

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ENGİNARDA DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARININ
İYİLEŞTİRİLMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

Hüsamettin Aycan ALP

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.01.03

Sunuş Tarihi: 26.02.2008

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eftal DÜZYAMAN

Bornova – İZMİR

III

Hüsamettin Aycan ALP tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan **“Enginarda Doku Kültürü Koşullarının İyileştirilmesine Yönelik Çalışmalar”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.02.2008 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. F. İ. Taş Düzgören
Raportör Üye: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin TÜRKÜSAĞ
Üye : Prof. Dr. Erhan ÖZCAN

ÖZET
ENGİNARDA DOKU KÜLTÜRÜ KOŞULLARININ
İYİLEŞTİRİLMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Alp, Hüsamettin Aycan

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Eftal Düzyaman

Şubat, 2008, 82 sayfa

Gerçekleştirilen çalışmada enginar doku kültürü koşullarının iyileştirilmesine yönelik olarak en sık karşılaşılan enfeksiyon ve kararma problemlerinin çözülmesi amaçlanmıştır.

Enfeksiyon problemini çözmeye yönelik olarak farklı sterilizant maddeler sterilizasyon işleminin yanı sıra ortama ilave edilerek denenmiş ve en iyi sonucun elde edildiği sterilizantın farklı doz ve uygulama süreleri denenerek sterilizasyon işlemi için en uygun yöntem tespit edilmiştir. Kararma problemine ilişkin olarak da sürgün uçlarının karanlıkta bekletilmesi ve ortama ilave edilen fenol tutucu maddelerin etkinlikleri araştırılmıştır.

% 87 sağlıklı gelişen sürgün ucu oranı ile en başarılı sonucu veren sterilizasyon prosedüründe sürgün uçları sırası ile, 3 dakika ultrason işleminin ardından, 20 saniye % 70'lik alkol çözeltisi, 10 dakika % 6 dozda fungusit, 15 dakika % 2,5 ve 3 dakika % 0,5 sodyum hipoklorit çözeltilerinde bekletilmelerinin ardından 500 mg l⁻¹ ampiciline içeren suda 3 kez durulanmışlardır. Ardından sürgün uçları 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmışlardır. Kararmayı önlemeye dönük olarak karanlıkta kültüre alma işlemi başarılı bulunmuş olup en düşük kararma oranı 4 g l⁻¹ PVP ilave edilen ortamda gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *in vitro* enginar kültürü, sterilizasyon işlemi, doku kararmaları.

ABSTRACT
INVESTIGATIONS ON OPTIMIZATION OF IN
VITRO CONDITIONS FOR ARTICHOKE

Alp, Hüsamettin Aycan

Master of Science Thesis, Horticultural Dept.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eftal Düzyaman

February, 2007, 82 pages

In the present study, it was aimed to solve the infection and browning problems, which are among the most common problems in *in vitro* culture of artichoke.

To solve the infection problem, various sterilizing agents were used as sterilants and as additive to the culture medium, where sodium hypochlorite was elected as the most promising. Application of sodium hypochlorite was further improved by applying it in different doses and durations. To investigate the problem of browning, plants were kept in the dark and fenolic traps were added to the culture medium.

By applying the most successful sterilization procedure 87 % of the explants grew healthy. The steps followed in this procedure were as follows: 3 minutes ultrasound application, 20 second in 70 % alcohol, 10 minutes fungicide (% 6) application, stepwise sterilization in % 2,5 sodium hypochlorite (for 15 minutes) + % 0,5 sodium hypochlorite for 3 minutes, rinsing of the explants in the sterile distilled water for three times contains ampiciline (500 mg l⁻¹). After the sterilization has been done, explants were planted in modified MS medium containing 100 mg l⁻¹ silver nitrate, which was proven to suppress bacterial growth. The least browning ratio was obtained in the medium containing 4 g l⁻¹ PVP. To further hinder browning of the tissues, plantlets were kept in dark conditions for 2 days at the beginning of the culture period.

Key words: *in vitro* artichoke culture, sterilization procedures, explant browning.

TEŞEKKÜR

Giriştiğim her işte, maddi-manevi imkanlarını seferber eden sevgili anne ve babama,

Bu çalışmanın yürütülmesi ve konunun incelenmesinde yaptığı değerli katkılarından dolayı Sayın Hocam Doç. Dr. Eftal Düzyaman'a,

Laboratuar çalışmalarında yol gösterici olan Sayın Hocam Prof. Dr. M. Ercan Özzambak'a,

Her zaman manevi desteğini hissettiren Sayın Hocam Prof. Dr. Yüksel Tüzel'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca kaynak temini konusunda çalışmama destek sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Benian Eser'e,

Çalışma arkadaşım Rıfat Tarık Yararbaş'a,

Ve değerli arkadaşım Ljiljaya Kuzmanoviç'e katkılarından ötürü teşekkür ederim.

X

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXI
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
2.1. Enginarın Morfolojisi ile İlgili Çalışmalar	8
2.2. Enginarın Üretim Yöntemleri ile İlgili Çalışmalar	10
2.3. Enginarın İn Vitro Üretimi ile İlgili Çalışmalar	12
2.4. İn Vitro Üretimde Karşılaşılan Problemler ile İlgili Çalışmalar	15
2.4.1. Enfeksiyon problemine ilişkin çalışmalar	15
2.4.2. Kararma problemine ilişkin çalışmalar	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Materyal	24
3.2. Metot	24
3.2.1. Besi ortamlarının hazırlanması	24
3.2.2. Sürgünlerin hazırlanması	27
3.2.3. Denemelerin kurulması	30
3.2.3.1. Deneme 1: Dikim öncesi farklı sterilizasyon ajanlarının uygulanması	30
3.2.3.2. Deneme 2: Sterilizasyon ajanlarının doğrudan ortama ilavesi ..	31
3.2.3.3. Deneme 3: Farklı sterilizasyon sürelerinin denenmesi	33
3.2.3.4. Deneme 4: Kademeli sterilizasyon uygulaması	34
3.2.3.5. Deneme 5: Ultrason kullanımı	35
3.2.3.6. Deneme 6: Ortama ilave edilen fenol tutucu maddelerin doku kararması üzerine etkileri	36

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.4. Kùltür koşulları	38
3.2.5. Yapılan gözlemler	38
3.2.6. Değerlendirme	39
4. BULGULAR	41
4.1. Sterilizasyon problemine ilişkin alışmalar	41
4.1.1. Deneme 1: Dikim ncesi farklı sterilizasyon ajanlarının uygulanması	41
4.1.2. Deneme 2: Sterilizasyon ajanlarının doğrudan ortama ilavesi	44
4.1.3. Deneme 3: Farklı sterilizasyon sùrelerinin denenmesi	46
4.1.4. Deneme 4: Kademeli sterilizasyon uygulaması	50
4.1.5. Deneme 5: Ultrason kullanımı	53
4.1.6. Deneme 6: Ortama ilave edilen fenol tutucu maddelerin doku kararması üzerine etkileri	55

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR DİZİNİ	71
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Türkiye enginar üretiminin yıllara göre dağılımı	6
3.1 Bahçe koşullarında sürgünlerin görünümü	28
3.2 Ön temizlik sonrası sürgünler.....	28
3.3 Sterilizasyon öncesi sürgünlerin görünümü	29
3.4 Farklı ortamlarda gelişimlerini sürdüren örnekler	32
3.5 PVP (4 g l ⁻¹) ilave edilmiş ortamda gelişen bir sürgün	37
3.6 AC (2 g l ⁻¹) ilave edilmiş ortamda gelişen bir sürgün	37
4.1.3 Farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine polinomiyal etkileri	47
4.1.4 Kademeli sterilizasyon işleminin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine polinomiyal etkileri	50

XX

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Enginarın Besin İçeriği	2
1.2 Enginar Üretiminin Ülke Ve Yıllara Göre Dağılımı	4
2.1 <i>In vitro</i> 'da kültüre alınan farklı enginar eksplantları ve elde edilen dokular.....	14
3.1 Denemelerde Kullanılan Standart Besi Ortamı Bileşenleri	25
4.1.1 Farklı sterilizasyon ajanlarının ve karanlık koşulların enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkileri.....	42
4.1.2 Ortama doğrudan ilave edilen sterilizasyon ajanları ve antibiyotiğin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkinlikleri.....	45
4.1.3 a) Farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkileri	47
4.1.3 b) 15 ve 20 dakikalık farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri	50

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

4.1.4 Kademeli sterilizasyon işleminin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri	51
4.1.5 Ultrason kullanımının enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen sürgün ucu oranlarına olan etkisi	54
4.1.6 Kararmayı engelleyici maddelerin ortama ilavesi	55

1. GİRİŞ

Akdeniz havzasının önemli bitkilerinden biri olan enginarın, bu havzada yer alan tüm ülkelerde yabani formlarının olduğu bilinmektedir. Yabani enginar formundan söz eden ilk kayıtlar M.Ö. 300'lü yıllara kadar dayanmaktadır (Eser ve ark., 2006). Theophratus henüz M.Ö. 371-287 yıllarında, enginarın çiğ ve haşlanmış olarak yenebildiğini belirtmiştir. Theophratus'a göre, enginarın yenilen kısmı, çiçeğin iç kısmı olarak da bilinen 'çiçek tablası'dır (Ryder et al., 1983). Günümüzdeki enginar formu hakkında ulaşılabilen ilk basılı bilgi ise 1597 yılında yayımlanan bir eserde kullanılan enginar resmi (GRIN, 2003).

Compositae familyasına ait olan enginarın taksonomisi hakkında halen bazı tartışmalı görüşler bulunsa da, tür ismi olarak *Cynara scolylus* pek çok araştırmacı tarafından yaygın olarak kabul görmektedir (Basnizki, 1979; Koçer, 1993). Genel olarak araştırmacılar, *C. cardunculus* ve *C. syriaca* türlerinin enginarın yakın akrabaları olduğunu ifade etmektedirler. Ancak bununla birlikte Basnizki (1979), *Cynara scolymus*, *C. cardunculus* ve *C. syriaca*'nın birbirleriyle melezlenmesi sonucunda fertil F₁ bireylerin oluştuğunu gözlemlemiştir. Bu nedenle söz konusu üç türün aslında aynı türün botanik varyeteleri olduğu görüşü gündeme gelmiştir. Rottenberg ve Zohary (1996), kültür enginarının yabani formları ile ilgili bir makalelerinde; *Cynara* cinsi içinde yedi farklı yabani türün bulunduğunu, kültür enginarlarının *Cynara cardunculus* ssp. *scolymus* türü olduğunu ve bu gruba en yakın yabani formların ise *Cynara cardunculus* ssp. *sylvestris* içinde yer aldıklarını belirtmektedirler. Sonnante ve arkadaşları (2001) kültürü yapılan enginarların genitörü olan formlarının *C. cardunculus* var. *sylvestris* grubu içinde yer aldığını ifade etmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca,

kültür çeşitlerinin yer aldığı grubun *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* veya *C. scolymus* olarak ifade edilebileceğini belirterek, bu konudaki farklı yaklaşımları anlaşılır bir düzeye getirmişlerdir.

Enginar bitkisi, genellikle taze ve pişirilerek tüketilen, konserve veya dondurulmuş gıda üretimine uygun ve besin değeri oldukça yüksek bir sebzedir (Delaveau, 1985; Eser ve ark., 2006). Enginar, yüksek protein ve karbonhidrat içeriğinin yanı sıra, bünyesinde önemli vitamin ve mineral elementleri de bulundurmaktadır (Macit ve Şalk, 1970; Abak, 1987; Pecaut and Foury, 1992; Koçer, 1993; Eser ve ark., 2006). Besin elementlerinin miktarı bitki ve kültür koşullarına göre değişmekle birlikte, 100 gram enginar bitkisinin bileşimi yaklaşık olarak Çizelge 1.1'deki gibidir. Diğer türlerle kıyaslandığında enginar özellikle potasyum, kalsiyum ve demir içeriği bakımından zengindir (Abak, 1987).

Çizelge 1.1 Enginarın besin içeriği

100 ENGİRAR'IN BESİN İÇERİĞİ			
KARBONHİDRAT	7.8 g	B2 VİTAMİNİ	0.05 mg
PROTEİN	2.3 – 3 g	B6 VİTAMİNİ	0.7 mg
YAĞ	0.2 – 0.3 g	C VİTAMİNİ	10 mg
SU	86.5 %	K	310 mg
KALORİ	63 kcal	P	69 mg
A VİTAMİN	280 mg	Ca	51 mg
B1 VİTAMİN	0.15 mg	Fe	11 mg

<http://www.taraklienginari.com>

Ağırlıklı olarak gıda amaçlı üretilmesine karşın enginar; kozmetik, içki, yem ve boya sanayinde de kullanılmaktadır (Bayraktar, 1981; Abak, 1987; Koçer, 1993). Ayrıca enginar uzun yıllardan beri tıbbi bitki olarak da bilinmektedir. Son yıllarda bu özelliği daha da ön plana çıkmıştır. Migliori'ye (1995) atfen Özen (1999), 1700 ile 1960 yılları arasında enginarın tıbbi özellikleri ile ilgili pek çok yayının yapıldığını belirtmektedir. Örneğin 1840 yılında Paris Guitnio Tıp Akademisi'nde ilk kez enginarın önemli bir içeriği olan cynarine'den söz edilmiştir. Enginarın tıbbi özellikleri arasında idrar söktürücü ve böbrek taşlarını düşürücü etkisi de önemlidir (Macit ve Şalk, 1970). Bunların yanında üre, kolesterol ve 7.6 ppm krom içeriği ile şeker hastalıklarına da iyi geldiği de bilinmektedir (Abak, 1987; Müller et al., 1988; Koçer, 1993). Sarılık tedavisinde, vücuttaki ödemlerin giderilmesinde, safra salgısının kolaylaştırılmasında da enginardan yararlanıldığı çeşitli araştırmacılarca ileri sürülmüştür (Bayraktar, 1981; Abak, 1987; Koçer, 1993; Pelt, 1993). Wohlmuth (2003) "Globe artichoke" adlı makalesinde enginarın; kafeik asit, bunun türevleri olan kloregenik asit ve cynarinin yanısıra, glikosid türevi olan cynaropicrin içeriği ile de önemli bir tıbbi bitki olduğunu belirtmiştir. Araştırmacı ayrıca luteolin içeriği ile enginarın peroksitatif zararlanmaları engelleyen antioksidant özelliğe sahip olduğunu da ifade etmektedir (www.botanicalpathways.com).

İlk çağlardan beri bilinen ve kullanılan enginar bitkisinin kültürü yapıldığı alanlara baktığımızda, % 85 gibi bir oranla yoğunluğun Akdeniz havzasında olduğu dikkati çekmektedir. 118.000 hektar olan bu üretim alanı büyük ölçüde, % 43 ile İtalya başta olmak üzere, İspanya (% 15) ve Fransa (% 11) arasında dağılım göstermektedir (Bianco, 2000). Bunların dışında enginarın yoğun olarak üretildiği ülkeler arasında, Güney Amerika'da Arjantin ve Peru ile Afrika'da Mısır ve Asya'da Çin yer almaktadır (FAOSTAT, 2007).

Gerçekleştirilen üretimin ağırlık bazında ülkelere göre dağılımı incelendiğinde ise, İtalya'nın başı çektiği ve bunu da İspanya'nın takip ettiği görülmektedir (Çizelge 1.2). Ayrıca Arjantin dünya genelinde önemli bir üretim hacmine sahiptir. Son yıllarda düşüş göstermesine karşın Mısır'ın 70.000 tonluk üretimle, üretim hacmi azalmakta olan Fransa'nın önüne geçtiği görülmektedir. Ayrıca Fas, Çin ve özellikle de Peru son yıllarda üretim oranlarını hızla arttırmaktadırlar. Türkiye ise yıllık 30,000 tonluk üretimi ile ABD ve Yunanistan'dan sonra dünya genelinde 11. sırada yer almaktadır.

Çizelge 1.2 Enginar üretiminin ülke ve yıllara göre dağılımı (× 1000 ton)

Ülkeler	1991	1993	1995	1997	1999	2001	2003	2005
İtalya	565.20	475.27	517.20	521.14	472.23	464.70	391.68	469.98
İspanya	359.70	334.10	250.70	274.43	289.65	277.38	306.48	188.90
Arjantin	72.00	73.00	75.00	75.00	85.00	85.00	88.00	88.00
Mısır	67.05	28.00	40.00	53.61	43.77	65.26	110.35	70.00
Peru	0.90	0.99	1.88	2.24	2.66	6.77	19.75	67.94
Çin	3.21	10.00	14.00	18.00	29.00	36.00	45.00	55.00
Fas	24.47	25.50	34.75	24.30	28.33	44.50	50.27	53.22
Fransa	90.22	67.99	63.19	76.00	75.00	59.48	50.30	50.15
ABD	54.72	45.90	37.15	42.18	51.03	45.36	45.72	38.10
Yunanistan	27.00	25.30	24.90	32.00	35.03	35.00	29.00	35.00
Türkiye	11.00	11.50	18.00	24.50	25.80	26.50	28.00	30.00

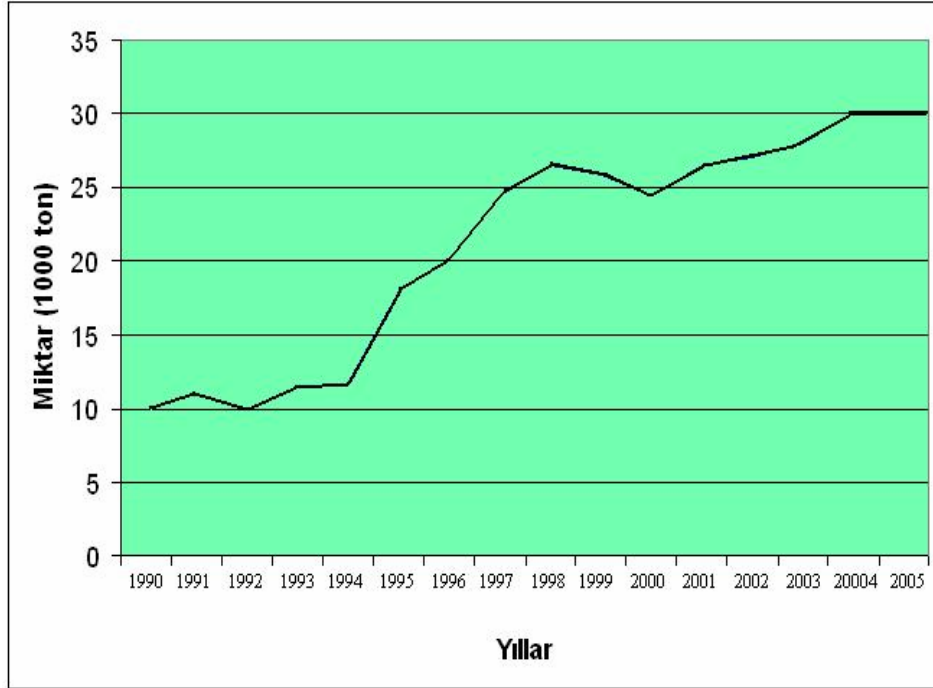
Bu üretim değerlerine karşın, ihracattaki sıralamaya bakıldığında, yıllık ortalama 27.000 ton ihracat gerçekleştiren İspanya, üretim değerlerinde ikinci sırada yer almasına karşın uluslararası enginar ticaretinde % 50'lik bir oranla başı çekmektedir. İspanya'yı 11.000 ton/yıl ihracat hacmi ile İtalya ve bunu da 6.000 ton/yıl ile Fransa izlemektedir. Konserve enginar ihracatına bakıldığında ise, İspanya'nın 21.000 ton/yıl, Fransa'nın 2.000 ton/yıl ve İtalya'nın da 36 ton/yıl ile başı çektiği görülmektedir. En önemli enginar ithalatçısı ülke ise yıllık 30.000 ton taze ve 11.000 işlenmiş enginar alan Almanya'dır (Bianco, 2000).

