

***In Vitro* Koşullarda Yerfıstık (*Arachis hypogaea*) Bitkisinde**

**Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları**

**Hülya ÖZKAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Genel Biyoloji Programı**

**Doç. Dr. Muhammad AASIM**

**Ocak-2016**

**T.C.  
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

***In Vitro* KOŞULLARDA YERFİSTİK (*Arachis Hypogaea* ) BİTKİSİNDE  
SÜRGÜN REJENERASYON ÇALIŞMALARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hülya ÖZKAN**

**Anabilim Dalı : Biyoloji**

**Programı : Genel Biyoloji**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Muhammad AASIM**

**KARAMAN - 2016**

## TEZ ONAYI

Hülya ÖZKAN tarafından hazırlanan “*In Vitro* Koşullarda Yer Fıstık (*Arachis hypogaea*) Bitkisinde Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Muhammad AASIM

Juri Üyeleri

İmza

**Prof. Dr. Khalid Mahmood KHWAR**

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi  
Tarla Bitkileri Bölümü

**Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ**

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyoteknoloji Bölümü

**Doç. Dr. Muhammad AASIM**

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyoteknoloji Bölümü

Tez Savunma Tarihi: 29.01.2016

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

Doç. Dr. Ahmet İpek  
**Enstitü Müdürü**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Hülya ÖZKAN**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*In Vitro* KOŞULLARDA YERFISTIĞI (*Arachis Hypogaea*) BİTKİSİNDE

SÜRGÜN REJENERASYON ÇALIŞMALARI

Hülya ÖZKAN

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimler Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muhammad AASIM

Ocak, 2016, 44 sayfa

Yerfıstığı (*Arachis hypogaea*) yüksek ekonomik potansiyele sahip baklagiller familyasından yazlık tek yıllık bir bitkidir. Bu tez çalışma kapsamında Ege Tarımsal Enstitüsünün yüksek verim ve potansiyele sahip yerfıstığı bitkisinin NC-7 hattına ait farklı eksplantları BAP hormon ile 15 gün boyunca ön muamele edilmiş olup MS ortamında beyaz LED ışık altında kültüre alınmıştır. Tohumların sterilizasyon için %100 çamaşır suyu (% 5NaOCl) 40 dk süre olarak uygulanmıştır. Ön muamele görmüş veya görmemiş tam embriyo, plumula, embriyonik eksen ve plumula+embriyonik eksen eksplantları 0,25-3,0 mg/L BAP içeren MS ortamına kültüre alınmıştır. Denemede ön muamele görmüş veya görmemiş tüm eksplantlarda %100 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Ancak, ön muamele görmüş eksplantlardan ön muamele görmemiş eksplantlara göre daha fazla sürgün oluşumu görülmüştür. Eksplant başına en fazla sürgün ön muamele görmüş plumula eksplantlarından 1,0 mg/L BAP ortamda gözlemlenmiştir. Eksplantlar kıyaslandığında tüm BAP bulunan ortamlar da en fazla sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu plumula eksplantından elde edilmiştir. Ancak, ortamda BAP oranının artışı ile tüm eksplantlardan elde edilen sürgünlerde azlama görülmüştür. Elde edilen sürgünler daha sonra 0,25-3,0 mg/L IBA'nın bulunduğu ortamlarda köklendirilmiştir. Köklendirilmiş bitkiler daha sonra tıfır içeren saksılara aktarılmış olup, başarıyla adaptasyon sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Embriyo, Embriyonik Eksen, Yerfıstığı, Plumula, Rejenerasyon,

## **ABSTRACT**

**Ms Thesis**

***In Vitro* SHOOT REGENERATION STUDY OF PEANUT (*Arachis hypogaea*)**

**Hülya ÖZKAN**

**Karamanoğlu Mehmetbey University**

**Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**Department of Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Muhammad AASIM**

**January, 2016, 44 pages**

Peanut (*Arachis hypogaea*) family leguminosae is an economically important annual crop. The present study was designed to develop reliable and repeatable regeneration protocol for promising peanut line Nc-7 of Aegean Agricultural Research Institute Izmir. With or Preconditioning with BAP on MS medium under white LED lighting system. Seed sterilization was done by using %100 commercial bleach (% 5 NaOCl) for 40 min. Preconditioned or nonconditioned full embryo, plumular apices, embryonic axis or plumular apices+embryonic axis explants were postconditioned on MS medium containing 0,25-3,0 mg/ L BAP. 100% callus induction and shoot regeneration was recorded on all explants irrespective of Preconditioning or nonpreconditioning. However, Improved shoot regeneration from all preconditioned explants was noted compared to regeneration nonconditioned explants. Maximum number of shoots per explants was recorded on preconditioned plumule explants. postconditioned on MS medium with 1.0 mg/L BAP. Comparing explants, maximum number of shoots per explants and shoot length were recorded on preconditioned plumule explants. However, increased BAP concentration in the medium resulted in decreased shoot length on all explants. Regenerated shoots were rooted on MS medium containing 0.25-3.0 mg/L IBA. Rooted plantlets were transferred to pots containing peat moss followed by successful acclimatisation field conditions.

**Key words:** Embryo, Embryonic axis, Peanut, Plumule, Regeneration,

## ÖN SÖZ

Yüksek lisansa başladığım andan tez bitim aşaması ve sonrasında her koşulda her koşulda benden yardımlarını, bilgilerini esirgemeyen ve çalışmalarımı bilinçli bir şekilde devam ettirmem için yönlendiren, bilimsel çalışmaların nasıl yürütüldüğünü öğrenmem için elinden gelenin fazlasını vermeye çalışan danışman hocam sayın Doç. Dr. Muhammad AASIM 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu süre zarfında benden manevi ve mali desteklerini eksik etmeyen her an yanımda olan anneme, babama teşekkürü bir borç bilirim.

Labratuvar ortamında, çalışmalarımda yanımda bulunan çalışma arkadaşlarıma ve manevi desteğini esirgemeyen Yunus SARIBAŞ, Merve KAYABAŞI" na ayrı ayrı teşekkür ederim.

**Hülya Özkan**

**Aralık, 2015**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Yerfıstığı'nın Yapısı.....	2
<b>2. KURUMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	3
2.1. Yerfıstığı Bitkisinde Doku kültür Çalışmaları.....	4
2.2. <i>In Vitro</i> Koşullarında LED Işıkların Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	6
2.3. <i>In Vitro</i> Koşullarda Ön Muamelenin Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	8
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Bitki Materyali .....	11
3.1.2. Deneme Yeri .....	11
3.1.3. Rejenerasyon için Kullanılan Eksplantlar.....	12
3.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Hazırlanması ve Muhafazası.....	12
3.2. Yöntem .....	12
3.2.1. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları.....	12
3.2.2. Yüze Sterilizasyonu.....	14
3.2.3. Eksplant İzolasyonu.....	14
3.2.4. Rejener Olan Eksplantların Köklendirilmesi.....	14
3.2.5. İstatiksel Değerlendirme.....	14
<b>4. BULGULAR</b> .....	16
4.1. Yerfıstığı Bitkisinin Tohumların Ticari Çamaşır Suyu ile Sterilizasyon Çalışmaları.....	16
4.2. Yerfıstığı Bitkisinde Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları.....	18
4.2.1. Farklı BAP Ortamda 25 Mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Plumula Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması.....	18
4.2.2. Farklı BAP Ortamda 25 Mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Tam Embriyo Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması.....	20



4.2.3. Farklı BAP Ortamda 25 Mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Embriyonik Eksen Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması.....	22
4.2.4. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Plumula Embriyonik Eksen Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması.....	24
4.2.5. Farklı BAP Ortamda 50 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Plumula Embriyonik Eksen eksplantından sürgün Rejenerasyon Çalışması .....	26
4.2.6. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş ve Görmemiş Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyon Çalışması.....	28
4.3. Köklendirme.....	31
4.4. Bitkilerin Dış Koşullara Adaptasyonu.....	32
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....</b>	<b>33</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>44</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1:</b>	Kullanılan büyüme düzenleyici ve antibiyotik çözücüleri, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları.....	13
<b>Çizelge 3.2:</b>	Murashige ve Skoog ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları .....	13
<b>Çizelge 4.1:</b>	<i>Arachis hypogaea</i> bitkisinde çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonun bulaşık oranı ve çimlenme oranlarına ait varyans analizi.....	16
<b>Çizelge 4.2:</b>	Yerfıstığı bitkisinin ticari çamaşır suyu ile yapılan tohumların yüzey sterilizasyonu.....	17
<b>Çizelge 4.3:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	18
<b>Çizelge 4.4:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	19
<b>Çizelge 4.5:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş tam embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	20
<b>Çizelge 4.6:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş tam embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	21
<b>Çizelge 4.7:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	23
<b>Çizelge 4.8:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	23

<b>Çizelge 4.9:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	25
<b>Çizelge 4.10:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	26
<b>Çizelge 4.11:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 50 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	27
<b>Çizelge 4.12:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 50 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	28
<b>Çizelge 4.13:</b>	Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi.....	29
<b>Çizelge 4.14:</b>	25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	29

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekiller</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 3. 1:</b> <i>In vitro</i> koşullarda sürgün rejenerasyon için kullanılan eksplantların izolasyonu.....	15
<b>Şekil 4.1:</b> <i>Arachis hypogaea</i> bitkisinin farklı oranlardaki sterilizasyon ile meydana gelen bulaşık ve çimlenmesi.....	17
<b>Şekil 4. 2:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	19
<b>Şekil 4. 3:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş tam embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu .....	21
<b>Şekil 4. 4:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonu .....	22
<b>Şekil 4. 5:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonu .....	25
<b>Şekil 4. 6:</b> 50 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonu .....	27
<b>Şekil 4.7:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş tam embriyo eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	30
<b>Şekil 4. 8:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş plumula eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	30
<b>Şekil 4. 9:</b> 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş embriyonik eksen eksplantlarından sürgün rejenerasyonu.....	30
<b>Şekil4.10:</b> <i>In vitro</i> koşullarda çoğaltılmış <i>Arachis hypogaea</i> bitkisinin dış koşullarda adaptasyonu.....	32
<b>Şekil 4.11:</b> <i>In vitro</i> koşullarda çoğaltılmış <i>Arachis hypogaea</i> (L.) bitkisinin kök oluşumu.....	32
<b>Şekil 4.12:</b> <i>In vitro</i> koşullarda çoğaltılmış <i>Arachis hypogaea</i> (L.) bitkisinin saksılarda adaptasyonu.....	33

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

°C

BAP

HCl

IBA

NaOH

NaOCl

MS

TDZ

2iP

KIN

LED

PAR

### Açıklama

Derece santrigrat

6BenzilAminoPürin /benziladenine

Hidroklorik Asit

İndol 3 bütirik asit

Sodyum Hipoklorit

Sodyum Hidroksit

Murashige ve Skoog Besi Ortamı

Thidiazuron

İzopentil adenin

Kinetin

Light Emitting Diodes(ışık veren diotları)

Photosyntheteic active radiation

(fatosentetik aktif radyasyon)

### Simgeler

µM

Cm

Dk

dSu

G

L

Mg

ml

### Açıklama

Mikromol

Santimetre

Dakika

Distile su

Gram

Litre

Miligram

Mililitre

## 1. GİRİŞ

Tarım ürününden elde edilecek gelirin artırılması, farklı mamüller haline getirilebilmesi ve bu işlemler zincirinde kullanılan teknoloji payının büyütülmesi ile olasıdır. Yerfıstığı (*Arachis hypogaea*) mamul olarak çeşitlendirilebilecek, ekonomik potansiyele sahip baklagiller familyasına ait yazlık tek yıllık bitkidir (Kaçmaz, 2006).

Meyvelerini toprak altında meydana getirmesiyle diğer bitkilerden farklılık gösterir. Dünya ve Türkiye’de yetişen yerfıstıkları Virginia, Espanyol ve Valencia olmak üzere başlıca üç grupta toplanmaktadır. Ülkemizde daha çok Virginia tipi, yarı yatık formlu yerfıstıkları ağırlık kazanmaktadır (Akova, 2000).

Yer fıstığının pek çok kullanım yeri olmakla birlikte genellikle insan gıdası, hayvan yemi ve sanayinin çeşitli alanlarında kullanılır. Bileşimin de ortalama % 25 protein, %46 yağ, % 16 karbonhidrat ve % 5 mineral madde bulunur. Meyveleri fosforca zengin aminoasitlerden olan “cystine” içermektedir. Ayrıca, zengin bir B vitamini kaynağı olup az miktarda A, C, D ve E vitaminlerini bünyesinde toplamaktadır (Woodrof, 1973). Yer fıstığı yağı içinde % 46,8 oleic asit, %33,4 linoleic asit ve %10 palmitik asit ve diğer yağ asitler olarak tearik asit, arakidik asit, arakidonik asit, behenik asit, lignokerik asit de bulunmaktadır (Venkatachalam ve Kavipriya, 2012).

Yemelik olarak katı ve sıvı halde kullanıldığı gibi balık konserveçiliğinde, bisküvi, pasta, şekerleme ve sabun yapımında da kullanılır. Yerfıstığının küspesi, çok değerli bir yem maddesidir. Ayrıca, yerfıstığı yeşil aksamı da hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir. Yerfıstığı meyvelerinden tohumun çıkarılmasıyla geriye kalan kabukta, % 6 - 7 ham protein, % 1 - 2 yağ, % 60 - 67 ham lif, % 35 - 45 selüloz, % 27 - 33 lignin ve % 2 - 4 kül bulunmaktadır. Bu nedenle yer fıstığı kabukları; sunta yapımında, yem dolgu maddesi olarak, mantar yetiştiriciliğinde, yakacak olarak, odun yapımında, yapay kömür yapımında, sığır yetiştiriciliğinde, kümes hayvancılığında altlık, kaba yem olarak ve malç olarak değerlendirilmektedir (Woodrof, 1973). Ayrıca, yerfıstığı dünyada yeşil gübre, örtü bitkisi (Balkcom ve ark., 2007) ve kuru ot (Hill, 2002) olarak da kullanılmaktadır.

