T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *Astragalus schizopterus* BİTKİSİNİN *IN VITRO* REJENERASYON POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

REFİK ERKOYUNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİMDALI

KONYA-2010

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDEMİK *Astragalus schizopterus* BİTKİSİNİN *IN VITRO* REJENERASYON POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Refik ERKOYUNCU

Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Bölümü Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR
2010, 35 Sayfa

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Doç. Dr. Özden ÖZTÜRK
Yrd. Doç. Dr. Semiha ERİŞEN

Bu çalışmada, *Astragalus schizopterus* Boiss. bitkisinin çimlenme ve *in vitro* rejenerasyon yeteneği araştırılmıştır. *A. schizopterus* tohumları; zımparalama, bisturi ile çizme ve hidroklorik (HCl) asit ile muamele edilmiştir. En iyi çimlenme oranı (% 96.7) bisturi ile çizilen tohumlardan elde edilmiştir. Kültür öncesi tohumların yüzey sterilizasyonu 20 dakika süreyle % 20 (v/v)'lik sodyum hipokloritle yapılmıştır. Steril tohumlar bisturi ile çizilerek ½ MS temel besin ortamlarında kültüre alınmış ve bu şekilde eksplant kaynağı için steril fideler elde edilmiştir.

Aseptik şartlarda yetiştirilen fidelerden alınan hipokotil, yaprak ve yaprak sapı eksplantları farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, NAA, TDZ, IAA, ZEA, 2,4-D, KIN) içeren yarı-katı MS ve B_5 gibi temel besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Tüm denemeler "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni" ne göre kurulmuştur.

A. schizopterus'da adventif sürgün rejenerasyonu için 2, 4 ve 8 mg/l 2,4-D x 0.5 mg/l KIN içeren MS veya B_5 ortamları, 0-5 mg/l 2,4-D x 0-5 mg/l KIN ve 1, 2, 4 mg/l 2,4-D x 0.5 mg/l BAP veya KIN içeren MS besin ortamları denenmiştir. Ayrıca 1, 2, 4 mg/l BAP x 0.5 mg/l NAA, 0.2, 0.4, 0.6 mg/l TDZ veya bunların 0.2 mg/l NAA kombinasyonu içeren ortamlar, 2 ve 4 mg/l IAA x 0.5 mg/l ZEA ile 0.5 mg/l IAA x 2 ve 4 mg/l ZEA içeren MS ortamları kullanılmıştır. *A. schizopterus*'ta denemeye

alınan eksplantlardan çoğunlukla yumuşak veya sert yapılı ve embriyogenik olmayan kallus elde edilmiştir. Rejenerasyon ortamına alınan kalluslarda herhangi bir sürgün rejenerasyonu görülmezken, bazı ortamlarda kök oluşumu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus*, Çimlenme, MS, B_5, Kallus, Büyüme Düzenleyicileri

ABSTRACT

MS Thesis

DETERMINATION OF *IN VITRO* REGENERATION ABILITIES OF ENDEMIC *Astragallus schizopterus*

Refik ERKOYUNCU

Selçuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR
2010, 35 Pages

Jury: Asist. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Assoc. Prof. Dr. Özden ÖZTÜRK
Asist. Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

In this study, *Astragalus schizopterus* Boiss. germination and plant regeneration ability was evaluated *in vitro*. *A. schizopterus* seeds were treated grinding, lancet with a boot and hydrochloric (HCl) acid. The best germination rate (96.7 %) was obtained from seeds that are plotted with a lancet. Surface sterilization of seeds, prior to culture was achieved by immersion in 20 % (v/v) sodium hypoclorite solution for 20 min. Drawn with a sterile lancet ½ MS basic food grains were cultured in medium and thus, sterile seedlings were obtained for explant source

Hypocotyl, leaf and petiole sponges obtained from seedlings grown in aseptic conditions were taken to culture in MS and B_5 basic nutritional environments containing semi-solid. plant growth regulators (BAP, NAA, TDZ, IAA, ZEA, 2,4-D, KIN) of different combinations and concentrations. The experiments were set up according to randomized complete plots design.

2, 4, 8 mg/l 2,4-D x 0.5 mg/l KIN MS or B_5 media containing 0-5 mg/l 2,4-D x 0-5 mg/l KIN and 1, 2, 4 mg/l 2,4-D x 0.5 mg/l BAP or KIN containing MS nutrient media were tested for *A. schizopterus* adventitious shoot regeneration. Also 1, 2, 4 mg/l BAP x 0.5 mg/l NAA, 0.2, 0.4, 0.6 mg/l TDZ, or a 0.2 mg/l NAA containing media combinations, 2 and 4 mg/l IAA x 0.5 mg/l ZEA and 0.5 mg/l IAA x 2 and 4 mg/l of MS medium was used containing ZEA. Mostly non- embriyogenic soft or

hard callus were obtainedfrom explants tried in *A. schizopterus*.While no shoot regeneration was observed in the callus taken to regenarion media,root regeneration was observedin certain media.

Key Words: *Astragalus*, Germination, MS, B_5, Callus, Growth Regulator

İÇİNDEKİLER

	Syf No
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
SİMGELER……..	ix
1-GİRİŞ……..…….	1
2-KAYNAK ARAŞTIRMASI.....…….....	5
3-MATERYAL VE METOT …….	9
3.1. Materyal…….....	9
3.2. Metot..…….....	9
3.2.1.Tohum sterilizasyonu……..…….....	10
3.2.2. Tohumların çimlendirilmesi……..……..	10
3.2.3. Doku kültürü çalışmaları.....……....…….....	10
3.2.3.1. Kallus oluşturma kapasiteleri.....	11
3.2.4. Gözlem ve ölçümler.....……....	11
3.2.4.1. Çimlenme değeri.....	11
3.2.4.2. Somatik dokulardan bitki rejenerasyonu	11
3.2.4.3. Kallus yolu ile bitki rejenerasyonu	11
3.2.5. Verilerin değerlendirilmesi.....…….....	11

4-ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA ..……..... 12

4.1. Çimlendirme Çalışmaları..……...…… 12

4.2. Doku Kültürü Çalışmaları .....……. 12

4.2.1. MS ve B_5 besin ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi……..... 13

4.2.2. 2,4-D, KIN ve BAP büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi..... 16

4.2.2.1. *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında 2,4-D ve KIN büyüme.... düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi……. 16

4.2.2.2. *A. schizopterus* hipokotil eksplantında 2,4-D, KIN ve BAP büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi..... 22

4.2.3. BAP ve NAA büyüme düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi.... 23

4.2.4. TDZ ve NAA büyüme düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi.... 25

4.2.5. IAA ve ZEA büyüme düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi..... 28

5-SONUÇ VE ÖNERİLER……...……. 31

6-KAYNAKLAR…….. 32

7-ÖZGEÇMİŞ……..... 36

ÇİZELGE LİSTESİ

Syf No

Çizelge 4. 1 *A. schizopterus* tohumlarının çimlenme durumu……... 12

Çizelge 4. 2. MS ve B_5 besin ortamlarının *A. schizopterus'*un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi…….. 14

Çizelge 4. 3. MS ve B_5 besin ortamlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı……. 14

Çizelge 4. 4. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarının *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi…….. 17

Çizelge 4. 5. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarında *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi…….. 19

Çizelge 4. 6. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarında *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı……. 20

Çizelge 4.7. Farklı 2,4-D, KIN ve BAP dozlarının *A. schizopterus*'un hipokotil eksplantında kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi…….. 22

Çizelge 4.8. Farklı 2,4-D, KIN ve BAP dozlarında *A. schizopterus*'un hipokotil eksplantında kallus ağırlığı……. 23

Çizelge 4.9. Farklı BAP ve NAA dozlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi…….. 24

Çizelge 4.10. Farklı BAP ve NAA dozlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı……. 25

Çizelge 4.11. Farklı TDZ ve NAA dozlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumuna ve kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi…….. 26

Çizelge 4.12. Farklı TDZ ve NAA dozlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığı…….. 27

Çizelge 4.13. Farklı IAA ve ZEA dozlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumuna ve kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi……. 29

Çizelge 4.14. Farklı IAA ve ZEA dozlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığı…….. 30

ŞEKİL LİSTESİ

	Syf No
Şekil 3.1. *Astragalus schizopterus* Boiss……	9
Şekil 4.1. *A. schizopterus* bitkisinde 2,4-D ve KIN içeren MS ve B_5 ortamlarda kallus oluşumu.....	15
Şekil 4.2. *A. schizopterus* bitkisinde 2,4-D ve KIN içeren ortamlarda kallus ve adventif kök oluşumu.....	18
Şekil 4.3. *A. schizopterus* bitkisinde TDZ ve NAA içeren ortamlarda kallus oluşumu....	26
Şekil 4.4. *A. schizopterus* bitkisinde IAA ve ZEA içeren ortamlarda kallus ve adventif kök oluşumu……	29

SİMGELER

B_5	Gamborg ve ark. bazal besin ortamı
BAP	6-Benzil amino pürin
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
IAA	Indol-3-asetik asit
IBA	Indol-3-bütirik asit
KIN	Kinetin
KOH	Potasyum Hidroksit
l	Litre
mg	Miligram
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog bazal besin ortamı
NAA	α-Naphthaleneacetic acid
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
TDZ	Thidiazuran
ZEA	Zeatin
ZR	Zeatin ribozid
2,4-D	2,4- dikloro fenoksi asetik asit
2,4,5-T	2,4,5-trikloro fenoksi asetik asit
2IP	İzopentil adenin
°C	Santigrat derece

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca her zaman yanımda olan, tez çalışmamda olduğu gibi her konuda yardım ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli Danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yine tez konusunun belirlenmesinde ve tez çalışmamın her aşamasında her türlü yardım ve bilgisini esirgemeyen, büyük bir sabırla, ilgi ve desteğini eksik etmeyen Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Semiha ERİŞEN' e çok çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda bize çalışma imkanı sağlayan Değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU'na, Prof.Dr. Ahmet DURAN'a, çalışmalarıma yardım ve katkılarından dolayı başta Dr. Emine ATALAY ve Yük. Zir. Müh. M. Ufuk BACAKSIZ olmak üzere diğer bütün laboratuvar arkadaşlarıma çok çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, TOVAG 106O136 nolu TÜBİTAK projesinden desteklenmiştir.