Ülkemiz, enginar tarımında ilk sıralarda yer alan diğer Akdeniz ülkeleriyle aynı ekolojik koşullara sahiptir. Küçük dalgalanmalarla birlikte üretim hacmi özellikler son on yılda ciddi bir artış sergilemektedir (Çizelge 1.3). Ancak buna rağmen ülkemizde üretim miktarı yeterli kabul edilemez. Ayrıca standardizasyon gibi problemler nedeniyle ülkemiz henüz yeterli düzeyde ihracat yapabilecek kapasiteye ulaşmamıştır (Eser ve ark., 2006).

Türkiye içerisindeki enginar üretiminin dağılımına ilişkin veriler incelendiğinde, Ege Bölgesi % 82'lik bir üretimle ilk sırada yer alırken, Marmara Bölgesi üretim toplamında % 16'lık bir paya sahiptir. Ege Bölgesi'nde İzmir ili tek başına % 76'lık bir pay ile Türkiye enginar kültürünün en yaygın olduğu ildir. Bu bölgede üretim özellikle İzmir'in Karaburun ilçesinde yoğunlaşmıştır. İzmir-Karaburun yöresi gerek erkencilik gerekse kalite yönünden yetiştiriciliğin en iyi yapıldığı yer olarak dikkati çekmektedir. Marmara bölgesinde ise enginar üretimi Pendik-İzmit arasında kalan Marmara Denizi kıyılarındaki yamaçlarla Yalova-Bursa ve Balıkesir dolaylarına gerçekleştirilmektedir. Bu iki bölge dışında Akdeniz Bölgesi'nde, Mersin ve dolaylarında sınırlı bir enginar üretimi vardır. İklim özellikleri bakımından enginar yetiştiriciliği

için Ege bölgesinden daha uygun şartlara sahip olmasına karşın, Akdeniz Bölgesi'nde önemli boyutlarda bir üretim yapıldığından söz etmek mümkün değildir (Macit ve Şalk, 1970; Özzambak ve Yoltaş, 1988; Özen, 1999). Son yıllarda enginar üretiminin, özellikle de bütün baş olarak konservelenen “enginar kalbi” üretiminin, İzmir-Aydın'da da yaygınlaştığı bilinmektedir (B. Eser, 2006, sözlü görüşme).

Şekil 1.1 Türkiye enginar üretiminin yıllara göre dağılımı ($\times 1000$ ton)



FAOSTAT , 2007

Yukarıdan da anlaşılacağı gibi enginar üretmi dünyada ve Türkiye’de önem kazanmaktadır. *In vitro* teknikleri ise bu üretimin daha sağlıklı yapılabilmesi için birçok avantaj sağlayacak niteliktedir. Buna karşın enginar bu teknik bakımından problemli bitkiler kategorisinde yer almaktadır. Bitkisel dokuların etkin bir şekilde dezenfekte (sterilize) edilememeleri (Ancora et al., 1981; Moncousin, 1981) ve kültür sırasında kararmaları, enginar ile gerçekleştirilen doku kültürü çalışmalarında en sık karşılaşılan problemler arasındadır (Ancora, 1986; E. Rugini, 2006, yazılı görüşme).

Bu tez, *in vitro* enginar kültürlerinde, dokularında kararma ve dezenfeksiyon (sterilizasyon) problemlerinin çözümlenmesi ve kültürlerin bu bakımdan optimize edilmeleri amacıyla düzenlenmiştir. Çalışmaların sonucunda ulaşılmak istenen, enginarın doku kültürü yolu ile üretiminde, doku ve besi ortamında kararmaya neden olan fenolik bileşiklerin etkisini ortadan kaldırmak veya bitki gelişimini aksatmayacak düzeye indirmektedir. Bunun yanı sıra çalışmada, bitki gelişimini bloke eden ve bitkilerde ölümlere neden olan enfeksiyon probleminin çözümü için en uygun sterilizant ve uygulama şeklinin belirlenmesi istenmektedir. Bu amaçlara ulaşmak için çalışmalarda, fenolik bileşikler absorbe edici bazı bileşikler denenmiş ve bazı yaygın sterilizasyon ajanlarının ve bunları uygulama tekniklerinin etkinliği incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Enginarın Morfolojisi ile İlgili Çalışmalar

Çok yıllık bir bitki olan enginarın, morfolojik bakımdan toprak altı ve toprak üstü olmak üzere iki kısımda incelenmesi mümkündür. Enginarın sürgün, yaprak ve çiçeklerden oluşan tek yıllık toprak üstü kısmı (Eser ve ark., 2006) 100-120 cm'ye kadar boy almakta ve bitki tacı 1 m²'lik bir alanı kaplayabilmektedir. Ekim ayında bitkinin generatif devreye girmesiyle birlikte çiçek sapı ve baş meydana gelir. Çiçek tablasının sapı 1-1,5 m uzunlukta olup, bir ana baş ve yan dallanma sonucu oluşan birçok yan başları taşır (Uğur, 2005). Bitkiye çok yıllık özellik kazandıran toprak altı kısmı ise üzerinde uyur gözler bulunduran toprak altı gövde (rizom) ve köklerden meydana gelmektedir (Eser ve ark., 2006). Bu rizomlar üzerinde bulunan aksiler tomurcuklar her yıl uyanarak yeni sürgünler oluştururlar. Bunların sürmesiyle de bitkinin toprak üzeri organlarını meydana gelir (Abak, 1987).

Toprak altı kısmı üzerinde yer alan tomurcukların meydana getirdiği yeni sürgünlerin -yani genç bitkilerin- üzerinde ilk 7-8 yaprak genellikle bütün ve düz yüzeyle olmakla birlikte, daha sonra oluşan yapraklar parçalı, girintili-çıkıntılı bir yapıya sahiptirler. Bu durum, "Violent de Provence" ve "Sakız" gibi bazı yerli ve yabancı çeşitlerde sık sık görülmektedir (Abak, 1987). Ancak enginarda yaprak yapısı ve çiçek tablası çeşit özelliğine göre de değişim göstermektedir. Bayrampaşa çeşidinde yapraklar parçalı iken, Sakız çeşidinde düz parçasız ve tüylü bir yapı gösterir (Vural ve ark., 2000). Bununla birlikte bazı çeşitlerde, düz ve parçalı yaprakları bir arada görmek mümkündür (Yalçın, 1992).

İlk dönemlerde sadece yapraklarından yararlanılan enginarın daha sonraları baş olarak adlandırılan kısmı da kullanılmaya başlanmıştır (Özen, 1999). Sebze olarak değerlendirilen baş kısmı, diğer bir ifadeyle, olgunlaşmamış çiçek topluluğu, çiçek tablası ve bundan çıkan brakte yapraklarının bir araya gelmesinden oluşur (Uğur, 2005). Enginarda baş; uzun, oval, yuvarlak ve basık şekilli olabilmektedir (Düzyaman and Ünver Düzyaman, 2005). Brakteler ise uzun-dar yada kısa-geniş olabildiği gibi uçları sivri, dikenli veya girintili olabilmektedir. Aslında *cynara* kelimesi de, braktelerin uçlarının şekli ve keskinliği nedeniyle köpek dişini andırmasından dolayı yunanca köpek anlamına gelen kelimeden; benzer şekilde *scolymus* kelimesi de, eski Yunanca'da diken anlamına gelen *scolus* kelimesinden türetilmiştir (www.slugsandsalal.com). Brakteler bazı çeşitlerde üst üste sıkıca kapalı durumda iken bazılarında oldukça gevşek yapıdadır. Bu durum başın sıkı veya gevşek yapıda olmasını da belirler. Baş rengi braktelerin dış yüzeyindeki antosiyan miktarı ile ilişkili olup mor renkli bölgeler her çeşit için karakteristiktir. Baş şekli ve rengi enginar kalitesinin belirlenmesindeki en önemli kriterler arasında kabul edilmektedir (Aubert et al., 1979; Marzi, 1981; Rossi and De Paoli, 1994; Özen, 1999).

Erselik çiçek yapısına sahip olan enginar bitkisinde çiçeklenme periyodu 50-60 gün sürmektedir. Bir çiçek tablası üzerinde 600-1200 çiçek bulunur (Uğur, 2005) ve çiçeklenme işlemi tablanın dış kısmından başlayıp merkeze doğru seyrederek 4-5 günde tamamlanmaktadır (Özen, 1999). Protandri gözlenen çiçeklenmede, polen ömrü 4 gün ile sınırlıdır; buna karşın stigma ancak 5 veya 6. günde alıcı konuma gelmektedir. Bu nedenle doğal olarak kendine döllenme zor olmaktadır ve pek sık görülmemektedir (Ryder et al., 1983). Enginar çiçekte kaldığı dönem içerisinde çiçek başına 0.250-0.720 mg şeker biriktirmekte ve bu nedenle

de çiçekler arılar için çok cazip olmaktadır. Bu çiçeklerden elde edilen bal 30-60 kg/ha arasında değişmektedir (Cirnu, 1988).

2.2. Enginarın Üretim Yöntemleri ile İlgili Çalışmalar

Abak (1987), heterozigot yapıya bağlı açılmaların gözlenmesi ve tohum elde etmede protandriye bağlı sorunların yaşanması nedeniyle enginarda generatif, yani tohumla üretimin oldukça sınırlı kaldığını belirtmektedir. Bu yüzden enginar bitkisinde halen en çok tercih edilen üretim şekli dip sürgünleri ile yapılan vegetatif üretimdir (De Vos, 1992). Bunun yanı sıra tohumla üretim, büyük ölçüde ıslah çalışmaları için istenen varyabiliteyi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak 1980'li yıllarda Avrupa ve Amerika'da bazı tohum firmalarının değişik amaçlara yönelik enginar tohumlarını piyasaya sürdükleri bilinmektedir (Uğur, 2005). Özellikle de genetik-erkek steril hatların çaprazlanması ile F₁ hibrid çeşitlerin elde edilmesinde tohumla üretim yöntemi büyük öneme sahiptir (Morison et al., 2000). Enginarın doğrudan tohumla üretimi son 10 yılda popüler olmaya başlamıştır. Tohumla üretilebilen çeşitler hasat kolaylığı sağlamasının yanı sıra yüksek verim gibi özellikler bakımından da ön plana çıkmaktadırlar. Bu çeşitler soğuk bölgelerde enginar üretimini mümkün kılmakta ve toprak kaynaklı hastalıkların taşınma riskini önlemektedir (Eser ve ark., 2006). Ancak tüm bunların yanında, Türkiye'de dahil olmak üzere birçok ülkede enginar, vegetatif yollarla üretilmekte ve bu durum halen büyük ölçüde geçerliliğini korumaktadır (Uğur, 2005).

Vegetatif üretimde kullanılan materyallere bakıldığında ise bunların; rizom, ovulil (yarı dormant dip sürgünleri), dip sürgünleri ve bu materyallerin köklendirme ortamlarında geliştirilmeleri ile elde edilen

köklü bitkicikler olmak üzere 4 grupta toplandığı görülmektedir (Özzambak ve Yoltaş, 1988; Eser ve ark., 2006). Ancak Rossi ve De Paoli (1994), vegetatif üretim materyali olarak kullanılmakla birlikte rizomların, yalnızca enginar plantasyonlarının bozulması sırasında elde edilebildikleri için yaygın olarak kullanılmadığını bildirmektedirler. Rizom ile üretim şekli ABD (Kaliforniya), Mısır ve Fransa'da (Ryder et al., 1983), dip sürgünlerinin köklendirilerek kullanımı Fransa ve İspanya'da, ovoliller ise daha çok İtalya'da tercih edilen üretim materyalleridir (Rossi and De Paoli, 1992; Eser ve ark., 2006). Türkiye'de ise vegetatif üretim materyali olarak büyük çoğunlukla dip sürgünleri kullanılmaktadır (Özzambak ve Yoltaş, 1988; Uğur, 2005).

Enginarın üretim yöntemleri üzerinde yapılmış olan pek çok çalışmada, farklı vegetatif üretim yöntemlerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajlarından karşılaştırmalı olarak söz edilmiş ve bunlarda üretimde karşılaşılan heterojen gelişim, köklendirmedeki güçlükler, aynı yıl verime yatmama gibi problemler üzerinde durulmuştur (Özen, 1999).

İtalya'da Basso (1974), en ideal üretim materyalini tespit etmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Söz konusu çalışmada farklı üretim materyallerinin bitki başına verim, baş sayısı ve ağırlığı yönünden değerlendirmeye alınmıştır. Araştırmacı, en iyi sonucun toprak altı gövdenin üst kısımlarındaki gözlerden oluşan ovolillerin kullanılması ile elde edildiğini kaydetmiş, ancak üretim materyalleri arasında erkencilik yönünden herhangi bir fark olmadığını belirtmiştir. Ancak Kaliforniya'da, üretim materyallerinin verime olan etkisini belirlemek amacı ile kurulan bir diğer denemede, dip sürgünü ile üretilmiş olan bitkilerin rizomla üretilenlere kıyasla daha yüksek verim sağladığı belirlenmiştir. Bu nedenle araştırmacılar, aynı üretim materyalinin farklı

bölgelerde farklı sonuçlar verebildiğini ve bunun büyük ölçüde ekolojiye bağımlı olduğunu ileri sürmektedir (Ryder et al., 1983).

Toprak altı gövdesi, yani rizom ile gerçekleştirilen bir çalışmada, yaz döneminde 2 cm'lik parçalara ayrılan gövdenin değişik kısımları köklendirmeye alınmıştır. Bu şekilde her anaç bitkiden, 3 aylık sürede dikime hazır hale gelen ve baharda verime yatacak olan ortalama 20 adet bitkinin elde edilmesi mümkün olmuştur (Vetrano et al., 2000).

Dip sürgünleri ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise Basnizki (1979), dip sürgünleri kullanılarak bitki başına ortalama 65 yeni bitki elde edilebildiğini fakat gelişim bakımından büyük oranda heterojenlik gözlemlendiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada, elde edilen bu bitkilerin generatif devreye geçmeye hazır oldukları ancak bunda, çevre şartlarının ve özellikle de sıcaklığın belirleyici etkisi olduğu belirtilmektedir.

Mısır'da ise toprak altı gövde parçaları ile yapılan üretimin dip sürgünlerine kıyasla daha iyi sonuç verdiği ve yaklaşık bir aylık bir erkencilik sağlandığı saptanmıştır. Ayrıca Mayıs ayında dikilen bitkilerin Haziran ve Temmuzda dikilenlere nazaran daha yüksek verim sağladığı da vurgulanmıştır (Abdel and Moustafa, 1976; Uğur'dan 2005).

2.3. Enginarın İn Vitro Üretimi ile İlgili Çalışmalar

Enginar bitkisi büyük ölçüde klasik vegetatif yöntemle üretilen bir bitkidir. Ancak bu üretim şeklinde çoğaltma katsayısı düşüktür ve materyal temininde büyük zorluklarla karşılaşmaktadır. Klasik vegetatif üretim ayrıca bir çok hastalığın taşınmasına da yol açmaktadır (Ancora, 1986; Rossi and De Paoli, 1994). Bu gibi nedenlerden dolayı enginar

üretiminde *in vitro*, yani doku kültürü ile çoğaltım tekniği önem taşımaktadır.

Doku kültürü kısaca, kontrollü laboratuvar koşullarında yeni bitkiciklerin elde edilmesidir. Bunun için, bitkilerden alınmış olan organ veya doku parçaları yüzey sterilizasyonu işleminden geçirilir ve aseptik koşullarda hazırlanmış olan besi ortamlarında kültüre alınır (Yalçın, 1992).

Enginarda *in vitro* çoğaltım çalışması ilk olarak Toponi (1960) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada başlangıç materyali olarak brakte dokuları kullanılmış ve bunlardan kallus üretimi ve farklı hormonlar kullanılarak hücrelerin çoğaltılması üzerinde durulmuştur. Ancak günümüzde doku kültüründe enginar üretimi üzerine yapılan çalışmalarda, başlangıç materyali olarak farklı doku ve organlar kullanılmaktadır. Elde edilen yeni dokular da, kullanılan başlangıç materyaline bağlı olarak değişim göstermektedir (çizelge 2.1). Bununla birlikte, birçok bitki türünde olduğu gibi enginarda da, en çok tercih edilen başlangıç materyali meristem dokusudur. Bu konuda ilk çalışma da Pena-Iglesias ve Ayuso tarafından 1974’de yapılmıştır (Özen, 1999).

De Leo ve Greco (1973) enginar bitkisinde doku kültürünün; ıslah çalışmaları, gen kaynağı materyallerinin kolay ve ucuz korunması ve hızlı bir şekilde bir-örnek bitki materyali elde etmek amacıyla kullanılmakta olduğunu belirtmektedir (Yalçın, 1992).

Çizelge 2.1 *İn vitro*'da kültüre alınan farklı enginar eksplantları ve elde edilen dokular.

Eksplant tipi	Rejenerasyon	Kaynak
Brakte	Kallus	Toponi, 1960
Yaprak parçaları	Kallus	Harbaoui, 1982
Çiçek tablası	Kallus – çiçek gelişimi	Ancora et al., 1979
Çiçek tablası	Kallus ve yan sürgünler	Morone-F. et al., 1979 Harbaoui, 1982 Devos et al., 1975
Çiçek gövdesi	Kallus – embriyoid	Scaromella and Ricci, 1979
Rizom dokusu	Sürgün ve kök	Scaromella and Ricci, 1979
Kotiledon	Kallus – kök – yeşil globüler yapı	De Leo and Greco, 1973
Tohum	Sürgün gelişimi ve çoğalma	De Leo and Greco, 1973
Meristem	Sürgün gelişimi ve çoğalma	Pena et al., 1974

Yalçın, 1992

2.4. *In Vitro* Üretimde Karşılaşılan Problemler ile İlgili Çalışmalar

Doku kültürü yöntemi üretimde pek çok avantaj sağlamaktadır. Ancak bu, uygulama aşamasında bir takım problemleri de beraberinde getiren bir sistemdir. Enginar üzerinde yapılan doku kültürü ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, başlangıç aşamasında karşılaşılan iki ana problem dikkati çekmektedir. Bunlardan ilki, farklı mikroorganizmalarla bulaşık başlangıç materyalinden kaynaklanan enfeksiyon gelişimi (Ancora, 1986; Özen, 1999), diğeri de fenolik bileşiklerin oksitlenmesi ile oluşan doku kararmalarıdır (Moncousin, 1981; Pecaut, 1983; Ancora, 1986; E. Rugini, 2006, yazılı görüşme).

