

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ERCİŞ LAHANASINDA (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) *in vitro* SÜRGÜN VE
KÖK REJENERASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ferit ERTAŞ
DANIŞMAN: Yrd.Doç. Dr. Burcu TUNCER

VAN-2015

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ERCİŞ LAHANASINDA (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) *in vitro* SÜRGÜN VE
KÖK REJENERASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ferit ERTAŞ

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **2014-FBE-YL105**
no'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN-2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yrd. Doç. Dr. Burcu TUNCER danışmanlığında, Ferit ERTAŞ tarafından sunulan "**Erciş Lahanasında (*Brassica oleracea* var. *capitata*) in vitro Sürgün ve Kök Rejenerasyonu**" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 18 / 12 / 2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

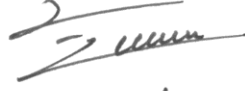
Başkan :Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

İmza:



Üye :Prof. Dr. Fikret YAŞAR

İmza:



Üye Yrd Doç. Dr. Burcu TUNCER

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../2014 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2015

Prof. Dr. Suat ŞENSOY

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ferit ERTAŞ

ÖZET

ERCİŞ LAHANASINDA (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) *in vitro* SÜRGÜN VE KÖK REJENERASYONU

ERTAŞ, Ferit

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Burcu TUNCER

Aralık 2015, 39 sayfa

Araştırmada, Van ve yöresine özgü yerel bir populasyon olan Erciş baş lahanasında (*B. oleraceae* var. *capitata*) 2 eksplant tipi (kotiledon ve hipokotil) ve 9 farklı hormon kombinasyonu içeren Murashige-Skoog (MS) ortamının sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, tohumlar MS ortamında çimlendirilmiş ve 7 günlük *in vitro* fidelerden kotiledon ve hipokotil eksplantları kesilerek MS ortamında BAP (0.5 mg/l, 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l) ve NAA' nın (0, 0.05 mg/l ve 0.1 mg/l) 9 farklı kombinasyonunda kültüre alınmıştır.

En yüksek sürgün rejenerasyonu hipokotil eksplantlarında %100 oranla MS7 (2 mg/l BAP) ortamından, %91.6 oranla MS6 (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), MS4 (1 mg/l BAP) ve MS3 (0.5 mg/l BAP+ 0.1 mg/l NAA) ortamlarından, %83.3 oranla MS1 (0.5 mg/l BAP), MS2 (0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ve MS5 (1 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ortamlarından elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı açısından ise sırasıyla MS4 (5.2 adet/eksplant), MS3 (4.42 adet/eksplant), MS6 ve MS7 (4.33 adet/eksplant) ortamları daha başarılı olmuştur. Kotiledon eksplantlarından ise en yüksek sürgün rejenerasyonu %91.6 oranla MS1 (0.5 mg/l BAP) ve MS9 (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), %83.3 oranla MS4 (1 mg/l BAP) ortamlarından sağlanmıştır. Hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hipokotil eksplantlarında tüm ortam kombinasyonlarında indirekt yolla rejenerasyon sağlanırken, kallus oluşum oranı da kotiledon ekplantlarına göre daha yüksek bulunmuştur. Kök rejenerasyonu yönünden ise kontrol ve 0.5 mg/l IBA dozundan %100 köklenme sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Rejenerasyon, *in vitro*, Lahana, Hipokotil, Kotiledon.

ABSTRACT

IN VITRO SHOOT AND ROOT REGENERATION IN ERCIS CABBAGE (*Brassica oleraceae* var. *capitata*)

ERTAŞ, Ferit

M. Sc., Department of Horticulture

Supervisor : Asst. Prof. Dr.Burcu TUNCER

December 2015, 39 pages

In this study, the effects of 2 explant types (cotyledon and hypocotyl) and 9 different hormone combination Murashige-Skoog (MS) medium on the shoot regeneration in Ercis population of head cabbage have been evaluated. For this reason, the seeds were germinated in Murashige-Skoog (MS) medium and the cotyledon and hypocotyl segments of the 7 day old seedlings were cultured on MS medium containing different 9 combinations of BAP (0.5 mg/l, 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l) and NAA (0, 0.05 mg/l ve 0.1 mg/l).

The highest shoot regeneration in hypocotyl explants were obtained with 100% ratio from MS7 (2 mg/l BAP) medium, 91.6% ratio from MS6 (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), MS4 (1 mg/l BAP) and MS3 (0.5 mg/l BAP+ 0.1 mg/l NAA) medium, 83.3% ratio from MS1 (0.5 mg/l BAP), MS2 (0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) and MS5 (1 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA). In terms of the number of shoots per explant, respectively, MS4 (5.2 shoot/explant), MS3 (4.42 shoot/explant), MS6 and MS7 (4.33 shoot/explant) medium were more successful. The highest shoot regeneration in cotyledon explants were achieved with 91.6% ratio MS1 (0.5 mg/l BAP) and MS9 (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), 83.3% ratio from MS4 (1 mg/l BAP) medium. Hypocotyl explants were determined to be more successful than the cotyledon explants.

According to the results obtained from research, indirect shoot regeneration was obtained from all medium combination at hypocotyl explants. Callus formation rate was significantly higher than the cotyledon explants. The best results on root regeneration were obtained from control ve 0.5 mg/l IBA dose.

Key words: Regeneration, *in vitro*, Cabbage, Hypocotyls, Cotyledon.

ÖN SÖZ

Yürüttüğüm çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, çalışmalarımı izleyip bana yön veren, tezin tasarlanma, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamaları olmak üzere her aşamasında yanımda olan, bilgi, öneri ve görüşlerini benimle paylaşan değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Burcu TUNCER’e teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarım süresince zamanını ayırıp bana yardımcı olan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 3. sınıf öğrencisi Fatma UMMUHAN’a teşekkürlerimi sunarım.

2015

Ferit ERTAŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal	11
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Tohumların Sterilizasyonu	11
3.2.2. Tohumların Çimlendirilmesi ve Eksplant Hazırlığı	11
3.2.3. Eksplantların Rejenerasyon Ortamına Dikilmesi ve <i>in vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu	13
3.2.4. <i>İn vitro</i> Kök Rejenerasyonu	16
3.2.5 Yapılan Ölçüm ve Değerlendirmeler	16
3.2.6. İstatistiki Analiz	16
4. BULGULAR	17
4.1. <i>İn vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu Deneme Bulguları	17
4.2. <i>İn vitro</i> Kök Rejenerasyonu Deneme Bulguları	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
5.1. Hipokotil Eksplantlarından <i>in vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu.....	29
5.2. Kotiledon Eksplantlarından <i>in vitro</i> Sürgün Rejenerasyonu	31
5.3. <i>İn vitro</i> Kök Rejenerasyonu	32
KAYNAKLAR	34
ÖZ GEÇMİŞ	39

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. MS (Murashige-Skoog) besin ortamının içeriği	15
Çizelge 4.1. Besin ortamlarına katılan farklı konsantrasyonlardaki BAP ve NAA'nın eksplant gelişimi ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	18
Çizelge 4.2. MS besi ortamına katılan farklı konsantrasyonlardaki BAP ve NAA'nın kallus oluşumu (%) üzerine etkisi.....	21
Çizelge 4.3 MS besi ortamına katılan farklı konsantrasyonlardaki BAP ve NAA'nın eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün boyuna etkisi	22
Çizelge 4.4. 1/2 MS besi ortamına katılan farklı konsantrasyonlardaki IBA'nın köklenme üzerine etkisi	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Tohumların MS çimlendirme ortamına ekilmesi.....	12
Şekil 3.2. <i>In vitro</i> koşullarda çimlenmiş olan 7 günlük lahana fideleri	12
Şekil 3.3. 7 günlük fidelerden kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kesimi ve besin ortamına dikimi	13
Şekil 3.4. Kavanozlarda MS ortamına dikilmiş olan kotiledon ve hipokotil eksplantları.....	14
Şekil 3.5. İklim odasındaki denemeden genel görünüm	14
Şekil 4.1. Rejenerasyon ortamına dikilen (a) kotiledon ve (b) hipokotil eksplantlarında dikimden 7 gün sonra meydana gelen şişmeler	17
Şekil 4.2. Hipokotil eksplantlarından kallus üzerinden indirekt sürgün oluşumu; (a) MS3 ortamı (0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IAA), (b) MS6 ortamı (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), (c) MS8 (2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA)	20
Şekil 4.3. Hipokotil eksplantlarından sürgün oluşumlarının başlaması	23
Şekil 4.4. Hipokotil eksplantlarından indirekt yolla sürgün oluşumları	23
Şekil 4.5. Sürgün çoğaltım ortamında <i>in vitro</i> gelişen lahana bitkicikleri	24
Şekil 4.6. Kotiledon eksplantlarından sürgün oluşumlarının başlaması	24
Şekil 4.7. Kotiledon eksplantlarından direkt sürgün oluşumlar; (a) MS1 ve MS9 ortamı; (b) MS9 ortamı (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), (c) MS1 ortamı (0.5 mg/l BAP)	25
Şekil 4.8. Sürgün rejenerasyonu ortamında çoğaltımı sağlanan bitkiciklerin köklendirme ortamına alınması için hazırlanması	26
Şekil 4.9. Köklendirme ortamına alınmış <i>in vitro</i> sürgünler	26
Şekil 4.10. Köklendirme ortamındaki bitkiciklerde kök oluşumu	28

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
AgNO ₃	Gümüş nitrat
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
CPPU	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalsiyum Klorür dihidrat
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Kobalt klorür heptahidrat
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
da	Dekar
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Demir sülfat heksahidrat
g	Gram
g/l	Gram/litre
ha	Hektar
H ₃ BO ₃	Borik asit
kg	Kilogram
K	Potasyum
KI	Potasyum iyodür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
KNO ₃	Potasyum nitrat
mg	Miligram
mg/l	Miligram/litre
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnezyum sülfat heksahidrat
MnSO ₄ ·4H ₂ O	Mangan sülfat tetrahidrat
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat

Na₂EDTA	Sodyum etta
Na₂MoO₄.H₂O	Disodyum molibdat hidrat
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
t	Ton
ZnSO₄.7H₂O	Çinko sülfat hekzahidrat

Kısaltmalar

Açıklama

BAP	Benzilaminopürin
BA	Benziladenin
B5	Gamborg besin ortamı (1968)
IAA	Indol asetik asit
IBA	Indol bütirik asit
NAA	Naftalen asetik asit
TDZ	Thidiazuron
2,4-D	2,4-D dimethylamine tuzu
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
MÖ	Milattan önce
MES	4-Morpholineethanessülfonik asit

1. GİRİŞ

Lahana grubu sebzeler *Curiceferae* (*Brassicaceae*) familyasına ait olup, ekonomik öneme sahip olan oldukça geniş bir familyadır. Bu familya içerisinde yaklaşık 350 cins ve 3000 tür bulunmaktadır (Şalk ve ark., 2008). *Brassica oleracea* cinsi içinde yer alan önemli sebze türleri baş lahana (*B. oleracea* var. *capitata*), yaprak lahana (*B. oleracea* var. *acephala*), brokoli (*B. oleracea* var. *italica*), karnabahar (*B. oleracea* var. *botrytis*), brüksel lahanası (*B. oleracea* var. *gemmifera*), alabaş (*B. oleracea* var. *gongylodes*), şalgam (*B. rapa* L.), turp (*Raphanus satius* L) ve tere (*Lepidium sativum* L.)' dir (Günay, 2005).

