



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

PEYZAJ MİMARLIĞI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***KALANCHOE BLOSSFELDİANA* POELLN. (KALANŞO)
TÜRÜNDE YAPRAK EKSPLANTLARINDAN IN VİTRO
REJENERASYON VE MİKROÇOĞALTIM ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR**

FATMA NUR ALTINDAĞ ÇELİK

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ CEVDET GÜMÜŞ

BARTIN-2022



T.C.
BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
PEYZAJ MİMARLIĞI ANABİLİM DALI

Kalanchoe blossfeldiana Poelln. (Kalanşo) TÜRÜNDE YAPRAK
EKSPLANTLARINDAN IN VİTRO REJENERASYON VE MİKROÇOĞALTIM
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Nur ALTINDAĞ ÇELİK

BARTIN-2022

KABUL VE ONAY



BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (Kalanşo) TÜRÜNDE YAPRAK EKSPLANTLARINDAN IN VİTRO REJENERASYON VE MİKROÇOĞALTIM ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

....../....../2022

Fatma Nur ALTINDAĞ ÇELİK

ÖNSÖZ

Öncelikle tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yardımcı olan, çalışma sürecimde bana yol gösteren değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu konuda bana çalışma olanağı veren, olumlu tavırlarıyla beni cesaretlendiren, değerli bilgilerini benimle paylaşan, çalışmam dışında da bana her konuda destek olan sayın Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU hocama teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca bana her zaman destek olan, manevi katkılarından dolayı babam Zekeriya ALTINDAĞ'a, annem Nazan ALTINDAĞ'a, kardeşim Furkan ALTINDAĞ'a ve motivasyon ve desteğini benden esirgemeyen, tez yazmamda yardımcı olan değerli eşim Mehmetcan ÇELİK'e sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Fatma Nur ALTINDAĞ ÇELİK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (Kalanşo) TÜRÜNDE YAPRAK EKSPLANTLARINDAN IN VİTRO REJENERASYON VE MİKROÇOĞALTIM ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Fatma Nur ALTINDAĞ ÇELİK

Bartın Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ

Bartın-2022, sayfa: 58

Kalanchoe cinsi *Crassulaceae* familyasına ait olup yaklaşık 130 tür ile temsil edilmektedir. Dünyada en çok bilinen türü *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.(Kalanşo)'dır. *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.(Kalanşo), sukulent karakterli çok yıllık bitkilerdir. Gerek dekoratif yaprakları gerekse uzun ömürlü ve rengârenk çiçekleri ile bulunduğu mekâna canlılık katan ve iç mekan bitkilendirme tasarımlarında en fazla kullanılan süs bitkilerindendir. Bu çalışmada *K. blossfeldiana*'nın mikroçoğaltımı üzerinde çalışılmıştır. Araştırmada öncelikle yaprak eksplantları kullanılarak adventif sürgün rejenerasyonu elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla farklı büyümeyi düzenleyici maddelerin veya kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Denemelere göre büyümeyi düzenleyici maddelerin cinsi ve dozu değişmekle birlikte genel olarak oksin grubu hormonlardan NAA (0.1, 0.5, 1.0 mg/L), sitokinin grubu hormonlardan ise BAP (2.0 mg/L) ve TDZ (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L) MS besin ortamına ilave edilmiştir. Büyümeyi düzenleyici madde içeren MS besin ortamlarında meydana gelen adventif sürgün oluşum oranları belirlenmiştir. *In vitro* sürgünler ½ MS + 0.2 mg/L GA₃ besin ortamı kombinasyonunda

pişkinleştirilmiştir. Pişkinleştirme ortamında yeterli gelişme gösteren sürgünler hem durgun su kültüründe hem de hormonsuz ½ MS, tam MS ve 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarında %100 oranında köklenmiştir. Köklü bitkicikler 1:1 oranında perlit + torf, vermikulit ve fide harcı yetiştirme ortamlarında başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılmıştır. Dış koşullara adaptasyonu sağlanan bitkiler saksılara alınarak çiçeklenme aşamasına kadar geliştirilmiş, donör bitki ile aynı yapıda oldukları, herhangi bir somaklonal varyasyon görülmediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Kalanchoe*, mikroçoğaltım, hormon, akklimatizasyon.



ABSTRACT

M. Sc. Thesis

***Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (Flaming Katy) RESEARCH ON IN VITRO REGENERATION AND MICROPROPRIATION USING LEAF EXPLANTS**

Fatma Nur ALTINDAĞ ÇELİK

Bartın University

Graduate School

Department of Landscape Architecture

Thesis Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Cevdet GÜMÜŞ

Bartın -2022, pp: 58

The *Kalanchoe* genus belongs to the *Crassulaceae* family and is represented by about 130 species. The most well-known species in the world is *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (Flaming Katy). *K.blossfeldiana* Poelln. are perennial plants with succulent character. It is one of the most used ornamental plants in interior designs, adding vitality to the place where it is placed due to its decorative leaves, long-life and colorful flowers. In this study, micropropagation of *Kalanchoe blossfeldiana* was studied. In the research, firstly, adventitious shoot regeneration was tried to be obtained by using leaf explants. For this purpose, the effects of different growth regulators and their combinations were investigated. Although the type and dose of growth regulators used vary according to the trials, in general, NAA (0.1, 0.5, 1.0 mg/L) from auxin group hormones, BAP (2.0 mg/L) and TDZ (0.1, 0.2, 0.5, 1.0) from cytokinin group hormones. mg/L) was added to the MS nutrient medium. Adventitious shoot formation rates were determined in MS nutrient media containing growth regulators. In vitro shoots were matured in a combination of ½ MS + 0.2 mg/L GA3 nutrient medium. The shoots with sufficient growth were rooted in 100% both in still water culture and in hormone-free ½ MS, MS, and MS medium with 0.1 mg/L IBA added. Rooted plantlets were successfully acclimatized in a mixture of perlite + peat (1:1), vermiculite, and a commercial seedling-growing soil. The plants

were adapted to the external conditions and were taken into pots and developed until the flowering stage. It was determined that they were in the same structure as the donor plant, and no somaclonal variation was observed.

Keywords: *Kalanchoe*, micropropagation, plant growth regulators, acclimatization.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
BEYANNAME.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1.Gövde Kısımlarının Kullanıldığı Mikroçoğaltım Çalışmaları	9
2.2.Yaprak Kısımları Kullanılarak Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları.....	13
2.3.Çiçek Kısımları Kullanılarak Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları	16
3.MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1 Materyal	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Bitkilerin Temin Edilmesi	19
3.2.2 <i>In-vitro</i> Kültürde Kullanılan Genel Yöntemler.....	19
3.2.2.1 Besin Ortamlarının Hazırlanması	20
3.2.2.2 Eksplantların Hazırlanması, Sterilizasyonu ve Dikimi	23
3.2.2.3 Kültür Koşulları.....	25
3.2.2.4 Elde Edilen Bitkiciklerin Dış Koşullara Adaptasyonu	26
3.2.2.5 Değerlendirme	27
3.2.3 Deneme Gruplarında Yapılan Farklı Uygulamalar	27
3.2.3.1 I.Deneme	28
3.2.3.2 II.Deneme	28
3.2.3.3 III.Deneme	28
3.2.4. Sürgünlerin geliştirilmesi, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1 I.Deneme Sonuçları	30
4.2 II.Deneme Sonuçları.....	32

4.3 III.Deneme Sonuçları	38
4.4. Sürgünlerin geliştirilmesi, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ	57



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
No	No
2.1: Türkiye’de Ticari Üretimi Yapılan Çeşitler.....	6
3.1: Pembe renkli çiçeklere sahip <i>Kalanchoe blossfeldiana</i> çeşidine ait bitkilerin görünümü	18
3.2: Kabin içinde materyal sterilizasyonunu sağlayan ispirto ocağı ve sterilizatör	20
3.3: Besin ortamı hazırlığı ve kabin içerisinde dikime hazır halde bulunan petri kapları ..	22
3.4: Akan suyun altında yıkanan yapraklar.....	24
3.5: Kabin içerisinde yapılan yüzey sterilizasyonu işlemi	24
3.6: Besi ortamına yerleştirilmiş eksplantlar	25
3.7: İklim odasında bulunan petriler	26
4.1: TDZ içeren ortamlardaki kalanşo yaprak eksplantlarının kenarlarında oluşan sürgün rejenerasyonu	31
4.2: Sürgünlerin alt kültüre alındığı kavanozlardaki transferden hemen sonraki ve bir hafta gelişmenin ardından görünümleri	32
4.3: Köklendirme ortamında köklendirilmiş genç bitkicikler.....	33
4.4: En fazla sürgün rejenerasyonu veren 1. ortamdan elde edilmiş sürgünler.....	36
4.5: Kallus oluşumu ile birlikte sürgün gelişimi, sürgün rejenerasyonu.....	36
4.6: Gelişmekte olan genç sürgünler ve mikro çelikleme yapılmış bitkicikler.....	37
4.7: Oluşan sürgün rejenerasyonlarından farklı gelişme aşamalarında çekilmiş mikroskop ve eksplant görünümleri.....	37
4.8: Eksplantlardan direkt olarak çıkan kök yapısı	39
4.9: MS + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA ortamı üzerinde kalanşo yaprak eksplantlarının 8 haftalık kültüründen sonraki görünümleri.....	40
4.10: MS ortamı + 2.0 mg / L BAP + 1.0 mg / L NAA üzerinde kalanşo yaprak eksplantlarının 8 haftalık kültüründen sonraki görünümleri.....	40
4.11: 1.0 mg/L NAA içeren ortamda kallus ve kök oluşumu başlangıç aşamaları.....	41
4.12: 8 haftalık kültürden sonra MS + 2 BAP mg/L +1.0 NAA mg/L oluşan farklı sürgünler	41
4.13: MS + 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA ortamı üzerinde kalanşo yaprak eksplantlarının 8 haftalık kültüründen sonraki görünümleri.....	41
4.14: 8 haftalık kültürden sonra MS + 2 BAP mg/L +0.5 NAA mg/L ortamında oluşan	

kökler ve sürgünler	42
4.15: MS + 0.1 mg/L TDZ ortamında kalanşo yaprak eksplantı kültüründe gözlemlenen sürgün rejenerasyonu görünümleri	42
4.16: Pişkinleştirme ortamına alınan kalanşo sürgünlerinin 4 hafta sonundaki gelişme durumları.....	43
4.17: Farklı yetiştirme ortamlarında dış koşullara alıştırılan <i>in vitro</i> Kalanşo bitcikiciklerinin 4 hafta sonundaki gelişme durumu.....	44
4.18: Su kültüründe dış koşullara alıştırılan kalanşo bitkileri.....	45
4.19: Dış koşullara alıştırıldıktan sonra saksılara aktarılarak çiçeklendirilen kalanşo bitkileri.....	47



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
No	No
3.1: MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel elementleri ve miktarları.....	21
4.1: Farklı TDZ dozlarının ortam üzerindeki etkileri.....	31
4.2: Farklı TDZ dozlarına 0,1 mg/L ve 0,5 mg/L eklenen NAA hormonunun ortam üzerindeki etkileri	34
4.3: Farklı dozlarda kullanılan hormonların ortam üzerindeki etkileri	39



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: celcius derece
g	: gram
L	: litre
mg	: miligram
ml	: mililitre
pH	: asitlik derecesi
µl	: mikrolitre
µM	: mikrometre
µmol	: mikromol
N	: normal
ppm	: madde miktarının milyonda 1'i

KISALTMALAR

ABA	: Absisik Asit
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
BA	: 6-Benziladenin
BAP	: 6-Benzilaminopurin
GA ₃	: Giberellik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
HgCl ₂	: Cıva (II) Klorür
IAA	: Indol-3-Asetik Asit
IBA	: Indol-3-Butirik Asit
Kin	: Kinetin
MS	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı

NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaOCI	: Sodyum Hipoklorit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
TDZ	: Thidiazuron
2İP	: İzopentanil adenin
2,4-D	: 2,4 -Diklorofenoksi Asit



1.GİRİŞ

Bugün 7,97 milyara ulaşan dünya nüfusu giderek artmaktadır. Bu hızlı nüfus artışının dolaylı etkisi nedeniyle sanayileşme ve küreselleşmenin gelişmesi, kentleşmenin hızını artırmaktadır. Günümüzde dünya nüfusunun %50'den fazlası şehirlerde yaşamaktadır. Plansız kentleşme ve kentsel vizyon ile doğa arasında artan mesafe, doğal ve ekolojik sorunları da beraberinde getirmiştir. Bu tarz çevre sorunlarının yaşandığı kentlerde yeşile özlem giderek artmaktadır. İnsanlar zaman zaman kentsel yeşil alanlar ve diğer rekreasyon alanları ile doğayı çevreye taşıma arzusunu tatmin edememekte, yeşili ve çiçekleri iç mekâna getirerek bu ihtiyaçları karşılamaya çalışmaktadır. Bu nedenle süs bitkileri insanların ihtiyaçlarını karşılamak için vazgeçilmez bir unsur haline gelmiştir. Başta AB ülkeleri ve Türkiye olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde süs bitkileri renk, koku, aroma ve kadifemsi yüzey gibi özellikler açısından insanlar üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Yetiştiricilik, paketlenme, muhafaza ve pazarlama gibi alanlarda istihdam yaratan süs bitkileri sektörü ülke ekonomilerinin gelişimine de büyük hizmet etmektedir (Kelkit ve Bulut, 1998; Hekimoğlu, B. ve Altindeğer, 2012; Uludağ ve Ertürk, 2012).

Süs bitkileri; yaprak, çiçek, gövde, brakte, tohum, meyve ve formu ile görsellik sağlayan estetik ve fonksiyonel özellikleri ile peyzaj tasarımlarının vazgeçilmez canlı elemanlarıdır. Süs bitkilerinin ekolojik istekleri aynı zamanda kullanım alanlarını da belirlemekte, buna göre iç mekân süs bitkileri, kesme çiçekler, dış mekân süs bitkileri ve geofitler olarak sınıflandırılmaktadır.

Peyzaj tasarımlarında dış mekân süs bitkileri kullanılırken, iç mekân tasarımlarında ise iç mekân süs bitkilerine olan ilgi ve istek her geçen gün artmaktadır (Zencirkıran ve ark.2018). Çevre problemlerinin arttığı, şehirlerin giderek betonarme yapılara dönüştüğü günümüzde çevreyle bağlantımızı sağlayan iç mekân süs bitkileri, yaşantımıza renk katan tasarım elemanlarıdır (Güçlü, 1999). Bilimsel araştırmalarda iç mekânlarda bitki kullanımının, insan psikolojisini olumlu etkilediği (Bringslimark vd., 2009); stresi azalttığı (Dijkstra vd., 2008); ofis ortamında çalışanların dikkatlerini, performanslarını artırdığı (Ranaas vd., 2011); böylece evde, iş ortamlarında doğal bir ortam sağlayarak insanlara faydalı olduğu (Korpela vd., 2017) belirlenmiştir.

İç mekânlarda bitki yetiştiren birçok insan, bitkilerin kendilerini dinlendirdiği ve huzur getirdiği düşüncesindedir. Bunun nedeni bitkilerinde insanlar gibi yaşamsal faaliyetlerinin olması, devamlı değişim ve gelişim göstermeleridir. Bitkilerin gelişim göstermesi, bazı dönemlerde çiçeklenmesi veya uyku hallerini gözlemlemek, insanlara tabiatla iletişim kurma fırsatı verir (Çelem ve Arslan, 1995). İç mekân süs bitkileri, alana anlam kazandırma; insana sınırsız alandaymış hissi verme, meyve, çiçek veya yaprakları ile yeşili kapalı alana taşıma; mekân içindeki bulunan eşyalar arasında renk geçişi sağlama; mekânı öne çıkarma ve yönlendirme vb. özellikleri ile iç mekân düzenlemelerinin vazgeçilmez bir parçasıdır (Sezen vd., 2017).

Günümüzde süs bitkileri sektörü gıda kadar önemli bir alan haline gelmiştir. İnsan psikolojisine olan etkisi nedeniyle de sağlıklı kuşaklar yetişmesinin de bir parçası olmuştur. Hızla gelişen şehirlerde dinlenme alanları yaratmak ve gelecek nesiller için çevre bilincini artırmak bu sektörün sosyal sorumluluğu haline dönüşmüştür (Anon., 2017).

Süs bitkileri sadece estetik amaçlı değil ticari amaçla da kullanılmakta ve ülke ekonomilerine katkı sağlamaktadır. Dünya’da kişi başına düşen süs bitkileri tüketiminin ülkelerin gelişmişlik düzeylerine göre farklılık göstermekle birlikte çoğu ülkede artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle dünyadaki rekabet giderek artmakta, yeni ülkeler pazara dahil olmaya çalışırken bazı geleneksel pazarlar ise düşüş eğilimi göstermektedir (Anon., 2020).

Dünyada 2020 yılında 22 milyar 223 milyon \$ değerinde süs bitkileri ihracatı yapılmıştır. Dünyada en fazla ihracatı yapılan ürün grubunu 10 milyar 624 milyon \$ ile canlı bitkiler oluşturmaktadır. Kesme çiçekler 8 milyar 435 milyon \$, geofitler 1,7 milyar \$ değerinde ihracatı yapılmıştır. Hollanda, dünyada süs bitkilerinde en fazla ihracat yapan ülkelerin başında gelmektedir. Hollanda’yı sırasıyla Kolombiya, Almanya, İtalya ve Kenya izlemektedir. Türkiye ise dünya süs bitkileri ihracatçıları arasında 23.sıradadır (Anon., 2021a).

Dünya süs bitkileri ithalatı ise 2020 yılında 20 milyar 60 milyon \$ olarak gerçekleşmiştir. En fazla ithalatı gerçekleştirilen ürün grubunu 8 milyar 848 milyon \$ değeri ile canlı bitkiler oluşturmuş, bunu sırasıyla, 7 milyar 799 milyon \$ ile kesme çiçekler, 1 milyar 705 milyon \$ ile geofitler izlemiştir (Anon., 2021). Almanya, dünya süs bitkilerinde ithalatında ilk sırayı alırken Almanya’yı sırasıyla Hollanda, ABD, İngiltere ve Fransa takip etmiştir. Türkiye ise dünya süs bitkileri ithalatçıları arasında 43. sıradadır (Anon., 2021a).

Dünyadaki süs bitkileri ticaretinin çoğu mezarlar aracılığı ile yapılmaktadır. Mezarlar, üreticilerin ürünlerini satmak için kurdukları toptan satış pazarlarıdır. İlk çiçek mezarı 1930'da Hollanda'da kurulmuştur. Hollanda, dünyanın süs bitkileri ticaretinin merkezi olarak bilinmektedir (Anon., 2014).

