

*Lotus maritimus* L. Türünün İn Vitro Rejenerasyon Kabiliyetinin Belirlenmesi

Pelin Gökçe

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Aralık 2019

Determination of In Vitro Regeneration Ability of *Lotus maritimus* L.

Pelin Gökçe

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Field Crops

December 2019

*Lotus maritimus* L. Türünün İn Vitro Rejenerasyon Kabiliyetinin Belirlenmesi

Pelin Gökçe

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı  
Çayır Mera ve Yem Bitkileri Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Süleyman Avcı

Aralık 2019

## ONAY

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Pelin Gökçe'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Lotus maritimus* L. Türünün İn Vitro Rejenerasyon Kabiliyetinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Süleyman AVCI

**İkinci Danışman** : -

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye** : Doç. Dr. Süleyman AVCI

**Üye** : Prof. Dr. Cengiz SANCAK

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Şule ERKOVAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....  
tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Süleyman Avcı danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Lotus maritimus* türünün in vitro rejenerasyon kabiliyetinin belirlenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 23/12/2019

Pelin GÖKÇE

İmza

## ÖZET

Bu tez çalışmasında, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Meşelik Kampüsü içerisinde doğal yayılış gösteren *Lotus maritimus* L. türünün in vitro rejenerasyon kabiliyeti araştırılmıştır. Bitkinin tohumları in vitro koşullarda yetiştirilmiş ve çalışmada eksplant olarak sap, hipokotil, kotiledon, kök ve epikotil parçaları kullanılmıştır. Besi yeri olarak MS ortamı, oksin çeşidi olarak NAA ve bu oksinin 3 farklı konsantrasyonu (1, 2 ve 4 mg/l), sitokinin çeşidi olarak kontrol, 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l kinetin kombinasyonları kullanılmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre en yüksek kallus oluşum oranı gösteren eksplantlar sap ve epikotil parçalarıdır. Ayrıca, oksin ve sitokinin kombinasyonu olarak 1 veya 2 mg/l NAA + 0.5 mg/l kinetin en yüksek kallus oluşumunu vermiştir. Rejenerasyon oranı bakımından en yüksek değerler 3.56 ve 3.20 rejenerant/kallus ile 1 mg/l NAA içeren ortamlarda kültüre alınan epikotil ve hipokotil parçalarından elde edilmiştir.

Elde edilen sürgünler 1 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında kolaylıkla köklendirilmiştir. Köklenen bu sürgünler büyük oranda dış ortama uyum göstermiş ve hayatta kalmışlardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kallus oluşumu, *Lotus*, Rejenerasyon, Eksplant tipi, NAA, Kinetin

## SUMMARY

In this study, the in vitro regeneration ability of *Lotus maritimus* L. species which shows a natural distribution in the Meselik Campus of Eskişehir Osmangazi University was investigated. The seeds of *L. maritimus* were sown in vitro condition and stem, hypocotyl, cotyledon, root and epicotyl parts were cultured on MS medium containing different combinations of NAA concentrations (1, 2 and 4 mg/l) and cytokinin types (0, 1 mg/l BAP and 0.5 mg/l kinetin).

According to the results of the research, the highest callus induction was obtained from the stem and epicotyl explants at 1 or 2 mg/l NAA concentrations and 0.5 mg/l kinetin as cytokinin types. The highest plant regeneration values (3.56 and 3.20 regenerate/callus) were derived from the epicotyl and hypocotyl parts which were cultured on media containing 1 mg / l NAA.

The obtained shoots were easily rooted in ½ MS medium containing 1 mg / l NAA. These rooted shoots have largely adapted to the external environment and survived.

**Keywords:** Callus induction, *Lotus*, Regeneration, Explant type, NAA, Kinetin

## TEŞEKKÜR

Tez araştırmam boyunca bana akademik yönden, tecrübeleriyle ve değerli bilgileriyle destek olan fikirlerini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarında, fotoğraf çekimlerinde büyük yardım sunan ve yol gösteren değerli danışmam hocam Doç. Dr. Süleyman AVCI'ya teőekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince desteklerini sunan hocalarım ve manevi desteğini esirgemeyen aileme de teşekkür ederim.

Pelin Gökçe



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>4</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>10</b>
3.1. Materyal .....	10
3.2. Yöntem .....	11
3.2.1. Donör bitkiler için tohum eldesi .....	12
3.2.2. Deneme planı .....	12
3.2.3. Besi ortamı ve içeriği.....	12
3.2.3.1. <u>Stok solüsyon I (Makro elementler) ve stok solüsyon II (Mikro elementler) çözeltilerinin hazırlanması</u> .....	13
3.2.3.2. <u>Stok solüsyon III (Demir şelatları) çözeltilerinin hazırlanması</u> .....	13
3.2.3.3. <u>Stok solüsyon IV (Vitaminler) çözeltilerinin hazırlanması</u> .....	14
3.2.3.4. <u>Oksin ve sitokin hormonlarına ait stok çözeltilerinin hazırlanması</u> .....	14
3.2.3.5. <u>Stok çözeltileri kullanarak besi ortamının hazırlanması</u> .....	14
3.2.4. Tohumların sterilizasyonu, çimlendirilmesi ve eksplantların kültüre alınması .	15
3.2.5. Kallus indüksiyonu .....	15
3.2.6. Bitki rejenerasyonu.....	16
3.2.7. Rejenere olan bitkiciklerin köklendirilmesi ve saksılara aktarılması .....	16
3.2.8. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri.....	16
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA</b> .....	<b>17</b>
4.1. Kallus oluşumu .....	17
4.1.1. Kallus oluşum oranı.....	18
4.1.2. Eksplantın etkisi .....	19
4.1.3. Oksin konsantrasyonu ve eksplant tipi × oksin konsantrasyon etkisi .....	20

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4.1.4. Stokinin çeşidi, eksplant tipi × sitokinin çeşidi, oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi ve eksplant tipi × oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi etkisi.....	22
4.2. Bitki rejenerasyonu.....	25
4.2.1. Rejenerasyon oranı .....	28
4.2.1.1. <u>Eksplantın etkisi</u> .....	28
4.2.1.2. <u>Oksin konsantrasyonu ve eksplant tipi × oksin konsantrasyon etkisi</u> .....	29
4.2.1.3. <u>Stokinin çeşidi, eksplant tipi × sitokinin çeşidi, oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi ve eksplant tipi × oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi etkisi</u> .....	31
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>35</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. <i>L. maritimus</i> türünün genel görünüşü .....	10
3.2. <i>L. maritimus</i> türünün yaprak görünümü .....	10
3.3. <i>L. maritimus</i> türünün çiçek görünümü .....	11
3.4. <i>L. maritimus</i> türünün meyve görünümü .....	11
4.1. <i>L. maritimus</i> bitkisinin sap eksplantlarından meydana gelen kalluslar .....	17
4.2. <i>L. maritimus</i> bitkisinin epikotil eksplantlarından meydana gelen kalluslar .....	18
4.3. <i>L. maritimus</i> bitkisinin kök eksplantlarından meydana gelen kalluslar .....	18
4.4. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra ışıklı koşullarda epikotil eksplantlarından meydana gelen bitkicikler .....	26
4.5. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra A) sap eksplantlarından meydana gelen ve kök oluşturmayan sürgünler, B) hipokotil eksplantlarından meydana gelen köklü sürgünler .....	26
4.6. 2 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan sap eksplantlarından meydana gelen köksüz sürgünlerin 1 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında köklendirilmesi .....	27
4.7. 1 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan epikotil eksplantlarından meydana gelen bitkilerin dış ortama alıştırılması .....	27

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. MS besi ortamının içeriğinde bulunan komponentler .....	13
3.2. Oksin ve sitokinlere ait çözücü ve seyreltme ortamları, sıvı olarak depolama koşulları ve siterilizasyon şartları .....	14
4.1. <i>L. maritimus</i> türünde, farklı oksin konsantrasyonu ve sitokinin çeşitleriyle farklı eksplant tiplerinden elde edilen kallus oluşum oranına ait varyans analiz sonuçları .....	19
4.2. <i>L. maritimus</i> türünün farklı eksplant tiplerinde ortalama kallus oluşum oranları (%) .....	19
4.3. Farklı oksin konsantrasyonlarının ortalama kallus oluşum oranına etkisi .....	21
4.4. Farklı eksplant tiplerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%) .....	21
4.5. Farklı sitokinin çeşitlerinin ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%) .....	22
4.6. Farklı eksplant tiplerinin farklı sitokinin çeşitlerinde ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%) .....	23
4.7. Farklı sitokinin çeşitlerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%) .....	23
4.8. Farklı oksin konsantrasyonları ve sitokinin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde kallus oluşum oranına etkisi (%) .....	25
4.9. <i>L. maritimus</i> türünde, farklı oksin konsantrasyonu ve sitokinin çeşitleriyle farklı eksplant tiplerinden elde edilen kallus başına sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları .....	28
4.10. <i>L. maritimus</i> türünün farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranları (rejenerant/kallus) .....	29
4.11. Farklı oksin konsantrasyonlarının ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/ kallus) etkisi .....	29
4.12. Farklı oksin konsantrasyonlarının farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi .....	30
4.13. Farklı sitokinin çeşitlerinin ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi.....	31
4.14. Farklı sitokinin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi .....	32
4.15. Farklı sitokinin çeşitlerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi .....	32
4.16. Farklı oksin konsantrasyonları ve sitokinin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi .....	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
da	Dekar
ha	Hektar
%	Yüzde
°C	Sıcaklık birimi
mm	Milimetre
mg	Miligram
g	Gram
µg	mikrogram
l	Litre
ml	Mililitre
mmol	Milimol
µM	Mikromolar
N	Azot
pH	Çözeltilerin asitlik/bazlık ölçü birimi

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
2,4 D	2,4 Diklorofenoksi asetik asit
BAP	6-Benzylaminopurine
NAA	1-Naftalin Asetik asit
IAA	indol-3-asetik asit
BA	6-Benzylaminopurine
2-ip	2-isopentenyladenine
NaOH	Sodyum hidroksit
HCL	Hidroklorik asit
LSD	Asgari Önemli Fark
Vd.	ve diğerleri

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için sınırlı olan tarım alanlarında doğal kaynakları da koruyarak tarımsal üretimin sürdürülebilir şekilde artırılması gerekmektedir. İnsan sağlığının korunması ve beslenmenin dengeli bir şekilde yapılması için hayvansal ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvancılığın gelişebilmesindeki en önemli etken ise kaliteli kaba yem teminidir (Çölgeçen, 2005). Hayvansal üretim için en ucuz kaliteli kaba yemler çayır ve meralar ile tarla bitkileri içerisinde yetiştirilen yem bitkilerinden elde edilmektedir.

Ülke hayvancılığı için en önemli kaba yem kaynaklarından olan doğal çayır ve mera alanlarımız, yanlış uygulamalar nedeniyle bugün 14.6 milyon ha'a kadar gerilemiştir (TUİK, 2018). Mevcut çayır ve mera alanları üzerindeki uzun yıllardır süren plansız, aşırı ve erken otlatmalar nedeniyle bugün bu alanlarda bitki örtüsü bozulmuş, verim azalmış ve erozyonun etkisi artmıştır (Demiroğlu Topçu ve Özkan, 2017). Ayrıca, hayvan varlığının artmasıyla bu alanlar üzerindeki baskı her geçen gün artmaktadır (Kuşvuran vd., 2011). Ülkemizde en önemli doğal kaynaklar arasında yer alan çayır ve meralarımız uygun ıslah metotları kullanılarak ıslah edilmeli ve daha sonra ulaşılan verim düzeyleri kontrollü otlatma ile korunmalıdır. Aynı zamanda çayır ve meralarımız üzerindeki baskı tarla bitkileri içerisinde yem bitkileri tarımının geliştirilmesiyle azaltılmalıdır.

Ülkemizde yaygın olarak rastlanan zayıf meralarda arzulanan türlerin oranı % 25'i geçmemekte ve bu meraların ıslahında otlatmanın kontrol altına alınması olumlu sonuçlar vermemektedir (Altın vd., 2005). Yıllık yağış toplamının 250-300 mm'den fazla, toprak ve topoğrafyası yapısının uygun olduğu bitki örtüsü zayıflamış mera alanlarında en akılcı ıslah yöntemi suni mera tesis etmektir (Tosun, 1996; Altın vd., 2005).

Suni mera tesisinin başarılı olması için ülkemizin farklı ekolojik koşullarına adapte olmuş yem bitkilerinin ıslah edilmesi ve tohumlarının üretilmesi gerekmektedir. Yapılan birçok çalışma olmasına rağmen ülkemizin farklı bölgelerine uyum sağlamış ve mera tesisi

için uygun yem bitkileri çeşitlerinin sayısı oldukça az ve bunların tohumlarına ulaşmak da oldukça zordur.

