

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) BİTKİSİ BALCI ÇEŞİDİNİN
DOKU KÜLTÜRÜYLE *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

ŞEYDA KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEMİHA ERİŞEN

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) BİTKİSİ BALCI ÇEŞİDİNİN
DOKU KÜLTÜRÜYLE *IN VITRO* ÇOĞALTIMI**

Şeyda KAYA tarafından hazırlanan tez çalışması 06.07.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Selma ONARICI
TÜBİTAK MAM

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakarlığı sağlayan, bilgi, tecrübe ve güleryüzü ile çalışmama ışık tutan tez danışmanım değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Semiha ERİŞEN'e,

Kilometrelerce uzaktaki ailemin yokluğunu hiçbir zaman hissettirmeyen İstanbul'daki ailem, sevgili Betül KAYA ve Rıdvan ARIKAN'a,

Ayrıca tezimin her aşamasında, benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Sevde BİLTEKİN, Pelin ŞAHİN ve Elif SERTEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı, aramıza kilometrelerce mesafe girmiş olmasına rağmen benden maddi-manevi desteklerini bir an bile esirgemeyen ve bugünlere gelmemi borçlu olduğum çok değerli AILEM'e ithaf ederim.

Mayıs, 2017

Şeyda KAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	2
1.1 Literatür Özeti	3
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	6
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i>) Bitkisi	8
2.2 Bitki Doku Kültürü	11
2.2.1 Bitki Doku Kültürü Tanımı ve Tarihiçesi.....	11
2.2.2 Bitki Doku Kültürü Kullanım Alanları	13
2.2.2.1 Islah Alanındaki Uygulamalar	13
2.2.2.2 Islah Dışı Uygulamalar	15
2.2.2.3 Araştırma Alanındaki Uygulamalar	16
2.2.3 Bitki Doku Kültürü Teknikleri	16
2.2.4 <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Teknikleri	18

2.2.4.1	Organogenez	18	
2.2.4.2	Somatik Embriyogenez.....	20	
2.2.5	Bitki Doku Kültürü Aşamaları.....	20	
BÖLÜM 3			
MATERYAL VE METOD			22
3.1	Materyal.....	22	
3.1.1	Bitki Materyali	22	
3.1.2	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	22	
3.1.3.1	Bitki Büyüme Düzenleyicileri Çözücüleri ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	25	
3.2	Metod	26	
3.2.1	Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	26	
3.2.2	Besin Ortamları ve Kültür Koşulları	26	
3.2.3	Sterilizasyon.....	28	
3.2.3.3	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	28	
3.2.4	Eksplant İzolasyonu ve Kültüre Alınması	30	
3.2.5	Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	30	
BÖLÜM 4			
BULGULAR VE TARTIŞMA.....			31
4.1	In Vitro Sterilizasyon Çalışmaları.....	31	
4.1.1	Juglonun Fungal Kontaminasyona Etkisi	31	
4.2	Aspir Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları	34	
4.2.1	BAP'ın Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	34	
4.2.1.1	Hipokotil ve Kotiledon Eksplantlarında Etkisi	35	
4.2.1.2	Nod Eksplantlarında Etkisi.....	39	
4.2.2	TDZ'nin Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi	42	
4.2.2.1	Hipokotil ve Kotiledon Eksplantlarında Etkisi	42	
4.2.3	2,4-D'nin Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	46	
4.2.3.1	Hipokotil ve Kotiledon Eksplantlarında Etkisi	46	
4.2.4	KIN'in Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	50	
4.2.4.1	Nod Eksplantlarında Etkisi.....	50	
BÖLÜM 5			
SONUÇ VE ÖNERİLER			53
ÖZGEÇMİŞ.....			60

SİMGE LİSTESİ

μ Mikro
° Derece
% Yüzde



KISALTMA LİSTESİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
BAP	Benzilaminopürin
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
dH ₂ O	Distile Su
DMSO	Dimetil sülfoksit
EtOH	Etil alkol (Etanol)
HCl	Hidroklorik asit
HgCl ₂	Civa (II) klorür
IAA	Indol asetik asit
IBA	Indol bütirik asit
KIN	Kinetin
MS	Murashige & Skoog
NAA	Naftalinen asetik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
TDZ	Thidiazuron
ZEA	Zeatin

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1	Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i>) bitkisinin görüntüsü.....	10
Şekil 4. 1	Sterilizasyon ajanı olarak HgCl ₂ ile muamele edilen ve <i>in vitro</i> da çimlendirilen aspir tohumları.....	32
Şekil 4. 2	Juglon ile muamele edilen ve <i>in vitro</i> da çimlendirilen steril Aspir tohumları.....	33
Şekil 4. 3	Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarını içeren besin ortamında aspir hipokotil eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu	37
Şekil 4. 4	Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarını içeren besin ortamında aspir kotiledon eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu.....	39
Şekil 4. 5	Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarını içeren besin ortamında aspir nod eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu	42
Şekil 4. 6	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarını içeren besin ortamında aspir hipokotil ve kotiledon eksplantlarına ait kallus ve sürgün oluşumu.....	46
Şekil 4. 7	Farklı 2,4-D ve KIN konsantrasyonlarını içeren besin ortamında aspir hipokotil ve kotiledon eksplantlarına ait kallus oluşumu	50
Şekil 4. 8	Farklı KIN ve NAA konsantrasyonlarını içeren besin ortamında aspir nod eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu. 0.5 mg l ⁻¹ KIN içeren MS besin ortamında gelişen nod eksplantı.....	52

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1	Cronquist sınıflandırma sistemine göre <i>Carthamus tinctorius</i> türünün sistematığı	8
Çizelge 2. 2	Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar	12
Çizelge 2. 3	Bitki Doku Kültürü Teknikleri	17
Çizelge 2. 4	Organogenesis Tipleri	19
Çizelge 2. 5	Bitki Doku Kültürü Aşamaları	21
Çizelge 3. 1	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	24
Çizelge 3. 2	Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Hazırlanması	25
Çizelge 3. 3	MS Besin Ortamı İçeriği	27
Çizelge 3. 4	Aspir tohumlarına uygulanan Sterilizasyon Protokolleri	28
Çizelge 3. 1	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	24
Çizelge 4. 1	Sterilizasyon protokollerine göre kontaminasyon durumları	31
Çizelge 4. 2	Aspir bitkisi Balcı çeşidine ait kontaminasyon ve çimlenme grafiği	34
Çizelge 4. 3	Farklı BAP Ve naa konsantrasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu	35
Çizelge 4. 4	Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu	35
Çizelge 4. 5	Farklı BAP Ve NAA konsantrasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu	37
Çizelge 4. 6	Farklı BAP Ve NAA konsantrasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu	37
Çizelge 4. 7	Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu	40
Çizelge 4. 8	Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu	40
Çizelge 4. 9	Farklı TDZ Ve NAA konsantrasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu	42
Çizelge 4. 10	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu	42
Çizelge 4. 11	Farklı TDZ Ve NAA konsantrasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu	44

Çizelge 4. 12	Farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait sonuçlar	44
Çizelge 4. 13	Farklı 2,4-D ve KIN konsantrasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu.....	47
Çizelge 4. 14	Farklı 2,4-D ve KIN konsantrasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu	47
Çizelge 4. 15	Farklı 2,4-D ve KIN konsantrasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu.....	48
Çizelge 4. 16	Farklı 2,4-D ve KIN konsantrasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu	48
Çizelge 4. 17	Farklı KIN ve NAA konsantrasyonlarının aspir nod	51
Çizelge 4. 18	Farklı KIN ve NAA konsantrasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait sonuçlar	51



**ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) BİTKİSİ BALCI ÇEŞİDİNİN
DOKU KÜLTÜRÜYLE *IN VITRO* ÇOĞALTIMI**

Şeyda KAYA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Semiha ERİŞEN

Bu tez çalışması, Aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisinin Balcı çeşidinin *in vitro* hızlı çoğaltımı amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada, *in vitro*'da yetiştirilen steril fidelerden elde edilen eksplantlar kullanılmıştır. Sterilizasyon işlemi için sodyum klorid ve civa klorürün farklı konsantrasyonları denenmiş ve en iyi sonuç; tohumların %70'lik EtOH'de 5 dk muamele sonrası dH₂O ile durulanması ardından %0,1'lik HgCl₂ çözeltisinde 15 dk karıştırıldıktan sonra 4 kez 5'er dk dH₂O ile durulanması protokolünden elde edilmiştir. Sterilizasyon için sodyum klorid ve civa klorür kullanımına ek olarak besin ortamında oluşan fungal kontaminasyonu engellemek amacıyla antifungal etkisi bilinen juglon maddesi ile bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada besin ortamına 250 µg/ml veya 500 µg/ml juglon ilave edilmiş ve fungal kontaminasyona etkisi belirlenmiştir. Juglon konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak besin ortamındaki fungal kontaminasyonu azalttığı tespit edilmiştir.

In vitro hızlı çoğaltım için nod eksplantları farklı konsantrasyonlarda BAP veya KIN içeren ortamlar ve bunların NAA ile kombinasyonunu içeren ortamlarda; hipokotil ve kotiledon eksplantları ise farklı konsantrasyonlarda BAP veya TDZ ile bunların NAA'li kombinasyonlarını içeren ortamlar ve farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 0.5 mg l⁻¹ KIN'li kombinasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Denemeler sonunda eksplant başına en çok sürgün sayısı nod eksplantında 3,76 adet ile 0.5 mg l⁻¹ KIN içeren MS besin ortamından; hipokotil eksplantında 1,0 adet ile 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamından; kotiledon eksplantında ise 8,33 adet ile 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aspir, juglon, kontaminasyon, sürgün, rejenerasyon

***IN VITRO* PROPAGATION WITH TISSUE CULTURE OF SAFFLOWER
(*Carthamus tinctorius* L.) BALCI CULTIVAR**

Şeyda KAYA

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Semiha ERİŞEN

This thesis aimed *in vitro* propagation of some safflower cultivars. In this study, explants that obtained sterile seedling were used. The best results for seed sterilization were obtained from the seeds were rinsed with dH₂O for 1 min 5 min after treatment with 70% EtOH, and after mixing for 15 min in 0,1% HgCl₂ solution, the seeds were finally rinsed 4 times with 5 min dH₂O. In addition to the use of sodium chloride and mercury chloride for sterilization, in order to prevent fungal contamination in the basal medium, a study with juglone agent known antifungal activity were performed. In this study 250 µg/ml or 500 µg/ml juglone was added to the basal medium. The effect of fungal contamination was determined. It has been found to reduce that fungal contamination in the basal medium depending on the increase in juglone concentration.

For *in vitro* propagation, hypocotyl, cotyledone and node explants were cultured on MS basal medium containing BAP, KIN and TDZ alone or combinations with some auxine 2,4-D, NAA. The highest number of shoots per explant from node explants (3,76 shoots) was obtained on MS medium containing 0.5 mg l⁻¹ KIN; from hypocotyl explants (1,0 shoots) was obtained on MS medium containing 2.0 mg l⁻¹ BAP; from cotyledone explants (8,33 shoots) was obtained on medium containing 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA.

Keywords: Safflower, juglone, contamination, shoot, regeneration



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ülkemizdeki tarımsal alanlar yüksek oranda yağlı tohum üretim potansiyeline sahiptir fakat yağlı tohum üretimi yeterli ve istenilen düzeye çıkarılamamıştır. Bitkisel yağ ihtiyacı yıldan yıla artmakta ve buna bağlı olarak ortaya çıkan yağ açığının %70'e yakını ithalat yoluyla karşılanmaktadır [1].

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Asteracea (Compositae) familyasından tek yıllık yağlı tohumlu bir bitkidir. Tohumlarında bulunan %35-45 oranındaki yağ, doymuş yağ asitleri yüzdesinin düşük, doymamış yağ asitleri yüzdesinin yüksek olması nedeniyle kaliteli bir yağdır. Bununla birlikte geniş adaptasyon yeteneğine sahip, orijini Anadolu olan, kuraklık şartlarında veya kısıtlı yağış şartlarında yetişebilen bir bitkidir. Bu açıdan değerlendirildiğinde aspir (*C. tinctorius* L.) alternatif bir yağ bitkisi olabilecek potansiyele sahiptir.

Aspirden ekonomik düzeylerde verim alınabilmesi için, bir taraftan modern yetiştiricilik yöntemlerinin geliştirilmesi, diğer taraftan da ileri ıslah metotları kullanılarak yeni çeşitlerin elde edilmesi gerekmektedir [2]. Aspir tarımının ülkemizde gelişememe nedeni mevcut çeşitlerin kuru tarım alanlarında düşük tohum verimi ve buna bağlı olarak düşük yağ oranı vermeleridir. Yürütülen aspir (*C. tinctorius* L.) ıslah çalışmalarının ana amacı da bu olumsuzluğu ortadan kaldırmak için soğuğa ve kuraklığa toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi yönündedir [3]. Islahçılar bu özelliklere sahip çeşitleri geliştirmek için MAS (markör destekli seleksiyon), *in vitro* seleksiyon, somaklonal varyasyonların kullanımı gibi biyoteknolojik yöntemlerden

faaydalanabilirler. Ancak aspir hakkında var olan bilgi birikimindeki eksikler bu yöntemlerin kullanımını kısıtlamaktadır [4, 5].

Günümüzde bitki ıslahçıları yüksek verimli, kaliteli ve stres faktörlerine dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek üzere klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan, destekleyen ve hızlandıran biyoteknolojik yöntemlerden yararlanma yoluna gitmektedirler. Biyoteknolojinin sınırları çok geniş olup değişik uygulama alanlarını içine almaktadır. Bu uygulama alanlarından bir tanesi de doku kültürü yoluyla yapılan uygulamalardır. İslah süresinin kısaltılması konusunda ıslahçıya avantaj sağlayabilme potansiyeli taşıyan *in vitro* rejenerasyonun gerçekleştirilebilmesi, kullanılabilmesi etkili doku kültürü protokollerin oluşturulmasına bağlıdır.

1.1 Literatür Özeti

Aspir bitkisinde doku kültürü çalışmaları 1980'li yıllara dayanmaktadır. Bu alanda ilk çalışma Hindistan'da yetişen üç farklı aspir çeşidinin kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılarak yürütülmüş ve farklı büyüme düzenleyicileri eklenen MS besin ortamı kullanılmıştır. İki farklı eksplant çeşidi karşılaştırıldığında kotiledon eksplantlarından daha iyi sonuç alındığı ve KIN, zeatin, 2-ip gibi sitokininleri içeren ortamlarda sürgün gelişiminin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Buna ek olarak BA ve NAA kombinasyonları denenmiş ve bu ortamlarda sürgün gelişiminin yavaş ve az olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada toplamda üç farklı aspir çeşidi kullanılmış ve ikisinde mikroçoğaltımın başarılı olduğu, bu yüzden genotipin rejenerasyon çalışmalarında etkili olduğu bildirilmiştir [6].

Hindistan çeşitleri ile yapılan bir diğer çalışmada ise, 10 farklı genotipteki aspir çeşitleri ile anter kültürü yöntemi uygulanarak haploid bitki eldesi üzerine, genotip, bitki yetişme koşulları, besin ortamı gibi farklı parametrelerin etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bu parametrelerden; genotip ve yetişme koşulunun haploid bitki eldesi üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Tarla şartlarında yetişen bitkilerden alınan anterlerde daha yüksek oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Anterlere uygulanan sıcaklık ön uygulaması sonucunda ise 3 ile 5 gün arasında yapılan ön uygulama ile kallus oluşum yüzdesinin arttırıldığı belirtilmiştir. Farklı büyüme düzenleyicilerinin ilave edildiği ortamlarda en iyi sonuçların sürgün rejenerasyonu için BAP (2.0 mg/l) ve NAA

(0.5 mg/l) içeren MS ortamında; sürgün köklendirilmesi için ise 0.1 mg/l NAA ve % 1 şeker içeren ½ MS ortamında gerçekleştiği görülmüştür [7].

