

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Ageratum houstonianum* Mill.'İN *IN VITRO* ÇOĞALTIMINDA
KİTOSAN UYGULAMALARINA BAĞLI ETKİLERİN
İNCELENMESİ**

A. ECE GÜN POLAT

KOCAELİ 2021

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Ageratum houstonianum* Mill.'İN *IN VITRO* ÇOĞALTIMINDA
KİTOSAN UYGULAMALARINA BAĞLI ETKİLERİN
İNCELENMESİ**

A. ECE GÜN POLAT

Prof. Dr. Fazıl ÖZEN

Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Özlem AKSOY

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Tezin Savunulduğu Tarih : 25.06.2021

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tezde *Ageratum houstonianum* üzerinde kitosan biyopolimerinin bitki büyüme ve gelişmesine olan fizyolojik etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Süs bitkisi yetiştiriciliğinde kimyasal içerikler yerine çevre dostu büyüme artırıcılara yönelinmesi ile birlikte kitosan ve benzeri biyopolimerler ile yapılan çalışmalar önem kazanmıştır.

Yüksek lisans ve lisans öğrenimim boyunca desteğini esirgemeyen ve bilgi birikimi ile bana her zaman yardımcı olan bölüm başkanı ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e;

Lisans öğrenimimden bu yana laboratuvar çalışmalarım ve her türlü akademik çalışmalarımı sonsuz bir destekle yürütmemi sağlayan, her zaman ufkumu genişleten bilgiler sunan, farklı yönlerden düşünmemi sağlayan, benim için her zaman en iyisinin olmasını isteyen, değerli tavsiyeleriyle yönlendiren ve ayrıca çalışmamda kullandığım kitosan stok çözeltilerini hazırlayarak temin etmemi sağlayan Sayın Dr. Arda ACEMİ'ye;

Lisans ve Yüksek Lisans öğrenimim boyunca akademik gelişimime destek olan Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma ve sevgili arkadaşlarıma;

En güzel anlarımda, en zor günlerimde her zaman yanımda olan can dostum Öykü ERDEM'e ve ikinci aileme;

Beni bu günlere getiren, her zaman arkamda duran, desteklerini esirgemeyen, tüm zorluklarla el ele başa çıktığımız sevgili annem Çiğdem EFE ÖZCAN, canım babam Nurettin ÖZCAN, minik kardeşim Şimal Meva ÖZCAN'a ve eşimin değerli ailesine;

Yürüdüğüm yolda desteğini ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen, yol arkadaşım Murat POLAT'a ve hayallerimize bütün içtenliğimle teşekkür ederim.

Haziran - 2021

A. Ece GÜN POLAT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Bitki Doku Kültürü	3
1.2. Kitosanın Genel Özellikleri	5
1.3. Kitosan ile Gerçekleştirilen Bazı Çalışmalar	8
1.4. Çalışmada Kullanılan Bitki Hakkında Genel Bilgiler.....	13
1.4.1. Asteraceae familyası	13
1.4.1.1. Asteraceae familyasının karakteristik özellikleri.....	14
1.4.1.2. Asteraceae familyasının taksonomik özellikleri.....	15
1.4.2. <i>Ageratum houstonianum</i> Mill. bitkisi hakkında genel bilgiler	16
1.4.2.1. <i>Ageratum houstonianum</i> bitkisinin sınıflandırması.....	16
1.4.2.2. <i>Ageratum houstonianum</i> bitkisinin kökeni.....	17
1.4.2.3. <i>Ageratum houstonianum</i> bitkisinin fiziksel özellikleri.....	18
1.4.2.4. <i>Ageratum houstonianum</i> bitkisinin habitatı.....	20
1.4.2.5. <i>Ageratum houstonianum</i> bitkisinin ekonomik ve çevresel önemi	20
1.4.3. <i>Ageratum houstonianum</i> bitkisi ile gerçekleştirilen bazı çalışmalar	21
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
2.1. Deneysel Çalışmalarda kullanılan Bitki Materyali	22
2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	22
2.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar	22
2.2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar	23
2.3. Besiyeri ve İçeriği	23
2.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu.....	24
2.5. Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu	25
2.6. Tohumların Besiyerlerinde Kültüre Alınması.....	25
2.7. Kültüre Alınan Tohumların İnkübasyonu ve Çimlenmesi.....	26
2.8. İstatistiksel Analiz.....	26
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
3.1. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Çimlenmeye Etkileri	29
3.2. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Kök Sayısı ve Kök Uzunluğuna Etkileri.....	34
3.3. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Sürgün Sayısı ve Sürgün Uzunluğuna Etkileri.....	36
3.4. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısına Etkileri.....	38

3.5. Tartışma.....	39
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	48
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	56
ÖZGEÇMİŞ	57



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Bitki doku kültürü tekniğinin farklı uygulama alanları.....	4
Şekil 1.2.	Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı	5
Şekil 1.3.	Mantarlardan ve deniz hayvanlarının kabuklarından kitin eldesi	6
Şekil 1.4.	Asteraceae familyasının karakteristik yapısı.....	14
Şekil 1.5.	<i>A. houstonianum</i> bitkisinin dünya genelinde yayılış haritası.....	17
Şekil 1.6.	<i>A. houstonianum</i> bitkisinin tohumu	18
Şekil 1.7.	<i>A. houstonianum</i> bitkisinin detay görünümü.....	19
Şekil 1.8.	<i>A. houstonianum</i> bitkisinin genel görünümü.....	19
Şekil 3.1.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama boyutlarda bitki örnekleri içeren magenta kapları.....	27
Şekil 3.2.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama boyutlarda bitki örnekleri	28
Şekil 3.3.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama boyutlarda kontrol grubu bitkisi örneği.....	29
Şekil 3.4.	<i>A. houstonianum</i> tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besi ortamındaki çimlenme performansları.	31
Şekil 3.5.	<i>A. houstonianum</i> tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besi ortamındaki çimlenme performanslarının genel karşılaştırılması.	32
Şekil 3.6.	<i>A. houstonianum</i> tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besi ortamındaki çimlenme performanslarının ortalamaya kıyasla zamana bağlı genel karşılaştırılması	33
Şekil 3.7.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama kök sayısı üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri	34
Şekil 3.8.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama kök uzunluğu üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri	34
Şekil 3.9.	Farklı besi ortamlarından alınan bitki kök sayılarının karşılaştırılması	35
Şekil 3.10.	Farklı besi ortamlarından alınan bitki kök uzunluklarının karşılaştırılması	35
Şekil 3.11.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama sürgün sayısı üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri	36
Şekil 3.12.	<i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama sürgün uzunluğu üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri	36
Şekil 3.13.	Farklı besi ortamlarından alınan bitki sürgün sayılarının karşılaştırılması	37

Şekil 3.14. Farklı besi ortamlarından alınan bitki sürgün uzunluklarının karşılaştırılması	37
Şekil 3.15. <i>A. houstonianum</i> 'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama yaprak sayısı üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri	38
Şekil 3.16. Farklı besi ortamlarından alınan bitki yaprak sayılarının karşılaştırılması	38



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.....	22
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi	23
Tablo 2.3. MS besiyerinin içeriği	23
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan CHI konsantrasyonları ve kontrol grubu için çimlenme sayıları	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
m	: Metre
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
cm ³	: Santimetreküp
g	: Gram
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
L	: Litre
ml	: Mililitre
s	: Saniye
dk	: Dakika
ppm	: Milyonda bir
β	: Beta
kDa	: Kilodalton
kPa	: Kilopaskal
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol
µg	: Mikrogram
v	: Hacim
m	: Kütle

Kısaltmalar

CHI	: Kitosan
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı
pH	: Potansiyel Hidrojen Derecesi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
BBA	: Bitki Büyüme Artırıcı
UV	: Ultraviyole
DA	: Asetilasyon Derecesi
DD	: Deasetilasyon Derecesi
DP	: Polimerizasyon Derecesi
dH ₂ O	: Distile Su
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
PPM	: Bitki Koruma Karışımı
WOX5	: WUSCHEL-related homeobox-5
KIN	: Kinetin
BA	: Benziladenin
IAA	: İndol-3-asetik Asit

***Ageratum houstonianum* Mill.'İN *IN VITRO* ÇOĞALTIMINDA KİTOSAN UYGULAMALARINA BAĞLI ETKİLERİN İNCELENMESİ**

ÖZET

Asteraceae (papatyagiller) familyasının bir üyesi olan *Ageratum houstonianum*, yaygın bilinen ismi “mavi vapor dumanı çiçeği” olan, Meksika ve Orta Amerika'ya özgü tek yıllık bir süs bitkisidir.

Son yıllarda kullanımını artan kitosan, mantarların hücre duvarlarında, bazı alglerde, Crustaceae üyelerinin ve böceklerin kabuklarında bulunan kitinin deasetile olan türevidir. Kitosanın karakteristik yapısı asetilasyon derecesi (DA) ve polimerizasyon derecesi (DP) ile tanımlanmaktadır. DA, kitosan zincir konformasyonu, elektrostatik özellikleri ve biyolojik özellikleri gibi kitin ve kitosanın fiziko-kimyasal özelliklerini etkileyen önemli bir parametredir.

Bu çalışmada *A. houstonianum* bitkisinin farklı konsantrasyonlarda (kontrol, 2,5, 5 ve 10 mg/L) ve DA'larda (%10 ve %20) kitosan ile muamele edilmesi sonucunda kök sayısı, kök uzunluğu, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, yaprak sayısı ve çimlenme oranı gibi bitki büyüme özelliklerine etkileri *in vitro* koşullarda incelendi. Çalışma sonucunda, kitosan kullanımının kontrol grubuna kıyasla; çimlenmeyi geciktirdiği, kök sayısını ve kök uzunluğunu konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde etkilediği, sürgün sayısını her iki kitosan varyantının tüm konsantrasyonlarında artırdığı, sürgün uzunluğunu %20 DA'ya sahip kitosanın 10 mg/L konsantrasyonu hariç artırdığı ve yaprak sayısını her iki kitosan varyantının tüm konsantrasyonlarında azalttığı belirlendi. Kitosanın DA'sının artmasına bağlı olarak sürgün sayısı ve çimlenme oranının arttığı, kök sayısının, kök uzunluğunun, sürgün uzunluğunun ve yaprak sayısının uygun konsantrasyonların kullanımına bağlı olarak önemli ölçüde etkilendiği bulundu. Çalışma, *A. houstonianum*'un verimli bir şekilde *in vitro* çoğaltımının yapılması için en iyi DA ve kitosan konsantrasyonunun 2,5 mg/L - %20 DA olması gerektiğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *Ageratum houstonianum*, Asetilasyon Derecesi, Bitki Doku Kültürü, *In vitro* Çoğaltım, Kitosan.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS RELATED TO THE APPLICATIONS OF CHITOSAN ON *Ageratum houstonianum* Mill.'S *IN VITRO* PROPAGATION

ABSTRACT

Ageratum houstonianum Mill., a member of the Asteraceae family, is an annual ornamental plant native to Mexico and Central America. The species' common name is "blue maudlin".

Chitosan, is a deacetylated form of chitin polymer found in the cell walls of fungi, some algae, Crustaceae members, and the shells of insects. The characteristic structure of chitosan is defined by the degree of deacetylation (DA) and degree of polymerization (DP). DA is an important parameter that affects chitin's and chitosan's physicochemical properties, such as chain conformation, electrostatic properties, and biological properties.

In this study, as a result of the treatment of *A. houstonianum* with chitosan at different concentrations (control 2,5, 5 and 10 mg/L) and DAs (10% and 20%), the effects on plant growth characteristics were investigated. As a result of the study, chitosan biopolymer delayed the germination, significantly affected the root number and root length depending on concentration, increased shoot number at all concentrations, increased shoot length except 10 mg/L - 20% DA treatment, and decreased leaf number at all concentrations in comparison with the control. It was observed that the number of shoots and germination increased depending on the increase in DA of chitosan, while the number of roots, root length, shoot length, and the number of leaves were significantly affected depending on the use of appropriate concentrations. The study showed that the optimal DA and concentration of chitosan should be 2,5 mg/L - %20 DA to establish an efficient *in vitro* propagation system for *A. houstonianum*.

Keywords: *Ageratum houstonianum*, Degree of Acetylation, Plant Tissue Culture, *In vitro* Propagation, Chitosan.

GİRİŞ

Bitki doku kültürü veya bir başka deyişle hücrelerin, dokuların, organların ve bileşenlerinin aseptik kültürü; *in vitro* koşullar altında, fiziksel ve kimyasal olarak temel, uygulamalı ve ticari alanlarda kullanılan önemli bir tekniktir. Kökeni, 20. yüzyılın başlarında Alman bilim insanı Haberlandt'ın çalışmalarına dayanmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda elde edilen veriler ışığında kök kültürleri, embriyo kültürleri ve ilk gerçek kallus kültürleri ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 1940 ve 1960 yılları arasında yeni tekniklerin geliştirilmesi ile bitki doku kültürünün uygulama alanı genişlemiştir [1]. Bu dönemde çoğunlukla hücre davranışı, bitki modifikasyonu, patojen içermeyen bitkiler ve germlazma depolaması alanlarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 1960'ların sonrasında ise klonal çoğaltım ve ikincil metabolitlerin eldesi alanındaki çalışmalar öne çıkmaktadır. *In vitro* teknolojilerinin artması ile birlikte 1990 yılından itibaren daha fazla sayıda bitki türü üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Bitki doku kültürü, günümüzde moleküler biyoloji ve tarımsal biyoteknoloji çalışmaları başta olmak üzere birçok alanda önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.

Nüfus artışı, çarpık kentleşme ve bunların sonucunda meydana gelen doğa tahribatı ile birlikte süs bitkilerinin yayılışı, kullanım alanları ve üretilmesi bu durumdan olumsuz etkilenmektedir. Bu etkilerin olabildiğince önlenmesi ve azaltılabilmesi için *in vitro* tekniklerden yararlanılmaktadır. *Ageratum houstonianum* Mill., Asteraceae familyasına ait, mavimsi-mor çiçeklere sahip tek yıllık bir süs bitkisidir [2]. Meksika ve Orta Amerika'ya özgü olan bu tek yıllık bitki keşfedildikten kısa bir süre sonra süs bitkisi olarak Avrupa'ya getirilmiştir [3].

Kitosan (CHI), çok sayıda fizikokimyasal ve biyolojik özelliğe sahip, kitin polimerinin deasetile edilmesi ile elde edilen bir polisakkarittir [4]. Atık su arıtımı, tarım, kozmetik ve gıda işleme gibi birçok çeşitli alanda kullanılabilen kitosan; biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyoaktivite gibi özellikleri ile ön plana çıkmaktadır [5, 6]. Kitosanın da yapısında bulunan asetil grupları kitin içeriğinde

%80'den fazladır. Kitindeki bu asetil grupları çıkarılarak kitosan oluşturulur [7]. Asetilasyon derecesi (DA) kitin biyopolimeri içerisinde bulunan *N*-asetil-D-glukozaminin oranını temsil eder. Kitin, DA'nın %50'nin altında olduğu durumda kitosan olarak adlandırılmaktadır [1]. Kitosanın DA ve polimerizasyon derecesi (DP) gibi özellikleri değiştikçe bitkilerdeki fizyolojik etkilerinin ve bunların sonucunda ortaya çıkan gelişimsel farklılıkların da önemli derecede etkilendiği birçok raporda bildirilmiştir.

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ndeki Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda *A. houstonianum* Mill. bitkisi kullanılarak kitosan oligomerlerinin DA'sının bitki büyümesine etkilerinin incelenmesi ve süs bitkilerinin yetiştirilmesinde hangi DA'ya sahip kitosanın kullanılmasının uygun olacağını belirlemek üzere yapıldı.

1. GENEL BİLGİLER

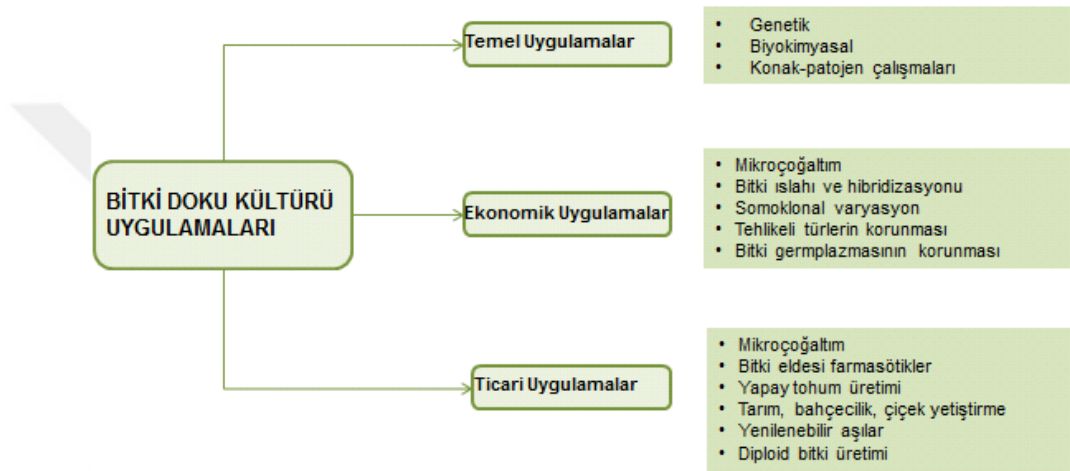
1.1. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü, bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının aseptik ortam şartlarında, kontrollü ışık, sıcaklık ve nem koşulları altında kültüre alınması için kullanılan bir tekniktir [8]. Bitki büyüme düzenleyicilerin keşfi ve karakterize edilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar bitki doku kültürü tekniğinin bir bilim dalı olarak geliştirilmesinde rol oynamıştır. Bitki doku kültürü araştırmacılara hücre ve dokularını büyütme ve gelişimlerini kontrol edebilme imkânı sağlamaktadır. Bu teknik aynı zamanda tarihte, tarım ve süs bitkileri yetiştiriciliği gibi uygulama alanlarının temelini oluşturmaktadır.

Bitkilerin dokuları ve organları üzerinde kontrollü laboratuvar deneyleri yapılması Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt'ın 1898 yılında tamamen farklılaşmış hücreleri kültüre alması ile gerçekleşmiştir. Çalışmada yapraklardan izole edilmiş hücrelerin büyümesi ve canlı kalması sağlanmış fakat besi ortamında gerekli bitki büyüme düzenleyicilerin eksikliği sebebi ile çoğaltımı mümkün olmamıştır. Haberlandt'ın çalışmalarında hedeflediği hücre bölünmesinin sağlanması oksinlerin keşfedilmesinin ardından mümkün hale gelmiştir [9, 10]. Yirminci yüzyılın başlarında steril çalışma yöntemlerinin geliştirilmesi ve bitki büyümesi için vitaminlere ve büyüme artırıcılara ihtiyaç duyulduğunun fark edilmesi ile birlikte bitki doku kültürü çalışmaları gelişim göstermiştir. Robbins ve Kotte, 1922 yılında izole edilmiş kök uçlarının başarılı bir şekilde büyümesini sağlamışlardır. Bitki hücre kültüründe büyüme ve bölünme süreci ilk kez domates bitkisinin köklerinin kültürlerini oluşturmayı başaran White tarafından gerçekleştirilmiştir. Ball, 1946 yılında sürgün ucundan bütün bitkiyi elde ederek günümüzde *in vitro* vejetatif çoğalma olarak bilinen tekniği ilk kez başarı ile gerçekleştirmiştir [11].