Ülkemizin farklı iklim koşulları ve toprak yapısına sahip bölgelerinde yayılış gösteren yabancı yem bitkisi türleri suni mera tesisi için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu türler yıllardır farklı stres faktörlerine karşı uyum göstermiş ve günümüze kadar ulaşmışlardır. Ancak, bu türler içerisinde ıslah programları dahilinde üstün hat ve bitkilerin belirlenerek seçilmesi ve tescil edilmesi gerekmektedir.

Bu türlerin ıslahı çoğu yabancı döllenmesi nedeniyle zor ve zaman alıcı olmaktadır. Islah amacına uygun olan hatların seçimi ve saflaştırma süreçleri klasik ıslah metotlarıyla uzun yıllar sürmektedir. Bu nedenle son yıllarda doku kültürü ve moleküler teknikler kullanılarak ıslah süreçlerinin kısaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ancak doku kültürü tekniklerinin başarılı bir şekilde uygulanmasında en büyük kısıtlama, cins, tür ve genotipler arasında rejenerasyon oranının farklılık göstermesidir. Bir türün farklı genotipleri, in vitro kültürde farklı sonuçlar verebilmekte ve bu nedenle her genotip için uygun kültür koşullarının belirlenmesi gerekmektedir (Hatipoğlu, 1995).

Suni mera tesisinde ve yem bitkileri tarımında baklagiller (*Fabaceae*) familyasına dahil yem bitkilerinin kullanılması hayvanlara kaliteli kaba yem sağlamanın yanı sıra ekim nöbeti sistemlerine dahil edilerek tarımsal verimliliğin sürdürülebilir şekilde artırılmasında ve toprak erozyonunun önlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Bu familya içerisinde yer alan Lotus cinsine ait türler ılıman ve nemli bölgelerdeki meralarda hayvanlara kaliteli kaba yem sağlamaktadır. Gazalboynuzu, şişirme özelliği olmadığı için saf ve karışım halinde mera bitkisi olarak güvenle kullanılabilir (Açıkgöz, 2001). Serin ve nemli bölgelerdeki asidik ve verimsiz topraklardaki mera tesisine uygun oldukları için gazalboynuzu türleri bu alanlarda öncü baklagiller olarak kabul edilir (Hatipoğlu ve Avcıoğlu, 2009).

*Lotus* cinsi ve buna dahil olan türler Avrupa, Kuzey ve Orta Amerika, Kuzey Afrika, Asya ve Avustralya'dan Kanarya Adalarına kadar dünyanın değişik bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Gençkan, 1983). Gazalboynuzu cinsinin tüm dünyaya yayılmış 125-180 türü bulunur (Sokoloff ve Lock, 2005) ve bu türlerin çoğunluğu Akdeniz bölgesinde yer

alır (Hatipoğlu ve Avcioğlu, 2009). Lotus cinsi içerisinde *Lotus corniculatus* L., *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. ex Willd. ve *Lotus uliginosus* Schkuhr türlerinin tarımı yaygın olarak yapılmaktadır (George, 2012). Diğer *Lotus* türlerinin tarımsal özellikleriyle ilgili kısıtlı oranda bilgi bulunmaktadır.

Tarımı yaygın olmayan *Lotus* türlerinden birisi olan *Lotus maritimus* (Syn: *Tetragonolobus maritimus* Roth, *Lotus siliquosus* L., *Tetragonolobus prostratus* Moench, *Tetragonolobus siliquosus* Roth, *Tetragonolobus tauricus* Bunge ex Nyman) 35 cm büyüyebilen ve iek ta yaprağıyla altın sarısı ya da sülfür renkte olan bir bitkidir (Kavak, 2014; Anonim, 2019). Canavar dişi adıyla da bilinen bitki Avrupa, Afrika ve ılıman Asya'da yayılış göstermektedir (Roskov vd., 2005). Türkiye'de İç Anadolu bölgesinde yaygın olarak yayılış gösteren bitki, "THE IUCN Red List"e göre asgari endişe altında tür sınıfı içindedir (Bakis vd., 2011; Anonim, 2019). Bitki çok yıllık olup, tırmanıcı bir gövdeye sahip değildir ve genellikle taşlık bölge, deniz kıyısı ve kıyı yamaçlarında yayılış gösterir (Anonim, 2019). Bu tür aynı zamanda bataklık alanlarda (genellikle tuzlu su) ve durgun havuzların çevresinde yayılış gösterebilmektedir (Kavak, 2014). ılıman ve nemli bölgelerdeki ıslak ve tuzlu alanlarda mera tesisi için bu türün değerlendirme potansiyeli bulunmaktadır.

Ülkemizin farklı bölgelerinde mera tesisi için marjinal toprak koşullarına adapte olmuş üstün cins ve türlerin belirlenmesi ve ıslah edilerek tarımsal üretime kazandırılması büyük önem taşmaktadır. Doku kültürü teknikleriyle klasik ıslah yöntemleri desteklenmekte ve seçilen ümitvar hatlar saf bir şekilde kısa sürede çok miktarda çoğaltılabilmektedir. Bu alışmada, Eskişehir'de dar alanda yayılış gösteren *Lotus maritimus* türünün farklı bitki parçaları kullanılarak ilk defa in vitro rejenerasyon kabiliyetinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Tomes (1979), Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus*) bir doku kültürü yöntemi tanımlamıştır. Dalların boğum bölgelerinden ve apikal sürgün ucundan 1 ay içinde küçük sürgünler geliştirmiştir. Yüzey sterilizasyonunun zor olduğu durumlarda sürgün ucu eksplantları tercih edilse bile doku kültürlerinin boğum parçalarından daha hızlı geliştiği bildirilmiştir. Kültür ortamına ilave edilen benziladenin sürgün uçlarından sürgün oluşumunu ve boğum ve sürgün ucu kültürlerinden oluşan sürgün sayısını artırmıştır. 1 ay süreyle azaltılmış sıcaklıklarda (2-4 °C) kültürlerin inkübasyonu sürgünlerin sayı ve boylarında çok küçük bir değişikliğe neden olmuştur. Aynı zamanda düşük sıcaklıkta inkübe edilen kültürlerden büyüme odasına transfer edilmiş olan bitkilerin yüksek hayatta kalma oranına sahip olduğu anlaşılmıştır.

Swanson vd. (1980), Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* cv. Leo) bitkisinde yüksek seviyelerde 2,4-D uygulayarak bu dozlara dayanıklı hızlı büyüyen, canlı, yeşil kalluslar elde etmişlerdir. Elde edilen seçilmiş popülasyonlar sürgün ucu kültürü yoluyla çoğaltılmıştır.

Orshinsky vd. (1983), Gazalboynuzunda, kallus kültürlerinden üretilen sürgünlerin sayısını artıran ve bitkilerin yenilenmesi için gereken süreyi azaltan bir homojenizasyon ve kaplama tekniği tarif edilmiştir. Genotipe bağlı olarak kallusun gramı başına elde edilmiş bitki sayısında 2-15 katlık bir artış gözlenmiştir. İlk çiçeklenme zamanı, bitki başına dal sayıları, polen boyanabilirliği, stomaların uzunluğu ve tüm bitkinin verimi gibi özellikler bakımından homojenizeye karşı homojenize olmayan kallustan elde edilen bitkiler arasında hiçbir fark oluşmadığı gösterilmiştir. Tekniğin uzun vadeli kültürlerden bitkilerin verimli bir şekilde geri kazanılması için faydalı olduğu kanıtlanmış ve herbisit toleransı için seçilen kültürlerde bitki rejenerasyonunda 15 katlık bir artış elde edilmiştir.

Ahuja vd. (1983), *Lotus corniculatus* L'nin fide köklerinden, hipokotillerden ve kotiledonlarından enzimatik olarak protoplast izolasyonu yapmışlardır. Üretilen kalluslara, üretken sürgün rejenerasyonu uygulanmıştır. Protoplast türevli dokulardan bitkilerin hızlı ve kolay şekilde elde edilmesi bu baklagil yem bitkisini genetik manüpülasyonda deneysel sistemler için uygun hale getirmiştir.

Rybczynski ve Badzian (1987), *Lotus corniculatus* L. fidelerinin meristematik olmayan kök bölümlerinden bitki rejenerasyonu ile ilgili deneyleri MS ortamı kullanarak yapmışlardır. Kültüre edilen eksplantların % 90-100'ü yanıt vermiştir. Elde edilen yanıt kullanılan varyetelere göre değişmiştir. Tomurcuk oluşumu, kallusun ara fazı olmaksızın eksplantın proksimal ucunda meydana gelmiştir. Bu durumun sukroz konsantrasyonuna da bağlı olduğu bildirilmiştir. Meristematik olmayan kök bölümlerinden üretilen rejenerantların fertil olduğu ve tohum bağladığı ortaya koyulmuştur.

Piccirilli vd. (1988), *Lotus tenuis*'te kallus indüksiyonu ve farklı eksplantlardan büyüme için kültür koşulları belirlenmiştir. Kotiledon, kök ve hipokotillerden hızlı büyüyen kalluslar, sadece 2,4-D veya NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Yapraklarda en iyi sonuçlar, 2,4-D içeren ortamlara BAP veya kinetin ilave edilmesiyle elde edilmiştir. Bu kalluslar sadece NAA ile birlikte BAP veya kinetin varlığında rejenerasyon ortamında sürgün üretebilmiştir. Protoplastlar kotiledonlardan, köklerden ve yapraklardan elde edilmiştir, fakat sadece kotiledon ve kök protoplastları bölünebilmiştir. Bitki rejenerasyonu, her türlü kallustan elde edilmiştir.

Pupilli vd. (1990), *Lotus pedunculatus*'ta yaprak ve kotiledonlardan üretilmiş kalluslardan ve protoplast kaynaklı dokulardan bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Kallus indüksiyonu için 2,4-D kullanılırken, bitki rejenerasyonunda sürgün oluşumu IAA ve BA yoluyla, sürgün büyümesi ise kinetin ile sağlanmıştır. Kök oluşumu, IAA varlığında meydana gelmiştir. Kotiledon protoplastları düşük verimli olup araya giren bir kallus fazı ile bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir.

Özcan vd. (1993), bezelyede olgunlaşmamış embriyolardan yüksek frekanslı adventif sürgün rejenerasyonu için bir yöntem geliştirmişlerdir. Üretken sürgün rejenerasyonu, 0.5 mg/l BAP ve 4 mg/l NAA içeren MS ortamındaki ilk kallus büyümesinin ardından meydana gelmiştir. Embriyonik eksene yakın olan kotiledon eksplantları, en yüksek rejenerasyon potansiyeline sahipken, embriyonik eksenin varlığının adventif sürgün rejenerasyonunu ihibe ettiği bildirilmiştir. Gümüş nitratın ( $AgNO_3$ ) ortama eklenmesi, rejenerasyonun sayısını artırırken, köklenme kapasitesini azaltmıştır. Rejenerasyon

edilmiş sürgünlerin 1 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında kolayca köklendiği ortaya koyulmuştur.

Vessabutr vd. (1995), Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* L. cv. Leo) protoplastlarından hızlı bitki rejenerasyonu için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu metod ile saflaştırma sonrası yüksek verimli canlı protoplastlar elde edilmiştir. Saflaştırmadan sonra serada bitkiciklerin oluşumuna kadar geçen süre yaklaşık 2,5 ay sürmüştür. Toprakta, 100'den fazla bitkicik büyütülmüştür. Bu prosedür sonucunda, iki somoklanal varyant, klorofil üretimi bakımından 1 kimerik bitki ve 1 adet albino hücre hattı elde edilmiştir.

Nenz vd. (1996), *Lotus angustissimus* L.'nin farklı bitki parçalarından kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu için kültür koşulları belirlenmiştir. Kalluslar, hipokotil, yaprak, dal, kotiledon ve köklerden farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda 2,4-D veya NAA içeren ortamlara BA veya kinetin ilave edilmesiyle elde edilmiştir. Sadece BA veya kinetin ile NAA varlığında meydana gelen kalluslar sürgün üretmiştir. Hipokotil eksplantlardan üretilen kalluslar, sürgün rejenerasyonunda en etkili olmuştur.