Refik Erkoyuncu

Konya, 2010

1. GİRİŞ

Baklagiller (*Fabaceae* Syn: *Leguminosae*), yaklaşık 600 cins ve 1500'e yakın türü içine alan bitkiler aleminin en kalabalık familyalarından birisidir. Baklagiller bu zengin çeşitlilikten dolayı insan gıdası, hayvan yemi, süs bitkisi, yeşil gübre, yağ ve endüstri ham maddesi gibi birçok alanda önemli bir bitki grubu olarak öne çıkmaktadır.

Baklagiller aynı zamanda morfolojik, ekolojik ve tarımsal karakterler bakımından da oldukça önemlidirler. Baklagiller, toprağın yapısını iyileştirirken, içerisindeki canlıların korunmasına yardımcı olurlar ve verimliliği doğal yolla artırırlar. Baklagiller, oluşturdukları yoğun toprak üstü ve toprak altı artıklarıyla organik madde miktarını yükseltirken, topraktaki canlıların çoğalmasına ve aktivitelerinin artmasına olanak sağlarlar. Ayrıca, biyolojik azot fiksasyonunun büyük bölümü de baklagillerin köklerine yerleşen ve bulundukları bitkiyle birlikte yaşayan *Rhizobium* bakterilerince yapılmaktadır (Orak ve Ateş 2004).

Baklagil yem bitkileri hayvan beslenmesinde büyük öneme sahiptir. Yapılan tahminlere göre, hayvanların tükettiği proteinin % 38'i, yağların % 16'sı ve karbonhidratların % 5'i baklagil yem bitkilerinden sağlanmaktadır (Açıkgöz 2001). Bu önemin farkında olan gelişmiş ülkelerde yem bitkileri tarımı, toplam ekili alanın % 25-30'unu kapsarken, bu oran ülkemizde % 3.2 gibi düşük bir değerde kalmıştır Hayvan beslemede kaba yem ihtiyacı çayır-meralar başta olmak üzere, yem bitkileri, saman, şeker pancarı posası, mısır hasılı ve diğer kaynaklardan sağlanmaktadır. Yem bitkisi olarak, özellikle yonca, korunga, fiğ gibi baklagiller önemli bir yere sahiptir (Avcıoğlu ve ark. 2000).

Günümüzde meralarımızın bozulmuş olması ve yetersiz yem bitkisi tarımı nedeniyle çiftlik hayvanlarımızın kaba yem ihtiyaçları bakımından açık mevcuttur. Ülkemizde mevcut bulunan yem açığının kapatılmasında alınacak tedbirlerden birisi de halen birkaç tür ile sınırlı olan yem bitkileri tarımımıza, alternatif olabilecek yeni yem bitkisi türlerini ilave etmektir. Önemli bir iklim ve toprak çeşitliliğine sahip olan ülkemiz birçok yem bitkisi türünün yetiştirilmesine oldukça elverişlidir. Ülkemizin

coğrafi konumu, jeolojik yapısı, farklı topoğrafik yapılara ve toprak gruplarına sahip oluşu, değişik iklim tiplerinin etkisi altında kalması ve üç farklı bitki coğrafya bölgesinin birleştiği yerde olması, özellikle bazı İran-Turan kökenli bitki cinslerinin gen merkezi olması gibi ekolojik ve floristik nedenlerle zengin bir flora ile çok değişik vejetasyon tiplerine sahiptir. Biyolojik zenginliklerin farkına varılması kadar, korunması ve zenginliklerden yararlanılması da önemlidir. Bilim dünyasına ilk kez ülkemizden betimlenerek tanıtılan türlerin, ekonomik değer taşıyan özelliklerinin belirlenmesi ve tarıma kazandırılması, ülkemizi daha da zenginleştirecektir. Bu bağlamda, ülkemiz florasında endemik türleri de bulunan gevenler (*Astragalus*), ülkemizde tarımı yapılmayan ancak mevcut yem bitkilerine ilave edilebilecek bir bitki grubu olarak önem kazanmaktadır.

Günden güne artan kuraklık nedeniyle dünyada ve Türkiye'de kuraklığa dayanıklı genotiplerin belirlenmesi ve bunların tarımsal üretimde değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Fakat bu bitkiler genellikle zor üreme özelliklerine sahip olup, nesilleri de tehlike altındadır. Bu nedenle gelecekte yem bitkisi olarak değerlendirilebilecek bu türlerin kuraklığa dayanıklılık genlerinin tespiti ve bunların doku kültürü ile çoğaltılabilme olanaklarının araştırılması, ayrıca bu türlerin *ex situ* korunması önem arz etmektedir.

Son yıllarda biyoçeşitliliğin değerinin farkına varılması, gen kaynaklarının korunması gerekliliğinin ön plana çıkması ülkemiz florasının ve zenginliklerinin belirlenmesi çalışmalarının artmasına neden olmuştur. Bu zenginliklerden faydalanmak ve ekonomiye kazandırmak için türlerin morfolojik özellikleri yanında, fizyolojik, farmasötik, genetik ve biyoteknoloji de yararlanma kapasitelerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Astragalus türlerinin genel olarak tohumla üreme yeteneklerinin sınırlı olması doku kültürü ile klonal çoğaltım yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyonun başarılması sentetik (yapay) tohum üretimine imkân sunacağından meralarımızın zenginleştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Aynı zamanda doku kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar genetik mühendisliği yöntemleriyle yapılacak ıslah çalışmalarına da temel teşkil

edecektir. Çünkü moleküler seviyede yapılan ıslahın başarılı olabilmesi uygun rejenerasyon yönteminin varlığına bağlıdır.

Bu sebeplerden dolayı, Türkiye Florası'nda bulunan ve çeşitli faktörlerin etkisiyle sayıları giderek azalma tehlikesinde olan acil koruma gerektiren endemik *Astragallus schizopterus* Boiss.'un doku kültürü yöntemleriyle rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması amaçlanmıştır.

Yeryüzünde 2200'den fazla türü olduğu saptanan *Astragalus*, Fabaceae familyasının Papilionoideae alt familyasında sistematik yerini alır ve Angiospermlerin en geniş genuslarından bir tanesi olarak belirtilir (Mirici 2004 ve Çobanoğlu 1987). Türkiye florasında tespit edilmiş yaklaşık 460 *Astragalus* türü bulunmaktadır. Bu rakam ülkemiz florasının yaklaşık % 5'ini oluşturur (Davis 1965; Davis ve ark. 1988; Güner ve ark. 2000). *Astragalus* cinsine ait türler; tek veya çok yıllık otsu bitkilerden oluşur. Çok yıllık dikenli *Astragalus* türlerinden ilaç ve tekstil sanayinde yaygın bir şekilde kullanılan kitre zamkı elde edilir. Bu bitkiler çıbanların tedavisinde kullanılan merhemlerde ve bazı güzellik ürünlerinin terkibinde de bulunmaktadır. Çok yıllık otsu *Astragalus* türlerinden bazıları ise hem meralarımız için yüksek besin değerine sahip önemli bir baklagil yem bitkisidir hem de kazık ve derin köklü olmaları nedeniyle erozyonun önlenmesinde etkilidir. *Astragalus* türlerinin bazıları ise süs bitkisi olarak değerlendirilebilecek niteliktedirler. Bazı *Astragalus* türlerinin olumsuz ortam şartlarına (soğuk, kuraklık tuz vb.) dayanıklılığı çok değişik habitatlarda yetişebilmelerini sağlar.

Astragalus, Dünya'da başlıca Avrasya, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'da kurak ve yarı kurak bölgelerde yayılım göstermektedir. Özellikle Güneybatı Asya (1000–1500 tür), Orta Asya'nın Sino- Himalaya bölgesi (500 tür), Alaska'dan Güney Meksika'ya, Güney Amerika'da (400-450 tür) ve Kuzey Amerika'da And dağları boyunca (100 tür) yayılış göstermektedir. Ülkemizde *Astragalus* türlerinin, Doğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgesi'ndeki 1300–3500 m yükseltilerde, İç Ege ve Toroslar'da 1300–2300 m yükseltilerde orman, step ve dağ yamaçlarında yayılış gösterdiği belirtilmiştir. (Oltulu 2008).

Bununla beraber, gelişme dönemlerinin uzun, tohum oluşturma ve çimlenme kapasitelerinin düşük olması bazı *Astragalus* türlerinin yetiştirilmesini veya adaptasyonunu zorlaştırmaktadır. Bu nedenle klonal çoğaltım çoğu durumda gerekli olabilmektedir. Eğer *Astragalus* türlerine uygun doku kültürü sistemleri geliştirilebilirse (özellikle somatik embriyogenesis) ileri ki dönemlerde modern tohum üretim sistemleriyle (sentetik tohum vb.) bitkinin hızlı bir şekilde üretimi sağlanacak, suni tohumlama yoluyla yeni meralar kısa sürede geliştirilebilecektir. Bu sayede vejetasyon düzeni bozulmuş ve ıslah gerektiren meraların iyileştirilmesi de mümkün olabilecektir. Doku kültürü ile geliştirilecek rejenerasyon sistemleri aynı zamanda türlerin klonal çoğaltılmasında ve genetik iyileştirmelerde önemli avantajlar sağlayacaktır. Bu sayede kaybolma tehlikesi içindeki endemik türlerin korunmasının yanı sıra ekonomik ve tarımsal kazancın elde edilmesi de mümkün olabilecektir. Dünyada son yıllarda özellikle de dar ve sınırlı yayılışa sahip endemik bitkilerin korunmaları konusunda kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizin sahip olduğu biyolojik çeşitliliğin ne derece zengin olduğu son yıllarda yapılan kapsamlı araştırmalarla oldukça net bir şekilde belirlenmiştir. İlk kez ülkemizde tanımlaması yapılarak bilim dünyasına kazandırılan türlere ait ekonomik özelliklerin belirlenmesi ve tarıma kazandırılması ülkemizi daha da zenginleştirecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Gelişen biyoteknolojik yöntemler, bitki ıslahında klasik yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç alınmasını ve türe sadece istenilen karakterlerin kazandırılmasını sağlamaktadır (Özcan ve ark. 2001a). Bitkilerde, yüksek oranda adventif sürgün oluşumu, bu amaçla yürütülen çalışmaların başarılı olma yüzdesini önemli düzeyde artırır. Bugün doku kültürü yöntemleri ile laboratuvar ortamında birçok bitkinin hızlı üretilmesi mümkün olmaktadır. Aynı zamanda doku kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar yapay tohum üretimi, somatik hibridizasyon ve gen kaynaklarının korunmasında da kullanılmaktadır (Babaoğlu ve ark. 2001).