Bitki doku kültürü alanında gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen veriler vasıtasıyla bitki fizyolojisi ve biyoteknolojisi alanlarında birçok gelişme sağlanmıştır. Bitki hücre ve doku kültürü deneylerinin *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmesi araştırmalarda

büyük avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlardan bazıları çok sayıda alt kültür oluşturulabilmesi, bitki gelişiminin kısa sürede tamamlanabilmesi, bitkinin gelişimi için optimum koşulların tespit edilip uygulanabilmesi sayılabilir. Bitki büyümesi, hücre bölünmesi ve biyokimya analizleri için temel düzeyde kullanılan bitki doku kültürü, gelişen teknoloji ile birlikte çok daha farklı alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bitki doku kültürü uygulamaları temel, ekonomik ve ticari uygulamalar olarak 3 grupta incelenebilir. Bitki doku kültürü tekniğinin farklı uygulama alanları Şekil 1.1’de verilmiştir [12].



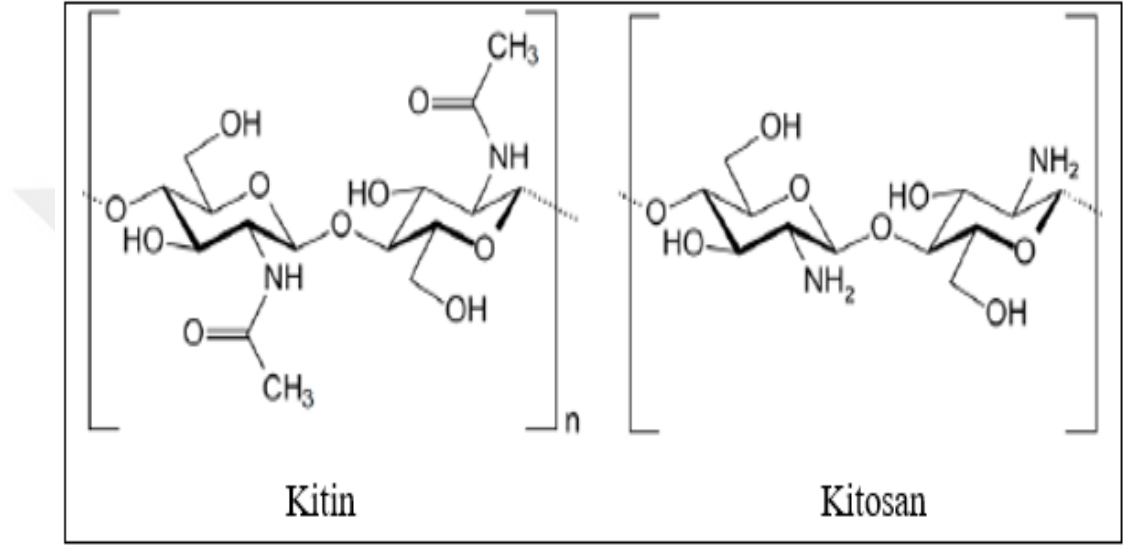
Şekil 1.1. Bitki doku kültürü tekniğinin farklı uygulama alanları [12]

In vitro kültür teknikleri günümüzde ticari öneme sahip bitkilerin üretilmesi, ender görülen türlerin hızlı ve etkili bir biçimde çoğaltılması, bitki genom transformasyonu ve sağlıklı bitki üretimi için çok önemli bir rol oynamaktadır [13]. Kullanılan materyale bağlı olarak bitki doku kültürü teknikleri 5 grupta incelenebilir. Bu teknikler: kallus kültürü, meristem kültürü, hücre kültürü, organ kültürü ve protoplast kültürü olarak adlandırılmaktadır [14].

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan bitkilerin ihtiyaçlarını karşılayabilmek için farklı besi ortamları kullanılabilir. Bu besi ortamlarının en çok bilinen ve yaygın olarak kullanılanı Murashige & Skoog (MS) besi ortamıdır [15]. Bu besi ortamlarının içerikleri şu şekilde gruplanabilir: mikro elementler, makro elementler, vitaminler, şekerler, katılaştırıcı ajanlar, aminoasitler, bitki büyüme düzenleyicileri ve zaman zaman besiyeri pH'sini dengede tutmak için kullanılan tamponlar [16].

1.2. Kitosanın Genel Özellikleri

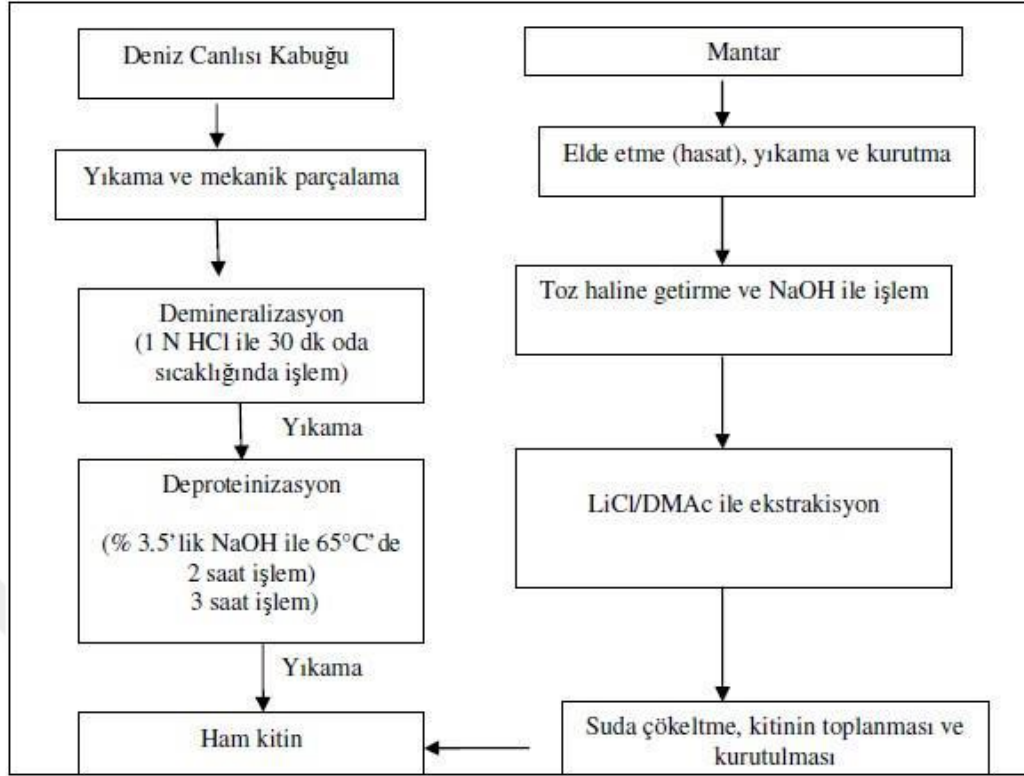
Kitosan (CHI), mantarların hücre duvarlarında, bazı alglerde, Crustacea üyelerinin ve böceklerin kabuklarında bulunan deasetile halde olan kitin polimeridir [17]. Kitin, yapısında *N*-asetil-D-glukozamin bulundurur ve bu asetil gruplar kitin içeriğinde %80'den fazladır. Bu asetil grupları deasetillenerek D-glukozamine dönüştürülür ve kitosanı oluşturur. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları Şekil 1.2'de belirtilmiştir [7].



Şekil 1.2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı [7]

Henri Braconnot'un 1811 yılında yaptığı mantarlar ile ilgili çalışmada kitin veya poli (β-(1 → 4)-*N*-asetil-D-glukozamin) ilk kez keşfedilmiştir [18]. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda böceklerin dış kabuklarında da bulunduğu keşfedilen kitin, doğrusal bir polisakarittir ve biyolojik olarak doğaya geri kazandırılabilir ve üretim hızı en yüksek maddelerden biridir [19].

Kitinin ticarete ana elde kaynakları karides ve yengeç kabuklarıdır ve kitin endüstriyel ortamda asit işleme ile CaCO₃ (kalsiyum karbonat)'ün çözülmesi ve ardından proteinleri bazik bir çözelti ile çözerek özütlenmesi ile elde edilir [20]. Ayrıca kitin içerisindeki pigmentleri ayrıştırabilmek için prosese renksizleştirme adımı eklenebilir [21]. Mantarlardan ve deniz hayvanlarının kabuklarından kitin eldesi Şekil 1.3'te verilmiştir.



Şekil 1.3. Mantarlardan ve deniz hayvanlarının kabuklarından kitin eldesi [20]

CHI kullanımının temel amaçlarından biri *in vitro* sistemlerde ve gelişme kabiliyetini sürdüren bitkilerde yararlı bileşikler üretilmesinin sağlanmasıdır [22]. CHI kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda lignin biyosentezi ve hücre duvarı lignifikasyonunun artış gösterdiği ve bu durumun bitki örneklerinde sürgün oluşmasını desteklediği gösterilmiştir [23]. CHI, bitkiler için savunma mekanizmasını uyaran bir faktör olmasının yanı sıra doğal bir bitki büyüme arttırıcı (BBA) olarak da kullanılmaktadır [24]. CHI, ilginç özellikleri nedeniyle çeşitli endüstriler tarafından kullanılan doğal ve güvenli bir üründür. Kitosanın bitki büyümesini teşvik ettiği, yenilebilir ürünlerin güvenliğini koruduğu ve çeşitli bahçecilik ürünlerinde abiyotik ve biyotik stres toleransını indüklediği düşünülmektedir. Yenilikçi çalışmalarda, dengeli ve sürekli bir beslenme yoluyla mahsul büyümesini teşvik etmek için gübreler, herbisitler, pestisitler ve mikro besinler içerisine kitosan biyopolimeri sentezlenmektedir. Ek olarak, kitosan nanopartikülleri bitki transformasyonu için güvenli bir şekilde genetik materyal sağlayabilmektedir. [25].

CHI biyopolimeri kullanımının glutamin sentetaz, proteaz gibi azot enzimlerinin aktivasyon düzeylerini artırarak bitki örneklerinin büyüme gelişmesine olumlu etkileri

ortaya konmuştur [26]. *In vitro* teknikleri ile çoğaltılan bitkilerin, CHI biyopolimerine karşı gösterdiği tepkiler kitosanın polimerizasyon ve/veya asetilasyon derecelerine bağlıdır [27].

DA, CHI zincir konformasyonu, elektrostatik özellikleri ve biyolojik özellikleri gibi kitin ve kitosanın fiziko-kimyasal özelliklerini etkileyen önemli bir parametredir. Aynı zamanda biyolojik özellikleri, örneğin lizozim tarafından biyolojik olarak parçalanmayı, yara iyileştirme özelliklerini ve yeni doku geliştirmeyi etkilemektedir [6, 28].

Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen CHI, doğal olarak veya alkali muameleden geçirilerek pozitif yüklü bir polisakkarit haline gelmektedir. Kitosan sulu asidik solüsyonlarda veya organik asitlerde çözünmektedir. Kitinin kitosana dönüştürülmesi için asitte çözdürülmesi gerekmektedir. Asitte çözdürülen kitin polimerinin DA'sı % 0-50 mertebesine ulaştığında kitosan biyopolimeri elde edilmektedir. Kitosanın DA'sı azaldıkça kristal yapı oluştuğundan asitte çözünürlüğü zorlaşmaktadır. Kitin ve kitosanın nicelliği asitte çözünme durumuna göre değerlendirilebilmektedir [29].

Kitosanın deasetilasyon derecesi (DD), *N*-asetil-D-glukozaminin, D-glukozamine dönüşme oranı olarak tanımlanmaktadır. Bazı çalışmalarda kitinin DA'sı adı altında bu oranın tersi kullanılabilmektedir. Deasetilasyon prosesinde kitinin DD'si %50 oranını geçtiğinde kitin sulu asidik ortamda çözünebilir hale gelir ve CHI elde edilmiş olur [30]. Polimerizasyon derecesi (DP) ise kitosan biyopolimerinin monomer sayısı olarak tanımlanır. CHI biyopolimerinin DP'si 20'nin altında ise kitosan oligomeri olarak adlandırılır. Kitosanın biyolojik davranışları DP ve DA derecelerinden etkilenmektedir [31]. Kitosanın bitki büyümesi üzerindeki etkileri DP ve DA'ya bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir [27]. Bir polimerdeki monomerik birimlerin sayısını temsil eden DP ve *N*-asetillenmiş glukozaminin molar fraksiyonu olan DA, bitkilerin tepkilerini etkileyen ana moleküler özelliklerden ikisidir [32]. Eşdeğer şartlarda üretilen ve birbirleri ile benzerlik gösteren kitin hammaddelerinden üretilen kitosanlar arasında DD, ortalama molekül kütlesi ve kütle dağılımı açısından farklılıklar olabilir. Hammaddenin benzer olmasına karşın söz konusu değerleri farklı olan iki kitosan biyopolimeri fiziksel ve biyolojik açıdan farklı davranışlar sergileyebilir. Bu farklılıkların ortadan kaldırılması için kimyasal veya enzimatik

hidroliz ile DD'ye NaOH müdahalesi yapılarak azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir [33, 34].

CHI biyopolimeri kitinaz ve glukanaz gibi savunma genlerini ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz enzimlerini uyarır. Kitosan bitki gelişimini etkileyen, stres duyarlılığını değiştiren ve patojenik direnç oluşturan bir biyopolimerdir. Bu etkilerden hangilerinin görüleceği veya baskın olacağı kitosanın elde edildiği ana maddeye ve konsantrasyonuna, çalışmanın gerçekleştirildiği bitki türüne ve bu bitkinin gelişme karakteristiğine göre değişiklik gösterebilir [33]. CHI biyopolimeri kullanılan bitkilerde savunma sistemleri farklı tepkimelerin ve enzimlerin aktif hale gelmesi ile oluşabilir. CHI ile bitki arasında oluşan etkileşim sonucu; Hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimi ile oksidatif tepkime gerçekleşmesi, biyosentezde önemli bazı bitki savunma enzimlerinin aktif hale gelmesi, ROS sisteminde katalaz ve peroksidaz gibi enzimlerin aktif hale gelmesi sonucunda bitki savunma sistemleri uyarılır [35, 36]. CHI, kuraklık ve sıcaklık gibi çevresel streslere karşı direnç oluşturabilir [37]. Aynı zamanda kitosan kullanımının bitkideki klorofil miktarını artırdığı ve bu sayede fotosentez artışı ile bitki büyümesini olumlu etkilediği ortaya konmuştur. Bazı bitkilerde ise bitki yapraklarına uygulanan kitosan, yaprak sayısı, yaprak boyutu, sürgün sayısı, köklerin taze ve kuru ağırlıklarının artışı tetikler ancak klorofil miktarını değiştirmez [26,38].

1.3. Kitosan ile gerçekleştirilen bazı çalışmalar

Nge ve diğ. (2006), yaptıkları çalışmada karides ve mantardan elde edilen farklı moleküler ağırlıktaki kitosan oligomerlerinin *in vitro* kültürlerine uygulanması sonucu *Dendrobium phalaenopsis*'de meristem kültürü ve protokorm oluşumuna etkilerini incelemiştir. Çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırılan kitosan uygulanan bitkilerde protokorm benzeri yapıların oluşumunun en üst düzeyde olduğu grupların karides kökenli ve 1 kDa moleküler ağırlıktaki CHI uygulanmış olan orkideler olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada 10 kDa moleküler ağırlıktaki fungal kökenli kitosanın 1 kDa moleküler ağırlıklı karides kökenli kitosandan daha etkin olduğu gösterilmiştir [17].

CHI biyopolimeri takviye edilmiş kültür ortamının kullanılması, *in vitro* kültürde bitkiciklerin kök ve sürgün biyokütlesini, fotosentezini ve ilgili parametrelerini

arttırmıştır. CHI, özellikle olgunlaşmamış bitkilerde veya doku kültüründe orkide üretimi için bitki büyümesini artırıcı olarak kullanılabilir. *Dendrobium* "Missteen" bitkisinin sürgün uzunluğunu artırmaktadır. Kitosan, giberellinler gibi bitki hormonlarını sentezlemek için bir moleküler sinyal yolağını tetikleyebilir. Ek olarak CHI, oksin biyosenteziyle ilgili bazı sinyal yollarıyla büyümeyi ve gelişmeyi artırabilir [39, 40].

Kitosanın çilek bitkisinin yapraklarına uygulanmasının bitki büyümesi, verimi ve meyve kalitesi üzerine etkilerinin incelenmesi için 2007 ve 2008 yıllarının iki sezonunda tarla deneyleri yapılmıştır. Bitki örnekleri killi-balçıklı bir toprakta yetiştirilmiştir. CHI çözeltisi, ekimden on hafta sonra 0 (kontrol), 1, 2, 3 ve 4 cm³/L konsantrasyonlarında dört hafta arayla üçer kez püskürtülmüştür. Veriler, kitosan uygulamasının sürgün uzunluğunu, yaprak sayısını, yaprakların taze ve kuru ağırlıklarını ve verim bileşenlerini (adet ve ağırlık) iyileştirdiğini göstermiştir. En iyi sonuç 2 cm³/L konsantrasyonunda elde edilmiş olmakla beraber tüm konsantrasyonlar kontrol grubundan daha iyi etkiler göstermiştir. Tüm konsantrasyonlar için meyvelerin ortalama ağırlıkları ve kaliteleri benzer özellikler göstermiştir [41].

CHI uygulamasının *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn'in bitki gelişimi ve çiçek kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. CHI biyopolimeri içeren (% 1, m:m) bir toprak karışımının uygulanması büyümeyi önemli ölçüde artırırken, % 0,1 CHI içeren laktik asit ile tohumun kaplanması etkisiz olmuştur. Kitosarla muamele edilmiş toprakta yetiştirilen bitkiler, kontrol bitkilerinden 15 gün önce çiçek açmıştır ve kontrol bitkilerine ve kitosarla muamele edilmiş tohumlara kıyasla kesme çiçeklerin sayısı ve ağırlığının daha fazla olduğu belirlenmiştir [42].

Acemi ve Kıran Acemi (2019), *Ipomea purpurea* bitkisinin farklı DP ve konsantrasyonlarda CHI biyopolimeri ile muamele edilmesi sonucunda fotosentetik pigment, protein ve kuru madde içeriğindeki değişiklikler ve bitki yaprakları üzerine etkileri araştırılmıştır. *I. purpurea*'nın nodal eksplantları, 2-15 arası ve 70 DP'ye sahip CHI karışımlarının 5, 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarındaki besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Hem oligomerik hem de polimerik CHI muamelelerinin, kontrol grubuna kıyasla yapraklarda klorofil-a içeriğini artırdığı bulunmuştur. Polimerik kitosan, klorofil-b ve karotenoit sentezini oligomer karışımından daha etkili bir şekilde

uyarmıştır. Ayrıca, 10 mg/L polimerik CHI, *I. purpurea*'daki toplam protein üretimini ve bitki kuru madde içeriğini daha iyi tetiklemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, fotosentetik pigment, protein ve bitki kuru madde üretimi üzerindeki uyarıcı etkilerinden dolayı, düşük konsantrasyonda CHI oligomerlerinin ve orta konsantrasyondaki polimerlerin, süs bitkileri için bitkiyi etkileyebilecek güvenli ve doğal biyostimülantlar olarak kabul edilebileceğini göstermiştir [43].

Asghari-Zakaria ve diğ. (2009), kitosanın patates mikroçoğaltımında bitkicik büyümesi ve mini yumru ile çoğaltım verimliliğini artırmak için çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada *in vitro* koşullar altında MS besisi ortamına 0, 5, 15, 50, 150, 500, 750 ve 1000 mg/L CHI eklenmiştir. Çalışma sonucunda 750 ve 1000 mg/L CHI konsantrasyonlarında kültür ortamının katılaşmadığı, 500 mg/L konsantrasyondaki CHI uygulamasının sürgünün taze ağırlığını arttırdığı, daha düşük konsantrasyonlarda ise bu özelliği etkilemediği ortaya koyulmuştur. 5 ve 15 mg/L konsantrasyonlarındaki kitosan, *in vitro* bitkiciklerin köklerinin taze ve kuru ağırlığında önemli bir artışa neden olurken, daha yüksek konsantrasyonlarda ciddi bir azalma gözlemlenmiştir. 500 mg/L CHI uygulamasında, kontrol bitkiciklerine kıyasla mini yumru sayısında ve veriminde önemli artış meydana gelmiştir. Test edilen daha düşük konsantrasyonların verim parametreleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Mevcut sonuçlar, çözünür kitosanın, *in vitro* fidanlardan patates tohumu üretimine başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir [44].

