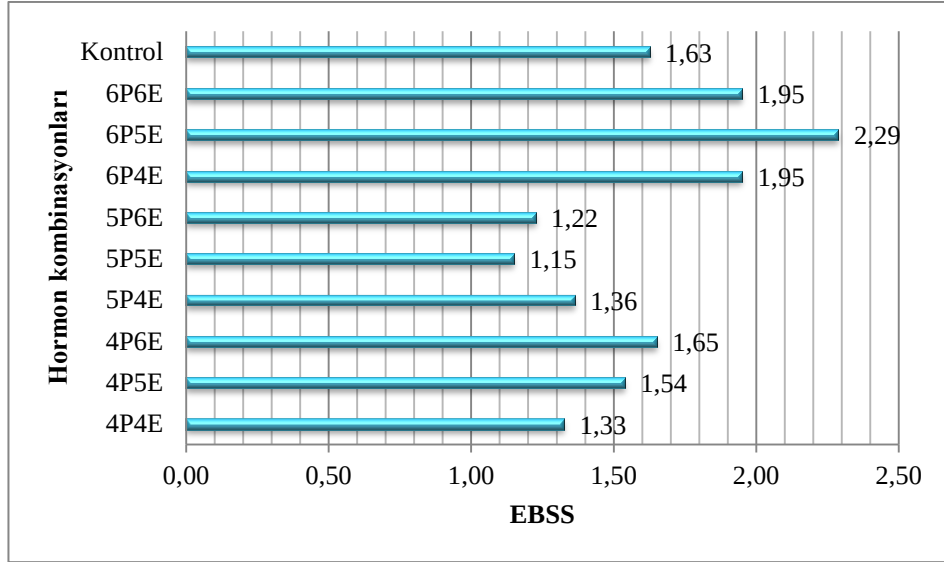
Çizelge 4.54. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

Doz	EBSS
	Ort $\pm$ SS
4P4E	1.33 $\pm$ 0.13 C
4P5E	1.54 $\pm$ 0.44 BC
4P6E	1.65 $\pm$ 0.18 BC
5P4E	1.36 $\pm$ 0.32 BC
5P5E	1.15 $\pm$ 0.29 C
5P6E	1.23 $\pm$ 0.45C
6P4E	1.95 $\pm$ 0.57 AB
6P5E	2.29 $\pm$ 0.49 A
6P6E	1.95 $\pm$ 0.70 AB
Kontrol	1.63 $\pm$ 0.26 BC

*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P<0,05$).

Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının EBSS'na bakıldığında ilk sırayı ortalama 2,29 adet ile 6P5E, 1,95 adet ile 6P4E ve 6P6E, 1,65 adet ile 4P6E, 1,63 adet

ile kontrol, 1,54 adet ile 4P5E, 1,36 adet ile 5P4E, 1,33 adet ile 4P4E, 1,23 adet ile 5P6E, 1,15 adet ile 5P5E izlemiştir (Şekil 4.81).



Şekil 4.81. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının eksplant başına sürgün sayısı

4.2.3.h. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı (EBKSS)’na etkileri

Eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup hormon kombinasyonları arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.55).

Çizelge 4.55. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P>F
Model	9	0,6605625	0,0733958	3,33	0,0062**
Hormon	9	0,6605625	0,0733958	3,33	0,0062**
Hata	30	0,661875	0,0220625		
Düzeltilmiş Toplam	39	1,3224375			

**: Çok önemli ($P<0,01$)

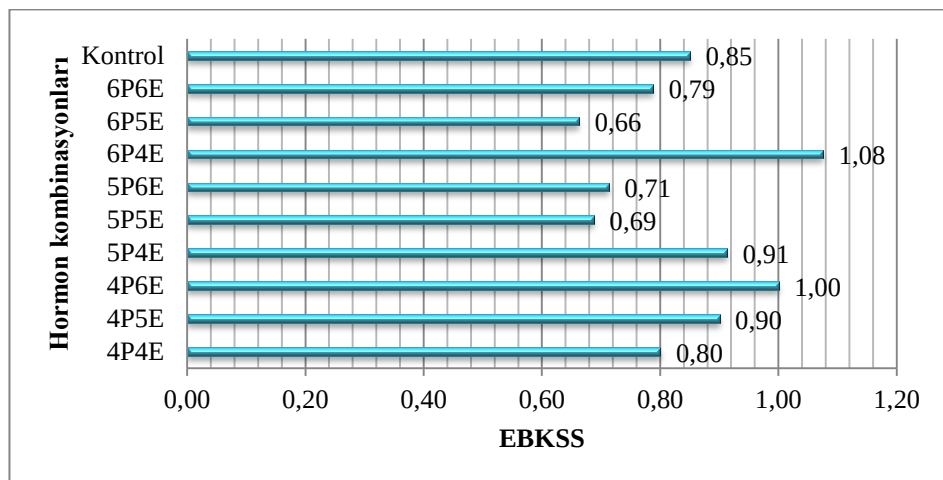
Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.56’da verilmiştir.

Çizelge 4.56. Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısına ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

EBKSS	
Hormonlar	
Doz	Ort $\pm$ SS
4P4E	0.80 $\pm$ 0.15 BCDE
4P5E	0.90 $\pm$ 0.15 ABCD
4P6E	1.00 $\pm$ 0.19 AB
5P4E	0.91 $\pm$ 0.12 ABC
5P5E	0.69 $\pm$ 0.14 DE
5P6E	0.71 $\pm$ 0.19 CDE
6P4E	1.08 $\pm$ 0.16 A
6P5E	0.66 $\pm$ 0.18 E
6P6E	0.79 $\pm$ 0.09 BCDE
Kontrol	0.85 $\pm$ 0.08 BCDE

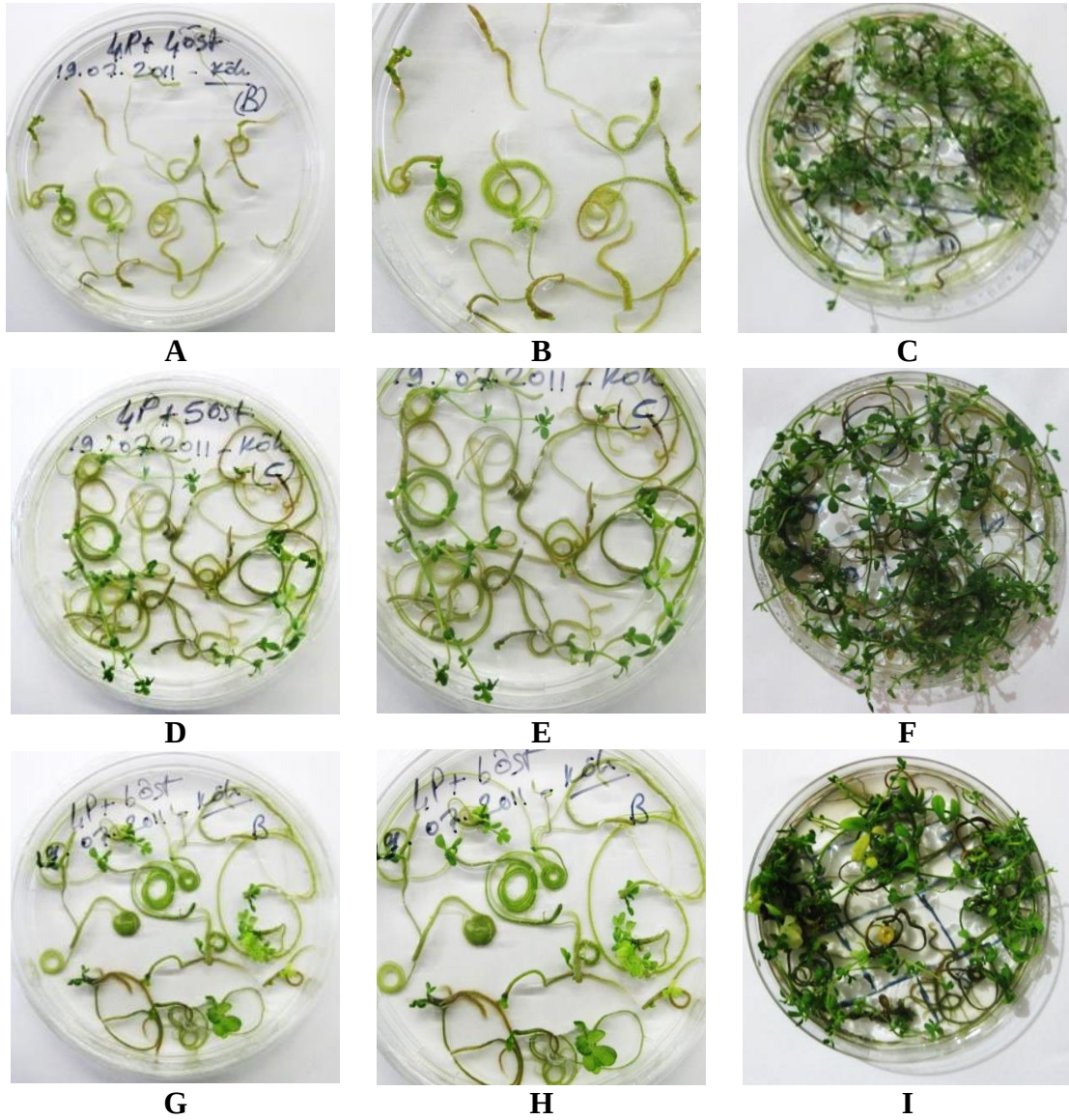
*: Aynı sütunda büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($P < 0,05$).

Progesteron ve estron ikili hormon kombinasyonlarının EBKSS’na bakıldığında ilk sırayı ortalama 1,08 adet ile 6P4E, 1 adet ile 4P6E, 0,91 adet ile 5P4E, 0,9 adet ile 4P5E, 0,85 adet ile kontrol, 0,8 adet ile 4P4E, 0,79 adet ile 6P6E, 0,71 adet ile 5P6E, 0,69 adet ile 5P5E ve 0,66 adet ile 6P5E izlemiştir (Çizelge 4.56 ve Şekil 4.82).