Modern ıslah metotları olarak kabul edilen tekniklerden birisi olan doku kültürünün bitki ıslahında kullanılması hem zaman hem de uzun dönemde uygulandığı takdirde yapılacak masraflar açısından büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları= eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark. 2001).

Bitki büyüme düzenleyicileri doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan, bitkisel hormonlar ya da fitohormonlardır. Söz konusu maddeler bitkilerde çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve bitki metabolizmasında önemli görevler üstlenmektedirler. Yapıları itibariyle bitkilerde bulunan doğal hormonlara benzeyen sentetik düzenleyiciler üretilebilmekte ve hormon isminin elde edilen maddeleri tam

tanımlamamasından hareketle bunlara büyüme ve gelişme düzenleyiciler denmektedir (George 1993).

Büyüme düzenleyicilerinden oksinler; fotoperyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidir. Oksinler, doku kültüründe tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Köklendirmede Indole-3- butirik asit (IAA) temel hormon formu olarak kullanılır. Sentetik oksinler ise α-Naphthaleneacetic acid (NAA), Indol-3-bütirik asit (IBA), 2,4- dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D), Picloram ve 2,4,5-trikloro fenoksi asetik asit (2,4,5-T) olarak belirtilmektedir (Smith 1992).

Doğal sitokinin formları zeatin (ZEA) ve zeatin ribozid (ZR)'dir. İzopentil adenin (2IP), kinetin (KIN), 6-Benzil amino pürin (BAP) en çok kullanılan adenin (aminopurin) türevleridir. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (re-differentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup, antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler (Babaoğlu ve ark. 2001).

Astragalus ile yapılan çalışmalarda araştırıcılar, embriyogenik kallus oluşturmak için diğer baklagillerde olduğu gibi yüksek oranda 2,4-D ile düşük oranda BAP içeren ortamların iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Gelişen embriyogenik kallusları farklı konsantrasyonlara sahip BAP ve NAA içeren ortamlarda kültüre almışlar ve olgunlaşan embriyoları hormon içermeyen ortamlara aktararak bitkicik gelişimini sağladıklarını belirtmişlerdir (Luo ve ark. 1999, Hou ve Jia 2004a).

Somatik embriyogenesis için besin ortamında bulunan büyümeyi düzenleyicilerin yanında kullanılan mineral ve vitaminler de önemlidir (Atanassov ve Brown 1984; Moursy ve ark. 1995; Romagnoli ve ark. 1996).

Son yıllarda *Astragalus* türlerinde doku kültürü çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. *A. melilotoides*, *A. adsurgens* gibi türlerde hipokotil, kotiledon, gövde ve protoplastlarından somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla rejenerasyon olduğu bildirilmiştir (Luo ve Jia 1998; Luo ve ark. 1999; Hou ve Jia, 2004a; Hou ve Jia, 2004b). *A. cicer*, *A. polemoniacus ve A. duranii* ile yapılan çalışmalarda da hipokotil, kotiledon, yaprak, yaprak sapı, koltukaltı meristem eksplantları kullanılarak adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (Uranbey ve ark. 2003; Mirici 2004; Çöcü ve ark. 2005). Luo ve ark. (1999), *A. adsurgens*'in hipokotil eksplantlarından elde edilen embriyonik kallusların 1 gramında ortalama 280 embriyo oluştuğu bildirilmiştir.

Mirici (2004), endemik *A. polemoniacus* ile yaptığı çalışmada yaprak sapı eksplantından 4 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamda ortalama 14 adet sürgün elde etmiştir. Çöcü ve ark. (2005), endemik *Astragalus duranii*'de en fazla sürgün gelişiminin TDZ içeren ortamda meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Astragalus melilotoides ile yapılan organogenesis ve embriyogenesis çalışmasında kullanılan hipokotil ve gövde eksplantlarınından elde edilen kalluslarda, sürgün gelişimi olmasına rağmen, embriyo oluşumunun sadece hipokotil eksplantından oluşan kalluslarda meydana geldiği görülmüştür (Hou ve Jia 2004a). *Astragalus adsurgens* ile yapılan somatik embriyogenesis çalışmasında da yine kullanılan hipokotil, kök ve kotiledon eksplantlarından sadece hipokotil eksplantının embriyogenik kallus oluşturduğu belirlenmiştir (Luo ve ark. 1999).

Baklagil yem bitkilerinde *in vitro* koşullarda oluşan sürgünlerin köklendirilmesinde genellikle IBA, NAA, IAA gibi büyüme düzenleyicileri ile hormon içermeyen besin ortamları kullanılmaktadır. En iyi köklenmenin macar fiğinde 1 mg/l IBA (Sancak ve ark. 2000), korungada 1 mg/l IBA veya 1 mg/l NAA (Özcan ve ark. 1996), çilek üçgülünde ise 1-4 mg/l IAA (Singha ve ark. 1988) içeren besin ortamlarında olduğu bildirilmiştir. Luo ve Jia (1998), *Astragalus adsurgens*'den elde ettikleri sürgünleri hormon içermeyen ½ MS ortamında kültüre almışlar ve bazı sürgünlerde köklenmenin olduğunu, köklenmeyen sürgünleri farklı konsantrasyonda NAA içeren ortamlara aktardıklarında ise köklenme ile birlikte kallus oluşumunun da başladığını tespit etmişlerdir. Hou ve Jia (2004a), *Astragalus*

melilotoides ile yaptığı çalışmada köklendirme için IBA'nın NAA'dan daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Çöcü ve ark. (2005), *Astragalus duranii*'den elde edilen sürgünlerde en iyi köklenmenin 0.5 mg/l NAA içeren ortamda olduğunu belirtmişlerdir.

Astragalus türlerinin ülkemizde yetişen cinslerinden *A. maximus* ve endemik *A. chrysochlorus* ile doku kültürü yöntemi ile klonal çoğaltım yapılması amaçlanan bir çalışma ile ilk kez *A. maximus*'da aksillar tomurcuk kökenli klonal çoğaltım başarılmıştır. Klonal çoğaltım gövdelerin 0.5 mg/l ZR içeren MS besin ortamında kültüre alınması ile elde edildiği belirtilmiştir. Çoğaltılan gövdelerin daha sonra MS tuzlarını ½ ve sükrozu % 1.5 oranlarında içeren besin ortamında köklenme sağlandığı rapor edilmiştir. Ayrıca *A. maximus*'da kallus oluşumu ve dolaylı somatik embriyogensis yolu ile somatik embriyo oluşumu MS + 0.5 mg/l 2,4-D besin ortamında elde edildiğini ifade etmiştir (Turgut 2002).

Astragalus hamosus Akdeniz bölgesindeki otlaklarda tarımsal açıdan önemli tek yıllık baklagil yem bitkisidir. Diğer baklagil bitkileri gibi çimlenmenin gecikmesi veya engellenmesi ile sonuçlanan bir dormansi gösterir. *Astragalus hamosus*'un mekanik, fiziksel ve kimyasal skarifikasyon gibi dormansinin kırılması için yapılan uygulamalara verdiği yanıt incelenmiştir. Zımpara kağıdı ile yapılan uygulamanın nerdeyse tüm tohumlarda dormansiyi kırması ve en hızlı sonuç vermesi dormansinin tohum kabuğundan kaynaklığını göstermektedir. Sıcak suda bekletme uygulamasının da tohum kabuğundan kaynaklanan dormansinin uzaklaştırılmasında etkili olduğu, fakat 800 ℃'nin üzerindeki sıcaklıkların tohumlarda meydana gelen hasarı % 97.9'a çıkardığı belirtilmiştir (Patane ve Gresta 2006).

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

Tez projesinde materyal olarak *Astragalus schizopterus* Boiss. türü kullanılmıştır. Bu tür endemik olup, türe ait bitkiler ve olgun tohumlar, Burdur: Dirmil-Gölhisar, 7. km, 1175 m, 25.07.2006, açık yerlerden S.Ü. Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri Ahmet Duran 7334 ve Muhittin Dinç tarafından toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Astragalus schizopterus* Boiss.

3.2. Metot

Tüm doku kültürü işlemleri Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tüm sterilizasyon işlemleri laminar hava akışlı steril kabin içerisinde yapılmıştır. Kabin, alkol ile silinip U.V. açılarak 15 dakika çalıştırıldıktan sonra sterilizasyon işlemlerine geçilmiştir.

3.2.1. Tohumların sterilizasyonu

Denemede birincil eksplant kaynağı olarak aksenik fideler kullanıldığı için bitkinin tohumları % 70'lik alkol içinde 30 saniye bekletildikten sonra 1-2 damla Tween-20 damlatılmış % 20'lik ticari hipoklorit (% 50 NaOCl içeren HES çamaşır suyu ile hazırlanmış) çözeltisinde 10 dakika sterilize edilmiş ve steril saf su ile 3-4 kez durulanmıştır.

3.2.2. Tohumların çimlendirilmesi

A. schizopterus Boiss.'a ait bitki tohumlarında sert tohum kabuğundan kaynaklanan çimlenme problemi bulunmaktadır. Bu nedenle tohumlara farklı uygulamalar yapılmıştır. Yapılmış olan uygulamalar tohum kabuğunun zımparalanması, tohum kabuğunun bistüri ile çizilmesi ve hidroklorik asit (HCl) uygulamasıdır. Bir kısım tohum ise kontrol amacıyla hiçbir uygulamaya tabi tutulmamıştır.

3.2.3. Doku kültürü çalışmaları

Eksplantlar farklı içeriğe sahip 100 x 10 mm'lik özel petri kutularında hormon grid metodu uygulanarak temel besin ortamlarında (MS, B_5) çeşitli oksin ve sitokinin konsantrasyon (0, 0.5, 1.0, 2, 5 mg/l) ve kombinasyonlarında (NAA x BAP; NAA x TDZ; 2,4-D x KIN; IAA x ZEA) kültüre alınmıştır. Ortamlara yarı-katılaştırıcı olarak agar (7-8 g/l), karbon kaynağı olarak sakkaroz (% 3, a/h) ilave edilmiştir. Besin ortamları pH'sı 1 N KOH yada 1 N HCl kullanılarak 5.5–5.8'e ayarlanmış sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler 16 saat fotoperiyot, % 62–64 oransal nem, 24±1°C ve 3000 lüks beyaz floresan ışık yoğunluğu koşullarında raflı kültür dolabında tutulmuştur. Tüm Denemeler "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre tekerrürlü olarak kurulmuştur.

