

Vigna caracalla L. Verdc. Bitkisinde *In Vitro* Klonal MikroçoğaltımHalide Hande GÜNGÖR^{1*}, Begüm GÜLER², Meltem BAYRAKTAR³, Aynur GÜREL⁴^{1*} Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir.² Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir.³ Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik - Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kırşehir.⁴ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

Sorumlu yazar* e-posta: handegunr@gmail.com

ORCID ID: http://orcid.org/0000-0003-4155-4926

e-posta: begumakyol.ege@gmail.com

ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9970-2111

e-posta: meltembayraktar5@gmail.com

ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-7569-6925

e-posta: aynurgurel@gmail.com

ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-7002-9752

Geliş Tarihi: 17.10.2019

Kabul Tarihi: 18.08.2020

Öz

Vigna caracalla L. Verdc., "İzmir sarmaşığı" olarak da adlandırılan, hoş kokulu güzel çiçekleriyle dikkat çeken bir süs bitkisidir. Bu çalışmada, *Vigna caracalla* L. Verdc. bitkisinde *in vitro* klonal mikroçoğaltımın gerçekleştirilmesi için etkili bir protokolün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Tohumlar, farklı sterilizasyon yöntemlerine maruz bırakıldıktan sonra MS besin ortamlarında kültüre alınmışlar. En yüksek sterilizasyon (%93.33) oranı (%93.33); 1 dk %70 etil alkol, 4 dk %0.1 HgCl₂ uygulamasının ardından, 7 saat suda bekletilen tohumlarda elde edilmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi (%95.24), N₆ besin ortamı içeren 250 mL'lik erlenlerde gözlenmiştir. En yüksek ortalama sürgün uzunluğu (5.05 cm) 1 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Jelleştirici ajan, ışık şiddeti ve eksplant tipinin sürgün rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi için yapılan denemelerde ise en yüksek çoğaltım katsayısı (1.71) ve yaprak boyu (0.82 cm), Duchefa agar ile katılaştırılmış N₆ besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarından elde edilmiştir. Bu çalışma kapsamında, fazla hiperhidrisite göstermeyen ve çoğaltım oranı daha yüksek olan 16 adet klonun mikroçoğaltım denemelerinde uygun reaksiyon verdiği belirlenmiştir. En yüksek kök rejenerasyonu (%85.71), Fluka agar ile katılaştırılmış N₆ besin ortamındaki 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarında saptanmıştır. Köklü sürgünler, %70 başarı yüzdesi ile aklimatize edilmişlerdir.

Anahtar kelimeler

Vigna caracalla L.
Verdc.; *In vitro*; Klonal
mikroçoğaltım;
Çoğaltım katsayısı

In Vitro* Clonal Micropropagation of *Vigna caracalla* L. Verdc.*Abstract**

Vigna caracalla L. Verdc. is an ornamental plant, having with its beautiful odorous remarkable flowers, named as "İzmir's ivy". In this study, it was aimed to develop an effective protocol for *in vitro* clonal micropropagation in *Vigna caracalla* L. Verdc. plant. The seeds were cultured in MS medium after exposed to different sterilization methods. The highest percentage of sterilization (93.33%) were achieved when the seeds were soaked in 70% ethyl alcohol for 1 min, 0.1% HgCl₂ for 4 min and then kept sterilized distilled water for 7 hours. The highest percentage of germination (95.24%) was observed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing N₆ medium. The highest shoot length (5.05 cm) was obtained from shoot tip explants cultured in MS medium containing 1 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP. In the experiments carried out to determine the effect of gelling agent, light intensity and explant type on shoot regeneration, the highest multiplication coefficient (1.71) and leaf length (0.82 cm) was achieved in node explants cultured in N₆ medium solidified with Duchefa agar and exposed to 4200 lux light intensity. Within the scope of this study, it was determined that 16 clones that did not show much hyperhydricity and had higher multiplication rate gave appropriate responses for micropropagation experiments. The highest root regeneration (85.71%) was achieved from shoot tip explants cultured in N₆ medium solidified with Fluka agar and exposed to 4200 lux light intensity. The rooted plantlets were acclimatized with 70% success.

Keywords

Vigna caracalla L.
Verdc.; *In vitro*; Clonal
micropropagation;
Multiplication
coefficient

1. Giriş

Fabaceae (Leguminosae) familyasına ait *Vigna* cinsi, 100'den fazla yabancı tür içermektedir. Börülce (*V.*

unquiculata L. Walpers), maş fasulyesi (*V. radiata* L. Wilczek) ve azuki fasulyesi (*V. angularis* Willd. Ohwi) gibi kültür türlerinin de dahil olduğu, tarımsal açıdan

önemli bir taksondur (Takahashi *et al.* 2016). Güney Amerika (Brezilya, Bolivya, Paraguay, Arjantin, Peru, Ekvator ve Kolombiya) ve Orta Amerika (Guatemala, Nikaragua, Kosta Rika, Meksika ve Panama) bölgelerine özgü çok yıllık bir bitki olan *Vigna caracalla* (Etcheverry *et al.* 2008) türünün sinonim isimleri, *Phaseolus caracalla* L. ve *Cochlianthus caracalla* L.' dir (Int Kyn. 1). Ülkemizde "Salyangoz asması", "Salyangoz çiçeği", "Tirbuşon sarmaşığı", "Zülf-ü Aruz", "İzmir sarmaşığı" ya da "Selluka" olarak çeşitli isimlerle anılan bu türe Akdeniz ve Ege Bölgelerinde de rastlanılmaktadır (Int Kyn. 2, Int Kyn. 3, Int Kyn. 4) .

Bu bitkinin en önemli özelliği, kokusu *Stephanotis* (Madagaskar yasemini)'ne rakip olacak kadar güzel olan orkide benzeri çiçekleridir (Anderson and Asche 1994). Haziran-Eylül ayları arasında pembe, eflatun, soluk sarı ve beyaz renkli açan çiçekleri limon ve yasemin arası bir kokuya sahiptir. Albenili çiçeklere sahip olan *V. caracalla* sarılıcı bir bitki olması sebebiyle parmaklık, pergola ve çardaklarda kullanılmaktadır (Int Kyn. 5). Ayrıca zengin besin içeriğinden dolayı yem olarak da kullanılabilir (Etcheverry *et al.* 2008).

Bir zamanlar İzmir-Karşıyaka'nın simgesi haline gelmiş olan *V. caracalla* bitkisinin tohumlarının pahalı olması, düşük çimlenme oranı (Suleiman 2003), ve çiçeklerindeki tozlaşma zorluğu gibi nedenlerle üretimi sekteye uğramış ve alternatif üretim tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. Geleneksel çoğaltım tekniklerinin yanı sıra, modern *in vitro* teknikler bitkilerin hızlı ve kontrollü koşullar altında çoğaltılması için yeni imkanlar sunmaktadır. *V. caracalla* bitkisi ile ilgili bugüne kadar gerçekleştirilmiş bir doku kültürü çalışmasına rastlanılmamıştır. Ancak; doku kültürü teknikleri kullanılarak *Vigna* cinsine ait bazı türler başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır (Dewir *et al.* 2016). *V. unguiculata* L. (Türk börülcesi cv. Akkız) türünde sürgün meristemleri kullanılarak *in vitro*

mikroçoğaltım (Aasim *et al.* 2008), *V. subterranea* (L.) Verdc. türünde *in vitro* sürgün ucu rejenerasyonu (Silué *et al.* 2016), *V. radiata* L. Wilczek. (Maş fasulyesi) türünde tuza toleranslı kallus hatlarının *in vitro* seleksiyonu ve tuza toleranslı bitkiciklerin rejenerasyonu (Rao and Patil 2012), *V. mungo* L. Hepper (siyah mercimek) türünde ise rejenerasyon çalışmaları ve kallus indüksiyonu gerçekleştirilmiştir (Adlinge *et al.* 2014, Saha *et al.* 2017).

Mevcut çalışmada; *V. caracalla* L. Verdc. türüne ait tohumların çimlendirilmesinden elde edilen sürgün ucu ve nod eksplantlarından etkili bir klonal mikroçoğaltım prosedürünün oluşturulması ve bu bitkinin yeniden biyoçeşitliliğe kazandırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitkisel materyal

Bu çalışmada, *V. caracalla* bitkisine ait tohumlar başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Tohumlar "Zengarden Ev ve Bahçe" online satış ve paylaşım sitesinden temin edilmiştir. Tohum göbeği de denilen hilumdan itibaren ortalama çapları 0.64 cm olan koyu kahve rengindeki sert kabuklu *V. caracalla* tohumları (Şekil 1), yüzeysel olarak steril edildikten sonra laboratuvarında hazırlanan besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Çimlenen tohumlardan elde edilen *in vitro* fideciklerin sürgün ucu ve nod eksplantları rejenerasyon çalışmaları için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 1. *Vigna caracalla* bitkisinin tohumu (Bar=0.5 cm).

