

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KORUNGA (*Onobrychis sativa* L.)’DA
FARKLI TDZ (THIDIAZURON) UYGULAMALARININ *IN VITRO* SÜRGÜN
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

Mehmet Burak TURGUT

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27/11/2014

Mehmet Burak TURGUT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KORUNGA (*Onobrychis sativa* L.)’DA FARKLI TDZ (THIDIAZURON)
UYGULAMALARININ IN VITRO SÜRGÜN REJENERASYONUNA ETKİSİ

Mehmet Burak TURGUT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Bu tez çalışmasında çok yıllık bir yem bitkisi olan korunga (*Onobrychis sativa* L.)’da thidiazuron (TDZ)’un in vitro sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. In vitro bitkicik elde etmek için öncelikle meyve ve tohumlar yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. En yüksek oranda ve bulaşksız bitkicik gelişimi tohumların %70’lik ticari çamaşır suyunda 15 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması sonucunda elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu çalışmalarında tohumdan gelişen in vitro bitkiciklerden izole edilen yaprak, gövde ve kotiledon eksplantları farklı konsantrasyonlarda TDZ, 6-benzilaminopurin (BAP) ve α -naftalenasetik asit (NAA) içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamlarında plastik ve cam petri kutuları içerisinde kültüre alınmıştır. Cam petri kutularında sürgün rejenerasyonu plastik olanlarından çok daha yüksek olmuştur. En yüksek sürgün rejenerasyonu ise cam petri kutusu başına 107.6 adet ile tek başına 2 mg/L TDZ içeren besin ortamından elde edilmiştir. Yine tohumların farklı oranlarda TDZ içeren besin ortamlarında kültüre alınması sonucunda da 0.1 mg/L TDZ içeren besin ortamında magenta kabı başına ortalama 148.6 adet sürgün elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 1 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) içeren ortamlarda köklendirilerek saksılara aktarılmıştır.

Kasım 2014, 42 sayfa

Anahtar Kelimeler: TDZ (Thidiazuron), korunga, *Onobrychis sativa*, sürgün oluşumu, doku kültürü

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF DIFFERENT TDZ (THIDIAZURON) APPLICATIONS ON IN VITRO SHOOT REGENERATION IN SAINFOIN (*Onobrychis sativa*L.)

Mehmet Burak TURGUT

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

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

In this work, effects of thidiazuron (TDZ) on in vitro shoot regeneration from perennial legume crop sainfoin (*Onobrychis sativa* L.) were studied. In order to obtain in vitro plantlets, fruit and seed material were surface-sterilized. The highest seed germination rate without contamination was obtained from seeds surface-sterilized in %70 commercial bleach for 15 minutes. For in vitro shoot regeneration, leaf, stem and cotyledon explants isolated from in vitro developing plantlets from seeds were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of TDZ, 6- benzylaminopurine (BAP) and α -naphthaleneacetic acid (NAA) in plastic or glass petri dishes. Shoot regeneration was much higher in glass petri dishes than plastic ones. The highest shoot regeneration (107.6 shoot per glass petri dishes) was achieved on 2 mg/L TDZ containing medium. The culture of seeds on MS medium supplemented with different concentrations of TDZ resulted in high frequency of shoot regeneration and the best regeneration was obtained in magenta culture vessels containing medium with 1 mg/L TDZ. Regenerated shoots rooted on MS medium containing 1 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) and were finally transferred to pots.

October 2014, 42 pages

Key Words: TDZ (thidiazuron), *Onobrychis sativa*, sainfoin, shoot regeneration, tissue culture

TEŞEKKÜR

Tez konumu veren, alıőmalarımı yönlendiren, araőtırmalarımın her aşamasında yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Cengiz SANCAK (Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı)'a, engin bilgi ve önerileri ile destek veren sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN (Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim dalı) ve Prof. Dr. Mustafa YILDIZ (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı öğretim üyesi)'a, laboratuvar çalışmalarında her türlü desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Betül TOPSAKAL, Burak ÖNOL ve Deniz KÖM'e, herkesten önce bunca sene maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem Őems Rabia TURGUT ve merhum babam Refik TURGUT'a teőekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Mehmet Burak TURGUT

Ankara, Kasım 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1 Bitki Materyali	17
3.2 Besin Ortamı ve Doku Kültürü Koşulları	17
3.3 Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu	19
3.4 Tohumların Çimlendirilmesi	19
3.5 Eksplant İzolasyonu	19
3.6 Rejenere Olan Sürgünlerin Köklendirilmesi	20
3.7 Köklenen Sürgünlerin Dış Şartlara Alıştırılması	20
3.8 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	21
4.1 Yüzeysel Sterilizasyonu	21
4.1.1 Meyve sterilizasyonu	21
4.1.2 Tohum sterilizasyonu	22
4.2 Sürgün Rejenerasyonu	23
4.2.1 Farklı TDZ ve BAP konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi	23
4.2.2 Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi	25
4.2.3 Farklı TDZ konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi	26
4.2.3.1 Plastik petri kutularında yapılan çalışmalar	27
4.2.3.2 Cam petri kutularında yapılan çalışmalar	29
4.2.4 Tohumdan doğrudan sürgün rejenerasyonu	32
4.3 Elde Edilen Sürgünlerin Köklendirilmesi	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	42

KISALTMALAR DİZİNİ

BAP	6- benzilaminopurin
Da	Dekar
HCl	Hidroklorik Asit
IBA	Indole-3-butrik asit
L	Litre
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
mg	Miligram
NAA	Naftalenasetik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
TDZ	Thidiazuron
2.4 – D	2.4 – diklorofenoksi – asetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Korunga meyvesi	21
Şekil 4.2	Meyveden çıkartılmış tohumların <i>in vitro</i> çimlendirmeye alınması.....	22
Şekil 4.3	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 1.0 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamında gövde eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyo	24
Şekil 4.4	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 1.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında gövde eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	28
Şekil 4.5	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 4.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında kotiledon eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	28
Şekil 4.6	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 1.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında yaprak eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	29
Şekil 4.7	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında gövde eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	30
Şekil 4.8	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında kotiledon eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	31
Şekil 4.9	Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında yaprak eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	31
Şekil 4.10	Korunga tohumunun yüzeye ekimi	32
Şekil 4.11	Korunga tohumunun orta ekimi	33
Şekil 4.12	Korunga tohumunun dip ekimi	33
Şekil 4.13	Kültür başlangıcından 12 hafta sonra 0.1mg/L TDZ içeren besin ortamında tohum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	34
Şekil 4.14	Elde edilen sürgünlerin 1.0mg/L IBA içeren besin ortamında köklendirilmesi.....	35
Şekil 4.15	Köklenen bitkiciklerin toprağa aktarılması	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Yıllara göre Türkiye’de burçak ve fiğ ekim alanı ve üretim miktarları.....	3
Çizelge 1.2 Yıllara göre Türkiye’de korunga ve mısır ekim alanı ve üretim miktarları	4
Çizelge 1.3 Yıllara göre Türkiye’de hayvan pancarı, üçgül ve yonca ekim alanı ve üretim miktarları.....	5
Çizelge 1.4 Farklı gelişme dönemlerinde korunganın ham protein, ham yağ, ham selüloz ve nitrojensiz öz madde oranları	6
Çizelge 1.5 Korungada değişik biçim dönemlerinde elde edilen kuru maddenin bileşimi ve köklerdeki TNC (toplam yapısal olmayan karbonhidratlar) oranlarının yıllara göre dağılışı	7
Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları	18
Çizelge 3.2 Büyüme düzenleyiciler, çözücüler ve saklama koşulları	18
Çizelge 4.1 Meyve kabuklu yüzey sterilizasyon sonuçları	22
Çizelge 4.2 Meyve kabuksuz korungaya uygulanan sterilizasyon çalışmaları	23
Çizelge 4.3 Farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda TDZ ve BAP uygulamalarının gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi	25
Çizelge 4.4 Farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda TDZ ve NAA uygulamalarının gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi	26
Çizelge 4.5 Farklı TDZ konsantrasyonlarının plastik petrilere kültüre alınan gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi	27
Çizelge 4.6 Farklı TDZ konsantrasyonlarının cam petrilere kültüre alınan gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi	30
Çizelge 4.7 FarklıTDZ konsantrasyonlarının magenta kaplarında kültüre alınan tohum eksplantlarındakallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi	34

1.GİRİŞ

Otobur hayvanların yaşayabilmeleri ve kendilerinden beklenen ürünleri verebilmeleri için, gereksinim duydukları unsurları bünyelerinde taşıyan ve belirli ölçülerde yedirildiklerinde hem hayvan sağlığına, hem de hayvansal ürünlere zarar vermeyen, gerek kültürü yapılan, gerekse doğada kendiliğinden yetişen bitkilere "yem bitkileri" adı verilmektedir. Yem bitkileri yetiştiriciliğine insanların göçebelikten yerleşik hayata geçtikleri dönemden itibaren başlamıştır. Yem bitkileri yetiştiriciliği ile ilgili ilk kayıtlara Çin'de rastlanmıştır. M.Ö. 2800 yıllarında Çinlilerin baklayı tane yem amacıyla yetiştirdikleri bilinmektedir. Yaygın olarak kültüre alınan en eski yem bitkilerinden biri de yoncadır. Yoncanın M.Ö. 1350 yıllarında Anadolu'da Hititler tarafından yetiştirildiği ve hayvanlara kış mevsiminde kuru ot olarak yedirildiği Hitit kitabelerinde bildirilmektedir.

Korunga tarımının ise M.Ö. Romalılar döneminde başladığı kabul edilmektedir. Korunga tarımının Avrupa'da 15. Yüzyılda başladığına dair kanıtlar bulunmakla birlikte ilk önce güney Fransa'da, 1560'lı yıllarda da güney Almanya'da yetiştiriciliği kayıt edilmektedir. Hollanda ve İngiltere 17. Yüzyılda, Afrika ve Kuzey Amerika 19. yüzyılda korunga tarımına geçmiştir (Gençkan 1992). Selçuklu ve Osmanlı döneminde de tarımının yapıldığı belirtilmektedir. Türkiye'de Doğu Anadolu bölgesinde ise bu bitkiye göringen veya koringa gibi isimler verilmektedir (Tosun 1974). *Onobrychis* cinsinin geçerli adı ilk kez Miller tarafından verilmiştir. Bu tarihten önce Linne (1753) bu cinse ait türleri *Hedysarum* cinsi içerisinde vermiştir. Sonradan bu türler *Onobrychis* cinsine aktarılmıştır. Türkiye türleri ile ilgili ilk ayrıntılı çalışma ve toplu bilgiler, birçok türü de bizzat kendisi tanımlayan Boissier'in (1872) *Flora Orientalis* adlı eserinde yer almıştır. Bu eser, Davis'in (1965-1985, 1988) en kapsamlı flora ve en önemli kaynak olarak yer alıyordu. Daha sonraki yıllarda ise Türkiye türleri ile ilgili yapılan en kapsamlı çalışma Hedge'nin (1970) Türkiye florası için yaptığı revizyondur.