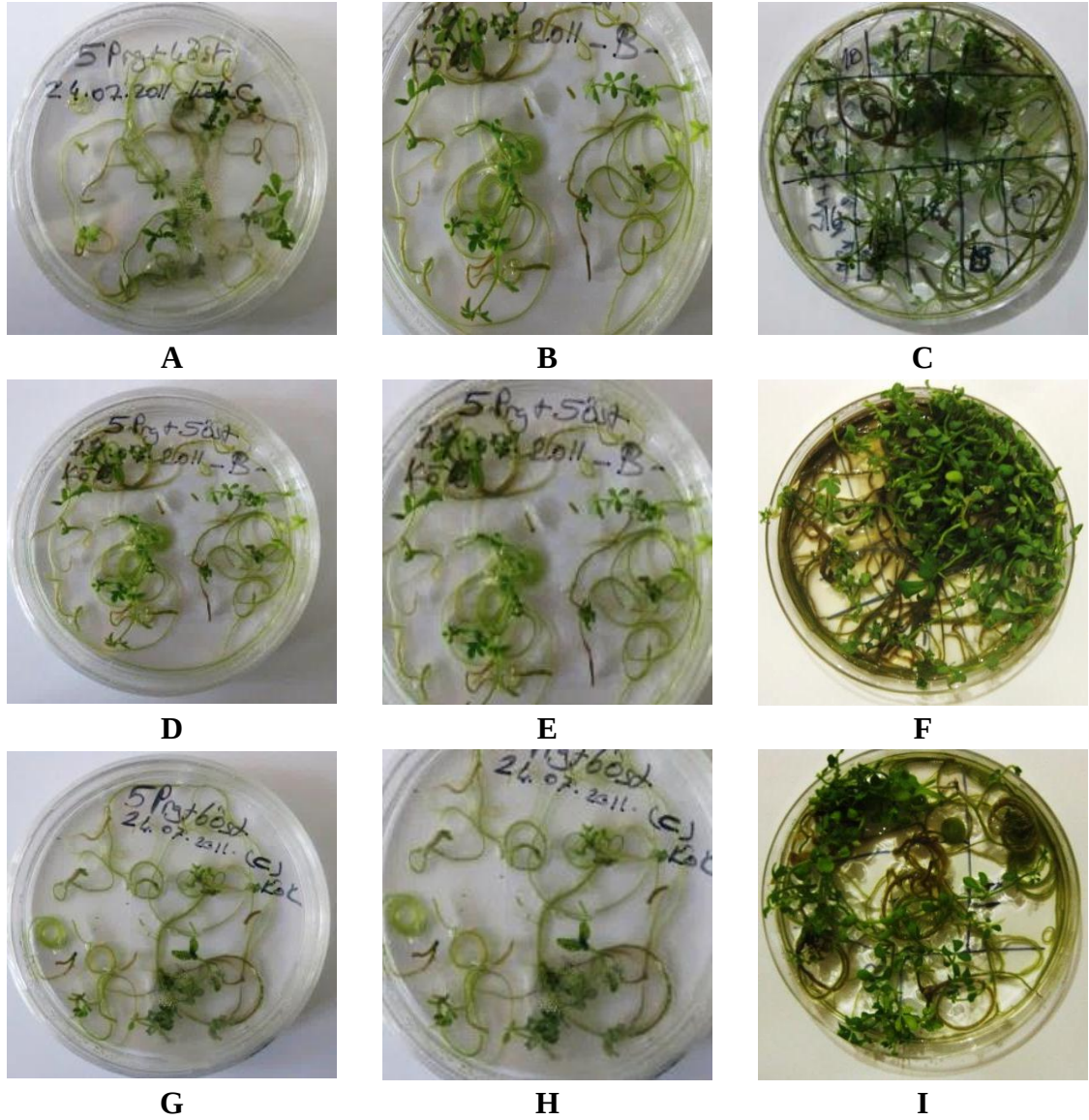
Şekil 4.82. Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının eksplant başına köklü sürgün sayısı

Gazalboynuzu kök eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonu üzerine progesteron ve estron hormon kombinasyonlarının etkisi ve tüm çalışma sonucunda elde edilen rejener bitkilerin büyütülmesi Şekil 4.83, Şekil 4.84, Şekil 4.85, Şekil 4.86'da görülmektedir.



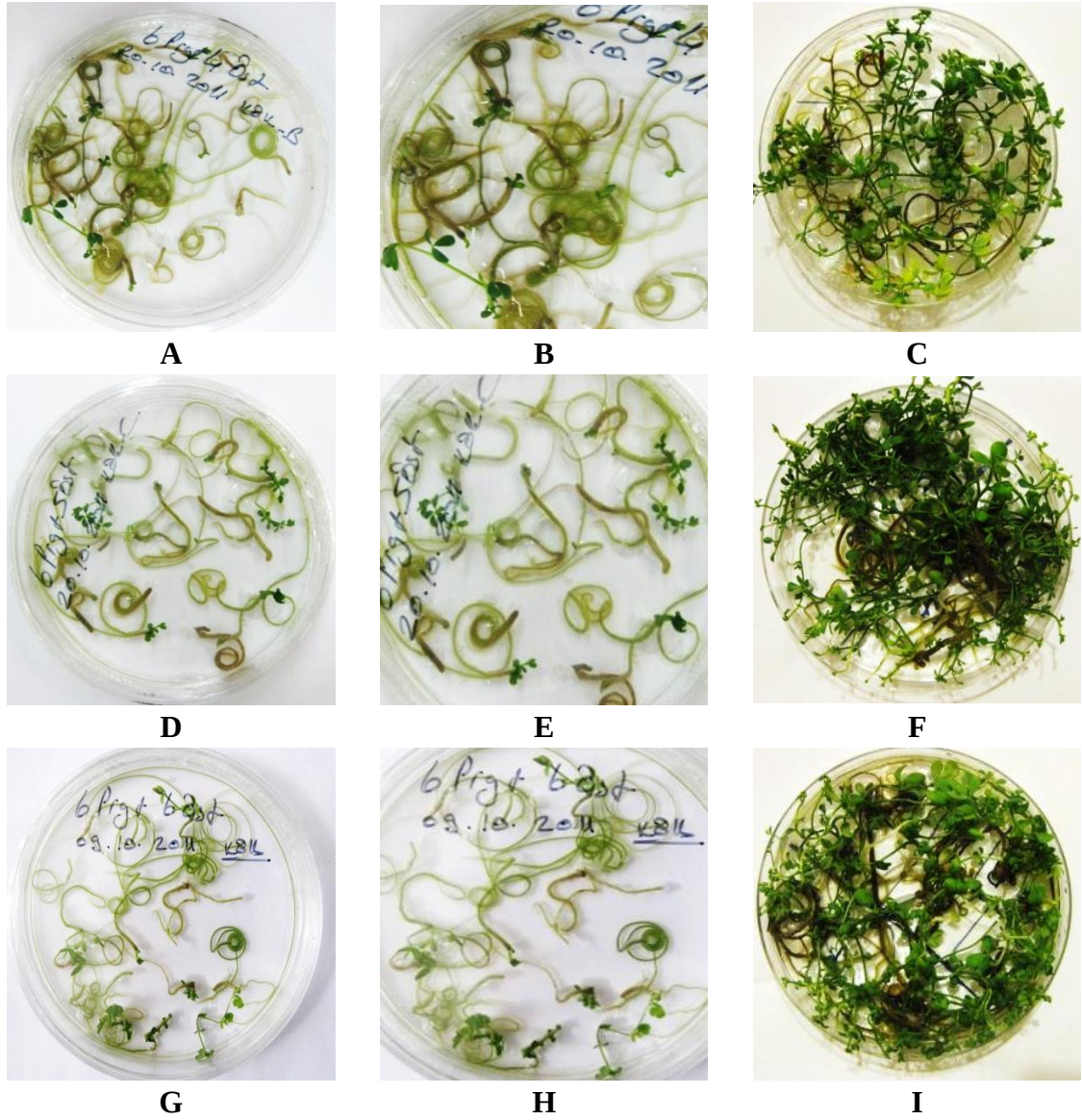
Şekil 4.83. Progesteron+estron (P+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 4P+4E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 4P+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü C) 4P+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 4P+5E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 4P+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü F) 4P+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 4P+6E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 4P+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü I) 4P+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü



Şekil 4.84. Progesteron+estron (P+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 5P+4E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 5P+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü C) 5P+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 5P+5E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 5P+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü F) 5P+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 5P+6E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 5P+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü I) 5P+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü



Şekil 4.85. Progesteron+estron (P+E) içeren kültür ortamına alınan kök eksplantlarının 30. ve 90. günlerdeki görünümü.

*: A) 6P+4E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü. B) 6P+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü C) 6P+4E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü D) 6P+5E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü E) 6P+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü F) 6P+5E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü. G) 6P+6E kombinasyonunu içeren ortamda 30. gündeki görünümü H) 6P+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 30. gündeki görünümü I) 6P+6E kombinasyonunu içeren ortamdaki kök eksplantlarının 90. gündeki görünümü



A



B



C

Şekil 4.86. Tüm rejenere bitkilerin büyütülmesi

*: A) Bİtkilerin saksılara aktarılması ve aklımasyona alınması B) Bitkilerin aklımasyon sonrası görünümü ve serada büyütülmesi C) Bitkilerin toprağa aktarılması ve büyütülmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gazalboynuzu bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisinin araştırıldığı bu çalışmada kotiledon yaprakları ve kök uçları olmak üzere iki farklı eksplant kaynağı kullanılmıştır. Çalışma iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada 4 farklı memeli cinsiyet hormonu (17 β -estradiol, estron, progesteron ve testosteron) ve 4 farklı dozunu (0, 10⁻⁴ mM, 10⁻⁵ mM ve 10⁻⁶ mM) içeren toplam 16 farklı kültür ortamının bazı rejenerasyon parametreleri üzerine, ana etkileri belirlenmiştir. İkinci aşamada memeli cinsiyet hormonlarının ikili kombinasyonlarını (17 β -estradiol+progesteron, 17 β -estradiol+testosteron, 17 β -estradiol+estron, progesteron+testosteron, progesteron+estron, testosteron+estron) içeren 6 farklı hormon karışımı ve 3 farklı dozunun (10⁻⁴ mM, 10⁻⁵ mM ve 10⁻⁶ mM) kombine edildiği ve biri kontrol (0 mM) olmak üzere toplam 55 farklı hormon kombinasyon ortamı denenmiştir.

5.1. Ana Etkiler

Farklı memeli cinsiyet hormonlarını ve dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınan kotiledon yapraklarında, kısa bir süre büyüme gözlendikten sonra ağarmalar başlamış ve 30. güne ulaşmadan bu eksplantların tamamı ağararak büyük bir kısmı ölmüştür. Canlı kalmayı başaran çok az sayıdaki eksplantların rejenerasyonunu sağlamak için 30. günün sonunda 0,5 mg/l BAP içeren standart MS (MS tuz ve vitaminlerine ilave olarak 50mg/l C vitamini) ortamında 30 gün süre ile kültüre alınmışlardır. Ancak bu ortamda da eksplantlar rejenere olamamışlar ve 10-12 gün içerisinde ölmüşlerdir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Ahmadabadi et al. (2007)'un bildirmiş olduğu gibi bir çok dikotiledonlu bitki yaprak materyalinden rejenere edilebilmektedir. Ancak, Gibbs (1991) ve Nikolic et al. (2006), *L. corniculatus*'un yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için kültür ortamında sitokininlerin bulunması gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Yine Gibbs (1991) yapmış olduğu çalışmada, yaprak eksplantlarını hormonsuz B5 besi ortamında kültüre aldıktan

7 gün sonra bir çok eksplantta ağarma gözlemlendiğini ve 28. gün sonunda bu bozulma yoğunluğunun arttığını ve eksplantlarda hücre çoğalmasının olmadığını kaydetmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da kotiledon yaprak eksplantları kültüre alındıktan 5-7 gün sonra pek çok eksplantta sararma gözlemlenmiş ve 30. güne ulaşmadan ölmüşlerdir. Bütün bunlar ve yaptığımız çalışmanın sonucu göz önüne alındığında kotiledon yapraklarının in vitro rejenerasyonunda uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının denenen konsantrasyonlarında tek başına faydalı olmadığı ve diğer bitki gelişimini düzenleyiciler (sitokin ve/veya oksinler) ile desteklenmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada kotiledon yaprak eksplantı ile beraber kök ucu meristemi kullanmamızın nedeni, Bhat *et al.* (2012)'nin belirtmiş olduğu gibi farklı bitki dokularının, farklı içsel hormon seviyelerine sahip olmaları nedeniyle eksplant kaynağının transformasyon üzerinde kritik bir etkiye sahip olması ve kültüre alınan eksplantların dediferensiye (farklılaşmalarından kaynaklanan özelliklerini yitirmeleri) ve rediferensiye (yeniden farklılaşma) yüzdesini belirleyen dış hormon seviyeleri gibi iç hormon seviyelerinde eşit şekilde önemli olmasıdır.