## 1.1. Yerfıstığıının Yapısı

Bitki, 90-120 cm derine, 60-100 cm yanlara yayılan kazık kök sistemine sahiptir. Bir baklagil olduğundan köklerinde *Rhizobium* bakterilerini taşıyan ve *nodozite* olarak isimlendirilen yumrucuklarını taşır. Ana sap, yaprak ve yaprak koltuklarından çıkan çiçekleri taşır. Bitki, 30-60 cm boylanır. Bitkinin genç devresinde sapın kesiti köşeli ve içi boştur. Olgunlaşma devresinde sap silindirik bir yapı gösterir. Yer fıstığı gövdesi, sap ve dalların durumuna göre 3 form altında gelişme gösterir. Yan dallar ana eksen etrafında bir daire şeklinde yayılır. Sap, dal, yaprak ve çiçekler toprak yüzeyine çok yakın veya toprak yüzeyine sürünücü bir yapı gösterir. Yatık ve dik formlar arasında bir geçiş formudur. Ülkemizde genelde bu formlar yetiştirilir. Sap ve buna bağlı yan dallar dikine büyüme gösterir ve yaprakları bileşiktir. Yaprakçık sayısı 4 'tür ve yaprakçıklar kısa bir sapla yaprak eksenine karşılıklı olarak bağlanmıştır. Yaprakçıklarda fototropizm vardır. Gündüz açık olan yaprakçıklar gece karşılıklı kapanırlar. Çiçek açıp yumurta döllendikten 10 - 12 gün sonra yumurtalığın altındaki meristem doku çoğalmaya başlar ve yumurtalığı çevreleyen doku ile birleşerek ginefor adı verilen bir uzantı oluşturur. Bu organ geotropik olup, yumurtalığın havadan toprak içerisine girmesini sağlar (İşler, 2015).

Işık fotosentez mekanizması nedeniyle bitkilerin gelişimi için çok önemlidir. Dalga halinde hareket eden ve foton taneciği adı verilen birimden oluşmuş enerji paketçikleridir. Işığın dalga boyu değıştikçe rengi de değışir. Örneğin uzun dalga boyları kırmızı ışığı oluştururken, kısa dalga boylu ışınlar mor ötesi ışınları oluşturur. Bitkiler, çeşitli dalga boyundaki ışığa karşı insanlardan farklı bir duyarlılığa sahiptir. İnsan gözü tarafından görülebilen ışığın sadece bir kısmı, yani 400 ile 700 nm arasında dalga boyuna sahip olan ışıklar bitkilerin büyümesine (fotosentez) yardımcı olur. Buna PAR alanı denir. (PAR = Fotosentetik Aktif Radyasyon). Gün ışığının küresel radyasyonu yaklaşık % 45'i 400 ile 700 nm arasındadır. Yani, küresel radyasyonun yaklaşık % 45'i PAR' dur. Bir ışık kaynağının bitkilerin büyümesinde etkili olması için, mümkün olan en fazla elektrik enerjisinin PAR'a dönüştürülmesi gerekir. LED yapay ışık kaynaklarından en son bulunandır. P ve N tipi yarı iletken katmanlar (Led çipi), yansıtıcı yüzey ve iletken alanlar bir LED'in yapısını oluşturur. LED'in hangi renkte ışık yayması isteniyorsa galyum, arsenit, alüminyum, fosfat,

indiyum, nitrit gibi kimyasallardan belirli ölçülerde yarı iletken malzemeye ilave edilir (TÜBİTAK, 2013).

Işıklandırmada verim maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresiyle ( $T_H$ ) ilişkilidir. LED ışıklarda kesikli ışık olmasına rağmen tübüler floresan lambalara göre maksimum ışık yoğunluğunda kalış süresi daha yüksektir (Jao, 2004). Bu nedenle LED'in bitki büyüme ve gelişmesi için olumlu sonuçlar oluşturacağı düşünülerek *in vitro* çalışmalarda LED ışık kullanımı artmaktadır. (Li ve ark., 2010). Ayrıca bitki büyüme ve gelişmesinde ışığın önemi incelenerek; özellikle farklı renklerde LED ışık kombinasyonlarının pamuk bitkisinde bitki büyümesi ve sürgün gelişimi üzerinde olumlu sonuçlar oluşturabileceği tespit edilmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında henüz çok yeni olan LED ışık kullanımının *in vitro* kültürü zor olan bir çok bitki ve çeşit için de temel oluşturacağı düşünülmektedir. Yerfıstığı bitkisinde çok fazla sayıda doku kültürü çalışmaları bulunmasına rağmen yüksek miktarda fenolik bileşikleri varlığından rejenerasyon yüzdesi çok düşüktür. Bazı araştırmacı eksplant tipi ve yaş, bitki büyüme düzenleyicileriyle kültür şartları (ışık, sıcaklık, makro/mikro mineralleri vb.) gibi faktörlerin de rejenerasyonuna farklı etki yaptığını vurgulanmaktadır. Bu tez kapsamında ülkemizde yaygın olarak üretilen yüksek verim potansiyeline sahip NC 7 hattından güvenilir ve tekrarlanabilir rejenerasyon protokolun geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

## **2. KURUMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI**

Bitki doku kültürü ile bitkilerin hücre, doku, organlarından kozmetik, farmasötik veya tarımsal açıdan önemli sekonder metabolitler üretilebilmektedir. Bu amaçla üretimin daha verimli, daha ucuz ve ürünün daha çok miktarda olması çok önemlidir. Moleküler biyolojik araştırmalarla ürün verimini artırma, bir materyalden birden çok ürün alma veya genetiği değiştirilmiş bitkilerden yeni ürünlerin kazanılması gibi metotlar geliştirilir. Bu metotlara göre güncellenen doku kültürü teknikleriyle üretilen doğal ham maddeler kullanılarak da yan etkisi olmayan “güvenli” ilaçlar elde edilebilir.



## 2. 1. Yerfıstığı Bitkisinde Doku kültürü alışmaları

Biyotik ve abiyotik streslere, kuraklık toleransı, tohum kalitesi ve fizyolojik adaptasyon açısından yerfıstığı çeşitlerin geliştirilmesi ıslahçılar için çok önem taşımaktadır (Venkatachalam ve Kavipriya, 2012). Yapılan alışmlara göre yerfıstığı tohum ve fide (Vajranabhaiah ve ark., 1993; Venkatachalam ve ark., 1994), olgun kotiledon (Mckentley ve ark., 1990), olgunlaşmamış kotiledon (Eapen and George 1993; Baker ve ark. 1994), olgunlaşmamış embriyonik aksil (Hazra ve ark., 1989; Ozias-Akins, 1989; Rani ve Padmaja, 2005), yaprakçık (Baker and Wetzstein, 1992), hipokotil (Venkatachalam ve ark., 1998) ve epikotil (Little ve ark., 2000). eksplantlardan başırıyla sürgün rejenerasyon elde edilmiştir. Ancak, karmaşık rejenerasyon protokoller ve düşük rejenerasyon olduğu için yeni protokollerin geliştirilmesi yerfıstığı ıslah program için çok önemlidir. Aşağıda bu konu ile ilgili önemli çalışmaları sıralanmıştır. Akasaka ve ark., (2000), tarafından yapılan bu çalışmada Espanyol tipi yerfıstığı (*Arachishypogaea L.*) bitkisinden sürgün rejenerasyon için yaprak eksplantları B5 vitaminler ile zenginleştirilmiş MS, %0,8 agar ile katılaştırılmış ortamda 1 mg/L NAA benziladenin (BA), izopenteniladenin (2iP), kinetin (KIN) klorpiridilfenilre (4PU), tidiazuron (TDZ) ve zeatin (ZTN) gibi çeşitli sitokininleri farklı konsantrasyonlar da kullanılarak tomurcuk oluşumu gerçekleşmiştir. Hormonlar kıyaslandığında TDZ diğer hormonlara göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Fakat TDZ ortamında uzun süre bekletildiğinde tomurcuklarda anormallik grlmştir. Sürgün tomurcuklarından sürgün oluşumu %34,7 kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünler 1 mg/L NAA içeren ortamda kklendirilip, adaptasyon sağlanmıştır.

Vasanth ve ark., (2006), yapılan bu çalışmada yerfıstığı bitkisinin kotiledon ve embriyonik eksen eksplant üzerinde farklı amino grup asitlerin (glutamin, serin, prolin etkileri glisin, valin) ve katkı maddelerinin (PVP, sodyum nitrat, aktif karbon) sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Eksplant başına en fazla 36,2 sürgün 1,5 mM BAP, 1,0 mM, NAA, 15 mM L-glutamin ile 25 mM PVP kullanılarak elde edilmiştir. Rejenere olan sürgünler 1 mM BA ve 0,5 mM GA3 içeren uzama ortamına aktarılmıştır daha sonra 1 mM NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Böylece % 97,5 bitkilerin başarı ile adaptasyonu sağlanmıştır.

Matand ve prakash (2007), yapılan bu çalışmada TDZ hormonun oranı ve uygulama süresinin yarfıstığı bitkisinin farklı eksplantlar üzerinde sürgün rejenerasyonuna etkisi araştırılmışlardır. 30 mg/L TDZ kullanıldığında eksplant başına ortalama 13 adet sürgün elde edilmiştir. Fakat 10 gün TDZ muamelesi sürgün oluşumu için yeterli bulunmuştur. Eksplantlar kıyaslandığında en fazla sürgün sayısı (15) hipokotil eksplantından elde edilirken, 7,4 sürgün ile lamina eksplantından elde edilmiştir.

Tiwari ve Tuli (2009), yarfıstığı bitkisinin olgunlaşmamış yaprakçık eksplantları kullanmışlardır. Eksplantlar bir hafta boyunca 13,32 mM BAP+4,95 mM NAA içeren ortamında bekletildiğinde hem büyüme hem yeşillenme gözlenmiştir. Büyümüş ve yeşillenmiş yaprakçık eksplantları 13.32 mM BAP içeren ortamında 1-2 alt kültür alındığında çoklu sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. 3 alt kültürden ortalama 6,17 sürgün elde edilmiştir. Tüm sürgünler 4,95 mM NAA içeren ortamda köklendirilmiş olup 4 ay içinde bitkicikler elde edilmiştir.

Nazir ve ark., (2011) Pakistan da yapılan bu çalışmada yarfıstığı bitkisinin yarı kotiledon eksplantlardan sürgün rejenerasyonu izlenmiştir. En iyi kombinasyonu 4 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA tespit edilmiştir. Çeşitler kıyaslandığında BARI 2000 en fazla sürgün ve köklenmesi izlenmiştir.

Aina ve ark., (2012) Tarafından yapılan çalışmada yabancı yarfıstığın 5 genotip üzerinde fotoperiyot etkisi araştırılmıştır. *In vitro* koşullarda çiçeklenmek için bitkileri iklim kabinlerde  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aydınlık ile  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklık ve  $60 \pm 5\%$  nem oranda 12, 16 ve 24 saat boyunca bekletilmiştir. Bitkiciklerin 12,16 ve 24 saat aydınlık ile çiçeklenme oranı sırasıyla %35'ten %93, %20'den %75 ve %5'ten %53 olarak değişmiştir. En fazla çiçeklenme oranı PI 26 28 42 hattından kaydedilmiştir.

Raman ve ark., (2012) yapılan bu çalışmada yarfıstığı bitkisinin yaygın olarak kullanılan Western HB-55, TAG 24 ve SB11 çeşitlerinin yaprakçık eksplantları *in vitro* rejeneasyonu için kullanılmamıştır. Çalışma sonucunda TDZ hormonundan BAP hormonuna göre daha iyi kallus oluşumu sağlanmıştır.

Venkatachalam ve Kavipriya (2012), tarafından yapılan bu çalışmada yer fıstığının kotiledon boğum eksplantından çoklu sürgün oluşum izlenmiştir. Kotiledon boğum eksplantları 7 günlük fidelerden elde edilip, farklı oranda (0,5-5,0 mg/L BAP ve KIN)

ile 0,5 mg/L NAA içerdiği (MS) ortamına kültürlenmiştir Eksplant başına en fazla (14,0) sürgün 5,0 mg/L içeren ortamından elde edilmiştir. Kök indüksiyon için sürgünler 0,5 ile 2,0 mg/L IAA, IBA ve NAA içeren ½.MS ortamına aktarılmıştır. En iyi köklendirme (% 100) NAA kullanılarak alırken en fazla (9,0 adet) kök 0,5 mg/L NAA içeren ortamdan izlenmiştir. Köklendirilmiş bitkiler ise başarıyla 2;1 oranda toprak ve kum içerdiği tarlalarda adaptasyon sağlanmıştır.

Hassan ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada yer fıstığı dikey kesilmiş yarı kotiledon eksplantlar kullanılmıştır. Elde edilen sürgünler tek veya demet halinde petri veya kavanoz içinde iki farklı ortama yerleştirilmiştir. Petride demet halinde bulunan sürgünler her iki ortamda yüksek oranda köklendirme ve adaptasyon göstermişlerdir. Petriler de alan az olduğundan dolayı mekanik basıncın etkisi sebep olarak kabullenmiştir.

Matand ve ark ., (2013) bu çalışmada in vitro koşullarda yer fıstığından direk sürgün ve kök oluşumu izlenmiştir. Bunun için tüm yarı, doğranmış ve her iki taraftan yararlanılmış kotiledon ve çimlenmiş embriyodan elde edilen kök parçası eksplant olarak ilk önce 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 gün için hormon içermeyen ortamda kültüre alınmıştır. kinetin, BAP, veya (TDZ) yalnız veya oksin ile kullandığından direkt olarak çoklu sürgün oluşumu izlenmiştir. 5-30 mg/L TDZ kulanıldığında tek yaralanmış kotiledon eksplantından en fazla sürgün oluşumu izlenmiştir. Elde edilen sürgünler hormon içermeyen ortamda köklendirilmiş, sera koşullarında büyütülmüştür.