2.4.1. Enfeksiyon problemine ilişkin çalışmalar

Doku kültüründe karşılaşılan enfeksiyonların çoğu endofitik bakterilerden ya da yüzey dezenfeksiyonuna dayanıklı olan mikroorganizmalarla bulaşık olan başlangıç materyallerinden kaynaklanmaktadır (Cassells, 2001). Bir çok araştırmacı, yaptıkları doku kültürü çalışmalarında gözlemledikleri tüm bakteri türlerinin, diğer çalışmalarda en çok karşılaşılan bakteri türleri ile uyumlu olduğunu belirterek, bunların gram-negatif bakteriler olduğunu kaydetmişleridir (Peñalver et al., 1994; Brunner et al., 1995; Buckley et al., 1995). Doku kültürü çalışmalarında gözlemlenen Gram-negatif bakteriler daha çok başlangıç safhasında ortaya çıkarken, Gram-pozitif bakteriler genellikle doku kültürünün alt kültürle birlikte ilerleyen safhalarında görülmektedir (Leifert and Waites, 1992; Leifert and Cassells, 2001).

E. agglomerans gibi enterobakteriler ve *P. fluorescens* gibi florasan pseudomonadlar tarla koşullarında yetişen ve/veya mikro üretimi yapılan (örn. *Delphinium*, *Gerbera*, *Hosta*, *Iris* (Leifert et al., 1989), *Galega orientalis* Lam. (Valkonen et al., 1993), *Cynara scolymus* L. (Peñalver et al., 1994) ve *Mentha* (Buckley et al., 1995) gibi) pek çok bitkiden izole edilebilmektedir. Yapılan pek çok çalışmada bu bakterilerin vasküler sistemde koloni oluşturdıkları (örn. Gardner et al., 1982; van Doorn et al., 1991; Whitesides and Spotts 1991; Valkonen et al., 1993) ve taşınabildikleri (Whitesides and Spotts 1991) gösterilmiştir.

Enginarda kullanılan dip sürgünleri toprakta olduğu için önemli ölçüde mantar ve bakteriler ile bulaşmıştır. Bu nedenle araştırmacılar sürgün ucunun ne kadar iyi korunursa korunsun bulaşık olma riski olduğunun altını çizmektedir (Harbaoui, 1982; Özen'den, 1999). Doku kültürüne alınacak olan enginarın sterilizasyonunun büyük önem taşımmasının nedeni budur (Ancora, 1986).

Fungal bulaşmalar tarla koşullarından alınan diğer türlerde de sorunlar yaratmaktadır. Örneğin Liesebach ve Naujoks (2004), söğüt üzerine gerçekleştirdikleri çalışmalarında fungal bulaşmaların (genus *Melampsora*) ciddi problem oluşturduğunu belirtmekte ve bu nedenle örneklerin sterilizasyon işleminden önce % 0.2'lik Euparen (fungusit, Bayer, 50% dichlorfluanide, w/v), ardından da 2 dakika süre ile yıkamaya tabi tutulmaları gerektiğini bildirmektedirler. Yine Koubouris ve Vasilakakis (2005) benzer şekilde kayısı bitkisinde başlangıç materyali olarak tomurcukların kullanıldığı ve farklı sterilizasyon prosedürlerinin denendiği çalışmalarında sterilizasyon işlemlerinden önce tomurcukların 10 dakika süreyle % 1'lik Neotoxin (fungusit) çözeltisinde bekletildiğini belirtmişlerdir.

Josekutty ve arkadaşları (2003) muz bitkisi üzerine gerçekleştirdikleri çalışmalarında, *in vitro*'da % 90 enfeksiyon oranını ile karşılaştıklarını, örneklerin alındığı bahçede düzenli pestisit kullanımı ile de bu oranı % 50'lere kadar düşürebildiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Hamil ve arkadaşlarının (1993) bahçede pestisit ve fungusit kullanılmaması halinde *in vitro* koşullarda yoğun olarak bakteri ve mantar gelişimi gözlemledikleri de belirtilmektedir.

Özen (1999)'in bildirdiğine göre *in vitro* kültürde sterilizasyon amacıyla en sık kullanılan maddeler şunlardır;

- Cıva klorür (HgCl_2) (Chaturverdi et al., 1978).
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Barnes, 1979).
- Brominli su (Brondi and Thorpe, 1981).
- Kalsiyum hipoklorit (CaOCl) (Vural, 1977; Abak and Dumas de Vault, 1980; Fordham and Stimart, 1982)
- Sodyum hipoklorit (NaOCl) (Hesegava, 1979; Smith and Nightingale, 1979; Kunisaki, 1980; Mayer, 1980; Özzambak, 1986; Cossio and Bussi, 1983; Paola et al., 1987)
- Kalsiyum hipoklorit % 5 ve Cıva klorür 5 g l^{-1} karışımı (Pecaut et al., 1983).
- Gümüş nitrat (AgNO_3) (Cambell and Tomes, 1984).

Pratikte ise en çok % 0.5'lik NaOCl, bitki türü ve dokuya göre 5 ila 20 dakika arasında değişen sürelerde kullanılmaktadır (Özen, 1999).

Altı aylık enginar fidelerinden alınan sürgün uçlarının, sterilizasyon işleminde öncelikle benomil çözeltisi ve ardından sodyum hipoklorit çözeltisiyle muamele edildiğinde mikro üretimin başarısının % 75 olduğu ifade edilmektedir (Moncousin, 1981). Pecaut ve arkadaşları (1983) ise, meristem kültürü ile virüsten arındırılmış enginar klonu elde etmeye yönelik yaptıkları çalışmalarında, sürgün uçlarını sırasıyla % 70'lik etil alkolde 5 dakika, mercury lauryle'de 5 dakika ve kalsiyum hipoklorit'te 10 dakika bekleterek dezenfekte ettiklerini bildirmişlerdir.

Rossi ve De Paoli (1994) *in vitro* enginar üretiminde sterilizasyon amacıyla etil alkol, cıva klorür ve kalsiyum hipoklorit gibi pek çok kimyasalın kullanılabildiğini ifade etmektedirler. Araştırmacılar ayrıca, dış yaprakları temizlenmiş 2-3 cm'lik sürgünlerin 20 dakika % 2-3'lük sodyum hipokloritle yıkanmasıyla % 40-50 oranında temiz sürgünler elde etmenin mümkün olduğunu bildirmektedirler. Bunun yanında kararmayı önlemek amacıyla durulama suyuna 100 mg l⁻¹ sitrik asit veya askorbik asit ilave edildiğini de belirtmişlerdir.

Başlangıç materyali olarak *Cynara scolymus* L. cv. Early French varyetesinin ilk bahar sürgünlerinin kullanıldığı bir çalışmada, sürgün uçları önce 5 dakika süreyle 5 g l⁻¹ cıva klorür, ardından da 10 dakika süreyle 1 g l⁻¹ AC ilave edilmiş % 17'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilmişlerdir. Bu işlemlerin ardından sürgün uçları kararmayı önlemek için 150 mg l⁻¹ sitrik asit ve 100 mg l⁻¹ askorbik asit içeren ortamda kültüre alınmıştır. Uygulanan bu işlemlerle araştırmacılar % 75 oranında, okside olmamış temiz bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir (Brutti et al., 1999).

Cynara scolymus L. cv. El-Balady sürgünleriyle gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise araştırmacılar en etkin sterilizasyonun sırasıyla kullanılan % 70 etanol, % 1.5 sodyum hipoklorit, streptomycin ve gentamycin (her biri 50 mg l⁻¹) ile sağlandığını bildirmektedir (Alphonse et al., 2002).

Kullanılan farklı kimyasalların yanında, enfeksiyon oranının yüksek seyrettiği çalışmalarda, örnekler sterilizasyon ve kesim işleminden sonra daha düşük dozlarda ikinci bir sterilizasyon işlemine daha tabi tutulabilmektedirler. Örneğin Josekutty ve arkadaşları (2003) muz bitkisi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, tek aşamalı sterilizasyonda % 50 olan enfeksiyon oranını iki aşamalı (kademeli) sterilizasyon ile % 8-10'a kadar düşürebildiklerini bildirmektedir. Benzer şekilde Ajayi ve arkadaşları (2006) kabak bitkisi üzerine yürüttükleri çalışmalarında yoğun enfeksiyon gelişimi nedeni ile sterilizasyon işlemini üç aşamada gerçekleştirdiklerini belirtmektedirler.

Bakteri kaynaklı enfeksiyonlara karşı sıkça başvurulmuş çözüm yollarından biri de besi ortamına antibiyotik ilave edilmesidir. Ancak antibiyotik kullanımı her *in vitro* çalışması için elverişli değildir. Zira yapılan çalışmalar antibiyotiğin özellikle protoplast gibi hassas materyaller üzerinde fitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir (Pollock et al., 1983; Keskitalo, 1999). Ancak araştırmacılar, penicilinle 6 türevi olan ampicilline ve carbenecilline'in çok yüksek dozlarda bile yalnızca bakteri çeperine etki ettiğini, bitkiye herhangi bir zararının olmamasının yanında hormon benzeri bir etki yaparak bitki büyümesini stimüle edici etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Pollock et al., 1983). Yapılan diğer çalışmalarda söz konusu antibiyotiklerin sitokinin (Santos and Salema, 1989) ve oksin (Holford and Newbury, 1992) sentezini arttırdığı da belirtilmektedir.

Benzer şekilde, Keskitalo (1999) gentamicin, rifampicin, cefotaxime ve bunların kombinasyonlarını kullandığı (genus *Tanacetum*) protoplast füzyonu çalışmasında, gram-negatif bakteriler üzerine başarılı sonuçlar elde edildiğini bildirmiştir. Ancak bu durumda bitki gelişiminin olumsuz etkilendiğini, bunun kullanılan antibiyotikle birlikte genotipe bağlı olarak da değiştiğini belirterek “gentamicin”in diğerlerine nazaran daha fazla vitrifiye edici ve gelişmeyi yavaşlatıcı etkisi olduğunu da sözlerine eklemektedirler.

Orlikowska (1997) ise çalışmasında, ortama gümüş nitrat ilave edilmesinin enfeksiyonlara karşı başarılı sonuç verdiğini belirterek, 100 mg l⁻¹ gümüş nitratin üç hafta süre ile bakteri faaliyetlerini önlediğini bildirmektedir. Aynı araştırmacı gümüş nitrat kullanımında antibiyotik aksine fitotoksit etkinin oluşmadığını, ancak gümüş nitratin etkisini yitirdiği üçüncü hafta sonunda bitki gelişimine bağlı olarak antibiyotik kullanılabileceğini belirtmiştir.

Tüm bunlarla birlikte, bitkileri steril hale getirebilmek için kullanılan kimyasalların yanında cihazlara da başvurulabilmektedir. Keza, Duckhouse ve arkadaşları (2004) sterilizasyon işleminde ultrason ve hipoklorit kullanımı üzerine gerçekleştirdikleri çalışmalarında, bakterileri öldürmek için ultrasonun tek başına yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak farklı uygulama yöntemlerinin denendiği çalışmada en uygun ultrason kullanım şeklinin hipoklorit uygulamasından hemen önce olduğu araştırmacılar tarafından not edilmiştir.

2.4.2. Kararma problemine ilişkin çalışmalar

Ekonomik öneme sahip bitkilerin *in vitro* kültürlerinde karşılaşılan ana problemlerden biri de dokuların kahverengileşmesi veya kararmasıdır (Block and Lankes, 1995; Keskitalo, 1999; Titov et al., 2006). Hücrelerin zarar görmesiyle birlikte fenolik bileşikler kolaylıkla oksitlenebilmektedir. Okside olan fenolikler enzim aktivitesini yavaşlatarak ortamın kararmasına ve ardından bitkinin kahverengileşerek ölmesine neden olmaktadır (Compton et al., 1986; Laukkanen et al., 1999).

Keskitalo (1999) yapılan pek çok çalışmada, bazı dış faktörlerin kararma gibi stres semptomlarını tetiklediğinin altını çizerek, bu faktörlerin patojenler (Jin et al., 1996), bazı durumlarda agar (El-Hadrami et al., 1993), ortama ilave edilen makro tuzlar (Choi et al., 1998), oksinler (Baker and Wetzstein, 1994; Mohamed and Jayabalan, 1996) ve şeker (Rout and Das, 1994; Curtis and Shetty, 1996) olabileceğini bildirmiştir.

Wang ve arkadaşları (1994) elma bitkisi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında kasım–şubat periyodunda alınan örneklerin nisan–ağustos döneminde alınanlara nazaran daha az kararmaya uğradığını saptayarak bitkinin gelişme döneminin de kararma üzerine etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Fenol bileşiklerin aktivitesini azaltmak için sıvı ortam kullanılabilir. Buna ek olarak, sık sık alt kültür yapılması veya ortama sitrik asit, askorbik asit, polyvinyl pyrolidone (PVP) veya aktif karbon (AC) gibi maddelerin ilave edilmesi ile fenoliklerin okside

olmasını azaltmak ve eksplantın gelişimine katkıda bulunmak mümkündür (Toth et al., 1994).

Ayrıca eksplantları karanlıkta bırakmak, sıcak veya soğuk ile muamele etmekte kararmayı önlemek için kullanılan en etkin uygulamalardır (Dalal et al., 1993; Block and Lankes, 1996). Kültüre alma işleminin düşük yoğunlukta ışıktaki gerçekleştirilmesi de benzer bir etki yaratmaktadır (Phoplonker and Caligari, 1993; Prathanturatug et al., 1996).

Bunların yanında, Keskitalo (1999)'nun bildirdiğine göre, azot kaynağı olarak kullanılan nitrat (Bergmann et al., 1997) ve fenolikleri absorbe etmek için kullanılan rest ve sistin (Pindel and Miczynski, 1996; Prathanturatug et al., 1996) de kararmayı azaltma veya ortadan kaldırma bakımından iyi sonuç vermektedir.

Zhu ve arkadaşları (1996) Japonya'da *Vitis vinifera* L. cv. Koshusanjaku protoplast kültürü çalışmalarında örneklerin sağlıklı bir şekilde gelişim gösterebilmesi için kültür ortamına başlangıç aşamasından itibaren fenolik bileşikler absorbe etmek amacıyla % 0.3 (w/v) oranında aktif karbon (AC) ilave edilmesinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde farklı biber türleri üzerine yürütülen ve minimum kararma oranını tespit etmeye yönelik çalışmalarında Madhusudhanan ve Rahiman (2000) en iyi sonucun 200 mg dm⁻³ konsantrasyonda AC'nin ortama ilave edilmesiyle elde edildiğini not etmektedir.

İleri boyutta kararma problemi ile karşılaşılacak muz bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, explantlar sterilizasyon işleminden sonra 15 dakika süreyle steril olarak kullanılan antioksidan ve fenolik bileşikler

absorbe edici maddelerde bekletilerek karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Antioksidan olarak sitrik asit, askorbik asit ve sistin (0, 25, 50 ve 100 mg l⁻¹), absorbent olarak da PVP (0, 100, 500 ve 1000 mg l⁻¹). kullanılan çalışmada en etkin sonuç, 500mg l⁻¹ PVP kullanımı ile elde edilmiştir (Figueiredo et al., 2000).

Muzda yapılan farklı bir çalışmada ise Titov ve arkadaşları (2006) kararmayı önlemek için örneklerin kesim işlemini de antioksidan çözeltiler içersinde gerçekleştirmişlerdir. Bunun için % 0.125'lik potasyum sitrat ve sitrat (K-C: C oranı 4:1), 0.25 g l⁻¹ askorbik asit ve 0.02 g l⁻¹ L-sistin'in farklı kombinasyonlarından oluşan çözeltiler kullanılmış ve örnekler karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Buna göre, araştırmacılar en iyi sonucun potasyum sitrat ve sitrat ile elde edildiğini bildirmektedirler.

Farklı *in vitro* kültür koşullarının enginar ve gül bitkileri üzerine olan etkisinin konu alındığı bir çalışmada, değişik kültür koşullarının tamamında enginar bitkisi için kararmayı önlemek amacıyla standart MS ortamına 10 mg l⁻¹ askorbik asit ilave edildiği bildirilmiştir (Schneider, 2005).

Yalçın (1992), doku kültürü koşullarında enginarın köklenmesi üzerine yürüttüğü çalışmasında, eksplantların sterilizasyon işleminden sonra filtre ile steril edilmiş askorbik asit içerisinde çalkalanarak kararmalarının önüne geçildiğini belirtmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

Tez kapsamında yapılan çalışmalar, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü bahçeleri ve doku kültürü laboratuvarında, 2006-2007 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmalarda materyal olarak, fakültenin Bahçe Bitkileri Bölümü bahçesinde, 2000 yılında kurulmuş olan koleksiyon parselinde bulunan Sakız tipine ait enginar klonları kullanılmıştır. Bitkilere 7 Ağustos 2006'da uyandırma suyu verilmiş ve bundan sonra da düzenli bir şekilde kültürel işlemler uygulanmıştır (Eser ve ark., 2006). Bu şekilde bitkilerden yaklaşık bir yıl süreyle çalışmada kullanılacak sağlıklı dip sürgünleri elde etme imkânı sağlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Besi ortamlarının hazırlanması

Araştırmada süresince, MS ortamı esas alınarak hazırlanmış besi ortamları kullanılmıştır (Murashige and Skoog, 1962). Ancak standart MS ortamında bulunması gereken 'glycine' otoklavda büyük ölçüde parçalandığı için, ortama 500 mg l⁻¹ kazein hidrolizat ilave edilerek (Reustle and Ingeborg, 1994) ortam modifiye edilmiştir (çizelge 3.1). Ayrıca sürgün gelişimini teşvik etmek için tüm ortamlara 1.0 mg l⁻¹ BA ilave edilmiştir (Iapichino, 1996).

Çizelge 3.1 Denemelerde Kullanılan Standart Besi Ortamı Bileşenleri

Bileşik	Formülü	Miktarı	
Amonyum nitrat	NH_4NO_3	1650	mg l^{-1}
Potasyum nitrat	KNO_3	1900	mg l^{-1}
Kalsiyum klorid 2-hidrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	mg l^{-1}
Magnezyum sülfat 7-hidrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	mg l^{-1}
Potasyum fosfat	KH_2PO_4	170	mg l^{-1}
Borik asit	H_3BO_3	6.200	mg l^{-1}
Mangan sülfat 4-hidrat	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300	mg l^{-1}
Çinko sülfat 7-hidrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	mg l^{-1}
Potasyum iyodür	KI	0.830	mg l^{-1}
Sodyum molibdat 2-hidrat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	mg l^{-1}
Bakır sülfat 5-hidrat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	mg l^{-1}
Kobalt klorid 6-hidrat	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	mg l^{-1}
NaFe EDTA		170	mg l^{-1}
Demir Sülfat 7-hidrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800	mg l^{-1}
Thiamin		0.100	mg l^{-1}
Nicotinic asit		0.500	mg l^{-1}
Pridoksin		0.400	mg l^{-1}
Kazein hidrolizat		500	mg l^{-1}
Myo-inositol		100	mg l^{-1}
N^6 -benzylaminopurine		1.0	mg l^{-1}
Sakaroz		20	g l^{-1}
Ph		5.8	

Bu anlatılanlara ek olarak MS ortamları farklı denemelerde ihtiyaca göre modifiye edilmiştir. Bunlar, '3.2.3. Denemelerin kurulması' bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

MS besi ortamı hazırlanırken ölçümdeki hata payını en aza indirmek için, kullanılacak olan maddeler derişimlerine göre, 10× veya 100×'lik stok solüsyonlar olarak hazırlanmıştır. Buzdolabında +4°C'de muhafaza edilen stoklar ortam hazırlama işleminde, oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılmış, bundan sonra da tekrar +4°C'de saklanmıştır. Olası bozulmalara karşı stoklar, hazırlandıktan kısa süre içerisinde kullanımına özen gösterilmiştir.