3.2.3.1. Kallus oluşturma kapasiteleri: Eksplantın kesilen kenarlarında oluşan kallustan herhangi bir doğrudan rejenerasyon olmaması durumunda bu kalluslar izole edilerek kallus kültür ortamlarına aktarılmıştır. Kalluslar daha sonra uygun ortamlara alınarak rejenerasyon potansiyelleri araştırılmıştır.

3.2.4. Gözlem ve ölçümler

3.2.4.1. Çimlenme değeri (%): Sterilize edilerek kağıt havlu arasında çimlendirme testine alınan tohumlarda 5., 7., 10., 12., 15. ve 20. gün sonunda çimlenme değeri belirlenmiştir.

3.2.4.2. Somatik dokulardan bitki rejenerasyonu: Hormon grid metoduna göre kültüre alınan farklı bitki kısımlarının farklı ortamlardaki durumu gözlemlenmiştir.

3.2.4.3. Kallus yolu ile bitki rejenerasyonu: Kültürdeki farklı bitki kısımlarının kallus oluşturma ve daha sonrasında rejenerasyon durumları tespit edilmiştir. Burada eksplantların kallus oluşturma potansiyelleri (%) ve kallus ağırlıkları (g) belirlenmiştir.

3.2.5. Verilerin değerlendirilmesi

Doku kültürü denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her tür ve eksplant için 100 x 9 mm'lik petrilerde 5 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Ayrıca gerekli durumlarda 4 tekerrürlü olarak 100x10 mm’ lik petri kutuları veya Magenta kültür kapları da kullanılmıştır. Deneme sonunda elde edilen veriler bilgisayarda MSTAT-C istatistik programı kullanılarak analiz edilmiş, önemli bulunan sonuçlarda çoklu karşılaştırma testi olan LSD yapılmıştır ve literatür bilgileri ile kıyaslamalı olarak yorumlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIRŞMA

4.1. Çimlendirme Çalışmaları

A. schizopterus Boiss.'a ait bitki tohumlarında sert tohum kabuğundan kaynaklanan çimlenme problemi bulunmaktadır. Bu nedenle tohumlara farklı uygulamalar yapılmıştır. Yapılmış olan uygulamalar tohum kabuğunun zımparalanması, tohum kabuğunun bistüri ile çizilmesi ve hidroklorik asit (HCl) uygulamasıdır. Bir kısım tohum ise kontrol amacıyla hiçbir uygulamaya tabi tutulmamıştır. Zımparalama ve bistüri ile tohum kabuğunun çizilmesi uygulamalarından 5 gün sonra çimlenme görülmüş ve 20. günde tüm çimlenme değerleri alınarak, bu değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *A. schizopterus* tohumlarının çimlenme durumu (%)

Uygulamalar	5.gün	7.gün	10.gün	12.gün	15.gün	20.gün
Kontrol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Çizme	46.7	63.3	86.7	86.7	96.7	96.7
Zımparalama	20.0	23.3	23.3	23.3	33.3	63.3
HCl ile muamele	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Sonuç olarak, bisturi ile çizme uygulamasında fide gelişiminin daha iyi olduğu ve çimlenme yüzdesinin de artması (% 96.7) nedeniyle sert kabukluluktan kaynaklanan çimlenme sorununun aşılması için bisturi ile çizme uygulamasının en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir.

4.2. Doku Kültürü Çalışmaları

Astragalus schizopterus Türkiye'de geniş yayılış gösteren, adaptasyon yeteneği çalışmadaki diğer *Astragalus* türlerine oranla daha yüksek olan endemik bir türdür. *Astragalus* türleri derin kök sistemine sahip olmaları nedeniyle toprağı tutarak erozyonu önleyici özelliğe sahiptirler. Doğal vejetasyonunda hayvanlar tarafından tüketilmektedir. Bu nedenle meraların ıslah edilmesinde kullanılabilecek özelliklere

sahiptirler. Fakat türlerin tohum bağlama ve çimlenme kapasitelerinin düşük olması nedeniyle klasik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Yeni biyoteknolojik yaklaşımlarla bu problemler giderilebilir. Bu nedenle türün doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılması ve adventif sürgün rejenerasyon yeteneği belirlenmeye çalışılmıştır. Doku kültürü çalışmalarında hipokotil, yaprak, yaprak sapı eksplantları farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

4.2.1. MS ve B_5 besin ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Doku kültüründe yapılan uygulamalardan biri de somatik embriyo yoluyla adventif sürgün rejenerasyonudur. Bu amaçla *A. schizopterus*'a ait yaprak ve yaprak sapı eksplantları farklı besin ortamlarına (MS ve B_5) 2,4-D (2, 4, 8 mg/l) ve KIN (0.5 mg/l) büyüme düzenleyicileri ilave edilerek kültüre alınmıştır. 5-6 gün sonra eksplantların tümünde kallus oluşumu başlamıştır. Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında B_5 besin ortamında kültüre alınan eksplantlardan gelişen kallusların gevşek dokulu ve sarı renkli, MS besin ortamında ise gevşek dokulu ve yeşil renkli oldukları gözlenmiştir. Ayrıca MS ortamında kallusların daha büyük oldukları ve bazı kalluslarda adventif köklerin oluştukları gözlenmiştir. Her iki ortamda da bazı kallusların üst kısımlarında beyazlaşmalar görülmüştür. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra ilk ortamlarının ½ katı 2,4-D konsantrasyonu içeren ortamlarda alt kültüre alınan kallusların kallus ağırlıkları alınmıştır. Bu ortamda kallusların büyüdükleri fakat herhangi bir embriyo veya sürgün gelişiminin olmadığı tespit edilmiştir. İkinci alt kültürden sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılan kalluslarda da bir değişime rastlanmamıştır. Kallus ağırlıklarına ait varyans analizi sonucunda kallus ağırlığı bakımından sadece eksplantlar arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Diğer değişkenler ve değişkenler arası etkileşimler arasında istatistiki olarak önemli farklılık yoktur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. MS ve B_5 besin ortamlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F.
Genel	35		
Besin Ortamı.	1	0.04	2.10
Ortam	2	0.02	0.79
Eksplant	1	0.20	10.61**
Besin Ort.x Ortam	2	0.01	0.40
Besin Ort. x Eksplant	1	0.01	0.75
Ortam x Eksplant.	2	0.01	0.47
Besin Ort. x Ortam x Eksplant	2	0.04	2.01
Hata	24	0.02	

Çizelge 4.3. MS ve B_5 besin ortamlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler(mg/l)			Kallus Ağırlığı(g)		
B.O.	**2,4-D**	**KIN**	**Yaprak**	**Y.sapı**	**Ort.**
	2		0.44	0.36	
MS	4	0.5	0.59	0.32	**0.40**
	8		0.34	0.36	
	2		0.42	0.30	
B_5	4	0.5	0.41	0.26	**0.34**
	8		0.46	0.16	
	Ort		**0.45 a**	**0.37 b**	

B.O.: Besin ortamı

Denemelerden elde edilen kallus ağırlıkları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Kallus ağırlığı bakımından yaprak eksplantı (0.45 g) yaprak sapı eksplantından (0.37 g) daha iyi sonuç vermiştir. Yaprak eksplantlarında en yüksek kallus ağırlığı (0.59 g) 4mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren MS besin ortamından elde edilmiştir Yaprak sapı eksplantında ise yine MS besin ortamında 2, 8 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortamlarda en yüksek sonuç (0.36 g) alınmıştır. B_5 besin ortamında ise yaprak

eksplantı 8 mg/l 2,4-D ve 0.5mg/l KIN içeren ortamda en yüksek (0.46 g) kallus ağırlığı oluştururken yaprak sapında 2 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortam en yüksek sonucu vermiştir. Besin ortamları açısından kallus ağırlıklarına bakıdığında MS besin ortamında kültüre alınan eksplantların kallus ağırlıkları ortalaması 0.40 g B_5 ortamında kültüre alınan eksplantların kallus ağırlığı ortalaması ise 0.34 g olmuştur. İkinci alt kültürden sonra büyüme düzenleyici içermeyen MS'e aktarılan kalluslarda embriyo oluşumu veya adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir.



Şekil 4.1. *A. schizopterus* bitkisinde 2,4-D ve KIN içeren MS ve B_5 ortamlarında kallus oluşumu, **a)** MS besin ortamındaki yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar **b)** MS besin ortamındaki yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar **c)** B_5 besin ortamındaki yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar **d)** B_5 besin ortamındaki yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar

Yapılan literatür taramasında farklı mineral ve vitamin içeriğine sahip besin ortamlarında başarılı sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir (Atanassov ve Brown 1984; Romagnoli ve ark. 1996). Bununla birlikte Suginobu ve ark. (1991) yonca'da MS ortamında B_5 ortamına göre kallusların daha büyük olduğunu ama B_5 ortamıyla

aralarında önemli bir farklılık bulunmadığını tespit etmişlerdir. En fazla somatik embriyoyu MS ortamından elde etmişlerdir. Bu çalışmada somatik embriyo oluşumu elde edilmese de kallus ağırlığı bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir. İstatistiksel olarak önemli farklılık bulunmasa da MS ortamındaki kallusların B_5 ortamındakilerden daha yüksek ağırlığa sahip oldukları tespit edilmiştir.

4.2.2. 2,4-D, KIN ve BAP büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Somatik embriyogenesis'de en çok kullanılan oksin 2,4-D'dir. Bu çalışmada, hipokotil, yaprak, yaprak sapı eksplantları kullanılarak 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamında iki farklı deneme kurulmuştur. Denemelerden birinde hipokotil eksplantı 1, 2, 4 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN veya 0.5 mg/l BAP içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Diğer denemede yaprak ve yaprak sapı eksplantları (0-5 mg/l) 2,4-D ve (0-5 mg/l) KIN içeren ortamlarda kültüre alınmıştır.