2.2. Yüzeysel tohum sterilizasyonu ve dormansinin kırılması

V. caracalla bitkisine ait sert kabuklu tohumların sterilizasyonu ve tohum dormansisinin kırılması için Çizelge 1’de belirtilen 4 farklı uygulama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yüzeysel steril edilen tohumların kabuklarına bisturi ucu yardımıyla çimlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla çizik atılmış ve tohumlar 30 g/L sükröz içeren ve 3 g/L Gelrite (Duchefa-Biochemie) ile katılaştırılmış MS (Murashige and Skoog 1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır (pH 5.8). Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 5 adet tohum kullanılmıştır. Kültürler, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C sıcaklıkta ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde bekletilmişlerdir.

Çizelge 1. Yüzeysel tohum sterilizasyonu ve tohum dormansisinin kırılması için saf suda bekletilerek gerçekleştirilen uygulamalar.

1. uygulama	2. uygulama	3. uygulama	4. uygulama
1 dk %70’lik etil alkol muamelesi	1 dk %70’lik etil alkol muamelesi	1 dk %70’lik etil alkol muamelesi	1 dk %70’lik etil alkol muamelesi
3 dk %0.1’lik HgCl ₂ muamelesi	4 dk %0.1’lik HgCl ₂ muamelesi	3 dk %0.1’lik HgCl ₂ muamelesi	4 dk %0.1’lik HgCl ₂ muamelesi
3 kez steril saf su ile durulama	3 kez steril saf su ile durulama	3 kez steril saf su ile durulama	3 kez steril saf su ile durulama
7 saat saf suda bekletme	7 saat saf suda bekletme	3 saat saf suda bekletme	3 saat saf suda bekletme

2.3. Çimlenme denemelerinin kurulması

2.3.1. Farklı temel besin ortamları ve kültür kaplarının çimlenme üzerine etkisi

Farklı temel besin ortamları ve kültür kaplarının tohum çimlenmesi üzerine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla çimlenme denemeleri kurulmuştur. Tohumlar, yüzeysel sterilizasyon için; 1 dk etil alkolde bekletmenin ardından 4 dk % 0.1’ lik HgCl₂ ile muamele edilmişler, ardından 3 kez steril su ile durulandıktan sonra 7 saat süreyle tohum kabuğunun yumuşaması için saf suda bekletilmişlerdir. Yüzeysel olarak sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumların kabuklarına çimlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla çizik atılarak Çizelge 2’de belirtilen temel besin ortamlarında

kültüre alınmışlardır (Gelrite 3 g/L, pH 5.8). Farklı kültür kapları olarak 10 mL besin ortamı içeren 50 mL hacimli cam kültür tüpleri (23/24x140 mm) ve 50 mL besin ortamı içeren 250 mL hacimli erlenler kullanılmıştır. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 7 adet tohum kullanılmıştır. Kültürler, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C sıcaklıkta ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 2. Çimlenme denemeleri için kullanılan temel besin ortamları ve içerikleri*.

Bileşikler	Miktar (mg/L)		
	MS	WPM	N ₆
Makro Elementler			
NH ₄ NO ₃	1.650	400	----
KNO ₃	1.900	----	2.830
CaCl ₂	332,02	72,5	125,33
MgSO ₄	180,54	180,54	90,27
KH ₂ PO ₄	170	170	400
K ₂ SO ₄	----	990	----
(NH ₄) ₂ SO ₄	----	----	463
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	----	471.26	----
Mikro Elementler			
KI	0,83	----	0,8
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	1,6
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	22,3	3,33
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	1,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	----
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,25	----
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	----	----
Na ₂ .EDTA	----	----	7,45
FeSO ₄ .7H ₂ O	----	----	5,57
FeNaEDTA	36,70	36,70	----
Organik Bileşikler			
Myo-Inositol	100	100	100
Nikotinic Asit	0,5	0,5	0,5
Pridoksin-HCl	0,5	0,5	0,5
Thiamin-HCl	0,1	1	1
Diğer Bileşikler			
Glisin	2	2	2
Sukroz	30.000	30.000	20.000

*MS (Murashige and Skoog 1962); WPM (Lloyd and McCown 1980), N₆ (Chu *et al.* 1975)

2.3.2. Farklı jelleştirici ajanlar ve kültür kaplarının çimlenme üzerine etkisi

Farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarının çimlenme üzerine etkisini belirleyebilmek amacıyla; yüzeysel steril edilen tohumların kabuklarına çimlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla çizik atılarak tohumlar, Gelrite (3 g/L) veya plant agar (Duchefa-Biochemie) (7g/L) ile katılaştırılmış, 30 g/L sükröz ilave edilmiş MS besin ortamı içeren cam tüplerde veya 250 mL’ lik erlenlerde kültüre alınmışlardır (pH 5.8).

Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrürde 7 adet tohum olacak şekilde denemeler kurulmuştur. Kültürler, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24±2 °C sıcaklıkta ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

2.3.3. Farklı ışık şiddetlerinin çimlenme üzerine etkisi

Işık şiddetinin çimlenme üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla; tohumlar yüzeysel olarak steril edildikten sonra tohumların kabuklarına çimlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla çizik atılarak WPM (Lloyd and McCown 1980) besin ortamı içeren cam kültür kaplarında kültüre alınmışlardır (sükroz 30 g/L, pH 5.8). Kültüre alınan tohumlar 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24±2 °C sıcaklıkta, farklı ışık şiddetlerinde (3500 ve 4200 lüks) muhafaza edilmişlerdir. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür 7 adet tohum içerecek şekilde denemeler kurulmuştur.

2.4. Mikroçoğaltım denemelerinin kurulması

Tohumların *in vitro*' da çimlendirilmesi sonucunda gelişen 14 günlük *in vitro* fideliklerden elde edilen sürgün ucu ve nod kısımları mikroçoğaltım çalışmaları için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 7 adet eksplant kullanılmıştır. Kültürler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24±2 °C' de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

2.4.1. Farklı besin ortamı kompozisyonları ve eksplant tiplerinin mikroçoğaltım üzerine etkisi

Yaklaşık 2 cm uzunluğundaki sürgün ucu ve nod eksplantları; mikroçoğaltım denemeleri için Çizelge 3'de belirtilen besin ortamlarını (pH 5.8) içeren cam kültür tüplerinde kültüre alınmışlardır.

Çizelge 3. Mikroçoğaltım denemeleri için kullanılan besin ortamları.

Temel besin ortamı	Besin ortamı kodu	Jelleştirici ajan (g/L)
MS	MS	3 g/L Gelrite
	½ MS	
WPM	WPM	7 g/L Duchefa agar (Lot. No: B010856.10)
	½ WPM	
	N ₆	
N ₆	N-21	7 g/L Duchefa agar (Lot. No: 01209.01)
	N-22	7 g/L Merck agar-agar
	N-25	7 g/L Fluka agar
	N-26	7 g/L Fluka agar

*MS (Murashige and Skoog 1962); WPM (Lloyd and McCown 1980), N₆ (Chu et al. 1975)

2.4.2. Farklı ışık şiddetleri ve jelleştirici ajanların mikroçoğaltım üzerine etkisi

Farklı ışık şiddetleri ve jelleştirici ajanların mikroçoğaltım üzerine etkisini belirlemek amacıyla; Çizelge 3'te belirtilen 5 farklı jelleştirici ajan ile katılaştırılmış N₆ temelli besin ortamlarında (pH 5.8) kültüre alınarak 3500 lüks ışıkta muhafaza edilen yaklaşık 2 cm uzunluğunda sürgün ucu ve nod eksplantlarına ilave olarak, yine aynı besin ortamları ve eksplant tipleri kullanılarak kültür oluşturulmuş ve kültürler 4200 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

2.4.3. Bitki büyüme düzenleyicileri ve eksplant tipinin mikroçoğaltım üzerine etkisi

Yaklaşık 2 cm uzunluğundaki sürgün ucu ve nod eksplantları; bitki büyüme düzenleyicileri ve eksplant tipinin mikroçoğaltım üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile Çizelge 4' de belirtilen besin ortamlarını (pH 5.8) içeren cam kültür tüplerinde kültüre alınmışlardır.

Çizelge 4. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamları.

