

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ BİTKİ BÜYÜME  
DÜZENLEYİCİLERİNİN *Amsonia orientalis* Decne.  
(Apocynaceae)'İN DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTILMASINA  
OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS**

**Arda ACEMİ**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Danışman: Prof. Dr. Fazıl ÖZEN**

**KOCAELİ, 2011**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ BİTKİ BÜYÜME  
DÜZENLEYİCİLERİNİN *Amsonia orientalis* Decne.  
(Apocynaceae)'İN DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTILMASINA  
OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Arda ACEMİ**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 13 Aralık 2011**

**Tezin Savunulduğu Tarih: 26 Aralık 2011**

**Tez Danışmanı  
Prof.Dr. Fazıl ÖZEN**

()

**Üye  
Prof.Dr. İbrahim ÖZKOÇ**

()

**Üye  
Yrd.Doç.Dr. Özlem AKSOY**

()

**KOCAELİ, 2011**

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Fizyolojik sebepler bir yana dünyanın hızla artmakta olan popülasyonu, çarpık kentleşme ve sanayileşme gibi nedenlerden dolayı bitki örtüsü tahrip olmaktadır. Bu nedenle endemiklerin ve dar alanda yayılış gösteren nadir bitkilerin neslinin devam edebilmesi için koruma ihtiyacı doğmuştur. Ayrıca kimi bitkilerin sahip oldukları önemli tıbbi özellikler nedeniyle bu ihtiyaç bir kat daha artmaktadır. Bu çalışma ile Türkiye ve Avrupa florasında yok olmak üzere olan bir tür olan *Amsonia orientalis* Decne.'in *in vitro* çoğaltımı için etkili ve hızlı bir protokolün yanında farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin bitkinin *in vitro* doku kültürüne olan etkileri ortaya konmuş ve bitki koruma altına alınmıştır.

Bir proje kapsamında hazırlanan bu tezin ortaya çıkması için gerekli tüm desteği veren, bilgi ve birikimiyle daima yanımda olan, bilimsel yönünün yanında sanatsal yönünü de kendime örnek aldığım, bana özgür bir çalışma ve tartışma ortamı sunan bölüm başkanım ve aynı zamanda danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e;

Lisans yıllarımdan bu yana benden desteğini esirgemeyen, tezimin her aşamasında tavsiyelerinden faydalandığım, kendisinden bilimsel bilginin yanı sıra "Güzel şeyler emek ister!" sözünün anlamını öğrendiğim ve kendime örnek aldığım diğer hocam olan Sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a;

Akademik gelişimime katkıda bulunan ve daima desteklerini gördüğüm Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarıma;

Beni 26 yaşına kadar omuzlarında taşıyan ve kendilerine olan minnetimi kelimelerle sınırlayamayacağım aileme, yolculuklarda büyüdüğüm şehirlerarası yollara ve geleceğe dair kurduğum tüm hayallere içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi-BAP 2009/040 No'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	vi
SİMGELER .....	vii
ÖZET .....	viii
İNGİLİZCE ÖZET .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Bitki Doku Kültürünün Tarihçesi .....	3
1.2. Bitki Doku Kültürünün Kullanım Alanları .....	5
1.2.1. Tarımsal ıslah uygulamalarında bitki doku kültürü .....	6
1.2.2. Islah dışı uygulamalarda bitki doku kültürü .....	7
1.2.3. Nesli tükenmekte olan bitkilerin çoğaltımında doku kültürü .....	8
1.3. Bitki Doku Kültürünün Avantajları ve Dezavantajları .....	9
1.4. Bitki Doku Kültürü Teknikleri .....	10
1.5. Bitki Doku Kültürlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	15
1.5.1. Besi ortamları (Besiyerleri) .....	15
1.5.2. Bitki büyüme düzenleyicileri .....	17
1.6. Kültüre Etki Eden Çevresel Etmenler .....	21
1.7. Bern Sözleşmesi .....	22
1.8. Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN).....	22
1.8.1. IUCN kırmızı liste sınıfları .....	23
1.8.2. Tehlike kategorilerinde bulunan bitkilerin dünyadaki durumu .....	25
1.8.3. Tehlike kategorilerinde bulunan bitkilerin Türkiye'deki durumu .....	26
2. GENEL BİLGİLER .....	28
2.1. Bitkinin Genel Özellikleri .....	28
2.2. Ekonomik ve Tıbbi Önemi .....	30
2.3. Avrupa ve Türkiye'deki Yayılış Alanları .....	32
2.3.1. Balıkesir'in iklimi .....	33
2.4. Apocynaceae Familyasına Ait Doku Kültürü Çalışmaları .....	34
2.5. <i>Amsonia</i> Cinsine Ait Doku Kültürü Çalışmaları .....	36
3. MALZEME ve YÖNTEM .....	38
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Bitki Materyali .....	38
3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler ...	38
3.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar .....	38
3.2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar .....	38
3.3. Deneylerde kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltileri .....	39
3.3.1. 6-benzilaminopürin (BAP) ana solüsyonu .....	39
3.3.2. Kinetin (Kn) ana solüsyonu .....	39
3.3.3. 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ana solüsyonu .....	39

3.3.4.	İndol-3-bütirik asit (IBA) ana solüsyonu .....	40
3.3.5.	İndol-3-asetik asit (IAA) ana solüsyonu .....	40
3.4.	Besi Ortamı ve İçeriği .....	40
3.5.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması ...	40
3.6.	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları .....	42
3.7.	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu .....	44
3.8.	Besi Ortamlarının Hazırlanması .....	45
3.8.1.	Besi ortamlarının sterilizasyonu .....	45
3.8.2.	Besi ortamlarının magenta kaplarına aktarımı .....	46
3.9.	Yetişkin <i>A. orientalis</i> Bireylerinden Eksplantların Alınması .....	46
3.10.	Uygun Sterilizasyon Prosedürünün Oluşturulması ve Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu .....	46
3.11.	Bitki Yetiştirme Kabininin İklimsel Şartları .....	47
3.12.	Eksplantların Besi Ortamlarında Kültüre Alınması .....	49
3.12.1.	Olgun bitki eksplantlarından rejenera olan sürgün uzunluklarının ölçümü .....	50
3.12.2.	Kallus ağırlıklarının tartımı .....	50
3.12.3.	En uzun sürgünlerin oluştuğu besi ortamlarının belirlenmesi .....	51
3.12.4.	Seçilen besi ortamlarında sürgünlerin alt kültürlere alınması .....	51
3.12.5.	Alt kültürlerdeki sürgün uzunluklarının ölçümü .....	52
3.12.6.	Alt kültürlerdeki kallus miktarlarının ölçümü .....	52
3.13.	Sürgünlerin Köklendirme Ortamlarına Aktarımı .....	52
3.13.1.	Kallus oluşumunun ve kök sayılarının belirlenmesi .....	53
3.13.2.	Kök uzunluklarının ölçümü .....	53
3.14.	Tam Rejenerasyonu Gerçekleşen Bitkilerin Toprağa Aktarımı .....	53
3.14.1.	Bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması (Aklimatizasyon) .....	54
3.15.	Verilerin İstatistiksel Yönden Değerlendirilmesi .....	55
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA .....	56
4.1.	Eksplantlarının Sterilizasyonu ve Sterilizasyon Başarısı .....	56
4.2.	Olgun Gövde Eksplantlarının Kullanıldığı Kültür Denemelerine Ait Bulgular .....	57
4.2.1.	Olgun gövde eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine farklı BBD kombinasyonu ve konsantrasyonlarının etkileri .....	57
4.2.1.1.	Farklı 2,4-D + BAP konsantrasyonlarının etkileri .....	57
4.2.1.2.	Farklı IAA + BAP konsantrasyonlarının etkileri .....	60
4.2.1.3.	Farklı IAA + Kinetin konsantrasyonlarının etkileri .....	64
4.2.2.	Farklı BBD kombinasyonu ve konsantrasyonlarının olgun gövde eksplantlarında kallus oluşumu üzerine etkilerine ait bulgular .....	67
4.2.2.1.	Farklı 2,4-D + BAP konsantrasyonlarının etkileri .....	67
4.2.2.2.	Farklı IAA + BAP konsantrasyonlarının etkileri .....	69
4.2.2.3.	Farklı IAA + Kinetin konsantrasyonlarının etkileri .....	71
4.3.	Genç Sürgün Eksplantlarının Kullanıldığı Denemelere Ait Bulgular ..	73
4.3.1.	Genç sürgün eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine seçilen besi ortamlarının etkileri .....	73
4.3.2.	Seçilen besi ortamların genç sürgün eksplantlarında kallus oluşumu üzerine etkileri .....	76
4.4.	Sürgünlerin Köklendirilmesine Ait Bulgular .....	78
4.4.1.	Farklı IAA konsantrasyonlarının etkileri .....	78

4.4.2. Farklı IBA konsantrasyonlarının etkileri .....	82
SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....	85
KAYNAKLAR .....	88
ÖZGEÇMİŞ .....	96

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Kallus kültürlerinin başlatılması ve ardından organogenesisin uyarılması .....	11
Şekil 1.2: Kallusun gevşek dokulu üst yüzeyi ve mekanik etkiyle hücrenin kallustan ayrılması .....	12
Şekil 1.3: Organ kültürlerinden sekonder metabolit eldesi .....	12
Şekil 1.4: Mikroçoğaltım metodları .....	14
Şekil 1.5: Bazı önemli bitki hormonları .....	17
Şekil 1.6: Kültür ortamındaki oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının etkileri ..	19
Şekil 1.7: Kırmızı liste kategorilerinin yapısı .....	24
Şekil 2.1: <i>Amsonia orientalis</i> 'in çiçekleri ve meyveleri .....	29
Şekil 2.2: <i>Amsonia orientalis</i> çiçeğinin genel görünüşü .....	29
Şekil 2.3: <i>Amsonia orientalis</i> 'in dünyadaki yayılışı .....	32
Şekil 2.4: Balıkesir'in iklim diyagramı .....	33
Şekil 3.1: Bitki büyütme kabininin görünümü .....	47
Şekil 3.2: Kabindeki çeşitli ışıklandırma seviyelerine göre ışık şiddeti .....	48
Şekil 3.3: Kültüre alınan eksplantlar .....	49
Şekil 3.4: Nodlardan rejenere olan sürgünler .....	50
Şekil 3.5: Kültür ortamında oluşan kalluslar .....	51
Şekil 3.6: Kültür periyodunun sonunda köklendirme ortamı ve kökler .....	52
Şekil 3.7: Besi ortamından çıkarıldıktan sonra bitkiciğin görünümü .....	53
Şekil 3.8: Başarılı bir şekilde aklimatize olmuş bir <i>A. orientalis</i> bitkisi .....	54
Şekil 4.1: Ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği (2,4-D + BAP) .....	59
Şekil 4.2: Kültürdeki anormal bir yaprak görüntüsü .....	59
Şekil 4.3: Bir noddan çoklu sürgün rejenerasyonu (2,4-D + BAP) .....	60
Şekil 4.4: Ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği (IAA + BAP) .....	63
Şekil 4.5: Bir noddan çoklu sürgün rejenerasyonu (IAA + BAP) .....	63
Şekil 4.6: Ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği (IAA + Kn) .....	66
Şekil 4.7: Sürgünlerin genel görünüşü (IAA + Kinetin) .....	67
Şekil 4.8: Ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği (2,4-D + BAP) .....	69
Şekil 4.9: Ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği (IAA + BAP) .....	71
Şekil 4.10: Ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği (IAA + Kn) .....	73
Şekil 4.11: MS49 besi ortamındaki sürgünlerin görünümü .....	74
Şekil 4.12: Seçilen besi ortamlarındaki ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği .....	76
Şekil 4.13: Seçilen besi ortamlarındaki ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği .....	78
Şekil 4.14: IAA destekli ortamlardaki ortalama kök uzunluklarının çizgi grafiği ..	81
Şekil 4.15: IAA ortamlarında rejenere olmuş köklerin karşılaştırmalı görünümü ..	81
Şekil 4.16: IBA destekli ortamlardaki ortalama kök uzunluklarının çizgi grafiği ..	84
Şekil 4.17: IBA ortamında rejenere olmuş köklerin karşılaştırmalı görünümü ....	84

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1: Bitki doku kültürü araştırmalarının tarihsel gelişiminde önemli olaylar .....	4
Tablo 1.2: Kanada'daki toplam tütün üretiminde Delgold'un yeri .....	7
Tablo 1.3: Bitki doku kültürlerinde kullanılan temel besi ortamları ve ortamların bileşenleri .....	16
Tablo 1.4: Farklı çevre şartlarının çeşitli evrlerde kültürler üzerine etkileri .....	21
Tablo 1.5: Tehlike sınıflarındaki bitki taksonlarının dünyadaki durumu .....	25
Tablo 1.6: Herhangi bir tehlike sınıfında yer alan taksonların başlıca bitki gruplarına göre dağılımı .....	26
Tablo 1.7: Türkiye florasında bir tehlike sınıfına dahil olan takson sayıları .....	26
Tablo 2.1: <i>A. orientalis</i> 'ten izole edilen 6 yeni flavonoid glikozit .....	30
Tablo 2.2: <i>A. orientalis</i> 'in alkaloid içeriği .....	31
Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler .....	39
Tablo 3.2: MS besi ortamının içeriği .....	40
Tablo 3.3: Sürgün gelişiminde kullanılan besi ortamları .....	42
Tablo 3.4: Köklendirmede kullanılan besi ortamları .....	44
Tablo 3.5: Sıvı hacmine göre otoklav süreleri .....	45
Tablo 3.6: Eksplantların yüzey sterilizasyonu için denenen çeşitli uygulamalar ..	47
Tablo 3.7: Işıklandırma kademelerine göre aktif floresan lamba sayıları .....	48
Tablo 4.1: Gövde eksplantlarında sterilizasyon denemeleri ve başarıları .....	56
Tablo 4.2: 2,4-D + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	58
Tablo 4.3: IAA + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	62
Tablo 4.4: IAA + Kinetin kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	65
Tablo 4.5: 2,4-D + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	68
Tablo 4.6: IAA + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	70
Tablo 4.7: IAA + Kinetin kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	72
Tablo 4.8: Seçilen besi ortamlarının ortalama sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	75
Tablo 4.9: Seçilen besi ortamlarının ortalama kallus ağırlığı ve yapısı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	77
Tablo 4.10: Farklı IAA konsantrasyonlarının ortalama kök uzunluğu ve kök sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	80
Tablo 4.11: Farklı IBA konsantrasyonlarının ortalama kök uzunluğu ve kök sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular .....	83



## SİMGELER

$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ g	: Mikrogram
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
cm	: Santimetre
g	: Gram
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
mM	: Milimolar
$\mu$ M	: Mikromolar
l	: Litre
Ppm	: Milyonda bir parça (Parts per million)
lx	: Lüks

## KISALTMALAR

2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
BAP	: 6-Benzilaminopürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GA	: Giberellik asit
HCl	: Hidrojen klorür
IAA	: İndol-3-asetik asit
IBA	: İndol-3-bütirik asit
Kn	: Kinetin
NAA	: 1-Naftalenasetik asit
MS	: Murashige ve Skoog besi ortamı
UV	: Ultra Viyole

**FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ BİTKİ BÜYÜME  
DÜZENLEYİCİLERİNİN *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)'İN DOKU  
KÜLTÜRÜ İLE ÇOĞALTILMASINA OLAN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Arda ACEMİ**

**Anahtar Kelimeler:** *Amsonia orientalis*, Doku Kültürü, *In vitro* Rejenerasyon, Bitki Büyüme Düzenleyicileri, Klonal Çoğaltım

**Özet:** Ülkemizde yaklaşık 9000 adet bitki taksonu bulunmaktadır. Bu taksonların yaklaşık 3000 tanesi endemiktir. Ülkemizde bulunan taksonlardan 4600 tanesi bir tehlike sınıfında bulunmaktadır. Başka bir deyişle ülkemiz florasını oluşturan türlerin neredeyse yarısı koruma önlemi gerektirmektedir.

Bu çalışmada Avrupa ve Türkiye ölçeğinde tükenmekte tehlikesinde olan ve CR (Çok Tehlikede) kategorisinde yer alan aynı zamanda Avrupa Konseyi, Bern Sözleşmesine göre “Florada Kesinlikle Korunması Gereken Türler” listesinde bildirilmiş olan Apocynaceae (Zakkumgiller) familyasına mensup *Amsonia orientalis* Decne. (syn. *Rhazya orientalis*) bitkisinin *in vitro* çoğaltımında farklı konsantrasyonlarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri araştırıldı. Olgun bitkilerden alınan nodal eksplantlar yüzey sterilizasyonundan sonra 2,4-D + BAP, IAA + BAP ve IAA + Kinetin ile desteklenmiş besi ortamlarında kültüre alındı. Koltukaltı tomurcuklarından rejeneren sürgünlerin boy uzunlukları ölçüldü. En uzun ortalama sürgün boyu 0,5 mg/l IAA + 1,5 mg/l BAP ortamında 4,38 cm olarak ölçüldü. Sürgünler en iyi büyüme gösterdikleri ortamlarda alt kültürlere alındı. Bu aşamada farklı BAP konsantrasyonlarının etkisi de denendi. Alt kültürlerde en uzun ortalama sürgün boyu 0,5 mg/l BAP ortamında 3,24 cm olarak ölçüldü. Eksplantlardan oluşan kalluslar eksplanttan ayrılarak tartıldı. IAA veya IBA ile desteklenmiş besi ortamlarında yapılan köklendirme denemelerinde ise ortalama en uzun kök 0,5 IAA MS ortamında 2,80 cm, 0,5 IBA ortamında ise 2,28 cm olarak belirlendi. Ayrıca ½MS ortamında en yüksek ortalama kök uzunluğu 2,64 cm olarak ölçüldü. Bu çalışma ile ilk defa olgun *A. orientalis* bitkisinden alınan nodal eksplantlar kullanılarak bu bitki için etkin ve hızlı bir rejenerasyon protokolü geliştirildi.

Literatürde *A. orientalis* üzerinde *in vitro* çoğaltımında farklı konsantrasyonlarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin incelenmesi ve ayrıca bitkinin yüksek miktarda çoğaltılması amaçlarını taşıyan bir çalışma daha önce yapılmadığından, mevcut çalışma öncü niteliğindedir.

# THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS ON PROPAGATION OF *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae) BY TISSUE CULTURE

Arda ACEMİ

**Key Words:** *Amsonia orientalis*, Tissue Culture, *In vitro* Regeneration, Plant Growth Regulators, Clonal Propagation

**Abstract:** There are about 9000 pieces of plant taxa in our country. About 3000 of them are endemics and about 4600 of them are in one of risk classes. In other words, almost half of the species that make up the flora of our country require a measure of conservation.

In present study, the effects of plant growth regulators used at different concentrations on *in vitro* propagation of the plant *Amsonia orientalis* Decne. (syn. *Rhazya orientalis*) which is the member of Apocynaceae (dogbane) family and shown in the category of “critically endangered” (CR) and, as per the Bern Convention, placed by the European Council in the list of the plant species that must be conserved on European scale was investigated. Nodal explants which are taken from mature plant were cultured in MS media which are supplemented by 2,4-D + BAP, IAA + BAP and IAA + Kinetin after surface sterilisation. Lengths of shoots which are proliferated from axillary buds were measured. The longest mean shoot length of 4,38 cm was measured from the medium which is supplemented with 0,5 mg/l IAA + 1,5 mg/l BAP. Shoots were subcultured in media which promoted shoot lengths most. At this stage the effects of different BAP concentrations were also examined. The longest mean shoot length of 3,24 cm was measured from the subculture medium which is supplemented with 0,5 mg/l BAP. Calli which are derived from mature nodal explants were scaled. In rooting experiments which are conducted in MS media supplemented with IAA or IBA, the longest mean root lengths of 2,80 cm and 2,28 cm in media which are supplemented with 0,5 mg/l IAA and 0,5 mg/l IBA were determined respectively. Moreover, the longest mean root length of 2,64 cm was measured from the ½MS basal medium. Through this study an effective and rapid regeneration protocol for *A. orientalis* was developed for the first time by using nodal explants taken from mature plants.

Because of the absence of any study which is intended to investigate the effects of plant growth regulators used at different concentrations on *in vitro* propagation and mass propagation of the plant *A. orientalis* in literature, the present study has a pioneer feature.

## 1. GİRİŞ

İzole edilmiş ilk bitki hücrelerinin Haberlandt tarafından 1902’de kültürünün yapılmasından 2 yıl sonra, 1904’de Hanning olgunlaşmış embriyoları kültüre almayı başarmıştır. Bu gelişmelerin ardından 1917’de Biyoteknoloji terimi ilk defa Karl Ereky tarafından kullanılmıştır. Bu süreci takiben bu çok disiplinli bilim dalı ivme kazanmış ve günümüzde oldukça ileri bir düzeye erişmiştir. Biyoteknoloji; Birleşik Devletler Teknoloji Değerlendirme Ofisi Kongresi’nde “bir ürün yapmak veya değiştirmek, bitkileri veya hayvanları ıslah etmek ya da belirli kullanımlar için mikro-organizmalar geliştirmekte canlı organizmaları veya bu organizmalardan elde edilen maddeleri kullanan herhangi bir teknik” olarak tanımlanmıştır (Watanabe ve diğ., 1997). Bitki doku kültürü ise bitki genetik mühendisliği ile birlikte bitki biyoteknolojisini oluşturan ana unsurlardan birisidir (Babaoğlu ve diğ., 2001).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında (besiyerinde), bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir (Babaoğlu ve diğ., 2001). Bu nedenle yöntemin diğer isimleri “Mikro üretim” veya “Aseptik kültür” dır (Gönülşen, 1987). Bitki doku kültürü, genetik olarak aynı ve çok sayıda bitkinin *in vitro* üretimi için artık kanıtlanmış bir teknolojidir. (Aitken-Christie ve diğ., 1995). Bitkilerin yapay besi ortamlarında nispeten küçük parçalar, kimi zaman hücreler halinde kültüre alınmaları ve bu kısımların tüm bitkiyi meydana getirme yeteneği doku kültürünün temel dayanağı olan totipotensiden kaynaklanmaktadır. Totipotent hücre yeni bir bitki oluşturabilecek özelliğe sahip bir hücredir. Birçok bitkide bir organın izole edilmesi veya çelik alınması totipotent hücrelerin aktif hale geçmelerini sağlar. Diğer bazı bitkilerde ise bunun gerçekleşmesi için birtakım hormonal stimulantların yetiştirme ortamına ilavesi gereklidir (Gönülşen, 1987). Doku kültürü teknolojisi, haploid bitki üretimi, germplasm muhafazası, yeni bitki varyetelerinin çoğaltımı, nadir ve tehlike altındaki bitkilerin korunması, çoğaltımı zor olan bitkilerin üretilmesi, sekonder metabolit eldesi ve transgenik bitkilerin üretimi için kullanılmaktadır (Ahloowalia ve diğ., 2004).

Dünyanın biyolojik çeşitliliği eşi benzeri görülmemiş bir oranda azalmaktadır. 1996-2004 dönemi boyunca, toplam 8321 bitki türü “IUCN (Doğa ve Doğal Kaynakların Korunması için Uluslararası Birlik) Tehdit Altındaki Türlerin Kırmızı Listesi” ne eklenmiştir (URL 1). Bu dönemde, çok tehlike altında (CR) olarak kaydedilen bitkilerin sayısında % 60'ın üzerinde bir artış olmuştur. Bu durum tehlike altındaki türlerin sayılarının hızla çoğalması bakımından araştırmacılara uyarı vermektedir ve bu türlerin korunması için acil koruma önlemleri gereklidir (Sarasan ve diğ., 2006). Tüm ender bitkiler tehlikede olmasına rağmen, en çok tehlike altındaki bitkiler neredeyse her zaman ender olanlardır. Bu enderlik durumunu belirleyen faktörler çoğunlukla antropojenik faaliyetler ve iklim değişiklikleri, tohum kaybı ve dölllenme başarısızlığı gibi çeşitli çevresel olaylardır (Holobiuc, 2004).

Tehlike altındaki çok sayıda bitkinin çoğaltımında *in vitro* tekniklerin yararlı olduğu bulunmuştur (AmoMarco ve diğ., 1996; Dhar ve diğ., 2000). Bu tekniklerin kullanımıyla Birleşik Krallık’da bulunan Kraliyet Botanik Bahçeleri (Royal Botanic Gardens) mikroçoğaltım ünitesi, 30 yılı aşkın süre içerisinde dünya üzerindeki 3000 den fazla bitki taksonunun çoğaltımına katkıda bulunmuştur. *In vitro* teknikler kullanarak tehlike altındaki bitkileri korumaya yönelik çalışmaları olan araştırma merkezlerini örneklerle çoğaltmak mümkündür. Avustralya, Perth’deki Kral Parkı & Botanik Bahçesi’ndeki laboratuvar (URL 2), Batı Avustralya’nın tehlike altındaki florasını korumakta uzmanlaşmış ve Avustralya bitkilerinden 33 familyayı temsilen 200 den fazla tür için mikroçoğaltım teknikleri geliştirmiştir. Yine, Avustralya, Güney Galler’deki Mount Annan Botanik Bahçeleri (URL 3), tehlike altındaki 17 *Grevillea* türünün mikroçoğaltımını yapmıştır. Birleşik Krallık’ta, Abertay Üniversitesi’ndeki Bitki Koruma Araştırma Grubu, İskoç yerel bitkilerini (URL 4) korumak için mikroçoğaltım ve diğer geleneksel üretim yöntemlerini uygulamaktadır. Amerika, Ohio’daki Cincinatti Hayvanat ve Botanik Bahçesi’nde (URL 5) farklı 8 enstitü ile iş birliği içinde, tehlike altındaki 30 farklı Amerikan bitkisinin *in vitro* korunması araştırılmıştır. Hindistan, Kerala’daki Tropikal Botanik Bahçeleri ve Araştırma Enstitüsü (URL 6) ise 46 tıbbi bitki ve 30 orkidenin *in vitro* korunması üzerine çalışmıştır. Son zamanlarda Şili, Punta Arenas’daki Macellan Üniversitesi’nde tropikal biryofitlerin *in vitro* korunması için bir laboratuvar kurulmuş ve çalışmalarına başlamıştır (Sarasan ve ark., 2006).

Ülkemizdeki çeşitli üniversitelerin biyoloji, biyoteknoloji ve tarla bitkileri gibi bölümlerinde, TÜBİTAK-MAM ve Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı araştırma enstitülerinde *in vitro* bitki koruma çalışmaları ve diğer doku kültürü uygulamaları için laboratuvarlar bulunmaktadır. Bu amaçla kurulmuş laboratuvarlardan biri olan Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ndeki Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı ise 2010 yılı başından bu yana *in vitro* bitki koruma çalışmalarına devam etmektedir.

Türkiye 9000 civarında eğrelti ve tohumlu bitki türü ile dünyada bulunduğu ılıman iklim kuşağında oldukça zengin floraya sahip ülkelerden biridir. Avrupa kıta florasının 12000'e yakın türe sahip olduğu ve kıta'nın ülkemizin yaklaşık 15 katı büyüklükte olduğu, yurdumuzun floristik açıdan zenginliğini gözler önüne sermektedir. Avrupa ülkelerindeki endemik türlerin toplamı 2750 kadar iken yurdumuzda bu sayı 3000 civarındadır (Ekim ve ark., 2000). Ülkemiz bitki örtüsünün nadir ve endemik bitkiler yönünden zenginliği ve bu bitki örtüsünün erozyon, çarpık kentleşme ve düzensiz sanayileşme gibi etmenler nedeniyle hızla tahrip olduğu gerçeği düşünüldüğünde bu gibi çalışmaları yürüten laboratuvarların sayıca artırılması ve niteliklerinin yükseltilmesi faydalı görülmektedir.

### **1.1. Bitki Doku Kültürünün Tarihçesi**

Bitki doku kültürünün tarihsel temeli 1838 yılında, Schwann ve Schleiden'in her bir hücrenin tüm bitkiyi meydana getirebilecek özerk bir yapıda olduğunu belirttikleri Totipotensi Teorisi'ni öne sürmeleri ile atılır. Heberlandt, 1902 yılında, izole edilmiş bitki hücrelerini kültüre alma çalışmaları yapmış fakat başarılı olamamıştır. White, 1934 yılında, *Lycopersicon esculentum*'da ilk defa kalıcı kök ve meristem kültürlerini geliştirmiş, aynı yıl Gautheret ve Nobecourt *Daucus carota*'da ilk defa kalıcı kallus kültürünü başlatmıştır (Pierik, 1997). Gautheret, 1934 yılında yaptığı çalışmada kullandığı besi ortamlarına IAA (İndol-3-asetik asit) ve çeşitli vitaminler ekleyerek *Salix* kalluslarının kültür periyodunu 18 aya kadar uzatmayı ve dokuyu aseptik olarak alt kültüre almayı başarmıştır. 1942'ye gelindiğinde ise Gautheret ilk defa *Daucus carota*'nın kallus kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretimini gözlemlemiştir. Heberlandt'ın 1902'de ilk bitki doku kültürü denemelerinden sonra

peşpeşe gelen yıllarda olgun embriyoların kültüre alınması, oksinin tanımlanması, kök ve sürgün uçlarının laboratuvarında çoğaltımı ve ilk kallus kültürlerinin başlatılması gibi gelişmeler 1995 yılına gelindiğinde insanlar için ilk rekombinant gıdanın üretimine kadar varmıştır. Son 20 yıl boyunca *in vitro* kültür teknikleri yoğun bir şekilde gelişmiş ve 1000 den fazla farklı türe uygulanmıştır (Bigot, 1987).