Putalun ve diğ. (2007), Asteraceae familyasının önemli bir tıbbi bitkisi olan *Artemisia annua* L. (pelin otu veya tatlı pelin otu) üzerinde kitosanın saçak kök gelişimine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 50, 100 ve 150 mg/L konsantrasyonlarında CHI biyopolimeri içeren MS besisi ortamı kullanılmıştır. Saçak kök gelişimine en yüksek etki, kontrol grubuna oranla 6 kat kuru ağırlık artışı sağlayan 150 mg/L konsantrasyonundaki CHI biyopolimeri ile elde edilmiştir [45].

Kanchanapoom ve diğ. (2012), *Lilium longiflorum* Thunb. (zambak) bitkisinin CHI ve benziladenin (BA) ile muamele edilmesi sonucunda sürgün gelişimine olan etkileri incelemişlerdir. Çalışmada 0, 5, 10, 15, 20 ve 25 mg/L konsantrasyonlarında CHI biyopolimeri ve 0, 1, 3 ve 5 mg/L BA kullanılarak hazırlanan MS besisi ortamlarının tamamında sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Kitosanın tek başına uygulanmasının

sürgün sayısında en iyi sonuçlar verdiği ve CHI konsantrasyonu arttıkça sürgün ve yaprak sayısının arttığı belirtilirken, belirtilen konsantrasyonlarda CHI ile 5 mg/L BA'nın birlikte uygulanması durumunda CHI konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısının azaldığı gözlemlenmiştir [46].

Lopez-Moya ve diğ. (2017), *Arabidopsis thaliana* bitkisinin CHI ile muamele edilmesinin kök uzunluğu, taze ağırlık, yaprak sayısı ve çiçeklenme süresine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarında CHI biyopolimeri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda CHI konsantrasyonu arttıkça kök uzunluğu ve taze ağırlığın azaldığı ve yaprak sayısının 0,5, 1 ve 2 kitosan konsantrasyonlarında azaldığı ve diğer konsantrasyonlarda değişmediği gözlemlenmiştir. Çiçeklenme süresinin tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla daha kısa sürede gerçekleştiği görülmüştür. *A. thaliana* köklerinde CHI konsantrasyonuna bağlı oksin sentezi, taşınması ve sinyalleşme değişiklikleri gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; yüksek doz CHI, kök apikal meristeminde *WOX5* ekspresyonunu azaltmış ve kök büyümesini baskılamıştır [47].

Anusuya ve Sathiyabama (2016), 30 günlük *Curcuma longa* L. (zerdeçal) bitkisinin yapraklarına CHI (%0,1, m:v) biyopolimerini 210 günlük olana kadar püskürtme yolu ile muamele etmişlerdir. Bitki başına günde 6 ml CHI uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda; CHI uygulamasının kontrol bitkilerine kıyasla sürgün uzunluğu ve yaprak sayısını artırdığı gözlenmiştir. Bitkilerin taze ağırlığının özellikle 5. aydan itibaren artış gösterdiği belirtilmiştir. Zerdeçal bitkisinde bulunan kurkumin pigmenti kontrol grubunda 8,64 mg iken CHI ile muamele edilen bitkilerde 35,87 mg olarak ölçülmüştür. Çalışma, kitosanın zerdeçal bitkilerinin büyüme ve kurkumin içeriğini artırmasının yanı sıra savunma tepkilerini indüklemek için çevre dostu bir bileşik olarak kullanılabileceğini göstermektedir [48].

Kiang ve diğ. (2004), bitkiler dışında HEK 293 (embriyonik böbrek hücresi), SW 756 ve HeLa (rahim hücreleri) hücrelerine farklı moleküler ağırlıklarda (390 kDa, 209 kDa ve 138 kDa) ve DD'lerde (%62, %70 ve %90) CHI biyopolimeri kullanımının gen transferine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada; farklı molekül ağırlıklarının ve farklı DD'lerin gen transferi etkinliğinde farklılıklar oluşturduğu ortaya koyulmuştur. Sonuç

olarak; *in vitro* çalışmalarda %62 ve %70 DD'ye sahip kitosanlarda %90 DD'ye göre daha fazla gen transferi sağlandığı belirtilmiştir [49].

Kulikov ve diğ. (2006), *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinin CHI biyopolimeri kullanılarak çoğaltımında antiviral etkileri incelemişlerdir. Çalışmada 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında, 700 kDa moleküler ağırlığa ve %85 DD'ye sahip CHI biyopolimeri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; kitosanın moleküler ağırlığı azaldıkça antiviral aktivitelerin arttığı belirtilmiştir. Bu durumun düşük moleküler ağırlıktaki küçük CHI molekülerinin bitki hücrelerine daha iyi nüfuz edebilmesinden kaynaklandığı vurgulanmıştır [50].

Falcón ve diğ. (2008), *Nicotiana tabacum* bitkisi üzerinde 250, 500 ve 1000 mg/L konsantrasyonlarında ve %1, %12 ve %36,5 DA'ya sahip CHI kullanımının patojenlere karşı etkilerini araştırmışlardır. CHI uygulaması bitki üzerine spreyleme ve tohum kaplaması yoluyla gerçekleştirilmiştir ve patojenlere karşı direnç yaratmıştır ve CHI ile tohum kaplaması yapılan bitkilerde hastalık direnci sağlandığı gözlenmiştir. Farklı DP ve DA'larda dirençler farklılık göstermiştir. Patojen direncinin en yüksek olduğu DA'lar %1 ve %36,5 olarak belirtilmiştir [51].

Salachna ve Zawadzińska (2014), *Freesia* (frezya) bitkisinin büyüme ve çiçeklenmesine CHI biyopolimerinin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 2, 50 ve 970 kDa (sırasıyla düşük, orta ve yüksek) moleküler ağırlıklarında ve %85 DD'ye sahip CHI biyopolimeri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; yüksek konsantrasyonda CHI kullanımının sürgün uzunluğunu, yaprak sayısını ve klorofil içeriğini artırdığı ve tüm konsantrasyonlarda bu özelliklerin kontrol grubuna kıyasla daha iyi olduğu belirtilmiştir. Orta konsantrasyonda en yüksek sürgün sayısı elde edilmiştir. Çiçeklenme süresi tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla daha iyi olup yakın özellikler göstermiştir [52].

Pornpienpakdee ve diğ. (2010), farklı DD ve konsantrasyonlarda oligomerik ve polimerik CHI kullanımının *Dendrobium* orkideleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada sırasıyla %70, %80 ve %90 DD'ye sahip polimerik (P-70, P-80, P-90) ve oligomerik (O-70, O-80, O-90) CHI biyopolimerleri 10, 20, 40 ve 80 mg/L konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; protokorm oluşumu öncesi hayatta kalma oranının en iyi 10 mg/L ve 20 mg/L P-70 konsantrasyonları ile

sağlanabildiği, protokorm (çimlenme sonrası oluşan yapı) çoğaltımı için en uygun CHI biyopolimerlerinin 10 mg/L P-70 veya 20 mg/L P-90 olduğu, bitkicik miktarı ve kalitesinin 10 mg/L O-80 ve P-80 konsantrasyonlarında en yüksek mertebeye ulaştığı, sürgün uzunluğunun tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ve en iyi sonucun 10 mg/L P-80 konsantrasyonu ile elde edildiği, kök uzunluğunun tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ve en iyi 10 mg/L ve P-80 ve O-90 konsantrasyonlarında görüldüğü, sürgün sayısının ise uygun konsantrasyonlar ile arttığı ve en yüksek sürgün sayısının 10 mg/L O-70 ve O-80 konsantrasyonlarında elde edildiği belirtilmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde tek bir konsantrasyonun tüm özelliklere en iyi etkileri sağlayamadığı da özellikle belirtilmiştir. Geliştirilmesi istenen farklı özellikler için farklı büyüme periyotlarında uygun konsantrasyonların kullanımı durumunda bitki büyümesi olumlu yönde tetiklenebilmektedir [53].

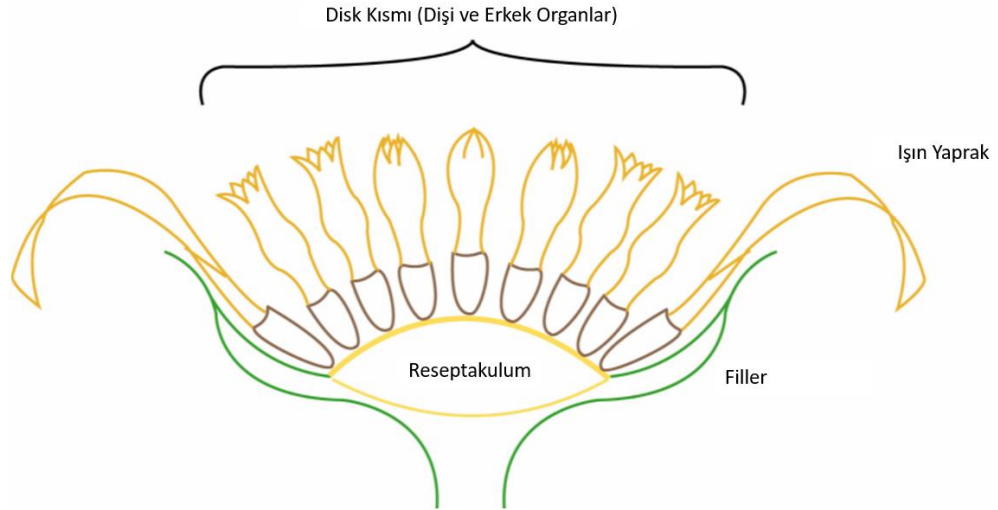
1.4. Çalışmada Kullanılan Bitki Hakkında Genel Bilgiler

1.4.1. Asteraceae familyası

Asteraceae (Compositae) yaklaşık 1.620 cinsi ve 23.600'den fazla türü ile en büyük çiçekli bitki ailesidir [54]. Bu familya Antarktika hariç dünya genelinde görülmektedir. Familya üyeleri özellikle Kuzey Amerika, And Dağları, Doğu Brezilya, Güney Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Asya ve Güneybatı Çin'in tropikal ve subtropikal bölgelerinde çeşitlilik gösterir. Asteraceae türlerinin çoğu otsudur, ancak familyanın önemli bir üyesi, özellikle Kuzey ve Güney Amerika, Afrika ve Madagaskar'ın tropikal bölgelerinde ve Atlantik ve Pasifik Okyanuslarındaki izole adalarda ortaya çıkan çalılar ve hatta ağaçlardan oluşur. Pek çok ayçiçeği türü arsızdır ve özellikle bitkilerin gelişim göstermesi için zor sayılabilecek bölgelerde dahi bol miktarda bulunur ancak bunların önemli bir kısmı, özellikle dağlık tropikal bölgelerde, dar endemiktir. Dağlık tropikal bölgelerde insan yayılmasının hızlandığı kontrolsüz habitat dönüşümü nedeniyle, bu türlerin bir kısmı sonuç olarak nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Bu familya, yenilebilir yağların, tatlandırıcıların ve çay karışımlarının önemli kaynakları olan birkaç türü içerir. Familyanın çeşitli cinslerinin üyeleri peyzaj alanlarındaki kullanımları ile tanınır ve dünya çapında bahçelerde popülerdir. Bu bitkilerden başlıcaları; papatya, zinnia, kadife çiçeği, yıldız çiçeği ve krizantem (kasımpatı) olarak öne çıkmaktadır [55].

1.4.1.1. Asteraceae familyasının karakteristik özellikleri

Familyada bulunan bitkiler birkaç istisna dışında, bir kapitulum veya baş, bir oküler ovaryum ve tek ovul ve yapıyı çevreleyen kaynaşmış anterlerden oluşur. Kapitulum (tepecik), 1 ila yüzlerce ayrı çiçek içerebilen özel bir rastgele çiçeklenme şeklidir. Kapitulumdaki çiçeklenme dizisi neredeyse her zaman dışarıdan merkeze doğrudur, yani merkezciidir. Çiçekler düz, içbükey, dışbükey veya nadiren sütunlu olabilen genişletilmiş bir sürgün olan disk veya yuva üzerine oturur. Disk ve çiçekler, filler adı verilen ve toplu olarak bir tutulum oluşturan parantez veya yaprak benzeri yapılarla çevrilidir. Filler, tek sıra halinde düzenlenebilir ve eşdeğer uzunlukta olabilir veya uzunlukları eşit olmayabilir. Çoğu ayçiçeğinin çeşitli dizilişlere sahip filler yapıları vardır. İmbrikat (üst üste binmiş düzensiz yapılar) yapısındaki bitkiler, familyada en yaygın görülen ve çok sayıda filler dizisinin birbiriyle örtüştüğü enginar (*Cynara cardunculus*) ile örneklenir. Bazı türlerde en dıştaki filler bazen yapraklara benzer. Reseptakulum (çiçek tablası) çıplak olabilir veya bazen her bir çiçeği çevreleyen çıkıntılar, pullar veya kıllar denen yapılara sahip olabilir [56].



Şekil 1.4. Asteraceae familyasının karakteristik yapısı [57]

Asteraceae'de ikisi aktinomorfik ve dördü zigomorfik olmak üzere altı tür korolla vardır. Aktinomorfik korollalar, yukarıdan bakıldığında beş kollu yıldız benzeyen beş eşdeğer lobdan oluşur ve normalde disk korollası olarak adlandırılır (disk alanının çoğunu kapladıkları için). Zigomorfik korollalar, bazı türleri birkaç sıraya sahip olmasına rağmen çoğunlukla kapitulumdaki tek sıradan oluşur. Bilabiata korollaları

genellikle sadece ailenin en erken ayrışmalarına ait birkaç cinstе bulunur. Işın çiçeği, Cichorioideae ve Asteroideae alt ailelerinin birkaç kabilesinde bulunur ve 2-3 lobda sona eren bir laminadan oluşur. Arctotideae kabilesinin (tribus) bazı üyeleri, 4 lobda sona eren bir ışın çiçeği içerir [58].

1.4.1.2. Asteraceae familyasının taksonomik özellikleri

Asteraceae familyasının cinsleri ilk kez Cassini tarafından 1819 yılında gruplandırılmıştır. Günümüzde halen taksonomistler tarafından sınıflandırmada bu tanımlamalar kullanılmaktadır. 1976 yılında Carlquist ve Wagenitz tarafından yapılan çalışmada Cichorioideae ve Asteroideae olarak iki alt familyaya ayrılmıştır. Bu iki alt grubun ayırt edici morfolojik özelliklerini korolla, anter ve stil yapısı oluşturmaktadır [59-62].

Moleküler filogenetik çalışmalardan elde edilen sonuçların dâhil edilmesiyle, Asteraceae'nin sınıflandırması, geleneksel olarak Cichorioideae'ye dâhil edilen monofiletik grupların tanınmasıyla nispeten hızlı bir şekilde değişmiştir. Jansen ve Palmer'ın (1987) çalışmasıyla Bremer (1994), üç alt familyayı (Asteroideae, Barnadesioideae ve Cichorioideae) ve 17 sınıfı tanıtmıştır. Baldwin ve diğerlerinde adı geçen moleküler analizle tanımlanan üç yeni sınıfı tanıtarak sınıfların sayısını 25'e çıkarmışlardır. Jeffrey (2007), Panero ve Funk'ın (2002) gruplamasını referans olarak 24 sınıfı tanıtmıştır ve onları beş alt familyada gruplandırmıştır. Moleküler çalışmalarda hem takson hem de karakter örneklemesini genişletme kapasitesi büyüdükçe, filogenetik analizlerde daha fazla çözünürlük ve kesinlik sağlandıkça, familyanın daha büyük soyları belirlenmiştir. Artan örnekleme, özellikle familyada anormal olduğu düşünülen taksonların örneklenmesi (belirsiz sınıf konumu, Bremer, 1994), *Corymbium*, *Gymnarrhena* ve *Hecastocleis* cinslerinin, büyük kuşaklara kardeş olan monotipik soyları temsil ettiği ve öncekinden daha fazla soy için kanıt sağladığı keşfiyle sonuçlanmıştır. [58, 63-66].

Asteraceae'nin sınıflandırmasına, familyanın türlerinin %70'inden fazlasını içeren Asteroideae alt familyası hakimdir. Asteroideae içindeki moleküler çalışmalarda bulunan üç ana soy (Kim ve Jansen, 1995, Panero ve Funk, 2008) son zamanlarda süper sınıf düzeyinde (Robinson, 2004, 2005) Asterodae, Helianthodae ve Senecionodae olarak tanınmıştır. Diğer büyük alt familyalar, her biri 2000'den fazla

türe sahip Carduoideae ve Cichorioideae'dir. Diğer tüm alt familyaların her biri, yalnızca bir tür içeren Gymnarrhenoideae ve Hecastocleidoideae ile 1000'den az tür içerir [66-69].

1.4.2. *Ageratum houstonianum* Mill. bitkisi hakkında genel bilgiler

A. houstonianum Mill., yaygın bilinen ismi “mavi vapur dumanı” olan, İngilizce’de “blue maudlin” olarak bilinen, EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü) kodu AGEHO olan, Meksika ve Orta Amerika'ya özgü tek yıllık bir bitkidir. Keşfedildikten kısa bir süre sonra süs olarak kullanılmaya başlandığı Avrupa'ya getirilmiştir [3]. Rüzgar veya su ile kolay dağılan küçük tohumların çok miktarda üretiminden dolayı türlerin doğal ortamı dışında bir yabancı ot ve istilacı olduğu bildirilmektedir [70]. Ayrıca tohumları hayvanlar, insan etkisi, araçlar ve çeşitli tarımsal ürünlerin taşınması yoluyla yayılmaktadır [3, 70]. Temelde bahçe kökenli bir bitki olmasına karşın, tarlalarda, çorak arazilerde, yol kenarlarında, orman yollarında, mahsullerde, nehir kenarlarında ve sulak alanlarda yayılım göstermiştir [70]. Türlerin Çin, Tayvan, Mozambik, Svaziland, Tanzania, Zimbabve, ABD (Hawaii), Küba, Peru, Avustralya, Fiji, Fransız Polinezyası, Yeni Zelanda'da istilacı olduğu ve yabancı ot olduğu bildirilmiştir [71]. Güney Afrika'daki en yüksek istilacı kategorisine sahip bitkidir [72]. Ayrıca Kenya, Malawi ve Ruanda'da da istilacı olduğu bildirilmektedir. Barua ve diğ., bu türlerin ekosistemleri etkileyen ve Hindistan'ın Assam kentinde yerel türlerin azalmasına neden olan bir istilacı olduğunu bildirmiştir. Özellikle su kanalları boyunca ve nehir kıyısındaki bitki örtüsünde istilacı olabilmektedir [73, 74].