Amerikan çeşitleri ile yapılan bir diğer çalışmada TDZ içeren besin ortamında vitrifikasyon probleminin azaldığını ve buna karşılık sürgün sayısında artış olduğunu rapor etmişlerdir [8]. Sürgünlerin köklendirilmesinde karşılaşılan vitrifikasyon problemine çözüm olarak yapılan çalışma ile besin ortamına düşük konsantrasyonlarda şeker ve aktif karbon ilavesinin etkili olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak besin ortamına eklenen oksin kaynağı, konsantrasyonu gibi faktörlerin de kallus oluşumunda büyük bir katkısı olduğunu aktarmışlardır. Fakat oksin kaynağı, konsantrasyonu gibi faktörlerin kallus oluşumu aksine kök oluşumunda etkisi olmadığını belirtmişlerdir [9].

Hindistan'da yetişen aspir çeşitlerinin kullanıldığı diğer çalışmada, oksin/sitokin oranının 1'den büyük olduğu takdirde kallus büyümesinin arttığı gözlenmiştir [10]. Ayrıca, aspir doku kültürü çalışmaları kapsamında ortama gümüş nitrat ilavesinin embriyo oluşumu ve gelişimini olumlu etkilediği bildirilmiştir [11]. Somatik embriyo oluşumunun gözlemlendiği bir çalışmada ise kullanılan oksin kaynağı ile konsantrasyonunun etkili olduğu belirtilmiş ve sonuçlara göre en iyi oluşumun 2 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edildiği rapor edilmiştir [12].

İlerleyen yıllarda, farklı sitokinlerin NAA ile kombinasyonlarını içeren ortamlarda çalışmalar yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda sürgün rejenerasyonu yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonucu TDZ x NAA kombinasyonunu içeren ortamlardan elde edildiği bildirilmiştir [13].

Aspir bitkisinin Hindistan çeşitlerinden NARI-6 ile yapılan çalışmada ortama sırasıyla TDZ, 2-ip, IBA hormonları ilave edilmiş ve ortamlarda embriyogenesinin teşvik edildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda embriyonik kallus oluşumunda oksin ve sitokin konsantrasyonlarının da etkili olduğunu bildirmişlerdir [14]. Aspir bitkisinin bir Çin çeşidi ile yapılan bir diğer çalışmada, kallus oluşumu için tek çeşit büyüme düzenleyicisinin yeterli olduğu fakat adventif sürgün oluşumu için yeterli olmadığı aktarılmıştır. Denenen diğer büyüme düzenleyicileri kombinasyonları ile elde ettikleri sonuçlara göre ise; kallus oluşumu için; MS + 1.0 mg/l NAA, sürgün rejenerasyonu için;

MS + 0.2 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA ve köklendirme için; ¼ MS + 2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l IAA ortamlarını önermişlerdir [15].

Hindistan çeşitleri üzerinde yapılan Agrobacterium ile gen aktarım çalışmasında sürgün rejenerasyonu için; MS + TDZ (0.2 mg/l) ve NAA (0.2 mg/l) ortamları önerilirken, sürgün çoğaltımı için; MS + BA(0.5 mg/l) + thiamine-HCl (4.0 mg/l) ortamları önerilmiş ve sürgün gelişimi için; MS + KN (0.5 mg/l) + 2iP (1.0 mg/l) ve AgNO₃ (1.0 mg/l) ortamları önerilmiştir [16].

2011 yılında yapılan bir çalışmada ise aspir bitkisine ait Avustralya çeşidi kullanılmış ve yapılan çalışmada sürgün rejenerasyonu için WT genotipinde 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA, S-317 genotipinde 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA içeren ortamları önermişlerdir [17].

Motamedi ve ark. tarafından yürütülen çalışmada ise, Dinçer ve Sina çeşitlerini kullanmışlar ve *in vitro* mikroçoğaltım ile Agrobacterium aracılı gen aktarımı çalışmaları yürütmüşlerdir. Bu çalışmada hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanmışlar ve sürgün rejenerasyon yüzdesi için en iyi sonucu Dinçer çeşidine ait kotiledon eksplantlarında, 0.1 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP ortamından elde etmişlerdir [18].

Başka bir çalışmada, kallus oluşumu için 2,4-D ve TIBA hormonları karşılaştırıldığında; TIBA içeren ortamlarda 2,4-D'ye göre daha iyi sonuç alındığı, en yüksek kallus oluşumunun ise ışıklı koşullarda BAP ve NAA içeren ortamda elde ettiklerini belirtmişlerdir [19].

Kumari ve ark. (2015) kök ve yaprak eksplantları ile yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda 2,4-D kullanmış ve yaprak eksplantlarının tümünde yüksek kallus oluşum yüzdesi (%90) rapor etmişlerdir. Ayrıca IAA ilave edilen besin ortamlarının 2,4-D içeren besin ortamların kallus oluşumunda daha az etkili olduğunu belirtmişlerdir [20].

Literatüre bakıldığında Türkiye'de yetiştirilen aspir bitkisi çeşitlerine ait çok fazla doku kültürü çalışmasına rastlanmamıştır. Dinçer çeşidi ile sınırlı kalmıştır. Dinçer çeşidi ile çalışmalardan biri Başalma ve ark. (2008) tarafından yürütülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda TDZ ve IBA içeren ortamlara alınan 10 günlük aseptik fidelere ait eksplantlar kültüre alınmıştır. En iyi sonucu 0.5 mg/l TDZ ve 0.25 mg/l IBA içeren MS besin ortamından, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%33) ve eksplant başına sürgün

sayısını (6.5) ile elde etmişlerdir. BAP ve NAA içerikli besin ortamlarına aldıkları nod eksplantları ile yürüttükleri çalışmada ise eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonucu 0,5 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren ortamdan almışlardır [21].

Literatürde incelenen aspir doku kültürü çalışmalarında tam bitki rejenerasyonunun düşük ve sınırlı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni sürgün rejenerasyon frekansının düşük olması, rejenere sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon ve sürgünlerin köklendirilmesinde karşılaşılan sorunlardır [4]. Fakat karşılaşılan bu sorunlara çözüm olabilecek çalışmaların sayısı yetersiz kalmaktadır [9,11,17]. Bu sorunlara ek olarak, çok çeşitli genotiplerinin olması ve genotipin sürgün rejenerasyonuna etkisi nedeniyle her genotip için protokol geliştirilmesi gerekmektedir.

Türkiye’de yapılan çalışmalarda, Diñçer çeşidi ile BAP, NAA, TDZ ve IBA hormonlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ile kurulan denemeler mevcut olup, sürgün rejenerasyon frekanslarının %33 (Başalma ve ark., 2008) ile %35 (Motamedi ve ark., 2011) olduğu belirlenmiştir [18,21]. Türkiye’de yetiştirilen diğer çeşitlerle ilgili doku kültürü çalışmasına rastlanılmamıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, Aspir Balcı çeşidinde farklı büyüme düzenleyicilerinin sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Aspir bitkisi, alternatif yağ bitkileri arasında yer almaktadır. Yağ sanayiinde kullanım alanı dışında gıda, boya, tıp vb. birçok alanda daha geniş kullanım alanına sahip olan aspir bitkisinin tarımının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, verimi yüksek ve çeşitli stres koşullarına dayanıklı aspir yetiştirilmesi amacıyla çalışmalar yürütülmektedir. Klasik ıslah yöntemleri ile bu sorunların çözümlenememesinden dolayı doku kültürü gibi biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Aspir doku kültürü çalışmalarında rejenerasyon frekansının düşük olması, rejenere sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon ve köklendirme problemleri gibi sorunlar karşımıza çıkmaktadır. Bu sınırlamalar, etkili bir rejenerasyon protokolü oluşturulması

gerekliliğini göstermektedir. Bu alışma ile birlikte aspir bitkisi Balcı eşidinde ilk kez farklı büyüme düzenleyicilerinin in vitro dayalı çoğaltıma etkisi belirlenecektir. Literatüre göre daha önce bu amaçla bir çalışmaya rastlanmadığından ülkemiz için ekonomik değeri bulunan bu çeşit üzerinde böyle bir çalışma planlanmıştır.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları denenecektir. Farklı konsantrasyonlara sahip sitokin ve oksin kombinasyonlarının eksplantlardan sürgün oluşumunu teşvik etmesi beklenmektedir.



GENEL BİLGİLER

2.1 Aspir (*Carthamus tinctorius*) Bitkisi

Carthamus tinctorius, *Compositae* familyasına ait yağlı-tohumlu, tek yıllık tıbbi bir bitkidir. Ülkemizde yalancı safran, Amerikan safranı ve boyacı safranı gibi isimlerle anılmaktadır [3]. Ana vatanı Arap Yarımadası'dır. Daha sonra buradan İran, Pakistan, Hindistan ve diğer ülkelere dağılmıştır. FAO 2013 verilerine göre ise Dünya genelinde 60'ın üzerinde ülkede aspir tarımı yapılmaktadır. Bu ülkeler arasında ilk sırayı Hindistan almaktadır. Günümüzde üretimini gerçekleştiren diğer başlıca ülkeler ise Amerika, Meksika, Arjantin ve Çin'dir [4]. Dünya genelinde şimdiye kadar tespit edilmiş 25 aspir türü bulunmaktadır [22]. Cronquist (1968) sınıflandırma sistemine göre *Carthamus tinctorius* türüne ait sistematik bilgisi çizelge 2.1'deki gibidir [23].

Çizelge 2. 1 Cronquist sınıflandırma sistemine göre *Carthamus tinctorius* türünün sistematigi

Alem:	Plantae (Bitkiler)
Şube:	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf:	Magnoliopsida (iki çenekliler)
Takım:	Asterales
Familya:	Astraceae / Compositae (Papatyagiller)
Alt Familya:	Carduoideae
Cins:	Carthamus
Tür:	<i>Carthamus tinctorius</i> (Yalancı Safran)

Aspirin önemi, tohumundan elde edilen yağına olan talepten kaynaklanmaktadır. Ülkemizde gün geçtikçe gerekliliğini hissettiren yemeklik yağ açığı vardır. Bu açığı kapatmak için aspir bitkisinin kullanımı yararlı olacaktır. Yemeklik yağ üretiminde kullanılan başlıca bitkiler aspir, kanola ve zeytin olarak sıralanabilmektedir. Aspir tohum yağının, kanola ve zeytinyağı ile karşılaştırıldığında içerik itibarıyla daha sağlıklı olduğu rapor edilmiştir [24]. Aspir yağı oleik asit (omega-9) bakımından zengindir ve insanlar için esansiyel yağ asidi olan linoleik asit (C 18:2) oranı %75'e kadar ulaşmaktadır. Bu nedenle önemli bir besin kaynağıdır. Yağının insan sağlığı açısından bir diğer önemi yüksek α -tokoferol içeriğidir [25]. Aspir yağının bu özelliği kandaki kolesterol seviyesini düşürmeye yardımcıdır [22].

Aspir bitkisi, alternatif yağ bitkisi olmasının yanı sıra yem, yakıt, boya sanayii ve tıbbi amaçlı kullanım alanlarına sahiptir. Boya sanayiindeki önemi, içerdiği yüksek orandaki linoleik asit (Omega-6) ten gelmektedir. Bu içeriği sayesinde çabuk kuruyan yağlardan olduğu için, boya sanayiinde sıkça tercih edilmektedir [26,27,28].

Bununla birlikte, aspir insan insülini, apolipoprotein-A1, büyüme hormonları vb. üretimi için moleküler tarım çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaya başlanmıştır [29].

Tüm bu kullanım alanları aspir bitkisinin daha geniş alanlarda üretimini gerektirmektedir. Bu geniş alandaki üretim gereksinimi karşılamak tarımının geliştirilmesiyle mümkün olacaktır.

Önemli bir diğer yağ bitkisi olan ayçiçeğine bakıldığında aspir bitkisine göre soğuğa ve kuraklığa daha hassas olmasına karşın oldukça geniş bir alanda tarımı sürdürülmektedir. Diğer yağ bitkileri ile karşılaştırıldığında aspir bitkisi kuraklığa daha dayanıklı olmasına rağmen tarımının gelişmemesi ise düşük tarım verimi ve düşük yağ oranı vermelerinden kaynaklanmaktadır [30].

Aspir tarımının geliştirilmesi amacıyla verimi yüksek, kaliteli ve strese dayanıklı çeşitlerin elde edilmeye çalışıldığı ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Islah çalışmalarında klasik ıslah ile çözümlenemeyen problemlerin aşılması için biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Aspir ıslah programlarında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılabilmesi aspir doku kültürü ve moleküler genetik çalışmalarına

bağlıdır. Genel itibariyle aspir bitkisi üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarının asıl amacı ıslah programlarında yeni yöntemlerin kullanılabilmesine olanak sağlamaktır. Bununla birlikte gen kaynaklarının korunması, sekonder metabolitlerin in vitro üretimi için de doku kültürü çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Aynı zamanda ürünün yetiştirilmesinde genetik zenginlik için in vitro tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin, abiyotik ve biyotik strese karşı bitkinin kendi genetik çeşitliliği sınırlı kalmaktadır ve bu şartlarda yetiştirilmesi zorlaşmaktadır [16]. Fakat *in vitro* tekniklerle genetik çeşitliliği arttırılan aspir bitkisinin yetiştirilmesi ve üretimi daha kolay hale gelmektedir.

Diğer yandan aspir doku kültürü çalışmalarında rejenerasyon frekansının düşük olması, rejenerasyon sürgünlerde gözlenen vitrifikasyon ve köklendirme problemleri gibi sorunlar nedeniyle biyoteknolojik yöntemlerin ıslah programlarında kullanımını sınırlandırmış durumdadır [4]. Bu nedenle doku kültüründe karşılaşılan bu sorunların çözümü önem arz etmektedir. Ayrıca genotipin rejenerasyon frekansı üzerindeki etkisi nedeniyle her genotip için uygun protokolün geliştirilmesi gerekmektedir.

Aspir bitkisi, genellikle 80-100 cm arasında boylanabilen, dikenli ve dikensiz formları olan, dikenli formların dikensizlere göre daha fazla yağ içerdiği, sarı, beyaz, krem, kırmızı ve turuncu gibi değişik renklerde çiçeklere sahip, tohumları, beyaz, kahverengi ve üzerinde koyu çizgiler bulunan beyaz taneler şeklinde olan, dallanan ve her dalın ucunda içerisinde tohumları bulunan küçük tablalar oluşturan, renkli çiçekleri (petal) gıda ve kumaş boyasında kullanılan, yaklaşık 2.5-3.0 m derinlere gidebilen bir kazık kök sistemine sahip, yazlık karakterde ve ortalama 110-140 gün arasında yetişebilen tek yıllık bir uzun gün yağ bitkisidir (Şekil 2.1) [31].



Şekil 2. 1 Aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisinin görüntüsü [32]

2.2 Bitki Doku Kültürü

2.2.1 Bitki Doku Kültürü Tanımı ve Tarihçesi

Bitkilerin ıslah çalışmaları göz önüne alındığında tarihte iki önemli dönem göze çarpmaktadır. Klasik bitki ıslah yöntemleri, ticari gübre ve diğer benzeri uygulamaları içine alan dönem “Yeşil Devrim” olarak adlandırılırken, DNA’nın keşfi ile başlayıp bakteri genetiği ile bitki doku kültürü yöntemlerinin kullanılmaya başlandığı ve birçok bitkiye bu yöntemlerin uygulandığı dönem ise “Gen Devrimi” olarak adlandırılmaktadır [33]. Yeşil devrime bakıldığında üretim, tohum-bitki-tohum döngüsünde gerçekleşirken gen devriminde bu durum biraz daha farklıdır. Uygulamalar daha moleküler düzeylerde gerçekleştirildiği için, üretim aşamalarında tohum zincirinin en ufak parçalarında dahi değişikliğe gidilerek sonuca varılmaktadır. Buradan yola çıkarak; bitki doku kültürü, genetik mühendisliği ve bitki biyoteknolojisi alanlarında birleştirici bir unsur olarak göze çarpmaktadır.