Tablo 1.1: Bitki doku kültürü araştırmalarının tarihsel gelişiminde önemli olaylar (Pierik, 1997; Babaoğlu ve diğ., 2001)

Tarih	Çalışmalar	Araştırmacılar
1838	Totipotensi Teori	Schwann & Schleiden
1892	Bitkilerin kutupsal olarak dağılan ve organı oluşturan maddeler sentezlemesi	Sachs
1902	Bitki doku kültüründe ilk adım: izole hücre kültürü (başarısız)	Heberlandt
1904	Çeşitli Cruciferae üyelerinin embriyo kültüründe ilk adım	Hannig
1909	Bitki protoplastlarının füzyonu (başarısız)	Kuster
1922	Orkide tohumlarının <i>in vitro</i> asimbiyotik çimlendirilmesi / Kök uçlarının <i>in vitro</i> kültürü	Knudson / Robbins
1925	<i>Linum</i> hibridlerine embriyo kültürü	Laibach
1929	<i>Linum</i> 'da çaprazlama uyumsuzluğunu gidermek için embriyo kültürü	Laibach
1934	<i>In vitro</i> kambiyum kültürü / Domates kökü kültürü	Gautheret / White
1936	Çeşitli açık tohumlu bitkilerin embriyo kültürü	LaRue
1939	Sürekli kallus kültürleri	Gautheret, Nobercourt, White
1940	<i>Ulmus</i> kambiyal dokuda <i>in vitro</i> adventif sürgün oluşumu	Gautheret
1941	<i>Datura</i> embriyo kültüründe hindistan cevizi sütünün ilk defa kullanılması	van Overbeek
1944	Adventif sürgün oluşumu için ilk defa tütünün <i>in vitro</i> kültürü	Skoog
1945	<i>Asparagus</i> gövde uçlarının ilk defa <i>in vitro</i> kültürü	Loo
1946	İlk defa <i>Lupinus</i> ve <i>Tropaeolum</i> 'da sürgün ucu kültüründen tam bitki eldesi	Ball
1948	Tütünde adventif sürgün ve kök oluşumunun oksin / adenin oranı ile belirlenmesi	Skoog & Tsui
1950	<i>Sequoia sempervirens</i> kallus dokularından organ rejenerasyonu	Ball
1952	Meristem kültürü ile hastalısız <i>Dahlia</i> üretimi / İlk mikro-aşılama	Morel & Martin
1953	Polenden üretilen haploid <i>Ginkgo biloba</i> kallusu	Tulecke
1954	Mısır endosperm kültürlerinde kromozom davranışında ve karyolojide değişimler	Strauss
1955	Kinetin'in keşfi	Miller ve diğ.
1956	Sekonder ürünlerin eldesi için süspansiyon kültürlerinin kurulması	Tulecke & Nickell
1957	Oksin / sitokin oranının organ oluşumuna etkileri	Skoog & Miller

Tablo 1.1 (Devam): Bitki doku kültürü araştırmalarının tarihsel gelişiminde önemli olaylar

Tarih	Çalışmalar	Araştırmacılar
1958	<i>Citrus ovules</i> nusellusundan somatik embriyo rejenerasyonu	Maheshwari & Rangaswamy
1958	Havuç kallus ve hücre kültürlerinde pro-embriyo rejenerasyonu	Reinert, Steward
1959	İlk bitki doku kültürü kitabı	Gautheret
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS besin ortamının geliştirilmesi	Murashige & Skoog
1964	<i>Populus tremuloides</i> kallus dokusundan kök ve sürgün gelişimi	Mathes
1965	Tek hücreden tütün bitkisinin rejenerasyonu	Vasil & Hildebrandt
1967	Anter polen kültürüyle ilk haploid tütünün üretimi	Bourgin & Nitsch
1968	B5 besin ortamının geliştirilmesi	Gamborg
1969	<i>Hapopappus gracilis</i> süspansiyon kültürden ilk başarılı protoplast izolasyonu	Eriksson & Jonassen
1970	HEPA filtrelerin kullanılmaya başlanması	
1970	<i>In vitro</i> biyolojik mutantların seçilimi / Başarılı ilk protoplast füzyonu	Carlson / Power ve diğ.
1971	Protoplasttan ilk bitkinin rejenerasyonu	Takabe ve diğ.
1972	Protoplast füzyonuyla türlerarası ilk melezleme (tütün)	Carlson
1973	Sitokininin dormansiyi kırmada başarılı olması	Murashige ve diğ.
1974	Sitokininle aksiller dallanmanın uyarılması / Protoplasttan haploid petunya eldesi	Murashige ve diğ. / Binding
1974	Bitki doku kültürlerinde transformasyon	Reinhard
1975	<i>Helminthosporium maydis</i> 'e dirençli mısır kallus kültürlerinin pozitif seçilimi	Gengenbach & Green
1976	Dondurulmuş karanfil sürgün ucundan sürgün oluşumunun uyarılması	Seibert

## 1.2. Bitki Doku Kültürünün Kullanım Alanları

Bitki doku kültürü teknolojisi genel anlamda; haploid bitki üretimi, germplazm muhafazası, yeni bitki varyetelerinin üretilmesi, nadir ve tükenmekte olan bitkilerin korunması, çoğaltılması güç olan bitkilerin çoğaltılması, sekonder metabolitlerin üretilmesi ve transgenik bitki eldesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Ahloowalia ve diğ., 2004). Bitki doku kültürü doğrudan ticari uygulamaların yanı sıra hücre biyolojisi, genetik ve biyokimyadaki temel araştırmalarda da oldukça değerlidir. Hücre, anter, ovül ve embriyo kültürleri, protoplast izolasyonu ve füzyonu, hücre seçimi, meristem ve tomurcuk kültürü gibi bitki doku kültürü teknikleri deneysel çalışmalar ve ticari uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Bu teknikler;

- meristem ve sürgün kültürleri kullanarak genetik ve morfolojik olarak birbiriyle aynı bitkilerin yüksek miktarda mikroçoğaltımı



- üstün (avantajlı) karakterlerin belirlenmesi için bitkiler yerine hücreleri tarama programları
- sekonder ürün kaynağı olarak bitki hücrelerinin sıvı kültür ortamlarında yüksek miktarda üretilmesi
- protoplast füzyonu ile uzak akraba türlerin çaprazlanması ile yeni melezlerin üretilmesi
- ıslah programlarında homozigot hatların eldesi için haploid kültürlerden dihaploid bitkilerin üretilmesi, transgenik bitkilerin eldesi ve hastalıksız bitki üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Harisha, 2007).

### 1.2.1. Tarımsal ıslah uygulamalarında bitki doku kültürü

Çoğu zaman bitki doku kültürü sadece mikroçoğaltım olarak ele alınsa da bitki ıslahındaki rolü oldukça önem taşımaktadır. Günümüzde, tuzluluğa dirençli domates hatları, dona dayanıklı tütün bitkileri, herbisitlere dirençli tarımsal ürünler ve çeşitli patojenlere karşı direnci artırılmış bitkiler doku kültürü teknolojisiyle üretilmektedir. Dirençlilik için seçim mutantların ayırt edilmesi için en kolay yoldur. Dolayısıyla, büyük bir hücre popülasyondaki dirençli hücreler, bir inhibitörün ortamda bulunması halinde, dirençli olmayan hücrelerden gelişimlerini devam ettirebilme kabiliyetlerine göre ayırt edilebilirler (Gonzales ve Widholm, 1987). Islah uygulamalarında zigot oluşumundan sonra (post-zigotik) uyuşmazlıklar *in vivo* melezlemelerde embriyo oluşumunu veya oluşan embriyoların yaşamalarını engellemektedir. Bu güçlüğü giderilmesi, söz konusu embriyoların özel besin ortamlarında geliştirilmesi ve *in vitro* melez bitkiler elde edilmesiyle mümkün olmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2001).

1980'lerde tek bir hücrenin tüm bir bitkiyi oluşturulabilme kabiliyeti transgenik yöntemlerin gelişmesinin ve tarımsal biyoteknoloji endüstrisinin başlangıç noktası olmuştur. 2006 yılında, bir önceki yıla göre biyoteknoloji mahsulü ürünlerin ekim alanı 90 milyon hektardan 102 milyon hektara ulaşmıştır. Bu artış, biyoteknolojik ürünlerin ticarileşmesinin ilk 11 yılındaki büyümeden yaklaşık 60 kat daha fazladır (Davey ve Anthony, 2010). 1990 ve 1994 yılları arasında Kanada'daki toplam tütün üretiminde protoplast füzyonu yolu ile üretilen tütün kültürü Delgold'un sürekli

artan miktarı biyoteknolojik ürünlerin bu gelişim sürecindeki ivmesini göstermesi bakımından önemlidir (Brown ve Thorpe, 1995).

Tablo 1.2: Kanada'daki toplam tütün üretiminde Delgold'un yeri (Brown ve Thorpe, 1995)

Yıl	Toplam Tütün Mahsulü		Delgold	
	Üretim Miktarı (ton)	Değeri (\$)	Toplam Üretimdeki Yüzdesi (%)	Değeri (\$)
1990	56000000	175000000	1	1750000
1991	70000000	212000000	23	48760000
1992	59000000	190000000	33	62700000
1993	71000000	224000000	35	78400000
1994	59000000	197000000	41	80770000

Bitki doku kültürünün ıslah uygulamalarındaki diğer bir kullanım alanı germplazm muhafazasıdır. Tohum bankalarına ve özellikle klonal olarak çoğaltılmış ekinlerin tarla koleksiyonlarına bir alternatif olarak germplazm muhafazasının bir yolu da yavaş büyüme şartları altında (düşük sıcaklıkta ve/veya besi ortamına büyüme geciktiricilerin ilavesiyle) *in vitro* depolanması veya kriyoprezervasyondur (Harry ve Thorpe, 1991; Villalobos ve Engelmann, 1995).

### 1.2.2. Islah dışı uygulamalarda bitki doku kültürü

Vejetatif olarak çoğaltılmış bitkiler genellikle patojenlerle enfekte olmuşlardır. Örneğin çilek bitkileri 60 dan fazla virüse ve mikoplazmaya karşı duyarlıdır (Boxus, 1976). Tüm bu patojenlerin bitkideki dağılımı aynı değildir. Apikal meristemlerde bu tip virüslere rastlanması nadirdir veya bunlar virüs bulundurmazlar (Wang ve Charles, 1991). Apikal meristemin çıkarılıp kültüre alınması ve termo- veya kemoterapiyle desteklenmesi, mikroçoğaltım için virüssüz ve genel olarak patojensiz materyal üretimi için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Kantha, 1981; Bhojwani ve Razdan, 1983; Wang ve Charles, 1991; Singh, 1992).

Günümüzde mikroçoğaltım en fazla uygulanan bitki doku kültürü tekniğidir (Brown ve Thorpe, 1995). Mikroçoğaltım, organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemidir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Bitki doku kültürünün diğer bir uygulama alanı ise sentetik tohum üretimidir. Bir sentetik veya suni tohum bir kaplama materyali içerisinde enkapsüle edilmiş şekilde bulunan somatik embriyodur ve bu yapı zigotik tohuma eşdeğerdir (Redenbaugh, 1993).

Sekonder metabolitlerin yüksek miktarlarda üretimi bitki doku kültürü ile mümkün olmaktadır. Bu moleküller bitkilerde haberleşme ve savunma mekanizmalarında etkili olabilirler (Wink, 2000). Bitki için önemlerinin yanısıra insanlar için besinlerde, tat, koku ve aroma kalitesinde, çiçek renginde, süs bitkilerinin kokusunda da önemlidirler (Rachel ve diğ., 2007). Kimi sekonder metabolitler ilaç, boya ve insektisit yapımında da kullanılmaktadırlar (Verpoorte ve Memelink, 2002). Sekonder metabolit eldesi için *in vitro* hücre ve kallus kültürlerinden yararlanılmaktadır.

### **1.2.3. Nesli tükenmekte olan bitkilerin çoğaltımında doku kültürü**

Türlerin korunması doğal habitatların ve yabancı populasyonların yönetimi ile gerçekleştirilmesine karşın (*in situ* koruma) *ex situ* koruma yöntemleri bunların tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Bazı durumlarda bazı türler için *ex situ* koruma tek seçenektir (Maunder ve diğ., 1998; Ramsay ve diğ., 2000). *In situ* koruma, ilgili germplazmın doğal olarak olduğu herhangi bir habitatta; sadece doğal habitatlar değil, çiftliklerde, bahçelerde ve diğer insan yapımı habitatlarda da korunması olarak kabul edilir. *Ex situ* koruma ise germplazmın; sadece tohum koleksiyonları ve sadece *in vitro* koleksiyonlar değil, aynı zamanda inatçı tohum (çimlenme gücü düşük) üreten türlerin ve botanik bahçelerindeki canlı koleksiyonların da doğal habitatı dışında sürdürülmesini ifade eder (Callow ve diğ., 1997). Aşırı toplama, uygunsuz tarım ve ormancılık, kentleşme, kirlilik, habitat tahribatı, istilacı türlerin yayılışı ve iklim değişikliği gibi çeşitli faktörlerin biraraya gelmesiyle bitki türlerinin nesilleri tükenmektedir (Pitman ve Jorgensen, 2002). Değerli genetik kaynaklarının yitirilmesine duyulan küresel boyuttaki endişe, bitki genetik kaynaklarının korunması için yeni birçok programın artmasına neden olmuştur (Paunescu, 2008). Özellikle *in vitro* kültür teknikleri, moleküler biyoloji ve

biyoteknoloji alanında gelişmeler, bitki genetik kaynaklarının korunması ve yönetimi için bazı önemli araçları sağlamaktadır. Geniş germplazm koleksiyonların kurulmasıyla birlikte çoğunlukla vejetatif olarak çoğaltılan ve inatçı tohum üreten türler için çeşitli *in vitro* teknikler geliştirilmiştir (Zapartan ve diğ., 1994; Engelmann ve Engels, 2002; Paunescu ve Holobiuc, 2005; Sarasan ve diğ., 2006).

Koruma biyolojisinde bitki doku kültürü, son derece küçük populasyonları olan bitki türlerinin çoğaltımı yoluyla biyolojik çeşitliliği korumak için, sınırlı üreme kabiliyetleri olan türler için ve bunların geri kazanımı ile yeniden doğal habitatlarına tanıtılması için kullanılır (Kapai ve diğ., 2010). Bitkinin *in vitro* çoğaltımında başlangıç materyali olarak (eksplant kaynağı) tohumu, gövde apikal veya aksillar meristemleri, yaprak ve yaprak sapları gibi parçaları kullanılabilir. Bunların sterilizasyonları yapıp besi ortamlarına ekim veya dikimleri gerçekleştirilir. Oluşan yeni sürgünler alt kültürlerle alınarak istenilen sayıda *in vitro* sürgün oluşumu sağlanır. Elde edilen sürgünler köklendirme ortamlarına transfer edilerek sonrasında *in vitro* bitkicikler elde edilmiş olur. Bu bitkiciklerin kültür kaplarından dış ortam şartlarına alışmaları için aklimatizasyon uygulamaları yapılmaktadır. Köklendirme aşamasının son günlerinde kültür kaplarının kapaklarının açılması veya bitkiciklerin saksılara dikimi yapıldıktan sonra üzerlerinin şeffaf naylon torbalar ile kaplanması ve daha sonra bu torbaların kademeli olarak açılması gibi yöntemler ile dış ortama alıştırmaya çalışmaları yürütülür. Kapların ağzı açık olarak bir haftadan daha uzun süre kalmadıkça ortamın kontaminasyonu sorun yaratmamaktadır (Sherwood, 1994). Bu şekilde dış ortama alıştıran bitkiler daha sonra doğal habitatlarına dikilebilirler.

### **1.3. Bitki Doku Kültürünün Avantajları ve Dezavantajları**

*In vitro* çoğaltım (mikroçoğaltım) bir dizi avantajı da beraberinde getirmektedir. Bu avantajlar; 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 (Arora, 2010). Ayrıca doku kültürü teknolojisiyle bitkilerin uzun süreli stokları oluşturulabilir. Büyümenin yavaşlatılması ve alt kültürleme sıklığının artırılması ile kısa ve orta

vadede bitkinin depolanması veya muhafazası sağlanabilir. Bunun yanında -196 °C derecede (sıvı nitrojen) dondurarak koruma (kriyoprezervasyon) işlemi uygulanarak sınırsız bir zaman dilimi için bitkiler depolanabilir veya muhafaza edilebilir (Callow, 1997) Doğal habitatlarında yaşayan bitkilere kıyasla doku kültüründe çoğaltılan bitkiler daha kontrollü bir fiziksel ve kimyasal çevreye sahiptirler. Bu sayede büyüme ve gelişmenin herhangi bir safhası rahatlıkla gözlemlenebilir ve üzerinde çalışılabilir (Neumann ve diğ., 2009)

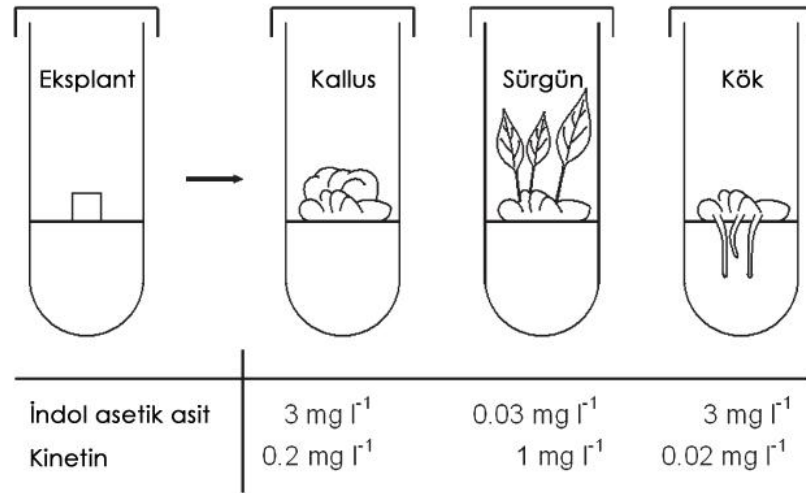
Doku kültürü sistemleri bitki materyalinin aseptik bir ortamda yüksek çoğaltım oranlarıyla üretilmesini sağlar. Ancak, *in vitro* kültür prosedürleri kullanılarak elde edilebilen yüksek çoğaltım oranları düzenli olarak büyük miktarlarda bitki materyali üretimine yol açar. Bu durum *in vitro* koleksiyonların yönetimi için büyük sorun yaratır. Buna ek olarak, kontaminasyon veya insan hatası sebebiyle materyal yitirme riski her alt kültürde mevcuttur. Daha da önemlisi, kültürlerde zamanla somaklonal varyasyon artışı ile bitki materyalinin genetik bütünlüğünü kaybetme riski mevcuttur (Scowcroft, 1984). Doku kültürü ile plastik veya cam kaplarda yetiştirilen bitkicikler yüksek nem maruz kalırlar ve fotosentetik olarak kendi kendilerine yetecek kapasitede değildirler. Genç bitkicikler dış ortamda su kaybına karşı çok hassastırlar. Bu yüzden kademeli olarak düşen nem ve artan ışık koşullarında yavaş yavaş dış ortama alıştırmaları gerekmektedir (George ve Debergh, 2008).

#### **1.4. Bitki Doku Kültürü Teknikleri**

Bitki doku kültürü teknolojisi kullanılan materyale bağlı olarak 5 sınıfa ayrılabilir.

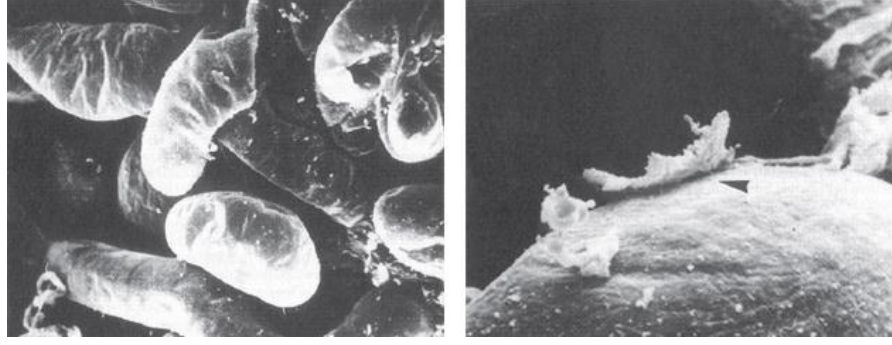
- (i) Kallus kültürü: Agarlı besiyeri üzerinde eksplantlardan üretilmiş kallus kültürü
- (ii) Hücre kültürü: Sıvı besiyerinde, genellikle çalkalamayla havalandırılan hücre kültürü.
- (iii) Protoplast kültürü: Bitki protoplastının kültüre alınmış hücrelerden veya bitki dokusundan aseptik izolasyonu ve kültürü
- (iv) Organ kültürü: Embriyoların, anterlerin, köklerin, sürgünlerin ve ovaryumların aseptik kültürü
- (v) Meristem kültürü: Apikal veya aksillar meristemlerin aseptik kültürü (Harisha, 2007).

Kallus kültürü, yarı-katı ortam üzerinde ilgili dokunun farklılaşmamış parankima hücrelerinin uyarılması ve proliferasyonu ile ilgilidir. Bu gibi kültürler 2-4 haftalık alt kültürlemeler ile uzun süre devam ettirilebilirler. Kallus, bir gövde veya kökün kesilen bir bölümünde yaraya karşı verdiği *in vitro* tepkidir. Oluşumu endojen oksin ve sitokininle kontrol edilir. Bu bitki büyüme düzenleyicilerinin besin ortamına ilavesiyle eksplantın *in vitro* kallus oluşturması sağlanır (Brown, 1990). Sonraki gelişimi ekzojen fitohormonlar veya sentetik büyüme düzenleyicileri ile kontrol edilir (Şekil 1.1) (Kreis, 2007).



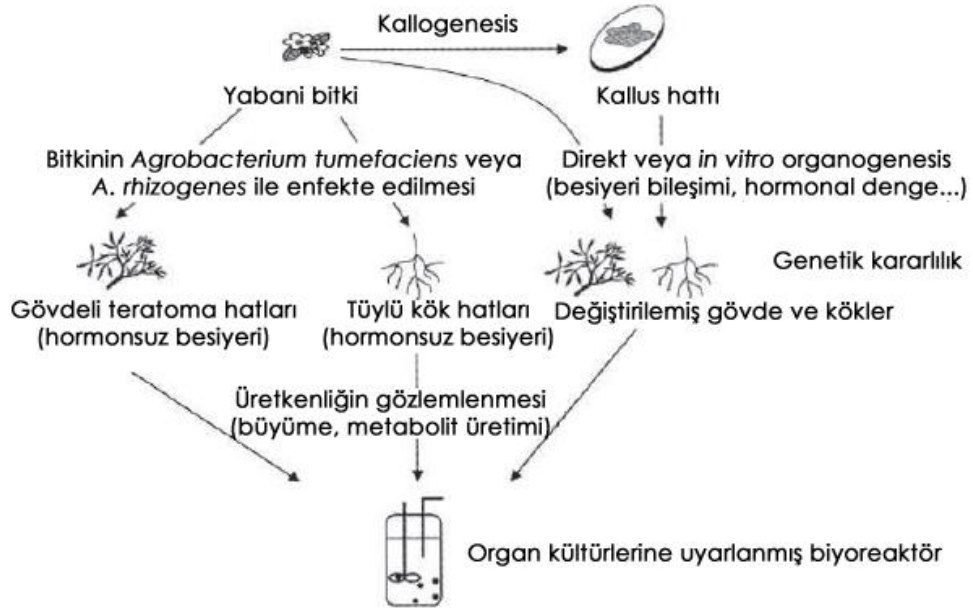
Şekil 1.1: Kallus kültürlerinin başlatılması ve ardından organogenesisin uyarılması (Kreis, 2007)

Çoğu hücre süspansiyon kültürü, mekanik etkiyle çalkalanan sıvı besiyerindeki kallus kültürlerinden meydana gelir. Kallus kültüründe bitişik hücreler aralarında plasmodesmata ile bağlantıdadırlar. İdeal bir hücre süspansiyonunda ise tüm hücreler izole edilir. Sıvı besiyeri içindeki kallus kültürleri genellikle çalkalanır ve 10-14 gün sonunda bu mekanik etkinin bir sonucu olarak eksplantın dış yüzeyinden kopan hücrelerin süspansiyon kültürlerinin gelişmeye başladığı görülür (Şekil 1.2) (Neumann, 2009).



Şekil 1.2: Kallusun gevşek dokulu üst yüzeyi (solda) ve mekanik etkiyle hücrenin kallustan ayrılması (sağda) (Neumann, 2009)

Protoplastlar mekanik parçalanma veya enzimatik çözünme ile kendilerini çevreleyen hücre duvarından izole edilebilirler. İzole protoplastlar somatik hibridizasyon ve bazı transformasyon işlemleri ile genetiği değiştirilmiş bitkiler için deneysel malzeme sağlarlar. Genel olarak fidelerden elde edilen genç yapraklar protoplastlar için eksplant kaynağı olarak kullanılırlar. Yarı-katı veya sıvı besiyerlerinde kültüre alınan protoplastların mitotik bölünmesinin başlatılması ortamın kimyasal kompozisyonuna bağlıdır (Davey ve diğ., 2010). Organ kültüründe ise anterleri veya anterlerden mikrosporları izole ederek somatik embriyogenesis ile haploid bitkiler elde edilmesi mümkündür. Ayrıca organ kültürleri hücre kültürü yoluyla sekonder metabolit üretimine ilginç bir alternatif sunarlar (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Organ kültürlerinden sekonder metabolit eldesi (Bourgau ve ark., 2001)

Genellikle tüylü kök kültürleri ve gövde kültürleri olarak iki şekilde kültürleri yapılır (Neumann, 2009). Bir mikroçoğaltım sistemi fenotipik ve genotipik olarak orijinal bitkiye benzeyen çok sayıda bitki üretebilir olmalıdır. Bu kriteri sağlayacak en uygun yöntem ise aksillar tomurcuk çoğaltımıdır. Bu tekniğin avantajı genetik olarak kararlı, tek tip bitkilerin steril şartlar altında minimum stres faktörlerine maruz kalarak üretilmesidir (Evans, 1990).

Mikroçoğaltım çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Evans (1990) bu aşamaları şöyle tanımlar;

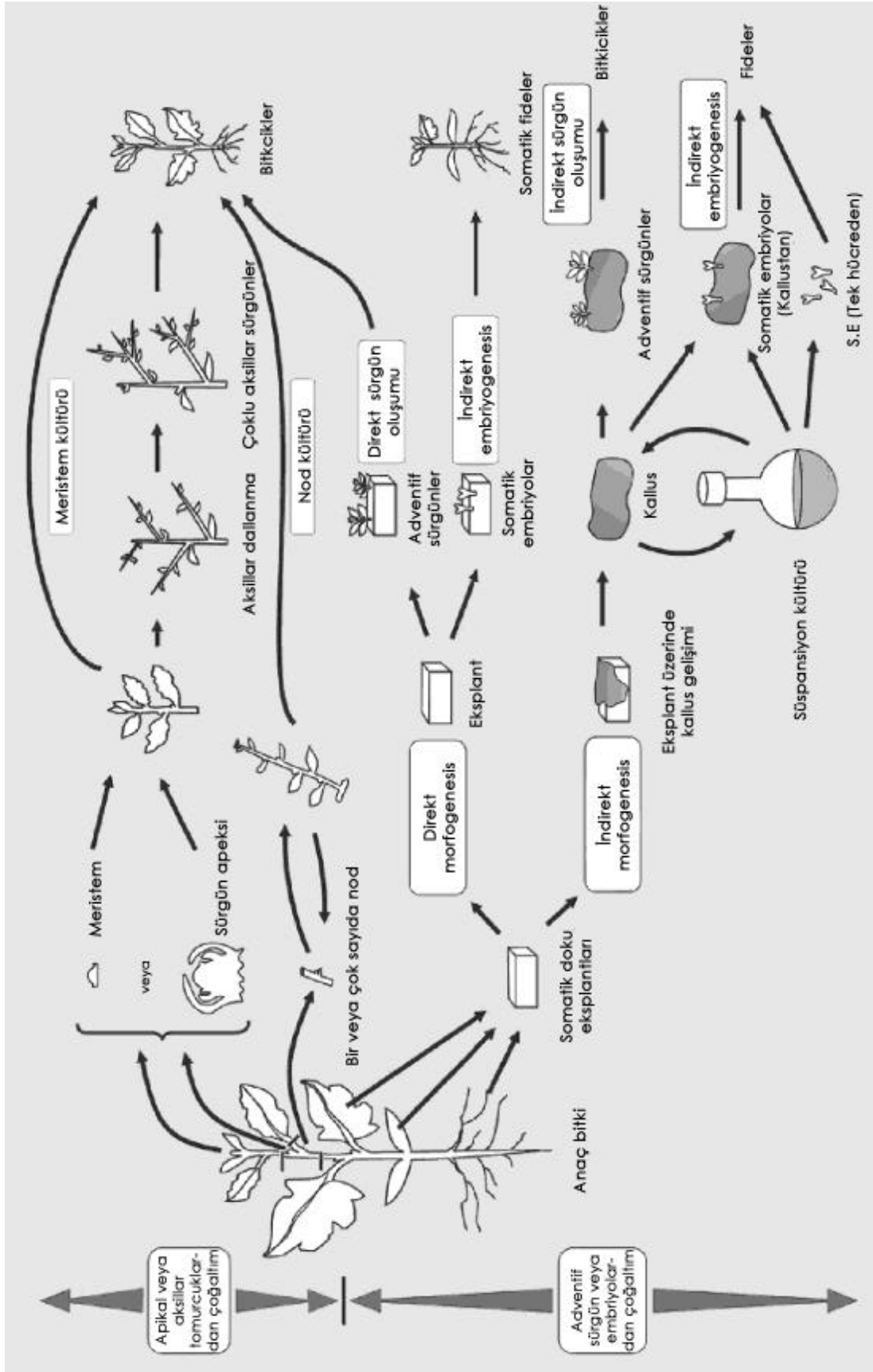
- Aşama 1: Anaç bitki seçimi ve sterilizasyonu
- Aşama 2: Aksillar tomurcukların kültürde oluşturulması
- Aşama 3: Kültürde çoğaltma (sürgün çoğaltımı)
- Aşama 4: *In vitro* bitkicikleri köklendirme ve dış ortama aktarma

Kimi araştırmacılar (Debergh ve Read, 1993; Babaoğlu ve diğ., 2001; George ve Debergh, 2008; Pierik, 2008) köklendirme ve dış ortama alıştırma işlemlerini ayrı birer aşama olarak ele almışlardır. Mikroçoğaltımın basamaklarını 5 aşama halinde incelerler. Bu aşamalar şunlardır;

- Aşama 1: Hazırlık (sterilizasyon ve anaç bitki seçimi)
- Aşama 2: Kültür başlangıcı (çoğunlukla apikal veya aksillar tomurcuklar)
- Aşama 3: Sürgün çoğaltım aşaması
- Aşama 4: Sürgün gelişimi ve köklendirme
- Aşama 5: Dış ortama alıştırma

George ve Debergh (2008), mikroçoğaltımın metodlarını şematik olarak göstermişlerdir (Şekil 1.4).