## **2.2. In Vitro Koşullarında LED Işıklarının Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi**

Hartman ve ark., (1990) Tohumlarda ışığa tepkinin temel mekanizmasının, kimyasal olarak aktif bir pigment olan fitokrom ile ilişkili bir durum olduğu yapılan çalışmalar sonucu saptanmıştır. Bitkilerde tohum kabuğu ve embriyonun ışığa hassasiyet gösteren sensör özelliğinde oldukları, bunların uzaklaştırıldıkların da ışığın etkisinin kaybolduğu saptanmıştır. Baskın ve ark., (1979) Kuşotu (*Stellaria media*) üzerinde yürütülen çalışmalarda ise yeşil ışığa maruz bırakılan bitkilerin karanlık uygulamasına göre çimlenme düzeyinde yüksek oranda artış gözlenmiştir. Mavi ve turuncu-sarı ışığa yönelik çalışmalarda ise çimlenme oranı düşük bulunmuştur.

LED ışık kaynaklarından en çok mavi ve kırmızı ışık kullanımı ön plandadır. Özellikle mavi/kırmızı ışık reseptörleri ile fitokromlar arasındaki sinerjetik etkileşimin büyüme üzerindeki teşvik ya da inhibe edici etkisi incelemişlerdir (Yamaguchi ve ark., 2002). (Onofrio ve ark., 1998).bu çalışmada ayva bitkisinde yürüttükleri çalışmada yapraklarda somatik embriyogenesis üzerine incelemelerde bulunmuş; kırmızı LED koşullarında yaprak/somatik embriyogenesis üzerinde pozitif etkiler bulunmuşlardır.

Krizantem (*Dendranthema grandiflorum*) bitkisinde nod sayısı üzerinde hiçbir değişiklik tespit edilmezken nodlar arası uzunlukta kırmızı ışığın meydana getirdiği pozitif etkileri tespit edilmiştir. Aynı etki kök uzunluğunda da gözlenmiştir. Stoma sayısı ve büyüklüğüne ilişkin mekanizma henüz tespit edilmemiş olmasına rağmen bu çalışmada kırmızı LED'in; stoma sayısında, kompleks LED sisteminin ise; stoma büyüklüğünde artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır (Kim ve ark., 2004).

Hibrid bir zambak çeşidi olan Pesaro bitkisinde soğan yapısı ve kök büyüklüğünün incelendiği çalışmada; 1:1 Kırmızı/Mavi LED ışık kompleksinin soğan büyüklüğünde ve kök sayısında artış oluştururken; beyaz ışığın kök büyüklüğünde artış oluşturduğu saptanmıştır (Lian ve ark., 2002).

Pamuk bitkisinde yürüttükleri çalışmalarda hem kök aktivitesi hem de şeker ve nişasta içeriğinin mavi LED kullanımıyla arttığını ancak büyüme ve sürgün rejenerasyonunun 1:1 Mavi: Kırmızı LED kullanımıyla daha verimli hale geldiğini saptamıştır (Li ve ark., 2010).

Gözde (2013), çalışma kapsamında yüksek konsantrasyonlarda (2,5, 5, 10, 20 mg/L) kinetin ön muamelesi sonrasında farklı MS (MSO, ½MS, ¼MS) ortamına aktarılmıştır. Bütün denemeler farklı LED (beyaz, kırmızı, mavi) ışık kombinasyonlarının kullanılarak uygulanmıştır. Işık denemelerinde GSN-12 çeşidi için 4 kırmızı:1 mavi; STN-468 çeşidi için 3 kırmızı:1 mavi ışık kombinasyonu uygun bulunmuştur.

Dazkirli (2015), *Bacopa monnieri* (Linn) Wettst bitkisinin yan veya adventif sürgün oluşumu için tam, alt ve üst yarım yaprak eksplantı ile sürgün ucu eksplantları 0,25, 0,50 ve 1,0 mg/l BAP içeren MS ortamına kültüre alınıp, farklı kombinasyonunda kırmızı:mavi (4:1, 3:1, 2:1, 1:1) veya beyaz LED ışıklarında hızlı çoğaltım için çalışmalar yapılmıştır. Tüm BAP içeren ortamlarda ve kullanılan farklı LED ışıklarda

tüm eksplantların %100 sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Sürgün ucu eksplantından en fazla sürgün kırmızı : mavi LED ışıklarından elde edilirken en düşük ise beyaz LED altında kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu bakımında tüm eksplantlardan en uzun sürgünler kırmızı:mavi LED ışıklar altında kültüre alınmış eksplantlarında tespit edilmiştir. BAP oranların sürgün rejenerasyonu kıyaslandığında tam ve üst yaprak eksplantlarında istatistik olarak her hangi etki bulunmazken, yarım lamina tabanı ve sürgün ucu eksplantlarında en fazla sürgün sayısı 1.0 mg/L BAP içeren ortamında kaydedilmiştir. Tüm eksplantlardan en uzun sürgünler ise 0.25 mg/L BAP içeren ortamında elde edilmiştir. LED×BAP kıyaslandığında, tam ve üst yaprak eksplantlarından en fazla eksplant başına sürgün sayısı beyaz LED+0.25 mg/L BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Alt yaprak eksplantından ise en fazla sürgün beyaz LED+1.0 mg/L BAP içeren ortamında kaydedilmiştir. Tam ve üst yaprak eksplantlarından en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi+0.25 mg/L BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Ancak, alt yaprak ve sürgün ucu eksplantından en uzun sürgünler 1:1 kırmızı:mavi+0.50 mg/L BAP içeren ortamında elde edilmiştir.

Karataş ve Ark., (2015) *Bacoba monnieri* bitkisinin tam , yarı üst ve ya yarı alt yaprak eksplantları 0,25 0,50 ve 1,00 mg /L BAP içeren MS ortamında farklı kırmızı:mavi (K:M) kombinasyonları (4:1, 3:1, 2:1 ve 1:1 )ile beyaz LED ışıklar altında kültür alınmıştır. En fazla eksplant başına 26,11 adet sürgün beyaz LED ışıklarda yarı üst yaprak eksplantların da kaydedilmiştir. Buna karşı tüm eksplantlardan en uzun sürgünler 1:1 (K:M) ışıklarda alırken en kısa sürgünler beyaz LED ışıklarda kaydedilmiştir.

### **2.3. In Vitro Koşullarında Ön Muamelenin Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi**

Brar ve ark., (1999) Çalışmada 17 börülce genotipi için bitki rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Kotiledon eksplantları ilk aşamada 15-35 mg/L BAP içeren 1/3 MS ortamında 5-15 gün bekletilmiştir. Daha sonra sürgün rejenerasyonu için eksplantlar 1mg/L BAP içeren besin ortamına kültüre alınmıştır. Bir hafta içerisinde kotedonların üst kısmında sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Rejenerasyon oranı %1-11 ve eksplant başına sürgün sayısı 4-12 arasında degismistir. Rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayısı üzerinde genotip, kültür süresi ve büyüme düzenleyici miktarların etkisi önemli bulunmudur. En fazla eksplant başına sürgün 15 mg/L BAP ile 5 gün muamele

süresi ile elde edilmiştir. Buna karşın en fazla sürgün sayısı 35 mg/L BAP ile 5 gün muamele edilmiş eksplantlarından elde edilmiştir. Köklenme için bitkiler MS ortamına aktarılmıştır.

Bhatti (2001), 21 farklı mercimek çeşidinin olgunlaşmamış embriyonik eksenlerini izole edilerek ilk önce 20 mg/L NAA içeren MS ortamında 10 gün kültüre almıştır. Daha sonra eksplantlar MS ortamında alt kültüre alınmıştır. MSO ortamına aktarıldıktan bir hafta sonra bir kaç genotipin eksplantı üzerinde kallus oluşumu başlamış ve 3 hafta sonra da bu kalluslar üzerinde adventif sürgün oluşumu gözlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant oranı %3,33-3,0 eksplant başına sürgün sayısı da 1,66-2,16 arasında değişmiştir. Fakat ön muamele yapılmamış eksplantlarda 4 mg/L BAP ve 0,25 mg/L NAA içeren MS ortamında sadece Emre 20 ve Kışlık 21 çeşidinde 10'ar sürgün ile %3,33 ve 43,33 arasında sürgün oluşumu gözlenmiştir. Geri kalan 19 çeşitte hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Van Le ve ark., (2002) TDZ içeren MS ve Gamborg B5 ortamda börülcenin kotiledon boğum eksplantından sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. 10 mol/L TDZ ile ön muamele, sürgün ucu uzaklaştırılması ve dikey kesilmiş ince hücre tabakalar elde edilip 1,0 mol/L IBA ve 1,0 Umol/L TDZ içeren MSB5 ortamı sürgün rejenerasyon için uygun bulunmuştur. Eksplant başına 32,5 adet sürgün elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerde genotipik değişiklik görülmemiş ve toprağa aktarılmıştır.

Börülcenin Akkız çeşidinin plumula eksplantında çoklu sürgün rejenerasyon elde etmek amacıyla ilk önce 10 mg/L BAP ile 5 gün ön muamele yapılmıştır. Daha sonra eksplantlar 0 ve 0,1 mg/L NAA ile 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 1,25 mg/L BAP içeren MS ortama aktarılmıştır. Tüm ortamlarda kallus ve sürgün oluşumu görülmüştür. Eksplant başına en fazla 7,43 adet sürgün 1 mg/L BAP içeren MS ortamdan elde edilmiştir. BAP ile 0,1 mg/L NAA içeren MS ortamda 0,1 mg/L NAA içermeyen MS ortama göre daha uzun sürgün görülmüştür. Elde edilen sürgünler 0,50 mg/L IBA içeren MS ortamda köklendirilmiş ve seralarda dış koşullara adaptasyon sağlanmış olup 3 ay sonra çiçeklendirilmiştir(Aasim ve ark., 2009).

Raveendar ve ark., (2009) Börülcenin dört genotipinin (VBN-1, VBN-2, Co-6 and Co (CP) 7 tohumları 13,3 µM BAP ile 3 gün ön muamele edip, 6,6 µM BAP içeren MSB5 ortamında 2 ile 3 hafta bekletilmisler ve değişik oranda sürgün elde etmişlerdir.

Sürgünlerin uzaması için elde edilen eksplantlar 0,5 µM BAP içeren besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgünler MSO ortamında köklendirilmiştir. Elde edilen bitkiler 12 gün sonra dış koşullara adaptasyon sağlamıştır. En fazla sürgün sayısı *V. unguiculata* Co (CP) -7 genotipten elde edilmiştir.

Börülcenin embriyonik eksen eksplantları agar ile katılaştırılan 10 mg/L BAP içeren ortamada 5 gün için kültüre alınmıştır. Daha sonra, eksplantlar 0,25, 0,50, 0,75 and 1,00 mg/L BA ile 0 veya 0,10 mg/L NAA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. En fazla eksplant başına 10,33 adet sürgün 1,00 mg/L BA -0,1 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 0,50 mg/L IBA içeren ortamda köklendirilip, iklim odasında adaptasyon sağlanmıştır. Üç ay sonra sera ortamda çiçeklenme ve tohumlar elde edilmiştir (Aasim ve ark., 2010).

Börülcenin Akkız ve Karagöz çeşitlerinin Plumula yaprak eksplant üzerine NAA'nin ön muamele süresi ve yoğunlaşmasının sürgün rejenerasyonu etkisi araştırılmıştır. 10 ve 20 mg/L NAA ile 1 ve 3 hafta ön muamele yapılmış olgun embriyolarından elde edilen plumula yaprakları 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,0 mg/L BAP içeren ortamda kültüre alınmıştır. Her iki çeşidinde somatik embriyogenez gözlenmiştir. Akkız çeşidinde 20 mg/L NAA ile 1 hafta ön muamele yapılmış eksplantları 6 hafta sonra MSO ortamında aktarıldığında sadece iki sürgün elde edilmiştir. Buna karşı, 10 mg/L NAA ve 1 hafta ön muamele yapılmış eksplantlarda akkız ve karagöz çeşidinde sırasıyla %33,33-50,00 ve %25,00-50,00 sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. En fazla 2.50 adet eksplant başına sürgün sayısı akkız ve karagöz çeşidinde sırasıyla 0,50 mg/L ve 1,00 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler 0,50 mg/L IBA içeren ortamda köklendirildikten sonra iklim odasında adaptasyon sağlanmıştır (Aasim, 2010). Nohut'un Gökçe çeşidininin 7 günlük 10 mg/L BAP ile ön muamele yapılmış embriyo ve embriyonik eksen eksplantları 0,25, 0,50, 1,00 ve 2,00 mg/L BAP ile 0 veya 0,25 mg/L (NAA), 4,0 g/L aktif kömür ve 1,0 mg/L PVP içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Tüm eksplantlarada sürgün oluşumu kaydedilmiştir. Olgunlaşmış embriyo eksplantından en fazla 14,75 adet eksplant başına sürgün 2,0 mg/L BAP ile 0,25 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilirken, embriyonik eksen eksplantından en fazla 16,83 adet eksplant başına sürgün 2,0 mg/L BA içeren ortamdan elde edilmiştir. Ortamlarda 0,25 mg/L NAA eklendiğinde her iki eksplantlarda sürgün uzunluğunda azlama kaydedilmiştir. Elde edilen sürgünler, 1,0 mg/L IBA içeren ortamda 4 hafta kültüre alındıktan sonra

saksılara aktarılıp iklim odasında adaptasyon için bırakılmıştır (Aasim ve ark. 2011). Gözde (2013), yapılan tez çalışma kapsamında pamuk bitkisinin *In vitro* koşullarda çimlenmiş 7-10 günlük bitkiciklerden izole edilen kotiledon boğum eksplantları, yüksek konsantrasyonlarda (2,5, 5, 10, 20 mg/L) kinetin ön muamelesi sonrasında farklı MS (MSO, ½MS, ¼MS) ortamına aktarılmıştır. GSN-12 çeşidi için en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (7,75 adet) 5 mg/L Kinetin ön muamelesi sonrası ¼MS besin ortamına aktarılan eksplantlarda gözlenmiştir. STN-468 çeşidinde ise en yüksek eksplant başına sürgün sayısı (6,00 adet) 10 mg/L kinetin ön muamelesi sonrası 0,05 mg/L Kinetin içeren MS ortamına aktarılan eksplantlarda elde edilmiştir.