Türkiye, süs bitkileri sektörü açısından iklim, coğrafi koşullar, pazara yakınlığı ve ucuz iş gücü nedeniyle önemli avantajlara sahiptir (Zencirkıran ve Gürbüz, 2009). Ülkemizde süs bitkileri üretim alanları 2020 yılında 54.126 da alana ulaşmıştır. 2020 yılı verilerine göre ülkemizde süs bitkileri üretim alanları ürün gruplarına göre değerlendirildiğinde, 39.739 da alan ile (%72) dış mekân süs bitkileri ilk sırada yer alırken, 12.183 da alan ile (%23) kesme çiçekler, 1.706 da alan ile (%4) iç mekân süs bitkileri izlemektedir. Çiçek soğanları 498 da alan ile (%1) en az üretim alanına sahip üretim grubudur.

Ülkemizde süs bitkileri üretim miktarları her yıl Türkiye İstatistik Kurumu tarafından yayınlamaktadır. TÜİK'nun 2021 yılı kayıtlarına göre en fazla üretilen ürün grubunu kesme çiçeklerin oluşturduğu görülmektedir. Bu ürün grubunu dış mekân süs bitkileri ile çiçek soğanları izlerken en az üretim miktarına sahip olan ürün grubu ise iç mekân süs bitkileridir. Süs bitkileri üretimi içinde kesme çiçekler %62.3, diğer süs bitkileri ise %37.7'lik bir paya sahiptir. Ülkemizde toplam süs bitkileri üretim miktarı 2021 yılında bir önceki yıla göre %2.9 oranında artmıştır. Kesme çiçek üretimi bir önceki yıla göre %5.2, iç mekân süs bitkileri üretimi ise %11.4 oranında artarken, dış mekân süs bitkileri üretimi %1.8 oranında azalmıştır (Anon., 2021a; Anon., 2021b)

Süs bitkileri yetiştiriciliğinin ülkemizde en fazla yapıldığı iller sırayla İzmir (%31), Sakarya (%21), Antalya (%11), Yalova (%7) ve Bursa (%6)'dır. Yalova, Sakarya, Adana, İstanbul, Osmaniye iç ve dış mekân bitki yetiştiriciliğinde önemli yere sahiptir. Sakarya'nın başta merkezi olmak üzere Sapanca, Arifiye, Pamukova ilçelerinde üretim alanları daha yoğundur. İzmir ve Antalya kesme çiçek üreticiliğinde en önemli illerdendir. Marmara ve Ege Bölgesinde yapılan kesme çiçek üretimi genel olarak iç pazara yöneliktir. Antalya bölgesinde ise büyük bir kısmı seralarda olmak üzere ihracata yönelik yüksek kalitede üretim yapılmaktadır (Anon., 2020).

Kalanşo, Avrupa ve Amerika'da ekonomik olarak değeri giderek daha da dikkat çeken iç mekân süs bitkileri arasında ilk sıralara yerleşmiştir. *K. blossfeldiana*, 2020 yılında dünyanın en büyük

çiçek mezatı olan Royal Flora Holland'da (Hollanda) 85 milyon adet ürün ve 61 milyon Euro ciro ile *Phalaenopsis*, aranjmanlar ve *Anthurium*'dan sonra en çok satılan tür olarak dördüncü tür olarak listelenmiştir (Royal FloraHolland, 2021).

Kalanşo (*Kalanchoe*) iç mekân bitkilendirme tasarımlarında en çok kullanılan süs bitkilerinden biridir. *K. blossfeldiana* rengarenk çiçekleri ile bulunduğu ortamı canlandırmak, mekânı anlamlandırmak, ortamda bulunan renk ve dokuları dengede tutmak, monotonluğu ortadan kaldırmak, mekânı öne çıkarmak, ortamın havasını değiştirerek stresi azaltmak ve mekânı öncelikli hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır (Sezen vd., 2017). Bunun yanında bakım ihtiyacının az olması, değişik renk ve görünümdeki çiçekleri ile uzun bir çiçeklenme süresinin olması çokça tercih edilme nedenlerindendir. Sukulent karakterli yapısı ile susuzluğa oldukça yüksek tolerans göstermektedir. Bu özellikleri nedeniyle de Güneydoğu Asya'da Bahar Festivalinde “uzun ömürlü çiçek” olarak satışa sunulmaktadır (Love 1980).

Ülkemizin kalanşo (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.) talebi çoğunlukla ithalat yoluyla, Danimarka ve Hollanda'dan karşılanmaktadır. Bu durum, kalanşonun da aralarında bulunduğu süs bitkilerinde önemli ölçüde yurtdışına bağlı olduğumuzun bir göstergesidir. Ülkemizde ise en önemli *K. blossfeldiana* yetiştiriciliği Danimarka menşeli bir firma tarafından İzmir'de yapılmaktadır. 35.000 m²'lik kapalı alanda üretim yapan firma bunun 15.000 m²'lik alanında yılda yaklaşık 2.5 milyon adet *K. blossfeldiana* üretmektedir. Bu üretim, iç tüketime yönelik olarak yapılmaktadır. Bazı firmalar ise patentli yabancı çeşitlerin yaprak çeliklerini ithal etmekte ve bunlardan yaptıkları üretimle iç piyasaya kalanşo vermektedir. Bunun dışında yurtdışından saksılı kalanşo bitkilerini doğrudan ithal ederek satışa sunan firmalar da mevcuttur. Bu tez kapsamında, *K. blossfeldiana* bitkisinde mikroçoğaltım olanaklarının araştırılması amaçlanmış olup, oksin ve sitokinin cins ve dozları, eksplant tipleri ve besin ortamı bileşimlerinin sürgün çoğaltımı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kalanchoe; *Crassulaceae* familyasına ait sukulent karakterli bitkiler olup çalı, tırmanıcı veya küçük ağaç formunda yaklaşık 130 türe sahiptir. Tek veya çok yıllıktır. *Kalanchoe beharensis*, *K. daigremontiana*, *K. pumila*, , *K. arborescens*, *K. tomentose*, *K. delagonensis*, , *K. marmorata*, *K. thyrsiflora*, *K. eriophylla*, *K. manginii*, *K. minia* bilinen bazı türleri olmasına karşılık dünyada en çok bilinen türü ***Kalanchoe blossfeldiana***'dır (Love, 1980). *Kalanchoe* türlerinin büyük çoğunluğu Afrika ve Madagaskar kökenlidir (Everett, 1981; Herwig, 1984; Khan vd., 2006; URL-1, 2018).

K. blossfeldiana, 1924 yılında Perrier de la Bâthie tarafından kuzey-orta Madagaskar'da bulunan Tsaratanana Dağlarının 2000-2200 m yüksekliğindeki yamacında keşfedilmiştir (Van Voorst ve Arends 1982). Araştırmacı bu türe *Kalanchoë globulifera* var. *coccinea* adını vermiştir. Sonraki yıllarda Humbert tarafından Kuzeybatı Madagaskar'ın Diana bölgesinde yer alan Sambirano nehrinin doğduğu yerlere yakın yerlerden toplanmıştır (Smith vd., 2019). Bu bitkinin Paris'teki botanik bahçesine gönderilmesinin ardından, Avrupa ve Amerika'daki çeşitli botanik bahçelerine dağıtıldığı düşünülmektedir. Almanya'nın Potsdam kentinde onu ilk kez saksı bitkisi olarak yetiştirmeye başlayan bir bahçıvan olan Robert Blossfeld'den sonra tür ismi '*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.' olarak anılmaya başlanmıştır (Broertjes, ve Leffring, 1972, Van Voorst ve Arends 1982). *K. blossfeldiana*'nın ($2n=34$) yeni çeşitlerinin geliştirilmesine 1930'larda başlanmış olmakla birlikte, vegetatif olarak yapılan çoğaltma nedeniyle çeşitlilik fazla olmamıştır. Kendilemeler ve gen havuzunun dar olması da genetik çeşitliliğin düşük kalmasına neden olmuştur. Bununla birlikte yapılan seleksiyonlarla hem bodur tipte kompakt yetişen tiplerin hem de renk bakımından farklılıkların oluşması bir miktar sağlanmıştır. Yıllar içinde tohumla çoğaltma ve açılımlar, seleksiyonlar sonucunda orijinal olan kırmızı çeşitlerden yeni turuncu ve sarı-çiçekli bitkiler geliştirilmiştir. İlk türler arası melezler ise, 1939 yılında *K. blossfeldiana* ve *K. glaucescens* arasındaki türler arası melezlemelerden elde edilen hibritlerdir (Mackenzie vd. 2019). Bu aşamadan sonra türler arası melezlemelerle genetik varyasyon artırılmış, farklı çiçek tipleri, gelişme şekilleri, katmerli ve bol çiçekli bitkiler geliştirilmiştir (Descoings 2006).

Ticari kalanşoların neredeyse tamamı tetraploid kromozom yapısında ($2n=4x=68$) olup günümüzde hem iç mekan süs bitkisi hem de kesme çiçek olarak yetiştirilen çok alternatifli kalanşo çeşitleri mevcuttur. Ülkemizde de ticareti yapılan bu çeşitlerin tümü yabancı firmalara

ait çeşitlerdir. Bitki Çeşitleri Topluluğu Ofisi'ne (CPVO) göre, dünya çapında 700 adet üzerinde kayıtlı kalanşo çeşidi vardır. Bunun büyük bir kısmını *K. blossfeldiana* oluşturmakla birlikte *K. marmorata*, *K. humilis*, *K. manginii*, *K. laciniata*, *K. uniflora* ve *K. thyrsiflora* gibi birkaç türe ait çeşitler de bu kayıtlarda yer almaktadır (CPVO 2017). Ülkemizde en fazla üretimi yapılan *K. blossfeldiana* çeşitleri Sia, Lindsay, Phoebe, Danielle, Kirsten, Alma, Lena ve Clara'dır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Türkiye’de Ticari Üretimi Yapılan Çeşitler (Sırasıyla Sia, Lindsay, Phoebe, Danielle, Kirsten, Alma, Lena, Clara (URL-2, 2018).

K. blossfeldiana çok yıllık sukulent karakterli bitkilerdir. Yaprakları etli, parlak yeşil renkte, kenarları oymalı dişli; çiçekleri yalın kat veya katmerli simöz durumlu, petalleri sarı, kırmızı, beyaz, pembe, mor ve turuncu renklerdedir (Morton, 1981; Oral, 1999). Her çiçek 100’ün üzerinde çiçekçiğe sahiptir (URL-1, 2018). Ülkemizde yalın katlı çeşitler “Kalanşo”, katmerli çiçek yapısına sahip çeşitler ise “Kalandiva” olarak isimlendirilmektedir. Üretimde genellikle katmerli çiçek yapısına sahip çeşitler tercih edilmektedir. Kış aylarında çiçek açan türün çiçeklenme süresi yaklaşık 7-8 haftadır (Izumikawa vd. 2007; Love 1980).

Fotoperiyodizm, çeşitli *Crassulaceae* türlerinde meydana gelen yaygın bir çiçek oluşumunun uyarılmasına ait fizyolojik bir mekanizmadır. *Kalanchoë* cinsi içinde, çiçeklenme indüksiyonu gereksinimine göre iki fotoperiyodik grup tanımlanmıştır. Bunlar, kısa gün (SD: short day) bitkileri, yani kısa gün periyoduna maruz kaldıklarında çiçek açan bitkileri ve uzun kısa gün (LSD: long ve short day) bitkileri, yani ikili fotoperiyot dizisi gerektiren bitkileri içerir. En önemli ticari nitelik taşıyan tür *K. blossfeldiana*, bir kısa gün bitkisi olarak sınıflandırılmaktadır (Currey ve Erwin 2011). Kritik gün uzunluğu 12.5 saat olarak belirtilmektedir (URL-1, 2018,

Smith vd., 2019) ve günlük karanlık geçen sürenin 14 saat olması sayesinde bitkilerde çiçek tomurcukları oluşmaya başlar (Martin 1986).

Kalanşoların çiçek oluşumunda fotoperiyot ana rolü oynasa da diğer çevresel faktörler de çiçeklenme üzerinde etkili olabilir. Örneğin gece boyunca düşük sıcaklık, *K. blossfeldiana*'nın çiçeklenmesini artırabilmektedir (Sharma 1970).

Ayrıca bazı araştırmalar, yüksek ışık yoğunluğu altında yetiştirilen *K. blossfeldiana*'nın, düşük ışık yoğunluğu altında yetiştirilen bitkilere kıyasla daha yüksek sayıda çiçekli sürgün ve daha büyük çiçek salkımı geliştirdiğini (Eveleens-Clark vd. 2003) ve çiçeklenmeye kadar geçen gün sayısının daha az olduğunu göstermiştir (Mortensen 2014). Böylece, ışık yoğunluğunu belirli bir düzeye çıkarmanın, bitki kalitesini önemli ölçüde artırabileceği anlaşılmıştır. Işığın hem süresi hem de yoğunluğu, çiçeklenme üzerinde önemli etkiye sahip olup bu özellik kalanşonun yıl boyunca çiçeklenmesinin kontrol edilmesinde büyük avantaj sağlamaktadır. Uzun süre çiçekli kalan saksılı bir süs bitkisi olan kalanşo, yapay karanlık uygulaması ve günlük aydınlık sürenin kısa tutulması sayesinde kontrollü olarak çiçeklendirilmekte ve piyasaya sunulmaktadır.

Kalanşodaki çiçeklenmenin uyarılması konusunda yapılan araştırmalarda en büyük zorluklardan biri, bitkinin gençlik evresinin uzunluğu hakkında bilgi eksikliğidir. Kalanşonun gençlik evresinin uzunluğu çeşide özgüdür. *K. blossfeldiana*'nın farklı çeşitleri köklendirildikten 10-14 hafta sonra çiçeklenme olgunluğuna erişebilmektedir (Khoury ve White 1980).

K. blossfeldiana çeşitlerinde olgunluğun yaprak çiftlerinin sayısı ile belirlendiğini bildiren Schwabe (1969)'ye göre bu türde, çiçeklenmeden önce sekiz yaprak çifti oluşması gerekmektedir. Genel olarak kalanşo türleri kendine uyur ve kendine döllen bir özellik taşımaktadır (González de León vd. 2016). Türler arasındaki melezlemeler hakkında geniş bilgiye Mackenzie vd. (2019) ile Kahraman ve Boyacı (2021)'dan ulaşmak mümkündür.

K. blossfeldiana yetiştiriciliğinde ışık isteklerinin yanında diğer ekolojik isteklerinin uygunluğu da önemlidir. Yetiştiriciliğini sınırlayan en önemli iklim isteklerinden biri de sıcaklıktır. Vejetatif gelişme döneminde 20-22 °C olan optimum sıcaklık isteği, kısa günde çiçek tomurcuğu oluşumu döneminde 15 °C'dir. Kış aylarında 12-15 °C'ye ihtiyaç duyan kalanşo bitkileri 5 °C sıcaklığa kadar tolerans gösterse de bu sıcaklık derecelerinde yapraklarında

dökülmeler görülür. Sukulent karakterli bitkiler olması nedeniyle su ihtiyacı az olsa da sulama düzenli yapılmalıdır. Düşük hava nemine dayanıklı olup hava nemi gereksinimi % 60-70 arasındadır (Oral, 1999).

Kalanşo, ticari olarak yaprak çelikleri ile çoğaltılan bir bitkidir. Tohumlarıyla çoğaltılma olanağı bulunsa da, genetik olarak açılım meydana geldiğinden, ana bitkinin aynı özelliklerine sahip kitlesel üretimde vejetatif çoğaltım tercih edilmektedir. Kültürü yapılan çeşitlerin türler arası melezlerden geliştirildiği göz önünde bulundurulduğunda tohumla üretimde sorunlar ortaya çıkabildiği gibi tohum çimlenmesi de çok başarılı değildir. Yaprak ve gövde çelikleriyle çoğaltıma göre çok daha hızlı ve yüksek çoğaltma katsayısı sayesinde küçük alanlarda yüksek miktarda üretim yapabilmeyi sağlayan doku kültürü tekniği, kalanşo bitkisinde önem taşımaktadır. Özellikle yeni ıslah edilen elit materyalin hızlı çoğaltılması ve ticari olarak pazarda yer alabilmesi açısından doku kültürü üretimi öne çıkmaktadır. Kalanşo, doku kültüründe organogenesis kapasitesi yüksek bir bitkidir (Gümüş ve Ellialtıoğlu 2018).

Doku kültürü, laboratuvarlarda steril koşullarda yapay bir besin ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitlerin) üretilmesi olarak tanımlanabilir. Kültüre alınan doku veya organ kısmına göre isimlendirilir (Ör. meristem kültürü, embriyo kültürü, anter kültürü, protoplast kültürü vb.). Bitki ıslahında yeni çeşit geliştirmek, mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, hastalıksız bitki elde etmek, bitkilerin üretim süresini kısaltarak çoğaltım katsayısını artırmak, çoğaltımı zor olan veya nesli tehlikede olan türleri çoğaltmak, bitkileri uzun süreli muhafaza etmek, yurtiçi veya yurt dışına bitkiciklerin transferini kolaylaştırmak gibi farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Pierik, 1997; Zencirkıran, 1998; Gürel vd., 2001; Küçükahmetler vd., 2002).

Birçok süs bitkisinin çoğaltılmasında ve ıslahında, konvansiyonel yöntemlerle ulaşılabilecek sınırlara gelinmiştir. Doku kültürü teknikleri, bu sınırları daha da üst seviyelere taşıyabilecek yardımcı teknikler olarak kabul görmektedir. Özellikle meristem kültürü, başta kesme çiçekler olmak üzere, virüssüz ve patojensiz anaçlık fide üretiminde günbegün daha fazla önem kazanmaktadır. Basit olarak, laboratuvar koşullarında bitkilerin kısa bir sürede klonal olarak hızlı çoğaltımı şeklinde tanımlayabileceğimiz *in vitro* mikroçoğaltım; orkide, soğanlı bitkiler, *Anthurium sp.*, *Spathiphyllum sp.*, Afrika menekşesi, *Gerbera sp.* gibi süs bitkilerinde ticari olarak uygulanmaktadır. Dünya üzerinde gelişmekte olan ülkelere doğru kaymakta olan ticari doku kültürü laboratuvarlarında ağırlıklı olarak süs bitkileri çoğaltılmasına karşın, ülkemizdeki

laboratuvarlarda süs bitkisi çoğaltımı çok daha az bir oranı kapsamaktadır. Mikroçoğaltımdaki yüksek maliyet, yoğun işçilik, teknik eleman gereksinimi ve dış koşullara adaptasyon, vitrifikasyon gibi sorunlara karşın, *in vitro* mikroçoğaltım geleneksel yöntemlere göre hastalıktan ari, bir örnek, kaliteli bitkiciklerin yıl boyu laboratuvarlarda üretimi gibi üstün özelliklere sahiptir. Doku kültürü tekniklerinin diğer önemli rolü ise, bitki ıslahının gelişimini sağlamak ile moleküler biyolojiyi, genetik mühendisliğindeki temel araştırmalara öncülük ve aracılık etmektir (Özzambak, 2015).

