T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI HUMİK MADDELERİN KOLZA (*Brassica napus* L.) c.v. PR46W31 ÇEŞİDİ ÜZERİNDEKİ BAZI FİZYOLOJİK PARAMETRELER , SÜRGÜN REJENERASYONU VE ANTİOKSİDANT ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf KOÇ

Enstitü Anabilim Dalı	**:**	**BİYOLOJİ**
Tez Danışmanı	**:**	**Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ**
Ortak Danışman	**:**	**Doç. Dr. Emine Selcen DARÇIN**

Ocak 2015

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI HUMİK MADDELERİN KOLZA (*Brassica napus* L.) c.v. PR46W31 ÇEŞİDİ ÜZERİNDEKİ BAZI FİZYOLOJİK PARAMETRELER , SÜRGÜN REJENERASYONU VE ANTİOKSİDANT ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ

Yüksek Lisans TEZİ

Yusuf KOÇ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 05 / 01 /2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı **Üye** **Üye**

Üye **Üye**

TEŞEKKÜR

Beni yarı yolda bırakmayan ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Kenan TUNÇ' a , eğitim hayatım boyunca daima yanımda olan ve sonsuz katkılar sağlayan ikinci danışman hocam sayın Doç.Dr.Emine Selcen DARÇIN' a sonsuz teşekkürlerimi sunar ve daima saygı ve minnetlerimi sunarım.

Eğitim hayatımda beni her zaman destekleyen, yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen her şeyimi borçlu olduğum sevgili Ailem' e teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Ahmet TUTAR'a, MSc. Mümin DİZMAN'a humik asitin sentezi ile yaptıkları katkıdan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez 2012-02-20-016 kodu ile Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ vi
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
TABLOLAR LİSTESİ ix
ÖZET x
SUMMARY xi

BÖLÜM 1.
GİRİŞ 1
1.1. Kolza Bitkisinin Önemi 1
1.2. Humik Madde ve Önemi 6
1.3. Bitkide Stres Faktörleri 10
1.3.1. Katalaz 11
1.3.2. Süperoksit dismutaz 12
1.4. Doku Kültürü 12
1.4.1. Bitki doku kültürünün tanımı 12
1.4.2. Bitki hücre, doku ve organ kültürleri teknikleri 14
1.4.3.Bitki büyüme düzenleyicileri 16
1.4.4. Bitki doku kültüründe kullanılan kimyasal maddeler 18

BÖLÜM 2.
MATERYAL METOT 19
2.1. Humik Madde Sentezi 19
2.2. Bitki Materyali 20
2.3. Bitki Doku kültürü Şartları 20
2.4. Uygun Humat Dozunun Belirlenmesi (EC 50 Değeri) 21

2.5. Yaprak Ayası Genişliğinin Belirlenmesi……..…..…….. 21
2.6. Kök ve Gövde Boylarının Belirlenmesi…….…...……..…..…..... 21
2.7. Taze ve Kuru Ağırlığın Belirlenmesi……..….....….. 21
2.8. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi…….……..…... 22
2.9. Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesim……..…..... 22
2.9.1. Toplam protein miktarının belirlenmesi …….……..…...… 22
2.9.2. Toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi…. 22
2.9.3. Katalaz (KAT) aktivitesinin belirlenmesi ……..…….……..… 23
2.10. Verilerin Analizi……..……....……...….... 23

BÖLÜM 3.
BULGULAR 24
3.1. Optimizasyon çalışmalarına ait bulgular..... 24
3.2. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın lamina üzerine etkisi 26
3.3. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın kök ve gövde üzerine etkisi …… 27
3.4. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın taze ve kuru ağırlık üzerine etkisi……..……... 27
3.5. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın fotosentetik pigment üzerine etkisi ..……..…….. ….…….…… 28
3.6. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın antioksidant enzimler üzerine etkisi……..…….…… 30
3.7. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın toplam sürgün sayısı üzerine etkisi……..…….……. 31
3.8. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın kallus ağırlığı üzerine etkisi…….……...…..….……. 32
3.9. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın kallus sayısı ve kallus yüzdesi üzerine etkisi……...…….……... 33
3.10. Potasyum humat,bor humat ve demir humatın petri başına sürgün oranı üzerine etkisi…….……...……. 34
3.11. Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi …….……...……..… 34
3.12. Çalışma fotoğrafları…….…. 35

BÖLÜM 4.
YAPILAN ÇALIŞMALAR 36

BÖLÜM 5.
SONUÇ VE ÖNERİLER 48

KAYNAKLAR 49
ÖZGEÇMİŞ 58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
2,4 - D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
$AgNO_3$	: Gümüş nitrat
BAP	: 6-Benzil amino pürin
BH	: Bor humat
FeH	: Demir humat
g	: Gram
H_20	: Su
HM	: Humik madde
KH	: Potasyum humat
L	: Litre
mg/L	: Milligram / litre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MS	: Murashige ve Skoog
NAA	: Naftalen asetik asit
ppm	: Milyonda bir birim
TDZ	: Thidiazuron

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Kolza (Brassica napus L.) ‘ un gelişme safhaları ……..…. 2

Şekil 2.1. Demir humat sentez aşamaları ……...…….…. 19

Şekil 3.1. Farklı hormon kombinasyonlarının kallus ağırlığı üzerine etkisi……..……. 25

Şekil 3.2. Farklı hormon kombinasyonlarının gövde eksplantı için toplam sürgün sayısı üzerine etkisi ……..…...… 25

Şekil 3.3. Farklı hormon kombinasyonlarının sürgün üzerine etkisi …… 26

Şekil 3.4. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının yaprak ayası genişliği üzerine etkisi ……..……...…… 26

Şekil 3.5. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının kök ve gövde boyu üzerine etkisi ……..…… 27

Şekil 3.6. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının (a) taze ağırlık ve (b) kuru ağırlık (gram) üzerine etkisi...……..……..…… 28

Şekil 3.7. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının klorofil a miktarı, klorofil b miktarı üzerine etkisi ……...……...……... 29

Şekil 3.8. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi ……..…...… 29

Şekil 3.9. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının toplam çözünür protein miktarı üzerine etkisi ……...……..……...…… 30

Şekil 3.10. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının katalaz aktivitesi üzerine etkisi …… 30

Şekil 3.11. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkisi ……...……...……... 31

Şekil 3.12. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının ortalama toplam sürgün sayısı üzerine etkisi ……...……...……... 32

Şekil 3.13. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının kallus ağırlığı üzerine etkisi ……...……...…….. 33

Şekil 3.14. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının ve kallus oranı (%) üzerine etkisi ……...……...……... 33

Şekil 3.15. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının petri başına sürgün oranına etkisi ……...……...…….. 34

Şekil 3.16. Farklı humat dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi ……...……...…….. 35

Şekil 3.17. Farklı humat dozlarının (a) MS 0 kontrol ortamı , (b) 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA (c) 1 ppm FeH + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA ve (d) 3 ppm KH + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA ortamlarına etkisi …… 35

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Farklı çevre şartlarının çeşitli evrelerde kültürler üzerine etkileri 17
Tablo 2.1. Potasyum humatın çimlenme üzerine etkisi..... 24

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Brassica napus* L., Humik Madde, Sürgün Rejenerasyonu

Bu çalışmada, hem katkı maddesi hem de bitki büyüme düzenleyici olarak seçilen farklı konsantrasyonlardaki potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın kolzanın fizyolojik özellikleri, sürgün rejenerasyonu ve antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Steril edilen tohumlar % 3 (w/v) sükroz ve % 0.7 (w/v) agar ile her biri 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm and 7 ppm konsantrasyonlarında olan potasyum humat, bor humat ve demir humat içeren Murashige and Skoog temel besiyerinde kültüre alınmıştır. Fizyolojik özellikler ve antioksidant enzim aktiviteleri bir haftalık bitkicikler üzerinde gözlenmiştir. 3-4 haftalık bitkiciklerden alınan gövde eksplantları 1 mgl^{-1} 6-benzylaminopurine ve 0,2 mgl^{-1} naphthaleneacetic acid içeren besiyerinde kültüre alınmıştır. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, bütün humik madde formlarının kolzanın fizyolojik özellikleri üzerinde olumlu etkisi olduğu, antioksidant enzim aktivitesi üzerinde negatif etkisi olduğu ve sürgün rejenerasyonuna hiç bir etkisi olmadığı görülmüştür.

THE EFFECTS OF HUMIC SUBSTANCES ON PHYSIOLOGICAL PROPERTIES, SHOOT REGENERATION AND ANTIOXIDANT ENZYMATIC ACTIVITIES *IN VITRO* CULTURED RAPESEED

SUMMARY

Keywords: *Brassica napus ssp. oleifera* L., Humic Substance, Shoot Regeneration

It was investigated the effects of various concentrations of potassium humate, boron humate and iron humate which was selected the additives to basal medium and phytohormones on physiological characteristics, antioxidant enzymatic activities and shoot regeneration rapeseed *in vitro*. Sterilized seeds were cultured on Murashige and Skoog Basal Medium with 3% (w/v) sucrose and 0.7% (w/v) agar containing each of the individual 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm and 7 ppm potassium humate, boron humate and iron humate. Physiological characteristics and antioxidant enzymatic activities were observed from one week old seedlings obtained from the seeds. For observing shoot regeneration capacity, stem segments 3-4 mm in length were excised from 3-4 week old seedlings obtained from the seeds. Stem explants were cultured on Murashige and Skoog Basal Medium with 1 mgl^{-1} 6-benzylaminopurine and 0,2 mgl^{-1} 1-naphthaleneacetic acid. As a results, it was expressed that all the humate forms had positive effects on physiological parameters, but there were no effect on shoot regeneration. It was observed negative correlation between antioxidant enzymatic activities and increasing doses of all the humate forms.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

1.1. Kolza Bitkisinin Önemi

Gün geçtikçe artan düzensiz nüfus, aşırı ve çarpık kentleşme, kuraklık, erozyon, ağır metaller, çevre kirliliği, tuzluluk, endüstriyel kuruluşlar gibi sebeplerle tarım alanları azalmaktadır. Bu sebeple sanayide kullanılan hammadde ve tarımsal üretimi arttırarak besin ihtiyaçları karşılanmalıdır ve bir ürün çeşidinden birden fazla alanda yararlanılmalıdır [1].

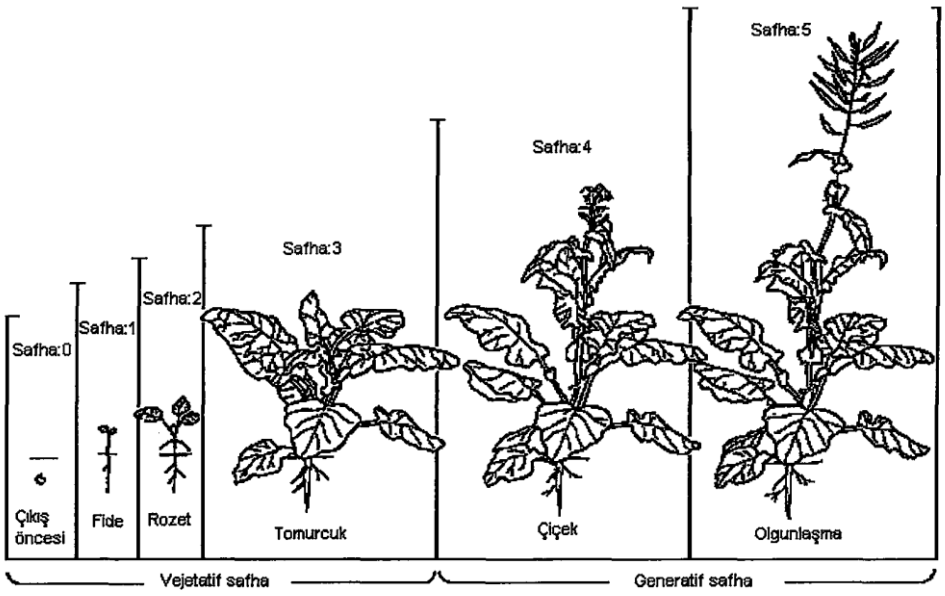
Temel besin maddelerinden olan ve insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan yağlar, insanların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli olan ana besin maddelerinden birisidir. Yetişkin bir insanın günlük aktiviteleri için 2000-3000 kalori gerekli olduğu ifade edilmektedir. Dengeli ve sağlıklı beslenmenin gereği olarak da bu miktarın 650-900 kalorisinin yağlardan karşılanması gerekmektedir [2].

İnsanların temel gıda ihtiyaçlarından biri olan yağlar, vücut için öncelikli enerji kaynağı olmaları ve sahip bulundukları diğer hayati fonksiyonları nedeni ile oldukça önemlidir. Yağlar orijin itibariyle hayvansal ve bitkisel olmak üzere; iki kaynaktan sağlanmaktadır [3].

Bitkisel yağ hammaddelerinin belirli bir plana göre üretilmemesi veya üretim planlaması yapılsa dahi uygulama imkanlarının kısıtlı olması, kuraklık, hastalık ve zararlı problemleri dışında özellikle taban fiyat politikaları, kalitesiz tohumluk, düşük verim ve kalite, bir veya ikinci ürüne olan bağımlılık, tarımsal mekanizasyon ve üreticilerin bilinçlendirilmemesi gibi sebepler hammadde üretiminin düzensiz gelişmesine yol açmıştır [4].

Günümüzde özellikle yağlı tohumlu bitkiler sofralık yağlar, hayvan yemi, biodizel, ilaç yapımı, boya sanayi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [5].

Kolza, yağ şalgamı *(B. campestris; n-10;* [AA]) ile lahananın *(B. oleracea;* n=9; [CC]) melezlenmesi ve kromozom sayılarının katlanmasıyla doğada kendiliğinden ortaya çıkmış amphidiploid bir bitkidir . Kolza, Rhoedales takımına ait *Crucifera* familyasına bağlı *Brassica* cinsinden *Brassica napus* ssp. *oleifera* L. olarak sistematikte yer alır, yazlık ve kışlık çeşitlerinin yanı sıra alternatif (hem yazlık hem de kışlık olarak ekilebilen) çeşitleri de bulunmakta olup tek yıllık otsu bir bitkidir.Gelişimi fide, rozet, tomurcuk, çiçek ve olgunlaşma dönemleri geçirir [1].



Şekil 1.1. Kolza *(Brassica napus* L.) ' un gelişme safhaları [6]

Kolza bitkisi, tohumunda ortalama %38-50 yağ, % 16-24 protein ve % 20 polisakkarit bulundurduğu için oldukça önemli bir yağ bitkisidir [7].

Yazlık ve kışlık çeşitlere sahip olan kolza, ayrıca yetişme devresinin kısa olması, kışlık ve yazlık çeşitlerinin olması, birim alandan yüksek tohum verimi (200-250 kg/da) elde edilmesi ve yağ oranının (%45-50) yüksek olması, ekiminden hasadına kadar bütün yetiştirme tekniğinin mekanizasyona uygun olması, ilkbaharda hızlı gelişerek yabancı

otların gelişmesini engellemesi ve kendisinden sonraki ürüne temiz toprak bırakması gibi özellikleriyle de oldukça avantajlı bir bitki durumundadır [8].

İlk olarak M.Ö. 2000 yılında Hindistan'da kültüre alınmış, daha sonra Çin'e ve Japonya'ya yayılmıştır. 1945'ten sonra Kanada ve Kuzey Avrupa'da kolza tohumu üretimi büyük bir artış göstermiştir. Özellikle son yirmi yılda; önemli bitkisel yağ kaynaklarından olan Brassica ailesinden olan yağlı tohumların üretimi daha da artmıştır. Çin, Kanada, Hindistan, Fransa, İngiltere ve Polonya, Brassica ailesine ait kolza tohumu üreticilerinin basında yer almaktadır [9]. Kolza'nın Kanada'da ıslahı sonucunda erüsik asit ve glukosinolat içermeyen bir türü elde edilmiş, adına da, İngilizce "Canadian Oil Low Acid" (düşük asitli Kanada yağı) kelimelerinin kısaltması olan "Kanola" adı verilmiştir [5]. Başta Trakya olmak üzere 1980 öncesinde kolza birçok yöremizde yetiştirilmiştir. Ancak yağındaki erüsik asit ve küspesindeki glikosinolat oranının yüksek olması nedeniyle kolzanın üretimi 1979 yılında yasaklanmıştır [8].

Yüksek erusik asit içeren yağ çesitli kardiyolojik problemlere yol açarken, küspede bulunan glukosinolatların fazlalığı ise yem kalitesini düşürmektedir. Yağda bulunan yüksek erüsik asit kalpte yağ birikmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kolza yağındaki erusik asit içerigi tohuma uygulanan genetik modifikasyonlar ile %5'in altına düşürülmüştür. *B. napus* türüne ait ilk düşük erusik asit içeren kolza tohumu (DEAK) ekimi 1968 yılında, *B. rapa* türüne ait ilk düşük erusik asit içeren kolza tohumu ekimi ise 1971 yılında Kanada'da geliştirilmiştir [10].

Düşük glukosinolat içeren kolza tohumu ise Polanyalı bir üretici tarafından elde edilmiştir. Düşük miktarda hem erusik asit hem de glukosinolat içeren ve çift sıfır varyetesi olarak adlandırılan kolza tohumu ilk olarak 1976 yılında Kanada'da yetiştirilmiştir. %2'den daha az erusik asit ve 30μmol/g'dan daha az glukosinolat içeren bu kolza tohumu için Amerika ve Kanada'da kanola adı kullanılmaktadır [10, 11].

Kolza dünyada yetiştirilen en önemli yağ bitkilerinden biridir. Kolza hem tarımsal hem de endüstriyel isletmelerde çok yönlü kullanılmaktadır. Kanola tohumlarından yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspesinde yüksek oranda protein bulunduğundan hayvan yemi olarak kullanılabilmektedir.Yenilenebilir enerji kaynağı olması ve yağının akaryakıt

olarak kullanılması sebebiyle dünyada kolza biyodizelinin üretilmesi ve tüketilmesi gittikçe yaygınlaşmaktadır [3].

Kolzanın geniş ekolojik koşullara uyumlu olması nedeniyle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde yaygın olarak yetiştirilmektedir [4]. Ülkemizde genellikle kışlık kanola tarımı yapılmaktadır. Kışlık kanola, kışa kar altında -15 ^{o}C' ye kadar dayanıklıdır. Ancak kışa girerken kuvvetli bir kök oluşturması ve rozetleşmesini tamamlamış olması gerekmektedir. En iyi yetiştiği toprak humuslu derin yapılı nötr veya hafif alkali ve hafif asitli topraklardır. Ph: 6.5-7.5 arası en uygun topraklardır [12].

Türkiye'de yağ üretiminin büyük bir kısmını bitkisel yağlar (% 88,4) oluşturmakta olup, bitkisel ham yağ üretimimizin% 66,1'i ayçiçeğinden, % 23,1'i pamuk çiğidinden, % 7,7'si kolzadan ve % 3,1'i ise mısırdan sağlanmaktadır [13].

FAO 2011 yılı verilerine göre, dünyada toplam 33,7 milyon ha alanda kolza ekimi yapılmakta olup, üretim 62,5 milyon ton' dur. Bu üretim değerleriyle dünyada soyadan sonra en fazla üretilen ikinci yağlı tohumlu bitkidir. Buna karşın, Fransa, Almanya, Polonya gibi çoğu Avrupa ülkesinde kolza üretimi ilk sıradadır. Ülkemizde ise 27 bin ha alanda, yaklaşık 91 bin ton verim alınmaktadır . Türkiye üretiminin yaklaşık 72 bin ton' u, 21 bin ha' lık ekiliş alanı ile en fazla Trakya Bölgesinden elde edilmektedir. Bölgede toplam ekiliş alanı ve üretim miktarları 2007 yılına göre, yaklaşık 6 kat artış göstermiştir [14].