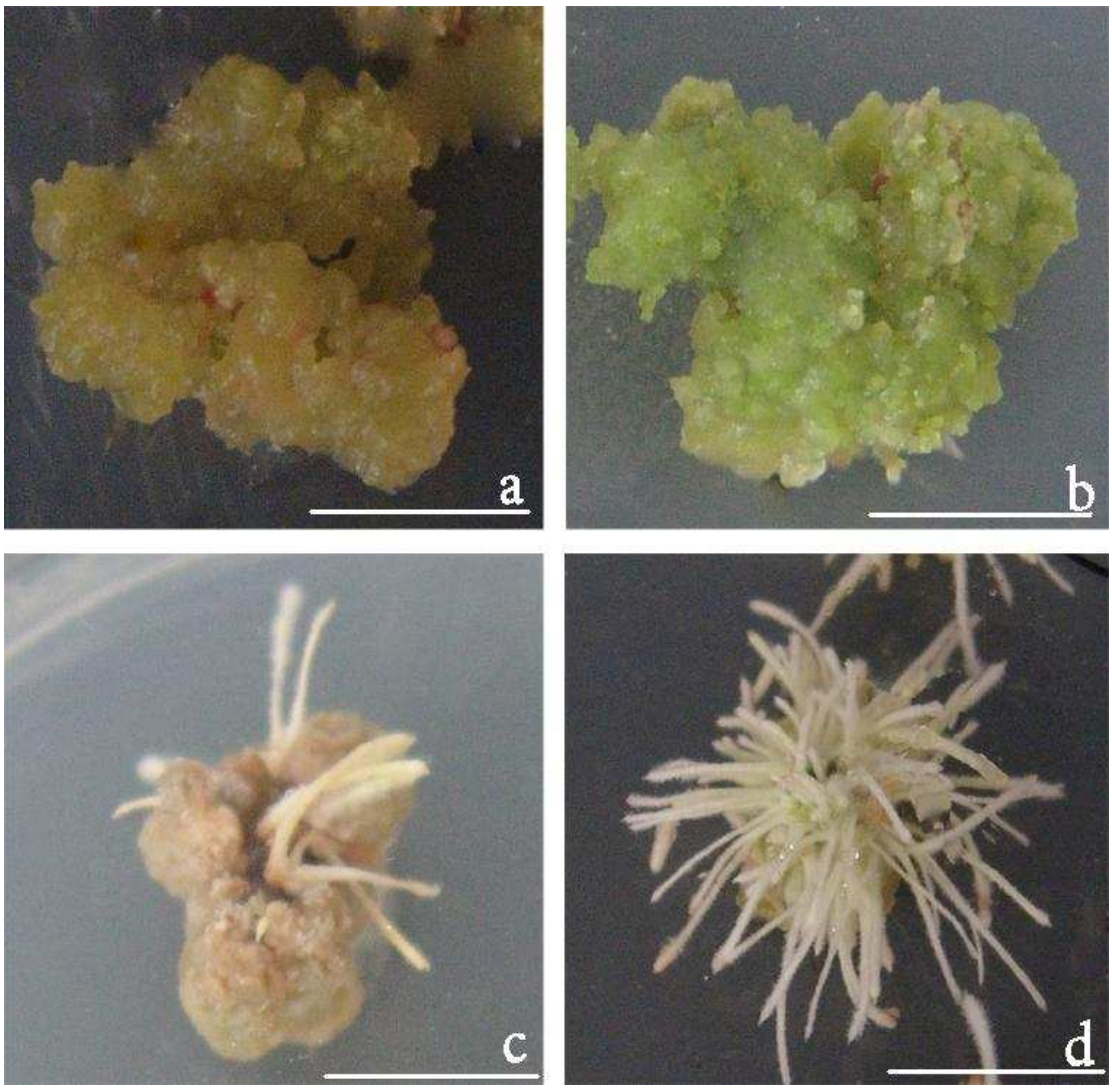
4.2.2.1. *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında 2,4-D ve KIN büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Bu denemede türe ait yaprak ve yaprak sapı eksplantları 0-5 mg/l 2,4-D ve 0-5 mg/l KIN içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 1 hafta sonra eksplantların kesilen kısımlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. 6 hafta sonunda ortamların çoğunda eksplantların tamamında kallus oluşumu gözlenmiştir. Gelişen kallusların farklı tiplerde olduğu tespit edilmiştir. Bazı kallusların sarımtrak, gevşek dokulu, bazılarının yeşil, daha sıkı dokulu, bazı kallusların ise kahverengi ve sıkı dokulu oldukları gözlenirken bazı kalluslarda da adventif köklerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.1a-d). Kallus ağırlıkları alınan kalluslardan yeşil ve sarı renkli kalluslar büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında alt kültüre alınmıştır. 8 hafta süre ile alt kültüre alınan kalluslarda embriyo yada sürgün oluşumuna rastlanmamıştır. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlıklarına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarının *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları		**Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi**		**Kallus Ağırlığı**	
	S.D.	**K.O.**	**F.**	**K.O.**	**F.**
Genel	199				
Ortam	24	13012.7	464.74**	2.09	58.33**
Eksplant	1	72.00	2.57	1.09	30.29**
OrtamxEksplant	24	63.67	2.27**	0.14	3.76**
Hata	150	28.00		0.04	

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortamlar ve ortam x eksplant etkileşimi arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık varken eksplantlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise tüm varyasyon kaynakları arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık vardır. Bu farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için LSD testi yapılmıştır (Çizelge 4.5-6).



Şekil 4.2. *A. schizopterus* bitkisinde 2,4-D ve KIN içeren ortamlarda kallus ve adventif kök oluşumu, **(a)** Kültürden 6 hafta sonra yaprak eksplantında 5 mg/l 2,4-D içeren ortamda gelişen kalluslar **(b)** Yaprak eksplantında 5 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortamda gelişen kalluslar **(c)** Yaprak eksplantında 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin içeren ortamda gelişen kalluslar ve adventif kökler (d) Yaprak sapı eksplantında 0.5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin içeren ortamda gelişen kalluslar ve adventif kökler (bar=1 cm)

Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından her iki eksplantta da ortamların çoğunda % 95-100 oranında kallus meydana getirirken 2,4-D içermeyen ortamların tamamında kallus oluşumu gözlenmemiştir. İkinci en düşük değer (% 75) ise 5 mg/l 2,4-D ve KIN içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantından elde edilmiştir. Yaprak eksplantında ise ikinci en düşük değer % 85 ile 2 mg/l 2,4-D içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarında *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)		Ort.
2,4-D	**KIN**	**Yaprak**	**Y.sapı**	
0.0	**0.0**	- d	- d	- c
0.5		100 a	100 a	100 a
1.0		100 a	100 a	100 a
2.0		95 a	85 b	90 b
5.0		100 a	100 a	100 a
0.0	**0.5**	- d	- d	- c
0.5		100 a	100 a	100 a
1.0		100 a	100 a	100 a
2.0		100 a	100 a	100 a
5.0		100 a	100 a	100 a
0.0	**1.0**	- d	- d	- c
0.5		100 a	100 a	100 a
1.0		100 a	100 a	100 a
2.0		100 a	95 a	97.5 a
5.0		100 a	100 a	100 a
0.0	**2.0**	- d	- d	- c
0.5		100 a	100 a	100 a
1.0		95 a	100 a	97.5 a
2.0		100 a	100 a	100 a
5.0		100 a	100 a	100 a
0.0	**5.0**	- d	- d	- c
0.5		100 a	100 a	100 a
1.0		100 a	100 a	100 a
2.0		95 a	100 a	97.5 a
5.0		100 a	75 c	87.5 b
Ortalama		**79.4**	**78.2**	

$LSD_{0.01}$: 6.90

Çizelge 4.6. Farklı 2,4-D ve KIN dozlarında *A. schizopterus* yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		Kallus Ağırlığı (g)		Ort.
2,4-D	**KIN**	**Yaprak**	**Y.sapı**	
0.0		- p	- p	- g
0.5		0.39 mno	0.40 l-o	0.40 f
1.0	**0.0**	0.94 f-j	0.46 l-o	0.70 cd
2.0		0.62 j-o	0.27 op	0.45 ef
5.0		1.00 e-h	0.49 l-o	0.75 c
0.0		- p	- p	- g
0.5		0.63 ı-n	0.36 no	0.50 def
1.0	**0.5**	1.92 a	1.47 bcd	1.70 a
2.0		0.58 k-o	0.75 h-l	0.67 cde
5.0		0.50 k-o	0.43 l-o	0.47 def
0.0		- p	- p	- g
0.5		1.32 cde	1.37 cd	1.35 b
1.0	**1.0**	1.59 abc	1.15 d-g	1.37 b
2.0		0.98 e-ı	1.37 cd	1.18 b
5.0		1.13 d-g	0.40 l-o	0.77 c
0.0		- p	- p	- g
0.5		0.33 nop	0.44 l-o	0.39 f
1.0	**2.0**	0.62 j-n	0.48 l-o	0.55 c-f
2.0		0.67 h-n	0.59 j-o	0.63 c-f
5.0		0.73 h-m	0.40 l-o	0.57 c-f
0.0		- p	- p	- g
0.5		0.49 l-o	0.66 h-n	0.58 c-f
1.0	**5.0**	0.84 g-k	0.51 k-o	0.68 cde
2.0		1.79 ab	1.59 abc	1.69 a
5.0		1.41 cd	1.21 def	1.31 b
Ortalama		**0.74 a**	**0.59 b**	
$LSD_{0.01}$: 0.35		**$LSD_{0.01}$: 0.25**		

Çizelge 4.6'da kallus ağırlığı bakımından ortam x eksplant etkileşimi arasında 0.01 düzeyindeki farklılıklar arasındaki önem düzeylerine bakıldığında en yüksek kallus ağırlığı (1.92 g) 1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından elde edilmiştir. Yine yaprak eksplantında 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l

KIN ile 2 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l KIN içeren ortamlardan elde edilen değerler (1.59 ve 1.79 g) istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır.Yaprak sapı eksplantında da 2 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l KIN içeren ortamdan elde edilen değer (1.59 g) aynı grupta yer almıştır. Kallus ağırlığı bakımından en düşük değerler 2,4-D içermeyen ortamlarda kallus oluşmadığı için 0.5-5 mg/l KIN içeren ve büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamlarından elde edilmiştir. 2 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantlarından elde edilen sonuçta (0.27 g) istatistiksel olarak en düşük değeri gösteren grupta yer almıştır.