Dünyada korunga (*Onobrychis*) cinsine bağlı 80-100 tür bilinmektedir. Yabani korungalar Baltık Deniz'inden, Akdeniz, Ön Asya ve Sibirya'ya kadar uzanan çok geniş bir alana yayılmıştır. Korungaların yayılma alanı içerisinde bulunan yurdumuzda, 52

korunga türünün (60 Takson) doğal olarak yetiştiği bilinmektedir (Aktoklu 1995). Korunga cinsindeki tür zenginliğine karşılık sadece 3 tür, [yaygın korunga (*Onobrychis sativa* Lam.), Anadolu korungası (*Onobrychis arenaria* K.) ve Kafkas korungası (*Onobrychis transcaucasia* G.)] tarımsal açıdan önem taşımaktadır. Bu türler içerisinde ise *Onobrychis sativa* Lam syn. *Onobrychis viciaefolia* veya *Onobrychis viciifolia* Scop. türleri yaygın olarak kullanılmaktadır. 2014 TÜİK tarım istatistiklerine göre ülkemizde yetiştirilen yem bitkilerinin ekim alanları, kuru ve yeşil ot verimleri çizelge 1.1 - 1.3'de verilmiştir.

Yem bitkileri günümüzde kullanılan en ucuz yem üretim kaynağıdır. Bazı mısır ve sorgum çeşitlerinden elde edilen verim 13 ton/da alınabilirken, yüksek verimli yonca, çayır üçgülü gibi bazı bitkilerden uygun koşullarda kuru ot verimi yaklaşık 16 ton/da'a kadar çıkabilmektedir. Yem bitkileri, çiftlik hayvanlarının midelerinin mikro floraları için gerekli olan besin maddelerini, yeterli ve dengeli bir oranda içermektedirler.

Korunga, baklagiller familyasına ait çok yıllık bir yem bitkisidir. Bitkinin kalınlaşmış bir ana kökü ve çok sayıda yan kökü bulunur. Bitki taç kısmından çok sayıda sap verir. Saplar 100-120 cm boylarındadır. Sap kesiti yuvarlaktır. Taban kısmında içi boştur. Yukarı kısımlarda ise içi dolu olup üzeri tüylüdür. Yapraklar karşılıklı bileşiktir. Bir yaprak ekseninde karşılıklı olarak 7-15 çift yaprakçık vardır. Uzun yumurta şeklinde olan yaprakçıklar, ince tüylerle kaplıdır. Yaprak ekseni daima yaprakçıkta biter. Çiçekleri yaprak koltuklarından çıkıp sap üzerindedir. Pembe renkli ve salkım şeklindedir. Her salkımda 5-80 adet çiçek bulunur. Meyveler 5-8 mm boyunda, yarım daire şeklindedir. Tek tohumlu yassı bir bakladır. Meyve kabuğunun üzeri damarlı ve dişlidir. Tohumlar, böbrek şeklinde kirli sarı veya kahve renklidir. Bin dane ağırlığı 13-17 g arasında değişir. Olgunlaşma sonunda meyve kabuğu açılmaz, ekim sırasında da meyve halinde (kabuğundan ayrılmadan) ekilir.

Çizelge 1.1 Yıllara göre Türkiye’de burçak ve fiğ ekim alanı ve üretim miktarları
(www.tuik.gov.tr, 2014)

Yıllar	Burçak			Fiğ		
	Ekilen Alan ⁽¹⁾ (dekar)	Üretim		Ekilen Alan(dekar)	Üretim	
		Yeşil Ot	Kuru Ot ⁽⁴⁾		Yeşil Ot	Kuru Ot ⁽⁴⁾
1992	-	130	2 940	-	298 255	326 857
1993	-	200	2 576	-	346 748	339 711
1994	-	184	3 176	-	293 895	236 650
1995	-	1 493	2 038	-	390 658	350 232
1996	-	1 278	2 468	-	395 000	315 000
1997	-	1 384	2 150	-	310 000	336 000
1998	-	1 000	2 000	-	325 000	340 000
1999	-	1 050	1 500	-	340 000	360 000
2000	-	360	800	-	395 000	261 000
2001	-	255	1 000	-	420 000	310 000
2002	-	950	1 050	-	450 000	368 000
2003	-	1 400	1 000	-	455 000	370 000
2004	15 500	3 600	1 550	2 200 000	540 000	410 000
2005	20 000	3 000	5 500	2 500 000	750 000	550 000
2006	29 170	6 610	8 310	3 862 882	1 026 324	1 210 618
2007	229 286	87 683	65 590	6 391 774	1 282 441	1 614 230
2008	189 371	42 596	29 493	5 796 842	1 249 948	1 828 937
2009	151 119	87 106	37 956	4 695 529	1 028 610	1 314 928
2010	99 508	80 005	-	4 288 400	4 018 984	-
2011	69 025	51 092	-	4 754 756	4 442 017	-
2012	82 743	42 894	-	5694254	4245417	-
2013	71 411	54 566	-	4990430	4492466	-

⁽¹⁾ Veriler 2004 yılından itibaren derlenmeye başlanmıştır.

⁽⁴⁾ Kuru ot; 2010 yılından itibaren derlenmemektedir.

Çizelge 1.2 Yıllara göre Türkiye’de korunga ve mısır ekim alanı ve üretim miktarları
(www.tuik.gov.tr, 2014)

Yıllar	Korunga ⁽⁵⁾			Mısır		
	Ekilen Alan (dekar)	Üretim		Ekilen Alan (dekar)	Üretim	
		Yeşil Ot	Kuru Ot ⁽⁴⁾		Hasıl ⁽²⁾	Silajlık ⁽¹⁾⁽³⁾
1992	838 600	262 025	288 992	-	134952	-
1993	880 400	252 817	333 177	-	143 273	-
1994	799 840	149 946	321 154	-	289 566	-
1995	889 530	271 909	316 391	-	551 000	-
1996	842 040	274 715	246 481	-	565 000	-
1997	825 000	205 800	255 300	-	576 000	-
1998	930 000	203 150	350 900	-	680 000	-
1999	943 620	185 000	310 000	-	640 000	-
2000	1 075 000	200 000	330 000	-	700000	-
2001	1 055 000	203 000	334 000	-	710 000	-
2002	990 000	204 000	350 000	-	740 000	-
2003	1 080 000	220 000	360 000	-	650 000	-
2004	1 070 000	270 000	330 000	1 500 000	600 000	6 200 000
2005	1 100 000	250 000	420 000	2 000 000	460 000	7 600 000
2006	1760 029	124 843	496 313	2 598 913	432 868	10 069 968
2007	1 298 958	191 991	525 563	2 690 132	302 550	10 259 595
2008	1 401 295	143 367	603 724	2 888 829	322 414	11 183 290
2009	1 508 927	157 029	785 283	2 740 031	243 268	11 099 653
2010	1 570 810	1 508 930	-	2 937 336	207 899	12 446 450
2011	1 536 445	1 571 606	-	3 127 946	238 973	13 294 380
2012	1963349	1459570	-	3540882	302014	14956457
2013	1914391	1630572	-	4 027 160	259335	17835115

⁽¹⁾ Veriler 2004 yılından itibaren derlenmeye başlanmıştır.

⁽²⁾ Hasıl; yem için kullanılan yeşil mısır

⁽³⁾ Silajlık; yem için kullanılan silolamaya uygun yeşil mısır

⁽⁴⁾ Kuru ot; 2010 yılından itibaren derlenmemektedir.

⁽⁵⁾ 2011 yılına kadar dane ve ot alanları ortak olup, 2011 yılından itibaren ayrı ayrı derlenmiştir.

Çizelge 1.3 Yıllara göre Türkiye’de hayvan pancarı, üçgül ve yonca ekim alanı ve üretim miktarları (www.tuik.gov.tr, 2014)

Yıllar	Hayvan Pancarı		Üçgül ⁽⁵⁾			Yonca ⁽⁵⁾		
	Ekilen Alan (dekar)	Üretim (ton)	Ekilen Alan ⁽¹⁾ (dekar)	Üretim		Ekilen Alan (dekar)	Üretim	
				Yeşil Ot ⁽¹⁾	Kuru Ot ⁽¹⁾⁽⁴⁾		Yeşil Ot	Kuru Ot ⁽⁴⁾
1992	17500	85000	-	-	-	1955430	1658646	1226501
1993	20500	100000	-	-	-	2061480	1581610	1292228
1994	31000	100000	-	-	-	1948010	1570439	1292772
1995	23000	110000	-	-	-	2140100	1803190	1399341
1996	24 000	110000	-	-	-	2290510	1935087	1444466
1997	25000	115000	-	-	-	2 175000	1905800	1364200
1998	26000	120000	-	-	-	2300000	1750 000	1550000
1999	27000	122000	-	-	-	2 456060	1594670	1641000
2000	31000	140000	-	-	-	2 508000	1807 000	1540000
2001	31500	150000	-	-	-	2 490000	1930 000	1563000
2002	33000	160000	-	-	-	2 600000	1900 000	1700000
2003	34000	160000	-	-	-	2900000	2100 000	1800000
2004	33900	160000	20000	1	10000	3200000	2300 000	2000000
2005	35000	165000	19100	16	11300	3750000	2100 000	2400000
2006	32038	158771	20000	5	10839	4440296	1814990	2820255
2007	31 000	151 611	20 105	-	11611	5348965	1697645	3513945
2008	30651	157 541	23 260	3 610	11394	5557215	1843961	3907403
2009	27987	145 628	18 720	3 560	9594	5692958	1747676	4037132
2010	26940	132 970	3 440	2 556	-	5688107	11 676115	-
2011	25399	127 114	4 340	3 160	-	5 585 525	12 076 159	-
2012	30397	125610	5093	3018	-	6741832	11536328	-
2013	28411	131289	4150	2528	-	6286419	12616178	-

⁽¹⁾ Veriler 2004 yılından itibaren derlenmeye başlanmıştır.

⁽⁴⁾ Kuru ot; 2010 yılından itibaren derlenmemektedir.

⁽⁵⁾ 2011 yılına kadar dane ve ot alanları ortak olup, 2011 yılından itibaren ayrı ayrı derlenmiştir.

Korunga her iklim koşulunda yetişebilir. İlk fide döneminde soğuğa fazla dayanıklı değildir, ancak daha sonraki dönemlerde soğuğa oldukça dayanıklıdır (Serin ve Tan 2001). Korunganın besleme değeri yüksek olup, yemi nitrojensiz öz maddeler, ham yağ ve ham protein bakımından zengindir. Hazmedilmeyi olumsuz yönde etkileyen lignin maddesi korunga otunda yoncadan daha azdır (Serin ve Tan 2001). Korunga, geçirgen, kireçli, tınlı-kumlu toprakları sever. Yonca tarımına uygun olmayan kıraç, zayıf ve çakıllı topraklarda da korunga yetişir (Elçi 2005). Her türlü iklim ve toprak şartlarında ekim nöbetine sokularak zayıf ve kıraç alanları ıslah eder. Çizelge 1.4’de farklı gelişme dönemlerinde korunganın ham protein, ham yağ, ham selüloz ve nitrojensiz öz madde oranları (Açıkgöz 2001) ile çizelge 1.5’de kuru maddenin bileşimi görülmektedir (Manga 1978). Ayrıca dokularında bulunan tanin maddesinden dolayı yoncada görülen hayvanları şişirme özelliği korungada görülmemektedir.

Çizelge 1.4 Farklı gelişme dönemlerinde korunganın ham protein, ham yağ, ham selüloz ve nitrojensiz öz madde oranları (Açıkgöz 2001)

Biçim Devresi	Ham Protein (%)	Ham Yağ (%)	Ham Selüloz (%)	N-siz Öz Madde (%)
Çiçeklenme Öncesi	21.2	2.1	22.3	44.7
Çiçeklenme Başlangıcı	18.9	3.2	29.8	42.6
Tam Çiçeklenme	17.3	3.0	33.7	41.0

Ekildiği sırada tohumlarına bakteri kültürü aşılanırsa, nodozite bakterileri sayesinde toprağa azot kazandırılır. Kurak bölgelerde ekim nöbetine dâhil edilerek nadas bölgelerinin daraltılmasına yardımcı olur. Aynı zamanda kıraç ve erozyona açık yerlerde suni meraların kurulmasında karışıma giren önemli bir bitkidir. Aynı zamanda korunga iyi bir arı merasıdır. Korunga tarımı yapılan yerlerde yerel arıcılık artırılabilir.