TÜİK 2014 verilerine göre Türkiye'de üretilen yağlı tohumların 1988 yılında toplam ekiliş alanı 9 348 850 da iken bu alan 2013 yılında 7 782 136 da'a düşmüştür. Kolza' nın ekilen alan (dekar) 1988 'de 12,300 dekar iken 2013 yılında bu sayısı 311,272 dekar alana yükselmiştir. 1988 yılında üretilen toplam yağ miktarı 1 422 230 ton iken bu miktar 2013 yılında 3 312 965 ton ağırlığına ulaşmıştır. Bu rakam kolza bitkisi için 1988 yılında 1 400 ton iken 2013 yılında 102000 tona ulaşmıştır.

Ülkemizde, yılda 500 bin ton bitkisel yağ ithal edilmektedir. Nüfus artışına bağlı olarak artan yağ ihtiyacının karşılanabilmesi için, yağ üretiminin de artırılması zorunludur. Kanola, bu bitkisel yağ açığının kapatılmasında önemli rol üstlenebilir [12].

Bitkisel yağlar gıda olarak kullanımlarının dışında biyodizel (biyomotorin) üretiminde de önemli ölçüde kullanılmaktadır. Biyodizel olarak tüm bitkisel yağlar kullanılabilmekle birlikte özellikle hintyağı, jojoba, kolza, yağ şalgamı, aspir ve yerfıstığı üzerinde fazlaca durulmaktadır. Biyodizel Avrupa'da yaygın olarak kullanılmakta olup, Türkiye'de mevcut olanaklarla uygulamaya alınabilecek en önemli alternatif yakıt seçeneklerinden biridir [13] . Kanola tohumlarından soğuk presleme ile elde edilen ham yağ metanol ile katalizör eşliğinde normal basınç ve ısıda estere dönüştürülür. 1 kg tohumdan 450 gr yağ çıkmaktadır ve metanol ile reaksiyondan sonra 450 lt biodizel yakıt elde edilebilmektedir [12]. Dünya biyodizel üretiminin % 84 gibi önemli bir kısmı kolzadan karşılanırken, % 13' ü ayçiçeğinden ve %3'ü ise soya vb. ürünlerden karşılanmaktadır [2].

Bu yönüyle ele alındığında, kolza ülkemizde mevcut bitkisel yağ açığını kapatmak için sahip olduğu üstün özellikleri ile avantajlı durumdadır. Kolza, yetişme devresinin kısa olması, birim alandan yüksek tohum verimi elde edilmesi, yağ oranının yüksek olması, toprak isteklerinin az, tarımının mekanizasyona uygun olması, vejetasyon suresinin diğer yağ bitkilerine oranla daha kısa olması , ilkbaharda hızlı gelişerek yabancı otların gelişmesini engellemesi ve kendisinden sonraki ürüne temiz toprak bırakması, hasat zamanının diğer yağ bitkilerinden 1-2 ay erken olması sebebiyle hem yağ fabrikalarına hammadde sağlayarak çalışma kapasitesini yükseltmesi hem de uygun bölgelerde ikinci ürün tarımına imkan sağlaması, küspesinin yem sanayinin protein kaynağı açığını kapatması, yağ fabrikasyonunda yağlı tohumların önce kabuk ayırım işlemine tabi tutulmaları gerektiği halde, kolza tohumunun doğrudan doğruya öğütülmesi, kışlık çeşitlerinin -15 – -20 ^{0}Cdereceye kadar dayanabilmesi gibi üstün özellikleri ile ilk akla gelecek bitkidir [13].

Kolza, arıları cezbeden sarı çiçeklere bol miktarda sahip olduğundan arıcılar içinde değerli bir bitkidir. Çiçek döneminde bal arıları bir hektar kolzadan 15 günde 100 kg bal ve yaklaşık 1 kg bal mumu yapabilir [12].

Kolza, tahıllara özgü hastalık kaynaklarının azaltılmasında diğer geniş yapraklı kültür bitkileri gibi büyük öneme sahiptir. Ayrıca kolza kökleri mantari hastalıklara karşı antifungal özelliklere sahip kimyasal salgılayarak hastalıkların kontrolünde büyük önem

taşır [3]. Ekim nöbeti içerisinde kolza bitkisinin yer alması ile kendisinden sonra ekilen tahılların verimini arttırmaktadır [15].

Kanola tohumunun içerdiği yağ oranının artırılması, yağın içerdiği doymamış yağ asidi (özellikle oleik asit) oranlarının yükseltilmesi, dolayısıyla doymuş yağ oranının azaltılması ve içerdiği vitaminlerin özellikle antioksidan özelliğe sahip tokoferol (E vitamini) miktarının ve kolesterol düşürücü fitosterollerin yükseltilmesiyle çok fonksiyonlu gıda ürünlerinin üretilebilmesi önem arz etmektedir [16]. Ayrıca Kolzada yapılan ıslah çalışmalarının başlıca amacı, yüksek verim, yüksek yağ oranı, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılıktır [17].

Kolza yağı, ülkemizde yoğun olarak kullanılan yağlarla rekabet edebilecek kadar iyi niteliklidir. Çok düşük miktarlarda doymuş yağ asidi, oldukça yüksek oranlarda oleik asit (%60) ve linoleik asit (%10) içermektedir. Bu özelliklerinden dolayı toplam kolesterol ve LDL kolesterol oranlarını düşürmekte, diğer yağ asitlerini dengeleyici özellikler göstermekte ve insan sağlığı üzerine olumlu etkiler yapmaktadır. Bunun yanı sıra; yetiştirilen ayçiçeği, mısır, soya gibi yağ bitkilerinin sezon itibariyle üretimlerinin bulunmadığı ya da yeterli olmadığı koşullarda kolzanın alternatif bir yağ bitkisi olarak değerlendirilmesi gerekmektedir [14]. Kolza çeşitlerinden elde edilen bitkisel yağ, besin değeri ve içeriği bakımından zeytinyağı ve yerfıstığı yağının kalitesine çok yakındır [5].

Kolza bitkisi ülkemizde son derece ihmal edilmiş bir bitkidir. Ülkemizde rapiska ve rapitsa isimleriyle de bilinmektedir. Ülkemizde tahıl üretimi yapılan her yerde kolzanın yetiştirilebileceği göz önüne alınarak sulama imkanı fazla olan tarımsal alanlar da dikkate alındığında yağ açığımızı kapatmada önemli alternatif yağ bitkilerinden birisi olabileceği mümkündür [2].

1.2. Humik Madde ve Özellikleri

Humik maddeler toprak ve yüzey suları gibi çevresel ortamlarda bulunan ve bitkilerin bozunması sonucu oluşan doğal organik materyal sınıfından, makromoleküler bileşiklerdir. Yani toprağın organik yapısının bir parçası olan humik maddeler

biyomoleküllerin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik dönüşümü sonucu oluşan bileşiklerdir [18].

Kimyasal olarak kararlı, koyu renkli ve yüksek moleküler ağırlıklı yapıya sahip olan hümik maddelerin yapısı % 44–58 Karbon (C), % 42–46 Oksijen (O), % 6–8 Hidrojen (H) ve % 0,5–4 Nitrojen (N) içermektedir. Nitrojen belirgin metallerle çok kuvvetli bağlar oluşturmak için önemli bir rol oynamaktadır [20]. Humik maddeler toprakta kolaylıkla parçalanmayan dayanıklı, toprak organik maddesinin temelini oluşturan maddelerdir. Humik asit ve türevleri, hücre zarının geçirgenliğini arttırarak, bitkilerin besin elementlerini almalarını kolaylaştırdığı tespit edilmiştir [19].

Hümik asit ilk defa Sprengel tarafından 1826 yılında çürümüş bitkisel maddelerden sodyum hidroksit ekstraksiyonuyla elde edilmiştir. Toprakta doğal hümik asitler, lignin ve selüloz gibi bitkisel maddelerin oksijenin varlığında bakteriler tarafından binlerce yılda oluşturulmaktadır. Hümik asit kimyasal olarak humusun yapısında hümin maddeleri olarak yer alır. Hümin asitleri içerdikleri karboksil (-COOH), fenolik, alkolik (-OH), metoksil ($-OCH_3$), kuinoid (CH=CH-) ve =CO grupları nedeniyle katyon değişim kapasitesi oldukça yüksek maddelerdir [21].

Başlıca hümik asit, fülvik asit ve hüminler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Hümik asitler, bazda çözünürler, asitte çözünmezler; fulvik asitler**,** asitte ve bazda çözünürler; hüminler, asitte ve bazda çözünmezler. Hümik ve fulvik asitler, bitki ve toprak için gerekli olan besin maddeleri ve elementleri içeren organik kompleks moleküllerdir [21].

Hümik maddelerin yapılarında bulunan önemli orandaki karboksilik asit grupları,fenolik ve alkolik hidroksil keton ve kinon gibi öğeler, onlara negatif (-) elektriksel yük kazandırarak katyonları absorbe etmelerine ve topraklarda doğal şelat olarak görev yapmalarına olanak vermektedir. Hümik maddeler toprakların katyon değişim kapasitelerini artırır ve toprak verimliliğini yükseltir [22].

Humik maddelerin kullanılması özellikle kireç ve kil kapsamı yüksek olan ve bu nedenle başta fosfor, çinko, demir, bor olmak üzere kimi bitki besin elementlerinin alınabilirliği yönünden önemli problemler ortaya çıkan ülkemiz topraklarında, besin elementi

alınabilirliğinin artırılması ve bazı alanlarda toksisite problemlerinin regüle edilmesi açısından önemlidir. Toprağa humik madde uygulaması ile birlikte toprak verimliliği artmakta ve bitkilerce besin elementlerinin alınabilirliği olumlu yönde etkilenmektedir [23].

Humik maddelerin topraklarda suyun tutulması, drenaj ve havalanma gibi toprakların fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi ve topraktaki besin elementlerinin yarayışlı hale getirilmesi gibi kimyasal özellikleri etkilediği bilinmektedir. Ayrıca humik maddeler ağır metallerle birleşerek, ağır metallerin bitkiler tarafından fazla miktarda alınmasını engellemektedir [24].

Olumsuz çevre koşullarından daha az etkilenecek veya bu koşullara toleranslı çeşitler geliştirmenin yanında, bitkilerin ilk gelişme devrelerini hızlandıracak, kök ve topraküstü organlarının daha iyi gelişimini sağlayacak uygulamalar son yıllarda büyük önem kazanmaktadır. Özellikle organik madde fraksiyonlarından olan humik asidin bitki biyokütlesini artırdığı ve bu olumlu etkinin kök gelişiminde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Humik asit bitki gelişimini doğrudan veya dolaylı yoldan etkilemektedir. Doğrudan etki bitki bünyesindeki humik madde bileşenlerinin bitki tarafından alınmasıdır. Dolaylı etki ise sentetik iyon değiştiricilerin yaptığı gibi bitki besin maddelerinin sağlanması ve düzenlenmesidir [25].

Humik maddelerin eşsiz özelliği geniş bir pH aralığında tampon özelliği göstermesidir. Bu tampon kapasitesi dar bir pH aralığında yetişen bitkiler için çok önemlidir [22]. Humik maddeler toprak pH'ını nötralize etmektedir. Toprak pH'ı nötralize olduğu zaman, toprakta bağlı duran ve bitki kökleri tarafından alınamayan birçok iz element alınabilir hale gelmektedir [26] Asidik ve bazik özelliklerdeki toprakları nötralize ederek fazla tuzluluğu ve fazla kireçliliği giderip toprağın pH'sını düzenlemektedir.Hümik asit kimyasal olarak aktif bir karaktere sahip olup ve topraktaki çeşitli metaller, mineraller ve organikler ile çözünebilir veya çözünemez kompleksler oluşturur. Bitkinin besinleri kolay ve sürekli almasını sağlayarak topraktaki azot oranını arttırır. Bitkilerde demir eksikliğinin (Kloroz) giderilmesine katkı sağlar [34]. Humik maddeler toprakta demir gibi elementlerin kristalize olmasını engeller, kompleks bileşikler oluşturur [27] ve demiri şelatlayarak bitkilerin demirden yararlanmasını artırırlar [28].

Humik maddeler, bitkilerin çimlenmesini ve büyümesini uyarıcı olarak bilinirler. Özellikle bitki zarlarının içerisinden geçebilirler, iz elementlerinin bitki kökleri içerisinde taşınmasını kolaylaştırırlar. Humik maddeler bitkilerde büyüme hormonlarına benzer davranışlar sergilerler [29].

Kumlu topraklarda bulunan besin maddeleri, suyla birlikte kök çevresinde tutunamayarak toprağın alt kısımlarına doğru kolayca süzülüp giderler. Humik asitler negatif yükleri sayesinde katyonları bağ yaparak tutarlar, böylece bitki kökleri tarafından kolayca emilirler. Humik asitler elementlerin topraktan bitkiye geçişi için son derece önemli bir ortam oluşturur. Kök sistemi de humik asitler gibi negatif yüke sahiptir. Fakat kök sisteminin sahip olduğu bu negatif yük, humik asitlerinkinden daha büyüktür. Böylece, humik asitlere bağlanan mikroelementler ayrılarak kökteki hücrelerin zarından bitkiye geçerler. Bitki kökleri, belirli konsantrasyonlardaki humik maddelerle temas halinde olduklarında, bitkinin köklerinin ya da tamamının katyonik ve anyonik makro besinlerinin miktarında bir artış görülmektedir [30].

Humik bileşiklerin reaktif yan gruplarının iyon değiştirme kapasitelerinden ötürü, bu bileşiklerin yer değiştirme reaksiyonlarıyla pestisitleri bağlama rolünde büyük bir önem taşımaktadır. Humik maddeler pestisitler ve herbisitlerle etkileşip kararlı yapılar oluşturarak onları bitkiler ve yeraltı suları için zararsız hale getirirler [31].

Humik asitlerle hormonlar arasında yakın bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Organik maddece zengin topraklar bitki gelişiminde etkili olan oksin ve diğer hormonların etkilerini gösterebilen humik maddeleri içermektedir [32].

Hümik asidin kök hücrelerinin zar geçirgenliğini arttırarak Na, K, Ca, Fe ve Mn gibi besin maddelerinin alımı ve bitkide taşınmasını olumlu olarak etkilediğini bilinmektedir. Ayrıca, hümik asit uygulamasıyla besin minerallerinin bitkiye alınımındaki artış, hümik asidin kök hücrelerinin H-ATPaz enzim aktivitesini uyarabildiğini kanıtlamaktadır [35].

1.3. Bitkide Stres Faktörleri

Bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilir ve bitki toleransı ile yakından ilişkilidir [36].

Kuraklık, yüksek sıcaklık, tuzluluk, metal, pestisid ve toprak pH'sı gibi stres faktörleri bitkilerdeki tüm metabolizmayı olumsuz etkileyerek, ürün verimini, büyümeyi ve gelişmeyi sınırlandırmakta, ilerleyen düzeylerde ise bitkinin ölümüne neden olabilmektedir. Bu yüzden bitkilerin kendilerine göre savunma mekanizmaları vardır [37].

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Kararlı hale geçebilmek için diğer bileşiklerle oldukça hızlı reaksiyona girme eğilimindedirler [38].

Stres faktörleri nedeniyle hücrede meydana gelen oksidatif stres; Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) (superoksid radikalleri (O^{2-}), hidrojenperoksid (H_2O_2), singlent oksijen ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi) oluşmasına neden olur. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin sebep olduğu ROS'lar, lipid peroksidasyonu ve membran zararlarında önemli bir role sahiptir. Bitkilerde ROS'ların temizlenmesinde antioksidan maddeler ve enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon s-transferaz (GST)) görev yapmaktadırlar [37].

Hücrelerde normal metabolizma sırasında serbest radikaller olarak adlandırılan okside edici moleküller (oksidantlar) oluşmaktadır. Bilindiği gibi serbest radikallerden olan aktif oksijen türevleri oksidant özellik gösterirler. Süper oksit radikali *(O_2'),* hidrojen peroksit (H_20_2), hidroksil radikali (OH') ve singlet oksijen ($^10_2$) gibi reaktif oksijen türevleri biyolojik sistemlerde en sık rastlanan oksidantlardır. Oksidantların neden olduğu hasarların mekanizması oldukça karmaşıktır. Ancak genel anlamda oksidantlar, hücre bölünmesini engellemekte [39], hücre zarını, kalıtsal materyali ve çeşitli enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarı yapmaktadırlar. Oksitleyici özelliğe sahip olan bu tür elektrofilitik moleküller hücre membranında ki lipidleri, hücrenin önemli fonksiyonel

molekülleri olan proteinleri ve DNA'yı oksitleyebilmekte ve sonuçta oksitlenmiş proteinler hücresel fonksiyon bozukluğuna, DNA hasarına ve mutasyona neden olmaktadır [40].

Bitkiler stres sonucu oluşan aktif oksijen türlerinin hasar verici etkilerinden korunmak için çok sayıda antioksidant enzime sahiptir. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), süperoksidin ($O_2^{\cdot}$) en önemli gidericisidir ve enzimin aktivitesi sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. SOD aktivitesinin bu toksik ürünü, askorbat peroksidaz (AP, EC.1.11.1.11) ve glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) tarafından ortadan kaldırılır. Katalaz (KAT, EC. 1.11.1.6) enzimi ise oluşan hidrojen peroksidi suya (H_2O) ve moleküler O_2 e dönüştürür [41].

1.3.1. Katalaz (CAT) enzimi

Katalaz enzimleri (EC 1.11.1.6) nükleer genler tarafından kodlanan çoklu izozimler olan tetramerik homoproteinlerdir. Genellikle peroksizom ve glioksizomlarda yer alırlar [42].

Katalaz, protein yapısında bol miktarda bulunan karakteristik bir enzimdir. Bu enzim yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmada mevcuttur. Ayrıca toksik hidrojen peroksidi hücrelerden uzaklaştırmada da önemli bir rol oynar [43].

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif bir oksijen türü olup hücreler tarafından yağ asitlerinin peroksizomlarda β−oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin katabolizması gibi normal aerobik reaksiyonlarda oluşturulur ve farklı konsantrasyon seviyelerinde mitojenik büyümeden apoptosise kadar bir çok hücresel cevap mekanizmasında etkinlik gösterir. Katalaz çeşitli streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır. Ayrıca patojenlerin öldürülmesinde de savunma sistemi hücreleri tarafından üretilir. Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 hücrelere zarar verir ve hücrelerde birikimi protein, lipit ve DNA gibi hücresel hedeflerin oksidasyonuna yol açar. Bu durum ise mutasyonların oluşmasına ve/veya hücre ölümüne yol açar. Bu sebeple H_2O_2'nin hücreden uzaklaştırılması oksidatif hasardan korunmak için önemlidir ve bu görevde katalaz tarafından yürütülür [37].

1.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi

Bitkilerde metabolik süreçlerde oluşan O_2^- radikalinin toksik etkilerine karşı ilk savunma hattını süperoksit dismutaz (SOD; EC 1. 15.1.1) oluşturur [42].

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit anyonunu (O_2^-) enzimatik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür. Metabolik aşamalarda üretimi oldukça fazla olan süperoksit, hücre içi aktivitesini düşük tutarak hücresel O_2^- düzeylerinin kontrolünde ve hücreleri O_2 radikalinin etkilerinden korumada görev alır [44].