Bitkilerin doku kültürü yoluyla üretimi 1940'lı yıllarda başlamış ve 1970'lere gelindiğinde tarımsal açıdan önemli bazı türlerin özellikle süs bitkilerinin büyük ölçekli üretimi başlamıştır. Son 40 yılda, doku kültürü yoluyla üretilen bitki türlerinin sayısı önemli ölçüde artmıştır. 1980'lerde doku kültürü ile elde edilmiş bitkiler yılda 500 milyon adedi aşmış olup, üretilen bu bitkilerin %50 ilâ %75'ini süs bitkileri kapsamaktadır (Debergh 1994). 1990'ların başında yıllık üretim 663 milyon adetken, 1990'ların sonlarında doku kültürü ile yıllık üretim 800 milyon adete ulaşmıştır (Ashloowalia vd. 2004; Kazaz vd., 2020).

K. blossfeldiana türünde yapılan doku kültürü çalışmaları incelendiğinde, çalışmaların genellikle ıslah ve mikroçoğaltım üzerinde yoğunlaştığı, daha ziyade Çinli araştırmacıların bu konuya ilgi gösterdikleri anlaşılmıştır. Burada konu bütünlüğü açısından yalnızca mikroçoğaltım çalışmalarına yer verilmiştir. Araştırmacılar mikroçoğaltım çalışmalarında eksplant kaynağı olarak genellikle gövde, yaprak ve çiçekleri kullanmış, incelenen literatür bilgileri eksplant kaynağına gruplandırılarak aşağıda özetlenmiştir.

2.1.Gövde Kısımlarının Kullanıldığı Mikroçoğaltım Çalışmaları

Bitkilerin büyüme bölgelerinde bulunan ve devamlı bölünebilme kapasitesinde olan hücrelerin oluşturduğu dokular meristematik dokulardır. Meristemler kökenlerine göre birincil ve ikincil, bitkideki konumlarına göre ise apikal ve lateral olarak isimlendirilirler. Devamlı bölünebilme kapasitesi nedeniyle yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahiptir ve bitkilerde eşeysiz üremede en çok kullanılan dokudur. *K. blossfeldiana* türünde yapılan bilimsel araştırmalar incelendiğinde meristematik dokuların yoğun olarak bulunduğu boğum, boğumarası ve sürgün ucu gibi gövde kısımlarının bu türün mikroçoğaltımında eksplant kaynağı olarak kullanıldığı belirlenmiştir.

Cui vd. (2003) *K. blossfeldiana*'nın meristematik dokularla mikroçoğaltımı konusundaki ilk araştırmacılar olarak literatürdeki yerini almıştır. Araştırmacılar sürgün ucu, gövde ve yan tomurcuklardan hazırlanan eksplantları farklı NAA ve BA dozlarının ilave edildiği besi yerlerine dikerek büyümeyi düzenleyicilerin sürgün proliferasyonu üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ifade etmişlerdir. 1.0 mg/l BA ile 0.3 mg/l NAA'ın ilave edildiği MS ortam kombinasyonunda kültüre ortama alınan tüm eksplantlarda farklılaşma katsayısı daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada en iyi kök gelişimini 0.1 mg/l NAA ile 0.5 mg/l IBA'in eklendiği ½ MS ortamının sağladığı belirlenmiştir. Bu ortam kombinasyonlarında elde edilen bitkilerin daha kuvvetli olduğu belirtilmiştir. BA ve NAA birlikte kullanıldığı kültürlerde aylık üretim katsayısının 2.67'den 5.8'e yükseldiğini vurgulanmıştır. Araştırmacılar, NAA + IBA kombinasyonunun kök gelişimini artırdığını gözlemlemişlerdir. MS + 4 mg/l BA + 0.2 mg/l NAA besiyerinde bulunan bütün eksplantlarda farklılaşma daha olumlu bulunmuştur. 0.4 mg/l IBA ilave edilen yarı kuvvetteki MS ortamında kök gelişiminin en iyi olduğunu rapor etmişlerdir.

Kordi vd. (2013) *K. blossfeldiana* türünde sürgün ucu eksplantlarını kullanarak büyüme düzenleyicilerin sürgün rejenerasyonu ve sürgünlerin köklendirilmesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada yüzeysel sterilisasyon için eksplantlar önce %15'lik sodyum hipokloritte 15 dakika sonra %70'lik etanolde 5 dakika bekletilmiştir. Dezenfeksiyon aşaması tamamlanan eksplantlar 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l BA ile NAA içeren ve pH'sı 5.7-5.8 e ayarlanan MS besiyerine dikilmiştir. Örnekler 25 ± 2 ° C'de, %75-80 nemde, 50µmol / m² / s ışık yoğunluğunda günde 14 saat inkübe edilmiştir. Fide uzunluğu, sürgün sayısı, kök sayısı ve köklerin uzunluğu kültüre alındıktan 45 gün sonra ölçülmüştür. En başarılı sonuçlar MS + 1.0 mg/L BA + 1.0 mg /L NAA besin ortamı bileşiminden elde edilmiş, en uzun bitki boyu 6.22 cm, kök sayısı 9.34 ve kök uzunluğu 10.36. cm olarak ölçülmüştür. En fazla sürgün sayısı (5.39) ise MS + 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA besiyerinde meydana gelmiştir. Doku kültürü çalışmalarında elde edilen bitkilerin %85'i dış koşullara adapte olmuştur.

İranlı araştırmacı Kaviani vd. (2014), apikal meristem içeren sürgün ucu eksplantlarını kullanarak benzer bir çalışma yapmıştır. Çalışmada farklı büyüme düzenleyicilerinin ve konsantrasyonlarının *K. blossfeldiana* cv. White çeşidinin mikroçoğaltımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Serada yetiştirilen bitkilerin sürgün ucu kısımlarından hazırlanan eksplantlardan NAA ve BA hormonlarının 0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l dozları kullanılarak sürgün proliferasyonu ve köklenme elde edilmeye çalışılmıştır. Eksplantlar, % 20'lik NaOCl ile 20 dakika ve daha

sonra 3 dakika boyunca % 70'lik etanol ile yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Besiyerin pH'sı 5.7 veya 5.8'e sabitlenmiştir. İn vitro koşullarda denemeye alınan örnekler, 5 hafta süreyle $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, %75-80 nemde ve günde 16 saat $50 \mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$ aydınlanma şiddetinde inkübe edilmiştir. MS + 1.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA ortamından en yüksek değerler (bitki boyu 7.012 cm, boğum sayısı 4.516, kök sayısı 8.86 adet ve kök uzunluğu 10.16 cm), büyümeyi düzenleyici madde içermeyen besin ortamlarında ise en düşük değerler (bitki boyu 1.988 cm, boğum sayısı 1.283, yaprak sayısı 2.015, kök sayısı 2.72, kök uzunluğu 3.016 cm, sürgün miktarı 1.221 adet, ve proliferasyon indeksi 0.405) elde edilmiştir. MS + 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ortamında ise sürgün sayısı 5.886 adet, yaprak sayısı 8.98 adet proliferasyon indeksi de 1.791 olarak hesaplanmıştır. Eşit miktarda kum, torf ve perlit içeren bir ortamda, mikroçoğaltılmış fidelerin yaklaşık %85'i başarıyla dış koşullara alıştırılmıştır.

K. blossfeldiana'nın mikroçoğaltımında sürgün ucu kültürünün yanısıra node ve internode gibi gövde kısımlarından yararlanılan birçok bilimsel bulunmaktadır.

Deng vd. (2005), *K. blossfeldiana*'nın internode kısımlarını kullanarak sürgün proliferasyonu elde etmeyi amaçlamıştır. Araştırmacılar yaptıkları denemelerde MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA ortam kombinasyonunda kültüre alınan örneklerin tamamında gelişme kaydedildiğini ve en başarılı başlangıç ortamı olarak belirlediklerini, BA, NAA ve GA₃ kombinasyonlarını ise sürgün çoğaltma ortamı olarak daha başarılı bulduklarını ifade etmişlerdir. Çalışmada MS + 2.0 mg/l BA + 0.2 mg/l NAA + 0.1 mg/l GA₃ oksin-giberellin kombinasyonunda 9.3 kat proliferasyon elde edilmiş, MS + 2.0 mg/l BA + 0.1 mg/l GA₃ + 2.0 g/l aktif kömür bileşimine sahip yarı katı ortam sürgün çoğaltma ve köklenme üzerine katı ortama göre daha etkili bulunmuştur. Ortalama sürgün sayısı eksplant başına ortalama 5.5'in üzerinde meydana gelmiş, tüm sürgünler başarılı bir şekilde köklendirilerek dış koşullara aktarılan bitkiciklerde %100 başarı oranına ulaşılmıştır.

Luo vd. (2009), *K. blossfeldiana*'nın hızlı çoğaltımında boğum eksplantlarını kullanan bir diğer araştırmacıdır. Çalışmada HgCl₂ konsantrasyonunun ve süresinin; kontaminasyon oranına etkisi ile bitki hormonlarının çoğaltma katsayısı ve çiçeklenme üzerine etkisi incelenmiştir. Herhangi bir dezenfektanın kullanılmadığı örneklerde yüksek oranda enfeksiyon (%77.8) meydana gelirken, 8 dakika süre ile HgCl₂ ile muamele edilen örneklerde en düşük kontaminasyon oranı (%20) elde edilmiştir. Denemelerde en uygun besiyeri bileşimleri, sürgün çoğaltımı için MS + 0.30 mg/L IAA + 2.1 mg/L BA + 0.6 mg/L GA₃, çiçeklenme için MS + 2.5 mg/L NAA olarak

belirlenmiştir. Araştırmacılar, GA₃'ün tek başına çiçeklenmeyi uyarmadığını, bunun yanında NAA ile kullanıldığında çiçeklenmede 15 gün erkencilik sağladığını bildirmişlerdir.

Filipinli biliminsanları Nieves vd. (2016) *K. blossfeldiana* “White” çeşidinde boğum eksplantlarından başarılı bir sürgün gelişimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar paclobutrazol içeren veya içermeyen farklı miktarlarda TDZ bulunan besin ortamlarında 7-11 gün sonra yeni sürgünlerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. 10 µM TDZ içeren ortamlarda 12 hafta sonra en yüksek miktarda sürgün (25 sürgün) sayısına ulaştıklarını, paclobutrazolün sürgün oluşumu, yaprak sayısı ve genişliği, gövde çapı, boğumarası ve sürgün uzunluğunu önemli oranda azalttığını, TDZ ile birlikte kullanıldığında ise sürgün rejenerasyonunu önemli oranda baskıladığını bildirmişlerdir. Çalışmada kültür kapları içerisindeki etilen miktarının 0.015-0.039 ppm arasında değiştiği ancak bu durumun mikroçoğaltımda olumsuz bir etki yaratmadığı rapor edilmiştir.

K. blossfeldiana'da in vitro bitki rejenerasyonu üzerine çalışan Huang vd. (2004) bu amaçla yapraklı ve yapraksız olarak hazırladıkları gövde eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırmacılar dikimi izleyen ilk 7-8. günde yan tomurcukların sürgün oluşturduğunu, MS + 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ortam bileşimini bu amaca hizmet eden en uygun kombinasyon olarak belirlemişlerdir. Yaprak ihtiva etmeyen eksplantlarda daha yüksek oranda sürgün oluşumu meydana gelmiştir. ½ MS + 1 mg/l BA adventif sürgün oluşumunda, ¼ MS ise köklenmede en uygun ortam olarak açıklanmıştır.

Boğum araları *K. blossfeldiana*'da mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan bir diğer gövde kısmıdır. Xinzheng vd. (2006) *K. Blossfeldiana*'da en uygun hızlı çoğaltım prosedürünü oluşturmak amacıyla beyaz renkli çiçeklere sahip bir *Kalanhoe* çeşidinin boğumalarını eksplant olarak kullanmıştır. Araştırmada tomurcuk proliferasyonu için MS + 2 mg/L BA + 0.1 mg/L IBA + 2 mg/L GA₃ + 40 g/l şeker, köklendirme için MS + 0.4 mg/l IBA + 0.1 mg/l BA + 1.5 mg/L GA₃ + 40g/l şeker kombinasyonu en başarılı ortam olarak belirlenmiş, dış koşullara adaptasyonda %99 başarı oranına ulaşıldığı rapor edilmiştir.

Kalanchoe blossfeldiana türünün mikroçoğaltımında boğumarası eksplantlarını kullanan diğer bir araştırmacı ise Sanikhani vd. (2006)'dir. Araştırmacılar Cora, Molly, Debbie, Gold strike, Celine, African Yellow, Purple Jaqueline çeşitlerinin boğumarası eksplantlarını yüzey sterilizasyonu için 9 dakika %2'lik NaOCI ile muamele ettikten sonra NAA (0 ve 0.57 M) ve TDZ (0, 0.45,

4.5, 22.5 ve 67.5 μM)’in değişik dozlarını ihtiva eden MS besiyerinde kültüre almıştır. Kültürler 8 hafta süresince 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 16/8 fotoperiyodik düzene sahip 55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde gelişmeye bırakılmıştır. Artan TDZ miktarı ile birlikte eksplant başına düşen sürgün sayısı ve sürgün oluşum frekansının arttığı, en uygun TDZ dozunun çeşide göre değiştiği, Purple Jaqueline  eşidinin en iyi performansı gösterdiği, bu çeşitte 0.45 μM TDZ uygulamasının yaklaşık 10 adet sürgün verdiğini, bazı çeşitlerde ise hormon içermeyen ortamlarda da sürgün oluşumu meydana geldiği araştırma bulguları olarak açıklanmıştır.

2.2.Yaprak Kısımları Kullanılarak Yapılan Mikroçoğaltım  alışmaları

Sürekli doku hücrelerinden bazıları bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi altında tekrar bölünebilme kabiliyetine ulaşarak sekonder meristemlere d n ş rl r. Bu özelliğe sahip olan parankimatik dokular in vitro mikroçoğaltımda başlangıç materyali olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. *K. blossfeldiana* türünde de, in vitro mikroçoğaltıma çalışmalarında, petiyol ve laminadan hazırlanan eksplantlar başlangıç materyali olarak kullanılarak adventif sürgün oluşumu sağlanmaya çalışılmıştır.

Kalanchoe blossfeldiana’da yaprak kısımları kullanılarak yapılan ilk mikroçoğaltım çalışmasını Hollanda kökenli Varga vd. (1988) yapmıştır. Araştırmacılar, epigenetik varyasyonun s s bitkilerinin eşeysiz çoğaltımında ana problem olduğuna vurgu yaparak bitki hormonlarının epigenetik varyasyona etkisini belirlemek amacıyla farklı oksin ve sitokininlerin ilave edildiği besiyerlerine “Yucatan”  eşidi *Kalanchoe* bitkilerinin yaprak eksplantlarını dikmişlerdir. Çalışmada, 2,4-D kullanımının sürgün dokularında bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir. IAA ve Zeatin bulunan besiyerlerinde gelişmeye alınan dokularda ise kallus oluşumunun en hızlı olduğu ve sürgünlerin de iyi bir gelişme gösterdiği gözlemlenmiştir. En uygun dozun iki hormon için de 1 μM olduğu belirlenmiştir. Epigenetik varyasyonun bitki hormonlarının uygulama süresi ile ilgili olduğu ve uygulama süresinin 3 haftaya düşürülmesinin epigenetik varyasyonu azalttığı bulgusu araştırmanın amaca uygun en çarpıcı sonucu olarak kaydedilmiştir.

Yuliang vd. (2004), *K. blossfeldiana*’da yüksek sürgün oluşum oranlarına ulaşabilmek için yaprak disk kültürünü kullanmıştır. %86.6 oranında kallusun ve % 83.3 oranında sürgün oluşturan 2.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA ortamını en başarılı ortam olarak niteleyen araştırmacılar, bu oranların yaprak disk yüzeylerinin besiyeri ile temasının artışı ile arttığını ifade

etmişlerdir. Çalışmada yaprak disklerinin kültüre alındığı sırada ortam içerisine 4 mg/L AgNO₃ eklenmesinin yeni sürgün oluşumuna pozitif etkide bulunduğu ve kallus oluşumundan sonraki dönemde de sürgün oluşum katsayısını önemli ölçüde artırdığı raporlanmıştır. Adventif sürgünler *in vitro* koşullarda kolay bir şekilde köklendirilerek dış koşullarda büyüme ve gelişmelerine sağlıklı bir şekilde devam ettiği bildirilmiştir.

K. blossfeldiana bitkisinde eksplant kaynağı olarak yaprakların kullanıldığı bir diğer çalışma “Rako” çeşidinde Zhang ve Guo (2005) tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, besin ortamında bulunan hormon içeriği ve miktarlarının yaprak rejenerasyonunu etkilediği saptanmıştır. Kültüre alınan yaprak eksplanlarının alt epidermis hücreleri, üst epidermis hücrelerine oranla daha kolay rejenere olduğu gözlemlenmiştir. Genç yapraklarda %70 oranında rejenerasyon sağlanmış, meydana gelen sürgünler %95 oranında köklendirilmiş ve yine aynı oranda dış ortama alıştırılmıştır.

Linjian vd. (2006) tarafından yapılan mikroçoğaltım çalışmasında pembe çiçekli *K. blossfeldiana* çeşidinin yaprakları kullanılmış ve rejenerasyon başarısı üzerine farklı kültür şartlarının (besiyeri, karanlık periyot ve bitki büyümeyi düzenleyiciler) etkisi araştırılmıştır. Araştırmada sürgün rejenerasyon oranı bakımından en yüksek değer (5.2) MS + 2.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA ortamından elde edilmiş, 2 hafta karanlık devre uygulaması ile bu oranın artış gösterdiği (5.47), MS + 1.0 mg/L IBA içeren ortamda ise sürgünlerin başarıyla köklendiği not edilmiştir.

