

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIŞNIŞTE (*Coriandrum sativum* L.)
DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Gökhan KILIÇ

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Tezin sunulduğu tarih: **02/02/2011**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Hakan TURHAN

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

GÖKHAN KILIÇ tarafından **PROF. DR. HAKAN TURHAN** yönetiminde hazırlanan “**KİŞNİŞTE (*Coriandrum sativum* L.) DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan TURHAN

Danışman

Prof. Dr. Harun BAYTEKİN

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hanife Genç

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 02/02/2011

Prof. Dr. İsmail TARHAN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2009/125 no’lu projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Gökhan KILIÇ

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının planlanmasında, araőtırılmasında, yűrűtűlmesinde ve oluőumunda ilgi ve desteęini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrűbelerinden yararlandıęım, yűnlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ıőıęında őekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Hakan TURHAN'a sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Ayrıca sevgili aileme manevi hiçbir yardımı esirgemedен yanımda oldukları için tűm kalbimle teőekkűr ederim.

Gűkhan KILIÇ

SİMGELER VE KISALTMALAR

IBA	Indole Butyric Acid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
NAA	1-Naphthaleneacetic Acid
BA	6-Benzylaminopurine
KIN	Kinetin
MS	Murashige ve Skoog
LS	Linsmaier ve Skoog
SH	Schenk ve Hildebrandt
μ M	Mikromolar
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
P	Önemlilik Düzeyi
L	Litre
Mg	Miligram
cm	Santimetre
°C	Santigrad
%	Yüzde

ÖZET

KİŞNİŞTE (*Coriandrum sativum* L.) DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Gökhan KILIÇ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hakan TURHAN

02/02/2011, 40

Bu çalışma Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü ve Biyoteknoloji laboratuvarlarında 2009-2010 yıllarında yürütülmüştür. Araştırma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada kişniş bitkisinin (*Coriandrum sativum* L.) doku kültürüne aktarımı ve kallus çoğaltımı, ikinci aşamada ise embriyogenik kallus gelişimi amaçlanmıştır. Çalışmada, Gamze kişniş çeşidi kullanılmıştır. Denemelere başlamadan önce, tohum sterilizasyonundan sonra tohumlar ½ Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında çimlendirilerek steril bitkiler elde edilmiştir. İlk aşamada temel besi ortamı olarak MS kullanılarak yedi farklı besi ortamında kallus oluşumu sağlanmıştır. Kallus oluşumu için kallus ağırlığı, kallus tipi ve kallus rengi skoru gibi ölçümler alınmış ve en uygun kallus oluşumu MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L BA besi ortamında gerçekleşmiştir. Buradan elde edilen kalluslar alt kültüre alınarak yine MS temel besi ortamı olacak şekilde 29 farklı besi ortamında kallus boyutu, kallus skoru, kallus rengi ve kallusta yeşil bölge yüzdesi gibi parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Kullanılan besi ortamlarında sürgün gelişimi gözlenmemesine rağmen bazı besi ortamlarında yeşil renkte embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. MS + 3,0 mg/L BA içeren ortamda gelişen kişniş kalluslarında tamamına yakın kısmının yeşilimsi renkte olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, kişnişte kallus gelişimi başarı ile gerçekleştirilmiş ve kalluslar alt kültüre alınmıştır. Ayrıca somatik embriyogenesis veya organogenesis temelini oluşturan embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Tam sürgün gelişimi için farklı yetiştirme koşulları ve yeni besi ortamlarının denenmesi uygun olacaktır.

Anahtar sözcükler: Kişniş, doku kültürü, kallus, büyüme düzenleyici, *in vitro*

ABSTRACT

TISSUE CULTURE STUDIES IN CORIANDER (*Coriandrum sativum* L.)

Gökhan KILIÇ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Crop Science Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Hakan TURHAN

02/02/2011, 40

This study was conducted in Field Crops and Biotechnology Laboratories of Agricultural Faculty during 2009-2010. The study consisted of two stages. In first stage, transferring coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants into tissue culture and proliferation, in the second stage, growth of embryogenic callus were aimed. In the study, Gamze coriander cultivar was used. Before starting the experiments, the seeds were surface-sterilized and germinated on ½ Murashige and Skoog (MS) medium. In the first stage, using MS as a basal medium, seven different media were used for callus induction. For callus induction, some parameters such as callus weight, callus type and callus color were measured and MS + 1 mg/L NAA + 1 mg/L BA medium was determined as the best medium for callus induction. These calli proliferated on the same callus induction medium were used for second stage of the study in which 29 media were tested for callus size, callus score, callus color and green spot percentage of callus. Although no shoot development was observed on calli, green embryogenic calli were obtained on some media. Almost all calli grown on MS supplemented with 3,0 mg/L BA were greenish in color. As a result, callus growth and subculture in coriander were successfully obtained. In addition, the embryogenic calli which is the first stage of embryogenesis or organogenesis were produced. Testing different growth conditions and new media will be appropriate for an entire shoot development in coriander.

Keywords: Coriander, tissue culture, callus, growth regulator, *in vitro*

İÇERİK

	<u>Sayfa</u>
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM.....	8
3.1. Bitki Materyallerinin Yüzey Sterilizasyonu.....	8
3.2. <i>In vitro</i> Bitki Elde Edilmesi.....	8
3.3. Kallus Oluşturma ve Çoğaltma Denemesi.....	9
3.4. Kallusların Alt Kültüre Alınması.....	10
3.5. Embriyogenik Kallus Denemesi.....	11
3.6. Deneme Deseni ve İstatistik Analiz.....	13
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	15
4.1. Kallus Oluşumu.....	15
4.1.1. Kallus Ağırlığı.....	15
4.1.2. Kallus Tipi.....	17
4.1.3. Kallus Rengi.....	18
4.1.4. Kallus Oluşumu Denemesinden Ölçülen Karakterler Arasındaki Korelasyonlar	20
4.2. Embriyogenik Kallus Gelişimi	22
4.2.1. Kallus Boyutu	22
4.2.2. Kallus Skoru	24
4.2.3. Kallus Rengi	27
4.2.4. Kallusta Yeşil Bölge Yüzdesi.....	30
4.2.5. Embriyogenik Kallus Denemesinden Ölçülen Karakterler Arasındaki Korelasyonlar.....	33
4.2.6. Embriyogenik Kallus Denemesine İlişkin Sonuç.....	34
BÖLÜM 5 – SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	37

Çizelgeler.....	I
Şekiller.....	II
Özgeçmiş.....	III

BÖLÜM - 1**GİRİŞ**

İnsanoğlu, bitkileri çoğaltmaya ve üretmeye çok eski tarihlerde başlamıştır. Günümüzde bitkilerin çoğaltılması çok farklı amaç ve doğrultuda yapılmaktadır. Bitkilerin çoğaltılması hobi amaçlı yapılabildiği gibi, çok geniş alanlarda küresel tohum şirketleri tarafından da yapılmaktadır. Ayrıca ticari olmayan kuruluşlar da arberetum veya botanik bahçesi oluşturma ve muhafazası için bitki çoğaltmaktadır. Bitki çoğaltmada geleneksel yöntemlerin kullanılması yanında günümüzde çeşitli amaçlar doğrultusunda *in vitro* teknikler de kullanılır. Doku kültürü bazen mikro çoğaltım veya *in vitro* kültürü olarak da ifade edilir.

Bitki doku kültürü; steril (aseptik) şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir (Babaoğlu ve ark., 2001). Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak bitki doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca nesli tükenmekte olan türlerin korunması veya üremesi zor olan türlerin çoğaltılmasında çeşitli doku kültürü uygulamaları rutin olarak kullanılmaktadır.

Bitki doku kültürünün amaçlarından biri de; hastalıktan arı bitki materyali üretimidir. Günümüzde büyük öneme sahip olan bitki doku kültürü çalışmaları, tarımsal üretimde sürekli olarak sorun teşkil eden hastalıkları bitkilerden uzak tutmak veya hastalıklardan arındırmak için sıkça başvurulan bir tekniktir. Özellikle patates gibi virüs hastalıklarının yaygın olduğu ürünlerde hastaliksız sertifikalı tohumluk üretimde daha fazla önem arz etmektedir. Çünkü hastalıklar bakımından çok kirlenen bir çevrede hastaliksız bitkileri doğal koşullarda yetiştirmek ve muhafaza etmek çok zordur. Bu nedenle tohumculuk ve fidancılıkta sağlıklı ve hastalıklarla bulaşmamış anaç bitkileri muhafaza etmek ve çoğaltmak için doku kültürü tekniklerinin kullanılması bir zorunluluk haline gelmiştir.

Doku kültüründe başarıyı etkileyen birçok faktör vardır. Bunlardan en önemli olanları eksplantın alındığı bitkinin sağlık durumu, eksplantın alındığı dönem, kültür işlemlerini yapan kişinin deneyimi, yetiştirme koşulları ve kullanılan besi ortamının içeriğidir. Doku kültüründe bir bitkinin yetiştirilmesinde uygun besi ortamının kullanılması, olmazsa olmazlardan biridir. Bu amaçla günümüze kadar bitki türü ve kültür

tipine göre çok sayıda besi ortamı geliştirilmiştir (George ve Sherrington, 1984; Murashige ve Skoog, 1962). Besi ortamlarının içeriğinde; inorganik tuzlar, bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler, amino asitler ve aminler, karbon ve enerji kaynağı bulunur. Günümüzde bitki doku kültüründe en yaygın olarak kullanılan besi ortamı MS (Murashige and Skoog, 1962) olmakla birlikte, bunun dışında B5 (Gamborg ve ark., 1968), SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972), LS (Linsmaier ve Skoog, 1965), White (1963), NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) gibi besi ortamları da farklı bitki türü ve kullanım amacı için geliştirilmiştir.

Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) bitkisi ülkemizde aşotu ve kuzbere isimleriyle de bilinir. Tarımı Polonya, Bulgaristan, Macaristan, İngiltere, Rusya, Hollanda, Fas, Mısır gibi ülkelerde yapılmaktadır. Yeşil aksamına “Çin Maydanozu” da denir. Bitkinin yararlanılan kısımları yaprakları ve tohumlarıdır.

Kişniş tek yıllık bir bitkidir, epigeal çimlenir, kazık köklü ve dik saplıdır (Şekil 1.1). Bitki yeşil haldeyken tıpkı bir böcek gibi kokar. Kişnişin İngilizce’deki “Coriander” adı Yunanca’da böcek anlamına gelen “Korion” kelimesinden gelir. Böyle kokmasının sebebi ise; bitkinin yeşil haldeyken uçucu yağlarında bulunan farklı aldehit bileşiklerinden kaynaklanır. Kişnişte önemli bir uçucu yağ olan Linalool yalnızca meyvesinde bulunur. Diğer kısımlarında bulunmaz (Lassányi ve Lörinez, 1967).



Şekil 1.1. Kişniş ve bitkisel özellikleri.

Geleneksel kullanımı ise; tıpta, yemeklerde baharat olarak, kimya sanayide olmak üzere sıralanabilir. Tıpta kullanımı ilk olarak eski Mısırlılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Sindirimi kolaylaştırdığı bilinen bitki, aynı zamanda ülser ve romatizma hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır. (Hegi, 1926; Losch, 1903). Et türü yemeklerde (özellikle de tavukta) hoş kokusundan dolayı baharat olarak da kullanılabilir. Ayrıca kişniş çiçeği çok fazla miktarda nektar ürettiği için böcekler tarafından çok sevilir. Bu nedenle bal arıcılığında çiçek kaynağı olarak da kullanılır (Hegi, 1926; Losch, 1903).