Ortamların ph'sı ilave edilecek tüm maddeler eklendikten sonra 1 ve 0.1 N potasyum hidroksit ve sitrik asit kullanılarak 5.8 olarak ayarlanmıştır (Keskitalo, 1999; Figueiredo, 2000; Puchooa, 2004; Schneider, 2005).

Kullanım kolaylığı sağlaması bakımından çalışmalarda 200 ml'lik cam kavanozlar tercih edilmiştir. Gelişmesi muhtemel enfeksiyonların daha çabuk göstermesi için tüm çalışmalarda sıvı ortam kullanılmıştır. Dikilen sürgün uçlarının ortamla temasını optimum düzeyde tutmak için sterilizasyon işleminden önce kavanozların içerisine pamuk destekler yerleştirilmiştir (Keskitalo, 1999). Hazırlanan ortamlar cam kavanozlara konmuş ve 30-35 ml ortam içeren kavanozlar hava almayacak şekilde kapatılarak, otoklavda 121°C'de 20 dakika bekletilmek suretiyle steril hale getirilmişlerdir (Bhatt and Dhar, 2004).

Bazı denemelerde ortama ilave edilen antibiyotik (rifampicin) gibi maddelerin (bkz. '3.2.3. Denemelerin kurulması') yüksek sıcaklıkta parçalandığı bilinmektedir. Bu nedenle söz konusu maddeler, ortam

sterilize edildikten sonra steril filtreden geçirilerek ortama verilmiştir (Thomas, 2004; Koubouris and Vasilakakis, 2005). Ortama bu şekilde ilave edilen maddelerin ortam pH'sını ne düzeyde değiştirdiği bir ön çalışmayla saptanmış ve sterilizasyon öncesi pH değeri bu değişim dikkate alınarak ayarlanmıştır.

Sterilizasyon işleminden sonra ortamlar oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Ancak ortamlar, gümüş nitrat gibi ışıktan zarar görerek parçalandığı bilinen maddeler ihtiva ettikleri durumda (bkz. 3.2.3. Denemelerin kurulması), kullanım öncesinde karanlık koşullarda saklanmışlardır.

3.2.2. Sürgünlerin hazırlanması

Çalışma süresince kullanılan sürgünler en fazla iki gün önce doğrudan bahçe koşullarından alınmışlar ve fazla yaprak ve kök parçaları temizlendikten sonra nemlendirilmiş kurutma kağıdına sarılarak +4°C'de muhafaza edilmişlerdir (şekil 3.1 ve 3.2).

Sterilizasyon aşamasından önce tüm denemelerde ortak olarak;

- Fazla yaprakları ve kökleri temizleme
- Anti bakteriyel sabunla yıkma
- 6-8 saat süre ile akmakta olan çeşme suyunda bekletme

prosedürü izlenmiştir (Özen, 1999).

Şekil 3.1 sürgünlerin bahçe koşullarında görünümü.



Şekil 3.2 Ön temizlik sonrası sürgünler.



Şekil 3.3 Sürgünlerin sterilizasyon öncesi görünümü.



Sürgünler sterilizasyon öncesi şekil 3.3'deki gibi hazırlanmışlardır. Su ile yıkama işleminden sonra kurularan sürgünler steril kabine alınarak her deneme için değişen dozlarda ve sürelerde çeşitli sterilizant maddelerle sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır (bkz. 3.2.3. Denemelerin kurulması). Çalışmada yer alan tüm sterilizasyon prosedürlerine, sürgün uçlarının öncelikle 20 saniye süreyle % 70'lik etil alkolde ıslatılması işlemi ile başlanmıştır (Ancora et al., 1981).

3.2.3. Denemelerin kurulması

Enfeksiyon ve kararma problemlerini çözmeye yönelik etkin bir yöntemin ortaya konabilmesi için farklı prosedürler izlenmiştir. Bu nedenle çalışma süresince birbirinden bağımsız denemeler kurulmuş ve bu denemeler ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır. **Her deneme sonucunda elde edilen olumlu bulgular bir sonraki denemenin kurulumunda kullanılmıştır.** Çalışmada kurulan denemeler aşağıda sırasıyla yer almaktadır.

3.2.3.1. Deneme 1: Dikim öncesi farklı sterilizasyon ajanlarının uygulanması

Çalışmada öncelikle, dikim öncesi sterilizasyon yapılması amacıyla değişik ajanların etkinliği araştırılmıştır. Kurulan bu deneme uygulanan sterilizasyon işlemi ayrıca, fungusit uygulamaları (Moncousin, 1981; Koubouris and Vasilakakis, 2005; Schneider, 2005) ve karanlıkta bekletme (karanlık / aydınlık uygulaması) ile kombine edilmiştir (Wang et al., 1994).

Toplam 165 örnekle kurulan denemede, fungisidin etkinliğini belirlemek için alkolle ıslatma işleminden sonra kullanılan örneklerin yarısı, % 6'lık Captan (etkin madde: % 50 Captan) çözeltisinde 10 dakika süre ile bekletilmiş, diğer yarısı ise Captan uygulaması görmemiştir. Bundan sonra, farklı sterilizant maddelerin kıyaslanması amacıyla Captan uygulaması gören ve görmeyen sürgün uçları ayrı ayrı üç gruba bölünmüş ve her bitki grubu farklı maddelerle sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada sürgün uçları, her biri % 0.5'lik

konsantrasyonda hazırlanmış olan Huwa-san® TR-50 (bundan sonra Huwasan olarak anılacaktır) (litrede 570g H₂O₂ + 0,36g kolloit gümüş) sodyum hipoklorit (NaOCl) veya hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltilerinden biri ile 10 dakika süreyle sterilizasyona tabi tutulmuşlardır (Barnes, 1979; Meyer, 1980; Özen'den, 1999; H. Türküsay, 2006, sözlü görüşme).

Sterilizasyon sonrası sürgün uçları, üç kez steril saf su ile durulanmış ve fazla yaprakları meristem +1 yaprak kalacak şekilde kesilmiştir. MS ortamına dikilen örneklerin, kavanozların streç film ile kapatılmasıyla, dış ortamla ilişkileri kesilmiştir. Aynı çalışma içerisinde ışığın kararma üzerine olan etkisini de tespit etmek amacıyla, farklı uygulamalar gören örneklerin yarısı kültür odasının karanlık bölümüne, diğer yarısı ise 2300-2500 lüks ışık intensitesi olan bölümüne alınmışlardır. Karanlık koşullara alınan örnekler burada 2 gün bekletildikten sonra ışıklı koşullara alınmışlardır (Wang et al., 1994).

3.2.3.2. **Deneme 2: Sterilizasyon ajanlarının doğrudan ortama ilavesi**

Bu denemde toplam 87 örnek yer almıştır. Yukarıda sözü edilen 'Deneme 1: Dikim öncesi farklı sterilizasyon ajanlarının uygulanması'den en iyi sonuç veren uygulamalar seçilerek çalışmalara devam edilmiştir. Bu nedenle tüm sürgün uçları etil alkolde ısıtma işleminden sonra sırasıyla, % 6'lık Captan ve % 0.5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 10'ar dakika bekletilerek sterilize edilmişlerdir.

Bundan sonra sürgün uçları her grupta yaklaşık 20 sürgün ucunun bulunduğu 4 eşit gruba ayrılmışlardır. Örneklerin 1/4'ü 2.5 ppm sodyum hipoklorit (Teixeira et al., 2006), 1/4'ü 2.5 ppm Huwasan (H. Türküsay,

2006, sözlü görüşme), 1/4'ü 30 mg l⁻¹ rifampicin (Keskitalo, 1999) ve son 1/4'ü de 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat (Orlikowska, 1997) içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bir önceki denemede (deneme 1) iyi sonuç vermesinden ötürü kültüre alınan tüm örnekler ilk iki gün boyunca karanlıkta bekletilmişlerdir.

Şekil 3.4. Farklı ortamlarda gelişimlerini sürdüren örnekler.



3.2.3.3. **Deneme 3:** Farklı sterilizasyon sürelerinin denenmesi

Ortalama sodyum hipoklorit dozu ve uygulama süresini tespit etmek için 60 örnek ile bir ön deneme kurulmuştur. Söz konusu denemede örnekler 3 veya 5 dakika sürelerle sodyum hipokloritte (% 0.5) sterilize edilmiş ve daha sonra normal MS ortamına dikilmişlerdir. Buradan elde edilen sonuçlar neticesinde denemede daha yüksek dozda ve daha uzun süreli sodyum hipoklorit uygulamalarının yapılmasına karar verilmiştir.

Optimum sterilizant dozu ve uygulama süresini tespit etmek için kurulan esas denemede toplam 100 örnek yer almıştır. Öncelikle tüm örnekler alkolle ıslatılmış ve deneme 1'deki gibi % 6'lık Captan'da 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 4 eşit gruba ayrılan örnekler, ön denemeye nazaran daha yüksek oranda (% 2.5) aktif klor içeren sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 5, 10, 15 ve 20 dakikayla değişen sürelerde sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Bundan sonra örnekler, 500 mg l⁻¹ ampicilin içeren steril su ile durulanmıştır (Leifert and Cassells, 2001). Fazla yaprakları uzaklaştırılan örnekler 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat (deneme 2'den elde edilen son bulgular) içeren MS ortamına dikilmişlerdir (Orlikowska, 1997). Örnekler son olarak deneme 1'deki gibi kültüre alma işleminin ilk iki gününde karanlıkta bekletilmişlerdir.

Aynı prosedür, sadece 15 ve 20 dakikalık sodyum hipoklorit (% 2.5 aktif klorür) uygulamaları ile tekrar edilmiştir. Bu tekrarda 60 örnek yer almış ve örnekler sterilizasyon sonucunda, gümüş nitrat içermeyen MS ortamında kültüre alınmışlardır.

3.2.3.4. **Deneme 4: Kademeli sterilizasyon uygulaması**

Kademeli sterilizasyon, sterilizasyonu güç olan bitkilerde kullanılacak olan sterilizant maddenin iki yada daha fazla aşamada uygulanması işlemidir (Josekutty et al., 2003; Ajayi et al., 2006).

Bu yöntemin uygulanabilmesi için toplam 96 bitkiciğin yer aldığı bir deneme (Deneme 4) kurulmuştur. Bu amaçla örnekler öncelikle yine alkolde ıslatıldıktan ve Captan (% 6'lık Captanda 10 dakika; deneme 1) uygulaması gördükten sonra 4 eşit gruba ayrılmışlar ve grupların her biri; 5, 10, 15 veya 20 dakika sürelerle (deneme 3'den elde edilen son bulgular) % 2.5'lik sodyum hipoklorit (deneme 1) çözeltisinde bekletilmişlerdir. Bu sterilizasyonun birinci kademesidir. Bundan sonra saf su ile durulanan örnekler, meristem +2 veya meristem +3 yaprak kalacak şekilde kesilmişler ve sterilizasyonun ikinci kademesi olan % 0.5 derişimde sodyum hipokloritte 3 dakika daha bekletilmişlerdir (Josekutty et al., 2003; Ajayi et al., 2006). Sterilizasyonun bu ikinci kademesi için süre tüm örnekler için aynıdır.

Sterilizasyon işleminin ardından 500 mg l⁻¹ ampicilin içeren steril suda 3 kez durulanan örneklerin, son olarak 1 veya 2 yaprağın daha kesilmesiyle dikime hazır hale getirilmişlerdir. Örneklerin tümü 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat (deneme 2) ilave edilmiş MS ortamlarına dikilerek kültüre alınmalarının ilk iki günü karanlık koşullarda bekletilmişlerdir (deneme 1).

3.2.3.5. **Deneme 5: Ultrason kullanımı**

Elde edilen steril bitki oranını arttırmak için düzenlenen bu demede sterilizasyon işlemine başlanmadan önce örnekler ultrason cihazında yüksek frekanslı ses dalgalarına maruz bırakılmışlardır (Duckhouse et al, 2004). Bu işlem için 30 W güçte çalışan ve 40 KHz frekansında ses dalgaları üreten (Kada marka) bir ultrason cihazı kullanılmıştır.

Toplam 50 bitkiciğin yer aldığı denemede, ön temizliği yapılan sürgünler saf su içerisinde kavanozla, yine saf su ile doldurulmuş ultrason cihazına yerleştirilmişleridir. Toplam 3 eşit gruba bölünen örnekler 3, 5 veya 10 dakika sürelerle ile ultrasondan geçirilmişlerdir (Duckhouse et al, 2004).

Bu işlemden sonra steril kabine alınan örnekler yine rutin olarak tüm denemelerdeki gibi alkolle ıslatılmışlar ve % 6'lık dozda ve 10 dakika süreyle Captan solusyonunda bekletilmişlerdir (deneme 1). Bundan sonra örneklerin tümü, önce 15 dakika % 2.5'luk sodyum hipoklorit (deneme 1 ve deneme 3) ve dış yaprakları kesildikten sonra da 3 dakika % 0.5'lik sodyum hipoklorit kombinasyonu ile kademeli sterilizasyon işlemine tabi tutularak steril hale getirilmişlerdir (deneme 4'den elde edilen son bulgular).

500 mg l⁻¹ ampiciline ilave edilmiş steril suda 3 kez durulanan sürgünler, meristem +1 yaprak kalacak şekilde kesildikten sonra 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat (deneme 2) ilave edilmiş MS ortamına dikilmişlerdir. Örnekler kültürlerinin ilk iki gününü yine karanlık koşullarda geçirmişlerdir (deneme 1).

Deneme sonucunda bazı parsellerde hiç enfeksiyon gelişimi gözlenmemesi nedeniyle buna ek olarak sadece 5 ve 10 dakikalık ultrason kullanımı ile ikinci bir deneme daha kurulmuştur. Aynı sterilizasyon prosedürünün izlendiği bu ilave denemede gümüş nitrat ilave edilmemiş MS ortamları kullanılmıştır. Bu şekilde olası bakteri gelişimine izin verilerek, sterilizasyon prosedürünün ve buna bağlı ultrason kullanımının etkinliği net olarak ortaya konmuştur.

3.2.3.6. **Deneme 6: Ortama ilave edilen fenol tutucu maddelerin doku kararması üzerine etkileri**

Fenol tutucu maddelerin doku kararması üzerine olan etkinliklerini gözlemlemek için denemde kullanılan MS ortamına farklı fenol tutucu maddeler ilave edilmiştir. Bununla birlikte ortamlarda gümüş nitrat (deneme 2) kullanımına devam edilmiştir. Denemede kullanılan örnekler alkol ve fungusit uygulamalarının (deneme 1) yanı sıra, 15+3 dakika kademeli sterilizasyon prosedürü (deneme 4) izlenerek steril hale getirilmişlerdir.

186 örneğin yer aldığı denemede sürgün uçları sterilizasyon işleminden sonra 4 gruba ayrılarak (ort. 46 bitki/grup) farklı ortamlara dikilmişlerdir. Çalışmada kullanılan ortamlara, ortam sterilizasyonundan önce, 2 g l⁻¹ ve 4 g l⁻¹ polyvinyl pyrolidone (PVP) (Toth et al., 1994; Bhatt and Dhar, 2004) ile 2 g l⁻¹ aktif karbon (AC) (Zhu et al., 1996; Liesebach and Naujoks, 2004) ilave edilmiştir. Bunların yanında ortama ilave edilen maddelerin etkinliğinin açıkça görülebilmesi için örneklerin bir bölümü normal MS ortamına dikilerek kontrol parseli oluşturulmuştur. Tüm örnekler kültürün ilk iki gününde karanlık odada tutulmuştur (deneme 1).

Şekil 3.5. PVP (4 g l⁻¹) ilave edilmiş ortamda gelişen bir sürgün.



Şekil 3.6. AC (2 g l⁻¹) ilave edilmiş ortamda gelişen bir sürgün.



3.2.4. Kùltür koşulları

Her bir kavanozda sadece bir sürgün ucu yer almıştır. Tüm denemelerde kùltürler, 8 saat karanlık ve 16 saat ışığın sağlandığı koşullarda bekletilmişlerdir (Pecaut et al., 1983). Kùltür odasında sıcaklık Rossi ve De Paoli'nin (1994) önerdiği gibi $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuştur. Florasan lambaların kullanıldığı kùltür odasında ışık şiddeti 2300-2500 lüks olarak ayarlanmıştır. Işığın kararmaya olan etkisini ortaya koymak için kurulan ilk denemedeki bir grup bitki hariç, diğer tüm denemelerde kùltüre alınan tüm bitkiler ilk 2 gün kùltür odası içinde bulunan karanlık odacıkta tutulmuşlardır (Wang et al., 1994).

3.2.5. Yapılan gözlemler

Çalışma boyunca kullanılan farklı maddeler ve uygulanan farklı yöntemlerin kararma, enfeksiyon ve sağlıklı gelişen bitki oranları üzerine olan etkileri gözlemlenmiştir. Gözlem sonuçları Akıncı'nın (1990) çalışmasında kullanmış olduğu aşağıdaki formüllerle bağlı kalınarak hesaplanmıştır.

Enfeksiyon oranı: Enfekte olan bitkilerin, söz konusu değerlendirmede kullanılan toplam bitki sayısı içinde payı (%).

Karama oranı: Denemede iki haftalık gözlem sonucu bitki ölümüne neden olan kararmaların, söz konusu gözlemdeki toplam bitki sayısı içindeki payı (%).

Sağlıklı gelişen bitki oranı: Enfeksiyon gelişimi göstermemiş ve kararmamış örnekler sağlıklı olarak gelişen örnekler olarak değerlendirilmiştir. Bu oran, sağlıklı olarak gelişimini sürdüren bitkilerin söz konusu değerlendirmede kullanılan toplam bitki sayısı içindeki payıdır (%).

3.2.6. Değerlendirme

Örneklerde; enfeksiyon kararma ve canlı bitki oranlarında meydana gelen değişimler bağımlı değişkenler olarak kabul edilmiştir. Denemeler 1-6'da yapılan uygulamalarla sözü edilen bu bağımlı değişkenlerde meydana gelen değişimler irdelenmiştir.

Çalışmalarda her bir kavanozda tek bir örnek yer almıştır ve her bir kavanoz da bir tekerrürün bir parçası olarak değerlendirilmiştir. Bu yol izlenerek tüm denemelerde 3 tekerrür oluşturulmuştur. Bağımlı değişkenlerle ilgili yapılan gözlemler her bir tekerrür içerisinde oransal olarak ifade edilmiştir.

