

# Besi Ortamı, Oksin Çeşidi ve Konsantrasyonunun Sarı Sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) Bitkisinin Genç Salkımlarından Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonuna Etkisi

Ersin CAN

Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Hatay - TÜRKİYE

Rüştü HATİPOĞLU

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Adana - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.11.1998

**Özet :** Bu araştırma, besi ortamı, oksin çeşidi ve konsantrasyonunun 15 Sarı Sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) ekopitinin genç salkımlarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisini saptamak amacıyla yapılmıştır.

Araştırmada, 15 farklı sarı sakalotu ekotipinden alınan genç salkımlar iki farklı oksin (2,4-D ve Dicamba) çeşidinin dört farklı konsantrasyonunu (2, 4, 6 ve 8 mg/l) içeren iki farklı temel besi ortamında (LS ve SH) kültüre alınmıştır.

İn vitro kültürde eksplant olarak kullanılan genç salkımların kallus oluşturma oranı ekotiplere bağlı olarak % 9.7 ile % 51.6 arasında, petri kutusu başına kallus ağırlığı 96.6 ile 414.6 mg arasında ve salkım segmenti başına rejeneren olan bitkicik sayısı 0.0 ile 2.2 arasında değişmiştir. Kallus oluşturma, kallus ağırlığı ve bitki rejenerasyon oranı açısından LS temel besi ortamının SH temel besi ortamından daha üstün olduğu, 2,4-D içeren ortamda kültür edilen salkımlardan dicamba içeren ortamda kültür edilenlere oranla daha yüksek kallus oluşturma oranı ve kallus ağırlığı gerçekleşirken, dicamba içeren ortamda daha yüksek bitki rejenerasyon oranı gerçekleştiği saptanmıştır. En yüksek kallus oluşturma oranı ve kallus ağırlığı 4 mg/l 2-4-D konsantrasyonunda gerçekleşirken, en yüksek bitki rejenerasyon oranı 8 mg/l'lik dicamba konsantrasyonundan sağlanmıştır.

## Effects of Different Media, Type and Concentrations of Auxin on Callus Induction and Plant Regeneration from Young Inflorescences of Yellow Bluestem (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng)

**Abstract :** This study was conducted to determine the effects of different media, auxin types and concentrations on callus induction and plant regeneration from young inflorescences of 15 ecotypes of yellow bluestem (*Bothriochloa ischaemum*).

The young inflorescences were cultured on two different basal media (LS and SH) containing different concentrations (2, 4, 6, and 8 mg/l) of two different auxins (2, 4-D and Dicamba).

The results showed that the ecotypes were significantly different from each other in callus induction rate, callus weight per dish and regenerate number per inflorescence segment. Depending on the ecotypes, mean callus induction rate varied from 9.7% 51.6%, mean callus weight per dish from 95.6 to 414.6 mg and number of regenerates per inflorescence segment from 0 to 2.2. LS medium resulted in better callus induction, and callus weight and regeneration than SH medium. While the media with 2,4-D produced higher callus induction and callus weight than those with dicamba, the media supplemented with dicamba produced more regenerates per inflorescence segment than those with 2,4-D. The highest value for both callus induction and callus weight was obtained at 4 mg/l 2,4-D concentration. However, the highest plant regeneration was recorded at 8 mg/l dicamba concentration.

## Giriş

Buğdaygil yembitkileri çok yönlü kullanım alanları ile insan yaşamında büyük öneme sahiptirler. Bu bitkiler bir taraftan hayvan yemi olarak kullanılırlar, diğer taraftan çevre düzenleme ve toprak muhafazası açısından da büyük önem taşırlar.

Sürekli olarak artan dünya nüfusuna yeterli kalite ve kantitede hayvansal ürün sağlayabilmek için yapılması

gerekenlerden birisi de; yüksek kalite ve kantitede yem üreten, belirli çevre koşullarına adaptasyon sağlayan yembitkisi tür ve çeşitlerinin geliştirilmesidir. Bu gereksinim, bir tarım ülkesi olan Türkiye'de daha büyük ölçüde kendini hissettirmektedir. Çünkü, uzun yıllar bilinçsiz bir şekilde yararlanma sonucu dejenere olmuş olan doğal çayır ve meralar sadece Türkiye hayvancılığını değil, aynı zamanda ülkenin toprak ve su kaynaklarını da olumsuz yönde etkilemektedir.

Ülkemizdeki bu sorunun çözümlenebilmesi için, en önemli yenilenebilir doğal kaynaklarımız olan çayır-meralarımızın uygun ıslah yöntemleri ile ıslah edilerek yeniden bol ve kaliteli yem üretir duruma getirilmeleri gerekmektedir.

Bugüne kadar ülkemiz meraları üzerinde sürdürülen mera ıslahı araştırmalarında; dinlendirme veya gübreleme gibi kısa sürede sonuç verecek yöntemlerin başarılı olmadığı (1-3), buna karşılık topografik ve toprak özellikleri toprak işlemeye elverişli olan meralarda doğal mera örtüsünün sürülerek, yerine bölgenin ekolojik koşullarına uyum göstermiş bitkilerden oluşan yem bitkileri karışımlarının ekilmesi yönteminin başarılı olduğu ortaya çıkmıştır (4).

Ancak, bu tip meraların ıslah çalışmalarında yapılacak işlemin başarısını; vejetasyonunun zenginleştirilmesinde kullanılan yem bitkileri önemli ölçüde etkilemektedir. Herşeyden önce bu türlerin ıslah işleminin sürdürüldüğü bölgenin ekolojik koşullarına çok iyi adapte olmuş, mevcut mera koşullarında bol ve kaliteli yem üretecek türler olması gerekmektedir.