Temel besin ortamı	Besin ortamı kodu	Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/L)
MS	BS1	0.25 BAP
	BS2	0.5 BAP
	BS3	1 BAP
	BS4	2 BAP
	HS1	0.5 IBA + 0.5 BAP
	HS2	0.5 IBA + 1 BAP
	HS3	0.5 IBA + 2 BAP
	HS4	1 IBA + 0.5 BAP
	HS5	1 IBA + 1 BAP
	HS6	1 IBA + 2 BAP

2.5. Aklimatizasyon

Genotip korunarak yapılan klonal mikroçoğaltım denemeleri sonucunda canlılığını devam ettiren 16 farklı klona ait 20 adet köklenmiş bitkicik aklimatize edilmiştir. Bunun için kültür kabından çıkarılan bitkiciklerin kökleri zarar görmeyecek şekilde su ile yıkanarak üzerindeki besin ortamı ve jelleştirici ajan kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Bitkicikler daha sonra içerisinde torf bulunan 7 cm çapında küçük plastik bardaklara aktarılmıştır. Saksıların üzerleri nem kaybını önlemek amacıyla başlangıçta şeffaf poşetlerle örtülmüş ve aklimatizasyon işleminden 3 gün sonra 5 dk, 5 gün sonra 10 dk ve 7 gün sonra 30 dk süreyle bu poşetler her gün çıkarılarak hem bitkiler sulanmış hem de havalandırılmıştır. Yedinci gün sonunda bu poşetler tamamen çıkarılarak 13 gün boyunca sürgünler laboratuvar ortamında açık bir şekilde 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24 ± 2 °C' de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. Toplam 20 günün ardından aklimatize olan bitkiler içinde torf bulunan daha büyük saksılara aktarılmışlardır.

2.6. Verilerin değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Denemelerden elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hataları, SPSS 16.0 istatistik paket programı (SPSS Inc., Chicago, USA) kullanılarak yapılmıştır. Yapılan denemelerin etkileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Deneme sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu durumlarda ortalamaların karşılaştırılması Duncan testine göre %5 hata sınırı esas alınarak yapılmış ve farklı harflerle ifade edilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Yüzeysel tohum sterilizasyonu denemelerinden elde edilen sonuçlar

Yapılan 4 farklı sterilizasyon uygulaması sonucunda, 3. uygulamada %86.67; 1, 2 ve 4. uygulamalarda ise %93.33 oranında sterilizasyon başarısı elde edilmiştir. Çalışmada çimlenme yüzdesi %53.33 (3.

uygulama) ile %93.33 (2. uygulama) arasında değişim göstermiştir. 4 farklı uygulamanın gerek sterilizasyon başarısı ve gerekse çimlenme oranı üzerinde etkisi istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p\geq 0.05$) (Çizelge 5).

Çizelge 5. Tohum sterilizasyon ve çimlenme yüzdeleri (%).

Uygulama no	Ortalama steril tohum yüzdesi (%) \pm SH	Ortalama çimlenen tohum yüzdesi (%) \pm SH
1	93.33 \pm 6.67 a	73.33 \pm 6.67 a
2	93.33 \pm 6.67 a	93.33 \pm 6.67 a
3	86.67 \pm 13.33 a	53.33 \pm 13.33 a
4	93.33 \pm 6.67 a	73.33 \pm 13.33 a
P Değeri	0.931	0.143

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 5 tohum kullanılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P\leq 0.05$ seviyesinde önemlidir. SH: Standart Hata

3.2. Çimlenme denemelerinden elde edilen sonuçlar

3.2.1. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarının çimlenme üzerine etkisi

Farklı temel besin ortamları ve kültür kaplarının *in vitro* tohum çimlenmesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen denemelerden elde edilen verilere yapılan varyans analizi sonucunda, "çimlenen tohum yüzdesi" $p\leq 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 6). En yüksek tohum çimlenme yüzdesi (%95.24) N₆ besin ortamı içeren erlenlerde kültüre alınan tohumlarda belirlenmiştir (Çizelge 6).

Tohum çimlenme denemelerinde bazı tohumların çoklu sürgün verdiği gözlenmiş ve bu parametre de ayrıca incelenmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda "çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi" $p\leq 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 6). En yüksek çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%38.10), N₆ besin ortamı içeren erlenlerde kültüre alınan tohumlarda gözlenmiştir (Çizelge 6).

Her iki kültür kabındaki farklı besin ortamlarında kültüre alınan tohumların, 3 ila 30 gün aralığında çimlendiği tespit edilmiştir. Erlenlerde çimlenen tohumların yaprak boylarının, cam tüpte çimlenenlere göre daha büyük olduğu da elde edilen veriler arasındadır (Şekil 2a ve Şekil 2b). Çimlenen tohumlardan gelişen çoklu sürgünlerin hepsi

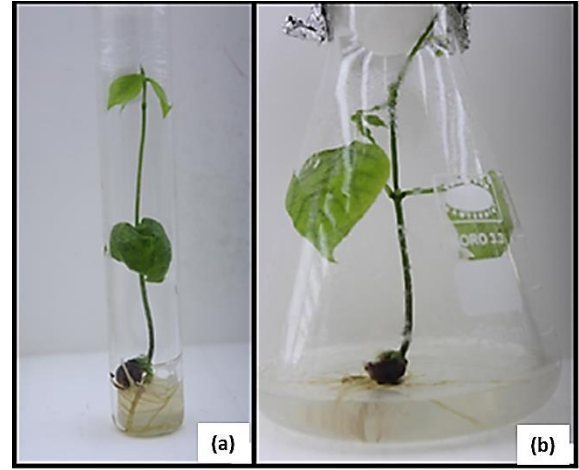
tohumun dip kısmından kardeş sürgün şeklinde gelişmiştir (Şekil 3a ve Şekil 3b).

Çoğaltım katsayısı çimlenen sürgünlerden elde edilen sürgün ucu ve nod eksplantlarının toplamı üzerinden hesaplanmıştır. Yapılan varyans analizine göre “çoğaltım katsayısı” parametresi $p \leq 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 6). En yüksek çoğaltım katsayısı (1.71) WPM besin ortamı içeren erlenlerde kültüre alınan tohumlarda gözlenmekle birlikte, $\frac{1}{2}$ N₆ besin ortamı içeren cam tüp ve erlenlerde kültüre alınan tohumlar hariç diğer tüm uygulamalar en yüksek çoğaltım kat sayısı elde edilen değerle aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 6).

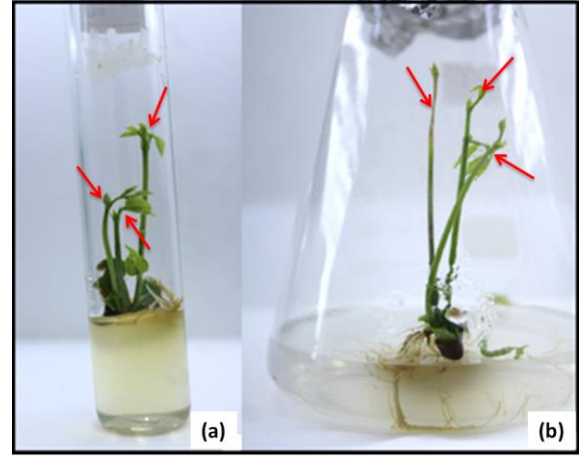
Çizelge 6. Farklı besin ortamları ve kültür kaplarında çimlenen tohum yüzdesi (%), çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%), çoğaltım katsayısı.

Besin ortamı	Kültür kabı	Çimlenen tohum yüzdesi (%) ± SH	Çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%) ± SH	Çoğaltım katsayısı ± SH
MS	Cam tüp	57.13 ± 16.48 bc	23.81 ± 4.76 ab	1.09 ± 0.37 a
	Erlen	61.87 ± 12.61 abc	4.76 ± 4.76 bc	1.47 ± 0.33 a
$\frac{1}{2}$ MS	Cam tüp	71.40 ± 8.26 ab	0.00 ± 0.00 c	1.00 ± 0.08 a
	Erlen	57.10 ± 14.30 bc	4.76 ± 4.76 bc	1.00 ± 0.08 a
WPM	Cam tüp	80.93 ± 4.77 ab	0.00 ± 0.00 c	1.38 ± 0.25 a
	Erlen	80.93 ± 9.53 ab	14.29 ± 8.25 bc	1.71 ± 0.00 a
$\frac{1}{2}$ WPM	Cam tüp	80.93 ± 4.77 ab	19.05 ± 12.60 bc	1.28 ± 0.08 a
	Erlen	52.38 ± 17.16 bc	0.00 ± 0.00 c	1.00 ± 0.36 a
N ₆	Cam tüp	80.93 ± 4.77 ab	19.05 ± 4.76 bc	1.62 ± 0.13 a
	Erlen	95.24 ± 4.77 a	38.10 ± 9.52 a	1.48 ± 0.29 a
$\frac{1}{2}$ N ₆	Cam tüp	33.27 ± 9.53 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 b
	Erlen	28.50 ± 8.26 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 b
P Değeri		0.003	0.001	0.000

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 tohum kullanılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir. SH: Standart Hata



Şekil 2. *In vitro* koşullarda (a) Cam tüp ve (b) erlende çimlendirilmiş *Vigna caracalla* tohumlarından elde edilen *in vitro* fideciklerin gelişimleri.



Şekil 3. *In vitro* koşullarda (a) Cam tüp ve (b) erlende çimlendirilmiş *Vigna caracalla* tohumlarının dip kısımlarından çıkan kardeş sürgünler.