Bir başka nedeni ise, *Lotus corniculatus*'un köklerinden kolaylıkla rejenere edilebildiği pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmasıdır. Öyleki dışarıdan herhangi bir gelişim düzenleyici olmaksızın, uzun yıllar alt kültüre alınarak canlılığı muhafaza edilen kökler başlangıçtaki gibi yüksek oranda gelişmeye devam etmişler ve ikincil uçlardan yeniden klonlanıp ışığa transfer edildiklerinde direkt embriyogenesis ile kolayca bitki rejenerasyonunu gerçekleştiren süper gelişen köklere sahip oldukları vurgulanmıştır. (Akashi *et al.* 1998; Akashiet *et al.* 2003; Tanakaa *et al.* 2008).

Yine, Rybczynski and Badzian (1987)'nin, *Lotus corniculatus*'un meristematik olmayan kök eksplantlarının, hormonsuz MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında kallus oluşumu olmaksızın, kullanılan çeşide bağlı olarak %90-100 oranında rejenere olduğu ve bu rejenerantların da fertil olduğunu ve tohum bağladıklarını gözlemlemişlerdir. Bu

nedenlerle kök eksplantları, *Lotus corniculatus* bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu üzerine, memeli cinsiyet hormonlarının etkisini araştırmak için uygun bir eksplant kaynağıdır.

Yapmış olduğumuz çalışmada kök eksplantlarında, hormonxdoz ve dozxsüre etkileşimi dikkate alınmaksızın genel olarak hormon, doz ve sürenin incelenen parametrelere etkisi şu şekilde özetlenebilir.

Köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KSOE) bakımından, ilk sırayı ortalama %41,25 ile 17 β -estradiol hormonu almış olup bunu sırasıyla %36,88 ile estron, %35,94 ile progesteron ve %26,67 ile testesteron izlemiştir (Çizelge 4.2). Sadece progesteron ve estron hormonları arasındaki farklılığın önemli olmadığı ve aynı grupta yer aldıkları bulunmuştur. 17 β -estradiol ile testesteron arasındaki fark önemlidir (Çizelge 4.2). Bu durum bize kök eksplantlarının memeli cinsiyet hormonları ile etkileşime girdiğini göstermektedir.

Yapılan pek çok araştırmada da bir çok bitkinin memeli cinsiyet hormonları ile etkileşime girdiği belirtilmiştir. Öyleki, Bishop and Koncz (2002), steroidlerin hayvanlarda olduğu gibi, bitkilerde de temel bir hormon olarak rol oynadığını, bitkilerin sayısız steroidleri ve sterollerini sentezlediklerini, Janeczko *et al.* (2011) ve Janeczko (2012) steroid grupların büyük bir kısmının hormonal özelliklere (brassinosteroids, ecdysteroids, progesterone, estrogens) sahip olduklarını, Milanesi and Boland 2004; Janeczko *et al.* 2008; Erdal *et al.* 2012; Erdal 2012 gibi pek çok araştırmacı memeli cinsiyet hormonlarından olan, progesteron, estron, testesteron, androsterone, β -estroidal ve 17 β -estradiolün hem bitkilerde hem de hayvanlarda doğal olarak meydana gelen steroidal bileşikler olduğunu, Speranza (2010) özellikle androsteron ve progesteronun incelenen bitki türlerinin %80'ninden daha fazlasında bulunduğunu, testesteronun %70'inde ve östrojenlerin (estronve 17 β - estradiol) %50 sinde oluştuğu, Speranza (2010) ve Janeczko and Skoczowski (2005) bu hormonların biyosentezi ve çevriminden sorumlu enzimlerin bitkilerde mevcut olduğunu bildirilmişlerdir. Bazı cinsiyet hormonlarının hücre seviyesinde uzama ve bölünmeyi uyardığı, hormonal denge, enzim aktivitesi, protein ve nükleik asit sentezinin aktivasyonu, fotosentetik aktivitenin

artması, proteinlerin amino asit kompozisyonuna ve protein spektrumuna, hücre zarının ve yağ asidi kompozisyonları üzerine etki ederek (Khripach *et al.* 2000), bitkilerin fizyolojik özelliklerini çeşitli şekillerde etkilediği Janeczko and Skoczowski (2005), Janeczko *et al.* (2008), Speranza (2010), Khripach *et al.* (2000), Janeczko *et al.* (2012) ve Erdal (2010) gibi pek çok araştırmacı da memeli cinsiyet hormonları ve bitkiler arasında bir etkileşim olduğunu bildirmektedirler.

Kök eksplantlarına uygulanan memeli cinsiyet hormon dozlarından 10^{-4} mM’lık dozda %KSOE bakımından en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla hormon tipleri estron, progesteron ve 17β -estradiol şeklinde sıralanmışlar, ancak aralarındaki fark önemli olmamıştır. 10^{-5} mM dozunda 17β -estradiol , 10^{-6} mM konsantrasyonda ise diğer hormonlarla arasındaki fark önemli olmamasına rağmen 17β -estradiol öne çıkmıştır (Şekil 4.9).

Gazalboynuzu kök eksplantlarına, *in vitro* şartlarda uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının tipine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak KSOE (%) farklı tepkiler göstermiş olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, birçok araştırmacının da farklı bitki türleri üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında, uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının tipi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı tepkiler gösterebileceklerini belirtmişlerdir. Aynı şekilde, Shore *et al.* (1992), Janeczko *et al.* (2002), Janeczko and Filek (2002), Hakk *et al.* (2005), Lino *et al.* (2007), Pekşen (2011), Hacıbektaşoğlu (2011), Erdal and Dumlupinar (2011a), Erdal and Dumlupinar (2011b), Dumlupinar *et al.* (2011), Shemesh and Shore (2012), Erdal (2012a), Erdal (2012b), gibi pek çok araştırmacının çalışmaları incelendiğinde, bitkinin türüne, uygulanan memeli cinsiyet hormonunun tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak bitkilerin farklı tepkiler gösterebildikleri görülmektedir.

Kök eksplantları ile yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz diğer bir sonuç ise, Şekil 4.8’de görüldüğü üzere tüm memeli cinsiyet hormonlarında 10^{-4} mM dozu en düşük köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesini verirken doz azaldıkça bu değer artmış ve 0 (kontrol) dozunda maksimum değerine ulaşmıştır.

Tüm memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre konsantrasyon ortalamaları incelendiğinde 10^{-4} mM dozu tüm aylarda en düşük, 0 dozu en yüksek %KSOE'sini vermiştir (Şekil 4.12). Ayrıca Şekil 4.12'den de görüldüğü üzere üçüncü ayın sonunda 2. ve 3. aylarda hormon kullanılmamasına rağmen hiçbir doz kontrole (%77,50) ulaşamamıştır. Yine 10^{-4} mM dozu en düşük (%21,56) gruba girerken 0 dozu (%77,50) en yüksek gruba girmiş olup 10^{-5} mM (%41,25) ve 10^{-6} mM (%50,67) konsantrasyonunda gözlemlenen değerler diğer iki dozun arasında olup aynı gruba düşmüşlerdir. Üç ayın ortalaması dikkate alındığında ise her bir hormon grubu arasındaki fark önemli olup her biri farklı bir gruba düşmüştür (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7).

Zamanın ilerlemesine bağlı olarak tüm dozların oluşturduğu köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi artmıştır. Bu durumun muhtemel nedenleri arasında, 2. ve 3. aylarda kullanılan besin ortamlarının hormon içermemesi nedeniyle memeli cinsiyet hormonlarının etkisinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Memeli cinsiyet hormonlarının, %KSOE'ine, inhibe edici etkilerinin zamanla azaldığı görülmektedir. 10^{-4} mM dozunun inhibe edici etkisinin daha uzun zaman sürdüğü Şekil 4.12'de görülmektedir. Buda bize gazalboynuzu kök eksplantlarının dışarıdan ilave edilen memeli cinsiyet hormonları ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu durum, daha sonraki yapılabilecek çalışmalarda bu hormonların bitki bünyesindeki etkinlik sürelerinin, bitki dokusuna bağlanma bölgelerinin ve bağlanma derecelerinin de çalışılması gereken bir konu olduğuna da işaret etmektedir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12).

Shore *et al.* (1992), yoncanın vejetatif gelişimi üzerine estron ve 17β -estradiolün etkisini araştırdıkları çalışmalarında, vejetatif gelişimi artırıcı konsantrasyonlarda (0,005 μ g/l-0,5 μ g/l) bitki içeriğindeki östrojen miktarının artmadığını, vejetatif gelişimi ve nodül ağırlığını inhibe edici östrojen konsantrasyonlarında (50 μ g/l-500 μ g/l) ise bitkideki dahili östrojen miktarının arttığını bulmuşlardır.

Memelilerde ve bitki bünyesinde meydana gelen bu hormonların, bitki ve memeli bünyesinde bulunan çeşitli mekanizmalar aracılığı ile birbirlerinin fizyolojik

özelliklerini karşılıklı olarak etkileyebildiği birçok araştırmacı tarafından da vurgulanmıştır.

Nitekim bazı araştırmacılar, memeli cinsiyet hormonlarının bağlanabileceği reseptörlerin bitkilerde de mevcut olduğunu göstermişlerdir. Örneğin, Milanesi and Boland (2004), [^3H]17 β -estradiol bağlanma deneyleri ile *Lycopersicon esculentum* ve *Solanum glaucophyllum*'un organlarının östrojen bağlanma bölgelerini içerdiğini göstermişlerdir. Ayrıca *S. glaucophyllum*'un kallus dokularında da doyurulabilir [^3H]17 β -estradiol bağlanma bölgelerini ve *S. glaucophyllum* ve *L. Esculentum*'un lipid ekstraktlarında östrojen benzeri bileşikler tespit etmişlerdir. Dahası lipit fraksiyonları, her iki bitki türünde de bulunan östrojen bağlanma bölgeleri hemde MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinden gelen östrojen reseptörlerine bağlanmak için [^3H]17 β -estradiol ile yarışabildiğini göstermişlerdir.

Memeli cinsiyet hormonlarının bitki bünyesindeki bağlanma noktalarını araştıran Janeczko *et al.* (2008)'da *Triticum aestivum* L. hücrelerinde progesteron ve 17 β -estradiol için spesifik bağlanma bölgelerinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlanmanın membranda ve sitozollarda meydana geldiğini vurgulayan araştırmacılar 17 β estradiol'ün membranlardaki özel bağlarının sitozollerden daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Otaran (2012) yapmış olduğu çalışmada, buğdayda olgun embriyolar kullanarak, doku kültürüne genotipin (Kırık, Nenehatun, Palandöken 97), memeli cinsiyet hormon tipinin (progesteron, testosteron, östrojen ve 17 β -Estradiol) ve hormon dozlarının (10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} mM) etkisini incelemiştir. Bu faktörlerin kallus oluşum oranı (KOO), ESEKO (Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu) oranı ve KSEKO (Meydana gelen kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu) oranı üzerine olan etkilerini belirlemiştir. Genotipin, hormon tipinin kallus, embriyogenik kallus, somatik embriyo ve rejenere olan bitki oluşumuna etkisini çok önemli bulmuştur. Hormon dozlarının kallus oluşumuna etkisi önemsiz, embriyogenik kallus, somatik embriyo ve rejenere olan bitki sayısına etkisini çok önemli bulmuştur. En yüksek kallus oluşumunun (%86,0) testosteron uygulamasında en yüksek KSEKO (%23,8) ve en yüksek ESEKO

(%19,4) β -Estradiol uygulamasında meydana geldiğini ve en yüksek rejenere bitki oluşumunun (%2,6) progesteron uygulamasında meydana gelmiş olduğunu belirtmiştir.