A. adsurgens'in hipokotil eksplantları ile yapılan çalışmada 2 mg/l 2,4-D veya 2 mg/l 2,4-D ve 0.5, 1, 1.5, 2 mg/l BA içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantların 4 farklı tipte kallus oluştuğunu rapor edilmiştir. Oluşan kallusların bir kısmı sarı gevşek dokulu, bir kısmı yeşil sıkı dokulu, bir kısmı yeşil–kahverengi sıkı dokulu ve kahverengi gevşek dokulu olduklarını bildirmişlerdir. Adventif sürgün rejenerasyonu bakımından en iyi sonucu sarı gevşek dokulu kallus tipinden aldıklarını diğer kallus tiplerinde çok düşük oranda sürgün rejenerasyonu gözlediklerini bildirmişlerdir (Luo ve Jia 1998). Bu çalışmada da kallus morfolojisi bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat farklı tiplerde kallusların oluştuğu gözlenmesine rağmen adventif sürgün rejenerasyonu veya somatik embriyo oluşumu tespit edilmemiştir.

A. schizopterus türünde yapılan denemelerde organogenesis veya embriyogenesis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Türlerin rejenerasyon yeteneğini etkileyen faktörlerden biri de bitkinin genotiptir. Soya (Parrott ve ark. 1989), mısır (Green ve Phillips 1975; Beckert ve Qing 1984), arpa (Hanzel ve ark. 1984), buğday (Sears ve Deckard 1982) ve pamuk (Trolinder ve Xhixian 1989) gibi bir çok kültür bitkisinde bireysel genotiplerin rejenerasyonu etkilediği belirlenmiştir. Yonca ile yapılan bir çalışmada da iki genin yüksek rejenerasyon yeteneği sağladığı belirtilmiştir (Reisch ve Bingham 1980). *A. schizopterus*'un genetik olarak rejenerasyon yeteneği düşük olabileceğinden yapılan denemelerde sürgün rejenerasyonu elde edilememiş olabilir.

4.2.2.2. *A. schizopterus* hipokotil eksplantında 2,4-D, KIN ve BAP büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

A. schizopterus'un 15 günlük steril fidelerinden izole edilen hipokotil eksplantları farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 4 mg/l) 2,4-D ile 0.5 mg/l KIN veya BAP içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 6-7 gün sonra kallus oluşumu başlamış ve tüm ortamlarda eksplantların hepsi kallus oluşturmuştur. KIN içeren ortamlarda kalluslar gevşek dokulu ve sarı renkli, BAP içeren ortamlarda ise daha sıkı dokulu ve yeşil-sarı renkli olmuşlardır. 6 hafta sonra kallus ağırlıkları alınan kalluslar büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında alt kültüre alınmışlardır. Bu ortamda kallus miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Daha sonra 0.2 mg/l BAP içeren ortamlara aktarılan kallusların kararmaya başladıkları gözlenmiştir. Fakat herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir. Kallus ağırlıklarına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı 2,4-D, KIN ve BAP dozlarının *A. schizopterus*'un hipokotil eksplantında kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F.
Genel	17		
Ortam	2	0.003	0.725
BDÇ*	1	0.162	45.195**
Ortam x BDÇ	2	0.005	1.424
Hata	12		

*BDÇ: Büyüme düzenleyici çeşidi

Varyans analizi sonucunda hipokotil eksplantında kallus ağırlığı bakımından ortamlar ve ortam x BDÇ etkileşimi arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır. Büyüme düzenleyici çeşidi arasında ise 0.01 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur (Çizelge 4.7). Denemelerden elde edilen ortalama değerler Çizelge 4.8' de verilmiştir.

A. schizopterus hipokotil eksplantında kallus ağırlığı bakımından KIN ve BAP büyüme düzenleyicilerinin etkisi incelendiğinde BAP içeren ortamlarda kallus ağırlığının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. BAP içeren ortamlarda kallus ağırlığı ortalaması 0.32 g iken KIN içeren ortamlarda 0.13 g olmuştur. Kallus ağırlığı bakımından en yüksek sonuç (0.36 g) 4 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l BAP içeren ortamdan

elde edilmiştir. En düşük kallus ağırlığı ise 0.11 g ile 4 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı 2,4-D, KIN ve BAP dozlarında *A. schizopterus*'un hipokotil eksplantında kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)			**Kallus Ağırlığı (g)**	
2,4-D	**KIN**	**BAP**	**Hipokotil**	**Ort.**
1.0	0.5		0.13	
2.0	0.5		0.14	0.13 b
4.0	0.5		0.11	
1.0		0.5	0.27	
2.0		0.5	0.33	0.32 a
4.0		0.5	0.36	

Takamizo ve ark. (1991), 26 çeşit kullanarak yaptıkları somatik embriyo oluşumu denemelerinde 3 Japon çeşidinde somatik embriyo oluşumunun düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan bir tanesini model bitki olarak kullanarak inatçı kültürler için iyi bir rejenerasyon protokolü geliştirmeyi amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmada 2 mg/l 2,4 D içeren UM ortamında 4 sitokinin (BA, 2IP, KIN, ZEA) etkisine baktıklarında BA'nın hem kallus oluşumu hem de somatik embriyo oluşumunda çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar bu çalışmadan da elde edilmiştir. *A. schizopterus* ile yapılan diğer denemelerden rejenerasyon yeteneğinin düşük olduğu söylenebilir. Bu denemede de kallus ağırlığı bakımından BAP içeren ortamlar daha iyi sonuç vermiştir. Kallus morfolojisi bakımından ise KIN içeren ortamlar BAP içeren ortamlara göre daha fazla embriyogenik kallus yapısı göstermektedir. Alt kültürlerde kalluslar üzerinde embriyo veya sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

4.2.3. BAP ve NAA büyüme düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

Türe ait 30 günlük steril fidelerden elde edilen yaprak ve yaprak sapı eksplantları farklı konsantrasyonlarda BAP (1,2 ve 4 mg/l) ve NAA (0.5 mg/l) içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 2 hafta sonra eksplantlar üzerinde kallus oluşumu gözlenmiş ve ortamların tümünde eksplantların tamamının

kallus oluşturdukları görülmüştür. Kallusların koyu yeşil ve sıkı dokulu bir yapıya sahip oldukları belirlenmiştir. Bu kalluslar 6 hafta sonra kallus ağırlıkları alınarak büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Kallus ağırlığına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı BAP ve NAA dozlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D.	K.O.	F.
Genel	17		
Ortam	2	0.32	6.39*
Eksplat	1	0.03	0.77
Ortam x Eksplant	2	0.02	0.49
Hata	12	0.05	

Kallus ağırlıkları bakımından *Astragalus schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında ortamlar arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılık bulunmuştur. Eksplantlar ve ortam x eksplant etkileşimi arasında ise önemli farklılık bulunmamıştır. Ortamlar arasındaki farklılıkların önem düzeyini belirlemek için yapılan LSD testi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Ortamlar arasında kallus ağırlığı bakımından en yüksek ortalama değer (0.89 g) 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda elde edilirken, en düşük ortalama değer 0.43 g ile 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Kallus ağırlıkları bakımından ortam x eksplant etkileşimi arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz olmasına rağmen en yüksek kallus ağırlığı (0.95 g) 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınan yaprak eksplantından elde edilirken, en düşük kallus ağırlığı (0.41 g) yine aynı eksplantta 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Yaprak sapı eksplantında da yine aynı ortamlarda en yüksek (0.84 g) ve en düşük (0.46 g) kallus ağırlıkları elde edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Farklı BAP ve NAA dozlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		**Kallus Ağırlığı (g)**		
BAP	**NAA**	**Yaprak**	**Y. sapı**	**Ort.**
1.0	0.5	0.95	0.84	**0.89 a**
2.0	0.5	0.41	0.46	**0.43 b**
4.0	0.5	0.72	0.50	**0.61 ab**
	Ort.	**0.70**	**0.60**	

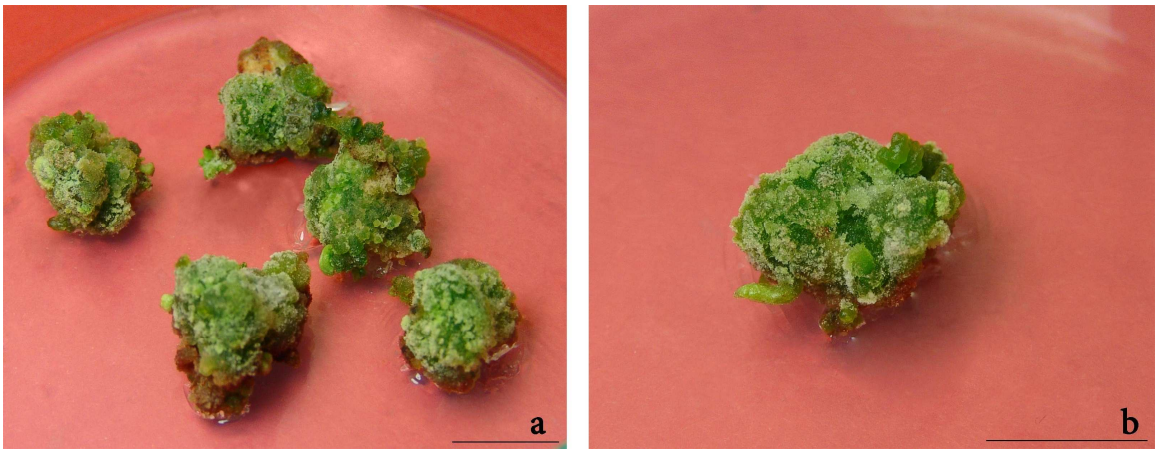
LSD 0.05: 0.2841

Büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında alt kültüre alınan kallusların büyüdükleri gözlenirken adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. *Astragalus*'un farklı türlerinde yapılan çalışmalarda BAP ve NAA büyüme düzenleyicileri kullanılarak organogenesis ile adventif sürgün rejenerasyonu çeşitli araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir (Uranbey 2003; Hou ve Jia 2004a; Mirici 2004). Fakat *A. schizopterus* ile yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *A. cariensis ve A. nezaketae* türlerinde BAP ve NAA büyüme düzenleyicilerinin kullanıldığı ortamlarda rejenerasyon elde edilmesine rağmen A. *schizopterus*'da adventif sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir.

4.2.4. TDZ ve NAA büyüme düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

TDZ ile TDZxNAA farklı konsantrasyonlarının *A. schizopters*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. 30 günlük steril fidelerden alınan eksplantlar 0.2, 0.4, 0.6 mg/l TDZ ile 0.2, 0.4, 0.6 mg/l TDZ x 0.2 mg/l NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu ortamlarda 6 hafta süre ile kültüre alınan eksplantların NAA içeren ortamlarda tamamının kallus oluşturduğu sadece TDZ içeren ortamlarda ise yaprak eksplantlarından çoğunun yaprak sapı eksplantlarından ise bir kısmının kallus oluşturduğu gözlenmiştir.