Barpete ve ark., (2014) Mürdümük bitkisinin embriyonik nod eksplantları ilk olarak 10 ve 20 mg/L TDZ ve ya 2 İP ortamda ön muamele yapılmıştır. Daha sonra eksplantlar 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 mg/L TDZ ve ya 2 İP ortamında kültür alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu (%100) ile eksplant başına 31,10 sürgün 1 mg/L TDZ +0.10mg/L IBA içeren ortamında kaydedilmiştir. Buna karşı 2İP+IBA içeren ortamda daha uzun sürgünler elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler başarıyla köklendirilmiş olup saksılarda %90 adaptasyon sağlanmıştır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bitki Materyali**

Çalışmada kullanılan bitki materyali yer fıstığı *Arachis hypogaea* türü ile çalışılmıştır. Çalışmada ülkemizde Türkiye'de Yetiştigi Yerler Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgesinde yetiştirilmektedir. NC -7 Çeşidi Kullanılmıştır. NC-7 çeşidine ait tohumlar Antalya Battem Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Deneme Yeri**

Bu çalışma, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında birlikte yürütülmüştür.



### **3.1.3. Rejenerasyonu için Kullanılan Eksplantlar**

Yapılan tez kapsamında yer fıstığının zigotik emriyosu, zigotik embryo+kotiledon, plumula ve embryonik eksen eksplantları kullanılmıştır.

### **3.1.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Hazırlanması ve Muhafazası**

Bitki büyüme düzenleyicileri, uygun çözücülerle çözüldükten sonra 1 mg/L oranında stok solusyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solusyonları BAP ve IBA büyüme düzenleyicilerinden otoklavda steril edilmeden, +4°C' veya -20°C sıcaklıkta saklanmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları**

Bu çalışmalarda 1.MS (Murashige ve Skoog, 1962) mineral tuz ve vitaminleri (Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Besi ortamı hazırlamak için 30 gr sukroz MS 7,5 gr agar ile katılaştırılan temel besin ortamı (MSO) hazırlanmasında distile saf su kullanılmıştır. Yapılan çalışmalara göre besin ortamlarına farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri olarak sitokinin (BAP) ve oksin (IBA,) ilave edilmiştir. Hazırlanan ortamların PH 'ı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 1,2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Kullanılan büyüme düzenleyici ve antibiyotik çözücülerini, stok konsantrasyonu ve saklama koşulları

Bitki büyüme düzenleyicileri	Çözücü	Stok Konsantrasyonu (mg/mL)	Sterilizasyon Şekli	Saklama Koşulları (°C)
<b>Oksinler</b>				
IBA	1N NaOH	1/1	Filtre	-20
NAA	1N NaOH	1/1	Otoklav	4
<b>Sitokinin</b>				
BAP	1N NaOH	1/1	Otoklav	4

**Çizelge 3.2.** Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan makro/mikro element ve vitaminler ile konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler	Konsantrasyonu (mg/L)	
<b>Makro Elementler</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
	KNO <sub>3</sub>	1900,000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000
<b>Mikro Elementler</b>	KI	0,830
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,300
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,850
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,250
<b>Vitaminler</b>	Myo-Inositol	100,000
	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamine-HCl	0,100
	Glycine	2,000

### **3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu**

*Arachis hypogaea* bitkisinde sterilizasyonu için tohumları % 25, %50, %75 yahut %100 oranında çamaşır suyu farklı süre (10 dk, 20 dk, 30 dk, 40 dk) ile muamele edilmiştir. Daha sonra 3×5 dk saf steril su ile durulama yapılmıştır. Steril edilmiş tohumlar ise steril magentalar kapları içerisinde %3 (ağırlık/hacim) sukroz ve %0,8 (ağırlık/hacim) agar içeren MS ortamlarına aktarılarak, 24±1°C'de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

### **3.2.3. Eksplant İzolasyonu**

Tez kapsamında zigotik embriyosu, zigotik embriyosu+kotiledon, plumula ve embryonik eksen eksplantları kullanılmıştır. Zigotik embriyosu+kotiledon eksplantları tohumları ikiye bölünüp kotiledon ile yapışmış embriyo eksplant (Şekil 3.1a) kullanılmıştır. Zigotik embryo ise tohumlar ikiye bölünüp, embriyonun bulunduğu kısımdan dikkatle zarar vermeden bistüri ve pens yardımıyla çıkartılmıştır (Şekil 3.b). Daha sonra, her iki eksplant 25 mg/L BAP içeren yahut hormon içermeyen MS ortamında 2 hafta boyunca ön muamele yapılmıştır. Plumula (Şekil 3.1) ve embryonik eksen (Şekil 3.1) eksplantları elde etmek için ilk olarak tam embriyo 25 mg/L BAP içeren veya hormon içermeyen MS ortamında 2 hafta boyunca bekletilmiştir. Daha sonra, aseptik koşullarda eksplantları, sürgün rejenerasyonu için farklı oranda BAP, içeren MS ortamına kültüre alınmıştır.

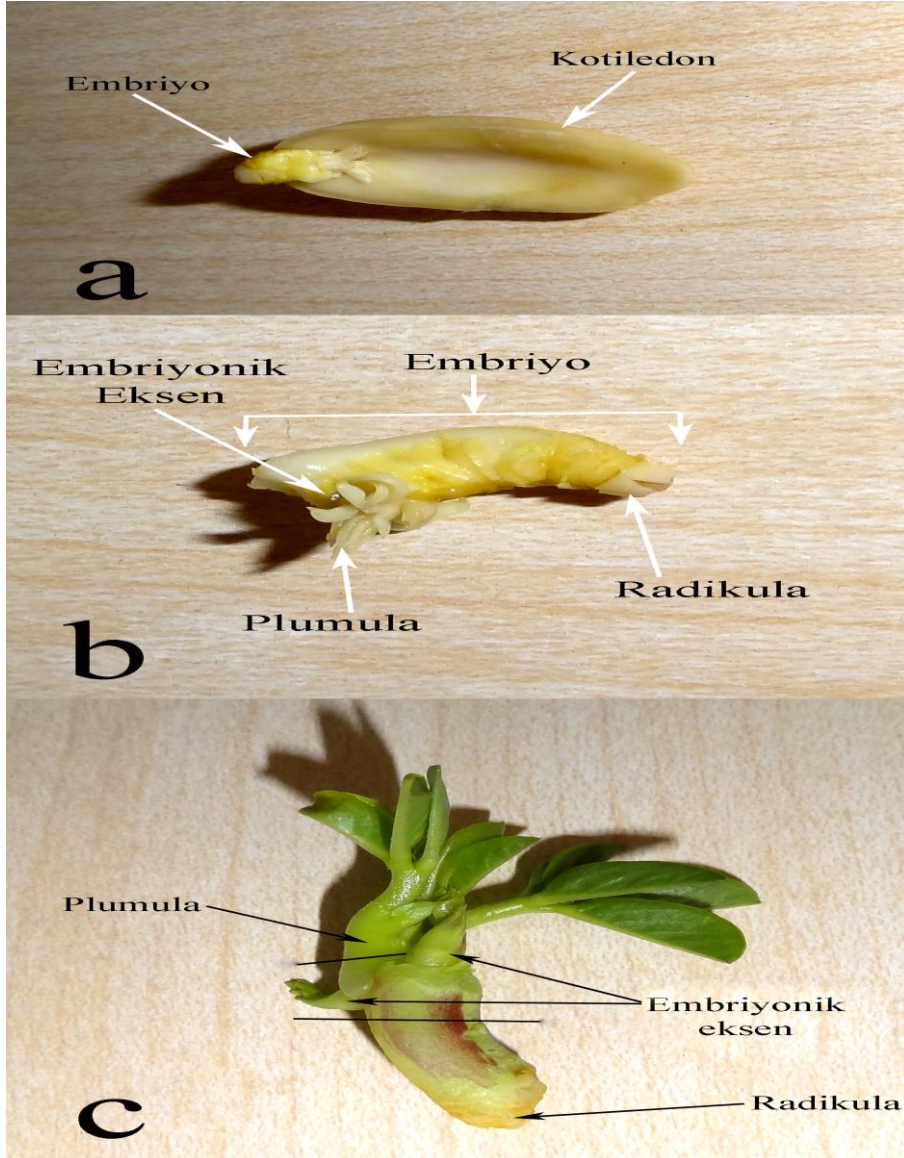
### **3.2.4. Rejenere Olan Eksplantların Köklendirilmesi**

Farklı ön muamele uygulamaları ile elde edilen çoklu sürgünler aseptik koşullarda ayrılıp, köklendirme işlemi için farklı oranda (0,25, 0,50, 1,0, 2,0 veya 3,0 mg/L) IBA kullanılarak kültüre alınmıştır. Magentalarda 1 hafta beklettikten sonra kök oluşumu yüzdesi, kök sayısı ve kök uzunluğu kıyaslanarak incelenmiştir.

### **3.2.5. İstatiksel Değerlendirme**

Denemeler, faktöriyel olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup her muamele, içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü Magenta GA7

kutuları veya petri kaplarından oluşmuştur. Elde edilen veriler “SPSS 17 for Windows” programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş muamele ortamlarını karşılaştırmak amacıyla M-STAT C bilgisayar programında Duncan testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran, 1967).



**Şekil 3.1.** *In vitro* koşullarda sürgün rejenerasyon için kullanılan eksplantların izolasyonu, (a) embriyo ile kotiledon, (b) MS ortamında ön muamele görmüş embriyo, (c) 25 mg/l BAP içeren ortamında ön muamele görmüş embriyo

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yerfıstığı Bitkisinin Tohumların Ticari Çamaşır Suyu İle Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları

Yüzey sterilizasyonu için ayıklanmış bitki tohumların sterilizasyonu için farklı oranda (%25, %50, %75 ve %100) ticari çamaşır suyunun (ACE- %5 NaOCl) kullanılmıştır. Her biri çamaşır suyu oran için 20dk 30dk ve 40 dk gibi farklı sürelerde yüzey sterilizasyon yapılmıştır. Yüzey sterilizasyondan sonra, tohumlar MS ortamında iki haftaya kadar bekletilmiştir. %25, %50 ve %75oranda çamaşır suyu kullandığında %100 çimlenme ve bulaşık (Şekil 4.1) kaydedildiği için varyans analizi yapılmamıştır. Buna karşı, %100 çamaşır suyu ile farklı süre uygulandığında çimlenme oranı (%) ait verileri istatistik analizine tabi tutulmuş olup, sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *Arachis hypogaea* bitkisinde çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonun bulaşık oranı ve çimlenme oranlarına ait varyans analizi

VK	SD	Çimlenme Oranı (%)		Bulaşık Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Süre	2	364,583	1,167*	1164,583	0,928*
Hata	9	312,500	-	1254,861	-
Genel Toplam	11	-	-	-	-

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.1.de gösterdiği gibi yapılan varyans analizi sonucunda çimlenme oranı ve bulaşık oranı 0,01 düzeyinde önemli farklılık göstermiştir. Bu farklılıkların önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan LSD test sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 İncelendiğinde çimlenme oranları %68,75 ile %87,50 olarak belirlenirken bulaşık oranı ise %0,00 - %31,25 arasında olduğu gözlenmiştir. Sonuçlara göre yüzey sterilizasyon süresi arttıkça çimlenme oranında azalma gözlemlenirken, bulaşık oranında da azalma kaydedilmiştir. Çamaşır suyu ile muamele 40 dk süre ve %100 çamaşır suyu kullandığında %68,75 çimlenme ve hiç bulaşık gözlemlenmemiştir. Denemede en fazla çimlenme oranı (%87,50) ve en fazla bulaşık oranı (%31,25) 20 dk süre ile yüzey sterilizasyon yapılan tohumlarda tespit edilmişti. Elde edilen sonuçlara

göre, %100 çamaşır suyu ve 40 dk süre yüzey sterilizasyon için en uygun muamale olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Yerfıstığı bitkisinin ticari çamaşır suyu ile yapılan tohumların yüzey sterilizasyonu

Süre(dk)	Çimlenme Oranı (%)	Bulaşık Oranı (%)
20	87,50 <sup>a</sup>	31,25 <sup>a</sup>
30	81,25 <sup>a</sup>	27,5 <sup>a</sup>
40	68,75 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.1.** *Arachis hypogaea* bitkisinin farklı oranlardaki sterilizasyon ile meydana gelen ve bakteriyel bulaşık ile çimlenmesi

## 4.2. Yerfıstığı Bitkisinde Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları

### 4.2.1. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Plumula Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması

Yerfıstığının NC-7 çeşidi ile yapılan *in vitro* sürgün rejenerasyon çalışmalarında tohumlar ilk olarak 25 mg/L BAP içeren MS ortamında iki hafta boyunca ön muamelesi yapılmıştır. İki hafta içinde tohumlar hem büyümüş hem de embriyodaki organlar (embriyo ve embriyonik eksen ) iyice farklılaşmıştır. Ön muamele görmüş embriyolardan *in vitro* koşullarda muamele edilmiş plumula eksplantları izole edilip 0,25, 0,50, 1,00 2,00 ve 3,00 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan iki hafta sonra tüm eksplantlarında hem kallus oluşumu hem de sürgün rejenerasyonu görülmeye başlamıştır. Dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu gözlenmiştir. BAP içeren ortamda 13 hafta beklettikten sonra sonuçlar kaydedilmiştir. Denemede tüm eksplantlar üzerinde kallus oluşumu (%100) ve sürgün oluşumu (%100) gözlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ile ilgili verileri varyans analizine tabi tutulmuş olup, çizelge 4.3’de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