Şekil 1.4: Mikroçoğaltım metodları (George ve Debergh, 2008)

## 1.5. Bitki Doku Kùltürlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bitki doku kùltüründe besiyerinin bileşimine giren kimyasal maddelerin dışında sterilizasyonda, pH ayarlanmasında ve vitamin veya bitki büyüme düzenleyicisi stok solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar bulunmaktadır. Eksplantların sterilizasyonu için genellikle %0,5-2'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit), %70'lik EtOH (Etil alkol), HgCl<sub>2</sub> (Civa klorür) gibi kimyasallar, çalışma ortamının sterilizasyonu için ise genellikle yine %70'lik EtOH kullanılmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicisi stok solüsyonlarının hazırlanmasında stok kimyasalı çözdürmek için EtOH, NaOH ve HCl kullanılmaktadır. Ayrıca NaOH (Sodyum hidroksit) ve HCl (Hidrojen klorür) 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<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, H, C, E, M, A, D<sub>3</sub>)
- Katılaştırıcı ajanlar (agar, agaroz, aljinat, phytigel, 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) (Dixon, 1987; Babaoğlu ve diğ., 2001)

### 1.5.1. Besi ortamları (Besiyerleri)

Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen birçok besin ortamı formülasyonu bulunmaktadır. Ayrıca bazıları ihtiyaca ve bitkinin isteklerine göre modifiye edilerek kullanılmaktadır. Bunlardan en bilineni Murashige ve Skoog (1962)'un geliştirdikleri MS ortamıdır. MS ilk defa tütün bitkisi için geliştirilmiş olup yüksek tuz içeriklidir. Gamborg ve ark. (1968) B5 ortamını soya kallus kùltürleri için geliştirmişlerdir. LS ortamı ise Linsmaier ve Skoog (1965) tarafından geliştirmiştir. White 1963 yılında domates köklerinin kùltürleri için düşük tuz formülasyonlu bir ortam olan WH

besiyerini geliştirmiştir. Bu besi ortamı hem monokotiledonlar hem de dikotiledonlar için uygun olabilmektedir. Ayrıca Schenk ve Hildebrandt (1972) tarafından geliştirilen SH ve anter külürü için Nitsch tarafından geliştirilen NN ortamları da kullanılmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2001). Yaygın olarak kullanılan bu besin ortamları ve bileşenleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1.3).

Tablo 1.3: Bitki doku kültürlerinde kullanılan temel besi ortamları ve bu ortamların bileşenleri (Babaoğlu ve diğ., 2001'den değiştirildi)

Bileşenler	Besi Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg/l)					
	MS	B5	SH	LS	WH	NN
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2500	1900	80	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	1650	-	720
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	300	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	400	370	720	185
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150	200	440	-	220
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	300	-
KCl	-	-	-	-	65	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-	170	68	68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	150	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	16,5	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	200	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	10	10	16,89	-	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	-	-	-	7	25
KI	0,83	0,75	1	0,83	0,75	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3	5	6,2	1,5	10
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	2	1	10,58	3	10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,2	0,025	-	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	1	0,25	-	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,1	0,025	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	15	27,85	-	27,8
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	-	2,5	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	20	-	-	37,3
Nikotinic asit	0,5	1	5	-	-	5
Pridoksin-HCl	0,5	1	0,5	-	-	0,5
Thiamin-HCl	0,1	10	5	0,4	-	0,5
Biotin	-	-	-	-	-	0,05
Folik asit	-	-	-	-	-	0,5
myo-inositol	100	100	1000	-	-	100
l-inositol	-	-	-	100	-	-
Glisin	2	-	-	-	-	2
Sakkaroz	30 000	20 000	30 000	-	-	20 000

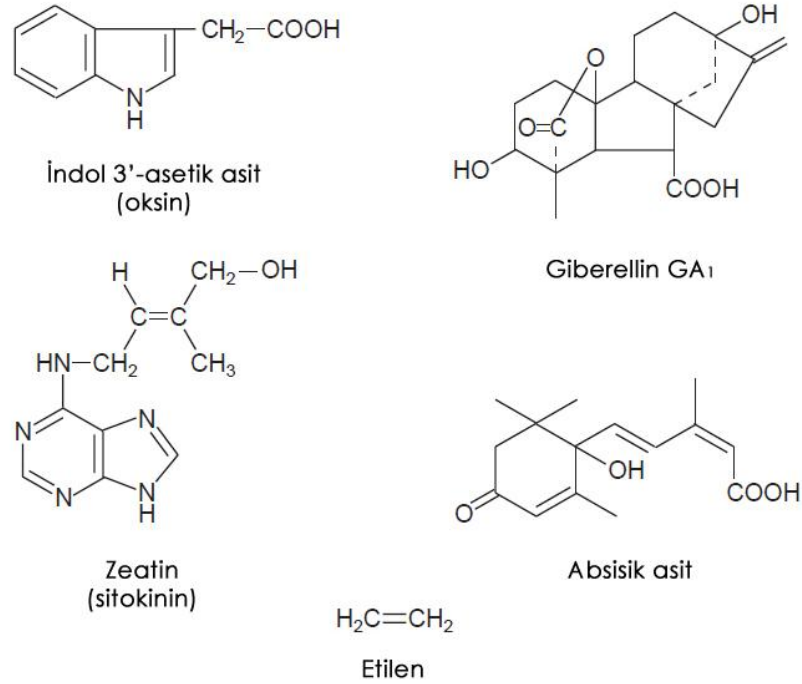
### 1.5.2. Bitki büyüme düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) bitki doku kültürü ortamlarının en önemli bileşenleridir. Bitki dokularında içinde doğal olarak oluşan bazı kimyasallar (endojen) beslenmeden ziyade büyüme ve gelişme düzenleyici role sahiptirler. Genellikle çok düşük konsantrasyonlarda aktif olan bu bileşikler, bitki hormonları veya bitki büyüme maddeleri (düzenleyicileri) olarak bilinirler (Machakova ve diğ., 2008). Bitkinin kendi yapısındaki bu maddeler “hormon” olarak isimlendirilirken bitki doku kültürü ortamlarına sonradan eklendiklerinde dışardan eklendiklerini belirtmek için “bitki büyüme düzenleyicileri” olarak isimlendirilirler (Cleland, 1999)

Bitki büyüme düzenleyicilerinin tanımlanmış beş grubu vardır. Bunlar;

- Sitokininler
- Oksinler
- Giberellinler
- Etilen
- Absisik Asit

olarak isimlendirilmişlerdir (Şekil 1.5).

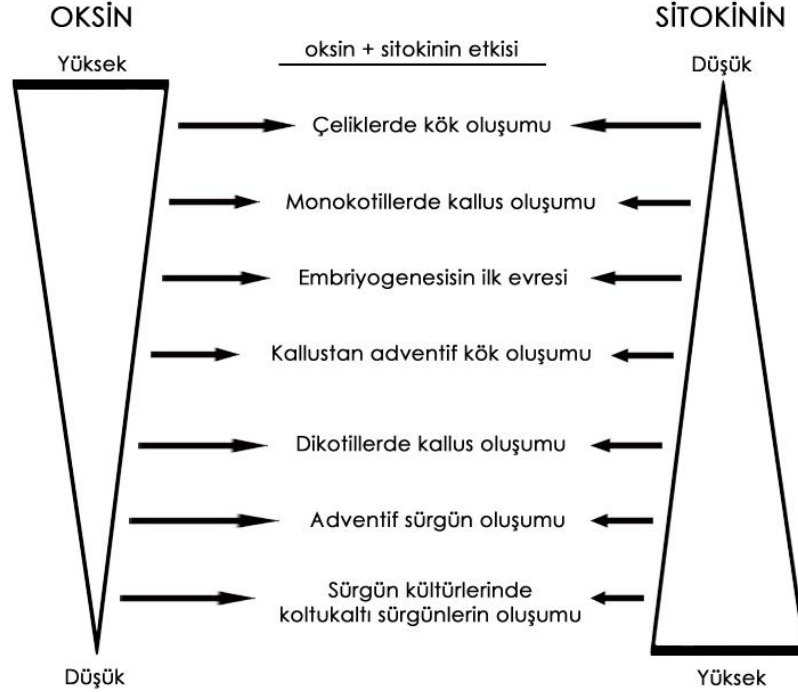


Şekil 1.5: Bazı önemli bitki hormonları (Heldt, 2005)

Oksinlerin bitkilerin büyümesinde rol oynadığı ilk defa Hollandalı bitki fizyoloğu Frits W. Went tarafından 1926 ve 1928 yılları arasında gösterilmiştir. Oksinler sürgün ve köklerin uçlarında üretilmektedirler. Bunlar yaprak, gövde ve köklerinin büyüyen hücrelerine yayılırlar. Oksinler ayrıca tropizma hareketlerinde de görev almaktadırlar (Anderson, 2011). Uygun konsantrasyonlarda, oksinler hücre duvarlarının plastisitesini (geri dönüşümsüz gerilme) artırarak genişlemesini uyarır. Oksinler meyve ve yaprak absisyonu aynı zamanda meyve olgunlaşması gibi gelişimsel süreçleri geciktirir ve lateral dallanmayı inhibe eder. Oksinler, doku kültürlerinde tek başlarında kullanıldıklarında kallus uyarımını ve elde edilen sürgünlerin köklendirilmesini sağlarlar. Geçmişte çeşitli oksinlerin doğal olarak oluştuklarına inanılmaktaydı. Günümüzde ise doğal olarak oluşan tek oksinin IAA (İndol-3-asetik asit) olduğu düşünülmektedir (Bidlack ve Jansky, 2011). Bunun yanında sentetik olarak üretilen ve bitki doku kültürü besin ortamlarında çok kullanılan 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit), IBA (indol-3-bütirik asit), NAA (naftalen asetik asit) ve Picloram (4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit) gibi oksinler de mevcuttur.

Bitki doku kültürlerinde en çok kullanılan sitokininler adenin (aminopürin) türevleridir. Sitokininler kök uçlarında ve çimlenmekte olan tohumlarda sentezlenirler. Sitokininler hücrelerin genişlemesi, dokuların farklılaşması, kloroplast gelişimi, kotiledon büyümesinin uyarılması ve yapraklarda yaşlanmanın gecikmesinde rol oynarlar (Bidlack ve Jansky, 2011). Oksinlerle birlikte doku kültürlerinde kullanıldıklarında hücre büyümelerini uyarma ve morfogenezini kontrol etme etkileri daha fazla göze çarpmaktadır. Doku kültürü besiyerlerine eklendiklerinde apikal dominansı aşarak lateral dallanmayı uyarırlar. Bu yüzden IAA'nın antagonistidirler. Etilenin etkisini giderirler ve bu yüzden senesensi geciktirirler (Heldt, 2005). Doğal olarak bulunan sitokininler şunlardır; *trans*-zeatin (4-hidroksi-3-metil *trans*-2-bütenil amino pürin), 2iP (N<sup>6</sup> -  $\Delta^2$  izopentenil adenine) ve Dihidro zeatin (6-(4-hidroksi-3-metil-*trans*-2-bütenil) amino pürin) (Staden ve diğ., 2008). Bunların yanında BAP (6-benzilaminopürin), Kn (Kinetin), Thidiazuron "TDZ" ((1-Fenil-3-(1,2,3-thidiazol-5-il) üre) ve CPPU (N-(2-kloro-4-piridil)-N'-Fenil üre) gibi sentetik sitokininler de bulunmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2001).

Oksin ve sitokininin birbirine oranı bitki morfogenezi ve büyümesinde yönlendiricidir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: Kültür ortamındaki oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının etkileri (Machakova ve ark., 2008)

Bitki patojeni bir fungus olan *Gibberella fujikuroi*, bitkilerin aşırı uzun boylu olmasına sonrasında devrilmelerine ve tohum üretmemelerine sebep olmaktadır. 1926'da Japon bilim adamı Eiichi Kurozawa ve arkadaşları bu duruma sebep olan maddeyi fungustan izole etmeyi başarmış ve bunu giberellin olarak isimlendirmiştir (Heldt, 2005). Giberellinlerin yapısal analizleri sonucunda bunların bitkilerde bulunan ve bitkisel hormonlar olarak görev alan, birbirine yapısal olarak benzeyen çeşitli maddelerin karışımı oldukları ortaya çıkmıştır. Bitkilerde teşhislerine göre numaralandırılmış olarak 100 den fazla giberellin bulunmaktadır. Bu numaralandırma giberellinlerin yapıları ve benzerlikleri ile ilgili bilgi vermektedir. Bu giberellinlerden birçoğu biyosentez yollarında ara ürünlerdir. Yalnızca birkaç tanesi bitki hormonu olarak görev almaktadır. En önemlileri GA<sub>1</sub> ve GA<sub>3</sub> tür. Gibberellinler gibberellan türevleridir ve internodların uzamalarına neden olurlar (Katekar, 1999).

Ayrıca giberellinler çiçeklenmenin düzenlenmesi, dormansinin kırılması, meyve oluşumu ve büyümesi gibi olaylarda da etkilidirler (Heldt, 2005).

İsveçli bir bilim adamı olan Torsten Hemberg, 1949 yılında dormant tomurcuklardan sentezlenen bir maddenin oksinlerin etkilerini bloke ettiğini bulmuş ve bu büyüme önleyicileri “Dormin” olarak isimlendirmiştir. Amerika, İngiltere ve Yeni Zelanda’da bulunan üç araştırmacı grubu birbirinden bağımsız olarak büyüme engelleyici bir hormon bulmuş ve bunu “Absisik asit” (ABA) olarak isimlendirmişlerdir. İleriki zamanlarda Dormin’in aslında ABA olduğu anlaşılmıştır (Bidlack ve Jansky, 2011). Absisik asit  $\alpha$ -amilaz sentezinde ve su stresinde stoma açıklığının düzenlenmesinde önemli rol oynamasıyla bilinir (Katekar, 1999). Tohumların ve tomurcukların dormansiye girmesinde etkili olduğu bilinmektedir. ABA sentezi su depolanmasının doğrudan gözlenebildiği yaprak ve kök gibi organlarda görülür. Terleme akıntısıyla ksilem kanalları vasıtasıyla köklerden yapraklara taşınırlar (Heldt, 2005). Biyosentezi plastidlerde, özellikle kloroplastlarda gerçekleştirilir (Milborrow, 1974). ABA somatik embriyoların büyümesi için gereklidir ve ancak ABA varlığında somatik embriyolar gelişimsel ve yapısal olarak zigotik embriyolara yakından benzerler. Endojen ve/veya ekzojen ABA seviyesindeki artış, olgunluğa erişen embriyoların sayısının artmasına sebep olur (Ammirato, 1988).

Etilen gaz halinde olan tek hormondur ve yüksek bitkilerin çoğu organlarında oluşur. Dokular yoluyla ulaşımı çok hızlı ve kolaydır. Etilenin biyosentezi stres, bazı fizyolojik süreçler veya oksin tarafından uyarılır. Etilen üretiminin uyarılmasının kuraklık, sel, soğuk, sıcak stresi, tuz, ozon, enfeksiyon ve mekanik yaralama ile olduğu bulunmuştur (Vanková, 2011). Etilen, savunma genlerinin ifadesinin uyarılmasında, yaprak ve meyve absisyonunda ve programlı hücre ölümünde önemli bir rol oynayan, abiyotik strese olduğu kadar biyotik strese de tepki ile ilişkili bir hormondur. Stres fonksiyonlarının dışında, etilen meyve olgunlaşmasını düzenler ve hem doğal hem de kuraklığa bağlı yaşlanma (senesens) başlangıcını belirler (Young ve diğ., 2004). Etilen yaprakların fotosentez performansı üzerinde olumsuz bir etkisi vardır. Solgun fidelerde ise etilenin üç şekilde etkisi vardır. Bu etkiler; hipokotil büyümesinin engellenmesi, apikal çengelin aşırı kıvrılması ve kök büyümesinin azaltarak düzenlenmesidir (Ecker, 1995).

## 1.6. Kültüre Etki Eden Çevresel Etmenler

Kültürde kullanılan besi ortamının bileşimi, bu besi ortamının yoğunluğu, ortamın gaz kompozisyonu, kabın içindeki CO<sub>2</sub> miktarı, kültür kabının şekli ve büyüklüğü, fiziksel çevre bileşenlerinden sıcaklık, nem ve ışık gibi faktörler çevresel etmenler arasında sayılabilirler. Farklı kültür ve çevre şartlarının kültürler üzerine olabilecek etkileri Tablo 1.4’de gösterilmiştir.

Tablo 1.4: Farklı çevre şartlarının çeşitli evrelerde kültürler üzerine etkileri (Babaoğlu ve diğ., 2001’den değiştirildi)

Çevre şartları	Etkileri ( <i>in vitro</i> )	Etkileri ( <i>ex vitro</i> )
Sabit hava sıcaklığı	Karanlıkta yüksek solunum	Çevresel strese hassaslık
Düşük-yüksek sıcaklık	Yavaş-aşırı 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 oranı, stomalarda düzensizlik, köklenme ve besin alımında zorluklar, vitrifikasyon	Aşırı transpirasyon, su ve besin maddesi alım zorluğu.
Ortamda düşük erimiş O <sub>2</sub>	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 kontaminasyon, bitki ölümü	-
BBD ve vitamin içeren ortamlar	Aşırı konsantrasyonlarda mutasyon ihtimali, somaklonal varyasyon	-
Uygun olmayan büyüme düzenleyicileri	Kallus gelişimi, köklenme ve büyüme bozuklukları	-
Yüksek konsantrasyonda agarla katılaştırılmış ortamlar	Düşük O <sub>2</sub> alımı, köklenmede bozukluk	-
Düşük CO <sub>2</sub> konsantrasyonu	Etilen biyosentezinin uyarılması	-



## 1.7. Bern Sözleşmesi

Avrupa'nın Yaban Hayatı ve Yaşama Ortamlarının Korunması Sözleşmesi 1979 Eylül' ünün 19. günü İsviçre'nin Bern kentinde imzalanmış ve bu Sözleşme, 09.01.1984 tarih ve 84-7601 sayılı Bakanlar Kurulu Kararı ile onaylanarak 20.02.1984 tarih ve 18318 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanmıştır (URL 7). Sözleşmenin amacı; yabancı flora ve faunayı ve bunların yaşama ortamlarını muhafaza etmek, özellikle birden fazla devletin işbirliğini gerektirenlerin korunmasını sağlamak ve bu işbirliğini geliştirmektir. Bu sözleşme, yabancı flora ve faunanın korunması ve gelecek nesillere aktarılması gerekli estetik bilimsel, kültürel, rekreasyonel, ekonomik ve özgün değerde doğal bir miras olduğunu takdir ederek, biyolojik dengenin devamlılığında yabancı flora ve faunanın oynadığı temel rolü bilerek, yabancı flora ve faunanın birçok türlerinin ciddi biçimde tükenmekte olduğu ve bazılarının yok olma tehlikesine maruz olduğunu kaydederek, yabancı flora ve faunanın korunmasında, hükümetlerin ulusal amaçları ve programlarında bunları dikkate alması ve özellikle göçmen türlerin korunmasında uluslararası işbirliğinin gerekliliğini takdir ederek, kabul edilmiştir (Jen, 1999). Avrupa Konseyi, Bern Sözleşmesine göre 2002 yılında bu teze konu olan *Amsonia orientalis* Decne. (syn. *Rhazya orientalis*) bitkisini "Florada Kesinlikle Korunması Gereken Türler" listesinde bildirmiştir (URL 8).

## 1.8. Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN)

IUCN (International Union for Conservation of Nature) Uluslararası Doğayı Koruma Birliği dünyanın en büyük ve önemli doğa koruma ağıdır. IUCN 1948 yılında kurulmuştur. Merkezi Gland, İsviçre'de bulunur. IUCN'nin 160'dan fazla ülkede, 200'den fazla hükümet ve 900'den fazla sivil toplum kuruluşu da dahil olmak üzere toplam 1.100'den fazla üyesi vardır. IUCN'in çeşitli komisyonlarında yaklaşık 11000 uzmanı ve toplam 1000 civarında çalışanı vardır (URL 9).

IUCN, yeryüzünün biyolojik çeşitliliğinin korunması ve doğal kaynakların sürdürülebilir ve eşit şartlarda kullanımı için, dünya toplumlarını etkilemek, teşvik etmek ve destek olmak amacıyla çalışmalar yürütür. Nesli tehlikedeki türler, yok olma tehdidi altındaki bitki ve hayvan türleridir. Bu türler IUCN'nin iki yılda bir yayımlanan kırmızı listesinde yer alırlar (URL 10).

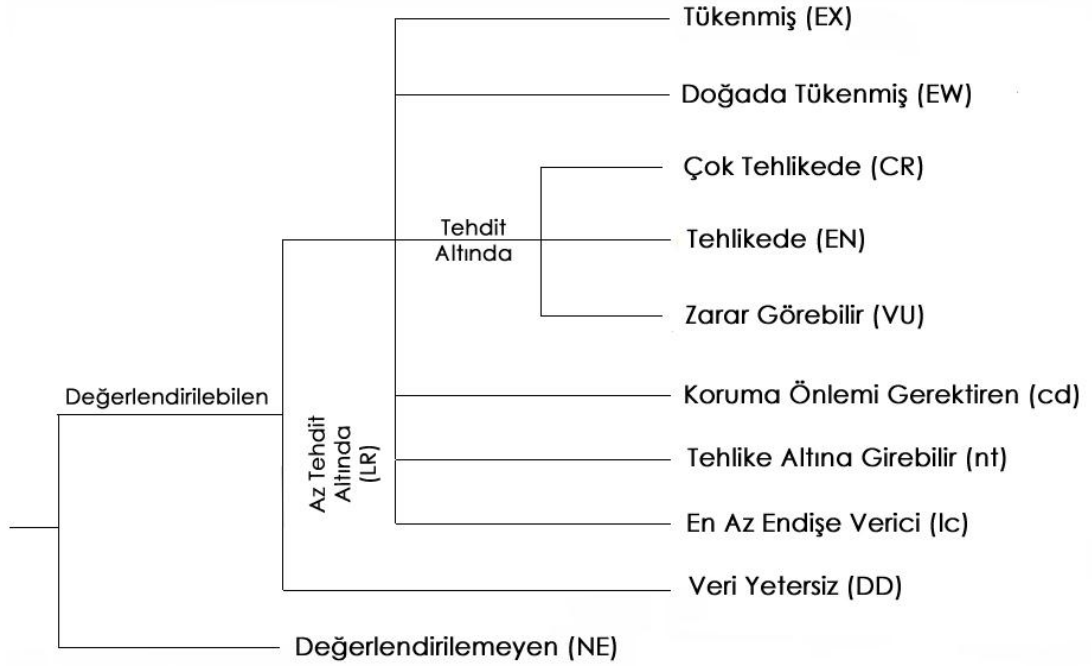
### **1.8.1. IUCN kırmızı liste sınıfları**

IUCN Kırmızı Liste Sınıfları ve Ölçütleri, küresel tükenme riskleri yüksek olan türleri sınıflandırmak için kolayca anlaşılacak bir sistem olarak tasarlanmıştır. Bu sistemin amacı, farklı türleri tükenme risklerine göre sınıflandırmak için açık ve nesnel bir yöntem oluşturmaktır.

IUCN Kırmızı Liste Sınıfları ve Ölçütlerinin amaçları;

- değişik kişilerce tutarlı olarak uygulanabilecek bir sistem temin etmek;
- tükenme riskini etkileyen değişik faktörlerin değerlendirilmesi için kolay anlaşılır bir rehberle değerlendirmelerin nesnellliğini artırmak;
- birbirinden çok farklı türlerin karşılaştırılabileceği bir sistem sağlamak;
- tehdit altındaki tür listelerini kullananların her türün nasıl sınıflandırıldığını anlamalarını sağlamaktır (IUCN, 2001).

Kırmızı Liste Sınıfları küresel olarak tükenme tehlikesinde olan taksonların dahil edildiği, o taksonun tükenme tehlikesinin derecesini belirten kategorilerdir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: Kırmızı liste kategorilerinin yapısı (IUCN, 2001)

Kırmızı liste kategorileri (sınıfları) şunlardır;

EX - Extinct - Tükenmiş: Şayet son ferдинin öldüğü konusunda hiçbir şüphe yoksa bu takson EX kategorisindedir.

EW - Extinct In The Wild - Doğada Tükenmiş: Takson bulunabileceği ortamlarda ve yılın farklı zamanlarında yapılan ayrıntılı araştırmalarda bulunamamış yani doğada kaybolmuş ve yalnız kültüre alınmış bir şekilde yaşamaya devam ediyorsa bu kategoriye dahil edilir.

CR - Critically Endangered - Çok Tehlikede: Bir takson çok yakın bir gelecekte yok olma riski altında ise bu kategoriye konur.

EN - Endangered - Tehlikede: Bir takson oldukça yüksek bir risk altında ve yakın bir gelecekte yok olma tehlikesi altında ancak henüz CR kategorisinde değilse EN kategorisinde değerlendirilir.

VU - Vulnerable - Zarar Görebilir: CR ve EN kategorilerine konmamakla birlikte, doğada orta vadeli gelecekte yüksek tehdit altında olan taksonlar bu kategoriye konur.

LR - Lower Risk - Az Tehdit Altında: Yukarıdaki gruplardan herhangi birine konamayan, onlara göre popülasyonları daha iyi taksonlar bu kategoriye konur. Gelecekteki durumlarına göre tehdit açısından sıralanabilecek 3 alt kategorisi vardır.

a-(cd) - Conservation Dependent - Koruma Önlemi Gerektiren: 5 yıl içinde yukarıdaki kategorilerden birine girebilecek taksonlar.

b-(nt) - Near Threatened - Tehdit Altına Girebilir: VU kategorisine konmaya yakın adaylar.

c-(lc) - Least Concern - En Az Endişe Verici: Herhangi bir koruma gerektirmeyen ve tehdit altında olmayan taksonlar.

DD - Data Deficient - Veri Yetersiz: Bir taksonun dağılım ve bolluğu hakkındaki bilgi yetersiz ise takson bu gruba konur

NE - Not Evaluated - Değerlendirilemeyen: Yukarıdaki herhangi bir kriterle değerlendirilemeyenler (Ekim, 2000).

### 1.8.2. Tehlike kategorilerinde bulunan bitkilerin dünyadaki durumu

IUCN Kırmızı Listesi'nde tehdit altındaki taksonların değerlendirildiği üç temel kategori olan CR, EN ve VU kategorilerindeki bitki taksonu sayılarının 1996-2011 yılları arasındaki değişimi dünyadaki genel durumu göstermektedir (Tablo 1.5).

Tablo 1.5: Tehlike sınıflarındaki bitki taksonlarının dünyadaki durumu (IUCN, 2011)

IUCN	Tarih										
	1996/98	2000	2002	2003	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Tehlike Sınıfı	Yıllara göre takson sayıları										
CR	909	1014	1046	1276	1490	1541	1569	1575	1577	1619	1731
EN	1197	1266	1291	1634	2239	2258	2278	2280	2316	2397	2564
VU	3222	3331	3377	3864	4592	4591	4600	4602	4607	4708	4861

Tabloda görüldüğü üzere sadece CR, EN ve VU kategorilerindeki toplam bitki taksonu sayısı 2011 yılı IUCN Kırmızı Listesi'ne göre 9156 olarak belirtilmiştir. IUCN Kırmızı Listesi'ndeki tüm kategoriler içerdikleri bitki gruplarına göre detaylı olarak incelendiğinde ise 2011 yılında tüm kategorilerde toplam 9156 bitki taksonunun Kırmızı Liste'de yer aldığı görülür (Tablo 1.6).

Tablo 1.6: Herhangi bir tehlike sınıfında yer alan taksonların başlıca bitki gruplarına göre dağılımı (IUCN, 2011)

		Tarih										
Başlıca		1996/98	2000	2002	2003	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Bitki Grupları		Yıllara göre takson sayıları										
Karayosunları		-	80	80	80	80	80	80	82	82	80	80
Eğretiler		-	-	-	111	140	139	139	139	139	148	163
Açık tohumlular		142	141	141	304	305	306	321	323	322	371	377
Çiçekli bitkiler		5186	5390	5492	6279	7796	7865	7899	7904	7948	8116	8527
Yeşil algler		-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0
Kırmızı algler		-	-	-	-	-	-	9	9	9	9	9
<b>Toplam</b>		<b>5328</b>	<b>5611</b>	<b>5714</b>	<b>6774</b>	<b>8321</b>	<b>8390</b>	<b>8448</b>	<b>8457</b>	<b>8500</b>	<b>8724</b>	<b>9156</b>

İncelenen 15 yıl içerisinde herhangi bir tehlike kategorisinde bulunan toplam bitki taksonu sayısının 5328 den 9156 ya yükselmesi ve tehlike kategorilerine dahil olan çiçekli bitki taksonlarının sayısındaki artış, koruma çalışmalarının önemini bir kez daha belirtmesi açısından önemlidir.