Ülkemizde yıllardır sürdürülen yem bitkisi araştırmalarına rağmen, ekolojik koşullar açısından büyük farklılıklar gösteren bölgelerimizin her biri için adapte olduğu saptanmış yem bitkisi türleri ve bunların tohumlarını bulmak oldukça güçtür. Bu nedenle, öncelikle muhtelif ekolojik bölgelerimizde mera ıslahı ve tarla yem bitkileri yetiştiriciliğinde kullanılabilecek yem bitkisi tür ve çeşitlerinin ortaya konması ve bunların yeterli miktarda tohumlarının üretilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda bu bitkilerde *in vitro* kültür tekniklerinin uygulanması ile ıslah sürecinin kısaltılabilmesi için uluslararası alanda büyük çabalar harcanmaktadır. Buğdaygil yem bitkileri ıslahında *in vitro* kültür tekniklerinin; özellikle varyasyon meydana getirilmesi, arzu edilen varyantların selekte edilmesi ve bu varyantların hızlı bir şekilde çoğaltılmasında kullanılabileceği üzerinde durulmaktadır (5). Buğdaygil yem bitkilerinde *in vitro* kültür tekniklerinin uygulanmasına yönelik araştırmalar 1950'li yıllarda başlamış olmasına karşılık, 1970'li yıllara kadar önemli bir başarı elde edilememiştir (6). Özellikle 1980'li yıllarda farklılaşmamış meristem hücrelerini içeren doku ve organların *in vitro* kültürde eksplant olarak kullanılması ve besi ortamlarına farklı büyüme düzenleyicilerinin ilave edilmesi ile büyük gelişmeler sağlanmıştır. Bugüne kadar

sürdürülen araştırmalarda çok sayıda buğdaygil yem bitkisi türü için uygun eksplantlardan kallus aracılığı ile bitki rejenerasyon sistemi geliştirilmiştir (5, 6). Bu türler arasında *Andropogon* (sakalotu) cinsine ait türler de bulunmaktadır. Aynı oymakta yer alan *Hyparrhenia hirta* (L) Stapf bitkisinin *in vitro* kültüründe 2-20 mm uzunluğundaki açık sarı renkli genç salkımların, embriyogenik kallus kültürlerinin elde edilmesinde eksplant olarak kullanılabileceği saptanmıştır (7). Yine, *Bothriochloa ischaemum* (L) Keng) (sarı sakalotu) bitkisinde somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu ve embriyolardan süspansiyon kültürlerinin oluşturulduğu bildirilmektedir (8). Elde edilen bu başarılı sonuçlara karşılık, diğer buğdaygil yem bitkilerinde olduğu gibi sarı sakalotu bitkisinde de birçok problem mevcuttur. Herşeyden önce, bir türün farklı genotipleri *in vitro* kültürde farklı sonuçlar vermekte, bir genotip için uygun olduğu saptanan kültür koşulları diğer bir genotipte aynı derecede başarılı olamamaktadır (9-11).

Bu araştırmada; Çukurova Bölgesi meralarında yaygın olarak bulunan sarı sakalotu bitkisinin genç salkımlarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotip, besi ortamı, oksin çeşidi ve konsantrasyonunun etkileri araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

1985 yılında Çukurova Üniversitesi kampüsü içerisinde doğal meralardan toplanarak klon halinde Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma alanına dikilmiş olan 15 ayrı Sarı Sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) ekotipinin her birisinden alınan beş klon bitkisi doku kültürü araştırmalarında kullanılmak üzere, 2 kısım tarla toprağı+1 kısım kum+1 kısım çiftlik gübresi ile doldurulmuş 13x13x13 cm boyutlarındaki saksılara şaşırtılmıştır. Bitkiler haftada bir kez % 8 N+ %8 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> içeren sıvı gübre solusyonunun % 1'lik çözeltisi ile gübrelenmiş ve yeterince sulanarak sera koşullarında yetiştirilmiştir.

Şaşırtılan donor bitkilerde bayrak yaprağı görünme safhasında olan sürgünler kesilmiş ve kesilen sürgünlerin dış yaprakları uzaklaştırılmıştır. Bu sürgünler, içerisinde bir miktar su bulunan ağzı kapaklı cam şişelere yerleştirilerek, bir gece +4°C'de muhafaza edilmiştir. Soğuk uygulanan sürgünler steril kabin içerisinde önce % 96'lık alkol ile 2 dakika, daha sonrada % 10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dakika süre ile yüzey

sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra sürgünler 4 kez steril destile su ile yıkanmıştır. Sterilize edilen sürgünlerden binoküler altında 5-20 mm boyundaki genç salkımlar çıkartılmış ve 5 mm'den büyük salkımlar skalpel yardımıyla 5'er mm lik segmentlere ayrılmıştır. Daha sonra, her salkım 60x15 mm boyutlarındaki steril petri kutusu içindeki katı kallus indüksiyon ortamı üzerine yerleştirilmiştir. Kallus oluşturma ortamı olarak, iki farklı oksin çeşidi (2,4-D -2,4-diklorofenoksiasetikasit ve Dicamba - 3,6 dikloro-2 metoksibenzoikasit) ve bunların 4 farklı konsantrasyonlarının (2, 4, 6 ve 8 mg/l) ilave edildiği Linsmaier ve Skoog (LS) (12) ve Schenk ve Hildebrant (SH) (13) olmak üzere iki farklı temel besi ortamı kullanılmıştır. LS ortamına 30 g sakkaroz ve 10 g agar, SH ortamına ise 30 g sakkaroz ve 9 g agar ilave edilmiştir. LS ortamının pH'sı 5.8'e, SH ortamının pH'sı ise 5.9 ayarlanmıştır. Heriki ortamın agar dışındaki organik bileşenleri steril filtrasyon ile, diğer bileşenleri ise otoklavda sterilize edilmiştir. İçerisinde genç salkımlar bulunan petri kutuları kenarları parafilm ile kapatıldıktan sonra iklim dolabında 25°C'de karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

4 Haftalık bir inkübasyon süresi sonunda, her petri kutusu içerisinde oluşan kalluslar tartılarak, bitki rejenerasyonu için yeni bir besi ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamı olarak; oksin içermeyen LS ve SH ortamı kullanılmıştır. Kültürler 10 gün süre ile kallus oluşum koşullarında muhafaza edildikten sonra, 25°C sıcaklık, 2000 lüks aydınlatma ve 16/8 saat gündüz-gece ritmi koşullarının sağlandığı iklim odasına aktarılmıştır.