Mingzhi (1996), *Lotus corniculatus* L. bitkisinde kalluslar, genç bitkilerinin saplarından 2 mg/l 2,4-D ve 2-ip içeren MS ortamında elde edilmiştir. Taze ve yeşil kalluslardan elde edilen protoplastlar, 300 mg/l kazein hidrolizat, % 2'lik Hindistan cevizi, % 2'lik şeker, % 6 glukoz, 2 mg/L 2, 4-D, 0.5 mg/L BAP, 5 mmol/L 2- (N-morpholino )-ethanesulfonic acid (MES) içeren modifiye KM8P, V-KM, MS ve SH ortamlarında kültür edilmiştir. Rejenere olan hücrelerin bölünmesi ve küçük kallus oluşumları 4 ortam içinde gözlenmiştir. KM8P dört ortam içerisinde en iyi olanıdır. Bu ortam üzerinde koloni oluşum sıklığı % 3.4 olmuştur. Kalluslardan bitkilerin oluşum sıklığı % 100 dür.

Nikolic vd. (2003), Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* L.) bitkisinin Bokor çeşidinde, sürgün rejenerasyonu ve genetik transformasyon için etkili bir protokol geliştirmişlerdir. Kök segmentleri üzerinden gelişen sürgünler, *Agrobacterium rhizogenes* A4M7GUS hattıyla inoküle edilmiş ve 0.2 mg/l BAP içeren ortamda tüylü kökler oluşturarak sürgünler meydana getirmişlerdir.

Barbulova vd. (2005), *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen eksplantlarında verimli bir gen transfer metodolojisinin geliştirilmesi için ön koşul olarak doğrudan somatik embriyogenezisin indüklenme olasılığının araştırılması gerekir. Yaprak sapları, kotiledon, hipokotil ve sap segmentleri, farklı miktarlarda benzilaminopürin (BAP) ve/veya tidiazuron (TDZ) varlığında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon farklı eksplantlarda farklı şekilde gerçekleşmiş ve TDZ ile daha yüksek sürgün oluşumu elde edilmiştir. Thidiazuron ayrıca dolaylı organogeneze dayalı transformasyon-rejenerasyon prosedürü içinde yüksek oranda tekrarlanabilir sürgün oluşum oranı göstermiştir.

Tirichine vd. (2005), *Lotus japonicus*'da in vitro sürgün rejenerasyonunun hipokotil parçalarından başarılı bir şekilde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Nikolic vd. (2006), *Lotus corniculatus* L.'de zeatin (ZEA), izopentanil adenin (2İP), kinetin (KIN), benziladenin (BA) ve thidiazuron (TDZ)'un tohum çimlenmesi, fide sürgünlerinin ve köklerinin uzaması, rejenerasyon sıklığı ve fide başına rejenerant sayısına etkileri belirlenmiştir. Steril tohumlar in vitro koşullarda % 3 şeker, % 0.7 agar ve farklı sitokinin dozlarını (0, 0.08, 0.22, 0.35, 0.80, 2.20, ve 3.50 µM) içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Fideler 30 gün sonra sitokinin içermeyen ortamlarda 60 gün süreyle kültür edilmiştir. Tüm sitokininler optimum konsantrasyonlarda tohum çimlenme oranını 2 kat teşvik etmişlerdir. Bununla birlikte, TDZ ve ZEA en aktif sitokininler olup bunları BA takip etmiş, oysa KIN ve 2 İP çimlenmeyi sadece yüksek konsantrasyonlarda teşvik etmişlerdir. Sürgünlerin ve köklerin uzaması, en düşük TDZ ve BA konsantrasyonlarında kuvvetli bir şekilde inhibe edilirken, ZEA, KIN ve 2İP'de orta dozlarda inhibasyon görülmüştür. Fide başına en yüksek rejenerant sayısı TDZ üzerinde bulunurken, rejenerantlardan üretilen tohumların sıklığı, ZEA ve BA'da en yüksek olmuştur. Sonuç olarak, sitokinin içeren ortamlarda tohum kültürünün, ardından sitokinin içermeyen ortama transferi çok sayıda uniform rejenerantın hızlı üretimi için uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Raikar vd. (2008), *Lotus corniculatus* protoplastların izolasyonunu etkileyen çeşitli parametreler, örneğin enzim kombinasyonu, doku tipi, inkübasyon süresi ve ozmolarite seviyesi araştırılmıştır. Test edilmiş olan üç enzim kombinasyonundan en yüksek canlı protoplast verimi, %2 Cellulase Onozuka RS, %1 Macerozyme R-10, %0.5 Driselase ve

%0.2 Pektoliz kombinasyonu ile elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalara oranla protoplast izolasyonu için soldurulmuş kotiledon dokusunun kullanılması önemli ölçüde daha yüksek canlı protoplast elde edilmesini sağlamıştır. Sürgün rejenerasyonu ve sağlam bitkiler protoplast türevli hücre kolonilerinin %46'sından elde edilmiştir.

Espasandin vd. (2010), *Lotus tenuis*'de transgenetik bitkilerin üretimi için yaprak segmentleri kullanılarak *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon yapılmıştır. Yaprak segmentleri ko-kültivasyon sonrası 45 gün süreyle NAA, BA, kanamisin ( $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and cefotaxime ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Eksplantlar, bütün süre boyunca seçim basıncını korumak için birkaç kez (2 haftalık aralıklarla) alt kültür edilmiştir.

Nandor (2011), doğal ortamında bulunan *Lotus corniculatus* L. bitkilerinin farklı eksplantları üzerinde in vitro çalışmalar yürütmüştür. MS ortamının 10 varyantı üzerinde bu eksplantlar rejenerasyon kapasitelerini belirlemek amacıyla kültüre alınmıştır. Buna paralel olarak, sonuçların normal olduğunu kanıtlamak için yüksek dozlarda (50 mg/l BA ve 2 mg/l zeatin) fitohormon kullanılmış ve dallı rizogen kalluslar elde edilmiştir.

Orcen (2013), Ege Bölgesinde, Sarı çiçekli gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* L.) bitkisine ait doğal yayılış gösteren popülasyonların 5 farklı eksplantının (kotiledon, yaprak, epikotil, hipokotil, apikal sürgün ucu) rejenerasyon kapasiteleri BA içeren iki farklı besi ortamında (MS ve PC-L2) değerlendirilmiştir. Sürgün ucu eksplantları, 3 mg/l BA konsantrasyon seviyesi ve MS temel ortamında, en iyi sürgün oluşum yüzdesini ve maksimum sürgün sayısını sağlamıştır. En yüksek sürgün uzunluğu, 1 mg/l BA ile desteklenmiş MS üzerinde sürgün ucu ve epikotil segmentlerinden elde edilmiştir. En iyi kök oluşumu ve kök uzunluğu, 1 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde meydana gelmiştir.

Uysal (2014), sarıçiçekli gazal boynuzu (*Lotus corniculatus* L.) bitkisinde kök meristemleri ve kotiledon yaprakları kullanarak memeli cinsiyet hormonlarının (17 $\beta$ estradiol, estron, progesteron ve testosteron) in vitro rejenerasyon üzerine etkisini incelemiştir. Bu çalışmada, memeli cinsiyet hormonlarının 0, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-6</sup>mM dozları ve bu hormonların ikili kombinasyonları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, kök

meristemlerinde herhangi bir etkileşim olmadığı, tekli hormon doz ve konsantrasyonlarında kotiledon yaprakların tamamının öldüğü, 6B5T, 4T6P, 5T5P, 5T6P ve 6T6P ikili hormon kombinasyonlarında ise çok az bir kısmının rejenere olduğunu tespit etmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Meşelik Kampüsü içerisinde doğal yayılış gösteren baklagiller (*Fabaceae*) familyasına dahil *Lotus maritimus* L. türü kullanılmıştır. Bu tür çok yıllık olup, taşlık alanlar ve denizin kıyı yamaçlarında görülür (Anonim, 2019). Heyn (1970)'e göre, bitki gövdesi yükselen özellikte olup 10-35 cm boyunda, seyrek veya yoğun tüylerle kaplıdır (Şekil 3.1). Yaprakçıklar kiliat, asimmetrik ve apikulattır (Şekil 3.2). Çiçekleri tektir ve korolla altın sarısı ya da sülfür renklidir (Şekil 3.3). Meyveleri hafif düz ve 4 kısa membranöz kanatlıdır (Şekil 3.4).



Şekil 3.1. *L. maritimus* türünün genel görünüşü



Şekil 3.2. *L. maritimus* türünün yaprak görünümü



Şekil 3.3. *L. maritimus* türünün çiçek görünümü



Şekil 3.4. *L. maritimus* türünün meyve görünümü

### 3.2. Yöntem

Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü laboratuvarında yürütülmüştür.



### 3.2.1. Donör bitkiler için tohum eldesi

2016-2017 yılları arasında doğal yayılış alanından toplanan meyveler kurutulularak tohumları elle çıkarılmıştır. Daha sonra bu tohumlar in vitro çalışmalarda kullanılincaya kadar + 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Deneme planı

Bu çalışmada, *L. maritimus* türüne ait sap, epikotil, hipokotil, kök ve kotiledon eksplantları, temel besi yeri olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı, oksin çeşidi olarak NAA (1-Naphthaleneacetic acid) ve bu oksinin 3 farklı konsantrasyonu (1, 2 ve 4 mg/l), sitokinin çeşidi olarak kontrol, 1 mg/l BAP (6-Benzylaminopurine) ve 0.5 mg/l kinetin (6-Furfurylaminopurine) kullanılmıştır.

Araştırma tesadüf parsellerinde 3 faktörlü olarak düzenlenmiştir. Birinci faktör; eksplant çeşitleri; ikinci faktör; oksin konsantrasyonları ve üçüncü faktörü de sitokinin çeşitleri oluşturmuştur. Her uygulama kombinasyonu üç kez tekrarlanmıştır.

### 3.2.3. Besi ortamı ve içeriği

Araştırmada besi yeri olarak MS (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. MS besi ortamının içeriği Çizelge 3.1’de verilmiş olup birim hacimde olması gereken maddelerin miktarları düşük olduğu için stok solüsyonlar hazırlanmıştır (Hatipoğlu, 1995).

Çizelge 3.1. MS besi ortamının içeriğinde bulunan komponentler

<b>Makro elementler (Stok solüsyon I)</b>	<b>Konsantrasyonlar (mg/l)</b>
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Mikro elementler (Stok solüsyon II)</b>	
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22.3
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8.6
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Demir şelatları (Stok solüsyon III)</b>	
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
<b>Vitaminler (Stok solüsyon IV)</b>	
Nikotinic asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Myo-inositol	100
Glisin	2.0
<b>Sakkaroz (gr)</b>	30
<b>Agar (gr)</b>	6-8
<b>pH</b>	5.6-5.8

### **3.2.3.1. Stok solüsyon I (Makro elementler) ve stok solüsyon II (Mikro elementler) çözeltilerinin hazırlanması**

Stok solüsyon I için MS besi ortamının içeriğinde bulunması gereken makro elementlerin 20 katı hassas terazide tartılmış ve 500 ml saf su içerisinde çözülerek 1000 litreye tamamlanmıştır. Bu çözelti 50 ml plastik şişelerde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok solüsyon II için de mikro elementlerin MS ortamı için gerekli miktarlarının 200 katı tartılmış ve aynı şekilde 1000 ml içerisinde çözülerek 500 ml'lik iki ayrı şişeye koyulmuş ve + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3.2. Stok solüsyon III (Demir şelatları) çözeltilerinin hazırlanması**

Babaoğlu vd. (2001)'e göre 7.45 gr Na<sub>2</sub>EDTA ve 5.57 gr FeSO<sub>4</sub> 350 ml saf su içeren ayrı kaplarda hafifçe ısıtılarak ve karıştırılarak eritilmiştir. Daha sonra her iki solüsyon

kariştirilmiş ve 1 litreye tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir. Koyu altın renkte olan bu solüsyon 500 ml'lik koyu renkli pyrex şişe içinde + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3.3. Stok solüsyon IV (Vitaminler) çözeltisinin hazırlanması**

MS besi ortamında bulunması gereken vitaminlerin 200 katı hassas terazide tartılmış ve 1000 ml'ye tamamlanarak 500 ml'lik 2 ayrı şişede +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3.4. Oksin ve sitokin hormonlarına ait stok çözeltilerinin hazırlanması**

Besi ortamında kullanılan oksin ve sitokinler için uygun çözücü ve seyreltme ortamları, sıvı olarak depolama koşulları ve sterilizasyon şartlarıyla ilgili bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Oksin ve sitokinlere ait çözücü ve seyreltme ortamları, sıvı olarak depolama koşulları ve siterilizasyon şartları

Oksin çeşidi	Çözücü ortamı	Seyreltme ortamı	Sıvı depolama koşulları	Sterilizasyon şartları
NAA	1 NaOH	N Saf su	2-8 °C	Otoklavlanabilir
BAP	1 NaOH	N Saf su	2-8 °C	Otoklavlanabilir. Ancak, bazı özelliklerini kaybetme riskinden dolayı filtre siterilizasyonu önerilmektedir.
Kinetin	1 NaOH	N Saf su	-0 °C	Otoklavlanabilir. Ancak, bazı özelliklerini kaybetme riskinden dolayı filtre siterilizasyonu önerilmektedir.