SOD, O_2 detoksifikasyonunda yer alan ilk enzimdir. Metaloenzim olan SOD enziminin izoformları, bitkilerde Cu/Zn SOD kloroplast ve sitosolde, Mn SOD mitokondri ve peroksizomlarda ve Fe SOD ise kloroplastlarda bulunmaktadır kloroplastlarda bulunmaktadır [45, 46].

1.4. Doku Kültürü

1.4.1. Doku kültürünün tanımı

Bitki doku kültürü , aseptik şartlarda bitki organ, doku ve hücrelerin steril ve yapay besi ortamlarında kültüre alınmasını, çoğaltılmasını ve genetik olarak değiştirilmesini, bitki yada bitkisel ürünlerin üretilmesidir [47].

Bitki biyoteknolojisi bitkilerin verim ve kalitesini artırmak, hastalık ve stres faktörlerini engellemek, azaltmak ya da ortadan kaldırmak için moleküler, hücre ve doku kültürü temelli teknolojilerin kullanıldığı bir süreçtir [47].

Modern ıslah metodları olarak kabul edilen tekniklerden birisi olan doku kültürünün bitki ıslahında kullanılması hem zaman hem de uzun dönemde uygulandıgı takdirde yapılacak masraflar açısından büyük kolaylıklar saglamaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik sartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çesitli bitki kısımları= eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi)

üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çesitlerde genetik varyabilite olusturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çogaltılması zor olan türlerin üretiminde, çesitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır [36].

Doku kültürüyle çoğaltmaya "*mikroüretim*" de denilir. Bu teknikle çoğaltmada bitkilerden yeni bitki oluşturabilecek birçok parçaları; meristemler, sürgün uçları, boğum ve boğum araları, hipokotil, yaprak, gövde parçaları, kotiledonlar, kökler, tomurcuklar vb. eksplantlar kullanılabilir [48].

Bitkilerin insan ve hayvan beslenmesi kullanım amacıyla iyileştirilmesi çalışmalarında iki önemli dönem göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki "Yeşil Devrim" olarak adlandırılan, klasik bitki ıslahı, ticari gübreler ve diğer agronomik tekniklerin gelişiminin etkili olduğu dönemdir. Yeşil devrimde üretim, tohum-bitki-tohum döngüsünde gerçekleştirilir. İkinci dönem ise "Gen Devrimi" olarak adlandırılmaktadır. DNA' nın yapısının anlaşılması, bakteri genetiği, bitki doku kültürünün gelişimi ve bu tekniklerin birçok bitkiye uygulanabilir olması gen devrimi döneminin başlamasını hazırlamıştır. Yeşil devrim ile karşılaştırıldığında gen devriminde hedefe ulaşma bakımından bir tümevarım söz konusudur. Yani, baz, nükleotid, gen, kromozom, ribozom, aminoasit, protein, kloroplast, mitokondri, hücre, doku, organ, bitki ve tohum zincirinin her parçası amaca ulaşmada ayrı ayrı veya birlikte değerlendirilerek üzerinde değişiklikler yapılabilmektedir. Bunlar arasında hücreye kadar olan konular genellikle bitki genetik mühendisliğinin, hücre-tohum arasındaki konular ise bitki doku kültürünün alanlarıdır. Görüldüğü gibi bitki doku kültürü, bitki genetik mühendisliği ile birlikte bitki biyoteknolojisini oluşturan ana unsurlardan biridir [36].

Doku kültürü tekniklerinden yararlanarak, bitkiden alınan herhangi bir parça (eksplant) ile kısa sürede bitkinin istenen kısımlarının veya tüm bir bitkinin çoğaltımı mümkündür. Kültüre alınan eksplantlardan hızlı bölünen embriyogenik hücreleri elde etmek için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda oksine ihtiyaç duyulmaktadır [49].

1.4.2. Bitki hücre, doku ve organ kültürü teknikleri

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenebilir:

- Organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon
- Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon
- Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon

Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denilir. Elde edilen hücreler tamamen donör (verici) bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon, doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum belirli bir kallus, proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonrada ortaya çıkabilir. Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici varyasyonlar oluşabilir. Son olarak normal kromozom sayısının yarısını içeren hücrelerden de direk veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploit bitkiler elde edilmiş olur [36].

Bitkilerin laboratuvarda veya kontrollü şartlarda fazlaca miktarda çoğaltılması, (mikro çoğaltım, klonal çoğaltım) klasik usullerle bitki üretimine önemli bir alternatiftir. Mikro çoğaltma çevre ve besin kontrolü yapılabilen steril (mikroorganizma, toz vb. ihtiva etmeyen) yetiştirme şartlarında bir bitkinin tomurcuk, boğum, yaprak ve kök parçaları gibi çeşitli yerlerinden alınan küçük parçalarının (eksplant) kültürü sonucu yeni bitkilerin üretilmesidir. Üretilen bitkiler her bakımdan birbirinin aynısıdırlar. Yani yapılan bu iş bitki klonlaması veya genetik kopyalamadır [50]. Yeoman' a (1993) [103] göre bitki hücre ve doku kültürlerinin pratik uygulamaları ve yapılma amaçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu sebeple bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Yok olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, doku kültürü yöntemleri kullanılır. Genellikle bitkilerin yaprak, gövde veya köklerinden alınan parçalarındaki hücrelerinin özel besin ortamlarında kültüre alınması yoluyla uygulanır. En çok karşılaşılan uygulama hücrelerde, o hücrelerin alındığı bitkiye benzer bitki veya bitkiler üretmektir. Buna rejenerasyon denilir. Ayrıca tek başına hücreler veya organlar çoğaltılabilir ve çeşitli amaçlar için kullanılabilir.

Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahında uygulama alanları : [36]

- Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü
- Haploit bitki üretiminde anter ve yumurtalık kültürü
- Somaklonal varyasyon
- *İn vitro* seleksiyon
- *İn vitro* döllenme
- *İn vitro* germplazm muhafazası
- Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu)
- Gen transferi

Bunların dışında bitki doku kültürünün ticari ve ıslah dışı uygulama alanları da mevcuttur. Hastalıksız bitki elde edilmesinde, meristem kültürü, mikroçoğaltım , sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar), sekonder metabolit üretimi (kallus-hücre süspansiyonları), kimeralar bunlar arasında sayılabilir [36].

Ayrıca bitki doku kültürlerinin temel araştırmadaki uygulama alanları da oldukça geniştir. Doku kültürü, protoplast izolasyonu ve füzyonu, hücre, doku, bitki beslenmesi, sitogenetik çalışmalar, morfogenesis çalışmaları ve biyolojik azot fiksasyonu gibi temel araştırmalarda da kullanılabilmektedir [36].

In vitro çoğaltımın avantajları yüksek çoğaltım oranlarında kısa sürede çok sayıda bitkicik elde edilmesi, mikroçoğaltımın mevsimden bağımsız olarak uygulanabilmesi, *in vitro*

üretilen bitkilerin sıklıkla mikroorganizma kaynaklı hastalıklardan bağımsız olması ve böylece değerli genotiplerin bitki virüslerinden korunabilmesidir [51].

1.4.3. Bitki büyüme düzenleyicileri

Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşiklerdir. İndol asetik asit, zeatin, zeatin ribozid, GA, absisik asit ve etilen bitkilerce üretilen hormonlardandır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. En çok kullanılanlar; oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir [50].

Oksinler; fotoperyodizm, köklendirme, apikal dormansi, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Temel hormon formu IAA (indol-3-asetik asit) tir. Sentetik oksinler arasında NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve pikloram sayılabilir [36].

En çok kullanılan sitokininler, adenin (aminopürin) türevleridir. Bunlar içinde de BAP en çok kullanılanıdır. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (re-differentitation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup, antioksidan etki göstererek yaşlanmayıda geciktirirler. Sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engellerler [36] Sitokininler, kloroplast gelişimi, kotiledon büyümesinin uyarılması ve yapraklarda yaşlanmanın gecikmesinde rol oynarlar. Oksinlerle birlikte doku kültürlerinde kullanıldıklarında hücre büyümelerini uyarma ve morfogenesisi kontrol etme etkileri daha fazla göze çarpmaktadır. Doku kültürü besiyerlerine eklendiklerinde apikal dominansı aşarak lateral dallanmayı uyarırlar. Bu yüzden IAA' nın antagonistidirler [52].

Giberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzamasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesisi ve adventif kök oluşumunu engeller. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi arttırırlar [36].

Tablo 1.1. Farklı çevre şartlarının çeşitli evrelerde kültürler üzerine etkileri [36]

Çevre şartları	*İn vitro* etkiler	*Ex vitro* etkileri
Sabit hava sıcaklığı	Karanlıkta yüksek solunum	Çevresel strese hassaslık
Düşük-yüksek sıcaklık	Yavaş-aşın gelişme	Yavaş-aşırı gelişme
Düşük ışık yoğunluğu	Yaprak çıkışında azalma, kültürlerde beyazlaşma	Fotosentezin azalması, büyüme ve gelişmenin yavaşlaması
Düşük hava girişi-yüksek nem	Düşük transpirasyon oram. stomalarda düzensizlik, köklenme ve besm alınlında zorluklar, virriiikasyon	Aşırı transpirasyon. su ve besin maddesi alım zorluğu.
Ortamda düşük erimiş O;	Köklenmede zorluk, kültürlerde kahverengileşme, hücre ve dokuların ölümü	Kök çürümesi, yavaş gelişme
Ortamda yüksek inorganik iyon konsantrasyonu	Ortamda yüksek ozmotik basınç, yüksek etilen üretimi	Büyümede gerileme
Ortamda yüksek şeker konsantrasyonu	Vitrifikasyon ve bazı düzensizlikler, bakteriyel ve fungal kontanıinasyon. bitki ölümü	-
BBD ve vitamin içeren ortamlar	Aşırı konsantrasyonlarda mutasyon ilıtınıalı. somaklonal varyasyon	-
Uygun olmayan büyüme düzenleyicileri	Kallus gelişimi, köklenme ve büyüme bozuklukları	-
Yüksek konsantrasyonda ağarla katılaştırılmış ortamlar	Düşük O; alımı, köklenmede bozukluk	-
Düşük CO_2 konsantrasyonu	Etilen biyosentezunn uyarılması	-

1.4.4. Bitki doku kültürlerinde kullanılan kimyasal maddeler

Bitki doku kültüründe besiyerinin bileşimine giren kimyasal maddelerin dışında sterilizasyonda, pH ayarlanmasında ve vitamin veya bitki büyüme düzenleyicisi stok solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar bulunmaktadır [36].

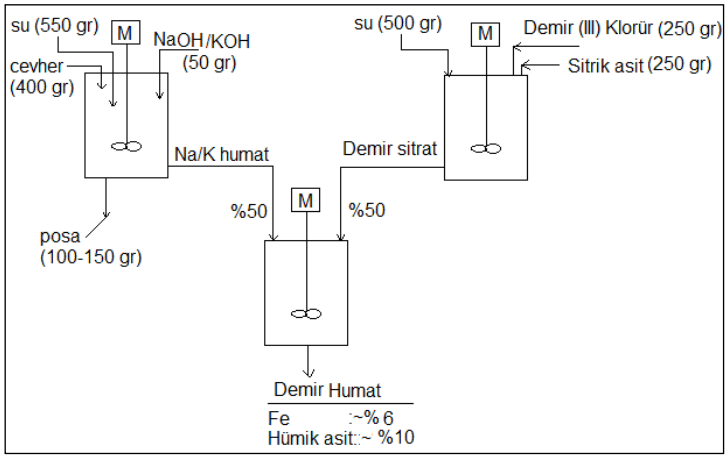
Eksplantların sterilizasyonu için genellikle %0,5-2'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit), %70'lik C_2H_6O (Etil alkol), $HgCl_2$ (Civa klorür) gibi kimyasallar, çalışma ortamının sterilizasyonu için ise genellikle yine %70'lik C_2H_6O kullanılmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicisi stok solüsyonlarının hazırlanmasında stok kimyasalı çözdürmek için C_2H_6O, NaOH ve HCl kullanılmaktadır. Ayrıca NaOH (Sodyum hidroksit) ve HCl (Hidroklorik asit) pH ayarlanmasında da kullanılmaktadır. Besiyerini oluşturan bileşenler ise şu şekilde sıralanabilir;

- Makro elementler (N, P, K, Cl, Mg, Na, Ca, S)
- Mikro elementler (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Co, I)
- Şeker (sükroz, glikoz, maltoz, rafinoz, fruktoz)
- Bitki büyüme düzenleyicileri
- Vitaminler (B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, H, C, E, M, A, D_3)
- Katılaştırıcı ajanlar (agar, agaroz, aljinat, phytagel, jelatin)
- Amino asitler veya diğer nitrojen sağlayıcıları (glisin, arginin, glutamin, prolin , aspartik asit)
- Kimyasal olarak tanımlanamayan maddeler (hindistan cevizi sütü, maya özü, kazamino asit)
- Tamponlar (nadiren kullanılırlar) [36]

BÖLÜM 2. MATERYAL VE METOT

2.1. Humik Madde Sentezi

Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet Tutar ve Doktora Öğrencisi Mümin Dizman tarafından Demir Humat, Potasyum Humat ve Bor Humat üretimi gerçekleştirilmiştir. Humik maddelerin sentezi Demir Humat örneği ile aşağıdaki gibi yapılmıştır.



Şekil 2.1. Demir Humat Sentez Aşamaları

Şekil 2.1 ' de Leonardite cevherinden demir humat üreten metot görülmektedir. Leonardite cevheri değirmene taşınmaktadır. Leonardite cevheri doğal olarak katı formda hümik asit, fulvik asit ve humin içermektedir. Cevher toz forma dönüştürülmek üzere değirmende öğütülür. Öğütme sonucu cevher 50–100 mesh partikül boyutuna getirilmelidir. Toz haldeki cevher ilk reaktöre gönderilmektedir. Burada bir litre toplam çözelti için 400 g cevher, 550 su ile karıştırılmaktadır. Cevherin ekstrakte olması için de 50 gr sodyum veya potasyumhidroksit çözeltiye ilave edilmektedir. Çözelti pH'ı 10-12 olmaktadır. Belirli sıcaklık (100°C) ve karıştırma süresinden (24 saat) sonra fulvik ve hümik asitler çözünmekte ve huminler ise kil vs. ile posa olarak çökmektedir.

Mikserde demir (III) klorür (250 gr) sitrik asitle (250 gr) sulu ortamda (500 gr) reaksiyona tabi tutulur. Reaksiyon sonucu çıkan demir sitrat (%50) ve sodyum/potasyum humat başka bir mikserde karıştırılır. Karışım sonucu, ~%6 demir (elemental) ve ~%10 hümik asit içeren demir humattır. Sistemde sitrik asit yerine peynir altı suyu veya mısır saturasyon suyu da alternatif olarak düşünülebilir. Humik asit kaynağı olarak Leonardite cevheri kaynak olarak tercih edilmez ise vinas her pH için iyi bir demir humat kaynağıdır.

2.2. Bitki Materyali

Bu araştırmada kullanılan kolza tohumu, kışlık PR46W31 çeşidine ait kolza tohumları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'dan temin edilmiştir.

2.3. Bitki Doku Kültürü Şartları

Kolza tohumları %12'lik sodyum hipoklorid ile 15 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra üç kere saf su ile durulanmıştır. Öncelikle sterilize edilen kolza tohumları %50 oranında çimlenmesini inhibe eden EC 50 değerinin belirlenebilmesi için dokuz farklı (0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 25, 50 ppm) dozda potasyum humat ve %3 sukroz, % 7 agar içeren Murashige ve Skoog [33] besiyerine 20 tohum 3 tekrarlı olarak ekilmiştir ve 7 gün sonunda sonuçlar kaydedilmiştir . Daha sonra, sterilize edilen tohumlar %3 sukroz, % 7 agar ile farklı dozlarda demir humat (1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm), bor humat (1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm) veya potasyum humat (1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm) içeren Murashige & Skoog temel besin ortamında çimlendirilmiştir. Hazırlanan ortamlar pH'sı 5,8'e ayarlanarak, 20 dakika 121°C ve 1,1 kg/cm^2 basınç altında steril edilmiştir. Bütün kültürler 25±1˚C'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperyotta iklim dolabında büyütülmüştür.

İklim dolabında büyütülen 3 haftalık kültürlerden gövde eksplantları izole edilerek 1 mg/L BAP ve 0,2 mg/L NAA hormon kombinasyonunu içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır.

Üç haftalık kültürlerden ise gövde eksplantları izole edilerek 0,5 mg/L ile 1 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) ve 0,2 mg/L ile 0,4 mg/L 1-naphthaleneacetic acid (NAA)

hormon kombinasyonlarını içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra gövde eksplantlarından sürgünler gelişmiştir. Bu süreçte kallus oluşumu yüzdesi, kallus ağırlığı, rejenerasyon oranı ve petride gelişen toplam sürgün sayısı gözlemlenmiştir.

2.4. Uygun Humat Dozunun Belirlenmesi (EC 50 değeri)

Uygun humat dozunu belirlemek amacıyla ön çalışma olarak potasyum humat (Kontrol , 1, 3, 5, 7, 10, 15, 25, 50 ppm) seçilmiştir. Uygun *in vitro* koşullarında magenta kaplarına 20 şer tohum 3 tekerrürlü olarak ekilmiştir. 7 gün sonra kaplardaki çimlenme yüzdesi belirlenmiştir.

2.5. Yaprak Ayası (Lamina) Genişliği'nin Belirlenmesi

Çimlenmenin 10. gününde milimetrik cetvel ile yaprak ayasının genişliği ölçülmüştür. Yaprak ayası genişliği cm/ bitki olarak ifade edilmiştir.

2.6. Kök ve Gövde Boylarının Belirlenmesi

Çimlenmenin 10. gününde, farklı dozlarda humik madde uygulanmış olan fidelerin kök ve gövdeleri birleşme yerlerinden jiletle kesilerek, uzunlukları milimetrik bir cetvel yardımıyla 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Ölçüm sırasında en uzun kökün uzunluğu esas alınmıştır. Kök boyu ve gövde boyu cm bitki^{-1} olarak ifade edilmiştir.

2.7. Taze ve Kuru Ağırlığın Belirlenmesi

Çimlenmenin 10. gününde toplam taze ağırlıkları (gr bitki^{-1}) 3 tekrarlı olarak tartılmıştır. Daha sonra bitkiler 100 °C' ye ayarlanmış etüvde 48 saat bekletilmiş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları (gr bitki^{-1}) kaydedilmiştir.

2.8. Fotosentetik Pigment Miktarının Belirlenmesi

Yaprak dokularındaki klorofil a, klorofil b, toplam klorofil (kloa+b) ve toplam karotenoid (x+c) miktarları Lichtenthaler (1987)'[101] ye göre belirlenmiştir. Çimlenmenin 10. gününde kotiledonlardan çıkarılan 0.5 cm çapındaki 2 adet disk tartıldıktan sonra, cam deney tüplerine alınarak üzerine 2 ml % 100' lük aseton ilave edilmiştir. Pigmentlerin yaprak dokusuna geçmesi için bir hafta buzdolabında (4 ºC) bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda elde edilen özüt 10,000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek absorbans değerleri 661.1, 644.8 ve 470 nm' de spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak belirlenmiştir. Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Lichtenthaler, 1987) [101].