### 1.8.3. Tehlike kategorilerinde bulunan bitkilerin Türkiye'deki durumu

Ülkemizin mevcut florasını oluşturan taksonların durumlarının belirlenmesi amacıyla IUCN Kırmızı Listesi'ndeki tehlike kategorileri ve ölçütlere göre hazırlanmış Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda yurdumuzdaki endemik ve endemik olmayan bitki taksonları dahil oldukları tehlike kategorilerine göre sınıflandırılmıştır (Tablo 1.7).

Tablo 1.7: Türkiye florasında bir tehlike sınıfına dahil olan takson sayıları (Ekim, 2000)

Takson özelliği	Tehlike Kategorisi									
	EX	EW	CR	EN	VU	LR (lc)	LR (cd)	LR (nt)	DD	NE
Endemik	12	-	171	774	688	769	470	347	270	3
End. Olmayan	1	-	10	69	769	-	-	-	244	3
<b>Toplam</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>181</b>	<b>843</b>	<b>1457</b>	<b>769</b>	<b>470</b>	<b>347</b>	<b>514</b>	<b>6</b>

Türkiye Avrupa ülkelerinin toplam alanının onbeşte biri kadar bir sahaya sahip olmasına karşın, Avrupa toplam 12000 adet eğrelti ve tohumlu bitki ile 2750 adet endemik türe sahipken, toplam sayı ülkemizde 9000 civarında olup bunlardan yaklaşık 3000 adedi ülkemize has, yani endemiktir (Ekim, 2000).

Floramızda bulunan bitkilerin tehlike kategorilerine göre dağılımına bakıldığında toplamda 4600 takson bir tehlike kategorisinde bulunmaktadır. Bu sayı ülkemiz florasındaki toplam takson sayısının yaklaşık yarısına denk gelmekte ve bu durum ülkemizde koruma çalışmalarına duyulan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında; Avrupa ve Türkiye ölçeğinde tükenme tehlikesinde olan ve CR (Çok Tehlikede) kategorisinde yer alan, Apocynaceae (Zakkumgiller) familyasına mensup, *Amsonia orientalis* Decne. bitkisinin *in vitro* çoğaltımında farklı konsantrasyonlarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin incelenmesi ve ayrıca bitkinin yüksek miktarda çoğaltılması amaçlanmıştır. Literatürde söz konusu bitki üzerinde bu amaçları taşıyan bir çalışma daha önce yapılmadığından, mevcut çalışma öncü niteliğindedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bitkinin Genel Özellikleri

*Amsonia orientalis* Decne., Apocynaceae (Zakkumgiller) familyasına mensup bir türdür. Bu familya hemen hemen kozmopolittir fakat bazı ılıman bölgelerdeki kimi temsilcileri nedeniyle genellikle tropikal olarak nitelendirilir. Pek çoğu süs bitkisidir. Bazı türler kauçuk (*Funtumia*, *Landolphia*) ve drog eldesinde (*Strophanthus*, *Acokanthera*, *Catharanthus*, *Rauwolfia*) kullanılır. Birçok türü zehirlidir (Raffauf, 1996). Apocynaceae familyası, genelde süt şeklinde salgıları olan (lateks) otlar çalılar veya küçük ağaçlardan oluşur. Familya üyelerinde yapraklar zıt veya halkavari diziliş gösterir. Almaşık diziliş daha az görülür. Ayrıca yapraklar stipulsuz ve basittir. Çiçek tek olarak yaprak koltuklarında veya kimöz şeklinde olup bazen panikül oluşturmaktadır. Çiçek kısımları beşlidir. Kaliks kaideye yakın kısma kadar 5 loblu ve kalıcı, korolla kampanamsı, hunimsi veya tüp kısmı uzun rozet şeklindedir. Beş lobun kıvrılmış olarak bulunduğu tomurcuk imbrikittir. Stamen sayısı 5 ve korollaya bitişiktir. Ovaryum 2 serbest karpelli veya karpeller kaideye yakın kısımda bitişik, yukarıda ise geniş ve değişik baş görünümüne sahip, stigmaları bulunan tek stilus şeklinde bitişmişlerdir. Meyve iki foliküle ayrılmakta, bazen indirgenme sonucu tek folikül gelişmektedir. *Amsonia orientalis*, tıbbi potansiyeli ve ekonomik değeri olan, 30-60 cm boyda, latekse sahip, dallı, çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.1). Ülkemizde “mavi yıldız, mavi çiçek ve doğu razyası” gibi isimlerle anılmaktadır.



Şekil 2.1: *Amsonia orientalis*'in çiçekleri ve meyveleri

Yaprakları neredeyse sapsız, dar yumurtamsı veya mızrağımsı,  $3-7 \times 0,5-3,5$  cm, tabanı kama şeklinde veya yuvarlak, uç kısmı dar veya sivri uçlu, kenarı ve yaprak orta damarı haricinde tüylüdür. Genç yapraklar genelde tüylüdür ve birçok yan damara sahiptirler. Çiçek örtüsü yoğun veya seyrek olabilir fakat bol çiçeklidir. Kaliks 2-3 mm dir. Korolla yıldız şeklinde, soluk veya parlak mavidir. Çiçek rengi mavi-lavanta olabilir. Korolla tübü yaklaşık 10-12 mm ve lobları 4-5,5 mm uzunluğundadır (Şekil 2.2). Tohumları 3-5 cm. uzunluğundaki meyvelerin içinde oluşurlar ve 6-8 mm. boyundadırlar (Davis, 1978; Darke, 2005). Bitkinin yaprakları bifasiyaldir. Epidermis bir katmanlı hipodermis ise yoktur. Palizat parankiması sünger parankiması ve epidermis arasında iki katman halinde uzanır. Anatomik yönden yapraklar hipostomatiktir ve stomaları amaryllis tiptir (Akyalçın ve diğ., 2006).



Şekil 2.2: *Amsonia orientalis* çiçeğinin genel görünüşü



Sistematik hiyerarşisi şu şekildedir; Alem: Plantae

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Gentianales

Familya: Apocynaceae

Cins: *Amsonia*

Tür: *Amsonia orientalis*

## 2.2. Ekonomik ve Tıbbi Önemi

*Amsonia orientalis* parlak mavi-mor çiçeklere sahip çiçek durumundan dolayı Batı Avrupa ve Amerika'daki bahçelerde süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır. *Amsonia* türleri diğer Apocynaceae (Zakkumgiller) familyası üyeleri gibi lateksli gövdeye sahiptirler. *Nerium* gibi kimi akrabalarının lateksi zehirli alkaloidlere sahip olsa da *Amsonia* türlerinin lateksi nisbeten zehirsizdir. Bu lateksin insanlara karşı zararlı olduğu bilinir fakat bitkinin geyik ve diğer memeliler tarafından yenmesine engel olur. Bu durum da bitkinin bahçelerde, peyzaj düzenlemelerinde kullanılmasında avantaj sağlar (Darke, 2005). Itoh ve diğ. (2002), *A. orientalis* üzerine yaptıkları bir çalışmada 6 yeni flavonoid glikozit izole etmişlerdir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: *A. orientalis*'ten izole edilen 6 yeni flavonoid glikozit (Itoh, 2002)

Tanımlanan Yeni Flavonoid glikozit	
1	quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-O-trans-p-coumaroyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
2	quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]-(3-O-trans-p-coumaroyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
3	isorhamnetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-O-trans-p-coumaroyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
4	isorhamnetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]-(3-O-trans-p-coumaroyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
5	isorhamnetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-O-cis-p-coumaroyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside
6	isorhamnetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)]-(4-O-trans-feruloyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside

Flavonoidler doğada birçok bitkide, yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı, bifenolik bileşiklerdir. Bu gruba dahil olan glikozitler (flavonoid glikozitler) kardiyovasküler sistem düzenleyicileri olarak çok eskiden beri kullanılmaktadır. Flavonoidlerle *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalar bunların kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada rol oynadığını göstermiştir. Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulması ve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, deoksifikasyon enzimlerinin indüksiyonu, immun sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir (Atasever, 2003). Bu bağlamda *A. orientalis*'in flavonoid içeriğinin önemi ortaya çıkmaktadır.

*A. orientalis* kökleri üzerine yapılan bir çalışmada sekologanine rastlanmıştır. Sekologanın isopirenoid glikozit olan bir biyoanahtardır. Çeşitli biyosentez yollarının merkez pozisyonunda bulunur ve diğer birçok doğal ürünün başlangıç bileşiğidir (Lengyel, 1986). Özellikle *A. orientalis* üzerinde alkaloit içeriği yönünden önemli çalışmalar yapılmış ve bu taksonun 12 çeşit alkaloit bulundurduğu rapor edilmiştir (Tablo 2.2). Bu alkaloitlerin bir kısmı antikanser özellikleriyle tıbbi öneme sahiptirler (Özen, 2006).

Tablo 2.2: *A. orientalis*'in alkaloit içeriği (Rahman ve ark., 1989)

	<b>Alkaloit</b>	<b>Kimyasal Formülü</b>
<b>1</b>	Tabersonine	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>2</b>	15,20,15',20'-Tetrahydrosecamine	C <sub>42</sub> H <sub>56</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
<b>3</b>	15,20,15',20'-Tetrahydrosecamine	C <sub>42</sub> H <sub>56</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
<b>4</b>	Secamine	C <sub>42</sub> H <sub>52</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
<b>5</b>	Vallesiachotamine	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>6</b>	Picalinal	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>7</b>	Picrinine	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>8</b>	Tetrahydrosecodin-17-ol	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>9</b>	Dihydrosecodin-17-ol	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>10</b>	Tetrahydrosecodine	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>11</b>	5- $\alpha$ -Carboxystrictosidine	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub>
<b>12</b>	Strictosidine	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>

### 2.3. Avrupa ve Türkiye'deki Yayılış Alanları

*Amsonia orientalis* Türkiye'de ve Yunanistan'ın Kuzeydoğusu'nda doğal olarak yayılış göstermektedir (Tutin ve diğ., 1968). Davis (1978), türün Türkiye ve Yunanistan'da yayılış gösterdiğini fakat Yunanistan'daki popülasyonun tükenmeye yakın olduğunu rapor etmiştir. Yunanistan popülasyonunun halen yayılış gösterdiğine dair yakın tarihli bir floristik kayıda rastlanmadığından, *A. orientalis*'in Yunanistan'da tükenmiş olma ihtimali oldukça yüksektir.

*A. orientalis* için ülkemizde ise Apolyont (Uluabat) Gölü, İstanbul Menekşe Deresi (Halkalı) ve Balıkesir Hıdırlık Tepe olmak üzere toplam üç lokalitede bulunduğu bildirilmektedir. Yapılan arazi çalışmalarına göre *A. orientalis* Türkiye'de sadece Balıkesir ilinde bulunmuş fakat daha sonra Ömerli Havzası'nda küçük bir popülasyonun yayılış gösterdiği rapor edilmiştir (Şekil 2.3). Bitki Balıkesir ilinde yaklaşık 10 km<sup>2</sup> alanda yayılış göstermektedir (Akyalçın ve diğ., 2006).



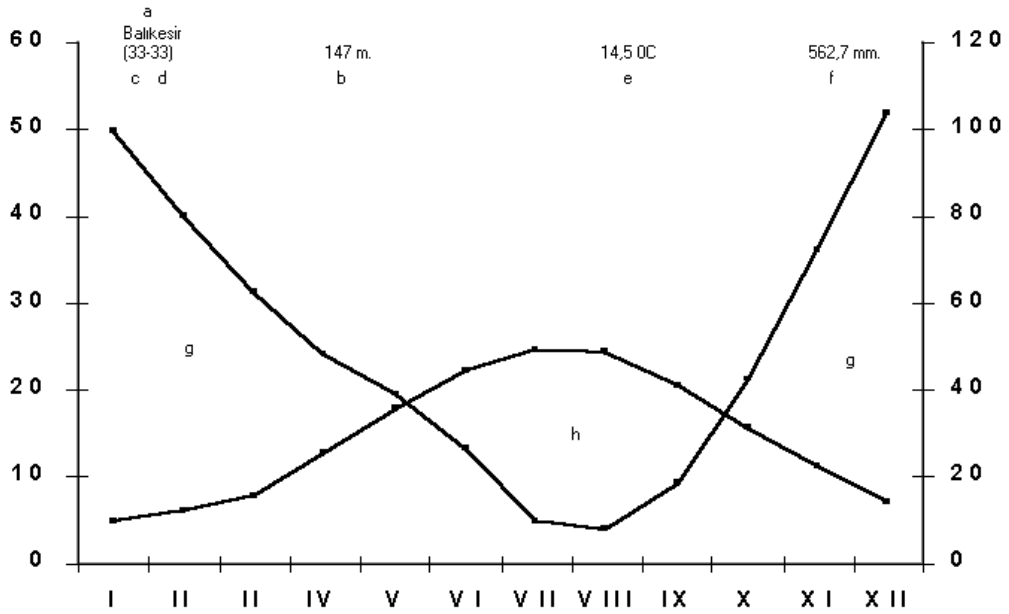
Şekil 2.3: *Amsonia orientalis*'in dünyadaki yayılışı

Arazi çalışmalarında bitkinin bulunduğu lokaliteler ve bunların GPS koordinatları şöyledir; Balıkesir Gazi Osman Paşa (175 m., N 39° 37' 26,3", EO 27° 52' 05,7"), Adnan Menderes (261 m., N 39° 38' 56,2" , EO 27° 51' 06,2") ve Paşaalanı Mahallesi (119 m., N 39° 39' 54,5" , EO 27° 54' 26,0") (Özen, 2006).

Bitkinin bu alanlarda oldukça lokal populasyonlar halinde bulunduğu tespit edilmiştir. Tür, Türkiye’de de çok nadir veya neredeyse tükenmek üzeredir (Davis, 1978). Mavi yıldız bitkisinin tükenme tehlikesinde olmasının en önemli nedeni, doğal yayılış alanlarının yerleşim alanı sınırlarında kalmasıdır.

### 2.3.1. Balıkesir’in iklimi

*Amsonia orientalis*’in en fazla bulunduğu doğal yayılış alanı olarak Balıkesir İli’nin iklimsel özellikleri bitkinin hangi ekolojik şartlar altında gelişim gösterebildiğinin bilinmesi için önemlidir. Balıkesir Akdeniz ikliminin etkisindedir. İlde 5. ayın başlarından 9. ayın sonlarına kadar devam eden uzunca bir kurak devre bulunmaktadır. Ayrıca ilde donlu aylar bulunmayıp muhtemel donlu aylar ise 1., 2., 3., 4., 10., 11. ve 12. aylara denk gelmektedir (Şekil 2.4)



Şekil 2.4: Balıkesir'in iklim diyagramı

#### 2.4. Apocynaceae Familyasına Ait Doku Kültürü Çalışmaları

Kanchanapoom ve diğ. (2010), çeşitli konsantrasyonlarda NAA ve BA ile desteklenmiş MS besi ortamı kullanarak *Adenium obesum* bitkisini sürgün ucu kültürüyle çoğaltmayı başarmışlardır. Eksplant başına en yüksek sayıda sürgün oluşumunu  $5,20 \pm 1,10$  sürgün ile  $22,2 \mu\text{M}$  N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) uygulamasının sonucunda elde etmişlerdir. Ayrıca %0,3 aktif kömür ile desteklenmiş fakat herhangi bir BBD içermeyen MS besi ortamında en yüksek hayatta kalma ve köklenme oranı gözlemişlerdir. Çoğaltılan bitkiler ve doğal habitatında üremiş bitkiler arasında DNA içeriği yönünden fark bulunmamıştır.

Choi ve diğ. (2003), *Catharanthus roseus*'un 22 kültüvarının hipokotil eksplantlarını, adventif sürgün oluşturma yetkinliklerini değerlendirmek için çeşitli sürgün uyarıcı besi ortamlarında kültüre almışlardır. Denemelerde kullanılan MS besi ortamlarını,  $14 \mu\text{M}$  zeatin ve  $2,5 \mu\text{M}$  indol-3-butirik asit (IBA),  $4,5 \mu\text{M}$  BA ve  $0,5 \mu\text{M}$   $\alpha$ -naftalen asetik asit (NAA) veya  $14 \mu\text{M}$  thidiazuron (TDZ) ve  $2,5 \mu\text{M}$  IBA ile desteklemişlerdir. Çalışmanın sonunda "Cooler Raspberry Red" kültüvarı,  $14 \mu\text{M}$  zeatin ve  $2,5 \mu\text{M}$  NAA ortamında en yüksek sürgün rejenerasyonunu (%86,7) göstermiştir.

Diğer bir çalışmada ise Nishitha ve diğ. (2006), *Chonemorpha grandiflora*'nın koltukaltı tomurcuklarından *in vitro* çoğaltımını yapmışlardır. Sürgün uyarılması için  $13,3 \mu\text{M}$  BA ve  $2,46 \mu\text{M}$  IBA kombinasyonu ile desteklenmiş MS besiyeri en iyi sonucu vermiştir. Besi yerinde IBA varlığında ortama AgNO<sub>3</sub> (Gümüş nitrat) eklenmesi köklerin sayı, uzunluk ve dallanmasını arttırmıştır. Ayrıca sürgün uçları  $0,49 \mu\text{M}$  IBA ve  $11,7 \mu\text{M}$  AgNO<sub>3</sub> içeren besi yerinde enkapsüle edilmiş ve bunların %95'i tam bitkicik haline gelmiştir.

Raha ve Roy (2001), odunsu, aromatik ve tıbbi bir bitki olan *Holarrhena antidysenterica*'yı koltukaltı tomurcukları içeren nodal segment eksplantları kullanarak *in vitro* ortamda çoğaltmışlardır. Bu çalışmada,  $15 \mu\text{M}$  konsantrasyonda kullanılan BA, 30 günlük kültür süreci sonunda eksplant başına 43 mikro sürgün ile en iyi sürgün gelişim oranını sağlamıştır. Nodal eksplantlar tekrar alt kültürlere

alınarak bitkinin yüksek sayıda üretimi amaçlanmıştır. Köklendirme için ise en uygun ortam, mikro sürgünlerin %80'inde köklenmeyi sağlayan 35 µM IBA ile desteklenmiş MS ortamıdır. Mallikarjuna ve Rajendrudu (2009), aynı bitkide nodal eksplanttan sürgün rejenerasyonunu 2 mg/l BA ile desteklenmiş MS ortamında en yüksek sayıda ( $40,1 \pm 0,54$ ) olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *ex vitro* köklendirme denelemleri yapmışlar ve sürgünleri 2 dakika boyunca 2 mg/l IBA solüsyonunda bekletip sertleştirme ortamına bitkiyi aktarmışlardır.

Biondo ve diğ. (2007), tükenme tehlikesi altındaki Brezilya endemiği *Mandevilla velutina* bitkisinin tohumlarının çimlenmesinden 90 gün sonunda gelişen bitkilerden alınan nodal eksplantları *in vitro* kültüre alarak bitkinin çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Eksplantlar çeşitli konsantrasyonlarda BA, Zeatin, [2-izopentenil]-adenin (2ip), DL-Dithiothreitol (DTT) ve TDZ destekli MS besi ortamında kültüre alınmış, gövde başına en fazla tomurcuk 0,44 µM BA ile desteklenmiş ortamda 6,74 tomurcuk olarak gözlemlenmiştir.

Bhatt ve diğ. (2008), Reserpin, Ressonamin ve Yohmbin gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan alkaloidleri içeren *Rauwolfia serpentina* bitkisini yaprak ve gövde eksplantlarından *in vitro* ortamda çoğaltmışlardır. İki farklı kombinasyonda, 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) + 2-benzilaminopürin (BAP) ve IBA + BAP BBD'leri ile destekledikleri MS ortamında direkt rejenerasyon ve kallus oluşumu üzerine yapılan çalışmada direkt rejenerasyon yaprak ve gövde eksplantlarından, kallus oluşumu ise apikal ve nodal eksplantlardan sağlanmıştır. 0,125 mg/l IBA + 1,0 mg/l BAP konsantrasyonu direkt rejenerasyon ve kallus oluşumu için en iyi sonucu vermiştir.

Fard ve diğ. (2008), toprak üstü kısımları Vinkamin, İzovinkamin ve Vinsin gibi alkaloidleri içeren Cezayir Menekşesi (*Vinca minor*) üzerine yaptıkları doku kültürü çalışmasında, arazide yetişen *V. minor*'un tek nod (boğum) eksplantından sürgün rejenerasyonunu WPM tuzları (Loyd ve McCowan, 1980), MS vitaminleri (Murashige ve Skoog, 1962), %3 sükröz, %0,8 agar içeren ve farklı konsantrasyonlarda BAP ile NAA ile desteklenmiş besi ortamlarında gerçekleştirmişlerdir.

En yüksek sürgün rejenerasyonunu (eksplant başına 5,6 sürgün) 7,21 mg/l BAP ve 0,0186 mg/l NAA konsantrasyonu ile desteklenmiş besi ortamında elde etmişlerdir.

Oliveira ve diğ. (2003), Brezilya'nın güneyinde nadir rastlanan bir tür olan *Tabernaemontana fuchsiaefolia*'nin sürgün ucu ve hipokotil eksplantlarından sürgün oluşumu ve gelişiminin teşviki için floroglusinol (1,3,5-hidroksibenzen) ile desteklenmiş farklı konsantrasyonlardaki BAP ve Kinetin kombinasyonları içeren besi ortamında kültüre almışlardır. Eksplant başına düşen sürgün sayısında Kinetin'in BAP'tan daha etkin olduğunu gözlemlemişlerdir. Tepe ve koltukaltı tomurcuklarından sürgün oluşumunda floroglusinolün olumlu etkisi gözlemlenmiştir. Köklendirme ortamında IBA yokluğunda, sadece 100 mg/l floroglusin ilavesiyle koltukaltı tomurcuklarından oluşturulan sürgünlerin %26'sı köklendirilmiştir.

## **2.5. *Amsonia* Cinsine Ait Doku Kültürü Çalışmaları**

Omar (1989), *Rhazya stricta*'da kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine yaptığı çalışmada *R. stricta* tohumlarını GA<sub>3</sub> ile desteklenmiş MS besi ortamında çimlendirmeyi başarmıştır. IAA destekli besiyerinde *R. stricta* köklerini kültüre almış ve tüm eksplantlar yüksek miktarda kallus ve yeni kök sürgünleri oluşturmuştur. NAA veya 2,4-D ile destekli besi ortamlarında ise hem gövde hem de yaprak eksplantlarından yumuşak ve kırılğan kalluslar elde etmiştir. Gövdeden elde edilen kalluslardan NAA destekli besi ortamında bitki rejenerasyonu sağlanmıştır.

Öz ve diğ. (2008) *Amsonia orientalis*'in doku kültürü ile çoğaltılması üzerine yaptıkları çalışmada bitkinin tohumlarını 100 µM Sodyum nitroprussid'i (SNP) çözeltisi içerisinde 12 saat bekletmişler ve sonrasında MS besi ortamında çimlendirmişlerdir. SNP tohum dormansisini kırabilmek için Nitrik oksit (NO) vericisi olarak kullanılmıştır. Tohumların çimlenme yüzdesi %15 olarak belirlenmiştir. 4 haftalık bitkiciklerden alınan gövde eksplantları 1 mg/l IBA + 0,5 mg/l kinetin ortamına aktarılmış ve sürgünlerin büyümesinde %33 oranında başarı sağlanmıştır. Aynı kültür ortamında 8 hafta sonunda eksplantların %15'i köklenmiştir. Kallus oluşumu ise 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA ortamında, gövde eksplantlarından sağlanmıştır. Bu çalışma *A. orientalis*'in bitkinin tohumlarının

çimlendirilmesinden elde edilen bitkiciklerin eksplant kaynağı olarak kullanılarak doku kültürü ile çoğaltımı üzerine yapılmış olan bir çalışmadır. Literatürde bu türün doku kültürü ile çoğaltımı üzerine farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının etkileri üzerine yapılmış ve eksplant kaynağı olarak arazide yetişen olgun bitkilerin kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.



### **3. MALZEME ve YÖNTEM**

#### **3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Bitki Materyali**

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyali, Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Yerleşkesi içerisinde bulunan, *Amsonia orientalis*'in Türkiye'de doğal yayılış gösterdiği tüm lokalitelerden toplanmış bireylerinin koruma altına alındığı özel koruma parselindeki Gazi Osman Paşa lokalitesine ait bireylerden sağlandı.

#### **3.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler**

##### **3.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar**

- Isıtıcılı Magnetik Karıştırıcı (H+P Labortechnik Variomag/Powertherm)
- pH Metre (Inolab WTW Series pH 720)
- Hassas Terazî (AND GR-200)
- Distile Su Cihazı (GFL 2001/4)
- Laminar-Hava Akışlı Kabin (Tez-San Class II)
- Otoklav (HMC Hiclave HG-80)
- Bitki Büyütme Kabini (Sanyo MCR-351H)
- Mikropipet (20µM, 200µM, 1000µM) (Eppendorf)
- Buzdolabı (+4°C) (Arçelik 5243 NEB)
- Vakum Filtrasyon Sistemi (Sartorius Millipore)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)

##### **3.2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar**

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Deneyleerde kullanılan kimyasal malzemeler

Madde Adı	Üretici Firma	Katalog No
Murashige & Skoog Bazal Tuz Karışımı (MS vitaminli)	Duchefa	M0222
6-benzilaminopürin	Duchefa	B0904
Kinetin	Sigma	K3378
2,4-diklorofenoksi asetik asit	Sigma	D7299
İndol-3-bütirik asit	Sigma	57310
İndol-3-asetik asit	Fluka	57333
Sükroz	Duchefa	S0809
Tween 20	Duchefa	P1362
Sodyum hidroksit	Sigma	S8045
Hidroklorik asit	Sigma	H1758
Etanol	Tek-Kim	TK.200655
~%5 Sodyum hipoklorit	Unilever	-
Agar	Duchefa	P1001

### 3.3. Deneyleerde kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltileri

#### 3.3.1. 6-benzilaminopürin (BAP) ana solüsyonu

BAP	50 mg
1N NaOH	3 ml
dH <sub>2</sub> O	47 ml

#### 3.3.2. Kinetin (Kn) ana solüsyonu

Kinetin	50 mg
1N NaOH	3 ml
dH <sub>2</sub> O	47 ml

#### 3.3.3. 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ana solüsyonu

2,4-D	50 mg
EtOH	3 ml
dH <sub>2</sub> O	47 ml

### 3.3.4. İndol-3-bütirik asit (IBA) ana solüsyonu

IBA	50 mg
EtOH	3 ml
dH <sub>2</sub> O	47 ml

### 3.3.5. İndol-3-asetik asit (IAA) ana solüsyonu

IAA	50 mg
EtOH	3 ml
dH <sub>2</sub> O	47 ml

### 3.4. Besi Ortamı ve İçeriği

Deneysel çalışmalarda besin ortamı olarak Murashige & Skoog tarafından önerilen MS besin ortamı kullanıldı. Kullanılan besin ortamı %3 sükröz ve farklı kombinasyon ve konsantrasyonlardaki çeşitli BBD'ler ile desteklendi, %0,8 agar ile katılaştırıldı. MS besin ortamının içeriği Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: MS besin ortamının içeriği

Bileşenler	Besi Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-
KCl	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2

Tablo 3.2 (Devam): MS besi ortamının içeriği

Bileşenler	Besi Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg/l)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
Nikotirik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,1
Biotin	-
Folik asit	-
<i>myo</i> -inositol	100
l-inositol	-
Glisin	2
Sakkaroz	30 000

### 3.5. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicilerin stok çözeltilerinin hazırlanması için orijinal ambalajında toz haldeki BBD'lerden bir miktar alınarak bir alüminyum folyonun üzerine konuldu ve hassas terazi ile 50 mg tartıldı. Topak halinde bulunan 2,4-D gibi BBD'ler tartılmadan önce bir petri kabına alındı ve bistöri ucu ile ezilerek toz hale gelmesi sağlandı. Tartılan BBD'ler 100 ml hacimli kapaklı şişelere konuldu. Üzerlerine her BBD'nin kendi çözücüsünden 3 ml eklenerek çözümleri sağlandı. Oluşan çözeltinin üzeri 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Böylece çözeltinin her mililitresinde 1 miligram BBD bulunması sağlandı. IBA gibi ışığa duyarlı BBD'lerin stok çözeltilerinin şişelerinin etrafı alüminyum folyo ile sarıldı. 2,4-D dışındaki diğer BBD'ler steril edilirken sıcaklık etkisiyle etkinliklerinde azalma olmaması için, 0,22 µM por çaplı filtre ile sterilizasyona tabi tutulduktan sonra besi ortamlarına eklendi. Tüm BBD stok çözeltileri + 4 °C'de buzdolabında saklandı ve her iki ayda bir yenilendi.