Bitki doku kültürü, *in vitro* ortamda su, vitaminler, bitki besin elementleri, katılaştırıcı ve gereken durumlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin eklendiği, ışık geçirebilen - ağzı kapalı steril kaplar içerisinde, sterilize edilmiş bitki materyalinin steril kabin içinde bu steril kaplara alınmasıdır. Buradaki *in vitro* ortam kavramı bize yöntemin, petri, şişe ya da deney tüpü içerisinde, ışık-sıcaklık gibi fiziksel faktörlerin kontrol edilebildiği çalışmaları belirtmektedir. Sağlanan bu kontrollü koşullar altında kültüre alınan bitkilerden alınan eksplantlar (bitki doku parçaları) aracılığıyla istenilen değişiklikler yapılmaktadır. Normal şartlar altında, doğada bitkiler tohum, spor ya da çeliklerden gelişmektedir. Fakat söz konusu *in vitro* ortam olduğunda bitki generatif üreme organları (tohum, anter, ovaryum gibi) yanı sıra vegetatif organları (kök, gövde, yaprak gibi) aracılığı ile de çoğaltılabilmektedir.

Bitki doku kültürü çalışmalarında, genellikle bitkiden alınan eksplant çeşidine göre farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler yeni bitkiyi oluşturacak olan bitki parçasının ana bitkinin hangi kısmından alındığına, hangi bitki formunun üretileceğine ve bitkinin gelişim safhalarına göre farklı isimler almaktadır [34].

İlk hücre teorisinin ispatı sonrasında, 1900'lü yıllardan itibaren bitki doku kültürü çalışmaları başlamıştır. Doku kültürünün temeli olarak sayılabilecek hücre teorisini tanımlayan Schleiden (1838) ve Schwann'ın (1839) çalışmaları ile totipotensi kavramı ortaya atılmış ve zamanla bu kavram anlaşılmaya başlamıştır. Bu süreçte bazı başarısız sonuçlar alınmış olmakla birlikte, 1902 yılında Haberlandt, *Eichhornia crassipes* bitkisinin izole edilmiş yaprak hücrelerinde çalışmış ve bitkilerin *in vitro* kültürünü çalışan ilk bilim insanı olmuştur. Totipotensi kavramının keşfiyle beraber, bu hücrelerin bitkiden izole edilerek uygun besin ortamı ve fiziksel şartlar sağlandığı takdirde bu bitkiye benzer bitkiler oluşturabileceği fikri ortaya çıkmıştır. 1934'lere gelindiğinde ise, White doku kültürü çalışmalarında besin ortamına şeker, vitamin, inorganik maddelerin ilave edilmesinin, Gautheret ise ortam şartlarının aseptik olması konusunun gerekliliğini vurgulamışlardır. 1983 yılına gelindiğinde doku kültürü ortamında tütün bitkisine ilk gen transferi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2. 2 Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar [35].

Tarih	Çalışmalar	Araştırmacılar
1838	Hücre Teorisi – Totipotensi (Bitki Hücreleri)	Schleiden
1838	Hücre Teorisi – Totipotensi (Hayvan ve İnsan Hücreleri)	Schwann
1902	İlk izole edilmiş hücrelerin kültürü	Haberlandt
1904	Olgun embriyoların kültürü	Hanning
1917	Biyoteknoloji teriminin ilk kullanımı	Karl Ereky
1920	Oksinin tanımlanması	Went ve ark.
1922	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarında çoğaltımı	Kotte ve Robbins
1922	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarında çoğaltımı	Kotte ve Robbins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısır)	Dieterich
1934	İlk sürekli kök kültürleri (domates)	White
1934	İlk kallus kültürleri	Gautheret
1942	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	Sürgün uçlarından ilk bitki eldesi	Ball

Çizelge 2. 2 Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar [35] (devamı).

1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi	Watson ve Crick
1954	Hücre süspansiyonlarından ilk bitki eldesi	Muir ve ark.
1957	İlk sitokin tanınması ve organ oluşumunda sitokin/oksin oranının öneminin ortaya konulması	Skoog ve Miller
1958	İlk somatik embriyogenesis (havuç)	Steward ve ark.
1960	İlk anter kültürü	Maheswari
1960	Mikropropagasyon	Morel
1962	MS besin ortamının geliştirilmesi	Murashige ve Skoog
1965	Tek hücreden bitki rejenerasyonu	Vasil ve Hilderbrandt
1967	İlk haploid bitki üretimi	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg ve ark.
1970	HEPA filtrelerinin kullanılmaya başlanması	-
1971	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu	Nagata ve Takabe
1974	İlk mikrospor kültürü	Nitsch
1978	Cinsler arası somatik melezleme	Melchers ve ark.
1983	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi (tütün)	Murai ve ark.
1986	Transgenik ilk bitkinin tarla testleri	-
1990	Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yoluyla germplazm muhafazası	-
1995	İlk rekombinant insan gıdası (domates)	Flavr Savr Domates

2.2.2 Bitki Doku Kültürü Kullanım Alanları

2.2.2.1 Islah Alanındaki Uygulamalar

Bitki doku kültürünün ıslah alanındaki uygulamalarına bakıldığında; embriyo kültürü, anter ve yumurtalık kültürü, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplazm muhafazası, somatik hücre melezlemesi, gen transferi karşımıza çıkmaktadır.

Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü, zigot oluşumu sonrası oluşan uyuşmazlıklardan dolayı embriyo oluşumu olumsuz etkilenmektedir. Bu olumsuzluğun giderilmesi adına, embriyolar doku kültürü yöntemi ile geliştirilmekte ve yeni melez bitkiler oluşturulmaktadır. Bu tekniğin bir diğer ismi embriyo kurtarma tekniğidir [35].

Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü ise, klasik ıslah yöntemleri ile uzun zaman alan hatların saflaştırılması işlemine alternatif bir yöntemdir. Mayoz geçirmiş haploid kromozomlu hücreler (polen -mikrospor- veya megaspor) veya bu hücreleri içeren anter ve yumurtalık kısımlarından doku kültürü tekniğiyle %100 homozigot bitkiler elde edilmesidir. Bu tekniğin bir diğer ismi *in vitro* haploidi tekniğidir [35,33].

Somaklonal varyasyon yöntemi, totipotent özellikteki ya da kallus oluşturabilme yeteneğine sahip hücreler uzun süre kültür ortamında tutulduklarında bu özelliklerini yitirebilirler. Bu hücrelerden oluşturulan yeni bitkilerde ise gen/kromozom bozuklukları gözlenmektedir. Bu bozukluklar sonucu ise somaklonal varyasyonlar ortaya çıkmaktadır. Somaklonal varyasyonlar ise yeni çeşitlerin yetiştirilmesi ve geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Chrispeels ve Sadava, 1994). Somaklonal varyasyonla ortaya çıkan değişiklikler; tohum veriminin, bitki canlılığı ve iriliğinin, hastalıklara dayanıklılığının, çiçek rengi ile yaprak ve çiçek morfolojisinin değişmesi olarak sıralanabilir [36,33].

In vitro seleksiyon yöntemi, tek hücre seviyesinde uygulanmaktadır. Çeşitli (tuz, herbisitler, patojenler vb.) faktörlere karşı dayanıklılığa göre seleksiyon yapılması sonucu bu hücrelerden ilgili faktörlere karşı toleranslı veya dayanıklı hücreler elde edilebilmektedir. Bu tekniğe *in vitro* seleksiyon denilmektedir. *In vitro* döllenme yönteminde ise özellikle aklimasyon yapılamayan yani dış ortama alıştıramayan bitkilerden tohum almak için tozlaşmaları laboratuvar ortamında sağlanmaktadır. Fakat bu yöntem sınırlı kalmaktadır.

In vitro germplazm muhafazası yönteminde, totipotent hücrelerin *in vitro* kültürleri uzun süreli olarak saklanabilmektedir (kallus veya süspansiyon hücreleri şeklinde) ve ihtiyaç duyulduğu an tam-yeni bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip bu hücrelerden yeni bitkiler oluşturulabilmektedir. Aynı şekilde kültüre edilmek yerine, yeni bitki

oluşturabilme yeteneğine sahip aynı hücreler, az miktarda besin maddesine ve alana ihtiyaç göstererek düşük sıcaklıkta (4°C) aseptik şartlarda 1 ile 4 yıl arasında saklanabilmektedir. Bu yöntemle benzer şekilde çok daha düşük sıcaklıklarda (196°C) sıvı azot içerisinde doku ve hücreler dondurularak saklanabilmektedir. Bahsedilen bu doku kültürü teknikleri, *in vitro* germplazm muhafazası açısından bir hayli önemlidir. Bu sayede gen ve tohum bankalarına alternatif oluşturabilmektedir [36,33].

Somatik hücre melezlemesi yöntemi protoplast füzyonu adıyla da bilinmektedir. Bu yöntem ise, klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin eldesinde kullanılan bir yöntemdir. Elde edilen somatik melez hücreye heterokaryon adı verilmektedir ve bu hücre, kallus oluşturulması ve bitki rejenerasyonu ile yeni bitkilerin elde edilmesinde yöntemin en gerekli ve kilit parçası olma özelliğini taşımaktadır. Bu yöntem aslında bir bakımdan genetik kopyalamadır ve bitki biyoteknolojisi alanında yaklaşık 30 yıldır uygulanmaktadır. Uygulamanın en başarılı örneği ise tütün bitkisinde yapılan çalışma olmuştur [37,33].

Gen transferi yöntemi, doku kültüründe bitki ıslahında kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olmuştur. Bu yöntemde gen ya da genler bitkilere aktarılmaktadır. Bu yöntemde olmazsa olmaz olan ise, tekrarlanabilir bir hücre-bitki rejenerasyonuna (organogenesis/somatik embriyogenesis) ihtiyaç duyulmasıdır [33].

2.2.2.2 Islah Dışı Uygulamalar

Bitki doku kültürü uygulamalarında ıslah alanındaki uygulamalar dışında kalan ticari ve ıslah dışı uygulamalar mevcuttur. Bu yöntemler hastaliksız bitki elde edilmesinde meristem kültürü, mikroçoğaltım, sentetik tohum üretimi (somatik embriyo), sekonder metabolit üretimi (hücre-kallus süspansiyonları) ve kimeralar olarak sıralanabilmektedir.

Hastaliksız bitki eldesinde meristem kültürü uygulaması, tüm apikal meristem ya da burdan alınan küçük embriyonik parçaların kültüre alınmasıyla uygulanan tekniktir. Uç ve yan meristemlerden birçok yeni bitkiler elde edilebilmektedir. Elde edilen bitkiler birçok bakımdan birbirine benzerdirler [33].

Mikroçoğaltım yöntemi ise, olgun ya da henüz olgunlaşmamış somatik hücrelerden direkt (somatik embriyogenesis/organogenesis) ya da indirekt (kallus/protoplast vb. aracılığıyla) yollar ile bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemlerine verilen genel isimdir [33].

Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar) yöntemi ise, somatik embriyoların çeşitli yöntemlerle kaplanarak sentetik tohumlar oluşturulmasını kapsamaktadır. Sentetik tohumlar ebeveyn hatların muhafazasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sentetik metabolit üretimi kallus-hücre süspansiyonları aracılı yapılmaktadır. *In vitro* hücre kültürleri sekonder metabolit üretiminde kullanılan önemli kaynaklardır. Bitki sekonder metabolitlere örnek olarak tanenler, antosiyaninler, karetenoitler, alkaloidler verilebilmektedir. Bu metabolitler bitki büyüme ve gelişmesinde doğrudan kullanılamamaktadır. Son yıllarda sekonder metabolit üretimi için yonca; azotlu gübre kullanımının az, ot veriminin yüksek oluşu ve geniş adaptasyon yeteneğiyle alternatif bir bitki olarak göze çarpmaktadır. Üretim için ilgili enzim alındıktan sonra ise yoncanın geriye kalan kısmı ot olarak kullanılabilir [33].

Kimeralar ise, özellikle süs bitkileri için karşımıza çıkan bir uygulamadır. Kimerik bitkiler, farklı türlerin protoplastların karışımı şeklinde tanımlanabilmektedir. Bitki rejenerasyonu ve mutasyon uygulamaları sonucu oluşturulabilmektedir [33].

2.2.2.3 Araştırma Alanındaki Uygulamalar

Temel araştırma alanlarında da bitki doku kültürü uygulamalarına rastlanmaktadır. Doku kültürü uygulamalarına rastlanan bu alanlar arasında protoplast izolasyonu ve füzyonu, hücre, doku ve bitki beslenmesi, sitogenetik çalışmalar, biyolojik azot fiksasyonu vb. gibi çalışmalar sıralanabilmektedir. Tüm bu araştırma alanları genel olarak sistem geliştirmede faydalı olmaktadır [38].

2.2.3 Bitki Doku Kültürü Teknikleri

Bitki doku kültürü çalışmaları, temelde 6 başlık altında toplanmaktadır. Bu sınıflandırma Çizelge 2.3 te gösterilmektedir. Bitki doku kültürü teknikleri, bütün bitki kültürü (orkide tohum kültürü), embriyo kültürü (embriyo kurtarma), organ kültürü

(mikroçoğaltım), kallus kültürü, hücre süspansiyon ve tek hücre kültürleri, protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon olarak sıralanmaktadır.

Çizelge 2. 3 Bitki Doku Kültürü Teknikleri

Bitki Doku Kültürü Teknikleri
1. Bütün bitkinin kültürü (Orkide tohum kültürü)
2. Embriyo kültürü (Embriyo kurtarma)
3. Organ kültürü: Mikroçoğaltma
A. Katı veya yarı katı besi ortamında organogenezis
1. Meristem ve sürgün ucu kültürü
2. Tomurcuk kültürü
3. Kök kültürü
4. Yaprak kültürü
5. Anter kültürü
B. Somatik embriyogenezis
C. Biyoreaktörde organogenezis ve somatik embriyogenezis
D. In vitro mikroaşılama
E. İnce hücre katmanı teknolojisi (TCLs)
F. Fotoototrofik kültürler
4. Kallus kültürü
5. Hücre süspansiyon ve tek hücre kültürleri
6. Protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon

Embriyo kültürü (embriyo kurtarma) tekniği, embriyonun yumurtalık içindeki gelişmesi sırasında istenilen belirli bir devresinde izole edilerek, çimlendirip, geliştirilmesine denir. Sekonder metabolit üretimi gibi amaçlarla yapılan embriyo kültürü tekniğinde ise, embriyo ile kastedilen ana bitkiden alınan embriyo yerine somatik embriyo kısmıdır. Bu kültürler ya doğrudan somatik embriyogenezle ya da dolaylı somatik embriyogenez yolu ile teşvik edilirler ve embriyolar oluşturulur [39].

Organ kültürü (mikroçoğaltım) tekniği, bitkilerin vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan yöntemdir. Bir bitkinin tam bir bitkiyi oluşturabilme

potansiyeline sahip bitki kısımlarının (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) alınarak, *in vitro* koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır.