Günümüzde bitkilerin çoğaltılması çok farklı amaç ve doğrultuda yapılmaktadır. Bitki çoğaltmada geleneksel yöntemler yanında günümüzde çeşitli amaçlar doğrultusunda *in vitro* teknikler de kullanılır. (Babaoğlu ve ark., 2001; George ve Sherrington, 1984). Kişnişin tarımı ve içeriği üzerine oldukça fazla sayıda çalışma olmasına rağmen doku kültüründe üretimi konusunda çalışmalar sınırlıdır. Bir bitkinin doku kültürüne yanıtı optimize edilmeden üzerinde biyoteknolojik çalışmaların yapılması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bu araştırma ile elde edilecek sonuçların gelecekte yapılacak biyoteknolojik çalışmalara ışık tutması planlanmaktadır. Ayrıca kişnişte doku kültürü çalışmaları, metabolit üretimi gibi konularda da katkılar sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu araştırmanın amacı üç kademedeki değerlendirilebilir;

- 1) Bitkilerin sterilizasyonu ve doku kültürü koşullarına aktarılması,
- 2) Kallus oluşumu için uygun büyüme düzenleyici içeriğinin belirlenmesi,
- 3) Son olarak ta, bazı büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamları kullanılarak, kallustan somatik embrogenesisin araştırılması olarak özetlenebilir.

BÖLÜM – 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kişniş *Umbelliferae* familyasından olup, Latince adı “*Coriandrum sativum* L.” dur. Kökeni Orta Asya ve Avrupa olan kişnişin iki alt türü vardır. Bunlardan biri tarımı yapılan *Coriandrum sativum* L. diğeri de yabani tür olan *Coriandrum tordylium* (Fenzl.) Bornm.’dur. Hedge ve Lamond (1972) kişnişin Güney Anadolu’da bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kişnişte doku kültürü çalışmaları sınırlı olup bu çalışmalardan birisi Kataeva ve Popowich (1993) tarafından yürütülmüştür. Çalışmada MS besi ortamına kinetin ve indol-3-asetik asit ilavesinin sürgün gelişimine olumlu katkıda bulunduğunu açıklamıştır.

Millam ve ark. (1997) ise kişnişte MS besi ortamına 0,45 µM 2,4-D’nin embriyogenik kallus gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise, kişnişte eksplant olarak petiol kullanılarak 0,5 mg/L 2,4-D içeren katı veya sıvı MS besi ortamında çok sayıda meristemoid geliştiği bulunmuştur (Zee, 1981). Daha sonra bu meristemoidler büyüme düzenleyici olmaksızın sıvı MS’e aktarıldığında embriyo oluşumu gözlenmiştir.

Kim ve ark. (1996) kişnişin hipokotil parçalarının ve embriyolarının 1 mg/L 2,4-D içeren MS besi ortamına koyulduğunda %75 oranında embriyogenik kallus geliştirdiğini bulmuşlardır. Bu kalluslar kullanılarak aynı besi ortamının sıvı formunda hücre kültürüne geçilmiştir. Hücre kümeleri tekrar azotça zenginleştirilmiş ve 0,1 mg/L 2,4-D içeren MS’te somatik embriyo geliştirerek bitkicikler elde edilmiştir.

Kişnişte yapılan bir başka çalışmada somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu araştırılmıştır (Murthy ve ark., 2008). Denemede besi ortamı olarak MS ile birlikte 4,52 µM 2,4-D kullanılmıştır. Eksplant olarak bitkinin kotiledeon ve hipokotil segmentleri kullanılmıştır. Aynı yoğunluktaki besin ortamında alt kültüre alınan eksplantlarda 3 hafta sonra somatik embriyoların geliştiği gözlemlenmiştir.

Turhan ve ark. (2009) bazı büyüme düzenleyicilerinin ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) kallus gelişimine etkisi araştırmışlardır. Denemede Sanay çeşidi 7 farklı besi ortamında denenmiştir. Bu besi ortamlarından gelişen kallusların arasındaki en uygun kallusun MS+ 1 mg/L NAA ortamından geliştiğini bildirmişlerdir.

Bitki doku kültüründe kallusun farklı amaçlar için kullanımıyla birlikte özellikle gen transferi için gerekli ve önemlidir. Bu konu ile ilgili Turhan (2005) patatesten *Agrobacterium* ile yaptığı gen transferinde öncelikle meristem içermeyen gövde parçaları

kullanarak kallus gelişimi ve daha sonra ise somatik embriyogenesis ile transgenik bitkiler elde etmiştir.

Ho ve Vasil (1983) MS'le birlikte 0,5-3,0 mg/L 2,4-D, 5% hindistan cevizi suyu ve 3-8% sükroz bileşiminde, şeker kamışının (*Saccharum officinarum* L.) genç yapraklarında somatik embriyo gelişimi gözlemlenmiştir.

Zencefilde (*Zingiber officinale* Rosc.) yapılan somatik embriyogenesisle bitki rejenerasyonu Kackar ve ark. (1993) tarafından gözlemlenmiştir. Burada ise; 4 farklı oksin MS ile beraber denenmiştir. 2,7 µM dicamba ile embriyogenik kallus oluşumunda tatmin edici sonuçlar kaydedilmiştir. 8,9 µM BA içeren MS'de daha iyi bir bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir.

Finer (1987) tarafından, yüksek sükroz (%12) içerikli ortamla olgunlaşmamış zigotik hibrit ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) embriyolarında direkt somatik embriyogenesis ve rejenerasyon kaydedilmiştir.

Bir başka çalışmada farklı buğday genotiplerinin kallus gelişimi ve rejenerasyon kapasiteleri araştırılmıştır (Machii ve ark., 1998). Denemede 107 çeşit buğday genotipine ait anterler (78 yerel, 29 yabancı kökenli), kullanılmıştır. MS ile birlikte bazı büyüme düzenleyicileri içeren ortamda (2,0 mg/L 2,4-D, 0,25 mg/L ABA, 0,1 mg/L BAP) gelişen kalluslar içinde en yoğun kallusu Glennson 81'in ürettiği gözlenmiştir. Bunu takip eden çeşitler ise, Orofen, Danchi-komugi ve Chris olmuştur.

Tatlı patatestede (*Ipomea batatas* Poir.) yapılan bir çalışmada somatik embriyo ve bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir (Liu ve Cantliffe, 1984). Burada 0,5 mg/L ve 2,0 mg/L 2,4-D içeren iki farklı MS ortamı denenmiştir. Kalluslardan birinin parlak ve sarımsı yeşil renginde olduğu, diğerinin ise donuk sarı renginde ve yumuşak (dağılıbilir) yapılı olduğu gözlemlenmiştir.

Ekmeklik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) yapılan bir çalışmada ise; kallus gelişimi sonrası somatik embriyogenesis sonucu olgunlaşmamış embriyolardan bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Çalışmada MS ile birlikte 2 mg/L 2,4-D kullanılmıştır (Akins ve Vasil, 1982).

Hirai ve ark. (1997), *Glehnia littoralis* bitkisinin olgun zigotik embriyolarından somatik embriyogenesis gözlemlenmiştir. MS ile birlikte NAA ve 2,4-D (0,01-10 µM) kullanmışlardır. Kalp şekilli ve torpido şekilli somatik embriyolar gözlemlenmiştir. Denemede 7 farklı ortam kullanılmıştır. Somatik embriyo oranının en çok gözlemlendiği ortamın Nitsch'in besi ortamı olmuştur.

Bir başka çalışmada ise; 2,4-D varlığında ve yokluğunda, buğdayda sürgün rejenerasyonunun potansiyeli araştırılmıştır (Wernicke ve Milkovits, 1986). Denemede 21 adet rastgele seçilmiş genotiplerin olgunlaşmamış sürgünlerinin meristemleri kullanılmıştır. Denemede kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonu gözlenmiştir.

Glayöl (*Gladiolus hort*) bitkisinde somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu hakkında kayda değer sonuçlar gözlemlenmiştir (Stefaniak, 1994). Ortam olarak MS ile beraber farklı konsantrasyonlardaki oksinler kullanılmıştır.

Stamp ve Henshaw (1987), kasava (*Mannihot esculenta* Crantz.) bitkisinde ikincil somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu hakkında bir deneme yürütmüştür. Ortam olarak ilk aşama için kallus oluşturma amaçlı MS ile beraber 2-8 mg/L 2,4-D kullanılmıştır. İkinci aşamada sürgün oluşturmak için ise, 0,01 mg/L 2,4-D ve 0,1 mg/L BAP kullanılmıştır.

Havuç (*Daucus carota* L.) bitkisinde yapılan bir çalışmada, çeşitli büyüme düzenleyiciler kullanılarak *in vitro* koşullarda çoğaltım gerçekleştirilmiştir (Pant ve Manandhar, 2007). MS ile beraber 0,5 mg/L BAP kullanılmıştır. Bu sayede tek sürgünden 8 haftada toplam 6 adet bitkicik elde edilmiştir. Sonra nodal eksplantlardan MS ile beraber 2 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA kullanılarak sürgün elde edilmiştir. Sürgünler alt kültüre alındıktan sonra MS ile beraber 1 mg/L NAA kullanılarak, 5 haftada köklenme meydana gelmiştir.

Kavunda (*Cucumis melo* L.) yapılan bir çalışmada, süspansiyon kallus kültürü ile somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir (Oridate ve Oosawa, 1986). Olgun kavun tohumlarından çıkartılan embriyolar, MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L BA biçimindeki besi ortamında 3 haftalık bir bekletme ile olgun kalluslar elde edilmiştir. Daha sonra büyüme düzenleyicileri olmaksızın sıvı MS'de 115 rpm hızında çapraz biçimde dönerek karıştırılmıştır. Somatik embriyolar ve bitkicikler 3 hafta sonunda sıvı ortamdan alınmıştır.

Diploid süs muzunda (*Musa ornata* Roxb.) tohumdan somatik embriyo oluşumu ile bitki rejenerasyonu sağlanmıştır (Mitra ve Krikorian, 1988). Yarı katı MS ortamında oksinlerden 2,4-D (0,5-1,0-2,0 mg/L) ve %5 hindistan cevizi sütü kullanılmıştır. Daha sonra embriyo çimlenmesi ve gelişimi için 2,4-D'li SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972) ortamına transfer işlemi yapılmıştır. Bunun sonunda somatik embriyo ile rejenerasyon gözlemlenmiştir.

Bitki doku kültüründe kallusun farklı amaçlar için kullanımında *in vitro* ortamda bitkilerden sekonder metabolit üretimi de önemlidir. Vanisree ve ark. (2004) tıbbi ve

aromatik bitkilerden bazı önemli sekonder metabolitlerin üretimi hakkında çalışmışlardır. Örneğin *Mucuna hassjoo* (Piper & Tracy) Mansf. bitkisinden temel besi ortamı olarak MS ile beraber 0,025 mg/L 2,4-D 10 mg/L Kinetin kullanılarak, L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) alkaloidi elde edilmiştir.