Ülkemizde 804.000 ha alan üzerinde yaklaşık 28.7 milyon ton sebze üretimi yapılmaktadır. (Anonim, 2014). Ülkemizde *Brassica* grubu sebzelerin toplam üretimi 935.230 t olup, bu üretimin 492.610 t' u beyaz baş lahanaya aittir (Anonim, 2014). Bu istatistiklerden de anlaşılacağı gibi lahana grubu sebzelerden özellikle beyaz baş lahana yaprağı yenen sebzeler içinde önemli bir üretim payına sahiptir.

Lahana grubu sebzeler uzun yıllardan beri insan beslenmesinde kullanılmaktadır. Bu durum lahana grubu sebzelerin besin değerlerinin zenginliğinden kaynaklanmaktadır (Günay, 2005). Son yıllarda sağlık değerlerinin de ön plana çıkması nedeniyle ülkemizde ve dünyada tüketimi giderek yaygınlaşmaktadır. Besin değerleri türlere göre değişmekle birlikte her 100 g' ında 2.0-4.6 g karbonhidrat, 0.2-0.6 g yağ, 1.0-4.6 g protein içerdiği, ayrıca mineral maddeler (özellikle K: 300-400 mg) ve karotenoidler (44.0-41.700 µg) yönünden de zengin olduğu bilinmekte, bol miktarda B, C ve E vitamini içermektedirler (Stewart ve McDougall, 2012).

Ülkemizde lahanaların bir çok değerlendirme şekli olup, çiğ olarak tüketilebildiği gibi, salatası, kapuskası, etli-zeytinyağlı sarması ve turşusu yapılmaktadır (Vural ve ark., 2000). Günümüzde lahana grubu sebzeler bütün yıl boyunca tüketilen ve pazarda satışı yapılan sebzeler arasındadır.

Ülkemiz lahana üretimi yönünden zengin olduğu kadar gen kaynakları yönünden de zengindir (Balkaya ve ark., 2005). Yaşar ve ark. (1995), yöresel bir popülasyon olan Erciş lahanasında çeşit geliştirme amacıyla seleksiyon çalışmaları yapmışlardır. Ülkemizde her bölgede farklı tipte lahana yetiştiriciliği yapılmaktadır. Örneğin Karadeniz Bölgesinde yaprak lahana, Doğu Anadolu'da beyaz baş lahana, Batı ve

Güney Bölgelerimizde kırmızı baş lahanaya yetiştiriciliği yapılmaktadır. Birçok araştırmacı lahananın anavatanı olarak Avrupa'nın kuzey sahil bölgeleri, İngiltere, İrlanda, Akdeniz çevresi, Fransa, İspanya, İtalya, Asya'nın doğusu ile Çin ve Anadolu olduğunu belirtmektedir (Günay, 2005). Rus araştırmacı Zhukowsky lahananın anavatanının Anadolu'nun Van yöresi olduğunu bildirmektedir (Bayraktar, 1970). Lahanalar çok eskilere dayanan bir geçmişe sahiptir. Eski eserlerden anlaşıldığına göre, lahana MÖ. 2000-2500 yıllarından beri bilinmekte ve gerek besin olarak gerekse tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Yine tarihi eserlerden lahananın Anadolu'da MÖ. 200-300 yıllarında kullanıldığı ve bahçe lahanası, yabani lahana ve Hozî (İran lahanası) adları altında farklı tiplerin yetiştiriciliğinin yapıldığı anlaşılmaktadır (Arın ve ark., 2008).

Erciş lahanası Doğu Anadolu Bölgesi'nde Van ve çevresinde yetiştirilmekte olan yerel bir baş lahana popülasyonudur. Gevşek ve iri baş (ortalama 1.012 kg) ve ince yaprak özellikleri nedeniyle daha çok sarmalık ve turşuluk için uygundur. Van'a özgü yerel bir popülasyon olan Erciş lahanası yöre halkının önemli gelir kaynakları arasındadır. Erciş ilçesinde yaklaşık 3.200 da alanda 12.240 t lahana üretimi yapılmaktadır. İlçede yetiştirilen lahanalar gerek Van ili içinde gerekse çevre illerde (Muş, Siirt, Ağrı ve Bitlis) satılmaktadır.

Günümüzde *Brassica* türlerinde ıslah çalışmalarında klasik ıslah yöntemlerine ilaveten biyoteknolojik yöntemler ve genetik transformasyon çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yaklaşımların başarılı olabilmesi etkili ve uygun *in vitro* rejenerasyon sisteminin kullanılması ve geliştirilmesine bağlıdır. Lahanalarda *in vitro* sürgün rejenerasyon üzerine başarılı pek çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Munshi ve ark., 2007; Pavlovic ve ark., 2010; Mollika ve ark., 2011).

Bitkilere gen aktarımında *Agrobacterium* bakterisi aracılığıyla gen transferi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde genellikle yabancı geni taşıyan bakteriyle bulaştırılmış eksplantlardan adventif sürgün oluşturmaya çalışılmaktadır. Transgenik hücrelerin *in vitro* koşullarda uygun besi ortamlarında rejenere olarak bitkicikler meydana getirmesi en önemli aşamalardan biridir (Yarimoğlu, 2004). Ancak uygun rejenerasyon sisteminin geliştirilebilmesi için, her tür hatta her genotip için ortam koşullarının belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Brassica türlerinde bitki rejenerasyonu ve genetik transformasyon çalışmalarında *in vitro* gelişmiş bitkiciklerden alınan kotiledon (Hazrat ve ark., 2007),

hipokotil (Cardoza ve Neal Stewart, 2004; Hazrat ve ark., 2007), epidermis ve alt epidermisden alınan ince hücre katmanları (Klimaszewska ve Keller, 1985), kökler (Xu ve ark., 1982), çiçek sapları (Christey ve Earle, 1991) ve protoplastlar (Hu ve ark., 1999) kullanılmaktadır. Bununla birlikte *Brassica*'larda rejenerasyon çalışmalarında kotiledon ve hipokotil eksplantlarının daha yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Cardoza ve Stewart, 2004; Hazrat ve ark., 2007).

Bu düşünceden hareketle yapılacak olan bu çalışmada, Van yöresine özgü olan Erciş lahanasında farklı eksplant tipi (kotiledon ve hipokotil) ve ortam bileşimlerinin *in vitro* sürgün ve kök rejenerasyonu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Rejenerasyon sisteminin optimize edilmesi halinde ileride yapılması planlanan genetik transformasyon ve biyoteknolojik çalışmalar için temel oluşturulacaktır. Bu çalışma Van yöresine özgü olan Erciş lahanasında doku kültürü alanında yapılacak olan ilk çalışma olması açısından da önem taşımaktadır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

In vitro doku kültürü teknikleri *B. oleracea*'nın birçok türünde hızlı ve sürekli bir üretim tekniği olanağı sunmaktadır. Ancak etkili sürgün rejenerasyonunda başta genotip olmak üzere, eksplant tipi ve yaşı, besin ortamının bileşimi önemli rol oynamaktadır. Çoğu *Brassica* türünde genç eksplantların yaşlı eksplantlarına göre daha olumlu sonuç verdiği belirtilmektedir (Rani ve ark., 2013).

Besin ortamına katılan BAP ve TDZ gibi hormonlar sürgün rejenerasyonunda artış sağlarken, rejenere olan sürgünlerin köklendirilmesinde ortama katılan oksinlerden (NAA, IBA ve IAA) yararlanılmaktadır (Cheng ve ark., 2001). *In vitro* sürgün rejenerasyonu farklı *Brassica* türlerinde örneğin; kolza (Chamandoosti ve Azad, 2012), baş lahanası (Munshi ve ark., 2007), hardal (Patil ve ark., 2006; Molika ve ark., 2011), brokoli (Huang ve ark., 2011), karnabahar, kırmızı baş lahanası, kıvrıkcık lahanası (Pavlovic ve ark., 2010), Çin lahanası (Memon ve ark., 2009) ve süs lahanasında (Dai ve ark., 2009) başarıyla uygulanmaktadır. Yapılan kaynak taramalarında, *Brassica* türlerinde *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında daha çok kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kullanıldığı belirlenmiştir (Cardoza ve Stewart, 2004; Hazrat ve ark., 2007).

Munshi ve ark. (2007), baş lahanada (*B. oleracea* var. *capitata*) direkt rejenerasyonda 7 günlük *in vitro* gelişmiş fidelerden alınan kotiledon ve hipokotil eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonunun 1/2 MS + 0.5 mg/l BA içeren ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca 1/2 MS + 0.5 mg/l IBA içeren köklendirme ortamında 10-12 gün içinde %98 oranında köklenmede başarı sağlandığını belirtmişlerdir.

Pavlovic ve ark. (2010), farklı *Brassica* türlerinde (kırmızı baş lahanası, Savoy lahanası, karnabahar) yapmış oldukları çalışmada, tüm türlerde sürgün rejenerasyonu açısından en iyi sonucun 7 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlarından elde edildiğini, besin ortamı olarak ise MS + BA (1.0 mg/l) + IBA (0.1 ve 0.2 mg/l) kombinasyonunun daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Sürgünlerin köklendirilmesinde ise %2-4 sakkaroz içeren, hormon bulundurmeyen MS ortamında başarılı sonuçlar almışlardır.

Khan ve ark. (2010), *B.rapa* (2 genotip), *B. napus* (2 genotip)'da en yüksek kallus oluşumunun (%91.43) MS + 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l AgNO₃'ten

elde edildiğini, sürgün rejenerasyonunda ise MS + 2.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 2 mg/l AgNO₃ ortamının daha başarılı olduğunu saptamışlardır.

4 farklı mustard (*Brassica*) çeşidinde yapılan çalışmada, 6-7 yaşlı kotiledon eksplantlarından tüm genotiplerde MS + 1.5 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l NAA + 2 mg/l AgNO₃ ortamında kallus oluşumunun en yüksek olduğu, maksimum sürgün rejenerasyonunun ise genotiplere göre değişmekle birlikte MS + 3.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l AgNO₃ ortamından elde edildiği belirtilmektedir (Başak ve ark., 2012).

Süs lahanasında (*Brassica oleracea* var. *acephala*) yapılan başka bir çalışmada, maksimum sürgün rejenerasyonu MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA ortamından elde edilirken, kotiledon eksplantlarından %65, hipokotil eksplantlarından %76.1 oranında sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Araştırmada ayrıca besin ortamına katılan AgNO₃'ün (3 mg/l) sürgün oluşumu açısından olumlu sonuç verdiği saptanmıştır (Dai ve ark., 2009).