Petri kutuları içerisinde kök ve sürgünlü bitkicikler oluştuğundan sonra, her petri kutusu içerisinde oluşan bitkicikler kaydedilmiştir. Sayımı yapılan bitkicikler içerisinde 30 ml gelişme ortamı bulunan 12,5x5 cm cam tüplere aktarılmıştır. Gelişme ortamı olarak; 1/2 LS ve SH besi ortamları, 20 g/l Sakkaroz ve LS besi ortamı için 10 g/l, SH besi ortamı için de 9 g/l agar kullanılmıştır. Cam tüpler, 25°C sıcaklık, 2000 lüks aydınlatma ve 16/8 saat gündüz-gece ritmi koşullarında muhafaza edilmiştir. Gelişme tüplerindeki bitkicikler 8-10 cm boya eriştikten sonra 7x7x8 cm saksılara aktarılmıştır. Saksılara şaşırtılan bitkiler bir hafta süre ile plastik örtü altında muhafaza edilerek, ortama adaptasyonları sağlanmıştır.

Araştırmada elde edilen verilere Steel ve Torrie (14) tarafından açıklanan, tesadüf bloklarında 4 faktörlü bölünmüş parseller deneme desenine uygun olarak MSTAT-C istatistik programından yararlanılarak varyans

analizi uygulanmıştır. Varyans analizi uygulanmadan önce, Kallus oluşturma oranı değerlerine Arcsin  $\sqrt{x}$  transformasyonu, bitki rejenerasyon oranı değerlerine  $\sqrt{x+0,5}$  transformasyonu uygulanmıştır. Varyans analizi sonucu önemli çıkan ekotip ortalamaları Duncan testine, besi ortamları ve oksin çeşitleri t-testine, oksin konsantrasyon ortalamaları LSD testine göre gruplandırılmıştır.

### Araştırma Bulguları ve Tartışma

Kültür başlangıcından bir hafta sonra salkım segmentlerinin kesilme bölgelerinde, salkım eksenlerinde ve çiçek organlarında şişme gözlenmiştir. Kültürün 15. gününde ise; çiçek segmentlerinin ve dış kavuzların uzadığı, kılçıklarda hafif bir uzamanın meydana geldiği ve çiçek primordialarının belirgin bir şekilde şişkinleştiği izlenmiştir. Ayrıca, bazı segmentlerin kesim yerlerinde ve başakçıkların salkım eksenine bağlanma yerlerinde kallus oluşmuştur.

Kültür başlangıcından üç hafta sonra oluşan kalluslarda belirgin bir büyüme görülmüştür. Dört haftalık kültür süresi sonunda, kültürlerin büyük bir çoğunluğunun tamamıyla embriyogenik kallus oluşturduğu ve embriyoidlerin belirginleştiği gözlenmiştir (Şekil 1).

Sarı sakalotu bitkisinin genç salkımlarından kallus oluşumu ile ilgili gözlemler, Artunduaga ve ark. (15)'in aynı bitkinin genç salkım segmentlerinden kallus oluşumu ile ilgili gözlemlerini desteklemektedir. Ayrıca, Franklin (16), Franklin ve ark. (17)'nin *Bothriochloa caucasica* bitkisi tohumlarının, Shatters ve ark. (18)'nin *Paspalum notatum* bitkisi yaprak sapı kesitlerinin ve Kostina ve ark. (19)'nin sorgum ve sudanotu bitkisinin olgunlaşmamış embriyoları ve genç salkımlarının *in vitro* kültüründe de benzer reaksiyonlar gözlemişlerdir.

Diğer taraftan, Metzinger ve ark. (20) aynı bitkinin genç salkımlarından embriyogenik olmayan kallus oluşumunu, ayrıca Johnson ve Worthington (8) bu bitkinin olgun tohumlarından hücre süspansiyon kültürü ile elde ettikleri kallusun embriyogenik, embriyogenik olmayan ve karışık yapıda hücreleri içerdiklerini gözlemişlerdir. Araştırmamızda ise, sadece açık sarı renkte sıkı yapıda kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu duruma neden olarak, Bregitzer (21)'in de bildirdiği gibi araştırmalarda kullanılan genotiplerin ve besi ortamlarının farklılığı gösterilebilir.



Şekil 1. Oluşan Kalluslarda Embriyoid Oluşumu (Kültür başlangıcından dört hafta sonra).