BÖLÜM – 3

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ve Biyoteknoloji laboratuvarlarında 2009-2010 yıllarında yürütülmüştür.

Denemede Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen kişnişlerden (*Coriandrum sativum* L.) Gamze çeşidi kullanılmıştır. Bu bölümde kullanılan yöntemler sırasıyla alt başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

3.1. Bitki Materyallerinin Yüzey Sterilizasyonu

Bu denemede öncelikle kişniş meyvelerinin meyve kabukları soyularak tohumları çıkarılıp kimyasal yol ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Bunun yapılmasının sebebi; meyve kabuğunun tohumu sıkıca sarması nedeniyle sterilizasyon esnasında yüzey temasını engellemekte ve sterilizasyonun başarısını olumsuz etkilemektedir.

Meyve kabuklarından ayrılan tohumlar sıvı sabun ve saf su karışımıyla bir süre çalkalanmak suretiyle yıkanmıştır. Bu işlem sonrasında tohumlar 30 saniye %70'lik etanol ile muamele edildikten sonra süzülerek, doğrudan %20'lik hipoklorit (çamaşır suyu) çözeltisine aktarılmıştır. Sodyum hipoklorit olarak %5 yoğunluktaki ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. Ayrıca bu solüsyona sterilizasyonda sorun olan eksplantlar üzerindeki yüzey gerilimini azaltmak için 1-2 damla Tween-20 ilave edilmiştir. Bu solüsyonda tohumlar 20 dakika süre ile çalkalandıktan sonra 3-4 kez steril saf suyla steril kabin altında durulanmıştır. Böylece yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır (Turhan, 1997).

3.2 In vitro Bitki Elde Edilmesi

Bitki doku kültürlerinde kullanılan besi ortamı ve içerikleri bitki türü, genotip, kültür tipi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterir. En sık kullanılan bitki besi ortamları MS, B5, LS, White, SH, NN olarak sıralanabilir. Kişnişte daha önceki çalışmalar temel besi ortamı olarak MS'in uygun olduğunu göstermektedir (Zee, 1981). Bu nedenle denemenin tüm besi ortamlarında temel besi ortamı olarak MS (Murashige & Skoog, 1962) kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Yetiştirme kabı olarak yüksekliği 9,5 cm, çapı 3,4 cm olan silindir şeklindeki, şeffaf, otoklavlanabilir, plastik vidalı, kapaklı plastik kaplar kullanılmıştır. Her bir kap 40 ml besi ortamı içermiştir. Katılaştırıcı olarak 2,5 g/L Gelrite (Gellan gum - Fluka)

kullanılmıştır. Yetiştirme kapları 120 °C sıcaklıkta ve 1,06 bar basınçlı bir otoklavda 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar büyüme düzenleyici içermeyen ½MS besi ortamına ekilmiştir. Bu şekilde denemenin kurulması için gerekli bitki materyali elde edilmiştir. Kapların kapaklarına değene kadar büyümesine izin verilmiş bitkiciklerden daha sonra da deneme için eksplantlar alınmıştır.

Çizelge 3.1. MS besi ortamı bileşenleri ve miktarları (Murashige & Skoog, 1962)

Kimyasallar	Yoğunluk (mg/L)	Kimyasallar	Yoğunluk (mg/L)
(NH ₄)NO ₃	1650,0	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,250
KNO ₃	1900,0	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ 2H ₂ O	440,0	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
MgSO ₄ 7H ₂ O	370,0	Myo-inositol	100,000
KH ₂ PO ₄	170,0	Nicotinic acid	0,500
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	Pridoksin-HCl	0,500
Na ₂ EDTA	33,6	Thamin-HCl	0,100
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	Glisin	2,000
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	Sakaroz	30000,000
H ₃ BO ₃	6,2	pH	5,7
KI	0,83		

3.3. Kallus Oluşturma ve Çoğaltma Denemesi

Eksplant olarak 1 cm uzunluğunda boğum içermeyen bitki gövde kısımları kullanılmıştır. Bu eksplantlar yukarıda elde edilen 4 haftalık steril bitkilerden alınmıştır. Steril koşullarda alınan bu eksplantlar kallus oluşturma amacıyla temel besi ortamı MS olacak şekilde farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlara konulmuştur. Bu ortamlara 4 adet farklı bitki büyüme düzenleyicisi konulmuştur. Bunlar; IBA, 2,4-D, NAA, BA'dır. (Çizelge 3.2).

Kallus oluşumu için kaplar 16 saat aydınlık ışıkta (3 000 lux) ve 25±1 °C’de 6 hafta boyunca bekletilmiştir. Deneme sonunda kullanılan ölçüm ve veri tipleri aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Kallus oluşumu denemesi için kullanılan besi ortamları

Besi Ortam No	Büyüme düzenleyiciler (mg/L)			
	IBA	2,4-D	NAA	BA
1	-	-	-	-
2	1.0	-	-	1.0
3	1.0	-	-	2.0
4	-	1.0	-	1.0
5	-	1.0	-	2.0
6			1.0	1.0
7			1.0	2.0

Ölçülen Özellikler

Denemede tüm ölçümler 6 haftalık kalluslardan alınmıştır. Ölçülen özellikler şunlardır;

Kallus Ağırlığı: Kallus üzerindeki besi ortam kalıntılarının yumuşak bir kâğıt havlu ile uzaklaştırıldıktan hemen sonra hassas terazide (g) olarak tartımı biçiminde elde edilmiştir.

Kallus tipi: Her bir kallusun doku olarak sertliği ölçülmüştür. 0=kallus yok, 1=sıkı, 2=orta, 3=gevşek

Kallus rengi skoru: 1’den 9’a kadar tek sayılarla değerlendirilerek açıktan koyu renge doğru değerler verilmiştir. Buna göre; 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9= kahve

3.4. Kallusların Alt Kültüre Alınması

Gövde eksplantlarından oluşan kalluslar 6. haftanın sonunda belirlenen en uygun besi ortamı olan 1 mg/L NAA ve 1 mg/LBA içeren MS ortamında alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre alınırken kalluslar yaklaşık 0,5 x 0,5 cm boyutlarına bölünmüş ve taze besi ortamına

hafifçe bastırarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde kalluslar 7 kez alt kültüre alınarak bir sonraki deneme için yeterli miktarda kallus üretilmiştir.

3.5. Embriyogenik Kallus Denemesi

İkinci aşamada daha önce yapılan, uygun kallusu belirleme denemesinden elde edilen kalluslar materyal olarak kullanılmıştır. Toplam 4 adet bitki büyüme düzenleyici kullanılmıştır. Bunlardan ikisi oksin olup (IBA ve 2,4-D), diğer ikisi ise sitokinindir (BA ve kinetin). Bu kısımdaki amaç, bitki büyüme düzenleyicilerinin aralarındaki kombinasyonlarla birlikte gözlenecek olan embriyogenik kallus oluşumuna ilişkin veriler kaydetmektir. Tekerrür sayısı 4 olan denemede 29 farklı uygulama (besi ortamı) kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Ölçülen Özellikler

Denemede tüm ölçümler 5 haftalık kalluslardan alınmıştır. Ölçülen özellikler şunlardır;

Kallus boyutu: Her bir kallusun eni ve boyu ölçülüp ortalaması alınarak (cm) belirlenmiştir.

Kallus Skoru: 0'dan 9'a kadar tek sayılarla değerlendirilerek küçükten büyüğe doğru değerler verilmiştir. Buna göre; 0=ölü, 1=çok küçük, 3=küçük, 5=Orta, 7=büyük, 9=çok büyük.

Kallus Rengi: 1'den 9'a kadar tek sayılarla değerlendirilerek açıktan koyu renge doğru değerler verilmiştir (Turhan, 1997). Buna göre; 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9= kahve

Yeşil Bölge (%): Kallustaki yeşil kısımlar 0, 20, 40, 60, 80, 100 biçiminde, % (oransal) değerlerle ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3. Embriyogenik kallus denemesi için kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı No	Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)			
	IBA	2,4-D	BA	Kinetin
1	*	*	*	*
2	0,5	*	*	*
3	1	*	*	*
4	1,5	*	*	*
5	*	0,5	*	*
6	*	1	*	*
7	*	1,5	*	*
8	*	*	0,5	*
9	*	*	*	0,5
10	0,5	*	*	0,5
11	1	*	*	0,5
12	1,5	*	*	0,5
13	0,5	*	0,5	*
14	1	*	0,5	*
15	1,5	*	0,5	*
16	*	0,5	*	0,5
17	*	1	*	0,5
18	*	1,5	*	0,5
19	*	0,5	0,5	*
20	*	1	0,5	*
21	*	1,5	0,5	*
22	*	*	1	*
23	*	*	2	*
24	*	*	3	*
25	*	*	*	1
26	*	*	*	2
27	*	*	*	3
28	*	*	1	1
29	*	*	2	2

3.6. Deneme Deseni ve İstatistikî Analiz

Denemeler 4 tekerrürde ve her bir tekerrür de 4 bitki içerecek şekilde yürütülmüştür. Deneme deseni olarak tesadüf blokları deneme deseni kullanılmıştır. Aynı deneme farklı zamanlarda 2 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistikî analiz SAS programında PROC GLM'e göre analiz edilmiştir (SAS Institute INC. 1989, Cary, North Caroline). Ortalamalar arasındaki farklar ise, %5 düzeyinde LSD testine göre belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Denemeden bazı görünüşler. A: Kişniş tohumlarının harmanlanması, B: Kullanılan yetiştirme kapları C: Alt kültür sonrası kişniş kallusları, D: Yetiştirme kaplarının yetiştirme odasındaki yerleşimi, E: Kişniş kallusu içeren yetiştirme kaplarının yakından görünümü.

BÖLÜM - 4**ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**

Bu araştırma 2 ana aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; kişnişte kallus oluşumu için uygun besi ortamının belirlenmesi ve bu ortamdan elde edilen kallusların üretilmesi, diğeri de üretilen bu kalluslardan embriyogenik kallus oluşumu veya organogenesis sağlanmasıdır.

4.1. Kallus Oluşumu

Denemenin bu ilk aşamasında, tohumların sterilizasyonundan sonra *in vitro* ortamda kişniş tohumları çimlendirilmiş ve steril bitkiler elde edilmiştir. Deneme için bu steril bitkilerden alınan gövde eksplantları kullanılarak temel besi ortamı MS olmak üzere farklı besi ortamında kallus oluşumu araştırılmıştır. Tezin bu aşamasındaki bulgular, aşağıda başlıklar her bir karakter ayrı ayrı olacak şekilde sunulmuş altında detaylı olarak açıklanmış ve tartışılmıştır.

4.1.1. Kallus Ağırlığı

Kalluslar besi ortamından dikkatlice alınarak üzerindeki besi ortamı kısmı bir kağıt havlu yardımı ile uzaklaştırılmış ve hemen tartılmıştır. Kallus ağırlığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları incelendiğinde denenen 7 besi ortamının kallus ağırlığını önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kişnişte kallus ağırlığına ait varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	6	<0,0001
Tekerrür	7	0,2086
Hata	42	

Kallus oluşumunun ve gelişimin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan kallus ağırlığına ait LSD testine göre ortalamalar arasında önemli farklar bulunmuştur. Çizelge 4.2'ye bakıldığında, en fazla kallus ağırlığı 643,75 mg ile MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA

ortamından elde edildiği görülmüştür. Kallus gelişimi gözlenmeyen MS hariç, en az kallus ağırlığı ise 207,50 mg ile MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA ortamından elde edilmiştir.