### 3.6. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları

Bu tez çalışmasında olgun eksplantların kültüründe kullanılan sürgün gelişimi ortamlarında 2,4-D + BAP, IAA + Kn ve IAA + BAP kombinasyonlarının 16 farklı konsantrasyonu, elde edilen genç sürgünlerin besi ortamlarında ise olgun eksplantların kültüründeki her kombinasyonda en iyi sonucu veren 3 konsantrasyon seçilip kullanıldı. Bu denemelerde ayrıca herhangi bir BBD ile desteklenmemiş (bazal) MS besi ortamı (MS0) ve tek başına 3 farklı konsantrasyonda BAP kullanıldı. (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Sürgün gelişimi ortamlarında kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı	BBD Kombinasyonu	Kullanılan Konsantrasyonlar (mg/l + mg/l)
MS0	-	-
MS1		0,5 + 0,5
MS2		1,0 + 0,5
MS3		1,5 + 0,5
MS4		2,0 + 0,5
MS5		0,5 + 1,0
MS6		1,0 + 1,0
MS7		1,5 + 1,0
MS8	2,4-D + BAP	2,0 + 1,0
MS9		0,5 + 1,5
MS10		1,0 + 1,5
MS11		1,5 + 1,5
MS12		2,0 + 1,5
MS13		0,5 + 2,0
MS14		1,0 + 2,0
MS15		1,5 + 2,0
MS16		2,0 + 2,0
MS17		0,5 + 0,5
MS18		1,0 + 0,5
MS19		1,5 + 0,5
MS20		2,0 + 0,5
MS21	IAA + BAP	0,5 + 1,0
MS22		1,0 + 1,0
MS23		1,5 + 1,0
MS24		2,0 + 1,0

Tablo 3.3 (Devam): Sürgün gelişiminde kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı	BBD Kombinasyonu	Kullanılan Konsantrasyonlar (mg/l + mg/l)
MS25		0,5 + 1,5
MS26		1,0 + 1,5
MS27		1,5 + 1,5
MS28	IAA + BAP	2,0 + 1,5
MS29		0,5 + 2,0
MS30		1,0 + 2,0
MS31		1,5 + 2,0
MS32		2,0 + 2,0
MS33		0,5 + 0,5
MS34		1,0 + 0,5
MS35		1,5 + 0,5
MS36		2,0 + 0,5
MS37		0,5 + 1,0
MS38		1,0 + 1,0
MS39		1,5 + 1,0
MS40	IAA + Kn	2,0 + 1,0
MS41		0,5 + 1,5
MS42		1,0 + 1,5
MS43		1,5 + 1,5
MS44		2,0 + 1,5
MS45		0,5 + 2,0
MS46		1,0 + 2,0
MS47		1,5 + 2,0
MS48		2,0 + 2,0
MS49		0,5
MS50	BAP	1
MS51		2

Köklendirme ortamlarında ise bazal MS besi ortamının yanı sıra bazal ½MS ortamı da denendi. MS ortamlarında 10 farklı konsantrasyonda IAA ve IBA, ½MS ortamlarında ise bu BBD'lerin sadece 1, 3 ve 5 mg/l konsantrasyonları kullanıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Köklendirmede kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı	BBD	Kullanılan Konsantrasyonlar (mg/l)
½MSk0	-	-
MSk0	-	-
MSk1		0,5
MSk2		1
MSk3		2
MSk4	IAA	3
MSk5		5
½MSk6		1
½MSk7		3
½MSk8		5
MSk9		0,5
MSk10		1
MSk11		2
MSk12	IBA	3
MSk13		5
½MSk14		1
½MSk15		3
½MSk16		5

### 3.7. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılan laminar hava akışlı kabinin iç yüzeyi %70 EtOH ile silindi. UV lambası açılarak 30 dakika çalışır konumda bekletildi. Magenta GA-7 kapları ve cam malzemeler yıkanıp distile sudan geçirildikten sonra kurutuldu ve ikili gruplar halinde buzdolabı poşetlerine konularak poşetlerin ağzı otoklav bandı ile kapatıldı. Bistüri sapı, pens ve cetvel gibi metal malzemeler alüminyum folyolara sarıldı. Mukavva kesme tablası, içerisine yerleştirilen kurutma kağıtları ile birlikte buzdolabı poşetine konularak poşetin ağzı otoklav bandı ile kapatıldı. Bu malzemeler otoklavda 121 °C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında 20 dakika sterilize edildi. Deneyler sırasında kullanılan distile su ve besi ortamlarını içeren kapaklı şişeler içerdiği sıvı hacmine göre artan sürelerde 121 °C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında otoklavda sterilize edildi. Sıcaklıkla yapısı bozulabilecek veya etkinliği azalabilecek BBD'ler 0,22 µM por çaplı steril Millipore şırınga ucu filtreleri ile sterilizasyona tabi tutuldu. Steril kabin içerisinde çalışmaya başlamadan önce eldiven giyildi ve eller %70 EtOH püskürtülerek steril edildi. Belirli aralıklarla bu işlem tekrarlandı.

Çalışma esnasında pens ve bistüri ucu her kullanımdan sonra %70 EtOH'a batırıldı ve birkaç kez alevden geçirilip yakılarak steril edildi.

### 3.8. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmalarda, MS vitaminleri içeren hazır MS besin tuzunun tam ve yarı güçlü konsantrasyonları ile hazırlanmış besi ortamları kullanıldı. Kullanılan tüm maddeler g/l, mg/l ve/veya (w/v) yüzde cinsinden ifade edildi. Hassas teraziye konan bir alüminyum folyo üzerinde MS tuzundan 200 ml besiyeri için 0,88 g (1 l besi ortamı için 4,4 g) tartıldı. Tartılan MS tuzları bekletilmeden içerisinde 20 ml distile su bulunan ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan kapaklı şişelere aktarıldı. Aktarılan MS tuzu çözündükten sonra hassas terazi kefesine yerleştirilern başka bir alüminyum folyo üzerinde 6 g sükroz (1 l besin ortamı için 30 g) tartılarak karıştırılmakta olan şişenin içerisine aktarıldı. Oluşan hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. 0,5 N HCl ve 0,5 N NaOH ile çözeltinin pH'ı  $5,7 \pm 1$ 'e ayarlandı. Son olarak katılaşmayı sağlaması amacıyla çözeltiliye 1,6 g agar eklendi.

#### 3.8.1. Besi ortamlarının sterilizasyonu

Besi ortamı  $1,2 \text{ kg/cm}^2$  basınç altında 20 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Farklı hacimlerde hazırlanan besi ortamlarının hazırlandıkları hacim göz önüne alınarak otoklav süreleri ayarlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: Sıvı hacmine göre otoklav süreleri

Kap cinsi	Sıvı Hacmi	Süre (d)
Test tüpleri	5-15 ml	15
500 ml erlen	250-350 ml	20
1 litre erlen	500-750 ml	25
2 litre erlen	1-1,5 litre	30
5 litre erlen	2-3 litre	35



### **3.8.2. Besi ortamlarının magenta kaplarına aktarımı**

Otoklavda steril edilen, içerisinde ikili gruplar halinde Magenta GA-7 kaplarının bulunduğu buzdolabı poşetleri üzerlerine %70 EtOH püskürtülerek steril edildi ve steril kabin içerisinde çalışılacak bölümden uzak bir köşede muhafaza edildi. Otoklavlanarak steril edilen besi ortamlarının yaklaşık 40 °C'ye kadar soğumaları beklendi. Soğuma işlemi için kapaklı şişelerin üzeri önce %70 EtOH püskürtülerek dezenfekte edildi ve steril kabin içerisinde muhafaza edildi. Ardından önceden belirlenmiş ve hazırlanmış olan stok BBD'leri filtre sterilizasyonuna tabi tutularak steril kabin içerisinde şişelerin içerisindeki besi ortamlarına aktarıldı. Şişeler içerisindeki besi ortamları köpürmeyecek şekilde çalkalanarak karıştırıldı. Karıştırılan besi ortamları şişelerin boğazı alevden geçirilerek Magenta GA-7 kaplarına her bir kaptaki 50 ml olacak şekilde aktarıldı ve kapların kapakları parafilm ile sarıldı. Bu işlemlerden sonra kaplar 3 gün inkübasyona bırakıldı. Herhangi bir çalışma hatasından dolayı kontamine olan ortamlar kullanılmadı.

### **3.9. Yetişkin *A. orientalis* Bireylerinden Eksplantların Alınması**

Koruma parselinde doğal olarak çoğalması sağlanan farklı lokalitelere ait popülasyonlardan Gazi Osman Paşa popülasyonu bireylerinin olgun gövdeleri budama makası ile kesilerek laboratuvar ortamına getirildi. Gövdelerin eşit uzunluk ve çapta olmalarına aynı zamanda hastalıksız olmalarına dikkat edildi. Nodlara zarar vermeyecek şekilde yapraklar petiolden kesilerek gövdeden uzaklaştırıldı. Gövdeler tozdan arındırmak için 5 dakika akan musluk suyuyla yıkandı.

### **3.10. Uygun Sterilizasyon Prosedürünün Oluşturulması ve Eksplantların Yüzeysel Sterilizasyonu**

Ön yıkama işleminin ardından gövdeler 4-5 nod içeren 5-6 cm uzunluğunda parçalara ayrıldı. Her bir gövde parçası akan musluk suyu altında 15 dakika boyunca yıkandı. Eksplantların yüzeysel sterilizasyonunda %70 EtOH ve ticari çamaşır suyu kullanıldı. Uygun bir sterilizasyon prosedürünün geliştirilmesi için bahsedilen sterilantların içinde çeşitli süreler boyunca eksplantlar bekletildi (Tablo 3.6).

Tablo: 3.6: Eksplantların yüzey sterilizasyonu için denenen çeşitli uygulamalar

Eksplant	% Etil alkol - Süre	% Sodyum hipoklorit - Süre
Gövde (En az 1 nodlu)	70 - 2 dk	0,5 - 3 dk
	70 - 2 dk	0,5 - 5 dk
	70 - 2 dk	0,75 - 5 dk
	70 - 2 dk	0,5 - 9 dk
	70 - 2 dk	0,75 - 11 dk
	70 - 2 dk	0,5 - 11 dk
	70 - 2 dk	0,75 - 13 dk

Ticari çamaşır suyu ile hazırlanan ana sterilant çözeltisinin içerisine bir tamlı Tween 20 damlatıldı. Denemelerde her bir konsantrasyon ve süre için 8-10 adet eksplant kullanıldı. Yüzey sterilizasyonu yapılan eksplantlar steril distile sudan 3 defa geçirildi. Ardından eksplantlar üzerlerindeki fazla suyun alınması için steril kurutma kağıtları içeren kesme tablasına yetleştirilerek uygun boyutlarda kesilmeye hazır hale getirildi.

### 3.11. Bitki Yetiştirme Kabininin İklimsel Şartları

Kültüre alınan eksplantlar için kültür periyodu boyunca Sanyo MCR-351H model bitki büyütme kabini kullanıldı (Şekil 3.1).



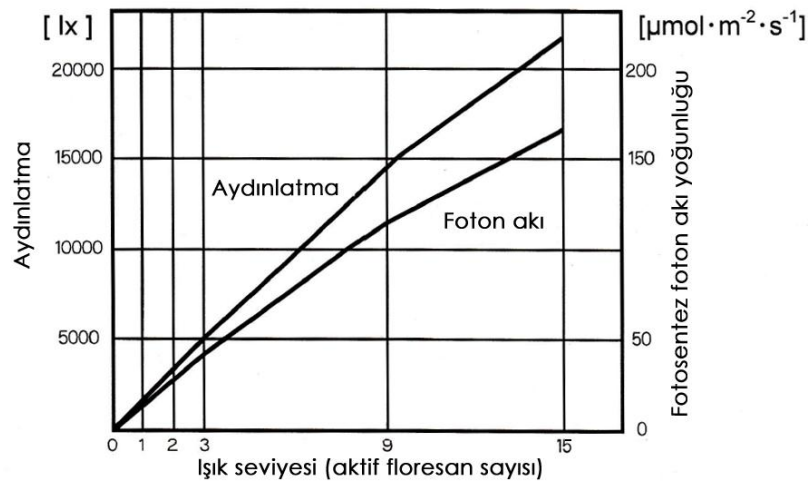
Şekil 3.1: Bitki büyütme kabininin görünümü

Kabin, ışıklanma süresi, ışık şiddeti, nispi nem ve sıcaklık kontrolü özelliğine sahiptir. Kültür ortamının sıcaklık derecesi ve nispi nem yüzdesi bitkinin doğal yayılış gösterdiği Balıkesir'in iklimi de gözönüne alınarak oluşturuldu. Kabin içi sıcaklık  $23 \pm 0,5$  °C ve nispi nem %65 olarak ayarlandı. Işıklandırma ise 16 saat ışıklı 8 saat karanlık periyoda göre ayarlandı. Gün ışığını ve gün içinde değişen ışık şiddetini yansıtması açısından kabin içi ışıklandırma yoğunluğu zaman periyoduna göre 3 kademe olarak ayarlandı (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: Işıklandırma kademelerine göre aktif floresan lamba sayıları

Kademe	Aktif floresan lamba sayısı
LS 0	0
LS 1	1
LS 2	2
LS 3	3
LS 4	9
LS 5	15

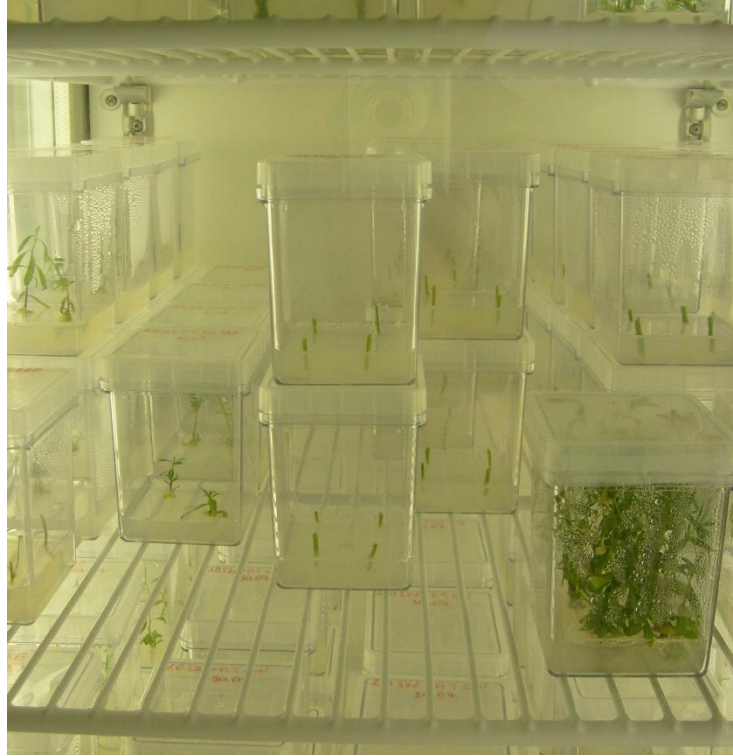
Sabah 05:00'dan 12:00'a kadar olan 7 saatlik zaman diliminde cihazın LS 3 kademesi, 12:00'dan 16:00'a kadar olan 4 saatlik zaman diliminde cihazın LS 4 kademesi, 16:00'dan 21:00'a kadar olan 5 saatlik zaman diliminde ise cihazın LS 3 kademesi ve 21:00'dan sabah 05:00'a kadar olan 8 saatlik zaman diliminde ise cihazın LS 0 kademesi kullanıldı. Işık yoğunluğu her kademe de cihaz tarafından otomatik olarak ayarlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Kabindeki çeşitli ışıklandırma seviyelerine göre ışık şiddeti

### 3.12. Eksplantların Besi Ortamlarında Kültüre Alınması

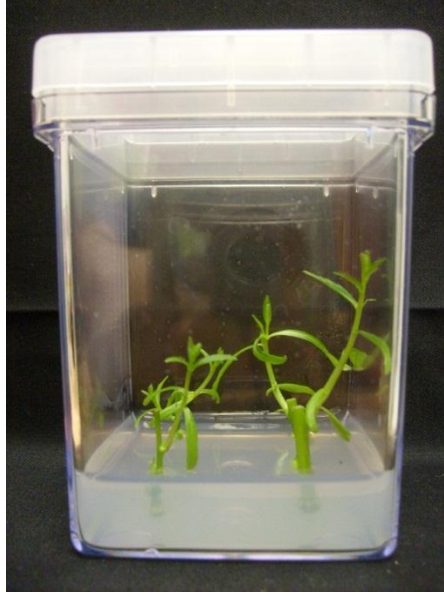
Yüze sterilizasyonu sonucunda yüzeyleri steril edilen 4-5 nod içeren gövde parçalarının uç kısımlarında sterilantların dokunun içine nüfuz etmesi sebebiyle meydana gelen beyaz kısımlar kesme tablasında kesilerek ana eksplanttan ayrıldı ve ana eksplant her parçada bir nod olacak şekilde parçalara bölündü. Kesme işlemi yapılırken her parçanın eşit uzunlukta olmasına dikkat edildi. Parçalar kesildikten sonra jel içerisinde kalacak kısımların eşit olmasına dikkat edilerek, dikey olarak kültür kaplarındaki besi ortamlarına yerleştirildi. Her bir kültür kabında olgun bitkiden alınmış 4 adet eksplant kültüre alındı (Şekil 3.3). Toplam 51 farklı besi ortamının bulunduğu ilk kısım denemeler için her bir kültür kabında 4 eksplant ve her tekrar balına 8 eksplant kültüre alındı. İlk kısım denemeler 2 tekrar halinde tasarlandı. İlk kısım denemelerden elde edilen veriler ışığında oluşturulan ikinci kısım denemede ise ilk denemelerde 3 BBD kombinasyonunda en fazla sürgün uzunluğuna ulaşılan 3 er ortam kullanıldı. İkinci kısım denemelerde her kültür kabında 10 eksplant kültüre alındı ve denemeler 3 tekrarlı tasarlandı. Sürgün gelişimi ve köklendirme aşamaları için kültür periyodu 30 gün olarak belirlendi.



Şekil 3.3: Kültüre alınan eksplantlar

### 3.12.1. Olgun bitki eksplantlarından rejenere olan sürgün uzunluklarının ölçümü

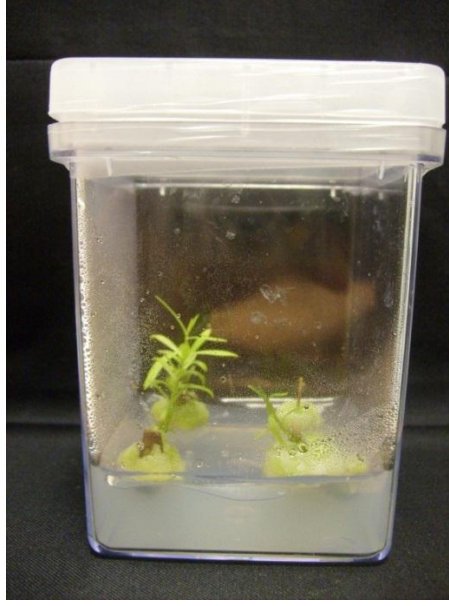
Eksplantlar kültüre alındıktan 30 gün sonra kültür kapları açılarak sürgün boylarının ölçümleri yapıldı. Bu ölçüm işlemi için kültür kapları üzerlerine %70 EtOH püskürtüldükten sonra steril kabin içerisine alındı. Bek alevinin yanında kültür kabının kapağı açıldıktan sonra steril bir pens ile kesme tablasına yetleştirildi. Kesme tablası içerisine yerleştirilmiş olan steril metal cetvel yardımıyla nodlardan rejenere olan sürgünlerin boy uzunlukları ölçüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Nodlardan rejenere olan sürgünler

### 3.12.2. Kallus ağırlıklarının tartımı

Kültüre alınan eksplantların nodlarından rejenere olan sürgünlerin boylarının ölçülmesinin ardından bu sürgünler kesilerek köklendirme ortamlarına veya sürgün çoğaltımı için hazırlanan ortamlara aktarıldı. Kalan nodal eksplantlarda kültür süresince oluşmuş olan kalluslar eksplanttan ayrılarak yaş ağırlıkları tartıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Kültür ortamında oluşan kalluslar

### **3.12.3. En uzun sürgünlerin oluştuğu besi ortamlarının belirlenmesi**

Ölçülen birincil sürgün uzunlukları karşılaştırıldı. Ortalama ve standart sapmaları hesaplandı. Elde edilen verilere göre 2,4-D + BAP, IAA + BAP, IAA + Kn kombinasyonlarından oluşan denemelerde her kombinasyonda en fazla sürgün uzunluğunun bulunduğu üç besi ortamı seçildi. Bu besi ortamları desteklendikleri BBD konsantrasyonları değiştirilmeden tekrar hazırlandı.

### **3.12.4. Seçilen besi ortamlarında sürgünlerin alt kültürlere alınması**

En fazla sürgün uzunluğunun elde edildiği ortamlar hazırlandıktan sonra çeşitli konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarında ve önceki ortamlarda çoğaltılmış olan sürgünler kabindeki kesme tablasında her biri bir nod içeren eşit boyda parçalara ayrıldı. Bu parçalar eksplant olarak kullanılarak belirtilen ortamlarda her bir kültür kabında 10 eksplant olacak şekilde kültüre alındı. Bu denemeler 3 tekrarlı olarak tasarlandı. Eksplantlar besi ortamına dik olarak yerleştirildi. Kültür periyodu 30 gün olarak belirlendi.

### 3.12.5. Alt kültürlerdeki sürgün uzunluklarının ölçümü

Kültür periyodunun sonunda kültür kapları fotoğrafları çekildikten sonra steril kabin içerisine alındı. Kabine alınmadan önce üzerlerine %70 EtOH püskürtülerek steril edildi. Sürgünlerin boyları kesme tablasındaki metal cetvel yardımıyla ölçüldü. Ölçümleri tamamlanan sürgünler köklendirme ortamlarına aktarıldı.

### 3.12.6. Alt kültürlerdeki kallus miktarlarının ölçümü

Sürgünler ayrıldıktan sonra kalan nodal eksplantlarda kültür süresince oluşmuş olan kalluslar eksplanttan ayrılarak yaş ağırlıkları tartıldı. Bu işlem kallusların kurummasına izin verilmeden hızlı bir şekilde yapıldı.

### 3.13. Sürgünlerin Köklendirme Ortamlarına Aktarımı

Sürgünler rejenere oldukları noddan kesilip ayrılarak çeşitli IAA ve IBA konsantrasyonlarıyla desteklenen ortamlarda veya bazal MS ile ½MS ortamlarında köklendirilmek üzere kültüre alındı. Her bir kültür kabına 5 adet sürgün dikey şekilde yerleştirildi (Şekil 3.6). Denemeler 3 tekrar olarak tasarlandı ve denemelerin her tekrarında 10 sürgün kullanıldı. Köklendirme periyodu 30 gün olarak belirlendi.



Şekil 3.6: Kültür periyodunun sonunda köklendirme ortamı ve kökler

### 3.13.1. Kallus oluşumunun ve kök sayılarının belirlenmesi

Sürgünlerin köklendirme ortamlarına aktarılmalarının ardından 30 gün sonra sürgünlerde köklenmenin ve köklerin oluştuğu bölgede kallus oluşumunun olup olmadığı belirlendi. Sürgünlerden oluşan kökler sayıldı ve kaydedildi. En sık ve uzun kök oluşturan ortamlar belirlendi.

### 3.13.2. Kök uzunluklarının ölçümü

Kültür periyodunun sonunda tamamen rejenerasyonu gerçekleşen bitkicikler kültür kaplarından çıkarılarak köklerin etrafında kalan besi ortamı kalıntıları distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Temizlenen köklerin uzunlukları ölçüldü. Her sürgünden kaç adet kök oluştuğu ve oluşan köklerin uzunlukları kaydedildi.

### 3.14. Tam Rejenerasyonu Gerçekleşen Bitkilerin Toprağa Aktarımı

Kökler tamamen temizlendikten sonra fotoğraflandı (Şekil 3.7) ve torf toprağı içeren saksılara dikildi.



Şekil 3.7: Besi ortamından çıkarıldıktan sonra bitkiciğın görünümü



### 3.14.1. Bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırılması (Aklimatizasyon)

Aklimatizasyon çalışmaları 3 basamaklı olarak yürütüldü. Birinci basamakta köklendirme ortamlarında kültür periyodunun son üç günü kültür kaplarının kapakları yarım açılarak kapların içerisindeki nem oranının kabinin nispi nem oranı olan %65 seviyesine çekilmesi sağlandı. İkinci aşamada bitkiler toprağa aktarıldıktan sonra saksıların üzerlerine şeffaf buzdolabı poşetleri geçirilerek dış ortama çıkarılan bitkinin birden su kaybetmesinin önüne geçildi. Üçüncü aşamada bitkinin %37-39 olan dış ortam nemine adaptasyonu için poşetlerin üst köşe kısımları kesildi ve hava sirkülasyonu sağlandı. Bitki böylece dış ortam nemine tam adapte edildi. Bitkiler bu aklimatizasyon süresince ışıklandırılmalı raflarda 16 saat ışıklı 8 saat karanlık ışıklandırma periyodunda tutuldu (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: Başarılı bir şekilde aklimatize olmuş bir *A. orientalis* bitkisi

### **3.15. Verilerin İstatistiksel Yönden Değerlendirilmesi**

Koruma parselinde bulunan olgun bitkilerden elde edilen eksplantlarla yapılan denemeler 2 tekrarlı ve her tekrarda 8 eksplant kullanılarak, *in vitro* rejenerasyonu gerçekleşen genç sürgünlerden alınan eksplantlarla yapılan denemeler ise 3 tekrarlı ve her tekrarda 10 eksplant kullanılarak yapıldı. Denemeler, tesadüf blokları deneme deseni kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen verilere ANOVA testi uygulanarak ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ayrıldı. Bu istatistik testleri SPSS 19 paket istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Eksplantlarının Sterilizasyonu ve Sterilizasyon Başarısı

Tez çalışmasının ilk aşamasında bitki doku kültürlerindeki en temel sorunlarından biri olan eksplant kaynaklı kontaminasyon probleminin aşılması amaçlandı. Literatürde *A. orientalis*'in olgun gövdelerinin sterilizasyonuna ait denenmiş herhangi bir prosedür bulunmadığından eksplantların %70 EtOH ile ön sterilizasyona tabi tutulduğu ve ana sterilant olarak çeşitli konsantrasyonlarda Sodyum hipoklorit'in kullanıldığı denemeler planlandı. Denemelerde gövde eksplantları %70 EtOH içerisinde 2 dakika, %0,5 veya %0,75 NaOCl (%15 ticari çamaşır suyu) içerisinde 3, 5, 9, 11 veya 13 dakika boyunca bekletildi. Sterilizasyon işlemleri biten eksplantlar herhangi bir BBD ile desteklenmemiş (bazal) MS besin ortamında kültüre alındı. Kültür başlangıcını takiben 10 gün sonunda besin ortamlarında oluşan eksplant kaynaklı kontaminasyon oranları belirlenerek en uygun sterilizasyon prosedürü oluşturuldu. En yüksek sterilizasyon başarısına (%90) eksplantların %70 etil alkolde 2 dakika ardından %15 ticari çamaşır suyunda 11 dakika bekletildiği denemelerde ulaşıldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Gövde eksplantlarında sterilizasyon denemeleri ve başarıları

Eksplant	% Etil alkol – Süre (dk)	% Sodyum hipoklorit Süre (dk)	% Sterilizasyon başarısı*
Gövde (En az 1 nodlu)	70 - 2	0,5 - 3	12,5 (1/8)
	70 - 2	0,5 - 5	37,5 (3/8)
	70 - 2	0,75 - 5	50 (4/8)
	70 - 2	0,5 - 9	60 (6/10)
	70 - 2	0,75 - 11	90 (9/10)
	70 - 2	0,5 - 11	70 (7/10)
	70 - 2	0,75 - 13	70 (7/10)

\* Kontamine olmayan ve sterilizasyondan sonra canlı kalan eksplant sayısı

## **4.2. Olgun Gövde Eksplantlarının Kullanıldığı Kültür Denemelerine Ait Bulgular**

### **4.2.1. Olgun gövde eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine farklı BBD kombinasyonu ve konsantrasyonlarının etkileri**

Bölüm 3.6'daki Tablo 3.3'de verilen besi ortamlarında kültüre alınmış olgun gövde eksplantlarının aksillar tomurcuklarından rejenere olan sürgünlerin boy uzunlukları ölçüldü. Kültüre alınan eksplant sayıları, bu eksplantlarının kaçının uyarıldığı yani kaçından sürgün rejenerasyonu görüldüğü, uyarılan eksplantların toplam eksplant sayısına oranının yüzde olarak ifadesi, her bir besi ortamında elde edilen toplam sürgün sayısı ve eksplant başına düşen sürgün sayısı hesaplandı.