Yaprak dokularını kullanarak sürgün rejenerasyonu elde etmeye çalışan Tang (2007), *K. blossfeldiana* türünde optimum sürgün çoğaltma ortamı olarak MS + 2.0 mg/L BA + 0.3 mg/L NAA kompozisyonunu belirlediğini açıklamıştır.

Chen vd. (2007), *K. blossfeldiana* türünün *in vitro* çoğaltım için başlangıç materyali olarak genç yapraklarını kullanmıştır. MS ortamına ilave ettikleri NAA ve BA hormonlarını kullanarak 4 ayrı ortam oluşturmuş ve bu ortamların rejenerasyon ile köklenmeye olan etkilerini incelemiştir. MS + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA kompozisyonu adventif sürgün rejenerasyon ortamı olarak, ½ MS + 0.5 mg/L NAA bileşimi ise köklendirme ortamı olarak en iyi sonuçları vermiştir. Çoğaltım katsayısının 10’u bulduğu araştırmada köklenme ve dış koşullara

alıştırmada başarı oranı %95 olarak tespit edilmiş, çoğaltma süresinin ise geleneksel yöntemlere göre daha kısa olduğu bildirilmiştir.

Penghui ve Xingze (2010), yaprak eksplantlarını kullanarak *K.blossfeldiana*'nın ticari ölçekte üretimine ışık tutmayı amaçlamıştır. Yaprak eksplantlarını civa klorürün %0.1'lik konsantrasyonunda 4 dakika bekleterek yaptığı yüzeysel sterilizasyon sonucunda enfeksiyon oranının %12.5, doku ölüm oranının ise %2.5 ile sınırlı olduğunu bildiren araştırmacılar MS + 1.0 mg/L BA + 0.1-0.3 mg/L NAA ortam bileşiminde %95.8 oranında kallusun meydana geldiğini, ½ MS + 1.0 mg /L BA + 0.1 mg / L NAA ortam bileşiminde ise en yüksek çoğaltma katsayısının (12.2) elde edildiğini saptamışlardır. Dış koşullara alıştırmadaki başarı oranı ise %99 olarak hesaplanmıştır.

İspanyol araştırmacılar Castelblaque vd. (2010), *K. blossfeldiana*'nın protoplast kültürü ile çoğaltımını araştıran ilk biliminsanları olarak literatürdeki yerini almıştır. Aseptik koşullarda geliştirilen *Kalanchoe* yapraklarının mezofil hücrelerinden protoplast elde etmişler, bu amaçla hücre duvarı yıkımını %0.4 Cellulase Onozuka R-10 ve % 0.2 Driselase ile gerçekleştirmişlerdir. Hücre duvarının yıkılması ile elde edilen protoplastlar, mililitrede 1×10^5 yoğunluğunda 320 mM mannitol, 130 mM süktroz, 2.3 µM 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), 5.4 µM' naftalenasetik asit (NAA) ve 2.2 µM 6-benzilamin (BA) içeren likit bir ortamda gelişmeye alınarak karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Kültürlerde 4. günde hücre duvarı rejenerasyonu, 5 - 7 gün sonra da hücre bölünmesi başlamıştır. İçerisinde 5.4 µM NAA ve 8.9 µM BA bulunan likit ortamlarda kültüre alınan protoplastlarda kallus oluşumu meydana gelmiş, fotoperyodik düzende gelişmeye bırakıldıklarında ise adventif gözler oluşmuştur. Adventif gözlerden gelişen sürgünler 0.6 µM IAA içeren katı ortamlarda köklendirilerek yüksek oranda dış koşullara adaptasyonu sağlanmıştır. 1×10^5 yoğunluğundaki protoplast kültürlerinden 6.4 adet bitki elde edilmiş, üretim döngüsü 4 ayda tamamlanmıştır.

K. blossfeldiana türünde yaprak kısımları kullanılarak yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında genellikle yaprak ayası (lamina) üzerinde yoğunlaştığı görülmüştür. Peng vd. (2008) ise, yaprak saplarından rejenerasyon üzerine çalışmıştır. Bu amaçla turuncu renkli bir *K. blossfeldiana* çeşidinde yaptığı denemelerde gelişme dönemine göre uygun besin ortamı kompozisyonlarını belirlemiştir. Buna göre kültür başlangıcı için MS + 0.5 mg/L BA + 2 mg/L NAA ortamının, sürgün oluşturma ortamı olarak MS + BA 0.5 mg/L + 0.4 mg/L NAA kombinasyonun ve elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için de ½ MS + 0.2 mg/ L IBA ortam

bileşiminin en iyi sonuçları verdiğini bildirmiştir. İn vitro bitkilerin dış koşullara alıştırılmasındaki başarı oranının ise %98 olduğunu rapor etmişlerdir.

Lin vd. (2005), kırmızı renkli petallere sahip bir *K. blossfeldiana* çeşidinde hem meristematik (gövde) hem de parankimatik dokulardan (yaprak) sürgün rejenerasyonunu araştırmıştır. Araştırmacılar her iki doku türünde de direkt organogenesis meydana geldiğini bunun için MS + 0.25 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA + 2.0 mg/L GA₃ besin ortamı-bitki hormonu bileşiminin en etkili ortam olduğunu, MS + 0.25 mg/L NAA ortamının ise sürgün köklendirmede maksimum değerleri verdiğini bildirmiştir.

K. blossfeldiana türünde hem meristematik hem de parankimatik dokulardan hızlı çoğaltım çalışmaları yapan bir diğer araştırmacı da Liu. (2010)'dur. Araştırmacılar meristematik doku olarak boğumarası ekplantlarını parankimatik doku olarakta genç yaprak ayalarını kullanmıştır. Araştırmada sürgün rejenerasyon oranının %95, çoğaltma katsayısının ise 20 olarak tespit edildiği MS + 0.5 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + 0.1 mg/l GA₃ ortam kombinasyonunu en başarılı ortam olarak nitelendirilmiştir. Köklenme prosedüründe sünger kullanan araştırmacılar %95 oranında köklenme başarısı elde ettiklerini, dış koşullara alıştırmadaki başarı oranlarının ise %100 olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.Çiçek Kısımları Kullanılarak Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları

Çiçekler tohumlu bitkilerin üreme organı olmakla birlikte süs bitkilerine dekoratif özellik kazandıran ve bunların doku kültürü ile çoğaltımında materyal olarak kullanılan bitki organlarıdır. Avrupada en fazla ticareti yapılan iç mekan süs bitkilerinden biri olan *K. blossfeldiana*'nın mikroçoğaltımında da çiçekler eksplant kaynağı olarak kullanılmaktadır. Cheng (2010), ülkemizde Kalandiva olarak isimlendirilen çok katlı petallere sahip bir *K. blossfeldiana* çeşidinde yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında çiçek saplarından (pedunkul) hazırladığı eksplantları 4 değişik IAA + BA konsantrasyonlarını içeren MS besiyerinde kültüre almış, farklılaşma için MS + 2.5 mg/L BA ve 0.5 mg/L IAA ortamını önermiştir.

Kalanchoe blossfeldiana'daki mikroçoğaltım çalışmalarında genellikle sürgün rejenerasyonu elde etmek için farklı eksplantlar, çeşitli büyüme düzenleyiciler ve bunların kullanılan doz miktarlarının kültür şartlarının etkisinin araştırıldığı görülmektedir. Araştırmalarda, eksplant

olarak gövde, yaprak (petiyol ve lamina) ve çiçek bölümlerinin kullanıldığı, yüzey sterilizasyonu için ise NaOCl veya HgCl₂ kullanıldığı belirtilmektedir.

K. blossfeldiana Poelln. türünde yapılan doku kültürü çalışmaları ülkemizde ilk olarak Gümüş ve Ellialtıoğlu (2018) tarafından 54 kaynak incelenerek derlenmiştir. Araştırmacılar derlemesinde türe ait doku kültürü çalışmalarını mikroçoğaltım, somatik embriyogenezis, çiçeklenme ve ıslah çalışmaları olarak gruplandırmışlardır. Yaptıkları literatür incelemelerinde genellikle farklı eksplant tipleri ile birlikte bitki büyüme düzenleyicilerin kültür şartlarındaki etkisinin araştırma konusu olarak seçildiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar mikroçoğaltım çalışmalarında, sürgün proliferasyonu için besiyerlerinde BA, NAA ve TDZ hormonlarının kullanıldığını, eksplant başına düşen sürgün sayısının 5-25 adet arasında değiştiğini, sürgünlerin köklendirme ve dış koşullara alıştırmada başarı oranlarının %95-100 olduğunu, *in vitro* çoğaltmada optimum kültür koşullarını ise 25-26 °C sıcaklık, 14-16 saat ışıklandırma süresi, 40-50 µmol/m²/s ışık yoğunluğu ve % 75-80 hava nispi nemi olarak açıklamıştır. Bitkide çiçeklenme çoğunlukla kısa günde 20 °C sıcaklıkta, 40 µmol /m²/s ışık şiddetinde meydana geldiği belirtilmiştir.

Bu tez çalışmasında *Kalanchoe blossfeldiana* türüne ait bitkilerin yapraklarından hazırlanan eksplantları kullanarak adventif sürgün rejenerasyonu elde etme, *in vitro* adventif sürgünlerde pişkinleştirme, sürgünleri köklendirme ve *in vitro* bitkicikleri dış koşullara alıştırma aşamalarının tamamlanarak bir mikroçoğaltım prosedürünün oluşturulması amaçlanmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma 2018-2019 yıllarında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bitkisel materyalin temin edilmesi amacıyla Ankara içerisinde *K. blossfeldiana* satan fidanlıklar ziyaret edilmiş ve bitkiler bu fidanlıklardan temin edilmiştir. *K. blossfeldiana* çeşitlerinde *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım yoluyla farklı besin ortamı bileşimlerinin etkileri araştırılmış, kültüre alınması ve bitkiye dönüştürülmesi aşamalarının tümü ve elde edilen bitkiciklerin dış koşullara alıştırma çalışmaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak *Kalanchoe blossfeldiana* kullanılmıştır. Araştırmada yer alan denemelerde, yaşama, gelişme ve bitkiye dönüşme yetenekleri üzerinde farklı kültür ortamı kombinasyonlarının ve büyüme düzenleyicilerin etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Katmerli yapıda olan pembe çiçekli bir kalanso çeşidi kullanılmıştır. Şekil 3.1'de çalışmada kullanılan pembe (fuşya) çiçek rengine sahip *K. blossfeldiana* bitkilerine ait görüntülere yer verilmiştir.



Şekil 3.1: Pembe renkli çiçeklere sahip *K. blossfeldiana* çeşidine ait bitkilerin görünümü
(Fotoğraf: Fatma Nur Altındağ Çelik, 2019).

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitkilerin Temin Edilmesi

Çalışmanın yürütüldüğü yıllar içerisinde bitkisel materyal olarak kullanılan kalanşo bitkileri, saksılar içinde fidanlıklardan temin edilmiş olup kültüre alınana dek ortalama sıcaklığı 25 °C’de kaloriferle ısıtılan laboratuvarında, cam kenarında havadar bir ortamda muhafaza edilerek gelişimlerine burada devam ettirilmiştir. Çalışmada kullanılacak olan bitkisel materyallerin sağlık durumunun iyi ve hastalık barındırmaması gerekmektedir.

Yapılan birkaç ön deneme sonucunda dikimi yapılan petrilere bir süre sonra ana materyal kaynaklı fungus oluşumu gözlemlenmiştir. Bu sebeple temin edilen bitkilerin bakteri ve fungustan arı, güçlü gelişen bitkiler olmasına özen gösterilmiştir.

3.2.2 *In-vitro* Kültürde Kullanılan Genel Yöntemler

Doku kültürü uygulamalarının tümü steril koşullar altında yapılmış, çalışmanın ana materyallerinden olan laminar akışlı ve HEPA filtreli steril kabin kullanılmıştır. Steril kabinler numune ve çalışma materyallerinin hava kaynaklı toz, partikül ve mikroorganizmalardan korunmasını ve ileri düzeyde temiz ortam sağlamaktadır. Denemelerde kullanılan tüm cam ve metal malzemelerin sterilizasyonu için otoklav makinesinde 1.2 atmosfer basınç altında, 121 °C sıcaklıkta 20 dakika süreyle sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kullanılacak bistüri bıçağı ve pensler önceden otoklavda steril edilmiş ve dikim işlemi sırasında da %96’lık etil alkole batırılıp alevden geçirme suretiyle (ispirto ocağı) veya sterilizatör yardımıyla steril koşulların sürekliliği sağlanmıştır. Her uygulamada kabin içerisine girmeden önce eller yıkanıp daha sonra %70’lik alkolle steril edilmiştir. Şekil 3.2’de kabin içinde materyal sterilizasyonunu sağlayan ispirto ocağı ve sterilizatör görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.2: Kabin içinde materyal sterilizasyonunu sağlayan ispiro ocağı ve sterilizatör.

3.2.2.1 Besin Ortamlarının Hazırlanması

Araştırmacılar, epigenetik varyasyonun tür içerisinde veya gen alellerinde gözlemlenen farklılıkların, süs bitkilerinin eşeysiz üremesindeki ana problem olduğunu fark ederek büyüme düzenleyicilerin etkisini belirlemek için farklı oksin ve sitokinin içeren besin ortamlarında kültür çalışmaları yapmışlardır. Yapılan denemelerde MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besin ortamı kullanılmış olup sürgünlerin oluşumunu, kök gelişimini teşvik etmek ve büyüme düzenleyici hormonların etkisini belirlemek için farklı kombinasyonlarda TDZ, BAP, NAA, IBA, GA₃ hormonları kullanılmıştır. Çalışma süresince temel besin ortamı olarak kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında bulunan makro elementler, mikro elementler, vitaminler, vb. temel elementleri ve miktarları Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1: MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel elementleri ve miktarları

Makro Elementler		
Kimyasal Adı	Formülü	Kullanılan Miktar (mg/l)
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	1650
Potassium phosphate	KH_2PO_4	170
Magnesium sulfate heptahydrate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Potasyum nitrat	KNO_3	1900
Calcium chloride	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	440

Mikro Elementler		
Kimyasal Adı	Formülü	Kullanılan Miktar (mg/l)
Manganese sulfate monohydrate	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	15.6
Borik Asit	H_3BO_3	6.2
Bakır (II) sülfat pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Çinko sülfat heptahidrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Cobalt (II) chloride hexahydrate	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Potassium iodide	KI	0.83
Sodium molybdate dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25

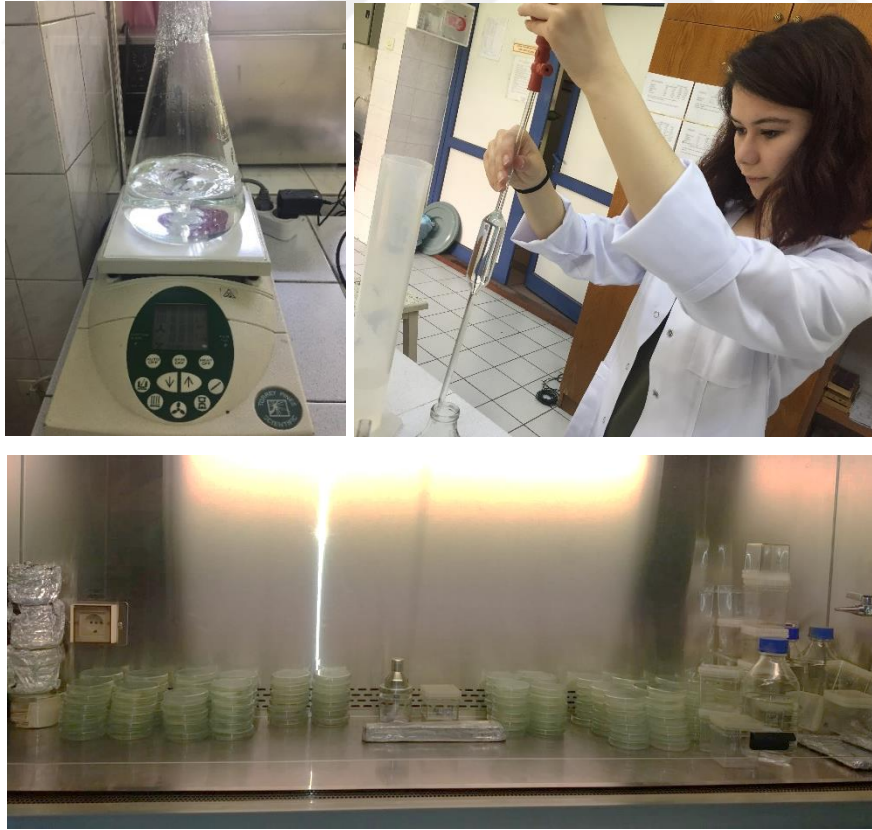
Vitaminler		
Kimyasal Adı	Formülü	Kullanılan Miktar (mg/l)
Nicotinic Asit	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5
Thiamine (Vitamin B1)	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}^+$	0.1
Pyridoxine (Vitamin B6)	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0.5
Glycine	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2
Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100

Demir - Şelat		
Kimyasal Adı	Formülü	Kullanılan Miktar (mg/l)
Demir(II) Sülfat Heptahidrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Disodium salt dihydrate	Na_2EDTA	37.3

Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan %100 saf kimyasal maddelerin önce stok çözeltileri hazırlanmıştır. Organik maddelerin x100'lük stok çözeltileri -20 °C'de derin

dondurucuda, inorganik tuzların x10'luk stok çözeltileri ise +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Dikim yapılmasından önce stok çözeltilerden gerekli miktarlarda alınıp karıştırılmış ve sulandırılarak esas besin ortamı hazırlanmıştır. Ortamların pH'sı, agar ve şeker katılmasından önce mikroçoğaltımda olumlu sonuçlar verdiği bildirilen, ortamlardaki değer, HCl (hidroklorikasit) ya da 1N NaOH (sodyum hidroksit) kullanılarak 5.7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Besin ortamlarının yarı katı yapıda olmalarını sağlamak amacıyla da agar 7 g/L olarak ilave edilmiştir. Dikim ortamındaki şeker miktarı 30 g/l olarak sabit tutulurken büyüme düzenleyicilerin kullanım dozları değişik kombinasyonlar belirlenerek hazırlanmıştır. Mineral madde, vitamin, amino asit ve büyüme düzenleyici (TDZ, NAA, BAP) karışımları tamamlanarak elektromanyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak içerisindeki maddelerin erimeleri ve ortama eşit olarak dağılmaları sağlanmış, pH'sı ayarlanan ortamlar otoklav şişesine konularak otoklava yerleştirilmiştir. Gautheret (1959) ve Street (1973)'e uyularak otoklavda sterilizasyon işlemi 121 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3'de besin ortamı hazırlığı ve kabin içerisinde dikime hazır halde bulunan petri kapları görünümleri verilmiştir.