Korunga, hayvanlara yeşil veya kuru olarak yedirilebilir. Yeşil yedirildiğinde şişkinlik yapmayan ve protein içeren değerli bir kaba yemdir. Biçimden sonra gelişmesi yavaştır. Kuru şartlar altında yıllık yağışı 300-400 mm olan yerlerde yılda bir biçim yapılır. İyi

tesis edilmiş korunga alanlarında gübreleme ve bakım yapılırsa kuru ot verimi 200-600 kg/da'dır. Tesis yılı dâhil ekonomik olarak 3-5 yıl kuru ot üretimi yapılır.

Çizelge1.5 Korungada değişik biçim dönemlerinde elde edilen kuru maddenin bileşimi ve köklerdeki TNC (toplam yapısal olmayan karbonhidratlar) oranlarının yıllara göre dağılışı (Manga 1978)

Toplam Yapısal Olmayan Karbonhidratlar	YILLAR			
	1969	1970	1971	Üç Yıl Ort.
Kuru Madde (kg)	346.16	351.83	439.55	379.19
Kuru Madde (%)	94.28	92.73	91.76	92.92
Ham Protein (kg)	86.30	83.58	75.55	81.80
Ham Protein (%)	24.84	23.88	17.39	22.04
Ham Selüloz (kg)	89.94	99.30	123.97	104.42
Ham Selüloz (%)	26.34	28.05	28.02	27.47
Kül (kg)	37.19	39.86	51.30	42.80
Kül (%)	10.65	11.41	11.92	11.32
Ham Yağ (kg)	12.11	12.33	14.65	13.05
Ham Yağ (%)	3.55	3.48	3.35	3.45
N-siz Öz Madde (kg)	120.53	114.36	173.92	136.28
N-siz Öz Madde (%)	34.63	33.18	39.32	35.71
Biçimlerde TNC (%)	10.35	9.25	11.31	10.30
Biçimlerden Sonra TNC (%)	7.62	6.43	8.38	7.48

Maestro vd. (1985), 1981-83 yıllarında yaptıkları çalışmalarda, korungada en yüksek verimi ekimden sonraki birinci yılda alırken, dördüncü yılın ortalama kuru madde verimi 440 kg/da olmuş ve verim geç biçimle azalmıştır. Geç biçimlerde ham protein oranının %14'ten %0,7'ye düştüğünü tespit etmişlerdir. Shah, (1991), 1985-87'de Kaşmirin 2 lokasyonunda yapılan çalışmalarda korunganın Melrose ve Eski varyetelerini kullanmış, dekadaki kuru madde verimlerini sırasıyla 1023 ve 889 kg olarak bulmuştur. Yağışlı şartlarda yapılan düzenli sulama sonucu dekada aynı türlerde sırasıyla 131 ve 97 kg verim artışı meydana geldiğini tespit etmiştir.

Korunga bitkisi özellikle sulanamayan alanlarda üretilebilecek önemli ve verimli bir yem bitkisi olmasına rağmen, köklerinde galeriler açarak beslenen ve bitkinin ikinci yıldan itibaren ölümüne neden olan *Bembecia scopigera* (Takım: Lepidoptera) ve *Sphenoptera carceli* (Takım: Coleoptera) böcek türleri nedeniyle ekimi ve üretimi sınırlı kalmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerle gen aktarımı sayesinde böceklere dayanıklı çeşitler kısa süre içerisinde geliştirilebilmektedir. Ancak, korunga da dâhil birçok bitki türünde gen aktarımını en fazla sınırlandıran faktör düşük *in vitro* sürgün rejenerasyonudur. Bundan dolayı bu tez çalışmasında korungada farklı TDZ uygulamalarıyla *in vitro* sürgün rejenerasyonunun artırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Kaynak özetlerinde son yıllarda baklagiller üzerine yapılan doku kültürü çalışmaları ile farklı bitkilerde TDZ ile yapılan araştırmalara yer verilmiştir.

Hiroshi ve Zhumeng (1993), korungada, *in vitro* koşullarda elde edilen fidelerden aldıkları kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarını farklı dozlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Sürgün oluşumu bakımından en iyi ortamın 1 μM NAA ve 10 μM BAP kombinasyonu olduğunu, kallus oluşumu bakımından eksplantlar arasında bir fark olmadığını, sürgün oluşumu bakımından ise kök ve hipokotil eksplantlarının kotiledonlara göre daha iyi sonuç verdiğini, BAP ve NAA'in bitki rejenerasyonu üzerinde etkili olduğunu ve elde edilen sürgünlerin 25 μM IBA ile başarılı bir şekilde köklendirildiğini bildirmişlerdir.

Barna ve Wakhlu (1994), olgunlaşmamış nohut (*Cicer arietinum*) yapraklarından oluşan kalluslardan organogenezis yoluyla adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. En iyi kallus oluşumunu, 10 μM NAA ve 5 μM BAP içeren besin ortamından kaydetmişlerdir. Gövde dokularının en alt kısımlarından alınan eksplantlar için en iyi sürgün rejenerasyonu ortamının ise 10 μM BAP ve 0.1 μM IBA içeren MS₀ besin ortamı olduğu bildirilmiştir. En iyi kök oluşumunu ise, 1 μM IBA içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Özcan vd. (1996a), gen aktarımına uygun adventif sürgün oluşumu sağlamak için, *in vitro* koşullarda gelişen korunga (*Onobrychis viciifolia*) fidelerinden elde ettikleri kotiledon ve hipokotil örneklerini değişik besin ortamlarında kültüre almışlardır. En yüksek oranda sürgünü, 0.5 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA içeren MS₀ ortamında kültüre alınan hipokotil örneklerinden elde etmişlerdir. Gelişen sürgünleri daha sonra, 1 mg/L IBA ya da 1 mg/L NAA içeren MS₀ ortamlarında köklendirmişlerdir.

Özcan vd. (1996b), korunga (*O. viciifolia*) bitkisinde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo ekseni örneklerini değişik oranlarda BAP ve NAA içeren MS₀ besin ortamında

kültüre almışlardır. Genel olarak, olgunlaşmamış embriyo eksenlerinin sürgün oluşturma kapasitesinin olgunlaşmamış kotiledonlardan daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek oranda sürgünün, 0.5 mg/L BAP ve 2 mg/L NAA içeren MS₀ ortamında kültüre alınan örneklerden elde edildiğini bildirmişlerdir. Gelişen sürgünleri daha sonra, 1 mg/L IBA ve 1 mg/L NAA içeren MS₀ ortamlarında köklendirmişlerdir.

Özgen vd. (1997), Elçi ve Mesa-Sirsa yonca çeşitlerinde, çimlendirme ile elde edilen fidelerden alınan sapçıklarda, *in vitro* koşullarda sürgün oluşumu sağlamışlardır. Sapçıkları farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS₀ ortamında büyütmüşlerdir. Sürgün sayısı, en fazla Elçi çeşidinde 2 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA; Mesa-Sirsa çeşidinde ise, 1 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA içeren kültür ortamlarından elde edilmiştir. Kültür ortamına ilave edilen IBA oranının artırılması ile köklenme miktarı %80-90 oranına ulaşmıştır. Bununla beraber, Elçi çeşidinin her bir sürgünde ortalama kök uzunluğu, Mesa-Sirsa çeşidinden daha fazla bulunmuştur. Kültür ortamında üretilen sürgünlerde somatik kromozom sayılarının değişmediğini gözlemlemişlerdir.

Özgen vd. (1998), gen aktarımına uygun adventif sürgün oluşumu sağlamak için, tarlada yetiştirilen korunga (*O. viciifolia*) fidelerinden elde ettikleri yaprakçık, yaprak sapı ve sap örneklerini, değişik oranlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. En yüksek oranda sürgünü, 20 µM BAP ve 0.5 µM NAA içeren MS₀ ortamında kültüre alınan sap örneklerinden elde etmişlerdir. Gelişen sürgünleri daha sonra 5 µM IBA içeren yarım MS ortamında köklendirmişlerdir.

Sancak (1999), *in vitro* koşullarda korunga bitkisinin hızlı çoğaltımı için bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde büyüme ortamındaki bitki büyüme düzenleyicilerinin oranı optimize edildikten sonra, farklı konsantrasyonlar da ki BAP, IBA ve NAA ilave edilen MS₀ ortamında, tek bir embriyodan, 8 haftada çok yüksek oranda sürgün çoğaltımı elde edilmiştir. En yüksek sürgün çoğaltımı, 2 mg/L BAP ile IBA'nın 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/L'lik ortamlarından veya 8 mg/L BAP ile 0.05 mg/L NAA ortamından elde

edilmiştir. En yüksek sürgün boyu yalnızca 2 mg/L BAP'ın bulunduğu ortamda gözlemlenmiştir. Elde edilen sürgünler 1 mg/L IBA içeren MS₀ ortamında köklendirilmiştir.

Akçura vd. (1999), korungada yaptıkları çalışmada eksplant olarak hipokotil, epikotil, kotiledon, yaprak ve kök parçalarını kullanmışlardır. En fazla sürgün rejenerasyonunu BAP ve NAA içeren ortamdan elde etmişler ve bu sürgünleri 0.2 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında köklendirmişlerdir.

Shibli ve Ajlouni (2000), endemik siyah iris (*Iris nigricans*)'te somatik embriyogenesi kallus, süspansiyon ve protoplast kültüründen elde etmişlerdir. Kallusların alt kültürü 4.5 µM 2,4-D, 0.5 µM Kinetin, 4.5 µM NAA ve 300 mg/L Prolin içeren ortamda, karanlık koşullarda yapılmıştır. Rejenerasyon ortamı olarak BA, 2IP, Zeatin ve TDZ (0, 4, 5, 9 ve 13.5 µM)'nin 0.49 µM IBA ve 0.45 µM 2,4-D ile kombinasyonu ile hazırlanan ortamlar kullanılmıştır. Maksimum embriyogenesis 4.5µM BA'da elde edilmiştir. Zeatin ve TDZ'nin embriyogenesis üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. 0.2 M Sukroz; Glukoz ve Fruktoz ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu bulunmuştur. 4.5 µM 2,4-D içeren ortamda 4 hafta içinde süspansiyon kültüründen gelişen hücreler 0.2 M sukroz, 4.5 µM BA içeren ortama transfer edildiğinde oldukça iyi sonuçlar (3568 embriyo/g hücre) elde edilmiştir. Çalışma sonucunda gelişen embriyoların % 90'ı köklenerek tam bir bitki haline gelmişlerdir. Üretilen bitkilerin ise % 95'i dış koşullara aktarılmıştır.

Bhatt ve Dhar (2000), *Bauhinia vahlii* bitkisinde etkili bir rejenerasyon yöntemi geliştirmişlerdir. Thidiazuron (TDZ) ve kinetin (1,0 µM) kombinasyonu sürgün sayısını önemli düzeyde artırmıştır. 1,0 µM NAA ilave edilmiş ¼ MS ortamında sürgünlerin %83'ü köklenmiştir. Dış koşullara alıştırmadan önce farklı şeker konsantrasyonları uygulanmasının canlılık yüzdesinin üzerine herhangi bir etkisi olmazken, bitki kalitesini geliştirmiştir. Bitkilerin %50'si soilrite + kum + toprak (2:1:1) toprak kasımında dış koşullara alıştırılmıştır.