1.4.2.1. *Ageratum houstonianum* bitkisinin sınıflandırması

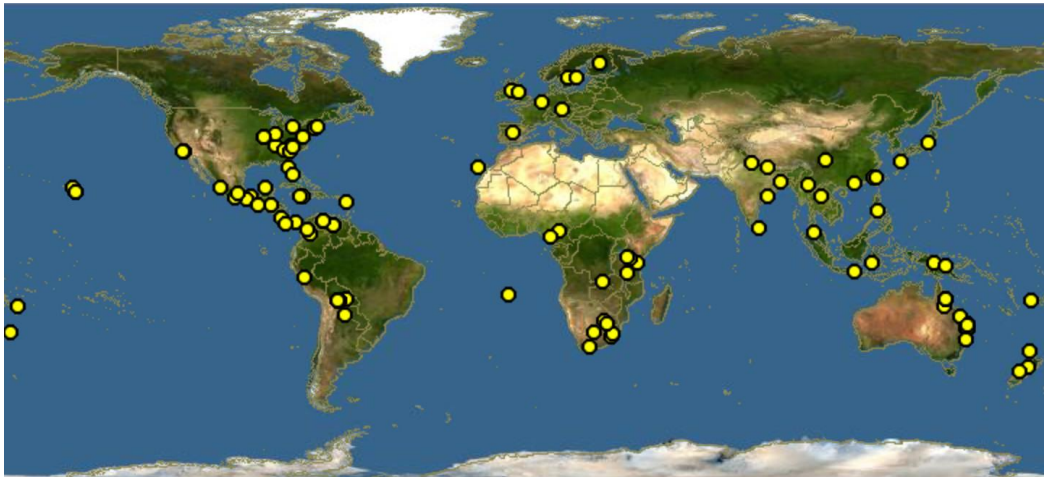
A. houstonianum bitkisinin sınıflandırması şu şekildedir [75]:

Alem : Plantae
Şube : Spermatophyta
Sınıf : Dicotyledonae
Takım : Asterales
Familya : Asteraceae
Cins : *Ageratum*
Tür : *Ageratum houstonianum* Mill.

1.4.2.2. *Ageratum houstonianum* bitkisinin kökeni

Ageratum, çiçeklerin uzun ömürlü doğasına atıfta bulunan, Yunanca a- (olumsuzluk) ve -geras (yaşlılık)'tan türetilmiş bir Linneaus sınıflandırmasıdır. Türlerin çoğu Yeni Dünya'ya özgüdür. *A. houstonianum* ilk olarak 1731'de Meksika'nın Veracruz kentinde görülmüştür ve şu anda popüler bir bahçe bitkisidir. Yetiştirilen çeşitler arasında melezler bulunur [3].

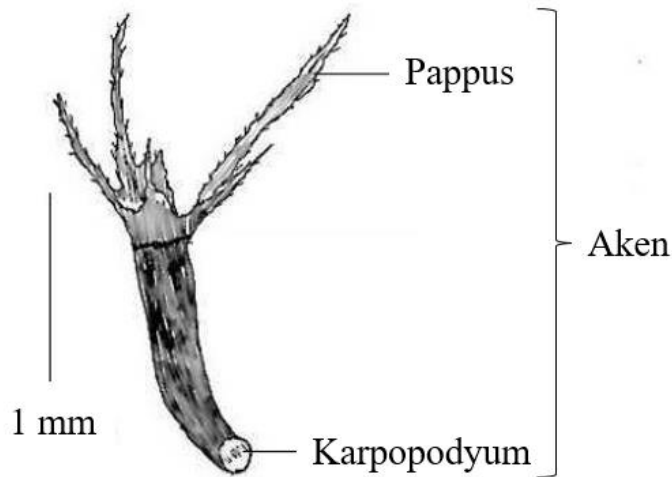
A. houstonianum tohumları Dr. William Houston tarafından Meksika'nın Veracruz şehrinden İngiltere'ye gönderilmiş ve burada ilk bitki örnekleri toplanmıştır. Tür, zaman içinde doğaya adapte olmuştur ve 1768'den önce İngiltere'deki sera topraklarında yabancı ot haline gelmiştir. Avrupa'da 1822'de yetiştirilerek ve 1860'da Salzburg'da (Avusturya) görüldüğü rapor edilmiştir [3]. Hindistan'a ondokuzuncu yüzyılın başlarında tanıtıldığı ve *Ageratum conyzoides* de dâhil olmak üzere yaylalarda yer alan otsu bitkilerin bölgelerini işgal ettiği bildirilmiştir [74, 76]. Johnson, türün bahçe bitkisi olmasına karşın merkezi Florida, Küba, Jamaika ve Hawaii'de yerleşmeye başladığını bildirmektedir. Ayrıca türlerin Afrika, Çin, Hindistan, Fransa, Java Adası, Okinawa (Japonya), Filipinler ve Kuzey Vietnam'da yayılım gösterdiği bildirilmiştir. ABD ve Karayipler'de 1800'lerin sonlarında bahçe ve istilacı bitki olarak ortaya çıktığı raporlanmıştır [77, 78]. *A. houstonianum* bitkisinin dünya genelinde yayılımı Şekil 1.5'te verilmiştir [79].



Şekil 1.5. *A. houstonianum* bitkisinin dünya genelinde yayılış haritası [79]

1.4.2.3. *Ageratum houstonianum* bitkisinin fiziksel özellikleri

A. houstonianum, 25-90 cm uzunluğa ulaşabilen tek yıllık bir bitkidir ve kökleri lifli yapıdadır. Alt düğümlerde, gövde yatık ise basit veya dallanmış, üst kısımları dik veya yatık formda kırmızımsı-yeşil renge ve daha üstte salgılı-villüslü sarımsı beyaz tüylere sahiptir. Yapraklar karşılıklı, alt kısmı oval ve uca doğru daralan formda, 2,4 - 9,5 cm uzunluğunda, 1,7 - 8 cm genişliğinde olabilen, üst yüzeyi koyu yeşil renkte, alt yüzeyi ise yeşil, kırışık ve yoğun tüylü formdadır. Yaprak kenarları dişli bir yapıdadır ve bazen uçları keskin olabilir. Yaprak yüzeyindeki damarlar ise tüysüz yapıdadır. Yaprak sapı 0,6 - 3,5 mm uzunluğunda beyaz tüylere sahip, üstteki sap kısmındaki çiçeklenme ucunda, küme halinde 5 - 15 baştan oluşan küçük çiçekçikler (tomurcuk) bulunur. Bu tomurcukların taban kısmında yeşilden kahverengiye 4 - 5 mm yüksekliğinde ve 0,5 - 0,75 mm genişliğinde sap ile tomurcuğu birleştiren yapılar bulunur. Korolla (renkli kısım) 2,5 - 3,5 mm uzunluğunda, huni şeklinde, tüysüz, boğaz mavisi, leylak, lavanta, mor-mavi ve nadiren beyaz renkte saçaklı bir yapıya sahiptir. Akenler (tohumu barındıran yapı) 5 açılı, siyah renkte, 1,5 - 1,75 mm uzunluğundadır. Karpodyum (akenin bir ucu) beyaz renkte, kabuksuz ve belirgindir. Pappuslar (akenin tüylü ucu) 2 - 3 mm uzunluğunda, nadiren pullu yapıdadır [3]. Bitkinin tohum, yaprak ve çiçek görünüşleri Şekil 1.6, Şekil 1.7 ve Şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.6. *A. houstonianum* bitkisinin tohumu [80]



Şekil 1.7. *A. houstonianum* bitkisinin detay görünümü [81]



Şekil 1.8. *A. houstonianum* bitkisinin genel görünümü [81]

A. houstonianum bitkisi tohumlardan veya vejetatif olarak çoğaltılabilir [73]. Wielgolaski, türlerin optimal büyümesi için minimum sıcaklığı 8 °C olarak bildirmiştir. Bazı çalışmalarda bitkinin dona toleransının olmadığı bildirilmesine rağmen, bitkilerin hayatta kalabileceğini ancak çiçeklenmenin azaldığı belirtilmiştir. *A. houstonianum*, drenajı yüksek topraklarda ve güneşli veya kısmi gölgeli bölgelerde iyi gelişim göstermektedir [82, 83].

1.4.2.4. *Ageratum houstonianum* bitkisinin habitatı

A. houstonianum'un otlaklarda, ekin tarlalarında, yol kenarlarında, savanlarda, ormanlardaki açıklıklarda, nemli alanlarda ve nehir kenarı bölgelerinde büyüdüğü bildirilmektedir ve bu bitki deniz seviyesinden 1300 metre rakıma kadar görülebilmektedir [70, 71]. Avustralya'da ayrıca bahçelerde, otlaklarda, sulak alanlarda ve su kanalları etrafında da gözlemlendiği rapor edilmektedir [74]. Keşfedilmesinden birkaç yıl sonra İngiltere'ye getirildiğinden beri yayılımını sürdürmektedir [3, 82].

1.4.2.5. *Ageratum houstonianum* bitkisinin ekonomik ve çevresel önemi

A. houstonianum, 1800'lerin başından beri bir çiçek bahçesi bitkisi olarak yetiştirilmektedir [3]. Bahçelere alışılmadık mavi rengi sağladığı için değerlidir. Bahçe bitkisi olarak kullanılması kelebekleri çekmek ve bazı yabancı hayvanları uzaklaştırmak için teşvik edilmektedir [82].

Tür, ılıman bölgelerde önemli hasara ve ürün kayıplarına neden olan bir parazit olan *Meloidogyne hapla*'nın yavrularının gelişimini önleyen ikincil metabolitler içermektedir. *A. houstonianum* ve diğer aromatik (hoş kokulu) türlerin elma bahçelerinde elma ağaçlarıyla birlikte yetiştirilmesi, *Aphis citricola* ve Lepidoptera, Trichogrammatidae, Ichneumonidae ve Braconidae gibi familyalardan faydalı böceklerin yoğunluğunu artırır. *Phytophthora infestans*'a karşı fungisidal aktiviteye sahiptir ve domates bitkilerinde, mildiyö (geç yanıklık) hastalığı şiddetini azaltmaktadır [84-87].

Tür, geleneksel tıpta cilt enfeksiyonlarını ve boğaz ağrılarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Yapraklar, kanamayı durdurmak için yaralara uygulanabilmektedir. Tennyson ve diğ. (2012), türün potansiyel kozmetik ve tıbbi kullanımlarla birlikte yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir [3, 88-91]. Ayrıca türün 4 farklı fitokozmetik kremde kullanıldığı belirtilmiştir [92]. Uçucu yağları, antimikrobiyal ve antifungisidal özelliklere sahiptir. Bitki ayrıca bir kene türü olan *Rhipicephalus lunulatus*'a karşı akarisit özellikler göstermektedir. Yaprak özütleri, sivrisinek türleri olan *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* ve *Culex quinquefasciatus*'a karşı kovucu ve öldürücü etkiye sahiptir [90, 91, 93-97].

A. houstonianum'un yoğun toprak örtüsü ve kolonileri, diğer türlerin büyümesini dışlayarak tür kompozisyonunda değişikliklere neden olabilir ve tür zenginliğini azaltabilir. *A. houstonianum*'un diğer türlerin çimlenmesi ve büyümesi üzerinde allelopatik (baskılayıcı) etkilere sahip olduğunu öne sürülmektedir [70, 73]. Koi (2008), *A. houstonianum*'u Florida, ABD'de nadir ve savunmasız olarak listelenen *Eumaeus atala* kelebeği için nektar kaynaklarından biri olarak listelemiştir [98].

1.4.3. *Ageratum houstonianum* bitkisi ile gerçekleştirilen bazı çalışmalar

Iapichino ve diğ. (2017), *A. houstonianum*'u farklı konsantrasyonlarda besi ortamları kullanılarak *in vitro* teknikleriyle çoğaltımını sağlamış ve besi ortamı içeriklerinin bitki gelişimine etkisini incelemiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak BA ve indol-3-asetik asit (IAA) kullanmışlardır. Çoğaltma yöntemi olarak aseptik sürgün kültürleri ile yeni alt kültürler oluşturmayı hedeflemiştir. Çalışma sonucunda en yüksek nod (düğüm) sayısı 0,88 µM BA ve 5,7 µM IAA ile hazırlanan besi ortamında elde edilmiştir ve bu besi ortamından elde edilen yeni bitkicikler alt kültürler için uygun bulunmuştur. Köklenmedeki optimum şartları belirlemek için belirlenen 5 farklı IAA konsantrasyonu ile yapılan çalışmada en yüksek kök sayısı 2,28 µM'de IAA ile elde edilmiştir. *A. houstonianum*'un *in vitro* köklenmeye dayalı mikroçoğaltım sistemi hastaliksız germplazmanın hızlı ve verimli bir şekilde çoğaltımı uygun bulunmuştur [99].

Mohammadi (2017), *A. houstonianum*'un kinetin (Kin) ve IAA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak hazırlanmış MS besi ortamlarının sürgün ve kök gelişimi ve bitki çoğaltımı üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda şu veriler elde edilmiştir: Yaprakta 1 - 1 ve 4 - 4 mg/L ve sürgün apikal meristeminde 2 - 2 mg/L Kin ve IAA kombinasyonlarında maksimum kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 0,4 - 1 mg/L MS besi ortamı kök ve sürgün rejenerasyonu için en uygun kombinasyona sahiptir. Bu çalışma diğer *Ageratum* türlerinden *in vitro* bitkicik üretimi sağlamak için etkili bir kaynak olarak değerlendirilmiştir [100].

2. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tezde gerçekleştirilen deneysel çalışmalar Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan Kitosan (CHI) stok çözeltisi Münster Üniversitesi (Almanya) Bitki Biyolojisi ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde üretilerek bu çalışmada kullanılmak üzere temin edilmiştir. Kullanılan CHI varyantları polimerizasyon dereceleri (DP) 2-15 olan oligomerik kitosan fraksiyonlarından oluşmaktadır ve asetilasyon dereceleri (DA) %10 ve %20'dir. DP ise kitosan biyopolimerinin monomer sayısı olarak tanımlanır. DA, kitosanın asetil grupları eklenmiş halidir ve zincir konformasyonu, elektrostatik özellikleri ve biyolojik özellikleri gibi kitin ve kitosanın fiziko-kimyasal özelliklerini etkileyen önemli bir parametredir.

2.1. Deneysel Çalışmalarda kullanılan Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında ticari olarak satılan *Ageratum houstonianum* Mill. (mavi vapur dumanı çiçeği) bitkisinin tohumları başlangıç materyali olarak kullanıldı. Tohumlar Vilmorin Garden, Türkiye tarafından üretilmiş olup ticari olarak temin edilmiştir.

2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

2.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi Tablo 2.1'de yer almaktadır.

Tablo 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi

Ekipman Adı	Ekipman Markası
Hassas Terazı	AND GR-200
Mikropipetler (20µM, 200µM, 1000µM)	Eppendorf
Vorteks	BİOSAN multivorteks V-32
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph-MR HEI
pH metre	WTW InoLab pH 720
Distile Su Cihazı	MP MiniPure Dest
Buzdolabı	Arçelik 5243 NEB
Laminar-Hava Akışlı Kabin	Tez-San Class II
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Bitki Büyütme Kabini	Sanyo MCR-351H

2.2.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi

Madde Adı	Üretici Firma	Katalog No
Murashige & Skoog Bazal Tuz Karışımı (MS vitaminli)	Duchefa	M0222
Sükroz	Duchefa	S0809
Sodyum hidroksit	Sigma	S8045
Hidroklorik asit	Sigma	H1758
Etanol	Tek-Kim	TK.200655
Sodyum hipoklorit %20	Unilever	-
Agar	Duchefa	P1001
PPM (plant preservative mixture)	Plant Cell Technology	-

2.3. Besiyeri ve İçeriği

Deneysel çalışmalarda besi ortamı olarak Murashige & Skoog (MS) kullanıldı [15].

Besiyeri içeriği Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3. MS besiyerinin içeriği

Bileşenler	Konsantrasyon (mg/l)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-
Na ₂ EDTA	37,3
Nikotik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,1
Biotin	-
Folik asit	-
<i>myo-inositol</i>	100
l-inositol	-
Glisin	2
Sakkaroz	30 000
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
NH ₄ H ₂ PO ₄	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-

Tablo 2.3. (Devam) MS besiyerinin içeriği

Bileşenler	Konsantrasyon (mg/l)
KCl	-
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-
NaH ₂ PO ₄	-
Na ₂ SO ₄	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2

Besiyerlerini hazırlamak için 10 adet 500 ml hacimli şişelerin içerisine ayrı ayrı 400 ml dH₂O ilave edildi. Besiyeri hazırlama işlemine ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde devam edildi. Şişenin içerisine 1,44 gr MS ve 12 gr (%3, m:v) sükröz ilave edildi. Sükröz çözüldükten sonra pH 5,7 - 5,8 olarak ayarlandı ve katılaştırıcı ajan olarak 2,8 gr agar (%0,7, m:v) ilave edildi. Son olarak kontaminasyonu önlemek amacı ile 0,4 ml PPM (%1, v:v) ilave edildi. Bu işlemler 10 adet 400 ml besiyeri için tekrarlandı. Hazırlanan besiyerleri 1,05 kPa basınçta 121 °C sıcaklıkta 20 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Şişeler el yakmayacak fakat katılaşmaya da başlamayacak kadar soğuduktan sonra kitosanın sıcaklık hassasiyeti sebebiyle otoklav kullanımı yerine steril kabin içerisinde 2,5 mg/L - %10 DA, 5 mg/L - %10 DA, 10 mg/L - %10 DA, 2,5 mg/L - %20 DA, 5 mg/L - %20 DA ve 10 mg/L - %20 DA olmak üzere 6 farklı CHI konsantrasyonu şırınga filtrasyonu ile 6 farklı MS besiyerinin içine ayrı ayrı aktarıldı ve karıştırıldı. Çimlendirme ve bitki büyütme deneme işlemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan besiyeri her bir Magenta kabına 40 ml olacak şekilde dağıtıldı. Toplamda 6 farklı CHI konsantrasyonu ve 1 kontrol (MS) grubu için 10 adet olacak şekilde toplamda 70 adet Magenta kullanıldı.

2.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Deneysel çalışmalarda kullanılan laminar hava akışlı kabinin iç yüzeyi %70 EtOH kağıt havluya püskürtülerek silindi. UV lambası laminar hava akışlı kabinin camı kapalı konumda olacak şekilde 20 dakika boyunca çalıştırıldı. Magenta kapları yıkandıktan sonra dörtlü gruplar halinde buzdolabı poşetine koyuldu ve ağız kısmı katlanarak otoklav bandı ile kapatıldı. Pens, cetvel, bistüri sapı gibi metal malzemeler alüminyum folyo ile sarıldı. Metal kesme tablası, uygun boyutlarda kesilip içine yerleştirilen kurutma kağıtları ile birlikte buzdolabı poşetine koyularak poşetin ağzı otoklav bandı ile kapatıldı. Bu malzemeler otoklavda 121 °C'de, 1,05 kPa basınçta 20

dk boyunca sterilize edildi. Deneyler esnasında kullanılan besi ortamları ve distile su içeren kapaklı şişeler içerdiği sıvı hacmine göre uygun sürelerde ve aynı koşullarda sterilize edildi. Sıcaklık etkisi ile yapısı bozulabilecek veya etkinliği azalabilecek CHI konsantrasyonları 0,22 µm por genişliğine sahip şırınga filtreleri ile sterilizasyon işlemi yapıldı. Steril kabin içerisinde çalışmaya başlamadan önce UV lambası kapatıldı ve kontrol düğmesi optimum ayarına getirildi. Kabine girmeden önce eldiven giyildi ve bütün malzemeler ile birlikte eller de %70 EtOH püskürtülerek steril edildi. Bu işlem olası bir kontaminasyonu engellemek adına sık sık tekrarlandı.