#### **4.2.1.1. Farklı 2,4-D + BAP konsantrasyonlarının etkileri**

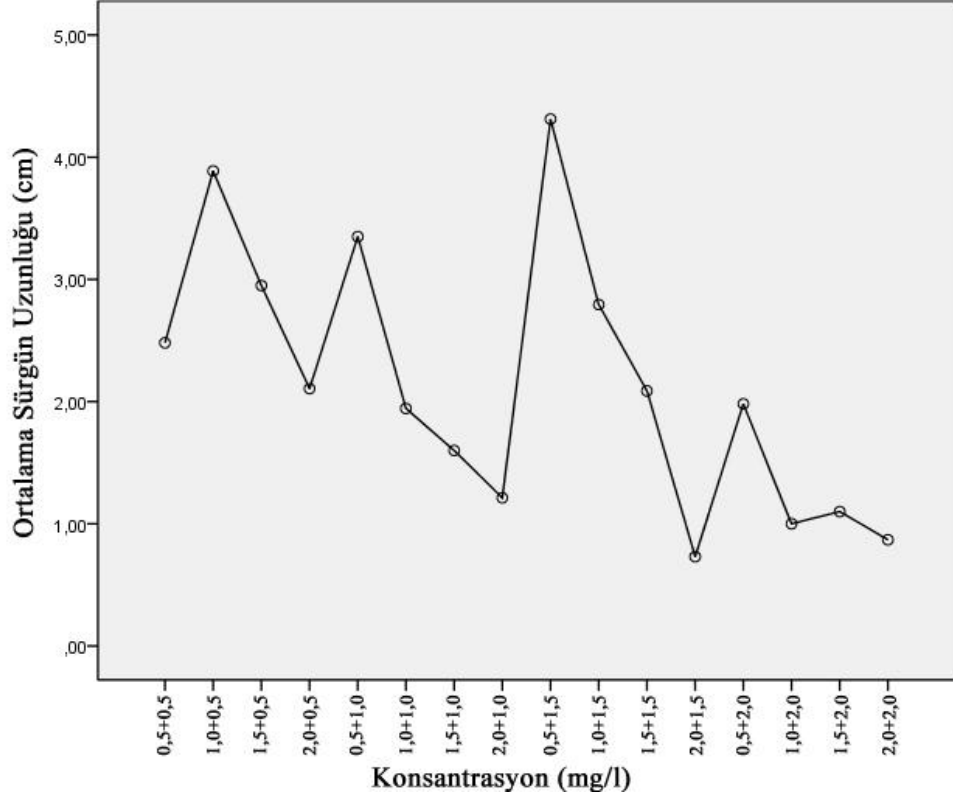
Deneilerin sonucunda kullanılan eksplantların tümünden sürgün rejenerasyonunun görüldüğü besi ortamının yalnızca MS9 olduğu görülmektedir. Başka bir ifadeyle bu konsantrasyonda kültüre alınan eksplantların tümü (%100) uyarılmıştır. En düşük sürgün rejenerasyonu oranı (%37,5) ve en düşük ortalama sürgün uzunluğu MS12 besi ortamında bulunmaktadır. En yüksek ortalama sürgün uzunlukları sırasıyla MS9 (4,31 cm), MS2 (3,89 cm) ve MS5 (3,35 cm) besi ortamlarında bulunmuştur. Uyarılan eksplant başına düşen sürgün sayıları incelendiğinde ise ilk sırada MS13 (2,00) görülürken ikinci sırayı MS15 (1,70) besi ortamı almaktadır. Üçüncü sırayı ise MS2 (1,63) ve MS14 (1,63) birlikte paylaşmaktadırlar. Ortalama sürgün uzunluklarının değişimine bakıldığında, MS2 besi ortamı haricindeki diğer besi ortamlarında 2,4-D konsantrasyonu arttıkça ortalama sürgün uzunluğunun azaldığı söylenebilir (Tablo 4.2). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.2: 2,4-D + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E**	Ort. Sürgün Uzunluğu (cm) ± std	Sürgün Sayısı	S.S / U.E**
MS1 - 0,5 + 0,5	16	13	81,25	2,48 <sup>abcd</sup> ± 0,31	13	1,00
MS2 - 1,0 + 0,5	16	8	50	3,89 <sup>ab</sup> ± 0,74	13	1,63
MS3 - 1,5 + 0,5	16	11	68,75	2,95 <sup>abcd</sup> ± 0,23	11	1,00
MS4 - 2,0 + 0,5	16	11	68,75	2,11 <sup>abcd</sup> ± 0,36	12	1,09
MS5 - 0,5 + 1,0	16	12	75	3,35 <sup>abc</sup> ± 0,16	18	1,50
MS6 - 1,0 + 1,0	16	9	56,25	1,94 <sup>abcd</sup> ± 0,49	10	1,10
MS7 - 1,5 + 1,0	16	9	56,25	1,60 <sup>bcd</sup> ± 0,30	14	1,56
MS8 - 2,0 + 1,0	16	9	56,25	1,21 <sup>cd</sup> ± 0,05	14	1,56
MS9 - 0,5 + 1,5	16	16	100	4,31 <sup>a</sup> ± 0,14	19	1,19
MS10 - 1,0 + 1,5	16	13	81,25	2,79 <sup>abcd</sup> ± 0,22	14	1,08
MS11 - 1,5 + 1,5	16	13	81,25	2,09 <sup>abcd</sup> ± 0,29	13	1,00
MS12 - 2,0 + 1,5	16	6	37,5	0,73 <sup>d</sup> ± 0,19	6	1,00
MS13 - 0,5 + 2,0	16	12	75	1,98 <sup>abcd</sup> ± 0,03	24	2,00
MS14 - 1,0 + 2,0	16	8	50	1,00 <sup>cd</sup> ± 0,23	13	1,63
MS15 - 1,5 + 2,0	16	10	62,5	1,10 <sup>cd</sup> ± 0,34	17	1,70
MS16 - 2,0 + 2,0	16	7	43,75	0,87 <sup>cd</sup> ± 0,03	7	1,00

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant - S.S / U.E: Sürgün Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.1: Ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği (2,4-D + BAP)

Yapılan gözlemlerde MS1 ve MS8 ortamlarında rejenere olan sürgünlerin kimi yapraklarının orta damarlarının yaprağın kenara yakın kısımlarına kaydığı, yaprakların kıvrık veya orak şeklinde diğer yapraklara oranla oldukça uzun bir yapıda oldukları görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Kültürdeki anormal bir yaprak görüntüsü

MS7 ortamında bir noddan birden fazla sürgünün rejenerasyonu not edilmiştir. Bu durumun, rejenere olan ana sürgün uzunluğunun çok kısa olması ve dolayısıyla üzerindeki nodların birbirine son derece yakın yer almaları neticesinde bu ana sürgündeki nodlardan rejenere olan yan sürgünlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Bir noddan çoklu sürgün rejenerasyonu (2,4-D + BAP)

Genel bir izlenim olarak 2,4-D + BAP kombinasyonu ile desteklenen besi ortamlarındaki eksplantlardan rejenere olan ana sürgünlerin internod uzunluklarının nispeten kısa olduğu fakat yan sürgünlerde internod uzunluklarının arttığı görülmüştür.

#### **4.2.1.2. Farklı IAA + BAP konsantrasyonlarının etkileri**

Denenen tüm konsantrasyonlarda sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu oranı (%93,75) MS22 besi ortamında, en düşük sürgün rejenerasyonu oranı ise (%43,75) MS21 besi ortamında bulunmuştur. En yüksek

ortalama sürgün uzunluğu MS25 (4,38 cm) ve en düşük ortalama sürgün uzunluğu MS21 (1,22 cm) besi ortamında bulunmaktadır. Uyarılan eksplant başına düşen sürgün sayılarına bakıldığında ilk sırada MS17 (1,92) görülürken ikinci sırayı MS27 (1,80), üçüncü sırayı ise MS21 (1,71) besi ortamı almaktadır. Ortalama sürgün uzunlukları MS22, MS24 ve MS32 besi ortamları haricinde IAA konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır (Tablo 4.3). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.4).

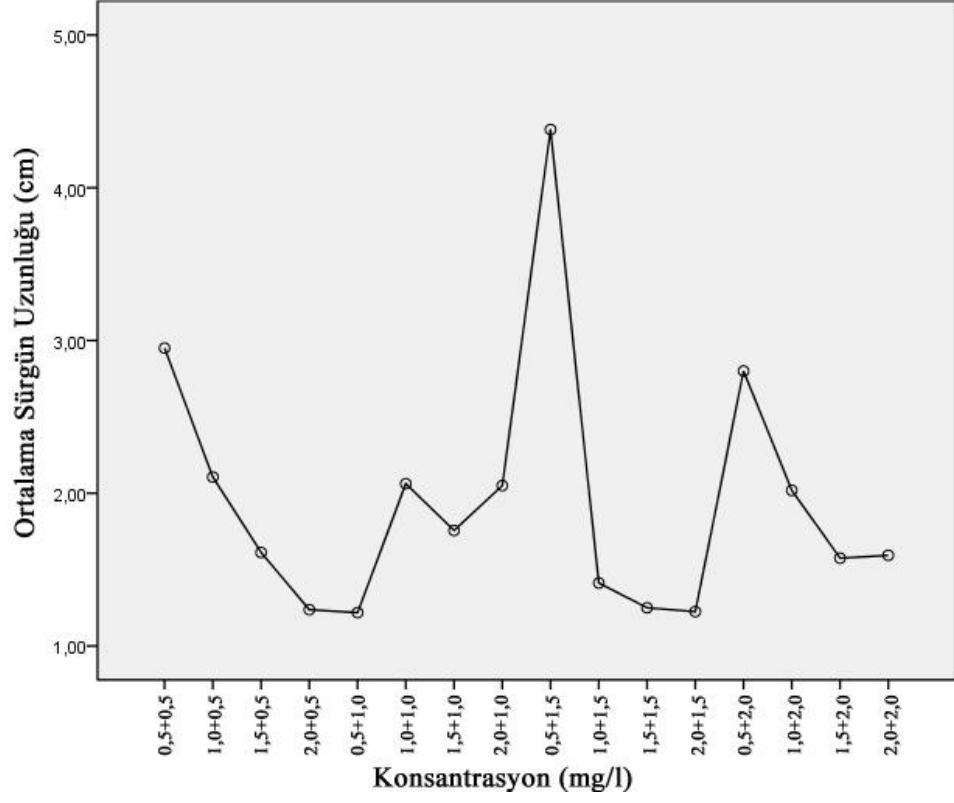


Tablo 4.3: IAA + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E** Ort.	Sürgün Uzunluğu (cm) ± std	Sürgün Sayısı	S.S / U.E**
MS17 - 0,5 + 0,5	16	12	75	2,95 <sup>a</sup> ± 0,28	23	1,92
MS18 - 1,0 + 0,5	16	11	68,75	2,11 <sup>bc</sup> ± 0,24	12	1,09
MS19 - 1,5 + 0,5	16	13	81,25	1,61 <sup>bc</sup> ± 0,53	13	1,00
MS20 - 2,0 + 0,5	16	14	87,5	1,24 <sup>c</sup> ± 0,28	20	1,43
MS21 - 0,5 + 1,0	16	7	43,75	1,22 <sup>c</sup> ± 0,17	12	1,71
MS22 - 1,0 + 1,0	16	15	93,75	2,06 <sup>bc</sup> ± 0,35	18	1,20
MS23 - 1,5 + 1,0	16	13	81,25	1,76 <sup>bc</sup> ± 0,27	18	1,38
MS24 - 2,0 + 1,0	16	12	75	2,05 <sup>bc</sup> ± 0,16	18	1,50
MS25 - 0,5 + 1,5	16	11	68,78	4,38 <sup>a</sup> ± 0,34	12	1,09
MS26 - 1,0 + 1,5	16	8	50	1,41 <sup>bc</sup> ± 0,05	11	1,38
MS27 - 1,5 + 1,5	16	10	62,5	1,25 <sup>c</sup> ± 0,18	18	1,80
MS28 - 2,0 + 1,5	16	10	62,5	1,23 <sup>c</sup> ± 0,27	15	1,50
MS29 - 0,5 + 2,0	16	13	81,25	2,80 <sup>bc</sup> ± 0,12	22	1,69
MS30 - 1,0 + 2,0	16	11	68,75	2,02 <sup>bc</sup> ± 0,26	14	1,27
MS31 - 1,5 + 2,0	16	13	81,25	1,58 <sup>bc</sup> ± 0,21	20	1,54
MS32 - 2,0 + 2,0	16	10	62,5	1,59 <sup>bc</sup> ± 0,26	13	1,30

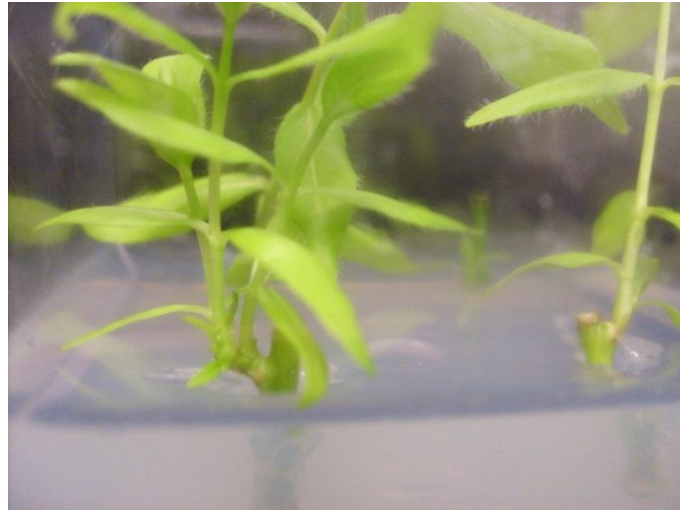
\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant - S.S / U.E: Sürgün Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.4: Ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği (IAA + BAP)

Bir noddan çoklu sürgün rejenerasyonu MS17 ve MS20 besi ortamlarında görülmüştür (Şekil 4.5). Buradaki durum 2,4-D + BAP kombinasyonunun MS7 ortamında görülen durumla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.5: Bir noddan çoklu sürgün rejenerasyonu (IAA + BAP)

Çeşitli IAA + BAP konsantrasyonları ile desteklenmiş besi ortamlarının kullanıldığı bu denemelerde oluşan sürgünlerin yaprak yüzeylerinin diğer BBD kombinasyonları ile desteklenmiş besi ortamlarındaki eksplantlardan oluşan sürgünlerin yaprak yüzeylerine oranla daha geniş oldukları gözlemlenmiştir.

#### **4.2.1.3. Farklı IAA + Kinetin konsantrasyonlarının etkileri**

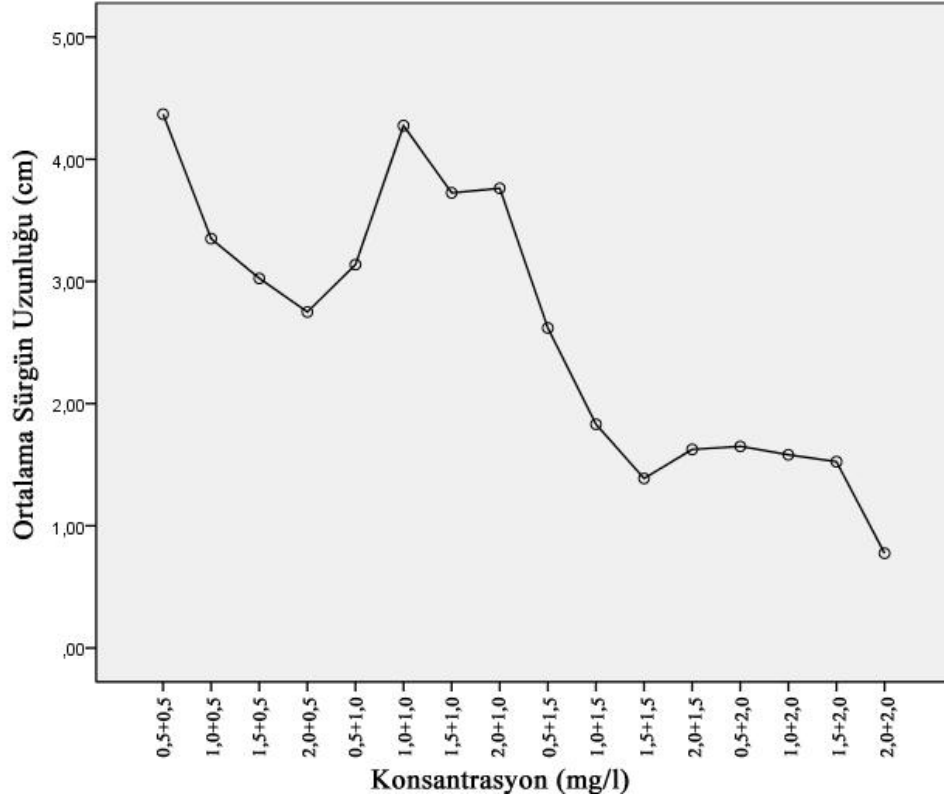
Denemelerde kullanılan tüm konsantrasyonlarda sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu oranı (%100) MS40 besi ortamında, en düşük sürgün rejenerasyonu oranı ise (%62,50) MS37, MS38 ve MS47 besi ortamlarında bulunmuştur. En yüksek ortalama sürgün uzunluğu MS33 (4,37 cm) ve en düşük ortalama sürgün uzunluğu MS48 (0,78 cm) ortamından kaydedilmiştir. Uyarılan eksplant başına düşen sürgün sayıları incelendiğinde ilk sırada MS33 (1,13) görülürken diğer tüm besi ortamlarında aynı oranda (1,00) bulunmuştur. Genel bir yargı olarak, ortalama sürgün uzunlukları MS38 ve MS40 ve MS44 besi ortamları haricinde IAA konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır (Tablo 4.4). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil4.6).

Tablo 4.4: IAA + Kinetin kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamları - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E** Ort.	Sürgün Uzunluğu (cm) ± std	Sürgün Sayısı	S.S / U.E**
MS33 - 0,5 + 0,5	16	15	93,75	4,37 <sup>a</sup> ± 0,08	17	1,13
MS34 - 1,0 + 0,5	16	12	75	3,35 <sup>ab</sup> ± 0,11	12	1,00
MS35 - 1,5 + 0,5	16	12	75	3,03 <sup>abc</sup> ± 0,37	12	1,00
MS36 - 2,0 + 0,5	16	15	93,75	2,75 <sup>abc</sup> ± 0,04	15	1,00
MS37 - 0,5 + 1,0	16	10	62,5	3,14 <sup>abc</sup> ± 0,27	10	1,00
MS38 - 1,0 + 1,0	16	10	62,5	4,28 <sup>a</sup> ± 0,44	10	1,00
MS39 - 1,5 + 1,0	16	15	93,75	3,73 <sup>a</sup> ± 0,25	15	1,00
MS40 - 2,0 + 1,0	16	16	100	3,76 <sup>a</sup> ± 0,19	16	1,00
MS41 - 0,5 + 1,5	16	14	87,5	2,62 <sup>abc</sup> ± 0,40	14	1,00
MS42 - 1,0 + 1,5	16	12	75	1,83 <sup>bcd</sup> ± 0,33	12	1,00
MS43 - 1,5 + 1,5	16	14	87,5	1,39 <sup>cd</sup> ± 0,07	14	1,00
MS44 - 2,0 + 1,5	16	14	87,5	1,63 <sup>bcd</sup> ± 0,07	14	1,00
MS45 - 0,5 + 2,0	16	15	93,75	1,65 <sup>bcd</sup> ± 0,09	15	1,00
MS46 - 1,0 + 2,0	16	12	75	1,58 <sup>cd</sup> ± 0,04	12	1,00
MS47 - 1,5 + 2,0	16	10	62,5	1,53 <sup>cd</sup> ± 0,41	10	1,00
MS48 - 2,0 + 2,0	16	12	75	0,78 <sup>d</sup> ± 0,25	12	1,00

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant - S.S / U.E: Sürgün Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.6: Ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği (IAA + Kinetin)

Yapraklarda önceki besi ortamlarında rastlanan orta damarın yaprak kenarına yaklaşması, aşırı uzun yaprak boyu, orak veya kıvrık yaprak şekli gibi herhangi bir anormallik gözlemlenmemiştir. Ayrıca IAA + Kinetin kombinasyonunun denenen tüm konsantrasyonlarında uyarılan eksplant başına düşen sürgün sayısı neredeyse aynıdır. Uyarılan eksplant başına düşen sürgün sayısı MS33 besi ortamında 1,13 olarak bulunmasına karşın denenen diğer tüm ortamlarda bu oran 1,00 bulunmuştur. Bu durumda mevcut kombinasyonun denenen konsantrasyonlarının *Amsonia orientalis*'in *in vitro* çoğaltımında sürgün sayısına etkisinin olmadığı veya çok az olduğu düşünülmektedir. Ayrıca rejenere olan sürgünlerin internodları diğer kombinasyonlardaki sürgünlerin internodlarına göre genellikle daha uzun olarak gözlemlenmiştir. Bu durum dolaylı olarak her bir sürgünde daha az sayıda nod bulunmasına ve bununla beraber sürgünlerdeki yaprak sayılarının azalmasına neden olmaktadır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Sürgünlerin genel görünüşü (IAA + Kn)

#### **4.2.2. Farklı BBD kombinasyonu ve konsantrasyonlarının gövde eksplantlarında kallus oluşumu üzerine etkilerine ait bulgular**

Sürgün gelişimi için kültüre alınan olgun bitki eksplantlarında oluşan kallus miktarları ölçülmüştür. Denemelerde kullanılan eksplant sayısı, uyarılan (kallus oluşturan) eksplant sayısı verilmiş ve o besi ortamında kültüre alınan eksplant sayısına oranı hesaplanmıştır. Ayrıca kallusun renk ve yapısı da kaydedilmiştir.

##### **4.2.2.1. Farklı 2,4-D + BAP konsantrasyonlarının etkileri**

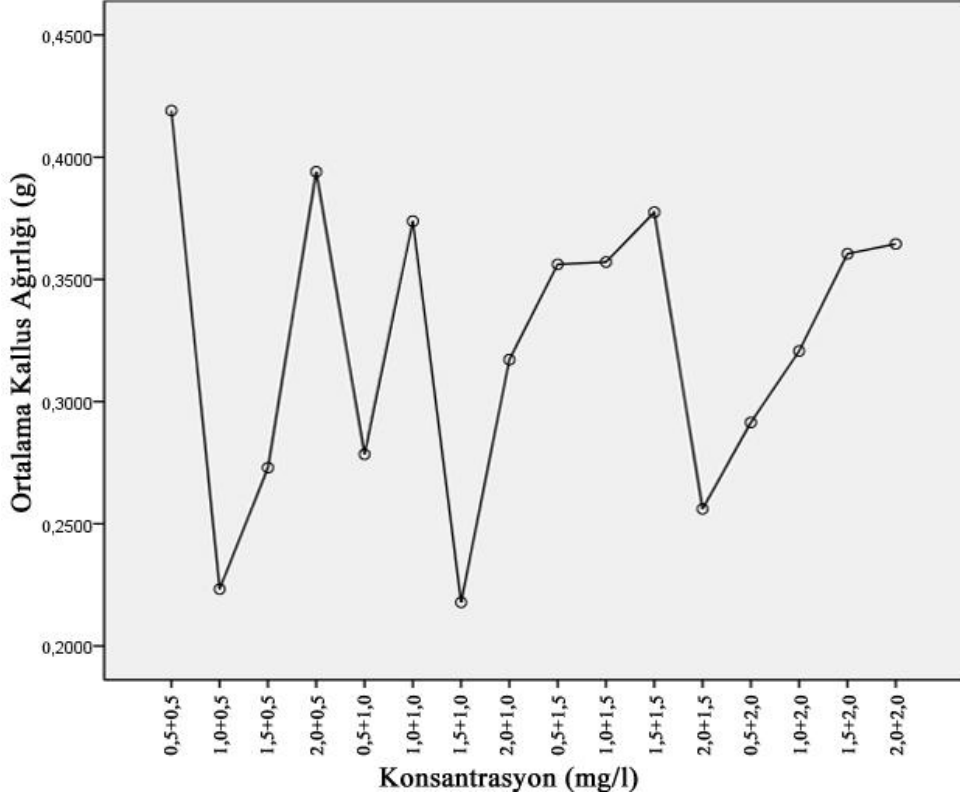
Bu kombinasyonun Tablo 3.3'de verilen konsantrasyonları ile yapılan denemelerde en yüksek uyarılan eksplant oranı (%100) MS1, MS2, MS3, MS4, MS6, MS7, MS16 besi ortamlarında, en düşük oran ise (%68,75) MS12 ortamında bulunmuştur. En fazla kallus ağırlığı (0,42 g) MS1 ortamında, en az kallus ağırlığı (0,22 g) ise MS2 ile MS7 ortamlarında ölçülmüştür (Tablo 4.5). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.8).

Tablo 4.5: 2,4-D + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E**	Ort. Kallus Ağırlığı (g) ± std	Kallus Yapısı
MS1 - 0,5 + 0,5	16	16	100	0,42 <sup>a</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS2 - 1,0 + 0,5	16	16	100	0,22 <sup>a</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS3 - 1,5 + 0,5	16	16	100	0,27 <sup>a</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS4 - 2,0 + 0,5	16	16	100	0,39 <sup>a</sup> ± 0,07	Koyu yeşil - Sert
MS5 - 0,5 + 1,0	16	13	81,25	0,28 <sup>a</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS6 - 1,0 + 1,0	16	16	100	0,37 <sup>a</sup> ± 0,03	Koyu yeşil - Sert
MS7 - 1,5 + 1,0	16	16	100	0,22 <sup>a</sup> ± 0,07	Açık yeşil - Sert
MS8 - 2,0 + 1,0	16	14	87,5	0,32 <sup>a</sup> ± 0,09	Koyu yeşil - Sert
MS9 - 0,5 + 1,5	16	15	93,75	0,36 <sup>a</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS10 - 1,0 + 1,5	16	13	81,25	0,36 <sup>a</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS11 - 1,5 + 1,5	16	13	81,25	0,38 <sup>a</sup> ± 0,10	Koyu yeşil - Sert
MS12 - 2,0 + 1,5	16	11	68,75	0,26 <sup>a</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Sert
MS13 - 0,5 + 2,0	16	15	93,75	0,29 <sup>a</sup> ± 0,03	Koyu yeşil - Sert
MS14 - 1,0 + 2,0	16	13	81,25	0,32 <sup>a</sup> ± 0,05	Koyu yeşil - Sert
MS15 - 1,5 + 2,0	16	13	81,25	0,36 <sup>a</sup> ± 0,03	Koyu yeşil - Sert
MS16 - 2,0 + 2,0	16	16	100	0,36 <sup>a</sup> ± 0,02	Açık yeşil - Sert

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.8: Ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği (2,4-D + BAP)

#### 4.2.2.2. Farklı IAA + BAP konsantrasyonlarının etkileri

Farklı IAA + BAP konsantrasyonları ile yapılan denemelerde en yüksek uyarılan eksplant oranı (%100) MS23, MS25 ve MS28 besi ortamlarında, en düşük oran ise (%43,75) MS21 ortamında bulunmuştur. En fazla kallus ağırlığı (0,09 g) MS22 ortamında, en az kallus ağırlığı (0,01 g) ise MS21 ortamında ölçülmüştür (Tablo 4.6). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.9).

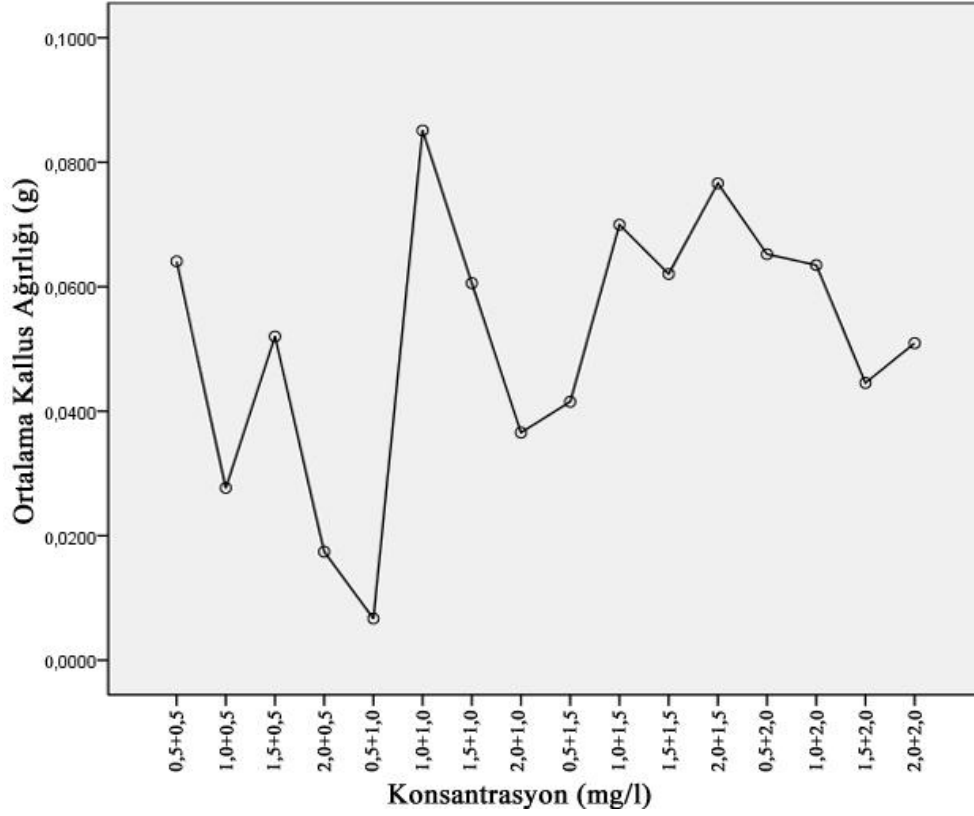


Tablo 4.6: IAA + BAP kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E**	Ort. Kallus Ağırlığı (g) ± std	Kallus Yapısı
MS17 - 0,5 + 0,5	16	15	93,75	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,00	Açık yeşil - Sert
MS18 - 1,0 + 0,5	16	8	50	0,03 <sup>bcd</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS19 - 1,5 + 0,5	16	12	75	0,05 <sup>abcd</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS20 - 2,0 + 0,5	16	12	75	0,02 <sup>cd</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS21 - 0,5 + 1,0	16	7	43,75	0,01 <sup>d</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS22 - 1,0 + 1,0	16	15	93,75	0,09 <sup>a</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Sert
MS23 - 1,5 + 1,0	16	16	100	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS24 - 2,0 + 1,0	16	15	93,75	0,04 <sup>abcd</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS25 - 0,5 + 1,5	16	16	100	0,04 <sup>abcd</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS26 - 1,0 + 1,5	16	13	81,25	0,07 <sup>ab</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS27 - 1,5 + 1,5	16	14	87,5	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,01	Açık yeşil - Sert
MS28 - 2,0 + 1,5	16	16	100	0,08 <sup>ab</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Sert
MS29 - 0,5 + 2,0	16	12	75	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS30 - 1,0 + 2,0	16	15	93,75	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,00	Açık yeşil - Sert
MS31 - 1,5 + 2,0	16	13	81,25	0,04 <sup>abcd</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS32 - 2,0 + 2,0	16	13	81,25	0,05 <sup>abcd</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert

\*Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\*E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.9: Ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği (IAA + BAP)

#### 4.2.2.3. Farklı IAA + Kinetin konsantrasyonlarının etkileri

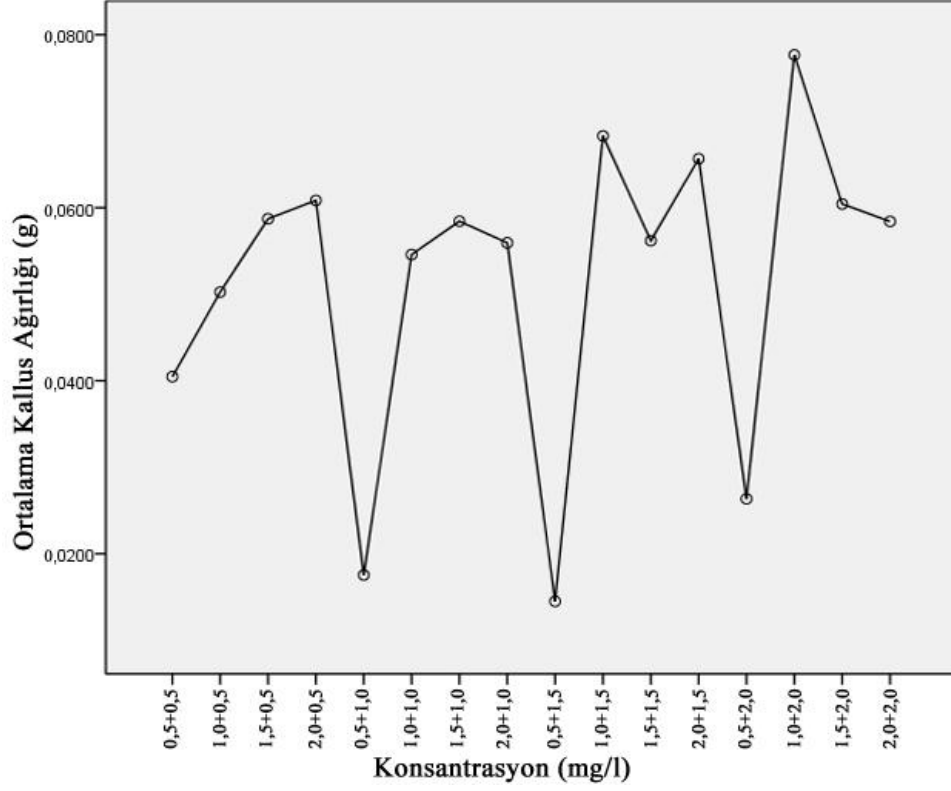
Denemelerde kullanılan IAA + Kn konsantrasyonları ile desteklenmiş besi ortamlarında en yüksek uyarılan eksplant oranı (%100) MS40, MS42, MS43 ve MS44 besi ortamlarında, en düşük oran ise (%37,50) MS41 ortamında bulunmuştur. En fazla kallus ağırlığı (0,08 g) 1,0 + 2,0 ortamında, en az kallus ağırlığı (0,01 g) ise MS46 ortamında ölçülmüştür (Tablo 4.7). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.10).