Klorofil a (Klo a)= (11.24 x A661.6) – (2.04 xA644.8)
Klorofil b (Klo b)= (20.13 x A644.8) – (4.19 x A661.6)
Toplam Klorofil (Kloa+b)= (7.05 x A661.6) + (18.09 x A644.8)
Karotenoid (x+c)= [(1000 x A470) – (1.9 x Klo a) – (63.14 x Klo b)] / 214

2.9. Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.9.1. Toplam protein içeriğinin belirlenmesi

Yapraklardaki toplam çözünür protein miktarı BSA (bovine serum albumin) kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımıyla Bradford (1976)'ya göre belirlenmiştir. 480 µl saf su, 20 µl supernatant ve 5 ml Bradford çözeltisi konulduktan sonra vortex yardımı ile homojenize edilir. Spektrofotometre de 595 nm ' de ölçülür.

2.9.2. Toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

Toplam SOD aktivitesi Beyer ve Fridovich (1987)'[99] e göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 100 mM K-PO_4 (pH 7.0), % 2' lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM Na_2EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14,000 rpm ve +4 ºC' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1030 µl olacak şekilde 100 mM K-PO_4 tamponu (pH 7.8), 9.9x10-3 M metionin, 5.7x10-5

M NBT (nitroblue tetrazolyum), % 1’ lik triton X-100 ve enzim karışımından oluşan bir reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon 0.9 µM riboflavin ilavesi ile başlatılmış, bu karışım 15 dakika boyunca 375 µmol m-2 s-1 şiddetinde ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm’ de absorbans değerleri belirlenmiştir (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer). Toplam SOD aktivitesi daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanarak hesaplanmıştır (U mg protein^{-1}).

2.9.3. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz aktivitesi Aebi (1984) [102]’ e göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 100 mM K-PO_4 (pH 7.0), % 2’ lik PVP ve 1 mM Na_2EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14,000 rpm ve +4 ºC’ de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µl olacak şekilde 150 mM K-PO_4 tamponu (pH 7.0), 2 mM Na_2EDTA, 15 mM H_2O_2 ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, H_2O_2’ nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak 240 nm’ de yapılan okumalarla ölçülmüştür. Enzim aktivitesi, H_2O_2’ nin ekstinksiyon katsayısı (40 mM cm^{-1} 240 nm) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol H_2O_2 dakika^{-1} mg protein^{-1}).

2.10. Verilerin Analizi

Daha önce de belirtildiği gibi, denemeler üç tekerrürlü olarak her petriye 10 eksplant konulmak suretiyle, Tesadüf Parselleri Deneme Deseni’ne göre kurulmuştur. Sonuçlar, SPSS 16.00 for Windows programında analiz edilmiş ve ortalamalar “Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi” ile karşılaştırılmıştır.

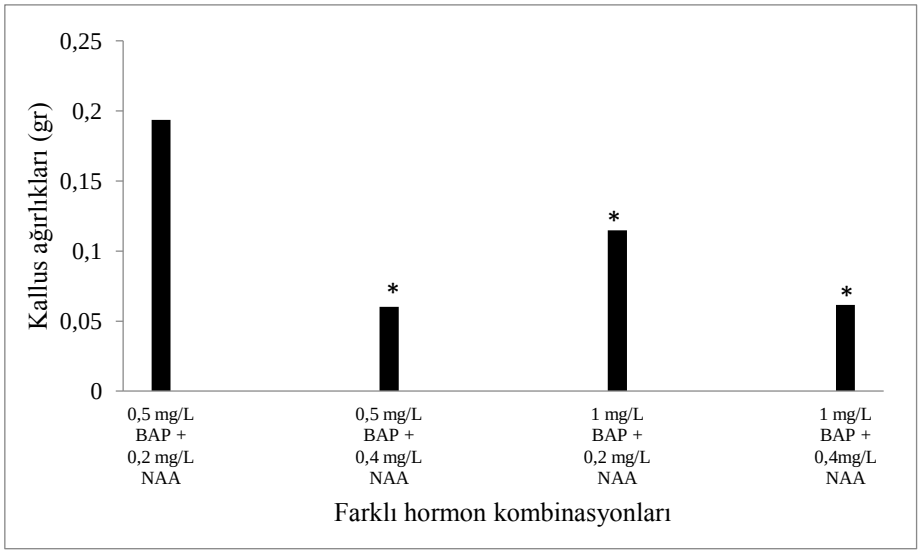
BÖLÜM 3. BULGULAR

3.1. Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

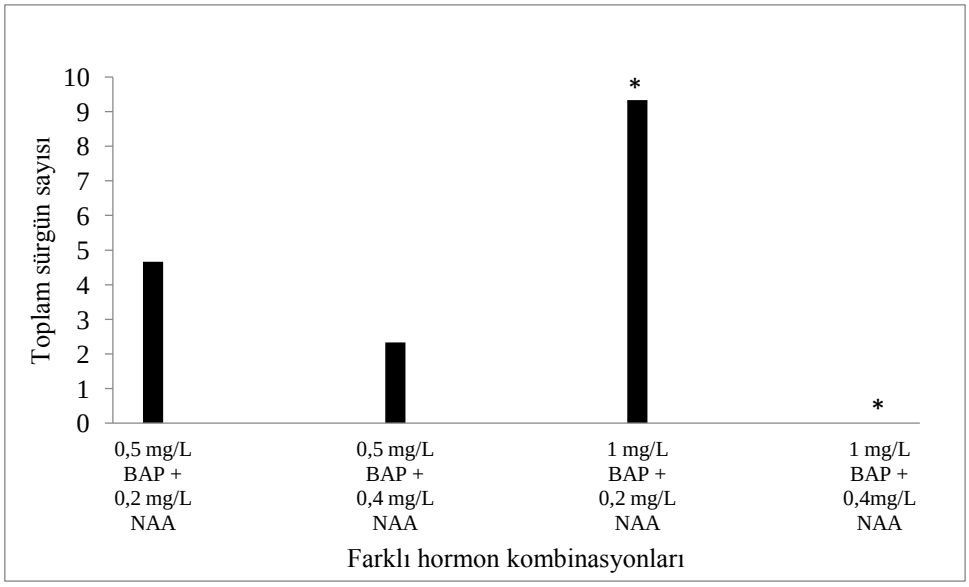
In vitro koşullarda 9 farklı potasyum humat dozunun kullanılarak kurulan optimizasyon denemesenin ilk aşaması olan EC 50 değerinin belirlenmesinde tohumların %50 sinin çimlenmesini inhibe eden konsantrasyon üst doz olarak çalışmamızda üst limit olarak kabul edilmiştir. 7 ppm potasyum humat %50 çimlenme ile EC50 değerine sahip olmuştur.

Tablo 2.1. Potasyum humatın çimlenme üzerine etkisi

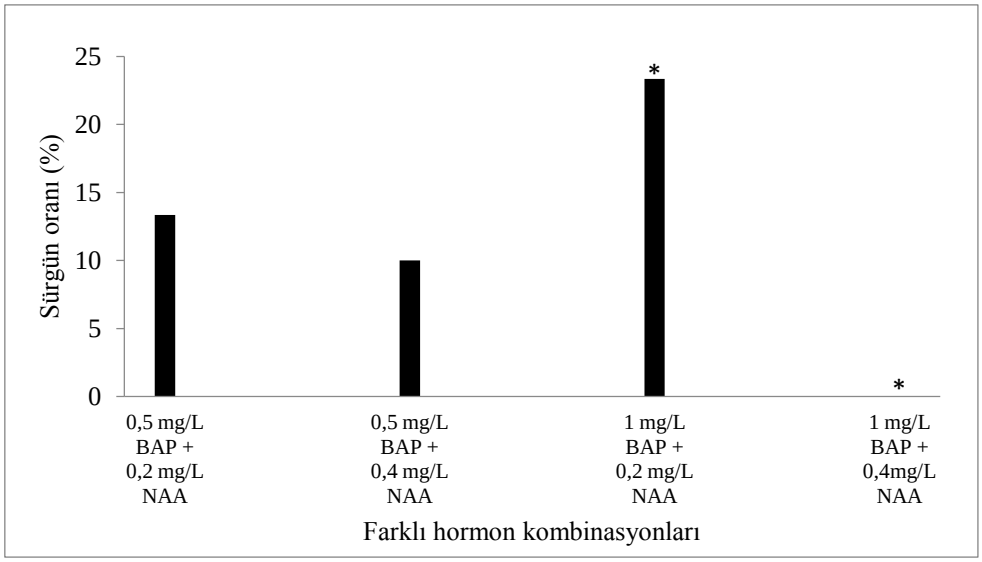
Konsantrasyon	Çimlenme (%)
Kontrol	92,5
1 ppm KH	87,5
3 ppm KH	85
5 ppm KH	90
7 ppm KH	50
10 ppm KH	50
15 ppm KH	47,5
25 ppm KH	45
50 ppm KH	45



Şekil 3.1. Farklı hormon kombinasyonlarının kallus ağırlığı üzerine etkisi



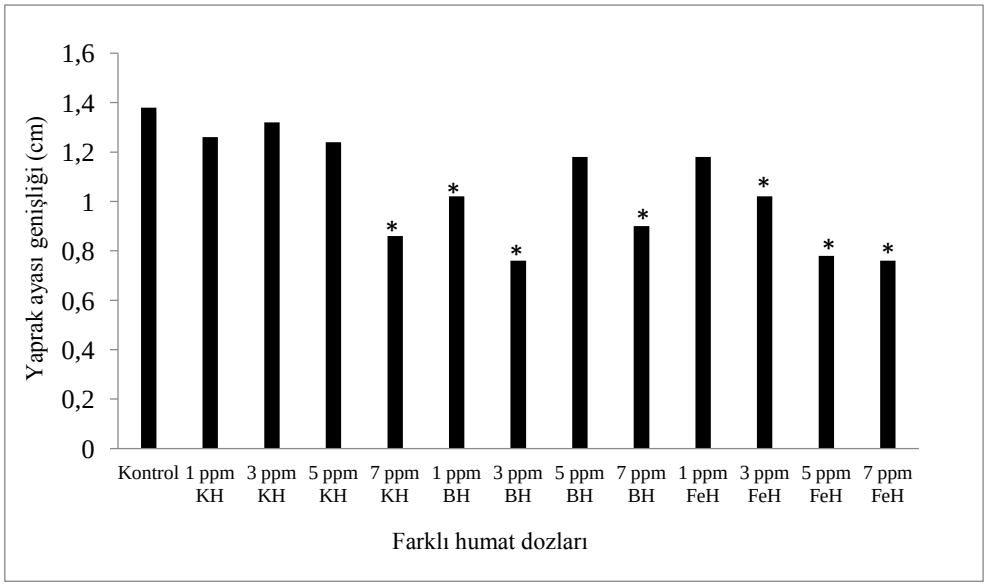
Şekil 3.2. Farklı hormon kombinasyonlarının gövde eksplantı için toplam sürgün sayısı üzerine etkisi



Şekil 3.3. Farklı hormon kombinasyonlarının sürgün oranı üzerine etkisi

3.2. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Lamina Üzerine Etkisi

Lamina genişliği kontrole göre 7 ppm KH, 1, 3 ve 7 ppm BH ve 3,5 ve 7 ppm FeH dozlarında genişliği azaltarak anlamlı bir değişime neden olmuştur. Grup içinde de 7 ppm KH, 3 ppm BH ve 5 ve 7 ppm FeH dozlarında azalma olmuştur.

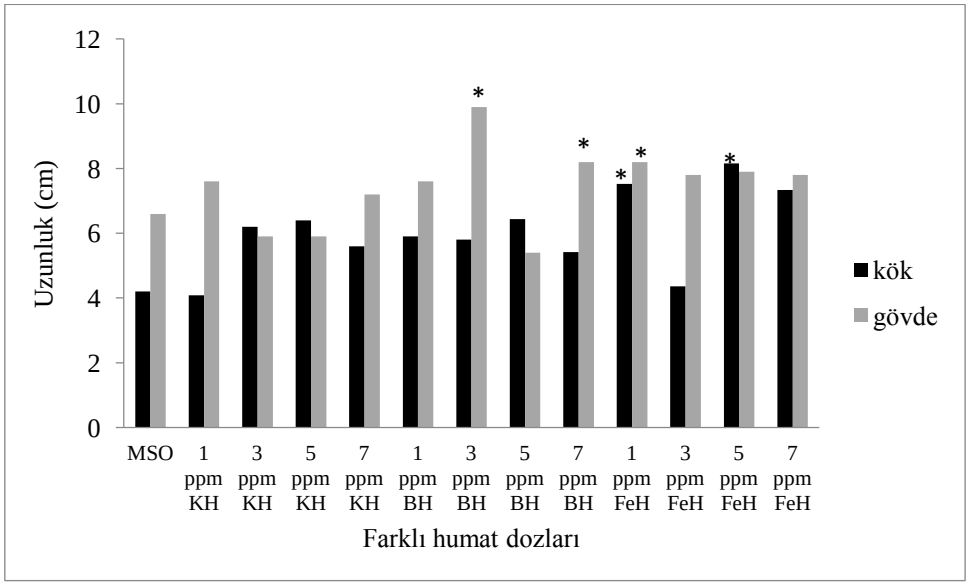


Şekil 3.4. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının yaprak ayası genişliği üzerine etkisi

3.3. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Kök ve Gövde Üzerine Etkisi

Kök boyunda kontrole göre 1 ve 5 ppm FeH de artış meydana gelmiştir. Diğer uygulamalarda anlamlı bir değişim olmamıştır. Grup içinde de uygulanan humatların anlamlı değişikliğe neden olmamıştır.

Gövde boyunda kontrole göre 3 ve 7 ppm BH ve 1 ppm FeH dozlarında artış olmuştur. Grup içindede KH ve FeH in anlamlı bir değişimi olmamıştır, 3 ppm BH gövde boyunu artırırken 5 ppm BH azaltmıştır.

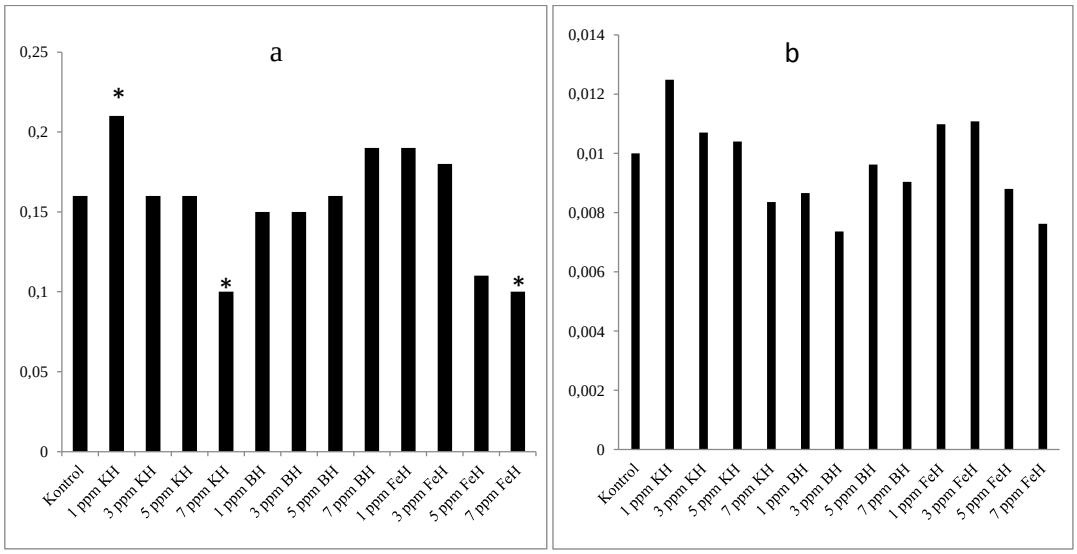


Şekil 3.5. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının kök ve gövde boyu üzerine etkisi

3.4. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Taze ve Kuru Ağırlık Üzerine Etkisi

Taze ağırlık, kuru ağırlık, grup içi ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. Taze ağırlıkta kontrole göre 1 ppm KH artışa neden olmuş, 7 ppm KH ve 7 ppm FeH da ise taze ağırlığı düşürmüştür. BH dozları taze ağırlığa etki etmemiştir.

Kuru ağırlıkta hiçbir uygulamada anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Gruplar içinde ise 7 ppm KH ve 7 ppm FeH kuru ağırlığı azaltmış BH etkilememiştir.



Şekil 3.6. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının (a) taze ağırlık ve (b) kuru ağırlık (gram) üzerine etkisi

3.5. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Fotosentetik Pigment Üzerine Etkisi

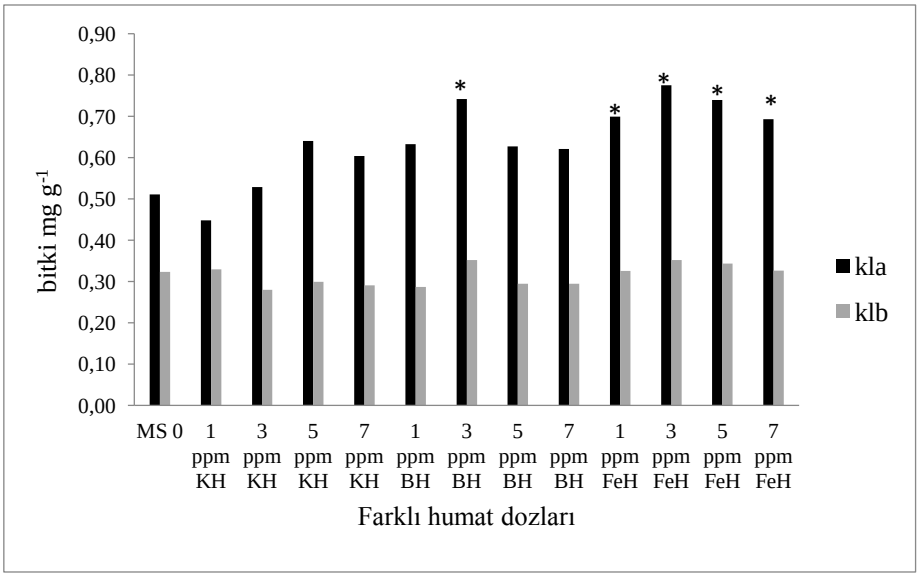
Klorofil a, toplam klorofil, toplam karotenoid miktarlarında, katalaz ve sod aktivitesinde grup içi ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar varken klorofil b miktarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Klorofil a miktarında kontrole göre 3 ppm BH dozunda artış olmuştur.1, 3, 5 ve 7 ppm FeH dozlarında ise artış olmuştur. Grup içinde ise 5 ve 7 ppm KH artış sağlamış diğer gruplar kendi içinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir.