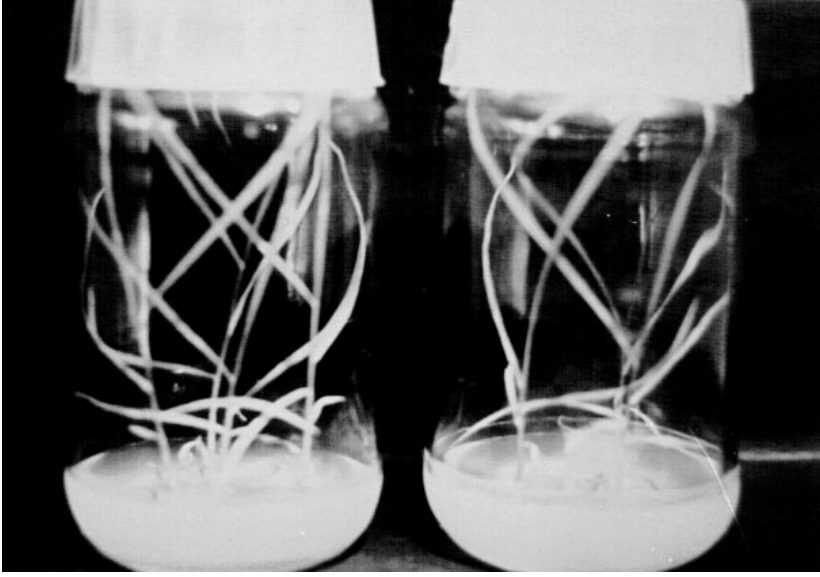
Kültür başlangıcından 5 hafta sonra oluşan embriyogenik kalluslar kallus oluşum ortamından rejenerasyon ortamına aktarılacak hale gelmiştir. Embriyogenik kalluslardan rejenerasyon ortamında karanlık koşullarda 7-10 gün içinde bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Rejenerasyon ortamında oluşan bitkiciklerde, ışıklı ortamda 3-4 gün içinde yeşil renk oluşumu gözlenmiştir. 3 haftalık süreç sonunda, kültürler yaklaşık olarak 10 mm boylanmıştır (Şekil 2). Gelişme

ortamına aktarılan bitkicikler dört haftalık kültür sonunda saksıya şaşırtılabilecek büyüklüğe erişmiştir (Şekil 3). Saksılara şaşırtılan bitkiler bir hafta süre ile serada plastik örtü altında bırakılarak ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Bununla birlikte bazı rejeneratlar ölmüşlerdir. Daha sonra, sera koşullarında bitkicikler gümrah bir gelişme göstererek bol miktarda kardeşlenmişlerdir (Şekil 4).



Şekil 2. Rejenerasyon Ortamında 10 mm Kadar Boylanan Bitkicikler (Kültür başlangıcından 8 hafta sonra).





Şekil 3. Gelişme Ortamında Saksiya Aktarılabilecek Hale Gelmiş Sakalotu Rejeneratları (Kültür başlangıcından 9 hafta sonra).



Şekil 4. Sarı Sakalotu Bitkisinin Sera Koşullarında Kardeşlenen Rejeneratları (Kültür başlangıcından 12 hafta sonra).

#### Ekotipin Kallus Oluşumu, Kallus Ağırlığı ve Bitki Rejenerasyon Oranına Etkisi

Araştırmada kullanılan farklı sarı sakalotu ekotiplerinde ortaya çıkan kallus oluşturma oranları, kallus ağırlığı ve bitki rejenerasyon oranı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 incelendiğinde, ekotiplere bağlı olarak ortalama kallus oluşturma oranının % 9.7 ile % 51.6 arasında değiştiği görülmektedir. 15 numaralı ekotip, en yüksek kallus oluşturma oranı gösteren ekotip olmuş ve 5, 9, 10, 11, 12, 13 ve 14 numaralı ekotipler de 15 no'lu ekotip ile istatistiki olarak farklı olmayan kallus oluşum oranları göstermiştir. 1, 2, 3, 4, 6 ve 8 numaralı ekotipler daha düşük oranda kallus oluşturma oranı gösterirken, 7 no'lu ekotip en düşük kallus oluşturma oranı göstermiştir. Bu sonuçlar, Metzinger ve ark. (20) ve Artunduaga ve ark. (15)'nin aynı bitki ile ilgili bulgularına benzerlik göstermektedir.

Ekotiplere bağlı olarak ortalama kallus ağırlığının 96,58 ile 414,6 mg/petri kutusu arasında değiştiği görülmektedir. En yüksek kallus ağırlığı 12 numaralı ekotipde oluşurken, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14 ve 15 numaralı ekotipler 12 no'lu ekotipten istatistiki olarak farklı olmayan ortalama kallus ağırlığı meydana getirmişlerdir. 1, 2, 4 ve 8 numaralı ekotiplerde daha düşük kallus ağırlığı oluşurken, en düşük kallus ağırlığının 7 no'lu ekotipde ortaya çıktığı saptanmıştır.

Ekotip No.	Kallus Oluşturma Oranı (%)	Kallus Ağırlığı (mg/petri kutusu)	Bitki Rejenerasyon Oranı (bitki/segment)
1	31.9 bc	278.2 cd	0.80 gh*
2	23.8 c	240.3 d	0.65 h
3	37.2 bc	330.4 abcd	0.68 fgh
4	31.9 bc	278.3 cd	1.08 cde
5	41.6 ab	358.3 abc	2.06 a
6	32.5 bc	316.2 abcd	0.15 j
7	9.7 d	96.58 e	0.00 j
8	32.2 bc	289.5 bcd	1.03 efg
9	40.0 ab	342.3 abcd	1.57 bc
10	41.3 ab	396.6 ab	1.36 bcd
11	43.1 ab	356.6 abc	2.20 a
12	40.3 ab	414.6 a	0.43 hı
13	45.0 ab	385.2 abc	0.87 ef
14	45.0 ab	326.1 abcd	1.04 de
15	51.6 a	404.7 ab	1.35 b
Ortalama	54.7	321.0	1.02

Tablo 1. Farklı Sarı Sakalotu Ekotiplerinde Ortalama Kallus Oluşturma Oranları, Kallus Ağırlığı ve Bitki Rejenerasyon Oranları.

\* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan testine göre  $p \leq 0,05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Araştırmada, farklı sarı sakalotu ekotiplerinin farklı kallus ağırlığı göstermesi ile ilgili bulgular, Gland ve Hatipoğlu (22), Hatipoğlu ve ark. (23), Can ve ark. (24)'nın muhtelif buğdaygillerin genç çiçek salkımlarıyla sürdürdükleri araştırmalarında elde ettikleri araştırma bulgularını desteklemektedir. Diğer taraftan, ekotiplerin ortalama kallus indüksiyon oranı ile ortalama kallus ağırlıkları incelendiğinde; genellikle yüksek kallus oluşturma oranı gösteren ekotiplerin yüksek kallus ağırlığı gösterdiği ortaya çıkmaktadır.

Aynı tabloda; ekotiplere bağlı olarak ortalama bitki rejenerasyon oranının 0.0 ile 2.2 arasında değiştiği görülmektedir. 11 numaralı ekotip ortalama 2.2 bitki rejenerasyon oranı ile en yüksek değeri gösterirken, 5 no'lu ekotip 2.1 bitki rejenerasyon oranı ile 11 no'lu ekotipten istatistiksel olarak farklı olmayan bitki rejenerasyon oranı göstermiştir. 9, 10 ve 15 numaralı ekotipler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olmayan ancak, 5 ve 11 no'lu ekotiplerden daha düşük oranda bitki rejenerasyon oranları göstermiştir. Diğer ekotiplerde ise

salkım segmenti başına ortalama bitki rejenerasyon oranı daha düşük olurken, 7 no'lu ekotipde bitki rejenerasyon gerçekleşmemiştir. Elde edilen bu bulgular, Lörz ve ark. (25), Akashi ve Adachi (26), Hatipoğlu ve Doğramacı (27)'nin muhtelif buğdaygillerle sürdürdükleri araştırma bulgularına benzerlik göstermektedir.

Ekotiplere bağlı olarak bitki rejenerasyon oranının değişmesine neden olarak, ekotiplerin genetik farklılığı gösterilebilir (28).

#### Besi Ortamının Kallus Oluşumu, Kallus Ağırlığı ve Bitki Rejenerasyon Oranına Etkisi

Araştırma bulguları, kullanılan besi ortamlarının ortalama kallus oluşturma oranı, kallus ağırlığı ve bitki rejenerasyon oranına etkilerinin önemli derecede farklı olduğunu göstermiştir. LS besi ortamının ortalama kallus oluşturma oranı, kallus ağırlığı ve bitki rejenerasyon oranı bakımından, SH besi ortamından istatistiksel olarak daha üstün olduğu görülmüştür (Tablo 2). LS besi ortamında kültüre alınan genç salkımların ortalama % 55,5'i

Besi Ortamı	Kallus Oluşturma Oranı (%)	Kallus Ağırlığı (mg/petri kutusu)	Bitki Rejenerasyon Oranı (bitki/segment)
LS	55.5 a	487.1 a	1.88 a*
SH	17.5 b	154.8 b	0.16 b

Tablo 2. Farklı Besi Ortamlarının Ortalama Kallus Oluşturma Oranı, Kallus Ağırlığı ve Rejenerasyon Oranlarına Etkisi.

\* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar t testine göre  $p \leq 0,05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

reaksiyon göstermesine karşılık, SH besi ortamında salkım segmentlerinin % 17,5'i reaksiyon göstermiştir.

Araştırmada kallus indüksiyon oranının besi ortamına bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermesi ile ilgili bulgular, Johnston ve Worthington (8), Metzinger ve ark. (20)'nin aynı bitki ile ilgili, Lörz ve ark. (25), Abd-El Maksoud ve Bedö (29), Hatipoğlu ve Doğramacı (27) buğday anter kültürü ile ilgili, Gendy, ve ark. (30)'nin *Sorghum bicolor*'daki bulgularına benzerlik göstermektedir.

LS besi ortamında kültüre alınan genç salkımlardan petri kutusu başına ortalama 478,1 mg kallus ağırlığı elde edilmesine karşılık, SH besi ortamında 154,8 mg olarak gerçekleşmiştir. Bu bulgular; sarı sakalotu salkımlarından kallus oluşumu ve oluşan kallusun büyümesi açısından genellikle LS ortamının SH ortamına göre daha üstün olduğunu göstermektedir.

LS besi ortamında kültüre alınan genç salkımlardan segment başına ortalama 1.9 bitki rejenerasyonu gerçekleşmesine karşılık, SH besi ortamında bu oran 0,2 olmuştur. Dolayısıyla, ortalama bitki rejenerasyon oranı bakımından LS besi ortamının, SH besi ortamından istatistiksel olarak daha üstün olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, Lörz ve ark. (25), Abd-El Maksoud ve Bedö (29), Hatipoğlu ve Doğramacı (27)'nin bulgularına benzerlik göstermektedir.

#### Oksin Çeşidinin Kallus Oluşumu, Kallus Ağırlığı ve Bitki Rejenerasyon Oranına Etkisi

Araştırma bulguları, kullanılan oksin çeşitlerinin ortalama kallus oluşturma oranı ve bitki rejenerasyon oranına etkilerinin önemli derecede farklı olduğunu göstermiştir. Ancak, oksin çeşitlerinin ortalama kallus ağırlığına etkisi birbirinden farksız olmuştur (Tablo 3).