Aynı şekilde bizim yapmış olduğumuz çalışmada da *Lotus corniculatus* L.'un kullanılan eksplant tipine, memeli cinsiyet hormonlarının tipine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak incelenen parametrelere farklı tepkiler vermiş olduğu tespit edilmiştir. Bu da *Lotus corniculatus*'un memeli cinsiyet hormonları ile etkileşime girebildiğini göstermiştir.

Yine çalışmamızda köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%KZSOE) bakımından, ilk sırayı ortalama %8,54 ile estron alırken, bunu %5,56 ile testosteron, %4,9 ile progesteron %3,13 ile 17β -estradiol izlemiştir. Uygulanan hormonlardan sadece testosteron ve progesteron arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

Uygulanan dozların üç aylık ortalamasına bakıldığında ilk sırayı 10^{-6} mM dozu (%9) almış olup bunu sırasıyla ile 10^{-5} mM dozu (%7,08), 10^{-4} mM dozu (%5) ve kontrol grubu (%1,25) izlemiştir.

KZSOE'ı bakımından 17β -estradiol'ün 10^{-4} mM dozu hariç tüm memeli cinsiyet hormonlarında kontrol grubu en düşük değeri almıştır. Progesteron hormonu hariç tüm memeli cinsiyet hormonlarında 10^{-6} mM dozundan 10^{-4} mM dozuna doğru gidildikçe köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi azalmıştır. Progesteron hormonunda ise durum tersi olmuştur (Çizelge 4.6). 17β -estradiol kök oluşumunu teşvik ettiği için 10^{-4} mM dozu minimum değeri almıştır.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi kültüre alınma süresi ilerledikçe %KZSOE artmıştır. Bunun nedeni ilk ay sürgün oluşturmeyen eksplantların ilerleyen aylarda kök oluşumu olmaksızın sürgün oluşturmalarından veya birincil köklerinin ölmelerinden ve henüz ikincil köklerinin gelişmediğinden kaynaklanabilir.

Toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%TSOEO) bakımından dişi cinsiyet hormonlarından estron ilk sırayı (%45,42) almış olup bunu sırasıyla 17 β -estradiol (%44,38) ve progesteron (%40,83) izlemiş aralarındaki farklılık önemli olmamıştır. Erkek memeli cinsiyet hormonu olan testesteron minimum değeri (%32,22) almış ve diğer hormonlarla aralarındaki farklılık önemli olmuştur. Özetle dişi cinsiyet hormonları %TSOEO'ni artırmış testesteron ise inhibe etmiştir. Ayrıca uygulanan hormon dozlarının konsantrasyonları azaldıkça TSOEO'ı artmış kontrol dozunda maksimum değerini almıştır.

Zamanın ilerlemesine bağlı olarak tüm dozların oluşturduğu sürgün oluşturan eksplant yüzdesi artmıştır. Bunun muhtemel nedenleri arasında bazı eksplantların daha yavaş gelişmesi ve 2. ve 3. aylarda kullanılan besin ortamlarının hormon içermemesi nedeniyle memeli cinsiyet hormonlarının inhibe edici etkisinin zamanla azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

İnhibe edici etkinin zamana bağlı olarak azalmasının, başlangıçtaki hormon konsantrasyonları ile yakından ilgili olduğu Şekil 4.25'de açıkça görülmektedir. Başlangıçta uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının konsantrasyonu artıkça inhibe edici etkilerin daha uzun zaman sürdüğü görülmektedir. Örneğin 10⁻⁴ mM dozunun inhibe edici etkisinin daha uzun zaman sürdüğü doz azaldıkça bu etkinin daha çabuk ortadan kalktığı Şekil 4.25'de görülmektedir. Bu durum daha sonraki yapılabilecek çalışmalarda bu hormonların bitki bünyesindeki etkinlik sürelerinin de çalışılması gereken bir konu olduğunda işaret etmektedir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.25).

Sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE) üzerine hormonların etkisini inceleyecek olursak, 17 β -estradiol diğer hormon gruplarından farklılık göstermiştir. Üç ayın ortalamasına bakıldığında sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ilk sırayı ortalama %21,98 ile 17 β -estradiol alırken, bunu %17,60 ile estron, %16,46 ile progesteron, %10,78 ile testesteron izlemiştir. Aynı sıralama köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde de görülmüştür. Bu durum her iki parametre içinde testesteronun kök oluşumunu inhibe edici etkisinin dişi cinsiyet hormonlarından daha yüksek

olduğunu göstermektedir. Bu özellik bakımından estron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmamış aynı grupta yer almış, ancak diğer hormonlarla aralarındaki farklılıklar önemli olmuştur. 17 β -estradiol ile testosteron arasındaki farklılık da önemli bulunmuştur (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.26).

Şekil 4.27'den görüldüğü üzere testesteronun 10⁻⁴ mM dozu tüm memeli cinsiyet hormonları içerisinde en düşük, sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi (%SKOE)'ni verirken konsatrasyon azaldıkça bu değer artmıştır. Bunun nedeni olarak testesteron hormonunun 10⁻⁴ mM dozunda kültüre alınan eksplantların çok büyük bir kısmının ölmesinden kaynaklanmaktadır. Testesteron hormonunun konsantrasyonu azaldıkça, %KSOE, %TSOEO ve %SKOE parametreleri üzerindeki inhibe edici etkisinin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.10, Şekil 4.23, Şekil 4.29.) %KZSOE bakımından da yine doz azaldıkça inhibe edici etkinin azaldığı görülmektedir. Ancak Şekil 4.17'de görüldüğü üzere kontrol dozunun %KZSOE parametresi bakımından minimum değeri almasının nedeni kontrol gurubunun kök oluşumuna inhibe edici etkisinin olmaması aksine kök gelişimini teşvik etmesinden kaynaklanmaktadır.

Nitekim baklagil yem bitkisi olan *Lotus corniculatus* baklagillerdeki transformasyon çalışmaları için model bitki olarak kullanılmaktadır (Akashi *et al.* 1998). Ayrıca *Lotus corniculatus*'un köklerinden kolaylıkla rejenere edilebildiği pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Öyleki dışarıdan herhangi bir gelişim düzenleyici olmaksızın, uzun yıllar alt kültüre alınarak canlılığı muhafaza edilen kökler başlangıçtaki gibi yüksek oranda gelişmeye devam etmişler ve ikincil uçlardan yeniden klonlanıp ışığa transfer edildiklerinde direkt embriyogenesis ile kolayca bitki rejenerasyonunu gerçekleştiren süper gelişen köklere sahip oldukları vurgulanmıştır (Akashi *et al.* 1998b; Akashi *et al.* 2003; Tanakaa *et al.* 2008).

17 β -estradiol hormonunun 10⁻⁴ mM dozu kendi içinde diğer konsantrasyonlarına göre en düşük %KSOE, %KZSOE, %TSOEO, EBKZSS, EBSS ve EBKSS'nı vermiştir. (Çizelge 4.2, Çizelge 4.6, Çizelge 4.10, Çizelge 4.20, Çizelge 4.22, Çizelge 4.24). Kullanılan 17 β -estradiol hormonunun dozu azaldıkça yukarıda bahsedilen

parametrelerde artış görülmüştür. Janeczko *et al.* (2003), Hakk *et al.* (2005), Lino *et al.* (2007), Guan and Roddick (1988), Shore *et al.* (1992) tarafından, memeli cinsiyet hormonları ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bitkinin cinsine ve kullanılan hormon türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekle birlikte yüksek dozlarda kullanılmaları halinde bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediği görülmektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da benzer bir durum görülmüştür.

Ancak 17β -estradiol hormonunun 10^{-4} mM dozu, aynı dozdaki diğer hormonlara göre %SKOE bakımından maksimum değeri almış olup kök gelişimini önemli oranda teşvik ettiği görülmektedir (Çizelge 4.14). 17β -estradiol hormonunun bütün dozlarının %SKOE bakımından birbirleri arasındaki fark önemli olmamıştır. 17β -estradiol hormonu kök gelişimini diğer hormonlara göre daha fazla teşvik ettiği Çizelge 4.2, Çizelge 4.5, Çizelge 4.14 ve Şekil 4.27’de açıkça görülmektedir.

Janeczko *et al.* (2003) ve Janeczko and Skoczowski (2005)’de bitkilerin memeli cinsiyet hormonları ve bunların ön maddeleri ile muamelesinin, kullanılan konsantrasyonları ve bitki türüne bağlı olarak hücre bölünmesi, kök ve sürgünlerin gelişmesi, kallusların üremesi, çiçeklenme, embryo ve polen tüp gelişimini etkilediği bildirilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da tüm dişi memeli cinsiyet hormonlarının, testesterona göre sürgün oluşumunu ve kök oluşumunu teşvik etmiş olduğunu, testesteron’nun ise inhibe etmiş olduğunu belirlemiş bulunmaktayız.

Estronda doz azaldıkça köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, köksüz sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve toplam sürgün oluşturan eksplant yüzdesi artmıştır (Çizelge 4.2, Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.10). Genel olarak estron hormonu diğer iki dişi cinsiyet hormonu (progesteron ve 17β -estradiol) gibi sürgün oluşturan eksplant yüzdesini teşvik etmiş olmakla birlikte bunlardan farkı köksüz sürgün oluşumunu diğer dişi cinsiyet hormonlarından daha fazla teşvik etmiş olmasıdır.

Tüm memeli cinsiyet hormonlarının aylara göre konsantrasyon ortalamalarından da görüldüğü gibi (Şekil 4.31, Çizelge 4.15) kullanılan 10^{-4} mM dozu en düşük, 0 dozu en yüksek %SKOE'sini vermiştir.

Üçüncü ayın sonuna gelindiğinde en düşükten yükseğe doğru sırasıyla 10^{-6} mM dozu (%6), kontrol grubu (%8,75), 10^{-5} mM dozu (%9,06) ve 10^{-4} mM dozu (%9,38) olmuştur. Şekil 4.31'den de görüldüğü üzere zamanın ilerlemesine ve aynı zamanda da 2. ve 3. aylarda kültür ortamında hormon kullanılmamasına bağlı olarak sürgün gelişimi teşvik edildiği (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.3, Şekil 4.25 ve Çizelge 4.11) için sadece kök oluşturan eksplant yüzdesi zamana bağlı olarak azalmıştır. Yine şekillerden (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.3, Şekil 4.25 ve Çizelge 4.11, Şekil 4.31) de görüldüğü üzere 10^{-4} mM dozu kültüre alınan eksplantlarda hem kök gelişimini hemde sürgün oluşumunu daha fazla inhibe ettiği sonucunu çıkarabiliriz.

Eksplant başına köksüz sürgün sayısına (EBKZSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmıştır. EBKZSS bakımından ilk sırayı estron (0,934 adet) almış olup bunu sırasıyla ile progesteron (0,794), testesteron (0,553) ve 17β -estradiol (0,342) izlemiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.32).

Dozların ortalamasına bakıldığında ilk sırayı 10^{-6} mM dozu (0,947 adet) almış olup bunu sırasıyla kontrol grubu (0,775 adet), 10^{-5} mM (0,588 adet) ve 10^{-4} mM (0,531 adet) konsantrasyonu izlemiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.33).

Eksplant başına köklü sürgün sayısına (EBKSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmıştır. Hormon ortalamalarına bakıldığında EBKSS bakımından ilk sırayı 0,63 ile 17β -estradiol , 0,58 ile estron, 0,57 ile progesteron ve 0,4 ile testesteron izlemiştir. 17β -estradiol , estron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmamış dişi cinsiyet hormonları ön plana çıkmıştır (Çizelge 4.24 ve Şekil 4.38).