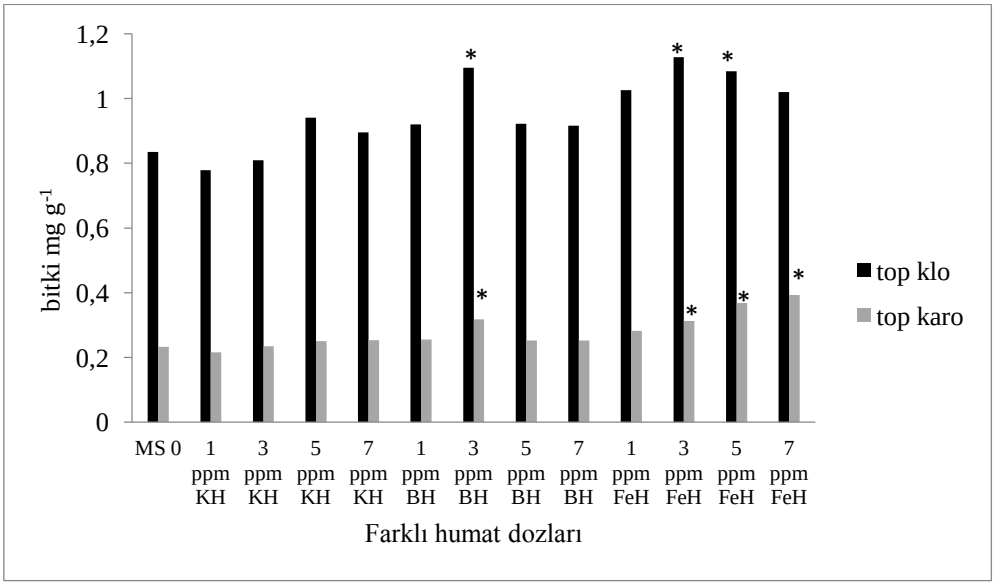
Klorofil b miktarında kontrole göre bütün uygulamalarda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Gruplar içinde ise 3 ppm BH dozunda azalma meydana gelmiştir.

Toplam klorofil miktarında kontrole göre 3 ppm BH dozunda artış meydana gelmiş, 3 ve 5 ppm FeH dozunda artış meydana gelmiştir. Gruplar kendi içinde anlamlı herhangi bir değişime neden olmamıştır.

Toplam karotenoid miktarında kontrole göre 3 ppm BH de artış olmuştur. 3,5 ve 7 ppm FeH dozlarında artış meydana gelmiştir. Gruplar kendi içinde 5 ve 7 ppm lik FeH dozu toplam karotenoid miktarını artırarak etkili olmuş diğer uygulamalarda anlamlı bir değişim olmamıştır.



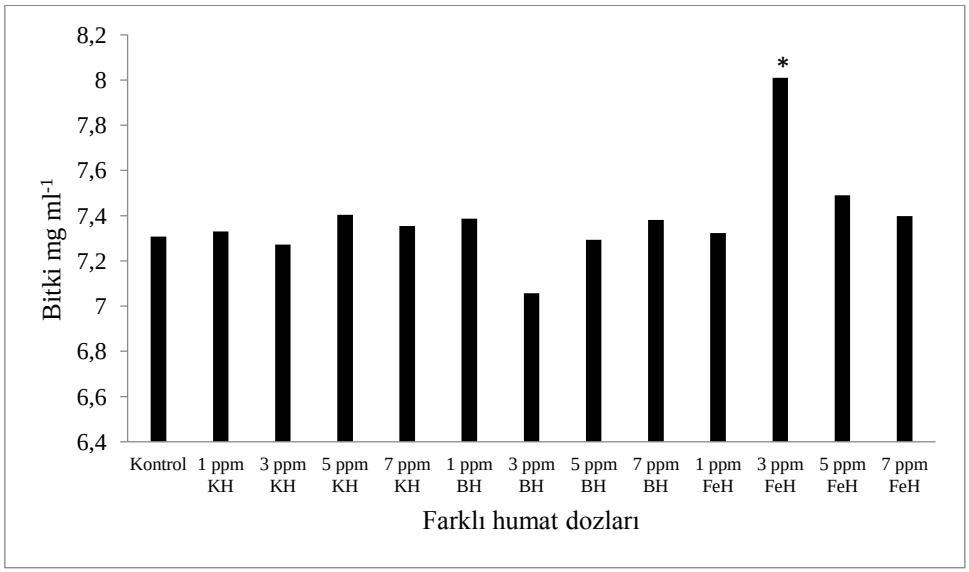
Şekil 3.7. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının klorofil a miktarı, klorofil b miktarı üzerine etkisi



Şekil 3.8. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi

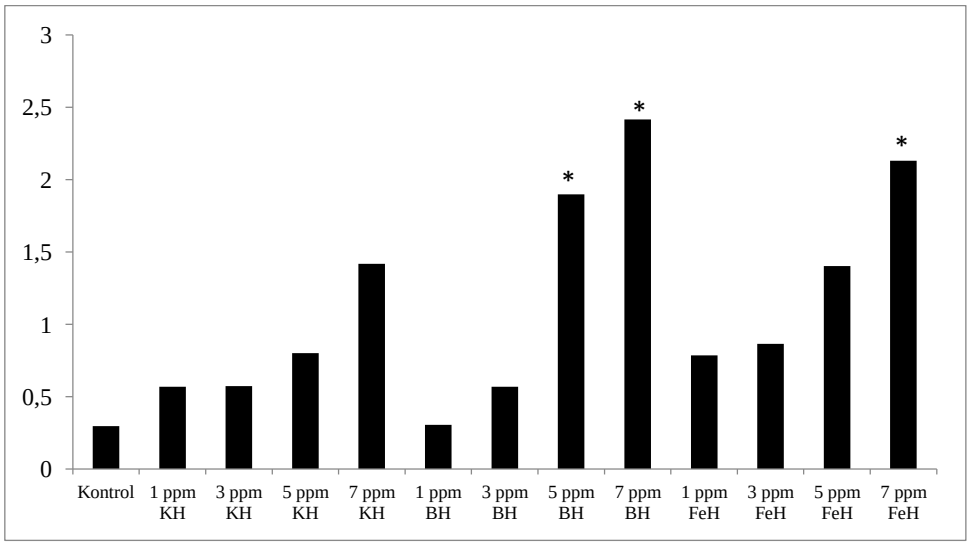
3.6. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Antioksidant Enzimler Üzerine Etkisi

Protein miktarında kontrole göre 3 ppm FeH dozunda artış meydana gelmiştir. Gruplar içinde ise 3 ppm BH olumsuz etki yapmış ve 3 ppm FeH olumlu etki yapmıştır.



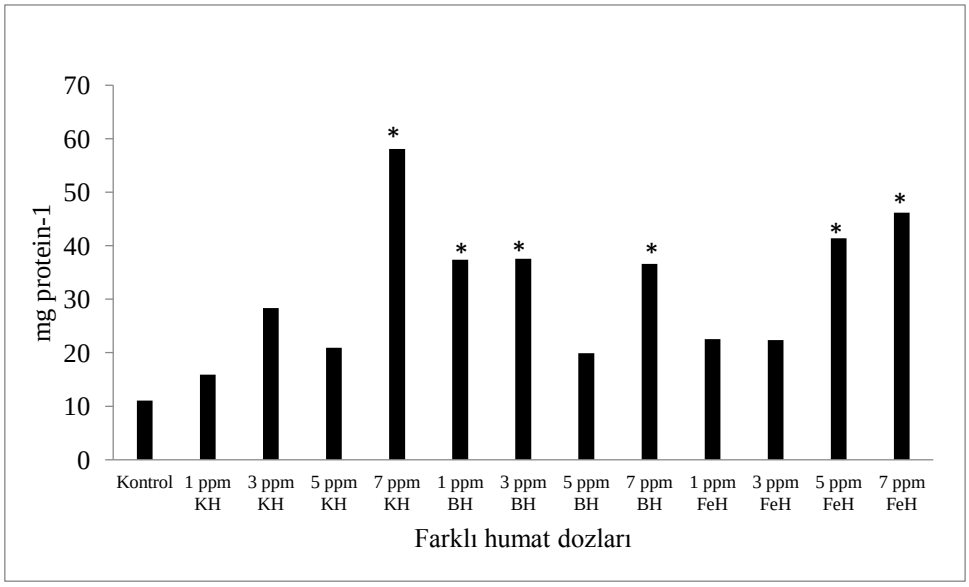
Şekil 3.9. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının toplam çözünür protein miktarı üzerine etkisi

Katalaz aktivitesinde kontrole göre 5 ve 7 ppm BH ve 7 ppm FeH dozlarında artış olmuştur. Grup içinde de 5 ve 7 ppm BH dozları ve 7 ppm FeH dozu aktiviteyi artırmıştır.



Şekil 3.10. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının katalaz aktivitesi üzerine etkisi

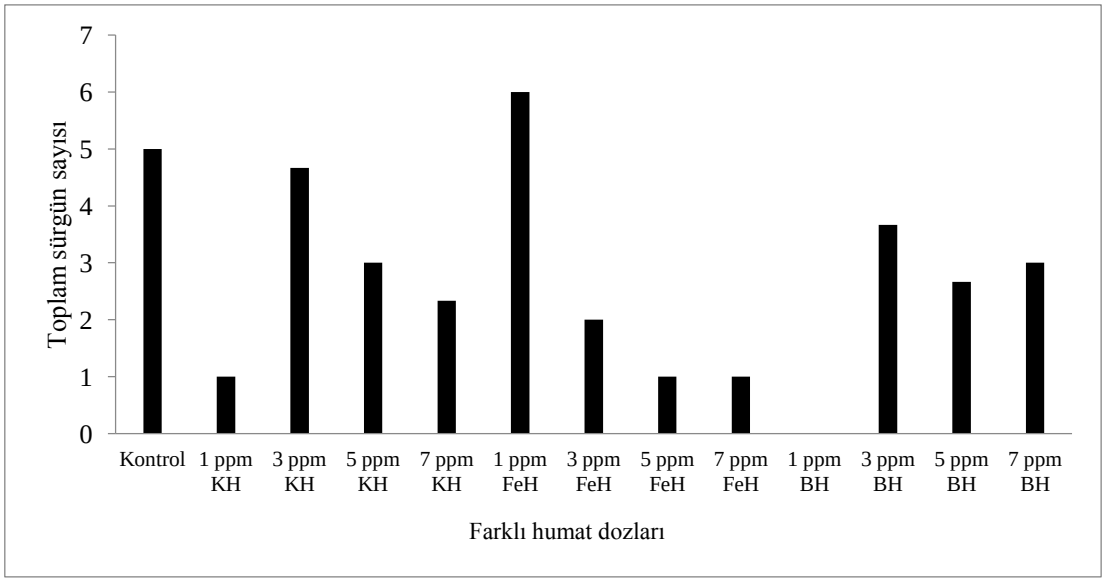
SOD aktivitesinde kontrole göre 7 ppm KH artış olmuştur. 1,3 ve 7 ppm BH dozlarında artış olmuştur. Ayrıca 5 ve 7 ppm FeH dozlarında da sod aktivitesi artmıştır. Gruplar kendi içinde 7 ppm KH da artış, 5 ppm BH da azalış, 5 ve 7 ppm FeH dozlarında artış meydana gelmiştir.



Şekil 3.11. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkisi

3.7. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Toplam Sürgün Sayısı Üzerine Etkisi

Kolza bitkisinin gövde eksplantlarından elde edilen toplam sürgün rejenerasyonu MS 0 ortamında toplam 15 adet, 1 ppm KH ortamında 3 adet, 3 ppm KH ortamında 14 adet, 5 ppm KH ortamında 9 adet, 7 ppm KH ortamında ise 7 adet sürgün elde edilmiştir. 1 ppm bor humat dozunda sürgün elde edilmememiştir. 3 ppm bor humat dozunda 11 adet , 5 ppm bor humat dozunda 8 adet ve 7 ppm bor umat dozunda 9 adet toplam sürgün sayısı elde edilmiştir.1 ppm FeH ortamında 14 adet toplam sürgün elde edilmiştir. 3 ppm FeH ortamında 6 , 5 ppm FeH ortamında 8 , 7 ppm FeH ortamında ise 8 adet toplam sürgün sayısı elde edilmiştir. Sonuç olarak petri başına en yüksek sürgün rejenerasyonu 11 adet ile 1 ppm demir humat ortamında bulunmuştur. 1 ppm bor humat dozunda sürgün elde edilememiştir ve anlamlı bir düşüş gözlenmiştir $P<0.05$.



Şekil 3.12. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının ortalama toplam sürgün sayısı üzerine etkisi

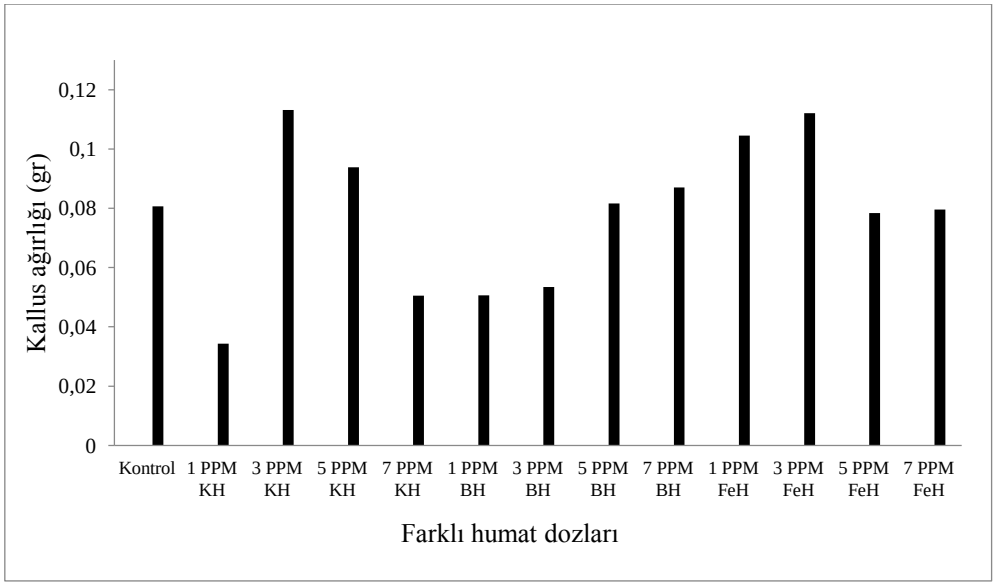
3.8. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Kallus Ağırlığı Üzerine Etkisi

MS 0 ortamında ortalama 0,0806 gr, 1ppm KH ortamında 0,0343 gr, 3 ppm KH ortamında 0,1131 gr, 5 ppm KH ortamında 0,0938 gr ve 7 ppm KH ortamında 0,0504 gr kallus ağırlıkları bulunmuştur. MS 0 kontrol ortamında göre 3 ppm ve 5 ppm potasyum humat ortamlarında kallus ağırlıklarında artış meydana gelmiş ayrıca 1 ppm potasyum humat ortamında azalma olmuştur.

1 ppm bor humat ortamında ortalama 0,0506 gr, 3 ppm BH ortamında 0,0534 gr, 5 ppm BH ortamında 0,0816 gr ve 7 ppm BH ortamında 0,0870 gr kallus ağırlıkları elde edilmiştir. Sonuç olarak 7 ppm bor humat ortamında MS 0 ortamına göre artış meydana gelmiş 1 ve 3 ppm bor humat dozlarında azalma meydana gelmiştir.

1 ppm demir humat ortamında 0,1045 gr, 3 ppm demir humat ortamında 0,112 gr, 5 ppm demir humat ortamında 0,0784 ve 7 ppm demir humat ortamında 0,0796 gr kallus ağırlığı elde edilmiştir. Sonuç olarak MS 0 ortamına göre 1 ve 3 ppm demir humat dozlarında artış meydana gelmiştir.

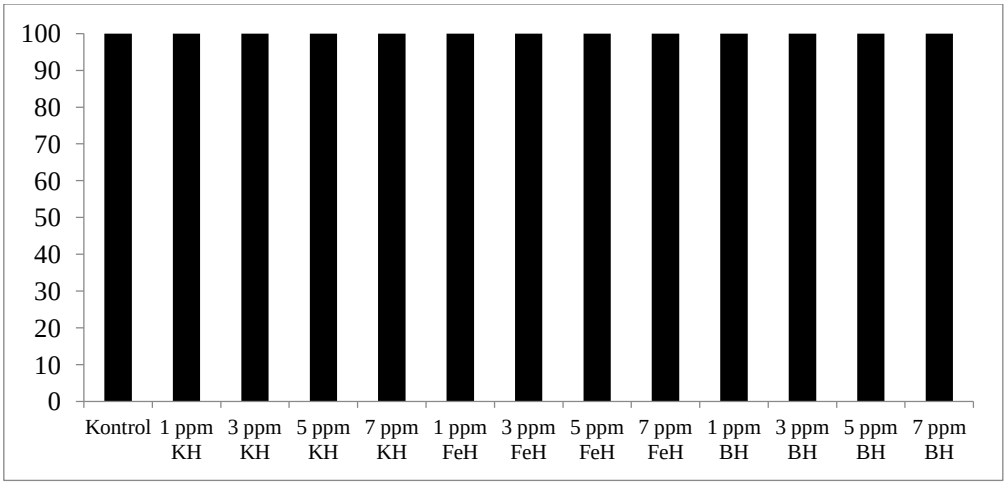
En yüksek ortalama kallus ağırlığı 3 ppm potasyum humat ortamında meydana gelmiştir.



Şekil 3.13. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının kallus ağırlığı üzerine etkisi

3.9. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Kallus Yüzdesi Üzerine Etkisi

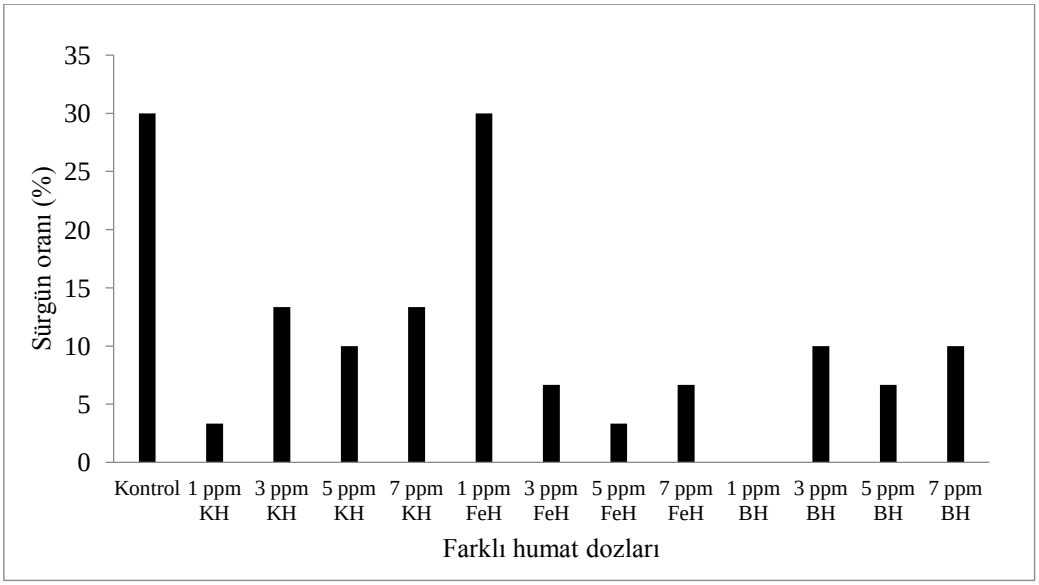
Bütün humat konsantrasyonlarında %100 kallus oranı elde edilmiş ve petri başına 10 ar adet kallus sayısı elde edilmiştir.