Kallusların sıkı dokulu, kahverengi bölgeler içeren koyu yeşil ve karsı oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.2a-b). Kalluslar 6 haftanın sonunda kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlıkları alınarak büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında alt kültüre alınmıştır. Bu değerlere ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Alt kültüre alınan kalluslarda adventif sürgün gelişimi olmamıştır.



Şekil 4.3. *A. schizopterus* bitkisinde TDZ ve NAA içeren ortamlarda kallus oluşumu, **(a)** Kültürden 6 hafta sonra yaprak sapı eksplantında 0.2 mg/lTDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren ortamda gelişen kalluslar **(b)** Yaprak eksplantında 0.6 mg/l TDZ içeren ortamda gelişen kalluslar (bar= 1 cm).

Çizelge 4.11. Farklı TDZ ve NAA dozlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumuna ve kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları		**Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi**		**Kallus Ağırlığı**	
	S.D.	**K.O.**	**F.**	**K.O.**	**F.**
Genel	35				
Ortam	5	4959.37	74.41**	1.68	68.14**
Eksplant	1	9998.67	150.02**	0.01	0.27**
OrtamxEksplant	5	2079.75	31.20**	0.16	6.38**
Hata	24	66.65		0.03	

Kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığı bakımından ortamlar, eksplantlar ve ortam x eksplant etkileşimi arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık

bulunmuştur. (Çizelge 4.11). Farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için LSD testi yapılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Farklı TDZ ve NAA dozlarında *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		**Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)**			**Kallus Ağırlığı (g)**		
TDZ	**NAA**	**Yaprak**	**Y.sapı**	**[1]Ort.**	**Yaprak**	**Y.sapı**	**[1]Ort.**
0.2	-	60.00 b	0.00 e	30.05 c	0.05 d	0.00 d	0.03 c
0.4	-	100.00 a	20.00 d	60.00 c	0.15 d	001 d	0.08 bc
0.6	-	100.00 a	40.00 c	70.00 b	0.59 c	0.03 d	0.31 b
0.2	0.2	100.00 a	100.00 a	100.00 a	1.16 d	1.13 ab	1.15 a
0.4	0.2	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0.94 abc	1.26 a	1.10 a
0.6	0.2	100.00 a	100.00 a	100.00 a	0.86 bc	1.15 ab	1.00 a
	[2]Ort.	93.33 a	60.00 b		0.63 a	0.60 b	

Kallus oluşturan eks. yüzdesi [1]LSD $_{0.01}$: 13.18, [2]LSD $_{0.01}$: 7.61, LSD $_{0.01}$: 18.64
Kallus ağırlığı [1]LSD $_{0.01}$: 0.25, [2] LSD $_{0.01}$: 0.15, LSD 0.01: 0.36

Çizelge 4.12'de yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesine ait değerlere bakıldığında ortamlar arasında NAA içeren ortamlarda kallus oluşumu % 100 iken sadece TDZ içeren ortamlarda % 30-70 arasında olmuştur. Eksplantlar arasında ise yaprak eksplantı en yüksek (% 93.33) kallus oluşum oranına sahipken yaprak sapında bu değer % 60 olmuştur. Ortam x eksplant etkileşimi açısından kallus oluşturan eksplant yüzdesi değerlendirildiğinde her iki eksplant da NAA içeren ortamlarda % 100 kallus oluştururken sadece TDZ içeren ortamlarda yaprak eksplantı 0.2 mg/l TDZ içeren ortamda en düşük (% 60) değeri vermiştir. Yaprak sapı eksplantında ise yine aynı ortamda kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Kallus ağırlıkları bakımından ortamlar arasında en yüksek ortalama değer (1.15 g) 0.2 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken, en düşük ortalama değer (0.03 g) 0.2 mg /l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Eksplantlar

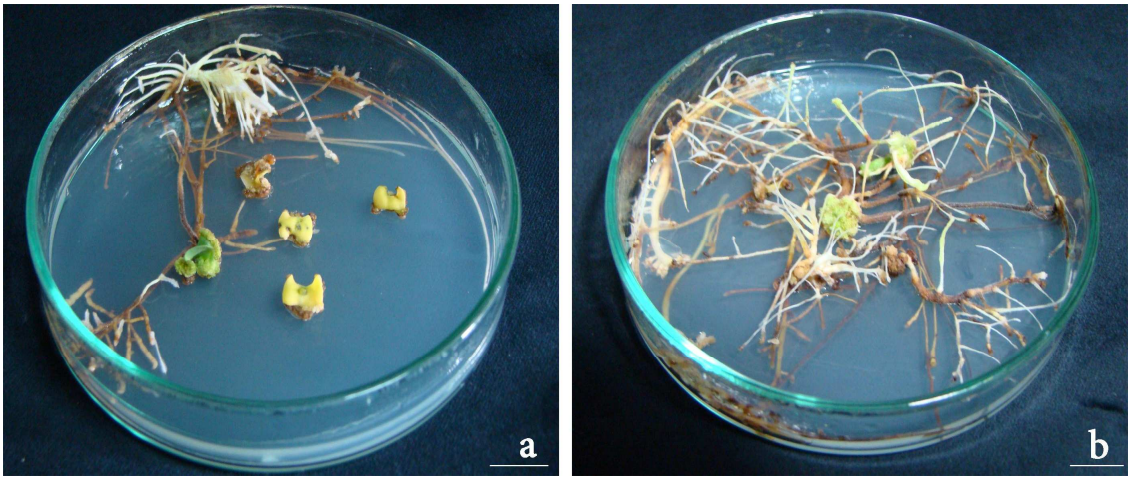
arasında 0.63 g ile yaprak eksplantında, yaprak sapı eksplantına göre (0.60 g) daha yüksek kallus ağırlığı elde edilmiştir. Ortam x eksplant etkileşimi incelendiğinde en yüksek kallus ağırlığı 0.4 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantından (1.26 g) elde edilirken, aynı eksplant 0.2 mg/l TDZ içeren ortamda kallus oluşumu olmadığı için kallus ağırlığı bakımından en düşük değeri vermiştir (Çizelge 4.12).

Mirici (2004), *Astragalus polemoniacus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarıyla yaptığı çalışmada 0.1, 0.2, 0.4 mg/l TDZ ve 0.1, 0.2, 0.4 mg/l TDZx0.1 mg/l NAA konsantrasyonlarında yaptığı denemelerde kallus oluşturan eksplant yüzdesinin her iki eksplantta da 0.2 mg/l TDZ ve 0.1 mg/l NAA içeren ortamdan % 100 ile en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir. Başalma ve ark. (2008) ise *A. cicer* ile yaptıkları çalışmada TDZ'nin farklı konsantrasyonlarında (0.05-1 mg/l) kültüre aldıkları hipokotil ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşum oranlarını vermişlerdir. Hipokotil eksplantında 0.25-1 mg/l TDZ içeren ortamlarda % 100 kallus oluştuğunu, kotiledon eksplantında ise en yüksek sonucun (% 50) 1 mg/l TDZ içeren ortamdan alındığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, her iki eksplant tipinde kallus oluşumu bakımından en iyi sonuç (% 100) 0.2, 0.4, 0.6 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Mirici (2004), Başalma ve ark. (2008) yaptıkları çalışmalarında, sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini belirtmişlerdir. Fakat bu çalışmada sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir.

4.2.5. IAA ve ZEA büyüme düzenleyicilerin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisi

A. schizopterus'da IAA ve ZEA büyüme düzenleyicilerinin adventif sürgün rejenerasyonuna etkisini araştırmak için yaprak ve yaprak sapı eksplantları 2, 4 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA ile 2, 4 mg/l ZEA ve 0.5 mg/l IAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından 2 hafta sonra bazı eksplantlarda kallus oluşumu başlamıştır. Kallusların sadece eksplantların kesilen yüzeylerinde az miktarda geliştiği ve 2 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamda bazı kalluslarda adventif köklerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.3a-b). Kallusların çoğunun kısa

sürede karardıkları görülmüştür. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve gelişen kallusların kallus ağırlıkları 6 hafta sonunda belirlenerek kalluslar atılmıştır. Bu değerlere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *A. schizopterus* bitkisinde IAA ve ZEA içeren ortamlarda kallus ve adventif kök oluşumu, **(a-b)** Kültürden 6 hafta sonra 2 mg/l IAA ve 0.5 mg/l zeatin içeren ortamda yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında gelişen kallus ve adventif kökler (bar0 1 cm)

Çizelge 4.13. Farklı IAA ve ZEA dozlarının *A. schizopterus*'un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşumuna ve kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	**S.D.**	**Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi**		**Kallus Ağırlığı**	
		K.O.	**F.**	**K.O.**	**F.**
Genel	23				
Ortam	3	0.81	14.82**	0.76	4.06
Eksplant	1	0.02	0.03	0.01	0.02
OrtamxEksplant	3	0.09	1.64	0.002	0.01
Hata	16	0.05		0.19	

Varyans analizi sonucunda kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ortamlar arasında 0.01 düzeyinde önemli farklılık varken eksplantlar ve ortam x eksplant etkileşimi arasında önemli farklılık bulunmamıştır. Kallus ağırlığı bakımından ise varyasyon kaynakları arasında istatistiksel farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için LSD testi yapılmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. ’de yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesine ait değerlere bakıldığında kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi ortamların (% 100) 2, 4 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamlar olduğu görülmektedir. 0.5 mg/l IAA ve 4 mg/l ZEA içeren ortamda ise % 29.99 ile kallus oluşturan eksplant yüzdesi en düşük seviyede olmuştur. Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarının her ikisi de 2, 4 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamlarda % 100 oranında kallus oluştururken, en düşük kallus oluşumu yaprak sapı eksplantından 2, 4 mg/l ZEA ve 0.5 mg/l IAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Kallus ağırlığı bakımından ise istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmasa da benzer sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek kallus ağırlığı (0.79 g) 4 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamda kültüre alınan yaprak sapı eksplantından elde edilirken, en düşük değer (0.02 g) her iki eksplantta da 0.5 mg/l IAA ve 2 mg/l ZEA içeren ortamdan elde edilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı IAA ve ZEA dozlarında *A. schizopterus*’un yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi ve kallus ağırlığı