Kallus kültürleri, ana bitkiden kesilip çıkarılan ve bölünme yeteneğini yitirmemiş doku parçalarının *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla elde edilir. Kültüre alınan bu parçalar aynı zamanda morfolojik düzensizliğe sahip kitleler olarak da tarif edilebilir.

Hücre süspansiyon ve tek hücre kültürleri, sıvı büyüme ortamında genellikle tek hücre şeklinde veya küçük çaplı hücre gruplarını içeren doku kültürü tekniğidir. Hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürlerine göre daha hızlı büyüme göstermesi açısından avantajlı kabul edilmektedir.

2.2.4 In Vitro Rejenerasyon Teknikleri

2.2.4.1 Organogenez

Döllenme, zigot meydana getirmek üzere, farklı iki gametin biraraya gelmesi olayıdır. Döllenmenin gerçekleşmesi ardından zigot, ard arda mitotik bölünmeler geçirerek bitkinin çok-hücreli (doku) ve çok-organlı (organizma) yapısını meydana getirir.

Hücre ve dokulara baskı uygulanarak bazı değişiklikler oluşturulur. Bu değişiklikler, sürgün olarak adlandırılan kökenini aldığı dokuya bağlı olarak bir yapının meydana gelmesi işlemine ise organogenesis denilmektedir.

Organ oluşumu olarak da adlandırabileceğimiz organogenesis olayının gerçekleşebilmesi için bazı şartlar oluşturulmalıdır. Bu şartlar, öncelikle uygun eksplantın seçilmesi, eksplantı koyacağımız büyüme düzenleyicileri içeren uygun bir besi ortamına karar verilmesi ve fiziksel çevre koşullarının uygun hale getirilmesidir.

Eksplant seçimi, organogenesis süreci için ilk ve önemli bir aşamadır. Kültüre aldığımız eksplantı etkileyen faktörler vardır. Bu faktörler;

- doku kaynağı olarak kullanılan organ,
- organın fizyolojik ve ontogenetik yapısı,
- eksplant yaşı (bitkiden alındığı dönem),

➤eksplant büyüklüğü,

➤eksplantın alındığı bitkinin diğer özellikleri olarak sıralanabilir.

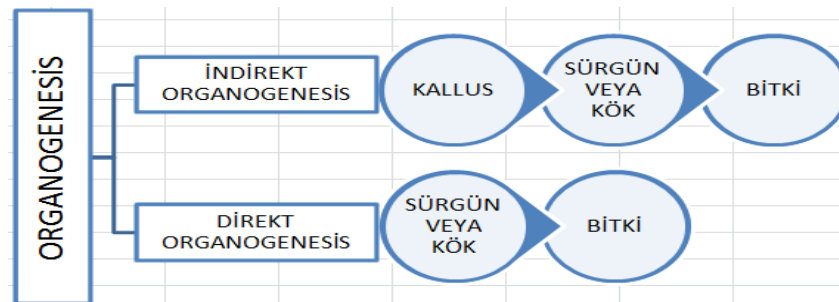
Organogenesis işlemi için alınan eksplantlar ise genellikle; kök, gövde, yaprak, çiçek, yumurtalık veya yumurta hücresi, fide organları (hipokotil, kotiledon gibi) ve tohum embriyosudur.

Eksplantın besi ortamına alındıktan sonra kültür şartları iyi kontrol edilmelidir. Kültür ortamının fiziksel hali (katı/sıvı oluşu), pH, nem, ışık, sıcaklık, kültür kaplarında biriken gaz miktarı organogenesis başarısı açısından önemlidir. Besi ortamının fiziksel hali yani katı veya sıvı oluşu organogenesis sürecini etkilemektedir. Agar yardımıyla katılaştırılmış besi ortamında kallus oluşumu yavaş olacaktır ve varolan kallusların etrafında yeni hücreler gelişecektir. Fakat buna rağmen genel olarak organogenesis başarı oranı katı besi ortamında daha yüksektir. Işık etmenine bakıldığında ise, maksimum kallus büyümesi karanlıkta olmasına rağmen, ışık şiddetinin düşük oluşu organogenesis sürecine olumlu katkılar sağlamaktadır. Sıcaklık etmeninde ise bitkiler genellikle 20 ile 30 °C aralığında gelişimleri sürdürürler Diğer yandan kültüre alınan eksplantların içinde bulunduğu atmosfer gaz içeriği de sistemi etkilemektedir [40].

Organogenez üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada, hücreler komponent (yeterli) hale gelirler. Daha sonra farklılaşırlar. Üçüncü ve son aşamada ise morfogenez gerçekleşir [41].

In vitro organogenesis iki tip olabilmektedir: indirekt ve direkt organogenesis (Çizelge 2.4). Direkt organogenesisde, kallus aşaması olmaksızın sürgün üretimi gerçekleştirilirken indirekt embriyogenesisde, kallus yoluyla indirekt organ oluşumu sağlanmaktadır [42].

Çizelge 2. 4 Organogenesis Tipleri



2.2.4.2 Somatik Embriyogenez

Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolara somatik embriyo adı verilmektedir. Somatik embriyogenesis, bitki somatik dokuları kullanılarak bir embriyo üretimini sağlayan gelişme sürecidir.

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokuları kullanılarak denenmiş ve başarılı olunmuştur. Organogenezde olduğu gibi kallus aracılı indirekt ya da direkt eksplant aracılığıyla oluşabilmektedir.

Somatik embriyolar, sentetik tohum üretimi için kullanılabilen ve üretilen bu sentetik tohumların dondurularak muhafazası sağlanabilmektedir. Sentetik tohum, kaplanmış somatik embriyolara verilen isimdir. Sentetik tohumların birçok avantajı vardır. Uzun süre saklanabilme, düşük maliyetlerle mümkün olabilmektedir.

Somatik embriyogenezin bilinen bir diğer avantajı ise, somatik embriyolar, organogeneze ihtiyaç duyulmaksızın direkt çimlendirilerek bütün bir bitkiye dönüştürülebilmeleridir. Bu açıdan bakıldığında somatik embriyogenez, doğal çimlenme işlemini taklit eden bir işlemdir.

2.2.5 Bitki Doku Kültürü Aşamaları

Bitki doku kültürü işlemleri birçok aşama gerektirmektedir. Hazırlık, sürgün rejenerasyonu, köklendirme ve toprağa alıştırma olmak üzere dört aşama sıralanabilmektedir. Ayrıntılı bir şekilde ifade edilecek olursa sırasıyla, çalışma öncesinde uygun laboratuvar düzeninin kurulması ardından bitki materyaline karar verilmesi ve bu materyale uygun besin ortamının amaca uygun olarak seçilerek hazırlanması ve sterilizasyonunun yapılması gelmektedir. Daha sonra kallus oluşturulması gerçekleştirilerek, oluşturulan kalluslardan istenilen bitki rejenerasyonunun uyarılması sağlanmaktadır. Ardından, oluşturulan sürgünlerin çoğaltılarak boylarının uzatılması ve somatik embriyoların oluşturulması gelmektedir. Sonrasında ise uzayan sürgünlerin köklendirilip dış ortama aklimiteasyonu sağlanmaktadır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Bitki Doku Kültürü Aşamaları

Bitki Doku Kültürü Aşamaları
1. Uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması
2. Bitki materyalinin ve bu materyale uygun besin ortamlarının seçimi, hazırlanması ve sterilizasyonu
3. Kallus oluşturulması
4. Kalluslardan çeşitli yöntemlerle bitki rejenerasyonunun uyarılması
5. Oluşan sürgünlerin çoğaltılması ve boylarının uzatılması, somatik embriyoların oluşturulması
6. Uzamış olan sürgünlerin köklendirilmesi
7. Köklenen bitkilerin dış ortama aklimitezasyonu

MATERYAL VE METOD

Çalışma 2016-2017 yılları arasında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne ait Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisinin Balcı çeşidinin *in vitro* çoğaltımının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında deney materyali olarak Asteracea (Compositae) familyasına ait *Carthamus tinctorius* türüne ait Balcı çeşidi tohumları kullanılmıştır. Tohumlar Eskişehir Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir ve 20 °C oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

3.1.2 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD), bitki doku kültürü çalışmaları için temel unsurlar arasında yer almaktadır. Kültüre alınan bitkinin, gelişimsel programını manipüle etmek (örneğin sürgünlerden kök oluşumu vb) için bu düzenleyicilere ihtiyaç duyulmaktadır [42]. Farklı konsantrasyon ve diğer BBD ile kombinasyonlarında farklı etkiler ortaya çıkmaktadır. Alınan eksplant tipi ve oluşturulmak istenen doku ya da organa göre ortama farklı bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmektedir. Bitki hormonları olarak da adlandırabileceğimiz bu büyüme düzenleyicileri, çok küçük konsantrasyonlarda dahi

etkili olabilen organik bileşiklerdir. Bitkiler tarafından üretilen hormonlar başlıca, indol asetik asit, zeatin, absisik asit, etilen olarak sıralanabilmektedir. Bunun yanı sıra sentetik yollarla üretilen hormonlar da vardır. Bunlara genel olarak bitki büyüme düzenleyicileri ismi verilmektedir. Sıkça kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri oksinler, sitokininler, giberellinler, absisik asit ve etilen olmak üzere 5 ana başlık altında toplanabilmektedir (Çizelge 3.1). Bu kimyasallar, besin ortamına ilave edilmeden önce stok solüsyonları hazırlanır ve daha sonra çalışmalarda bu stok solüsyonlardan ilave yapılır. Stok solüsyonları hazırlanırken Sodyum hidroksit (NaOH), etanol (EtOH), dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücü maddeler kullanılır (Çizelge 3.1). Bu çözücüler ile çözüldükten sonra belirli konsantrasyonlarda stok solüsyonları elde edilmiş olur.

Oksinler, kök gelişimi, fotoperiyodizm, apikal dormansi, yan sürgün gelişiminin engellenmesi ve hücrenin büyümesinde etkilidir. En temel formu IAA (indol asetik asit) iken diğer yaygın olarak kullanılan oksin çeşitleri IBA (indol bütirik asit), NAA (naftalen asetik asit) ve 2,4-D'dir (2,4-diklorofenoksiasetik asit) [43]. Doku kültürü ortamına tek başına eklendiklerinde kallus ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını sağlarken, sitokininler ile kombine edilmesi halinde yine kallus ve somatik embriyo oluşumunu ve ek olarak sürgün rejenerasyonunu sağlamaktadır. Sürgün köklendirilmesi işlemi için ise vezgeçilmez hormon grubudur [33,44,45].

Sitokininler, sürgün rejenerasyonu, yeniden farklılaşmayı ve hücre bölünmesini teşvik etmektedir. En yaygın olarak karşımıza çıkan sitokininler BAP (benzilaminopürin), 1-Fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) üre (Thidiazuran-TDZ), zeatin (ZEA) ve KIN (kinetin) dir. En çok karşımıza çıkan sitokinin formları aminopürin türevleridir. Bitkide çoğunlukla yapraklarda ve kök ucu meristeminde üretilmekte olup, antioksidan aktivitesi sayesinde yaşlanmayı da geciktirmektedir. Sürgünlerde köklenme ve embriyogenesi engelleme özelliği ile de bilinmektedir [33,44].

Giberellinler, sürgün boyu uzatılmasında, embriyo kültürlerinde, bitkilerde gövdenin uzatılmasında ve meristemden sürgün rejenerasyonunun uyarılmasında yararlanılan hormon grubudur. Adventif kök oluşumunu, organogenesi ve kallus gelişimini engelleme özelliği vardır. Çiçeklenme hormonu olarak da bilinirler [33,44].

Absisik asit, tohumlarda ve strese maruz kalmış yapraklarda bolca bulunmaktadır. Işığa karşı hassas bir hormon grubudur. Hormon olarak işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır fakat somatik embriyo olgunlaşmasında pozitif etkiler gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca stomaların açılıp-kapanma mekanizması üzerinde de etkileri vardır [33,44].

Etilen, gaz formundaki tek bitki hormonudur. Çiçeklenmeyi teşvik edici ve meyve-sebze olgunlaşmasını hızlandırıcı etkilere sahiptir. Gaz formunda bir hormon olduğu için yayılma gösterebilir. Bu nedenle yalnızca sentezlendiği bitkiyi değil, komşu bitkileri de etkileyebilmektedir [44].

Çizelge 3. 1 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Adı	Kısa Adı	Çözücüsü	Toz Hal için Saklama Koşulları (°C)	Sıvı Hal için Saklama Koşulları (°C)	Otoklav (O) ve/veya Filtre (F) ile Sterilizasyon
Oksinler					
Indol-3-Asetik Asit	IAA	EtOH	-0	-0	O/F
Indol-3-Bütirik Asit	IBA	EtOH	0-5	-0	O/F
Naftalen Asetik Asit	NAA	NaOH	OS	0-5	O
2,4-Diklorofenoksi asetik asit	2,4-D	EtOH	OS	0-5	O
Sitokininler					
6-Benzilaminopürin	BAP	NaOH	OS	0-5	O
Kinetin	KIN / K	NaOH	-0	-0	O/F
1-Fenil-3-(1,2,3-thiadiazol -5-yl) üre (Thidiazuran)	TDZ	DMSO, KOH	OS	0-5	O/F
Zeatin	ZEA	NaOH	-0	-0	F
Giberellinler					
Giberellik Asit	GA ₃	Su	0-5	-0	F
Absisik Asit					
Absisik Asit	ABA	Su	0-5	-0	F

Çalışmada kullanılan hormonlar ve kimyasal maddeler Duchefa ve Merck tarafından temin edilmiştir.

3.1.2.1 Bitki Büyüme Düzenleyicileri Stok Solüsyonların Hazırlanması

BBD stok solüsyonlarının hazırlanması işleminde ilk olarak Çizelge 3.2’de belirtilen miktarlarda BBD ler ölçüm kapları yardımı ile tartılmıştır. Tartılan BBD ler ayrı ayrı, bir manyetik karıştırıcı ile beraber 100 ml hacimli beher içerisine konulmuştur. Her BBD kendi çözücüsünde çözülmüş ve daha sonra distile su ile 100 ml’ye tamamlanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm stok solüsyonlar mg l^{-1} ve/veya (w/v) oranına göre hesaplanmıştır.

Çizelge 3. 2 Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Hazırlanması

NAA ana çözeltisi (10^{-2}) (1 mg/mL)	
NAA	100 mg
%95 EtOH	3-5 ml
Distile su	100 ml’ye tamamlanır
BAP ana çözeltisi (10^{-2}) (1 mg/mL)	
BAP	100 mg
1 N NaOH	2-3 ml
Distile su	100 ml’ye tamamlanır
2,4-D ana çözeltisi (10^{-2}) (1 mg/mL)	
2,4-D	100 mg
%95 EtOH	3-5 ml
Distile su	100 ml’ye tamamlanır
TDZ ana çözeltisi (10^{-2}) (1 mg/mL)	
TDZ	22.0 mg
1 N NaOH	2-3 ml
Distile su	100 ml’ye tamamlanır

Çizelge 3. 2 Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Hazırlanması (devamı)

KIN ana çözeltisi (10^{-2}) (1 mg/mL)	
KIN	100 mg
1 N NaOH	2-3 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır

Çalışmada kullanılan BBD ler'den KIN -20°C 'de; TDZ, BAP, NAA, 2,4-D ise $+4^{\circ}\text{C}$ 'de (buzdolabında) 1 ay süreyle saklanmıştır.

3.2 Metod

Çalışmada, bitki doku kültürü aracılığıyla mikroçoğaltım işlemi yapılmıştır. Yöntem kapsamında uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması, bitki materyalinin ve bu materyale uygun besin ortamının seçimi-hazırlanması-sterilizasyonu, kallus oluşturulması, kalluslardan BBD ler aracılığı ile bitki rejenerasyonunun uyarılması ve oluşan sürgünlerin çoğaltılması, boylarının uzatılması aşamaları uygulanmıştır.