Şekil 3.14. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının ve kallus oranı (%) üzerine etkisi

3.10. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Petri Başına Sürgün Oranı Üzerine Etkisi

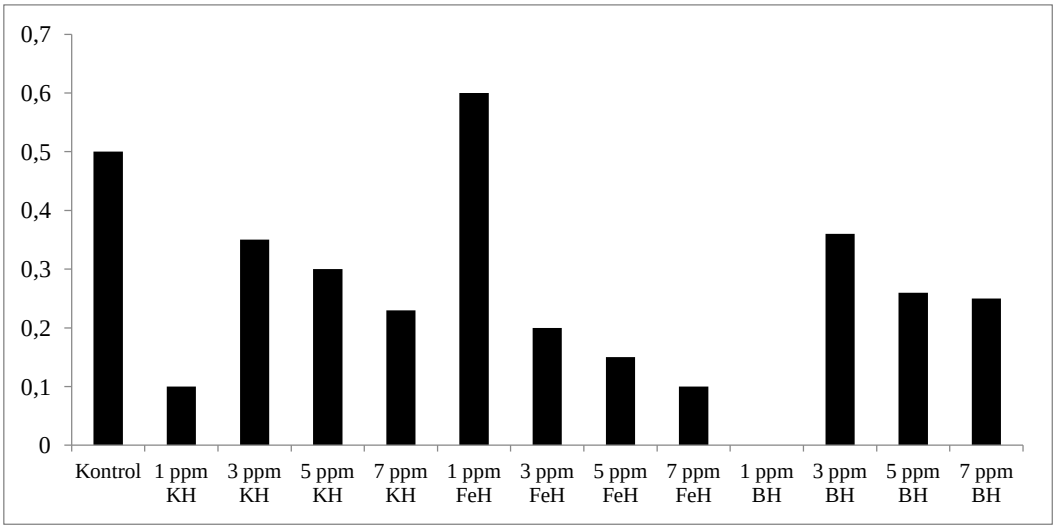
En yüksek sürgün oranı kontrol ortamında ve 1 ppm demir humat ortamında ve MS 0 kontrol ortamında elde edilmiştir. Genellikle % 0 ile %30 arasında sürgün rejenerasyonu oranı görülmüştür. MS 0 kontrol ortamında ve 1 ppm FeH ortamında en yüksek % 30 oranında sürgün rejenerasyonu görülmüş ve 1 ppm bor humat dozunda sürgün gözlenememiştir.



Şekil 3.15. Farklı çeşit ve dozlardaki humat dozlarının petri başına sürgün oranına etkisi

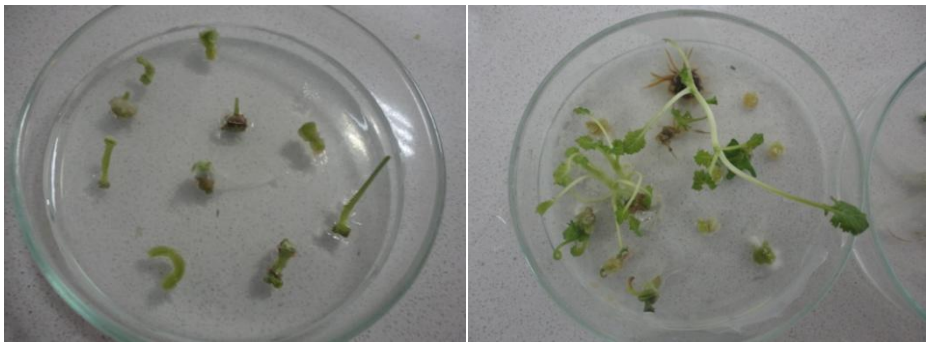
3.11. Potasyum Humat, Bor Humat ve Demir Humat'ın Eksplant Başına Sürgün Sayısı Üzerine Etkisi

En yüksek ekplant başına sürgün oranı 1 ppm demir humat ortamında 0.6 adet olarak bulunmuştur. Kontrol ortamında ise bu oran 0.5 adet olarak bulunmuştur.

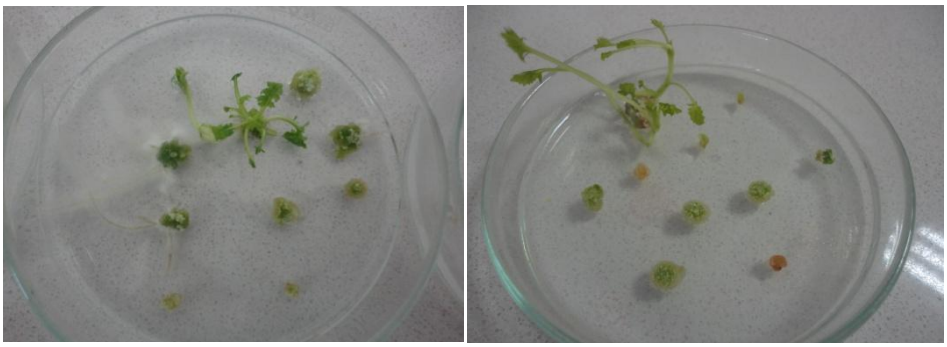


Şekil 3.16. Farklı humat dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

3.12. Çalışma Fotoğrafları



(a) (b)



(c) (d)

Şekil 3.17. Farklı humat dozlarının (a) MS 0 kontrol ortamı , (b) 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA (c) 1 ppm FeH + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA ve (d) 3 ppm KH + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA ortamlarına etkisi

BÖLÜM 4. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Dunwell (1981), *B. oleraceae, B. napus, B. campestris* türlerinde yaprak disklerini, BAP ve NAA' nın değişik kombinasyonlarını içeren besin ortamında kültüre aldıklarında her tür için gerekli olan optimum büyümeyi düzenleyici oranını farklı bulmuşlardır. Bunlar; *B. oleracea* için 10 mg/L BAP ve 1 mg/L NAA, *B. napus* için 10 mg/L BAP ve 10 mg/L NAA, *B.campestris* için ise 1 mg/L BAP ve 10 mg/L NAA'dır [53].

Klimaszewska ve Keller (1985), Kolzanın Westar çeşidinde ince hücre katmanlarını (epidermis ve 4-9 kat subepidermal hücreler) eksplant olarak kullanmıştır. Sürgün rejenerasyonu ortamına (0,5 mg/L NAA ve 5 mg/L BAP içeren) demir kaynağı olarak 40 mg/L Fe-330 eklenmiştir. Ortamı optimize etmek için BAP (5 mg/L) sabit tutularak NAA, 2-4 D, IAA, IBA, 2,44,5-T ve picloram gibi oksinler 0,5-2 mg/L oranında besin ortamına ilave edilmiştir. Sürgün oluşumunun sadece NAA içeren ortamda gözlendiği, diğer oksinlerin bulunduğu ortamlarda ise eksplantlar üzerinde yalnızca kallus oluşumunun gözlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, NAA (0,5 mg/L) sabit tutularak BAP, BA-riboside, kinetin, N6 ve zeatin gibi sitokininlerin 1-5 mg/L oranmda kullanıldığı besin ortamlarında bütün sitokininlerin sürgün oluşumunda etkili olduğu, ancak BAP'ın (10-15 mg/L) en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir. Oksinler ya da sitokininler tek başına kullanıldığında ise sürgün rejenerasyonunun gözlenmediği bildirilmiştir. Besin ortamında bulunan nitrojen içeriğinin Organogenezisi etkilediği belirtilmiş ve en iyi nitrojen kaynağının NO_3 olduğu tespit edilmiştir [54].

Yang ve ark., (1991), *B. carinata'nm* hipokotil eksplantlannın 2 mg/L BAP ve 0,01 mg/L NAA veya 4 mg/L kinetin ve 0,01 mg/L 2,4-D kombinasyonlarında % 100 adventif sürgün rejenerasyonu verdiğini belirlemişlerdir. Yüksek sürgün rejenerasyonunun 6-7 günlük eksplantlardan elde edildiğini ve distal olanların proksimal olanlardan, aynca üst hipokotiller segmentlerinin alttakilerden daha fazla rejeneratif olduğunu tesbit etmişlerdir [55].

Khehra ve Mathias (1992), kolzanın Westar, Ariana, Cobra, Libravo çeşitlerinde kotiledon, hipokotil ve gövde segmentlerini üç farklı BAP ve NAA kombinasyonu içeren ortamlarda kültüre aldıkları araştırmalarında adventif sürgün rejenerasyonu sıklığının belirlenmesinde eksplant tipi, genotip ve büyüme düzenleyicilerinin önemini değerlendirmişlerdir. Sonuçta, sürgün rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörün eksplant tipi ve genotip olduğunu belirtmişlerdir. Gövde eksplantının kotiledon ve hipokotil eksplantına göre 2-3 kat daha fazla sürgün rejenerasyonu oluşturduğu belirtilmişlerdir [56].

Ono ve ark., (1994), 100 kolza çeşidinde, kotiledon eksplantının ve eksplant yaşının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, en yüksek sürgün rejenerasyonu 4 günlük fidelerden elde edilen kotiledonlann 4 mg/L BAP içeren besin ortamında kültüre alındığında elde edilmiştir. Ayrıca, sürgün rejenerasyon oranına yazlık ve kışlık kolza çeşitlerinin bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Rejenere edilen bitkiler 2 mg/L IBA içeren ortamda köklendirilmiştir [57].

Dahawan ve ark., (2000), *B. juncea'nın* bir çeşidi olan RH781 çeşidinin hipokotil ve kotiledonlarından izole edilen eksplantlar, BAP ve IAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre almıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu kotiledonlardan izole edilen eksplantlarda ve 2,0 mg/L BAP+0,5 mg/L IAA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir [58].

Mirici (2000), *B. napus* L. ssp. *oleifera*'nın 11 çeşidinin hipokotil, 2/2 distal kotiledon ve petiyolü tam kotiledonlarından izole edilen eksplantlar, farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, Kinetin, 2,4-D, TDZ, NAA) kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre almıştır. Deneme sonuçlarına göre en yüksek adventif sürgün rejenerasyonu petiyollü tam kotiledonlardan alınan eksplantlarda gözlenmiştir. En yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu Spok çeşidinde (%44,3) ve 2mg/L veya 4 mg/L BAP içeren MS ortamında görülmüştür. Bununla beraber, Spok ve Hansen çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyolun adventif sürgün rejenerasyonuna teşvik edilmek için farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Bu deneme sonucunda da, 0,5 mg/L BAP+ 2 mg/L NAA içeren besin ortamında hem Hansen hem de Spok çeşidinde yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde edilmiş olup, olgunlaşmamış embriyolardan izole edilen

eksplantların, olgunlaşmamış kotiledonlardan alman eksplantlara oranla daha yüksek rejenerasyon gösterdikleri saptanmıştır [59].

Jonoubi ve ark., (2004) , *Brassica napus* L., cv. SLM 460 cinsinde farklı konsantrasyonlarda TDZ ve BAP kullanmış ve maksimum sürgün rejenerasyonunu 4.5 BAP mg/L + 0.30 mg/L TDZ kombinasyonunda bulmuşlardır [60].

Hazrat Ali ve ark., (2007) , *Brassica napus* ‘ un Star, Cyclon ve Westar çeşitlerinde 0.1 mg/L NAA+2 mg/L BAP+5 mg/L $AgNO_3$ ortamında Star cinsi için %82, Westar cinsi için %67, Cyclon cinsi için % 78 oranında kallustan sürgün oluşturma yeteneği gözlemlemişlerdir [61].

Kamal ve ark., (2007) , *Brassica napus* L. *ye ait* 'Sarigol', 'Quantum' ve 'Option 500' çeşitleri ile yaptıkları çalışmada , en iyi rejenerasyon yeteneği 'Quantum' cinsinde 68.8% ile bulunmuştur. 1 mg/L NAA, 8 mg/L BAP ve 3 mg/L ABA kombinasyonunda 'Quantum' cinsinin kotiledon eksplantları ile 100% sürgün rejenerasyonuna ulaşılmıştır [62].

Zebarjadi ve ark., (2008) , *Brassica napus* ‘ un SLM-046 genotipinde yaptığı bir çalışmada 30 g^{-1}sükroz ve 0.8% agar bulunan besiyerlerinde BAP, NAA ve 2,4-D hormonları kullanmıştır. en etkili kallus gelişimi ve üretiminde BAP, NAA ve 2,4-D hormonları arasında interaksiyon bulmuşlardır [63].

Burbulis ve ark., (2009) , *Brassica napus*‘ un farklı cinslerinde yaptıkları çalışmada 4 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA hormon dozlarını içeren ve 30 g/L sükroz ve 0.8% agar bulunan besiyerlerinde 'Valesca' çeşidi en yüksek sürgün üretme kapasitesine sahip olduğu ve rejenerasyon oranları 78% ('Casino') ile 85.11% ('Libea') cinslerinde bulunmuştur [64].

Dai ve ark., (2009), *Brassica oleracea* L. var. *acephala* Alef. Bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada Nagoya çeşidi için 3 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) ve 0.1 mg/L naphthaleneacetic acid (NAA) kullanmışlardır. Bunun sonucunda en iyi sonucu 65.0 %

kotiledonlarda, 76.1 % hipokotil eksplantlarınadn elde etmişlerdir. Eksplant başına sürgün sayısını kotiledonlarda 4.3 adet, hipokotillerde 8.2 olarak bulmuşlardı [65].

Khan ve ark., (2010) , yaptıkları çalışmada *Brassica rapa* ve *Brassica napus* cinsine ait Tori-7, Sampad, Kallyania, BARI Sarisha-7, BARI Sarisha-8 ve MM 20-3 çeşitleri farklı konsantrasyonlarda BAP, NAA, ve $AgNO_3$ kullanmışlar sonuç olarak en yüksek kallus oluşumunu 91.43% ile 2 mg/L BAP +0.1 mg/L NAA +2.0 mg/L $AgNO_3$ kombinasyonu içeren MS ortamında Tori-7 cinsinde bulmuşlardır [66].

Khan ve ark., (2010) , *Brassica napus* L ' a ait Cyclone, Star ve Westar çeşitlerinde araştırma yapmış ve sonuç olarak kotiledon eksplantlarının 0.5 mg/L 2,4-D ve BAP (0.5, 1.0,1.5 ve 2.0 mg/L) kombinasyonlarına en yüksek tepki verdiğini bulmuşlardır. En anlamlı ağırlıktaki ve uzunluktaki kallus 0.5 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L BAP hormon kombinasyonunda Star kotiledon eksplantı için bulunmuştur [67].

Koç ve ark., (2011), *Brassica napus* L. ssp. oleifera ile yaptıkları bir çalışmada değişik bitki büyümesini düzenleyicilerden BAP, kinetin, 2,4-D, TDZ, NAA, $AgNO_3$ ve GA_3 kullanmışlardır. Eksplantlar BAP ve NAA'in değişik kombinasyonlarında denemeye alınmıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonuç %10 ile 1 mg/L BAP+0,02 mg/L NAA içeren MS0 ortamında elde edilmiştir. Ayrıca TDZ, kinetin, BAP, NAA, 2,4-D kombinasyonları kullanılmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu %60 ile 0,30 mg/L TDZ içeren MS0 de gözlenmiştir ikinci olarak %40 ile 0,15 mg/L TDZ üçüncü olarak %20 ile 0,30 mg/L TDZ + 0,02 mg/L NAA içeren MS0 ortamlarından elde etmişlerdir [68].

Mollika ve ark., (2011) de yaptığı çalışmada *Brassica juncea* ' ye ait BARI Sarisha-11 ve BARI Sarisha-16 cinslerinde ve *Brassica campestris*' e ait Tori ‑ 7 cinsinde sürgün rejenerasyonu araştırmışlar ve 2 mg/L BAP, 0.2 mg/L NAA ve 0.5 mg/L Kinetin içeren MS ortamında BARI Sarisha ‑ 11 ve BARI Sarisha ‑ 16 için en yüksek eksplant başına sürgün sayısını elde etmişlerdir ayrıca Tori ‑ 7 için 3 mg/L BAP ve 0.2 mg/L NAA ortamında en yüksek eksplant başına sürgün sayısını elde etmişlerdir [69].

Maheshwari ve ark., (2011) de *Brassica napus* L. ye ait Invigor 5020, Westar ve Topas çeşitleri ile yaptıkları çalışmada donör bitkinin yaşı, hormonal kombinasyonunun rejenerasyonuna etkisi ve eksplant tipinin rejenerasyon kapasitesi üzerindeki etkiyi araştırmışlardır. Sonuç olarak 8 günlük hipokotillerin 1 mg/L 2-4 D hormonu ile en yüksek sürgün üretimine sahip olmuştur [70].

Hnatuszko-konka ve ark., (2013) de yaptıkları bir çalışmada *Brassica oleracea* var. Botrytis 'in Pionier ve Rober varyetelerini kullanmışlardır. MS ortamı ve 4 farklı kombinasyonunu (MS + 1 mg/L BAP, MS + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA, MS + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA, MS+ 2 mg/l BAP + 0.1 mg/L NAA) kullanmışlardır. Sonuç olarak Pionier cinsinin hipokotilleri en yüksek sürgün rejenerasyonu MS+ 2 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA ortamında bulmuşlardır.Rober cinsine ait hipokotiller en yüksek *in vitro* yanıtını MS + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA ortamında vermiştir [71].

Al-Forkan ve ark., (2013), *Brassica napus* L. ile yaptıkları çalışmada en uygun kallus oluşumunu 0,5 mg/L 2-4 D ortamında, en yüksek sürgünü 3.0 mg/L benzyl amino purine (BAP), 0.1 mg/L naphtalene acetic acid (NAA), ve 5.0 mg/L $AgNO_3$ ortamında bulmuşlardır ayrıca en yüksek sürgün sayısını 0,5 mg/L kinetin ilavesinde elde etmişlerdir [72].

Al-Forkan ve ark., (2013), *Brassica campestris* ' in Tori-7 cinsi ile yaptıkları bir çalışmada en uygun kallus oluşumunu 0,5 mg/L 2-4 D ortamında , en yüksek sürgünü 3 mg/L benzyl amino purine (BAP), 0.1 mg/L naphtalene acetic acid (NAA), ve 5 mg/L $AgNO_3$ ortamında bulmuşlardır [73].

Alam ve ark., (2014) , *Brassica napus* L. ye ait *BARI* sarisha-13 cinsini kullanmış, hormon olarak artan dozlarda 0,5 mg/L- 6 mg/L arası 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2 mg/L – 3 mg/L arası BAP ve 0.1 mg/L- 0.5 mg/L NAA kombinasyonlarını kullanmışlardır. En yüksek kallus ağırlığını 0.5 mg/L 2, 4-D , 0.5 mg/L BAP ve 0.5 mg/L $AgNO_3$ içeren ortamda kotiledon eksplantlarında elde etmişlerdir ayrıca bu ortamda kallus yüzdesi 91% e ulaşmıştır [74].

Darçın ve ark. (2014) , yaptıkları çalışmada *Brassica napus* ssp. oleifera L. cvs.ye ait 'Spok','Helios' ve 'Westar' çeşitlerini kullanmışlar ayrıca ortam olarak MS 0 ve B5 kullanmışlardır. En yüksek kallus ağırlığını 0.626 g olarak 3 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında bulmuşlardır. En yüksek sürgün rejenerasyonu oranını 90% olarak 3 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA ve 3 mg/L BAP + 0.4 mg/L NAA kombinasyonlarını içeren MS ortamında bulmuşlardır. Eksplant başına maksimum sürgün sayısı (12.97) ve petri başına toplam sürgün sayısı (118) olarak gövde eksplantı kullanılan MS ortamında 3 mg /L BAP + 0.2 mg /L NAA hormon kombinasyonunda gözlemlemişlerdir [75].

Hussain ve ark., (2014), *Brassica napus* L. ye ait Wester, Con-1, Pakola cinslerini kullanmışlardır. Kallus oluşumu için Wester ve Con-1 çeşitleri Pakola ya göre daha yüksek bir cevaba ulamıştır (63.8%). En yüksek rejenerasyon Wester (87.6) ve Con-1(84.4) a aitken Pakola (54.2%)tür [76].