Araştırmada kullanılan 2,4-D oksininin, ortalama kallus oluşturma oranı (% 39) bakımından dicamba'ya (% 34) göre istatistiksel olarak daha üstün olduğu ortaya çıkmıştır. Buna karşılık, Conger ve ark. (31), biryillik

çimde ve Hatipoğlu ve ark. (23) tüylü sakalotunda genç salkımlardan kallus oluşturmada etkinlik açısından 2,4-D ve dicamba'nın birbirinden farksız olduğunu saptamışlardır.

Kullanılan oksin çeşitlerinin ortalama kallus ağırlığına etkisi birbirinden farksız olmuştur. Nitekim, 2,4-D içeren ortamlarda 328,4 mg kallus ağırlığı elde edilmesine karşılık, dicamba içeren ortamlarda 313,4 mg olmuştur. Elde edilen bu bulgu, dicamba içeren ortamda kültür edilen tüylü sakalotu salkımlarının 2,4-D içeren ortama göre daha fazla kallus oluşturduğunu bildiren Hatipoğlu ve ark. (23)'nin bulguları ile çelişmektedir. Bu çelişkinin nedeni, farklı bitki türlerinin farklı oksinlere farklı reaksiyon göstermeleri olabilir.

Dicamba, ortalama bitki rejenerasyon oranı bakımından 2,4-D'den istatistiksel olarak daha üstün olmuştur. Dicamba içeren ortamlarda kültüre alınan genç salkımlardan segment başına ortalama 1,38 bitki elde edilmesine karşılık, 2,4-D içeren ortamlarda bu oran 0,66 olarak gerçekleşmiştir. Papenfuss ve Carman (32)'in buğday genç embriyoları ile Immonen (33)'in buğday x çavdar genç embriyoları ile sürdürdükleri araştırmalarda elde ettikleri bitki rejenerasyonu açısından dicamba'nın 2,4-D'den daha üstün olduğu şeklindeki bulguları bu araştırmadaki bulguları desteklemektedir. Papenfuss ve Carman (32) embriyo kültüründe dicamba'nın 2,4-D'ye göre daha etkin olmasını; dicamba'nın 2,4-D'ye göre bitki dokusunda daha hızlı metabolize olması ile açıklamaktadır. Montague ve ark. (34) ise, oksinlerin bitki dokularında uzun süre aktif kalmasının kallus'dan embriyoid oluşumunu engellediğini bildirmektedir.

Bu literatür bildirişleri dikkate alındığında; 2,4-D'nin bitki dokularında uzun süre aktif kalarak kallus oluşumu ve kallus ağırlığı açısından dicamba'ya göre daha etkin olduğu, buna karşılık dicamba'nın bitki dokularında hızlı bir şekilde metabolize olması nedeniyle aktif kalma süresinin 2,4-D'ye göre daha az olduğu ve sonuçta kallus oluşumu ve kallus ağırlığı açısından 2,4-D'den daha az

Oksinler	Kallus Oluşturma Oranı (%)	Kallus Ağırlığı (mg/petri kutusu)	Bitki Rejenerasyon Oranı (bitki/segment)
2,4-D	39.0 a	328.437 a	0.66 b*
Dicamba	34.0 b	313.443 a	1.38 a

Tablo 3. Farklı Oksin Çeşitlerinin Ortalama Kallus Oluşturma Oranı Kallus Ağırlığı ve Rejenerasyon Oranlarına Etkisi.

\* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar t testine göre  $p \leq 0,05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

etkin olduğu, buna karşılık, dicamba'nın kısa sürede metabolize olması nedeniyle de dicamba içeren ortamda oluşan kalluslardan embrioid oluşumunun 2,4-D içeren ortamda oluşan kalluslara göre daha fazla olduğu söylenebilir.

#### Oksin Konsantrasyonunun Kallus Oluşumu, Kallus Ağırlığı ve Bitki Rejenerasyon Oranına Etkisi

Araştırma bulguları, kullanılan oksin konsantrasyonlarının kallus oluşturma oranı, kallus ağırlığı ve bitki rejenerasyon oranına etkilerinin oksin çeşidine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Tablo 4). Nitekim 2,4-D'de 4 mg/l'nin üzerindeki konsantrasyonda önemli bir azalma ortaya çıkmıştır. Dicamba'da ise, kallus oluşturma oranı 6 mg/l konsantrasyonuna kadar istatistiksel olarak önemli artış göstermiştir. Bu bulgular; sarı sakalotu bitkisinin genç salkımlarından kallus oluşturmada optimum 2,4-D konsantrasyonunun 4 mg/l, dicamba konsantrasyonunun ise 6 mg/l olduğunu göstermektedir. Oksin konsantrasyonunun kallus oluşumuna etkisinin oksin çeşidine bağlı olarak değişmesi ile ilgili bulgular Gland ve Hatipoğlu (22)'nin bulgularını desteklemektedir.

2,4-D'nin 4 mg/l konsantrasyonu en yüksek kallus ağırlığı sağlmasına karşılık, dicamba'da en yüksek kallus ağırlığı 8 mg/l ile sağlanmıştır. Gland ve Hatipoğlu (22)'nin bulguları bu sonuçlarla uyum içerisinde bulunmaktadır.

4 mg/l 2,4-D konsantrasyonu salkım segmenti başına 1.4 bitki rejenerasyonu ile incelenen 2,4-D konsantrasyonları arasında en yüksek bitki rejenerasyonu oranını sağlayan konsantrasyon olmasına karşılık, dicamba'nın 8 mg/l konsantrasyonu 2.7 bitki

rejenerasyonu ile en yüksek bitki rejenerasyon oranını sağlayan konsantrasyon olmuştur. Bu bulgular; Gland ve Hatipoğlu (22), Kuusiene ve Sliesaravvigijs (35), Holme ve Petersen (36)'in bulgularına benzemektedir.