3.2.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Bitki doku kültürü çalışmaları için steril kabin, otoklav, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, hassas terazi, buzdolabı, mikropipet, pH metre, pens, bisturi, bitki büyütme dolabı, distile su cihazı, dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

Ek olarak, doku kültürü çalışmasında ortama sürgün ve kök gelişimini teşvik etmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda BBD ilave edilmiştir.

3.2.2 Besin Ortamları ve Kültür Koşulları

Bu tez çalışmasında besin ortamı olarak Murashige & Skoog (MS) temel besin ortamı kullanılmıştır [46]. Çizelge 3.3'te MS besin ortamı içeriğindeki bileşenler verilmiştir.

Çizelge 3. 3 MS Besin Ortamı İçeriği (Babaoğlu vd., 2002)

BİLEŞENLER			
MAKRO ELEMENTLER	MİKRO ELEMENTLER	VİTAMİNLER	DİĞER MADDELER
NH ₄ NO ₃	CuSO ₄ 5H ₂ O	Nikotinic asit (B3)	Sükroz
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	MnSO ₄ H ₂ O	Glisin	
CaCl ₂ 2H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	Myo-inositol	
MgSO ₄ 7H ₂ O	Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Thiamine (B1)	
KH ₂ PO ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O		
K ₂ SO ₄	H ₃ BO ₃		
	Na ₂ .EDTA		

Bir litrelik MS besin ortamı hazırlamak için, 1 litrelik erlen içerisinde yaklaşık 300 ml distile saf su konulmuştur ve manyetik balık ile beraber ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Bir yandan manyetik karıştırıcı üzerinde karışmaya devam ederken diğer yandan erlen içine 4,4 gr MS hazır besin ortamı ve 30 gr sükroz ilave edilmiştir. Daha sonra toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Besin ortamının pH aralığı 5.6 ile 5.8 aralığında olmalıdır. pH, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl yardımı ile bu aralıkta ayarlanmıştır. Son olarak katılaştırma ajanı olarak ortama 8 gr agar eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamı sterilizasyon işlemi için 121°C sıcaklıkta 1 atm basınç altında 20 dk süreyle otoklav edilmiştir. Bu süre sonunda steril olan besin ortamı, steril kabin içinde eş zamanlı sterilizasyonu yapılan magenta veya petrilerin her birine 35'er ml olacak şekilde döküldü ve yaklaşık yarım saatlik bir süre sonunda besin ortamlarının jel kıvamına gelmesi sağlanmıştır.

Temel besin ortamına kallus ve sürgün oluşumu için BAP (0.5 - 4.0 mg l⁻¹) tek veya NAA (0.1 - 0.2 mg l⁻¹) farklı kombinasyonlarını içeren; TDZ (0.25 - 1.0 mg l⁻¹) tek veya 0.1 mg l⁻¹ NAA farklı kombinasyonlarını içeren; 2,4-D (0.5 - 4.0 mg l⁻¹) veya 0.5 mg l⁻¹ KIN farklı kombinasyonlarını içeren; KIN (0.5 - 2.0 mg l⁻¹) tek veya 0.2 mg l⁻¹ NAA farklı kombinasyonlarını içeren BBD ilave edilmiştir.

3.2.3 Sterilizasyon

3.2.3.1 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında, sterilizasyon sağlanamadığı takdirde çalışmanın devamı getirilememektedir. Bitki materyalinin yüzey sterilizasyonu, doku kültürü çalışmasında sterilizasyon açısından kilit işlemlerden biridir. Her bitki tohumu için kabuklu/kabuksuz oluş, hassaslık/dayanıklılık gibi farklılıklardan dolayı, farklı sterilizasyon protokolleri uygulanmaktadır.

Bu açıdan çalışma öncesinde kullanılacak bitki materyaline en uygun sterilizasyon protokolünün belirlenmesi, çalışmanın seyri açısından oldukça önemlidir.

Tohum yüzey sterilizasyonu sağlamak amacıyla hidrojen peroksit, gümüş nitrat, civa, antibiyotikler kullanılmaktadır. En yaygın kullanım ise ticari sodyum hipoklorittir [47]. Bu çalışmada, aspir tohumlarının yüzey sterilizasyonu için sterilizasyon ajanı olarak sodyum klorid (NaClO) ve civa klorür (HgCl₂) kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında, protokoller Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3. 4 Aspir tohumlarına uygulanan sterilizasyon protokolleri

Protokol No	Uygulanan Kimyasal	Süresi (dk)
1.	30% NaClO	30
	3 x dH ₂ O	3 x 5
2.	70% EtOH	1
	1 x dH ₂ O	5
	70% NaClO	30
	4 x dH ₂ O	4 x 5
3.	70% NaClO	30
	4 x dH ₂ O	4 x 5
4.	70% EtOH	1
	1 x dH₂O	1 x 5
	0.1% HgCl₂	15

Çizelge 3. 4 Aspir tohumlarına uygulanan sterilizasyon protokolleri (devamı)

	4 x dH₂O	4 x 5
5.	70% EtOH	1
	1 x dH ₂ O	1 x 5
	0.2% HgCl ₂	10
	4 x dH ₂ O	4 x 5
6.	70% EtOH	1
	1 x dH ₂ O	1 x 5
	0.2% HgCl ₂	15
	4 x dH ₂ O	4 x 5
7.	70% EtOH	1
	1 x dH ₂ O	1 x 5
	0.3% HgCl ₂	10
	4 x dH ₂ O	4 x 5

Tohum yüzeylerinin sterilizasyonu işlemi sonrasında, tohumlar *in vitro* şartlar altında çimlendirilmek üzere MS besin ortamına aktarıldı. Her bir tüpe 1 adet tohum olacak şekilde ekim işlemi yapılmıştır. Ekim işlemi sonrası, tohumlar çimlendirilip yeterli büyüklüğe ulaşması için 25°C sıcaklıkta % 60 nem oranında, 18 saat ışık 6 saat karanlık periyotta 4000 lux ışık şiddetinde bulunan bitki büyütme dolabında kültüre alınmıştır.

Juglon, ceviz allelopatisinden sorumlu bir allelokimyasaldır. Ceviz ağacından izole edilmektedir ve önemli antimikrobiyal, antitümör, antihipertansif ve enzim inhibe edici aktiviteler sergilemektedir. Gıda, kozmetik, tekstil ve boya sanayiinde kullanılmaktadır.

Çimlendirme ortamında aspir tohumlarında gözlenen yüksek miktardaki fungal kontaminasyonu engellemek amacıyla antifungal etkisi bilinen juglon maddesi bulunan ortamda kültüre alınmasının kontaminasyonu azaltacağı düşünülerek besin ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda juglonun etkisi incelenmiştir.

Yüzey steriliasyonu yapılan aspir tohumlarının ekildiği besin ortamına 250 µg/ml ve 500 µg/ml (0,75 mg ve 1,5 mg) konsantrasyonlarda juglon ilave edilmiştir. Daha sonra 10 günlük tohumların kontaminasyon durumlarına bakılmıştır.

Çimlenme için steril tohumlar, 10 ile 12 gün arasında bitki büyüme dolabında bırakılmıştır. Tohumların çimlendirilip belli boylara ulaşmasının ardından eksplant alımı işlemine geçilmiştir.

3.2.4 Eksplant İzolasyonu ve Kültüre Alınması

Üç farklı eksplant tipi kullanılarak yapılan çalışmada hipokotil ve kotiledon eksplantları 7 veya 10 günlük aseptik fidelerden alınarak besin ortamlarına yerleştirilmiştir. Kotiledon ve hipokotil kısımları alındıktan sonra geriye kalan sürgün uçları MS ortamına yerleştirilerek bu kısımdan gelişen sürgünlere ait nod eksplantları ile denemeler kurulmuştur.

Çalışmada BAP, KIN ve TDZ sitokininleri ile NAA ve 2,4-D oksinleri kullanılmıştır. Alınan eksplantlar, BBD içeren besin ortamları içinde 4-6 hafta bekletildikten sonra MS ortamına alınmış ve bu ortamda 2-3 hafta tutulmuştur. Bu kapsamda, tüm bu çalışmalar steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Her bir deneme, hipokotil ve kotiledon eksplantları için 10ar; nod eksplantları için 5'er eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Eksplantlardan oluşan kallus ve sürgün oluşturan kallus sayısı (adet) ile sürgün oluşturan eksplantlarda kaç adet sürgün olduğu (adet) belirlenmiştir. Elde edilen veriler için "SPSS for Windows" programı yardımıyla varyans analizi yapılmış ve Duncan testi uygulanmıştır [48,49].

BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1 In Vitro Sterilizasyon Çalışmaları**

Tohumların yüzey sterilizasyonu amacıyla sodyum klorid (NaClO) ve civa klorürün (HgCl₂) farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanmasının sterilizasyona etkisi araştırılmıştır (Çizelge 4.1). NaClO uygulanan denemelerde %100 kontaminasyon gözlemlendiği için HgCl₂ etkisi değerlendirilmiştir.

6 ve 7 nolu protokollere bakıldığında, kontaminasyon oranları düşük (sırasıyla; %3,33 ve %13,33) görünmesine rağmen çimlenme ve gelişmenin iyi olmaması sebebiyle çalışmada tercih edilmemiştir. Bunun sebebi, gittikçe arttırılan HgCl₂ konsantrasyonunun olabileceği düşünülmüştür.

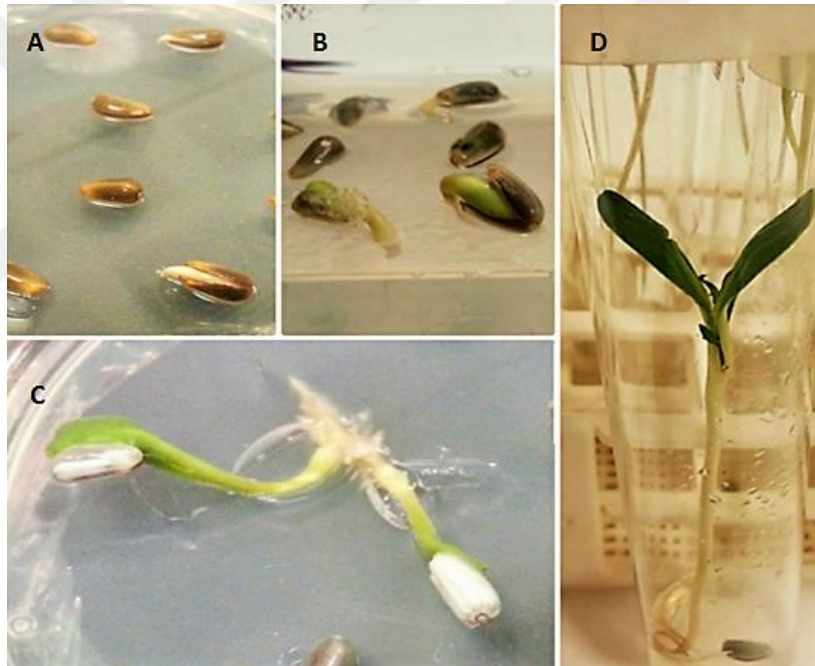
Çizelge 4. 1 Sterilizasyon protokollerine göre kontaminasyon durumları

PROTOKOL NO	1.Tekerrür	2.Tekerrür	3.Tekerrür	ORTALAMA
1	%50	%40	%50	%46,67
2	%30	%50	%30	%36,67
3	%20	%20	%40	%26,67
4	%10	%10	%40	%20
5	%50	%20	%10	%26,67
6	%10	%0	%0	%3,33
7	%10	%30	%0	%13,33

En iyi sonucu (%20) veren 4 nolu protokol (%70'lik EtOH ile muamele sonrası 1 kez 5 dk süreyle dH₂O ile durulama işlemi yapıp %0.1'lik HgCl₂ çözeltisinde 15 dk karıştırıldıktan sonra 4 kez 5'er dk dH₂O ile son durulama işleminin yapılması işlemi) çalışmanın devamında tercih edilen sterilizasyon protokolü olmuştur (Çizelge 4.1).

Kontaminasyon probleminin en aza indirgenmesinin ardından, çimlenme çalışmaları başlamıştır. Çimlenme oranı en fazla olan sterilizasyon protokolünün tercih edilmesinin yanı sıra, büyütme dolabındaki sıcaklık, nem ve fotoperiyot gibi fiziksel koşullar da optimize edilmiştir.

Aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisi Balcı çeşidine ait HgCl₂ ile yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlardan farklı gün aralıklarında *in vitro* şartlar altında çimlenme durumları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4. 1 Sterilizasyon ajanı olarak HgCl₂ ile muamele edilen ve *in vitro* da çimlendirilen Aspir tohumları **A.** *C. tinctorius* tohumlarında çimlenme (3 günlük) **B.** *C. tinctorius* tohumlarında çimlenme (5 günlük) **C.** *C. tinctorius* tohumlarında çimlenme (10 günlük) **D.** *C. tinctorius* tohumlarında çimlenme (21 günlük)

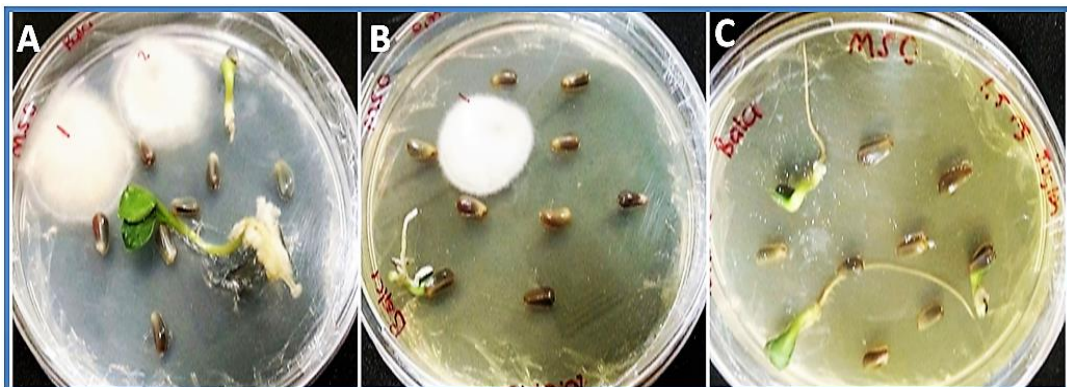
Literatüre bakıldığında, aspir bitkisi tohum yüzey sterilizasyonu işlemi için NaOCl ve civa klorür gibi sterilizasyon ajanları kullanılmıştır. Sterilizasyon ajanı olarak NaOCl kullanılan bir çalışmada tohumlar %100'lük NaOCl içerisinde 20 dk bekletilmesi ardından saf su ile 3 kez durulama işlemine tabi tutularak sterilizasyon gerçekleştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır [3]. Bu çalışmanın aksine, yapılan çalışmada 1, 2 ve 3 nolu

protokollerde NaOCl ile yüzey sterilizasyon işlemi yüksek kontaminasyon oranları (sırasıyla %46,67; %36,67; %26,67) gözlenmiştir.

Sterilizasyon ajanı olarak HgCl₂ kullanılan bir çalışmada ise, %0,1'lik HgCl₂ ile tohum yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ve çalışmanın devamı için başarılı sonuçlar alınmıştır [12]. Sterilizasyon ajanı olarak HgCl₂ kullanılan bir diğer çalışmada, tohumların yüzey sterilizasyonu için 7 dk boyunca %0,1'lik HgCl₂ ile muamele ile sağlanmıştır [10]. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde, kontaminasyonu önleme ve çimlenmenin olumsuz etkilenmediği denemeler %0,1'lik HgCl₂ ile yapılan sterilizasyon ile sağlanmıştır.