Ravanfar ve ark., (2014) de *Brassıca oleracea* subsp. *italica* ve *Brassica oleracea* subsp. *capitata* ile yaptıkları çalışmada kotiledon eksplantlarını kullanarak TDZ ve NAA hormonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak *Brassica oleracea subsp*. İtalica cv. Green Dragon King çeşidinde en yüksek sürgün oluşumunu (76.66%) ile bulmuşlardır. Ayrıca aynı çeşit için anlamlı en yüksek eksplant başına sürgün sayısını 0.9 olarak 0.1 mg/L TDZ ile 0.1 mg/L NAA ortamında bulmuşlardır. *Brassica oleracea* subsp. *Capitat*a cv. Gianty çeşidi için en yüksek sürgün rejenerasyonunu 86.67% olarak bulmuşlardır. en yüksek eksplant başına sürgün sayısını 1.1 olarak 0.5 mg/L TDZ ile 0.1 mg/L NAA ortamında bulmuşladır [77].

Swift ve Posner (1972), alkali koşullar altında hümik asit oksidasyonunu inceledikleri çalışmalarında, hümik asitlerin hormon benzeri bir etki yaparak solunum, fotosentez, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi, antioksidanlar ve çeşitli enzimatik reaksiyonları etkileyerek bitki büyümesi ve verimliliği arttırdığını bildirmişlerdir [78].

Malik ve Azam (1985), buğday bitkisinin gelişimi üzerine hümik asitin etkisini araştırdıkları çalışmada dört farklı hümik asit konsantrasyonunu (18, 27, 54, 72 mg/L) denemişler ve 54 mg/L hümik asit uygulamasının kök uzunluğunu % 500 artırdığını belirlemişlerdir. Hümik asit ile birlikte kökün yaş ve kuru ağırlığı da artmıştır. 54 mg/L

hümik asit uygulaması gövde kuru ağırlığında % 22 artışa neden olurken N içeriği ve su alınımı da yükseltmiştir. Ayrıca azotun verilmediği yetiştirme ortamında hümik asit uygulaması ile kök ve gövdede büyüme, su alımı ve fidelerin N içeriği artmıştır. Maksimum büyüme 54 mg/L hümik asit uygulaması ile elde edilmiştir [79].

Senesi ve ark., (1990), toprağa veya besin çözeltisine uygulanan humik asidin bezelyenin kuru ağırlığı, bitki besin elementlerinin alımı ve tohumların çimlenmesi üzerine olumlu etki yaptığını belirtmişlerdir [80].

Feretti ve ark. (1991), 0, 15, 30 ve 50 mg/L hümik madde içeren besin solüsyonunda mısır bitkisini yetiştirmişlerdir. 30 mg/L hümik madde ile yaprakların klorofil içeriği düşerken, protein seviyesi yükselmiştir. Deneme sonucunda hümik maddelerin mısır bitkisinin sülfat asimilasyonunda önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır [81].

David ve ark. (1994), sera koşularında su kültüründe domates fidelerinin gelişimi ve besin içeriği üzerine hümik asitin etkilerini belirlemek amacıyla araştırma düzenlemişler ve besin çözeltisine 0, 640, 1280 ve 2560 mg/L hümik asit uygulamışlardır. 180 mg/L hümik asit uygulamasıyla sürgünlerde P, K, Ca, Mg, Ma ve Zn, kökte N, Ca, Fe, Zn ve Cu besin maddeleri miktarı ile yaş ve kuru kök ağırlığında artış olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar, hücre zan geçirgenliğinin bir göstergesi olan elektrolit sızma kaybı ile hümik asit oram arasında doğrusal bir ilişki tespit etmişlerdir [35].

Aydın ve ark., (1998), mısır (*Zea mays*) ve ayçiçeği (*Heliantus annus*) bitkilerinin gelişimi, besin elementi alımı ve mineral içeriğine topraktan ve yapraktan uygulanan K-humatın etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar hem topraktan hemde yapraktan K-humat uygulamasının doz arttıkça kuru madde miktarını, besin elementi alımını ve bitki mineral içeriğini arttırdığını, ancak topraktan uygulamanın daha etkili olduğunu belirlemişlerdir [82].

Erdal ve ark., (2000) , *Zea mays* L. ile yaptıkları çalışmada toprağa 4 dozda P (0, 20, 40, 80 mg/kg) ve 3 dozda hümik asit (0, 250, 500 mg/kg) uygulanmıştır. Araştırrma sonunda hümik asit uygulamalarının bitki kuru ağırlığıını bitki P konsantrasyonunu, bitki

tarafından alınan P miktarı ile toprakta kalan yarayışlı P konsantrasyonunu artırdığını belirlenmiştir [83].

Bostan ve ark., (2001) , fındık bitksinin 'Tombul', 'Palaz', 'Sivri', 'Çakildak' ve 'Kalikara' cinsleriyle kontrol ve potasyum humat (120g/L) ' ın 3 konsantrasyonu ile (0.01 ml, 0.02 ml ve 0.03 ml/tohum) perlit ortamında yetiştirlmiştir. Tohum çimlenme yüzdesi ve çimlenme periyodu kayıt edilmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi 64.17 % ile Çakıldak, ve en düşük olarak 37.08% ile Kalınkara cinslerinde bulunmuştur. Çimlenme yüzdesi en yüksek (53.33%) ile 0.02 ml/tohum uygulamasında, ayrıca kontrol ortamında 43 % olarak bulunmuştur [84].

Atiyeh ve ark., (2002), normal koşullar altında büyütülen domates ve salatalık (fidelerinin bazı morfolojik parametreler) üzerine humik asitin etkilerini incelemişlerdir. Humik asit uygulamasının fidelerin kök ve gövde kuru ağırlıklarını, kök/gövde oranlarını, bitki uzaması ve yaprak yüzey alanını arttırdığını belirlemişlerdir [85].

Arancon ve ark., (2006) , çilek, kadife çiçeği ve biber fideleri kullanarak yaptıkları çalışmada, humik asitin normal koşullar altında büyütülen fidelerin boyunu, yaprak yüzey alanını, kök ve gövde kuru ağırlıklarını artırdığını gözlemlemişlerdir [86].

Türkmen ve ark. (2004), tuzlu toprak koşullarında domates fidelerinin gelişimi, tohum çimlenmesi ve besin elementlerinin içeriğine humik asit ve kalsiyumun etkisinin belirlenmesi için yaptıkları araştırmada humik asit uygulamasının yalnız mikro besin elementlerini değil, aynı zamanda köklerde N ve P, sürgünlerde N, Ca ve S içeriklerini de arttırdığını belirtmişlerdir [87].

Kaya ve ark., (2005) , (*Triticum aestivum* L.) ye ait tohuma çinko ve yapraktan humik asit uygulamalarının ekmeklik buğdayda verim ve bazı özelliklere etkilerini araştırmıştır. Çeşit olarak Bezostaja 1 ve Gün 91 ekmeklik buğday çeşidi tohumları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; birinci yıl en yüksek tane verimi çeşitlerin ortalaması olarak 510.4 kg/da ile çinko ve hümik asitin birlikte uygulanmasından elde edilmiş olup, bunu 509.5 kg/da ile hümik asit, 503.0 kg/da ile çinko ve 434.2 kg/da ile kontrol uygulaması izlemiştir. İkinci yılda da benzer sonuçlar alınmış, kontrol uygulamasında 474.9 kg/da olan tane verimi

çinko uygulaması ile 501.7 kg/da, hümik asit uygulaması ile 528.1 kg/da ve çinko ile hümik asitin birlikte uygulanması ile 537.5 kg/da'a yükselmiştir [88].

Erdoğan (2005) , fasulye (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) fidelerinde nikel toksitesinin (0.5, 5, 10, 20 ve 40 mg/L) ve bu toksiteyi azaltılmak amacıyla humik asit (0.5, 10, 20 ve 40 mg/L) uygulamalarının etkisini araştırmıştır. Humik asit uygulamasının nikel toksitesinin azaltılmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Humik asitin 10 ve 20 mg/L dozları, yüksek nikelden (20 mg/L) kaynaklanan toksiteyi azaltmada etkili olmuştur. Ancak humik asit, nikelin çok yüksek dozlarındaki (40 mg/L) toksiteyi gidermede yetersiz olduğunu bulmuşlardır [29].

Kolsarıcı ve ark., (2005) , Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) Sanbro, Isera ve P-4223 çeşitleri ile yaptıkları çalışmada farklı humik asit (HA) dozlarının (kontrol (su), 60, 120 ve 180 g/100 kg tohum) kullanmışlardır. Sonuç olarak kök uzunluğu, HA dozlarına göre 8.43–11.23 cm arasında değişmiş ve en yüksek kök uzunluğu 60 g dozdan elde edilmiştir. Çeşitler arasında fide boyu bakımından önemli faklılıklar belirlenmiş ve en yüksek değer 8.15 cm ile Sanbro çeşidinden elde edilmiştir. Uygulanan HA dozları fide boyunu kontrole göre artırmış ve en yüksek değer 60 g HA dozunda saptanmıştır [25].

Ferrara ve ark. (2007) , topraktan ve kompostan elde ettikleri hümik asidi üzüm (*Vitis vinifera* L.) bitkilerine yapraktan uyguladıklarında, hümik asidin ürün miktarını ve niteliğini kontrol gruplarına göre oldukça olumlu etkilediğini saptamışlardır. Topraktan elde edilen hümik asidin 5 ve 20 mg/L konsantrasyonlarda uygulanması sonucu asmalardan ortalama olarak sırasıyla 32.2 ve 29.9 kg üzüm elde edilirken, hümik asit verilmeyen kontrol grubunda ise bu miktar sadece 28.2 kg olarak ölçülmüştür. Her iki çeşit hümik asidin de asmalara verilmesi, üzüm tanelerinin boyunda, çapında ve ağırlığında anlamlı artışlar bulmuşlardır [89].

Akıncı ve ark., (2009) , *Vicia faba* L. nın Eresen 87 çeşidi ile yaptıkları çalışmada humik asitin taze ve kuru ağırlığında %30.1 oranında ve 56.6% oranında ise kök üzerinde anlamlı bir artışa neden olduğunu bulmuşlardır. Bitkinin Na ve K içeriklerini artırmıştır [90].

Patil ve ark., (2011), potasyum humatın (1.0%) bitki besin alımı (kalsiyum ve fosfor) üzerine etkisi araştırdıkları çalışmada *Glycine max* (soya) (L.) Merrill cv. Mahamendal, *Phaseolus mungo* (black gram) (L.) cv. Local ve *Triticum aestivum* (buğday) (L.) cv. Lokvan kullanmışlardır. Sonuç olarak bitkilerin kuru ağırlıkları ölçülerek kalsiyum ve fosfor alımının kontrol ortamına göre anlamlı olarak arttığını bulmuşlardır [91].

Demir ve ark., (2011) , arıtma çamuru (0, 10, 20 ve %30 AÇ) ve humik asit (0, 1000, 1500 ve 2000 ppm HA) kullanarak kireçli toprakta yetiştirilen *Zea mays* L. (mısır) üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak artan dozlardaki HA uygulamaları toprağın organik madde ve alınabilir P, Ca ve Mg içerikleri üzerinde önemli etkide bulunurken, diğer toprak özelliklerine önemli bir etkisi saptanmamıştır. Mısır bitkisinin kök ve kök üstü kısımlarının yaş ve kuru ağırlıklarını ile bitki boyu HA'nın 1000 ppm'lik dozuna kadar artmış bu dozdan sonra önemli derecede azalmışlardır [92].

Karaman ve ark., (2012) , farklı humik asit kaynaklarının domates bitkisinin verim parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla sera koşullarında yürütülmüştür. bu çalışmada domates bitkisine 2 farklı humik asit kaynağı (Ca ve B humat) toprak, yaprak ve toprak+yapraktan uygulanmıştır. Bitki gövde çapı, yapraklı dal sayısı, klorofil ve stoma geçirgenli, bitki toplam ve kök ağırlığında toprak+yapraktan Ca-humat ve B humat uygulamalarının kontrole göre daha yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir B-humat'ın toprak+yapraktan uygulanması durumunda kontrole göre gövde çapı %37, dal sayısı %50, bitki B içeriği ise %84 oranında artışlara neden olurken, Ca-humat'ın toprak+yapraktan uygulanması durumunda ise kontrole göre kök ağırlığında %62, bitki ağırlığında %29 ve bitki Ca içeriğinde ise kontrole göre %70 düzeyinde artışa neden olduğu belirlenmiştir [93].

Patil ve ark., (2013) , potasyum humatın buğday bitkisinin fizyolojik (klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarı) ve biyokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada potasyum humatın biyokimyasal (beta karoten, fenolik madde, protein miktarı ve çözünebilir şeker) özellikleri üzerinde anlamlı bir artışa neden olduğunu bulmuşlardır [94].

Doğru ve ark., (2012) , çalışmalarında humik asidin (50, 100, 200, 400 ve 600 ppm) mısır (*Zea mays* L. cv. 3167) bitkisinde tohum çimlenmesi ve erken fide evresindeki etkilerini araştırmışlardır. 50 ve 100 ppm'lik humik asit uygulamaları mısır tohumlarının çimlenmesi üzerinde inhibitör etki yapmazken, 200 ve 400 ppm'lik humik asit çimlenmeyi % 2, 600 ppm'lik humik asit ise % 4 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Mısır fidelerinin taze ve kuru ağırlıklarının sadece 200, 400 ve 600 ppm'lik humik asit uygulamaları sonucu kontrole göre önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Yapraklardaki fotosentetik pigment miktarı humik asit uygulamaları sonucu önemli derecede azalırken, çözünür protein miktarı artmıştır. 400 ve 600 ppm'lik humik asit mısır yapraklarındaki süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin önemli derecede azalmasına neden olduğunu bulmuşlardır [95].

Tufail ve ark., (2014) , *Triticum aestivum* L. ile yaptıkları bir çalışmada 0, 2,5, 5 , 7,5 , 10 , 12,5 kg/ha dozlarında humik asit kullanmışlardır.Maksimum gövde ve kök uzunluğunu 12,5 Kg/ha dozunda elde etmişlerdir. Ayrıca bitkinin kuru ağırlığında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir [96].

Koç ve ark., (2014) , bitki besin maddesi eksikliği durumunda humik madde kullanılarak bitkinin stresten korunması amaçlanmıştır. *In vitro* koşullarda yürütülen çalışmada, kolza (*Brassica napus* L.) bitkisinin Gladyatör çeşidi kullanılmıştır. Murashige& Skoog temel besi yerinin üç farklı konsantrasyonuna (Tam doz MS, ½ oranında MS ve ¼ oranında MS) 25, 50 ve 100 ppm potasyum humat (KH) ilave edilmiştir. En yüksek kök uzunluğu 50 ppm potasyum humat ilavesi MS ¼ ortamında; en yüksek gövde boyu 100 ppm KH ilave edilen MS ¼, en yüksek taze ağırlık ve kuru ağırlık 100 ppm KH ilave edilen tam doz MS besiyerinde gözlenmiştir. Potasyum humat konsantrasyonu arttıkça, kontrol gruplarına oranla klorofil a, klorofil b toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarında azalma tespit edilmiştir. Toplam protein miktarında ise kontrol grupları ile potasyum humat ilave edilen besiyerleri arasında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Kontrol gruplarına oranla potasyum humat dozları arttıkça glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin de arttığını bulmuşlardır [97].

Koç ve ark., (2014), kolza (*Brassica napus* L.) bitkisinin Licosmos çeşidi kullanılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* ortamda gerçekleşen MS 0, MS ½ ,MS ¼ ve 25,50 ve 100 ppm potasyum humat konsantrasyonları kullanılmıştır. MS 0 da potasyum humat dozları arttıkça çimlenme artmıştır. 100 ppm' lik potasyum humat dozu MS ¼ ortamında olumsuz etki göstererek kök boyunu azaltmıştır. MS ¼ ortamında 25 ppm lik potasyum humat gövde boyunu arttığı gözlenmiştir. MS 0 ortamında konsantrasyonların artışıyla taze ağırlıktada bir artma gözlenmiştir. MS ½ ortamında 100 ppm olumsuz etki yaratmıştır. SOD aktivitesi potasyum humat dozları arttıkça artış gözlenmiştir. 25 ve 50 ppm içeren potasyum humatta anlamlı bir şekilde artmıştır [98].

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmaların sonucunda, farklı humat ve dozlarına göre bitkilerin bazı fizyolojik parametreler ve *in vitro* rejenerasyon parametrelerinde farklılıklar bulunmuştur. Genellikle 5 ve 7 ppm' lik humat uygulamaları yüksek geldiği için strese yol açmış bu yüzden uygulanması uygun görülmemektedir. Önceden yapılan çalışmalarla bağlı olarak özellikle antioksidant enzim aktiviteleri ve fizyolojik parametrelerde uyumluluk bulunmuştur. Humik madde ile sürgün rejenerasyon çalışmaları ilk defa yapılmış oldu ve önemli bir yağ bitkisi olan kolza üzerinde ki sürgün rejenerasyonuna etkileri ortaya çıkmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre aşağıdaki öneriler yapılabilir:

a. Bu çalışmada demir humat, bor humat ve potasyum humat kullanılmıştır. Farklı humat ligandları kullanılabililir.

b. Besi ortamına farklı dozlarda farklı oksin grubu hormonlar ilave edilerek, kallus uyarımı arttırılabilir.

c. Besi ortamına farklı dozlarda farklı sitokinin grubu hormonlar ilave edilerek, sürgün uyarımı arttırılabilir.

d. Kolza bitkisinde doku kültürü yapmak için, farklı eksplantlarının kullanılması önerilebilir.

e. Hastalıklardan arî, hızlı ve toplu üretime olanak veren ve yeni çeşit geliştirmek üzere yapılan gen aktarım çalışmalarının başarısını arttırılabilmesi için *in vitro* kültürün tercih edilmesi önerilebilir.

f. Humat konsantrasyonları düşürülerek yeni kombinasyonlar denenebilir.

g. Diğer bazı antioksidant enzim aktivite analizleri yapılarak sonuçlar desteklenebilir.

KAYNAKLAR

[1] DARÇIN, E. S., Bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde doku kültürü yöntemiyle bitki rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi. Ankara, 2003.

[2] KOLSARICI Ö., GÜR, A., BAŞALMA, D., KAYA, M.D., İŞLER, N., Biyodizel dosyası başlık 2: Türkiye'nin yağ açığı kapatılabilir mi? Yağlı tohumlu bitkiler üretimi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi,(78-79): p. 65-78 syf. , 2006.

[3] EPİRTÜRK, B., Bazı Kolza (*Brassica napus* ssp. oleifera L.) Çesitlerinde farklı ekim zamanı uygulamalarının verim ve kalite özelliklerine etkisinin araştırılması. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi. Tekirdağ, 2009.

[4] ÖZTÜRK, Ö., Bazı kışlık kolza çeşitlerinde farklı ekim zamanı ve sıra arası uygulamalarının verim, verim unsurları ve kalite üzerine etkileri. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2000.

[5] GIDIK, B., Trakya bölgesinde yetişen kanola (kolza) bitkisinde genetik çeşitliliğin moleküler işaretleyicilerle karakterizasyonu. Hitit Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2012.

[6] WEISS, E. A., Rapeseed, Oilseed Crops. New York. : The United States of America by Longman Inc. 161-214, 1983.

[7] ANĞIN, N., VURARAK, Y., Çukurova bölgesine uygun kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinin belirlenmesi.Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi. 5(1): p. 90-9, 2012.