Daha önce yapılan bir çalışmada kışlık buğdayın (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyoları, MS + 2,0 mg/L 2,4-D içeren bir besi ortamında kallus için kültüre alınmıştır (Özgen ve ark., 1998). Olgunlaşmış embriyodan elde edilen kallusların olgunlaşmamış embriyodan elde edilen kalluslara oranla kallus ağırlığının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu da gerek besi ortamının gerekse kullanılan eksplantın, kallus oluşumu ve kallus ağırlığını etkileyen önemli faktörlerden olduğunu göstermektedir.

Başka bir araştırmada, farklı buğday genotiplerinin olgun embriyolarından kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir (Nasırcılar ve ark., 2006). Bu denemede 5'er adet ekmeklik (*Triticum aestivum* L) ve makarnalık buğday (*Triticum durum* L.) çeşitleri kullanılmıştır. Besi ortamda kullanılan 1,0 mg/L NAA'nın kallus ağırlığına ve genel olarak kallus gelişimine pozitif etkilediği bildirmişlerdir. Bizim araştırmamızda da NAA içeren besi ortamlarının kallus oluşumu ve ağırlığı açısından daha iyi yanıt verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.2). 2,4-D içeren besi ortamları ise diğer besi ortamlarına göre daha az kallus gelişimi göstermiştir. (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte kallus ağırlığına etkisi (LSD_{0,05}: 0,194)

Besi Ortamı	Kallus Ağırlığı (mg/eksplant)
MS	0,00 d ¹
MS + 1,0 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA	456,25 ab
MS + 1,0 mg/L IBA + 2,0 mg/L BA	556,25 a
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA	207,50 c
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L BA	220,00 c
MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	643,75 a
MS + 1,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BA	328,75 bc

¹: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

4.1.2. Kallus Tipi

Kallus tipi *in vitro* çalışmalarda kallus yapısı açısından önemli bir karakterdir. Farklı besi ortamlarının kallus tipi üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu Çizelge 4.3'te görülmektedir.

Çizelge 4.3. Kışnişte kallus tipine ait varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	6	<0,0001
Tekerrür	7	0,9922
Hata	42	

Kallus tipini değerlendirmek için 0=kallus yok, 1=sıkı, 2=orta, 3=gevşek skalası kullanılmıştır. Farklı besi ortamlarında kallus tipine ilişkin yapılan LSD testinde bulgulara göre, 2,20 ortalama ile orta sertlikteki kallusun MS + 1,0 mg/L IBA + 2,0 mg/L BA ortamında geliştiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4). Kallus tipleri arasında en sıkı kallusun 1,50 ortalama ile MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L BA ortamından elde edildiği görülmüştür. Bu da orta ile sıkı arasında bir sertliğe denk gelmektedir.

Sarı sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* L. (Keng)) bitkisinde yapılan bir çalışmada 15 farklı sarı sakalotu ekotipinden alınan genç salkımlar iki farklı oksin (2,4-D ve Dicamba) çeşidinin 4 farklı konsantrasyonunu içeren (2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 mg/L) iki farklı temel besi ortamında (LH ve SH) kültüre alınmıştır (Can ve Hatipoğlu, 1998). Deneme sonunda LS temel besi ortamının SH temel besi ortamından daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Her iki ortamda da sadece açık sarı renkte sıkı yapıda kallus oluştuğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak da araştırmalarda kullanılan genotiplerin ve besi ortamlarının farklılığı gösterilmiştir.

Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) bitkisinde yapılan bir diğer çalışmada 4 farklı karanfil çeşidiyle çalışılmıştır (Karami, 2008). MS ile beraber 2,0 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BA içeren besi ortamı kullanılmıştır. 2 farklı tipte kallus geliştiği görülmüştür. 1. tip kallus yumuşak, sulu yapılı ve sarımsı yeşil renge iken 2. tip kallusun daha sert, krem renkli ve nodüler yapıda olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bizim bulgularımız ile benzerlik göstermektedir. Yaptığımız araştırma sonucunda da, 2,4-D içeren MS ortamında gelişen kallusların tipi, 2,4-D içermeyenlere göre biraz daha sert veya serte yakın olmuştur.

Özet olarak kişnişte, besi ortamı ve kullanılan büyüme düzenleyicisine bağlı olarak kallus tipinde de değıştiği söylenebilir.

Çizelge 4.4. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kişnişte kallus tipine etkisi (LSD_{0,05}: 0,658)

Besi Ortamı	Kallus Tipi
MS	0,00 c ¹
MS + 1,0 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA	1,96 ab
MS + 1,0 mg/L IBA + 2,0 mg/L BA	2,20 a
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA	1,96 ab
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L BA	1,50 b
MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	1,91 ab
MS + 1,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BA	2,08 ab

¹: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Kallus tipi skalası: 0=kallus yok, 1=sıkı, 2=orta, 3=gevşek

4.1.3. Kallus Rengi

Kallus rengi *in vitro* denemelerde kallusun gelişimi, tipi ve sağlıklı olup olmadığı hakkında bilgiler vermektedir. Kallus rengi ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları incelendiğinde denenen besi ortamlarının kallus rengini önemli düzeyde etkilediği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kişnişte kallus rengine ait varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	6	<0,0001
Tekerrür	7	0,2359
Hata	42	

Farklı besi ortamlarındaki kallusların rengine ait skorlar için, 1-9 skalası kullanılmıştır. Buna göre 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9=kahve'dir (Turhan, 1997). Bulgulara göre büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamında kallus

gelişimi gözlenmemiştir. Kallus rengine ilişkin Çizelge 4.6’de genel olarak kallus renginin yeşil ile koyu yeşil aralığında olduğu görülmektedir. LSD testine göre 3,25 ortalama değer ile en yüksek renk skoru MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA içeren besi ortamından elde edilmiştir. Kallus oluşan besi ortamlarında en düşük kallus rengi skoru 1,5 ise MS + 1,0 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA içeren besi ortamından elde edilmiştir. Renk skalasına göre 1,5 değeri yeşil ile koyu yeşil arasına düşmektedir.

Çizelge 4.6. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kişnişte kallus rengine etkisi (LSD_{0,05}: 1,106)

Besi Ortamı	Kallus Rengi
MS	0,00 c ¹
MS + 1,0 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA	1,50 b
MS + 1,0 mg/L IBA + 2,0 mg/L BA	2,46 ab
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA	3,08 a
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L BA	2,33 ab
MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA	3,25 a
MS + 1,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BA	2,83 a

¹: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Kallus renk skalası: 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7=sarımsı yeşil, 9=kahve.

Çeltik ve soya fasulyesinde daha önce yapılan bir çalışmada MS ile beraber 4,0 mg/L NAA ve 2,5 mg/L kinetin kullanılarak alt kültürle bitkilerden kalluslar elde edilmiştir (Niizeki ve ark., 1985). Soyadan elde edilen kallusların genelde sarı renkli olduğu, rengin bazen de yeşile döndüğü belirlenmiştir. Çeltik bitkisinden elde edilen kallusların renkleri ise kapalı mor ve açık sarı arasında değiştiği görülmüştür. Gelişen bu kalluslar arasındaki renk farklılığının önemli olduğu bulunmuştur. Türe bağlı kallus renginin değiştiği gibi tür içinde de besi ortamına göre kallus renginin değişebileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, kallus rengi bitki türüne ve çeşidine göre değişmekle birlikte, çalışmamızda kullanılan kişnişte NAA kallus rengini diğer kullanılan büyüme düzenleyicilerine oranla daha koyu yeşil olmasını sağlamıştır.

4.1.4. Kallus Oluşumu Denemesinden Ölçülen Karakterler Arasındaki Korelasyonlar

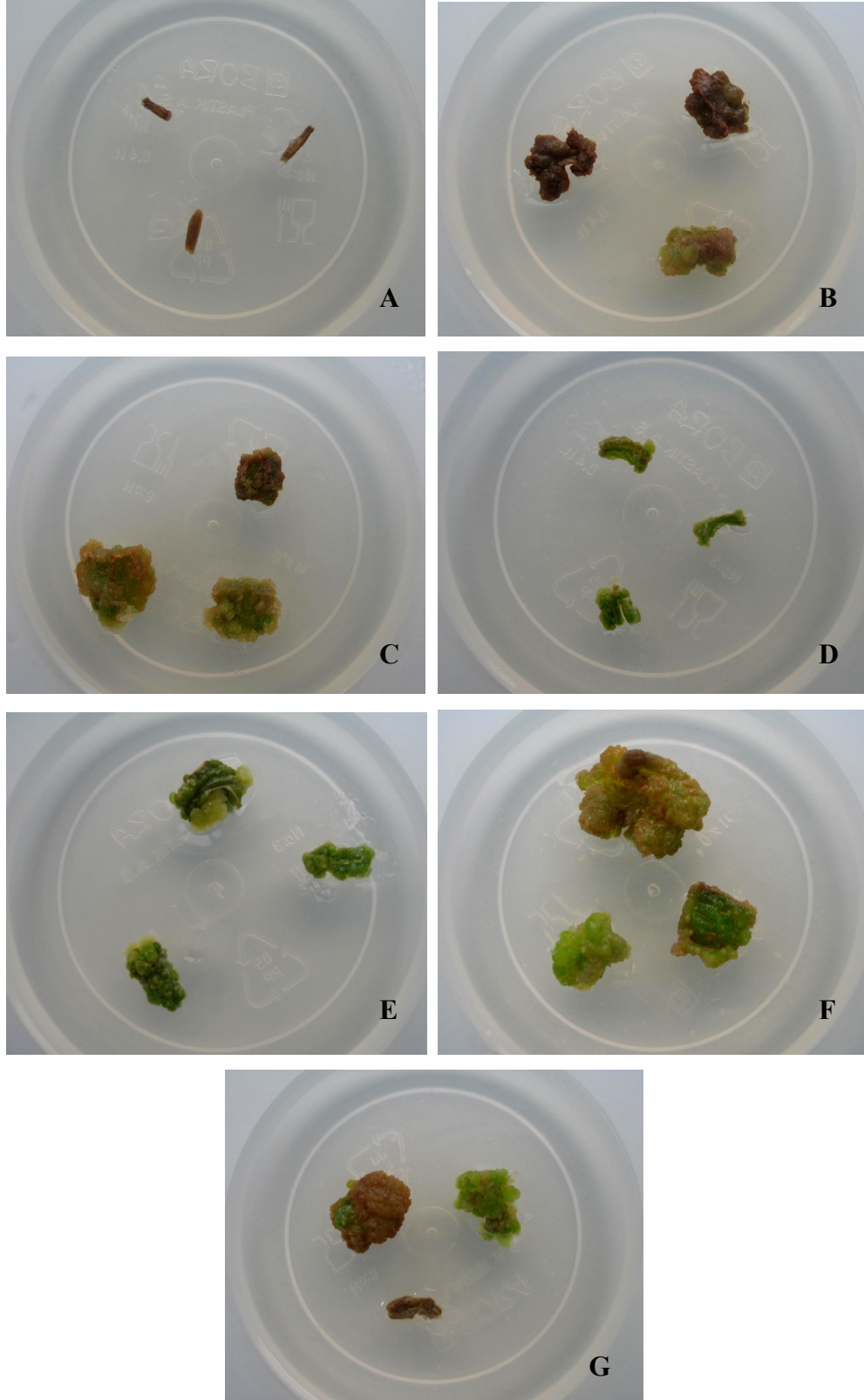
Çizelge 4.7’de kallus oluşumu denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları belirtilmiştir. Kallus tipinin, kallus rengi ile arasındaki korelasyon katsayısının düşük fakat önemli olduğu görülmektedir. Kallus tipi ile kallus ağırlığı arasındaki korelasyon katsayısı ve önemlilik düzeyinin ise yüksek olduğu görülmektedir. Korelasyon katsayısının yüksek olması ölçülen karakterler arasındaki ilişkinin yakınlığını göstermektedir. Aralarında çok yüksek ve önemli ilişki bulunan bu karakterler, gelecekteki çalışmalarda ölçülen karakterlerin azaltılmasında fayda sağlayabilir. Diğer taraftan bu ilişkinin olması, bu karakterlerin birbirine bağlı olduğunu da göstermektedir.