**Kaynak:**<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html>.

Bu büyüme düzenleyicilerin 50 mg'ı ilk olarak birkaç damla 1 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve her bir hormon için uygun depolama koşullarında muhafaza edilmiştir (Tablo 3.2).

### **3.2.3.5. Stok çözeltileri kullanarak besi ortamının hazırlanması**

Bhojwani ve Razdan (1996)'a göre 1 litre besi ortamı hazırlamak için stok solüsyonu I (20x)'den 50 ml, stok solüsyonu II (200x)'den 5 ml, stok solüsyonu III (200x)'den 5 ml ve stok solüsyonu IV (200x)'den 5 ml olmak üzere gerekli miktarlar 1 litrelik beher içesine yerleştirilmiştir. Şeker kaynağı olarak sakkarozdan 30 g/l tartılmış ve büyüme düzenleyici

hormonların gerekli miktarları ilave edildikten sonra karışımın hacmi 800 ml'ye tamamlanmıştır. Karışımın pH değeri 1 N NaOH ve 1 N HCl çözeltilerinin yardımıyla 5.8'e ayarlanmıştır. Çözelti 1000 ml'ye tamamlanarak 500 ml'lik iki eşit parçaya bölünmüş ve her şişeye 3.25 g agar ilave edilmiştir. Şişeler içindeki karışım otoklavda 121 °C'de ve 1.2 bar basınç altında 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan karışımın sıcaklığı 40-50 °C'ye düştüğünde steril petri kapları içerisine dökülmüştür. Petri kaplarındaki ortamların katılaşmasından sonra kapakları streç film ile kaplanarak kullanıncaya kadar + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.4. Tohumların sterilizasyonu, çimlendirilmesi ve eksplantların kültüre alınması**

*L. maritimus* türünün tohumları sert kabuklu olduğu için ilk olarak zımparalama işlemi yapılmıştır. Sterilizasyon işleminde ilk olarak tohumlar % 70'lik alkol içerisinde 1 dakika bekletilmiş ve ardından 3-4 kez steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra % 25'lik ticari çamaşır suyunda (Sodyum hipoklorit oranı en az % 4.6) 25 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Tekrar 3-4 kez steril saf su ile durulanan tohumlar ½ MS ortamı içeren büyütme şişelerine ekilmiştir.

Bu büyütme şişelerinde çimlenen tohumlar eksplant eldesi için 25 °C sıcaklıkta, % 60 nem oranında ve 12 bin lüks ışık altında iklim dolabında kültüre alınmıştır. Bitkilerin çimlenmesini takiben 10 gün içerisinde kotiledon yapraklar, epikotil, hipokotil ve kök eksplantları ve 30 gün içerisinde de sap eksplantları kesilerek besi ortamına aktarılmıştır. Her kültür kabına 5 adet eksplant yerleştirilmiş ve iklim dolabının kültür koşulları donör bitkilerin yetiştirme koşullarında olduğu gibi ayarlanmıştır.

### **3.2.5. Kallus indüksiyonu**

Besi ortamına yerleştirilen eksplantlar karanlık koşullarda kültür başlangıcından 20-30 gün sonra kallus oluşum fazı sonra erdiğinde değerlendirilmiştir. Her petri kutusunda kallus oluşturan eksplantlar sayılarak petri başına kallus oluşturma oranı yüzde olarak kaydedilmiştir.

### **3.2.6. Bitki rejenerasyonu**

Kallus oluşumu gerçekleştikten sonra kültürler 10-15 gün süreyle ışıklı ortama alınmıştır. Yeterince büyüyen sürgünlerin her uygulama için sayımı yapılmış ve kallus başına oluşan rejenerant olarak rejenerasyon oranı hesaplanmıştır.

### **3.2.7. Rejenere olan bitkiciklerin köklendirilmesi ve saksılara aktarılması**

Rejenere olan sürgünler içerisinde  $\frac{1}{2}$  MS ortamı olan büyütme şişelerine aktarılmıştır. Bu ortamda 25-30 gün süreyle kültüre alınan bitkicikler kolaylıkla kök meydana getirmiştir. Daha sonra bu şişelerden çıkartılan bitkilerin kökleri çeşme suyuyla yıkanmış ve içerisinde toprak, torf ve vermikulit (2:1:1) olan saksılara aktarılmıştır. Saksılara aktarılan bitkiler başarılı şekilde dış ortama alıştırılmıştır.

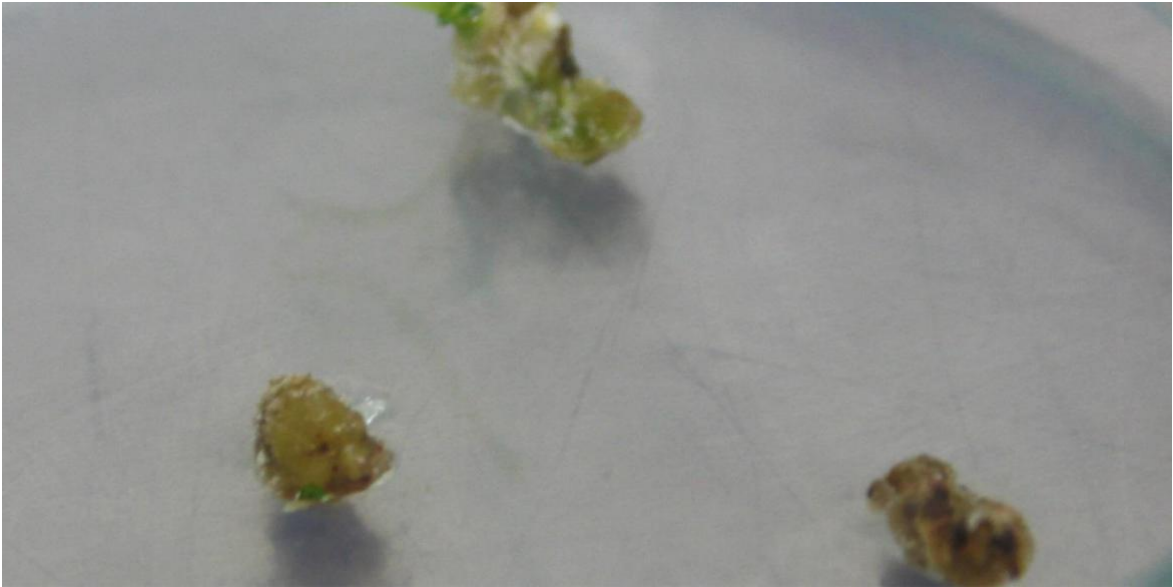
### **3.2.8. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri**

Araştırma sonucunda elde edilen veriler tesadüf parsellerinde 3 faktörlü deneme desenine göre SPSS 16.0 paket programı ile varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi uygulanmadan önce, kallus indüksiyon oranı değerlerine  $\text{Arcsin } \sqrt{x}$  transformasyonu uygulanmıştır. Varyans analizi sonucu önemli çıkan interaksiyonlar MSTAT-C istatistik programı kullanılarak harflendirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Kallus oluşumu

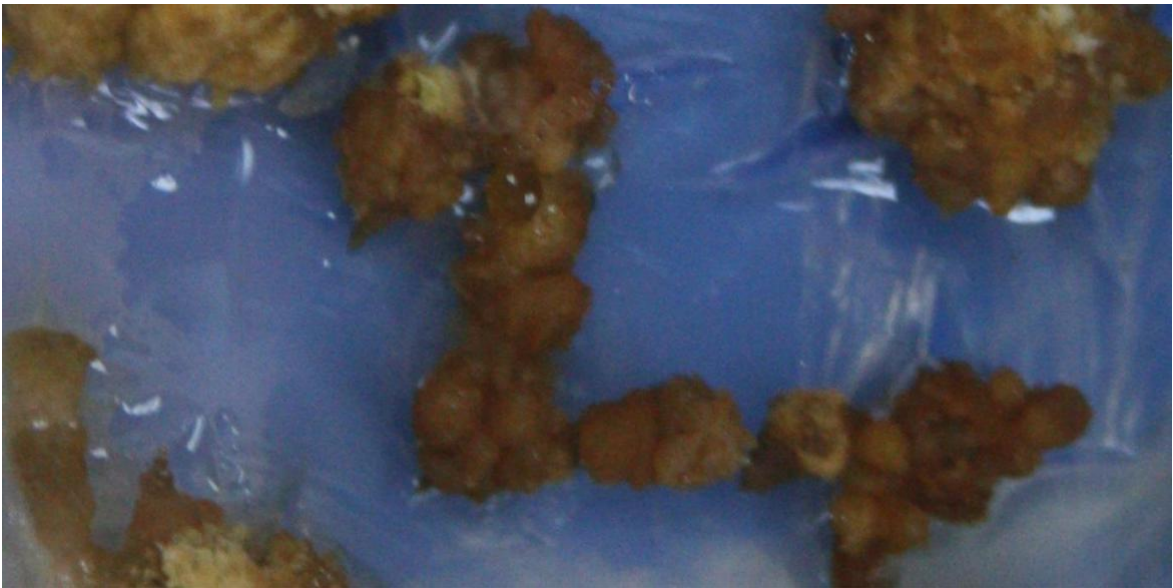
Kültür ortamına yerleştirilen tüm eksplant tipleri kültür başlangıcından 20-30 gün sonra şişmeye başlamış ve kesim yerlerinden kallus oluşumları gözlenmiştir. Ancak farklı eksplantlar farklı tipte kalluslar meydana getirmiştir. Bitki saplarından sert ve kompakt kalluslar meydana gelmiştir (Şekil 4.1). Kotiledon, hipokotil ve epikotil eksplantlarından ise hem sert hem de sulu yumuşak yapıda kalluslar oluşmuştur (Şekil 4.2). Kök parçalarında şişmeler ve boğumlanmaların ardından kallus dokusu oluşmuş, ancak bu yapı hızlı bir şekilde kahverengiye dönmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. *L. maritimus* bitkisinin sap eksplantlarından meydana gelen kalluslar



Şekil 4.2. *L. maritimus* bitkisinin epikotil eksplantlarından meydana gelen kalluslar



Şekil 4.3. *L. maritimus* bitkisinin kök eksplantlarından meydana gelen kalluslar

#### 4.1.1. Kallus oluşum oranı

Üç farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonu ve bunların kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan *L. maritimus* türünün beş farklı eksplantının kallus oluşturma oranlarına ait verilere yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre *L. maritimus* türünde kallus oluşum oranı; eksplant tipi, oksin

konsantrasyonu, eksplant tipi  $\times$  oksin konsantrasyonu, sitokinin çeşidi, eksplant tipi  $\times$  sitokinin çeşidi, oksin konsantrasyonu  $\times$  sitokinin çeşidi ve eksplant tipi  $\times$  oksin konsantrasyonu  $\times$  sitokinin çeşidi interaksiyonlarından önemli derecede etkilenmiştir.

Çizelge 4.1. *L. maritimus* türünde, farklı oksin konsantrasyonu ve sitokinin çeşitleriyle farklı eksplant tiplerinden elde edilen kallus oluşum oranına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant tipi (A)	4	5133	1283	7.79**
Oksin konsantrasyonu (B)	2	21101	10550	64.10**
A $\times$ B	8	10151	1268	7.71**
Sitokinin çeşidi (C)	2	122273	61136	371.45**
A $\times$ C	8	16319	2039	12.39**
B $\times$ C	4	4481	1120	6.80**
A $\times$ B $\times$ C	16	16106	1006	6.11**
Hata	89	14648	164	
Genel	133	210212		

\* $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

\*\* $p \leq 0.01$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

#### 4.1.2. Eksplantın etkisi

Araştırmada kullanılan farklı eksplant tiplerinde meydana gelen kallus oluşum oranları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Bu çizelgeye göre kallus oluşum oranları eksplant tiplerine göre % 46.66 ile % 66.15 aralığında değişim göstermiştir. En yüksek kallus oluşum oranı sap eksplantlarından elde edilirken, en düşük değerler kök parçalarında tespit edilmiştir. Sap (% 66.15) ve epikotil (% 61.48) eksplantlarından oluşan kallus oranları arasında istatistiki olarak bir fark meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.2. *L. maritimus* türünün farklı eksplant tiplerinde ortalama kallus oluşum oranları (%)

Eksplant tipi	Kallus oluşum Oranı
Sap	66.15 + (58.13) a*
Epikotil	61.48 (54.14) a
Hipokotil	52.59 (45.50) b
Kök	46.66 (41.88) b
Kotiledon	50.37 (44.69) b

\*Benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

+Açı değerleri



Nenz vd. (1996)'nın *Lotus angustissimus* türünün farklı eksplantlarıyla (sap, yaprak, kök, kotiledon ve hipokotil) yaptıkları rejenerasyon çalışmasında, en iyi kallus oluşum oranının hipokotil eksplantından elde edildiği bildirmişlerdir. Handberg ve Stougaard (1992)'ın yaptıkları çalışmada ise; *Lotus japonicus* türünde 0.2 µg/ml BAP ilave edilmiş MS ortamından en yüksek kallus oluşum oranı hipokotil eksplantından meydana gelmiştir. Akashi vd. (1998)'nin bildirdiğine göre *Lotus corniculatus* türünün hipokotil ve kotiledon eksplantlarının B5 ortamında BAP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarıyla kültüre alınması durumunda kotiledon eksplantlarının embriyonik kalluslar üretmiştir. Piccirilli vd. (1988), *Lotus tenuis* Wald & Kit. türünde yaprak parçalarının benzer sonuçlar veren kotiledon, kök ve hipokotil eksplantlarına göre daha yüksek kallus oluşum oranlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı *Lotus* türlerinde farklı eksplantların kallus meydana getirme oranları farklılık göstermektedir. Aynı tür içerisindeki popülasyonların bile genetik yapılarındaki farklılıktan dolayı in vitro rejenerasyon tepkileri farklı olabilmektedir.