Tablo 4.7: IAA + Kinetin kombinasyonunun çeşitli konsantrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E**	Ort. Kallus Ağırlığı (g) ± std	Kallus Yapısı
MS33 - 0,5 + 0,5	16	15	93,75	0,04 <sup>abc</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS34 - 1,0 + 0,5	16	15	93,75	0,05 <sup>abc</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS35 - 1,5 + 0,5	16	14	87,5	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS36 - 2,0 + 0,5	16	13	81,25	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Kıvrılgan
MS37 - 0,5 + 1,0	16	11	68,75	0,02 <sup>c</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Sert
MS38 - 1,0 + 1,0	16	14	87,5	0,05 <sup>abc</sup> ± 0,01	Koyu yeşil - Sert
MS39 - 1,5 + 1,0	16	13	81,25	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Sert
MS40 - 2,0 + 1,0	16	16	100	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Sert
MS41 - 0,5 + 1,5	16	6	37,5	0,01 <sup>c</sup> ± 0,00	Koyu yeşil - Kıvrılgan
MS42 - 1,0 + 1,5	16	16	100	0,07 <sup>ab</sup> ± 0,01	Açık yeşil - Kıvrılgan
MS43 - 1,5 + 1,5	16	16	100	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,01	Açık yeşil - Sert
MS44 - 2,0 + 1,5	16	16	100	0,07 <sup>ab</sup> ± 0,02	Koyu yeşil - Sert
MS45 - 0,5 + 2,0	16	13	81,25	0,03 <sup>bc</sup> ± 0,01	Açık yeşil - Kıvrılgan
MS46 - 1,0 + 2,0	16	14	87,5	0,08 <sup>a</sup> ± 0,02	Açık yeşil - Sert
MS47 - 1,5 + 2,0	16	12	75	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,01	Açık yeşil - Sert
MS48 - 2,0 + 2,0	16	14	87,5	0,06 <sup>abc</sup> ± 0,01	Açık yeşil - Kıvrılgan

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.10: Ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği (IAA + Kn)

### 4.3. Genç Sürgün Eksplantlarının Kullanıldığı Denemelere Ait Bulgular

Olgun bitkilerden alınan eksplantlardan rejenere olan genç sürgünler kültüre alındı. Sürgün rejenerasyonu görülen (uyarılan) eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranı, ortalama sürgün uzunlukları, sürgün sayısı ve her bir eksplant başına düşen sürgün sayısı hesaplandı.

#### 4.3.1. Genç sürgün eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine seçilen besi ortamlarının etkileri

Denemelerde olgun bitki eksplantlarında en uzun sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besi ortamları kullanılmıştır. BAP ile desteklenmiş besin ortamlarındaki eksplantların tümü %100 oranıyla en yüksek uyarılma oranını yakalamıştır. En düşük uyarılma oranı (%76,67) ise MS40 besi ortamında görülmüştür. En fazla ortalama sürgün uzunluğu (3,24 cm) MS49 besi ortamında, en kısa ortalama sürgün uzunluğu ise (0,22 cm) MS2 besi ortamında ölçülmüştür.

Uyarılan eksplant başına düşen sürgün sayısı ise en yüksek (2,77) MS49 besi ortamında bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: MS49 besi ortamındaki sürgünlerin görünümü

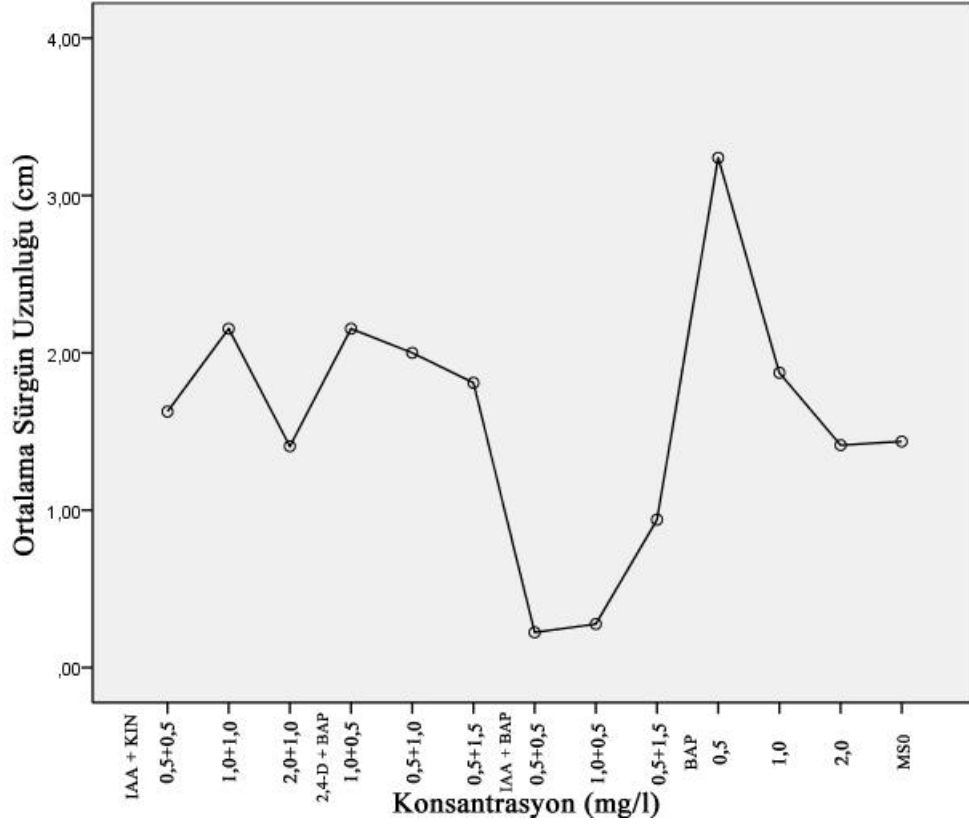
Bu oran aynı zamanda denemelerin tümünde ölçülen en yüksek orandır. Uyarılan eksplant başına düşen en düşük sürgün sayısı (1,00 cm) ise IAA + Kn kombinasyonu ile desteklenmiş her üç besin ortamında da görülmüştür. Diğer bir ifadeyle olgun eksplantlarla yapılan denemelere paralel olarak eksplant başına düşen en düşük sürgün sayısının görüldüğü besi ortamları IAA + Kn kombinasyonu ile desteklenen ortamlar olmuştur. Tek başına kullanılan BAP konsantrasyonları arttıkça eksplant başına düşen sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu azalmıştır (Tablo 4.8). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.12).

Tablo 4.8: Seçilen besi ortamlarının ortalama sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E**	Ort. Sürgün Uzunluğu (cm) ± std	Sürgün Sayısı	S.S / U.E**
MS33 - 0,5 + 0,5	30	30	100	1,63 <sup>bc</sup> ± 0,05	30	1,00
MS38 - 1,0 + 1,0	30	30	100	2,15 <sup>b</sup> ± 0,07	30	1,00
MS40 - 2,0 + 1,0	30	23	76,67	1,41 <sup>bc</sup> ± 0,06	33	1,10
MS2 - 1,0 + 0,5	30	25	83,33	0,22 <sup>d</sup> ± 0,02	30	1,00
MS5 - 0,5 + 1,0	30	27	90	0,28 <sup>d</sup> ± 0,01	30	1,00
MS9 - 0,5 + 1,5	30	28	93,33	0,94 <sup>cd</sup> ± 0,05	33	1,10
MS17 - 0,5 + 0,5	30	30	100	2,15 <sup>b</sup> ± 0,07	33	1,10
MS18 - 1,0 + 0,5	30	30	100	2,00 <sup>b</sup> ± 0,07	41	1,37
MS25 - 0,5 + 1,5	30	28	93,33	1,81 <sup>b</sup> ± 0,05	52	1,73
MS49 - 0,5	30	30	100	3,24 <sup>a</sup> ± 0,06	83	2,77
MS50 - 1	30	30	100	1,87 <sup>b</sup> ± 0,04	50	1,67
MS51 - 2	30	30	100	1,41 <sup>bc</sup> ± 0,07	33	1,10
MS0	30	28	93,33	1,44 <sup>bc</sup> ± 0,09	30	1,00

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında  $P < 0,01$  seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant - S.S / U.E: Sürgün Sayısı / Uyarılan Eksplant



Şekil 4.12: Seçilen besi ortamlarındaki ortalama sürgün uzunluklarının çizgi grafiği

#### 4.3.2. Seçilen besi ortamların genç sürgün eksplantlarında kallus oluşumu üzerine etkileri

Kültür periyodu sonunda, kullanılan genç sürgün eksplantlarından oluşan kallus miktarları ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Buna göre en fazla uyarılma oranına MS38 ve MS40 besi ortamlarında %100 olarak rastlanmıştır. Bu oran ayrıca MS2, MS17 ve MS50 ortamınlarında da %100 olarak bulunmuştur. En yüksek ortalama kallus ağırlığı olgun eksplantlarla gerçekleştirilen denemelerin sonuçlarına paralel olarak 2,4-D + BAP kombinasyonları ile desteklenen besi ortamlarında görülmüştür. MS9 besi ortamında en yüksek ortalama kallus ağırlığı (0,22 g) elde edilmiştir. En düşük ortalama kallus ağırlığı ise (0,01 g) herhangi bir BBD ile desteklenmemiş MS0 besi ortamında bulunmuştur (Tablo 4,9). Ortalama kallus ağırlıkları olgun eksplantlarla gerçekleştirilen denemelerdeki sonuçlarla paralellik göstermektedir. Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.13).

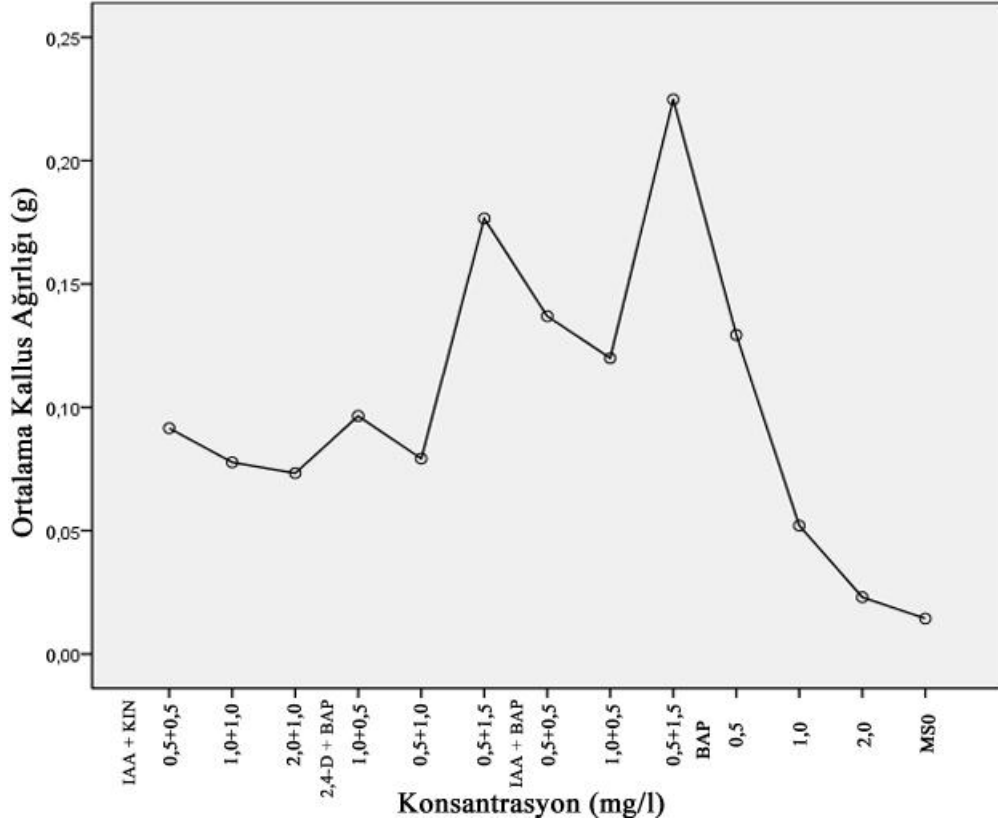
Tablo 4.9: Seçilen besi ortamlarının ortalama kallus ağırlığı ve yapısı üzerine olan etkilerine ait bulgular

	Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Sayısı	Uyarılan Eksplant	% E.S / U.E**	Ort. Kallus Ağırlığı (g) ± std	Kallus Yapısı
IAA + Kinetin	MS33 - 0,5 + 0,5	30	29	96,67	0,10 <sup>cd</sup> ± 0,00	Yeşil-Sert
	MS38 - 1,0 + 1,0	30	30	100	0,08 <sup>cd</sup> ± 0,00	Yeşil-Sert
	MS40 - 2,0 + 1,0	30	30	100	0,07 <sup>cd</sup> ± 0,00	Yeşil-Sert
2,4-D + BAP	MS2 - 1,0 + 0,5	30	30	100	0,14 <sup>bc</sup> ± 0,03	Yeşil-Sert
	MS5 - 0,5 + 1,0	30	27	90	0,12 <sup>bcd</sup> ± 0,01	Açık Yeşil-Sert
	MS9 - 0,5 + 1,5	30	28	93,33	0,22 <sup>a</sup> ± 0,02	Yeşil-Sert
IAA + BAP	MS17 - 0,5 + 0,5	30	30	100	0,10 <sup>cd</sup> ± 0,01	Yeşil-Sert
	MS18 - 1,0 + 0,5	30	28	93,33	0,08 <sup>cd</sup> ± 0,00	Yeşil-Sert
	MS25 - 0,5 + 1,5	30	29	96,67	0,18 <sup>ab</sup> ± 0,00	Yeşil-Sert
BAP	MS49 - 0,5	30	20	66,67	0,13 <sup>bc</sup> ± 0,01	Yeşil-Sert
	MS50 - 1	30	30	100	0,05 <sup>d</sup> ± 0,00	Açık Yeşil-Sert
	MS51 - 2	30	28	93,33	0,02 <sup>ef</sup> ± 0,00	Açık Yeşil-Sert
MS0	MS0	30	28	93,33	0,01 <sup>f</sup> ± 0,00	Açık Yeşil-Sert

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur

\*\* E.S / U.E: Eksplant Sayısı / Uyarılan Eksplant





Şekil 4.13: Seçilen besi ortamlarındaki ortalama kallus ağırlıklarının çizgi grafiği

#### 4.4. Sürgünlerin Köklendirilmesine Ait Bulgular

Elde edilen sürgünler köklendirme ortamlarında kültüre alındı. Kültür periyodu sonunda uyarılan sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranı (uyarılma oranı), ortalama kök uzunluğu, sürgün başına düşen ortalama kök sayısı ve sürgünlerin kallus oluşturma oranı ölçüldü.

##### 4.4.1. Farklı IAA konsantrasyonlarının etkileri

Denemeler sonucunda en yüksek uyarılma oranı (%100) MSk0, MSk1, MSk2 ve MSk3 besi ortamlarından elde edilmiştir. En düşük uyarılma oranı ise (%73,33) MSk4 ortamında bulunmuştur. En fazla ortalama kök uzunluğu (2,80 cm) MSk1 besi ortamında, en az ortalama kök uzunluğu ise (1,15 cm) ½MSk8 ortamında ölçülmüştür. Sürgün başına düşen en fazla ortalama kök sayısı (9,83) MSk3 ortamında en az ortalama kök sayısı (4,23) ise ½MSk0 ortamından elde edilmiştir.

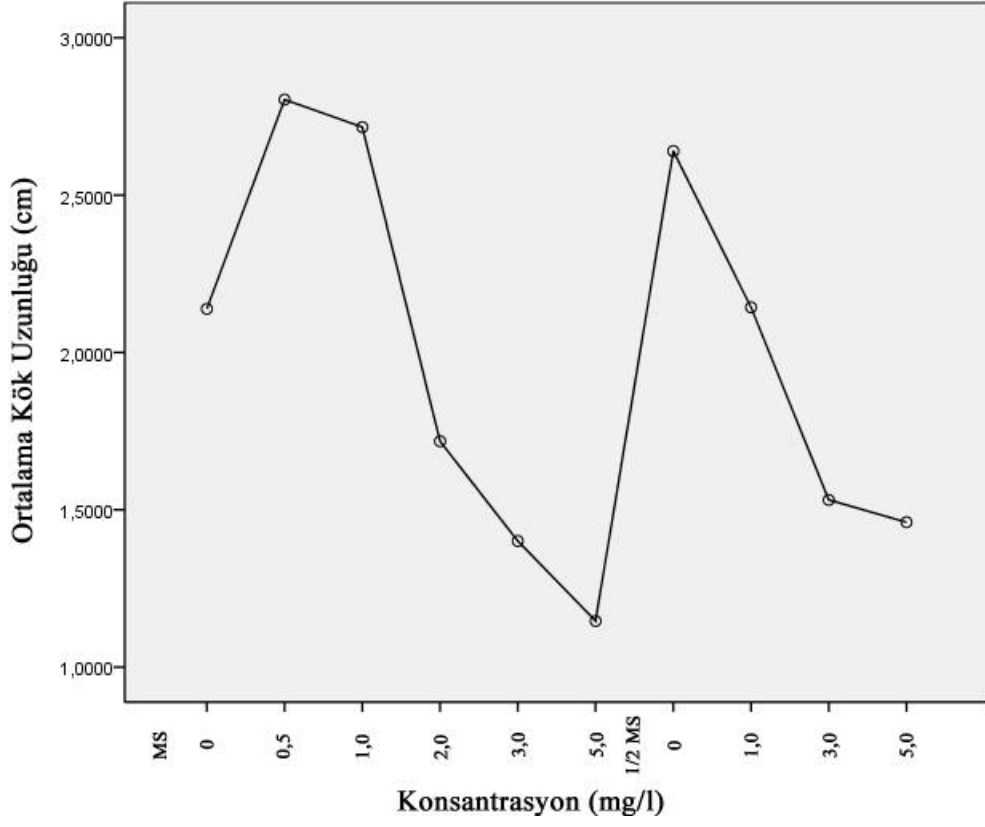
Kallus oluşum oranlarına bakıldığında en yüksek kallus oluşum yzdesi (%100) MSk3, MSk4 ve MSk5 besi ortamlarında gürlmüştür. En düşük kallus oluşum yzdesinin (%33,33) gürldüğü ortam ise ½MSk0 ortamı olmuştur (Tablo 4.10). Ortalama kök uzunlukları MSk1 besi ortamından sonraki ortamlarda düşüşe uğramıştır. Bu durum *A. orientalis* bitkisinin *in vitro* köklendirilmesinde BBD konsantrasyonu ile kök uzunluğu arasında doğrusal bir ilişkinin olmadığını belgelemektedir. Ayrıca MSk0 ve ½MSk0 ortamları ortalama kök uzunluğu bakımından karşılaştırıldıklarında MS tuzlarının yarı yarıya azaltıldığı ½MSk0 ortamının daha iyi netice verdiği gürlmüştür. Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (şekil 4.14). Genel bir gözlem olarak besi ortamlarında MSk1 besi ortamından sonra BBD konsantrasyonu arttırıldığça ortalama kök uzunlukları kısalmakta fakat sürgün başına düşen kök sayısı artmaktadır (şekil 4.15). Bunun yanında hem MSk0 hem de ½MSk0 ortamlarında BBD konsantrasyonu arttırıldığça kallus oluşumunun da arttığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.10: Farklı IAA konsantrasyonlarının ortalama kök uzunluğu ve kök sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular

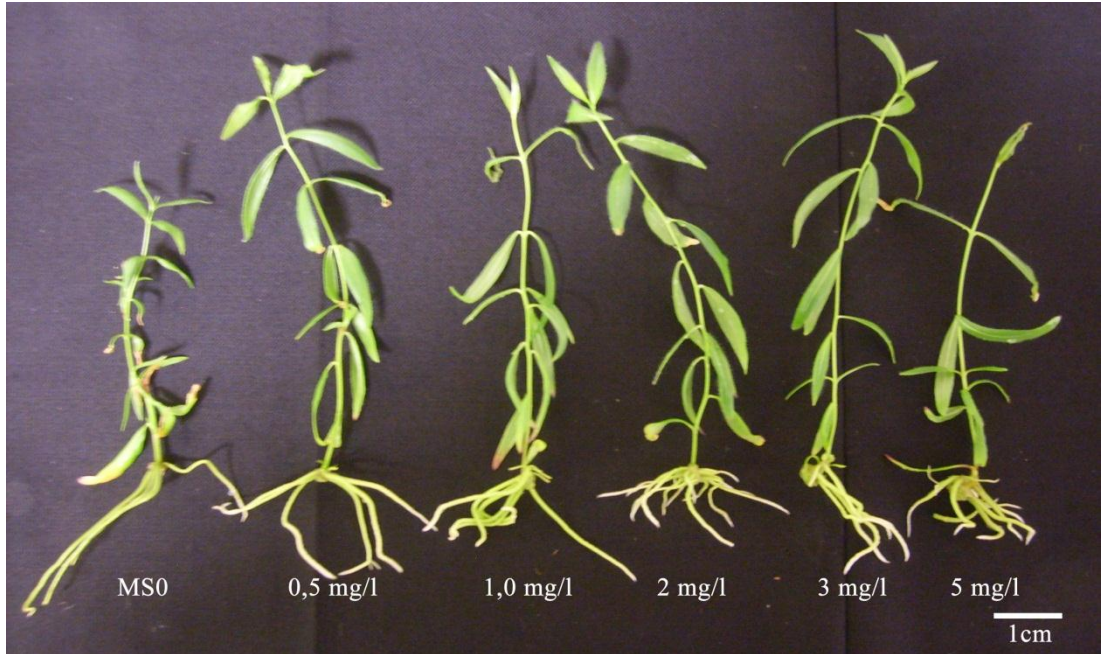
Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Sürgün Sayısı	Uyarılan Sürgün	% S.S / U.S.**	Ort. Kök Uzunluğu (cm) ± std	Ort. Kök Sayısı	% Kallus Oluşumu
MSk0	30	30	100	2,14ab ± 0,24	4,47 (134/30)	60 (18/30)
MSk1 - 0,5	30	30	100	2,80a ± 0,21	7,90 (237/30)	96,67 (29/30)
MSk2 - 1	30	30	100	2,72a ± 0,26	7,73 (232/30)	93,33 (28/30)
MSk3 - 2	30	30	100	1,72bc ± 0,11	9,83 (295/30)	100 (30/30)
MSk4 - 3	30	22	73,33	1,40bc ± 0,18	6,67 (200/30)	100 (30/30)
MSk5 - 5	30	26	86,67	1,15c ± 0,16	8,90 (267/30)	100 (30/30)
½MSk0	30	27	90	2,64a ± 0,19	4,23 (127/30)	33,33 (10/30)
½MSk6 - 1	30	27	90	2,14ab ± 0,26	5,97 (179/30)	80 (24/30)
½MSk7 - 3	30	21	70	1,53bc ± 0,18	4,40 (132/30)	93,33 (28/30)
½MSk8 - 5	30	27	90	1,46bc ± 0,14	5,53 (166/30)	76,67 (23/30)

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında  $P < 0,01$  seviyesinde farklılık yoktur.

\*\* S.S / U.S: Sürgün Sayısı / Uyarılan Sürgün



Şekil 4.14: IAA destekli ortamlardaki ortalama kök uzunluklarının çizgi grafiği



Şekil 4.15: IAA ortamlarında rejenere olmuş köklerin karşılaştırmalı görünümü

#### 4.4.2. Farklı IBA konsantrasyonlarının etkileri

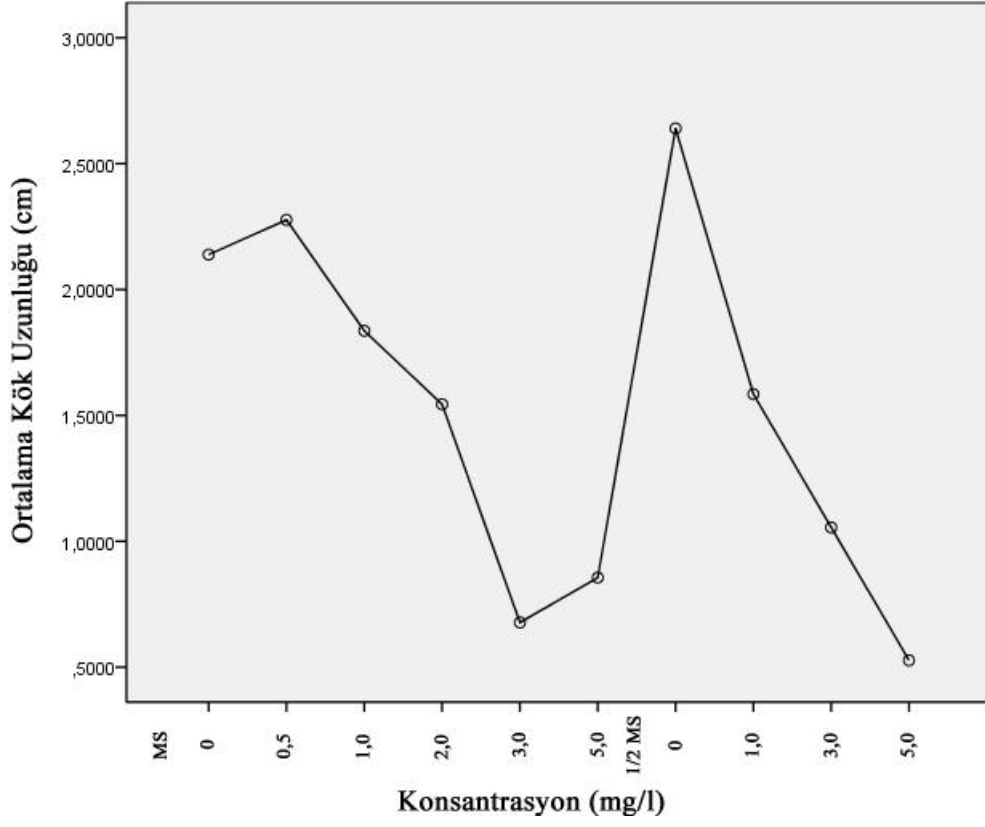
Kültür periyodunun sonunda en yüksek uyarılma oranı (%100) MSk0, MSk9, MSk10, MSk12 ve MSk13 besi ortamlarında bulunmuştur. En düşük uyarılma oranına ise (%56,67) ½MSk16 ortamında ulaşılmıştır. En fazla ortalama kök uzunluğu (2,64 cm) ½MSk0 ortamında, en az ortalama kök uzunluğu ise (0,53 cm) ½MS16 ortamında ölçülmüştür. Sürgün başına düşen en fazla ortalama kök sayısı (17,73) MSk13 ortamında en az ortalama kök sayısı (4,23) ise ½MSk0 ortamından elde edilmiştir. Kallus oluşum oranları incelendiğinde en yüksek kallus oluşum yüzdesi (%100) MSk12 ortamında görülmüştür. En düşük kallus oluşum yüzdesinin (%33,33) bulunduğu ortam ise ½MSk0 olmuştur (Tablo 4.11). Ortalamalar çizgi grafiği olarak verilmiştir (Şekil 4.16). Farklı IAA konsantrasyonları ile desteklenmiş ortamların kullanıldığı denemelerde olduğu gibi ortalama kök uzunlukları MSk9 ortamından sonraki ortamlarda düşüşe uğramıştır. Besi ortamlarında IBA konsantrasyonu arttırıldıkça ortalama kök uzunlukları kısalmakta fakat sürgün başına düşen kök sayısı artmaktadır (Şekil 4.17). Benzer sonuç IAA ile desteklenmiş köklendirme ortamlarında da bulunmuştur.