Şekil 3.3: Besin ortamı hazırlığı ve kabin içerisinde dikime hazır halde bulunan petri kapları

Kültüre alma işleminde kullanılan 8 santimetre çapındaki cam petri kapları besin ortamlarından önce otoklavda 121 °C’de 20 dakika süreyle tutularak sterilize edilmiş ve izolasyon kabinde soğumaya bırakılmıştır. Besin ortamları, otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril kabin içerisinde ve aseptik koşullarda her bir petri kabına yaklaşık 10-12 mL düşecek şekilde doldurulmuştur. Ortamlar petri kapları içerisinde 30-40 dakika kadar bekletildiğinde agarın etkisi ile jel kıvamına ulaşmış ve dikime hazır hale gelmiştir.

Mikroçoğaltımı yapılan bitkiciklerin geliştirilmesi için alınan alt kültür ortamlarında ise GA₃ hormonu kullanılmıştır. Karışımları tamamlanıp pH’sı 5.7’ye ayarlanan, şeker ve agarı katıldıktan sonra otoklava atılan ortamlar; 8.5 x 10 cm boyutlarındaki cam kavanozlara ortalama yirmişer ml olacak şekilde dökülmüştür. Alt kültüre alınan bitkiciklerin köklenmesi için ise IBA hormonu kullanılmış olup hazırlanan ortamlar, 2,5 x 13 cm boyutlarındaki cam tüplere ortalama 10’ar mililitre olacak şekilde doldurulmuş ve tüplerin ağzı cam kapak ile kapatılmıştır.

3.2.2.2 Eksplantların Hazırlanması, Sterilizasyonu ve Dikimi

Mikroçoğaltım için bitkilerden alınan yapraklar önce akan suyun altında yıkanmış daha sonra birkaç damla Tween 20 eklenmiş %20’lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika süreyle bekletilerek yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Magenta kutuları içine konulan yapraklar steril olma süresi boyunca kabin içerisinde belli aralıklarla çalkalanarak sodyum hipokloritin tüm yüzeyle temas etmesi sağlanmıştır. Üç kez beşer dakika süreyle daha önceden otoklavlanmış soğutulmuş steril saf su ile durulanarak, steril kurutma kağıtları üzerinde suların süzülmesi sağlanmıştır. Şekil 3.4’te akan suyun altında yıkanan yapraklar, Şekil 3.5’da kabin içerisinde yapılan yüzey sterilizasyonu işlemi görünümü verilmiştir.

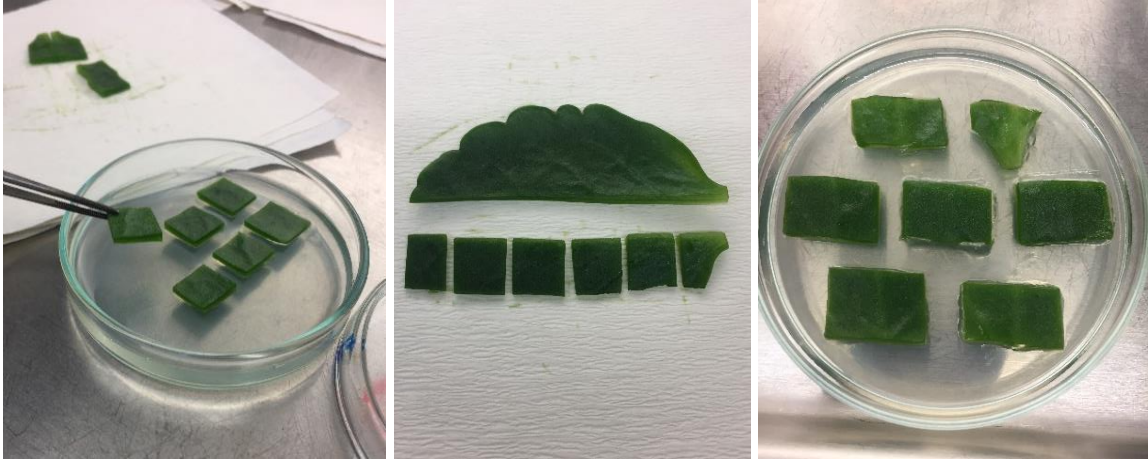


Şekil 3.4: Akan suyun altında yıkanan yapraklar



Şekil 3.5: Kabin içerisinde yapılan yüzey sterilizasyonu işlemi

Steril olan yaprakların üzerlerinde su damlası kalmamasına özen gösterilerek yaprak kenarları pens ve bistüri yardımıyla kesilmiş, ortada kalan yaprak kısmı yaklaşık 1 cm'lik parçalar olacak şekilde kesilmiştir. Kesme sırasında yaprak dokusunun zedelenmemesine özen gösterilmiştir. Kesilen eksplantlar bekletilmeden pens yardımıyla besin ortamı üzerine, ortama batırılmaksızın hafifçe temas edecek biçimde yerleştirilmiştir. Şekil 3.6'te besin ortamına yerleştirilmiş eksplantlar görülmektedir.

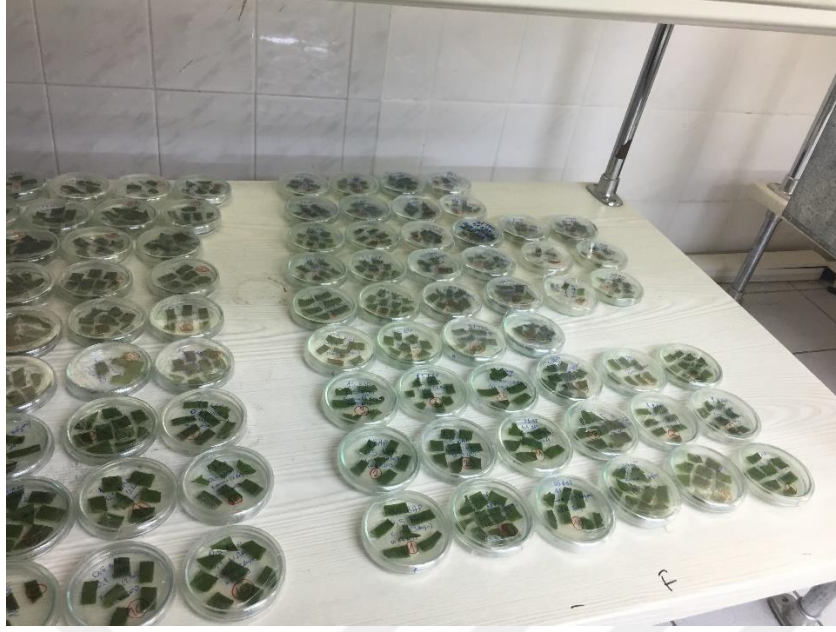


Şekil 3.6: Besi ortamına yerleştirilmiş explantlar

Her petri kabına 5 ila 7 arasında eksplant dikimi yapılmıştır. Dikim işlemi tamamlanan petri kaplarının kenarları dış ortamla ilişkinin kesilmesi amacıyla streç film ile kapatılmış ve üzerlerine uygulama bilgileri yazılmıştır. Dikim aletleri çalışma esnasında sık sık önce %96'lık etil alkole batırılıp hemen ardından aleve veya sterilizatöre tutularak sterilize edilmişlerdir. Kabin içi ve uygulama yapılan alan sık sık, hazırlanmış %70'lik alkolle silinip steril edilmiştir.

3.2.2.3 Kültür Koşulları

Dikim işlemi tamamlanan petri kaplarının tümü, sıcaklığı 25 ± 2 °C'de kontrol edilen iklim odasındaki karanlık raflara yerleştirilmiş ve gelişmeye bırakılmışlardır. Petriler burada 30-45 gün boyunca kallus ve sürgün oluşurması beklenmiştir. Şekil 3.7'te iklim odasında bulunan petriler görünmektedir.



Şekil 3.7: İklim odasında bulunan petriler

Bazı eksplantlar yara dokuları ve içinde bulunduğu ortam nedeniyle kesilen kenarlardan sadece kallus oluşturmuş fakat bazı petrilerde eksplant kenarlarından sürgün rejenerasyonu oluşturduğu görünmüştür. Bu sürgünlerin gelişimi için MS + büyüme hormonu içeren ortamlara diğer bir deyişle alt kültüre alınmışlardır. Kallus ve sürgün oluşumu gözlenen petriler yeniden laboratuvara getirilmiş, kabin içerisinde sürgünler bistüri yardımıyla eksplantlardan ayrılarak kavanozlara dikilmiştir. Dikim yapılan kavanozlar iklim odasındaki fotoperiyodik düzeni 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan ışıklı raflara yerleştirilmişlerdir. Floresan lambaların ışık kaynağı olarak kullanıldığı odada, kavanozların yerleştirildiği seviyedeki ışık şiddeti 2000 Lux değerinde ölçülmüştür.

Kavanozların içinde alt kültüre alınmış, 20-30 gün süreyle kalan sürgün gelişimi devam eden materyaller, genç bitkicik görünümü almışlardır. Bu materyallerin bir kısmı kabin içerisinde boğum aralarından kesilerek *in vitro* mikro çelikleme yapılmış; bir kısmı ise daha önceden 2.5 x 13 cm boyutlarındaki tüpler içinde hazırlanmış ½ MS + 0.5 mg/L IBA köklenme ortamına köklendirilmek üzere dikilmişlerdir.

3.2.2.4 Elde Edilen Bitkiciklerin Dış Koşullara Adaptasyonu

İn vitro koşullarda elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması amacıyla, tüplerde köklenen genç bitkicikler önceden hazırlanan 1:1 oranında perlit + torf, vermikulit ve fide harcı içeren

kasa veya viyol içerisine dikilmişlerdir. Saksılar 2/3'ü torf, 1/3'ü perlit ile hazırlanan harçla doldurulmuştur. İklimlendirmeye alınan bitkiler ilk olarak saf su ile sulanmış daha sonraki sulamalarda musluk suyu kullanılmıştır. Dikimi yapılan saksılar gündüz sıcaklığı 20-25 °C arasında değişen iklim odasına yerleştirilmişler ve gelişmelerine burada devam ettirilmişlerdir.

3.2.2.5 Değerlendirme

Denemelerde kallus oluşturma miktarı ve sürgün oluşum oranları (%) gibi özelliklere dikkat edilmiştir. İncelemeler kültürlerin 6.hafta ve 8. haftaları tamamlandığında iki kez yapılmıştır. Kallus oluşturma miktarları, kallus çapına göre sınıflandırılmış, 0.5 cm den küçük çapa sahip kalluslar +, çapı 0.5-1.0 cm arasında olanlar ++ ve 1.0 cm den büyük çapa sahip olanlar ise +++ olarak değerlendirilmiştir. Sürgün oluşturma oranları (%), her uygulamada sürgün oluşturan eksplantların toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile belirlenmiştir. Sürgün oluşturma oranları (%), açılı değerlerine dönüştürülerek SPSS 18.0 paket programı ile varyans analizine tabi tutulmuş, farklı grupların harflendirilmesinde Duncan testinden yararlanılmıştır.

3.2.3 Deneme Gruplarında Yapılan Farklı Uygulamalar

Denemelerde *in vitro* çoğaltım oranları üzerine kullanılan temel besin ortamı MS esas alınmıştır. Değişken olarak ortamlara farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicilerden olan thidiazuron (TDZ), α -naphthalene acetic asit (NAA) ve benzyl aminopurine (BAP) hormonları eklenmiş bu ortamlar üzerine denemeler yapılmıştır. Ortamlardaki şeker konsantrasyonu %3 oranında sakkaroz ve agar miktarı ise 7 g/L olarak sabit tutulmuştur.

Her denemede bitkilerden alınan yapraklar önce akan suyun altında yıkanmış daha sonra %20'lik ticari sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi içine birkaç damla Tween-20 eklenerek 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiştir. Üç kez beşer dakikalık sürelerle steril saf su ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları üzerinde suların süzülmesi sağlanmıştır. Yapraklar bistüri yardımıyla kesilerek elde edilen eksplantlar ortama dikilmiştir. Her bir deneme ortamına 140-150 adet petri dikimi yapılmıştır.

3.2.3.1 I.Deneme

Çalışmanın başlangıcında yapılan ödenemelerde, hormon ilave edilmeyen besin ortamlarında kalanşo eksplantlarında bir miktar şişme ve genişleme olmasına rağmen 60 gün beklendiği halde hiçbir organogenesis sağlanamadığı görülmüştür. Bu nedenle denemeler, büyüme düzenleyici katkıları ve bunların dozlarının etkilerini incelemek üzerine kurulmuştur. Çalışmanın ilk BGD denemesinde MS besin ortamına ek olarak, bitki dokularında özellikle hücre bölünmeleri esnasında ortaya çıkan, diğer hormonların aksine hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunan organik maddelerden biri olan thidiazuron (TDZ) kullanılmıştır. Hormonun etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda TDZ (0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L) ortama ilave edilerek 4 adet besin ortamı bileşimi oluşturulmuştur. Denemede kalanşo yaprakları bitki üzerinden alınmış, yüzeysel sterilizasyon işleminin ardından aseptik koşullarda petri kaplarındaki ortamların üzerine yerleştirilmiştir. Kültüre alınmış eksplantlar, inkübasyon koşullarında bekletilerek kültür süresince kallus oluşturma ve sürgün gelişim parametrelerine ait ölçümler yapılmıştır.

3.2.3.2 II.Deneme

Sitokinin olarak sürgün oluşturma kapasitesi yüksek olan TDZ ile birlikte, bitkilerde gelişim düzenleyici olarak kullanılan naftalen asetik asit (NAA) hormonunun etkisini incelemek amacıyla 1. deneme'deki TDZ hormon dozları içeren besin ortamlarının her birine 0.1 mg/L ve 0.5 mg/L NAA eklenerek 8 adet kombinasyon oluşturulmuştur. Bu aşamadaki denemede TDZ, tek başına yeniden kullanılarak toplamda 12 farklı ortam bileşimi birbiriyle karşılaştırılmıştır. Yapraklar aynı şekilde steril şartlarda izole edilerek ortamların üzerine yerleştirilmişlerdir. İnkübasyon süresi boyunca gelişim durumları gözlenmiştir. TDZ'nin tek başına kullanımı veya NAA büyüme düzenleyici hormonunun TDZ ile birlikte kullanımının kalanşo eksplantları üzerinde kallus oluşumu, sürgün gelişim durumları belirlenmiştir.

3.2.3.3 III.Deneme

Linjian vd. (2006), çalışmalarında en yüksek rejenerasyon oranının MS + 2 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA besin ortamı kombinasyonunda meydana geldiğini açıklamıştır. Yapılan bu denemede önceki çalışmalardan yola çıkılarak MS besi ortamına 0.5 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP ilave edilmiştir. Karşılaştırma yapılması amacıyla BAP sabit tutulup NAA 2 katına (1.0

mg/L) çıkartılarak başka bir ortam daha hazırlanmıştır. Daha önceki yapılan denemelerde kullanılan ortamlardan MS + 0.1 mg/L TDZ ile MS + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA içeren ortamlar tekrarlanarak BAP hormonu ile karşılaştırma denemesi yapılmıştır.

Her deneme grubu için eşit sayıda petri kullanılmaya gayret edilmiş, ortamlar üzerine 5 ilâ 7 arasında eksplant yerleştirilmiştir. Deneme sonuçları, kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon oranları yönünden değerlendirilmiştir.

3.2.4. Sürgünlerin geliştirilmesi, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması

Elde edilen her sürgün veya sürgün kümeleri birbirinden ayrılarak, gelişim ve pişkinleştirme amacıyla MS + 0.2 mg/L GA₃ içeren ortamlara transfer edilmiştir. Burada 1 cm uzunluğa ulaşan her sürgün köklendirme aşamasına alınabilir bulunmuştur. Köklendirme için ½ MS + 0.5 mg/L IBA içeren ortam kullanılmıştır. Dış koşullara alıştırma aşamasında Perlit + torf karışımı (1:1), Vermikulit ve ticari fide harcı (Vera Mix) içeren kasalara dikimleri yapılan sürgünlerin bir kısmı da durgun su kültürüne alınmıştır. Gelişmeleri sağlıklı olarak devam eden bitkiler daha büyük saksılara transfer edilmiş, seraya aktarılmış ve Nisan ayı içerisinde çiçeklenmeleri sağlanmıştır. Böylece tam bir döngü gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan denemelerde elde edilen veriler; dikilen eksplant sayısı, kallus oluşum miktarı, oluşan sürgün rejenerasyonu ve sürgün oluşum oranı şeklindeki başlıklar halinde oluşturulan tablolarda verilmiştir. Her denemede eksplantlar üzerinde farklılaşmalar görülmüştür. Dikilen eksplant sayısı ile oluşan sürgün rejenerasyonunun oranı yüzde olarak hesaplanmış ve tablolarda sürgün oluşum oranı şeklinde verilmiştir. *In vitro* koşullarda yaprak eksplantlarından oluşan sürgünler ve sürgün kümeleri, pişkinleştirme ortamlarında geliştirilerek tek tek ayrılmış ve köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. Köklenme sağlandıktan sonra ise dış koşullara alıştırmaya amacıyla harç içeren viyollere, kasalara veya küçük saksılara ya da durgun su kültürüne aktarılmıştır. Sağlıklı elde edilen bitkiler, serada geliştirilerek çiçeklenme aşamasına kadar büyütülmüşler, herhangi bir genetik açılım olup olmadığı yönünde incelenmişlerdir.