Büyüme Düzenleyiciler (mg/l)		**Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)**			**Kallus Ağırlığı (g)**		
IAA	**ZEA**	**Yaprak**	**Y.sapı**	**Ort.**	**Yaprak**	**Y.sapı**	**Ort.**
0.5	2.0	40.00	26.66	33.33 b	0.02	0.02	0.02
0.5	4.0	33.33	26.66	29.99 b	0.04	0.03	0.03
2.0	0.5	100.00	100.00	100.00 a	0.38	0.45	0.41
4.0	0.5	100.00	100.00	100.00 a	0.75	0.79	0.77

$LSD_{0.01}$: 0.3955

Yapılan literatür taramalarında *Astragalus schizopterus*' ta IAA ve ZEA’nın organogenesis veya embriyogenesise etkisine ait çalışmaya rastlanılmamıştır. *A. cariensis* ve *A. nezaketae*’de az miktarda sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. *A. antalyensis*’de sürgün rejenerasyonu olmamasına rağmen *A. schizopterus* ile karşılaştırıldığında kallus morfoloji bakımından oldukça farklı sonuçlar alınmıştır. *A. antelyansis*’de kalluslar gevşek dokulu sarı-yeşil renkli, *A.schizopterus*’da ise yeşil-kahverenginde ve sıkı dokuludurlar. Ayrıca, 2 mg/l IAA ve 0.5 mg/l ZEA içeren ortamda adventif kök oluşumu gözlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

A. schizopterus ile yapılan çalışmalarda yaprak ve yaprak sapı eksplantları BAP, NAA, TDZ, IAA, ZEA içeren MS ortamı ile 2,4-D ve KIN içeren MS ve B_5 ortamlarında kültüre alınmıştır. Hipokotil eksplantları da 2,4-D ile KIN veya BAP içeren ortamlarda denenmiştir, denemelerde sürgün rejenerasyonu tespit edilememiş, kallus oluşturma oranının ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. BAP x NAA, TDZ, TDZ x NAA ile IAA ve ZEA içeren ortamlarda yaprak eksplantı tüm ortamlarda kallus oluştururken, yaprak sapı 0.2 mg/l TDZ dozu dışındaki ortamlarda kallus oluşturmuştur. IAA ve ZEA denemesinde ise yüksek IAA dozu içeren ortamlarda kallus oluşumu % 100 olurken ZEA dozunun yüksek olduğu ortamlarda en yüksek % 40 olmuştur. Kallus ağırlığı bakımından da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

MS ve B_5 besin ortamları arasında istatistiksel farklılık gözlenmemiştir. Fakat MS besin ortamında kallus ağırlığı ve büyüklüğü B_5 ortamına göre daha fazladır. Bu denemede eksplantlar arasında önemli farklılık bulunmuştur. Kallus ağırlığı bakımından yaprak eksplantı en iyi sonucu (0.45 g) vermiştir. Hipokotil eksplantı ile yapılan denemede ise kallus ağırlığı bakımından BAP içeren ortamlardan daha yüksek sonuç (0.32 g) alınmıştır. Fakat kallus morfolojisi bakımından KIN içeren ortamlardaki kallusların daha gevşek dokulu ve embriyogenik kallus yapısına daha yakın oldukları gözlenmiştir. Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarının 2,4-D ve KIN içeren ortamlarda kültüre alındığı denemelerde 2,4-D içermeyen ortamlarda eksplantların kallus oluşturmadığı belirlenmiştir. Kallus oluşumu için ortamda mutlaka oksin bulunması gerektiği tespit edilmiştir. Yaprak eksplantının diğer denemelerde olduğu gibi yaprak sapı eksplantına oranla kallus oluşumu ve kallus ağırlığı bakımından daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, *A. schizopterus*'da yapılan denemelerde adventif sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Türün genetik olarak rejenerasyon yeteneği düşük olabilir. Fakat sıvı kültürler veya süspansiyon kültürleri ile farklı besin ortamları kullanarak yapılacak denemelerde sürgün rejenerasyonu elde edilebilir. Yapılacak denemelerde, kallus oluşumu için oksin içeren ortamların ve eksplant olarak yaprak eksplantının kullanılması önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

Açıkgöz, E., 2001. Yem Bitkileri, U.Ü. Güçlendirme Vakfı Yayını No:182, Bursa, S: 41-66.

Atanassov, A.I., Brown, D.C.W., 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyII protoplasts of *Medicago sativa* L., Plant Cell Tissue Organ Culture, 3: 149-162.

Avcıoglu, R., Açıkgöz, E., Soya, H. ve Tan, A., 2000.V. Teknik Tarım Kongresi. Ankara S:567.

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları 11 Bölüm, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya. 374 s.

Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Bölüm 1 Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi: I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, ISBN: 975-6652-03-09.

Basalma, D., Uranbey, S., Gurlek, D., Ozcan, S., 2008. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. African Journal of Biotechnology, 7 (8), 955-959.

Beckert, M., Qing, C.M., 1984. Results of a diallel trial and a breeding experiment for *in vitro* aptitude in maize. Theoretical and Applied Genetics, 68, 247-251.

Çobanoğlu, D**.,** 1987. *Astragalus cepholotes* Banks.& Sol var. *Brevicialyx* Eig. (Fabaceae)'in Morfolojik ve Sitolojik Özellikleri, VIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 199–214, İzmir

Çöcü, S., Erişen, S. Duran, A., Hamzaoğlu, H., Gürlek, D., Parmaksız, İ., Mirici, S. 2005. Lokal Endemik *Astragalus duranii* Türünün *In Vitro* Hızlı Çoğaltımı. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos-2 Eylül, Eskişehir.

Davis, P. H.,1965. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. 1: 219-236, Edinburgh.University Press, Edinburgh.

Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg Unv. Pres. Edinburg.

George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture Part I. The Technology, Second Edition, Exegetics Ltd. England, p. 74

Green, C.E., Phillips, R.L., 1975. Plant regeneration from tissue cultures of maize, Crop Science, 15, 417-421.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. & Başer, K.H.C. (eds.), 2000, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Suppl.) 11: 513 - 616: Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.

Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkman, M.A., Endos, E., 1984. Genotype and media effects of callus formation and regeneration in barley, Crop Science, 25, 27-31.

Hou, S.W., Jia, J.F. 2004a. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocıtyl and stem explants via somatic embrryogenesis and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 95-100.

Hou, S.W., Jia, J.F. 2004b. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. Plant Cell. Rep., online.

Luo, J.P., Jia, J.F. 1998. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens***.** Plant Cell. Rep. 17: 567 – 570.

Luo, J.P., Jia, J.F., Gu, Y.H., Liu, J. 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. Plant Science 143:1, 93-99.

Mirici, S. 2004. Endemik Geven (*Astragalus polemoniacus* Bunge) Bitkisinin Yaprak Sapı Ve Yaprak Eksplantlarından Yüksek Oranda Adventif Sürgün Rejenerasyonu. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18 (34), 31-34.

Moursy, H.A., Haggag, M.E.A., Ghanem, S.A., Rady, M.R. 1995. Callus induction and plant regeneration of alfalfa. Egyptian Journal of Agronomy 20:1-2, 179-189.

Murashige, T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

Oltulu, B., 2008. *Astragalus trojanus* (geven) bitkisinin farklı *in vitro* besin ortamlarında rejenerasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik A.B.D. Yüksek Lisans Tezi.

Orak A., Ateş E. 2009. Ekolojik Tarımda Baklagillerin Rolü. http://www.bugday.org/article. php?ID=133 (on line erişim: 06.05.2009)

Özcan, S., Sevimay, C.S., Yıldız, M., Sancak, C., Özgen, M. 1996. Prolific shoot regeneration from immature embriyo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Plant Cell Rep., 16: 200-203.

Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M. 2001a. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları 16. Bölüm, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 2001, 454 s.

Parrott, W.A., Williams, E.G., Hildebrand, D.F., Collins G.B. and Williams, E.G., Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean plantcell. Tissue and Organ Culture, 16, 15-21, (1989).

Patane, C., Gresta. F., 2006. Germination of Astragalus hamosus and Medicago orbicularis as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. Journal of Arid Environments 67:165-173.

Reisch B. and Bingham E.T., 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. Plant Science Lett. 20: 71-77.

Romagnoli, M.V., Ortiz, J.P.A., Cervigni, G.D. 1996. High Frequency somatic embryogenesis with a pampeana-derived genotype of alfalfa. Euphytica 90: 1, 89-93.

Sancak, C., Mirici, S., Özcan, S. 2000. High frequency shoot rejeneration from immature embriyo explants of Hungarian vetch, Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 61: 231-235.

Singha, S., Baker, B.S., Bhatia, S.K. 1988. Tissue culture propagation of running buffalo clover (*Trifolium stoloniferum* Muhl. ex A. Eatton). Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 15: 9-11.

Sears, R.G., Deckard, E.L., 1982. Tissue culture variability in wheat, callus induction and plant regeneration. Crop Science, 22, 546-550.

Smith, R. 1992. Plant Tissue Culture Techniques and Exferiments. Academic Press Inc., UK, p. 27.

Suginobu, Ki., Takamizo, T., Hayashi, H., Abe, S., 1991. Effects of genotype medium and nature of the eksplant on the formation of callus and somatic embryos in alfalfa. Journal of Japenese Society of Grassland Science, 36: 4, 390-403.

Takamizo, T., Suginobu, K., Ohsugi, R., 1991.Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium. Bulletin of the National Grassland Research Institute, 44, 15-22.

Trolinder, N.L., Xhixian, C., 1989. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton, Plant Cell Reports, 8, 133-136.

Turgut, N., 2002. *Astragalu*s türlerinde doku kültürü çalışmaları. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Ensitüsü, Biyoloji A.B.D,Yüksek Lisans Tezi

Uranbey, S., Mirici, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar, K.M., Mirici, S., Özcan, S. 2003. Adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 17: 33-37.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Konya ili Çumra İlçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Çumra'da tamamladı. 2001 yılında T.C. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Programını kazandı. Buradaki dört yıllık lisans eğitimimden sonra, yüksek lisans eğitimini Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda tamamladı. Yüksek Lisansı boyunca Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesinde bulunan Bitki Biyoteknolojisi ve Moleküler Genetik Laboratuarında aktif olarak çalışmalarda bulundu. Halen özel bir bankada portföy yöneticisi olarak çalışmaktadır.