2.5. Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu

Sterilizasyon işlemine hazırlık için 7 adet 10x10 cm. boyutlarında kurutma kağıdı kenarlarından katlanıp zımbalanarak kese haline getirildi. Hazırlanan her bir kesenin içerisine 90 adet tohum koyuldu. Tohum yüzeyi sterilizasyon işlemi için 40 ml dH₂O içerisine 10 ml çamaşır suyu (%5 v:v NaOCl) eklenerek hacimce %20'lik dezenfeksiyon çözeltisi (%1, v:v NaOCl içeren) hazırlandı. Laminar hava akışlı kabin içerisinde steril ortamda her bir kese ayrı kapların içerisinde 5 dk boyunca NaOCl çözeltisinde sürekli çalkalanarak bekletildi. Tohumların bulunduğu keseler steril dH₂O içerisine 5 dk sürede ara ara çalkalanarak durulandı. Tohumların üzerlerindeki yüzey kaplamaları bu aşamada giderildikten sonra keselerden alınan tohumlar 1,5 ml'lik santrifüj tüplerinin içerisine aktarıldı ve aynı dezenfeksiyon çözeltisi içerisinde 3 dk daha çalkalandı. Mikropipet ile çekilen NaOCl yerine tüpün içerisine steril dH₂O eklenerek ara ara çalkalanarak tohumlar durulandı. Mikropipetin ucu her işlemde değiştirildi. Durulama suyu da mikropipet ile boşaltıldı ve tohumların yüzeysel sterilizasyon işlemi tamamlandı.

2.6. Tohumların Besiyerlerinde Kültüre Alınması

Yüzeysel sterilizasyon işlemi sonunda tohumlar steril kesme tablasının içindeki kurutma kağıdının üzerine alındı. Her bir tüpteki 90 adet tohum 10 adet Magenta kabına ekildi. Her bir Magenta kabına 9 adet tohum besiyeri yüzeyine çok hafif batırılarak ekildi ve kapağı kapatıldı. Ekim işlemi tamamlanan Magenta kaplarının ağız kısmı parafilm ile kapatıldı.

2.7. Kùltùre Alınan Tohumların İnkùbasyonu ve Çimlenmesi

Ekim işlemleri tamamlandıktan sonra 30., 45., ve 60. günde çimlenen tohumlar her bir konsantrasyon için ayrı ayrı sayıldı ve çimlenme oranları hesaplandı. Toplam 60 günlük inkùbasyon süreci, 16 saatlik bir fotoperiyot ve $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton akı yoğunluğunun aydınlatması altında, %50 bağıl nem ile $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ortam koşullarına sahip bitki büyütme kabininde tamamlandı.

Altmış günlük çimlenme ve büyüme süreci sonunda gelişim gösteren bitkiler Magenta kaplarından çıkarılarak köklerde kalan besiyeri kalıntıları distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Kök uzunluğu, kök sayısı, sürgün uzunluğu, sürgün sayısı ve yaprak sayısı gibi parametreler cetvel yardımı ile ölçüldü ve sayıldı.

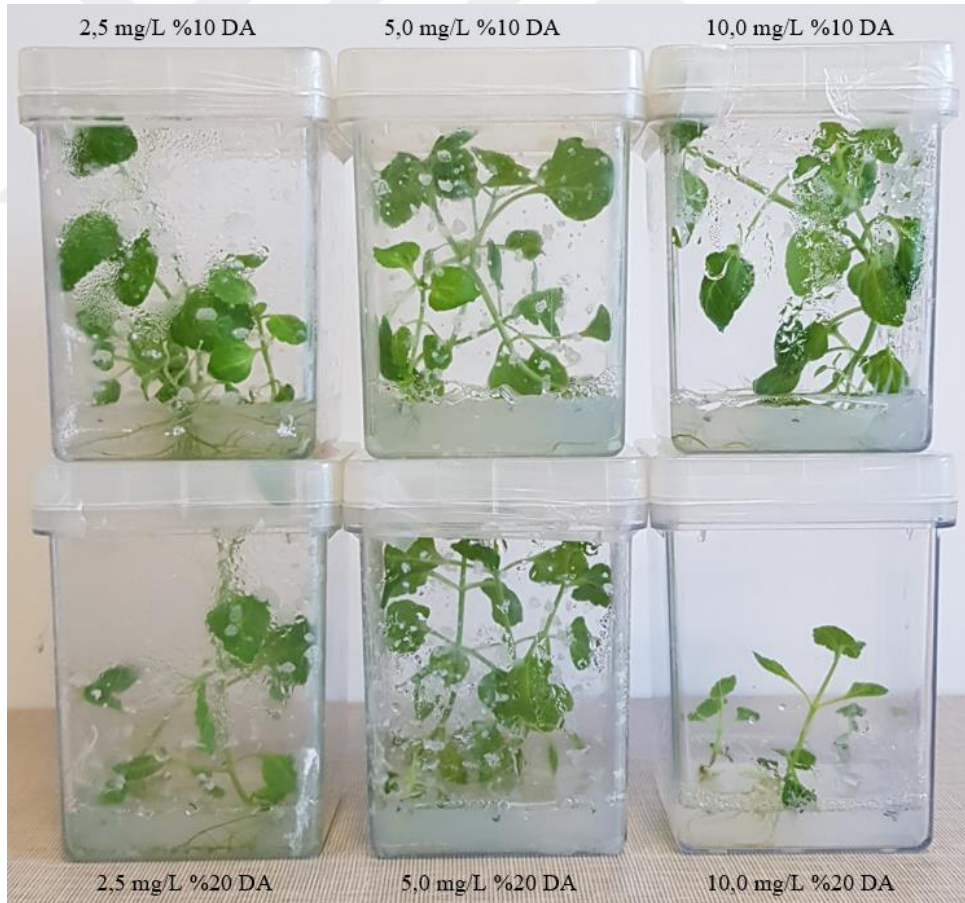
2.8. İstatistiksel Analiz

İnkùbasyon periyodunun sonunda tüm gelişimsel parametreler için elde edilen veriler tek yönlü varyans analizini (ANOVA) takiben Duncan çoklu karşılaştırma testi ($p < 0,05$) kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Analizler SPSS programı aracılığıyla yapıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Ageratum houstonianum* bitkisinin 6 farklı konsantrasyona ve 2 farklı DA'ya sahip CHI biyopolimeri kullanılarak çoğaltımı sağlanmış ve kitosan konsantrasyonu ile DA'sının bitki büyümesine etkileri incelenmiştir.

Bitki büyütme kabininde 60 gün boyunca uygun ortam koşullarında muhafaza edilen ve 6 farklı konsantrasyon ve 2 farklı DA'ya sahip CHI ile desteklenen MS besi ortamları kullanılarak hazırlanan ortalama boyutlarda bitki örnekleri içeren magenta kaplarının görseli Şekil 3.1'de ve bu magenta kaplarından alınan örneklerinin görseli Şekil 3.2'de verilmektedir. Kontrol grubuna ait bitki görseli Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.1. *A. houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama boyutlarda bitki örnekleri içeren magenta kapları



Şekil 3.2. *A. houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama boyutlarda bitki örnekleri (Ölçek: 1 cm)



Şekil 3.3. *A. houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama boyutlarda kontrol grubu bitkisi örneği (Ölçek: 1 cm)

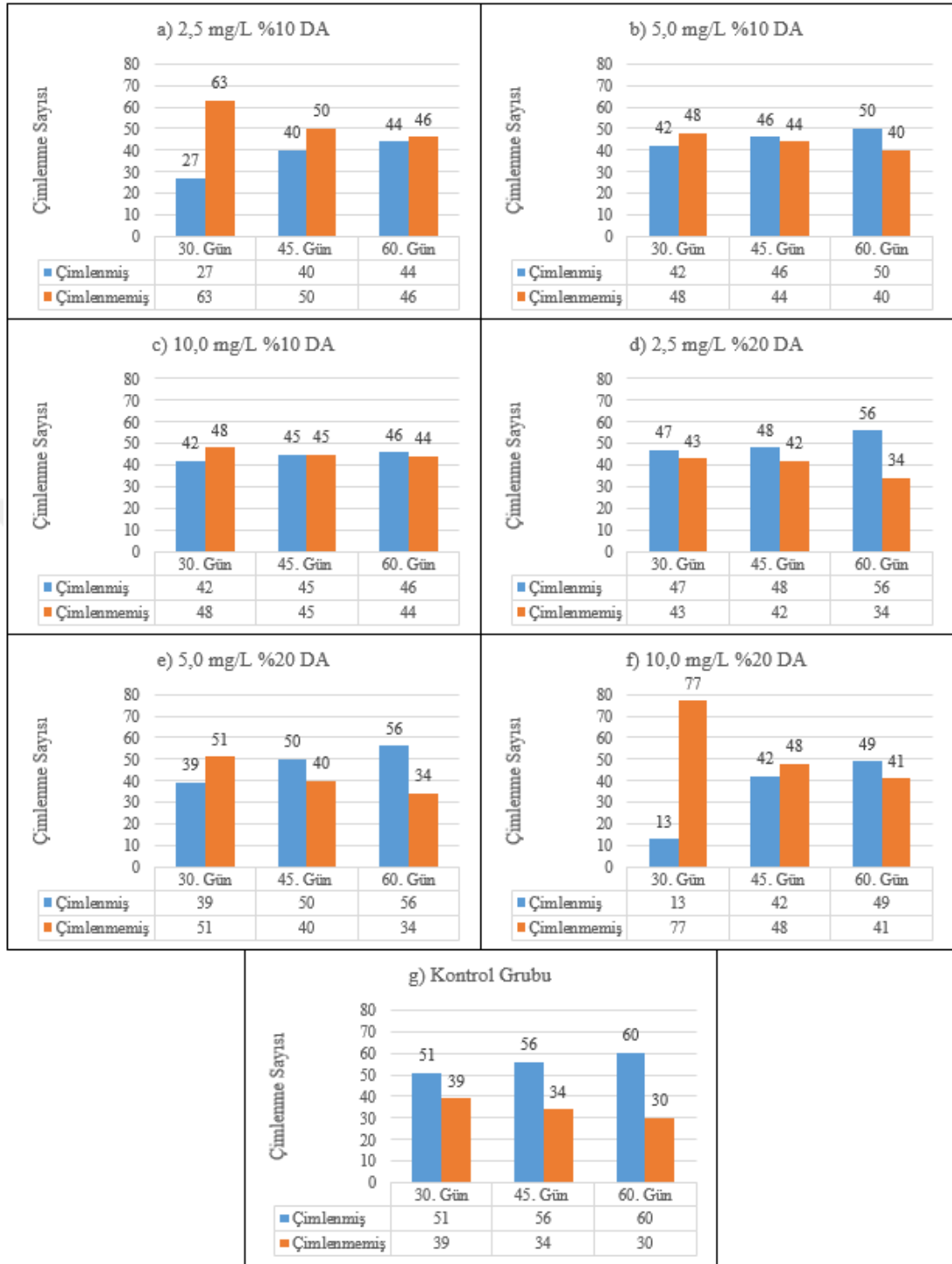
3.1. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Çimlenmeye Etkileri

Farklı konsantrasyon ve DA'larda CHI içeren MS besiyerleri ve MS kontrol grubuna ekilen bitki tohumlarının çimlenme durumları kültür periyodu boyunca incelendi. İnceleme sonucunda elde edilen çimlenmiş ve çimlenmemiş tohum sayıları Tablo 3.1'de verilmektedir.

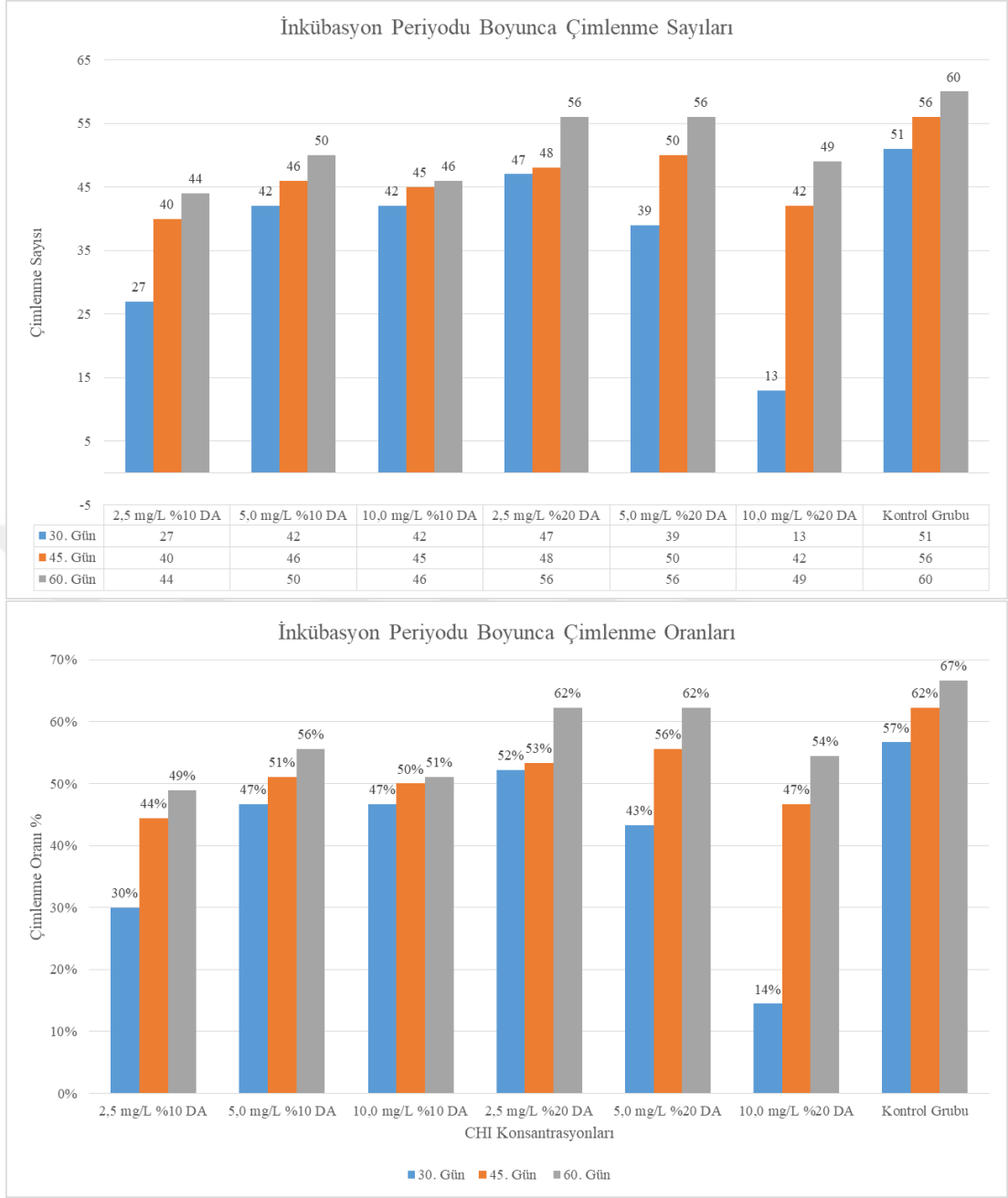
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan CHI konsantrasyonları ve kontrol grubu için çimlenme sayıları

Besiyerleri	30. Gün		45. Gün		60. Gün	
	Çimlenmiş	Çimlenmemiş	Çimlenmiş	Çimlenmemiş	Çimlenmiş	Çimlenmemiş
2,5 mg/L - % 10 DA	27	63	40	50	44	46
5,0 mg/L - % 10 DA	42	48	46	44	50	40
10,0 mg/L - % 10 DA	42	48	45	45	46	44
2,5 mg/L - % 20 DA	47	43	48	42	56	34
5,0 mg/L - % 20 DA	39	51	50	40	56	34
10,0 mg/L - % 20 DA	13	77	42	48	49	41
Kontrol Grubu	51	39	56	34	60	30
Ortalama	37	53	47	43	52	38

A. *houstonianum* tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besi ortamındaki çimlenme performansları Şekil 3.4'te verilmektedir. İnkübasyon periyodunun 30. gününde yapılan sayımlarda 2,5 mg/L - % 10 DA ve 10 mg/L - % 20 DA CHI ile desteklenen MS besi ortamlarında çimlenme sayısının diğer konsantrasyonlardaki MS besi ortamlarına oranla daha düşük olduğu tespit edildi. İnkübasyon periyodunun 45. ve 60. günlerinde yapılan sayımlarda tüm magentalarda çimlenme sayısının artış gösterdiği görüldü. Altmış günün sonunda elde edilen en yüksek çimlenmiş tohum sayısı 60 ile kontrol grubunda görülürken, en düşük çimlenme sayısı 44 ile 2,5 mg/L - % 10 DA konsantrasyonundaki CHI ile hazırlanan MS besiyerinde görüldü. Tüm magenta kaplarında çimlenme oranının yaklaşık %50'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Farklı DA ve konsantrasyondaki CHI ile desteklenmiş MS besi ortamındaki çimlenme performanslarının genel karşılaştırması Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.4. A. houstonianum tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besisi ortamındaki çimlenme performansları. Uygulamalar “konsantrasyon – DA” olarak verilmektedir. a) 2,5 mg/L - %10 DA b) 5,0 mg/L - %10 DA c) 10,0 mg/L - %10 DA d) 2,5 mg/L - %20 DA e) 5,0 mg/L - %20 DA f) 10,0 mg/L - %20 DA g) Kontrol grubu



Şekil 3.5. *A. houstonianum* tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besisi ortamındaki çimlenme performanslarının genel karşılaştırılması. Uygulamalar “konsantrasyon – DA” olarak verilmektedir.

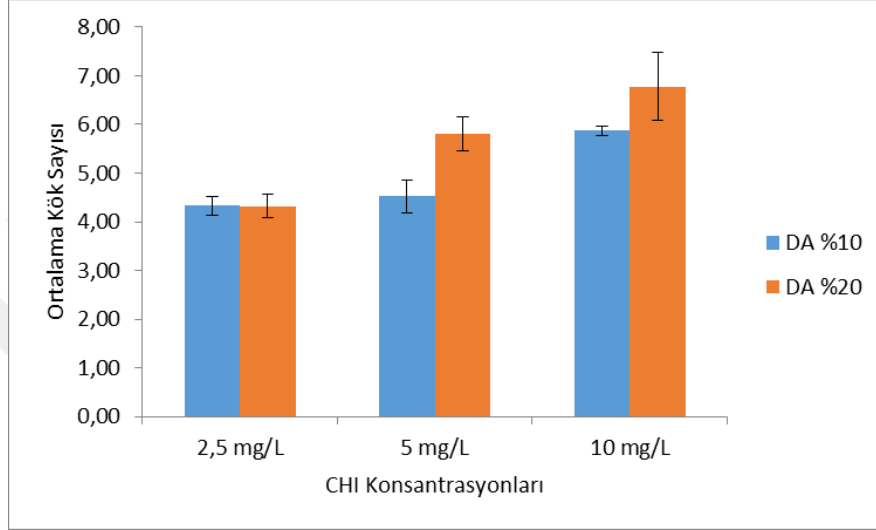
İnkübasyon periyodunun 30., 45. ve 60. günlerde yapılan sayımlarda elde edilen çimlenen tohum sayılarının ortalama değer ile kıyaslaması Şekil 3.6’da yapılmıştır.