#### **4.1.3. Oksin konsantrasyonu ve eksplant tipi × oksin konsantrasyon etkisi**

Araştırma sonuçlarına göre oksin konsantrasyonunun kallus oluşum oranına etkisi önemli derecede farklılık göstermiştir (Çizelge 4.3). Oksin konsantrasyon değerlerine bağlı olarak kallus oluşum oranları % 67.55 ile % 35.55 arasında değişmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı 2 mg/l oksin konsantrasyonundan elde edilirken, bu değer 1 mg/l konsantrasyonunda tespit edilen % 63.18'lik kallus oluşum oranıyla istatistiki olarak bir farklılık oluşturmamıştır. Oksin konsantrasyonunun artmasıyla kallus oluşum oranı da önemli derecede azalmıştır.

Pupilli vd. (1990), *Lotus pedunculatus* Cav. türünde 2,4-D yerine IAA veya NAA kullandıklarında kallus oluşumunun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar çalışmamıza benzer şekilde 2,4-D'nin 2 mg/l üzerindeki dozlarında kallus oluşum oranının azaldığını tespit etmişlerdir. Piccirilli vd. (1988)'nin *L. tenuis* türünde yaptıkları çalışmada çalışmamıza benzer şekilde düşük NAA konsantrasyonlarının kallus oluşumunda daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3. Farklı oksin konsantrasyonlarının ortalama kallus oluşum oranına etkisi

Oksin konsantrasyonu (mg/l)	Kallus oluşum oranı (%)
1	63.18 + (55.67) a*
2	67.55 (59.56) a
4	35.55 (31.33) b

\*Benzer harfle gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

+Açı değerleri

Araştırma bulgularına göre farklı eksplant tiplerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama kallus oluşum oranına etkisi önemli derecede farklılık göstermiştir (Çizelge 4.4). En yüksek kallus oluşum oranı % 86.66 ile sap eksplantında tespit edilirken, en düşük kallus oluşum oranı % 6.66 ile kök eksplantında belirlenmiştir. Pupilli vd. (1990)'nin *L. pedunculatus* türünde yaprak ve kotiledon eksplantlarını kullanarak yaptıkları çalışmada; en yüksek kallus oluşum oranı 2 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l kinetin içeren ortamda yaprak eksplantının kültüre alınmasıyla elde edilmiştir. Nenz vd. (1996), *L. angustissimus* türünde en iyi kallus oluşumunun 2,4-D'nin 1 ve 2 mg/l konsantrasyonunu içeren kültür ortamında yaprak eksplantlarının kültüre alınması sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir. Handberg ve Stougaard, (1992)'a göre *L. corniculatus* türünde hipokotil, kotiledon, yaprak ve kök eksplantları 1 ila 3 mg/l'lik eşit oranda 2,4-D ve kinetin içeren ortamda kültüre alındığında iyi bir kallus büyümesi gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı eksplant tiplerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%)

Eksplant tipleri	Oksinler konsantrasyonları (mg/l)		
	1	2	4
Sap	72.50 + (62.30) b*	86.66 (76.92) a	40.00 (35.64) de
Epikotil	64.44 (57.04) bc	60.00 (52.68) bc	60.00 (52.68) bc
Hipokotil	60.00 (52.68) bc	60.00 (52.68) bc	37.77 (32.68) e
Kök	66.66 (60.00) bc	66.66 (60.00) bc	6.66 (5.64) t
Kotiledon	53.33 (47.04) cd	64.44 (57.04) bc	33.33 (30.00) e

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen eksplant tipi  $\times$  oksin konsantrasyonu interaksyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. +Açı değerleri (Lsd:13.18)

#### 4.1.4. Stokinin çeşidi, eksplant tipi × sitokinin çeşidi, oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi ve eksplant tipi × oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi etkisi

Sitokinin çeşitlerinin ortalama kallus oluşum oranına etkisi önemli derecede farklılık göstermiştir (Çizelge 4.5). En yüksek kallus oluşum oranı % 84.54 ile ortama 0.5 mg/l kinetin ilave edildiği zaman elde edilmiştir. Bununla birlikte, ortama 1 mg/l BAP ilave edilmesi kallus oluşum oranını olumsuz etkilemiştir. Nenz vd. (1996) ve Handberg ve Stougaard (1992)'ın yaptıkları çalışmalarda; eşit oranlarda 2,4-D ve kinetin içeren ortamların etkili bir kallus oluşumu sağladığı bildirilmiştir. Pupilli vd. (1990)'e göre kinetin, 2 iP ve zeatine göre kallus oluşumunda daha etkilidir. Aynı araştırmacılar, ortamda BAP bulunması durumunda 3 hafta içinde eksplantların öldüğünü bildirmişlerdir.

Çizelge 4.5. Farklı sitokinin çeşitlerinin ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%)

Sitokinin çeşitleri	Kallus oluşum oranı
Kontrol (0 mg/l)	74.66 + (65.50) b*
BAP (1 mg/l)	7.55 (6.51) c
Kinetin (0.5 mg/l)	84.54 (74.97) a

\*Benzer harfle gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

+Açı değerleri

*L. maritimus* türünde farklı eksplant tiplerine göre kullanılan farklı sitokinin çeşitleri kallus oluşum oranı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. Kallus oluşum oranları % 0 ile 100 arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek kallus oluşum oranları ortama kinetin ilave edildiğinde epikotil ve kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı ortamlarda kaydedilmiştir. Bu değerler ile kontrol grubunda sap eksplantlarından elde edilen kallus oluşum oranları arasında istatistiki olarak bir fark oluşmamıştır. En düşük kallus oluşum oranları ise ortama BAP ilave edilmesi durumunda epikotil, hipokotil, kök ve kotiledon eksplantlarında gözlenmiştir. Ortama BAP ilave edilmesi sap eksplantları dışında diğer eksplantlardan kallus oluşumunu engellemiştir.

Piccirilli vd. (1988)'nin tespitine göre *L. tenuis*'in kotiledon, kök ve hipokotil eksplantlarından kallus oluşumunda BAP'ın ortama ilave edilmesi kallus oluşumunu

engellemiştir. Ancak, 2 mg/l 2,4-D ile birlikte BAP'ın ilave edildiği ortamda yaprak eksplantlarının kültüre alınması sonucu kallus oluşumu artmıştır.

Çizelge 4.6. Farklı eksplant tiplerinin farklı sitokin çeşitlerinde ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%)

Eksplant tipleri	Stokinin çeşitleri		
	Kontrol (0 mg/l)	BAP (1 mg/l)	Kinetin (0.5 mg/)
Sap	91.11 + (81.28) ab*	37.77 (32.56) e	70.00 (60.85) c
Epikotil	84.44 (72.42) bc	0.00 (0.00) f	100.0 (90.00) a
Hipokotil	73.33 (64.09) c	0.00 (0.00) f	84.44 (72.42) bc
Kök	73.33 (65.64) c	0.00 (0.00) f	66.66 (60.00) c
Kotiledon	51.11 (44.09) d	0.00 (0.00) f	100.0 (90.00) a

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen eksplant tipi × sitokin çeşitleri interaksyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. +Açı değerleri (Lsd:11.38)

Oksin konsantrasyonu × sitokin çeşitleri interaksyonunun kallus oluşum oranına etkisi önemli derecede farklılık göstermiştir (Çizelge 4.7). En yüksek kallus oluşum oranı % 97.33 ile 2 mg/l NAA ve 0.5 mg/l kinetin ilave edilmiş besi ortamlarında kaydedilmiştir. Bu değer ile 1 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin ve saf olarak 2 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilen değerler arasında istatistiki olarak bir fark oluşmamıştır. Öte yandan 4 mg/l NAA+1 mg/l BAP içeren besi ortamlarında kültüre alınan eksplantlar üzerinde hiç kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Piccirilli vd. (1988)'e göre *L. tenuis* türünde NAA içeren ortama BAP ve kinetin ilave edilmesi genellikle kallus oluşumunu engellemiştir.

Çizelge 4.7. Farklı sitokin çeşitlerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama kallus oluşum oranına etkisi (%)

Oksin konsantrasyonları (mg/l)	Stokinin çeşitleri		
	Kontrol (0 mg/l)	BAP (1 mg/l)	Kinetin (0.5 mg/)
1	84.00 + (73.45) b*	10.66 (9.38) e	97.14 (86.20) a
2	93.33 (82.07) ab	12.00 (10.15) e	97.33 (86.45) a
4	46.66 (40.99) d	0.00 (0.00) f	60.00 (52.99) c

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen oksin konsantrasyonları × sitokin çeşitleri interaksyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. +Açı değerleri (Lsd:8.813)

Farklı oksin konsantrasyonları ve sitokinin çeşitlerini içeren ortamlarda kültüre alınan *L. maritimus* türüne ait farklı eksplant tiplerinin üzerinde meydana gelen ortalama kallus oluşum oranları arasında farklar istatistikî olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). En yüksek kallus oluşum oranları; sap eksplantında 2 mg/l NAA ve 2 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin, epikotil eksplantında 1, 2 ve 4 mg/l NAA dozlarının 0.5 mg/l kinetin ile tüm kombinasyonları, hipokotilde 1 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin, kökte 1 ve 2 mg/l NAA ile 0.5 mg/l kinetin ve kotiledonda ise 1, 2 ve 4 mg/l+0.5 mg/l kinetin ile tüm kombinasyonlarından elde edilmiştir. En düşük kallus oluşum oranları ise sap eksplantının 1 ve 2 mg/l NAA + 1 mg/l BAP içeren kombinasyonları hariç 1 mg/l BAP ilave edilen tüm ortam kombinasyonlarında kültüre alınan eksplantlarda gözlenmiştir.

Nenz vd. (1996), eşit oranlarda (1:1) 2,4-D ve kinetin içeren ortamların hipokotil, kök, yaprak, sap, kök ve kotiledon eksplantlarında etkili bir kallus oluşumu sağladığını bildirmişlerdir. Pupilli vd. (1990)'nin bildirdiğine göre *L. pedunculatus* türünde 2 mg/l 2,4-D+0.25 mg/l kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan yaprak ve kotiledon eksplantlarından en yüksek kallus oluşumu meydana gelmiştir. Ayrıca bu çalışmada ortama 2,4-D ve NAA varlığında BAP ilave edilmesiyle çalışmamıza benzer şekilde kallus oluşmamıştır. Çalışmamızda *L. maritimus* türünün birçok eksplantında başarılı kallus oluşumu meydana getiren NAA, bu çalışmada 2,4-D yerine kullanıldığında tüm sitokinin (kinetin, 2iP, zeatin ve BAP) kombinasyonlarıyla birlikte yaprak ve kotiledon eksplantlarından kallus oluşturmamıştır. Piccirilli vd. (1988), kotiledon, kök ve hipokotil eksplantlarında 2,4-D ve NAA oksinlerinin tek başına kullanıldıklarında kallus oluşumu bakımından eşit değerler oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Kallus oluşumu açısından 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları arasında fark oluşmazken, bulgularımıza destekler nitelikte NAA'in düşük konsantrasyonlarda (1 mg/l) daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bahsi geçen eksplantlarda NAA içeren ortama BAP veya kinetin ilave edilmesi hipokotil eksplantı dışından kallus oluşumu olumlu yönde etkilememiştir. NAA ve kinetin eşit oranda (1:1) kullanıldığı durumda hipokotillerden tatmin edici bir kallus oluşumu sağlanmıştır.