Oluşturulan oransal verilerin, varyans analizinin varsaydığı eşit dağılım eğrisine daha iyi uyabilmeleri için, verilerde varyans analizi öncesi karekök transformasyonu yapılmıştır. Ancak transforme edilmiş veriler sadece istatistik analizde kullanılmıştır; '4. Bulgular' bölümünde sözü edilen veriler orijinal verilerdir.

Uygulamaların bağımlı değişkenlerde istatistiksel anlamda önemli bir değişime neden olup olmadıkları varyans analizi ile belirlenmiştir. Tüm varyans analiz modelleri, tam faktöryel deneme desenine uygun olarak yapılmıştır. Aynı denemede farklı uygulamaların yer aldığı

Deneme 1 (*Dikim öncesi farklı sterilizasyon ajanlarının uygulanması*)’de uygulamalar arasında interaksiyonların varlığı da incelenmiştir.

Uygulamaların artan dozlar halinde yapıldığı Deneme 3, (*Farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkileri*) ve Deneme 4 (*Kademeli sterilizasyon işleminin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri*)’de verilerde varyans analizi polinomiyal olarak yapılmıştır. Bu şekilde bağımlı değişkenlerdeki değişimin nasıl bir yapıya sahip olduğu (lineer, quadratik veya kübik) da tespit edilmiştir.

Varyans analizinde istatistiksel bakımdan önemli çıkan uygulamalarda gruplar arasındaki farklar ‘Duncan’ın Çoklu Sınıflandırma Testi’ ile belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler SPSS (13.0 versiyonu) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Sterilizasyon problemine ilişkin çalışmalar

4.1.1 Deneme 1: Dikim öncesi farklı sterilizasyon ajanlarının uygulanması

Toplam 165 bitkiciğin yer aldığı 1. denemede, 10 dakika süre ile üç ayrı sterilizant (sodyum hipoklorit, Huwasan ve hidrojen peroksit), bir adet fungusit (Captan, 10 dakika) ve dikim sonrası aydınlık veya karanlık koşullarda bekletme olmak üzere 3 faktörün etkileri irdelenmiştir (Çizelge 4.1.1). Oluşturulan varyans analiz modelinde, bu faktörlerin enfeksiyon oranı, dokularda kararma oranı ve canlılık oranı üzerine tek tek ve kombine etkileri araştırılmıştır.

İki haftalık gözlem süresi sonunda, deneme genelinde örneklerin % 44'ünün (165 sürgünden 72'si) enfeksiyonsuz olarak geliştiği tespit edilmiştir. Denemede uygulanan sterilizant maddelerle, teorik olarak % 100 kabul edilebilecek enfeksiyon oranının % 56'ya düştüğü görülmüştür (denemede yer verilmemiş olmakla birlikte, sterilizant uygulanmayan dokularda istisnasız % 100 oranında enfeksiyon gelişimi olmaktadır). Ancak, denenen üç farklı sterilizant madde arasında bu bakımdan istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunamamıştır. Uygulanan fungusidin ve karanlık koşulların ise bitkilerde enfeksiyon oranı üzerinde istatistiksel anlamda sırasıyla $p \leq 0.01$ ve $p \leq 0.05$ önem düzeyinde etkili oldukları saptanmıştır. Denemede ikili veya üçlü interaksiyonlar önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.1.1 Farklı sterilizasyon ajanlarının ve karanlık koşulların enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkileri

Sterilizant	Fungusit	Işık	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Sağlıklı gelişen bitki oranı (%)	Toplam bitki sayısı
NaOCl	Captanlı	Karanlık	50	50	50	13
NaOCl	Captanlı	Aydınlık	56	35	28	15
NaOCl	Captansız	Karanlık	61	50	39	16
NaOCl	Captansız	Aydınlık	56	75	25	15
Ortalama			56 (öd.)	53c	35a	59
HUWASAN	Captanlı	Karanlık	53	47	47	10
HUWASAN	Captanlı	Aydınlık	53	67	33	11
HUWASAN	Captansız	Karanlık	57	50	43	10
HUWASAN	Captansız	Aydınlık	67	80	20	12
Ortalama			58 (öd.)	61b	36a	43
H ₂ O ₂	Captanlı	Karanlık	50	57	43	16
H ₂ O ₂	Captanlı	Aydınlık	50	76	22	16
H ₂ O ₂	Captansız	Karanlık	57	50	43	16
H ₂ O ₂	Captansız	Aydınlık	67	74	12	15
Ortalama			56 (öd.)	64a	30b	63
Captanlı ort.			52b	55b	37a	81
Captansız ort.			60a	63a	30b	84
Karanlık ort.			55b	51b	44a	81
Aydınlık ort.			58a	68a	23b	84
Genel ortalama			56	59	34	165

Sterilizant maddelere ilave olarak Captan fungisidi kullanıldığında enfeksiyona uğrayan bitki oranında düşüş olduğu tespit edilmiştir. Sterilizasyon prosedüründe dikim öncesi Captan

uygulanmaması halinde örneklerin % 60'ında enfeksiyon gelişimi gözlenirken, Captan uygulanması ile bu oranı % 52'ye düşürmek mümkün olmuştur. Belirtildiği üzere bu fark istatistiksel anlamda önemlidir.

Denemede yer alan enginar sürgünlerinin % 59'unda (165 sürgünün 97'sinde) değişik düzeylerde kararmalar görülmüştür. Denemede yer alan sterilizant, fungusit ve karanlık koşullar uygulamalarının dokularda meydana gelen kararma üzerinde, tek tek ve kombine (ikili veya üçlü interaksiyonları) olmak üzere tüm etkileri istatistiksel olarak $p \leq 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Sterilizant madde uygulamalarında hidrojen peroksit sterilizantı en yüksek kararma oranına (% 64) neden olurken, bunu Huwasan (% 61) ve sodyum hipoklorit izlemiştir (% 53). Kararma oranı üzerinde fungusit uygulamalarının da önemli bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Captan uygulandığında dokuların % 55'inde kararmalar görülürken, Captan uygulanmadığında bu oran % 63 olarak gerçekleşmiştir. Ancak uygulanan faktörlerin tek tek etkileri bakımından en büyük farklılık aydınlık / karanlık uygulamalarından elde edilmiştir. Aydınlık koşullarda kültüre alınan bitkilerin % 68'i kararırken, kültürlerinin ilk iki gününü karanlık ortamda geçiren bitkilerde bu oran % 51'e düşmüştür.

İki haftalık kültür sonucunda sürgünlerin % 34'ü (165 örnekten 56'si) canlı kalmıştır ve sağlıklı gelişmiştir. Bunlar, hem enfeksiyon geliştirmeyen hem de kararmayan sürgün uçları. Denemede; sterilizant uygulamaları, fungusit uygulaması ve ışık koşullarının dokuların canlılığı üzerine olan etkisi $p \leq 0.01$ önem düzeyinde istatistiksel farklılıklar yaratmıştır. Bunların ikili kombinasyonları ve üçlü kombinasyonu ise istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Sterilizant madde uygulamalarında en fazla sayıda canlı bitki Huwasan (% 36) ve sodyum hipoklorit (% 35) uygulandığında elde edilmiştir. Bunları istatistiksel olarak bir alt grupta yer alan hidrojen peroksit (% 30) izlemiştir. Captansız sterilizasyon uygulamalarında örneklerin % 30'u canlı kalırken, fungisidin uygulanması ile bu oran % 37'ye yükselmiştir. Ancak -kararma probleminde de olduğu gibidokuların canlı kalması bakımından en etkili uygulama ışık koşulları olmuştur. İki haftalık kültür periyodu sonunda dikim sonrası doğrudan aydınlık koşullara alınan örneklerin ancak % 23'ü canlı kalırken, kültürlerinin ilk iki gününü karanlık ortamda geçiren bitkilerin % 44'ü canlı kalmıştır.

Bu deneme sonucunda, çalışma süresince sterilizasyon işlemi için sodyum hipokloritin kullanımına karar verilmiştir. Buna ilave olarak ilerleyen denemelerin tümünde Captan fungisidi 10 dakika süre ile % 6 konsantrasyonda kullanılmış ve örnekler kültüre alma işleminin ilk iki günü karanlık koşullarda bekletilmiştir.

4.1.2 Deneme 2: Sterilizasyon ajanlarının doğrudan ortama ilavesi

Toplam 87 bitkiciğin yer aldığı bu denemede, bir antibiyotik (rifampicin) ve üç sterilizasyon ajanı (sodyum hipoklorit, Huwasan ve gümüş nitrat) MS ortamına doğrudan ilave edilerek değerlendirmeye alınmışlardır. Denemede kontrol olarak salt MS ortamı kullanılmıştır. Ortama doğrudan ilave edilen sterilizasyon ajanlarının bitkilerde enfeksiyon gelişme oranı, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranı üzerindeki etkileri istatistiksel anlamda $p \leq 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1.2).

Çizelge 4.1.2 Ortama doğrudan ilave edilen sterilizasyon ajanları ve antibiyotiğin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkinlikleri

Ortam	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Sağlıklı gelişen bitki oranı (%)	Toplam bitki sayısı
Rifampicin	43 b	50 b	50 b	14
NaOCl	33 c	78 a	22 c	18
Huwasan	22 d	83 a	22 c	18
AgNO ₃	33 c	44 c	61 a	18
Sadece MS	74 a	42 c	21 c	19
Genel ortalama	41	59	35	87

İki haftalık gözlem süresi sonunda, deneme genelinde örneklerin % 41'inin (87 sürgünden 36'sı) enfeksiyon geliştirdiği tespit edilmiştir. Enfeksiyon oranı değişkenler düzeyinde incelendiğinde oldukça geniş bir yüzde aralığı dikkati çekmektedir. En yüksek oranda enfeksiyon % 74 ile denemenin kontrolü olarak kullanılan standart MS ortamında gelişirken, en başarılı sonucun elde edildiği Huwasan ilavesinde bu oran % 22 seviyesinde kalmıştır. Sodyum hipoklorit ve gümüş nitratlı ortamlarda enfeksiyon oranı % 33, antibiyotikli ortamda da ise % 43 olarak gerçekleşmiştir.

Denemede yer alan enginar sürgünlerinin % 59'unda (87 sürgünün 51'inde) değişik düzeylerde kararmalar meydana gelmiştir. Değişkenler arası farklılık incelendiğinde en fazla kararma oranı, istatistiksel olarak aynı grupta yer alan Huwasan (% 83) ve sodyum hipoklorit (% 78) ilave edilmiş ortamlarda gözlenmiştir. Antibiyotik ilave edilmiş ortamda kararma oranı % 50, gümüşlü ortamda % 44 ve istatistiksel olarak gümüşlü ortamla aynı grupta yer alan standart MS

ortamında ise % 42'dir. Diğer bir ifadeyle standart MS ortamında yer alan örneklerde kararma en az olmuştur.

İki haftalık kültür sonucunda sürgünlerin % 35'i (87 örnekten 30'u) canlı kalmıştır ve sağlıklı gelişmiştir. En fazla sayıda sağlıklı sürgün gümüş nitrat ilave edilmiş ortamdan (% 65) elde edilirken, en az sayıda sağlıklı sürgün, istatistiksel olarak aynı grupta yer alan sodyum hipoklorit (% 22), Huwasan (% 22) ve standart MS (% 21) ortamlarından elde edilmiştir.

Sağlıklı gelişen bitkiler ile ilgili veriler tekrardan irdelendiğinde; sodyum hipoklorit ve Huwasan ilave edilmiş ortamlardaki düşük canlılık oranının yüksek kararma oranından kaynaklandığı söylenebilmektedir. Standart MS ortamından az sayıda sağlıklı bitkiciğin elde edilmiş olması ise yüksek enfeksiyon oranının bir sonucudur. Rifampicin ve gümüş nitratlı ortamlarda ise meydana gelen kayıplar, hem enfeksiyonlara hem de kararmalara atfedilebilmektedir.

4.1.3 Deneme 3: Farklı sterilizasyon sürelerinin denenmesi

Ortalama doz ve uygulama süresini tespit etmek için 60 örnek ile kurulan ön denemede, 3 ve 5 dakikalık uygulama süreleri için sırasıyla % 85 ve % 82 enfeksiyon oranları gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar neticesinde sterilizant dozu ve uygulama sürelerinin sterilizasyon için yeterli olmadığına kanaat getirilerek kurulacak bir deneme ile sürgün uçlarının daha yüksek doz ve uygulama sürelerinde sterilize edilmelerine karar verilmiştir.

Optimum sterilizant dozu ve uygulama süresini tespit etmek için 100 örnek ile kurulan 3. denemede sürgün uçları rutin olarak kullanılan alkol ve fungusit uygulamasından sonra sterilizasyon işlemine alınmışlardır. Denemede % 2.5 oranında aktif klorür içeren sodyum hipoklorit sterilandı dokulara 5, 10, 15 ve 20 dakikalık sürelerle uygulanmıştır (Çizelge 4.1.3 a). Sterilizasyon işleminden sonra sürgün uçları antibiyotikli steril saf suda durulanarak 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat ilave edilmiş MS ortamında, karanlıkta kültüre alınmışlardır.

Oluşturulan varyans analiz modelinde, farklı uygulama sürelerinin enfeksiyon gelişimi, dokularda kararma oranı ve canlılık oranı üzerine olan etkileri ortaya konmuştur. Buna göre farklı uygulama sürelerinin enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranları üzerine istatistiksel anlamda p≤0.01 önem düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.1.3 a) Farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine etkileri

Süre (dk.)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Sağlıklı gelişen bitki oranı (%)	Toplam bitki sayısı
5	67 a	9 c	25 b	25
10	50 b	9 c	38 a	25
15	28 c	23 b	41 a	25
20	17 c	59 a	25 b	25
Ortalama	40	25	32	100

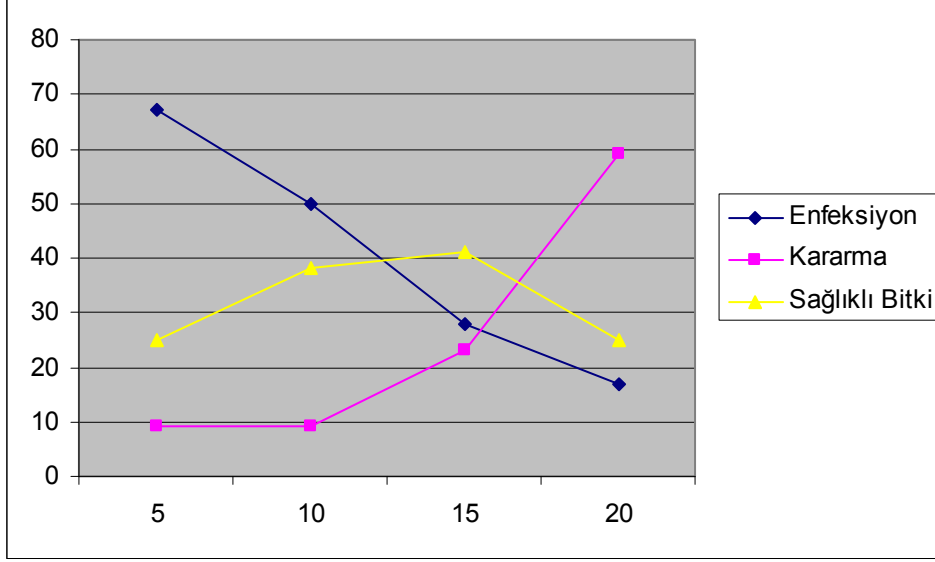
İki haftalık gözlem süresi sonunda, deneme genelinde örneklerin % 40'ında (100 örnekten 40'ında) enfeksiyon gelişimi izlenmiştir. Değişkenlere göre enfeksiyon oranındaki dağılıma baktığımızda en düşük

enfeksiyon oranlarının istatistiksel olarak aynı grupta yer alan 15 ve 20 dakikalık uygulamada elde edildiği görülmektedir (sırasıyla % 20 ve % 17 enfeksiyon gelişimi). Bunu % 67 ve % 50'lik enfeksiyon oranlarıyla sırasıyla 5 ve 10 dakikalık uygulama süreleri takip etmiştir.

Denemede yer alan enginar sürgünlerinin % 25'inde (100 sürgünden 25'inde) değişik düzeylerde kararmalar görülmüştür. 5 ve 10 dakikalık uygulamaların % 9 karama oranıyla istatistiksel olarak aynı grupta yer aldıkları görülmektedir. Ancak 15 dakikalık ve özellikle de 20 dakikalık uygulamalarda kararmalar önemli ölçüde artmıştır (sırasıyla % 23 ve % 59).

Şekil 4.1.3'de artan sterilizasyon süreleri ile örneklerde görülen enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranları yer almaktadır. Arttırılan uygulama süreleri kararma oranını hızla yukarı çekmektedir. Varyans analizinde yapılan polinomiyal testte, kararma oranında quadratik bir değişimin olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.01$). Enfeksiyonu ise, arttırılan uygulama süreleri düzgün bir şekilde düşürmektedir. Polinomiyal testte enfeksiyon oranındaki değişimlerde lineer etki $p \leq 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Buna göre, hem enfeksiyon gelişiminin hem de kararmanın ortak ifadesi olan sağlıklı gelişen bitki oranı için en iyi sonuç, 15 dakikalık uygulamadan elde edilmiştir. Polinomiyal testte sağlıklı gelişen bitkileri oranı üzerinde kübik etkinin önemli olduğu saptanmıştır ($p \leq 0.01$). Bu etkiler, veriler doğrultusunda hazırlanan grafikde açıkça görülmektedir (Şekil 4.1.3).

Şekil 4.1.3 Farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine polinomiyal etkileri



15 ve 20 dakikalık uygulama süreleri arasındaki farklılığı daha iyi irdelemek için aynı sterilizasyon işlemi ile ayrı bir deneme daha kurulmuştur (Çizelge 4.1.3 b). Toplam 60 bitkiciğin yer aldığı denemede, bu iki sterilizasyon süresinin etkinliğini daha iyi görebilmek için MS ortamına, enfeksiyonları baskı altında tutan gümüş nitrat ilave edilmemiştir. Oluşturulan varyans analiz modelinde, bu iki uygulama süresinin enfeksiyon gelişimi, dokularda kararma oranı ve canlılık oranı üzerine olan etkileri ortaya konmuştur. Buna göre, iki haftalık gözlem süresi sonunda sterilizant uygulama süresi enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen sürgün oranı üzerine istatistiksel olarak $p \leq 0.01$ önem düzeyinde etkili bulunmuştur.

Çizelge 4.1.3 b) 15 ve 20 dakikalık farklı sterilizasyon sürelerinin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri

Süre (dk.)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Sağlıklı gelişen bitki oranı (%)	Toplam bitki sayısı
15	43 a	37 b	43 a	30
20	37 b	50 a	27 b	30
Ortalama	40	43	35	60

15 dakikalık uygulamada enfeksiyon oranı 20 dakikalık uygulamaya göre daha yüksektir (% 43), ancak kararma oranı da daha düşük kalmaktadır (% 37). Bu nedenle sağlıklı gelişen bitki sayısı daha fazladır (% 43). Deneme bu yönü ile bir önceki denemeyi desteklemektedir.