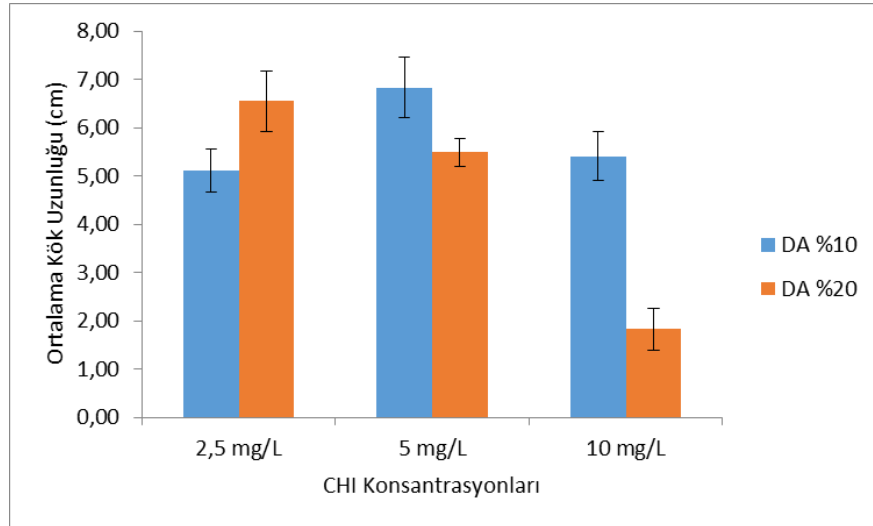
Şekil 3.6. *A. houstonianum* tohumlarının farklı DA ve konsantrasyondaki kitosan ile desteklenmiş MS besisi ortamındaki çimlenme performanslarının ortalamaya kıyasla zamana bağlı genel karşılaştırılması. Uygulamalar “konsantrasyon – DA” olarak verilmektedir a) 30. Gün b) 45. Gün ve c) 60. Gün Çimlenme durumları

3.2. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Kök Sayısı ve Kök Uzunluğuna Etkileri

CHI konsantrasyonu ve DA'nın *A. houstonianum* bitkisinin köklenmesine etkileri incelendi. Sayımlarda kayda alınan kök sayısı ve uzunluğu verilerinin ortalama değerleri karşılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de verilmektedir.

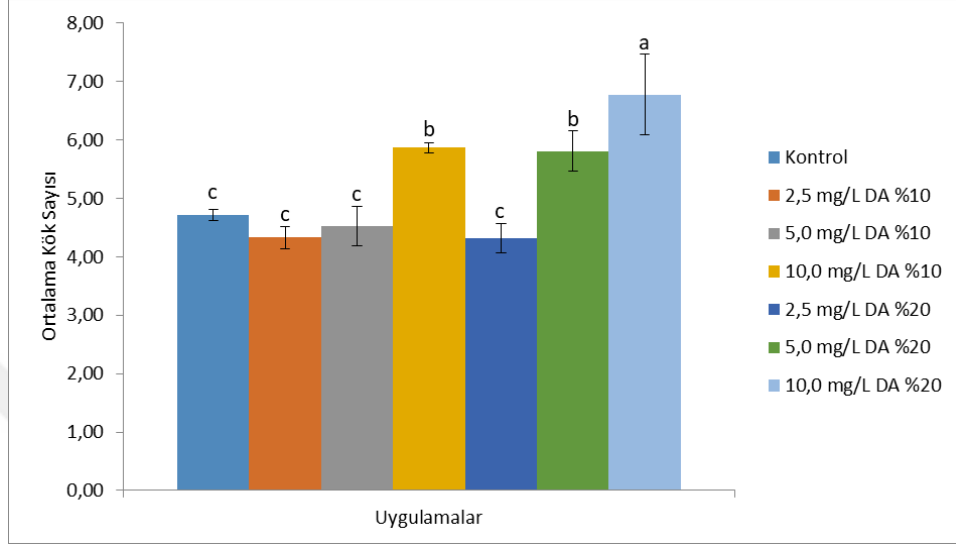


Şekil 3.7. *A. houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama kök sayısı üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri

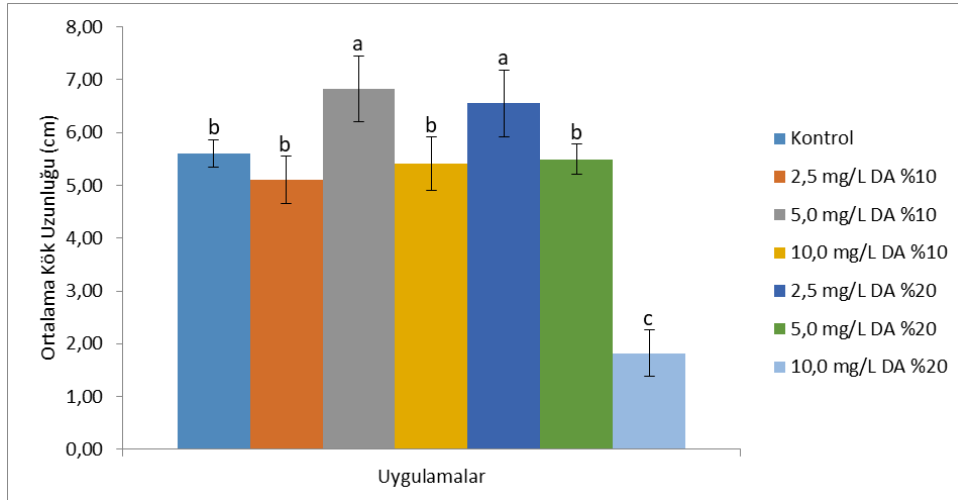


Şekil 3.8. *A. houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama kök uzunluğu üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri

İncelemede elde edilen verilere varyans analizi gerçekleştirildi ve farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma programı ile incelendi. Tüm CHI konsantrasyonları ve kontrol grubu için kök sayısı ve kök uzunluğu karşılaştırmaları sırasıyla Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmektedir.



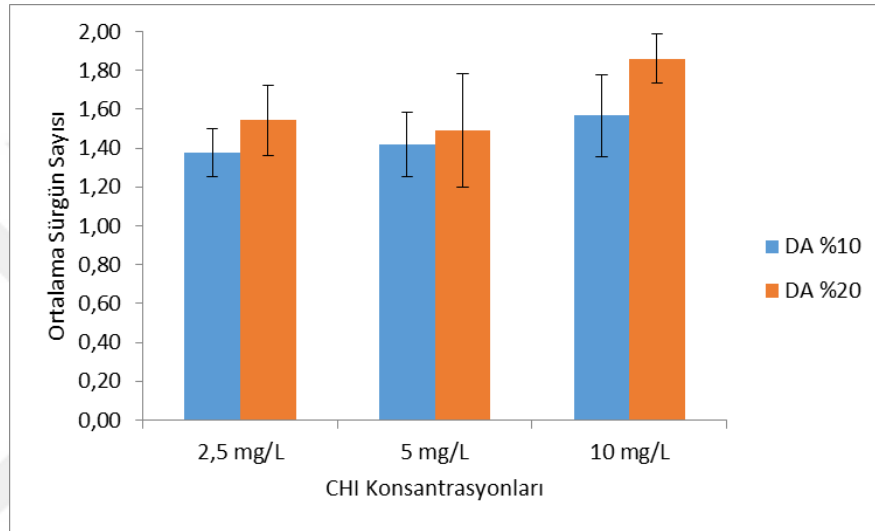
Şekil 3.9. Farklı besi ortamlarından alınan bitki kök sayılarının karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur.)



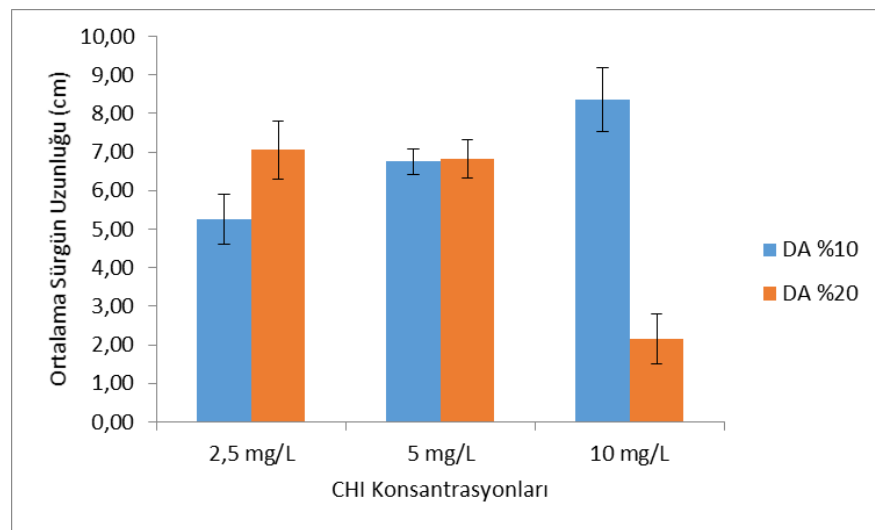
Şekil 3.10. Farklı besi ortamlarından alınan bitki kök uzunluklarının karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur.)

3.3. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Sürgün Sayısı ve Sürgün Uzunluğuna Etkileri

A. *houstonianum* bitkisinin kitosanın farklı moleküler ağırlıkta ve asetilasyon derecesinde hazırlanmış örnekleri ile muamele edilmesi sonucunda sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunun nasıl değiştiği incelendi. Sayımlarda kayda alınan sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu verilerinin ortalama değerleri karşılaştırmalı olarak sırasıyla Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmektedir.

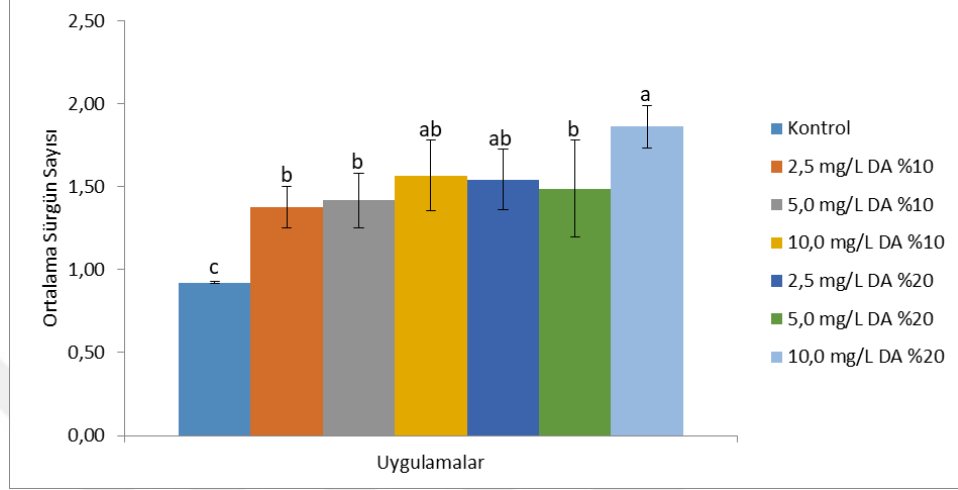


Şekil 3.11. A. *houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama sürgün sayısı üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri

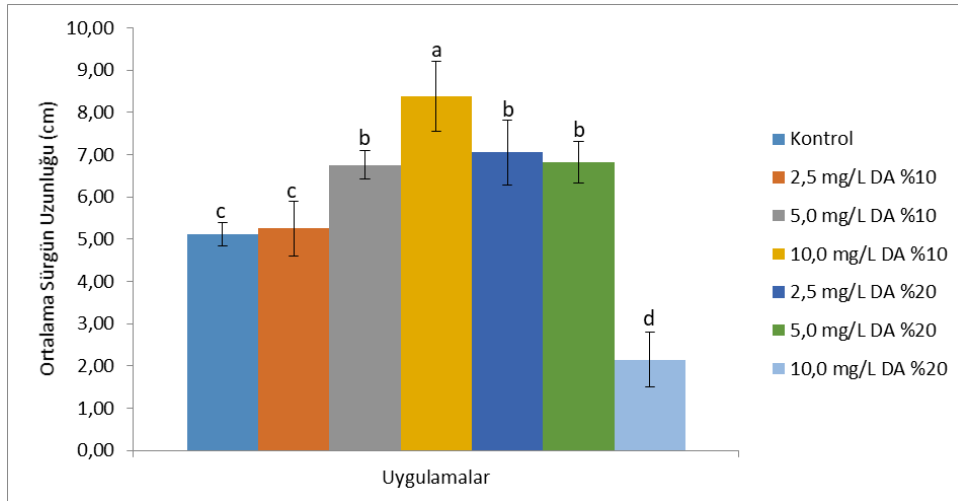


Şekil 3.12. A. *houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama sürgün uzunluğu üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri

Sürgün sayısı ve uzunluklarının karşılaştırmaları varyans analizi gerçekleştirildi ve farklılıkları Duncan çoklu karşılaştırma programı ile incelendi. Tüm CHI konsantrasyonları ve kontrol grubu için sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu karşılaştırmaları sırasıyla Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'te verilmektedir.



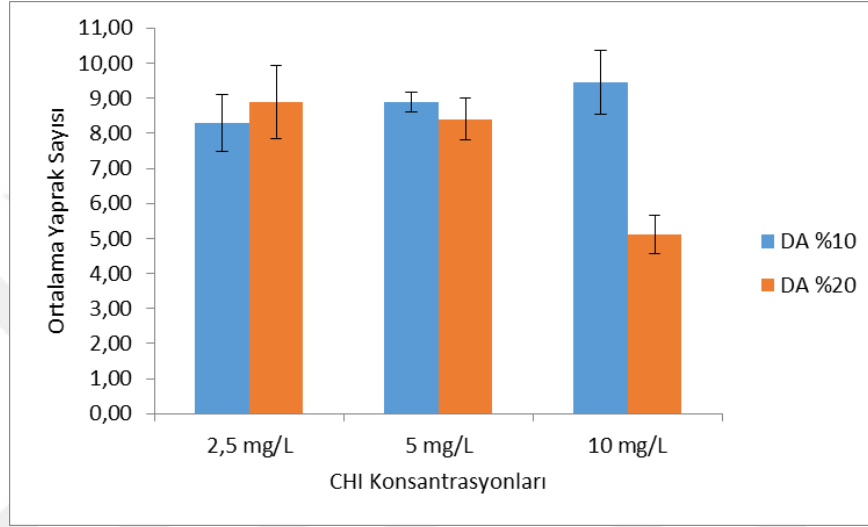
Şekil 3.13. Farklı besi ortamlarından alınan bitki sürgün sayılarının karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur.)



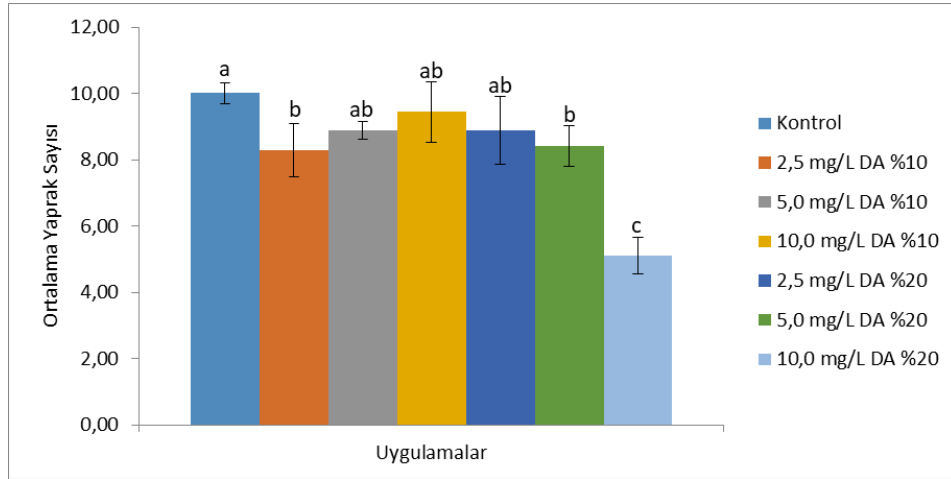
Şekil 3.14. Farklı besi ortamlarından alınan bitki sürgün uzunluklarının karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur.)

3.4. Farklı CHI Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısına Etkileri

A. houstonianum bitkisi ile farklı besi ortamlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada yaprak sayıları incelendi. Sayımlarda kayda alınan yaprak sayısı verilerinin ortalama değerleri ve varyans analizi sonucu elde edilen verilerin Duncan çoklu karşılaştırma yöntemi ile karşılaştırılması ile elde edilen veriler sırasıyla Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da verilmektedir.



Şekil 3.15. *A. houstonianum*'un inkübasyon periyodu sonundaki ortalama yaprak sayısı üzerine farklı konsantrasyondaki ve DA'daki CHI uygulamalarının etkileri



Şekil 3.16. Farklı besi ortamlarından alınan bitki yaprak sayılarının karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur.)

3.5. Tartışma

Iapichino ve diğ. (2017), *A. houstonianum*'u farklı konsantrasyonlarda besi ortamları kullanılarak *in vitro* teknikleriyle çoğaltımını sağlamış ve besi ortamı içeriklerinin bitki gelişimine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda tüm BA konsantrasyonlarında sürgün uzunlukları IAA konsantrasyonlarından daha iyi sonuç vermiştir. En yüksek sürgün uzunluğu, 1,78 μ M BA içeren MS besi ortamında 6,0 cm olarak ölçülmüştür. Sürgün uzunluğunun en iyi olduğu konsantrasyon 7,1 μ M BA içeren besi ortamında 1 cm olarak ölçülmüştür ve köklenme için yeterli olduğu ve kullanılabilceği belirtilmiştir. Bitkicik başına ortalama kök sayısı 1,14 μ M IAA konsantrasyonunda 8,2 olarak en iyi sonucu vermiştir. En yüksek kök uzunluğu ise 2,28 μ M IAA konsantrasyonunda 1,3 cm olarak ölçülmüştür. IAA içeren besi ortamının BA içeren besi ortamından yaklaşık %30 büyüme artışı gösterdiği görülmektedir. Uygun konsantrasyonda kullanıldığında IAA ve BA'nın *A. houstonianum* gibi süs özelliğine sahip bitkilerin hızla kültüre alınabilir olduğunu ve tohum çoğaltımının yapılabildiğini ortaya koymuşlardır [99]. Bu tez çalışmasında sürgün uzunluğu kontrol grubunda 5,11 cm iken en yüksek 10 mg/L - %10 DA'da 8,37 cm olarak ölçüldü. Ortalama kök sayısı kontrol grubunda 4,72 iken en yüksek kök sayısı 6,78 ile 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonunda ölçüldü. Ortalama kök uzunlukları kontrol grubunda 5,60 cm iken en yüksek kök uzunluğu 5 mg/L - %10 DA konsantrasyonunda 6,83 cm olarak ölçüldü. BA, IAA ve CHI kullanımının bitki büyüme özelliklerine benzer etkiler gösterdikleri gözlemlendi. Farklı CHI konsantrasyonları ile muamele edilen bitki örnekleri *in vitro* teknikleri kullanılarak başarıyla çoğaltıldı.

Mohammadi M. (2017), *A. houstonianum*'un kinetin (Kin) ve IAA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak hazırlanmış MS besi ortamlarının sürgün ve kök gelişimi ve bitki çoğaltımı üzerine etkilerini incelemiştir ve diğer *Ageratum* türlerinden başarılı bitkicik üretimi sağlamak için etkili bir kaynak olmuştur. Çalışma sonucunda 0,4 - 0,4 mg/L konsantrasyonlarda Kin ve IAA içeren besi ortamındaki bitkicikler 2 - 3 cm boya ulaşmış fakat nekroz sebebi ile yaşamamışlardır. 1 - 0,4 mg/L Kin ve IAA konsantrasyonlarda en yüksek sürgün uzunluğu 12 cm olarak ölçülmüştür fakat bitkicikler yavaş büyüme göstermiştir. En iyi kök ve bitkicik gelişimi %88 oran ile 4 - 2 mg/L karışım konsantrasyonunda meydana gelmiştir. 1 - 0,4 mg/L Kin ve IAA

karışımında en yüksek kök uzunluğu 3 cm olarak ölçülmüştür ve kök sayıları diğer konsantrasyonlara göre daha fazladır. Aynı konsantrasyonlarda Kin ve IAA karışımı kullanmak yerine 2 kat konsantrasyonda Kin kullanmak bitkicik üretimini artırmıştır. Yine de Kin ve IAA konsantrasyonlarının birlikte kullanılmasının bitkicik gelişimine olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır [100]. Bu tez çalışmasında *A. houstonianum* bitkisi CHI biyopolimeri ile muamele edildi. Çalışma sonucunda en yüksek sürgün uzunluğu 10 mg/L - %10 DA konsantrasyonunda 8,37 cm olarak ölçülürken en yüksek kök uzunluğu 5 mg/L - %10 DA konsantrasyonunda 6,83 cm olarak ölçüldü. Ortalama kök sayılarının en yüksek değeri 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonunda 6,78 olarak ölçüldü ve tüm konsantrasyonlardaki MS besi ortamlarında başarıyla bitkicik oluşumu sağlandı.