Eksplant başına köklü sürgün sayısı bakımından dozlar arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,01$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.23). 10^{-4} mM dozu en düşük EBKSS vermiş olup doz azaldıkça bu değer artmış sıfır dozunda maksimum değerine ulaşmıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı (EBSS) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmıştır. Hormon ortalamalarına bakıldığında EBSS bakımından ilk sırayı estron (1,519 adet) almış olup bunu sırasıyla progesteron (1,366 adet), 17β -estradiol (1,16 adet) ve testosteron (0,957 adet) izlemiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.35). Dozların ortalamasına bakıldığında ilk sırayı 1,625 ile kontrol grubu almış olup bunu sırasıyla 1,513 ile 10^{-6} mM dozu, 1,075 ile 10^{-5} mM ve 0,822 ile 10^{-4} mM konsantrasyonu izlemiştir.

Rejenerasyon etkinliğine (RE) ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmıştır. Köklü sürgün sayısının toplam sürgün oluşturan eksplant sayısına (TSOES (adet)) bölünmesi ile elde edilen RE’de, hormon, doz ve hormonxdoz etkileşimleri önemsiz bulunmuştur. Bunun nedeni dişi cinsiyet hormon uygulamalarında hem fazla sayıda köklü sürgün oluşumu hemde fazla sayıda sürgün oluşturan eksplant mevcuttur. Testosteron uygulamasında ise az sayıda köklü sürgün oluşumuna karşılık az sayıda sürgün oluşturan eksplant mevcuttur. O nedenle bu sonuç iki değer bir birine oranlanmasından kaynaklanmıştır. Hem köklü hemde köksüz sürgün oluşumunu dişi cinsiyet hormonları erkek cinsiyet hormonundan daha fazla artırmıştır.

Kitts *et al.* (1959) ve Cook (1960) gazalboynuzunun östrojenik aktiviteye sahip olduğunu söylemişlerdir. Progesteron ve testosteron’un da bir çok bitki türünde mevcut olduğu bildirilmiştir (Janeczko and Skoczowski 2005). Yine bazı bitkilerde (buğday) progesteron reseptörlerinin varlığı bildirilmiştir (Janeczko and Filek 2002; Janeczko *et al.* 2008). Ayrıca bizim çalışmamızda progesteron ve östrojen hormon kombinasyonları, her iki hormonun tek başlarına uygulanmasından daha iyi sonuç vermiştir. Bu nedenlerle çalışmış olduğumuz bitkiye memeli cinsiyet hormonlarının özellikle östrojenlerin (17β -estradiol ve estron) etkisi kaçınılmazdır.

Kök eksplantlarında, hormonxdoz ve dozxsüre etkileşimi dikkate alınmaksızın genel olarak hormonlar şu parametrelerde öne çıkmıştır;

17 β -estradiol hormonu; %KSOE, %SKOE, %TSOEO ve EBKSS parametreleri bakımından öne çıkmıştır.

Estron; %KZSOE, %TSOEO, EBKZSS, EBSS, EBKSS parametreleri bakımından öne çıkmıştır.

Progesteron; EBKZSS ve EBSS ait gözlemler sadece üçüncü ayda alınmış olup ilk sırayı estron almış bunu progesteron izlemiştir. Estron hormonu ile aralarındaki fark önemsiz olmuştur. EBKSS, %TSOEO parametreleri bakımından öne çıkmıştır.

Testosteron; genel olarak incelenen parametreler arasında testosteron uygulamaları minimum değeri almıştır. Nitekim %KSOE, %TSOEO, %SKOE, EBSS, EBKSS parametrelerinde testosteron uygulamaları minimum değeri alırken, %KZSOE bakımından testosteron ikinci sırada olmuştur.

Testosteron hormon uygulamasının %KZSOE bakımından estron hormonunun gerisinde olmasına rağmen aralarındaki fark önemli olmamıştır. Bunun nedeni estron hormonunun hem çok sayıda köklü sürgün oluşumunu hemde çok sayıda eksplantın köklü sürgün oluşturmasını teşvik etmiş olmasından ve köksüz sürgün oluşturan eksplant sayısının oldukça düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Görüldüğü üzere hormon uygulamaları karşılaştırıldığında testosteron uygulaması tüm parametrelerde en düşük değeri almış ve incelenen parametreleri inhibe ettiği gözlenmiştir.

Görüldüğü üzere incelenen EBKZSS, EBKSS, EBSS, %TSOEO parametreleri bakımından estron ve progesteron arasındaki farklılık önemli olmamış ve aynı gruba düşmüşlerdir. Ancak %KZSOE'i bakımından estron hormonu ön plana çıkmıştır. İncelenen hormonlar (17- β Estradiol, progesteron, testosteron, östrojen) arasında bu parametreler açısından en iyi sonucu sırasıyla estron ve progesteron vermiştir.

TSOEO bakımından progesteron ve estron hormonlarının en iyi konsantrasyonunun kontrol (0 mM) dozu olduğu ve diğer konsantrasyonlarla (10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur.

EBKZSS, EBSS bakımından progesteron ve estron hormonlarının konsantrasyonları arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

EBKSS bakımından kontrol en iyi sonucu vermiş olup bunu sırasıyla 10^{-6} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-4} mM dozu izlemiştir.

Progesteronun EBKSS'na etkili en iyi dozu kontrol olup diğer dozlarla arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. 10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM dozları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur.

Özetleyecek olursak; Her üç dişi cinsiyet hormonu (17β -estradiol, estron ve progesteron), %TSOEO, EBKSS (adet) parametreleri bakımından öne çıkmış olup aralarındaki farklılıklar önemli olmamıştır.

Genel olarak kültüre alınma sürelerinin incelenen parametreler üzerindeki etkisini incelediğimizde %SKOE'i zamanın ilerlemesine bağlı olarak azalmıştır. İncelenen diğer tüm parametrelerde zaman ilerledikçe hormon uygulamalarının etkisi azaldığı için memeli cinsiyet hormon uygulamalarının eksplantların rejenerasyonu ve gelişimini inhibe edici etkileri azalmış ve tüm parametrelerde zamanın ilerlemesine bağlı olarak artış görülmüştür. Kültürün 2. ve 3. aylarında eksplantlar, hormonsuz besi ortamına alınmasına rağmen uygulanan yüksek dozların inhibe edici etkisi daha uzun zaman sürmüştür.

Shore *et al.* (1992)'nın yoncanın vejetatif gelişimi üzerine estrone ve 17β -estradiolün etkisini araştırdıkları çalışmalarında, vejetatif gelişimi artırıcı konsantrasyonlarda (0,005 μ g/l -0,5 μ g/l) bitki içeriğindeki östrojen miktarının artmadığını, vejetatif gelişimi ve nodül ağırlığını inhibe edici östrojen konsantrasyonlarında (50 μ g/l-500 μ g/l) ise

bitkideki dahili östrojen miktarını artırdığını bulmuşlardır. Bu bulgudan yola çıkarak yapmış olduğumuz çalışmada gelişimi teşvik edici dozlarda uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının bitki bünyesinde birikmediği, gelişimi inhibe edecek kadar yüksek dozlarda uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının ise bitki bünyesinde birikmiş olabileceğini söyleyebiliriz. Bu durumun kültürün 2. ve 3. aylarında hormonsuz besi ortamına alınan eksplantlar üzerinde, yüksek dozlarda uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının inhibe edici etkisinin daha uzun zaman sürmesini açıklayabilir.

Kontrol (0 Mm) dozu, KSOE, TSOEO, SKOE, EBKZSS, EBKSS, EBSS parametrelerinde öne çıkmıştır.

KZSOE bakımından ise minimum değeri almış olup diğer konsantrasyonlarla arasındaki fark önemli olmuştur. Bunun nedeninin gazalboynuzu bitkisinin kök eksplantlarından hormon olmaksızın kolaylıkla üretilebilmesinden kaynaklanabilir. Nitekim, Rybczynski and Badzian (1987), *Lotus corniculatus*'un meristematik olmayan kök eksplantlarının rejenerasyon kapasitesini hormonsuz Murashige and Skoog (MS) ortamında araştırmışlardır. Sonuç olarak kallus oluşumu olmaksızın bu eksplantların kullanılan *Lotus corniculatus* çeşidine bağlı olarak %90-100 oranında rejenere olduğunu ve bu rejenerantların fertil olduğunu ve tohum bağladıklarını gözlemlemişlerdir. Yine *Lotus corniculatus*'un köklerinden kolaylıkla rejenere edilebildiği, Akashi *et al.* (1998b), Akashi *et al.* (2003), Tanakaa *et al.* (2008) tarafından da vurgulanmıştır.

10^{-4} Mm dozuna gelince, incelenen hiçbir parametrede öne çıkamamıştır. Bu dozun minimum değeri aldığı gözlemler ise şunlardır: %KSOE, %TSOEO, EBKSS olup 10^{-4} Mm dozu sadece %SKOE parametresi bakımından 10^{-6} mM ile aynı gruba düşmüş ancak minimum değeri almıştır. EBKZSS 10^{-5} mM dozu ile aynı gruba düşmüş ancak minimum değeri almıştır. EBSS 10^{-5} mM dozu ile aynı gruba düşmüş ancak minimum değeri almıştır.

10^{-5} mM dozu, %KZSOE, %SKOE parametrelerinde öne çıkmıştır. SKOE'ı kontrolle aynı grupta olmasının nedeni 17β -estraidolün diğer hormonlara göre ortalamayı yükseltmesi ve 17β estraidolün kök oluşumunu teşvik etmesinden kaynaklanmaktadır.

10^{-6} mM dozu ise %KZSOE,EBKZSS, EBSS bakımından öne çıkmıştır.

Sonuç olarak; %KZSOE hariç incelenen tüm parametrelerde uygulanan tüm hormon ve konsantrasyonlarında genel olarak kontrol (0 mM) dozu en iyi sonuçları vermiş olup bunu sırasıyla 10^{-6} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-4} mM dozu takip etmiştir.

KSOE bakımından en iyi sonucu kontrol (%64,17) vermiştir. İncelenen hormon ve dozları dikkate alındığında ise en iyi sonucu 17β -estraidolün 10^{-5} mM dozu (%49,58) vermiştir. Kültüre alınma süresi ve dozlar dikkate alındığında en iyi sonucu kontrolün (%77,5) 3. ayı vermiştir. Daha sonra sırasıyla 10^{-6} mM dozu (%50,67) ve 10^{-5} mM dozunun (%41,25) 3. ayı vermiştir.

KZSOE bakımından incelenen hormon ve dozlar dikkate alındığında en iyi sonucu aynı gruba düşmelerine rağmen testosteronun 10^{-6} mM dozu (%13,33) vermiş olup bunu sırasıyla estron'un 10^{-6} mM dozu (%12,50) ve 17β -estraidolün 10^{-6} mM dozu (%5,83) izlemiştir.

TSOE (%) bakımından en iyi sonucu kontrol (%65,42) vermiştir. Hormon ve dozlar dikkate alındığında en iyi sonucu 17β -estraidol'ün 10^{-5} mM dozu (%54,58) vermiştir. Kültüre alınma süresi ve hormon dozları dikkate alındığında kontrolün 3. ayı en iyi sonucu vermiştir. Daha sonra 10^{-6} mM dozunun 3. ayı vermiştir (%43,67).