Khawar ve Özcan (2002), MS besin ortamında gelişen Ali Dayı mercimek çeşidine ait 10 günlük sürgünleri keserek, köklendirme için 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L IBA içeren MS₀ besin ortamına aktarmışlardır. Dört hafta sonra en yüksek köklendirme oranını (% 25), sürgün başına ortalama kök sayısını (7.87 adet) ve ortalama kök uzunluğunu (7.18 cm) 0.25 mg/L IBA içeren MS₀ besin ortamından elde etmişlerdir. Ancak, diğer IBA uygulamalarında kök oluşumunu uyaramamışlardır.

Duong vd. (2002), *Lilium longiflorum* bitkisinde soğan uçlarından alınan ince hücre tabakası kullanılarak somatik embriyogenesis çalışılmıştır. Eksplantlar üzerinde 45 gün sonunda yuvarlak şekilli embriyolar oluşmuştur. Somatik embriyo oluşumu için 4 µM NAA ile 1.1 µM TDZ içeren ortamlarda embriyo benzeri yapılar eksplantlar üzerinden alınıp 5.4 µM NAA ve 0.4 µM TDZ içeren ortamda büyümeye bırakılmıştır. En iyi somatik embriyo oluşumu; 0.8 - 1 mm kalınlığında ki eksplantlarda gözlenmiştir. Oluşan somatik embriyoları bitkiye dönüştürmek için, 30 g/L sukroz içeren MS ortama aktarılmıştır. Tüm embriyolardan, 90 gün sonunda bitki oluşumu gözlenmiştir.

Çöçü vd. (2003), yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 8 ayrı fiğ çeşidinde olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerini değişik oranlarda büyüme düzenleyiciler içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Olgunlaşmamış embriyo eksenlerinden en yüksek sürgün rejenerasyonu % 95 ile *Kubilay* çeşidinden 4 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren besin ortamından; eksplant başına en fazla sürgün 9.47 adet ile *Sarıelçi* çeşidinden 2 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren besin ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış kotiledon eksplantlarında ise hiç sürgün rejenerasyonu elde edememişlerdir. Gelişen bu sürgünleri daha sonra, keserek 2.5 mg/L IBA içeren MS₀ besin ortamında köklendirmişlerdir. Son olarak köklenen sürgünler saksılara aktarmışlardır.

Değirmenci (2004), korungada köklendirme amacıyla farklı besin ortamlarında değişik oksin konsantrasyonlarını uygulamıştır. Denemeler sonucunda en fazla köklenme yüzdesini 1.5 mg/L IBA içeren %3 sukroz ve ½ MS ortamından elde etmiştir. Sağlıklı köklenen sürgünleri 2 farklı torf ve kokonat lifinden oluşan 3 değişik saksı ortamında

denemeye almıştır. Bu deneme sonucunda en fazla canlı bitki oranı %78.33 ile kuru madde oranı 120 g/L olan torftan elde etmiştir.

Erdoğan vd. (2004), Burçak (*Vicia ervilia*) bitkisinde yaptıkları çalışmada, tohumları MS besin ortamında çimlendirdikten 4-5 gün sonra gelişen bitkilerden kotiledon boğum eksplantlarını izole ederek değişik oranlarda TDZ veya BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısını 15.7 adet ile 7 numaralı hattan 4 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren besin ortamından elde etmişlerdir, ayrıca adventif sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında ortamda bulunan bitki büyüme düzenleyicilerinin olduğunu ve besin ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması neticesinde yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Gelişen sürgünleri daha sonra değişik oranlarda IBA içeren MS₀ ortamında köklendirmeye almışlar ve 7 hafta sonra en yüksek köklenme oranını (% 100) ve sürgün başına ortalama kök sayısını (6 adet) 2 mg/L IBA içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Erdoğan vd. (2005), yüksek oranda bir adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için 6 farklı burçak (*Vicia ervilia*) hattına ait olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo eksenlerini değişik oranlarda TDZ içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. TDZ konsantrasyonları, hatlar ve kullanılan eksplantların sürgün rejenerasyonuna önemli etkisi olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı % 90 ve eksplant başına en fazla sürgün sayısı da 22 adet olarak belirlenmiştir. Sekizinci hattan elde edilen adventif sürgünleri farklı konsantrasyonlarda BAP, NAA ve TDZ içeren ortamlarda hızlı çoğaltıma almışlardır. Burada eksplant başına en yüksek sürgün sayısını 7.33 adet ile 2 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA içeren MS₀ besin ortamından sağlamışlardır. Gelişen sürgünleri daha sonra, 2 mg/L IBA içeren MS₀ ortamında köklendirmişlerdir.

Yıldız vd. (2005), son yıllarda sürgün rejenerasyonunu artırmada yaygın olarak kullanılan TDZ'nin keten hipokotil eksplantlarından sürgün gelişimi üzerine olan etkisini BAP ve NAA ile karşılaştırılmışlardır. Özellikle gen arkamı yapıldıktan sonra,

gen aktarılmış dokulardan transgenik sürgünlerin rejenerasyonu son derece önemlidir. Başarılı bir gen aktarımı için adventif sürgün rejenerasyonunun ve özellikle de eksplant başına rejeneren olan sürgün sayısının yüksek olması gerekmektedir. Keten hipokotil eksplantlarından yüksek adventif sürgün elde etmek için rejenerasyon ortamında yaygın olarak BAP ve NAA kullanılmaktadır. Farklı TDZ dozları (1, 2, 4 ve 8 mg/L) arasında; sürgün rejenerasyon oranı eksplant başına sürgün sayısı ve petri başına toplam sürgün sayısı bakımından en uygun dozun 2 mg/L olduğunu belirlenmiş ve TDZ dozları BAP ve NAA ile karşılaştırılmıştır.

Çeliksa vd. (2006), korungada kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu elde etmek amacıyla değişik bitki parçalarını (boğum arası, yaprakçık, apikal meristem, yaprak sapı, olgunlaşmamış çiçek durumu) değişik oranlarda NAA, BAP ve Kinetin içeren B5 besin ortamında kültüre almışlardır. Eksplant tipine ve ortam bileşimine bağlı olarak eksplantlardan organogenesis, somatik embriyogenesis ve direk sürgün oluşumu gözlemişlerdir. En fazla sürgün rejenerasyon oranını apikal meristemlerden 10.7 µM NAA ve 2.3 µM kinetin içeren B5 besin ortamından elde etmişlerdir. Elde edilen sürgünleri 9.8 µM IBA içeren ½ MS besin ortamında köklendirmişlerdir.

Yıldız ve Özgen (2006), BAP, NAA ve TDZ'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının üç keten çeşidinin hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkisi araştırmışlardır. En iyi sonuçlar, 1 mg/L BAP ve 0,02 mg/L NAA içeren MS ortamından; Madaras 1886 Sel. ve Clarek çeşitlerinde sırasıyla eksplant ağırlığında 1054, 944, ve 800 mg, sürgün rejenerasyonunda % 100, % 96.7 ve % 70, eksplant başına sürgün sayısında 9.8, 9.8 ve 15.4 petri başına toplam sürgün sayısında 98, 96 ve 108 olarak elde edilmiştir. 1 mg/L'nin üzerinde artan TDZ dozları, eksplant üzerinde toksik etki göstermiş ve sürgün rejenerasyon frekansını önemli derecede düşmüştür. TDZ'nin ketenin *in vitro* kültüründe yalnız başına kullanılması önerilmiştir.

Dimech vd. (2007), *Doryanthes excelsa* bitkisinde IBA, NAA, 2,4-D, TDZ ve BAP'in fizyolojik gelişmeye etkisi incelenmiştir. Eksplant olarak dikey kesilmiş olgunlaşmamış çiçek sapı kullanılmıştır. En iyi (%46,2) kallus oluşum oranı 50 µM NAA ve 0,5 µM

TDZ içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Ancak en yüksek soğan oluşumu (%56,8) 0,5 µM NAA ve 50 µM TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Köklendirme için gelişen sürgünler 6 hafta sonra 50 µM NAA ile muamele edilmiştir. Gelişen bitkiciklerin iklim odasında adaptasyon sağlanmıştır.

Tang vd. (2007), *Chirita heterotricha* bitkisinin yaprak eksplantlarından 0,1 mg/L NAA ve 0,1 mg/LBAP içeren MS ortamda yüksek oranda (39,5 adet) sürgün elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler 5 mg/L aktif kömür ve 30 g/L sukroz içeren ½ MS ortamında köklendirilmiştir. Köklenen bitkilerin % 95 başarı ile dış koşullara adapte edilmiştir.

Şahin - Demirbağ (2008), askorbik asit eklenmiş TDZ, 6-benzyl amino purine ve naftalin asetik asit içeren MS ortamında nohut mürdümüğü (*L.cicera* L.)'nun olgunlaşmamış embriyo eksplantlarını kullanmıştır. Bir bitkide görülen en yüksek sürgün sayısı 0,45 mg/L TDZ ve 0,4 mg/L askorbik asit eklenmiş MS ortamında gözlenmiştir. Sürgünler 7 dakika boyunca 50 mg/L IBA ile muamele edilerek köklendirilmiştir. Bitkicikler sera ortamında başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılmıştır.

Şahin - Demirbağ (2008), *in vitro*'da tohumlardan gelişen *L.cicera* L.'dan alınan kotiledon eksplantlarını kullanmış ve 0,2 mg/L TDZ içeren MS ortamında %100 sürgün rejenerasyonu rapor etmiştir. 0,2 mg/L TDZ ve 300 mg/L Casein hydrosate içeren MS ortamında kaydedilen bitki başına en yüksek sürgün rejenerasyonu sırasıyla 11.83 ve 10,56'dır. % 60 köklenme oranı 5 ve 7,5 dakika boyunca 100 mg/L IBA ile muamele edilerek elde edilmiştir.

Kendir vd. (2009), TDZ ve BAP-NAA'nın çeşitli konsantrasyonlarını askorbik asitli ve askorbik asitsiz şekilde kullanarak mürdümüğün olgunlaşmamış zigotik embriyolarından sürgün rejenerasyonu elde etmiştir. Araştırmalar askorbik asit olmaksızın hem TDZ hem de BAP-NAA'nın fenolik bileşiklerin salınımına bağlı olarak bitkide sürgün rejenerasyonuna etki yapmadığını göstermiştir. 0,45 mg/L TDZ (askorbik asitli) içeren MS ortamında yan sürgün rejenerasyonu, BAP-NAA (askorbik

asitli)'ya göre çok daha yüksektir. GeliŖen sürgünler en iyi 0,90 mg/L NAA eklenmiŖ MS ortamında kklendirilmiŖtir. Köklenen bitkicikler sera ortamında dıŖ koŖullara alıŖtırılmıŖtır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen Gözlu ekotipine ait tohumlar kullanılmıştır.

3.2 Besin Ortamı ve Doku Kültürü Koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige and Skoog 1962; çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve % 07'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS₀) kullanılmıştır. Ortamların hazırlığında bidistile su kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121 °C'de 20 dakika tutularak steril edilmiştir. Uygulanan yüksek ısının eklenecek hormonların yapısını bozma ihtimali üzerine sterilizasyon sonrası MS₀ ortamına farklı dozlarda steril TDZ, NAA ve BAP eklenmiştir.