A. houstonianum bitkisinin CHI biyopolimeri kullanılarak çoğaltımı ile ilgili bilimsel yayın bulunmamaktadır. Bu sebeple CHI biyopolimerinin diğer bitkilerle gerçekleştirilen çalışmalarında elde edilen bulgular karşılaştırıldı.

Asghari ve diğ. (2009), patates bitkisinin farklı konsantrasyonlarda CHI kullanılarak çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda; en iyi sürgün uzunluğu kontrol grubu bitkilerinde 13,7 cm olarak ölçülmüştür. Diğer gruplar için, 150 mg/L CHI konsantrasyonu ise 13,5 cm ile en iyi ve yaklaşık olarak kontrol grubu ile aynı oranda büyüme davranışı göstermiştir. Kontrol grubu bitkilerinin bitki başına yaprak sayısı ortalama 8,8 iken, en yüksek yaprak sayısına sahip olan 500 mg/L CHI konsantrasyonunda 9,8 olarak ölçülmüştür ve bir miktar artış gözlenmiştir. Ortalama mini yumru sayıları kontrol grubunda 2,4 iken, 500 mg/L CHI konsantrasyonunda 3,3 olarak ölçülmüştür ve artış gözlenmiştir. Mini yumru verimi ise kontrol grubunda ortalama 13,8 g iken, 500 mg/L CHI konsantrasyonunda 15,56 g olarak ölçülmüştür ve verim artışı sağlanmıştır. Genel çalışma sonucunda, mini yumru artışı 500 mg/L CHI konsantrasyonunda %12,6; mini yumru verim artışı ise %36,3 olarak verilmiştir. Çalışmada kullanılan 750 mg/L ve 1000 mg/L CHI konsantrasyonları bitki gelişimi için uygun olmamıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak uygun konsantrasyonlarda CHI biyopolimeri kullanılarak bitki ve yumru gelişiminin mümkün olabileceği belirtilmiştir [44]. Bu tez çalışmasında ise *A. houstonianum* bitkisinin çoğaltımında kitosanın uygun konsantrasyonlarda kullanımının büyüme ve gelişmeyi artırıcı etkiler ortaya koyduğu görüldü. Sürgün uzunluğu kontrol grubu bitkilerinde 5,15 cm olarak

ölçülürken en yüksek sürgün uzunluğu 10 mg/L - %10 DA'da 8,37 cm olarak ölçüldü ve artış gösterdi. Yaprak sayısı kontrol grubu bitkilerinde ortalama 10,02 ile en yüksek değerde ölçüldü. CHI biyopolimerinin muamele edildiği bitkinin özelliklerine bağlı olarak farklı büyüme özellikleri gösterebileceği görüldü. Asghari ve diğ. (2009)'nin elde etmiş olduğu verilere göre CHI biyopolimeri kullanımı sürgün uzunluğunu artırıcı ve yaprak sayısını azaltıcı etkiler gösterirken bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyalinin CHI ile muamele edilmesi sonucu paralel sonuçlar elde edildi.

Kiang ve diğ. (2004), HEK 293 (embriyonik böbrek hücresi), SW 756 ve HeLa (rahim hücreleri) hücrelerinin farklı moleküler ağırlık ve DD değerlerine sahip kitosan biyopolimerlerinin kullanımının gen transferine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda yüksek (390) moleküler ağırlıktaki (kDa) kitosan, orta (209) ve düşük (138) moleküler ağırlığa kıyasla daha iyi DNA okunmasına sebep olmuştur. Aynı kDa değerlerinde düşük (%10) DA'ya sahip DNA molekülleri daha iyi okunmuştur. Serum proteinlerinde %10 DA en iyi, %30 DA orta ve %38 DA'ya sahip olan genler ise en az gözükmüş ve okunmuştur. DA'nın artırılması, gen ekspresyonunu azaltmıştır. Gen ekspresyonunun azalmasının kaslarda daha fazla lusiferaz transgen ekspresyonuna sebep olduğu belirtilmiştir [49]. CHI biyopolimerinin farklı DA'larda kullanımının farklı canlı hücrelerinde etkilerinin değişkenlik gösterebileceği görüldü. Bu tez çalışmasında kitosanın DA'sı bitki büyüme özellikleri üzerinde farklı etkiler gösterdi.

Kulikov ve diğ. (2006), farklı moleküler ağırlıklara sahip kitosanların bitkilerdeki antiviral etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda en düşük (1,2 ve 2,2) kDa %15 DA ya sahip CHI biyopolimeri ile muamele edilen bitkilerde en iyi viral aktivite gözlemlendi. CHI monomerleri olan glukozamin ve *N*-asetilglukozaminin tek başlarına uygulamalarının antiviral etki göstermediği belirtilmiştir. Çalışma, küçük kitosan moleküllerinin (düşük kDa'ya sahip) bitki bünyesine daha iyi nüfuz etmesinden dolayı antiviral etkinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur[50]. Falcón ve diğ. (2008), farklı DA ve konsantrasyonlara sahip kitosanların *Nicotiana tabacum* bitkisinin patojenlere karşı gösterdiği direnci incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 500 mg/L – 1000 mg/L %1 DA'ya sahip CHI konsantrasyonu patojen büyümesini baskılamıştır. Patojenlere karşı %36 DA'ya sahip CHI kullanımı ise %46 oranında koruma artışı sağlamıştır. DA değişiminin farklı patojen dirençleri meydana getirdiği belirtilmiştir [51]. *A. houstonianum* bitkisi ile gerçekleştirilen bu çalışmada ise diğer çalışmalara

benzer şekilde molekül ağırlığı ve DA değıştikçe inceleme parametrelerinin değışim gösterdiği gözlemlendi.

Kanchanapoom ve diğ. (2012), *Lilium longiflorum* Thunb. (zambak) bitkisinin kitosan ve benziladenin (BA) ile muamele edilmesi sonucunda sürgün gelişimine olan etkileri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda sadece 25 mg/L CHI konsantrasyonu kullanımında ortalama sürgün sayısı 5,0; sadece 5 mg/L BA konsantrasyonu kullanımında 4,7; 10 mg/L CHI ve 5 mg/L BA konsantrasyonlarının birlikte kullanımı durumunda ise 3,3 olarak ölçülmüştür. BA ve CHI biyopolimerinin bir arada kullanılması bitkicik gelişmesinde daha az etkili olmuştur. Bu durumun sebebinin bitki büyüme düzenleyicilerin endojen seviyelerindeki ve duyarlılıklarındaki farklılıklardan meydana gelebileceği belirtilmiştir. Kitosanın tek başına uygulanmasının sürgün sayısında en iyi sonuçlar verdiği ve kitosan konsantrasyonu arttıkça sürgün ve yaprak sayısının arttığı belirtilmiştir [46]. Bu tez çalışmasında kitosan biyopolimeri kullanımı sonucunda *A. houstonianum* bitkisinin ortalama sürgün sayısı kontrol grubunda 0,92 iken 10 mg/L - %20 DA'da 1,86 ile 2 kat daha yüksek değerde ölçüldü.

Lopez-Moya ve diğ. (2017), *Arabidopsis thaliana* bitkisinin kitosan ile muamele edilmesinin kök uzunluğu, taze ağırlık, yaprak sayısı ve çiçeklenme süresine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda %15 DA ve DP-70'ye sahip CHI konsantrasyonları ile muamele edilen bitkilerde en iyi sonucu 0,1 mg/ml CHI konsantrasyonu vermiştir ve kök uzunluğu 8,96 cm olarak ölçülmüştür. En düşük etki ise 1 mg/ml salisilik asit içeren ortamda olup, kök uzunluğu 0,59 cm olarak ölçülmüştür. Domates bitkisinde ise en iyi sürgün sayısı 0,01 mg/ml CHI içeren konsantrasyonda yaklaşık 6,4 cm, en düşük sürgün sayısı ise 2 mg/ml CHI içeren konsantrasyonda yaklaşık 2,5 cm olarak ölçülmüştür ve yaklaşık 2,5 katı etkiye sahiptir. Kök uzunlukları incelendiğinde en iyi sonuç kontrol grubu bitkilerinde yaklaşık 16,3 cm, en düşük sonuç 0,5 mg/ml CHI konsantrasyonunda yaklaşık 6,1 cm olarak ölçülmüştür ve kök uzunlukları yaklaşık 2,5 kat azalmıştır. Çalışma sonucunda gen ifadesinin azalmasının kök gelişimini baskıladığı ifade edilmiştir. Kitosanın bitkilerde fotosentetik hızı artırıcı olabileceği, alkaloidler ve lignin gibi metanolitlerin etkinliğini artırabileceğini göstermişlerdir [47]. Bu tez çalışmasında kök sayısının 2,5 mg/L %10 DA, 5 mg/L %10 DA ve 2,5 mg/L %20 DA konsantrasyonlarında azalma gösterdiği, kök uzunluğunun 2,5 mg/L %10 DA ve 10 mg/L %20 DA

konsantrasyonlarında azalma gösterdiği ve yaprak sayısının tüm konsantrasyonda azaldığı gözlemlendi. Uygun konsantrasyonlarda, Lopez-Moya ve diğ.'nin çalışması ile paralel sonuçlar ortaya koyulduğu görüldü.

Salachna ve Zawadzińska (2014), *Freesia* (Frezya) bitkisinin büyüme ve çiçeklenmesine CHI biyopolimerinin etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, sürgün uzunluğu, yaprak sayısı ve klorofil miktarı orta ve yüksek kDa'ya ve %15 DA'ya sahip CHI kullanımında kontrol grubuna göre %16,8 artış gözlenmiştir. Sürgün uzunlukları kontrol grubu bitkilerinde ortalama 51,2 cm iken yüksek konsantrasyonda 61,1 cm ile en yüksek değere ulaşmıştır. Ortalama sürgün sayısı kontrol grubu bitkilerinde 1,12 iken en yüksek sürgün sayısı orta konsantrasyonda 1,58 olarak ölçülmüştür. Ortalama yaprak sayıları yüksek konsantrasyonda 8,4 ile en yüksek değere ulaşırken kontrol grubunda 5,23 olarak ölçülmüştür. Frezya bitkisinin soğanlarını yüksek moleküler ağırlığa sahip CHI biyopolimeri ile ıslatmak soğan büyüklüğünün artmasını sağlamıştır [52]. *A. houstonianum* bitkisine uygulanan CHI biyopolimerinin moleküler ağırlığının artması sonucunda sürgün uzunluğu %10 DA'da 5,11 cm'den 8,37 cm'ye yükselerek yaklaşık 1,5 kat artış gösterdi. Yaprak sayısı kontrol grubunda ortalama 10,02 ile en yüksek değere ulaştı. CHI biyopolimeri kullanımı sonucunda yaprak sayıları azaldı. Yapılan çalışma Salachna ve Zawadzińska (2014)'nin çalışması ile karşılaştırıldığında sürgün uzunluğu değişiminde benzer sonuçlar elde edilirken yaprak sayılarında elde edilen sonuçların tersine olduğu görüldü.

Pornpienpakdee ve diğ. (2010), farklı deasetilasyon derecelerinde (DD) ve farklı konsantrasyonlarda oligomerik ve polimerik kitosan kullanımının *Dendrobium* orkideleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda ortalama protokorm sayısı kontrol grubunda 278,25 iken en yüksek değere P-70 10 mg/L'de 540,75 değerine ulaşmıştır. En düşük değer ise P-70 80 mg/L konsantrasyonuna 62,0 olarak ölçülmüştür. Ortalama sürgün sayıları kontrol grubu bitkilerinde 22,0'dır. En yüksek sürgün sayısı O-80 10 mg/L konsantrasyonda 39,20 iken en düşük sürgün sayısı P-80 80 mg/L konsantrasyonda 13,64 olarak ölçülmüştür. Ortalama sürgün uzunluğu kontrol grubu bitkilerinde 1,86 cm olarak ölçülmüştür. En yüksek sürgün uzunluğu P-80 10 mg/L konsantrasyonda 2,24 cm iken en düşük sürgün uzunluğu P-70 40 mg/L konsantrasyonda 1,51 cm olarak ölçülmüştür. Ortalama kök uzunlukları

kontrol grubu bitkilerinde 2,89 cm ile en düşük değerde ölçölürken en yüksek kök uzunlukları P-80 10 mg/L konsantrasyonda 4,54 cm olarak ölçölmüştür. Sonuç olarak; P-70 10 mg/L veya 20 mg/L konsantrasyonları bitkiciklerin en iyi şekilde hayatta kalma oranını ve büyüme oranını artırmak için püskürtme yöntemiyle kullanılabilceği bildirilmiştir [53]. Bu çalışmada oligomerik CHI kullanımını sonucunda sürgün sayısı %20 DA'da ve 10 mg/L konsantrasyonda 1,86 ile en yüksek değere ulaştı. Sürgün uzunluğunun en düşük değeri 10 mg/L - %20 DA'da ölçöldü. Kök uzunlukları 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonunda 1,82 cm ile en düşük değerde ölçöldü. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile Pornpienpakdee ve diğ. (2010)'nin yaptığı çalışmadaki sonuçlar incelendiğinde aynı DA'ya sahip CHI kullanımının *A. houstonianum* bitkisi üzerinde farklı etkiler gösterdiği gözlemlendi.

Literatür çalışmaları incelendiğinde; kitosanın DA ve DP özelliklerinin değişimi sonucunda farklı organizmalarda farklı etkilerin görölebileceği anlaşılmaktadır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *Ageratum houstonianum* bitkisinin 2,5 mg/L - %10 DA, - 5,0 mg/L - %10 DA, 10,0 mg/L - %10 DA, 2,5 mg/L - %20 DA, 5,0 mg/L - %20 DA, 10,0 mg/L - %20 DA konsantrasyonlarında ve DA'larında CHI biyopolimeri kullanılarak mikroçoğaltımı gerçekleştirildi. Altmış gün boyunca gözlemlenen bitkiler bu süre sonunda incelendi ve çimlenme, kök sayısı, kök uzunluğu, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı gibi özellikleri istatistiksel olarak yorumlandı. İstatistiksel verilerin sonuçları şu şekilde yorumlanabilir:

CHI biyopolimerinin çimlenme oranını azalttığı tespit edildi. 30., 45. ve 60. günde yapılan incelemelerde en yüksek çimlenme oranının kontrol grubunda gerçekleştiği ve CHI biyopolimeri ile muamele edilen tüm bitkilerde çimlenmenin daha geç başlayarak daha az sayıda gerçekleştiği sonucuna varıldı. Yalnızca CHI ile muamele edilen besi ortamlarında elde edilen sonuçlar incelendiğinde CHI biyopolimerinin DA'sının artması ile birlikte çimlenme oranı artış gösterdi.

Kök sayıları incelendiğinde; 10 mg/L - %20 DA, 10 mg/L - %10 DA ve 5 mg/L - %20 DA konsantrasyonlarında CHI içeren MS besiyerlerinde sırasıyla en yüksek kök sayılarına ulaştığı tespit edildi. CHI biyopolimerinin uygun konsantrasyonda kullanımının kök sayısını artırabildiği görüldü. DA artışı kök sayısını 2,5 mg/L konsantrasyonda değiştirmezken 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlarında artırdı. Sabit DA değerinde molekül ağırlığının artırılması sonucunda kök sayısı artış gösterdi.

Köklerin 5 mg/L - %10 DA ve 2,5 mg/L - %20 DA konsantrasyonlarında kontrol grubundan daha yüksek uzunluğa ulaştığı görüldü. DA artışı kök uzunluğunu 2,5 ve 5 mg/L konsantrasyonlarında azaltırken 10 mg/L konsantrasyonunda artırdı. %20 DA konsantrasyonunda molekül ağırlığı artışı sonucunda konsantrasyonunun kök uzunluğu artış gösterdi.

Sürgün sayıları; tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna oranla daha fazla sürgün sayısına ulaşırken en fazla sürgün oluşumu 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonu içeren MS besi ortamında gözlemlendi. Sürgün sayıları incelendiğinde, DA artışının sürgün sayısını tüm konsantrasyonlarda artırdığı görüldü. Moleküler ağırlık artışı %10 DA konsantrasyonunda sürgün sayısını arttırırken, %20 DA konsantrasyonunda yalnızca 10 mg/L konsantrasyonunda artış gözlemlendi.

Sürgün uzunluğu; kontrol grubuna oranla 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonu hariç daha yüksek değerlerde ölçüldü. 2,5 mg/L - %10 DA konsantrasyonu ise kontrol grubu ile neredeyse aynı uzama etkilerine sahipti. Sürgün uzunluğunun DA'ya bağlı olarak değişimi 2,5 ve 5 mg/L'de artış gösterdi. 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonunda CHI kullanımı sürgün uzunluğunun azalmasına sebep oldu. %10 DA'ya sahip tüm konsantrasyonlarda moleküler ağırlığa bağlı olarak sürgün uzunluğu artarken %20 DA'da azaldı.

CHI biyopolimerinin yaprak sayılarını azalttığı tespit edildi. Çalışmada en fazla yaprak sayısı kontrol grubunda elde edilirken en düşük yaprak sayısı 10 mg/L - %20 DA konsantrasyonu içeren MS besiyerinde görüldü. 2,5 ve 5 mg/L konsantrasyonlarında DA artışına bağlı olarak yaprak sayısı artarken 10 mg/L'de azaldı. Sabit DA değerinde molekül ağırlığının artırılması durumunda %10 DA'nın yaprak sayısını artırdığı ve %20 DA'nın azalttığı görüldü.

Tüm sonuçlar bir arada incelendiğinde CHI biyopolimerinin kullanım miktarının ve/veya DA'sının biki büyüme parametrelerinde farklı davranışlar sergilediği görüldü. Tüm parametrelerin artırılma veya azaltılma hedefinin tek bir konsantrasyonda elde edilemediği gözlemlendi.

A. houstonianum'un verimli bir şekilde *in vitro* çoğaltımının yapılması için en iyi DA ve CHI konsantrasyonunun 2,5 mg/L - %20 DA olduğu görüldü.

Bulgular ve tartışma bölümünde elde edilen ve istatistiksel olarak açıklanan veriler kullanılarak yorumlanan sonuçlar *A. houstonianum* bitkisinin CHI biyopolimeri ile mikroçoğaltımının yapılacağı uygulamalarda çimlenmeyi geciktirebildiği, kök sayısı, kök uzunluğu ve sürgün uzunluğunu uygun konsantrasyonların kullanımı ile artırabildiği, sürgün sayısını tüm konsantrasyonlarda bariz bir şekilde artırabildiği,

yaprak sayısını ise bariz bir şekilde azalttığı sonucuna varıldı. Uygulamada talep edilen özelliğe bağlı olarak uygun konsantrasyonun seçilmesi ile birlikte kök sayısı, kök uzunluğu, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı gibi özellikler CHI kullanımını ile optimize edilebilir.

A. houstonianum bitkisinin kullanım yeri ve amacına bağlı olarak yayılması veya baskılanması uygun CHI biyopolimeri konsantrasyonları kullanımı ile mümkün olabilir. CHI biyopolimerinin sürgün uzunluğunu artırabilmesi sonucunda bir süs bitkisi olan *A. houstonianum* daha hızlı büyüme göstererek görsel anlamda daha iyi olabilir. Dış mekan bitkisi olarak kullanımını durumunda kök gelişimini baskılayacak konsantrasyonlar bitkinin topraktan alması gereken ihtiyaçlarını yeterince alamadığından gelişimini olumsuz etkileyebilir. CHI uygulamasının çimlenmeyi geciktirdiği tespit edildiği için bitkinin çoğalması daha uzun sürede gerçekleşerek istilacı özelliği baskılanabilir. Kitosanın yaprak gelişimini baskılaması sonucunda fotosentez kabiliyeti azalacağından gün ışığına maruziyet gereksinimi artabilir.