SKOE bakımından hormon ve dozlar beraber düşünüldüğünde en iyi sonucu 17β -estraidol'ün 10^{-4} mM dozu (%26,25) öne çıkmıştır. Dozlar ve süre bakımından incelendiğinde ise kontrolün 1. ayı en yüksek (%36,25) değeri vermiş olup bunu

sırasıyla 10^{-6} mM dozunun 1. ayı (%31,33) ve 10^{-5} mM dozunun 1. ayı (%30,31) izlemiştir.

RE bakımından uygulamalar arasındaki fark önemli olmamıştır.

EBKZSS bakımından en iyi hormon grubunun estron (0,934) olduğu ve bunu progesteronun (0,794) takip ettiği bulunmuştur. Dozlar içerisinde en iyileri sırasıyla 10^{-6} mM (0,947) ve kontrol (0,775) olduğu bulunmuştur.

EBSS bakımından en iyi hormon grubunun estron (1,519) olduğu bulunmuştur. Bunu sırasıyla progesteron (1,366) ve 17 β -estraidol (1,16) izlemiştir. EBSS bakımından en düşük değeri testesteron (0,957) vermiştir. En iyi doz olarak sonucu kontrol (1,625) ve 10^{-6} mM (1,513) dozu olduğu bulunmuştur.

EBKSS bakımından en iyi sonucu kontrol (0,85) vermiştir. Hormon ve dozlar beraber düşünüldüğünde en iyi sonucu 17 β -estraidolün 10^{-5} mM dozu (0,76) vermiştir.

5.2. Kombinasyonlar

İkinci aşamada memeli cinsiyet hormonlarının farklı kombinasyonları (17 β -Estradiol+progesteron, 17 β -estradiol+testosteron, 17 β -estradiol+estron, progesteron+testosteron, progesteron+estron, testosteron+estron) içeren 6 farklı hormon kombinasyonu ve 3 farklı doz (10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) ve biri kontrol olmak üzere toplam 55 farklı hormon kombinasyon ortamı denenmiştir.

Kotiledon yaprak eksplantları için Leo çeşidine ait gazalboynuzu tohumları sterilize edildikten sonra MS ortamında çimlendirilmiştir. Daha sonra kotiledon yaprakları uç kısımlarından ve yaprak sapına yakın kısımlardan kesilerek arada kalan kısım (Şekil 3.1) farklı memeli cinsiyet hormon doz ve konsantrasyonlarında kültüre alınmıştır. 30 gün kültüre alınan bu eksplantlar bir miktar büyüdüktan sonra hemen hemen tamamına

yakın kısmı ölmüştür. Çok az sayıda canlı kalmayı başaran eksplantların rejenerasyonunu sağlamak için 30. günün sonunda 0,5 mg/l BAP içeren standart MS (MS tuz ve vitaminlerine ilave olarak 50mg/l vitamin C içeren ortam) ortamında 30 gün süre ile kültüre alınmışlardır. Ancak bu ortamda da bir çok eksplant rejenere olamadan ölmüşlerdir. Çok az sayıda eksplant canlı kalmayı başarmış bunlardan bazıları da rejenere olabilmışlerdir. Canlı kalabilen bu eksplantlar 3. kez kültüre alınmışlardır. Ancak 3. ortamda herhangi bir hormon kullanılmamış olup sadece standart MS ortamı kullanılmıştır. Denemeye alınan tüm eksplantların tamamına yakın bir kısmı 30 gün içerisinde öldüğü için her hangi bir istatistik uygulanmamış olup sadece canlı kalıp rejenere olabilen eksplantların ortalama değerleri verilmiştir. 6B5T, 4T6P, 5T5P, 5T6P ve 6T6P hormon kombinasyonlarında kültüre alınan kotiledon yapraklarından bazıları da sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. EBSS sırasıyla 0,1, 0,1, 0,2, 0,1 ve 0,05 adet olup EBKSS ise sırasıyla 0, 0, 0,2, 0 ve 0 olmuştur. TSOEO sırasıyla %10, %10, %5, %10 ve %5 olup geri kalan eksplantlar ölmüştür.

Memeli cinsiyet hormonları farklı kombinasyonlarının dozları dikkate alınmaksızın kök meristemlerinin hormon kombinasyonlarına tepkileri incelendiğinde rejenerasyon kapasitesi üzerine önemli etkisi olan KSOE, EBSS, EBKSS ve TSOEO bakımından genel olarak en iyi karışımın progesteron+estron (PE) kombinasyonu olduğu ve kontrolü geçtiği bulunmuştur.

Estron ve 17β -estradiolün her ikisinde östrojen grubuna dahil olan hormonlardır. Buna rağmen genel olarak bakıldığında, 17β -estradiol+progesteron kombinasyonu, Estron+progesteron kombinasyonunun gerisinde kalmıştır. Kök eksplantlarına uygulanan hormon kombinasyonlarının bitkilerdeki etki mekanizmalarıyla ilgili bilgiye ulaşılammıştır. Ancak bu hormonların insanlar üzerindeki etki mekanizmalarına bakılacak olursa, Uğur ve Işık (2002) "bir hormonun bir hücreye tesir edebilmesi için, hücre zarında ya da sitoplazmasında, o hormon için son derece spesifik bir reseptör protein'inin mevcut bulunması gereklidir. Bu özel reseptöre bağlanan hormon, daha sonra hücre içi fonksiyonları yönetmeye başlar. Dokuların hormonlara verdiği cevap,

reseptör sayısına bağlı olarak değişir. Reseptör yapımının uyarılması ve frenlenmesi de rastgele olmamaktadır. Örneğin östradiol'ün kendi reseptörlerini ve progesteron reseptörlerini artırdığı; östradiol ile progesteron beraberce verilirse progesteronun östradiol reseptörlerini bloke ettiği saptanmıştır. Hormon aktivitesinin, serbest hormon miktarına, reseptör sayısına, hormon/reseptör kompleksinin çözülme oranına ve nihayet kromatinle yaptığı bağlantı süresine göre değiştiğini'' bildirmişlerdir. Üzerinde çalıştığımız bu hormonların insan vücudundaki etki mekanizmaları bu şekilde özetlendiğinde, neden estron+progesteron kombinasyonun, genel olarak 17 β -estradiol+progesteron karışımından daha iyi olduğu anlaşılabilir.

Farklı dozlardaki progesteron+estron (PE) hormon kombinasyonun, gazalboynuzu kök eksplantları üzerine etkileri aşağıda özetlenmiştir.

Progesteron ve estron ikili kombinasyonlarının köklü sürgün oluşturan eksplant yüzdesi Şekil 4.67'de görüldüğü gibi kültüre alınma süresi ilerledikçe artmıştır. Bunun nedeni ilk ay köklü sürgün oluşturmeyen eksplantların ilerleyen aylarda kök oluşturmalarından ve zamanla rejenere eksplant sayısının artmasından ve bunlarında kök oluşturmalarından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.42'te koyu renkle belirtilen ve Şekil 4.68 üzerinde de görülen 4P5E, 4P6E, 5P4E ve 6P4E ikili kombinasyonları %KSOE bakımından her 3 ay da da ileri çıkmıştır. Ancak 5P4E ikili kombinasyonu diğer öne çıkan ikili kombinasyonlara göre ilk ay daha düşük KSOE%'ni verdiği için Şekil 4.66'de görülen 3 aylık ortalama sonuçlarda kontrolden daha düşük gözükmetedir. İlk ay KSOE%'ni 5P4E bu kombinasyon düşürürken diğer aylarda kültür ortamında hormon kullanılmadığı için hormon kombinasyonunun konsantrasyonu giderek azalmış ve gelişim 2. ve 3. aylarda solumüle edilmiştir.

Genel olarak %SKOE ile TSOE %'nin birbiriyle ters orantılı olarak değiştiği Şekil 4.76 ve Şekil 4.73, Şekil 4.74 ile Şekil 4.77'den görülmektedir.

Şekil 4.68, Şekil 4.74 ve Şekil 4.77'den görüldüğü üzere 4P4E kombinasyonu 1. ay en yüksek %SKOE'ni verirken en düşük %KSOE'ni ve %TSOE vermiştir. Zaman ilerledikçe 4P4E kombinasyonunun %TSOE ve %KSOE'i genel olarak artarken %SKOE'i giderek azalmıştır. Aynı durum diğer kombinasyonlar içinde gözlemlenmiştir. Ancak %SKOE'i bakımından 5P5E kombinasyonunda 1. aydan düşüş göstermesine rağmen 2. ve 3. aylarda %SKOE'i sabit kalmıştır. Yine 5P5E kombinasyonunda %KSOE'i bakımından 1 aydan itibaren zaman ilerledikçe artış göstermiş ancak 2. ve 3. aylarda bu değer sabit kalmıştır. Şekil 4.78'den de görüldüğü gibi %SKOE'i bakımından en hızlı düşüş 4P4E kombinasyonunda gözlemlenmiştir. 4P4E kombinasyonundaki %SKOE'i bakımından bu hızlı değişikliklerin nedeni 2. ve 3. aylarda hormon kullanılmaması nedeniyle bu aylarda aşırı dozun sağlamış olduğu sürgünlenmeyi inhibe edici dozun azalması ile sürgün oluşumunu teşvik eden hormon konsantrasyonuna daha çabuk ulaşması ve bu sitümüle edici etkinin diğer kombinasyonlara göre daha uzun sürmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Progesteron+estron kombinasyonları içerisinde 10^{-6} mM progesteron+ 10^{-4} mM estron (6P4E) kombinasyonu TSOEO, RE, EBKSS, KSOE, EBSS parametrelerinde öne çıkmıştır. En iyi karışımın 6P4E olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla 4P+6E ve 5P+4E izlemiştir. Kontrol ise 5P+5E ve 5P+6E kombinasyonları hariç hepsinin gerisinde kalmıştır.

5.3. Sonuç ve Öneriler

Gazalboynuzu bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisinin araştırıldığı bu çalışmada kotiledon yaprakları ve kök uçları olmak üzere iki farklı eksplant kaynağı kullanılmıştır. Çalışma iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada 4 farklı memeli cinsiyet hormonu (17β -estradiol, estron, progesteron, testosteron) ve 4 farklı dozunu (0 , 10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) içeren toplam 16 farklı kültür ortamının bazı rejenerasyon parametreleri (%KSOE, %TSOEO, %SKOE, %KZSOE, EBKZSS, EBKSS, EBSS, RE) üzerine, ana etkileri belirlenmiştir. İkinci aşamada memeli cinsiyet hormonlarının ikili kombinasyonlarını (17β -estradiol + progesteron, 17β -estradiol+testosteron, 17β -estradiol+estron, progesteron+testosteron,

progesteron+estron, testosteron+estron) içeren 6 farklı hormon karışımı ve 3 farklı dozunun (10^{-4} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-6} mM) kombine edildiği ve biri kontrol (0 mM) olmak üzere toplam 55 farklı hormon kombinasyon ortamı denenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada *Lotus corniculatus* L.'un kullanılan eksplantın tipine, memeli cinsiyet hormonlarının tipine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak incelenen parametrelere farklı tepkiler vermiş olduğu tespit edilmiştir. Bu da *Lotus corniculatus*'un memeli cinsiyet hormonları ile etkileşime girebildiğini göstermiştir. Elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda özetlenmiştir.

5.3.1. Sonuçlar

Yaptığımız çalışmada denenen tekli hormon konsantrasyonlarında kotiledon yapraklarının tamamen öldüğü, ikili hormon kombinasyonlarında (6B5T, 4T6P, 5T5P, 5T6P ve 6T6P) ise çok az bir kısmının rejenere olduğu görülmüştür.

Çalışmanın kök meristemleri ile yapılan kısmında ise denenen memeli cinsiyet hormonlarının gazalboynuzu kök eksplantları ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Tekli hormon uygulamalarında; %KSOE, %TSOEO, EBKSS bakımından en iyi sonucu kontrol grubu vermiş olup bunu 17β -estraidol'ün 10^{-5} mM dozu takip etmiştir.