4.1.1 Juglonun Fungal Kontaminasyona Etkisi

250 µg/ml veya 500 µg/ml juglon ilavesinin fungal kontaminasyona etkisi belirlenmiştir. Juglon konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak fungal kontaminasyonu azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). 250 µg/ml juglon içeren besin ortamında %23 oranında kontaminasyon gözlenirken, 500 µg/ml juglon içeren besin ortamında hiç kontaminasyon gözlenmemiştir. Kontrol grubunda ise, %47 oranında kontaminasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Doku kültüründe kontaminasyonu engellemek amacıyla juglon ilavesi ile ilgili ilk kez bu çalışma yapılmış olup juglon ilavesinin etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte meyve ekstraktı, nano gümüş, PPM gibi maddelerin besin ortamına ilavesinin kontaminasyonu azaltıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir [50,51,52].



Şekil 4. 2 Juglon (500 µg/ml) ile muamele edilen ve *in vitro* da çimlendirilen aspir tohumları A. MS 0 B. 250 µg/ml juglon içeren besin ortamı C. 500 µg/ml juglon içeren besin ortamı

Özet olarak aseptik fide eldesi için aspir tohumları yüzey sterilizasyonundan sonra çimlenme ortamına aktarılmış, fakat bu ortamlarda yoğun kontaminasyon oluşmuştur. Bu çalışmada besin ortamına juglon ilavesi olumlu sonuç vermiştir. Aspir aseptik fide eldesinde karşılaşılan kontaminasyon sorununun çözümünde antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen juglon, kontaminasyonu engellemek için kullanılabilir.

Kontaminasyon oranını azaltmak için yapılan bu çalışmada ayrıca tohumların çimlenme oranları da belirlenmiştir. Juglonun artan konsantrasyonlarının çimlenmeyi arttırıcı bir etki yaptığı tespit edilmiştir. Buradan hareketle, juglonun çimlenmeyi engelleyici bir etkide bulunmadığı ve hatta çimlenmeyi arttırdığı söylenebilir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2 Aspir bitkisi Balcı çeşidine ait kontaminasyon ve çimlenme grafiği

BESİN ORTAMI	KONTAMİNASYON	ÇİMLENME
MS 0	%47	%23
MS + 250 µg/ml juglon	%23	%33
MS + 500 µg/ml juglon	%0	%37

4.2 Aspir Sürgün Rejenerasyon Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında, *C. tinctorius* fidelerine ait hipokotil, kotiledon ve nod eksplantları ile çalışılmıştır. Bu eksplantlar farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BBD içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

4.2.1 BAP'ın Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Bu denemede; MS besin ortamına eklenen farklı konsantrasyonda BAP ve BAP x NAA kombinasyonlarının aspir bitkisine ait hipokotil, kotiledon ve nod eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına etkisi araştırılmıştır.

4.2.1.1 Hipokotil ve Kotiledon Eksplantlarında Etkisi

Aspir bitkisi Balcı çeşidine ait steril fidelerden izole edilen hipokotil ve kotiledon eksplantları, kontrol (MS 0); 0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı ile; 0.5, 1.0, 2.0 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantların kültüre alınması ardından, 10-12 gün içinde kallus oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Kültürden 28-35 gün sonra ise gelişen kalluslar üzerinde sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Çizelge 4. 3 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	20						
ORTAMLAR	6	4182,540	26,616**	9,524	0,667	0,413	0,788
HATA	14	157,143		14,286		0,524	

** Önemlilik düzeyleri (P) <0,01'dir. S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

Çizelge 4.3'e bakıldığında, aspir bitkisi Balcı çeşidi hipokotil eksplantları ile yapılan çalışmalarda, farklı BAP konsantrasyonları ile BAP x NAA konsantrasyonlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesine etkisi 0,01 düzeyinde anlamlı farklılık bulunurken; sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır.

Yalnız BAP bulunan besin ortamlarında düşük kallus oluşturma yüzdesi (%0 - 16,67) gözlenirken; BAP'ın NAA'li kombinasyonlarında yüksek kallus oluşturma yüzdesi (%60 – 86,67) gözlenmiştir. 0.5 ve 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren ortamlarda eksplantların kallus oluşturmadiği; 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren ortamda ise %16,67 oranında kallus oluşturdıkları

tespit edilmiştir (Çizelge 4.4) Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonucu veren ortam 2.0 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamı olmuştur (%86,67).

Çizelge 4. 4 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
BAP	NAA			
-	-	63,33 b	3,33	0,33
0.5	-	0,00 c	0	0
1.0	-	0,00 c	0	0
2.0	-	16,67 c	3,33	1,0
0.5	0.5	80,00 ab	3,33	0,33
1.0	0.5	60,00 b	0	0
2.0	0.5	86,67 a	0	0

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

Sürgün oluşturma yüzdesi bakımından sonuçlara bakıldığında, MS 0 besin ortamı, 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı ve 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamı en yüksek sonucu veren ortamlar olduğu gözlenmiştir (%3,33). Eksplant başına sürgün sayısı bakımından, en iyi sonuç 1,0 adet ile 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.4; Şekil 4.3).



Şekil 4. 3 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarını içeren besin ortamında aspir hipokotil eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu **A**.MS 0; Hipokotil eksplantından elde edilen kallus ve sürgünler **B**.2.0 mg l⁻¹ BAPx0.5 NAA Hipokotil eksplantından elde edilen kalluslar **C**.2.0 mg l⁻¹ BAP Hipokotil eksplantından elde edilen sürgünler

Farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarında kotiledon eksplantı ile yapılan çalışmaların sonucuna göre, hipokotil eksplantları ile benzer sonuçlar vermiştir. Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi sonucunda kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0,01 düzeyinde anlamlı farklılık bulunurken; sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 4.5). Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.6)

Çizelge 4. 5 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	20						
ORTAMLAR	6	7885,714	1656,00**	77,778	1,815	0,302	2,111
HATA	14	4,762		42,857		0,143	

** Önemlilik düzeyleri (P) <0,01'dir. S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

MS 0 ile birlikte yalnız BAP bulunan besin ortamlarında kallus oluşumu görülmezken; BAP'ın NAA'li kombinasyonlarında eksplantların neredeyse tamamı kallus oluşturmuştur (%86,67 - 100). Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonucu veren ortam 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA ve 1.0 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamı olmuştur (%100) (Çizelge 4.6).

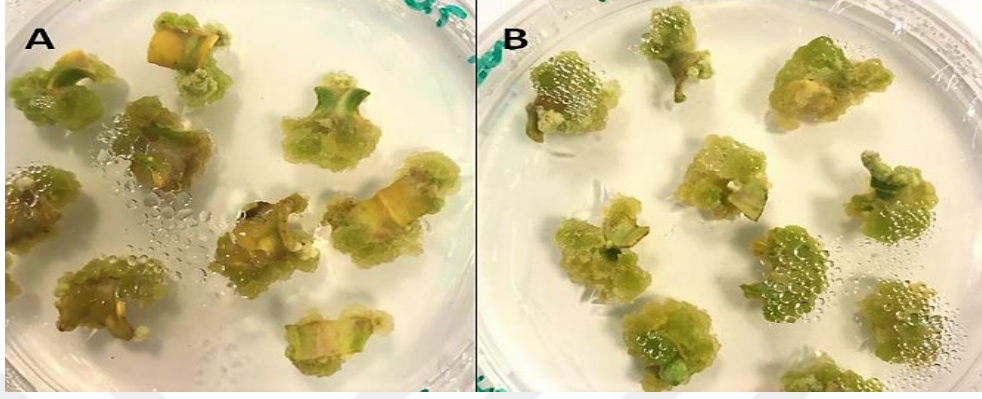
Çizelge 4. 6 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
BAP	NAA			
-	-	0,00 c	0,00	0,00
0.5	-	0,00 c	0,00	0,00
1.0	-	0,00 c	0,00	0,00
2.0	-	0,00 c	0,00	0,00
0.5	0.5	100,00 a	3,33	8,33
1.0	0.5	100,00 a	13,33	0,67
2.0	0.5	86,67 b	6,67	0,67

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi sonucu 1.0 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamı vermiştir (%13,33). Eksplant başına sürgün sayısı için ise en yüksek sonuç 8,33 adet ile 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.6; Şekil 4.4).

Literatüre bakıldığında, farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA ile yapılan çalışmalarda, eksplant tipinin sürgün rejenerasyon çalışmalarında etkili bir faktör olduğu gözlenmiştir. Kallus oluşturan eksplant yüzdesi açısından kotiledon eksplantlarında hipokotil eksplantlarına göre daha iyi sonuçlar alındığı belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarını içeren besin ortamında aspir kotiledon eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu **A.** 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA Kotiledon eksplantından gelişen kallus ve sürgünler **B.** 1.0 mg l⁻¹ BAP x 0.5 mg l⁻¹ NAA Kotiledon eksplantından gelişen kallus ve sürgünler

Yapılan bir çalışmada aspir bitkisi Dinçer ve Sina çeşitleri kullanılmış ve her iki çeşit için de kotiledon eksplantlarının farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonunda daha yüksek kallus oluşturma ve sürgün oluşturma yüzdesi verdikleri rapor edilmiştir [18]. Bir diğer çalışmada, en yüksek kallus oluşumunun BAP ve NAA içeren ortamda elde edildiği belirtilmiştir [19].

4.2.1.2 Nod Eksplantlarında Etkisi

Aspir bitkisi Balcı çeşidine ait steril fidelerden izole edilen nod eksplantları, kontrol (MS 0); 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamı ile; 0,5, 1.0, 2.0 BAP x 0,2 NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantların kültüre alınmasının ardından, 10-12 gün içinde kallus oluşumunun başladığı fakat sürgün gelişiminin henüz başlamadığı gözlenmiştir. 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren besin ortamındaki bazı eksplantlar hariç tüm eksplantlar adventif sürgün oluşturmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı ise yaklaşık 28-35 günlük bir süreç sonunda belirlenmiştir.

Aspir bitkisi Balcı çeşidi nod eksplantları ile yapılan çalışmalarda, farklı BAP konsantrasyonları ile BAP x NAA konsantrasyonlarında kallus oluşturan eksplant

yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına etkisi 0.01 düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4. 7 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	23						
ORTAMLAR	7	616,667	74,00 **	485,119	1,98	1,115	7,678 **
HATA	16	8,33		441,667		0,145	

** Önemlilik düzeyleri <0,01'dir. S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

Farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan testi sonucu verilerine göre; kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonucu veren ortamlar MS 0; 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı; 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı; 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı ve 1.0 mg l⁻¹ BAP x 0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı olmuştur (%100). Buna ek olarak, 4.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı da %96,67 ile kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından istatistiksel olarak en yüksek sonucu veren ortamlar ile aynı harf grubunda yer almıştır.

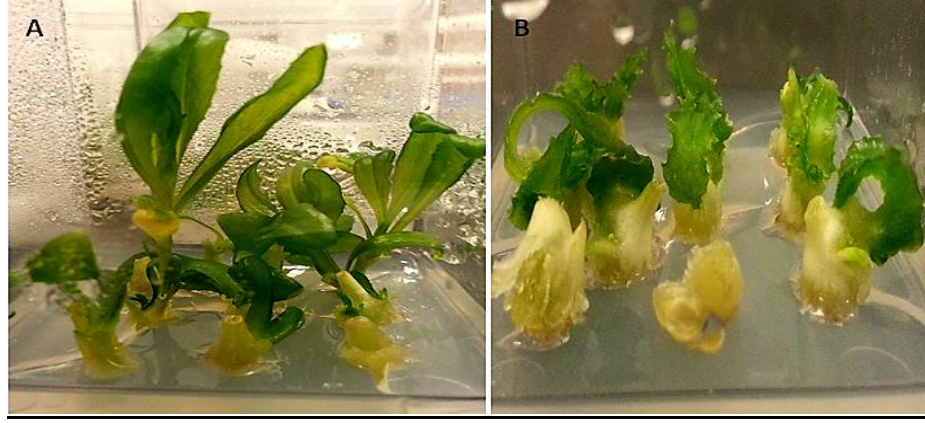
Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından sonuçlara bakıldığında, 1.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı en yüksek sonucu vermiştir (%86,67). Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (2,5 adet) 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca, eksplant başına 2,48 adet sürgün sayısı elde edilen 1.0 mg l⁻¹ BAP x 0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı da istatistiki açıdan aynı grup içinde değerlendirilmiştir (Çizelge 4.8; Şekil 4.5).

Çizelge 4. 8 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
BAP	NAA			
-	-	100,00 a	80,00	1,70 bc
0.5	-	83,33 b	60,00	1,32 cd
1.0	-	100,00 a	86,67	1,45 cd
2.0	-	100,00 a	53,33	0,96 d
4.0	-	96,67 a	56,67	1,15 cd
0.5	0.2	100,00 a	80,00	2,50 a
1.0	0.2	100,00 a	73,33	2,48 a
2.0	0.2	60,00 c	60	2,20 ab

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

Literatür çalışmalarına bakıldığında, aspir bitkisinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında eksplant kaynağı olarak nod kısımlarının kullanıldığı birkaç çalışmaya rastlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bu tez çalışması ile benzer şekilde; aspir bitkisi Dinçer çeşidinde sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en iyi sonuç 0.5 mg l⁻¹ BAPx0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı ve 1.0 mg l⁻¹ BAPx0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamından elde edildiği rapor edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonuç ise 0.5 mg l⁻¹ BAPx0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamından elde edildiği gözlenmiştir. [21].



Şekil 4. 5 Farklı konsantrasyonlarda BAP veya BAPxNAA kombinasyonlarını içeren besin ortamında aspirin nod eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu **A.** 0.5 mg l⁻¹ BAPx0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamında Nod eksplantından gelişen sürgünler **B.** 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında Nod eksplantından gelişen sürgünler

4.2.2 TDZ'nin Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

4.2.2.1 Hipokotil ve Kotiledon Eksplantlarında Etkisi

Aspirin bitkisi Balcı çeşidine ait steril fidelerden izole edilen hipokotil ve kotiledon eksplantları 0.25, 0.5, 1.0 mg l⁻¹ TDZ içeren MS besin ortamı ile; 0.25, 0.5, 1.0 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Farklı TDZ ve NAA kombinasyonlarında hipokotil ve kotiledon eksplantları ile yapılan çalışmada 28-35 günlük kültür süresi sonunda elde edilen veriler Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'de verilmiştir.

Çizelge 4. 9 Farklı konsantrasyonlarda TDZ veya TDZxNAA kombinasyonlarının aspirin hipokotil eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	17						
ORTAMLAR	5	2498,889	2,811	298,889	3,165 *	0,356	3,200 *
HATA	12	888,889		94,444		0,111	

* Önemlilik düzeyleri (P) <0,05'dir. S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi; farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarında hipokotil eksplantı ile yapılan çalışmaların varyans analizi sonuçlarına göre, kallus oluşturan eksplant yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi ise 0,01 düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

Kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0.25 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı (%63,33) ile 1.0 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı (%60) en iyi sonuçları vermiştir. 1.0 mg l⁻¹ TDZ içeren besin ortamı ve 0.5 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamlarında ise kallus gelişimi olmamıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4. 10 Farklı konsantrasyonlarda TDZ veya TDZxNAA kombinasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
TDZ	NAA			
0.25	-	30,00	0,00 b	0,00 b
0.5	-	10,00	0,00 b	0,00 b
1.0	-	0,00	0,00 b	0,00 b
0.25	0.1	63,33	23,33 a	0,67 a
0.5	0.1	0,00	0,00 b	0,00 b
1.0	0.1	60,00	13,33 ab	0,67 a

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından istatistiksel farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0.25 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı %23,33 ile en iyi sonucu vermiştir.