3.2.2. Farklı jelleştirici ajanlar ve kültür kaplarının çimlenme üzerine etkisi

Jelleştirici ajan ve kültür kabının çimlenmeye etkisini belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirilen denemeler sonucunda çimlenme oranları %61.87-%85.71 (cam tüp*Gelrite) arasında, çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi %4.76-%23.81 (cam tüp*Gelrite) arasında ve çoğaltım katsayısı ise 0.85-1.48 (erlen*Gelrite) arasında değişim göstermiştir (Çizelge 7). Yapılan varyans analiz sonucuna göre farklı jelleştirici ajan ve kültür kaplarının incelenen üç faktör üzerine etkisi istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur ($p \geq 0.05$) (Çizelge 7).

Agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren erlenlerde oluşan çoklu sürgünlerin bir kısmı kardeş sürgün; bir kısmı tek bir sürgün uzadıktan sonra üst

kısımdan ikinci bir sürgün oluşumu şeklinde meydana gelmiştir. Gelrite'in ilave edildiği MS besin ortamı içeren cam tüpler ile erlenlerde oluşan çoklu sürgünler ve agar ile katılaştırılmış MS besin ortamı içeren cam tüplerde oluşan çoklu sürgünler tohumun dip kısmından kardeş sürgünler şeklinde oluşmuşlardır.

Çizelge 7. Farklı kültür kabı ve jelleştirici ajan uygulamaları sonucunda elde edilen çimlenen tohum yüzdesi (%), çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%) ve çoğaltım katsayısı.

Jelleştirici ajan tipi	Kültür kabı	Çimlenen tohum yüzdesi (%) ± SH	Çoklu sürgün oluşturan tohum yüzdesi (%) ± SH	Çoğaltım katsayısı ± SH
Gelrite	Cam tüp	85.71 ± 8.26 a	23.81 ± 4.76 a	1.09 ± 0.37 a
	Erlen	61.87 ± 4.77 a	4.76 ± 4.76 a	1.48 ± 0.33 a
Agar	Cam tüp	61.87 ± 4.77 a	4.76 ± 4.76 a	1.33 ± 0.08 a
	Erlen	71.43 ± 8.26 a	14.29 ± 8.25 a	0.85 ± 0.22 a
P Değeri		0.109	0.139	0.465

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir. SH: Standart Hata

3.2.3. Farklı ışık şiddetlerinin çimlenme üzerine etkisi

Farklı ışık şiddetlerinin çimlenme yüzdesi üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılan deneme sonucunda 3500 lüks ışık şiddetinde (%80); 4200 lüks ışık şiddetine (%60) göre daha yüksek çimlenme yüzdesi elde edilmiştir (Çizelge 8).

Çizelge 8. Farklı ışık şiddeti uygulamalarından elde edilen çimlenme yüzdeleri (%).

Işık şiddeti (lüks)	Kültüre alınan tohum sayısı (adet)	Çimlenen tohum yüzdesi (%) ± SH
4200	15	60 ± 11.55
3500	15	80 ± 11.55

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 5 tohum kullanılmıştır. SH: Standart Hata

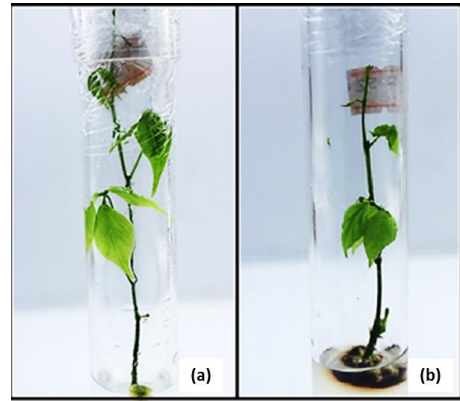
3.3. Mikroçoğaltım denemeleri

3.3.1. Farklı besin ortamı kompozisyonları ve eksplant tiplerinin mikroçoğaltım üzerine etkisi

Farklı besin ortamı kompozisyonları ve eksplant tiplerinin sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen denemelerden elde edilen sonuçlara göre yapılan varyans analizi

sonucunda, "ortalama sürgün uzunluğu" ve "ortalama yaprak boyu" $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 9). Eksplant başına en yüksek ortalama sürgün uzunluğu 4.52 cm ile WPM besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında saptanmış ve bunu 4.36 cm ile $\frac{1}{2}$ MS besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantları takip etmiştir. Her iki uygulama istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. En yüksek ortalama yaprak boyu (0,80 cm) MS besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında elde edilmiştir. Çoğaltım katsayısı 0.43 (N-25*sürgün ucu)– 1.62 (WPM*sürgün ucu) arasında ve gözlenen hiperhidrisite yüzdesi %9.53 (N-22*sürgün ucu) - %52.33 (N₆*sürgün ucu) arasında değişim göstermiştir (Çizelge 9). Yapılan varyans analiz sonucuna göre farklı temel besin ortamları, jelleştirici ajan ve kültür kaplarının incelenen bu iki faktör üzerine etkisi istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur ($p \geq 0.05$) (Çizelge 9).

Nodlardan sürgünler genellikle tekli olarak gelişmekle birlikte, çok düşük oranda da bilateral sürgün oluşumları gözlenmiştir. Kültüre alınan eksplantların 2 hafta sonundaki gelişimleri Şekil 4'de gösterilmiştir.

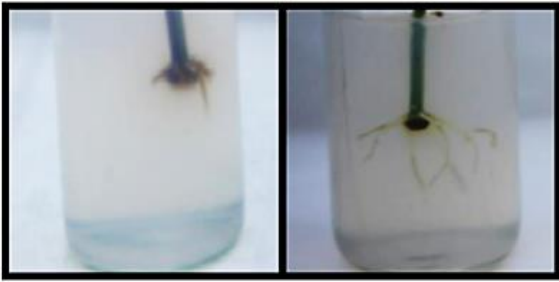


Şekil 4. Farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan (a) sürgün ucu ve (b) nod eksplantlarının 2 hafta sonraki gelişimleri.

3.3.2. Farklı ışık şiddetleri ve jelleştirici ajanların mikroçoğaltım üzerine etkisi

Farklı besin ortamı kompozisyonları ve eksplant tiplerinin mikroçoğaltım üzerine etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen denemelerden (N₆, N-21, N-22, N-25 ve N-26) elde edilen 3500 lüks ışık şiddeti verileri ile yine aynı ortamlarda kültüre

alınarak 4200 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilen eksplantlardan alınan veriler karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yapılan varyans analizi sonucunda, “ortalama sürgün uzunluğu” $p \leq 0.05$ seviyesinde, “ortalama yaprak boyu”, “çoğaltım katsayısı” ve “kök rejenerasyon yüzdesi” $p \leq 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 10). Buna göre; en yüksek ortalama sürgün uzunluğu 3.58 cm ile N-26 besin ortamında kültüre alınarak 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Bunu 3.57 cm ile N₆ besin ortamında kültüre alınarak 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantları takip etmiştir. Her iki uygulama istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. En yüksek ortalama yaprak boyu (0.82 cm) ve en yüksek çoğaltım katsayısı (1.71) N-21 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan nod eksplantlarında gözlenmiştir (Çizelge 10). Kök rejenerasyon oranı (%85.71) ise en yüksek N-26 besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir. Köklenme denemelerinden elde edilen farklı uzunluktaki kökler Şekil 5’de gösterilmiştir. Kültürlerde gözlenen hiperhidrisite yüzdesi %4.96 (N26*3500*sürgün ucu) - %61.87 (N26*4200*sürgün ucu) arasında değişim göstermiştir. Varyans analiz sonucuna göre yapılan uygulamaların hiperhidrisite üzerine etkisi istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur ($p \geq 0.05$) (Çizelge 10).



Şekil 5. Mikroçoğaltım denemelerinden elde edilen *in vitro* bitkiciklere ait farklı uzunluktaki kökler.

3.3.3. Bitki büyüme düzenleyicileri ve eksplant tipinin mikroçoğaltım üzerine etkisi

Bitki büyüme düzenleyicilerinin mikroçoğaltım üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneyler sonucunda; en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (5.05 cm), en yüksek ortalama yaprak

boyu (0,87 cm) ve en yüksek çoğaltım katsayısı (1.48) HS4 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir (Şekil 6). En yüksek hiperhidrisite yüzdesi %47.6 olarak; BS2*sürgün ucu, BS3*nod, HS1*nod, HS6*sürgün ucu kombinasyonlarında belirlenmiştir (Çizelge 11). Yapılan varyans analizi sonucunda bitki büyüme düzenleyicisi ve eksplant tipinin “ortalama sürgün uzunluğu” üzerine etkisi $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bulunurken, “ortalama yaprak boyu”, “çoğaltım katsayısı” ve “hiperhidrisite yüzdesi” üzerine etkisi istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur ($p \geq 0.05$) (Çizelge 11).



Şekil 6. HS4 besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantından gelişen *in vitro* sürgün.