Hazrat ve ark. (2007), 3 farklı *Brassica napus* L. çeşidinde en yüksek kallus oluşumunun MS + 2,4-D (0.5 mg/l) + BAP (0.5 mg/l) + AgNO₃ (0.5 mg/l) ortamından, en yüksek sürgün rejenerasyonunun (% 67-82) ise MS+ NAA (0.1 mg/l) + BAP (2 mg/l) + AgNO₃ (5 mg/l) ortamından elde edildiğini, en yüksek köklenme kapasitesinin ise 1/2 MS + IBA (0.3 mg/l) ortamından sağlandığını bildirmişlerdir.

Huang ve ark. (2011), brokoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) üzerinde yürüttükleri bir dizi çalışma neticesinde maksimum sürgün rejenerasyonunun MS + 0.107 µM NAA + 17.76 µM BAP + %2 sakkaroz ve %0.8 agar ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir.

Ravanfar ve ark. (2009), brokolide (*Brassica oleracea* subsp. *italica* cv. Green Marvel), hipokotil ve sürgün ucu eksplantlarını kullanarak yürüttükleri çalışmada, hipokotil eksplantlarında en yüksek sürgün oluşumunun %96.7 oran ile MS + 3 mg/l BAP ortamından elde edildiğini, bu ortamda eksplant başına sürgün sayısının 6.03 adet olduğunu bildirmişlerdir. Sürgün ucu eksplantlarının kullanıldığı denemede ise, %100 sürgün rejenerasyon oranı ile en başarılı ortam MS + 5 mg/l BAP ortamı bulunmuş, eksplant başına 3.76 adet sürgün elde edilmiştir. Köklenme ortamı olarak MS + 0.2 mg/l IBA ortamında %100 kök rejenerasyonu sağlandığını ve sürgün başına 6.5 adet kök elde

edildiği, en fazla kök uzunluğunun (2.46 cm) ise hormonsuz MS ortamından sağlandığını bildirmişlerdir.

Ghnaya ve ark. (2008), *Brassica napus L.*'da hipokotil eksplantları üzerinde yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda NAA (0.1 - 0.4 mg/ l), BAP (1 – 4 mg/l) ve şeker (20 – 40 g/l) içeren MS ortamında en iyi sonucun 3 mg/l BAP, 0.3 mg/l NAA ve 30 g şeker içeren ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir. Çin lahanası üzerinde yürütülen başka bir çalışmada ise, maksimum sürgün rejenerasyonunu 5 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (Zhang ve ark., 1998).

Hachey ve ark. (1990), *in vitro* sürgün rejenerasyonu çalışmalarında *Brassica campestris*'de 4 günlük kotiledon ve hipokotil eksplantlarını kullanmışlardır. BA ve NAA kombinasyonlarında 2 haftadan sonra %70 oranında sürgün elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon oranı MS + BA (2 mg/l) + NAA (1 mg/l) ortamından sağlanmıştır.

Kumar ve Srivastava (2015), brokolide (*Brassica oleracea L.var italica*) etkili sürgün rejenerasyon protokolünü belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmada hipokotil, kotiledon, yaprak ve yaprak sapı olmak üzere 4 farklı eksplant tipini kullanmışlardır. Hipokotil ve kotiledon eksplantlarını 10-12 günlük *in vitro*da gelişmiş bitkilerden, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını ise 18-20 günlük serada gelişmiş olan bitkilerden almışlardır. Araştırma sonucunda, yaprak sapı eksplantlarının sürgün rejenerasyonu açısından daha başarılı olduğunu, en yüksek sürgün rejenerasyonunun hipokotil eksplantlarında %83.3 rejenerasyon oranı ile MS + 3.5 mg/l BAP + 0.019 mg/l NAA, kotiledon eksplantlarında %90.1 oran ile MS + 2.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, yaprak eksplantlarında (%62.9) 4 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, yaprak saplarında ise (%91.1) ile MS + 4.5 mg/l BAP + 0.019 mg/l NAA ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca 0.1 mg/l NAA katılmış MS ortamında %100 oranında köklenme sağlandığını saptamışlardır.

Gerszberg ve ark. (2015), 8 farklı baş lahana (*Brassica oleracea var.capitata*) çeşidinde, 10 günlük hipokotil ve kotiledon eksplantlardan *in vitro* sürgün rejenerasyonu elde edilmesine yönelik başlattıkları bir dizi çalışma neticesinde hipokotil eksplantlarının kallus uyartımı ve organogenesis açısından daha başarılı olduğunu, 5 çeşitte MS + 8.88 µM BAP + 0.53 µM NAA ortamından etkili sürgün rejenerasyonunun gözlemlendiğini ifade etmişlerdir. Buna ilaveten 10-15 günde bütün çeşitlerde

köklenmenin sağlandığını, MS + 5.37 μ M NAA ortamında sağlıklı ve güçlü köklerin sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Peng-fang ve ark. (2003), yaprak lahanada (*Brassica oleracea var. capitata*) kallus ve adeventif tomurcuk oluşturmak amacıyla *in vitro* koşullarda farklı eksplantları (çiçek tomurcuğu, çiçek sapı ve filament) kullanmışlardır. Araştırma sonucunda uyartım için en iyi ortamın MS + BA (4mg/l) +NAA (0.1 mg/l), çoğaltım için ise en iyi ortamın MS + BA (2 mg/l) + NAA (0.02 mg/l) ortamlarından elde edildiğini saptamışlardır. Ayrıca 1/2MS + 4 mg/l NAA ortamından % 98 oranında köklenmede başarı sağladıklarını ifade etmişlerdir.

Alam ve ark. (2013), kanolada (*Brassica napus* L.) hipokotil ve kotiledon eksplanlarından *in vitro* koşullarda kallus oluşumunun elde edilmesine yönelik yürüttükleri çalışmada, optimum kallus oluşumunun 0.5 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamından elde edildiğini, buna karşın en iyi sürgün ortamının MS + 3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 5 mg/l AgNO₃ olduğunu, maksimum sürgün sayısının ise 0.5 mg/l kinetin katılmış ortamdaki elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca kallus uyartımı için 0.5 mg/l AgNO₃ katılmış ortamın, sürgün rejenerasyonu açısından ise 5 mg/l AgNO₃ katılmış ortamın olumlu etki yaptığını, köklenme ortamı olarak ise 2.5 mg/l NAA veya 1 mg/l IBA katılmış ortamlardan başarılı sonuçlar alındığını tespit etmişlerdir.

Sharma ve ark. (2014), baş lahanada (*Brassica oleracea L. var. capitata*) rejenerasyon protokolü geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, MS ortamında 36 farklı hormon konsantrasyonu denemişlerdir. En yüksek sürgün rejenerasyonu kotiledon eksplantlarında MS + 1.5 mg/l BAP + 0.50 mg/l NAA ve MS + 2 mg/l BAP + 0.25 mg/l IAA ortamından elde edildiğini, köklenme ortamı olarak da MS + 0.1 mg/l IBA ortamından %90 rejenerasyon sağlandığını bildirmişlerdir.

Yawen ve ark. (1998), *Brassica alboglabra*'nın 3 çeşidinde hipokotil eksplantları kullanarak yürüttükleri çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyonu %84.6 oranla 'Early Flowering' çeşidinde MS + 2mg/l BA ortamından, %86.7 oranla " Middle Flowering" çeşidinde 0.3 mg/l NAA + 2 mg/l BA ortamından ve %93.3 oranla " Late Flowering" çeşidinde 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l BA ortamından elde edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar Sürgün rejenerasyonu açısından optimum sakkaroz konsantrasyonunun %1 olduğunu, besin ortamına 4 mg/l AgNO₃ ve 5mg/l MES ilavesinin sürgün oluşum

oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Optimum köklenme için ise 1/2 MS + 1 mg/l NAA ortamından daha başarılı sonuçlar alındığını ifade etmişlerdir.

Bano ve ark. (2010), *Brassica juncea*'nın 3 farklı genotipinde 3 farklı eksplant tipinde (kotiledon, hipokotil ve kök) yürüttükleri çalışmada, her 3 genotipde de kotiledon eksplantlarından daha fazla sayıda sürgün elde edildiğini, 2 genotipte ise MS + 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA, 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, 2 mg/l kinetin + 0.2 mg/l IAA, 3 mg/l kinetin + 0.5 mg/l IAA kombinasyonlarının sürgün oluşumu açısından olumlu sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, hipokotil ve kök eksplantlarında kallus oluşumunun daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Thakur ve ark. (2013), *Brassica juncea* (var. NRCDR-2)' da direkt organogenesis üzerine yaptıkları çalışmada 5 günlük *in vitro* fidelerden alınan kotiledon eksplantlarını MS ortamında farklı konsantrasyonlarda sitokinin (BAP, Kinetin) ve oksin (IAA, NAA) içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda eksplant başına en yüksek sürgün sayısının ortalama 6.73 adet ile MS + BAP (1mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + AgNO₃ (10 mg/l) ortamından elde edildiğini, 0.3 mg/l IAA içeren MS ortamına alınan sürgünlerden ise 10-12 gün içinde %100 köklenme sağladıklarını bildirmişlerdir. 10 kışlık kolza (*B. napus*) çeşidinde yapılan başka bir çalışmada, sürgün rejenerasyon oranının eksplant tipine göre büyük ölçüde değişim gösterdiği, gövde segmentlerinin eksplant olarak kullanıldığı denemelerde rejenerasyon oranının % 25.78 - % 85.1 arasında değişim gösterdiği ve gövde eksplantlarının hipokotil eksplantlarına göre daha başarılı olduğu belirtilmektedir (Burbulis ve ark., 2009)

Burbulis ve ark. (2010), 11 ticari yazlık kolza çeşidinde yaptıkları çalışmada, hipokotil eksplantlarında sürgün rejenerasyon oranının %0- 26, gövde segmentlerinde ise %38.7-100 arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

B. oleraceae var. *capitata*'da farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki Thidiazuron'un (TDZ) sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini araştırıldığı bir çalışmada, eksplant olarak 20-25 günlük serada yetiştirilmiş olan bitkilerden alınan yaprak ve yaprak sapı kullanılmıştır. En yüksek sürgün eldesi yaprak eksplantlarında %91.1 oranla MS + TDZ (0.22 mg/l) + NAA (0.02 mg/l) ortamından, yaprak sapı eksplantlarında ise %88.8 oranla MS + TDZ (0.33 mg/l) + NAA (0.02 mg/l) ortamından elde edilmiştir (Gambhir ve Srivastava, 2015).