Tüm kültürler beyaz florasan ışığında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24 °C'de tutulmuştur. Sterilizasyon ve tüm doku kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Kapların, saf su ve ortamın sterilizasyonunda 1.2 atmosfer, 121°C ve 20 dakikaya ayarlı otoklav kullanılmıştır. Cam petri kutuları, 160 °C'de 2 saat etüvde steril edilmiştir.

Büyümeyi düzenleyiciler uygun çözücülerde çözüldükten sonra saf su ile istenen miktarlarda ve oranlarda stok solüsyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları

Besin Maddeleri		Konsantrasyonu (mg/L)
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,3
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,3
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
	Na ₂ EDTA	37,25
Vitaminler	Myo-Inositol	100,00
	Nikotinkasid	0,50
	Pyrotinkasid	0,50
	Thiamin-HCl	0,10
	Glysin	2,00

Çizelge 3.2 Büyüme düzenleyiciler, çözücüler ve saklama koşulları

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama Koşulları (°C)
NAA	1 N NaOH	+4
BAP	1 N NaOH	+4
TDZ	DMSO	+4

3.3 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının sağlanacağı dozlar (meyve kabuklu veya kabuksuz) belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma için kabuklu halde sterilizasyon uygulamasında %100 ve % 90 oranlarında ticari çamaşır suyu, Tween 80 ve bidistile su kullanılmıştır. Kabuksuz yüzey sterilizasyonu için %100, %80, %70 ve %60 oranlarında ticari çamaşır suyu ve bidistile su kullanılmıştır. Ayrıca daha sonra alınan sonuçların doğrultusunda %50 etil alkol ve bidistile su ile de uygulama yapılmıştır. Bütün çalışmaların sonunda bitki materyali steril bidistile su ile 3 kez durulanmıştır.

Çimlenmeyi kolaylaştırmak için tohumların dış kavuzları el yordamı, tırnak makası ve zımpara kâğıdı kullanılarak tohumdan ayrılmıştır. Bu yöntemler arasında zımpara kâğıdı ile yapılan en kolay ve çabuk sonuca ulaştıran yöntem olmuştur. İki zımpara arasına kavuzlu tohumlar koyularak saat yönünde çevirile suretiyle uygulanmıştır.

3.4 Tohumların Çimlendirilmesi

Steril edilen tohumlar, yine steril magenta kapları içerisinde, %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar ile katılaştırılan MS₀ besin ortamında 24°C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilmiştir. Her magenta kabına 10 adet tohum yerleştirilmiştir. Tohumların çimlenmeye alınmasından 8-10 gün sonra gelişen fidelerden kotiledon, 30-45 gün sonra sap ve yaprak eksplantları kültüre alınmıştır.

3.5 Eksplant İzolasyonu

Kotiledon, gövde ve yaprak eksplantları, *in vitro* yetiştirilen bitkiciklerden elde edilmiştir. Her biri 4-7 mm uzunluğunda kesilip parçalara ayrıldıktan sonra değişik dozlar içeren TDZ, BAP ve NAA hormonlarının bulunduğu petrilere aktarılmıştır. Eksplantlar 7-9 hafta boyunca bu ortamlarda tutulduktan sonra MS₀ ortamına alınıp 1-2 hafta bu ortamda tutulmuştur.

3.6 Rejenere Olan Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler Çöçü vd. (2003) ve Değirmenci (2004)'den yararlanılarak 0,5-3 cm uzunluğuna ulaştığı zaman kesilerek 1,5 mg/L IBA içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir.

3.7 Köklenen Sürgünlerin Dış Şartlara Alıştırılması

Köklenen sürgünler Çöçü vd. (2003) ve Değirmenci (2004)'den yararlanılarak içerisinde torf bulunan saksılara aktarılıp öncelikle yüksek nemde iklim dolabında daha sonra nem miktarı yavaş yavaş düşürülmek suretiyle normal seviyeye alıştırılmıştır.

3.8 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuş olup, her bir tekerrürde 10 eksplantın kültüre alındığı 100x10 mm'lik petri kutuları veya Magenta kapları kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler bilgisayarda "SPSS for Windows" programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre analiz edilmiştir.

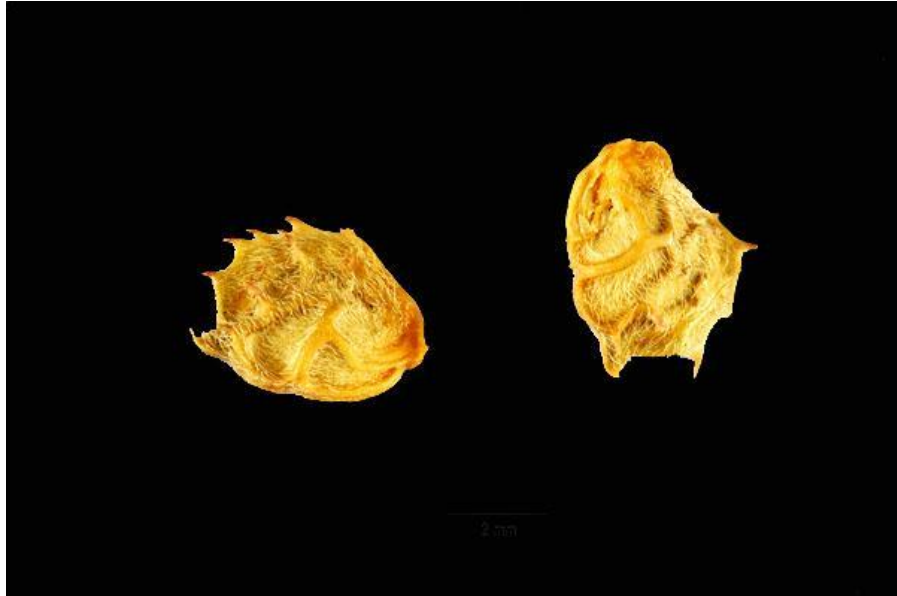
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Yüzey Sterilizasyonu

Bütün denemelerinde 15 dakika sterilizasyon süresi uygulanmış olup, son olarak 5'er dakikadan 3 kez steril su ile durulama işlemleri yapılmıştır.

4.1.1 Meyve sterilizasyonu

Korunga meyve kabuğuna sahip bir bitkidir (Şekil 4.1). Dolayısıyla ilk denemeler kabuklu şekilde uygulanmıştır. Uygulamalarda farklı oranlarda ticari çamaşır suyu ve Tween-20 kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi kullanılan tüm denemelerde %100 oranında çimlenme gözlenmiştir. Ancak, %90 çamaşır suyu kullanılan denemelerde bulaşıklık %100 oranında giderilememiştir. %100 çamaşır suyu kullanıldığında ise bulaşıklık tamamen giderilebilmiştir. Öte yandan meyvelerin *in vitro* koşullarda çimlendirmeye alındığı denemelerde fide gelişimi zayıf olmuştur.



Şekil 4.1 Korunga meyvesi

Çizelge 4.1 Meyve kabuklu yüzey sterilizasyon sonuçları

Çamaşır Suyu (%)	Kontaminasyon Oranı (%)	Çimlenme Oranı (%)
100	0	100
90	14	100
90 + Tween 20	8	100

4.1.2 Tohum sterilizasyonu

Kabuklu meyvelerin sterilizasyon denemelerinde kontaminasyon gözleendiğinden ve iyi bir fide gelişimi gözlenmediğinden dolayı, meyve kabuğu tırnak makası, el veya zımpara kâğıdı kullanılarak tohuma zarar vermeden ayrılıp MSo'lı ortama ekilmiştir. (Şekil 4.2). Özellikle yapılan çalışmalarda kabuklu meyvelerin zımpara kâğıdının arasına konularak ve saat yönünde hafifçe çevrilmek suretiyle tohumlar dış kabuktan kolayca ayrılmıştır. İlk denemede %100 ticari çamaşır suyu ile yapılmış olup herhangi bir çimlenme gözlenmemiştir. Bunun üzerine konsantrasyon seviyeleri düşürülerek yapılan denemelerde beklenen en yüksek çimlenme değerini %70 ve %60 oranlarında kullanılan ticari çamaşır suyunun uygulandığı denemeden elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Ancak, %60 çamaşır suyu uygulamasında önemli oranda bulaşıklık da gözlenmiştir. Bundan dolayı tüm denemelerde %70'lik çamaşır suyu kullanılmıştır.



Şekil 4.2 Meyveden çıkartılmış tohumların *in vitro* çimlendirmeye alınması

Çizelge 4.2 Meyve kabuksuz korungaya uygulanan sterilizasyon çalışmaları

Çamaşır Suyu (%)	Kontaminasyon Oranı (%)	Çimlenme Oranı (%)
100	0	0
80	%0	76.7
70	%0	100
60	11.0	100

4.2 Sürgün Rejenerasyonu

4.2.1 Farklı TDZ ve BAP konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

Yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde etmek için yapılan çalışmalarda *in vitro* gelişen bitkiciklerden elde edilen kotiledon, yaprak ve gövde eksplantları değişik konsantrasyonlara sahip büyüme düzenleyiciler içeren besin ortamlarında plastik petripler içerisinde kültüre alınmıştır. Çalışmada TDZ (0.5, 1 ve 2 mg/L), BAP (0.5, 1 ve 2 mg/L) ve NAA (0.5, 1 ve 2 mg/L)'in değişik doz ve kombinasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonuna etkileri araştırılmıştır. Kültür ortamına alındıktan sonra 1-12 hafta boyunca tüm eksplantlar gözlemlenmiştir. Oluşan kalluslardan 8-12 hafta sonra sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiş olup, sonuçları çizelge 4.3'te verilmiştir. Gövde ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek değerler 1,0 TDZ mg/L ve 0,5 BAP mg/L (gövde %83,33, kotiledon %23,30) uygulamasında elde edilirken (Şekil 4.3), yaprak eksplantında ise 1.0 mg/L TDZ ve 1.0 mg/L BAP ile 2.0 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamından elde edilmiştir. Adventif sürgün rejenerasyonunda plastik petride yetişen toplam sürgün sayısında 1,0 mg/L TDZ ve 0,5 BAP mg/L uygulaması en yüksek değerler gövde eksplantından elde edilmiştir. Ancak kotiledon eksplantında herhangi bir sürgün oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca, 1,0 mg/L TDZ sabit tutulduğunda hatta gövde ve kotiledon eksplantlarında BAP konsantrasyonu arttıkça kallus oluşumun düştüğü gözlemlenmiştir. Yaprak eksplantındaki kallus oluşumları üzerinden en yüksek değer 1,0 mg/L TDZ ve

1,0 mg/L BAP uygulamasında elde edilmiştir. Buna karşın en yüksek adventif sürgün oluşumu 0,5 mg/L TDZ ve 1,0mg/L BAP içeren ortamda (2,60 adet) elde edilmiştir.