3.4. Aklimatizasyon denemeleri

Denemeler sonucunda genotipi korunarak elde edilen 16 klona ait 20 bitkicik aklimatize edilmiş, 20. günün sonunda 9 klona ait 14 adet bitkicik ile %70 canlılık oranına ulaşılmıştır (Şekil 7). Sürgün ucu kökenli 11 adet aklimatize edilmiş bitkilerde yaşama oranı %72.7 iken; 9 adet nod kökenli aklimatize edilen bitkilerde yaşama oranı ise %66.7 olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Saksılara aktarılmış bitkiler.

Çizelge 9. Farklı besin ortamı kompozisyonlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen eksplant başına ortalama sürgün uzunluğu (cm), ortalama yaprak boyu (cm), çoğaltım katsayısı ve hiperhidrisite yüzdesi (%).

Besin ortamı	Eksplant tipi	Ortalama sürgün uzunluğu (cm) ± SH	Ortalama yaprak boyu (cm) ± SH	Çoğaltım katsayısı ± SH	Hiperhidrisite yüzdesi (%) ± SH
MS	Sürgün ucu	2.81 ± 0.38 abc	0.80 ± 0.33 a	1.24 ± 0.24 a	33.30 ± 9.50 a
	Nod	3.08 ± 0.65 abc	0.60 ± 0.33 abcd	1.24 ± 0.31 a	28.57 ± 8.23 a
½ MS	Sürgün ucu	4.36 ± 0.58 a	0.68 ± 0.21 ab	1.52 ± 0.42 a	19.03 ± 12.58 a
	Nod	2.85 ± 0.72 abc	0.36 ± 0.08 abcde	0.98 ± 0.28 a	28.57 ± 8.23 a
WPM	Sürgün ucu	4.52 ± 0.69 a	0.48 ± 0.08 abcde	1.62 ± 0.35 a	23.80 ± 12.59 a
	Nod	3.31 ± 0.63 ab	0.56 ± 0.24 abcde	1.19 ± 0.42 a	42.83 ± 8.23 a
½ WPM	Sürgün ucu	3.76 ± 0.80 ab	0.65 ± 0.19 abc	1.29 ± 0.30 a	42.83 ± 8.23 a
	Nod	2.48 ± 0.05 bc	0.25 ± 0.08 bcde	0.95 ± 0.09 a	38.07 ± 4.73 a
N ₆	Sürgün ucu	3.19 ± 0.97 ab	0.43 ± 0.19 abcde	1.10 ± 0.33 a	52.33 ± 4.77 a
	Nod	2.70 ± 0.51 abc	0.08 ± 0.05 de	1.14 ± 0.08 a	23.80 ± 12.59 a
N-21	Sürgün ucu	2.81 ± 0.80 abc	0.43 ± 0.13 abcde	0.81 ± 0.10 a	14.30 ± 8.26 a
	Nod	2.24 ± 0.25 bc	0.11 ± 0.02 de	0.90 ± 0.13 a	33.30 ± 9.50 a
N-22	Sürgün ucu	2.40 ± 0.53 bc	0.37 ± 0.04 abcde	0.76 ± 0.10 a	9.53 ± 4.77 a
	Nod	2.14 ± 0.21 bc	0.14 ± 0.07 bcde	0.86 ± 0.00 a	23.80 ± 12.59 a
N-25	Sürgün ucu	1.24 ± 0.46 c	0.12 ± 0.10 cde	0.43 ± 0.14 a	23.83 ± 4.77 a
	Nod	1.95 ± 0.28 bc	0.11 ± 0.04 de	0.76 ± 0.13 a	33.33 ± 4.73 a
N-26	Sürgün ucu	2.43 ± 0.34 bc	0.39 ± 0.08 abcde	1.00 ± 0.08 a	23.80 ± 17.15 a
	Nod	2.12 ± 0.13 bc	0.05 ± 0.01 e	0.86 ± 0.08 a	23.83 ± 4.77 a
P Değeri		0.023	0.028	0.144	0.256

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir. SH: Standart Hata

Çizelge 10. Farklı jelleştirici ajanlarla katılaştırılmış besin ortamları ve farklı ışık şiddetlerinde kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (cm), ortalama yaprak boyu (cm), çoğaltım katsayısı, kök rejenerasyon yüzdesi (%), hiperhidrisite yüzdesi (%).

Besin ortamı	Işık şiddeti (lüks)	Eksplant tipi	Ortalama sürgün uzunluğu (cm) ± SH	Ortalama yaprak boyu (cm) ± SH	Çoğaltım katsayısı ± SH	Kök rejenerasyon yüzdesi (%) ± SH	Hiperhidrisite yüzdesi (%) ± SH
N ₆	3500	Sürgün ucu	3.19 ± 0.97 ab	0.43 ± 0.19 abcde	1.10 ± 0.33 bc	42.86 ± 16.50 bcde	52.33 ± 4.77 a
		Nod	2.70 ± 0.51 abc	0.08 ± 0.05 e	1.14 ± 0.08 bc	28.57 ± 8.25 cdef	23.80 ± 12.59 a
	4200	Sürgün ucu	3.57 ± 0.48 a	0.68 ± 0.17 ab	1.19 ± 0.29 abc	28.57 ± 21.82 cdef	42.83 ± 16.48 a
		Nod	2.74 ± 0.32 abc	0.23 ± 0.13 cde	1.28 ± 0.17 ab	9.52 ± 9.52 ef	28.57 ± 14.27 a
N-21	3500	Sürgün ucu	2.81 ± 0.80 abc	0.43 ± 0.13 abcde	0.81 ± 0.10 bcd	47.62 ± 9.52 bcd	14.30 ± 8.26 a
		Nod	2.24 ± 0.25 abc	0.11 ± 0.02 e	0.90 ± 0.21 bcd	9.52 ± 4.76 ef	33.30 ± 9.50 a
	4200	Sürgün ucu	2.89 ± 0.81 ab	0.46 ± 0.26 abcde	1.09 ± 0.33 bc	57.14 ± 8.25 abc	19.03 ± 12.58 a
		Nod	3.14 ± 0.20 ab	0.82 ± 0.21 a	1.71 ± 0.25 a	71.43 ± 8.25 ab	42.83 ± 8.23 a
N-22	3500	Sürgün ucu	2.40 ± 0.53 abc	0.37 ± 0.05 abcde	0.76 ± 0.10 bcd	28.57 ± 8.25 cdef	9.53 ± 4.77 a
		Nod	2.14 ± 0.21 abc	0.14 ± 0.07 cde	0.86 ± 0.00 bcd	0.00 ± 0.00 f	23.80 ± 12.59 a
	4200	Sürgün ucu	3.19 ± 0.47 ab	0.56 ± 0.12 abc	1.24 ± 0.13 ab	33.33 ± 12.60 cdef	33.33 ± 19.03 a
		Nod	1.86 ± 0.04 bc	0.05 ± 0.05 e	0.81 ± 0.05 bcd	0.00 ± 0.00 f	23.83 ± 4.77 a
N-25	3500	Sürgün ucu	1.24 ± 0.47 c	0.12 ± 0.10 de	0.43 ± 0.14 d	9.52 ± 9.52 ef	23.83 ± 4.77 a
		Nod	1.95 ± 0.28 abc	0.11 ± 0.04 e	0.76 ± 0.13 bcd	9.52 ± 9.52 ef	33.33 ± 0.00 a
	4200	Sürgün ucu	1.79 ± 0.14 bc	0.19 ± 0.05 cde	0.62 ± 0.09 cd	42.86 ± 0.00 bcde	28.53 ± 14.27 a
		Nod	2.88 ± 0.76 ab	0.15 ± 0.07 cde	1.05 ± 0.05 bc	33.33 ± 12.60 cdef	9.53 ± 9.53 a
N-26	3500	Sürgün ucu	2.43 ± 0.34 abc	0.39 ± 0.07 abcde	1.00 ± 0.08 bc	52.38 ± 4.76 bcd	23.80 ± 4.68 a
		Nod	2.12 ± 0.13 abc	0.05 ± 0.01 e	0.86 ± 0.08 bcd	19.05 ± 4.76 def	23.83 ± 4.77 a
	4200	Sürgün ucu	3.58 ± 0.26 a	0.73 ± 0.17 ab	1.24 ± 0.13 ab	85.71 ± 8.25 a	61.87 ± 19.07 a
		Nod	3.39 ± 0.20 ab	0.53 ± 0.15 abcd	1.33 ± 0.13 ab	38.10 ± 17.17 bcde	33.30 ± 17.15 a
P Değeri			0.026	0.000	0.002	0.000	0.125

* Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir. SH: Standart Hata

Çizelge 11. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS temelli besin ortamlarında kültüre alınan sürgün ucu ve nod eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (cm), ortalama yaprak boyu (cm), çoğaltım katsayısı ve hiperhidrisite yüzdesi (%).