4.1 I.Deneme Sonuçları

Bu denemede, MS besi ortamına 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L ve 1 mg/L oranlarında TDZ hormonu eklenerek 4 farklı ortam bileşimi elde edilmiştir. Denemede kullanılan petri kaplarının tümü, sıcaklığı 25 ± 2 °C’de kontrol edilen iklim odasındaki karanlık raflara yerleştirilmiş ve gelişmeye bırakılmışlardır. TDZ hormonu eksplantlarda kallus oluşumu için önemli bir ivme oluşturmuştur. Bununla birlikte bu etki, kullanım dozuna bağlı olarak farklılık göstermiştir. Pembe çiçekli kalanşo genotipine ait yaprak eksplantları, kültüre alma işleminden 6 ve 8 hafta sonra incelenerek kallus ve sürgün oluşturma oranları belirlenmiştir. Kültür başlangıcından itibaren 6. hafta tamamlandıktan sonra yapılan gözlemlerde elde edilen sürgün oluşum oranlarının %6.99 ile %40 arasında değiştiği ve uygulamaların istatistiksel olarak farklı gruplarda yer aldığı görülmektedir. Buna göre 6.haftanın sonunda en yüksek sürgün oluşum oranı MS + 1 mg/L TDZ içeren IV. ortamda kültüre alınan eksplantlarda meydana gelirken en düşük sürgün oluşum oranı ise MS + 0.2 mg/L TDZ içeren II. ortamda tespit edilmiştir. Kültürün 8.haftasının tamamlanmasıyla yapılan ölçümlerde sürgün oluşum oranlarının tüm uygulamalarda hızlı bir artış göstererek %94’ün üzerine çıktığı görülmüş, istatistiki değerlendirmeler neticesinde aralarında fark olmaksızın IV. ve II. ortamın en yüksek sürgün oluşum oranlarını verdiği tespit edilmiştir. Tablo 4.1’de farklı TDZ dozlarının ortam üzerindeki etkileri görülmektedir. Şekil 4.1’de eksplant kenarlarında oluşan sürgün rejenerasyonu görünümü verilmiştir. Her deneme

sonrasında elde edilen sürgünler alt kültür ortamına (MS + GA₃) alınarak gelişim göstermesi beklenmiştir. Şekil 4.2’de sürgünlerin alt kültüre alındığı kavanozlar görünmektedir.

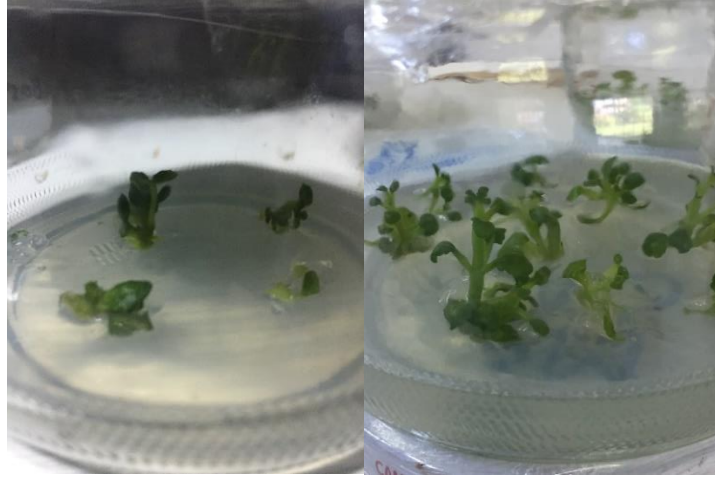
Tablo 4.1: Farklı TDZ dozlarının ortam üzerindeki etkileri

TDZ dozu (mg/L)	Ortamın Kodu	Dikilen Eksplant Sayısı (adet)	6.Hafta		8. Hafta	
			Sürgün oluşturan eksplant sayısı (adet)	Sürgün Oluşum Oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant sayısı (adet)	Sürgün Oluşum Oranı (%)
0.1	I	145	12	8.28 c	137	94.48 b
0.2	II	143	10	6.99 d	139	97.2 a
0.5	III	138	42	30.43 b	130	94.2 b
1.0	IV	135	54	40.0 a	131	97.04 a
CV%			3,02		1,39	
Ortam			*		*	

(*) Sütunda farklı harfleri alan gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P \leq 0.05$)



Şekil 4.1: TDZ içeren ortamlardaki kalancho yaprak eksplantlarının kenarlarında oluşan sürgün rejenerasyonu (8 haftalık kültürlerde).



Şekil 4.2: Sürgünlerin alt kültüre alındığı kavanozlardaki transferden hemen sonraki (solda) ve bir hafta gelişmenin ardından (sağda) görünüşleri.

Yaprak eksplantlarının kültüre alınmasının ardından 8 hafta geçtiğinde, 6.hafta ölçümlerine göre önemli oranda farklılıklar meydana gelmiştir. TDZ dozu fark etmeksizin tüm ortamlarda %94'ün üzerindeki eksplantta sürgün rejenerasyonunun olduğu belirlenmiştir. Buradan TDZ'nin oldukça güçlü bir sitokinin etkisi yaptığı ve düşük dozlarda kullanımının bile kalanşo mikroçoğaltımı için yeterli olabileceği anlaşılmıştır. Dozlar arasındaki oransal sürgün oluşturma farklılığı ortadan kalkmıştır. En düşük kullanım dozu olan 0.1 mg/L TDZ içeriğinde bile tüm eksplantlarda 10 adetten fazla, bazılarında ise sayılamayacak şekilde meristematik dokuların olduğu gözlemlenmiştir. 0.5 mm'den küçük oluşan bu mini sürgünler küme veya cluster olarak nitelendirilmiştir. Bu konuda çalışan ve farklı kalanşo türlerinde rejenerasyon amacıyla doku kültürü uygulamaları yapan Frello vd. (2002) adlı araştırmacı ve ekibi de sürgün sayısını belirleyemediklerini bildirmiştir.

4.2 II.Deneme Sonuçları

2. denemede, MS besi ortamına 1. denemede olduğu gibi 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L ve 1.0 mg/L oranlarında TDZ hormonu eklenen 4 ortam bileşimi hazırlanmış; bunun yanı sıra büyüme düzenleyici olan NAA hormonu tüm ortamlara 0.1 mg/L ve 0.5 mg/L dozlarda ilâve edilmiştir. Böylece toplam 12 farklı ortam bileşimi elde edilmiştir. Her bir deneme kombinasyonunda ortalama 150 adet yaprak eksplantı dikimi yapılan petriler, sıcaklığı 25 ± 2 °C'de kontrol edilen iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır. Petriler 40 gün boyunca karanlıkta bekletilmiş, kallus ve sürgün rejenerasyon oluşumu gözlemlenmiş ve oranları belirlenmiştir. Daha sonra

fotoperiyodik düzene aktarılan kültürlerde ayrıca 8. hafta sonunda bir değerlendirme daha yapılmıştır.

Kültürün 6.haftasında yapılan gözlemlerde, sürgün oluşturan eksplant oranının %5.63 ile %47.89 arasında değiştiği görülmektedir. Denemede en yüksek sürgün oluşum oranı MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ içeriği ile XI. ortamdan, en düşük sürgün oluşum oranı ise MS + 0.1 mg/L NAA + 0.2 mg/L TDZ içeriği ile VI. ortamda belirlenmiştir. Kültürün 8.haftasının tamamlanmasının ardından yapılan ölçümlerde 1.denemeye benzer şekilde sürgün oluşum oranlarının tüm uygulamalarda hızlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. 8.hafta sonunda yapılan gözlemler değerlendirildiğinde ise sürgün oluşturan eksplant oranının %92.81 ile %98.60 arasında değiştiği görülmektedir. MS + 0.1 mg/L TDZ içeriği ile I. Ortam ilk sırayı alırken, MS + 0.5 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ içeriği ile XII. ortam son sırada yer almıştır. Tablo 4.2’de farklı TDZ dozlarına 0.1 mg/L ve 0.5 mg/L eklenen NAA hormonunun ortam üzerindeki etkileri görülmektedir. Şekil 4.3’de ½ MS + 0.5 mg/L IBA köklendirme ortamında köklendirilmiş genç bitkicikler görülmektedir.



Şekil 4.3: Köklendirme ortamında köklendirilmiş genç bitkicikler.

Tablo 4.2: Farklı TDZ dozlarına 0.1 mg/L ve 0.5 mg/L eklenen NAA hormonunun ortam üzerindeki etkileri

Ortamdaki BGD dozları (mg/L)		Ortamın Kodu	Dikilen Eksplant Sayısı	Kallus	6.Hafta		8. Hafta	
NAA	TDZ				Sürgün oluşturan eksplant sayısı (adet)	Sürgün Oluşum Oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant sayısı (adet)	Sürgün Oluşum Oranı (%)
-	0.1	I	143	-	14	9.79 g	141	98.60 a
-	0.2	II	140	-	21	15.00 f	137	97.86 ab
-	0.5	III	133	-	32	24.06 e	129	96.99 a-c
-	1.0	IV	136	-	58	42.65 b	131	96.32 b-d
0.1	0.1	V	146	++	22	15.07 f	139	95.21 cd
0.1	0.2	VI	142	++	8	5.63 j	137	96.48 b-d
0.1	0.5	VII	138	+	37	26.81 d	132	95.65 cd
0.1	1.0	VIII	149	+	10	6.71 ij	143	95.97 b-d
0.5	0.1	IX	147	+++	42	28.38 c	140	95.24 cd
0.5	0.2	X	144	+++	10	7.19 hi	136	94.44 de
0.5	0.5	XI	140	+++	68	47.89 a	135	96.43 b-d
0.5	1.0	XII	139	+++	12	8.22 h	129	92.81 e
CV%					5.65		1.46	
Ortam					*		*	

(*) Sütunda farklı harfleri alan gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P \leq 0.05$)

(+) Kallus çapı 0.5cm'den daha küçüktür

(++) Kallus çapı 0.6-1.0cm arasındadır

(+++) Kallus çapı 1cm'den büyüktür

Kültürün 8.haftasında yapılan gözlemlerde ise tek başına TDZ kullanımının sürgün oluşumunu büyük oranda etkilediği tespit edilmiştir. MS + 0.1 mg/L TDZ içeriği ile I.ortam 6.haftanın sonunda en düşük oranı (%9.79) vermiş olmasına rağmen, 8.haftanın sonunda en yüksek sürgün oluşum oranını vermiş sürgün oluşum oranı %98.60'a ulaşmıştır. Aynı şekilde MS + 0.5 NAA + 0.5 mg/L TDZ içeriği olan XI. ortam 6.haftanın sonunda en yüksek sürgün oluşum oranına (%47.89) sahipken 8.haftanın sonuna gelindiğinde I. ortama (MS + 0.1 mg/L TDZ) göre daha

geride kaldığı (%96.32) görülmektedir. Tek başına TDZ kullanımı halinde eksplantlarda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Bununla birlikte NAA içeren ortamlarda, NAA dozunun varlığına göre kallus oluşumu artmıştır. Oksin grubunda yer alan NAA'nın hücre bölünmesini teşvik ettiği Castel blanche vd.(2010) tarafından da bildirilmektedir.

Sitokinin aktivitesi gösteren bir büyümeyi düzenleyici olan TDZ'nin tek başına kullanıldığı denemelerde kültür süresine bağlı olarak belirgin farklar ortaya çıkmıştır. Kültürün 40.gününde artan TDZ dozları ile sürgün oluşum oranının da arttığı görülürken, kültürün 8.haftasına gelindiğinde bu durumun tersine çevrildiği görülmüştür. Bununla birlikte kültürün 8. haftasında sürgün oluşum oranlarında ivmeli bir artış ortaya çıkmış, uygulamalar arasındaki fark ise azalmıştır. Tablo 4.2'den de anlaşılacağı gibi farklı dozlarda (0.1, 0.2, 0.5, 1.0) TDZ uygulanan kültürlerin 6.haftasında sürgün gelişim oranları sırasıyla yüzde 9.79, 15.00, 24.06, 42.65 olurken kültürün 8.haftasına gelindiğinde bu oranlar yüzde 98.60, 97.86, 96.99, 96.32 şeklinde sıralanmıştır.

Sanikhani vd. (2006), kalanşo bitkisinde yaprak ve boğumarası eksplantlarından rejenerasyon elde etmek amacıyla yaptıkları çalışmada büyümeyi düzenleyici olarak BAP ve NAA kombinasyonları ile TDZ kullanmıştır. Çalışmada 0 ile 15 mg/L arasındaki dozlarda denenilen TDZ miktarları arasında 0.1 mg/L dozunun yaprak ve boğum arası eksplantlarında yeterli sürgün farklılaşmasını sağladığı, bu düşük dozda dahi tek başına kullanılan TDZ'nin, BAP ve NAA kombinasyonlarından daha yüksek meristematik dokuların oluşumunu sağladığı görülmüştür. Bu sonuçlar, bizim çalışmamızla benzerlik göstermiştir. Bhuiyan vd. (2006), MS + 1.0 mg/L BAP + 0.4 mg/L IAA ortamında %100 sürgün oluşumu oranı ve eksplant başına 9.5 adet sürgün sayısını elde etmişlerdir. Araştırmacılar TDZ içeren ortamlardaki yüksek sayıdaki sürgün oluşumunun yanı sıra bu sürgünlerin çok kısa boylu olduklarını ve küme şeklinde bulunduklarını bildirmiştir. 5 mm'nin altındaki sürgünler çok küçük olduklarından sayılamamış, 50'nin üzerinde gibi yaklaşık değerlendirmelerle ifade edilmiştir. Çalışmamızda da TDZ içeren ortamlarda sürgün sayısı vermenin sağlıklı olmayacağı, yoğun adventif göz kümelerinin elde edildiğini söylemek daha doğru bir yaklaşım olarak görülmüştür. TDZ'nin BAP'a göre daha etkin bir rejenerasyon uyarıcısı olduğu bu araştırmacılar tarafından da belirtilmektedir. TDZ'nin biyolojik aktivitesi birçok bitki türünde, adenin-tipli sitokininlere kıyasla çok daha yüksek bulunmuştur (Moc vd., 1987; Huettelman ve Preece, 1993). TDZ katkısı ile farklı bitki türlerine ait eksplantlardan çalimsı ve çok yoğun küme şeklinde sürgün rejenerasyonu, başka çalışmalarda da rapor edilmiştir (Yusnita vd., 1990; Bates vd., 1992;

Murthy vd., 1998). Bu tip çalışmalarda da TDZ katkılı ortamlardaki rejenerant meristemlerin sayımlarının yapılamadığı ya da sayılamayacak kadar çok meydana geldikleri kaydedilmiştir. TDZ'nin BAP içeren ortamlara göre kalanşonun başlangıç kültürlerinde daha fazla oran ve sayıda sürgün farklılaşması sağladığı, Frello vd. (2002) tarafından da bildirilmiştir.



Şekil 4.4: En fazla sürgün rejenerasyonu veren I. ortamdan elde edilmiş sürgünler.



Şekil 4.5: Kallus oluşumu ile birlikte sürgün gelişimi (NAA + TDZ ortamları: üstte), sürgün rejenerasyonu (TDZ ortamları: altta).

Elde edilen genç sürgünlerin bir kısmı kabin içerisinde boğum aralarından kesilerek *in vitro* mikro çelikleme yapılmıştır. Şekil 4.6'da gelişmekte olan genç sürgünler ve mikro çelikleme yapılmış bitkiciklerin görünümü verilmiştir. Şekil 4.7'de Oluşan sürgün rejenerasyonlarından farklı gelişme aşamalarında çekilmiş mikroskop ve eksplant görünümleri yer almaktadır.



Şekil 4.6: Gelişmekte olan genç sürgünler ve mikro çelikleme yapılmış bitkicikler.



Şekil 4.7: Oluşan sürgün rejenerasyonlarından farklı gelişme aşamalarında çekilmiş mikroskop ve eksplant görünümleri.

4.3 III.Deneme Sonuçları

Kalanşo'nun doku kültürü ile çoğaltımında araştırmacıların yoğunlaştığı oksin-sitokinin kombinasyonu (NAA + BAP) bu denemede değerlendirmeye alınmıştır. NAA ve BAP kombinasyonlarının yer aldığı bu deneme aşamasında sürgün oluşturma oranının kültürün 6.haftasında 11.28 ile %40 arasında değiştiği görülmektedir. Bu ölçüm zamanında en yüksek sürgün oluşum oranı MS + 0.5 mg/L NAA + 2 mg/L BAP içeriği ile I. ortamda kültüre alınan örneklerde meydana gelmiş, MS + 0.1 mg/L TDZ içeriği ile III. ortamdan ise en düşük değerler elde edilmiştir. Kallus oluşumu bakımından yapılan değerlendirmelerde ise I. ve II. ortamlar en fazla kallus çapına sahip ortamlar olarak belirlenmiş, III. ve IV. ortamlar diğerlerine göre daha küçük çapta kallus oluşturduğu gözlenmiştir. I. ortamda birkaç eksplantta kallus ve sürgün rejenerasyonu dışında gelişen bir kök gelişimi gözlemlenmiştir. Bazı besi ortamı kombinasyonlarda oksin hormonunun fazla veya içeriğe bağlı olarak baskın gelmesiyle kök oluşabilmektedir. Şekil 4.8'de görüldüğü üzere eksplantlardan direkt olarak çıkan bu kök yapısını NAA büyüme düzenleyici hormonunun oksinler grubunda yer almasına yorumlayabiliriz. Bu kökler bir süre sonra kararıp canlılığını yitirmekte sürgün rejenerasyonu sağlamamaktadır. Kültür süresinin devam etmesi sürgün oluşum oranının tüm ortamlarda artırmıştır. Denemede 8.hafta tamamlandıktan sonra yapılan ölçüm ve hesaplamalarda sürgün oluşum oranının %78.99 ile %97.24 arasında değiştiği görülmektedir. MS + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ içeriği ile IV. ortam en yüksek sürgün oluşum oranını sağlarken, en düşük sürgün oluşum oranı ise MS + 1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP içeriği ile II. Ortamda görülmüştür. Tablo 4.4'te farklı dozlarda kullanılan hormonların ortam üzerindeki etkileri görülmektedir.

NAA ve BAP kombinasyonlarının ilave edildiği III. denemede de, I.ve II. denemeden elde edilen bulgulara benzer şekilde TDZ'in tek başına ve düşük dozlarda kullanımının kültürün 8.haftasında %90'nın üzerinde bir sürgün oluşum oranı meydana getirdiği görülmüştür. Bununla birlikte kültür ortamına 0.1 TDZ ile birlikte 0.1 NAA ilavesi kültürün 8.haftasında sürgün oluşum oranını %97.24'e yükseltmiştir. Bu sonuçlar, sitokinin etkisinin görülebilmesi için oksin varlığının da gerekli ve dengeleyici olduğunu belirten çalışmalarla paralellik göstermektedir (Mercier ve Roggemans, 1985; Schneider vd., 1985; Ionnau ve Ionnau, 1992). Ayrıca araştırmada artan NAA dozlarıyla sürgün oluşum oranları azalmış, yoğun bir kök oluşumu ortaya çıkmıştır. Liang (2013), BAP ve NAA dozlarını oldukça düşük seviyelerde uygun gelişme için önermişlerdir. Penghui ve Xingze (2010), *K.blossfeldiana*'nın yaprak

eksplantlarından kallus ve bitkicik rejenerasyonu amaçladığı çalışmasında düşük dozda NAA kullanımının ($\frac{1}{2}$ MS + 1.0 mg /L BA + 0.1 mg / L NAA) sürgün sayısını önemli oranda artırdığını bildirmiştir.