Daud ve ark (2015), *Brassica oleraceae* var. *capitata*'da yaptıkları çalışmada, *in vitro* 7 günlük fidelerden alınan gövde, kök, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarını kullanmışlardır. MS + BAP (1 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) ortamında kültüre alınan gövde ve kök eksplantlarında elde edilen kalluslardan daha hızlı bitkicik elde edildiğini saptamışlardır. Baş lahananın (*B. oleracea* var. *capitata* L.) 2 genotipinde yapılan başka bir çalışmada, 5 günlük *in vitro*' da gelişen fidelerden alınan hipokotil eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonunun 9.1 μ M zeatin ve 2.8 μ M IAA katılmış MS ortamından elde edildiği bildirilmektedir (Cristea ve ark., 2010).

B. carinata'da yürütülen bir çalışmada, en yüksek kallus oluşumunun hipokotil (%80.7) ve kotiledon (%95) eksplantlarında 0.5 mg/l 2,4-D katılmış ortamdan elde edildiği, en yüksek sürgün rejenerasyonunun ise %90 oran ile 2 mg/l BAP katılmış MS ortamından elde edildiği bildirilmektedir. Kök rejenerasyonu yönünden ise 0.3 mg/l IBA ortamı daha başarılı bulunurken, maksimum kök uzunluğu ise hiç hormon katılmamış ortamdan elde edilmiştir (Abrha ve ark., 2013).

Khan ve ark. (2002), *B. napus* cv. Oscar çeşidinde, 10-14 günlük *in vitro* bitkilerden alınan hipokotil eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırma sonucunda, %96 oranla en yüksek kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4-D katılmış Gamborg (B5) ortamından elde edildiğini, maksimum sürgün rejenerasyonunun ise B5 + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA ortamından sağlandığını saptamışlardır.

B. napus'da etkili rejenerasyon sistemini belirlemek amacıyla yürütülen bir çalışmada, 7, 14 ve 21 günlük hipokotil eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda BA (1.5, 3.0 ve 4.5 mg/l) ve Thidiazuron (TDZ) içeren Gamborg (B5) ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda maksimum sürgün rejenerasyonunun 21 günlük eksplantların kullanıldığı 4.5 mg/l BA ve 0.3 mg/l TDZ içeren Gamborg ortamından elde edildiği, elde edilen sürgünlerin ise MS + 2 mg/l IBA içeren ortamda başarıyla köklendiği belirtilmektedir (Jonoubi ve ark., 2004).

Guo ve ark. (2005), *B. juncea* var. *tsatsai*' de yaptıkları çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyonunun kotiledon eksplantlarında %61.3-67.9 oranla, yaprak eksplantlarında ise %40.7-52.4 oranla MS + 2.27 μ M veya 4.54 μ M TDZ + 5.37 μ M NAA içeren ortamdan elde edildiğini, her iki eksplant tipinde de sürgün rejenerasyonu açısından TDZ' nin diğer sitokinin gruplarına (BA, Kinetin, CPPU) göre daha başarılı olduğunu belirlemişlerdir.

Alabařta (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) yürütülen bir çalışmada, sürgün rejenerasyonu üzerine farklı eksplant tipleri (hipokotil ve bozulmamış fide) ile farklı sitokonin ve konsantrasyonlarının etkisi denenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu her iki çeşitte de hiç kesim yapılmamış doğrudan *in vitro* imlendirilmiř fideciklerden elde edilirken, VP eřidinde MS + 5 mg/l BA (%60) ile MS + 2 mg/l TDZ (%50) ortamları, VW eřidinde ise MS + 5 mg/l BA (%50), MS + 2 mg/l TDZ (%47.5) ile MS + 1 mg/l transzeatin katılmış ortamlar daha başarılı bulunmuştur (Cosic ve ark., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma, 2014-2015 yılları arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada Van ve çevresinde yetiştirilmekte olan Van'ın Erciş ilçesinden temin edilen 'Erciş lahana popülasyonu'na ait tohumlar kullanılmıştır.

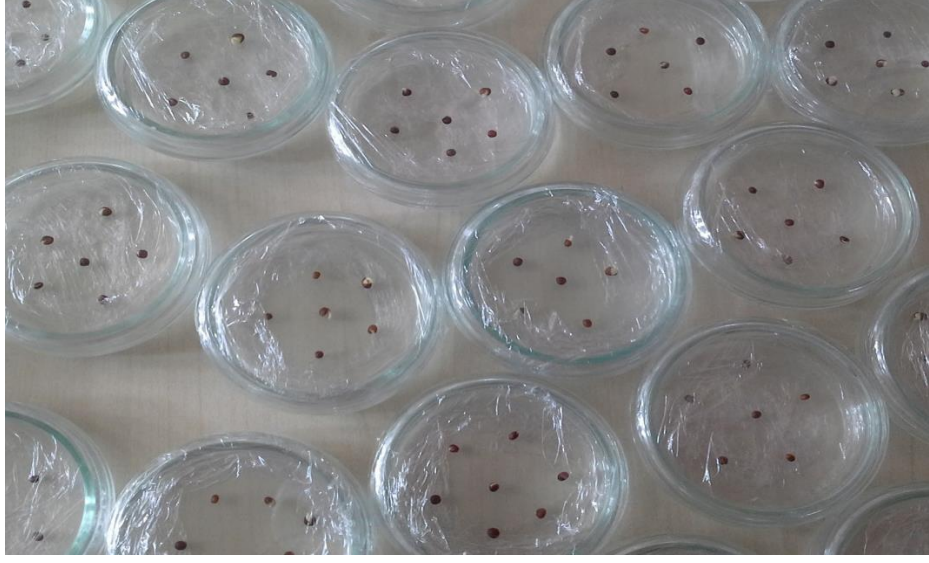
3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların Sterilizasyonu

Tohumlar, musluk suyu altında birkaç kez yıkanarak, tohum dışındaki cansız maddelerden arındırılmıştır. Daha sonra laminar flow kabin içinde %70'lik etil alkolde 30 sn kadar tutulduktan sonra bidistile su ile birkaç kez yıkanarak etil alkolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu aşamadan geçirilen tohumlar son olarak birkaç damla Tween-20 damlatılmış % 20'luk ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletildikten sonra 3 kez bidistile suyla 6'şar dakika çalkalanarak yıkanmıştır.

3.2.2. Tohumların Çimlendirilmesi ve Eksplant Hazırlığı

Sterilizasyonu yapılmış olan tohumlar 6 cm'lik petri kutuları içerisinde (ortalama 6-7 tohum/petri) hormon içermeyen MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında (30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar, PH: 5.8) çimlendirilmiştir (Şekil 3.1). Tohumların çimlendirilme işlemi 25°C'de 16 saat aydınlık; 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında yapılmıştır (Pavlovic ve ark., 2010). Çimlenen 7 günlük fidelerden kotiledon ve hipokotil eksplantları kesilerek alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Tohumların MS çimlendirme ortamına ekilmesi.



Şekil 3.2. *İn vitro* koşullarda çimlenmiş olan 7 günlük lahana fideleri.

3.2.3. Eksplantların Rejenerasyon Ortamına Dikilmesi ve *in vitro* Sürgün Rejenerasyonu

7 günlük *in vitro* fidelerden alınan kotiledon ve hipokotil eksplantları MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında (30 g sakkaroz/l, 7 g/l agar, PH:5.8) farklı konsantrasyonlarda BAP (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) ve NAA (0, 0.05, 0.1 mg/l) içeren besin ortamlarına dikilmiştir (Şekil 3.3). Her bir uygulama için her kavanoza 4 eksplant dikilmiş ve deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. (Şekil 3.4). Dikilen eksplantlar 25 °C 16 saat gün uzunluğundaki iklim odasında kültüre alınmıştır (Şekil 3.5). 4 hafta sonra kotiledon ve hipokotil eksplantlarından elde edilen eksplant başına sürgün sayısı ve %'si ile ortalama sürgün uzunluğu hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. 7 günlük fidelerden kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kesimi ve besin ortamına dikimi.



Şekil 3.4. Kavanozlarda MS ortamına dikilmiş olan kotiledon ve hipokotil eksplantları.



Şekil 3.5. İklim odasındaki denemeden genel görünüm.

Sürgün rejenerasyon ortamı olan MS besiy ortamının içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS besin ortamının içeriği (Murashige, T., Skoog, F., 1962)

Kimyasallar	Miktar (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Myo-inositol	100
Glisin	2.0
Sakkaroz	30 000

3.2.4. *İn vitro* Kök Rejenerasyonu

Yaklaşık 3 cm uzunluğuna ulaşan sürgünler köklendirilmek amacıyla 4 farklı konsantrasyonda IBA (0, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) içeren 1/2 MS ortamında, her bir uygulama için 6 tekerrür ve her tekerrürde 4 eksplant olacak şekilde kültüre alınmıştır (Munshi ve ark., 2007). Yaklaşık 1 ay sonra kültürlerde sürgün başına elde edilen kök sayısı ve %'si ile ortalama kök uzunluğu hesaplanmıştır.

3.2.5 Yapılan Ölçüm ve Değerlendirmeler

- **Eksplant başına sürgün sayısı ve yüzdesi:** Sürgün geliştirme ortamına alınan eksplantlarda dikimden 1 ay sonra eksplant başına sürgün sayısı (adet) ve %'si belirlenmiştir.
- **Ortalama sürgün uzunluğu (cm):** Her uygulama için toplam 5 sürgünde, sürgün uzunluğu cetvel yardımı ile ölçülerek elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır.
- **Sürgün başına kök sayısı ve yüzdesi:** Kök geliştirme ortamına alınan sürgünlerde dikimden 1 ay sonra sürgün başına kök sayısı (adet) ve %'si belirlenmiştir.
- **Ortalama kök uzunluğu (cm):** Her uygulama için toplam 5 sürgünde kök uzunluğu cetvel yardımı ile ölçülerek, elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır.