4.1.4 Deneme 4: Kademeli sterilizasyon uygulaması

Toplam 96 bitkiciğin yer aldığı denemede, alkol ve fungusit uygulamalarının ardından sürgünler sodyum hipoklorit sterilizantı ile öncelikle % 2,5 dozda 4 farklı sürede (5, 10, 15 ve 20 dakika) ve ardından her biri % 0,5 dozda 3 dakika süre ile kademeli sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Sterilizasyon işleminin ardından antibiyotik ilave edilmiş su ile durulanan örnekler gümüş nitrattı (100 mg l⁻¹) MS ortamında ilk iki gün karanlıkta bekletilmek suretiyle kültüre alınmışlardır.

Oluşturulan varyans analiz modelinde, uygulama süresinin enfeksiyon oranı, dokularda kararma oranı ve canlılık oranı üzerine olan

etkileri araştırılmıştır. Buna göre, sterilizant uygulama süresi enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen sürgün oranı üzerine $p \leq 0.01$ önem düzeyinde etkili bulunmuştur (Çizelge 4.1.4).

İki haftalık kültür sonucunda deneme genelinde örneklerin % 50'si (96 sürgünden 48'i) sağlıklı gelişmiştir. Bu bakımdan 5 + 3 ve 20 + 3 dakikalık uygulamalar aynı istatistiksel grupta yer alırken en yüksek canlılık % 63 canlı bitki oranı ile 15 + 3 dakikalık uygulama neticesinde elde edilmiştir.

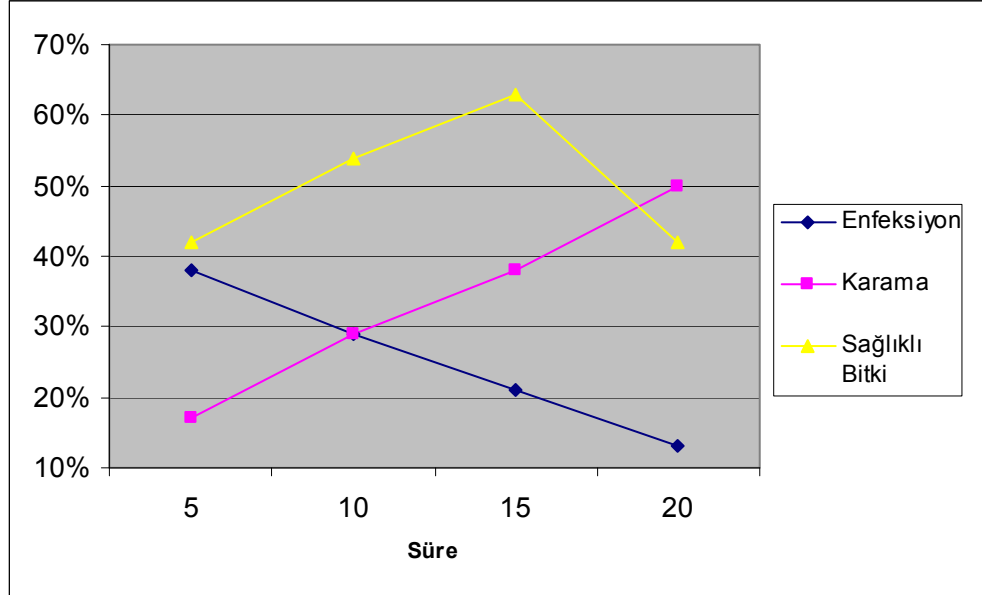
Çizelge 4.1.4 Kademeli sterilizasyon işleminin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri

Süre (dk.)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Sağlıklı gelişen bitki oranı (%)	Toplam bitki sayısı
5 + 3	38 a	17 d	42 c	24
10 + 3	29 ab	29 c	54 b	24
15 + 3	21 bc	38 b	63 a	24
20 + 3	13 c	50 a	42 c	24
Ortalama	25	34	50	96

Şekil 4.1.4'de artan sterilizasyon süreleri ile sürgünlerde görülen enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen bitki oranları yer almaktadır. Sterilizant uygulama süresindeki uzunluğundaki artışa bağlı olarak enfeksiyon oranının doğrusal bir şekilde düştüğü, kararma oranının ise doğrusal bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Polinomial testte enfeksiyon ve kararma oranındaki bu değişimler üzerine lineer etkinin, $p \leq 0.01$

seviyesinde önemli olduğu bulunmuştur. Denemde en düşük enfeksiyon oranı % 13 ile 20 + 3 dakikalık uygulamada elde edilirken, en düşük kararma oranı ise % 17 ile 5 + 3 dakikalık uygulamada gözlenmiştir. Ancak en fazla sayıda sağlıklı bitkinin (% 63) 15 + 3 dakikadan elde edildiği görülmektedir. Polinomiyal testte sağlıklı gelişen bitki oranı üzerine quadratik etkinin önemli olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0.01$).

Şekil 4.1.4 Kademeli sterilizasyon işleminin enfeksiyon, kararma ve bitki gelişimi üzerine polinomiyal etkileri



4.1.5 Deneme 5: Ultrason kullanımı

Toplam 50 bitkiciğin yer aldığı 5. denemede tüm örnekler, deneme 4'de en iyi sonucun elde edildiği 15 + 3 dakika kademeli sterilizasyon prosedürüne tabi tutulmuşlardır. Bununla birlikte daha önceki denemelerde iyi sonuçlar elde edilen fungusit kullanımı ve karanlık koşullarda kültüre alma işlemleriyle, gümüş nitratlı MS ortamının kullanımına devam edilmiştir. Denemede öncekilerden farklı olarak sterilizasyon işleminin başında üç ayrı uygulama süresinde (3, 5 ve 10 dakika) ultrason cihazı kullanılmıştır.

Çalışmada ultrason kullanılmayan kontrol parseli ile kıyaslanarak farklı uygulama sürelerinde kullanılan ultrason cihazının etkinliği araştırılmıştır. Buna göre uygulama süresinin enfeksiyon oranı üzerinde istatistiksel anlamda $p \leq 0.05$ önem düzeyinde, kararma ve canlılık oranları üzerine ise $p \leq 0.01$ önem düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır.

İki haftalık gözlem süresi sonunda, deneme genelinde % 10 oranında enfeksiyon gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.1.5). 5 ve 10 dakikalık ultrason kullanımında -besi ortamına ilave edilmiş olan gümüş nitratın da etkisi ile- hiç enfeksiyon gelişimine rastlanmamıştır. Bunun yanında 3 dakikalık kullanımda % 13 olarak tespit edilen enfeksiyon gelişimi ultrason kullanılmadığında % 27 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel guruplara bakıldığında 5 ve 10 dakikalık uygulama sürelerinin aynı gurupta yer aldığı görülmektedir. Bununla birlikte ultrason kullanılmayan sterilizasyon işlemi ile 3 dakikalık kullanım süresi ayrı bir gurup oluşturmaktadır.

Kararma oranları incelendiğinde deneme genelinde kullanılan örneklerin % 41'inin karardığı tespit edilmiştir. En düşük kararma oranı % 13 ile 3 dakikalık ultrason kullanımında elde edilmiştir. Bununla birlikte süredeki artışa bağlı olarak kararma oranının büyük oranda arttığı tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak ultrason kullanılmayan sterilizasyon işlemi ile 3 dakikalık uygulama süresi aynı grupta yer alırken, 5 ve 10 dakikalık uygulamalar ayrı bir grup oluşturmaktadır.

Çizelge 4.1.5 Ultrason kullanımının enfeksiyon, kararma ve sağlıklı gelişen sürgün oranlarına olan etkisi

US Süresi (dk.)	Enfeksiyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Sağlıklı gelişen bitki oranı (%)	Toplam bitki sayısı
0	27 a	20 b	60 b	15
3	13 ab	13 b	87 a	13
5	0 b	61 a	39 c	10
10	0 b	67 a	33 c	12
Ortalama	10	41	55	50

Gözlem süresi sonunda, deneme genelinde sürgünlerin % 55'inin gelişimlerini sağlıklı şekilde sürdürdüğü gözlenmiştir. En çok sayıda sağlıklı bitki oranı % 87 oran ile 3 dakikalık ultrason kullanımı sonucunda elde edilmiştir. Bunu % 60 sağlıklı bitki oranı ile ultrason kullanılmayan sterilizasyon işlemi izlemektedir. Ultrason cihazının uzun süreli kullanımı ile sağlıklı bitki oranının kararmaya bağlı olarak büyük ölçüde düştüğü tespit edilmiştir.

Ultrason cihazının uzun süreli kullanımında enfeksiyon gelişimine rastlanmadığı için aynı sterilizasyon prosedürünün uygulanması ile kurulan ikinci bir denemede yalnızca 5 ve 10 dakikalık ultrason kullanımına yer verilmiştir. Bu denemede örnekler gümüş nitrat içermeyen MS ortamına dikilmişlerdir. Deneme sonucunda 10 dakikalık ultrason kullanımı ile elde edilen enfeksiyon oranı % 28 olurken 5 dakikalık kullanımda % 39 oranında enfeksiyon gelişimi gözlenmiştir.

4.1.6 Deneme 6: Ortama ilave edilen fenol tutucu maddelerin doku kararması üzerine etkileri

186 bitkiciğin yer aldığı 6. denemede 15 + 3 dakika kademeli sterilizasyon işlemine tabi tutulan örnekler gümüş nitratlı MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Denemede kontrol parseli olarak kullanılan normal MS ortamının yanında 2 g l⁻¹ aktif karbon ile 2 g l⁻¹ ve 4 g l⁻¹ dozlarında PVP ortama ilave edilerek dokuların kararması üzerine olan etkinlikleri gözlenmiştir (Çizelge 4.1.6).

Çizelge 4.1.6 kararmayı engelleyici maddelerin ortama ilavesi

Ortam	Kararma oranı (%)	Toplam bitki sayısı
2 g PVP	24 b	46
4 g PVP	15 c	46
2 g Aktif karbon	29 b	48
Normal MS	48 a	46
Ortalama	30	186

Oluşturulan varyans analiz modelinde, besi ortamına ilave edilen fenol tutucu maddelerin dokularda kararma oranı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Ortama ilave edilen maddeler kararma oranı üzerine $p \leq 0.01$ önem düzeyinde etkili bulunmuştur. Buna göre en yüksek kararma oranı % 48 ile kontrol parseli olarak düzenlenmiş olan normal MS ortamının kullanıldığı parselde gözlenmiştir. Bunu sırasıyla 2 g l⁻¹ aktif karbon, 2 g l⁻¹ PVP ve 4 g l⁻¹ PVP ilave edilmiş ortamlar izlemiştir. 2 g l⁻¹ aktif karbon ilave edilmiş olan MS ortamında % 29 oranında kararma oranı elde edilmiş ve bu ortam % 24 kararma oranının gözlendiği 2 g l⁻¹ PVP ilave edilmiş ortamla aynı istatistiksel grupta yer almıştır. Bunların yanında en düşük kararma oranı % 15 ile 4 g l⁻¹ PVP ilave edilmiş ortamda elde edilmiştir.

Bunlara ek olarak, deneme genelinde % 24 enfeksiyon oranı gözlenmiştir (186 örnekten 45'i). Deneme sonucunda elde edilen sağlıklı gelişen canlı sürgün oranı ise % 51 olmuştur (186 örnekten 95'i).

5. TARTIŞMA

Enginarın doku kültürü ile çoğaltılmasında, başlangıç aşamasında karşılaşılan yoğun kararma ve enfeksiyon oranlarına ilişkin problemler bizi söz konusu tür üzerinde böyle bir çalışma yapmaya yönlendirmiştir. Çalışmada enfeksiyon ve kararma problemleri ele alınmış ve bunlar üzerinde birbirlerinden bağımsız denemeler kurularak enginarın doku kültürü koşulları optimize edilmeye çalışılmıştır.

Kurulan ilk denemede (deneme 1), çalışmanın devamında kullanılacak sterilizant maddenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Karanlık koşulların dokuların kararmaları üzerine etkili olduğu bilinmektedir (Dalal et al., 1993; Phoplonker and Caligari, 1993; Block and Lankes, 1996; Prathanturatug et al., 1996; Figueiredo et al., 2000). Bu nedenle çalışmanın başında, karanlık koşulların kararma üzerine olan etkisi ortaya konarak ilerleyen çalışmalar için standart bir yöntem belirlenmiştir.

Farklı sterilizant maddeler kullanılarak kurulan bu ilk denemede, deneme genelinde % 56'lık bir enfeksiyon oranı gözlenmiştir. Rossi ve De Paoli (1994)'nin, enginar bitkisinde sterilizasyon amacıyla kullanılabilecek pek çok kimyasalın yanında, % 40-50 temiz bitki elde etmek için % 2-3'lük sodyum hipoklorit ile 20 dakika yıkamanın yeterli olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışma göz önüne alındığında, bizim ilk denemede dahi elde ettiğimiz enfeksiyon oranının tatmin edici olduğuna kanaat getirilebilir. Bizim denememizde kullanılan farklı sterilizant maddeler arasında enfeksiyon gelişimi bakımından herhangi bir farklılık elde edilememiştir. Benzer şekilde cıva klorid, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit ve etanol sterilizantları ile litchi (lychee) bitkisi üzerine çalışan Puchooa (2004) da, bu sterilizant maddelerin değişen doz ve sürelerde uygulanması ile dokularda benzer enfeksiyon oranların

yakalandığından söz etmektedir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar çalışmalarında farklı sterilizant maddeleri kıyasladıklarında birbirlerinden farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Sabaratnam ve Beattie (2003) mısır ve fasulye bitkileri ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, sodyum hipokloridin hidrojen perokside kıyasla daha iyi sonuç verdiğini belirtirken, *Pinellia tarnata* bitkisi ile çalışan Xu ve arkadaşları (2005) denemelerinde cıva kloride de yer vermiş ve cıvanın daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir.

Denememizde kullanılan farklı sterilizant maddelerin dokularda farklı oranlarda hasar meydana getirdiği tespit edilmiştir. Kurulan deneme, kararma ve sağlıklı bitki oranları bakımından değerlendirmeye alındığında, sodyum hipoklorit bileşiğinin kararma (% 53) ve canlı bitki oranı (% 35) bakımından en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Bu nedenle ilerleyen denemelerde çalışmaya sodyum hipoklorit sterilizantı kullanılarak devam edilmiştir. Mısır, fasulye ve litchi gibi farklı bitki türleri üzerine çalışan araştırmacılar, benzer şekilde hidrojen peroksit bileşiğinin sodyum hipokloride kıyasla bitkilerde daha fazla hasara neden olduğunu bildirmektedirler (Sabaratnam and Beattie, 2003; Puchooa, 2004). Buna ek olarak Puchooa (2004) hidrojen peroksidin yıkanarak dokudan uzaklaştırılmasının da daha zor olduğunu belirtmiştir. Huwasan sterilizantı, gümüş nitrat ve hidrojen peroksit içermekte olan bir bileşime sahiptir. Gümüş nitratın ortama ilave edilerek kullanıldığı ileriki denemelerde herhangi bir fitotoksit etkiye rastlanmaması nedeniyle, Huwasan kullanımında artan kararma oranının büyük oranda Huwasan'ın içerdiği hidrojen peroksit bileşimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sonuçta kararma olayı fenolik maddelerin oksitlenmesine bağlı gelişen bir olaydır ve oksijen içeriğine sahip olan sterilizant maddelerin bu oksitlenme olayını hızlandırarak dokulardaki kararmayı arttırdığı düşünülmektedir.

Kurulan denemede, fungusit dahil edilmiş sterilizasyon işlemi ile kurulan parsellerin, kullanılmayanlara kıyasla daha düşük oranda enfeksiyona uğradığı görülmüştür. Bu sonuç, denemede kullanılan Captan fungisidinin etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır. Farklı türler üzerine çalışan pek çok araştırmacı, daha düşük enfeksiyon oranlarına ulaşabilmek için özellikle tarla koşullarından alınan bitkilerin sterilizasyonunda fungusit kullanımının gerekli olduğunu belirtmektedirler (Shields et al., 1984; Josekutty et al., 2003; Liesebach and Naujoks, 2004; Puchooa, 2004; Ajayi et al., 2006). Enginar bitkisinin sürgünleri doğrudan topraktan alınmaktadır. Bunun olası enfeksiyon riskini büyük ölçüde arttırdığı düşünüldüğünde fungusit kullanımının önemi artmaktadır.

Bunların yanında, kültüre alma işleminin ilk iki gününde karanlıkta bırakılan örneklerde daha az kararma gözlenmiştir. Diğer araştırmacıların da kullandığı üzere (Dalal et al., 1993; Phoplonker and Caligari 1993; Block and Lankes 1996; Prakash et al., 1997; Puchooa, 2004) düşük ışık yoğunluğu veya karanlıkta bırakma işlemi, *in vitro*'da karşılaşılan kararma problemine karşı kullanılan etkin bir çözümdür. Bununla birlikte muz gibi kararma olayının yoğun olarak gözlemlendiği bitkilerde karanlıkta bırakma işlemi 7 güne kadar uygulanmaktadır (Figueiredo et al., 2000).