EBSS bakımından en iyi hormon grubu estron olup 10^{-6} mM dozu öne çıkmıştır. KZSOE bakımından en iyi sonucu testosteron'un 10^{-6} mM dozu vermiştir.

SKOE bakımından 17β -estradiolün 10^{-4} mM dozu öne çıkmıştır.

EBKZSS bakımından en iyi hormon grubunun estron olduğu ve bunu progesteronun takip ettiği bulunmuştur.

17β -estradiol hormonunun, kök gelişimini diğer hormonlara göre daha fazla teşvik ettiği görülmüştür.

RE bakımından uygulamalar arasındaki farkın önemli olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak bu parametre köklü sürgün sayısının, Toplam sürgün oluşturan eksplant sayısına oranı olduğu için bu iki parametrenin doğru orantılı olarak değişebildiği gözlemlenmiş olduğundan eksplantların rejenerasyon kapasitesi özelliği bakımından ayırt edici bir faktör olarak değerlendirilmesinin yanlış olduğu sonucuna varılmıştır.

Denenen memeli cinsiyet hormonlarının, uygulanan konsantrasyonlarında herhangi bir kallus oluşumu gözlemlenmemiştir.

Her üç dişi cinsiyet hormonu (17β -estradiol , estron ve progesteron), %TSOEO, EBKSS parametreleri bakımından öne çıkmış olup aralarındaki farklılıklar önemli olmamıştır.

Genel olarak %KSOE, %TSOEO, %SKOE, EBSS, EBKSS parametreleri testosteron uygulamalarında minimum değeri almış olup yalnızca %KZSOE bakımından ikinci sırayı almıştır. Diğer tüm parametrelerde dişi cinsiyet hormon uygulamalarının gerisinde kalmıştır.

Ana etkilerde %KZSOE hariç incelenen tüm parametrelerde uygulanan tüm hormon ve konsantrasyonlarında genel olarak kontrol (0 mM) dozu en iyi sonuçları vermiş olup bunu sırasıyla 10^{-6} mM, 10^{-5} mM ve 10^{-4} mM dozu takip etmiştir.

Kontrol (0 Mm) dozu, %KSOE, %TSOEO, %SKOE, EBKZSS, EBKSS, EBSS parametrelerinde öne çıkmıştır.

Kök meristemlerinin hormon kombinasyonlarına tepkileri incelendiğinde ise rejenerasyon kapasitesi üzerine önemli etkisi olan KSOE, EBSS, EBKSS ve TSOEO bakımından genel olarak en iyi karışımın progesteron+estron (PE) karışımı olduğu ve kontrolü geçtiği bulunmuştur. PE kombinasyonun en etkili bileşiminin ise 10^{-6} mM progesteron+ 10^{-4} mM estron olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla 10^{-4} mM progesteron+ 10^{-6} mM estron ve 10^{-5} mM progesteron+ 10^{-4} mM estron izlemiştir. Kontrol

ise 10^{-5} mM progesteron + 10^{-5} mM estron ve 10^{-5} mM progesteron + 10^{-6} mM estron kombinasyonları hariç hepsinin gerisinde kalmıştır.

5.3.2. Öneriler

Genel olarak kök eksplantlarına memeli cinsiyet hormonlarının tekli uygulamalarında, denenen tüm konsantrasyonlarında kültüre alınma sürelerinin incelenen parametreler üzerindeki etkisini incelediğimizde %SKOE'i zamanın ilerlemesine bağlı olarak azalmıştır. İncelenen tüm parametrelerde zaman ilerledikçe hormon uygulamalarının etkisi azaldığı için (2. ve 3. aylarda kullanılan besin ortamlarının hormon içermemesi nedeniyle) memeli cinsiyet hormon uygulamalarının eksplantların rejenerasyonu ve gelişimini inhibe edici etkileri azalmış ve tüm parametrelerde zamanın ilerlemesine bağlı olarak iyileşme görülmüş ancak hiçbir kontrolle ulaşamamıştır. İnhibe edici etkinin zamana bağlı olarak azalmasının, başlangıçtaki hormon konsantrasyonları ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Başlangıçta uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının konsantrasyonu artıkça inhibe edici etkilerinin daha uzun zaman sürdüğü gözlemlenmiştir. Bu durum daha sonraki yapılabilecek çalışmalarda bu hormonların bitki bünyesindeki etkinlik sürelerinin, bitki dokusuna bağlanma bölgelerinin ve bağlanma derecelerinin çalışılması gereken bir konu olduğuna işaret etmiştir.

Ayrıca tekli hormon uygulamaları in vitro muhafaza çalışmalarında kullanılabilir. Konu ile ilgili ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Yine Tekli hormon uygulamalarının daha düşük konsantrasyonlarda denenmeleri halinde bitki rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri olabilir.

Kök eksplantlarına uygulanan ikili hormon kombinasyonlarında, en iyi karışımın Progesteron + Estron (PE) karışımı olduğu ve kontrolü geçtiği bulunmuştur. Bu durum daha sonraki yapılabilecek çalışmalarda, bitki bünyesinde bulunan memeli cinsiyet hormon reseptörleri üzerine, ikili hormon kombinasyonlarının etkisinin araştırılmasının gerekli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Acemi, A., 2011. Farklı Konsantrasyonlardaki Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)'nin Doku Kültürü ile Çoğaltılmasına Olan Etkilerinin Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Adams, N.R., 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 73, 1509-1515.
- Agarwal, M.K., 1993. Receptors for mammalian steroid hormones in microbes and plants. *Federation of European Biochemical Societies*, 322(3), 207-210.
- Ahmadabadi, M., Ruf, S., Bock, R., 2007. A leaf _based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res.*, 16:437-448.
- Ahuja, P. S., Hadiuzzaman, S., Davey, M.R., Cocking E.C., 1983. Profilic plant regeneration from protoplast_derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (Birdsfoot Trefoil) *Plant Cell Reports*, 2, 101-104.
- Akashi, R., Hoffmann-Tsay S.S., Hoffmann, F., 1998b. Selection of a super_growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theory Appl. Genet.*, 96, 758-764.
- Akashi, R., Uchiyama T., Sakamoto A., Kawamura O., Hhoffman F., 1998a. High-frequency embryogenesis from cotyledons of bird'sfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J. Plant Physiol*, 152, 84-91.
- Akashi, R.,Kawano T.,Hashiguchi M.,Kutsuna Y., Hoffmann-Tsay S.S,Hoffmann F. 2003. Super root in lotus corniculatus: A Unique tissue culture and regeneration system in legume species. *Plant and Soil* 255, 27-33.
- Aşkın, H., 2009. Bazı Bitkisel Östrojenlerin *Drosophila Melanogaster*'de Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi ve Folik Asit Kullanılarak Bu Etkilerin İyileştirilmesi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
- Aydoğdu, M., Boyraz N., 2005. Bitki büyüme düzenleyicileri (Hormon) ve hastalıklara dayanıklılık. *Bitkisel Araştırma Dergisi*, 1, 35-40.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A., 2001. Bölüm 1. Doku kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. *Bitki biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. S. Ü. Vakfı yayınları, Konya, Türkiye, 1-35.
- Badzian, T. and Rybczynski J. J. 1994. Cytokinin control of shoot regeneration in root segment culture of *Lotus corniculatus* seedling. *Acta Physiol. Plant.*16, 61-67.
- Baran, M.S.,Kocabağlı, N., 2000. Yemlerdeki Öströjenik Etkili Maddeler Ve Hayvanlar Üzerindeki Etkileri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 26 (1), 141-148.
- Bhat, W.W., Lattoo, S.K., Rana, S., Razdan, S., Dhar, N., Dhar, R.S., Vishwakarma R.A., 2012. Efficient plant regeneration via direct organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Picrorhiza kurroa*: an endangered medicinal herb of the alpine Himalayas. *In Vitro Cell. Dev.Biol. Plant*, 48, 295–303.
- Bishop, G.J., Koncz, C., 2002. Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling, *The Plant Cell*, 14 (Suppl. S) S97–S110.

- Blaydes DF (1966). Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Pl.* 19:748-753.
- Cho, H.J., Xu, Y., Murooka., 1995. Formation of adventitious shoots and plant regeneration by culture of cotyledon segment in *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch). *Plant tissue culture letters*, 12(1), 87-90.
- Colucci, M.S., Bork, H., Topp, E., 2001. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17-Estradiol and estrone. *J. Environ. Qual.* 30:2070–2076.
- Cook, H., 1960. The effect of certain extracts of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and yellow pine needles (*Pinus ponderosa*) on the reproductive processes of the laboratory mouse and rat. B.S.A., The University of British, Columbia.
- Dumlupınar, R., Genisel, M., Erdal, S., Korkut, T., Taspınar, M.S., Taskın, M., 2011. Effects of progesterone, β -estradiol and androsterone on the changes of inorganic element content in barley leaves. *Biol. Trace Elem. Res.*, 143, 1740-1745.
- Erdal, S., 2010. Memeli Cinsiyet Hormonlarının Arpa ve Nohut Bitkilerinin Büyüme Ve Gelişmeleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
- Erdal, S., 2012a. Exogenous mammalian sex hormones mitigate inhibition in growth by enhancing antioxidant activity and synthesis reactions in germinating maize seeds under salt stress. *J. Sci. Food Agric.* 92, 839-843.
- Erdal, S., 2012b. Alleviation of salt stress in wheat seedlings by mammalian sex hormones. *J. Sci. Food Agriculture*, 92, 1411-1416.
- Erdal, S., Dumlupınar, R., 2011b. Exogenously treated mammalian sex hormones affect inorganic constituents of plants. *Biol. Trace Elem. Res.*, 143, 500-506.
- Erdal, S., Dumlupınar, R., 2011a. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. *Acta Physiol Plant*, 33, 1011-1017.
- Erdal, S., Genisel M., Turk H., Gorcek Z., 2012. Effects of progesterone application on antioxidant enzyme activities and K^+/Na^+ ratio in bean seeds exposed to salt stress. *Toxicology and Industrial Health*, 28(10), 942-946.
- Genisel, M., Turk, H., Erdal, S., 2012. Exogenous progesterone application protects chickpea seedlings against chilling-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant*, DOI 10.1007/s11738-012-1070-3.
- Gibbs, M.J., 1991. Genetic engineering of the forage legume *Lotus corniculatus* using *Agrobacterium*: mediated transformation systems. Doctoral thesis, Durham University Department of Biological Sciences, UK.
- Guan, M., Roddick, J.G., 1988. Epibrassinolide-inhibition of development of excised, adventitious and intact roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*): Comparison with the effects of steroidal estrogens. *Physiologia Plantarum*, 74(4), 720-726.
- Hacibektaşoğlu Y. E., 2011. Memeli Cinsiyet Hormonları (Östron Ve Testesteron)'nın Farklı Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Genotiplerinde Çimlenme Karakterleri, Bitki Gelişimi, Cinsiyet Oluşumu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi, Y.Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Erzurum.
- Hakk, H., Millner, P., Larsen G., 2005. Decrease in water-soluble 17-B-estradiol and testosterone in composted poultry manure with time. *J. Environ. Qual.* 34, 943–950.