3.2.6. İstatistiki Analiz

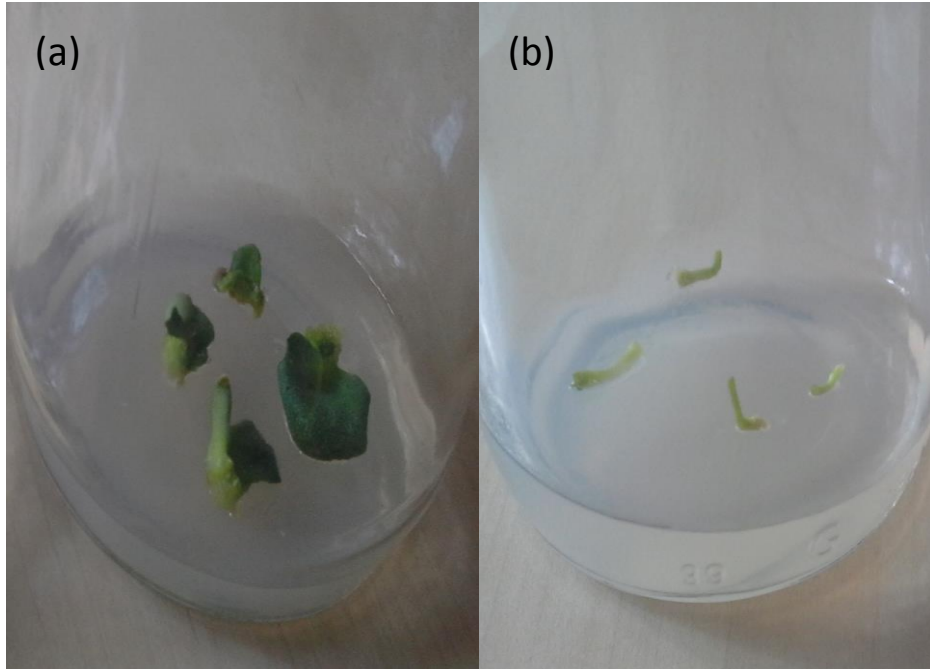
Çalışmada ele alınan özellikler bakımından tanımlayıcı istatistikler; ortalama olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından yapılacak karşılaştırmalarda, Varyans analizi yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (ver:13) istatistik paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *İn vitro* Sürgün Rejenerasyonu Deneme Bulguları

7 günlük *in vitro*'da gelişen bitkilerden kotiledon ve hipokotil parçaları kesilerek, MS ortamında farklı oranlarda BAP ve NAA içeren 9 farklı besin ortamı kombinasyonunda kültüre alınmıştır.

Besin ortamına dikildikten 7-9 gün sonra eksplantlarda meydana gelen şişme ve büyümler gelişme olarak belirlenmiş (Şekil 4.1) ve gelişme gösteren eksplant sayıları kaydedilmiştir (Çizelge 4.1). Gelişme ve büyüme gösteren eksplantların tamamından sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır.



Şekil 4.1. Rejenerasyon ortamına dikilen (a) kotiledon ve (b) hipokotil eksplantlarında dikimden 7 gün sonra meydana gelen şişmeler.

Farklı besin ortamı kombinasyonlarının eksplant gelişimi ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi Çizelge 4.1’ de verilmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde, ortam bileşimi ve eksplant tipine göre gelişme gösteren eksplant sayısı ve sürgün rejenerasyon oranı (%) yönünden önemli farklılıklar olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Besin ortamlarına katılan farklı konsantrasyonlardaki BAP ve NAA'nın eksplant gelişimi ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Ortam	Büyüme düzenleyiciler (mg/l)		Eksplant tipi	Dikilen eksplant sayısı (adet)	Gelişme gösteren eksplant sayısı (adet)	Rejenerasyon olan eksplant sayısı	Sürgün Rejenerasyon oranı (%)
	BAP	NAA					
MS1	0.5	0	Kotiledon	12	11	11	91.6
			Hipokotil	12	10	10	83.3
MS2	0.5	0.05	Kotiledon	12	6	6	50.0
			Hipokotil	12	10	10	83.3
MS3	0.5	0.1	Kotiledon	12	7	7	58.3
			Hipokotil	12	11	11	91.6
MS4	1.0	0	Kotiledon	12	10	10	83.3
			Hipokotil	12	11	11	91.6
MS5	1.0	0.05	Kotiledon	12	9	9	75.0
			Hipokotil	12	10	10	83.3
MS6	1.0	0.1	Kotiledon	12	5	5	41.6
			Hipokotil	12	11	11	91.6
MS7	2.0	0	Kotiledon	12	5	5	41.6
			Hipokotil	12	12	12	100
MS8	2.0	0.05	Kotiledon	12	8	8	66.0
			Hipokotil	9	9	9	75.0
MS9	2.0	0.1	Kotiledon	12	11	11	91.6
			Hipokotil	12	7	7	58.3

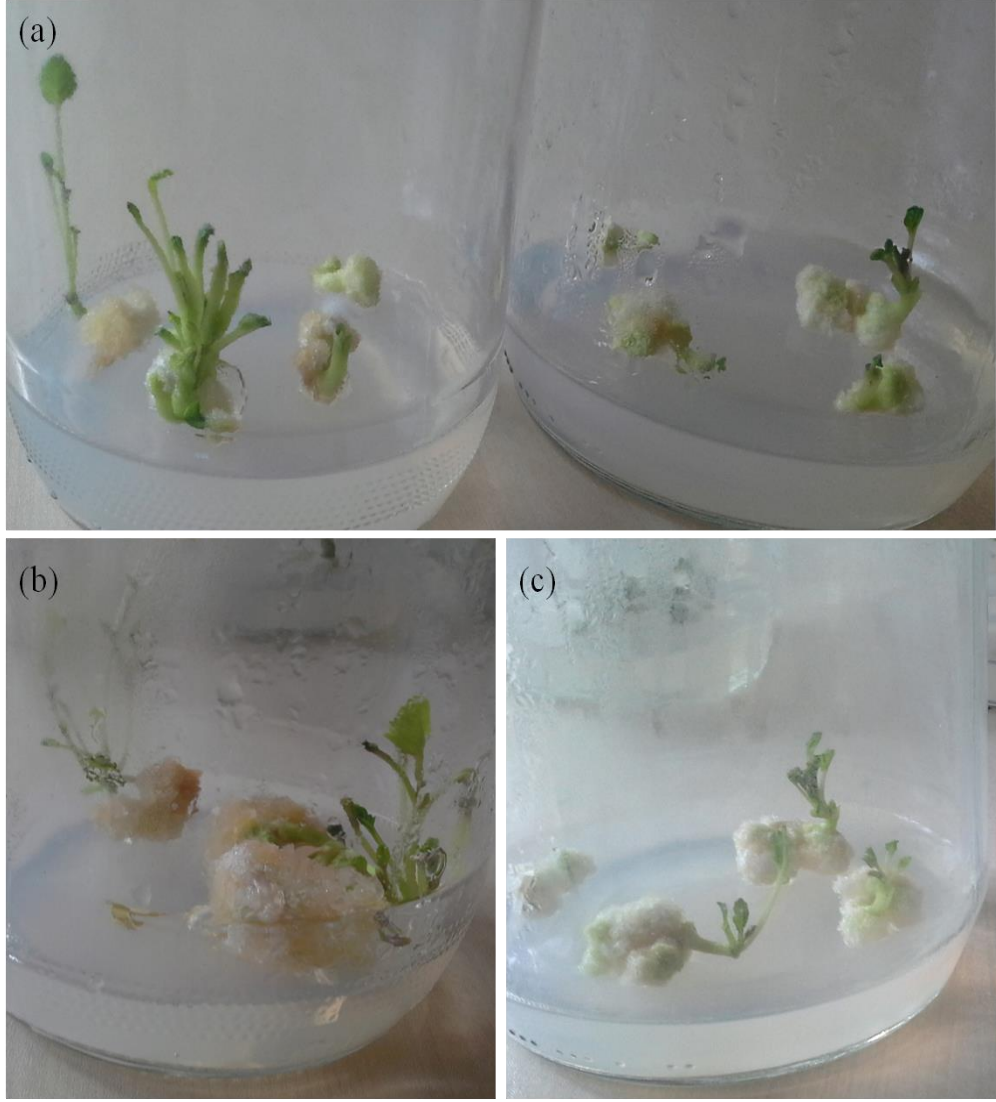
Yine Çizelge 4.1'den anlaşılabacağı üzere, eksplant gelişimi ve sürgün rejenerasyonu açısından MS1 (0.5 mg/l BAP) ve MS9 (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamları hariç hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha başarılı olduğu görülmektedir.

Hipokotil eksplantlarında MS7 ortamında (2 mg/l BAP) eksplantların tamamı gelişme gösterirken (%100), bunu %91.6 rejenerasyon oranı ile MS6 (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), MS4 (1 mg/l BAP) ve MS3 (0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamları, 10 eksplant gelişme % 83.3 rejenerasyon oran ile MS1 (0.5 mg/l BAP), MS2 (0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ve MS5 ortamları (1 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) izlemiştir. %58.3 rejenerasyon oranı ile MS9 (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) en başarısız ortam olmuştur.

Kotiledon eksplantları kullanıldığında ise %91.6 rejenerasyon oranı ile MS1 (0.5 mg/l BAP) ve MS9 (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamları daha başarılı bulunurken, bunu sırasıyla MS4 (%83.3), MS5 (%75) ve MS8 (%66) ortamları izlemiştir. %41.6 rejenerasyon oranı ile MS6 ve MS7 ortamları sürgün rejenerasyonunu açısından daha başarısız bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Doku kültürü çalışmalarında rejenerasyon direkt veya indirekt yolla gerçekleşmektedir. Yaptığımız denemelerde, her iki eksplant tipinde de ortamlara dikilen eksplantlarda sürgün rejenerasyonu direkt veya indirekt rejenerasyon olarak gerçekleşmiştir. Ancak hipokotil eksplantları kullanıldığında tüm ortam kombinasyonlarında ara bir kallus dokusu oluştuktan sonra bu kallus üzerinden indirekt yolla sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir (Şekil 4.2). Kotiledon eksplantlarında ise bazı ortamlarda indirekt yolla rejenerasyon sağlanırken, 3 ortamda (MS1, MS4 ve MS5) hiç kallus oluşmamış ve direkt sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Yine Çizelge 4.2 incelendiğinde, hipokotil eksplantlarından elde edilen kallus oluşum oranlarının (%) kotiledon eksplantlarına göre daha yüksek olduğu ve hipokotil eksplantlarının kallus oluşturmaya daha meyilli olduğu görülmektedir. Hipokotil eksplantlarında kallus oluşum oranı % 41.6 – 100, kotiledon eksplantlarında ise % 0 – 33.3 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.2). Her iki eksplant tipinde de elde edilen kallusların yarı kompakt yapılı, krem veya beyaz renkli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hipokotil eksplantlarından kallus üzerinden indirekt sürgün oluşumları; (a) MS3 ortamı (0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), (b) MS6 ortamı (1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), (c) MS8 ortamı (2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA).