Süs bitkileri yetiştiriciliğinde doğaya zarar vermeden bitki büyüme ve gelişimini artırması, doğal ve güvenilir olması, sürdürülebilir kullanım olanağına sahip olması gibi özellikleri sayesinde doğal büyüme artırıcı olarak kitosan biyopolimerinin kullanımını tercih edilebilir. Uygun konsantrasyonda ve DA'da CHI kullanımını ile birlikte kısa zamanda yüksek verimlilikte bitki üretiminin gerçekleştirilmesi mümkün olabilir ve bu sayede birim maliyetlerde azalma meydana getirilebilir. *In vitro* koşullar altında tohumlardan bitkicik elde edilmesi ve bu bitkiciklerin alt kültürlerle alınarak çoğaltımı ile birlikte ithal tohum gereksinimi azaltılabilir. Çalışmada elde edilen sonuçların farklı süs bitkilerinde farklı etkiler ortaya çıkarabileceği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Thorpe T., History of Plant Tissue Culture, *Molecular Biotechnology*, 2007, **37**(2), 169-180.
- [2] Hutchinson J., Dalziel J. M., *Flora of West Tropical Africa*, 2nd ed., Crown Agents for Overseas Governments & Administrations, London, 1963.
- [3] Johnson M. F., A monograph of genus *ageratum* L., *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1971, **58**(1), 6-88.
- [4] Domard A., Chen R. H., Chen H. C., *Advances in Chitin Science*, Vol 3., National Taiwan Ocean University Publisher, Taipei, 1998.
- [5] Chandy T., Sharma C. P., Chitosan as a Biomaterial, *Biomaterials Artificial Cells and Artificial Organs*, 1990, **18**(1), 1-24.
- [6] Chatelet C., Damour O., Domard A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 2001, **22**(3), 261-268.
- [7] Nwe N., Furuike T., Tamura H., Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides: Chitosan and Glucan, *Advances in Polymer Science*, 2011, 244(1), 187-207.
- [8] Evans D., Coleman J., Kearns A., *Plant Cell Culture*, 1st ed., Taylor & Francis Group, London, 2003.
- [9] Bhojwani S. S., Razdan M. K., *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a revised edition, Elsevier, New Delhi, 2004.
- [10] Harrison J. H., *Experiment in Plant Tissue Culture*, 7th ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
- [11] Gautheret R., Plant tissue culture: A history, *The botanical magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi*, 1983, **96**(1), 393-410.
- [12] Yılmaz S., *Plantago Lanceolata* Bitkisinin Doku Kültüründe Rejenerasyonu, Bitki Ekstraktından Nanopartikül Sentezi, Antibakteriyel ve Yara İyileştirici Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2020, 637737.
- [13] Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S., *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds, *Planta*, 2018, **248**(1), 1-18.

- [14] Harisha S., *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*, 1st ed., Infinity Science Press LLC., 2007.
- [15] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bio assays with *tobacco* tissue cultures, *Physiolgia Plantarum*, 1962, **15**(3), 473-497.
- [16] Saad A. I. M., Elshahed A. M., Plant Tissue Culture Media, Eds : Leva A., Rinaldi L. M. R., *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 1st ed., InTech, Winchester, 29-40, 2012.
- [17] Nge K. L., Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W. F., Chitosan as A Growth Stimulator in Orchid Tissue Culture, *Plant Sci.*, 2006, **170**(6), 1185-1190.
- [18] Koilparambil D., Shanavas J., Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 16(1), 1-12.
- [19] Ferri M., Tassoni A., Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in *in vitro* plant cell cultures, Eds: Mackay R. G., Tait J. M., *Handbook of Chitosan Research and Applications*; 1st ed., Nova Science Publishers Inc., New York, 389-414, 2011.
- [20] Demir A., Seventekin N., Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, *Electronic Journal of Textile Technologies*, 2009, **3**(2), 92-103.
- [21] Younes I., Rinaudo M., Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Mar Drugs*, 2015, **13**(3), 1133-1174.
- [22] Khan T., Khan T., Hano C., Abbasi B. H., Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*, *Industrial Crops and Products*, 2019, **129**, 525-535.
- [23] Vasconsuelo A., Giulietti A. M., Boland R., Signal Transduction Events Mediating Chitosan Stimulation of Anthraquinone Synthesis in *Rubia tinctorum*, *Plant Sci.*, 2004, **166**, 405-413.
- [24] Acemi A., Kitosan ile Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Serapias vomeraceae*'nin *in vitro* Fizyolojisi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2018, 522093.
- [25] Malerba M., Cerana R., Chitosan Effects on Plant Systems, *Intenational Journal of Molecular Sciences*, 2016, **17**(7), 996.
- [26] Mondal M. M. A., Malek M. A., Puteh A. B., Ismail M. R., Ashrafuzzaman M., Naher L., Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra, *Australian Journal of Crop Science*, 2012, **6**(5), 918.
- [27] Luan L. Q., Ha V. T. T., Nagasawa N., Kume T., Yoshii F., Nakanishi T. M., Biological Effect of Irradiated Chitosan on Plants *in vitro*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2005, **41**(1), 49-57.

- [28] Wu T., Zivanovic S., Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method, *Carbohydrate Polymers*, 2008, **73**(2), 248-253.
- [29] Han Z., Zeng Y., Lu H., Zhang L., Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products, *Carbohydrate Research*, 2015, 413(1), 75-84.
- [30] Czechowska-Biskup R., Jarosińska D., Rokita B., Ulański P., Rosiak J. M., Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 2012, **17**, 5-20.
- [31] Hembach L., Cord-Landwehr S., Moerschbacher B. M., Enzymatic production of all fourteen partially acetylated chitosan tetramers using different chitin deacetylases acting in forward or reverse mode, *Scientific Reports*, 2017, **7**(1), 17950-17956.
- [32] Acemi A., Bayrak B., Çakır M., Demiryürek E., Gün E., Gueddari N. E. E, Özen F., Comparative analysis of the effects of chitosan and common plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from nodal explants, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2018, 54(1), 537-544.
- [33] Pichyangkura R., Chadchawan S., Biostimulant activity of chitosan in horticulture, *Sciencra Horticulturae*, 2015, **196**, 49-65.
- [34] Rinaudo M., Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 2006, **31**(7), 603–632.
- [35] Desikan R., A-H-Macherness S., Hancock J. T., Neill S. J., Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress, *Plant physiology*, 2001, **127**(1), 159-72.
- [36] Zhao X., She X., Du Y., Liang X., Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, **87**(1), 78-84.
- [37] Górnik K., Grzesik M., Romanowska-Duda B., The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress, *Journal of Fruit Ornamental Plant Research*, 2008, **16**, 333-343.
- [38] El-Miniawy S., Ragab M., Youssef S., Metwally A., Response of strawberry plants to foliar spraying of chitosan, *Research Journal of Agriculture & Biological Sciences*, 2013, **9**(6), 366-372.
- [39] Barka E.A., Eullaffroy P., Clement C., Vernet G., Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*, *Plant Cell Reports*, 2003, 22(8), 608-614.

- [40] Uthairatanakij A., Silva J.A.T., Obsuwan K., Chitosan for Improving Orchid Production and Quality, *Orchid Science and Biotechnology*, 2007, 1(1), 1-5.
- [41] Abdel-Mawgoud A.M.R., Tantawy A., El-Nemr M.A., Sassine Y., Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application, *European Journal of Scientific Research*, 2010, 39(1), 170-177.
- [42] Ohta K., Taniguchi A., Konishi N., Hosoki T., Chitosan Treatment Affects Plant Growth and Flower Quality in *Eustoma grandiflorum*, *HortScience*, 1999, 34(2), 233-234.
- [43] Kıran Acemi R., Acemi A., Polymerization degree-dependent changes in the effects of *in vitro* chitosan treatments on photosynthetic pigment, protein, and dry matter contents of *Ipomoea purpurea*, *The EuroBiotech Journal*, 2019, 3(4), 197-202.
- [44] Asghari-Zakaria R., Maleki-Zanjani B., Sedghi E., Effect of *in vitro* chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L., *Plant Soil and Environment*, 2009, 55(6), 252-256.
- [45] Putalun W., Luealon W., De-Eknamkul W., Tanaka H., Shoyama H., Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L., *Biotechnology Letters*, 2007, 29(7) 1143-1146.
- [46] Kanchanapoom K, Pimolthai P., The effect of chitosan on regeneration of lily (*Lilium longiflorum* Thunb.'Ester Lily') from bulb scale explants cultured *in vitro*, *Propagation of Ornamental Plants*, 2012, 12(2), 127-129.
- [47] Lopez-Moya F., Escudero N., Zavala-González E.A., Esteve-Bruna D., Blázquez M.A., Alabadi D., Lopez-Llorca L.V., Induction of auxin biosynthesis and WOX5 repression mediate changes in root development in *Arabidopsis* exposed to chitosan, *Scientific Reports*, 2017, 7(16813), 1-14.
- [48] Anusuya S. ve Sathiyabama M., Effect of chitosan on growth, yield and curcumin content in turmeric under field condition, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 6(1), 102-106.
- [49] Kiang T., Wen J., Wen Lim H., Leong K. W., The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection, *Biomaterials*, 2004, **25**, 5293-5301.
- [50] Kulikov S. N., Chirkov S. N., Il'ina A. V., Lopatin S. A., Varlamov V. P., Effect of the Molecular Weight of Chitosan on Its Antiviral Activity in Plants, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, **42**(2), 200-203.
- [51] Falcón A., Cabrera J. C., Costales D., Ramírez M. A., Cabrera G., Toledo V., Martínez Téllez M. A., The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, **24**, 103-112.

- [52] Salachna P., Zawadzińska A., Effect of Chitosan on Plant Growth, Flowering and Corms Yield of Potted *Freesia*, *Journal of Ecological Engineering*, 2014, **15**(3), 97-102.
- [53] Pornpienpakdee P., Singhasurasak R., Chaiyasap P., Pichyangkura R., Bunjongrat R., Chadchawan S., Limpanavech P., Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan, *Scientia Horticulturae*, 2010, **124**, 490-499.
- [54] Stevens P. F., Missouri Botanical Garden, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, (Ziyaret Tarihi: 30 Mayıs 2021).
- [55] Rieseberg L. H., Raymond O., Rosenthal D. M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T., Durphy J. L., Schwarzbach A. E., Donovan L. A., Lexer C., Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization, *Science*, 2003, **301**(5637), 1211-1216.
- [56] Harris E. M., Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts, *Botanical Review*, 1995, **61**(2/3), 93-278.
- [57] <http://tolweb.org/Asteraceae/20780>, (Ziyaret Tarihi: 07 Mayıs 2021).
- [58] Bremer K., *Asteraceae: Cladistics and Classification*, 1st ed., Timber Press, Portland-Oregon, 1994.
- [59] Carlquist S., Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae, *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 1976, **8**(4), 465-492.
- [60] Cassini H., Sixième mémoire sur la famille des Synanthérées, contenant les caractères des tribus, *J. Phys. Chim. Hist. Nat. Arts*, 1819a, **88**, 150-163.
- [61] Cassini H., Suite du sixième mémoire sur la famille des Synanthérées, contenant les caractères des tribus, *J. Phys. Chim. Hist. Nat. Arts*, 1819b, **88**, 189-204.
- [62] Wagenitz G., Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae), *Plant Systematics and Evolution*, 1976, **125**, 29-46.
- [63] Jansen R. K., Palmer J. D., A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae), *Proceedings of National Academy Sciences*, 1987, **84**(16), 5818-5822.
- [64] Jeffrey C., Compositae: Introduction with key to tribes, Eds: Kadereit J. W., Jeffrey C., *Families and Genera of Vascular Plants Vol 8. Flowering Plants, Eudicots, Asterales*, 1st ed., Springer-Verlag, Berlin, 61-87, 2007.
- [65] Panero J. L., Funk V. A., Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae, *Proceedings of the Biological Society Washington*, 2002, **115**(4), 909-922.

- [66] Panero J. L., Funk V. A., The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, **47**(2), 757-782.
- [67] Kim K. J., Jansen R. K., *NdhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family, *Proceedings of National Academy Sciences*, 1995, **92**(22), 10379-10383.
- [68] Robinson H., New supertribes Helianthodae and Senecionodae, for the subfamily Asteroideae (Asteraceae), *Phytologia*, 2004, **86**, 116-120.
- [69] Robinson H., Validation of the supertribe Asterodae, *Phytologia*, 2005, **87**, 72-88.
- [70] [https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Ageratum_houstonianum_\(Blue_Billygoat_Weed\).htm](https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Ageratum_houstonianum_(Blue_Billygoat_Weed).htm), (Ziyaret Tarihi: 30 Mayıs 2021).
- [71] http://www.hear.org/pier/species/ageratum_houstonianum.htm, (Ziyaret Tarihi: 30 Mayıs 2021).
- [72] Prieto R., Oliver P., Caluff M. G., ve diğ., National list of invasive and potentially invasive plants in the Republic of Cuba – 2011, *Bissea*, 2012, **6**(Special Issue 1), 22-96.
- [73] Barua I. C., Deka J., Devi M., Invasive weeds and vegetation dynamics in Assam., *The role of weed science in supporting food security by 2020. Proceedings of the 24th Asian-Pacific Weed Science Society Conference*, Bandung Indonesia, 22-25 October 2013.
- [74] https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/ageratum_conyzoides.htm, (Ziyaret Tarihi: 30 Mayıs 2021)
- [75] <https://www.cabi.org/isc/datasheet/3573#tosummaryOfInvasiveness>, (Ziyaret Tarihi: 04 Mayıs 2021).
- [76] Sahu T.R., Taxonomic studies of the genus *Ageratum* L. in India, *Feddes Repertorium*, 1982, **93**(1-2), 61-65.
- [77] Sorrie B. A., Alien vascular plants in Massachusetts, *Rhodora*, 2005, **107**(931), 284-329.
- [78] <https://www.tropicos.org/name/2700027>, (Ziyaret Tarihi: 30 Mayıs 2021)
- [79] <https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Ageratum+houstonianum> (Ziyaret Tarihi: 14 Mayıs 2021)
- [80] Mukherjee S. K., Das S. K., Comparative Morphological, Anatomical and Palynological Observation in *Ageratum conyzoides* and *Ageratum houstonianum* of The Family Compositae, *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 2013, **2**(4), 48-62.

- [81] <http://powo.science.kew.org/taxon/175500-1>, (Ziyaret Tarihi: 14 Mayıs 2021)
- [82] <https://gardening.cals.cornell.edu/>, (Ziyaret Tarihi: 30 Mayıs 2021)
- [83] Wielgolaski F. E., The influence of air temperature on plant growth and development during the period of maximal stem elongation. *Oikos*, 1966, **17**(2), 121-141.
- [84] Song B., Jiao H., Tang G., Yao Y., Combining repellent and attractive aromatic plants to enhance biological control of three tortricid species (Lepidoptera: Tortricidae) in an apple orchard, *The Florida Entomologist*, 2014, **79**(4), 1679-1689.
- [85] Song B., Tang G., Sang X., Zhang J., Yao Y., Wiggins N., Intercropping with aromatic plants hindered the occurrence of *Aphis citricola* in an apple orchard system by shifting predator-prey abundances, *Biocontrol Science and Technology*, 2013, **23**(4), 381-395.
- [86] Thoden T. C., Hallmann J., Boppré M., Effects of plants containing pyrrolizidine alkaloids on the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*, *European Journal of Plant Pathology*, 2009, **123**(1), 27-36.
- [87] Goufo P., Fontem D. A., Ngnokam D., Evaluation of plant extracts for tomato late blight control in Cameroon, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2010, **38**(3), 171-176.
- [88] Andrade-Cetto A., Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México, *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, **122**(1), 163-171.
- [89] Bodner C. C., Gereau R. E., A contribution of Bontoc ethnobotany. *Economic Botany*, 1988, **42**(3), 307-369.
- [90] Tennyson S., Ravindran K. J., Eapen A., William J., Repellent activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012, **2**(6), 478-480.
- [91] Tennyson S., Ravindran K. J., Eapen A., William S. J., Effect of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts on the oviposition activity of *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, 2012, **111**(6), 2295-2299.
- [92] Koluman N. M. A., Süzgeç S., Eczanelerde fitokozmetikler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2016, **20**(1), 7-20.
- [93] Pamo E. T., Tendonkeng F., Kana J. R., Payne V. K., Boukila B., Lemoufouet J., Miegoue E., Nanda A. S., A study of the acaricidal properties of an essential oil extracted from the leaves of *Ageratum houstonianum*, *Veterinary Parasitology*, 2005, **128**(3/4), 319-323.

- [94] Pandey D. K., Chandra H., Tripathi N. N., Dixit S. N., Mycotoxicity in leaves of some higher plants with special reference to that of *Ageratum houstonianum* Mill. *Mykosen*, 1984, **26**, 565-573.
- [95] Njateng G. S. S., Kuate J. R., Gatsing D., Tamokou J. D., Mouokeu R. S., Kuete V., Antidermatophytic activity and dermal toxicity of essential oil from the leaves of *Ageratum houstonianum* (Asteraceae). *Journal of Biological Sciences*, 2010, **10**(5), 448-454.
- [96] Menut C., Lamaty G., Zollo P. H. A., Kuate J. R., Bessière J. M., Aromatic plants of tropical central Africa. Part X. Chemical composition of the essential oils of *Ageratum houstonianum* Mill. and *Ageratum conyzoides* L. from Cameroon, *Flavour and Fragrance Journal*, 1993, **8**(1):1-4
- [97] Ravindran J., Samuel T., Alex E., William J., Adulticidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against three vector mosquito species (Diptera: Culicidae), *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012, **2**(3), 177-179.
- [98] Koi S., Nectar sources for *Eumaeus atala* (Lepidoptera: Lycaenidae: Theclinae). *Florida Entomologist*, 2008, **91**(1), 118-120.
- [99] Iapichino G., Ferrara G., Airò M., Sabatino L. and Germanà M.A., a Micropropagation of *Ageratum houstonianum* by nodal segments, *Acta Horticulturae*, 2017, 1187, 29-36.
- [100] Mohammadi M., *In vitro* organogenesis of *Ageratum houstonianum* (Asteraceae), *International Journal of Biosciences*, 2017, **10**(5), 85-96.

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

- [1] Acemi A., Bayrak B., Çakır M., Demiryürek E., **Gün E.**, Gueddari N. E. E, Özen F., Comparative analysis of the effects of chitosan and common plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from nodal explants, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2018, **54**(1), 537-544.
- [2] **Gün E.**, Bayrak B., Demiryürek E., Çakır M., Acemi A., Özen F., Changes in Photosynthetic Pigment Quantities of *Ipomea purpurea* Due to *In vitro* Chitosan Treatment, *International Congress for Applied Biological Sciences*, Eskişehir, Turkey, 3-5 May 2018.
- [3] Acemi A., Kıran Acemi A., Çakır M., **Gün Polat E.**, Özen F., Preliminary screening the antioxidant potential of *in vitro*-propagated *Amsonia orientalis*: An example to sustainable use of rare medicinal plants in pharmaceutical studies, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2020, **17**, DOI: 10.1016/j.scp.2020.100302.
- [4] Acemi A., **Gün Polat E.**, Yavuz B., Çakır M., Demiryürek E., Özen F., Molecular weight and concentration of chitosan affect plant development and phenolic substance pattern in *Arugula*, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2021, **49**(2), 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2014 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2018 yılında Biyoloji Lisans Mezununu olarak mezun oldu. 2018 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