1.0 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı ise ikinci en iyi sonucu veren ortam olmuştur (%13,33). Diğer ortamlarda ise sürgün oluşumu gözlenmemiştir. 0.25 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren ve 1.0 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında eksplant başına sürgün sayısı en iyi sonucu vermiştir (0,67 adet).

Çizelge 4. 11 Farklı konsantrasyonlarda TDZ veya TDZxNAA kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	17						
ORTAMLAR	5	333,333	2,609	128,889	1,365	3,209	1,068
HATA	12	127,778		94,444		3,005	

S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

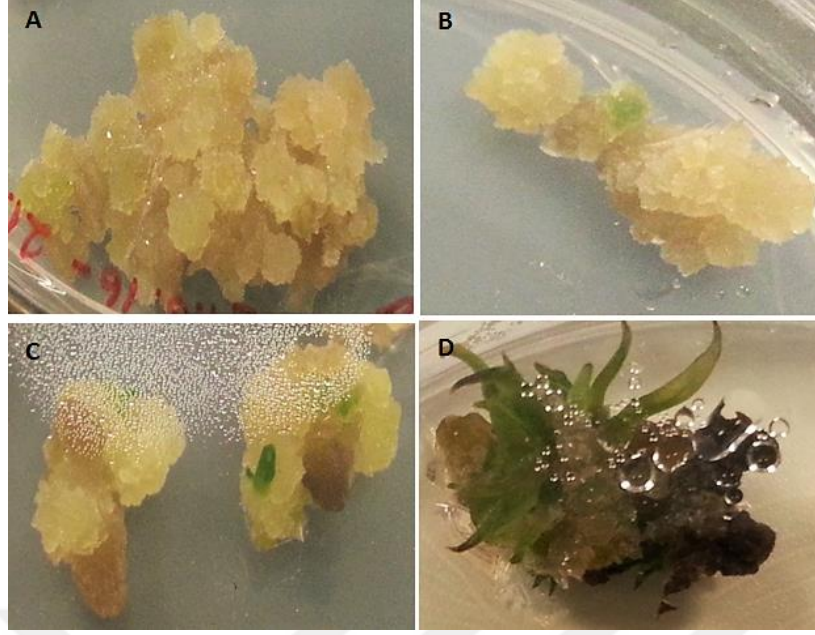
Çizelge 4.11'de verilen varyans analizi tablosunda görüldüğü gibi; farklı TDZ ve NAA konsantrasyonlarında kotiledon eksplantı ile yapılan çalışmaların sonucuna göre, bakılan parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

İstatistiksel farklılık bulunmamasına rağmen, farklı konsantrasyonlarda TDZ veya TDZxNAA kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait verilere göre; kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonucu veren ortam 0.5 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamı olmuştur (%30). Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından sonuçlara bakıldığında, 0.5 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamı en yüksek sonucu vermiştir (%16,67). Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (2,67 adet) 0.5 mg l⁻¹ TDZ x 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.12; Şekil 4.6).

Çizelge 4. 12 Farklı konsantrasyonlarda TDZ veya TDZxNAA kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait sonuçlar

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
TDZ	NAA			
0.25	-	0,00	0,00	0,00
0.5	-	10,00	3,33	1,67
1.0	-	16,67	6,67	0,33
0.25	0.1	23,33	13,33	1,67
0.5	0.1	30,00	16,67	2,67
1.0	0.1	20,00	13,33	2,11

Literatür incelendiğinde, aspir bitkisi hipokotil ve kotiledon eksplantlarında TDZ ile yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde besin ortamına eklenen TDZ için; sürgün sayısında bir artış sağladığı rapor edilmiştir [8]. Farklı sitokinlerin aspir rejenerasyonu üzerinde etkilerine bakılan Radhika vd yaptığı diğer çalışmada ise bu tez çalışmasını destekler nitelikte, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonucun tek başına TDZ içeren besin ortamından değil, TDZ x NAA kombinasyonunu içeren ortamlardan elde edildiği bildirilmiştir [13].



Şekil 4. 6 Farklı konsantrasyonlarda TDZ veya TDZxNAA kombinasyonlarını içeren besin ortamında aspir hipokotil ve kotiledon eksplantlarına ait kallus ve sürgün oluşumu **A.** 0.5 mg l^{-1} TDZ x 0.1 mg l^{-1} NAA içeren besin ortamında kotiledon eksplantından gelişen kalluslar **B.** 0.25 mg l^{-1} TDZ x 0.1 mg l^{-1} NAA içeren besin ortamında kotiledon eksplantından gelişmekte olan sürgün **C.** 0.25 mg l^{-1} TDZ x 0.1 mg l^{-1} NAA içeren besin ortamında hipokotil eksplantından gelişen sürgünler **D.** 0.25 mg l^{-1} TDZ x 0.1 mg l^{-1} NAA içeren besin ortamında hipokotil eksplantından gelişen sürgünler

4.2.3 2,4-D'nin Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

4.2.3.1 Hipokotil ve Kotiledon Eksplantlarında Etkisi

Aspir bitkisi Balcı çeşidine ait steril fidelerden izole edilen hipokotil ve kotiledon eksplantları $0.5, 1.0, 2.0, 4.0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D ve aynı ortamların 0.5 mg l^{-1} KIN'li kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

2,4-D ve/veya KIN içeren ortamlarda yapılan denemede, eksplantlarda 10-12 gün içerisinde kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallusların, eksplantların kesilen yüzeylerinde, az miktarda oluşturdukları görülmüştür. Kültür boyunca kallusların karararak öldükleri ve sürgün oluşturmadıkları gözlenmiştir. Sonuçlar yalnızca kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından değerlendirilmiştir. Varyans analizi sonucunda Çizelge 4.13'te görüldüğü gibi, hipokotil eksplantlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından istatistiksel olarak 0,01 düzeyinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4. 13 Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ	
		K.O	F.
GENEL	23		
ORTAMLAR	7	3178,571	95,357**
HATA	16	33,333	

** Önemlilik düzeyleri (P) <0,01'dir. S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu verilerine göre; kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından en yüksek sonucu veren besin ortamları; 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren besin ortamı ile 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D x 0.5 mg l⁻¹ KIN içeren besin ortamı olmuştur. Bu ortamlarda eksplantların tamamının kallus oluşturduğu gözlenmiştir. Besin ortamına 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren ortamda eksplantların tamamı kallus oluştururken; 1.0 mg l⁻¹ , 4.0 mg l⁻¹ ve 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D içeren ortamlarda sırasıyla %70, %30 ve %10 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. 2,4-D x KIN kombinasyonlarında ise birbirine daha yakın sonuçlar elde edilmiştir (%76 – 100) (Çizelge 4.14; Şekil 4.7).

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizinden elde edilen verilere bakıldığında ise, kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 0,05 düzeyinde, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından 0,01 düzeyinde anlamlı sonuçlar bulunmuştur (Çizelge 4.15). Farklılıklar arasındaki önem düzeyini belirlemek için Duncan testi yapılmıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4. 14 Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir hipokotil eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)
2,4-D	KIN	
0.5	-	10,000 e
1.0	-	70,000 c
2.0	-	100,000 a
4.0	-	30,000 d
0.5	0.5	100,000 a
1.0	0.5	86,67 b
2.0	0.5	80,00 bc
4.0	0.5	76,67 bc

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,01).

Çizelge 4. 15 Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	23						
ORTAMLAR	7	1066,071	2,665 *	47,024	11,286**	0,470	11,286**
HATA	16	400,000		4,167		0,042	

Önemlilik düzeyleri * (P<0,05), ** (P<0,01) 'dir. ** S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucuna göre, kallus oluşturan eksplant yüzdesi bakımından 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren ortam ile 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D x 0.5 mg l⁻¹ KIN içeren besin ortamında eksplantların tamamı kallus oluşturmuş ve en iyi sonucu vermiştir. %46,67 oranı ile 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren besin ortamı ise en düşük sonucu vermiştir (Çizelge 4.16; Şekil 4.7).

Çizelge 4. 16 Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarının aspir kotiledon eksplantına etkisine ait Duncan testi sonucu

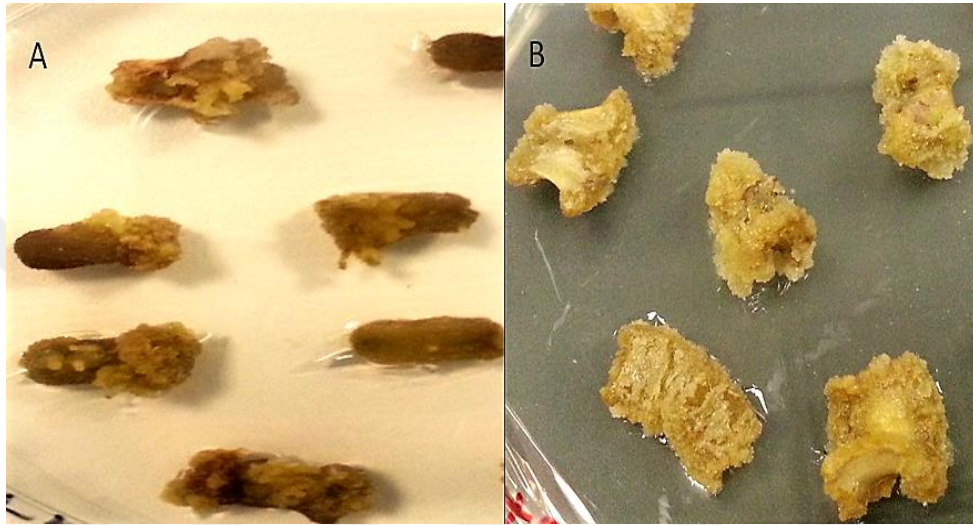
Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
2,4-D	KIN			
0.5	-	80,00 abc	10,00 A	1,00 A
1.0	-	100,00 a	0,00 B	0,00 B
2.0	-	46,67 c	6,67 A	0,67 A
4.0	-	80,00 abc	0,00 B	0,00 B
0.5	0.5	100,00 a	0,00 B	0,00 B
1.0	0.5	80,00 abc	0,00 B	0,00 B
2.0	0.5	86,67 ab	0,00 B	0,00 B
4.0	0.5	56,67 bc	0,00 B	0,00 B

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (küçük harfler; P<0,05; büyük harfler; P<0,01).

Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi bakımından sonuçlar değerlendirildiğinde ise en iyi sonuç 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D (%10) ve 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D (%6,67) içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Kallus oluşumu düşük olmasına rağmen 2.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren besin ortamında sürgün oluşumu gözlenirken, 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D içeren besin ortamı dışında

diğer ortamlarda kallus oluşumu yüksek olmasına rağmen sürgün oluşumu görülmemiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.16).

Literatürde benzer şekilde, aspir bitkisinde 2,4-D veya 2,4-D x KIN'li kombinasyonlarının ilave edildiği besin ortamları ile yapılan çalışmalarda, diğer oksin çeşitleri ile kıyaslandığında daha az sayıda kallus oluşturduğu rapor edilmiştir [19].



Şekil 4. 7 Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-DxKIN kombinasyonlarını içeren besin ortamında aspir hipokotil ve kotiledon eksplantlarına ait kallus oluşumu **A.** 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D x 0.5 mg l⁻¹ KIN içeren MS besin ortamında gelişen hipokotil eksplantından gelişen kalluslar **B.** 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D x 0.5 mg l⁻¹ KIN MS besin ortamında gelişen kotiledon eksplantından gelişen kalluslar

4.2.4 KIN'in Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

4.2.4.1 Nod Eksplantlarında Etkisi

Nod eksplantlarında, farklı KIN konsantrasyonları ile KIN x NAA konsantrasyonlarında kallus oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu bilgilere ait değerler Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18 verilmiştir.

Çizelge 4. 177 Farklı konsantrasyonlarda KIN veya KINxNAA kombinasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait varyans analizi tablosu

VARYASYON KAYNAKLARI	S.D	KALLUS OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		SÜRGÜN OLUŞTURAN EKSPANT YÜZDESİ		EKSPANT BAŞINA SÜRGÜN SAYISI	
		K.O	F.	K.O	F.	K.O	F.
GENEL	17						
ORTAMLAR	5	8,889	0,800	22,222	0,286	0,128	0,846
HATA	12	11,111		77,778		0,151	

S.D: Serbestlik Derecesi, K.O: Kareler Ortalaması, F: Frekans

Kallus oluşturan eksplant yüzdesine ait değerlere bakıldığında, KIN ve NAA içeren besin ortamlarında, nod eksplantlarının tamamında kallus oluşumu gözlenmiştir. Sadece KIN içeren ortamlarda da, yüksek oranlarda (%93 – 100) kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4. 188 Farklı konsantrasyonlarda KIN veya KINxNAA kombinasyonlarının aspir nod eksplantına etkisine ait sonuçlar

Bitki Büyüme Düzenleyicisi mg l ⁻¹		Kallus oluşturan eksplant (%)	Sürgün oluşturan eksplant (%)	Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
KIN	NAA			
0.5	-	100	93	3,76
1.0	-	93	86	3,06
2.0	-	93	80	2,90
0.5	0.2	100	93	3,52
1.0	0.2	100	93	2,72
2.0	0.2	100	86	3,54

Çizelgede farklı harfle gösterilen ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi değerleri açısından, tüm ortamların benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir (%80 – 93). Eksplant başına sürgün sayısı bakımından da değerler yakın olmakla birlikte en iyi sonuç 3,76 adet ile 0.5 mg l⁻¹ KIN içeren besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.8). En düşük sürgün sayısı ise 2,72 adet ile 1.0 mg l⁻¹ KIN x 0.2 mg l⁻¹ NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

Literatürde aspir bitkisi mikroçoğaltım çalışmaları kapsamında KIN farklı konsantrasyonları ile yapılan çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 4. 8 Farklı konsantrasyonlarda KIN veya KINxNAA kombinasyonlarını içeren besin ortamında aspir nod eksplantına ait kallus ve sürgün oluşumu. 0.5 mg l⁻¹ KIN içeren MS besin ortamında gelişen nod eksplantı

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, Aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisinin *in vitro* hızlı çoğaltımı amacıyla yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar aşağıda özet olarak verilmiştir.

Aspir doku kültürü çalışmalarında, *in vitro*'da yetiştirilen steril fidelerden elde edilen eksplantlar kullanılmıştır. Tohum sterilizasyon işlemlerinde, kontaminasyon, çimlenme ve fide gelişimi bakımından en iyi sonuçlar, tohumların %70'lik EtOH ile muamele sonrası 1 kez 5 dk süreyle dH₂O ile durulama işlemine tabi tutulup, %0.1'lik HgCl₂ çözeltisinde 15 dk karıştırıldıktan sonra 4 kez 5'er dk dH₂O ile son durulaması yapılan sterilizasyon protokolünden (4 nolu protokolü) elde edilmiştir.

Tohum yüzey sterilizasyonu sonrası kontaminasyonu azaltmak amacıyla juglon antifungal ajanının aspir tohumlarında sterilizasyona ve çimlenmeye etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda juglon içeren besin ortamlarında çimlenmeye alınmıştır. Juglonun kontaminasyonu azaltırken, çimlenmeyi arttırdığı tespit edilmiştir. Aspir bitkisinde doku kültürü çalışmalarında juglon kullanılabilir. Daha sonraki çalışmalarda antifungal ajan olarak juglonun diğer bitkilere etkisi araştırılabilir.