Deneme 2'de, enfeksiyon problemine karşın ortama ilave edilen maddelerin etkinliği değerlendirmeye alındığında, kontrol parseli ile aralarında ciddi farklılıklar olduğu görülmektedir. Kontrol parselinde % 74 olarak gözlenen enfeksiyon oranı, ortama ilave edilen maddeler genelinde % 33'e düşmüştür. En düşük enfeksiyon oranı, ticari üretimlerde ortama ilave edilerek kullanıldığı belirtilen (H. Türküsay, 2006, sözlü görüşme) Huwasan ile elde edilmiştir. Bununla birlikte,

antibiyotik ve sterilizant maddelerin ortama ilave edilerek kullanımının çeşitli bitki türleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda enfeksiyona karşı başvurulmuş etkin bir yöntem olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Orlikowska, 1997; Keskitalo, 1999; Thomas and Prakash, 2004; Ajayi et al., 2006; Teixeira et al., 2006). Ortama ilave edilen maddeler enfeksiyon kaynağını yok etmesinde bitkilerin sağlıklı bir şekilde büyümesine olanak sağlamaktadırlar. Antibiyotik ve gümüş nitrat gibi etkinlikleri belli bir süre ile sınırlı olan maddelerin ilave edildiği ortamlarda süre aşımı ile birlikte enfeksiyon gelişimine rastlanıldığı bilinmektedir (Orlikowska, 1997)

Ancak deneme 2, kararan ve sağlıklı gelişen bitkiler bakımından değerlendirmeye alındığında optimum sonuç, gümüş nitrat kullanımı ile (kararma oranı % 42, sağlıklı gelişen sürgün % 61) elde edildiği görülmektedir. Buna karşın antibiyotiğin kararma oranını arttırarak sağlıklı sürgün oranını düşürdüğü görülmektedir. Orlikowska (1997) ortama ilave edilen gümüş nitratın enfeksiyon gelişimini büyük ölçüde engellediğini ve antibiyotik kullanımında meydana gelen hasarların gümüş kullanımında gözlenmediğini belirtmektedir. Benzer şekilde, farklı araştırmacılar antibiyotik kullanımının fitotoksit etkilerinden de söz etmektedirler (Pollock et al., 1983; Keskitalo, 1999; Thomas and Prakash, 2004). Araştırmacıların bu bulgularına ek olarak denemede, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit ve Huwasan'ın ortama ilavesi ile kararma oranının büyük ölçüde arttığı da görülmüştür. Deneme 1'de değinildiği gibi, söz konusu maddelerde bulunan oksijenin fenolik bileşiklerin oksitlenmesini hızlandırarak kararma oranını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

Deneme 3’de direkt bahçe koşullarından alınan enginar sürgünleri için en uygun sterilizasyon süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sterilizasyon işlemi için önceki denemelerde % 0,5’lik aktif klor kullanılmasına karşın bu denemede enfeksiyon oranını daha aşağı çekmek için % 2,5’luk aktif klor kullanılmıştır. Buna ek olarak farklı uygulama süreleri (5, 10, 15 ve 20 dakika) de denenmiştir. Ancak önceki denemelere kıyasla bu denemede arzu edildiği şekilde düşük enfeksiyon oranı elde edilememiştir. Denemenin kurulduğu zamanlarda örneklerin alındığı bahçede afit popülasyonunun artmakta olduğu gözlenmiştir. Sokucu emici ağız yapısına sahip böceklerin bakteri taşınımında etkili oldukları bilinmektedir (Jones and Aldwick, 1990; Roberts, 1998; TEDGEM, 2007; Dedeoğlu, 2007). Bu nedenle başlangıç materyallerinde bakteri bulaşımının arttırdığı ve sterilizasyon işleminin zorlaştığı düşünülmektedir. Ayrıca bazı araştırmacılar, doku kültürü koşullarında gelişen bazı enfeksiyonların örneklerle taşınan farklı endogen, yani iç bakterilerden kaynaklandığını belirtmektedirler (Whitesides and Spotts, 1991; Peñalver et al., 1994; Cassells 2001; Van den Houwe and Panis, 2004; Thomas and Prakash, 2004; Ajayi et al., 2006). Bununla birlikte Josekutty ve arkadaşları (2003) çalışmalarında, bahçe koşullarında pestisit ve fungusit kullanımı ile doku kültüründe karşılaştıkları enfeksiyon oranını büyük ölçüde düşürdüklerinin altını çizmişlerdir. Benzer şekilde Puchooa (2004) çalışmasında olası bulaşmaları önlemek için bahçe koşullarında bir dizi pestisit ve fungusit kullandığını belirtmiştir. Deneme 3’den elde edilen veriler ışığında, çalışma süresince geliştirilen sterilizasyon prosedürüne karşın, enfeksiyon oranlarında daha da büyük bir düşüşün elde edilememesi, bitkilerin iç bakterilerce bulaşık olduğu fikrini akla getirmektedir. Sonuçta doku kültüründe uygulanan sterilizasyon işlemleri yüzey sterilizasyonu ile sınırlı kalmakta ve bitkinin vasküler sistemi gibi iç dokularına etki edememektedir.

Deneme 3’de en düşük enfeksiyon oranına, ki bu % 17’dir, 20 dakikalık sterilizant kullanımı ile ulaşılmıştır. Ancak bununla birlikte, 15 dakikalık uygulama süresi sağlıklı gelişen bitki oranı % 41 iken, 20 dakikalık uygulama ile bu oran % 25’e düşmüştür. Yani bitkilerin enfeksiyondan temiz olmasının yanı sıra sağlıklı gelişmeleri de ele alındığında, 15 dakika 20 dakikaya göre daha iyi bir seçimdir. Çalışmamıza benzer şekilde Puchooa (2004)’da optimum sonucu % 1,5 dozda 15 dakika sodyum hipoklorit kullanarak elde ettiğini bildirmiştir. Araştırmacı bu uygulama ile % 30 enfeksiyon oranına düşmeyi başarmıştır. Aynı araştırmacı sodyum hipoklorit dozunu daha da arttırdığında % 100 temiz bitkiciğe ulaşabildiğini bildirmiş ancak bu şekilde bitkilerde meydana gelen hasar oranının artmakta olduğunu not etmiştir. Benzer şekilde Xu ve arkadaşları (2005) farklı sterilizantların kullanıldığı çalışmalarında doz ve uygulama süresindeki artışın bitki gelişimini olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Bu veriler ışığında, çalışmada elde edilen sterilizant uygulama süresinin sağlıklı bitki oranı üzerine olan quadratik etkisinin pek çok araştırmacının çalışmasıyla paralellik halinde olduğu görülmektedir.

Bingshan ve arkadaşları (2000) çalışmalarında, yüksek dozda sterilizant uygulamasından sonra bitkinin dış dokularını uzaklaştırıp daha düşük dozda ikinci bir sterilizant uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar, kademeli veya iki aşamalı sterilizasyon işlemi olarak adlandırılan bu prosedürün bakteri bulaşımına karşı daha etkin olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, kurulan deneme 4’de enfeksiyon oranını daha da düşürmek için sterilizasyon işlemi farklı uygulama sürelerinde kademeli olarak gerçekleştirilmiştir (% 2,5 dozda 5, 10, 15 veya 20 dakikaya ilaveten % 0,5 dozda 3 dakika). Bu şekilde, bir önceki denemede % 40 olan ortalama enfeksiyon oranının bu denemede % 25’e düşürülmesi başarılmıştır. En uzun uygulama süresi olan 20 dakikalık tek

aşamalı sterilizasyonda % 17 olan enfeksiyon oranı (deneme 3), uygulanan ikinci bir sterilizasyon işlemi ile (% 0,5 dozda 3 dakika), söz konusu kademeli sterilizasyon işleminin uygulanması ile (deneme 4'de) % 13'e düşmüştür.

Bu sonuçlar kademeli sterilizasyonun etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır. Josekutty ve arkadaşları (2003) da kademeli sterilizasyon işlemini muz bitkisinde uygulamışlar ve bu bitkide enfeksiyon oranını % 5-8 arasına çekmeyi başarmışlardır. Ancak buna karşın Ajayi ve arkadaşları (2006) gerçekleştirdiği çalışmada, kademeli sterilizasyon ve ortama antibiyotik ilave edildiği durumda dahi enfeksiyon oranının yüksek olduğu bildirmektedirler. Araştırmacılar bunun büyük oranda sistemik enfeksiyona bağlı olduğunu ifade etmektedirler. Bu bir önceki denemede (deneme 3) tartışılan olası iç bakteri bulaşımını (Whitesides and Spotts, 1991; Peñalver et al., 1994; Cassells, 2001; Van den Houwe and Panis, 2004; Thomas and Prakash, 2004; Ajayi et al., 2006) destekler niteliktedir. Buna göre farklı bitki dokularına yerleşmiş olan iç bakteriler yüzey dezenfeksiyonundan etkilenmemekte ve kültüre alma işleminden bir süre sonra ortamda enfeksiyon gelişimine neden olmaktadır (Van den Houwe and Panis, 2004; Ajayi et al., 2006).

Çalışma kapsamında, enfeksiyon problemine ilişkin kurulan son denemede (deneme 5) sterilizasyon işleminde kullanılan ultrasonun etkinliği incelenmiştir. Bunun için sürgün uçları sterilizasyon işleminden hemen önce steril saf su içerisinde ultrason işlemine tabi tutulmuştur. Deneme sonucunda, ortama ilave edilen gümüş nitratın da etkisi ile, 5 ve 10 dakikalık ultrason kullanımında enfeksiyon gelişimine rastlanmamıştır. Duckhouse ve arkadaşları (2004) sterilizasyon işleminde ultrason ve hipoklorit kullanımı üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada ultrasonun tek başına bakterileri öldürmek için yeterli olduğunu

bildirmişlerdir. Bunun yanında en iyi sonucun -bizim de uyguladığımız gibi- ultrasonun hipoklorit kullanımından hemen önce uygulanması ile elde edildiğini belirtmişlerdir.

Ancak uzun süreli ultrason kullanımı bitkilerde kararma oranını arttırmaktadır ve canlılık düşmektedir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın yanı sıra birçok araştırmada da bildirilmektedir. Scouten ve Beuchat (2002) yonca tohumu ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında sterilizasyon için ultrason, sıcaklık ve kimyasal ajanlar kullanmışlar ve sterilizasyon süresinin uzamasıyla birlikte tohum canlılığının azaldığını tespit etmişlerdir. Söz konusu denemede, bizim denememize benzer şekilde, kararma oranında da bir artış ortaya çıkmaktadır. Ancak deneme 5’de kurulan kontrol parseli incelendiğinde % 20 olan kararma oranının, 3 dakikalık ultrason kullanımında, beklenenin tersine bir düşüş göstererek, % 13 olduğu görülmüştür. Bu büyük oranda, denemenin değerlendirilmesi aşamasında enfeksiyon gelişimine bağlı olan kararmaların ayırt edilememesinden ileri gelmektedir. Enfeksiyon gelişiminin, diğer stres faktörleri gibi, bitkilerde fenolik bileşiklerin salgılanmasını arttırarak kararmayı tetikleyici etkisinin olduğu bilinmektedir (Keskitalo, 1999). Sonuç olarak, kararma oranındaki bu farklılığın ultason uygulanmayan parseldeki yüksek enfeksiyon oranına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışma süresince karşılaşılan kararma problemi enfeksiyon problemi kadar büyük ve belirsiz bir problem olmamıştır. Ayrıca birçok araştırmacının belirtmiş olduğu gibi (Dalal et al., 1993; Phoplonker and Caligari, 1993; Block and Lankes 1996; Prathanturatug et al., 1996; Figueiredo et al., 2000) karanlıkta bekletmenin kararma üzerine olan etkinliği ilk denemelerde test edilerek çalışma süresince uygulanmıştır.

Bu şekilde doku kararmalarının büyük ölçüde önüne geçmek mümkün olmuştur.

Farklı bitki türleri üzerine çalışan araştırmacılar, örneklerin kesimiyle birlikte kararma olayının başladığını ve bu nedenle kesim işleminin antioksidan çözeltisi içinde gerçekleştirildiğini bildirmektedirler (Bhatt and Dhar, 2004; Titov et al., 2006). Bu, doku kararmalarının çok hızlı gerçekleştiği özellikle muz bitkisi gibi hassas materyallerde uygulanması gereken bir işlemdir (Figueiredo et al., 2000; Titov et al., 2006). Ancak çalışma süresince enginar bitkisinde bu denli yoğun bir kararma olayı izlenmemiştir. Sürgünlerde, dış yapraklarının temizlenmesinden sterilizasyon işlemine kadar geçen 6-8 saatlik sürede kararma olayı gerçekleşmemektedir. Bunun yanında, sürgün uçlarında kararma olayı yoğun olarak sterilizasyon işleminde izlenmiş ve bazı araştırmacıların bildirdiği gibi (Scouten and Beuchat, 2002; Puchooa, 2004; Xu et al., 2005) sterilizasyon işleminin şiddetine bağlı olarak artış göstermiştir.

Ayrıca değerlendirmeye alınmamış olsa da, çalışma süresince sürgünlerin temin edilme zamanının, dokuların kararmasında etkin olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın ilerleyen safhalarında, kışın kurulan denemelerde, çalışmanın başladığı mevsim olan sonbaharda kurulanlara nazaran daha az kararma problemi ile karşılaşmıştır. Fenolik madde içeriklerinin mevsimsel değişimlerini inceleyen çalışmalar, elde edilen bu verileri destekler niteliktedir. Özen (1999) çalışmasında farklı enginar dokularındaki fenolik madde miktarının mevsime göre değişim gösterdiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, *Myrica esculenta* buch. bitkisiyle çalışan Bhatt ve Dhar (2004) bahar aylarında karama olayına bağlı ölümlerin yüksek olduğunu tespit etmiş ve bunun artan fenolik madde miktarına bağlı olabileceğini belirtmiştir.

Deneme 6'da kararma problemine yönelik olarak farklı fenol tutucu maddeler pek çok araştırmada olduğu gibi ortama ilave edilerek kullanılmıştır. Ortama ilave edilen maddeler kararma oranı üzerine tamamen etkin bulunmakla birlikte etkinlikleri farklı seviyededir. Çalışma neticesinde kararmayı önlemede en etkin sonuç % 15 kararma oranı ile 4 g l^{-1} PVP ilavesinde elde edilmiştir. PVP'nin hidrojen bağlarıyla polifenol bileşikler tutarak ve sentezlenmelerini yavaşlatarak doku kararmalarının önüne geçtiği bilinmektedir (Figueiredo et al., 2000). Ancak bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde araştırmacıların farklı görüşler ileri sürdüğü görülmektedir. Puchooa (2004) diğer araştırmacıların kararmaya karşı PVP ve aktif karbonu etkin olarak kullandıklarını ancak çalışmasında PVP'nin kararma üzerine herhangi bir etkisi olmadığını bildirmiştir. Benzer şekilde Bingshan ve arkadaşları (2000) kararmanın çok yoğun olarak gerçekleştiği çalışmalarında PVP'nin kararmayı engellemek için yeterli olmadığından bahsetmektedir. Reustle ve Natter (1994) çalışmalarında 5 g l^{-1} PVP'nin kararma oranını düşürdüğünü ancak tamamen önüne geçemediğini not etmektedir. Bununla birlikte araştırmacılar farklı dozlarda ($1, 5$ ve 10 g l^{-1}) ortama ilave edilen aktif karbonun kararmayı tamamen engellediğini belirtmişlerdir. Ancak Figueiredo ve arkadaşları (2000) farklı maddelerin kararma üzerine etkinliğini inceledikleri çalışmalarında en iyi sonucu 500 mg l^{-1} PVP ilavesiyle elde ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Bhatt ve Dhar (2004) ortama farklı dozlarda askorbik asit, sitrik asit, PVP ve aktif karbon ilave etmeleri sonucunda en az (% 20,84) kararma oranını 5 g l^{-1} PVP ilavesi ile elde ettiklerini belirtmişleridir.

Tüm bunların yanında çalışma süresince enfeksiyon (Keskitalo, 1999) gibi stres faktörlerine bağlı kararmalar deney sonuçlarının gözlenmesinde ve değerlendirilmesinde güçlüklerle yol açmıştır. Enfeksiyon gelişimi olan örneklerin bir bölümü ile ölümü gerçekleşen

örneklerin tamamında kararın olayı izlenmektedir. Bu nedenle, örneklerde kararın ve enfeksiyon oranlarının tespit edilmesinin mümkün olduğu halde, karara uğrayan örneklerin tam olarak yüzde kaçının enfeksiyon nedeniyle karardığını tespit etmek mümkün değildir. Bu da, özellikle enfeksiyon problemine ilişkin düzenlenen denemelerde kararın oranlarını tespit ederken güçlükler yol açmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma süresince ön denemeler dışında, enfeksiyon ve kararma problemlerine ilişkin 6 adet deneme kurulmuştur. Bu denemelerden 5'i enfeksiyon problemini konu alırken, bir tanesi kararma problemini çözmeye yönelik olarak düzenlenmiştir.

Çalışma süresince, enfeksiyon problemine ilişkin kurulan denemelerde elde edilen veriler bir sonra kurulacak olan denemede kullanılmış ve bu bu şekilde izlenecek olan sterilizasyon prosedürü optimize edilmiştir. Buna göre % 87 sağlıklı gelişen enfeksiyonsuz bitki oranı ile en başarılı sonuç başlangıç aşamasında ultrason cihazının (3 dakika – 40 KHz.) kullanıldığı kademeli sterilizasyon işleminde yani, deneme 5'den elde edilmiştir.

İzlenen bu prosedürde, bahçeden alınan sürgünler dış yaprakları ve çamurlu kısımları temizlendikten sonra anti-bakteriyel sabunla yıkanarak 6-8 saat akan çeşme suyunda durulanmıştır. Ardından sürgünler steril saf su içerisinde 3 dakika süre ile ultrason işlemine tabi tutularak sterilizasyon işlemine başlanmıştır. 20 saniye % 70'lik alkolde bekletilen sürgünler 10 dakika süre ile % 6'lık Captan çözeltisinde bekletilerek durulanmışlardır. Bu işlemlerden sonra sürgünler 15 dakika % 2.5 dozunda hazırlanmış olan sodyum hipokloritte 15 dakika, dış yaprakların kesilmesinin ardından da % 0.5 dozunda sodyum hipokloritte 3 dakika bekletilmişlerdir. 500 mg l⁻¹ ampiciline ilave edilmiş olan durulama suyunda 3 kez durulanarak meristem +1 yaprak kalacak şekilde kesilen sürgünler 100 mg l⁻¹ gümüş nitrat ilave edilmiş ortamlarda kültüre alınmışlardır. Bu şekilde % 87 oranında sağlıklı gelişen sürgün elde edilmiştir.

Çalışma süresince denemelerde izlenen sterilizasyon prosedürleri incelendiğinde, özellikle enginar gibi toprakla bulaşık olan örneklerin kullanıldığı denemelerde yoğun bir sterilizasyon prosedürünün uygulanması gerektiği görülmektedir. Ancak yüksek doz ve uzun süreli sterilizant uygulamalarında sürgünler hasar gördüğü için kullanılacak olan sterilizant maddenin düşük dozlarda ancak iki veya üç aşamada kullanılması önerilmektedir. Bununla birlikte fungal bulaşımın gözlendiği örneklerde sterilizasyon işlemi için fungusit kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada olduğu gibi, enfeksiyon oranının arzu edilen seviyelere çekilememesi halinde ultrason cihazının kullanılması da enfeksiyon gelişimine karşı uygulanabilecek etkin bir yöntemdir.

Bunlarla birlikte, cıvalı bileşikler gibi düşük dozlarda etkin olarak kullanılacak farklı sterilizant maddelere başvurulabilir. Ancak cıvalı bileşiklerin kullanımına, çevreye verdiği zararlar nedeni ile çalışma süresince yer verilmemiştir.

Yüksek enfeksiyon oranı görülen bitkilerde enfeksiyon gelişimini engellemek için ortama birtakım maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak antibiyotikler büyük ölçüde bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir. Bunun yanında antibiyotikler sıcaktan etkilendikleri için ortam hazırlanmasından sonra ilave edilmeleri gerekmektedir. Antibiyotiklere kıyaslandığında gümüş nitratin bitki gelişimine olumsuz bir etkisi tespit edilmemiştir. Bununla birlikte sıcaktan etkilenmediği için ortam hazırlanırken ilave edilebilmekte ve böylelikle ortamın hazırlanmasından sonra ilave bir işleme gerek kalmamaktadır.

Kararma problemine ilişkin kurulan denemede ortama ilave edilen fenol tutucu maddelerin etkinliklerinin kıyaslanması sonucunda en düşük kararma oranı (%15 ile) 4 g l-1 PVP ilave edilmiş olan MS ortamında gözlenmiştir. Denemede kullanılan ortamların normal MS'den tek farkı sterilize edilmeden önce 4 g l⁻¹ dozunda PVP ilave edilerek hazırlanmasıdır.