Çizelge 4.7. Kışnişte kallus oluşumu denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları

Karakterler	Kallus Rengi	Kallus Ağırlığı
Kallus Ağırlığı	0,186 0,169	
Kallus Tipi	0,444 0,001	0,646 <0,0001

4.1.5. Kallus Oluşumu Denemesine İlişkin Sonuç

Kışnişte kallus oluşumu ile ilgili 7 farklı besi ortamı denenmiştir. Kallus ağırlığı, kallus tipi ve kallus rengi gibi parametreler değerlendirildiğinde en uygun besi ortamının MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.1 F). Uygun olduğu belirlenen bu ortamdan elde edilen kalluslar steril ortamda 7 kez alt kültüre alınmıştır. Bu şekilde kalluslar çoğaltılarak bir sonraki deneme için yeterli miktarda eksplant kaynağı elde edilmiş ve aynı zamanda kallus gelişiminin kararlılığı gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Kişnişte farklı büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu etkileri. A: MS, B: MS + 1,0 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA, C: MS + 1,0 mg/L IBA + 2,0 mg/L BA, D: MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA, E: MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 2,0 mg/L BA, F: MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA, G: MS + 1,0 mg/L NAA + 2,0 mg/L BA).

4.2. Embriyogenik Kallus Gelişimi

Denemenin ikinci aşaması olan bu bölümde daha önce üretilen kalluslardan embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Bu amaçla çeşitli büyüme düzenleyicileri ve kombinasyonlarını içeren 29 farklı besi ortamı kullanılarak kalluslar 6 haftada süre ile 16 saat fotoperiyotta kültüre alınmıştır. Deneme sonunda, kallus boyutu, kallus skoru, kallus rengi ve kallus canlı ağırlığına ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.2.1. Kallus Boyutu

Kallus boyutu, kallusun eni ve boyu ölçülerek ortalaması hesaplanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre, farklı besi ortamlarının kallus boyutu üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Kişnişte kallus boyutuna ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	28	<0,0001
Tekerrür	3	0,4705
Hata	84	

Farklı besi ortamlarındaki kallus boyutlarına ilişkin yapılan LSD testindeki bulgulara göre, Çizelge 4.9’da 27,15 mm ile MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA içeren besi ortamındaki kallusun en büyük boyuta sahip olduğu görülmüştür. En küçük kallus ortalaması ise 4,27 mm ile MS + 0,5 mg/L Kinetin içeren besi ortamından elde edilmiştir. Kinetinin tek başına kullanıldığı besi ortamında gelişen kallusların diğer besi ortamlarında gelişenlere oranla daha küçük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

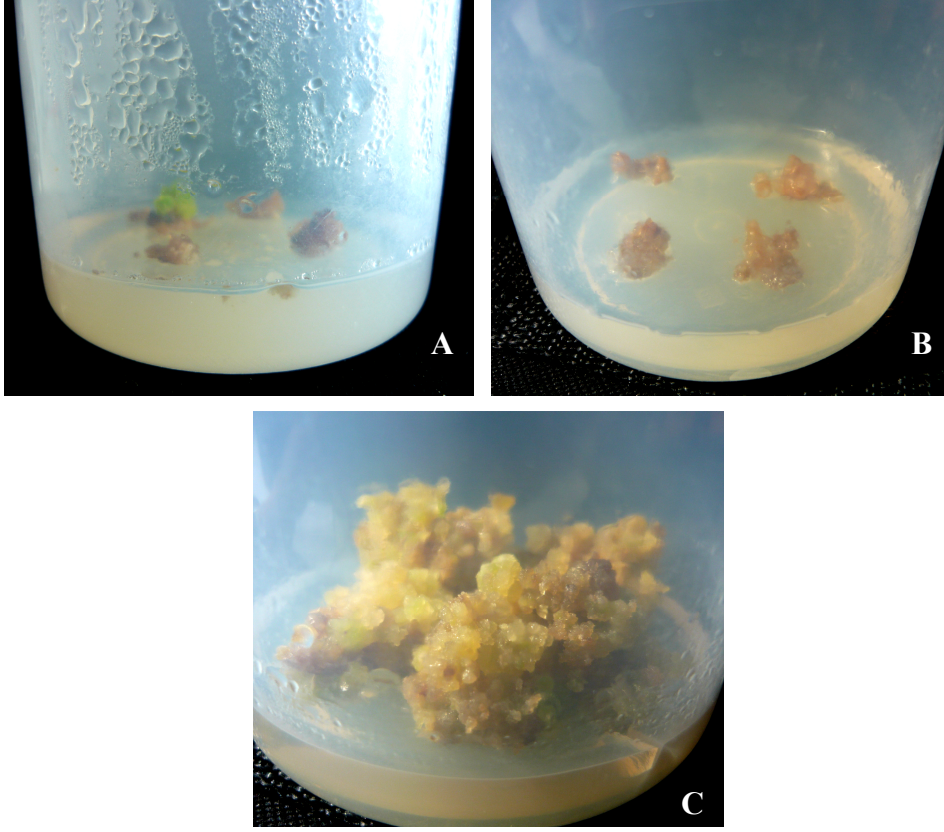
Ekmeklik buğdayda yapılan bir çalışmada İnqilab-91 ve Chakwal-97 buğday çeşitlerinin kallus gelişimi ve bitki rejenerasyonu incelenmiştir (Rashid ve ark., 2009). Bu denemede kullanılan kinetin ile kallus boyutu arasında negatif ilişki olduğu belirlenmiştir. Yine başka bir araştırmada, hurmada (*Elaeis guineensis* Jacq.), embriyogenik kallus üretme amacıyla 2,5 mg/L dicamba (3,6-dichloro-oanisic acid) içeren MS besi ortamı ve olgunlaşmamış zigotik embriyolar kullanılmıştır (Sanputawong ve Te-chato, 2008). Bu denemede en yüksek kallus boyutu 1,17 cm olarak ölçülmüştür. Denemelerde kullanılan farklı besi ortamlarının üretilen bitkinin çeşidine de bağlı olarak kallusun boyutunda

farklılığa yol açtığı bildirilmiştir. Bu araştırmaların sonuçları bizim bulgularımız ile benzerlik göstermektedir. Bizim araştırmamızda da farklı besi ortamlarında elde edilen ortalama kallus boyutu önemli farklılık göstermiştir. Şekil 4.2’de temel besi ortamı MS ile en yüksek ve en düşük kallus boyutuna sahip uygulamalara ait fotoğraflar verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi kallus boyutu bakımından besi ortamları arasında çok önemli farklar vardır.

Çizelge 4.9. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kişnişte embriyogenik kallus denemesinde kallus boyutuna etkisi (LSD_{0,05}: 0,556)

Besi Ortamı	Kallus Boyutu (mm)
MS	5,35 jk ¹
MS + 0,5 mg/L IBA	14,60 efg
MS + 1,0 mg/L IBA	9,40 ghijk
MS + 1,5 mg/L IBA	7,47 ijk
MS + 0,5 mg/L 2,4-D	10,50 fghij
MS + 1,0 mg/L 2,4-D	4,67 k
MS + 1,5 mg/L 2,4-D	6,52 ijk
MS + 0,5 mg/L BA	22,20 abc
MS + 1,0 mg/L BA	7,40 ijk
MS + 2,0 mg/L BA	9,62 ghijk
MS + 3,0 mg/L BA	20,30 bcd
MS + 0,5 mg/L Kinetin	4,27 k
MS + 1,0 mg/L Kinetin	13,47 efgh
MS + 2,0 mg/L Kinetin	15,25 def
MS + 3,0 mg/L Kinetin	16,60 de
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	10,27 fghij
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	6,65 ijk
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	22,32 ab
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	26,80 a
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	27,15 a
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	22,55 ab
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	12,02 efghi
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	11,27 efghi
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	6,77 ijk
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	14,27 efgh
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	8,90 hijk
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	14,72 efg
MS + 1,0 mg/L BA + 1,0 mg/L Kinetin	16,65 cde
MS + 2,0 mg/L BA + 2,0 mg/L Kinetin	16,20 de

¹: Aynı harf taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.



Şekil 4.2. Kişnişte embriyogenik kallus denemesinden kallus boyutuna ilişkin bazı fotoğraflar. A: MS (Kontrol), B: MS + 0,5 mg/L Kinetin (en düşük ortalama), C: MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA (en yüksek ortalama).

4.2.2. Kallus Skoru

Her bir kallusun boyutu ve hacmi dikkate alınarak kallus skoru belirlenmiştir. Bunun nedeni genellikle kalluslar gevşek yapıda olduğu için hacim ölçümünde besi ortamından ayrılması zor olduğu gibi kolaylıkla dağılmaktadır. Bu da hacim ölçümünü imkânsız kılmaktadır. Bunun dışında kallusun eni ve boyu ölçülerek kallus boyutunun belirlenmesinde yukarı doğru gelişiminin dikkate alınmaması neden olmaktadır. Bu nedenle burada kallus gelişimi hem hacmi hem de boyutu dikkate alan bir skala kullanılarak yapılmıştır. Kallusun hacim skorunun denemedeki skalası 0=ölü, 1=çok küçük, 3=küçük, 5=Orta, 7=büyük, 9=çok büyük şeklindedir. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı besi ortamlarının kallus skoru üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Kişnişte kallus skoruna ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	28	<0,0001
Tekerrür	3	0,7789
Hata	84	

Farklı besi ortamlarındaki kallus skoruna ilişkin yapılan LSD testindeki bulgulara göre, genel olarak skaladaki boyut sınıflarının birçoğu denemede gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.11’de en yüksek ortalama kallus skoru (9,00) MS + 0,5 mg/L BA ortamından elde edilmiştir. Bunu MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin ortamından elde edilen kalluslar (8,00) ortalama değer ile izlemiştir. En düşük ortalama kallus değeri (1,00) ise MS + 0,5 mg/L Kinetin ortamından elde edilmiştir. Kontrol, en düşük ortalama ve en yüksek ortalama Şekil 4.3’de görülmektedir.