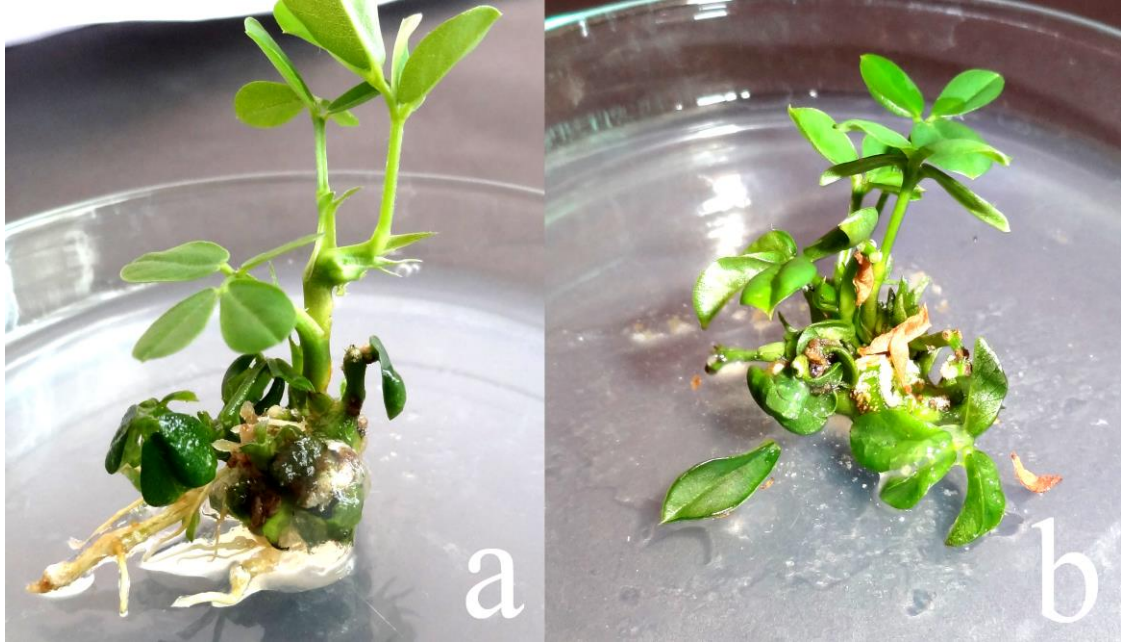
VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	1,906	8,378**	2,149	24,100**
Hata	10	0,228	-	0,089	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-

\*\* $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.3 görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu



farklılıkların önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4’de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonu

**Çizelge 4.4.** Farklı BAP dozlarının yerfistığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/L)	Kallus oluşum oranı (%)	Sürgün Rejenerasyon oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)**	Sürgün Uzunluğu (cm)**
0,25	100.00	100.00	3,55 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>
0,50	100.00	100.00	4,11 <sup>a</sup>	3,05 <sup>b</sup>
1,00	100.00	100.00	2,44 <sup>b</sup>	2,24 <sup>c</sup>
2,00	100.00	100.00	2,50 <sup>b</sup>	2,58 <sup>bc</sup>
3,00	100.00	100.00	2,33 <sup>b</sup>	1,45 <sup>d</sup>

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında Duncan sonuçlarına göre  $p<0,01$  düzeyinde önemli farklılıgıgörülmüştür.

Çizelge 4.4’de incelenen çalışmada tüm ortamlarda %100 kallus ve sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Farklı oranda, BAP hormonun eksplant başına sürgün sayısına ve uzunluğuna göze çarpan şekilde etkilendiğini izlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 2,33 - 4,11 adet arasında kaydedilmiştir. En fazla eksplant başına 4,11 adet



sürgün 0,50 mg/L BAP içerdiği ortamından elde edilmiştir. BAP oranının artış ile eksplant başına sürgün sayısında azalma kaydedilirken en az 2,33 adet sürgün 3,0 mg/L BAP içeren ortamında görülmüştür. Benzer şekilde BAP oranının artış ile sürgün uzunluğunda da olumsuz etki gözlemlenmiştir.

En uzun sürgünler( 3,70cm) 0,25 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilirken en kısa sürgün (1,45 cm) , 3 mg/L BAP kullandığında not edilmiştir.

#### 4.2.2. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Tam Embriyo Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması

Yer fıstığının NC-7 hattı ile yapılan in vitro sürgün rejenerasyon çalışmalarında tohumların ilk olarak 25 mg/L BAP içeren MS ortamında 2 hafta boyunca ön muamelesi yapılmıştır. Daha sonra 2 hafta boyunca eksplant üzerinde gelişen sürgün ve embriyoların (embriyo ve embriyonik eksen) oluşumu ve farklılaşmaları izlenmiştir. *In vitro* ortamında gelişen ve büyüyen embriyoların ön muamelesinden sonra farklılaşan embriyonun tam kısmı steril ortamda izole edilerek 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ve 3,00 mg/L BAP içeren MS besin içeren ortamlarında kültüre alınmıştır. 2 hafta sonra kültüre alınan embriyolarda hem kallus hem ve sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. BAP içeren kültür ortamında 3 hafta bekletildikten sonra eksplantlar da tekli ve çoklu sürgün oluşumu gözlenmiş ve 9 hafta sonra sonuçlar not edilerek deneme kapatılmıştır. Tüm eksplantlar üzerinde ( %100,00 ) gözlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ile ilgili verileri varyans analizine tabi tutulmuş olup çizelge 4. 5’de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	3,011	11.433**	1.503	12.031**
Hata	10	0,263	-	0.125	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.5 görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan test sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.



**Şekil 4.3.** 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu, (a, b) dört ve (c) sekiz hafta sonra çoklu sürgün oluşumu

**Çizelge 4.6.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş tam embriyo eksplantından sürgün rejenerasyonu etkisine ait Duncan testi sonuçları

<b>BAP (mg/L)</b>	<b>Kallus oluşum oranı (%)<sup>ös</sup></b>	<b>Sürgün Rejenerasyonu (%)<sup>ös</sup></b>	<b>Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)**</b>	<b>Sürgün Uzunluğu (cm)**</b>
0,25	100	100	2.87 <sup>b</sup>	2.25 <sup>bc</sup>
0,50	100	100	4.43 <sup>a</sup>	3.62 <sup>a</sup>
1,00	100	100	4.67 <sup>a</sup>	2.45 <sup>b</sup>
2,00	100	100	2.67 <sup>b</sup>	2.12 <sup>bc</sup>
3,00	100	100	2.67 <sup>b</sup>	1.75 <sup>c</sup>

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

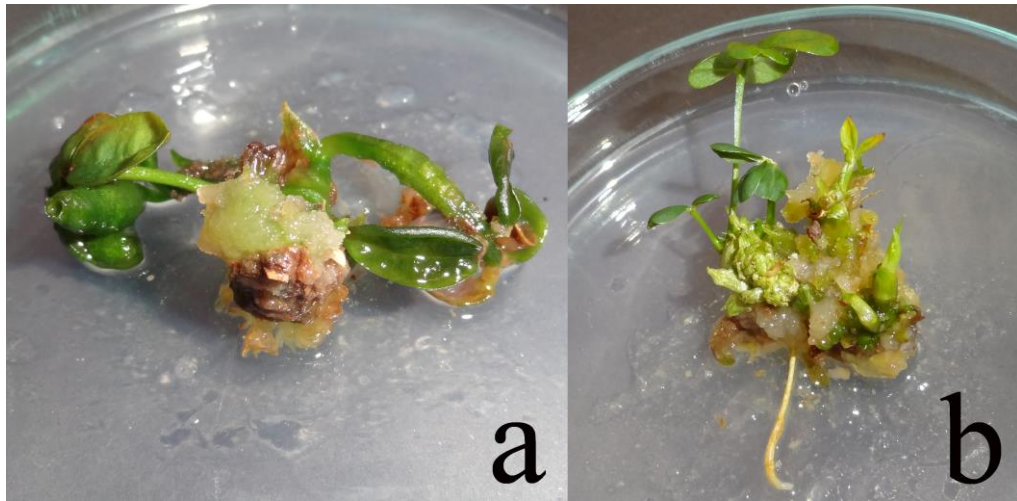
<sup>ös</sup>Aynı sütunda ös işaretle gösterilen ortamlar arasında fark yoktur.

Çizelge 4.6 görüldüğü gibi kallus rejenerasyonu oranı ve sürgün rejenerasyonu oranı %100 olarak not edilmiştir. Denemede BAP hormonunun eksplant başına sürgün sayısını ve sürgün uzunluğunu etkilediği belirlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 2,67- 4,67 adet olarak belirlenirken, eksplant başına en fazla sürgün sayısı (4,67) 1,00 mg/L BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Elde edilen çalışma sonuçlarına göre BAP miktarı 0,25 ile 1.00 mg/L arasında artıça sürgün sayısı 2,87-4,67 adet ile

değişmiştir. Ancak, denemede kullanılan BAP hormonu 1.00 mg/L'den fazla olunca sürgün sayısında olumsuz şekilde azalma belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan BAP hormonunun artırılması sürgün uzunluğuna olumsuz yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Sürgün uzunluğu 1,75-3,62 cm olarak belirlenirken, en uzun sürgün 0,50 mg/L BAP içeren ortamında 3,62 cm olduğu kaydedilmiştir. 3,00 mg/L BAP içeren ortamında ise en kısa 1.75 cm sürgünler izlenmiştir.

#### 4.2.3. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Embriyonik Eksen Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması

Yerfıstığının NC-7 hattı ile yapılan in vitro sürgün rejenerasyon çalışmalarında tohumlar ilk olarak 25 mg/L BAP içeren MS ortamında iki hafta boyunca ön muamele edilmiştir. İki hafta içinde tohumlar hem büyümüş hem de (embriyo ve embriyonik eksen ) üzerinde göze çarpan farklılaşma gözlemlenmiştir. Ön muamele görmüş embriyolardan in vitro koşullarda plumula eksplantları izole edilip 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ve 3,00 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarına kültüre alınmıştır. Kültüre alınmış eksplantlarında iki hafta sonra tüm eksplantlarda hem kallus oluşumu hem de sürgün rejenerasyonu görülmeye başlamıştır. Dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu da gözlenmiştir.



**Şekil 4.4.** 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonu, (a) dört hafta sonra, (b) sekiz hafta sonra çoklu sürgün oluşumu

BAP içeren ortamında 13 hafta beklettikten sonra veriler not ederek varyans analizi yapılmıştır. Denemede tüm eksplantlar üzerinde kallus oluşumu (100,00%) ve sürgün

oluşumu (100,00%) gözleendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizine tabi tutulmuş olup, çizelge 4. 7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Farklı BAP dozlarının yerfistüğü bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
BAP	4	1.271	4.825**	0.098	2.576*
Hata	10	0.263	-	0.038	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

\*  $p < 0,05$  düzeyinde önemli

**Çizelge 4.8.** Farklı BAP dozlarının yerfistüğü bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

BAP (mg/L)	Kallus oluşum oranı (%) <sup>ös</sup>	Sürgün Rejenerasyonu (%) <sup>ös</sup>	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) <sup>**</sup>	Sürgün Uzunluğu (cm) <sup>**</sup>
0,25	100.00	100.00	1.87 <sup>b</sup>	2.60 <sup>a</sup>
0,50	100.00	100.00	2.43 <sup>ab</sup>	2.10 <sup>b</sup>
1,00	100.00	100.00	3.33 <sup>a</sup>	2.40 <sup>ab</sup>
2,00	100.00	100.00	3.33 <sup>a</sup>	2.46 <sup>ab</sup>
3,00	100.00	100.00	2.33 <sup>ab</sup>	2.35 <sup>ab</sup>

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p < 0,01$  düzeyinde önemlidir.

\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir.

Çizelgede 4.8’de yapılan çalışmada embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonu ve kallus rejenerasyonu %100 olduğunu tespit edilmiştir. Buna karşı,

eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunu farklı şekilde BAP hormonunun etkisinde kaldığı izlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 1,87-3,33 adet arasında kaydedilmiştir. Eksplant başına en fazla 3,33 adet sürgün 1,00 ve 2,00 mg/L BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Buna karşı en düşük 1,87 adet 0,25 mg/L BAP içeren MS ortamlarında elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu 2,10 - 2,60 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 2,60 cm olarak 0,25 mg/L BAP içeren ortamdan en kısa sürgün 2,10 cm olarak 0,50 mg/L BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir.