Tablo 4.3: Farklı dozlarda kullanılan hormonların ortam üzerindeki etkileri

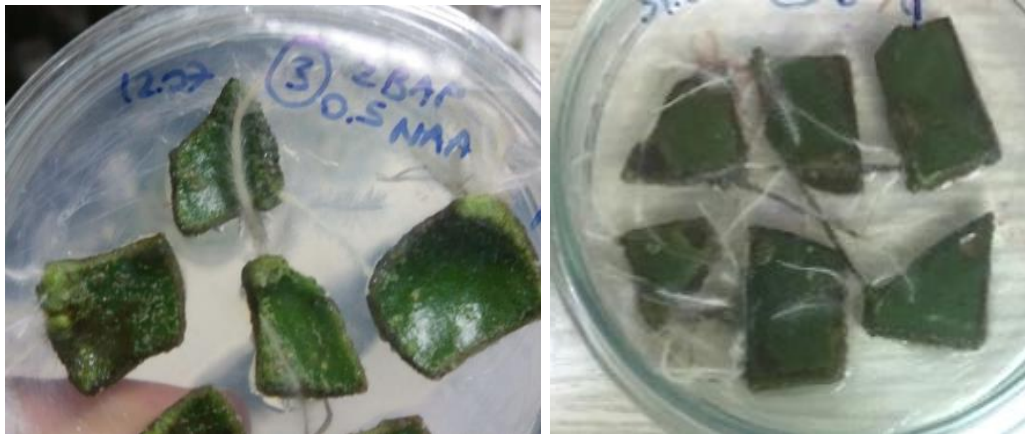
Ortamdaki BGD dozları (mg/L)			Ortamın Kodu	Dikilen Eksplant Sayısı	Kallus Oluşumu	6.Hafta		8.Hafta	
NAA	BAP	TDZ				Sürgün oluşturan eksplant sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)	Sürgün oluşturan eksplant sayısı (adet)	Sürgün oluşum oranı (%)
0.5	2	-	I	140	++	56	40.00 a	115	82.14 c
1	2	-	II	138	++	48	34.78 b	109	78.99 d
-	-	0.1	III	133	+	15	11.28 d	121	90.98 b
0.1	-	0.1	IV	145	+	28	19.31 c	141	97.24 a
CV%						3.64		1.24	
Ortam						*		*	

(*) Sütunda farklı harfleri alan gruplar arası farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir ($P \leq 0.05$)

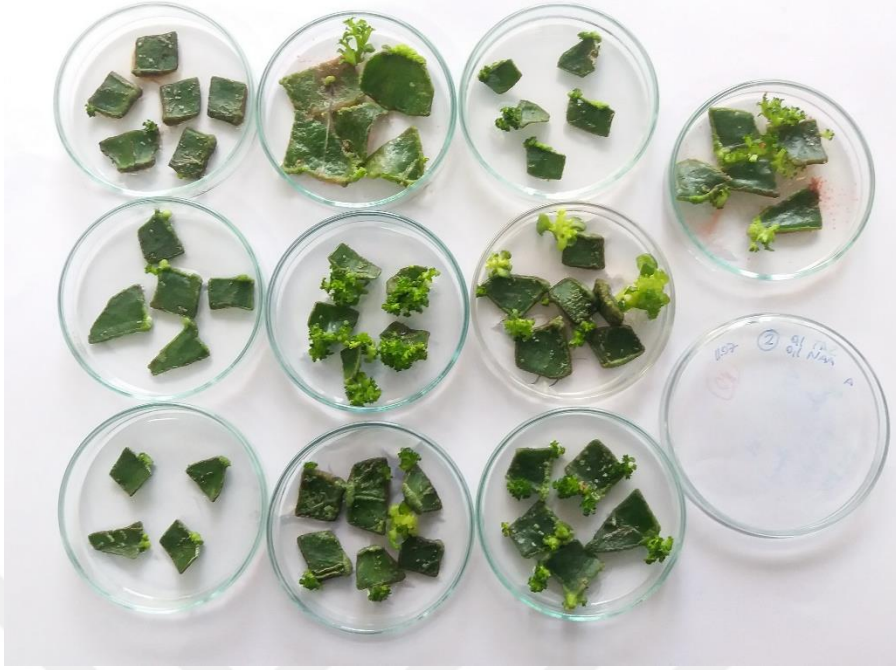
(+) Kallus çapı 0.5cm'den daha küçüktür

(++) Kallus çapı 0.6-1.0cm arasındadır

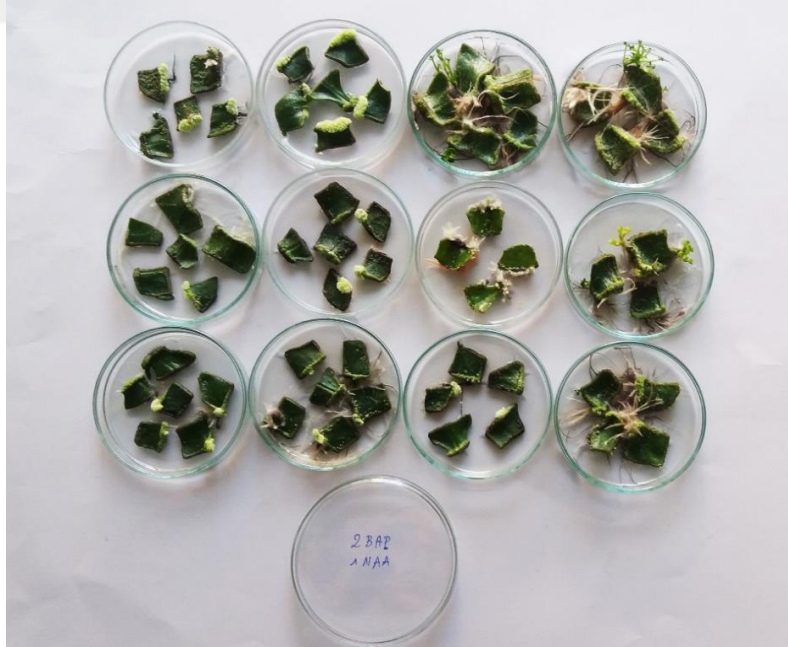
(+++) Kallus çapı 1cm'den büyüktür



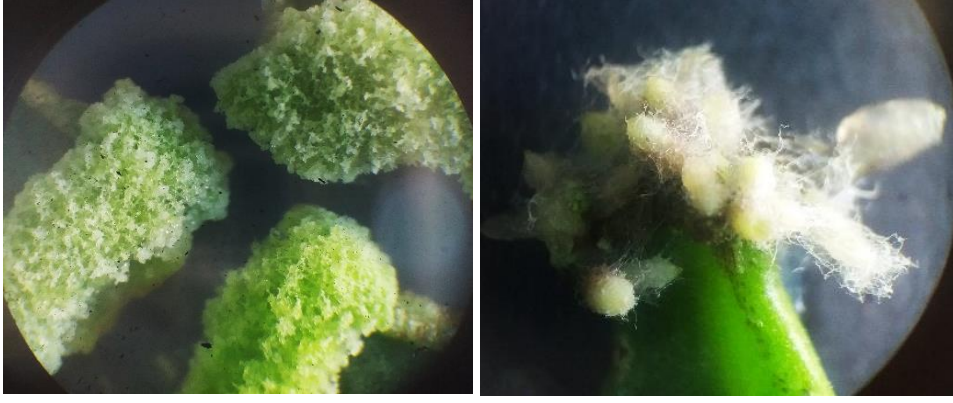
Şekil 4.8: Eksplantlardan direkt olarak çıkan kök yapısı.



Şekil 4.9: MS + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA ortamı üzerinde kalanşo yaprak eksplantlarının 8 haftalık kültüründen sonraki görünüşleri.



Şekil 4.10: MS ortamı + 2.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA üzerinde kalanşo yaprak eksplantlarının 8 haftalık kültüründen sonraki görünüşleri.



Şekil 4.11: 1.0 mg/L NAA içeren ortamda kallus ve kök oluşumu başlangıç aşamaları.



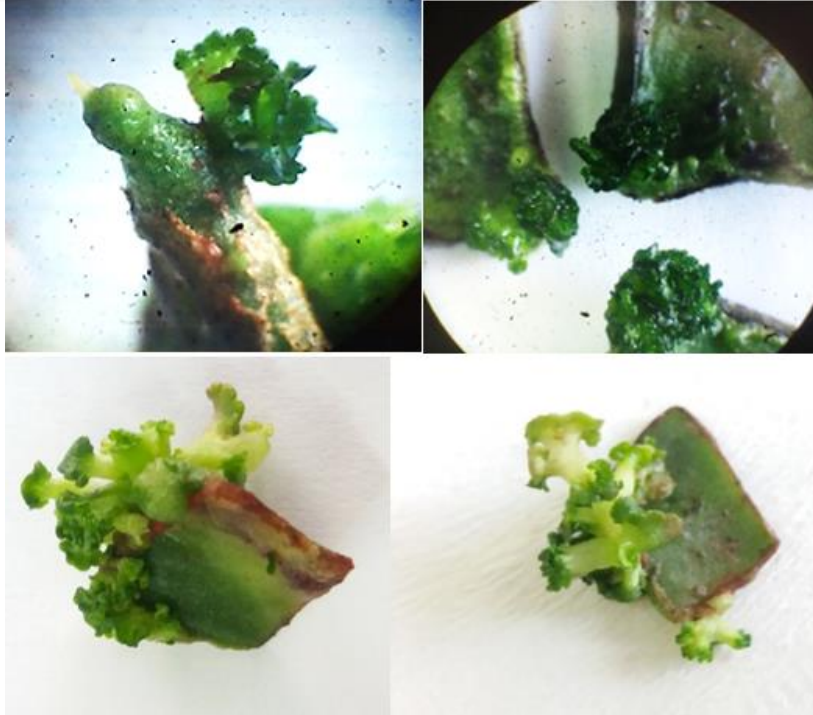
Şekil 4.12: 8 haftalık kültürden sonra MS + 2 BAP mg/L +1.0 NAA mg/L oluşan farklı sürgünler.



Şekil 4.13: MS + 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA ortamı üzerinde kalanşo yaprak eksplantlarının 8 haftalık kültüründen sonraki görünimleri.



Şekil 4.14: 8 haftalık kültürden sonra MS + 2 BAP mg/L +0.5 NAA mg/L ortamında oluşan kökler ve sürgünler.



Şekil 4.15: MS + 0.1 mg/L TDZ ortamında kalanşo yaprak eksplantı kültüründe gözlemlenen sürgün rejenerasyonu görünümleri.

4.4. Sürgünlerin geliştirilmesi, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması

Kültürlerde yeterli oranda sürgün oluşumu sağlandıktan sonra sürgünler pişkinleştirme ortamlarına aktarılmıştır. Pişkinleştirme ortamı olarak $\frac{1}{2}$ MS + 0.2 mg/L GA₃ kombinasyonu kullanılmıştır. Çoğaltım ortamlarında küme şeklinde gelişen adventif sürgünler tek tek ayrılarak pişkinleştirme ortamlarına dikilmiştir. Pişkinleştirme ortamlarında 1 ay süreyle inkübe edilen kültürlerde sürgünlerin uzaması, kalınlaşması ve köklendirme aşamasına alınabilmesi için uygun duruma getirilmeleri amaçlanmıştır. Bu aşamada da çoğaltma ortamının etkileri devam etmiş, küme halinde gelişimin yanı sıra küme şeklinde bir köklenme durumu meydana gelmiştir. Benzil amino pürin (BAP), doku kültürlerinde aksillar sürgünlerin oluşturulmasında en fazla kullanılan büyüme düzenleyicilerin başında gelir. Bitki hücrelerinde bölünmeyi teşvik eder, oksinin tepe hâkimiyeti oluşturma etkisini ortadan kaldırarak dip kısımdan yan sürgünler gelişmesini uyarır (Kumar ve Reddy 2011). Besin ortamlarında yetiştirilen bitki dokuları ortamdaki maddeleri bünyelerine alarak biriktirirler, bunlar bir sonraki ortama aktarıldığında hala etkisini sürdürebilir. Bu nedenle yüksek dozda BAP içeren ortamlardan alınan sürgünler, pişkinleştirme ortamında BAP bulunmadığı halde sürgün çoğalmasına daha yüksek seviyede devam etmişlerdir. Şekil 4.16 da pişkinleştirme ortamına alınan sürgünlerin 4 hafta sonraki gelişme durumları gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Pişkinleştirme ortamına alınan Kalanchoe sürgünlerinin 4 hafta sonundaki gelişme durumları.

Pişkinleştirme ortamında inkübe edilen kültürlerde yeterli miktarda sürgün uzaması (1 cm) ve sürgün kalınlaşması elde edildikten sonra *in vitro* köklendirme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada da pişkinleştirme aşamasında olduğu gibi küme halinde gelişme gösteren

sürgünler yine tek tek ayrılarak köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. Köklendirme aşamasında hormonsuz ½ MS, tam MS ve 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarına alınan sürgünlerde köklenme oranları belirlenmiştir. Periyodik olarak takibi yapılan kültürlerin tamamında 4.haftanın sonunda %100 oranında köklenme meydana gelmiştir.

Yeterli kök sayısı ve kök uzunluğuna ulaşan *in vitro* bitkiciklerde akklimatizasyon aşamasına geçilmiştir. Köklü Kalanşo sürgünleri dış koşullara alıştırılmak amacıyla plastik kasa veya viyoller içerisindeki farklı yetiştirme ortamları içerisine dikilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak 1:1 oranında perlit + torf, vermikulit ve ticari ithal fide harcı (Vera Mix) kullanılmıştır. Fidelerin dikimini izleyen ilk birkaç gün üzerleri kapatılmıştır. Mikroçoğaltımın son basamağı olan akklimatizasyon safhasında bitkiciklerin gelişmeleri takip edilmiş ve dış koşullara aktarılan bitkiciklerin tamamı 4 hafta süre ile %100 oranında canlılıklarını sürdürmüşlerdir. Farklı yetiştirme ortamlarında başarılı bir şekilde dış koşullara aktarılan bitkiciklerin gelişme durumları Şekil 4.16’da gösterilmiştir.



Şekil 4.17: Farklı yetiştirme ortamlarında dış koşullara alıştırılan *in vitro* kalanşo bitkiciklerinin 4 hafta sonundaki gelişme durumu a) Perlit + Torf b) Vermikulit c) Fide harcı.

Kalanşo bitkisinin köklenme ve dış koşullara alıştırılması aşamalarında elde edilen yüksek başarı, bitkinin her iki aşamayı birleştirerek hızlandırılabilceği düşüncesini de gündeme getirdiğinden, köklendirme ortamında üç hafta tutularak kök oluşumu başlayan sürgünlerin doğrudan su kültürüne alınması yöntemi de denenmiştir. İlk kez Fira vd. (2011) tarafından uygulanan bu yöntem Bejaoui (2022) tarafından da uygulanmış ve tavsiye edilmiştir. Çalışmamızda da kalanşo sürgünlerinin kök gelişimi devam etmiş olup tümü dış koşullara başarılı bir şekilde alıştırılmıştır. Böylece kalanşonun doku kültürü yoluyla üretiminde ilk kez bu çalışmada suda dış koşullara alıştırma uygulaması yapılmış ve başarılı bulunmuştur. Şekil 4.17’de bu çalışmadan bazı görüntülere yer verilmiştir. Liu (2010) da *ex vitro* köklenme ve dış koşullara alıştırma çalışmalarında sürgünlerin taşıyıcısı olarak sünger kullanmış ve sıvı ortamda köklenme oranının %95, aktarılan bitkiciklerin canlılık oranının ise %100 olduğunu bildirmiştir. Duan vd. (2020), aklimatizasyon aşamasında yeni bir uygulama olan durgun suda (Hoagland çözeltisi kullanmışlardır) geliştirme yöntemini *Trichosanthes kirilowii* bitkisindeki *in vitro* sürgünlerde kullanmışlardır. Araştırmacılar yaşama oranı, fotosentez kapasitesi, pigmenti içeriği, stoma yoğunluğu ve morfolojik parametreleri incelediklerinde; hidroponik sistemde köklendirme ve dış koşullara alıştırma işleminin sağlıklı bitki yetiştirmek amacıyla tercih edilebilecek bir teknik olduğuna kanaat getirmişlerdir. Zang vd. (2019) da *Caladium* bitkilerinde *in vitro* çoğaltılan sürgünleri Hoagland solüsyonu içeren hidroponik sistemlerde dış koşullara alıştırmışlar ve bunun bitki kaybını önlediğini, hızlı gelişme sağladığını belirtmişlerdir.



Şekil 4.18: Su kültüründe dış koşullara alıştırılan kalanşo bitkileri.

Tüm ortamlardaki kalanşolar saksılara aktarıldıklarında sağlıklı gelişmelerine devam etmişlerdir. Bir diğer uygulama viyollerdeki fide harcına doğrudan köklenmiş sürgünlerin

aktarılması ve seradaki mistleme ünitesi altında bir hafta içinde dış koşullara alıştırılmasıdır. Bu uygulamada da tutum oranı %100 olan kalanşo fideleri sağlıklı bir şekilde büyütülmüştür. Nitekim Hepaksoy ve Aksoy (2006), *in vitro* olarak yetiştirilen sürgünlerin dış koşullara alıştırılması aşamasında mist altında ve substrat olarak peat ortamı içinde elde edilen aklimatizasyon başarısının yüksek olduğunu belirlemişlerdir. İnce su zerreciklerinin aralıklı olarak püskürtülmesi sayesinde doku kültüründen çıkan bitkiciklerin atmosfer oransal nemine uyum sağlamaları daha kolay olmakta, yeni yapraklar gelişene kadar bitkiciğin canlılığını sürdürmesini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle kalanşonun da dış koşullara aktarılmasında toprak veya harç karışımlarına aktarma ve bu materyali seralarda sisleme ünitesinin altına yerleştirerek alıştırılmalarını sağlama yöntemi de kullanılabilecek bir başka seçenek olarak görülmüştür. Deng vd. (2005), Zhang ve Guo (2005), Xinzheng vd. (2006), Peng vd. (2008), Kordi vd. (2013), Bhuiyan vd. (2006) gibi kalanşonun *in vitro* çoğaltımı üzerinde çalışan araştırmacılar, köklenmiş *in vitro* sürgünlerin uygun koşullarda %85-100 arasında canlılık oranının sağlandığını ve başarıyla aklimatizasyonunun yapıldığını belirtmektedirler. Çalışmamızda elde edilen sonuçlarla kaynaklardaki bilgiler uyumlu bulunmuştur. Araştırmamızda gelişen fideler, daha büyük hacimli saksılara aktarılmış olup Şubat 2022 döneminde Antalya'daki kapalı seralarda çiçeklendirilmişlerdir. Böylece tam bir döngü sağlanmıştır (Şekil 4.31). Yapılan gözlemlerde çiçekli kalanşo bitkilerinin donör bitki ile aynı yapıda oldukları, herhangi bir somaklonal varyasyon görülmediği belirlenmiştir.