Çizelge 4.8. Farklı oksin konsantrasyonları ve sitokin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde kallus oluşum oranına etkisi (%)

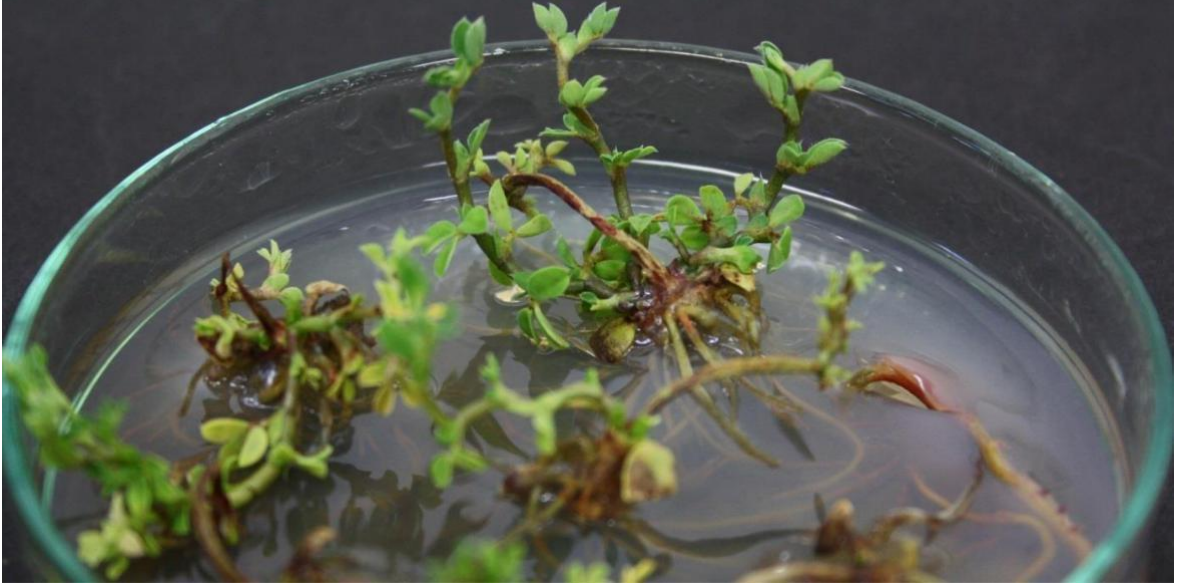
Eksplant tipi	Oksin konsantrasyonu (mg/l)	Sitokin çeşidi		
		Kontrol (0 mg/l)	BAP (1 mg/l)	Kinetin (0.5 mg/l)
Sap	1	86.66 (76.92) <sup>a-c</sup>	53.33 (46.92) <sup>e-g</sup>	80.00 (63.43) <sup>b-f</sup>
	2	100.0 (90.00) <sup>a</sup>	60.00 (50.76) <sup>d-g</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	4	86.00 (76.92) <sup>a-c</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	33.33 (30.00) <sup>gh</sup>
	1	93.33 (81.14) <sup>ab</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
Epikotil	2	80.00 (68.06) <sup>a-e</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	4	80.00 (68.06) <sup>a-e</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	1	80.00 (68.06) <sup>a-e</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	2	93.33 (81.14) <sup>ab</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	86.66 (72.29) <sup>a-d</sup>
Hipokotil	4	46.66 (43.07) <sup>fg</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	66.66 (54.99) <sup>c-f</sup>
	1	100.0 (90.00) <sup>a</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	2	100.0 (90.00) <sup>a</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	4	20.00 (16.92) <sup>hi</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>
Kök	1	60.00 (51.14) <sup>d-g</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	2	93.33 (81.14) <sup>ab</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	4	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	1	60.00 (51.14) <sup>d-g</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
Kotiledon	2	93.33 (81.14) <sup>ab</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	4	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	1	60.00 (51.14) <sup>d-g</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>
	2	93.33 (81.14) <sup>ab</sup>	0.00 (0.00) <sup>1</sup>	100.0 (90.00) <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen eksplant tipi × oksin konsantrasyonları × sitokin çeşitleri interaksiyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. +Açı değerleri (Lsd:19.71)

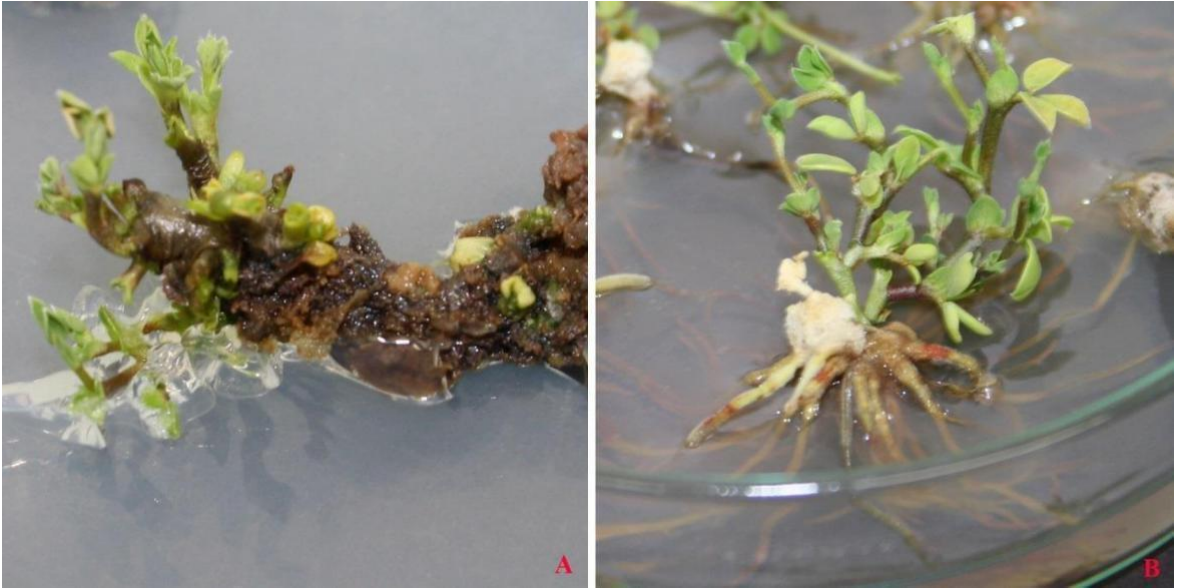
## 4.2. Bitki rejenerasyonu

Karanlık koşullarda yaklaşık 3-4 hafta içerisinde meydana gelen kalluslar üzerinde aynı zamanda sürgünler oluşmuştur. Bu kültürlerin ışıklı ortama alınmasından 2 hafta sonra klorofil oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 4.4). Sap eksplantları üzerinde meydana gelen sürgünler kök oluşturmazken, kotiledon, hipokotil ve epikotil eksplantlarından oluşan sürgünlerde aynı zamanda köklerde görülmüştür (Şekil 4.5). Köklenmeyen sürgünler 1 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında kolaylıklar köklendirilmiştir (Şekil 4.6). Köklenmiş veya köklendirilmiş sürgünler kültür başlangıcından 8-9 hafta sonra saksılara aktarılmıştır (Şekil

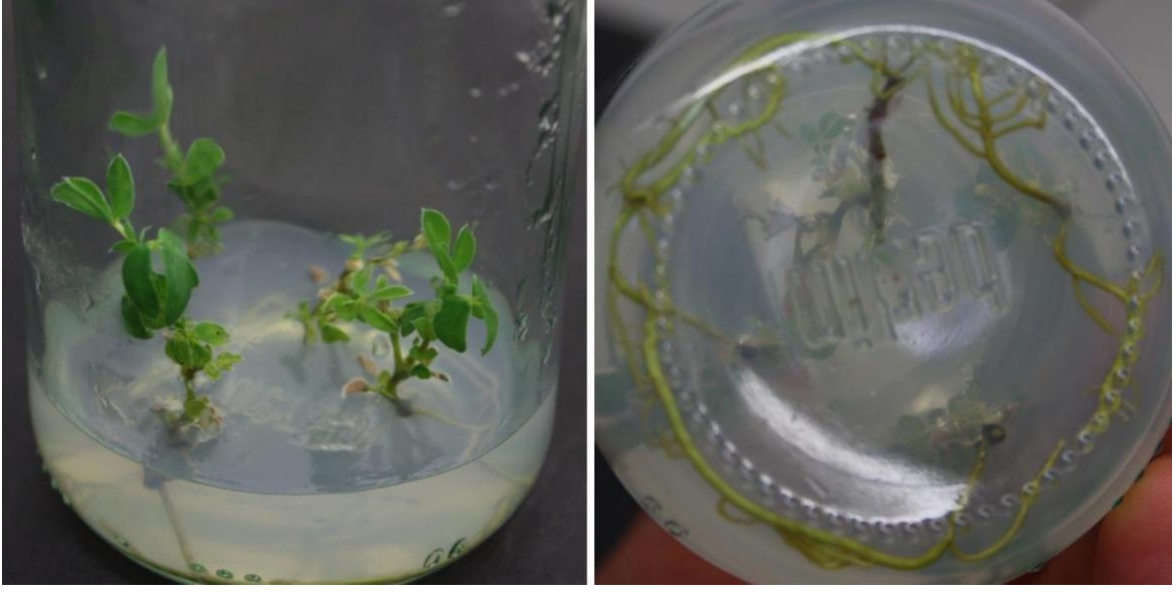
4.7). Kùltürlerin büyük çoğunluğu kolaylıkla dış ortama alıştırılmış ve güçlü bir gelişme göstermiştir.



Şekil 4.4. Kùltür başlangıcından 6 hafta sonra ışıklı koşullarda epikotil eksplantlarından meydana gelen bitkicikler



Şekil 4.5. Kùltür başlangıcından 6 hafta sonra A) sap eksplantlarından meydana gelen ve kök oluşturmayan sürgünler, B) hipokotil eksplantlarından meydana gelen köklü sürgünler



Şekil 4.6. 2 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan sap eksplantlarından meydana gelen köksüz sürgünlerin 1 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında köklendirilmesi



Şekil 4.7. 1 mg/l NAA+0.5 mg/l kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan epikotil eksplantlarından meydana gelen bitkilerin dış ortama alıştırılması



#### 4.2.1. Rejenerasyon oranı

Üç farklı oksin konsantrasyonu ve sitokinin çeşidini içeren MS ortamında kültüre alınan *L. maritimus* türüne ait beş farklı eksplanttan meydana gelen rejenerasyon oranına yapılan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.9’da verilmiştir. Çizelge’ye göre rejenerasyon oranı üzerinde eksplant tipi, oksin konsantrasyonu, eksplant tipi × oksin konsantrasyonu, sitokinin çeşidi, eksplant tipi × sitokinin çeşidi ve eksplant tipi × oksin konsantrasyonu × sitokinin çeşidi interaksiyonlarının etkileri önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.9. *L. maritimus* türünde, farklı oksin konsantrasyonu ve sitokinin çeşitleriyle farklı eksplant tiplerinden elde edilen kallus başına sürgün sayısına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Eksplant tipi (A)	4	30	8	17.46**
Oksin konsantrasyonu (B)	2	17	8	19.26**
A × B	8	14	2	3.93**
Sitokinin çeşidi (C)	2	9	5	10.51**
A × C	8	25	3	7.39**
B × C	4	2	0.6	1.37
A×B×C	16	31	2	4.48**
Hata	89	38	0.4	
Genel	133	166		

\*p<0.05 hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

\*\*p<0.01 hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

##### 4.2.1.1. Eksplantın etkisi

Çalışmada kullanılan farklı eksplant tiplerine göre meydana gelen rejenerasyon oranları Çizelge 4.10’da verilmiştir. Bu çizelgeye göre rejenerasyon oranları 0 ile 1.16 rejenerant/kallus arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı sap eksplantlarından elde edilirken, bu değer ile epikotil ve hipokotil eksplantlarından meydana gelen rejenerasyon oranları arasında istatistiki olarak bir fark oluşmamıştır. Diğer taraftan kök eksplantlarından hiç rejenerasyon meydana gelmemiştir. Piccirilli vd. (1988), *L. tenuis* türünde yaptıkları çalışmada yapraklardan %30, kotiledon ve hipokotillerden % 16 ve köklerden ise % 4 oranında rejenerasyon sağlandığını bildirmişlerdir. Nenz vd. (1996)’nin *L. angustissimus* türünde en hızlı rejenerasyonun hipokotillerden daha sonra sırasıyla kotiledon, kök, sap ve yapraklardan meydana geldiği tespit edilmiştir. Orcen (2013), *L. corniculatus* üzerinde yaptığı çalışmada en yüksek sürgün rejenerasyonunun sürgün uçlarından elde edildiğini belirlemiştir. Bu çalışmada en iyi rejenerasyon oranına sahip ikinci

eksplant epikotildir. Espasandin vd. (2010), *L. tenuis*'in en iyi sürgün oluşumunu yaprak eksplantlarından yaptığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.10. *L. maritimus* türünün farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranları (rejenerant/kallus)

Eksplant tipi	Rejenerasyon oranı (adet)
Sap	1.16 <sup>a*</sup>
Epikotil	0.84 <sup>a</sup>
Hipokotil	0.96 <sup>a</sup>
Kök	0.00 <sup>b</sup>
Kotiledon	0.07 <sup>b</sup>

\*Benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

#### 4.2.1.2. Oksin konsantrasyonu ve eksplant tipi × oksin konsantrasyon etkisi

Farklı oksin konsantrasyonlarına göre meydana gelen rejenerasyon oranları Çizelge 4.11'de verilmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı 0.95 rejenerant/kallus ile 1 mg/l oksin konsantrasyonundan elde edilmiştir. Bu değer ile 2 mg/l oksin konsantrasyonundan meydana gelen rejenerasyon oranları arasında istatistiki olarak fark oluşmamıştır. Oksin konsantrasyonunun 4 mg/l'ye çıkması rejenerasyon oranını olumsuz yönde etkilemiştir.