Hipokotil eksplantlarında en yüksek kallus oluşumu (%100) MS3 (0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ve MS4 (1 mg/l BAP) ortamlarından elde edilirken, bunu %91.6 oranla MS2 (0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ve MS5 (1 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ortamları izlemiştir. Kotiledon eksplantlarında ise en yüksek kallus oluşumu %33.3 oranla MS8 (2 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ve MS9 (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamlarından elde edilmiş, MS1 (0.5 mg/l BAP), MS4 (1 mg/l BAP) ve MS5 (1 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ortamlarında ise hiç kallus oluşumu gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. MS besisi ortamına katılan farklı konsantrasyondaki BAP ve NAA'nın kallus oluşumu (%) üzerine etkisi

Ortam	Büyümeyi düzenleyiciler (mg/l)		Kallus oluşum oranı (%)	
	BAP	NAA	Hipokotil	Kotiledon
MS1	0.5	0	66.6	0.0
MS2	0.5	0.05	91.6	16.6
MS3	0.5	0.1	100.0	16.6
MS4	1.0	0	100.0	0.0
MS5	1.0	0.05	91.6	0.0
MS6	1.0	0.1	66.6	8.3
MS7	2.0	0	58.3	25.0
MS8	2.0	0.05	41.6	33.3
MS9	2.0	0.1	50.0	33.3

Çizelge 4.3'de ise farklı ortam bileşimi ve eksplant tiplerinin, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna etkisi verilmiştir. Çizelge 4.3 incelendiğinde eksplant tipi ve ortam bileşimine göre eksplant başına elde edilen sürgün sayısı açısından istatistiki olarak önemli farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Eksplant başına sürgün sayısı açısından hipokotil eksplantları kotiledon eksplantlarına göre daha başarılı bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Hipokotil eksplantlarında ortam tiplerine göre eksplant başına sürgün sayısı yönünden görülen farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3). Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı MS4 (5.25 sürgün/eksplant) ortamından elde edilirken, bunu sırasıyla aynı istatistiki grup içinde yer alan MS3 (4.42 sürgün/eksplant), MS6 (4.33 sürgün/eksplant) ve MS7 (4.33 sürgün/eksplant) ortamları izlemiştir. MS9 ortamı ise eksplant başına sürgün sayısı açısından en başarısız ortam olmuştur (Çizelge 4.3). Şekil 4.3'de hipokotil eksplantlarından gelişmeye başlayan sürgünler, Şekil 4.4'de ise hipokotil eksplantlarından indirekt yolla sürgün rejenerasyonları görülmektedir.

Çizelge 4.3. MS besisi ortamına katılan farklı konsantrasyondaki BAP ve NAA'nın eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün boyuna etkisi

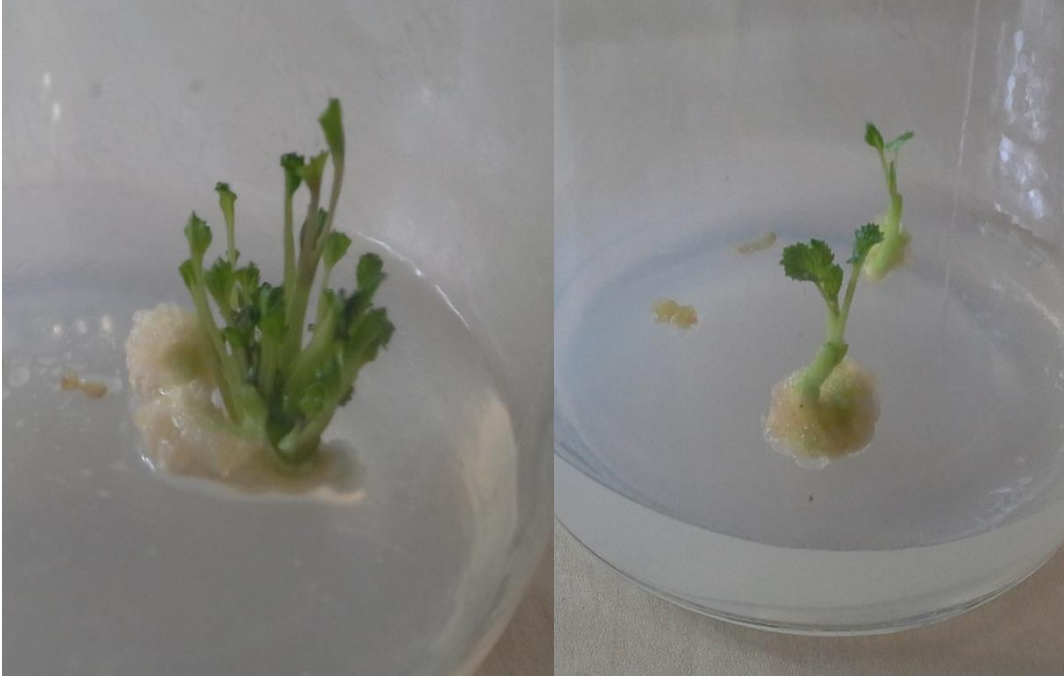
Ortam	Büyümeyi düzenleyiciler (mg/l)		Sürgün sayısı /eksplant		Sürgün boyu (cm)	
	BAP	NAA	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon
MS1	0.5	0	3.16 bc	2.92 ab	1.83 bc	2.33 a
MS2	0.5	0.05	3.75 b	0.66 c	3.80 a	1.60 ab
MS3	0.5	0.1	4.42 ab	0.75 c	2.60 ab	1.60 ab
MS4	1.0	0	5.25 a	2.58 b	2.0 bc	1.63 ab
MS5	1.0	0.05	2.42 cd	1.16 c	1.53 bc	1.66 ab
MS6	1.0	0.1	4.33 ab	0.41 c	2.60 ab	1.0 b
MS7	2.0	0	4.33 ab	0.75 c	2.03 bc	1.40 ab
MS8	2.0	0.05	2.33 cd	1.36 c	1.83 bc	2.0 ab
MS9	2.0	0.1	1.16 d	3.75 a	1.0 c	2.26 a
LSD.05			1.21	1.09	1.28	1.03

Kotiledon eksplantlarından elde edilen sürgün sayısında istatistiki açıdan dikkate değer bir azalış belirlenmiştir. Kotiledon eksplantlarında en yüksek sürgün sayısı MS9 (3.75 sürgün/eksplant) ortamından elde edilirken, bunu MS1 (2.92 sürgün/eksplant) ve MS4 (2.58 sürgün/eksplant) ortamları takip etmiştir. Diğer ortam kombinasyonlarında elde edilen sürgün sayısı düşük olmuş ve aralarındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3).

Sürgün boyları değerlendirildiğinde, hipokotil eksplantlarından gelişen sürgünlerde sürgün boyu 1.0 – 3.8 cm arasında değişim göstermiştir. En yüksek sürgün boyu MS2 (3.8 cm) ortamından elde edilirken, bunu MS3 (2.60 cm) ve MS6 (2.60 cm) ortamları izlemiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. Hipokotil eksplantlarından sürgün oluşumlarının başlaması.



Şekil 4.4. Hipokotil eksplantlarından indirekt yolla sürgün oluşumları.

Kotiledon eksplantlarından gelişen sürgünlerde ise sürgün boyu 1.0-2.33 cm arasında değişim gösterirken, en yüksek sürgün boyu MS1 (2.33 cm) ve MS9 (2.26 cm) ortamlarından elde edilmiştir. Diğer ortam kombinasyonlarında sürgün boyları arasında görülen farklılık istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3).

Şekil 4.5’de *in vitro* sürgün rejenerasyonu denemelerinden genel görüntü, Şekil 4.6’da kotiledon eksplantlarından gelişmeye başlayan sürgünler, Şekil 4.7’de ise kotiledon eksplantlarından direkt sürgün oluşumları görülmektedir.



Şekil 4.5. Sürgün çoğaltım ortamında *in vitro* gelişen lahana bitkicikleri.



Şekil 4.6. Kotiledon eksplantlarından sürgün oluşumlarının başlaması.



Şekil 4.7. Kotiledon eksplantlarından direkt sürgün oluşumları; (a) MS1 ve MS9 ortamı, (b) MS9 ortamı (2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), (c) MS1 ortamı (0.5 mg/l BAP).

4.2. *In vitro* Kök Rejenerasyonu Deneme Bulguları

Yaklaşık 1 ay sonra sürgün rejenerasyon ortamından alınan sürgünler 1/2 MS ortamında farklı konsantrasyonlarda IBA (0 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l ve 1.5 mg/l) içeren köklendirme ortamlarına alınmıştır. Sürgün rejenerasyon ortamında çoğaltımı sağlanan bitkicikler, köklendirme ortamına aktarılmadan önce laminar flow kabin içinde tek tek sürgünlerine ayrılmış, uzayan sürgünlerde gerekli kısaltma ve kesme işlemleri yapıldıktan sonra köklendirme ortamına dikilmiştir (Şekil 4.8). Köklendirme ortamına alınan sürgünler ise Şekil 4.9’da görülmektedir.



Şekil 4.8. Sürgün rejenerasyon ortamında çoğaltımı sağlanan bitkiciklerin köklendirme ortamına alınması için hazırlanması.



Şekil 4.9. Köklendirme ortamına alınmış *in vitro* sürgünler.

Farklı konsantrasyonlardaki IBA'nın sürgün başına elde edilen kök sayısı, kök uzunluğu ve rejenerasyon oranı üzerine etkisi Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde, sürgün başına en yüksek kök sayısının (14.16 adet) 0.5 mg/l IBA

dozundan elde edildiği görülmektedir. Diğer dozlarda ise sürgün başına kök sayısı azalış gösterirken, dozlar arası görülen farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.4. 1/2 MS besi ortamına katılan farklı konsantrasyondaki IBA'nın köklenme üzerine etkisi

Büyümeyi düzenleyici (mg/l)	Kök sayısı /sürgün	Kök uzunluğu (cm)	Rejenerasyon oranı (%)
IBA			
0	8.50 b	2.35 a	100
0.5	14.16 a	1.82 ab	100
1.0	8.30 b	1.78 ab	83.3
1.5	8.16 b	1.56 b	66.6
LSD.05	1.84	0.66	

Kök uzunluğu yönünden ise hiç hormon katılmamış kontrol grubundan daha yüksek sonuç alınırken, artan IBA dozlarının kök uzunluğu üzerine olumlu etkisi bulunmamıştır. Ayrıca kontrol ve 0.5 mg/l IBA dozunda %100 oranla kök rejenerasyonu sağlanırken, diğer dozlarda rejenerasyon oranında azalma görülmüştür (Çizelge 4.4). Şekil 4.10'da ise köklendirme ortamına alınan sürgünlerde kök oluşumları görülmektedir.



Şekil 4.10. Köklendirme ortamındaki bitkiciklerde kök oluşumları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmanın temel amacı, *Brassica* cinsi içinde yer alan Van ve çevresinde yetiştirilen yöreye özgü bir popülasyon olan Erciş baş lahanası popülasyonunda *in vitro* rejenerasyon olanaklarını araştırmaktır. Ayrıca bu çalışma, Erciş lahanası üzerinde doku kültürü alanında yapılmış ilk çalışma olmasından dolayı, çalışmadan elde edilen sonuçlar ile ileride bu popülasyon üzerinde gerek genetik çalışmalar gerekse doku kültürü alanında çalışacak olan araştırmacılara yol gösterilmiş olacaktır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar ayrı başlıklar altında tartışılmıştır.

5.1. Hipokotil Eksplantlarından *in vitro* Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine ortam bileşimi olarak BAP (0.5 mg/l, 1.0 mg/l , 2.0 mg/l) ve NAA'nın (0 mg/l, 0.05 mg/l, 0.1 mg/l) 9 kombinasyonu ve farklı 2 eksplant tipi (kotiledon ve hipokotil) denenmiştir.