Besin ortamı	Eksplant tipi	Ortalama sürgün uzunluğu (cm) ± SH	Ortalama yaprak boyu (cm) ± SH	Çoğaltım katsayısı ± SH	Hiperhidrisite yüzdesi (%) ± SH
BS1	Sürgün ucu	2.57 ± 0.52 bcd	0.15 ± 0.04 a	0.95 ± 0.17 a	28.53 ± 8.23 a
	Nod	1.67 ± 0.07 cd	0.11 ± 0.04 a	0.71 ± 0.00 a	33.33 ± 4.73 a
BS2	Sürgün ucu	2.71 ± 0.59 bcd	0.33 ± 0.07 a	1.00 ± 0.08 a	47.60 ± 9.50 a
	Nod	2.31 ± 0.29 bcd	0.19 ± 0.09 a	0.90 ± 0.13 a	42.80 ± 0.00 a
BS3	Sürgün ucu	2.60 ± 0.79 bcd	0.41 ± 0.20 a	1.05 ± 0.27 a	33.30 ± 9.50 a
	Nod	2.45 ± 0.29 bcd	0.33 ± 0.17 a	0.81 ± 0.05 a	47.60 ± 12.59 a
BS4	Sürgün ucu	1.55 ± 0.15 cd	0.26 ± 0.08 a	0.57 ± 0.08 a	38.10 ± 9.50 a
	Nod	2.05 ± 0.41 bcd	0.24 ± 0.13 a	0.81 ± 0.17 a	42.83 ± 16.48 a
HS1	Sürgün ucu	3.19 ± 0.60 bcd	0.20 ± 0.03 a	1.10 ± 0.25 a	29.47 ± 13.33 a
	Nod	2.10 ± 0.08 bcd	0.12 ± 0.01 a	1.00 ± 0.22 a	47.60 ± 9.50 a
HS2	Sürgün ucu	3.74 ± 0.64 ab	0.37 ± 0.14 a	1.05 ± 0.21 a	28.57 ± 8.23 a
	Nod	2.00 ± 0.18 bcd	0.13 ± 0.01 a	0.81 ± 0.05 a	33.33 ± 4.73 a
HS3	Sürgün ucu	3.48 ± 0.56 abc	0.39 ± 0.18 a	1.00 ± 0.17 a	28.57 ± 8.23 a
	Nod	1.71 ± 0.18 cd	0.13 ± 0.05 a	0.76 ± 0.05 a	42.83 ± 14.27 a
HS4	Sürgün ucu	5.05 ± 1.67 a	0.87 ± 0.42 a	1.48 ± 0.48 a	28.60 ± 0.00 a
	Nod	2.74 ± 0.63 bcd	0.38 ± 0.16 a	0.95 ± 0.17 a	33.30 ± 9.50 a
HS5	Sürgün ucu	3.21 ± 0.81 bcd	0.44 ± 0.10 a	1.05 ± 0.21 a	42.83 ± 8.23 a
	Nod	1.74 ± 0.16 cd	0.13 ± 0.04 a	0.71 ± 0.08 a	42.80 ± 0.00 a
HS6	Sürgün ucu	2.34 ± 0.33 bcd	0.18 ± 0.09 a	0.71 ± 0.08 a	47.60 ± 12.59 a
	Nod	1.33 ± 0.21 d	0.11 ± 0.09 a	0.67 ± 0.13 a	42.83 ± 8.23 a
P Değeri		0.013	0.092	0.297	0.886

*Uygulamalar üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir. SH: Standart Hata

4. Tartışma ve Sonuç

Tohumlar, ait oldukları popülasyonun genetik yapı ve çeşitliliğini temsil ettikleri için *in vitro* kültürlerin kurulmasında başlangıç materyali olarak kullanımları açısından tercih edilirler (Hayta *et al.* 2017). Çalışmamızda da olduğu gibi, şimdiki kadar *Vigna* cinsi ile yapılan birçok doku kültürü çalışmasında tohum, başlangıç materyali olarak kullanılmıştır (Aasim *et al.* 2008, Aasim *et al.* 2011; Rao and Patil 2012, Adlinge *et al.* 2014, Silué *et al.* 2016, Saha *et al.* 2017). *V. caracalla* gibi sert ve su geçirimsiz bir tohum kabuğuna sahip bitkilerde, tohum kabuğu; çimlenme için mekanik bir engel teşkil ederek, suyun emilimini ve bazen de gaz alışverişini önleyebilir (Hayta *et al.* 2017). Bu tip tohum kabuğu içeren tohumlarda dormansiyi kırmak, çimlendirmeyi kolaylaştırmak ve çimlenme oranını arttırmak amacıyla; sıcak suyla muamele, asit gibi çözeltilerle veya keskin bir bıçak yardımıyla tohum kabuğunun aşındırılması (skarifikasyon), tohumları su veya ozmotik çözeltide bekletme gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. Böylelikle tohumun suyu çekmesi sağlanarak çimlenme

sürecinin başlamasına yardımcı olmaktadır (Hayta *et al.* 2017, Marty and Kettenring 2017). Mevcut çalışmada çimlenmeyi kolaylaştırmak ve çimlenme oranını arttırmak amacıyla tohum kabuğunun yumuşatılması için tohumlar yüzeysel sterilizasyon işleminden sonra 3 ve 7 saat süreyle steril suda bekletilmişlerdir. Uygulama sonucunda 7 saat suda bekletilen tohumlarda kabukların daha fazla yumuşadığı ve hatta bisturi yardımıyla daha kolay çizildiği belirlenmiştir. On ikinci günün sonunda yapılan gözlemler sonucunda, 4 dk %0.1'lik HgCl₂ çözeltisi ile steril edildikten sonra 7 saat steril suda bekletilen ve daha sonra çizilerek kültüre alınan tohumlarda sterilizasyon ve çimlenme oranı %93.33 gibi oldukça yüksek bir oranda gerçekleşmiştir (Çizelge 5). *V. caracalla*'nın sera koşullarında düşük çimlenme oranının olduğunun bilinmesi elde edilen bu sonucun başarılı olduğunu göstermektedir.

Bitki doku kültürlerinde başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri kültür için en uygun temel besin ortamının belirlenmesidir. Uygun besin ortamının belirlenmesinde bitki türü veya çeşidine uygulanacak olan bitki doku kültürü tekniği önemlidir. Bitki türleri, besin ihtiyaçları bakımından

genellikle farklı oldukları için çeşitli besin ortamlarına farklı tepkiler verirler (Shirin *et al.* 2015). Mevcut araştırmada, hem *in vitro* çimlenme hem de mikroçoğaltıma en uygun temel besin ortamının belirlenmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

V. caracalla tohumlarının *in vitro* çimlenmesi için en uygun temel besin ortamının araştırıldığı denemede MS, 1/2 MS, WPM, 1/2 WPM, N₆, 1/2 N₆ temel besin ortamları kullanılmış ve en yüksek çimlenme oranı N₆ temel besin ortamında kültüre alınan tohumlarda gözlenmiştir (Çizelge 6). N₆ besin ortamında KNO₃ miktarı MS besin ortamına göre daha fazladır ve WPM besin ortamı azot kaynağı olarak farklı bileşikler içermektedir. Azot bitki yaşamı için önemlidir ve çoğunlukla bitkiler tarafından nitrat (NO₃⁻) formunda alınmaktadır. Hem proteinlerin hem de nükleik asitlerin bileşenini oluşturmaktadır (Bayraktar *et al.* 2020). Besin ortamına eklenen azotun formu ve miktarı kültürü etkilemektedir. Besin ortamlarında azot; nitrat, amonyum tuzları, aminoasitler ve kompleks organik bileşikler formunda yer almaktadır (Shirin *et al.* 2015). Yüksek konsantrasyonda amonyum iyonunun gizli toksisitesi ve ortam pH'nın kontrolünün sağlanması amacıyla, besin ortamlarının çoğu amonyum iyonlarından daha fazla nitrat içerir (Bayraktar *et al.* 2020). Nitrat iyi bir azot kaynağıdır, çünkü hücreler tarafından kolayca alınır, metabolize edilir ve ayrıca tohum dormansisinin kırılmasında da etkilidir (Shirin *et al.* 2015). KNO₃'ün tohum embriyosunda birikerek ozmotik etki oluşturduğu ve embriyonun su ve hatta oksijen alımını arttırabildiği, ayrıca, nitratın indirgenmesinin protein sentezini desteklediği ve buna bağlı olarak da embriyo büyümesinin devam etmesini sağladığı rapor edilmiştir (McIntyre *et al.* 1996). N₆ besin ortamındaki yüksek çimlenme oranının böyle bir etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mikroçoğaltım için en uygun temel besin ortamının araştırıldığı denemelerde ise en yüksek eksplant başına ortalama sürgün uzunluğu, sırasıyla sürgün ucu*WPM (4.52 cm) ve sürgün ucu*1/2 MS (4.36 cm) kombinasyonlarında elde edilmiştir. Besin ortamlarında makro ve mikro elementlerin yetersizliği bitki hücre ve dokularının büyüme ve