Piccirilli vd. (1988), bulgularımızı destekler nitelikte *L. tenuis* türünde en yüksek sürgün oluşumunun 1 mg/l NAA içeren ortamda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Nenz vd. (1996)'nin *L. angustissimus* türünde yaptıkları çalışmada NAA'nın besi ortamında bulunduğu kombinasyonlarda az miktarda sert ve yeşil kalluslar oluşmasına rağmen bu kalluslar yüksek oranda sürgün meydana getirmiştir. Pupilli vd. (1990)'e göre *L. pedunculatus* türünde rejenerasyon için IAA yerine NAA kullanımı sürgün oluşumunu olumsuz etkilemiş ve sadece bu kombinasyonlardan kökler meydana gelmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı oksin konsantrasyonlarının ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi

Oksin konsantrasyonu (mg/l)	Rejenerasyon oranı (adet)
1	0.95 <sup>a*</sup>
2	0.74 <sup>a</sup>
4	0.12 <sup>b</sup>

\*Benzer harfle gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Farklı oksin konsantrasyonlarının farklı eksplant tiplerinde rejenerasyon oranına etkisine ilişkin ortalama değerler izelge 4.12’de verilmiştir. Rejenerasyon oranı 0 ile 1.73 rejenerant/kallus arasında değişim göstermiştir. En yüksek rejenerasyon oranı hipokotil eksplantlarının 1 mg/l oksin konsantrasyonunda kültüre alındığı uygulamalardan elde edilmiştir. Bu değer ile sap eksplantlarının kültüre alındığı 1 ve 2 mg/l konsantrasyonu ve epikotil eksplantının 1 mg/l konsantrasyonunda kültüre alınması sonucu elde edilen veriler arasında istatistiki olarak bir fark oluşmamıştır. Diğer taraftan tüm oksin konsantrasyonlarında kök eksplantlarından ve 4 mg/l oksin konsantrasyonunda sap eksplantı hariç diğer eksplantlardan hiç rejenerasyon gerçekleşmemiştir.

Pupilli vd. (1990)’nin yaptıkları çalışmaya göre *L. pedunculatus* türünde yaprak ve kotiledonlardan 2 mg/l IAA dozunda bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Nenz vd. (1996)’nin *L. angustissimus* türünde yaptıkları rejenerasyon çalışmasında bulgularımızı destekler nitelikte en yüksek rejenerasyon oluşumu 1 mg/l NAA içeren ortamlarda hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir. Piccirilli vd. (1988)’nin bildirdiğine göre *L. tenuis*’de en yüksek rejenerasyon oranını 1 mg/l NAA içeren ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantları sağlamıştır. Akashi vd. (1998)’i tarafından *L. corniculatus* trene ait kotiledon eksplantlarının 0.1 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınması sonucu embriyogenik kallusların oluştuğu ve bunlarında yüksek oranda sürgün meydana getirdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı oksin konsantrasyonlarının farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi

Eksplant tipleri	Oksin konsantrasyonları (mg/l)		
	1	2	4
Sap	1.36 <sup>ab*</sup>	1.55 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>cd</sup>
Epikotil	1.63 <sup>a</sup>	0.88 <sup>bc</sup>	0.00 <sup>d</sup>
Hipokotil	1.73 <sup>a</sup>	1.16 <sup>bc</sup>	0.00 <sup>d</sup>
Kök	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
Kotiledon	0.11 <sup>d</sup>	0.11 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>

\*Aynı sütünde benzer harfle gösterilen eksplant tipi × oksin konsantrasyonu interaksyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. (Lsd:0.6273)

**4.2.1.3. Stokinin çeşidi, eksplant tipi × stokinin çeşidi, oksin konsantrasyonu × stokinin çeşidi ve eksplant tipi × oksin konsantrasyonu × stokinin çeşidi etkisi**

Farklı stokinin çeşitlerinin rejenerasyon oranına etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.13’de verilmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı 0.96 rejenerant/kallus oranı ile kontrol uygulamalarından elde edilmiştir. Besi ortamında BAP veya kinetin olması rejenerasyon oranı üzerinde farklı bir etki yaratmamıştır. Nikolic vd. (2006)’nin *L. corniculatus* türünde yaptıkları çalışmada rejenerasyon oranı üzerinde TDZ, BAP ve Zeatin’in, Kinetin ve 2iP’e göre daha yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Akashi vd. (1998)’e göre de besi ortamına 0.5 mg/l BAP ilave edilmesi sürgün oluşumu bakımından etkili olmuştur. Lombardi vd. (2003)’nin *L. japonicus* türünde yaptıkları çalışmada besi ortamına 0.2 mg/l BAP ilavesiyle yüksek oranda sürgün oluşumu sağlanmıştır. Bahsi geçen çalışmalarda sürgün ortamı ve kallus oluşum ortamları farklıdır. Çalışmamıza benzer şekilde kallus ortamına ilave edilen sitokininler kallus oluşumunu olumsuz etkilemektedir. Ancak, sürgün ortamında düşük oranlarda sitokinin ilavesi rejenerasyonu teşvik etmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı stokinin çeşitlerinin ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi

Sitokinin çeşitleri	Rejenerasyon oranı (adet)
Kontrol (0 mg/l)	0.96 <sup>a*</sup>
BAP (1 mg/l)	0.34 <sup>b</sup>
Kinetin (0.5 mg/l)	0.50 <sup>b</sup>

\*Benzer harfle gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Araştırma bulgularına göre farklı stokinin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde rejenerasyon oranına etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.14’de verilmiştir. Rejenerasyon oranı 0 ile 1.73 rejenerant/kallus aralığında değişim göstermiştir. En yüksek rejenerasyon oranı sap eksplantının 1 mg/l BAP ilave edilmiş ortamda kültüre alınması sonucu oluşmuştur. Bu değer ile sap, epikotil ve hipokotil eksplantlarının kültüre alındığı kontrol uygulaması ve hipokotil eksplantının kültüre alındığı 0.5 mg/l kinetin uygulamasından elde edilen değerler arasında istatistiki olarak bir fark oluşmamıştır. Kök eksplantının tüm sitokinin uygulamalarında, kotiledon eksplantının kontrol hariç diğer sitokinin uygulamalarında ve BAP ilave edilmiş ortamlarda sap dışındaki diğer eksplantlarda herhangi bir sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir. Espasandin vd. (2010), *L. tenuis* türünde

yapraklardan düşük oranlarda (0.5 ve 1 mg/l) TDZ ve BAP ilave edilmiş ortamlarda daha yüksek rejenerasyon sağlandığını bildirmişlerdir. Orcen (2013)'in doğal yayılış gösteren *L. corniculatus* popülasyonları üzerinde yaptığı çalışmada en yüksek sürgün oluşumu 3 mg/l BAP içeren ortamlarda kültüre alınan sürgün uçlarından elde edilmiştir. Pupilli vd. (1990)'nin *L. pedunculatus* türü üzerinde yaptıkları çalışmaya göre 2 mg/l kinetin içeren ortamda yaprak ve kotiledonlardan yüksek oranda sürgün oluşumu sağlanmıştır. Aynı çalışmaya göre ortama 0.25 mg/l'lik BAP ilavesi bile eksplantların ölümüne yol açmıştır.

Çizelge 4.14. Farklı sitokinin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi

Eksplant tipleri	Stokinin çeşitleri		
	Kontrol (0 mg/l)	BAP (1 mg/l)	Kinetin (0.5 mg/)
Sap	1.38 <sup>ab*</sup>	1.73 <sup>a</sup>	0.28 <sup>cd</sup>
Epikotil	1.67 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.84 <sup>bc</sup>
Hipokotil	1.51 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>d</sup>	1.38 <sup>ab</sup>
Kök	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
Kotiledon	0.22 <sup>cd</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen eksplant tipi × sitokinin çeşitleri interaksyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. (Lsd: 0.663)

Farklı sitokinin çeşitlerinin farklı oksin konsantrasyonlarıyla kombinasyonu sonucu meydana gelen rejenerasyon oranlarına ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.15'de verilmiştir. Bu çizelgeye göre rejenerasyon oranları 0 ile 1.55 rejenerant/kallus arasında değişim göstermiştir. En yüksek rejenerasyon oranı 1 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilirken, 2 ve 4 mg/l NAA ve kinetin kombinasyonları en düşük rejenerasyon oranına sahip uygulamalardır. Piccirilli vd. (1988) ve Nenz vd. (1996)'nin yaptıkları çalışmalara göre 1 mg/l NAA ile BAP veya kinetin kombinasyonundan en yüksek sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır.

Çizelge 4.15. Farklı sitokinin çeşitlerinin farklı oksin konsantrasyonlarında ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi

Oksin konsantrasyonları (mg/l)	Stokinin çeşitleri		
	Kontrol (0 mg/l)	BAP (1 mg/l)	Kinetin (0.5 mg/)
1	1.55 <sup>a*</sup>	0.50 <sup>b</sup>	0.80 <sup>b</sup>
2	1.02 <sup>b</sup>	0.53 <sup>bc</sup>	0.00 <sup>c</sup>
4	0.80 <sup>b</sup>	0.67 <sup>b</sup>	0.06 <sup>c</sup>

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen oksin konsantrasyonları × sitokinin çeşitleri interaksyonu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. (Lsd: 0.51)

Araştırma bulguları, eksplant tipi  $\times$  oksin konsantrasyonu  $\times$  sitokinin çeşiti interaksiyonunun ortalama rejenerasyon oranına etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.16'da verilmiştir. Bu çizelgeye göre rejenerasyon oranı 0 ile 3.56 rejenerat/kallus aralığında değişim göstermiştir. En yüksek rejenerasyon oranı epikotillerin 1 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınması sonucu elde edilmiştir. Bu değerle 1 mg/l NAA konsantrasyonunda hipokotil eksplantlarından meydana gelen ve 1 ve 2 mg/l NAA+1 mg/l BAP kombinasyonlarında sap eksplantlarından elde edilen rejenerasyon oranları arasında istatistiki olarak bir fark oluşmamıştır. 4 mg/l NAA ve sitokinin kombinasyonları sap eksplantı dışında diğer eksplantlardan rejenerasyonu olumsuz etkilemiştir. Kök ve kotiledon eksplantları genel olarak rejenerasyon kabiliyeti en düşük bitki parçalarıdır. BAP uygulamalarının, sap eksplantının 1 ve 2 mg/l NAA+1 mg/l BAP kombinasyonları dışında diğer eksplantlar üzerinde rejenerasyon oranı bakımından olumsuz etkisi olmuştur.

Akashi vd. (1998)'nin yaptıkları çalışmada 0.5 mg/l BAP+0, 0.01 veya 0.1 mg/l NAA dozlarında hem kotiledon hem de hipokotil eksplantlarından sürgün oluşturan morfogjenik kalluslar elde edilmiştir. Piccirilli vd. (1988), 1 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP içeren ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantlarının kotiledon ve hipokotil eksplantlarına göre daha yüksek oranda sürgün oluşturduğunu bildirmişlerdir. Nenz vd (1996)'e göre 1 mg/l NAA+ 0.25 kinetin veya 0.25 BAP kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında hipokotil eksplantlarının yüksek oranda sürgün rejenerasyonu sağlamıştır.