Sonuç olarak eksplantlara uygulanan değişken dozlar içerisinde gövde eksplantı gerek kallus oluşumu gerekse adventif sürgün rejenerasyonu bakımından en yüksek değerleri 1,0 TDZ mg/L ve 0,5 BAP mg/L içeren besin ortamında vermiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 1.0 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamında gövde eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.3 Farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda TDZ ve BAP uygulamalarının gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)		Kallus Oluşumu (%)			Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı (adet)		
TDZ	BAP	Gövde	Yaprak	Kotiledon	Gövde	Yaprak	Kotiledon
0.5	0.5	16.00 c	3.30 d	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00
0.5	1.0	3.30 d	3.30 d	0.00 d	0.26 b	0.26 a	0.00
0.5	2.0	0.00 f	6.60 c	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00
1.0	0.5	83.33 a	16.60 b	23.30 a	2.86 a	0.00 b	0.00
1.0	1.0	30.00 b	33.30 a	3.30 c	0.13 c	0.00 b	0.00
1.0	2.0	3.30 d	10.00 c	10.00 b	0.00 d	0.00 b	0.00
2.0	0.5	0.00 f	30.00 a	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00
2.0	1.0	0.00 f	16.60 b	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00
2.0	2.0	3.30 d	3.30 d	0.00 d	0.00 d	0.00 b	0.00

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2.2 Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

Çizelge 4.4’de besin ortamına farklı konsantrasyonlarda ilave edilen BAP ve NAA’nın kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonuna etkisi verilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde BAP’ın aksine NAA kullanıldığında kallus oluşumlarında genel bir iyileşme gözlemlenmiştir. Kallus oluşum oranları baz alındığında gövde eksplantında 0,5 TDZ mg/L ve 2,0 NAA mg/L (%100) uygulamasında en yüksek değer ölçülmüştür. Yaprak eksplantında ise 0,5 TDZ mg/L ve 2,0 NAA mg/L, 1,0 TDZ mg/L ve 1,0 NAA mg/L ile 1,0 TDZ mg/L ve 2,0 NAA mg/L uygulamalarında en yüksek değerler ölçülmüştür. Kotiledon eksplantında da 2,0 TDZ mg/L ve 1,0 NAA mg/L uygulamasında en yüksek kallus oluşumu gözlemlenmiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonu göz önüne alındığında gövde eksplantında 2,0 TDZ mg/L ve 0,5 NAA mg/L uygulaması en yüksek (6,33 adet) değeri; yaprak eksplantında ise 2,0 TDZ mg/L ve 1,0 NAA mg/L uygulaması en yüksek (4,00 adet) değerini vermiştir. NAA'nın artırılması sürgün oluşumuna olumsuz yönde etki ettiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4). Kotiledon eksplantında ise tüm uygulamalarda sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir.

Çizelge 4.4 Farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda TDZ ve NAA uygulamalarının gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)		Kallus Oluşumu (%)			Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı (adet)		
TDZ	NAA	Gövde	Yaprak	Kotiledon	Gövde	Yaprak	Kotiledon
0.5	0.5	93.30 a	86.60 a	0.30 e	0.00 c	0.00 c	0.00
0.5	1.0	93.30 a	93.30 a	53.30 b	0.00 c	0.00 c	0.00
0.5	2.0	100.00 a	96.60 a	43.30 b	0.00 c	0.00 c	0.00
1.0	0.5	50.00 b	90.00 a	3.30 e	0.00 c	0.00 c	0.00
1.0	1.0	36.60 c	96.60 a	3.30 e	0.00 c	0.00 c	0.00
1.0	2.0	63.30 b	96.60 a	63.30 a	0.00 c	0.00 c	0.00
2.0	0.5	90.00 a	50.00 c	16.60 c	0.63 a	0.00 c	0.00
2.0	1.0	96.60 a	73.30 b	76.60 a	0.46 a	0.40 a	0.00
2.0	2.0	63.30 b	63.30 b	6.60 d	0.20 b	0.11 b	0.00

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2.3 Farklı TDZ konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

TDZ, NAA ve BAP büyüme düzenleyicilerinin birlikte kullanılması sonucunda yüksek oranlarda sürgün rejenerasyonu elde edilemediğinden dolayı bu çalışmada tek başına

0.1, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/L TDZ konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada denemeler plastik ve cam petri kutularında ayrı ayrı yürütülmüştür.

4.2.3.1 Plastik petri kutularında yapılan çalışmalar

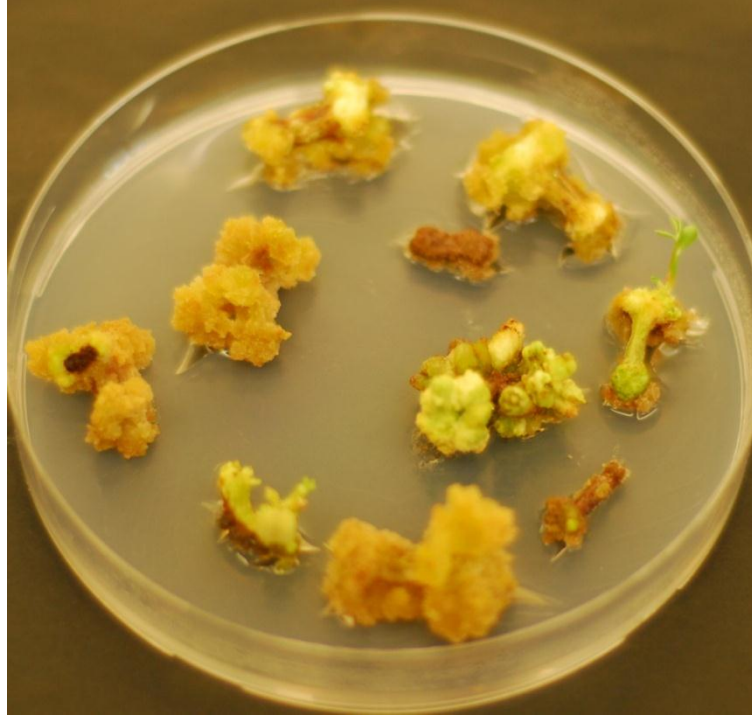
Petrolden elde edilen polistiren, monomer haldeki stirenden polimerizasyon ile üretilen bir polimerdir. Polistirenden üretilen plastik petrilerde yapılan çalışmalar çizelge 4.5’de verilmiştir. En yüksek kallus oluşum oranları 1,0 TDZ mg/L dozunda gövde (%86,60) ve yaprak (%46,60) eksplantından; 4,0 TDZ mg/L dozunda da kotiledon (%66,60) eksplantından elde edilmiştir.

Adventif sürgün rejenerasyonunda petri başına toplam sürgün sayısı baz alındığında 1,0 TDZ mg/L dozunda gövde (3,00 adet) ve yaprak (0,70 adet); kotiledon eksplantında ise 4,0 TDZ mg/L dozunda (7,00 adet) en yüksek değerler elde edilmiştir. Gövde ve yaprak eksplantlarında optimal TDZ dozunun 1,0 mg/L, kotiledon eksplantında ise TDZ oranının 1.0 mg/L’den 4,0 mg/L’ye artması gerek kallus gerekse adventif sürgün rejenerasyonuna etkisinin olumlu yönde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Farklı eksplantlardan elde edilen sonuçlara ait görseller ise şekil 4.4 - 4.6’da verimiştir.

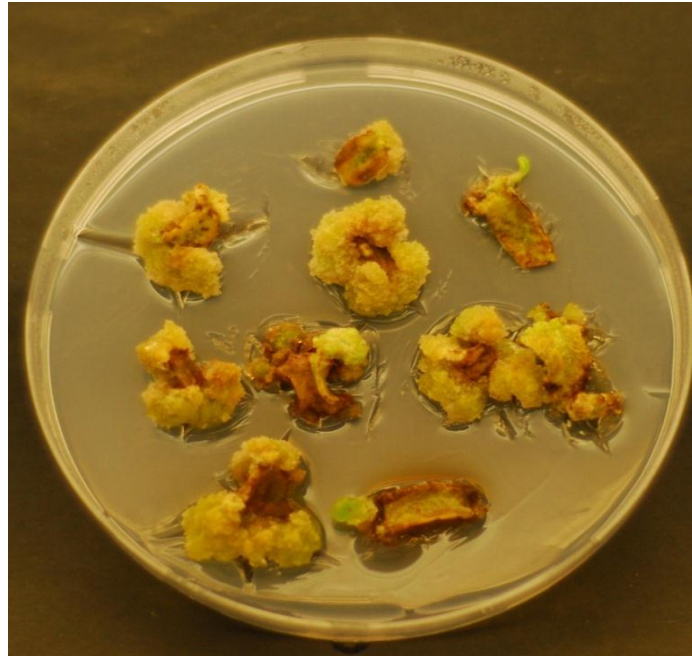
Çizelge 4.5 Farklı TDZ konsantrasyonlarının plastik petrilerde kültüre alınan gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

TDZ (mg/L)	Kallus Oluşumu (%)			Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı (adet)		
	Gövde	Yaprak	Kotiledon	Gövde	Yaprak	Kotiledon
0.1	0.00 d	0.00 c	13.30 b	0.00 c	0.00 b	0.00 c
0.5	26.60 c	0.00 c	10.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 c
1.0	86.60 a	46.60 a	0.00 c	0.30 a	0.07 a	0.00 c
2.0	46.60 b	6.60 b	10.00 b	0.07 b	0.00 b	0.20 b
4.0	26.60 c	10.00 b	66.60 a	0.10 b	0.00 b	0.70 a

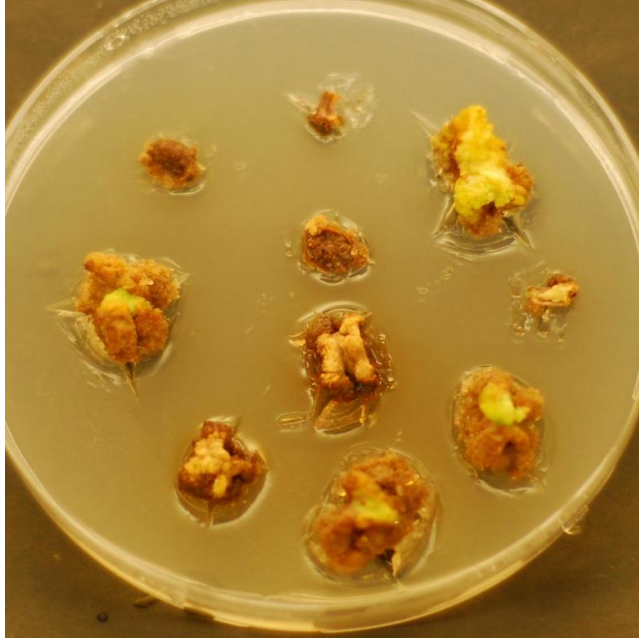
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.4 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 1.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında gövde eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.5 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 4.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında kotiledon eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.6 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 1.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında yaprak eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

4.2.3.2 Cam petri kutularında yapılan çalışmalar

Çalışmalarda kullanılan cam petri malzemesi %13 bor oksit içeren 3,3. sınıfta borosilikat camlardan üretilmektedir. Borosilikat camları istenen oranda boroksitin yanı sıra yüksek oranda silisyum dioksit ve düşük oranda sodyum oksit ihtiva etmektedir. 600 °C ve üzeri sıcaklıklardaki kullanımlar için uygundur (Anonim. 2007. T.Şişe ve Cam Fabrikaları A.Ş. Araştırma ve Teknoloji Genel Müdür Yardımcılığı Yayınları, İstanbul).