gelişmeleri için olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Gürel vd. 2013). N₆ besin ortamının makro ve mikro besin elementi içeriği MS ve WPM besin ortamlarına göre çok daha düşük kalmaktadır (Çizelge 2). Bu nedenle, N₆ besin ortamı *V. caracalla* tohumlarının *in vitro* çimlenmesi için en uygun besin ortamı olmasına rağmen, mikroçoğaltım açısından diğer temel besin ortamlarına göre daha düşük tepkiler vermiştir. Çoğaltım katsayısı mikroçoğaltımda önemli bir faktördür. Her ne kadar çoğaltım katsayısı uygulamalar arasında istatistiki açıdan farklılık göstermese de "ortalama sürgün uzunluğu", "ortalama yaprak boyu" ve "çoğaltım katsayısı" faktörleri birlikte düşünüldüğünde *V. caracalla* türünün mikroçoğaltımında MS, 1/2 MS, WPM besin ortamlarının daha uygun olduğu ifade edilebilir. Gulati ve Jaiwal (1992) tarafından *V. radiata* (L.) Wilczek türünde gerçekleştirilen sürgün rejenerasyon çalışmasında; B5 vitaminleri ile desteklenmiş MS besin ortamında elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (5.5 cm), çalışmamızda elde edilen en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (4.52 cm) ile benzerlik göstermektedir. Mevcut çalışmada, en yüksek çoğaltım katsayısı (1.62), WPM besin ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiş ve bu veriler Diallo vd. (2008) tarafından *V. unguiculata* türünde MS besin ortamında elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (4.21 cm) ve çoğaltım katsayısı (1.81) ile uyumlu bulunmuştur. Gulati ve Jaiwal (1994) tarafından gerçekleştirilen ve farklı bir tür olan *V. radiata* (L.) Wilczek'de B5 vitaminleri içeren MS besin ortamında çoğaltım katsayısı ise 1 olarak belirlenmiştir.

In vitro kültürler; kültür kabı tipi, eksplant ile kültür kapağı arasındaki boşluk, kültür kapağının gaz geçirgenliği gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (Bayraktar *et al.* 2015). Farklı kültür kapları ve temel besin ortamlarının çimlenme üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan denemelerde, en yüksek çimlenme yüzdesi N₆ besin ortamı içeren erlenlerde kültüre alınan tohumlarda elde edilmiştir (Çizelge 6). Ancak 1/2 MS ve 1/2 WPM besin ortamları kendi içlerinde değerlendirildiklerinde ise cam tüplerde çimlenme oranı erlenlere göre daha yüksek bulunmuştur. WPM ve 1/2 N₆ besin ortamları

kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise her iki kültür kabında da çimlenme oranları hemen hemen aynı olmuştur. Bu denemede kültür kabından ziyade, besin ortamlarının çimlenme yüzdelerinde farklılık oluşturduğu düşünülmektedir. Kültür kabı ve farklı jelleştirici ajanların çimlenme üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir diğer çalışmamızda bu faktörlerin çimlenme üzerine etkili olmadıkları belirlenmiştir (Çizelge 7). Her iki denemede de erlenlerde gelişen *in vitro* fideliklerin yaprak boyutlarının cam tüplere göre daha büyük olduğu gözlenmiştir (Şekil 2a ve Şekil 2b). Bazı çalışmalarda kültür kabı hacim artışına bağlı olarak yaprak büyüklüğünün de arttığı rapor edilmiştir (McClelland and Smith 1990, Bayraktar *et al.* 2015). Bu nedenle, erlenlerde gelişen *in vitro* fideliklerde yaprak büyüklüğünün daha fazla olması erlen hacminin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Işık, bitki gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Hem ışık yoğunluğu hem de ışık kalitesi bitkilerde morfogenezin uyarılmasında önemlidir. Işık; kloroplast olgunlaşması, yaprak şekli ve büyüme yönü gibi bitki gelişimindeki birçok süreci etkilemektedir (Reuveni and Evenor 2007). Mevcut çalışmada 2 farklı ışık şiddetinin (3500 ve 4200 lüks) çimlenme ve mikroçoğaltım üzerine etkileri incelenmiştir. Tohum çimlenme denemelerinde, 3500 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan tohumlarda 4200 lükse maruz bırakılan tohumlara göre daha yüksek çimlenme yüzdesi (%80) elde edilmiştir (Çizelge 8). Mikroçoğaltım denemelerinde ise, en yüksek "ortalama sürgün uzunluğu" (3.58 ve 3.57cm), "çoğaltım katsayısı" (1.71) ve "ortalama yaprak boyu" (0.82 cm) 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan eksplantlardan elde edilmiştir (Çizelge 10).

Bitki doku kültürlerinde rejenerasyonları yönlendirmek üzere farklı tiplerde ve dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri besin ortamlarına ilave edilirler (Gürel vd. 2013). Mikroçoğaltımda genellikle çoklu sürgün oluşumunu desteklemek amacıyla ya sitokininler tek başına veya oksinlerle birlikte besin ortamlarına eklenirler (Röck-Okuyucu *et al.* 2016). Oksinlerin doğada, gövde ve internodyumların uzaması, fotoperiyodizm, apikal

dominansi, absisyon, köklenme gibi çeşitli fizyolojik olaylarla ilişkili olduğu ve doku kültürlerinde ise hücre bölünmesi ve uzaması ile kallus oluşumunu teşvik etmek ve kök farklılaşmasını sağlamak amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. DNA'yı oluşturan moleküllerden biri olan adenin türevi olan sitokininler, büyüme ve gelişmeyi teşvik etmek için kullanılırlar. Oksinlerle birlikte kullanıldıklarında ise genellikle hücre bölünmesini desteklerler. Yeniden farklılaşma (redifferentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkilidir. Apikal dominansiyi azaltarak, koltuk altı (aksiler) sürgün oluşumunu desteklerler (Gürel vd. 2013). Mevcut çalışmada BAP tek başına veya BAP + IBA kombinasyonu şeklinde farklı dozlarda besin ortamına ilave edilerek mikroçoğaltım üzerine etkileri incelenmiştir. En yüksek "ortalama sürgün uzunluğu" (5.05 cm), "çoğaltım katsayısı" (1,48) ve "yaprak boyu" (0.87 cm) 1 mg/L IBA + 0.5 mg/L BAP ile desteklenmiş MS besin ortamında (HS4) kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 11). Besin ortamındaki oksin + sitokinin kombinasyonunun oranı rejenerasyonun yönünü belirlemektedir. En yüksek sürgün uzunluğu ve yaprak boyunun elde edildiği besin ortamında oksin (IBA) oranının sitokinin oranından (BAP) fazla olması, boy uzaması ve yaprak boyu uzamasını bitki büyüme düzenleyicisi içeren diğer ortamlara göre daha fazla teşvik etmiş olabilir. Çünkü yukarıda da belirtildiği gibi oksinlerin gerek hücre bölünmesi ve uzamasını ve gerekse de gövde ve internodyumların uzamasını sağladığı bilinmektedir.

En yüksek kök rejenerasyonu (%85.71), N-26 besin ortamında kültüre alınıp 4200 lüks ışık şiddetine maruz bırakılan sürgün eksplantlarından elde edilmiştir. Adlinge vd. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamlarında köklenme elde edilememiştir. 0.1-0.25 mg/L NAA veya IBA ile desteklenmiş 1/2 MS besin ortamlarında ve 3000 lüks ışık şiddetinde kültüre alınan eksplantlarda en yüksek köklenme yüzdesi %76.6 olarak elde edilmiştir. Mevcut çalışmada N₆ temelli besin ortamında 4200 lüks ışık şiddetinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarında, Adlinge vd. (2014) tarafından *V. mungo* L. Hepper türünde

yapılan çalışmadan daha yüksek köklenme yüzdesi elde edilmiştir. Diallo vd. (2008) tarafından *V. unguiculata* L. Walp. türünde gerçekleştirilen çalışmada ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı güçte MS besin ortamında %41.60 oranında köklenme elde edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamında ekstra bir *in vitro* köklendirme aşamasına gerek duyulmadan sürgün gelişimi ile birlikte köklenmenin gerçekleşmesi mikroçoğaltım açısından avantaj oluşturmaktadır.