Tablo 4.11: Farklı IBA konsantrasyonlarının ortalama kök uzunluğu ve kök sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular

Besi Ortamı - Konsantrasyon (mg/l)	Sürgün Sayısı	Uyarılan Sürgün	% S.S / U.S**	Ort. Kök Uzunluğu (cm) ± std	Ort. Kök Sayısı	% Kallus Oluşumu
MSk0	30	30	100	2,14 <sup>abc</sup> ± 0,24	4,47 (134/30)	60 (18/30)
MSk9 - 0,5	30	30	100	2,28 <sup>ab</sup> ± 0,23	8,00 (240/30)	43,33 (13/30)
MSk10 - 1	30	30	100	1,84 <sup>bc</sup> ± 0,13	9,47 (284/30)	53,33 (16/30)
MSk11 - 2	30	29	96,67	1,54 <sup>cd</sup> ± 0,27	13,37 (401/30)	76,67 (23/30)
MSk12 - 3	30	30	100	0,68 <sup>e</sup> ± 0,06	14,47 (434/30)	100 (30/30)
MSk13 - 5	30	30	100	0,86 <sup>e</sup> ± 0,02	17,73 (532/30)	80 (24/30)
½MSk0	30	27	90	2,64 <sup>a</sup> ± 0,19	4,23 (127/30)	33,33 (10/30)
MSk14 - 1	30	25	83,33	1,59 <sup>cd</sup> ± 0,14	5,57 (167/30)	86,67 (26/30)
MSk15 - 3	30	24	80	1,06 <sup>de</sup> ± 0,15	8,17 (245/30)	76,67 (23/30)
MSk16 - 5	30	17	56,67	0,53 <sup>e</sup> ± 0,05	4,67 (140/30)	76,67 (23/30)

\* Aynı harfle işaretli ortalamalar arasında P<0,01 seviyesinde farklılık yoktur.

\*\*S.S / U.S: Sürgün Sayısı / Uyarılan Sürgün



Şekil 4.16: IBA destekli ortamlardaki ortalama kök uzunluklarının çizgi grafiği



Şekil 4.17: IBA ortamında rejener olmuş köklerin karşılaştırmalı görünümü

## SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Literatürde daha önce *Amsonia orientalis* türü ile yapılan sadece bir adet *in vitro* doku kültürü çalışması bulunmaktadır. Öz ve ark. (2008) bitkinin tohumundan elde ettikleri *in vitro* bitkiciklerden aldıkları eksplantları 1 mg/l IBA + 0,5 mg/l Kinetin ortamına aktarmış ve sürgünlerin büyümesinde %33 oranında başarı sağlamışlardır. Araştırmacılar, besi ortamını değiştirmeden bitkiciklerin %15'inin köklendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca kallus oluşumunu ise 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA ortamında, gövde eksplantlarından gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada sürgün boyu veya kallus ağırlığına dair herhangi bir bulgu belirtilmemiştir.

Bu tez çalışmasında ise *A. orientalis* bitkisinin Gazi Osman Paşa lokalitesine ait olgun bireylerinden alınan nodal eksplantlar kullanıldı. Eksplantların Gazi Osman Paşa lokalitesine ait bitkilerden alınmasının nedeni; bitkilerin yetiştirildiği koruma parsellerinde bu lokaliteye ait bitkilerin diğer lokalitelere ait bitkilere oranla daha fazla sayıda olmasıdır. Çalışmada bahsedilen nodal eksplantların *in vitro* kültürü ve elde edilen sürgünlerin en yüksek uzunluğa ulaştığı besi ortamlarının bu sürgünlerin nodları kullanılarak kendi arasında tekrar karşılaştırılması, ayrıca besi ortamının MS tuzu konsantrasyonu ile farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin köklenmeye olan etkilerinin karşılaştırılması yapıldı. Buna göre olgun nodal eksplantlar ile gerçekleştirilen kültürlerde en yüksek ortalama sürgün uzunlukları MS2 besi ortamında  $3,89 \pm 0,74$  cm, MS25 besi ortamında  $4,38 \pm 0,34$  cm ve MS33 besi ortamında  $4,37 \pm 0,08$  cm olarak bulundu. MS1 ortamında  $0,42 \pm 0,01$ g, MS22 ve MS28 ortamlarında  $0,08 \pm 0,02$  g ve MS46 ortamında ise  $0,08 \pm 0,02$  g olarak ölçüldü. Bu kültürlerden elde edilen sürgünlerin nodal eksplantlarının kullanıldığı denemelerde ise en yüksek ortalama sürgün uzunluğu MS17 ve MS38 besi ortamlarında  $2,15 \pm 0,07$  cm olarak ayrıca MS49 ortamında  $3,24 \pm 0,06$  cm olarak belirlendi. En fazla ortalama kallus ağırlıkları MS9 ortamında  $0,22 \pm 0,02$  g, MS25 ortamında  $0,18 \pm 0,00$  g ve MS33  $0,10 \pm 0,00$  g olarak kaydedildi. Köklendirme denemelerinde ortalama en uzun kök MSk1 ortamında  $2,80 \pm 0,21$  cm, MSk9



ortamında ise  $2,28 \pm 0,23$  cm olarak belirlenmesinin yanında ayrıca  $\frac{1}{2}$ MSk0 ortamında  $2,64 \pm 0,19$  cm olarak ölçüldü. Çalışma sonucunda yaklaşık 300 fide elde edilerek bitkinin tükenme tehlikesinin önüne geçilmesine çalışıldı. Ayrıca denemeler sırasında ayrı bir çalışma olarak yaprak eksplantlarından ve kalluslardan indirekt sürgün ve indirekt kök rejenerasyonu gerçekleştirildi. Çeşitli bitkilerin *in vitro* kültür denemelerinde farklı konsantrasyonlardaki BBD'ler ile desteklenmiş besi ortamlarının kullanıldığı ve bu ortamlarda kültüre alınan eksplantlardan elde edilen verilerin karşılaştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur.

Sharma ve ark. (2011) tıbbi ve ornamental bir bitki olan *Portulaca oleracea* üzerine yaptıkları doku kültürü çalışmasında çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün gelişimine ve çiçeklenmeye etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmalarında olgun bitkilerden alınan 1,0-1,5 cm uzunluğundaki nodal eksplantları başlangıç materyali olarak kullanmışlardır. İki haftalık kültür periyodu sonunda 0,5 mg/l Kinetin ile desteklenmiş besi ortamında ortalama  $7,23 \pm 0,3$  cm uzunlukta, 0,5 BAP besi ortamında ise  $2,14 \pm 0,3$  cm uzunluğunda sürgünler elde etmişlerdir. Bu çalışmalarında, *P. oleracea* bitkisinin *in vitro* doku kültüründe nodlardan rejenere olan sürgün boyları üzerine Kinetin'in BAP'tan daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise *A. orientalis* bitkisinin nodlarından rejenere olan sürgün boyları üzerinde BAP'ın Kinetin'den daha etkin olduğu gösterildi. Bunun nedeni olarak çalışmadaki bitki türünün farklı olması ve eksplant dokusundaki endojen hormon konsantrasyonlarının farklı olması düşünülmektedir.

Diğer bir çalışmada ise Devi ve ark. (2008) *Gymnema sylvestre* bitkisinin *in vitro* çoğaltımını amaçlamışlardır. Nodal eksplantlar kullanarak yaptıkları çalışmada 2,4-D + Kinetin, ve IAA + BAP kombinasyonlarının çeşitli konsantrasyonlarını denemişlerdir. En yüksek sürgün uzunluğunu 2,4-D + Kinetin kombinasyonunun 1,0 mg/l + 1,0 mg/l konsantrasyonunda  $3,0 \pm 0,02$  cm olarak, 2,4-D + BAP kombinasyonunun 0,5 mg/l + 1,5 mg/l konsantrasyonunda  $2,4 \pm 0,09$  cm ve IAA + BAP kombinasyonunun 2,0 mg/l + 1,0 mg/l ile 0,5 mg/l + 1,0 mg/l konsantrasyonunda sırasıyla  $2,1 \pm 0,02$  cm ve  $2,1 \pm 0,01$  cm olarak bildirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada çeşitli IBA konsantrasyonlarının 1,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ , ve  $\frac{1}{8}$  MS ortamlarında kök uzunluğuna etkilerini araştırmış ve en yüksek ortalama kök

uzunluğunu  $9,2 \pm 0,38$  cm ile 3 mg/l IBA ile desteklenmiş  $\frac{1}{2}$  MS besi ortamında elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise köklendirme aşamasında en uzun kök uzunluğu çeşitli IAA konsantrasyonları ile desteklenmiş besi ortamlarının kullanıldığı köklendirme denemelerinde belirlendi. Köklenme üzerine BBD'lerin etkileri kıyaslandığında kök uzamasını IAA ile desteklenmiş ortamların IBA ile desteklenmiş ortamlardan daha fazla teşvik ettiği görüldü. Ayrıca besi ortamlarında kullanılan MS tuzunun konsantrasyonunun düşürülmesi IAA veya IBA ile desteklenmemiş bazal besi ortamlarında Devi ve ark. (2008) yaptıkları çalışmayla paralel sonuç göstermektedir. Bu durum köklendirme ortamlarında düşük MS tuzu konsantrasyonlarında da olumlu sonuç alınabileceğini düşündürmektedir.

Nodal eksplantların kullanıldığı ve çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin aksillar tomurcuklardan rejenere olan sürgünlerin rejenerasyon yüzdesi ve sürgün boylarına etkilerinin incelendiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Her ne kadar aşılama ve gübreleme gibi geleneksel çoğaltım yöntemleri olsa da bu yöntemler oldukça yavaşlardır (Jaiswal ve Amin, 1992). Bitkinin tohumlarından çoğaltılması ise kimi bitkilerde tohumun çimlenme yüzdesinin düşük olması ve çimlenmenin uyarılmasının uzun zaman alması nedeniyle pratik değildir (Doijode, 2001). Doku kültürü tekniğinin kullanımı klonal çoğaltım, tükenme tehlikesindeki değerli bitkilerin korunması ve germplasm muhafazası gibi amaçlar için giderek artmaktadır (Boro ve ark., 1998; Murch ve ark., 2000).

Bu tez çalışmasına konu olan *A. orientalis* bitkisinin tohumları düşük çimlenme yüzdeleri ve zor çimlenmeleri ile bilinmektedir. Bitkinin tükenme tehlikesine girmesinde bu faktörün de etkili olduğu düşünülmektedir. Tohumları çimlenme gücü çeken ve bu şekilde tıbbi öneme sahip tükenme tehlikesindeki bitkilerin *in vitro* çoğaltımında başlangıç eksplantı olarak tohum yerine nodal eksplantların kullanılmasının daha etkili ve hızlı bir yöntem olabileceği görülmektedir. Başka bir ifadeyle; çimlenme yüzdeleri düşük olan tohumlar yerine sürgün verme yüzdesi çok yüksek olan nodal eksplantların kullanılması ve çoğaltımın buradan rejenere olan sürgünlerin alt kültürleriyle devam ettirilmesi bitkinin *in vitro* çoğaltımı için en uygun yol olarak görülmektedir.

## KAYNAKLAR

Ahloowalia, B.S., Prakash, J., Savangikar, V.A., Savangikar, C., "Plant Tissue Culture", *Low Cost Options For Tissue Culture Technology In Developing Countries, Proceedings of Technical Meeting*, FAO/IAEA, 26-30 August 2002, Vienna, 3-11, (2004)

Akyalçın, H., Özen, F., Dülger, B., "Anatomy, Morphology, Palynology and Antimicrobial Activity of *Amsonia orientalis* Decne. (*Apocynaceae*) Growing in Turkey", *Intel. J. Bot.*, 2(1): 93-99, (2006)

Ammirato, P.V., "Role of ABA in Regulation of Somatic Embryogenesis", *Hort. Science*, 23, 520, (1988)

Anderson, M., "A closer look at plant reproduction, growth, and ecology", *Britannica Educational Publishing*, 41-42, (2011)

Arora, R., "Medicinal Plant Biotechnology", *USA: CAB International*, 94-95, (2010)

Atasever, B., Akgün-Dar, K., Kuruca, S.E., Turan, N., Seyhanlı, V., Meriçli, A., "Cynara syriaca'dan Elde Edilen Flavonoidlerinin Lösemi Hücreleri Üzerine Etkisi", *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 32 (3) 143-150, (2003)

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., "Bitki Biyoteknolojisi - Doku Kültürü ve Uygulamaları I", *S.Ü Vakfı Yayınları*, 8-70, (2001)

Bhatt, R., Arif, M., Gaur, A.K., Rao, P.B., "Rauwolfia serpentina: Protocol Optimization for *In vitro* Propagation", *African Journal of Biotechnology*, 7 (23), 4265-4268, (2008)

Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., "Plant Tissue Culture: Theory and Practice", *Developments in Crop Science*, 5, (1983)

Bidlack, J.E., Jansky, S.H., "Stern's Introductory Plant Biology", *McGraw-Hill*, New York, USA, 191-195, (2011)

Bigot, C., "In vitro Manipulation of Higher Plants: Some Achievements, Problems and Perspectives", *IAPTC French-British Meeting, Cell Culture Techniques Applied to Plant Production and Plant Breeding*, IAPTC, 5-17, Angers, France, 8-9 October, (1987)

Biondo, R., Souza, A.V., Bertoni, B.W., Soares, A.M., França, S.C., Pereira, A.M.S., "Micropropagation, Seed Propagation and Germplasm Bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson", *Sci. Agric.*, Piracicaba, Brazil, 64:3, 263-268, (2007)

- Boro, P.S., Shirma Deka, A.C., Kalita, M.C., “Clonal propagation of *Alternanthera sessilis*: A biopharmaceutically potent herbal medicinal plant”, *J. Phytol. Res.*, 11: 103-106, (1998)
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., “Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective”, *Plant Sci.*, 161, 839–851, (2001)
- Boxus, P., “Rapid Production of Virus-Free Strawberry by *In vitro* Culture”, *Acta Hort.*, 66: 35-38, (1976)
- Brown, J.T., “The Initiation and Maintenance of Callus Cultures”, In: Pollard, J.W., Walker, J.M., “Plant Cell and Tissue Culture”, *The Humana Press*, 57, (1990)
- Brown, D.C.W., Thorpe, T.A., “Crop improvement through tissue culture”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11:409-415, (1995)
- Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., and Newbury, H.J., “Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use”, *CAB International*, 49, (1997)
- Cassells, A.C., and Curry, R.F., “Oxidative Stress and Physiological, Epigenetic and Genetic Variability in Plant Tissue Culture: Implications for Micropropagators and Genetic Engineers”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 145-157, (2001)
- Choi, P., Lee, S., Chung, H., In, D., Choi, D., Liu, J.R., “Assessing Competence for Adventitious Shoot Formation in Hypocotyl Explant Cultures from *Catharanthus roseus* Cultivars”, *Journal of Plant Biology*, 46(2) : 90-94, (2003)
- Cleland, R.E., “Introduction: Nature, occurrence and functioning of plant hormones”, In: Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones”, *Elsevier Science B.V.*, Amsterdam, Netherlands, 33, 3-4, (1999)
- Darke, R., “*Amsonia* in cultivation”, *The Plantsman*, New Series, 4:2, (2005)
- Davey, M.R., Anthony, P., “Plant Cell Culture – Essential Methods”, *Wiley-Blackwell*, 317-326, (2010)
- Davis, P. H., “Flora of Turkey and East Aegean Islands”, *Univ. Press of Edinburg*, 6:161, (1978)
- Debergh, P.C., Read, P.E., “Micropropagation”, In, “Debergh, P.C., Zimmerman, R.H., “Micropropagation - Technology and Application”, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Netherlands, 1-15, (1993)
- Devi, C.S., Srinivasan, V.M., “*In vitro* propagation of *Gymnema sylvestre*”, *Asian J. Plant Sci.*, 7(7), 660-665, (2008)
- Dhar, U., Upreti, J., Bhatt, I. D., “Micropropagation of *Pittosporum napaulensis* (DC.) Rehder & Wilson – a rare, endemic Himalayan medicinal tree”, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 63:231–235, (2000)

- Dixon, R.A., "Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures", *Plant Cell Culture – A Practical Approach*, **Oxford Uni. Press**, New York, USA, 1-20, (1987)
- Doijode, S.D., "Guava: *Psidium guajava* L. In: Doijode, S.D. (ed.), Seed storage of horticultural crops", **Haworth Press New York**, 65-67, (2001)
- Dunwell, J.M., "Methods in Molecular Biology Transgenic Plants: Methods and Protocols", **Humana Press**, Totowa, NJ, USA, 377-396, (2004)
- Ecker, J.R., "The Ethylene Signal Transduction Pathway in Plants", **Science**, 268, 667-675, (1995)
- Eibl, R., Eibl, D., "Design of Bioreactors Suitable for Plant Cell and Tissue Cultures", **Phytochem. Rev.**, 7, 593-598, (2007)
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, Mecit., Dumay, Hayri., Aytaç, Z., Adıgüzel, Nezaket., "**Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı**", **Türkiye Tabiatını Koruma Derneği & Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi**, Ankara, 11-33, (2000)
- Engelmann, F., Engels, J.M.M., "Technologies and Strategies for *Ex situ* Conservation", *Managing Plant Genetic Diversity.*, **IPGRI, Wallingford, Rome, CAB International**, 89-104, (2002)
- Fard, F.R., Moieni, A., Omidbaigi, R., "Effects of Different Concentrations of  $\alpha$ -naphthaleneacetic Acid and 6-benzylaminopurine on Shoot Regeneration of *Vinca minor* L.", **J. Agric. Sci. Technol.**, 10: 337-344, (2008)
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., "Nutrition Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells", **Exp. Cell. Res.**, 50: 151-159, (1968)
- George, E.F., Debergh, P.C., "Micropropagation: Uses and Methods" In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G., "Plant Propagation by Tissue Culture: The Background", **Springer**, Dordrecht, Netherlands, 30-31, (2008)
- Gonzales, R.A., Widholm. J.M., " Selection Of Plant Cells For Desirable Characteristics: Inhibitor Resistance", In: *Plant Cell Culture A Practical Approach*, **IRL Press**, Washington DC, United States, 72-77, (1987)
- Harisha, S., "Biotechnology Procedures and Experiments Handbook", **Infinity Science Press LLC**, 485-497, (2007)
- Harry, I.S., Thorpe, T.A., "Tissue Cultures: *In Vitro* Biosphere Reserves", **Nature and Resources**, 27, 18-22, (1991)
- Hazarika, B.N., "Morpho-physiological Disorders in *In Vitro* Culture of Plants", **Scientia Horticulturae**, 108, 105-120, (2006)
- Heldt, H.W., "Plant Biochemistry", **Elsevier Academic Press**, USA, 469-476, (2005)

Holobiuc, I., Păunescu, A., Blîndu, R., “Ex Situ Conservation Using *In Vitro* Methods In Some *Caryophyllaceae* Plant Species from The Red List of Vascular Plants In Romania”, **Rom. J. Biol.-Plant Biol.**, 49-50, 3-16, (2004)

Itoh, A., Kumashiro, T., Tanahashi, T., Nagakura, N., Nishi, T., “Flavonoid Glycosides from *Rhazya orientalis*”, **J. Nat. Prod.**, 65, 352-357, (2002)

IUCN, “IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1.” **IUCN Species Survival Commission**, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, ii + 30 pp, (2001)

Jaiswal, V.S., Amin, M.N., “*In vitro* propagation of guava from shoot cultures of mature trees”. **J. Plant Physiol.**, 130: 7-12, (1992)

Jen, S., “The Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (Bern, 1979): Procedures of Application in Practice I”, **J. Int'l Wildlife L. & Pol'y**, 2(2), (1999)

Kanchanapoom, K., Sunheem, S., Kanchanapoom, K., ”*In vitro* Propagation of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. and Schult.”, **Not. Bot. Hort. Agrobot.**, Cluj, Romania, 38 (3), 209-213, (2010)

Kapai, V.Y., Kapoor, P., and Rao, U., “*In Vitro* Propagation for Conservation of Rare and Threatened Plants of India - A Review”, **International Journal of Biological Technology**, 1(2), 1-14, (2010)

Kartha, K.K., “Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture, Meristem Culture and Cryopreservation Methods and Applications”, **New York: Academic Press**, 181-211, (1981)

Katekar, G.F., “Structure-activity relationships of plant growth regulators”, In: “Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones”, **Elsevier Science B.V.**, Amsterdam, Netherlands, 33, 93-100, (1999)

Kreis, W., “*In vitro* Culturing Technics of Medicinal Plants” In: Kayser, O., Quax, W., “Medicinal Plant Biotechnology”, **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, Weinheim, Germany, 162, (2007)

Lengyel, E.D., Turiak, G.Y., Szabady, J.N., Zambo, I., Tetenyi, P., Hermeecz, I., “Determination of Secologanin Content from Shoots of *Rhazya orientalis* (DCNE) A. DC. Using The HPLC Method”, **Herba Hungarica**, 2, 141-150, (1986)

Linsmaier, E.M., Skoog, F., “Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures” **Physiol. Plant**, 18: 100-127, (1965)

Lloyd, G., McCown, B., “Commercially-feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-tip Culture, **Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, 30, 420-427, (1980)

- Machakova, I., Zazimalova, E., George, E.F., ” Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors”, In: “Plant Propagation by Tissue Culture”, **Springer**, AA Dordrecht, Netherlands, 3:175, (2008)
- Mallikarjuna, K., Rajendrudu, G., “Rapid *In vitro* Propagation of *Holarrhena antidysenterica* Using Seedling Cotyledonary Nodes”, **Biologia Plantarum**, 53 (3): 569-572, (2009)
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., “Mikroçoğaltım”, Bitki Biyoteknolojisi – Doku Kültürü ve Uygulamaları I, **S.Ü Vakfı Yayınları**, 262-281, (2001)
- Maunder, M., Higgins, S., Culham, A., “Neither Common nor Garden: the garden as a refuge for threatened plant species”, **Curtis’s Bot. Mag.**, 15, 124–132, (1998)
- Murashige, T., Skoog, F., “ A Revised Medium for Growth and Bioassays with Tobacco Cultures”, **Physiol. Plant**, 15, 473:497, (1962)
- Murch, S.J., KrishnaRaj, S., Saxena, P.K., “Phytomaceuticals: Mass production, standardization and conservation”, **Sci. Rev. Alternative Med.**, 4:39-43, (2000)
- Neumann, K.-H., Kumar, A., Imani, J., “Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology”, **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, 1-7, (2009)
- Nishitha, K., Martin, K.P., Ligimol, Beegum, A.S., Madhusoodanan, P.V., “Micropropagation and Encapsulation of Medicinally Important *Chonemorpha grandiflora*”, **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, 42:385-388, (2006)
- Oliveira, A.J.B, Carvalho, V.M., Ferreira, A., Sato, F.Y., Machado, M.F.P.S., “*In vitro* Multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae), **R. Árvore, Viçosa-MG**, 27:4, 421-425, (2003)
- Omar, M.S., “Tissue Culture of *Rhazya stricta* Decaisne”, **Journal of the University of Kuwait (Science)**, 16: 105-114, (1989)
- Öz, G.C., Yüzbaşıoğlu, E., Erol, O., Üzen, E., “In vitro Propagation of *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae), **African Journal of Biotechnology**, 7:20, 3638-3641, (2008)
- Özen, F., “Türkiye’de Tükenme Tehlikesinde Olan Bir Türün Otekolojisi: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)”, **BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi**, 8.1, 4-9, (2006)
- Paunescu, A., “Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview”, **Romanian Biotechnological Letters**, 14(1), 4095-4103, (2008)
- Paunescu, A., Holobiuc I., “Preliminary Researches Concerning Micropropagation of Some Endemic Plants from Romanian Flora”, **Acta Horti Bot.**, 32, 103-108, (2005)
- Pierik, R.L.M., “In Vitro Culture of Higher Plants”, **Kluwer Academic Publishers**, 21-26, (1997)

Pitman, N.C.A., Jorgensen, P.M., “Estimating The Size of The World’s Threatened Flora”, *Science*, 298:989, (2002)

Rachel, D.R., Yaron, S., Yaakov, T., “The original publication describing the use of metabolic engineering for improvement of fruit quality”, *Nature Biotechnol.* 25, 899-901, (2007)

Raffauf, R.F., “Plant Alkaloids A Guide to Their Discovery and Distribution”, ”*Food Products Press, Haworth Press, USA*”, 17-18, (1996)

Raha, S., Roy, S.C., “*In vitro* Plant Regeneration of *Holarrhena antidysenterica* Wall. Through High-Frequency Axillary Shoot Proliferation”, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37:232-236, (2001)

Rahman, A.U., Qureshi, M.M., Zaman, K., Malik, S., Ali, S.S., “The Alkaloids of *Rhazya stricta* and *R. orientalis*- A Review”, *Fitoterapia*, 60(4): 291-322, (1989)

Ramsay, M.M., Jackson, A.D., Porley, R.D., “A Pilot Study for The *Ex situ* Conservation of UK Bryophytes”, *BGCI EuroGard 2000 – II European Botanic Gardens Congress*, Canary Islands, Spain: Las Palmas de Gran Canaria, 52–57, (2000)

Redenbaugh, K., “Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement” *Boca Raton, FL: CRC Press*, (1993)

Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M.M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., and Rowntree J.K., “Conservation *In Vitro* of Threatened Plants - Progress In The Past Decade”, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42, 206-214, (2006)

Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., “Medium and Techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures” *Can. J. Bot.*, 50: 199-204, (1972)

Scowcroft, W.R., “Genetic Variability in Tissue Culture: Impact on Germplasm Conservation and Utilization”, *IBPGR – Rome*, (1984)

Sharma, M.M, Singh, A., Verma, R.N., Ali, D.Z., Batra, A., “Influence of PGRS for he *in vitro* plant regeneration and flowering in *Portulaca oleracea* (L.): A medicinal and ornamental plant”, *Int. J. Bot.*, 7(1), 103-107, (2011)

Sherwood, J.L., “Applied Aspects of Plant Regeneration (Virus-free Plants)”, Dixon, R.A., Gonzales, R.A., *Plant Cell Culture – A Practical Approach, Oxford Uni. Press*, New York, USA, 135-138, (1994)

Singh, R.B., “Plant Biotechnologies for Developing Countries: Current Status and Future Prospects of Plant Biotechnologies in Developing Countries in Asia”, *London: Chayce Publication Services*, 141-162, (1992)



Staden, J., Zazimalova, E., George, E.F., “Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists”, In: “Plant Propagation by Tissue Culture”, *Springer*, AA Dordrecht, Netherlands, 3, 175, (2008)

Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., “Flora Europea”, Vol.3, *Cambridge University Press*, (1968)

Vanková, R., “Plant Hormone Functions in Abiotic and Biotic Stress Responses”, In: “Handbook of Plant and Crop Stress”, *CRC Press*, USA, 191-204, (2011)

Verpoorte, R., Memelink, J., “The Significance of Secondary Metabolites for Humans”, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 181-187, (2002)

Villalobos, V.M., Engelmann, F., “Ex Situ Conservation of Plant Germplasm Using Biotechnology”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 375-382, (1995)

Wang, P.J., Charles, A., “Micropropagation through Meristem Culture”, *Biotechnology Agriculture and Forestry*, 17:5, 32-52, (1991)

Watanabe, K., Pehu, E., “Plant Biotechnology and Plant Genetic Resources For Sustainability and Productivity”, *Academic Press*, USA, 228, (1997)

White, P.R., “Neoplastic growth in plants”, *Q. Rev. Biol.*, 26, 1-16, (1951)

Wink, M., “A General Introduction to Plant Secondary Metabolites”, *Trends Biotechnol.* 18, 321-322, (2000)

Wink, M., “Function of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology”, *Sheffield Academic Press and CRC Press*, Annual Plant Reviews, Volume 3, (1999b)

Young, T.E., Meeley, R.B., Gallie, D.R., “ACC Synthase Expression Regulates Leaf Performance and Drought Tolerance in Maize”, *Plant Journal*, 40, 813–825, (2004)

Zapartan, M., Deliu, C., “Conservation of Endemic Rare and Endangered Species in The Romania Flora Using In vitro Methods”, *8th Nat. Symp. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Bucharest, 432-436, (1994)

URL1. IUCN, *Numbers of threatened species by major groups of organisms (1996 2011)*, (2011)

[http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2011\\_1\\_RL\\_Stats\\_Table\\_1.pdf](http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2011_1_RL_Stats_Table_1.pdf) (**Ziyaret tarihi: 29 Ekim 2011**)

URL 2. Botanic Gardens and Parks Authority,  
<http://www.bgpa.wa.gov.au> (**Ziyaret tarihi: 30 Ekim 2011**)

URL 3. The Royal Botanic Gardens, *The Australian Botanic Garden Mount Annan*  
<http://www.rbg Syd.nsw.gov.au/annan> (**Ziyaret tarihi: 30 Ekim 2011**)

URL 4. University of Abertay, *The Plant Conservation Research Group*, İskoçya  
<http://scieng.tay.ac.uk/plant/> (**Ziyaret tarihi: 30 Ekim 2011**)

URL 5. Cincinatti Zoo & Botanic Gardens, Amerika  
<http://www.cincyzoo.org> (**Ziyaret tarihi: 30 Ekim 2011**)

URL 6. Kerala Tropical Botanic Gardens and Research Institute, Hindistan  
<http://www.tbgr.in/> (**Ziyaret tarihi: 30 Ekim 2011**)

URL 7. Orman Genel Müdürlüğü, *Bern Sözleşmesi Çevirisi*  
<http://web.ogm.gov.tr/birimler/merkez/StratejiGelistirme/Dokumanlar/Bern%20S%C3%B6zle%C5%9Fmesi.pdf> (**Ziyaret tarihi: 1 Kasım 2011**)

URL 8. Avrupa Konseyi, *Avrupa yaban hayatı ve doğayı koruma konvansiyonu*  
<http://www.conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/104-1.htm> (**Ziyaret tarihi: 1 Kasım 2011**)

URL 9. IUCN, *Üyeler*  
<http://www.iucn.org/about/union/members/> (**Ziyaret tarihi: 1 Kasım 2011**)

URL 10. IUCN, *Amaçlar*  
[http://www.iucn.org/about/work/global\\_programme/](http://www.iucn.org/about/work/global_programme/) (**Ziyaret tarihi: 1 Kasım 2011**)

## **ÖZGEÇMİŞ**

1984 yılında Uşak'ta doğdu. 2002 yılında Uşak Orhan Deniz Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2003 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nü kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında aynı bölüme araştırma görevlisi olarak atandı ve halen bu görevine devam etmektedir.