#### **4.2.4. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Plumula Embriyonik Eksen Eksplantından Sürgün Rejenerasyon Çalışması**

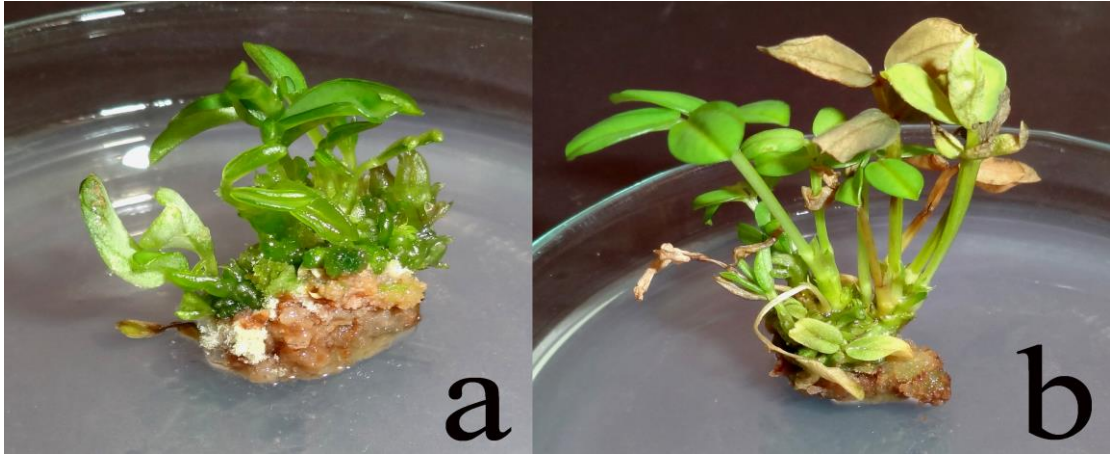
Yerfistiğinin NC-7 çeşidi ile yapılan in vitro sürgün rejenerasyon çalışmalarında tohumların ilk olarak 25 mg/l BAP içeren MS ortamında 2 hafta boyunca ön muamelesi yapılmıştır. Bu ön muamelede 2 hafta boyu bitkide sürgün ve embriyoların (embriyo ve embriyonik eksen)oluştugu ve farklılaşmaların olduğu gözlenmiştir. in vitro ortamında gelişen ve büyüyen embriyoların ön muamelesinden sonra farklılaşan embriyonun plumula +eksen kısmı steril ortamda izole edilerek 0.25 0.50 1.00 2.00 ve 3.00 mg/BAP içeren MS besin içeren ortamlarında kültüre alınmıştır.2 hafta sonra kültüre alınan embriyolarda hem kallus hem de sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. BAP içeren kültür ortamında 3 hafta bekletildikten sonra eksplantlar da tekli ve çoklu sürgün oluşumu gözlenmiş ve 9 hafta daha sonra verileri alınmış olup, deneme bitirilmiştir. Tüm eksplantlar üzerinde (%100,00) kallus ve sürgün oluşum gözlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait verileri varyans analizine tabi tutulmuş olup çizelge 4'9 da verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Farklı BAP dozlarının yerfistği bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen + plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Sürgün rejenerasyon yüzdesi (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
BAP	3	133,333	4,000**	1.692**	3.316**	1.358	30,596**
Hata	8	33,33	-	0.510	-	0.044	-
Genel Toplam	11	-	-	-	-	-	-

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkları önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları çizelge 4.10’da verilmiştir.



**Şekil 4.5.** 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) dört ve (b) sekiz hafta sonra çoklu sürgün oluşumu

**Çizelge 4.10.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin embriyonik eksen+plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

<b>BAP (mg/L)</b>	<b>Kallus oluşum oranı (%)<sup>ös</sup></b>	<b>Sürgün Rejenerasyonu (%)<sup>ös</sup></b>	<b>Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) **</b>	<b>Sürgün Uzunluğu (cm) **</b>
0.25	100.00	100 <sup>a</sup>	4.47 <sup>a</sup>	2.57 <sup>a</sup>
0.50	100.00	100 <sup>a</sup>	4.07 <sup>ab</sup>	1.40b <sup>c</sup>
1.00	100.00	100 <sup>a</sup>	3.87 <sup>ab</sup>	1.44 <sup>b</sup>
2.00	100.00	86,67 <sup>b</sup>	2.72 <sup>b</sup>	1.01 <sup>c</sup>

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

<sup>ös</sup>aynı sütunda ös işaretle gösterilen ortamlar arasında fark yoktur.

Çizelge 4.10 de gösterdiği bu çalışmada bütün ortamlarda %100 kallus rejenerasyonu gözlemlenmemiştir. Sürgün rejenerasyonu tüm BAP oranlarda %100 olarak kaydedilirken, 2,0 mg/L BAP hormonu içeren ortamda sürgün rejenerasyonu 86,67 olarak not edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı 2,72-4,47 adet arasında değişmiştir. En fazla eksplant başına 4,47 adet sürgün 0,25 mg/L BAP içerdiği ortamından elde edilmiştir. Bundan sonra ortamda BAP oranının artışı ile eksplant başına sürgün sayısında azalma kaydedilirken en az 2,72 adet sürgün 2,0 mg/L BAP içeren ortamından elde edilmiştir. Benzer şekilde, BAP oranının artış ile sürgün uzunluğunda da olumsuz etkileri gözlemlenmiştir. En uzun (2,57 cm) sürgünler 0,25 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilirken en kısa sürgün (1,01 cm ) 2,0 mg/L BAP kullandığında kaydedilmiştir.

#### **4.2.5. Farklı BAP Ortamda 50 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş Plumula Embriyonik Eksen Eksplantından sürgün Rejenerasyon Çalışması**

Yerfıstığının NC- hattı ile yapılan in vitro sürgün rejenerasyon çalışmalarında tohumlar ilk olarak 50 mg/L BAP içeren MS ortamında iki hafta boyunca ön muamele yapılmıştır. İki hafta içinde tohumlar hem büyümüş hem de embriyodaki organlar (embriyo ve embriyonik eksen ) farklılaşmıştır. Ön muamele görmüş embriyolardan in vitro koşullarda eksen+plumula eksplantları izole edilip 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 ve 3,00 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarına kültüre alınmıştır. İki hafta sonra tüm eksplantlar da hem kallus oluşumu hem de sürgün rejenerasyonu görülmüştür. Dört hafta sonra çoklu sürgün oluşumu da gözlenmiştir. BAP içeren ortamında 13 hafta



beklettikten sonra veriler kaydedilmiştir. Denemede tüm eksplantlar üzerinde kallus oluşumu (%100) ve sürgün oluşumu (%100) gözlemlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ile ilgili verilerin varyans analizi yapılmıştır ve çizelge 4.11 'de verilmiştir.

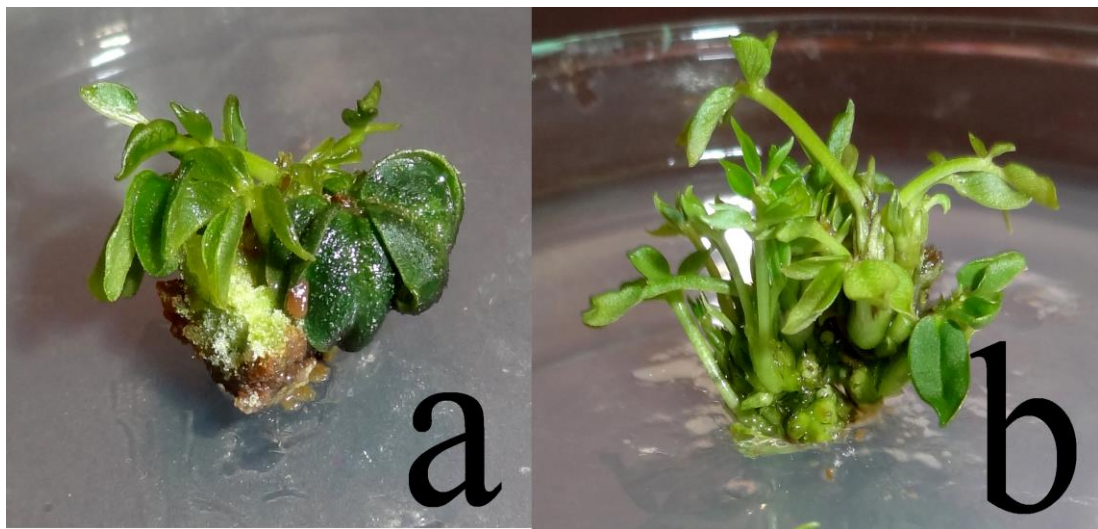
Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlemlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan test sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir.

**Çizelge 4.11.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 50 mg/l BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen + plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi sonuçları

VK	SD	Kallus Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
BAP	3	416,667	8,000**	1.388	0.193 <sup>ös</sup>	0.176	2.949**
Hata	8	52,083	-	7.186	-	0.060	-
Genel Toplam	11	-	-	-	-	-	-

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

<sup>ös</sup> önemsiz



**Şekil 4.6.** 50 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen eksplantından sürgün rejenerasyonu ,(a) dört hafta sonra ,(b) sekiz hafta sonra çoklu sürgün oluşumu



**Çizelge 4.12.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 50 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş embriyonik eksen + plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna etkisi

<b>BAP (mg/L)</b>	<b>Kallus oluşum oranı (%)</b>	<b>Sürgün Rejenerasyonu (%)</b>	<b>Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)**</b>	<b>Sürgün Uzunluğu (cm)**</b>
0.25	100 <sup>a</sup>	100,00	4.76	1.89 <sup>a</sup>
0.50	100 <sup>a</sup>	100,00	5.06	1.55 <sup>ab</sup>
1.00	75,0 <sup>b</sup>	100,00	5.13	1.56 <sup>ab</sup>
2.00	100 <sup>a</sup>	100,00	3.66	1.30 <sup>b</sup>

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

<sup>as</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark yoktur.

Çizelge (4. 12) görüldüğü gibi kallus rejenerasyonu 75,0-100,00 arasında kaydedilirken, sadece 2,0 mg/L BAP hormonu içeren MS ortamında kallus rejenerasyonu 75,0 olarak elde edilmiştir. Denemede tüm eksplantlarda Sürgün rejenerasyon gözlemlendiği için %100 olarak kaydedilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı ise 3,66-506 adet olarak belirlenirken, eksplant başına en fazla sürgün sayısı (5,06) 0,50 mg/L BAP içeren MS ortamında elde edilmiştir. Buna karşı, en az eksplant başına sürgün (3,66 adet) 2,0 mg/L BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan BAP hormonunun artırılması ile sürgün uzunluğuna olumsuz yönde etkilediği gözlemlendiği görülmüştür. Sürgün uzunluğu 1,89-1,30 cm olarak belirlenmişken en uzun sürgün 0,25 mg/L BAP içeren ortamında 1,89 cm olduğu kaydedilmiştir. 2,00 mg/L BAP içeren ortamında ise en kısa sürgünler ( 1.30 cm) izlenmiştir.

#### **4.2.6. Farklı BAP Ortamda 25 mg/L BAP ile Ön Muamele Görmüş ve Görmemiş Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyon Çalışması**

Bu çalışmada yerfıstığının NC-7 hattın embriyolar hem 25 mg/L BAP içeren hem MS ortamında iki hafta boyunca ön muamele yapılmıştır. İki hafta içinde tohumlarda büyüme ve embriyodaki organların (embriyo ve embriyonik eksen) farklılaşması görülmüştür. Ön muamele görmüş veya görmemiş tam embriyoları ve embriyolardan elde edilen plumula embriyonik eksen eksplantları in vitro koşullarda izole edilip 1 mg/L BAP içeren veya MS içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür alındıktan iki hafta sonra ön muamele görmüş tüm eksplantlarda hem kallus oluşumu

hem de sürgün rejenerasyonu görülmeye başlamıştır. Buna karşı, ön muamele görmemiş eksplantlarda iki hafta sonra sürgün oluşumu ve dört hafta sonra kallus oluşumu kaydedilmiştir. BAP ve MS içeren ortamda 12 hafta beklettikten sonra (Şekil 4,7a,b,c; 4,8a,b; 4,9a,b) sonuçlar kaydedilmiştir. Denemede tüm eksplantlar ve ortamlarda 100,00% kallus oluşumu ve sürgün oluşumu gözlemlendiği için varyans analizi yapılmamıştır. Ancak, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait verilerin varyans analizine yapılmıştır(çizelge 4.13 ) verilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Farklı BAP dozlarının yerfıstığı bitkisinin 25 mg/L BAP ile ön muamele edilmiş plumula eksplantından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

VK	SD	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Eksplant	5	169,772	12,309**	5,745	20,477**
Hata	12	13,793	-	0,281	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-

\*\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında fark  $p<0,01$  düzeyinde önemlidir.

Yapılan varyans analizi sonucunda Çizelge 4.14 'de görüldüğü gibi eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,01 düzeyinde önemli farklılık gözlenmiştir. Bu farklılıkların önem düzeyi belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge. 4.14 'te verilmiştir.

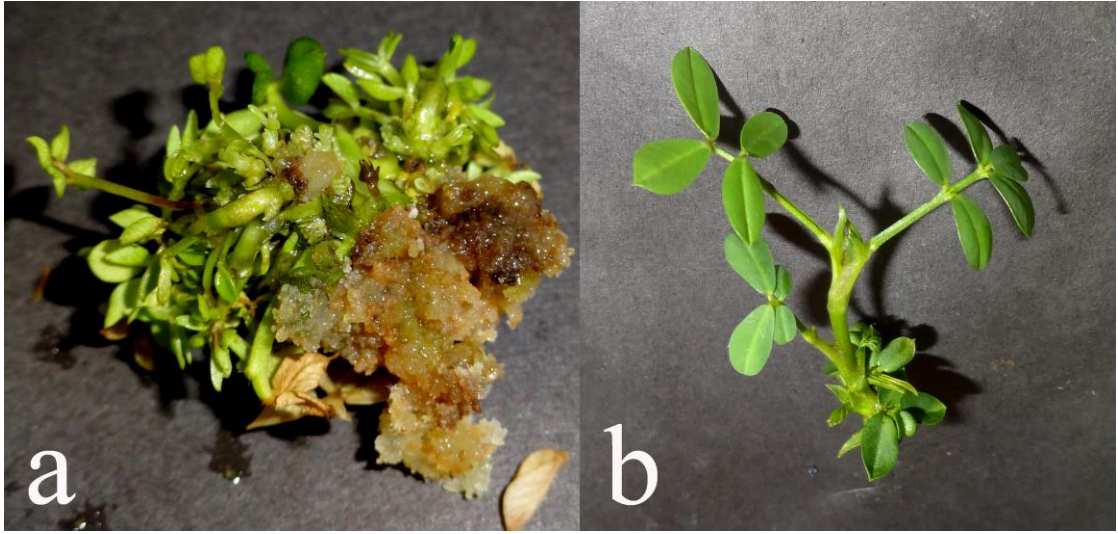
**Çizelge 4.14.** 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna etkisi