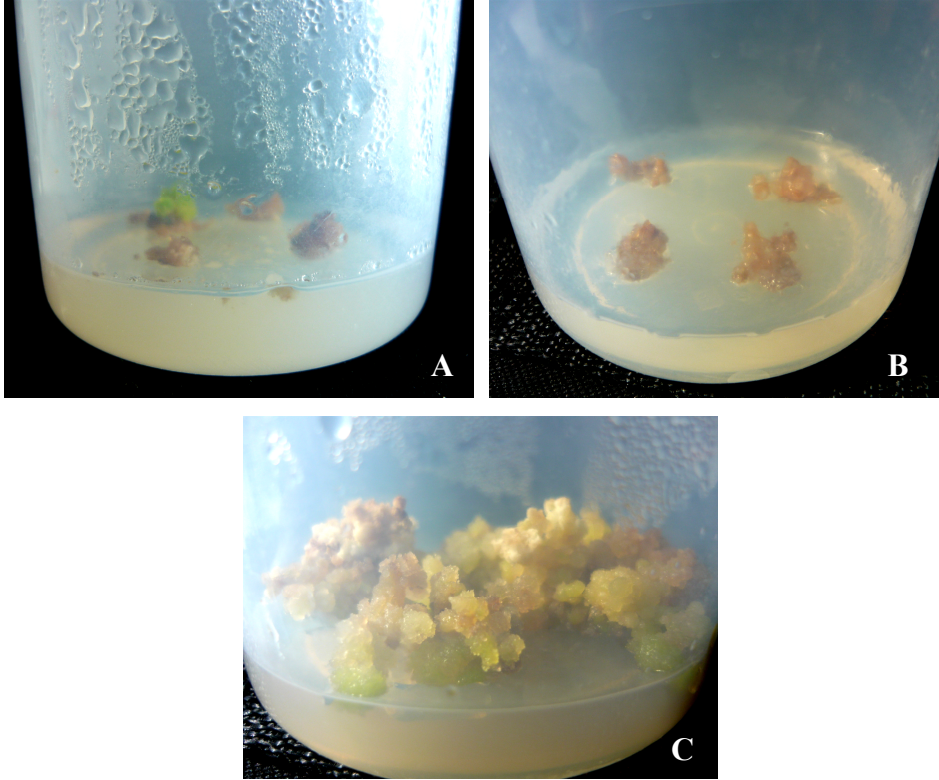
Lotus bitkisinde (*Nelumbo nucifera* Geartn.) yapılan bir çalışmada MS yanında 0, 4,0, 8,0, 10,0 µM 2,4-D ve 0, 1,0, 2,0, 3,0 µM Kinetin bunun yanında 0, 0,5, 1,0 µM BA kullanılarak kallus gelişimi ve somatik embriyo oluşumu araştırılmıştır (Arunyanarat ve Chaitrayagun, 2005). 12 haftalık yetiştirme periyodu sonunda 6,0 µM 2,4-D ve 0,5 µM BA içeren besi ortamında gelişen kalluslarda en iyi kallus skoru belirlenmiştir. Benzer olarak, bizim araştırmamızda da BA’nın büyüme düzenleyicileri kombinasyonunda yer alması kallus gelişimine olumlu etkide bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kişnişte embriyogenik kallus denemesinde kallus skoruna etkisi ($LSD_{0,05}: 1,455$)

Besi Ortamı	Kallus Skoru
MS	1,50 ij ¹
MS + 0,5 mg/L IBA	2,50 ghi
MS + 1,0 mg/L IBA	2,12 ghij
MS + 1,5 mg/L IBA	3,12 efgh
MS + 0,5 mg/L 2,4-D	3,50 efg
MS + 1,0 mg/L 2,4-D	3,00 fgh
MS + 1,5 mg/L 2,4-D	3,50 efg
MS + 0,5 mg/L BA	9,00 a
MS + 1,0 mg/L BA	2,00 hij
MS + 2,0 mg/L BA	2,00 hij
MS + 3,0 mg/L BA	7,50 b
MS + 0,5 mg/L Kinetin	1,00 j
MS + 1,0 mg/L Kinetin	5,00 cd
MS + 2,0 mg/L Kinetin	3,00 fgh
MS + 3,0 mg/L Kinetin	3,50 efg
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	4,33 cdef
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	1,50 ij
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	8,00 ab
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	3,50 efg
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	4,50 cde
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	4,00 def
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	3,00 fgh
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	3,00 fgh
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	1,00 j
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	3,00 fgh
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	2,50 ghi
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	4,00 def
MS + 1,0 mg/L BA + 1,0 mg/L Kinetin	5,50 c
MS + 2,0 mg/L BA + 2,0 mg/L Kinetin	3,00 fgh

¹: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Kallus skor skalası: 0=ölü, 1=çok küçük, 3=küçük, 5=Orta, 7=büyük, 9=çok büyük.



Şekil 4.3. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden kallus skoruna ilişkin bazı görüntüler. A: MS (Kontrol), B: MS + 0,5 mg/L Kinetin (en düşük ortalama), C: MS + 0,5 mg/L BA (en yüksek ortalama).

4.2.3. Kallus Rengi

Kallus rengi ile ilgili 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7= sarımsı yeşil, 9= kahve şeklinde bir skala kullanılmıştır (Turhan, 1997). Farklı besi ortamlarına ilişkin kallus renginin varyans analiz tablosu aşağıdaki gibidir. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı besi ortamlarının kallus rengi üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Kışnişte kallus rengine ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	28	<0,0001
Tekerrür	3	0,5286
Hata	84	

Farklı besi ortamlarındaki kallus rengine ilişkin yapılan LSD testindeki ortalamalara göre, Çizelge 4.13’de genel olarak denemede görülen genel renk durumu koyu yeşil ile sarımsı yeşil arasındadır. Denemede LSD testine göre en yüksek renk skoru MS + 3,0 mg/L BA içeren besi ortamından 8,50 (yeşilimsi) ile elde edilmiş ve bunu 8,00 renk skoru ile MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin içeren besi ortamı takip etmiştir. Buna karşılık en düşük kallus renk skoru da 0,50 ile MS + 0,5 mg/L Kinetin ve MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin içeren besi ortamlarından elde edilmiştir (Şekil 4.13). Parametreye ait kontrol, en düşük ortalama ve en yüksek ortalama Şekil 4.4’de görülmektedir.

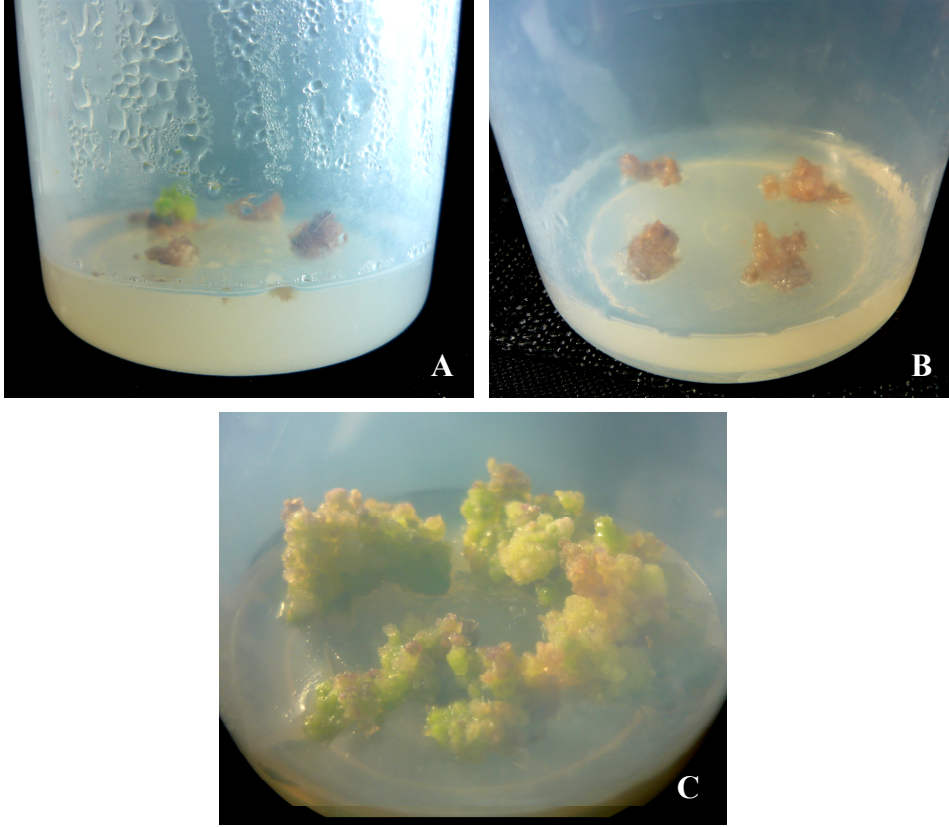
Gomphrena globosa L. bitkisinde yapılan bir çalışmada besi ortamı olarak MS ile birlikte 4 mg/L 2,4-D ve % 10 hindistan cevizi sütü kullanılmıştır (Ghaffar ve ark., 2007). Kallus oluşumundan sonra alt kültür için 1,5 mg/L BAP, 1,0 mg/L NAA kullanılmıştır. BA’nın farklı dozlarının kullanıldığı besi ortamından üretilen kallusların renginin yeşile yakın gelişiminin ise gevşek yapıda olduğunu bulmuşlardır. Bu da bizim denememizle benzerlik göstermektedir. Fakat kallus renginin sadece kullanılan besi ortamına bağlı olmayıp eksplanta, bitki türüne ve yetiştirme koşullarına göre de değiştiği göz ardı edilmemelidir (Shirin ve ark., 2007)

Çizelge 4.13. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kişnişte embriyogenik kallus denemesinde kallus rengine etkisi (LSD_{0,05}: 2,266)

Besi Ortamı	Kallus Rengi
MS	1,65 hi ¹
MS + 0,5 mg/L IBA	2,06 ghi
MS + 1,0 mg/L IBA	2,18 fghi
MS + 1,5 mg/L IBA	1,25 i
MS + 0,5 mg/L 2,4-D	5,00 cd
MS + 1,0 mg/L 2,4-D	2,50 efghi
MS + 1,5 mg/L 2,4-D	2,25 efghi
MS + 0,5 mg/L BA	6,50 abc
MS + 1,0 mg/L BA	1,00 i
MS + 2,0 mg/L BA	1,65 hi
MS + 3,0 mg/L BA	8,50 a
MS + 0,5 mg/L Kinetin	0,50 i
MS + 1,0 mg/L Kinetin	5,50 bcd
MS + 2,0 mg/L Kinetin	6,50 abc
MS + 3,0 mg/L Kinetin	5,00 cd
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	4,33 cdef
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	0,50 i
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	8,00 a
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	3,50 defgh
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	4,50 cde
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	4,00 defg
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	2,00 ghi
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	4,00 defg
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	2,00 ghi
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	7,50 ab
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	3,50 defgh
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	5,50 bcd
MS + 1,0 mg/L BA + 1,0 mg/L Kinetin	3,50 defgh
MS + 2,0 mg/L BA + 2,0 mg/L Kinetin	1,50 hi

¹: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.

Renk skalası: 1=koyu yeşil, 3=yeşil, 5=açık yeşil, 7= sarımsı yeşil, 9= kahve.