[8] ESRİNGÜ, A., Toprakta kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve bor (B) elementlerinin şelatör desteğiyle kolza (*Brassica napus* L.) bitkisi kullanılarak fitoremediasyon yöntemiyle giderilmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi , Erzurum, 2010.

[9] ERSUNGUR, S., Üretim yönteminin kolza yağının özelliklerine etkisinin incelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2008.

[10] SHAHİDİ F., Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Volume 6,. New Jersey, USA.: Wiley- Interscience, 2005.

[11] SHAHİDİ, F., Canola and Rapeseed, Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Van Nostrand Reinhold, New York,1990.

[12] SOBUTAY, T., Kanola sektör araştırması. İstanbul ticaret odası dış ticaret şubesi araştırma servisi, 2004.

[13] COŞGUN, B., Bazı kışlık kolza çeşitlerinde verim, verim usnurları ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2013.

[14] GÜLTAŞ, H., Kolza (*Brassica napus* L.) bitkisinin toprak-su-atmosfer ilişkilerinin belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2013.

[15] ARSLAN, M., ÜREMIŞ, İ., ÇALIŞKAN, S., ÇALIŞKAN, M. E., Bazı Kanola (*Brassica napus* oleifera sp.) çeşitlerinin amik ovası koşullarında yetiştirilebilme olanaklarının belirlenmesi. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 2007.

[16] DİNÇ, B. E., Yazlık kanola (*Brasica napus* L.) çeşitlerinin verim ve bazı özellikleri üzerinde çalışmalar. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi. Tekirdağ, 2010.

[17] GÜL, M., EGESEL, C., KAHRIMAN, F., Çanakkale yöresinde yeni kışlık kolza çeşitlerinde bazı özelliklerin araştırılması. M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. 10(1-2): p. 1-8, 2005.

[18] ERGİN, H. G., Tuzlu koşullarda yetiştirilen arpa fidelerinin bazı morfolojik ve anatomik parametrelerine humik asitin etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2014.

[19] KAPTAN, M. A., AYDIN, M., Humik asidin pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) gelişimi ve kalite özellikleri üzerine etkileri. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi. 2012-1: p. 291-298, 2012.

[20] AKINCI, Ş., Hümik asitler, bitki büyümesi ve besleyici alımı. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 23(1): p. 46-56, 2011.

[21] KOCAMAN, A., Farklı su streslerinde yetiştirilen buğday bitkisinin (*Triticum aestivum* L.) soğuğa dayanımını artırmak amacıyla uygulanan humik asit, salisik asit ve absisik asit uygulamalarının antioksidan enzimler ve verim unsurları üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2010.

[22] STEVENSON, F. J., Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions,. Vol. 2nd edition. John Wiley and Sons, 1994.

[23] ÖNDİN, E., Farklı yem bitkilerinde bor ve humik asit uygulamasının verim ve bitki besin elementi (N, P, K, B) içeriklerine etkileri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi , 2013.

[24] ÖZTÜRK, E., Farklı dozlarda humik asit ve kadmiyum uygulamalarının hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde kadmiyum birikimine ve fide gelişimine etkileri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2011.

[25] KOLSARICI, Ö., KAYA, M. D., DAY, S., İPEK, A., URANBEY, S., Farklı humik asit dozlarının ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) çıkış ve fide gelişimi üzerine etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 18(2): p. 151-155, 2005.

[26] YILMAZ, C., Humik ve Fulvik Asit. Hasad Bitkisel Üretim. (260): p. 74, 2007.

[27] CHEN, Y., MAGEN, H. & CLAPP, C.E., , Plant growth stimulation by humic substances and their complexes with iron. Proceedings of International Fertiliser Society. p. 14, 2001.

[28] KARAMAN, M. R., ŞAHİN, S., GEBOLOĞLU, N., TURAN, M., GÜNEŞ, A., TUTAR, A., Humik asit uygulaması altında farklı domates çeşitlerinin (*Lycopersicon esculentum* L.) demir alım etkinlikleri. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi. 2012-1, 2012.

[29] ERDOĞAN, O., Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinde nikel toksitesinin humik asit ile azaltılması üzerine bir araştırma. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2005.

[30] DİZMAN, M., Arifiye Turbasının O_2 ve N_2 ile etkileştirilmesiyle elde edilen humik asitlerin karekterizasyonu. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2014.

[31] HELAL, A. A. I., D. M., KHALIFA, S. M., ALY, H. F, Interaction of Pesticides with Humic Compounds and Their Metal Complexes. Radiochemistry. 48: p. 419, 2006.

[32] CACCO, G., DELL' ANGOLA, G., Plant Growth Regulator Activity of Soluble Humic Complexes. Canadian Journal of Soil Sciences. 64: p, 225. 1984.

[33] MURASHİGE, T., SKOOG, F. K., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497, 1962.

[34] ERGÖNÜL, U., Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşitlerine uygulanan humik asit ve leonardit'in verim, verim öğeleri üzerine etkileri. Ankara. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2011.

[35] DAVID, P. P., NELSON, P.V., SANDERS, D.C ., A humic acid improves growth of tomato seedling in solution culture. Journal of Plant Nutrition. 17(1): p. 173-184, 1994.

[36] BABAOĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., Bitki Biyoteknolojisi -I- Doku Kültürü ve Uygulamaları. Konya, 2001.

[37] YEDİYILDIZ, A. G., Kuraklık ve tuz stresi uygulanan buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinde antioksidant enzim aktivitesindeki değişimlerin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2008.

[38] ASLANTÜRK, Ö. S., Aydın yöresinde kullanılan bazi tibbi bitkilerin antioksidant ve sitotoksik etkilerinin araştırılması. Adnan menderes üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2010.

[39] YAMADA, T., OSAWA, T., KAWAKİSHİ, S., UDAKA, S., OHTA, T., Antimutagenic effects of N.methy-valyl-amiclenomycin (BA-2) isolated from the metabolites of streptomyces sp. Mut. Res., (286): p. 293-297, 1993.

[40] DOĞAN, M., Domates (*Lycopersicon* Sp.)' te tuz stresinin bazı fizyolojik parametreler ve antioksidant enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenmesi . Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2004.

[41] DİONİSİO-SESE, M., TOBİTA, S., Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Science. 135: p. 1-9, 1998.

[42] NOSTAR, Ö., Farklı *Cucumis sativus* L. çeşitlerinin antioksidant içeriği üzerine biyotik ve abiyotik stresin birlikte etkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2011.

[43] ÇİMEN, Ç., ÖTER, Ç., DEMİR, H., SAVRAN, A., Rateritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karekterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi . YYÜ Vet Fak Derg 16(1): p. 15-20, 2005.

[44] BİTİKTAŞ, A., Çinko ve kadmiyum toksitesinin marul bitkisinde gelişme ve bazı antioksidant enzimlerin aktivitesine etkileri.Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi ,Van, 2007.

[45] RABINOWITCH, H.D., FRIDOVICH, I., Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. Photochemistry and Photobiology, 37: p. 679-690, 1983.

[46] SANDALIO, L. M., PALMA, J.M., DE RİO, L.A., Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L., Plant Science. 51(1), 1987.

[47] KORKMAZ, Y., Bitki doku kültürü teknikleri ile üretilen tetraploid *trifolium pratense L.* rejenerantları arasındaki somaklonal varyasyonun belirlenmesi. Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2013.

[48] POYRAZ, H., Endemik *Erodium somanum*'un bitki doku kültürü yöntemi ile mikroçoğaltımı. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2012.

[49] ALAÇAM, G. K., Arpa (*Hordeum vulgare* L.) doku kültüründe sukkula retrotranspozon hareketlerinin belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2013.

[50] YILDIZHAN, Y., *Brassica nigra* bitkisinin *in vitro* şartlarda doku kültürü ile çoğaltılması. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2007.

[51] ARORA, R., Medicinal Plant Biotechnology. USA: CAB International, 2010.

[52] ACEMİ, A., Farkli konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)'in doku kültürü ile çoğaltılmasına olan etkilerinin araştırılması. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2011.

[53] DUNWELL, J. M., *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three Brassica species. J. Exp. Hot, . 129: p. 789-799, 1981.

[54] KLİMASZEWSKA, K., KELLER, W.A., High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 4: p. 183-197, 1985.

[55] MEI-ZHU YANG., S.-R. J., ENG-CHONG PUA High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24: p. 79-82, 1991.

[56] KHEHRA, G. S., MATHİAS, R.J., , The interaction of genotype, expiant and media on the regeneration of shoots from complex expiants of *Brassica napus* L., J. Exp. Bot. 43(256): p. 1413-1418, 1992.

[57] ONO, Y., TAKAHATA, Y., AND KAIZUMA, N., , Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (Brassica napus L). Plant Cell Rep., 14: p. 13-17, 1994.

[58] DAHAWAN, A.K., J, INDERJEET, A.F., SINGH, J., An Efficient Plant Regeneration Protocol from Seedling Explants of *Brassica juncea* RH-781. A Freze Tolerant Cultivar, Cruciferae Newsletter, . 22: p. 21-22, 2000.

[59] MIRICI, S., Kolza (*Brassica napus* L. ssp. Oleifera) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve agrobacterium tumefaciens aracılığıyla gen aktarımı. Ankara, Gazi üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 2000.

[60] JONOUBI, P., MOUSAVI, A., MAJD, A., DANESHIAN, J., Improved *Brassica napus* L., regeneration from hypocotyls using thidiazuron and benzyladenine as cytokinin sources. Pak. J. Bot., 36(2): p. 321-329, 2004.

[61] ALİ, H., ALİ, Z., ALİ, H., MEHMOOD, S., ALİ, W., *In vıtro* regeneratıon of brassica napus L., cultivars (star, cyclone and westar) from hypocotyls and cotyledonary leaves . pak. j. bot. 39(4): p. 1251-1256, 2007.

[62] KAMAL, G. B., ILLİCH, K. G., ASADOLLAH, A., Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. African Journal of Biotechnology. 6(7): p. 861-867, 2007.

[63] ZEBARJADI, A., BOURJİAN, L., GHASEMPOR, H.R., KAHRIZI, D., Study on effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2,4-D and kinetin) on callus induction in *Brassica napus.* 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Biotechnology for the Sustainability of Human Society-IBS 2008 Abstracts, 2008.

[64] BURBULIS, N., BLINSTRUBIENE, A., KUPRIENE, R., JONYTİENE, V., RUGIENIUS, R., STANİENE, G., *In vitro* regeneration of *Brassica napus* L. shoots from hypocotyls and stem segments. Zemdirbyste-Agriculture 96(3): p. 176-185 , 2009.

[65] DAI, X.G., SHI, X. P., YE, Y.M., FU, Q., BAO, M.Z., High frequency plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of ornamental kale. Biologia plantarum 53(4): p. 769-773, 2009.

[66] KHAN, M.M.A., KHAN ROBIN, A.B.MA.H., NAZIM-UD-DOWLA, M.A.N., TALUKDER, S.K., HASSAN, L., *In vitro* regeneration potentiality of Brassica genotypes in differential growth regulators. Bangladesh J. Agril. Res. 35(2): p. 189-199, 2010.

[67] KHAN, I., ALİ, W., TAKAR, Z. A., Arfa FROOQI, S., AKHTAR, W., Increased regeneration efficiency of *Brassica napus* L. cultivars Star, Westar and Cyclone from hypocotyle and cotyledonary explants. Nature Precedings, 2010.

[68] KOÇ, Y., KAYAN, M., TAŞCI, Y., *Brassica napus* L. ssp. oleifera bitkisinde sürgün rejenerasyonunun araştırılması. 19.ulusal biyoloji öğrenci kongresi , İstanbul, 2011.

[69] MOLLIKA, S.R., SARKER, R. H., HOQUE, M. I., *In vitro* Plant Regeneration in Brassica spp., Plant Tissue Cult. & Biotech. 21(2): p. 127-134, 2011.

[70] MAHESHWARİ, P., SELVERAJ, G., KOVALCHUK, I., Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation. New Biotechnology. 29(1), 2011.

[71] HNATUSZKO-KONKA, A.G., KOWALCZYK, T., KONONOWICZ, A.K. *Brassica oleracea* var. botrytis: evaluation of *in vitro* potential of two commercial cultivars. BioTechnologia 94(3): p. 352, 2013.

[72] ALAM, S., KHALEDA, L., AL-FORKAN, M., Establishment of regeneration protocol for canola (*Brassica napus* L.). Global Journal of Science Frontier Research. 13(7), 2013.

[73] ALAM, S.S., KHALEDA, L., AL-FORKAN, M., An Efficient *in vitro* regeneration system for Tori (*Brassica Campestris*)-7. Global Journal of Science Frontier Research. 13(2), 2013.

[74] ALAM, S.S., KHALEDA, L., AL-FORKAN, M., *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of BARI SARISHA-13 (Brassica napus L.). Asian Journal of Agriculture and Food Sciences. 2(1), 2014.

[75] DARÇIN, E. S., KOLSARICI, Ö., YILDIZ, M., Establishment of efficient regeneration protocol for three rapeseed cultivars. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 28(1): p. 21-26, 2014.

[76] HUSSAIN, S., RASHEED, A., LATIF, M., MAHMOOD, T., NAQVI, S. M. S., Canola (*Brassica napus* L.) regeneration and transformation via hypocotyl and hypocotyl derived calli. Sarhad J. Agric. 30(2), 2014.

[77] RAVANFAR, S.A., AZİZ, M. A. , RASHID, A.B., SALIM, S., *In vitro* adventitious shoot regeneration from cotyledon explant of *Brassica oleracea* subsp. Italica and *Brassica oleracea* subsp. capitata using TDZ and NAA. Pak. J. Bot.,. 46(1): p. 329-335, 2014.

[78] SWIFT, R. S., POSNER, A.M., Autoxidation of humic acid under alkaline conditions. European Journal of Soil Science, 23(4): p. 381-393, 1972.

[79] MALIK, K. A., AZAM, F., Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. Environmental and Experimental Botany. 25(3): p. 245-252, 1985.

[80] SENESİ, N., LOFFREDO, E., PADOVANO, G., Effects of humic acid-herbicide interactions on the growth of *Pisum sativum* in nutrient solution. Plant and Soil. 127(1): p. 41-47, 1990.

[81] FERETTİ, M., GHİSİ, R., NARDİ, S., PASSERA, C., Effect of humic substances on photosynthetic sulphate assimilation in maize seedlings. Canadian Journal of Soil Science. 71(2): p. 239-242, 1991.

[82] AYDİN, A., TURAN, M., SEZEN, Y., Effect of fulvic-humic acid application on yield and nutrient uptake in sunflower and corn. Improved Crop Quality by Nutrient Management, Kluwer Acedemic Publishers Dordrecht. Boston. London, 1999.

[83] ERDAL, İ., BOZKURT, M. A., ÜMRÜN, K. M., KARACA, S., SAĞLAM, M., Kireçli bir toprakta yetiştirilen mısır bitkisi (*Zea mays* L.) gelişimi ve fosfor alımı üzerine humik asit ve fosfor uygulamasının etkisi. Turk J Agric For 24: p. 663-668, 2000.

[84] BOSTAN, S. Z., ISLAM, A. , YİLMAZ, M, Effect of potassium humate on hazelnut seed germination. Acta Hort. (ISHS) 556: p. 287-290, 2001.

[85] ATİYEH, R.M., S. L., C.A. Edwards , N.Q. ARANCON, METZGER, J.D., The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth . Bioresource Technology 84(1): p. 7-14, 2002.

[86] ARANCON, N.Q., EDWARDS, C. A., Lee, S., ve Byrne, R., Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth European Journal of Soil Biology 42: p. 65-69, 2006.

[87] TÜRKMEN, Ö., DURSUN, A., TURAN, M., ERDİNÇ, Ç., Calcium and humic acid affect seed germination, growth, and nutrient content of tomato seedlings under saline soil conditions. Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci, 54: p. 168-174,2004.

[88] KAYA, M., ATAK, M., ÇİFTÇİ, C.Y., ÜNVER, S., Çinko ve humik asit uygulamalarının ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)' da verim ve bazı verim öğeleri üzerine etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9(3), 2005.

[90] AKINCI, Ş., The effect of humic acid on nutrient composition in broad bean (*Vicia faba* L.) roots, Notulae Scientia Biologicae. 1(1), 2009.

[91] PATIL R.B., A.D, MORE., KALYANKAR, M.,WADJE S.S., Effect of potassium humate on nutrients uptake of glycine max, *Phaseolus mungo* and *Triticum aestivum* L., Plant Sciences Feed 1(10): p. 174-178, 2011.

[92] DEMİR, E., ÇİMRİN, K.M., Arıtma çamuru ve humik asit uygulamalarının mısırın gelişimi, besin elementi ve ağır metal içerikleri ile bazı toprak özelliklerine etkileri. Tarım bilimleri dergisi - journal of agricultural sciences 17: p. 204-216, 2011.

[93] KARAMAN, M. R., TURAN, M., YILDIRIM, E., GÜNEŞ, A., ESRİNGÜ, A., DEMİRTAŞ, A., GÜRSOY, A., DİZMAN, M., TUTAR, A., KILINÇ, H., Ca ve B-humat bileşiklerinin domates (*Lycopersicon esculentum* L.) bitkisinin verim parametreleri ile klorofil ve stoma geçirgenliği üzerine etkilerinin belirlenmesi. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi 1, 2012.

[94] PATIL, R.B., CHAVAN, S. B., MORE, A.D., Shinde, J.B., Effect of potassium humate on biochemical aspects of wheat. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 3(1): p. 89-91, 2013.

[95] DOĞRU, A., DARÇIN, E. S., TUTAR, A., DİZMAN, M., KOÇ, Y., Potasyum humatın mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin büyümesi üzerine etkileri. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi 1: p. 83-93, 2012.

[96] TUFAİL, M., K. N., USMAN, M., Impact of humic acid on the morphology and yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.). World Applied Sciences Journal. 30(4): p. 475-480, 2014.

[97] KOÇ, Y., YILDIZ, M., ERGİN, N., DARÇIN, E. S., *In Vitro* Koşullarda Farklı Humik Madde Konsantrasyonları İlavesinin Bitki Besin Maddesi Noksanlığının Giderilmesinin Kolza Bitkisinin Fizyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi .Ulusal Botanik Bitki Bilimi Kongresi p. 92. 25-28 Ekim , 2014.

[98] KOÇ, Y., DARÇIN, E. S., YILDIZ, M., ERGİN, N. Effects of potassium humate and different concentration of MS medium in *Brassica napus* L. cv. Licosmos on shoot regeneration and some physiological parameters. 3rd İnternational molecular biology and biotechnology congress. Bosnia and Herzegovina, 2014.

[99] BEYER, W. F., FRİDOVİCH, I., Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry, 161, 559-566, 1987.

[100] BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254, 1976.

[101] LİCHTENTHALER, H.K., Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148, 350–382, 1987.

[102] AEBİ, H., Catalase *in vitro*. Method Enzym 105: 121-126, 1984.

[103] YEOMAN, M.M., "Lecture Notes for Plant" Physicology of Onay A, 1993.

ÖZGEÇMİŞ

Yusuf KOÇ, 09.08.1990 da Kastamonu' da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Taşköprü'de tamamladı. 2008 yılında Taşköprü Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2008 yılında başladığı SAÜ Biyoloji bölümünü 2012 yılında bitirdi. 2012 yılında Sakarya Üniversitesi, Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı. Bu süre içerisinde çeşitli projelerde araştırıcı olarak görev aldı. 2015 yılında SAÜ Biyoloji bölümü yüksek lisans programından mezun oldu.