EKSPLANT	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
	25 MG/L	MS	25 MG/L	MS
Tam embriyo	16,92 <sup>b</sup>	7,80 <sup>c</sup>	1,30 <sup>b</sup>	4,23 <sup>a</sup>
Plumula	25,80 <sup>a</sup>	1,67 <sup>c</sup>	0,73 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>
Embriyonik Eksen	16,37 <sup>b</sup>	15,15 <sup>b</sup>	1,20 <sup>b</sup>	0,93 <sup>b</sup>

\*\*  $p<0,01$  düzeyinde önemli



**Şekil 4.7.** 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş tam embriyo eksplantlarından sürgün rejenerasyonu



**Şekil 4.8.** 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş plumula eksplantlarından sürgün rejenerasyonu



**Şekil 4.9.** 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş ve görmemiş embriyonik eksen eksplantlarından sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.14 de gösterdiği gibi denemede ön muamele görmüş veya görmemiş tüm eksplantlardan %100,00 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir. Sonuçlara göre ön muamele görmüş plumula (Şekil 4,7a,b,c) ve tam embriyo (Şekil 4,8a,b) eksplantından ön muamele görmemiş eksplantlar göre daha fazla sürgün elde edilmiştir. Ön muamele görmüş tam embriyo eksplantından ön muamele görmemiş eksplantlar göre iki kat fazla sürgün elde edilmiştir. 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş tam embriyo eksplantından 16,92 adet sürgün elde edilirken ön muamele görmemiş eksplantından 7,80 adet sürgün elde edilmiştir. Benzer şekilde, ön muamele görmüş Plumula eksplantından ön muamele görmemiş eksplantından 15 kat fazla sürgün kaydedilmiştir. 25 mg/L BAP ile ön muamele görmüş plumula eksplantından 25,80 adet sürgün kaydedilirken ön muamele görmemiş eksplantından 1,67 adet sürgün kaydedilmiştir. Buna karşı, ön muamele görmüş veya görmemiş embriyonik eksen eksplantları arasında istatistik olarak farkı bulunmamıştır (Şekil 4,9a,b). Eksplant başına sürgün sayısı ise ön muamele görmüş embriyonik eksen ve ön muamele görmemiş embriyonik eksen eksplant için sırasıyla 16,37 ve 15,15 olarak kaydedilmiştir. Sürgün uzunluğu incelendiğinde ön muamele görmüş veya görmemiş plumula ve embriyonik eksen eksplantların arasında istatistik olarak fark bulunmazken, tam embriyo eksplant için fark bulunmuştur. Sonuçlara göre en uzun (4,23 cm) sürgün ön muamele görmemiş embriyo eksplantından elde edilmiştir. Diğer tüm ön muamele görmüş veya görmemiş eksplantlarda sürgün uzunluğunda istatistik olarak farklılığı bulunmamıştır.

### **4.3. Köklendirme**

Tez kapsamında farklı eksplantlardan elde edilen sürgünlerin dış koşullarda adaptasyon sağlamak amacıyla 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 veya 3,0 mg/L IBA içeren MS ortamlara kültüre alınmıştır. İki hafta sonra sürgünlerin üzerinde beyazlaşma ve daha sonra kök oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.10). IBA içeren ortamda 6 hafta sonra tüm bitkilerde çoklu adventif kök oluşumu (Şekil 4.11) gözlemlenmiştir. Bitkicikleri adaptasyon için torf toprak içeren saksılara şaşırtılmıştır.





Şekil 4.10. *In vitro* koşullarda çoğaltılmış *Arachis hypogaea* (L.) bitkisinin kök oluşumun başlangıcı



Şekil 4.11. *In vitro* koşullarda çoğaltılmış *Arachis hypogaea* (L.) bitkisinin adventif kök oluşumu

#### 4.4. Bitkilerin Dış Koşullara Adaptasyonu

Köklendirilmiş bitkilerin köklerine zarar vermemek amacıyla bitkiciklerinden agar için çeşme suyu ile durulanmıştır. Bitkiler daha sonra ilk olarak çeşme suyu içinde 10-15 dk bekletilmiştir. Saksılarda homojenez nem tutmak için toprak olarak kullanılan torf su ile beraber karıştırılıp, saksılara doldurulmuştur. Bitkiler torfa aktarıldıktan sonra bitkilerin

nem dengesini koruyabilmesi çok önem taşımaktadır ve saksılar şeffaf poşet ile kapatılıp, iklim odasında  $23\pm 1$  °C’te bırakılmıştır. Bir hafta sonra poşetlere delik açılıp, iki hafta sonra poşetler tamamen uzaklaştırılmıştır ve herhangi olumsuz etki görmeden sağlıklı şekilde adaptasyonu sağlamıştır (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** *In vitro* koşullarda çoğaltılmış *Arachis hypogaea* (L.) bitkisinin saksılarda adaptasyonu

## 5. TARTIŞMA

Yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) ekonomik olarak yüksek potansiyele sahip baklagiller familyasından yazlık tek yıllık bir bitkidir. Dünyada yetişen yerfıstıkları Virginia, Espanyol ve Valencia tipi olmak üzere başlıca üç grupta toplanıp, Ülkemizde Virginia çeşitli, yarı yatık formlu yerfıstıkları ağırlık kazanmaktadır. Bu tez çalışmada yerfıstığı bitkisinin NC-7 hatların farklı eksplantları ilk olarak BAP hormon ile ön muamele yaptıktan sonra düşük oranda BAP içeren ortamında kültüre alınmıştır. Tez kapsamında tüm çalışmalar beyaz LED ışık altında gerçekleştirilmiştir. LED ışık ile *in vitro* koşullarda

zor olan bitkilerin rejenerasyonu, çimlenme ve metabolit üzerinde son yıllarda çok sayıda çalışmaları izlenmektedir (Karataş ve ark. 2015).

*In vitro* koşullarda bitkilerin rejenerasyonu için genel olarak sitokin hormonlar tek başına yahut oksin ile beraber çok düşük miktarda oksin ile beraber kullanılmaktadır. Ancak, rejenerasyonuna çok inatçı bitkiler için bu uygulamaları yetersiz kalmaktadır. Özellikle baklagil bitkilerde rejenerasyon için son yıllarda farklı eksplantlar ilk olarak yüksek miktarda sitokin ile muamele edilip, düşük oranda sitokin veya sitokin-oksini içeren ortamda daha avantajlı şekilde kullanılmaktadır. Daha önce Börülce bitkisinin kotiledon eksplantları (Brar ve ark.,1999), tohumlar (Raveendar ve ark., 2009), plumula (Aasim ve ark., 2009) ve embriyonik eksen eksplantları (Aasim ve ark., 2010), Nohut bitkisinin tam embryo ve embriyonik eksen (Aasim ve ark., 2011) ve plumula eksplantları (Aasim ve ark., 2013) ile mercimek bitkisinin plumula eksplantında (Aasim ve ark., 2012) farklı oranda BAP ile yapılan ön muamele sonucunda başarı ile sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Bunun dışında Börülce bitkisinin kotiledon boğum eksplantları TDZ ile (Van Le ve ark., 2002) ve mürdümük bitkisinin kotiledon boğum eksplantları de TDZ veya 2iP ile ön muamele ile daha fazla sürgün elde edildiği rapor edilmiştir (Barpete ve ark. 2014).

Yerfıstığı bitkisinde çok fazla sayıda doku kültürü çalışmaları bulunmasına rağmen rejenerasyon yüzdesi çok düşüktür. (Hazra ve ark., 1989; Ozias-Akins, 1989; Mckentley ve ark., 1990; Baker ve Wetzstein, 1992; Eapen ve George 1993; Vajranabhaiah ve ark., 1993; Baker ve ark., 1994; Venkatachalam ve ark., 1994; Venkatachalam ve ark., 1998; Little ve ark., 2000; Rani ve Padmaja, 2005). Ancak, karmaşık rejenerasyon protokoller ve düşük rejenerasyon olduğu için yeni protokollerin geliştirilmesi yerfıstığı ıslah program için çok önemlidir.

Tez Kapsamında yapılan sterilizasyon çalışmada %25, %50, %75 ve %100 oranlarında çamaşır suyu 20dk 30dk ve 40dk süre ile uygulanmıştır. Bulaşık ve çimlenme oranlarına bakıldığında en fazla bulaşıksız çimlenmesi (%67,5) %100 çamaşır suyu ve 40 dk muamele ile elde edilmiştir. Benzer şekilde *Trigonella* (Aasim ve ark., 2009, 2010), tüylü (Aasim ve ark., 2011), mercimek (Aasim, 2012), ve nohut (Aasim ve ark., 2013), bitkilerinde tohum sterilizasyonu için %100 çamaşır suyu başarıyla kullanılmıştır. Ancak, çimlenme oranında farklılık bulunmuştur. *Trigonella* (Aasim ve ark., 2009,

2010) ve fesleğen (Ekmekçi, 2013) bitkilerinde %100 çamaşır suyu ile muamele sonucunda MS ortamında %100 çimlenme kaydedilmiştir. Bu çalışmada düşük çimlenme oranının sebebi ise tohumların kabuğunun daha ince olması ve çamaşır suyunun embriyolarına zarar verdiğinden kaynaklandığını düşünülmektedir.

Tez kapsamında *in vitro* koşullarda ön muamele edilmiş embriyoları ve embriyodan izole edilen plumula, embriyonik eksen ve plumula+embriyonik eksen olmak üzere dört farklı eksplantlar kullanılmıştır. Yerfıstığı bitkisinin farklı eksplantları tohum ve fide (Vajranabhaiah ve ark., 1993; Venkatachalam ve ark., 1994), olgun kotiledon (Mckentley ve ark., 1990), olgunlaşmamış kotiledon (Eapen ve George 1993; Baker ve ark., 1994), olgunlaşmamış embriyonik eksen (Hazra ve ark., 1989; Ozias-Akins, 1989; Rani ve Padmaja, 2005), yaprakçık (Baker ve Wetzstein, 1992), hipokotil (Venkatachalam ve ark., 1998), ve epikotil (Little ve ark., 2000), eksplantlarından başarıyla sürgün rejenerasyon elde edilmiştir. Tez kapsamında tüm eksplantlar 25 mg/L BAP ile ön muamele yapıldıktan sonra farklı BAP içeren ortamda kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tüm eksplantlardan çoklu sürgün oluşumu izlenmiştir. Tüm eksplantlardan hemen hemen %100 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon elde edilmiştir. Bir başka çalışmada plumula+embriyonik eksen eksplantları 25 ve 50 mg/L BAP ile ön muamele yapıldığında da %100 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon elde edilmiştir. Benzer şekilde, ön muamele görmüş veya görmemiş eksplantlar kıyaslandığında da kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonunda farklılık bulunmamıştır. Daha önce yapılmış çalışmalarında yerfıstığının *in vitro* koşullarda çok düşük oranda sürgün rejenerasyon yüzdesi elde edilmesi rapor edilmiştir (Sharma ve Anjaiah, 2000; Shan ve ark 2009; Burns ve ark., 2012; Venkatachalam ve Kavipriya, 2012). Buna karşı, bu tez kapsamında yapılan denemelerinde farklı BAP oran ile yapılan ön muamele sonucunda %100 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon sonuçları börülce (Aasim ve ark., 2009, 2010) nohut (Aasim ve ark., 2011, 2013),ve mercimek (Aasim ve ark. 2012) te yapılmış benzer çalışmalarına uyum sağlanmıştır. Benzer şekilde mürdümük bitkisinde 20 mg/L TDZ ile ön muamele sonucunda %100 sürgün rejenerasyon elde edilmiştir. (Barpete ve ark. 2014). Buna karşı, farklı sitokinin ile ön muamele sonucunda çok düşük oranda sürgün rejenerasyonu yerfıstığı (Akasaka et al. 2000; Matand ve ark., 2013) ve *Lathyrus cicera* (Sağlam, 2012da rapor edilmiştir.



Eksplant başına sürgün sayısı kıyaslandığında en fazla sürgün 25 mg/L ön muameleden sonra 1.0 mg/L BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Benzer şekilde BAP ile ön muameleden sonra eksplant başına en fazla sürgün sayısı 1.0 mg/L BAP içeren ortamda börülcenin plumula (Aasim ve ark., 2009) ve embriyonik eksen eksplantından elde edilmesi rapor edilmiştir.

Eksplantlar kıyaslandığında en fazla sürgün plumula eksplantından elde edilmiştir. Plumula eksplantı bezelye (Molnar ve ark., 1999), börülce (Aasim ve ark., 2009), mercimek (Aasim ve ark., 2012) ve nohut (Aasim ve ark., 2013) gibi bir çok bitkilerde sürgün rejenerasyon için başlarıyla ile kullanılmıştır. Ön muamele veya ön muamele görmemiş eksplantlar kıyaslandığında ön muamele daha etkili olduğu ve daha fazla sürgün verdiği ortaya çıkmıştır. Benzer sonuçlar daha önce nohut (Aasim ve ark., 2011, 2013), mercimek (Aasim ve ark., 2012) ve mürdümük (Barpete ve ark., 2014) bitkilerde rapor edilmiştir. Bunun sebebi ise ilk aşamda yüksek oranda BAP tarafından meristem bölgede hızlı ve çok sayıda hücre bölünmesi olarak kabul edilmiştir (Von Arnold ve Tillberg 1987; Brar ve ark., 1999; Madhulatha ve ark. 2004; Aasim ve ark. 2009; Sağlam, 2012; Aasim ve ark., 2013, Barpete ve ark., 2014).

Buna karşı, ön muamele sonucunda daha kısa sürgünler kaydedilmiştir. Ön muamelenin sürgün uzunluğu üzerinde olumsuz etkisi daha önce nohut (Aasim et al. 2011, 2013), mercimek (Aasim ve ark., 2012) ve mürdümük (Barpete ve ark., 2014) bitkisinde rapor edilmiştir. Ortamda BAP oranı arttıkça sürgün uzunluğuna olumsuz şekilde etkilendiği göstermiştir. Bu sonuçlar daha önce ön muamele yapılmış diğer çalışmaları benzerlik göstermektedir (Aasim ve ark., 2009, 2010, 2011, 2012, 2013; Barpete ve ark., 2014). Eksplantlar kıyaslandığında plumula eksplantından diğer eksplantlara göre en uzun sürgünler elde edilmiştir.