Şekil 4.4. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden kallus rengine ilişkin bazı fotoğraflar. A: MS (Kontrol), B: MS + 0,5 mg/L Kinetin (en düşük ortalama), C: MS + 3,0 mg/L BA (en yüksek ortalama).

4.2.4. Kallusta Yeşil Bölge Yüzdesi

Farklı besi ortamlarına ilişkin yeşil bölgelerin varyans analiz tablosu aşağıdaki gibidir. Varyans analizi sonuçlarına göre farklı besi ortamlarının yeşil bölge üzerine etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Kışnişte yeşil bölgeye ait varyans analiz tablosu

Kaynaklar	Serbestlik derecesi	Önemlilik düzeyi (P)
Besi ortamı	28	<0,0001
Tekerrür	3	0,3316
Hata	84	

Çizelge 4.15’de kallus oluşumunda, farklı besi ortamlarında yeşil bölgelerin karşılaştırılması amacıyla yapılan LSD testine göre, kallustaki yeşil bölgeler 20, 40, 60, 80, 100 biçiminde, % cinsinden ifade edilmiştir. Buna göre, % 100 yeşil bölgeye sahip kallusun MS + 3,0 mg/L BA içeren ortamdan elde edildiği görülmüştür. Buna karşın %1,5 ile en düşük yeşil bölgeye sahip kallusun olduğu besi ortamının MS + 2,0 mg/L BA + 2,0 mg/L Kinetin içeren besi ortamı olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol, en düşük ortalama ve en yüksek ortalama ait fotoğraflar Şekil 4.5’de görülmektedir.

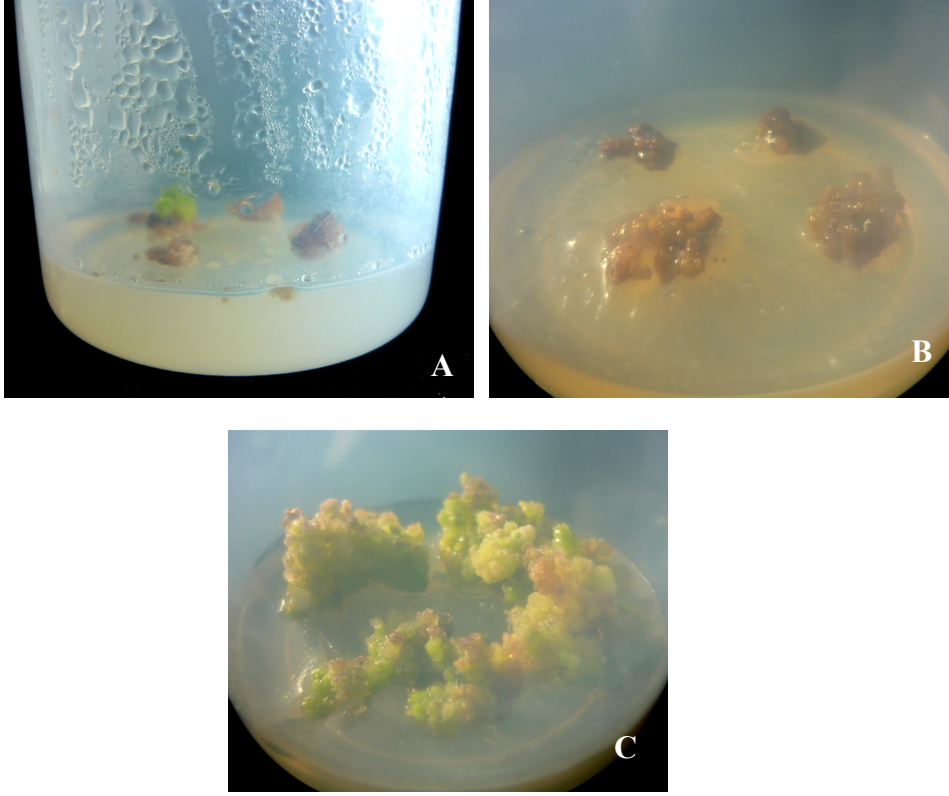
Ekmeklik buğdayın olgun tohumlarıyla (*Triticum aestivum* L.) yapılan bir çalışmada MS ile birlikte 0,1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IAA içeren ortamlarda, somatik embriyogenesisle bitki rejenerasyonu amaçlı kallus üretimi yapılmıştır (Malik ve ark., 2004). Denemede iki adet buğday çeşidi kullanılmıştır (Inqilab-91 ve Pavon-76). Denemede üretilen kallusların Inqilab-91’de % 84, Pavon-76’da ise % 52’lik bir oranda yeşil bölgeye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kallusların yeşil bölgeleri hakkında genel bir değerlendirme yapılacak olursa, MS ile beraber kullanılan BAP ve BA gibi stokininlerin *in vitro* koşullarda kallusların yeşil bölge oluşturması hakkında pozitif etkileri olduğu söylenebilir. Bu araştırmanın sonuçları bizim bulgularımız ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kişnişte embriyogenik kallus denemesinde yeşil bölgeye etkisi (LSD_{0,05}: 25,228)

Besi Ortamı	Yeşil Bölge (%)
MS	10,00 lm ¹
MS + 0,5 mg/L IBA	28,75 hijklm
MS + 1,0 mg/L IBA	16,25 klm
MS + 1,5 mg/L IBA	43,75 efghij
MS + 0,5 mg/L 2,4-D	53,75 defgh
MS + 1,0 mg/L 2,4-D	23,75 jklm
MS + 1,5 mg/L 2,4-D	30,00 ghijklm
MS + 0,5 mg/L BA	87,75 ab
MS + 1,0 mg/L BA	5,00 m
MS + 2,0 mg/L BA	5,00 m
MS + 3,0 mg/L BA	100,00 a
MS + 0,5 mg/L Kinetin	25,00 ijklm
MS + 1,0 mg/L Kinetin	40,00 fghijk
MS + 2,0 mg/L Kinetin	40,00 fghijk
MS + 3,0 mg/L Kinetin	55,00 defg
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	53,33 defgh
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	50,00 defghi
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin	68,75 bcde
MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	35,00 fghijkl
MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	25,00 ijklm
MS + 1,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA	50,00 defghi
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	50,00 defghi
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	75,00 abcd
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin	35,00 fghijkl
MS + 0,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	85,00 abc
MS + 1,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	60,00 cdef
MS + 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BA	70,00 bcd
MS + 1,0 mg/L BA + 1,0 mg/L Kinetin	35,00 fghijkl
MS + 2,0 mg/L BA + 2,0 mg/L Kinetin	1,50 jklm

¹: Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasında % 5 düzeyinde önemli fark yoktur.



Şekil 4.5. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden yeşil bölgeye ilişkin bazı fotoğraflar. A: MS (Kontrol), B: MS + 2,0 mg/L BA + 2,0 mg/L Kinetin (en düşük ortalama), C: MS + 3,0 mg/L BA (en yüksek ortalama).

4.2.5. Embriyogenik Kallus Denemesinden Ölçülen Karakterler Arasındaki Korelasyonlar

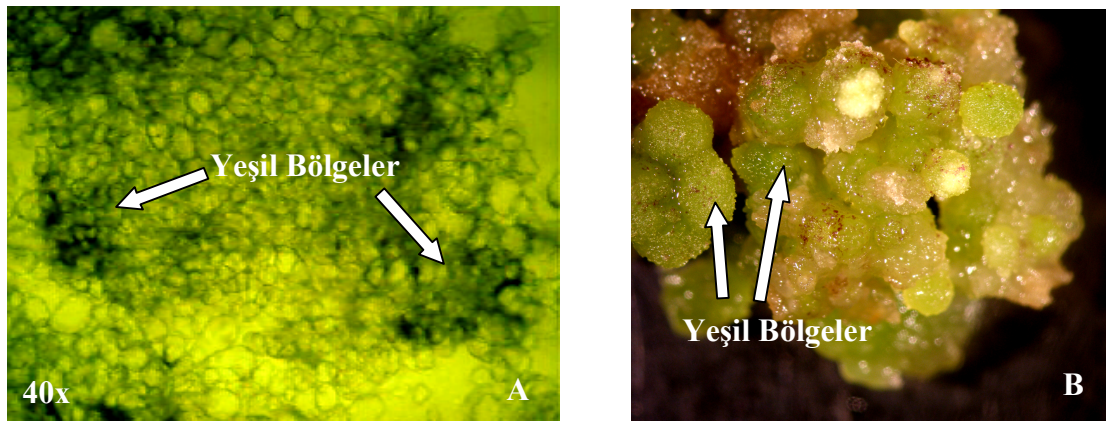
Çizelge 4.16’de embriyogenik kallus denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri gösterilmiştir. Kallus boyutunun yeşil kısım karakterleri ile arasındaki korelasyon katsayısının düşük fakat önemli olduğu görülmektedir. Kallus skoru, kallus rengi ve yeşil kısım karakterlerinin birbiri ile olan ilişkisinde ise korelasyon katsayısı orta ve önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.16. Somatik embriyogenesis denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları

Karakterler	Kallus Boyutu	Kallus Skoru	Kallus Rengi
Kallus Skoru	0,6119 <,0001		
Kallus Rengi	0,5229 <,0001	0,6451 <,0001	
Yeşil Kısım	0,3638 <,0001	0,5246 <,0001	0,6417 <,0001

4.2.6. Embriyogenik Kallus Denemesine İlişkin Sonuç

Kışnişte embriyogenik kallus gelişimi ile ilgili 29 farklı besi ortamı denenmiştir. Denemede kallus boyutu, kallus rengi, kallus hacmi, yeşil bölge yüzdesi gibi parametreler değerlendirilmiştir. Bu ortamlar arasında en büyük kallus boyutunun, MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA içeren besi ortamından elde edileceği, BA'nın da kallus rengi ve kallus skoru parametrelerinde pozitif rol oynadığı sonucuna varılabilir. En fazla yeşil bölge yüzdesi ise MS + 3,0 mg/L BA ortamından elde edilmiştir.



Şekil 4.6. Kışniş kalluslarında yeşil bölgelerin yakından görünümü. A: Mikroskofta 40 kez büyütülerek fotoğrafı çekilmiş kışniş kallusu ve içerdiği yeşil bölgeler, B: Fotoğrafı yakından çekilen kışniş kallusu.

Genel olarak bu denemede yeşil bölgeler embriyogenik kallus gelişimine işaret etmektedir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi sürgün gelişimi olmamasına rağmen yeşil

bölgelerin klorofil içeren hücrelerden oluştuğu ve sürgün gelişimi için temel oluşturduğu söylenebilir (Şekil 4.6 A ve B).