#### Sonuçlar

Araştırma sonuçlarına göre, sarı sakalotu bitkisinin genç salkımlarının *in vitro* kültüründe; genotip, besi ortamı, oksin çeşidi, oksin konsantrasyonu ve bunların interaksiyonlarının başarıyı önemli derecede etkileyen faktörler olduğu ortaya çıkmıştır. İn vitro kültür araştırmalarında kullanılan 75 bitkiden 3 aylık bir süre sonunda 4882 bitkinin elde edilmesi ve rejeneratların genetik stabilite göstermesi, *in vitro* kültürün bu bitkinin ıslah sürecinde çok kısa bir sürede çoğaltılması amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Araştırma sonuçları, 8 mg/l dicamba ilave edilen LS besi ortamının sarı sakalotu genç salkımlarından bitki rejenerasyonu amacıyla kullanılabilmesini ortaya koymuştur. Bu yöntemle, üstün karakterleri taşıdığı saptanan ve özellikle obligat apomiktik olduğu tesbit edilen bitkilerin çok kısa bir zamanda çoğaltılması mümkündür.

Ayrıca, gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalarda bitki rejenerasyon oranını arttırabilecek; donör bitkilerin fizyolojik ihtiyaçlarının tam olarak belirlenmesi, farklı besi ortamları ve oksinlerin kullanılması, kültüre alınan salkım segmentlerinin uzunluğunun rejenerasyon oranına tepkisinin belirlenmesi gibi bitki rejenerasyon oranını doğrudan etkileyebilecek faktörlerin denenmesi başarı oranını arttırma açısından faydalı olacaktır.

Konsantrasyonlar	Kallus oluşturma Oranı (%)		Kallus Ağırlığı (mg/petri kutusu)		Bitki Rejenerasyon Oranı (bitki/segment)	
	2,4-D	Dicamba	2,4-D	Dicamba	2,4-D	Dicamba
2 mg/l	33.8 b	10.3 c	288.0 c	96.0 d	0.53 b	0.14 d*
4 mg/l	49.7 a	20.5 b	411.7 a	187.3 c	1.40 a	0.56 c
6 mg/l	45.0 a	46.3 a	375.2 b	431.4 b	0.64 b	2.09 b
8 mg/l	27.3 c	58.7 a	238.9 d	589.1 a	0.04 c	2.74 a
Ortalama	39.0	34.0	328.4	325.9	0.65	1.38

\* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0,05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Tablo 4. Farklı Oksin Konsantrasyonlarının Ortalama Kallus Oluşturma Oranı Kallus Ağırlığı ve Rejenerasyon Oranlarına Etkisi.