*In vitro* çalışmalarda rejenerasyonundan sonra en önemli aşaması köklendirilmesi ve dış koşullarda adaptasyonudur. Genel olarak, yerfıstığı bitkisinin *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi zor olduğunu rapor edilmiştir (Hassan ve ark., 2013). Tez kapsamında farklı oranda IBA köklendirme için kullanılmıştır. IBA köklendirmek için diğer Oksinlere göre daha çok etkili olduğunu bilinmektedir. Bu çalışmada ön muamele olmasına rağmen çok yüksek oranda kök oluşumu gerçekleştirilmiştir. Ön muameleden sonra börülce (Aasim ve ark., 2009, 2010) ve mürdümük (Barpete ve ark., 2014) bitkilerde kök oluşumunda sıkıntı görülmezken, nohut (Aasim ve ark., 2011) ve mercimek (Aasim ve ark., 2012) bitkilerde düşük oranda köklenme kaydedilmiştir.

Köklendirilmiş bitkilerin köklerinden ilk olarak agar köklere zarar vermeden çeşme suyu ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, börülce bitkisinde kullanılan protokol, gibi (Aasim ve ark., 2009, 2010) ,adaptasyon sağlanmıştır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde özet olarak sonuçlar ve öneriler;

1. Denemede kullanılan yerfıstığı bitkisinin yüzey sterilizasyonu için %100 çamaşır suyu (NaOCl) ile 40 dk sterilizasyon sonucunda bulaşık oranı yok iken çimlenme oranının %67 civarında bulunmuştur.
2. Denemede kullanılan zigotik embriyo, plumula ve embriyonik eksen eksplantları 25 mg/L BAP ile ön muamele yapılırken, plumula+embriyonik eksen ise hem 25 hem de 50 mg/L BAP içeren ortamda 15 gün boyunca kültüre alınmıştır.
3. Tüm eksplantlar daha sonra çoklu sürgün rejenerasyon için 0,25-3,0 mg/L BAP içeren ortamda kültüre alınmıştır.
4. Tüm eksplantlarda %100 kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu kaydedilmiştir.
5. En fazla eksplant başına sürgün sayısı 25 mg/L BAP ile 15 gün boyunca ön muamele yaptıktan sonra 1,0 mg/L BAP ortamda kültüre alındığında kaydedilmiştir.
6. Ön muameleden sonra, tüm BAP ortamda en uzun sürgünler plumula eksplantından elde edilmiştir.
7. Ortamda BAP oranı arttıkça tüm eksplantlardan elde edilen sürgün sayısında azlama görülmüştür.
8. Denemelerde IBA'nın bulunduğu ortamlarda kök oluşumu kaydedilmiştir.
9. Köklendirilmiş bitkiler ise başarıyla dış koşullarda torf içeren saksılarda adaptasyon sağlanmıştır.

Çalışma kapsamında farklı oranlarda çamaşır suyu ile sterilizasyon yapıp sürgün oluşumu ve kallus oluşumu steril ortamlarda elde edilmiş olup farklı oranlarda hormonlar kullanılarak embriyo gelişimi sağlanmıştır.

Dünyada ve ülkemizde yerfıstığı bitkilerin elde edilmesine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Çalışmalara paralel olarak ekim alanları da artmaktadır. Yerfısığı bitkisinde ıslah çalışmalarını hızlandırmak amacıyla yeni mikro çoğaltım yöntemlerin geliştirilmesi çok büyük önem arz etmektedirler. Bu nedenle Türkiye'nin gelecekte ıslah edilmiş bitkilerden maksimum fayda ile yararlanabilmesi için mikro çoğaltım yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmaları sürdürmesi gerekmektedir.

## KAYNAK

- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2009. *In Vitro* micropropagation from Plumula apex of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Cultivar Akkiz. *Scientia Horticulturae*, 122, 468-471.
- Aasim, M., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2010. Efficient *In Vitro* propagation from preconditioned embryonic axes of Turkish Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Akkiz. *Archives of Biological Sciences*, 62,1047-1052.
- Aasim, M., Day, S., Rezai, F., Hajyzadeh, M., Mahmud, S.T. ve Ozcan, S., 2011. *In Vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivar Gokce. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2020-2023.
- Aasim, M., 2012. Micropropagation of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Using Pulse Treatment of Immature Plumular Apices. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 49(2)149–154.
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F. ve Hajyzadeh, M., 2013. Multiple Shoot Regeneration of Plumular Apices of Chickpea. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 33-39.
- Akaska, Y., Daimon, H. ve Mii, M., 2000. Improved Plant Regeneration from Cultured Leaf Segments in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). By limited Exposure to Thidiazuron. *Plant Science*, 156, 169–175.
- Aina, O., Quesenberry, K. ve Gallo, M., 2011. Photoperiod Affects *in Vitro* Flowering in wild Peanut (*Arachis paraguariensis*). *American Journal of Plant Sciences*, 3, 567-571.
- Baker, C.M., Burns, J.A. ve Wetzstein, H.Y., 1994. Influence of photoperiod and medium formulation on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 13, 159-163.
- Baker, C.M. ve Wetzstein, H.Y., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Cell Reports*, 11, 71-75.
- Barpete, S., Aasim, M., Khawar, K.M. ve Özcan, S., 2014. Preconditioning Effect of Cytokinins on *In Vitro* Multiplication of Embryonic Node of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.).Cultivar Gürbüz. *Turkish Journal of Biology*. 38, 485-492.

- Balkcom, K.S., C.W., Wood, J.F., Adams. ve Meso, B., 2007. Suitability of Peanut Residue as a Nitrogen Source for Arye Cover. *Crop Science agric*,64, 181-186.
- Brar, M.S., Al-Khayri, J.M., Morelock, T.E. ve Anderson, E.J., 1999. Genotypic Response of Cowpea *Vigna Unguiculata* (L.) to *In Vitro* Regeneration From Cotyledon Explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 35, 8-12.
- Bhatti, K.M.K., 2001. Mercimek (*Lens culinaris Medik*)' te Doku Kültürü Çalışmaları ve *Agrobacterium Tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Doktora Tezi (Basılmamış), Ankara Üniversitesi, 147, Ankara.
- Baskın J.M. ve Baskın, C.C., 1979. Promotion of germination of *stellaria media* seeds by Light From a Green Safe lamp. *The New Phytologist*, Vol 83,381-383.
- Dazkırılı ,M., 2015. Farklı Led ışıklarda *Bacopa Monnieri* Bitkisinin *In Vitro* Koşullarda Çoğaltımı. *Biyoloji Anabilim Dalı*, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Eapen, S. ve George, L., 1993. Somatic embryogenesis in peanut: influence of growth regulators and sugars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 35, 151-156.
- Hassan, M.U., Akram, Z., Ajmal, S., Mukhtar,T., Nasım, S., Shabbir, N. ve Zafar, Y., 2013. Highly efficient *In Vitro* root induction in peanut by mechanical stress method. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(2), 425-429.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. ve Geneve, R.L., 1997. Plant propagation, principles of propagation by Seed. 6th ed. Prentice Hall, *Englewood Cliffs, N.J.*
- Hazra, S., Sathaye, S.S. ve Mascarenhas, A.F., 1989. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogea*). *Nature Biotechnology*. 7, 949-951.
- Hill G.M., 2002. Peanut by-products fed to cattle. *Vet. Clin. Food Animal*. 18: 295-315.
- İşler, N., 2015. Yerfıstığı Yetiştiriciliği (Ders Notları). Tarla Bitkileri Bölümü, Ziraat Fakültesi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay.
- Jao, R.J., 2004. Effect of Frequency and Duty Ratio on the Growth of Potato Plantlets in vitro Using of Light emitting Diodes. *Hort Science*, 39(2), 375-379.

- Kaçmaz, A., 2006. Yerfıstığı İşleme Teknolojisi ve Bu Amaçla Kullanılan Makinelerin İş Başarılarının Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma *yüksek lisans tez, Çukurova üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü .Adana*
- Karataş, M., Aasım, M. ve Dazkirli, M., 2015. Influence of Light Emitting Diodes and Benzylamino purin on Adventitious Shoot Regeneration of Water Hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennel.). *In Vitro Archives of Biological Sciences*(In Press).
- Kim, J.S ., Hahn E.J., Heo, J.W. ve Paek, K.Y., 2004. Effects Of Leds On Net Photosynthetic Rate, Growth and Leaf Stomata Of Chrysanthemum Plantlets In Vitro. *Scientia Horticulturae*,101, 143-151.
- Lian, M.L., Murthy, H.N. ve Paek, K.Y., 2002.Effects of Light Emitting Diodes (Leds) on the In Vitro Induction and Growth Of Bulblets Of Liliium O Riental Hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94, 365–370.
- Li, H., Xu, Z. ve Tang, C., 2010. Effect of light-emitting diodes on growth and Morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets İn Vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103, 155-163.
- Little, L. I., Magbanua, Z.V., Parrott, W.A., 2000. Protocol for repetitive somatik embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Report*, 19, 351–357.
- Matand , K. Ve Prakash, C.S., 2006. Evaluation of Peanut Genotypes for *In Vitro* Plant Regeneration Using Thidiazuron. *Journal of Biotechnology*, 130,202–207.
- Matand, K., Wu, N., Wu, H., Tucker, E. ve Love, K., 2013. More İmproved Peanut(*Arachis Hypogaea* L.) Protocol For Direct Shoot Organogenesis in Mature Dry-Cotyledonary and Root Tissues. *Journal of Biotech Research* , 5, 24-34.
- McKently, A.H., Moore, G.A. ve Gardner, F.P., 1990. *In vitro* plant regeneration of Peanut from seed explants. *Crop Science*, 30, 192-196.
- Molnar, Z., B, Jenes. ve Ördog., 1999. Genetic transformation of pea (*Pisum sativum* L.) via particle bombardment. *Recent Advances in Plant Biotechnology*, *Stara Lesna, Slovak Republic, September 4–11*.

- Nazir, F., Hassan, M., Akram, Z., J, Javed, M., Ali, S., Ghulam, M.A, ve Zafar, Y., 2011. *In Vitro* regeneration of Pakistani Peanut (*Arachishypogea* L.) varieties using de-embryonated coteledonary explants. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8599-8604.
- Ozias-Akins, P., 1989. Plant regeneration from immature embryos of peanut (*Arachis hypogea* L). *Plant Cell Report*, 8, 217-218.
- Onofrio, C.D., Morini, S.ve Bellocchi ,G., 1998. Effect of Light Quality on Somatic Embriyogenesis Quince Leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 91-98.
- Raveendar, S., Premkumar, A., Sasikumar, S., Ignacimuthu, S. ve Agastian, P., 2009. Development of a Rapid, Highly Efficient System of Organogenesis in Cowpea *Vigna unguiculata* (L). *South African Journal of Botany*, 75, 17-21.
- Rani, A.R. Ve Padmaja, G., 2005. A protocol for high frequency plant conversion from somatic embryos of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Biotechnology journal*, 7, 187-193.
- Raman, S., Dagne, D.E., Malpathak, N.P. ve Gade, W.N., 2012. Evaluation Of Indian Peanut On The Induction Of Caulogenic Buds İn Vitro. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 2(4),171-174.
- Sağlam, S., 2012. *In Vitro* regeneration of Turkish dwarf chickling (*Lathyrus cicera* L.) from longitudinally sliced cotyledon node explants. *Janural. Biotechnol*, 161, 15-16.
- Snedecor, G.W. ve Cochran, W.G., 1997. Statistical methods. *The Iowa State University Press, Iowa. USA.*
- Sharma, K.K. ve Anjaiah, V., 2000. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. *Plant Scientia*, 159,7–19.
- Tiwari , S., Tuli, R., 2009. Multiple shoot regeneration in seed-derived immature leaflet explants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 121,223–227.
- Van Le, B.U.I., De Carvalho, M.H.C., Zuily-Fodil, Y., Thi, A.T.P. ve Van, K.T.T., 2002. Direct Whole Plant Regeneration of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)

from cotyledonary node thin cell layer explants. *Journal of Plant Physiology*, 59, 1255-1258.

Vasanth ,K., Lakshmiprabha, A. ve Jayabalan, N., 2006. Acids Enhancing plant Regeneration from Cotyledon and Embryonal Axis of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian Journal Crop Science*, 1(1-2), 79-83

Venkatachalam, P. ve Kavipriya, V., 2012. Efficient Method for In Vitro Plan Regeneration from Cotyledonary Node Explants of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *International Conference on Nuclear Energy, Environmental and Biological Sciences Bangkok*, (Thailand).

Vajranabhaiah, S.N., Purushotham, M.G., Reddy, P.C. ve Prakash, P.C., 1993. Regeneration Potential of Hypocotyl-derived Long Term Callus Cultures in Groundnut (*Arachis hypogaea* L). 65, 806-807.

Venkatachalam, P., Pillai, A.S. ve Jayabalan, N., 1994. Plant regeneration from cultured apical meristems of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Proceedings of The Natural Academy of Sciences*, 64, 99- 103.

Yalçın, G., 2013. Farklı Pamuk Çeşitlerinde *İn Vitro* Sürgün Rejenerasyonu. *Yüksek Lisans* , Biyokimya enstitüsü.

Yamaguchi, S. ve Kamiya, Y., 2002. Gibberalins ve Light-Stimulated Seed Germination. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20,369-376.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Adı Soyadı** : Hülya ÖZKAN  
**Doğum Tarihi ve yer** : 07.06.1988/Adıyaman  
**Medeni Hali** : Bekâr  
**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Yıl
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	201
Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	2013
Lise	Adıyaman Lisesi	2006