Lahanalarda yapılan birçok çalışmada ortam bileşimi ve eksplant tipinin sürgün rejenerasyonu üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (Munshi ve ark., 2007; Pavlovic ve ark., 2010; Mollica ve ark., 2011). *Brassica* türlerinde yapılan literatür taramalarında sürgün rejenerasyon oranı açısından hipokotil eksplantlarının diğer eksplant tiplerine oranla daha başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Dai ve ark., 2009; Pavlovic ve ark., 2010; Ravanfar ve ark., 2009; Ghnaya ve ark., 2008; Misikita ve ark., 1989; Yawen ve ark., 1998; Khan ve ark., 2002; Jonoubi ve ark., 2004). Bizim çalışma sonuçlarımız da bu literatürleri destekler nitelikte bulunmuş, hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu açısından daha başarılı sonuçlar alınmıştır.

Çalışmamızda hipokotil eksplantlarında 2 mg/l BAP içerikli ortamda (MS7) eksplantların tamamı gelişme gösterirken (%100), bunu %91.6 rejenerasyon oranı ile 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS3), 1 mg/l BAP (MS4) ve 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS6) ortamları takip etmiştir (Çizelge 4.1.). En düşük sürgün rejenerasyon ise %58.3 oranıyla 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS9) ortamından elde edilmiştir. Ancak *in vitro* sürgün rejenerasyonu çalışmalarında etkili besin ortamı bileşimi tür hatta aynı tür içindeki çeşit ve genotiplere göre büyük farklılık göstermektedir. Nitekim farklı *Brassica* türlerinde yapılmış olan çalışmalarda da gerek ortam bileşimi gerekse

kullanılan eksplant tipi yönünden sürgün rejenerasyonu yönünden farklı sonuçlar alınmıştır. Örneğin; hipokotil eksplantlarının kullanıldığı kırmızı baş lahanası, Savoy lahanası, karnabaharda optimum sürgün rejenerasyon ortamının MS + BA (1.0 mg/l) + IBA (0.1 ve 0.2 mg/l) (Pavlovic ve ark. 2010), süs lahanasında (*Brassica oleracea* var. *acephala*) %76.1 oranla MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA (Dai ve ark. 2009), brokolide (*Brassica oleracea* subsp. *italica* cv. Green Marvel) %96.7 oranı ile MS + 3 mg/l BAP ortamından (Ravanfar ve ark. 2009) elde edildiği saptanmıştır. Ghnaya ve ark. (2008), *Brassica napus* L.'da en iyi sonucun 3 mg/l BAP, 0.3 mg/l NAA takviyeli MS ortamından, Misikita ve ark. (1989) ise *Brassica oleracea* var. *truncata* Bailey'de MS + 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. Yawen ve ark. (1998), *Brassica alboglabra*'nın 3 çeşidinde hipokotil eksplantları kullanarak yürüttükleri çalışmada, sürgün rejenerasyon başarısının çeşitlere göre değişmekle birlikte MS + 2mg/l BA, MS + 0.3 mg/l NAA + 2 mg/l BA ortamından, MS + 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l BA ortamlarından elde edildiğini ifade etmişlerdir. Farklı türlerde yapılmış olan bu çalışmalar dikkate alındığında hipokotil eksplantlarında etkili sürgün rejenerasyon ortamının türlere göre farklılık gösterdiği, genellikle BAP'ın 1.0 - 3.0 mg/l, NAA'nın ise 0 - 0.3 mg/l arasındaki dozlarının kullanıldığı belirlenmiştir. Bu dozlar tür farklılığından dolayı uyumlu olmadığından, baş lahanada yapılmış olan çalışma sonuçları (Munshi ve ark., 2007; Gerszberg ve ark., 2015) dikkate alınmıştır. Munshi ve ark. (2007), baş lahanada sürgün rejenerasyonu üzerine MS ve 1/2 MS ortamında BAP'ın (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) dozlarını denedikleri çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyonunun 1/2 MS ortamında 0.5 mg/l dozundan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu nedenle baş lahanada yapılmış olan bu iki çalışma sonuçları dikkate alınarak deneme programımıza daha düşük dozlardaki BAP konsantrasyonları (0.5 – 2.0 mg/l) modifiye edilerek alınmıştır.

Çalışmamızda hipokotil eksplantları kullanıldığında, eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 5.25 sürgün adet 1 mg/l BAP içeren MS4 ortamından elde edilmiştir. 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS9) içeren ortam ise en başarısız ortam (1.16 sürgün/eksplant) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Hipokotil eksplantlarında en yüksek sürgün boyu MS ortamında 0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA (MS2) içeren ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Munshi ve ark. (2007), baş lahanada hipokotil eksplantlarını kullandıkları çalışmada MS ortamında BAP'ın (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l)

dozlarını kullandıklarında eksplant başına sürgün sayısının 2-4 adet arasında değiştiğini, 1/2 MS ortamında aynı BAP dozlarını kullandıklarında ise 5-12 adet arasında sürgün elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bano ve ark.(2010) tarafından *Brassica juncea*'da yapılan çalışmalarda, hipokotil ve kök eksplantlarından kallus oluşumunun diğer ekplant tiplerine oranla daha yüksek olduğunu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da tüm besin ortamı bileşimlerinde hipokotil eksplantlarından kallus oluşum oranı, kotiledon eksplantlarına oranla daha yüksek bulunmuştur. Araştırma sonuçlarımızda hipokotil eksplantlarında kallus oluşum oranı %50-100 arasında değişim göstermiştir. MS2 (0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA), MS3 (0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA), MS4 (1.0 mg/l BAP) ve MS5 (1.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA), ortamları kallus oluşumu yönünden başarılı bulunurken, diğer ortam bileşimlerinde kallus oluşumunun belirgin olarak azalış gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

5.2. Kotiledon Eksplantlarından *in vitro* Sürgün Rejenerasyonu

Çalışmamızda kotiledon eksplantlarında, sürgün rejenerasyonu açısından 0.5 mg/l BAP (MS1) ve 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS9) içeren ortamlar en başarılı ortamlar olurken, bu ortamları 1 mg/l BAP (MS4) ve 1 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA (MS5) ortamları izlemiştir. En düşük sürgün rejenerasyonları ise %41.6 oranla 2 mg/l BAP (MS7) ve 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS6) ortamlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Yine kotiledon eksplantlarında sürgün rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda da başarı oranının türlere göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir. 4 farklı mustard çeşidinde maksimum sürgün rejenerasyonunun MS + 3.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l AgNO₃ (Başak ve ark., 2012), brokolide MS + 2.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA (Kumar ve Srivastava, 2015), *B. juncea*'da MS + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 10 mg/l AgNO₃ (Thakur ve ark., 2013) ortamlarından elde edilmiştir. Sharma ve ark. (2014) tarafından baş lahanada yapılan çalışmada ise; MS + 1.5 mg/l BAP + 0.50 mg/l NAA ve MS + 2 mg/l BAP + 0.25 mg/l IAA ortamlarının rejenarasyon yönünden daha başarılı olduğunu belirtilmektedir.

Farklı araştırmacıların farklı *Brassica* türlerinde yaptıkları çalışmalarda kotiledon eksplantlarından sürgün rejenerasyon çalışmalarında genellikle BAP' ın (1.0 – 3.5 mg/l), NAA' nın (0.1-0.5 mg/l) farklı dozlarının kullanıldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kotiledon eksplantlarından eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (3.75 adet) 2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA (MS9) ortamından sağlanırken, bunu MS1 (0.5 mg/l BAP) ve MS4 (1 mg/l BAP) ortamları izlemiştir (Çizelge 4.3).

Deneme sonuçlarımıza göre kotiledon eksplantlarından kallus oluşum oranı % 0-33.3 arasında değişim göstermiştir. MS7 (2.0 mg/l BAP), MS8 (2.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA) ve MS9 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamlarında kallus oluşum oranı daha yüksek bulunurken, diğer ortam kombinasyonlarında kallus oluşum oranı oldukça düşük bulunmuştur (Çizelge 4.2).

5.3. *In vitro* Kök Rejenerasyonu

Farklı *Brassica* türlerinde yürütülen birçok çalışmada köklendirme ortamı olarak genellikle IBA (0 – 1.0 mg/l) veya NAA'nın (0.1 – 4.0 mg/l) farklı dozları kullanılmış ve elde edilen sonuçlar başarılı olmuştur (Peng-fang ve ark., 2003; Hazrat ve ark., 2007; Munshi ve ark., 2007; Ravanfar ve ark., 2009; Abrha ve ark., 2013; Alam ve ark., 2013; Sharma ve ark., 2014; Kumar ve Srivastava, 2015; Gerzberg ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda da yapılmış olan bu literatür bildirişleri dikkate alınarak 1/2 MS köklenme ortamında 4 farklı IBA (0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/l) dozunun *in vitro* kök rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Denememizden elde ettiğimiz sonuçlarda en başarılı kök rejenerasyonu sonuçları, hiç hormon katılmamış kontrol grubu ve 0.5 mg/l IBA katılmış ortamdan elde edilmiştir. IBA dozunun 0.5 mg/l'nin üzerine çıkması sürgün başına elde edilen kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenme oranı üzerine olumlu etki yapmamıştır. Bu nedenle ileride bu tür üzerinde yapılacak köklenme çalışmalarında yüksek IBA dozlarının denenmesinin faydalı olmayacağı kanısına ulaşılmıştır.

Sonuç olarak; baş lahananın Erciş genotipinde ilk defa yürütülen bu çalışma ile, *in vitro* sürgün ve kök rejenerasyonu için protokol oluşturmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda her iki eksplant tipinden de (kotiledon ve hipokotil) direkt ya da indirekt yolla sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Hipokotil eksplantlarında sürgün rejenerasyonu bütün besin ortamı kombinasyonlarında indirekt yolla gerçekleşirken, kotiledon eksplantlarından kallus üzerinden sürgün rejenerasyon oranı daha düşük oranda gerçekleşmiştir.