Çizelge 4.16. Farklı oksin konsantrasyonları ve sitokinin çeşitlerinin farklı eksplant tiplerinde ortalama rejenerasyon oranına (rejenerant/kallus) etkisi

Eksplant tipi	Oksin konsantrasyonu (mg/l)	Sitokinin çeşidi		
		Kontrol (0 mg/l)	BAP (1 mg/l)	Kinetin (0.5 mg/l)
Sap	1	0.66 <sup>ef*</sup>	2.53 <sup>a-d</sup>	0.65 <sup>ef</sup>
	2	2.00 <sup>b-d</sup>	2.66 <sup>a-c</sup>	0.00 <sup>f</sup>
	4	1.50 <sup>c-d</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.33 <sup>ef</sup>
Epikotil	1	3.56 <sup>a</sup>	0.00 <sup>f</sup>	1.33 <sup>c-f</sup>
	2	1.46 <sup>c-e</sup>	0.00 <sup>f</sup>	1.20 <sup>d-f</sup>
	4	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
Hipokotil	1	3.20 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>f</sup>	2.00 <sup>b-d</sup>
	2	1.33 <sup>c-f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	2.15 <sup>b-d</sup>
	4	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
Kök	1	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
	2	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
	4	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
Kotiledon	1	0.33 <sup>ef</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
	2	0.33 <sup>ef</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>
	4	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>	0.00 <sup>f</sup>

\*Aynı sütunda benzer harfle gösterilen eksplant tipi × oksin konsantrasyonları × sitokinin çeşitleri interaksyonunu ortalamaları Duncan testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir. (Lsd: 1.148)

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Meşelik Kampüsü içerisinde doğal yayılış gösteren *L. maritimus* türünün farklı bitki parçalarının in vitro rejenerasyon çalışmalarında eksplant olarak kullanılma potansiyelleri araştırılmıştır.

Araştırma bulgularına göre hem kallus oluşumu hem de bitki rejenerasyonu için en iyi bitki parçaları sap, epikotil ve hipokotildir. Oksin konsantrasyonu olarak 2 mg/l'den sonraki dozlar bu türde bitki rejenerasyonunu olumsuz etkilemiştir. Kallus oluşumunda 1 veya 2 mg/l NAA +0.5 mg/l kinetin kombinasyonları daha yüksek kallus oluşum oranları sağlarken, bitki rejenerasyonunda 1 veya 2 mg/l NAA dozları daha yüksek rejenerasyon oranı göstermiştir. Besi ortamına eklenen BAP sap eksplantı dışında diğer eksplantlardan bitki rejenerasyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. En yüksek rejenerasyon oranı 3.56 rejenerant/kallus ile epikotil eksplantlarının 1 mg/l NAA içeren besi ortamında kültüre alınması sonucunda elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre bu tür genetik açılım olmaksızın organogenesis yoluyla çok kısa sürede çoğaltılabilmektedir. Bu sayede, doğal yayılış alanlarında üstün karakterleri taşıdığı tespit edilen tek bitki veya popülasyonlar kısa sürede ve çok miktarda oğaltılabilecektir.

Bu alışma öncesinde yapılan ön denemelerde baklagiller ve *Lotus* türleri için bitki rejenerasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan oksin türlerinden 2,4-D ve NAA üzerinde durulmuştur. Ancak, diğer *Lotus* türlerinde 2,4-D rejenerasyon açısından iyi sonuçlar vermesine rağmen bu türde NAA ön plana çıkmıştır. Üzerinde çok fazla literatür çalışması olmamakla birlikte IAA, IBA, Dicamba ve Pikloram gibi diğer oksin türlerinde bu türün rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi yararlı olacaktır.

Bu çalışmada eksplantlar kallus ve rejenerasyon oluşum süreçlerinde tek bir ortam kombinasyonu üzerinde kültüre alınmıştır. Bununla birlikte, yapılan bazı çalışmalarda kallus ortamı ve rejenerasyon ortamının farklı olması rejenerasyon oranı bakımından olumlu etkiler



yaratmıştır. Bu nedenle hem kallus ve rejenerasyon süreçlerinde kullanılan ortamlar hem de içerikleri üzerinde durulmasında fayda olacaktır.

Bu cins üzerinde yapılan rejenerasyon ve genetik transformasyon çalışmalarında bulgularımıza benzer şekilde sap, hipokotil ve epikotil eksplantlarının yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, bazı çalışmalarda yaprak, sürgün ucu ve tohum gibi bitki parçaları da iyi rejenerasyon oranları göstermiştir. Bu tür üzerinde bahsi geçen eksplantlar içinde yeni çalışmalar planlanması yararlı olabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıkgöz, E., 2001, Yem Bitkileri. U.Ü. Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, Vıpaş A.Ş. Yayın No: 58, Bursa, s. 584.
- Ahuja, P. S., Hadiuzzaman, S., Davey, M. R., Cocking, E. C., 1983, Prolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil). *Plant Cell Reports*, 2(2), 101–104. doi: 10.1007/bf00270177.
- Akashi, R., Hoffmann-Tsay, S.-S., Hoffmann, F., 1998, Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 758–764. doi: 10.1007/s001220050799.
- Altın, M., Gökkuş, A., Koç, A., 2005, Çayır ve Mera ıslahı, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ankara, s.17-24.
- Anonim, 2019, Kocaeli bitkileri. [https://Kocaelibitkileri.com/Lotus maritimus](https://Kocaelibitkileri.com/Lotus_maritimus).
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A., 2001, Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları (Editörler; M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 1-35.
- Bhojwani, S. S., Razdon, M. K., 1996, *Plant tissue culture : Theory And Practice*, Elseiver, Amsterdam, s. 55.
- Bakis, Y., Babac, M. T., Uslu, E., 2011, Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES)" In *Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT)*, 2011 6th International Symposium on (pp. 136-140). IEEE.
- Barbulova, A., Dapuzzo, E., Rogato, A., Chiurazzi, M., 2005, Improved procedures for in vitro regeneration and for phenotypic analysis in the model legume *Lotus japonicus*. *Functional Plant Biology*, 32(6), 529. doi: 10.1071/fp05015.
- Çölgeçen H., 2005, Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'de in vitro organogenez. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 105 sayfa. (yayınlanmamış).
- Demiroğlu Topçu, G., Özkan, S. Ş. , 2017, Türkiye ve Ege Bölgesi Çayır Mera Alanları İle Yem Bitkileri Tarımına Genel Bir Bakış. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1), 21– 28.
- Espasandin, F. D., Collavino, M. M., Luna, C. V., Paz, R. C., Tarragó, J. R., Ruiz, O. A., Sansberro, P. A., 2010, Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Lotus tenuis* and regeneration of transgenic lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(2), 181–189. doi: 10.1007/s11240-010-9720-x.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gençkan, M. S., 1983, Yem Bitkileri Tarımı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 467, İzmir, s.177-183.
- George, R. A. T., 2012, Agricultural seed production. Cabi Publishing, Oxfordshire, UK. pp. 216.
- Handberg, K., Stougaard, J., 1992., *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. The Plant Journal, 2(4), 487–496. doi: 10.1111/j.1365-313x.1992.00487.x.
- Hatipoğlu, R., 1995, Biyoteknolojiye Giriş. Ç.Ü.Z.F. Ders Kitabı, No: 129, s.76.
- Hatipoğlu, R., Avcioğlu, R., 2009, Gazalboynuzu türleri (*Lotus* sp.). Avcioğlu, R., Hatipoğlu, R., Karadağ, Y., (Ed) Yem Bitkileri Baklagil Yem Bitkileri, Cilt 2, s: 387-389, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir.
- Heyn, C.C., 1970, *Tetragonolobus Scop.* (Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh: Ed. Davis PH) Volume 3, pp. 531.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Kavak, S., 2014, *Tetragonolobus maritimus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T19619442A19621026. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T19619442A19621026.en>.
- Kuşvuran, A., Nazlı, R. İ., Tansı, V., 2011, Türkiye’de ve Batı Karadeniz Bölgesinde Çayır Mera Alanları, Hayvan Varlığı Ve Yem Bitkileri Tarımının Bugünkü Durumu. GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2), 21-32.
- Lombardi, P., Ercolano, E., Alaoui, H. E., Chiurazzi, M., (2003). A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to Agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell Reports, 21(8), 771–777. doi: 10.1007/s00299-003-0576-y.
- Mingzhi, L., 1996, Plant regeneration from callus protoplasts of *Lotus corniculatus* L., Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000).

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nandor, K., 2011, Regeneration and in vitro multiplication of *Lotus corniculatus* L. species. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*, Vol. XVII, 677-684.
- Nenz, E., Pupilli, F., Paolocci, F., Damiani, F., Cenci, C. A., Arcioni, S., 1996, Plant regeneration and genetic transformation of *Lotus angustissimus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(2), 145–152. doi: 10.1007/bf00048758.
- Nikolić, R., Mitić, N., Ninković, S., Miljuš-Djukić, J., Nešković, M., 2003, Efficient Genetic Transformation of *Lotus corniculatus* L. and Growth of Transformed Plants in Field. *Biologia Plantarum*, 47(1), 137–140. doi: 10.1023/a:1027357620951.
- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R., Nešković, M., 2006, Effects of Cytokinins on In Vitro Seed Germination and Early Seedling Morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(3), 187–194. doi: 10.1007/s00344-005-0129-4.
- Orcen, N., 2013, Regeneration of Bird's-Foot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.) Native Race of Aegean Region. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(8a), 2409-2414.
- Orshinsky, B. R., Swanson, E. B., Tomes, D. T., 1983, Enhanced shoot regeneration from homogenized callus cultures of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2(4), 341–347. doi: 10.1007/bf00039881.
- Özcan, S., Barghchi, M., Firek, S., Draper, J., 1993, Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34(3), 271–277. doi: 10.1007/bf00029716.
- Piccirilli, M., Pupilli, F., Arcioni, S., 1988, *Lotus tenuis* Wald.& Kit.: In vitro conditions for plant regeneration from protoplasts and callus of various explants. *Plant Science*, 55(1), 77–82. doi: 10.1016/0168-9452(88)90044-1.
- Pupilli, F., Arcioni, S., Damiani, F., Pezzotti, M., 1990, Plant regeneration from callus and protoplast cultures of *Lotus pedunculatus* Cav. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23 (3), 193–199. <https://doi.org/10.1007/BF00034431>
- Raikar, S. V., Braun, R. H., Bryant, C., Conner, A. J., Christey, M. C., 2008, Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* protoplasts. *Plant Biotechnology Reports*, 2(3), 171–177. doi: 10.1007/s11816-008-0058-3.
- Roskov, Y. R., Bisby, F. A., Zarucchi, J. L., Schrire, B. D., White, R. J., 2006, ILDIS World Database of Legumes: Draft Checklist, Version 10 [published June, but CD shows November 2005 date]. ILDIS, Reading, UK, [CD-Rom: ISBN 0 7049 1248 1].

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rybczynski, J., Badzian, T., 1987, High regeneration potential of root segments of *Lotus corniculatus* L. Seedlings on hormone free media. *Plant Science*, 51(2-3), 239–244. doi: 10.1016/0168-9452(87)90198-1.
- Sokoloff, D. D., Lock, J. M., 2005, *Loteae*. (Legumes of the World. Bath Press, UK: Ed. Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M) 455-466.
- Swanson, E. B., Tomes, D. T., 1980, Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* and the selection and characterization of 2,4-D tolerant cell lines. *Canadian Journal of Botany*, 58(10), 1205–1209. doi: 10.1139/b80-150.
- Tomes, D. T., 1979, A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes. *Canadian Journal of Botany*, 57(2), 137–140. doi: 10.1139/b79-022.
- Tosun, F., 1996, Türkiye’de kaba yem üretiminde çayırmera ve yembitkileri yetiştiriciliğinin dünü, bugünü ve yarını. Türkiye III. Çayır- Mera ve Yembitkileri Kongresi, 17-19 Haziran, Erzurum, s. 1-4.
- Tirichine, L., Herrera-Cervera, J. A., Stougaard, J., 2005, Transformation-regeneration procedure for *Lotus japonicus*. *Lotus Japonicus Handbook*, 279–284. doi: 10.1007/1-4020-3735-x\_27.
- TÜİK, 2018, Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001).
- Uysal, P., 2014, Memeli Cinsiyet Hormonlarının Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* L.) bitkisinin in vitro rejenerasyonu üzerine etkisi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Çayır Mera ve Yem Bitkileri Bilim dalı, 171 s. (yayınlanmamış).
- Vessabutr, S., Grant, W. F., 1995, Isolation, culture and regeneration of protoplasts from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41(1), 9–15. doi: 10.1007/bf00124081