Kararmanın yoğun olarak gerçekleştiği bitki türlerinde kesim işlemi antioksidan madde çözeltileri içerisinde yapılabilir. Bununla birlikte sterilizasyon işleminden sonra örnekler antioksidan ilave edilmiş steril durulama suyu ile durulanabilir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan maddelerin yanı sıra sitrik asit askorbik asit ve sistin gibi maddeler ortama ilave edilerek kullanılabilir. Bunların yanı sıra kararma problemi olan tüm bitki türlerinde kültüre alma işleminin ilk birkaç günü örnekler karanlık ortamda bekletilmelidir. Ayrıca soğuk koşullarda bekletme işlemi de kararmaya karşı kültür odasında uygulanabilecek işlemler arasındadır.

Enfeksiyon ve kararma problemlerine karşı bunlar ve benzeri farklı işlemlerle elde edilen sağlıklı bitki oranının daha da yukarı çekilebileceği düşünülmektedir. Bu şekilde enginar doku kültürü çalışmalarında başlangıç aşamasında karşılaşılan bitki kayıpları en aza indirilebilir. Bu ticari üretimde yüksek verim anlamına gelmektedir. Bilimsel çalışmalar için ise kısa sürede yüksek sayıda sağlıklı bitki eldesi çalışmanın yapılacağı asıl konuya daha rahat odaklanma imkânı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abak, K.**, 1987, Enginar ve Kuşkonmaz Yetiştiriciliği, TAV Yay., Yalova, 64s.
- Ajayi, S.A., Berjak, P., Kioko J.I., Dulloo, M.E., Vodouhe, R.**, 2006 Observation on *in vitro* behaviour of the zygotic axes of fluted pumpkin. African Jurnal of Biothecnology Vol. 5 (15), pp. 1397-1404, 3 August 2006
- Alphonse, M., Badawi, M.A., Abd-Elal, T.M.**, 2002, Physiological studies on the *in vitro* micropropagation of some artichoke genotypes: I - Sterilization, multiplication and elongation stages. Egyptian Journal of Horticulture, 2002, publ. 2004 (Vol. 29) (No. 3/4) 377-395.
- Akıncı İ.E.**, 1990, Enginarın (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* vegetatif çoğaltılmasında besi ortamına ilave edilen NAA ve Kinetin'in sürgün verimi ve kalitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi.
- Ancora, G., Belli-Donni, M. and Couzzo, L.**, 1981, Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation, Scientia Horticulture 14: 207-213.
- Ancora, G.**, 1986, Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 2: Crops 1 Berlin, p. 471-484.
- Arab L. and Ehsanpour A.A.**, 2006, The effects of ascorbic acid on salt induced alfalfa (*Medicago sativa* L.) in *in vitro* culture Biokemistri, Vol. 18, No. 2, December, 2006, pp. 63-69.
- Aubert, S. et Foury, C.**, 1979, Couleur et Pigmentation anthocyanique de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) In Studi Sul Carciofo. Atti 3° Congresso Internazionale Du Stud. Carciofo, Bari, 57-76, 1979.
- Basnizki, J.**, 1979, Research on growth physiology of the artichoke. Estratto da Atti 3° Congresso Internazionale Du Stud. Carciofo, Bari, 27-30, 1979.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Basso, F.**, 1974, Influenza Della Posizione Dela Geme Delgi “Ovoli2 Sula Produzione E Precocita Del Carciofo. Atti Del. 2. Internazionale Sul Carciofo Nuvoi, Studi, Sul Carciofo, p.327. Bari.
- Bayraktar, K.**, 1981, Sebze Yetiştirme. Kültür Sebzeleri, E.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:169. Bornova İzmir.
- Bhatt, I.D. and Dhar, U.**, 2004, Factors controlling micropropagation of *Myricaesculenta buch.* – Ham. ex D. Don: a high value wildedible of Kumaun Himalaya. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (10), pp. 534-540.
- Bianco, V.V.**, 2000, Present Situations and Future Potentials of Artichoke in The Mediterranean Basin. IV. International Congress on Artichoke, Oct. 17-21, Bari, Italy.
- Bingshan, Z., Hungacan, X., Ying, L., Guangtian Y. and Zhenfei, Q.**, 2000, Tissue culture for mass propagation and conservation of rattans. Research on Rattans in China. Online: http://www.bioversityinternational.org/publications/Web_version/576/ch22.htm
- Block, R. and Lankes, C.**, 1995, Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment. Gartenbauwissenschaft 60: 276-279.
- Brunner, I., Echegary, A. and Rubluo, A.**, 1995, Isolation and characterization of bacterial contaminants from *Dieffenbachia amoena* Bull, *Anthurium andreanum* Linden and *Spathiphyllum* sp. Shoot cultured *in vitro*. Scientia Horticulturae 62: 103-111.
- Brutti, C., Apóstolo, N.M., Ferrarotti, S.A., Llorente, B.E. and Krymkiewicz, N.**, 1999, Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Laboratorio de Química Biológica, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján. Buenos Aires, Argentina. (Available online 20 December 1999).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Buckley, P.M., DeWilde, T.N. and Reed, B.M.,** 1995, Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant 31: 58-64.
- Cassells A. C.,** 2001, Contamination and its impact in tissue culture. *Acta Hort.* 560, pp.117-121.
- Cirnu, I.,** 1988, Anghinarea și topinamburul, surse tirzii, valoroase de nectar și polen. (Globe and Jerusalem artichokes as valuable sources of nectar and pollen) *Apicultura Romano*. 63 (7): 7-8. *Hort. Abst.* 60: 284; 1990.
- Compton, M.E., Preece, J.E.,** 1986, Exudation and explant establishment. *NS Int. Assn. Plant Tissue Culture* 50: 9-18.
- Dalal, M.A., Sharma, B.B., Mir, N.A. and Sahni, C.K.,** 1993, Initiation culture mode and subculturing in *in vitro* culture of grapevine-control of oxidative browning. *Annals of Agricultural Research* 14: 168-172.
- Dedeoğlu, İ.,** 2007, <http://www.bahcesel.com/content/view/3007/3067/>
- Delaveau Le, C.,** 1985, Le Concours, *Medical* 29, 242371-2372.
- De Vos, N.E.,** 1992, Artichoke production in California. *HortTechnology* 2 (4): 438-444.
- van Doorn, W.G., de Stigter, H.C.M., de Witte, Y. and Boekestein, A.,** 1991, Micro organisms at the cut surface and in xylem vessels of rose stems: a scanning electron microscope study. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 34-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duckhouse, H., Mason, T.J., Phull, S.S. and Lorimer, J.P.,** 2004, The effect of sonication on microbial disinfection using hypochlorite. *Ultrasonics Sonochemistry* Volume 11, Issues 3-4, May 2004, Pages 173-176. 4th Conference on the Applications of Power Ultrasound in Physical and Chemical Processing.
- Düzyaman, E. and Ünver-Düzyaman B.,** 2005, Fine-tuned head weight estimation in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *HortScience*, 40: 525-528.
- Eser, B., Mohammad, J.A., and Özen, Ş.,** 2000, Effects of Apex Removal of Rooted Offshoots at The Artichoke Production. IV International Congress on Artichoke, October 17-21, Valenzano-Bari-Italy. *Acta Horticulturae* 681.
- Eser, B., İlbi, H. and Uğur, A.,** 2006, Enginar Yetiştiriciliği, Hasat Yayıncılık Ltd. Şti., Ekim 2006, s. 7.
- FAOSTAT,** 2007 <http://faostat.fao.org/site/336/DesktopDefault.aspx?PageID=336>
- Figueiredo, S.F.L., Albarello, N. and Viana, V.R.C.,** 2000, Micropropagation of *Rollinia Mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:471-475, July-August 2001.
- Herman, E.B.,** 2004, Microbial "Contaminants" in Plant Tissue Cultures: Solutions and Opportunities 1996-2003, Volume 8 of Recent Advances in Plant Tissue Culture.
- Housti, F., Coupe, M. and D'Auzac, J.,** 1992, Effect of ethylene on enzymatic activities involved in the browning of *Hevea brasiliensis* callus. *Physiologia Plantarum* 86: 445-450.
- Van den Houwe, H.I., and Panis, B.,** 2004, Banana cell and tissue culture - review – Strosse. Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations. Available on line at: <http://chipbooks.com>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iapichino, G.**, 1996, Micropropagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) from underground dormant buds (Ovoli). World Congress on *In Vitro* Biology, San Francisco, CA , ETATS-UNIS (22/06/1996) 1996, vol. 32, n^o 4, pp. 305-315.
- Jones, A.L., Aldwick, H.S.**, 1990, Compendium of Apple and Pear Disease. American Phythopathological Society Press: 1990 Pgs 61-63 available on line at: <http://plantsciences.montana.edu/horticulture>.
- Josekutty, P.C., Cornelius, S.S. and Kilafwasru T. N.**, 2003, Micropropagation of four Banana Cultivars in Micronesia Micronesica Supplement 7: 77–81, 2003.
- Keskitalo, M.K.**, 1999, Exploring Biodiversity to Enhance Bioactivity in The Genus *Tanacetum* Through Protoplast Fusion. University of Helsinki, Finland. ISBN 951-45-8965-3. pp. 34-40.
- Koçer G.**, 1993, Sakız Enginar Çeşitinde (*Cynara scolymus* L. Cv. Sakız) Verim Dağılımına, Bitki Yaşı, Uyandırma Suyu Veriliş Zamanı ve GA₃ Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. E.Ü. Ziraat Fakültesi.
- Koubouris, G. and Vasilakakis, M.**, 2005, Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar ‘Bebecou’. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2006) 85: 173–180.
- Laukkanen, H., Häggman, H., Kontunen-Soppela, S., Hohtola, A.**, 1999, Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiologia Plantarum 106: 337 343.
- Leifert, C. and Cassells, A.C.**, 2001, Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 37: 133–138.
- Leifert, C., Waites, W.M.**, 1992, Bacterial growth in plant tissue cultures. Journal of Applied Bacteriology 72: 460-466; 1992.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leifert, C., Waites, W.M., Nicholas, J.R.,** 1989, Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology* 67: 353-361.
- Liesebach, M. and Naujoks, G.,** 2004, Approaches on vegetative propagation of difficult-to-root *Salix caprea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 239–247, 2004.
- Macit, F. ve Şalk A.,** 1970, Enginar. E.Ü. Ziraat Fakültesi Teknik.No.14.
- Madhusudhanan, K. and Rahiman, B.A.,** 2000, The effect of activated charcoal supplemented media to browning of *in vitro* cultures of Piper species. Central Plantation Crops Research Institute, India. *Biologia Plantarum Prague*. [print] 43(2): 297-299.
- Marzi, V.,** 1981, A three year trial of sixteen globe artichoke cultivars *Industria Grafica Laterza* 393-421.
- Moncousin, C.,** 1981, Rapid vegetative propagation of *Cynara scolymus* L. II. Improvement of the various techniques. *Hort. Abstr.* 51: 6926.
- Morison, N., BE. Vaissiere, F. Martin, P. Pecaut, G. Cambon,** 2000, Pollination of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by honey bees (*Apis mellifera* L.) to produce hybrid seed under enclosure. *APIDOLOGIE*.
- Murashige, T., Skoog, T.,** 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
- Müller, A., Diemann, E., Sassenberg, P.,** 1988, Chromium contents in medicinal plants used for treating diabetes mellitus type II. *Naturwissenschaften* 75 (3) 155-156. (H.A. Vol 59.5175).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Orlikowska, T.**, 1997, Silver nitrate inhibits bacterial growth in plant tissue. *Cultures Agricell Report* 29 (4): 25, October, 1997
- Özen, Ş.**, 1999, Sakız Enginar Çeşitinde (*Cynara scolymus* L. Cv. Sakız) Görülen Tek Yönlü Değişimin Fizyolojik Nedenleri Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. E.Ü. Ziraat Fakültesi.
- Özzambak, E. ve Yoltaş, T.**, 1988, Enginar (*Cynara scolymus* L. Cv. Sakız) yetiştiriciliğinde uygulanan yeni üretim yöntemleri. E.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. Vol. 25, No.1. 345-351, Bornova.
- Pécaut, P.**, 1983, Amélioration des variétés d'artichaut: variétés à multiplication végétative, variétés à multiplication par semences, clones sans virus issus de multiplication *in vitro*. Procès-verbal de la Séance de 12 janvier, Académie d' Agriculture de France pp 69–78.
- Pécaut, P.**, 1993, Globe Artichoke *Cynara scolymus* L. In: Kallo G, Bergh BD (eds) Genetic improvements of vegetable crops. Pergamon, Oxford, p. 737–746.
- Pécaut, P., De Dumas, V. and Lot, H.**, 1983, Virus Free Colonies of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) obtained after *in vitro* propagation. *Acta Hort.* 131: 303-309.
- Pécaut, P. et Foury C.**, 1992, L'artichautvoir Gallais et Bonnerot.
- Pelt, J.M.**, 1993, Des Legumes, Livre de poche. *Fayard* (1993).
- Peñalver, R., Durán-Vila, N. and López, M.M.**, 1994, Characterization and pathogenity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Annals of Applied Biology* 125: 501-513.
- Prakash, A.H., Rao, K.S. and Kumar, M.U.**, 1997, Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *Journal of Biosciences* 22: 339-344.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Puchooa D.**, 2004, *In vitro* regeneration of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) African Journal of Biotechnology Vol. 3, No. 11, November, 2004 pp. 576-584.
- Reustle, G. and Natter, I.**, 1994, Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). Vitis 33, 117-121 (1994).
- Roberts, R.G., Hale, C.N., Van Der Zwet, T., Miller, C.E. & Redlin, S.C.**, 1998, The potential for commercial spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via apple fruit: a critical review and risk assessment. Crop Protection 17: 19-28.
- Rossi, V., and De Paoli, G.**, 1992, Micropropagation of Artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.),. Biotechnology in Agriculture and Forestry: High-Tech and Micropropagation II, Vol 19. Springer-Verlag, Berlin, pp.118-134.
- Rossi, V. And De Paoli, G.**, 1994, Micropropagation of artichoke, L'informatore agrario 118-134.
- Rottenberg, A. and Zohary, D.**, 1996, The wild ancestry of the cultivated artichoke. Genetic Resources & Crop Evolution.43 (1): 53-58.
- Ryder, E.J., De Vos, N.E., and Bari, M.A.**, 1983, The Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) . Hort. Sci., 18: 646-653.
- Schneider, F.**, 2005, Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa* sp. L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) Ph. D.Thesis, Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Department für Pflanzenwissenschaften Lehrstuhl für Zierpflanzenbau.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scouten, A.J. and Beuchat L.R.**, 2002, Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on alfalfa seeds. Journal of Applied Microbiology 2002, 92, 668±674.
- Shields, R., Robinson S.J. and Anslow, P.A.**, 1984, Use of fungicides in plant tissue culture. Volume 3, Number 1 / February, 1984 pg:33-36 1432-203X (Online).
- Sonnante, G., De Paolis, A., Lattanzio, A. and Perrino, P.**, 2001, Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers Genetic Resources and Crop Evolution 49: 247–252, 2002.
- Şimşek G.**, 1988, Enginar Araştırmaları Projesi. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı. Açıkta sebze yetiştiriciliği projesi, Yalova.
- TEDGEM**, 2007, <http://www.bahcesel.com>.
- Teixeira S.L., Ribeiro J.M., Teixeira, M.T.**, 2006, Influence of NaOCl on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2006) 86:375–378.
- Thomas, P.**, 2004, *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 173–179, 2004.
- Titov, S., Bhowmik, S.K., Mandal, A., Alam, Md.S. and Udin, S.N.**, 2006, Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from *Musa* spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2 (3): 97-104.
- Toponi.**, 1960, Researches sur le développement de fragments de bractées d'artichaut. C.R.Acad. Sci. 250-2439-2441.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toth, K., Haapala, T. and Hohtola, A.** 1994, Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. *Biologia Plantarum* 36: 511-517.
- Uğur A.,** 2005, Enginarın Hızlı Çoğaltılmasında Bazı Vegetatif Yöntemlerin Kullanılma İmkanlarının Araştırılması. Doktora Tezi. E.Ü. Ziraat Fakültesi.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program.,** Germoplasm Resources Information Network - (GRIN). *Mentha pulegium* [Internet] - [cited 2003 July 22]. Available from: http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl
- Valkonen, J.P.T., von Heiroth, W., Savela, M.L.,** 1993, Fungi and Gram-negative bacteria as soilborne minor pathogens of goat's rue (*Galega orientalis* Lam.). *Annals of Applied Biology* 123: 257-269.
- Vetrano, F., Ianpichino, G., and Guella, V.,** 2000, Propagation of Artichoke cv. Romanesco from Underground Stem Sections. 8th. International Symposium on Timing of Field Production in Vegetable Crops, Bari, Italy. *Acta Horticulturae*, 533:593-596.
- Vural, H., Eşiyok, D. Ve Duman, İ.,** 2000, Kültür Sebzeleri, Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova, İzmir. s. 397.
- Wang, Q.C., Tang, H.R., Quan, Q. and Zhou, G.R.,** 1994, Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji'apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 69: 833-839.
- Whitesides, S.K. and R.A. Spotts.,** 1991, Induction of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Pathology* 40: 118-127.
- Wohlmuth, H.** *Botanical Pathways* (www.botanicalpathways.com)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Xu, T., Zhang, L., Sun, X., and Tang, K., 2004, Efficient *in vitro* plant regeneration of *Pinellia Ternata* (Thunb) Breit. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47/2: 27–32, 2005.

Yalçın, N., Y., 1992, Enginarın *in vitro* çoğaltılmasında Besi Ortamına Katılan NAA, IBA, Riboflavin ve Aktif Karbonun Küklenme Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi.

Zhu, Y.M., Hoshino, Y., Nakano, M., Takahashi, E. and Mii, M., 1996, Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis by using embryogenic callus culture and activated charcoal. Available online: Dec. 1997, <http://www.sciencedirect.com/science?>

<http://artichokes.org>, California Artichoke Advisory Board. Dataweb. Accessed July 2005

<http://www.botanicalpathways.com/issue09/Artichoke.html>

<http://www.fas.usda.gov/ustrade>, United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service (FAS). Trade Database.

<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Statistical Database- Agriculture. Accessed July 2005.

http://www.kkgm.gov.tr/birim/bitkikoruma/teknik_talimat.

<http://usda.mannlib.cornell.edu/data-sets/specialty/89011>, United States Department of Agriculture, Economic Research Service (ERS). Vegetables and Melons Yearbook 2005.

<http://www.slugsandsalal.com>

<http://www.taraklienginari.com>

ÖZGEÇMİŞ

23.02.1981 yılında Denizli’de doğdum. İlk öğrenimi 19 Mayıs ilk okulunda, orta öğrenimi Pamukkale Ortaokulu ve Anafartalar Lisesi’nde tamamladım. 1999 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesinde lisans öğrenimine başladım. 2004 yılında Bahçe Bitkileri bölümünden mezun olmamın ardından, 2005 yılında aynı bölümde yüksek lisans öğrenimine başladım. Ders aşamasını öğrenci değişim programı ile gittiğim Mediterranean Agronomic Institute of Chania’da *Horticultural Genetics and Biotechnology* bölümünde tamamladım. 2007 yılında askerlik görevimi yerine getirdim. Aralık 2007’de Syngenta Tarım San. ve Tic. A.Ş. – Tohum bölümünde çalışmaya başladım. Halen, ilgili firmada üretim uzmanı olarak görev yapmaktayım.