Aspir bitkisi Balcı çeşidinde MS besin ortamında farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda, hipokotil ve kotiledon eksplantları için; kallus oluşturma yüzdesi bakımından en iyi sonuçlar hipokotil eksplantında 2.0 mg l⁻¹ BAP x 0,5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamından elde edilirken; kotiledon eksplantı için 0.5 mg l⁻¹ BAP x 0,5 mg l⁻¹ NAA ve 1.0 mg l⁻¹ BAP x 0,5 mg l⁻¹ NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçlar ise hipokotil eksplantında 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besin

ortamından, kotiledon eksplantı için ise 0.5 mg l^{-1} BAP x 0.5 mg l^{-1} NAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Sadece BAP içeren ortamlarda daha düşük oranda sürgün elde edilmiştir. Nod eksplantında ise, kallus oluşturma yüzdesi bakımından başarılı sonuçlar alınmış ve eksplant başına sürgün sayısı için en iyi sonuç 0.5 mg l^{-1} BAPx 0.2 mg l^{-1} NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

Hipokotil ve kotiledon eksplantları ile kurulan TDZ denemelerinde ise, hipokotil eksplantları için yalnızca TDZ içeren besin ortamlarında sürgün oluşumu gözlenmezken, kotiledon eksplantlarında az sayıda sürgün oluşumuna rastlanmıştır. Fakat NAA'li kombinasyonlarında daha fazla sayıda sürgün oluşmuştur. Sürgün oluşum yüzdesi bakımından en iyi sonuç 0.5 mg l^{-1} TDZ x 0.1 mg l^{-1} NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir (%16,67).

Aspir bitkisi Balcı çeşidinde MS besin ortamında farklı 2,4-D ile kurulan denemelerde, hipokotil eksplantında kallus oluşumunu takiben sararmalar meydana gelmiş ve sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Kotiledon eksplantında ise düşük oranda sürgün gelişimi 0.5 mg l^{-1} 2,4-D (%10) ve 2.0 mg l^{-1} 2,4-D (%6,67) içeren besin ortamlarından elde edilmiştir.

KIN'in tek başına ve 0.2 mg l^{-1} NAA ile kombinasyonları ile hazırlanan MS besin ortamlarında geliştirilen nod eksplantlarında ise, kallus ve sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ile eksplant başına sürgün sayısı açısından iyi sonuçlar elde edilmiş fakat ortamlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 0.5 mg l^{-1} KIN içeren besin ortamından eksplant başına 3,76 adet sürgün elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşumu bakımından iyi sonuçlar elde edilmiştir. Fakat sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından literatüre kıyasla daha düşük sonuçlar elde edilmiştir. Doku kültüründe rejenerasyonu etkileyen en önemli faktörlerden biri de genotiptir. Tez çalışmasında kullanılan aspir çeşidi bu çalışmada ilk kez kullanılmış farklı bir genotiptir. Benzer büyüme düzenleyicileri ile yapılan diğer çalışmalarda kallus oluşturan eksplant yüzdesi, sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı açısından daha iyi sonuçların çıkmasının nedeni bu olabilir. Bu genotipte daha sonra yapılacak

çalışmalarda farklı BBD ile denenen BBD'lerin farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonlarının sürgün oluşumuna etkisi araştırılabilir.

Aspir doku kültürü çalışmalarında sürgünlerin vitrifikasyonu önemli sorunlardan biri olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada da gelişen sürgünlerin çoğunun vitrifikasyon sürgünler olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle köklendirme çalışmaları yürütülemedi. Balcı çeşidi ile yapılacak çalışmalarda vitrifikasyonu engelleyici ajanların (gümüş nitrat, aktif karbon vb.) kullanılması gerekliliği tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- [1] Bitkisel Yağ Sanayicileri Derneği, Aspir Özellikleri, <http://www.bysd.org.tr/Istatistikler.aspx>, 5 Şubat 2015.
- [2] Baydar, H. ve Kara, N., (2010). Dry Matter Accumulation in Vegetative and Generative Parts During Growth and Development Periods of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), Journal of Natural & Applied Sciences, 14(2).
- [3] Özdemir, F.A. ve Türker, M., (2014), "Yabani Aspir'in (*Carthamus percius Wild*) in vitro Çoğaltımında Farklı BAP-NAA Kombinasyonlarının Etkisi". Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 24(1), 30-35.
- [4] Lijiao, F.A.N. ve Meili, G.U.O., (2013). "Progress of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Regeneration through Tissue Culture". Journal of Medical Colleges of PLA, 28(5), 289-301.
- [5] Golkar, P. (2014)., "Breeding Improvements in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.): A Review", Australian Journal of Crop Science, 8(7), 1079.
- [6] George, L. ve Rao, P.S. (1982), "In vitro Induction of Pollen Embryos and Plantlets in *Brassica juncea* through Anther Culture", Plant Science Letters, 26(1), 111-116.
- [7] Rajendra Prasad, B., Khadeer, M. A., Seeta, P. ve Anwar, S. Y. (1991), "In vitro Induction of Androgenic Haploids in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.)", Plant cell reports, 10(1), 48-51.
- [8] Orlikowska, T.K., Cranston, H.J. ve Dyer, W.E. (1995), "Factors Influencing *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation and Regeneration of the Safflower Cultivar 'Centennial'", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40(1), 85-91.
- [9] Baker, C.M. ve Dyer, W.E. (1996), "Improvements in Rooting Regenerated Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Shoots", Plant Cell Reports, 16(1), 106-110.
- [10] Nikam, T.D. ve Shitole, M.G. (1998), "In vitro Culture of Safflower L. cv. Bhima: Initiation, Growth Optimization and Organogenesis", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55(1), 15-22.
- [11] Mandal, A.K.A. ve Gupta, S.D. (2001), "Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration in Safflower", In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37(1), 50-54.

- [12] Mandal, A. K. A., & Gupta, S. D. (2003), "Somatic Embryogenesis of Safflower: Influence of Auxin and Ontogeny of Somatic Embryos", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 27-31.
- [13] Radhika, K., Sujatha, M. ve Rao, T.N. (2006), "Thidiazuron Stimulates Adventitious Shoot Regeneration in Different Safflower Explants", *Biologia plantarum*, 50(2), 174-179.
- [14] Kumar, J.V., Kumari, B.R., Sujatha, G. ve Castano, E. (2008), "Production of Plants Resistant to *Alternaria carthami* via Organogenesis and Somatic Embryogenesis of Safflower cv. NARI-6 Treated with Fungal Culture Filtrates", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1), 85-96.
- [15] Yang, Z., Yang, J., Jia, Y., Tian, Y. ve Wen, A. (2009), "Pharmacokinetic Properties of Hydroxysafflor Yellow A in Healthy Chinese Female Volunteers", *Journal of ethnopharmacology*, 124(3), 635-638.
- [16] Shilpa, K.S., Kumar, V.D. ve Sujatha, M. (2010), "Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(3), 387-401.
- [17] Belide, S., Hac, L., Singh, S.P., Green, A.G. ve Wood, C.C. (2011), "Agrobacterium-mediated Transformation of Safflower and The Efficient Recovery of Transgenic Plants via Grafting", *Plant methods*, 7(1), 12.
- [18] Motamedi, J., Zebarjadi, A., Kahrizi, D. ve Salmanian, A.H. (2011), "*In vitro* Propagation and Agrobacterium-mediated Transformation of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Using a Bacterial Mutated *aroA* Gene", *Australian Journal of Crop Science*, 5(4), 479.
- [19] Ali, N. ve Afrasiab, H. (2014), Effect of TIBA and other Plant Growth Regulators on Callogenic Response from Different Explants of Safflower (*Carthamus tinctorius*), *International Journal of Agriculture & Biology*, 16(6).
- [20] Kumari, S., Pandey, R.K. ve Kumar, U. (2015), "In-vitro Callus Induction from Two Different Explants Stem and Leaf in *Carthamus-tinctorius* Linn", *European Journal of Experimental Biology*, 5(2), 1-4.
- [21] Basalma, D., Uranbey, S., Mirici, S. ve Kolsarici, Ö. (2008), "TDZ x IBA Induced Shoot Regeneration from Cotyledonary Leaves and *In vitro* Multiplication in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.)", *African Journal of Biotechnology*, 7(8).
- [22] Singh, V. ve Nimbkar, N. (2006), *Safflower (Carthamus tinctorius L.)*, Chapter, 6, 167-194.
- [23] Cronquist, A. (1981), *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press.
- [24] Dajue, L. ve Mündel, H.H. (1996), *Safflower. Carthamus tinctorius*, 1-83
- [25] Sujatha, M. (2002), "Current Status and Future Prospects of *In vitro* Techniques and Biotechnology in Safflower Breeding", *Sesame and Safflower Newsletter*, (17), 92-97.

- [26] Sales R.L. (2005), "The Effects of Peanut Safflower and Olive Oil on Body Composition, Energy Metabolism, Lipid Profile and Food Intake of Eutrophic, Normolipidemic Subjects", *Revista Nutrican*, 18:499-511.
- [27] Vogel G. ve Browse J. (1996), "Cholinephosphottransferase and Diacylglycerolacyltransferase (Substrate Specificities at a Key Branch Point in Seed Lipid Metabolism)", *Plant Physiology*, 110:923-931
- [28] Konar V., Aşkın Y., Türkoğlu İ. (2010), "Yabani Aspir (*Carthamus percisus* wild) Bitkisinin Yağ Asidi Bileşiminin İncelenmesi", *Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi*, 22: 29-36].
- [29] Gürel, F., Modern Biyoteknolojinin Geleceği Üzerine Bir Analiz, <https://genotyping.wordpress.com/2013/04/15/modern-biyoteknolojinin-gelecegi-uzerine-bir-analiz/> 12 Şubat 2017.
- [30] Arslan, Y., Katar, D., Güneylıoğlu, H., Subaşı, İ., Şahin, B. ve Bülbül, A.S. (2010), "Türkiye Florasındaki Yabani *Carthamus* L. Türleri ve Aspir (*C. tinctorius* L.) İslahında Değerlendirme Olanakları", *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 19(1-2).]
- [31] İşler, N., Aspir Tarımı, Mustafa Kemal Üniversitesi Resmi Sayfası. <http://www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1022> 29 Nisan 2016.
- [32] <http://www.wellbeingherbs.com/wp-content/uploads/2014/10/safflower-carthamus-tinctorius.png>, 30 Nisan 2016.
- [33] Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2001), *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, 1st ed. Konya, Turkey: Selçuk Üniversitesi Basımevi (in Turkish).
- [34] Kocaçalışkan, İ., (2002), *Bitki doku kültürleri (Organ, Doku ve Hücre)*, DPÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, (ISBN:978-975-8201-47-6)
- [35] Maheshwari, N., Rajyalakshmi, K., Baweja, K., Dhir, S.K., Chowdhry, C.N. ve Maheshwari, S.C. (1995), "In vitro Culture of Wheat and Genetic Transformation—Retrospect and Prospect", *Critical reviews in plant sciences*, 14(2), 149-178.
- [36] Brown, D.C.W. ve Thorpe, T.A. (1995), "Crop Improvement through Tissue Culture", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 409-415.
- [37] Ochatt, S.J. ve Power, J.B. (1992), *Plant Regeneration from Cultured Protoplasts of Higher Plants*. *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*, Second Supplement/Volume Editors, Michael W. Fowler & Graham S. Warren; editor-in-chief, Murray Moo-Young.
- [38] Biyologlar Derneği, Bitki Doku Kültürü, <http://biyologlar.com/bitki-doku-kulturu>, 12 Şubat 2017.
- [39] Sokmen, A. ve E. Gürel. (2001), *Bitki Biyoteknolojisi [Plant Biotechnology]. In Sekonder Metabolit Üretimi (Secondary Metabolite Production)*, edited by Babaoğlu, M., E. Gürel, S. Özcan, 211– 261. Konya: Selçuk University Press

- [40] Bahçe Bitkileri, Organogenesis ve Somatik Embriyogenesis, http://www.bahcebitkileri.org/wp-content/uploads/2011/04/4.hafta_-organogenesisiz-ve-somatik-embriyogenesis.pdf, 23 Nisan 2017
- [41] Sugiyama, M. (1999), "Organogenesis *In vitro*", Current Opinion in Plant Biology, 2(1), 61-64.
- [42] Stewart Jr, C.N. (2016), Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications, John Wiley & Sons.
- [43] Grunewald, W., Van Noorden, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., Gheysen, G. ve Mathesius, U. (2009), "Manipulation of Auxin Transport in Plant Roots During Rhizobium Symbiosis and Nematode Parasitism", The Plant Cell, 21(9), 2553-2562.
- [44] Kumlay, A.M. ve Eryiğit, T. (2011), "Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları", Iğdır Üni. Fen Bilimleri Ens. Dergisi, 1(2), 47-56.
- [45] Halloran, N. ve Kasım, M.U. (2002), Meyve ve Sebzelerde Büyüme Düzenleyici Madde Kullanımı ve Kalıntı Düzeyleri, GIDA/THE JOURNAL OF FOOD, 27(5).
- [46] Murashige T. ve Skoog F. (1962), "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures", Physiol. Plant. 15:473-497.
- [47] Özcan, S. ve Özgen, M. (1996), "Bitki Genetik Mühendisliği", Kükem Dergisi, 1(1), 69-95.
- [48] Snedecor, G.W. ve Cochran, W.G. (1967), "Shortcut and Non-Parametric Methods". Statistical Methods, 120-134.
- [49] Kramer, C.Y. (1956), "Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications", Biometrics, 12(3), 307-310.
- [50] Marino, G., Gaggia, F., Baffoni, L., Toniolo, C. ve Nicoletti, M. (2015), "Antimicrobial Activity of Melia Azedarach Fruit Extracts for Control of Bacteria in Inoculated *In-vitro* Shoots of 'MRS 2/5' Plum Hybrid and Calla Lily and Extract Influence on the Shoot Cultures", European journal of plant pathology, 141(3), 505-521.
- [51] Abdi, G., Salehi, H. ve Khosh-Khui, M. (2008), "Nano Silver: A Novel Nanomaterial for Removal of Bacterial Contaminants in Valerian (*Valeriana officinalis* L.) Tissue Culture", Acta Physiologiae Plantarum, 30(5), 709-714.
- [52] Paul, A.L., Semer, C., Kucharek, T. ve Ferl, R.J. (2001), "The Fungicidal and Phytotoxic Properties of Benomyl and PPM in Supplemented Agar Media Supporting Transgenic Arabidopsis Plants for a Space Shuttle Flight Experiment", Applied microbiology and biotechnology, 55(4), 480-485.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Şeyda KAYA
Doğum Tarihi ve Yeri : Karabük – 01.09.1992
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : seyda.kaya@std.yildiz.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Üniversitesi	2014
Lise	Sayısal / Fen	Kastamonu Göl Anadolu Öğretmen Lisesi	2010

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2016-2017	Bayrampaşa Aliya İzzetbegoviç Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi	Kimya Öğretmeni
2015-2016	ÇAPA Onkoloji Enstitüsü	Moleküler Biyolog, Kemoterapi İlaçları Araştırma Ekibi
2015	Yedikule Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

YAYINLARI

Bildiri

1. Kaya, Ş., Kocaçalışkan, İ., Erişen, S. (2016), “The Effect of Juglone on Contamination in Plant Culture”, International Congress of Fundamental and Science.
2. Kaya, Ş. (2016), “Bitkilerde Yeni Bir Hormon Grubu : Poliaminler” Ulusal Botanik Kongresi.

ÖDÜLLERİ

1. TÜBİTAK ve KADEM işbirliği ile düzenlenen “Kadın Girişimcilik Kampı”, 2015. Kanser Erken Teşhis Kiti - Finalist Proje
2. TÜSİAD organizatörlüğünde düzenlenen “Bu Gençlikte İş Var” adlı proje yarışması, 2016. “Kanser Erken Teşhis Kiti” – İlk 10 proje