Mevcut çalışmada *V. caracalla* bitkisinin sürgün rejenerasyonu esnasında gözlemlenen en büyük problemlerden biri hiperhidrisitedir. Hiperhidrik olan sürgünler, hiperhidrisite göstermeyenlere nazaran daha yüksek su içeriğine sahiptirler. Bu yüzden hiperhidrisite durumunda yapraklar ve gövde şeffaf ve camsı bir görünüm almakta ve bu durum birçok bitkinin mikroçoğaltımında ciddi fizyolojik bir problem teşkil etmektedir. Hiperhidrisitenin başlıca sebepleri olarak; düşük agar konsantrasyonu ve agar çeşidi, kullanılan temel besin ortamı, bazı sitokinler ve onların yüksek konsantrasyonları, yüksek NH₄ seviyeleri ve düşük K seviyeleri, kültür kabı içerisindeki yüksek nem ve etilen ve karbondioksit gibi gazların birikmesi gibi nedenler gösterilmektedir (Bayraktar 2013). Mevcut çalışmada, kullanılan temel besin ortamı, eksplant tipi, ışık şiddeti, agar çeşidi ve konsantrasyonu, bitki büyüme düzenleyicileri hiperhidrisite oranlarında bir farklılık oluşturmamış ve mikroçoğaltım amacıyla yapılan tüm denemelerde hiperhidrisite ile karşılaşmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde kültür kabı olarak tüp kullanılmıştır. Kültürler oluşturulduktan sonra tüp kapaklarının etrafı kontaminasyonu önlemek amacıyla streç film ile kaplanmıştır. Bu nedenle, kültür kabında yoğun bir nem oluştuğu ve gaz alışverişinin engellenmesiyle etilen ve karbondioksit gibi gazların biriktiği ve bu durumun kültürlerde hiperhidrisiteye sebep olduğu düşünülmüştür.

Hiperhidrisite sürecinin bazı bitkilerde geri döndürülebilir olduğu ve seraya transfer edildikten sonra hiperhidrik sürgünlerin oluşturduğu yeni sürgünlerin veya yaprakların, normal bitkilerinkine yakın bir morfoloji ve anatomiye sahip olabildikleri bilinmektedir (Bayraktar 2019). Mevcut çalışmada,

hiperhidrisite problemine sahip bazı klonların aklimatizasyonu sonrasında, bu problemin elimine edildiği gözlemlenmiştir. *In vitro* koşullarda elde edilen 20 adet köklü sürgün seçilerek aklimatize edilmiş ve % 70 oranında aklimatizasyon başarısı elde edilmiştir. Başarı ile aklimatize edilen bitkiler saksılara aktarılmıştır. Silué vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *V. subterranea* L. Verdc. türü %70 başarı oranıyla aklimatize edilmiştir. *V. mungo* L. Hepper türünde ise %70-75 aklimatizasyon başarısı elde edilmiştir (Adlinge *et al.* 2014). Bu çalışmada belirlenen aklimatizasyon başarısı bu araştırmacıların bulgularıyla uyum içindedir.

Sonuç olarak; yapılan çalışma, *Vigna caracalla* bitkisinde gerçekleştirilen ilk *in vitro* çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bu sebeple elde edilen veriler bundan sonra yapılacak çalışmalara yol gösterici olacaktır. Çalışma sonucunda ulaşılan veriler ışığında *V. caracalla*'nın ticari üretimi, biyoreaktörlerde kitlesel üretimi, sekonder metabolit çalışmaları, yeni çeşitlerin eldesine yönelik biyoteknolojik çalışmalar gibi çok farklı alanlarda çalışmalar gerçekleştirilebilecektir.

Teşekkür

Bu çalışma, ALİYE ÜSTER VAKFI tarafından Eylül 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında "Selluka-İzmir Sarmaşığı (*Vigna caracalla* L. verdc.) Bitkisinin *In vitro* Klonal Mikroçoğaltımı" isimli proje olarak desteklenmiştir.

5. Kaynaklar

- Aasim, M., Khawar K.M. and Özcan, S., 2008. *In vitro* micropropagation from shoot meristems of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkız. *Bangladesh Journal of Botany*, **37(2)**, 149-154.
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., Hajyadeh, M., Mahmud, S.T. and Ozcan, S., 2011. *In vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce. *African Journal of Biotechnology*, **10(11)**, 2020-2023.
- Adlinge, P.M., Samal, K.C., Kumara Swamy, R.V. and Ranjan Rout, G.R., 2014. Rapid *in vitro* plant regeneration of black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) var. sarala, an important legume crop. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, **84(3)**, 823-827.
- Anderson, N.O. and Asche, P.D., 1994. Breakup of linkages for diagnostic traits in three-species congruity backcross (cbc) *Phaseolus* hybrids. *Journal*

- of the American Society for Horticultural Science, **29(5)**, 496.
- Bayraktar, M., 2013. "Gemlik" ve "Domat" zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinin *in vitro* koşullarda rejenerasyon potansiyellerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 193.
- Bayraktar, M., Hayta, S., Parlak, S. and Gurel, A., 2015. Micropropagation of centennial tertiary relict trees of *Liquidambar orientalis* Miller through meristematic nodules produced by cultures of primordial shoots. *Trees*, **29**, 999–1009.
- Bayraktar, M., 2019. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni using RITA® bioreactor. *HortScience*, **54 (4)**, 725–731.
- Bayraktar, M., Hayta-Smedley, S., Unal, S., Varol, N. and Gurel, A., 2020. Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Gemlik'. *South African Journal of Botany*, **128 (2020)**, 264-273.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Msu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., and Bi, C.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther cultures of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Scientia Sinica*, **18**, 659-668.
- Dewir, Y.H., Murthy, H.N., Ammar, M.H., Alghamdi, S.S., Al-Suhaibani, N.A., Alsadon, A.A. and Paek, K.Y., 2016. *In vitro* rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, **57(4)**, 311-322.
- Diallo, M.S., Ndiaye, A., Sagna, M. and Gassama-Dia, Y.K., 2008. Plant regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.) *African Journal of Biotechnology*, **7(16)**, 2828-2833.
- Etcheverry, A.V., Aleman, M.M. and Fleming, T.F., 2008. Flower Morphology, Pollination Biology and Mating System of the Complex Flower of *Vigna caracalla* (Fabaceae: Papilionoideae). *Annals of Botany*, **102**, 305–316.
- Gulati, A. and Jaiwal, P.K., 1992. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **29**, 199-205.
- Gulati, A. and Jaiwal, P.K., 1994. Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna Radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell Reports*, **13**, 523-527.
- Gürel, A., Hayta, S., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Orhan-Fedakar, S., 2013. Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Uygulamaları, Ege Üniversitesi Basımevi, 47-66.
- Hayta, S., Bayraktar, M., Baykan Erel, S. and Gurel, A., 2017. Direct plant regeneration from different explants through micropropagation and determination of secondary metabolites in the critically endangered endemic *Rhaponticoides mykalea*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **151**, 20-28.
- Lloyd, G. and McCown, B.H., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society*, **30**, 421-427.
- Marty, J.E. and Kettenring, K.M., 2017. Seed dormancy break and germination for restoration of three globally important wetland bulrushes. *Ecological Restoration*, **35(2)**, 138-147.
- McClelland, M.T. and Smith, M.A.L., 1990. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience*, **25(7)**, 797–800.
- McIntyre, G.I., Cessna, A.J. and Hsiao, A.I., 1996. Seed dormancy in *Avenafatua*: Interacting effects of nitrate, water and seed coat injury. *Physiologia Plantarum*, **97**, 291-302.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- Rao S. and Patil, P., 2012. Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life. Reda Helmy Sammour (Ed.), Intech, 197-212.
- Reuveni, M. and Evenor, D., 2007. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **89**, 49–54.
- Röck-Okuyucu, B., Bayraktar, M., Akgun, I.H. and Gurel, A., 2016. Plant growth regulator effects on *in vitro* propagation and stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *HortScience*, **51(12)**, 1573–1580.
- Saha, P., Afrin, M., Mohiuddin, A.K.M. and Shohae, A.M., 2017. Development of an effective *in vitro* regeneration protocol for BARI Mash 2 (*Vigna mungo* L.) an important legume crop in Bangladesh. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, **6(1)**, 23-33.

Shirin, F., Parihar, N.S. and Shah, S.N., 2015. Effect of nutrient media and KNO₃ on *in vitro* plant regeneration in *Saraca asoca* (Roxb.) Willd. *American Journal of Plant Sciences*, **6**, 3282-3292.

Silué, N., Koné, T., Soumahoro, A.B. and Kon, M., 2016. *In vitro* shoot tip multiplication of bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **127**, 603-611.

Suleiman M.K., 2003. Seed germination of ornamental plants: a greenery plan contribution. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **49**, 37-44.

Takahashi, Y., Somta, P., Muto, C., Iseki, K., Naito, K., Pandiyan, M., Natesan, S. and Tomooka, N., 2016. Novel Genetic Resources in the Genus *Vigna* Unveiled from Gene Bank Accessions. *Plos One*, **11(1)**, 1-18.

İnternet kaynakları

1- <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VICA83>
(17.10.2019)

2- <https://www.kadirbekci53.blogspot.com/2013/09>
(14.10.2019)

3-
<https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=280333&isprofile=1&basic=Vigna%20caracalla> (14.10.2019)

4- <https://www.tohumdunyasi.com.tr/selluka-tohumu-izmir-sarmasigi-muhtesem-kokulu-cok-nadir-bitki-turu>
(14.10.2019)

5-
<https://izmirobm.ogm.gov.tr/SitePages/OGM/OGMBiliyormuydunuz.aspx?l=64cb0954-5394-4fcc-83e9-dc545a01a899&i=1> (14.10.2019)