- Janeczko A., Filek Wł., Skoczowski A. 2002. Influence of human sex hormones on the growth response of winter wheat immature embryos and callus. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 488, 667-673.
- Janeczko, A. and Skoczowski, A., 2005. Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 43(2), 71-79.
- Janeczko, A., 2012. The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids*, 77, 169-173.
- Janeczko, A., Budziszewska B., Skoczowski A. Dybala M., 2008. Specific binding sites for progesterone and 17 β -estradiol in cells of *Triticum aestivum* L. *Acta Biochimica Polonica*, 55 (4), 707–711.
- Janeczko, A., Filek W., 2002. Stimulation of generative development in partly vernalized winter wheat by animal sex hormones. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24 (3), 291-295.
- Janeczko, A., Filek, W., Biesaga-Ko_cielniak J., Marci_ ska, Janeczko, Z., 2003. The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24-*epibrassinolide*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 147–151.
- Janeczko, A., Kocurek, M., Marcińska, I., 2012. Mammalian androgen stimulates photosynthesis in drought-stressed soybean. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7(5), 902-909.
- Janeczko, A., Oklešťková J., Simerský R., Novák O., 2011. Presence of progesterone in leaves of spring wheat. The 5th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology, 6-9 September 2011, Wrocław, Poland.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., Groot, A 2000. Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany*, 86, 441-447.
- Kılıç, Y., 2007. Fitohormonların Saplı Meşe (*Quercus robur* L.) 1+0 Yaşlı Fidan Morfolojik Karakterler Üzerine Etkisi.Y. Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Kiasalari, Z., Khalili, M. and Aghaei, M., 2009. Effect of *Withania somnifera* on levels of sex hormones in the diabetic male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 7 (4), 163-168.
- Kitts, W. D., Swierstra, E., Brink, V. C., Wood, A. J., 1959. The estrogen-like substances in certain legumes and grasses. 2. The effect of stage of maturity and frequency of cutting on the estrogenic activity of some forages. *Canad. J. Animal Sci*, 39: 158-163.
- Klee, H., , Horsch, R., Rogers, S., 1987. Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38,467-486 (1987).
- Kopcewicz, J., 1972. Oestrogens in the long-day plants *Hyoscyamus niger* and *Salvia splendens* grown under inductive and non-inductive light conditions. *New Phytologist*. 71, 129-134.
- Kopcewicz, J., Porazinski Z., 1974. Effects of growth regulators, steroids and estrogen fraction from sage plants on flowering of a long day plant, *Salvia splendens*, Grown under non-inductive light conditions. *Biologia Plantarum (Praha)*, 16 (2), 132-135.

- Kuiper, G.G. J.M., Lemmen, J.G., Carlson, B., Corton J.C., Safe, S.H., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139, 4252-4263.
- Kuiper, G.G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J., 1997. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology*, 138(3), 863–870.
- Kumlay, A.M., Eryiğit, T., 2011. Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: Bitki hormonları. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 1(2), 47-56.
- Laurence, S., Shore, L.S., Kapulnik, Y., Ben-Dor, B., Fridman, Y., Wininger, S., Shemesh, M., 1992. Effects of estrone and 17 β -estradiol on vegetative growth of *Medicago sativa*. *Physiologia Plantarum*, 84 (2), 217-222.
- Lino, M., Nomura, T., Tamaki, Y., Yamada, Y., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Mori, M., Asami, T., Nakano, T., Yokota, T., 2007. Progesterone: its occurrence in plants and involvement in plant growth. *Phytochemistry*. 68(12), 1664-73.
- Milanesi, L., Boland, R., 2004. Presence of estrogen receptor (ER)-like proteins and endogenous ligands for ER in solanaceae. *Plant Science*, 166, 397-404.
- Milanesi, L., Monje, P., Boland, R., 2001. Presence of estrogens and estrogen Receptor-like proteins in *Solanum glaucophyllum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 1175–1179.
- Miller, C.O., 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. In: *Modern methods of plant analysis*, 6., Ed: Linskers, H.F. and Tracey, M.V.. Springer-Verlag. Berlin, 192-202.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- Murkies, A.L., Frydenberg, M., 2000. Phytoestrogens. *Encyclopedia of hormones*, 3:192–201.
- Nicolic, R., Mitic, N., Ninkovic, S. and Neskovic, M., 2007. Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. using a direct shoot regeneration protocol, Stepwise hygromycin B selection, and a super binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 59(4), 311-317.
- Nicolic, R., Mitic N., 2005. Analysis of morphological traits of bird's foot trefoil plants cv. Bokor Transformed with *Agrobacterium Rhizogenes*. *Genetika*, Vol.37, No:1, 33-38.
- Nicolic, R., Mitic, N., Miletic, S., Neskovic, M., 2006. Effects of cytokinins on in vitro seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25, 187-194.
- Nicolic, R., Mitic, N., Ninkovic, S., Neskovic, M., 1997. Evaluation of agronomic traits in tissue culture derived progeny of bird's-foot trefoil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48, 6761-6769.
- Niizeki, M., Saito, K., 1987. *Plant Tissue Culture Letters*. 4(1), 27-31.
- Nilzeiki, M. and Grant W. F., 1971. Callus, plantlet formation and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotillna*. *Can. J. Bot.* 49, 2041-2051.
- Otaran, O., 2012. Buğday olgun embriyo kültüründe memeli cinsiyet hormonlarının kallus oluşumu ve somatik embriyo oluşumuna etkisi. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Erzurum.

- Özen, H.Ç. ve Onay, A., 2007. Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti., 332, Ankara, Türkiye.
- Özer, Ö., 2006. Menopoz ve Fitoöstrojenler. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı Fitoterapi Drogları Tezsiz Y. Lisans Dönem Projesi S: 1
- Pekşen, A., 2011. Memeli Cinsiyet Hormonları (Östron Ve Testosteron)'Nın Domateste (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) Tohum Çimlenmesi, Fide Gelişimi, Çiçeklenme, Cinsiyet Oluşumu Ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi, Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Erzurum.
- Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A., Tempe, J., 1987. Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: A system for molecular studies of Symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 207, 245-250.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A.M, 2000. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Raikar, S.V., Braun, R. H., Bryant, C., Conner, A.J., Christey, M.C., 2008. Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* L. protoplasts. *Plant Biotechnol Reports*, 2, 171-177.
- Raman, D.R., Layton, A.C., Moody, L.B., Easter, J.P., Sayler, G.S., Burns, R.T., Mullen, M.D., 2001. Degradation of estrogens in dairy waste solids: Effects of acidification and temperature. *Trans. ASAE* 44:1881–1888.
- Rybczynski, J.J., Badzian, T., 1987. High regeneration potential of root segments of *Lotus corniculatus* L. Seedlings on hormone free media. *Plant Science*, Vol.51: 2-3, 239-244.
- Sarin, R., 2005. Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology*, 4(2), 79-93.
- Schaller, H., 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42, 163-175.
- Shemesh, M., Shore, L.S., 2012. Effects of environmental estrogens on reproductive parameters in domestic animals. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67(1), 6-10.
- Shore, L. S., Kapulnik, Y., Ben-Dor, B., Fridman, Y., Wininger, S., Shemesh, M., 1992. Effects of estrone and 17 β -estradiol on vegetative growth of *Medicago sativa*. *Physiologia Plantarum*, 84, 217-222.
- Sláma, K., 1980. Animal hormones and antihormones in plants. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 175(3), 177-193.
- Snochowski, M., Romanowicz, K., 2003. The use of estrogen receptors for evaluation of phytoestrogens activities in mammals. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 12(53), 175-187.
- Speranza, A., 2010. Into the world of steroids: A biochemical “keep in touch” in plants and animals. *Plant Signaling and Behavior*, 5(8), 940-943.
- Swanson, E. B. and Tomes, D. T., 1980. Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* L. and the selection and characterization of 2,4-D-tolerant cell lines. *Can. J. Bot.* 58, 1205-1209.

- Szweykowska, A.M., 1987. Hormonal Control of Protein Synthesis In Plants. Hormonal Regulation of Plant Growth and Development, Volume 2., Ed: Purohit, S.S. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, 1-32.
- Tabaeizadeh, Z., 1989. Genetic transformation of a pasture legume, *Lotus corniculatus* L. (bird's-foot trefoil). Biotechnol. Lett. 11, 411-416.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2008. Ünite III. Bitki Fizyolojisi, Ed: Türkan, İ., Palme Yayıncılık, Ankara, 309-621.
- Tanaka, H., Toyama, J., Hashiguchi, M., Kutsuna, Y., Tsuruta, S., Akashi, R., Hoffmann, F., 2008. Transgenic superroots of *Lotus corniculatus* can be regenerated from superroot-derived leaves following Agrobacterium-mediated transformation. Journal of Plant Physiology, 165, 1313-1316.
- Tanino, K.K., Matthews, L., Wasif, E., Shenouda, A., Gilliland, B., Nair, M.P.M., 2002. Absciscic acid and estrogen effects on flowering and phenotypic traits in melon (*cucumis melo* cv. 'Earligold') and pumpkin (*cucurbita pep* cv. 'Baby bear'). Acta Hort. (ISHS) 588:97-101.
- Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants: II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci. Total Environ. 225:91-99.
- Tomes, D. T., 1979. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes. Can. J. Bot. 57, 137-140.
- Ugur, S., Işık Ç., 2002. Obstetrik ve Jinekoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 452, İstanbul.
- Vessabutr, S. and Grant, W. F., 1995. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*). Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 41, 9-15.
- Webb, K. J., Watson, E.J., 1991. *Lotus corniculatus* L.: Morphological and cytological analysis of regenerants from three sources of tissue and selected progeny. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 25, 27-33.
- Ylstra, B., Touraev, A., Brinkmann, A.O., Heberle- Bors, E., Van Tunen, A.J., 1995. Steroid hormones stimulate germination and tube growth of in vitro matured tobacco pollen. Plant Physiol, 107, 639-643.
- Yoo, H.H., Kim, T., Ahn, S., Kim, Y.J., Kim, H.Y., Piao, X.L., Park, J.H., 2005. Evaluation of the estrogenic activity of Leguminosae plants. Biol Pharm Bull, 28, 538-540
- Zayed, R., El-Shamy, H., Berkov, S., Bastida, J., Codina, C., 2011. In vitro micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum vittatum*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 47, 695-701

ÖZGEÇMİŞ

1997 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda mühendisliği bölümünü bitirdi. 1998-2000 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde iki yıl araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2001 yılında kurumlara arası geçiş yaparak Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde göreve başladı. Yüksek lisansını Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde tamamladı. 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Çayır Mera ve Yem Bitkileri Islahı bilim dalında doktora eğitimine başladı. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden lisans düzeyinde on dört ders alarak bilimsel hazırlığı tamamlayıp doktora derslerini aldı. Çayır Mera ve Yem Bitkileri Islahı bölümünde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından desteklenen “Erzurum, Erzincan, Bayburt İlleri Doğal Florasında bulunan Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* L. var. *corniculatus*) Ekotiplerinin Toplanması, Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu, Tek Yıllık Baklagil Yem Bitkileri Islahı, Gazalboynuzu Islahı” projelerinde proje lideri “Doğu Anadolu Bölgesi Çayır Mera Alanlarında Bulunan Yem Bitkilerinin Kültüre Alınma Olanaklarının Araştırılması, Doğu Anadolu Bölgesi Yem Bitkileri Genetik Kaynakları Araştırma Projesi, Korunga Islah Çalışmaları, Yonca Islah Projesi, Buğdaygil Yem Bitkileri Islah Çalışmaları” projelerinde araştırmacı olarak çalıştı. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Tarafından 2012 yılı “Çayır Mera ve Yem Bitkileri Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı’nda proje liderliğini yürüttüğü gazalboynuzu Islah Projesi ikinci proje ödülüne layık görüldü. Halen Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde Çayır Mera ve Yem bitkileri ıslahı şubesinde görev yapmaktadır.