Araştırma sonucunda, sürgün rejenerasyon oranı (%), eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu yönünden eksplant tipleri karşılaştırıldığında tüm ortam

kombinasyonlarında (MS1 ve MS9 hariç) hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

İleride Erciş genotipinde *in vitro* sürgün rejenerasyonu üzerine yapılacak çalışmalarda, 7 günlük steril fidelerden alınan hipokotil eksplantlarının kullanılması, besin ortamında BAP' ın 0.5 – 2.0 mg/l arasındaki dozlarının kullanılarak daha fazla sayıda tekrarlamalı çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır. *In vitro* köklenme açısından ise; ileride yapılacak olan çalışmalarda besin ortamına hiç hormon katılmaması ya da 0.5 mg/l IBA dozunun üzerine çıkılmaması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abrha, G.T., Mekbib, F., Admassu, B., 2013. *In vitro* plant regeneration from callus of hypocotyls and cotyledonary explants in ethiopian mustard (*Brassic carinata* A. Braun), yellow dodolla cultivar. **Asian Journal of Plant Sciences**, **12** (6-8):262-270.
- Alam, S.S., Khalade, L., Al-Forkan, M., 2013. Establishment of regeneration protocol for canola (*Brassica napus* L.). **The Global Journal of Science Frontier Research (C)**. **13** (7-1): 7-11.
- Anonim, 2014. Türkiye İstatistik Kurumu. Web Sitesi: <http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi>. Erişim Tarihi: 18.01.2010.
- Arın L, Şalk A, Deveci M, Polat S (2008). **Özel Sebzecilik**. NKÜ, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Tekirdağ, 488 s.
- Balkaya, A., Yanmaz, R., Apaydın, A., Kar, H., 2005. Morphological characterisation of white head cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata* subvar. *alba*) genotypes in Turkey. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, **33**: 333-341.
- Bano, R., Khan, M.H., Rashid, H., 2010. Callogenesis and organogenesis in three genotypes of *Brassica juncea* affected by explant source. **Pakistan Journal of Botany**, **46** (2): 3925-3932.
- Bayraktar, K., 1970. **Sebze Yetiştirme Cilt II. Özel Sebzecilik**. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir. 163.
- Basak, H., Biswas, B.K., Azad, M.A.K., Arifuzzaman, M., Sharmeen, F., 2012. Micropropagation of mustard (*Brassica* spp.) from leaf explants. **Thai Journal of Agricultural Science**, **45** (2): 75-81.
- Burbulis, N., Blinstrubiene, A., Kupriene, R., Jonytiene, V., Rugienius, R., Staniene, G., 2009. *In vitro* regeneration of *Brassica napus* L. shoots from hypocotyls and stem segments. **Zemdirbyste-Agreiculture**, **96** (3), 176-185.
- Burbulis, N., Blinstrubiene, A., Kupriene, R., 2010. Genotypic and growth regulator effects on shoot regeneration from hypocotyl and stem segment explants of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, **8** (2): 634-637.

- Cardoza, V., Stewart, J.R., 2004. *Brassica* biotechnology: Progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental. Biology-Plant*, **40**: 542–551.
- Cheng, P.K., Lakshmanan, P., Swarup, S., 2001. High frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cycling *Brassica oleracea*. *In Vitro Cellular and Developmental. Biology-Plant*, **37**: 592-598.
- Chamandoosti, F., Azad, H. A., 2012. Somaclonal variation in resistance of canola (*Brassica napus* L.) to sclerotinia stem root. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, **3** (12): 613-617.
- Christey, M.C., Earle, E.D., 1991. Regeneration of *Brassica oleracea* from peduncle explants. *Hortscience*, **26** (8): 1069-1072.
- Cosic, T., Motyka, V., Raspor, M., Savic, J., Cingel, A., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Travnickova, A., Dobrev, P.I., Bohanec, B., Ninkovic, S., 2015. *In vitro* shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*): effects of genotype, explant type and applied cytokinins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **121**: 741-760.
- Cristea, T.O., Prisecaru, M., Calin, M., 2010. Preliminary studies on the influence of exogenous hormonal factors on the “*in vitro*” organogenesis of *Brassica oleracea* L. var. *capitata*. *Studii și Cercetări Biologie*, **18**: 95-98.
- Dai, X.G., Shi, X.P., Ye, Y.M., Fu, Q., Bao, M.Z., 2009. High frequency plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of ornamental kale. *Bilogia Plantarum*, **53** (4): 769-773.
- Daud, N.F.A., Hasbullah, N.A., Azis, N.A., Rasad, F.M., Amin, M.A.M., Lassim, M.M., 2015. *In vitro* regeneration of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* through stems, roots, leaves and petioles culture. *International Conference of Agriculture, Ecological and Medical Sciences*, April 7-8 2015, Phuket Tailanad.
- Gambhir, G., Srivastava, D.K., 2015. Thidiazuran induces high frequency shoot regeneration in leaf and petiole explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Journal of Biotechnology Biomaterials*, **5**: 1.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, **60**: 151-158.

- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., 2015. In vitro regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. *capitata*. ***In Vitro Cellular and Developmental. Biology-Plant***, **51** (1):80-87.
- Ghnaya, A. B., Charles, G., Branchard, M., 2008. Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***, **92**: 25-30.
- Guo, D., Zhu, Z.J., Hu, X.X., Zheng, S.J., 2005. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, **83**: 123-127.
- Günay, A., 2005. ***Sebze Yetiştiriciliği*** Cilt II. Meta yayınevi, İzmir. 531.
- Hachey, E. J., Sharma, K. K., Moloney, M. M., 1990. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. ***Plant Cell Reports*** **9**: 549-554.
- Hazrat, A., Zahir, A., Haidar, A., Sultan, M., Wiqar, A., 2007. In vitro regeneration of *Brassica napus* L., cultivars (star, cyclone and westar) from hypocotyls and cotyledonary leaves. ***Pakistan Journal of Botany***, **39** (4): 1251-1256.
- Hu, Q., Anderson, S.B., Hansen, L.N., 1999. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. ***Plant Cell Tissue Organ Culture***, **59**: 189-196.
- Huang, K., Wu, Q., Lin, J., Zheng, J., 2011. Optimization of a plant regeneration protocol for broccoli. ***African Journal of Biotechnology***, **10** (20): 4081-4085.
- Jonoubi, P., Mousavi, A., Majd, A., Daneshian, J., 2004. Improved *Brassica napus* L. regeneration from hypocotyls using thidiazuran and benzyladenine as cytokinin sources. ***Pakistan Journal of Botany***, **36** (2):321-329.
- Khan, M.R., Rashid, H., Quraishi, A., 2002. Effects of various growth regulators on callus formation and regeneration in *Brassica napus* cv. *Oscar*. ***Pakistan Journal Biological Sciences***, **5** (6):693-695.
- Khan, M. M. A., Arif Hasan, A. B. M., Khan, R., Nazım-Ud-Dowla, M.A.N., Talukder, S. K. Hassan, L., 2010. In vitro regeneration potentiality of *Brassica* genotypes in differential growth regulators. ***Bangladesh Journal Agricultural. Research***, **35** (2): 189-199.

- Klimaszewska, K., Keller, W.A., 1985. High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. ***Plant Cell Tissue Organ Culture***, **4**:183–197.
- Kumar, P., Srivastava, D.K., 2015. High frequency organogenesis in hypocotyl, cotyledon, leaf and petiole explants of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) an important vegetable crop. ***Physiology Molecular Biology Plants***, **21** (2):279-285.
- Memon, S.A., Hou, X., Zhu, B., Wolukau, J.N., 2009. High-frequency adventitious shoots regeneration from leaf of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) cultured in vitro. ***Acta Physiologiae Plantarum***, **31**: 1191–1196.
- Mollika, S.R., Sarker, R.H., Hoque, M.I., 2011. In vitro plant regeneration in *Brassica* spp. ***Plant Tissue Culture and Biotechnology***, **21** (2): 127 - 134.
- Munshi, M. K., Roy, P.K., Kabir, M.H., Ahmed, G., 2007. In vitro regeneration of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) through hypocotyl and cotyledon culture. ***Plant Tissue Culture and Biotechnology***, **17** (2): 131-136.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, ***Physiology Plantarum***, **15**: 473-497.
- Patil, S., Suryapujary, S.M., Lende, S.R., Kamble, P.S., Fulkar, P.L., Kalamkar, V., 2006. Studies on callus culture and regeneration in mustard (*Brassica juncea*). ***Journal Soils and Crops***, **16** (2): 331-334.
- Pavlović, S., Vinterhalter, B., Mitić, N., Adžić, S., Pavlović, N., Zdravković, M., Vinterhalter, D., 2010. In vitro shoot regeneration from seedling explants in *Brassica* vegetables: Red cabbage, broccoli, Savoy cabbage and cauliflower. ***Arch. Biol. Sci.***, **62** (2), 337-345.
- Peng-fang, Z., Li, L., Guang-zhu, Z., 2003. A study on in vitro culture of *Brassica oleracea* var. *acephala*. ***Journal of Shenyang Agricultural University***. 2003-04.
- Rani, T., Yadav, R.C., Yadav, N.R., Rani, A., Singh, D., 2013. Genetic transformation in oilseed Brassicas- A Review. ***Indian Journal of Agricultural Sciences***. **83** (4): 367-73.
- Ravanfar, S. A., Aziz, M. A., Kadir, M., A., Rashid, A. A., Sirchi, M. H. T., 2009. Plant regeneration of *Brassica oleracea* subsp. *italica* (Broccoli) CV green marvel as

- affected by Plant growth regulators. *African Journal of Biotechnology*, **8** (11): 2523- 2528.
- Sharma, S., Gambhir, G., Srivastava, D.K., 2014. High frequency organogenesis in cotyledon and hypocotyl explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Natl. Acad. Sci. Lett.*, **37** (1):5-12.
- Stewart, D., McDougalla, G., 2012. The Brassicas – An Undervalued Nutritional and Health Beneficial Plant Family. <http://www.foodhealthinnovation.co.uk> *Food&Health Innovation Service* (FHIS). Erişim tarihi: 12.08.2015.
- şalk, A., L. Arın, M. Deveci ve S. Polat, 2008. *Özel Sebzeçilik*. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakóltesi, ISBN 978-9944-0786-0-3, İstanbul. 488.
- Thakur, A.K., Sing, B.K., Verma, V., 2013. Direct organogenesis in *Brassica juncea* var. NRCDR-2 and analysis of genetic uniformity using RAPD markers. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, **36** (4): 403-409.
- Xu, Z.H., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1982. Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Science Letters*, **24**: 117-121.
- Vural, H., D. Eřiyok ve İ. Duman, 2000. *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme)*. Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova, İzmir. 440 s.
- Yawen, H., Hong, H., Meilli, H., Yanhua, L., Gengguang, L., 1998. Plant regeneration in vitro from hypocotyl explants of *Brassica alboglabra*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*. 1998-02.
- Yarımoglu, M. 2004. *Bazı Yazlık Kabak (Cucurbita pepo L.) Çeřitlerinde in vitro Bitki Rejenerasyonu*. (yüksek lisans tezi, basılmamış). Kahramanmarař Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmarař.
- Yaşar, F., Türkmen, Ö., Akıncı, İ.E., Karatas, A., 1995. Ercis Yerel Lahanasının Seleksiyon Çalışmaları. **II. Türkiye Bahçe Bitkileri Kongresi**. 3-6 Ekim1995, Adana.
- Zhang, F.-L., Takata, Y., Xu,J.-B., 1998. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of chinese cabbage (*Brassica campestris* L. spp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports*, **17**: 780-786.

ÖZ GEÇMİŞ

1987 yılında Van'ın Gürpınar ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2008 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden 2012 yılında Ziraat mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2013 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2014 yılından itibaren Çaldıran'da özel bir Tarımsal Yayım ve Danışmanlık Şirketi'nde yönetici pozisyonunda çalışmaktadır. Halen bu görevini devam ettirmektedir.