BÖLÜM - 5
SONUÇ ve ÖNERİLER

- Kallus oluşumu ve çoğaltma ile ilgili deneme sonucunda MS + 1,0 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA besi ortamının kallusun oluşumunda kullanılabilecek uygun ortam olduğu belirlenmiştir. Aynı besi ortamı kullanılarak çok sayıda alt kültür oluşturulması ile kallus gelişiminin kararlılığı da test edilmiştir.
- Embriyogenik kallus veya organogenesis ile ilgili denemede kallus boyutunda MS + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA içeren besi ortamında yetişen kallusların denemede kullanılan diğer ortamlardaki gelişen kalluslara göre boyutunun daha büyük olduğu gözlemlenmiştir.
- Kallus skorunda ise MS + 0,5 mg/L BA ortamından elde edilen kallusların diğer ortamlarda gelişen kalluslara göre hacim olarak daha büyük olduğu gözlemlenmiştir.
- Kallus rengine ilişkin parametrede somatik embriyo oluşturabilecek kallusların denemedeki besi ortamları arasındaki en uygun rengin, MS + 3,0 mg/L BA ortamından elde edilmiştir.
- Kallus ağırlığı ve kallus oluşumu ile ilgili bir değerlendirme yapılacak olursa, bitki büyüme düzenleyicilerinin bu hususta önemli bir faktör olduğunu ve NAA'nın bu bağlamda pozitif rol aldığı belirlenmiştir.
- Yeşil kısım ile ilgili ölçüm ve istatistiklere göre ise, tamamının yeşil olduğu gözlemlenen kallusun yetiştirildiği ortamın MS + 3,0 mg/L BA içeren ortam olduğu anlaşılmıştır. Yeşil bölgenin somatik embriyo gelişiminin başlangıcı olabileceği gibi hücrelerin klorofil pigmentleri içerdiği yani fotosentezin başladığının da göstergesidir.

Sonuç olarak kişnişte kallus gelişimi başarı ile gerçekleştirilmiş ve çalışmanın amaçlarından biri olan somatik embriyogenesis veya organogenesis ile ilişkin başlangıç kallusları olan embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Bulgular kişnişte sınırlı olan doku kültürü çalışmalarına bilimsel anlamda katkı sağlayacağı gibi gelecekte kişniş üzerine yapılacak diğer gen transferi gibi biyoteknolojik çalışmalara da temel oluşturması beklenmektedir. Bunun dışında kişnişte doku kültürü veya hücre kültürü yolu ile biyoreaktörde sekonder metabolitlerin üretilmesine de katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akins P.O. ve Vasil I.K., 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 110 (2): 95-105.
- Arunyanart S. ve Chaitrayagun M., 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). *Scientia Horticulturae*, 105: 411-420.
- Babaoğlu M., Gürel E. ve Özcan S., 2001. *Bitki Biyoteknolojisi* 1. Cilt, Selçuk Üniversitesi Vakfı. 2-17.
- Can E. ve Hatipoğlu R., 2000. Besi ortamı, oksin çeşidi ve konsantrasyonunun sarı sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* L. (Keng)) bitkisinin genç salkımlarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi. *Turkish Journal Agricultural and Forestry*, 24 (2000): 221-230.
- Finer J.J., 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose-containing medium. *Plant Cell Reports*, 6: 372-374.
- Gamborg O.L., Miller R.A. ve Ojima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- George E.F. ve Sherrington P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture. *Eastern Press*, England. 25: 475.
- Hedge I.C. ve Lamond J.M., 1972. *Coriandrum* L. in Flora of Turkey. In: Davis P.H., Chemberlain D.F. ve Matthews V.A., Eds. *Edinburgh Univesity Press*, Edinburgh. 4: 330-331.
- Hegi G., 1926. Illustrierte flora von mitteleuropa. *J.F. Lehmanns*, München. 1071-1074.
- Ghaffar I., Ali B. ve Hasnain S., 2007. Effect of different hormonal combinations on regeneration of callus of *Gomphrena globosa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (20): 3708-3712.
- Hirai G., Kasai N. ve Takashi H., 1997. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48 (3): 175-180.
- Ho W.J. ve Vasil I.K., 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118 (3): 169-180.
- Kackar A., Bhat S.R., Chandel K.P.S. ve Malik S.K., 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32 (3): 289-292.

- Karami O., 2008. Induction of embryogenic callus and plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Online Journal of Biological Sciences*, 8 (4): 68-72.
- Kataeva N.V. ve Popowich E.A., 1993. Maturation and rejuvenation of *Coriandrum sativum* L. shoot clones during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34 (2): 141-148.
- Kim S.W., Park M.K. ve Liu J.R., 1996. High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 15 (10): 751-753.
- Lassányi Z.S. ve Lörinez C., 1967. Test on terpenoids present in parts of *Coriandrum sativum* L. I. Thin-layer chromatographic examination of the volatile oil of the pericarpium and seedling of the 'Lucs' variety. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 16: 95-100.
- Linsmaier E.M. ve Skoog F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 18: 100-127.
- Liu J.R. ve Cantliffe D.J., 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomea batatas* Poir.). *Plant Cell Reports*, 3 (3): 112-115.
- Losch F., 1903. Kräuterbuch unsere heilpflanzen in wort und bild. *J.F. Schreiber*, Eßlingen und München. 110-111.
- Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H. ve Hagio T., 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53: 67-74.
- Malik S.I., Rashid H. ve Yasmin T., 2004. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature seed explants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 36 (3): 629-634.
- Millam S., Mitchell S., Craig A., Paoli M., Moscheni E. ve Angelini L., 1997. *In Vitro* manipulation as a means for accelerated improvement of some new potential oil crop species. *Industrial Crops and Products*, 6 (3-4): 213-219.
- Mitra S.S.C. ve Krikorian A.D., 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports*, 7: 23-25.
- Murashige T. ve Skoog T.F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, 15: 473-479.
- Murthy H.N., Hahn E.J. ve Paek K.Y., 2008. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. *Scientia Horticulturae*, 118: 168-171.

- Nasırcılar A.G., Turgut K. ve Fıskın K., 2006. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (2): 637-645.
- Niizeki M., Tanaka M., Akada S., Hirai A. ve Saito K., 1985. Callus formation of somatic hybrid of rice and soybean and characteristics of the hybrid callus. *Japanese Journal Genetics*, 60: 81-92.
- Nitsch J.P. ve Nitsch C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85–87.
- Oridate T. ve Oosawa K., 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension callus culture in melon (*Cucumis melo* L.). *Japanese Journal of Breeding*, 36: 424-428.
- Özgen M., Türet M., Altınok S. ve Sancak C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports*, 18: 331-335.
- Pant B. ve Manandhar S., 2007. *In vitro* propagation of carrot (*Daucus carota* L.). *Scientific World*, 5 (5): 51-53.
- Rashid U., Ali S., Ali G.M., Ayub N. ve Masood M.S., 2009. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12 (3).
- Sanputawong S. ve Te-chato S., 2008. Effect of genotypes of oil palm as indicator for speed of callus and embryogenic callus formation. *Journal of Agricultural Technology*, 4 (2): 147-156.
- SAS Institute 1998. Statistical Analysis System User's Guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC.
- Schenk R.U. ve Hildebrandt A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50: 199-204.
- Shirin F., Hossain M., Kabir M.F., Roy M. ve Sarker S.R., 2007. Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (1): 1-6.
- Stamp J.A. ve Henshaw G.G., 1987. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10 (3): 227-233.
- Stefaniak B., 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of Gladiolus (*Gladiolus hort.*). *Plant Cell Reports*, 13 (7): 386-389.

- Turhan, H., 1997. Salinity studies in potato (*Solanum tuberosum* L.). Ph.D. Dissertation (Doktora Tezi). The University of Reading, UK. 252.
- Turhan H., 2005. Salinity Response of Transgenic Potato Genotypes Expressing the Oxalate Oxidase Gene. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29: 187-195.
- Turhan H., Kilic G., Turkmen O.S. ve Egesel C., 2009. The effects of some growth regulators on callus induction of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proceedings of the Second International Conference on Reserach People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences*, Lozenec, Bulgaria, 1: 196-199.
- Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y. ve Tsay H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 1-22.
- Wernicke W. ve Milkovits L., 1986. The regeneration potential of wheat shoot meristems in the presence and absence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, 131 (2): 131-141.
- Zee Y., 1981. Studies on adventive embryo formation in the petiole explants of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Protoplasma*, 107 (1-2): 21-26.

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 3.1. MS besi ortamı bileşenleri ve miktarları.....	9
Çizelge 3.2. Kallus oluşumu denemesi için kullanılan besi ortamları.....	10
Çizelge 3.3. Embriyogenik kallus denemesi için kullanılan besi ortamları.....	12
Çizelge 4.1. Kışnişte kallus ağırlığına ait varyans analiz sonuçları.....	15
Çizelge 4.2. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte kallus ağırlığına etkisi.....	16
Çizelge 4.3. Kışnişte kallus tipine ait varyans analiz sonuçları.....	17
Çizelge 4.4. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte kallus tipine etkisi.....	18
Çizelge 4.5. Kışnişte kallus rengine ait varyans analiz sonuçları.....	18
Çizelge 4.6. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte kallus rengine etkisi.....	19
Çizelge 4.7. Kışnişte kallus oluşumu denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları.....	20
Çizelge 4.8. Kışnişte kallus boyutuna ait varyans analiz tablosu.....	22
Çizelge 4.9. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte embriyogenik kallus denemesinde kallus boyutuna etkisi.....	23
Çizelge 4.10. Kışnişte kallus skoruna ait varyans analiz tablosu.....	25
Çizelge 4.11. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte embriyogenik kallus denemesinde kallus skoruna etkisi.....	26
Çizelge 4.12. Kışnişte kallus rengine ait varyans analiz tablosu.....	27
Çizelge 4.13. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte embriyogenik kallus denemesinde kallus rengine etkisi.....	29
Çizelge 4.14. Kışnişte yeşil bölgeye ait varyans analiz tablosu.....	30
Çizelge 4.15. Farklı büyüme düzenleyicilerinin kışnişte embriyogenik kallus denemesinde yeşil bölgeye etkisi.....	32
Çizelge 4.16. Somatik embriyogenesis denemesinde ölçülen karakterler arasındaki korelasyon katsayıları.....	34

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Kışniş ve bitkisel özellikleri.....	2
Şekil 3.1. Denemenin aşamalarından görünümlemler.....	14
Şekil 4.1. Kışnişte farklı büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu etkileri.....	21
Şekil 4.2. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden kallus boyutuna ilişkin bazı fotoğraflar.....	24
Şekil 4.3. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden kallus skoruna ilişkin bazı fotoğraflar.....	27
Şekil 4.4. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden kallus rengine ilişkin bazı fotoğraflar.....	30
Şekil 4.5. Kışnişte embriyogenik kallus denemesinden yeşil bölgeye ilişkin bazı fotoğraflar.....	33
Şekil 4.6. Kışniş kalluslarında yeşil bölgelerin yakından görünümü.....	34

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Gökhan KILIÇ

Doğum Yeri: Fatih / İstanbul

Doğum Tarihi: 26.01.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D. (2003-2007)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tarla Bitkileri A.B.D. (2008-2011)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (İleri)

BİLİMSEL FAALİYETLER

a) Yayınlar - SCI - Diğer

b) Bildiriler - Uluslar Arası – Ulusal

Turhan H., Kilic G., Turkmen O.S. and Egesel C., 2009. The effects of some growth regulators on callus induction of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proceedings of the Second International Conference on Reserach People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences*, Lozenec, Bulgaria, 1: 196-199.

c) Katıldığı Projeler

Kişnişte (*Coriandrum sativum* L.) doku kültürü çalışmaları, BAP Proje No: 2009/125

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

İLETİŞİM

E-posta Adresi: gokhankilic@hotmail.com