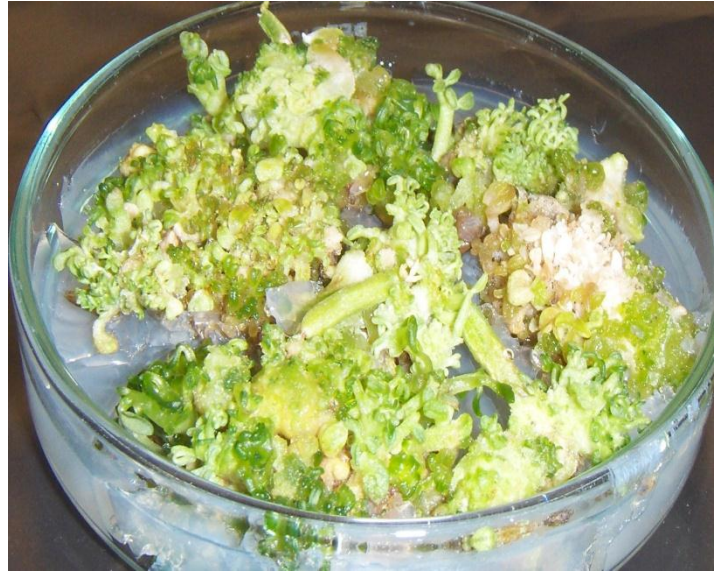
Çizelge 4.6 incelendiğinde, gövde eksplantı için 1 ve 2 mg/L TDZ'de (%100), yaprak eksplantı için 0,5 mg/L TDZ'de (%96,66), kotiledon eksplantı için ise 0,5, 1 ve 2 mg/L TDZ konsantrasyonlarında (%96,66) en yüksek kallus oluşumları gözlemlenmiştir. Adventif sürgün oluşumunda ise gövde eksplantında 2 mg/L TDZ (107,6 adet), yaprak eksplantında 2 mg/L TDZ (27,3 adet), kotiledon eksplantında 2 mg/L TDZ (62,60 adet) dozlarında petri başına en yüksek değerler elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar cam

petri kutuları kullanıldığında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonunun önemli oranda arttığını göstermiştir (Şekil 4.6 - 4.8).

Çizelge 4.6 Farklı TDZ konsantrasyonlarının cam petrilerde kültüre alınan gövde, yaprak ve kotiledon eksplantlarında kallus oluşumu, eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

TDZ (mg/L)	Kallus Oluşumu (%)			Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı (adet)		
	Gövde	Yaprak	Kotiledon	Gövde	Yaprak	Kotiledon
0.1	86.66 a	73.30 b	80.00 b	2.36 c	1.60 b	2.22 d
0.5	96.66 a	96.66 a	96.66 a	6.80 b	1.43 b	3.10 c
1.0	100.00 a	90.00 a	96.66 a	8.80 a	2.40 a	4.66 b
2.0	100.00 a	93.30 a	96.66 a	10.76 a	2.73 a	6.26 a
4.0	90.00 b	80.00 b	73.33 b	2.90 c	0.96 c	1.70 e

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.7 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında gövde eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.8 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında kotiledon eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu



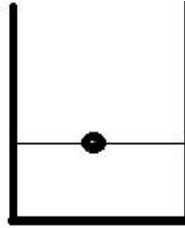
Şekil 4.9 Kültür başlangıcından 6 hafta sonra 2.0 mg/L TDZ içeren besin ortamında yaprak eksplantında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

4.2.4 Tohumdan doğrudan sürgün rejenerasyonu

Sterilizasyon sonrasında korunga tohumları 380 x 240 x 115 mm boyutlarında magentalara 10'ar adet dikildikten sonrasürgün ve bitkicik oluşumu için iklim dolaplarına yerleştirilmiştir. 3 haftanın sonunda bazı magentalarda kallus oluşumu ilerleyen safhalarda bu kalluslardan sürgünlerin oluşumu gözlemlenmiştir. Bunun üzerine 3 farklı *in vitro* ekim metodu denenmiştir (Şekil 4.10 - 4.12). Ayrıca çalışmalar sırasında hücre içi sinyal mekanizmasını uyarmak ve uygun eksplant seçimi için çimlendirme ortamına koyulan tohumların bulunduğu ortama 0.1 g/L ve 1 g/L myo-inositol uygulamaları yapılmıştır. Ancak alınan sonuçlar doğrultusunda normal MS₀ ortamına nazaran daha geç gelişim gösterdiğinden dolayı değişik konsantrasyonlardaki myo-inositol kullanımından vazgeçilmiştir

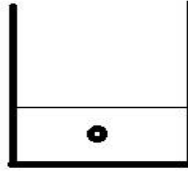
Ekim metotları:

- 1) Yüzey ekim: Yüzey ekim sırasında normal çimlenme gözlenmiş olup, herhangi bir kallus oluşumu olmamıştır.



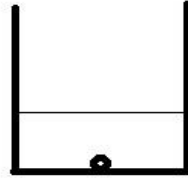
Şekil 4.10 Korunga tohumunun yüzeye ekimi

- 2) Orta ekim: Tohumun magenta içerisindeki ortamın tam ortasına ekilip üzeri tekrar aynı ortamla kapatılmak sureti ile yapılan dikimde maksimum kallus oluşumu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11 Korunga tohumunun orta ekimi

- 3) Dip ekim: Tohumun magentanın dip kısmına ekilmek sureti ile yapılan çalışmada herhangi bir çimlenme veya kallus oluşumu gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.12 Korunga tohumunun dip ekimi

Orta dikim sonucunda tohumdan doğrudan sürgün rejenerasyonu ile ilgili sonuçlar çizelge 4.7’de verilmiştir. Çizelge 4.7’den de gözlemlendiği gibi kullanılan tüm TDZ konsantrasyonlarında yüksek oranlarda kallus ve sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. En yüksek kallus ve sürgün oluşumu ise 0.1 mg/L TDZ içeren besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca TDZ miktarı arttıkça gerek kallus oluşum ve gerekse magenta başına düşen toplam sürgün sayısında azalma gözlemlenmiştir.

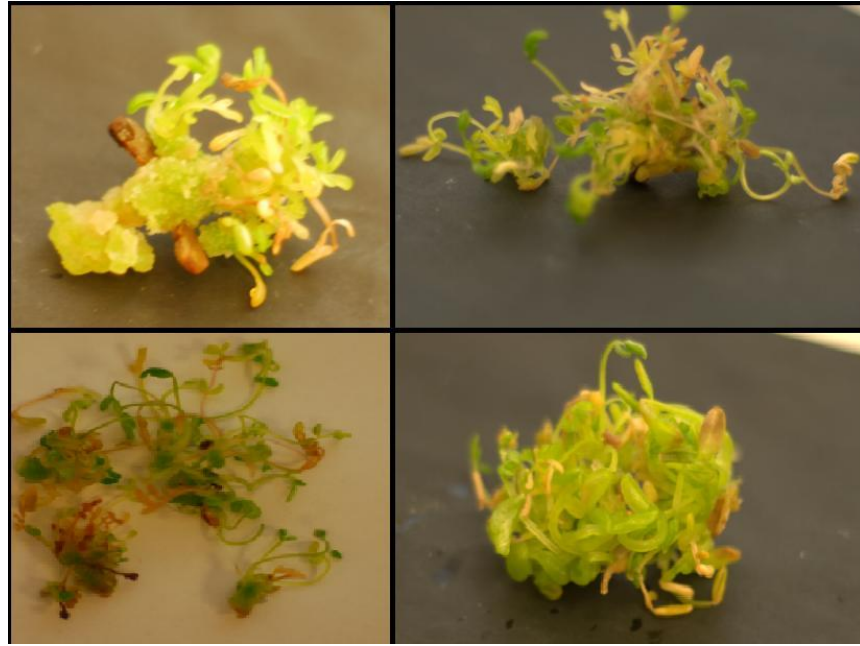
Çizelge 4.7 Farklı TDZ konsantrasyonlarının magenta kaplarında kültüre alınan tohum eksplantlarında kallus oluşumu, tohum başına sürgün sayısı üzerine etkisi

TDZ (mg/L)	Kallus Oluşumu (%)	Tohum Başına Sürgün Sayısı (adet)
0.0	55.00 b	5.38 c
0.1	83.33 a	14.86 a
0.5	60.00 b	9.80 b
1.0	46.66 b	9.00 b
2.0	56.66 b	8.07 b
4.0	16.66 d	2.17 d

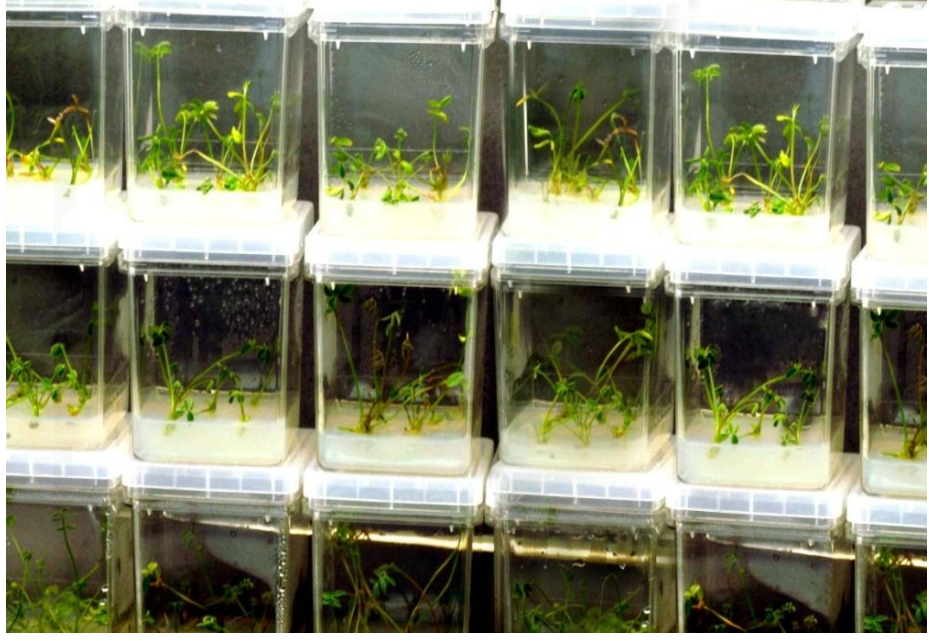
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.3 Elde Edilen Sürgünlerin Köklendirilmesi

Yaprak, gövde, kotiledon ve tohum eksplantlarından elde edilen sürgünler 1.0 mg/L IBA içeren besin ortamında köklendirildikten sonra içerisinde kompost bulunan saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.14 ve 4.15). Bitkiciklerin dış şartlara alışmasını sağlamak için öncelikle saksıların üzeri naylon ile örtülmüş ve 1 hafta sonra naylon örtü açılmıştır.