## Kaynaklar

- Altın, M., Erzurum Şartlarında Azot, Fosfor ve Potasyumlu Gübrelere Tabii Çayır ve Meranın Ot Verimine, Otun Ham Protein ve Ham Kül Oranına ve Bitki Kompozisyonuna Etkileri Üzerinde Bir Araştırma. A.Ü. Basım Evi Araştırma Serisi Erzurum, No: 95, 1975.
- Alinoğlu, N., Mülayim, M., Investigations on Effects of Some Fertilizers on Green Grass Yields of Natural Pasture and Meadow in Ankara Conditions. In: Grassland and Animal Husbandry Research Institute Research Activities, Edited By Karabulut, A. and Munzur, M. Ministry of Agriculture Forestry and Village Affairs Grassland and Animal Husbandry Research Institute Pub. 97, pp. 17-18, 1984.
- Tükel, T., Hatipoğlu, R., Çukurova Koşullarında Farklı Azot Dozlarının Tüylü Sakalotu (*Hyparrhenia hirta* (L.) Stapf)'nın Baskın Olduğu Doğal Bir Meranın Verim ve Botanik Kompozisyonuna Etkisi Üzerinde Bir Araştırma. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi Cilt 2 (1): 10-24, 1987.
- Tosun, F., Manga, I., Altın, M., Serin, Y., Erzurum Şartlarında Kıraç Mera Islahı Üzerinde Bir Araştırma. TÜBİTAK V. Bilim Kong. TOAG, 1975.
- AHLOWALLA, B.J., Forage Grasses. In: Handbook of Plant Cell Culture, Ammirato, P.V.J., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Yamada, Y. (Eds), McMillan Pub. Comp., New York, London Vol. 3: 91-125, 1984.
- Vasil, I. K., Vasil, V., Regeneration in Cereal and Other Grass Species. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vasil, I. K (Ed.), Academic Press, Inc. Vol. 3: 121-150, 1986.
- Hatipoğlu, R., Tüylü Sakalotu (*Hyparrhenia hirta* (L.) Stapf) Genç Salkımlarının *In Vitro* Kültüründe Salkım Uzunluğunun Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonuna Etkisi Ç.Ü.Z.F. Dergisi 7, (3): 153-166, 1992.
- Johnson, B.B., Worthington, M., Establishment of Suspension Culture from Seeds of Plains Bluestem (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) and Regeneration of Plants via Somatic Embryogenesis. Journal of the Tissue Culture Association V. 23 (11) P. 783-788, 1987.
- Dale, P.J., Embryoids from Cultured Immature Embryos of *Lolium multiflorum*. Z. Pflanzenphysiol. 100: 73-77, 1980.
- Ahn, B.J., Huang, F.H., King, J.W., Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in Common Bermudagrass Tissue Culture. Crop. Sci. 25: 1107-1109, 1985.
- Hatipoğlu, R., Untersuchungen über die Zytologischen Eigenschaften und In-vitro-Kulturmöglichkeiten von Zwei wild Vorkommenden Grasarten, *Hyparrhenia hirta* (L.) Stapf und *Dactylis glomerata* L., aus dem Çukurova-Gebiet, Südtürkei. Dissertation an der Universität Hohenheim, 1991.
- Linsmaier, E.M., Skoog, F., Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant. 18: 100-127, 1965.
- Schenk, R.U., Hildebrand, C., Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204, 1972.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Principles and Procedures Statistics. With Special References to the Biological Sciences. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York-Toronto-London. 481 p, 1960.
- Artunduaga, I.R., Taliaferro, C.M., Johnson, B.L., Effects of Auxin Concentration on Induction and Growth of embryogenic Callus from Young Inflorescence Explants of Old World Bluestem (*Bothriochloa* spp.) and Bermuda (*Cynodon* spp.) Grasses. Plant Cell Tiss. Org. Cult.: 12, 1, 13-19, 1988.
- Franklin, C.I., Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in the Forage Grass Caucasian bluestem (*Bothriochloa caucasica*) Plant-Physiol.: 89, 4, Suppl., 8, 1989.
- Franklin, C.I., Trieu, T.N., Gonzales, R.A., Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in the Forage Grass Caucasian bluestem (*Bothriochloa caucasica*) Plant-Cell-Rep.: 9, 8, 443-46, 1990.
- Shatters, R.G., Wheeler, R.A., West, Sh., Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of Tifton 9' Bahiagrass. Crop Sci. 34: 5, 1378-1384, 1994.
- Kostina, G.I., Larina, T.V., And Efremova, I.G., Effect of Explant Type in Sorghum on the Development of Cultures with Regenerative Ability. Plant Breeding Abstracts Vol. 67 No. 1-316, 1997.
- Metzinger, B.D., Taliefferro, C.M., Johnson, B.B., Mitchell Jr. E.D., In Vitro Regeneration of Apomictic Bluestem Grasses. Plant Cell Tiss. Org. Cult.: 10, 1, 31-38, 1987.
- Bregitzer, P., Plant Regeneration and Callus Type in Barley; Effect of Genotype and Culture Medium. Crop. Sci., 32: 1108-1112, 1992.
- Gland, A., Hatipoğlu, R., Einsatz der Biotechnologie zur Entwicklung Dürreresistenter Gertengenotype. und zur Verbesserung Von Weidegrasses für den Anbau in der Türkei. Wissenschaftliche Ergebnisse Deutsch-Türkischer Universitaetpartnerschafter in Agrarbereich, Deutsh-Türkisches Symposium in Bornova-Izmir/Türkei Vom 26 bis 30 September, S. 274-285, 1989.
- Hatipoğlu, R., Hesemann, C.U., Gland, A., Tükel, T., Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration From Immature Inflorescences of *Hyparrhenia hirta* (L.) Stapf. Proceedings of the XVII. International Grassland Congress 13-16 February, Session 27-51, pp: 1036-1038, 1993.
- Can, E., Tükel, T., Hatipoğlu, R., Domuz Ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) Bitkisinin Genç Salkımlarının *In Vitro* Kültürde Eksplant olarak Kullanılma Olanakları Üzerinde Bir Araştırma. Tarla Bitkileri Kongresi Cilt II Bitki Islahı Bildirileri S: 254-256 Bornova/Izmir, 1994.
- Lörz, H., Gobel, E., Brown, P., Advances in Tissue Culture and Progress towards Genetic Transformation of Cereals. Plant Breeding, 100: 1-2, 1988.,
- Akashi, R., Adachi, T., High Frequency Somatic Embryo Formation in Cultures of Immature Embryos of Guineagrass, *Panicum maximum* Jacq. Japanese Journal of Breeding. 41: 1, 85-93, 1991.
- Hatipoğlu, R., Doğramacı, M., Die Wirkungen von Genotyp, Kulturmedium Sowie Gelierstoff auf die Antherenkultur von Weizen. Deutsch-Türkische Agarforschung-Deutsche-Türkisches Symposium, 12-12 September, Ankara, pp: 139-146, Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart, 1995.
- Hatipoğlu, R., Biyoteknolojiye Giriş Ç.Ü.Z.F. Ders Kitabı No: 129, 1995.

29. Abd-El Maksoud, M.M., Bedö, Z., Genotypes and Genotype x Medium interaction in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Cereal Research Communications, Vol. 21, No. 1: 17-24, 1993.
30. Gendy, C., Sene, M. Bui V.L., Vidal, J., Tranh Van, K., Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Breeding Abstracts Vol. 67 No. 1-315, 1997.
31. Conger, B.V., Hanning, G.E., Registration of Embryogen-P Orchardgrass Germplasm with a High Capacity for Somatic Embryogenesis from *In-vitro* Cultures. Plant Breeding Abst. Vol. 62 No. 5, 1992.
32. Papenfuss, J.M., Carman, J.G., Enhanced regeneration from Wheat Callus Cultures Using Dicamba and Kinetin. Crop. Sci. 22: 588-593, 1987.
33. Immonen, A.S.T., Influence of Media and Growth Regulators on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration for Production of Primary Triticales. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 45-52, 1996.
34. Montague, M.J., R.K., Siegel, N.K., Jaworski, E.G., A Comparison of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid Metabolism in Cultured Soybean Cells and Embryogenic Carrots Cells. Plant Physiol. 67: 603-607, 1981.
35. Kuusiene, S. & Sliesaravicius, A., Callus Formation and Plant Regeneration in Tissue Cultures of *Festuca pratensis* Huds. Plant Breeding Abstracts vol. 62 No. 10, 1992.
36. Holme, I.B., Petersen, K.K., Callus Induction and Plant Regeneration from Different Explant Types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus.'. Plant Breeding Abstracts Vol. 66 No. 10-10388, 1996.