Şekil 4.13 Kültür başlangıcından 12 hafta sonra 0.1mg/L TDZ içeren besin ortamında tohum eksplantlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.14 Elde edilen sürgünlerin 1.0 mg/L IBA içeren besin ortamında köklendirilmesi



Şekil 4.15 Köklenen bitkiciklerin toprağa aktarılması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doku kültürlerinin başarısını etkileyen faktörlerin başında bakteri ve mantar bulaşıklıklarının olmamasıdır. Bundan dolayı kullanılacak bitki materyalinden kaynaklanabilecek bulaşıklığın başlangıç aşamasında giderilmesi gerekmektedir. Bitki materyalinden kaynaklanan bulaşıklığın giderilmesinde en yaygın kullanılan yöntem ise ticari çamaşır suyu (sodyum hipoklorit) ile yapılan yüzey sterilizasyonudur. Eğer kullanılacak bitkisel materyalde herhangi bir enfeksiyon bulunmuyorsa, yüzey sterilizasyon uygulamaları çok başarılı olmaktadır. Ancak yüzey sterilizasyonda kullanılacak olan dezenfektan miktarı ve süresi büyük önem taşımaktadır. En ideal dezenfektan miktarı ve süresi ise dokuya en az zarar veren ancak, bulaşıklığı tamamen gideren uygulamadır (Öztürk 2002). Genellikle yeşil aksam için daha düşük miktarlarda ve sürelerde dezenfeksiyon uygulanırken, tohum gibi sert bitki materyalinde miktar ve oran artırılabilir. Ancak, dokunun ve tohumun içine işlemiş olan enfeksiyonların yüzey sterilizasyonla giderilmesi mümkün olmamaktadır. Bundan dolayı başlangıç materyali olarak hastaliksız temiz bitki materyalinin kullanılması son derece büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında da meyve ve tohumlar ticari çamaşır suyuyla yüzey sterilizasyona tabi tutulduktan sonra, *in vitro*'da çimlendirilerek başlangıç materyali olarak bulaşıksız *in vitro* gelişen bitkicikler elde edilmeye çalışılmıştır. Yüzey sterilizasyon için ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. Doğrudan meyveler yüzey sterilizasyona tabi tutulduğunda %100 çamaşır suyundan düşük uygulamalarda bulaşıklık gözlenmiştir. %100 çamaşır suyu uygulamasında bulaşıklık olmazken, çimlenme oranında %100 olmuştur. Öte yandan meyve kabuğu çıkartıldıktan sonra, doğrudan tohumların yüzey sterilizasyonunda en uygun uygulamanın %70'lik çamaşır suyu olduğu gözlenmiştir. Daha yüksek oranlarda çamaşır suyu uygulamaları tohumun çimlenme oranını düşürmüştür. Çimlenen ve bulaşıklığın giderildiği tohumlardan sağlıklı bitkicikler elde edilerek sürgün rejenerasyonunda kullanılan yaprak, gövde ve kotiledon gibi eksplantların kaynağı olarak kullanılmıştır.

Yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde etmek için yapılan ilk çalışmalarda *in vitro* gelişen bitkiciklerden elde edilen kotiledon, yaprak ve gövde eksplantları değişik konsantrasyonlara TDZ, BAP ve NAA içeren besin ortamlarında ve plastik petri kaplarında kültüre alınmıştır. Yapılan bu çalışmalarda kullanılan tüm eksplantlar ve TDZ içeren büyüme düzenleyici kombinasyonlarında sürgün rejenerasyon oranı nisbeten düşük olmakla birlikte, en yüksek sürgün rejenerasyonu 1.0 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamlarında gövde eksplantından elde edilmiştir. Benzer şekilde besin ortamlarında TDZ kullanılması iris (Shibli ve Ajlouni 2000), burçak (Erdoğan vd. 2004) ve keten (Yıldız ve Özgen 2006) türlerinde sürgün rejenerasyonunu artırmamıştır.

Plastik petri kutularıyla karşılaştırıldığında, cam petri kutuları içerisinde yapılan denemelerde yüksek oranlarda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Cam petri kutularında yapılan denemelerde tek başına TDZ'nin farklı konsantrasyonları kullanılmış ve en yüksek rejenerasyonu 1 veya 2 mg/L TDZ kullanılan besin ortamlarından elde edilmiştir. Benzer şekilde bu TDZ dozlarının sürgün rejenerasyonunu artırdığı Yıldız vd. (2005) ve Yıldız ve Özgen (2006) tarafından da bildirilmiştir. Plastik petri kutularıyla karşılaştırıldığında, cam petri kutularında rejenerasyonun daha yüksek olmasının en önemli nedenlerinin başında cam petrilerde ışık geçirgenliğinin daha yüksek olması belirtilebilir. Ayrıca, plastik petri kaplarında daha fazla etilen birikimi ile *in vitro* bitki gelişimini engelleyen diğer toksik bileşiklerin de daha yüksek oranlarda oluşabileceği düşünülmektedir.

Doğrudan tohumların farklı konsantrasyonlarda TDZ içeren besin ortamlarının bulunduğu magenta kaplarına ekimi neticesinde de bu tohum eksplantlarında çok yüksek oranlarda sürgün gelişimi gözlenmiştir. Tohum eksplantlarından sürgün rejenerasyonunun yüksek olmasının en önemli nedeninin embriyoda bulunan meristemlerin hızlı gelişim göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tohumdan en yüksek sürgün rejenerasyonu ise 0.1 mg/L TDZ içeren MS besin ortamından elde edilirken, yüksek TDZ oranları rejenerasyonu olumsuz yönde etkilemiştir. Benzer sonuçlar Yıldız ve Özgen (2006), Şahin ve Demirbağ (2008) ve Kendir vd. (2009) tarafından da elde edilmiştir.

Sonuç olarak, plastik petri kutularında yapılan çalışmalarda BAP ve NAA ile birlikte veya tek başına kullanılan TDZ'nin sürgün rejenerasyonuna etkisi düşük olmuştur. Öte yandan, TDZ cam petri kutularında kullanıldığı zaman yüksek etki göstererek sürgün rejenerasyonunu önemli oranda artırmıştır. Bu sonuçlar cam petri kutularının *in vitro* sürgün rejenerasyonunda plastik petri kutularından daha etkili olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri. Uludag Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 83-94s., Bursa.
- Akçura, M., Eskalen, A. ve Elçi, S.1999. Korungada (*Onobrychis viciifolia* Scop.) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. Türkiye III. Tarla Bitkileri Kongresi,Cilt I, Genel ve Tahıllar, s 47-51, Adana.
- Aktoklu, E. 1995. Türkiye’de Yetişen *Onobrychis* Miller. (Fabaceae) türlerinin revizyonu. Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Anonim. 2007. T.Şişe ve Cam Fabrikaları A.Ş. Araştırma ve Teknoloji Genel Müdür Yardımcılığı Yayınları, s 56, İstanbul,
- Anonim. 2014. Web Sitesi: www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=61 Erişim Tarihi: 01.09.2014
- Barna, K.S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. *Plant Cell Rep.* 13: 510-513.
- Bhatt I.D. and Dhar, U. 2000. Combined effect of cytokinin on multiple shoot production from cotyledonary node explants of *Bauhinia vahlii*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 62: 79-83.
- Boissier, E. 1872. *Flora Orientalis*. Vol. 2, p 35, Geneve.
- Çöçü, S., Uranbey, S. ve Sancak, C. 2003. Bazı yaygın fig (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi* 9 (4): 445-449.
- Davis, P.H., 1965-1985. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 1-9. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Degirmenci, D. 2004. Korunga (*Onobrychis sativa* L.)’da *in vitro* köklendirme ve bitkilerin dış ortama alıştırılması. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Dimech, A.M., Cross ,R., Ford, R. and Taylor, P.W. 2007. Micropropagation of gynea lily (*Doryanthes excelsa* Correa) from new South Wales, Australia. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 88: 157-165.
- Duong, T.T., Bui, V.L., Nguyen, T.M., Jaime, T.D.S., Seiichi, F., Michio, T. and Tran, T.V.K. 2002. Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin layer of *Lilium longilorum*, *Plant Growth Regul.*, 37: 193-198.

- Elçi, S. 2005. Baklagil ve Bugdaygil Yem Bitkileri. T. C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, s. 223-257, Ankara
- Erdoğan Y., Çöçü S., Parmaksız İ., Sancak C. ve Arslan, O. 2004. Bazı Burçak (*Vicia ervilia* L. Wild.) Kotiledon Boğum Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 10 (2) 206-210.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksız, İ., Sancak, C. ve Arslan, O. 2005. Burçak (*Vicia ervilia* L.Wild.) Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltım. Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi Dergisi,11 (1), 60-64.
- Gençkan, S. 1992. Yem Bitkileri Tarımı. Ege Ü. Z. F. Yayın No: 467 (2. Baskı), İzmir, s. 222-228.
- Hedge, I.C. 1970. Hedysarum L. in Davis, P.H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. vol.3: 549-560. -Edinburgh.
- Hiroshi, N. and Zhumeng, Y. 1993. Tissue culture of sainfoin. Proceeding of the XVII international grassland congres, 1044-1045.
- Kendir, H., Sahin - Demirbag, N., Khawar, K.M. and Ozcan, S. 2009. *in vitro* plant regeneration from Turkish grass pea (*Lathyrus sativus* L.) using immature.
- Khawar, M.B. and Özcan, S. 2002. Effect of Indole-3-Butyric Acid on *in vitro* Root Development in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). Turk J. Bot. 26, p 109-111.
- Linne, C. 1753. Species plantarum: A facsim. of the 1st ed., p 89-95, 1753
- Maestro, M., Broca, A., Amella, A., Ferrer, C. 1985. Yield and Quality of Sainfoin in The Depression Prepirenarca Pastos, Grass and Forage Science, 159. 1, p 175 - 181.
- Manga, I. 1978. Yonca ve Korungada Değişik Olgunluk Devrelerinde Yapılan Biçmelerin Ot Verimine, Otun Kalitesine ve Yedek Besin Maddelerine Etkileri Üzerine Araştırmalar, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayın No. 228, s 25, Erzurum.
- Murashige, T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Özcan, S., Yıldız, M., Sancak, C. and Özgen, M. 1996a. Adventitious Shoot Regeneration in Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), *Tr. J. of Botany*, 20, 497-501.

- Özcan, S., Sevimay, C.S., Yıldız, M., Sancak, C. and Özgen, M. 1996b. Prolific shoot regeneration from immature embriyo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Plant Cell Rep., 16:200-203.
- Özgen, M., Altınok, S., Özcan, S. and Sevimay, C.S. 1997. *In vitro* Micropropagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars, Tr. J. of Botany, 21. 275-278.
- Özgen, M., Özcan, S., Sevimay, C.S., Sancak, C. and Yıldız, M. 1998. High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 52:205-208.
- Öztürk, M. 2002. Akvaryum Bitkisi *Ludwigia sp*'nin *in vitro* Koşullarda Çoğaltımına Farklı Oranlardaki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Su Ürünleri Anabilim Dalı. Ankara.
- Sancak, C. 1999. *In vitro* Micropropagation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.), Tr. J. of Botany, 23, 133-136.
- Serin, Y. ve Tan, M. 2001. Baklagil Yem Bitkileri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, yayın no:190, s. 49-66, Erzurum.
- Shah, M., Singh, K.H., Kachroo, D., Khanday, B.A. 1991. Performance of Lucerne and Sainfoin Under Different Cutting and Levels of Phosphorus, Indian Journal of Agronomy 36, 4. p 61 - 66.
- Shibli, R.A. and Ajlouni, M.M. 2000. Somatic embryogenesis in the endemic black iris (*Iris nigricans*). Plant Cell, Tiss. Org. Culture. 61: 15-21.
- Şahin - Demirbağ, N., Kendir, H., Khawar, K.M. and Çiftçi, C.Y. 2008. *In vitro* regeneration of Turkish dwarf chuckling (*Lathyrus cicera* L) using 7 immature zygotic embryo explant. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (12): pp. 2030-2033.
- Tang, Z., Shi, L., Chen, W.L. and Lin, H.H. 2007. *In vitro* propagation of Chirita heterotricha Merr, Prop. Ornamental Plants, 7: 43-48.
- Tosun, F. 1974. Baklagil ve buğdaygil yem bitkileri kültürü. Ziraat Fak. Yay. No., 123. Erzurum. S: 242-244.
- Yıldız, M., Koyuncu, N. ve Özgen, M. 2005. Adventitious shoot regeneration from hypocoty explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi. 369-373, Antalya.
- Yıldız, M. and Özgen, M. 2006. A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment 4: 171-174.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Burak TURGUT
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 01/01/1982
Medeni Durumu : Bekar
Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : TED Ankara Koleji, (1999)
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Tarla
Bitkileri Anabilim Dalı, (2006)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri
Anabilim Dalı, (2014)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yılı

Anadolu Sigorta, 2000-2004
Tarım Kredi Kooperatifleri, 2009
Koçtaş, 2011-2012