Şekil 4.19: Dış koşullara alıştırdıktan sonra saksılara aktarılarak çiçeklendirilen kalanşo bitkileri.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *K. blossfeldiana*'nın yaprak eksplantları kullanılarak mikroçoğaltım prosedürü oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla in vitro sürgün çoğaltımı, elde edilen adventif sürgünlerin pişkinleştirilmesi, köklendirme, bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması ve çiçekli bitki elde edilmesi aşamalarının tümü gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bu amaçla yapılan uygulamalar ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Başlangıç materyali olarak kullanılan yapraklardan hazırlanan eksplantlar sürgün oluşturma oranı bakımından elverişli bulunmuştur. Uygun besin ortamı bileşimlerinde kültüre alındığında direkt veya indirekt organogenesis oluşumu meydana gelmiştir.
2. Her ne kadar kültürlerin ilerleyen dönemlerinde içsel kökenli fungal veya bakteriyel enfeksiyonlar ortaya çıksa da yaprakların %10-15'lik ticari sodyum hipoklorit (ACE)'te 12 dk süreyle bekletme uygulamasının eksplantların yüzeysel sterilizasyon için yeterli olduğu görülmüştür. Bu hususta dikilen eksplant sayısı %20 oranında artırılabilceği gibi sağlam kalan materyalden yüksek oranda sürgün elde edilebileceğinden bu durum önemli bir sorun olarak görülmemiştir.
3. Kontrol ortamı olarak kullanılan hormonsuz MS ortamında herhangi bir organogenesis meydana gelmemiş, yalnızca dokularda şişme ve kesim yüzeylerinde çok hafif kabarma olmuştur. *In vitro* rejenerasyon için BGD ihtiyacı olduğu görülmüştür.
4. Sürgün çoğaltımı amacıyla büyümeyi düzenleyici madde olarak yalnızca TDZ'nin kullanıldığı uygulamalarda kültürün 6.haftasında düşük dozlarda düşük oranda (%6.99-42.65) sürgün oluşumu meydana gelirken kültürün 8.haftasına gelindiğinde uygulamalar arasındaki farkın azaldığı ve 0.1mg/L TDZ uygulamasında %98.60'a varan bir sürgün oluşum oranına ulaşıldığı belirlenmiştir.
5. Sürgün çoğaltma ortamlarına ilave edilen 2 mg/L BAP'in küme şeklinde bir gelişmeyi teşvik ettiği ve sayılamayacak kadar aksilllar sürgün oluşumuna neden olduğu görülmüştür.
6. Sürgün çoğaltma ortamlarında kullanılan oksin-sitokinin kombinasyonlarında TDZ'un BAP göre üstün performans göstererek daha yüksek oranda sürgün oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir.

7. Sürgün oluşum oranı bakımından TDZ-NAA kombinasyonları tek başına TDZ uygulamasına göre daha iyi sonuç vermiştir. Bu sonuç sitokinin etkisinin görülebilmesi için oksin varlığının da gerekli ve dengeleyici olduğu bilgisi ile uyumludur.
8. TDZ'nin tek başına (0.1, 0.2, 0.5 mg/L) veya NAA (0.1 mg/L) ile birlikte kullanımı, yaprak eksplantlarından ölçülemez seviyede meristematik sürgün ucu farklılaşması elde edilmesini sağlamıştır. Kitlesel küme (cluster) şeklinde oluşan sürgünler doku parçaları halinde alt kültüre alınabilmektedir. Sürgünlerin ayrılması mümkün olmamıştır.
9. Yaprak eksplantları üzerinde meydana gelen sürgünler ile meristematik dokular proliferasyon aşamasından önce geliştirilmeli, boyları uzatılmalı ve pişkinleştirilerek güçlü sürgünler elde edilmelidir. Araştırmada pişkinleştirme ortamı olarak ½ MS + 0.2 mg/L GA₃ kombinasyonu kullanılmış ve yeterli bulunmuştur.
10. İn vitro koşullarda elde edilen kalanşo sürgünlerinin köklendirilmesinde kullanılan hormonsuz ½ MS, tam MS ve 0.1 mg/L IBA ilave edilmiş MS ortamlarında %100 oranında köklenme meydana gelmiştir. Köklendirme amacıyla kullanılan bir diğer yöntem olan durgun su kültüründe de aynı oranda köklenme sağlanmıştır.
11. İn vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılmasında 1:1 oranında perlit + torf, vermikulit ve fide harcı kullanılmış ve tüm yetiştirme ortamlarında bitkicikler sağlıklı bir şekilde %100 oranında canlılıklarını sürdürmüşlerdir.
12. Dış koşullara alıştırma aşaması tamamlanan bitkilerin yetiştiriciliğine çiçeklenme dönemine kadar devam edilmiş, donör bitki ile aynı yapıda oldukları, herhangi bir somaklonal varyasyon görülmediği belirlenmiştir.
13. *K. blossfeldiana*, in vitro rejenerasyon yeteneği yüksek bir bitki olarak tespit edilmiştir.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, Kalanşo bitkisinin mikroçoğaltımı ve ıslah çalışmalarına ışık tutacak nitelikte olup, gerek süs bitkilerinin doku kültürü ile çoğaltımını yapan ticari laboratuvarlar gerekse bu konuda çalışacak araştırmacılar için uygun bir literatür olacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim. (2014). Hollanda Süs Bitkileri Sektörü ve Mezat Sistemi Araştırma Raporu.
- Anonim. (2017). Süs Bitkileri Sektör Raporu, Haziran.
- Anonim. (2020). Süs Bitkileri ve Mamulleri Sektör Raporu. SSBİR
- Anonim. (2021a). Dünya Süs Bitkileri Sektörü Araştırma Raporu, Orta Anadolu Süs Bitkileri ve Mamulleri İhracatçıları Birliği, Haziran, 34s.
- Anonim, (2021b). TÜİK.
- Ashloowalia, B., Prakash, J. ve Savangikar, V. (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, 26–30 August 2002
- Bates S, Preece J.E, Navarrele N.E, Van Sambeek JW ve Gaffney GR (1992) Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 31:21-29 <https://doi.org/10.1007/BF00043471>.
- Bejaoui, R. (2022). Kalanşo (*Kalanchoe Blossfeldiana* Poelln.)’Nun *In Vitro* Koşullarda Mikroçoğaltımı. *Doktora Tezi (Yayınlanmamış), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 50 s.*
- Bhuiyan, M.S.U., Kim, T., In, J. G., Yang, D. C. ve Choi, K. S. 2006. Plant regeneration from leaf explants of *Kalanchoe daigremontiana* Hamet & Perrier. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 14(5), 293-298.
- Bringslimark, T., Hartig, T. ve Patil, G.G. (2009). The Psychological Benefits Of Indoor Plants: A Critical Review Of The Experimental Literature, *Journal of Environmental Psychology*, 29: 422–433.
- Broertjes, C. ve Leffring, L. (1972). Mutation breeding of *Kalanchoe*. *Euphytica*, 21(3), 415-423.
- Castelblanque, L., Garcıa-Sogo, B., Pineda, B. ve Moreno, V. (2010). Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(1), 107-112.
- Chen, M. (2007). Study on in vitro rapid propagation of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 32. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHNY200732072.htm.
- Cheng, J. (2010). Research on in vitro rapid propagation of inflorescence of double-type *Kalanchoe blossfeldiana*. *Northern Horticulture*, 2. Erişim adresi:(23.04.2018):[http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALBFYY201002069](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALBFYY201002069.htm) .htm.CPVO varieties database (2017) <http://cpvo.europa.eu>. Accessed 12.04.2017.

- Currey, C. J. ve Erwin, J. E. (2011). Photoperiodic flower induction of several *Kalanchoe* species and ornamental characteristics of the flowering species. *HortScience*, 46(1), 35-39.
- CPVO varieties database (2017). <http://cpvo.europa.eu>. Erişim 12.04.2017.
- Cui, R., Chen, C., Tian, L. ve Wang, G. (2003). Studies on Tissue Culture and Artificial Seeds of *Kalanchoe bossfeldiana*. *Journal of Beijing Agricultural College*, 4.
- Çelem, H. ve Arslan, M. (1995). İç Mekân Bitkileri. Tagey Yayıncılık, Ankara.
- Debergh, P. (1994). In vitro culture of ornamentals. In *Plant cell and tissue culture* (pp. 561-573). Springer, Dordrecht
- Deng, Q. Zhang, Y. ve Wang, C. (2005). Study on in vitro propagation of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, Vol.2.
- Descoings, B. (2006). Le genre *Kalanchoe* structure et définition. *Journal de Botanique de la Société Botanique de France*, 33, 3-28.
- Dijkstra, K., Pieterse, M.E. ve Pruyn, A. (2008). Stress-Reducing Effects Of Indoor Plants In The Built Healthcare Environment: The Mediating Role Of Perceived Attractiveness. *Preventive Medicine* 47: 279–283.
- Duan, J. X., Duan, Q. X., Zhang, S. F., Cao, Y. M., Yang, C. D., ve Cai, X. D. (2020). Morphological, physiological, anatomical and histochemical responses of micropropagated plants of *Trichosanthes kirilowii* to hydroponic and soil conditions during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(1), 177-186.
- Everett, TH. (1981). *Kalanchoe*. The New York Botanical Garden illustrated encyclopedia of horticulture, vol. 6. Garland, New York, pp 1884–1889.
- Eveleens-Clark, B., Carvalho, S. M. P. ve Heuvelink, E. (2003). A conceptual dynamic model for external quality in *Kalanchoe*. In *International Workshop on Models for Plant Growth and Control of Product Quality in Horticultural Production* 654 (pp. 263-270).
- Fira, A., Clapa, D. ve Rakosy-Tican, E. (2011). In vitro Propagation of the Thornless Blackberry Cultivar 'Loch Ness'. *Bulletin UASVM Horticulture*, 68(1), 39-46.
- Frello, S., Venerus, E. ve Serek, M. (2002). Regeneration of various species of Crassulaceae, with special reference to *Kalanchoë*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(2), 204–208. doi:10.1080/14620316.2002.11511480.
- Gautheret, R.J. (1959). *La culture des tissus vegetaux*. Masson et Cie, Edit. Paris.
- Gonzalez de Leon, S., Herrera, I. ve Guevara, R. (2016). Mating system, population growth, and management scenario for *Kalanchoe pinnata* in an invaded seasonally dry tropical forest. *Ecology and Evolution*, 6(13), 4541-4550.

- Güçlü, K. (1999). İç Mekân Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No:148. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum.
- Gümüş C. ve Ellialtıoğlu Ş. Ş. (2018). *Kalanchoe Blossfeldiana* Poelln. Türünde Yapılan Doku Kültürü Araştırmaları Üzerinde Bir İnceleme. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11 (1): 18-26.
- Gürel, S. , Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M.A. (2001). Doku Kültürü Temel Laboratuvar Teknikleri. M. Babaoğlu, E. Özcan (Ed.), Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü Uygulamaları içinde (s.1-35). Konya: S.Ü. Vakfı Yayınları.
- Hekimoğlu, B. ve Altindeğer, M. (2012)._Süs Bitkileri Sektör Raporu. Samsun Valiliği Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü Erişim adresi: http://samsuntarim.gov.tr/yayinlar/tarimsal_strateji/tarimsal_strateji_pdf/ Süs Bitkileri Endüstrisi Sektör Raporu (01.05.2018).
- Hepaksoy, S. ve Aksoy, U. (2006). Propagation of *Ficus carica* L. clones by *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 50(3), 433-436.
- Herwig R. (1984). The Hamlyn encyclopedia of house plants: kalanchoe. Hamlyn, London, pp 188–189.
- Huang, H., Baoyin, L. ve Ping, L. (2004). Several factors influencing *in vitro* culture and plantlet regeneration of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZNTB200402004.htm.
- Huetteman, C.A. ve Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33: 105-119.
- Ioannou, M. ve Ioannou, N. (1992). Micropropagation of *K. blossfeldiana* Poelln. from leaf blade segments. *Miscellaneous Reports, Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resources, Nicosia* 53.
- Izumikawa, Y., Nakamura, I. ve Mii, M. (2007). Interspecific Hybridization between *Kalanchoe blossfeldiana* and Several Wild *Kalanchoe* Species with Ornamental Value. *ISHS Acta Horticulturae* 743: XXII. International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Breeding For Beauty - Part II.3-6 July 2001, Melle, Belgium.
- Kahraman, M.U. ve Boyacı, H.F. (2021). Kalancho. in: Süs Bitkileri Islahı Cilt II: Türler. Kazaz S, Yalçın Mendi Y (Eds.). Bölüm 6, s: 241-284.
- Kaviani, B., Hashemabadi, D. ve Kordi, M. (2014). The effect of different concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Kalanchoe blossfeldiana* cv. White. *Journal of Ornamental Plants*, 4(2), 101-106.
- Kazaz, S., Kılıç, T., Doğan, E., Karagüzel, Ö. ve Mendi, Y.Y. (2020). Süs bitkileri üretiminde mevcut durum ve gelecek. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat

Mühendisliği IX. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı-1: 673-698. 13-17 Ocak 2020, Ankara.

- Kelkit, A. ve Bulut, Y. (1998). Seralarda Süs Bitkileri Yetiştiriciliğinde Jeotermal Enerjinin Önemi. Çevre Koruma ve Araştırma Vakfı, 8(29), 21-24.
- Khan, S., Naz, S., Ali, K. ve Zaidi, S. (2006). Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot tip. *Pakistan Journal of Botany*, 38(4), 977-981.
- Khoury, N. ve White, J. W. (1980). Juvenility and response time of *Kalanchoe* cultivars. *Journal American Society for Horticultural Science*, 105, 724-726.
- Kordi, M., Kaviani, B. ve Hashemabadi, D. (2013). In vitro propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 285-288.
- Korpela, K., De Bloom, J., Sianoja, M., Pasanen, T. ve Kinnunen, U. (2017). Nature At Home And At Work: Naturally Good? Links Between Windowviews, Indoor Plants, Outdoor Activities And Employee Well-Being Overone Year. *Landscape and Urban Planning*, 160:38-47.
- Kumar, N. ve Reddy, M. P. (2011). In vitro plant propagation: a review. *Journal of forest and environmental science*, 27(2), 61-72.
- Küçükahmetler, Ö., Şeniz, V., Zencirkıran, M. (2002). Afrika Menekşesinin (*Saintpaulia ionantha* L.) Doku Kültürü ile Üretiminde Bazı Büyüme Düzenleyicilerin Verim ve Kaliteye Etkisi. (Poster). II. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, Antalya. Bildiriler Kitabı, 264-270.
- Liang, H. 2013. Research on Rapid Propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* in vitro. *Modern Agricultural Science and Technology*, Vol.16.
- Lin, X., Lai, Z., Huang, S., Wu, J., Huang, Y., Huang, X. ve Ke, C. (2005). Study on in vitro culture and micropropagation from the stem sections and the leaves of *Kalanchoe blossfeldiana* with red flower. *Sugarcane*, 2. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-GZZZ200502001.htm.
- Linjian, F., Dongpo, J., and Xinshuan, Z. (2006). Research of different culture conditions on plantlet regeneration from leaves of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 5. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZNTB200605021.htm.
- Liu, H. (2010). High propagation and tissue culture system and outside-tube rooting technology of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 12. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHNY201012018.htm.
- Love, J.W. (1980). *Kalanchoe*. In: Larson RA (ed) *Introduction to floriculture*. Academic Press, New York, pp 409-434.

- Luo Y. et al. (2009). Study on rapid propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* and flowering of its plantlet. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 6. Erişim adresi (23.04.2018) http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHNY200906023.htm.
- Martin, T. (1986). Flowers and Foliage Accent The Sturdy *Kalanchoes*. The New York Times, 28.
- Mackenzie, K. K. Cui, J., Eeckhaut, T., Müller, R. ve Lütken, H. (2019). Protoplast isolation and culture from *Kalanchoë* species: optimization of plant growth regulator concentration for efficient callus production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 138(2), 287-297.
- Mercier, LN. ve Roggemans J. (1985). Micropropagation trials with some *K. blossfeldiana* Poelln. cultivars. Bulletin de la Societe Royale de Botanique de Belgique 118: 198–204.
- Moc, M.C., D.W.S. Moc, J.E. Turner ve Mujer, C.V. (1987). Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. HortScience 22: 1194-1197.
- Mortensen, L.M. (2014). The effect of wide-range photosynthetic active radiations on photosynthesis, growth and flowering of Rosa sp. and Kalanchoe blossfeldiana. Am J Plant Sci 5:1489–1498.
- Morton, J.F. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America. Charles C Thomas, Springfield Illinois, USA, pp 258–260.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) Physiol. Plant. 15: 473–497.
- Murthy, B.N.S, Murch ,S.J, Saxena ,P.K (1998). Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 34:267-275 <https://doi.org/10.1007/BF02822732>
- Nieves, M. C., Aspuria, E. T., Bernardo, E. C.ve Tayangona, M.A.D. (2016). Growth responses of in vitro-derived nodal sections of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellnitz as influenced by benzylaminopurine, thidiazuron and paclobutrazol. Asia life sciences, 25(1), 207-220.
- Oral, N. (1999). İç Mekan Süs Bitkileri. Ezgi Kitabevi, 374 s.
- Özzambak, E. (2015). Süs Bitkilerinin Doku Kültürü ile Çoğaltımı. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, (14)
- Pierik, R.L.M. (1997). In vitro culture of higher plants. Springer science & business media.
- Peng, C., Wang, L., Li, K., Xia, L.ve Lu, F. (2008). Research on tissue culture and plantlet reproduction from leafstalk of *Kalanchoe blossfeldiana* with orange flower. Tropical Agricultural Science & Technology, 01. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YNRJ200801012.htm.

- Penghui, D. ve Xingze, L. (2010). Study on the callus induction and plantlet regeneration from the leaves of *Kalanchoe blossfeldiana*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1. Erişim adresi: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZNTB201001039.htm. (23.04.2018).
- Ranaas, R.K., Horgen Evensen, K., Rich, D. Sjøstrøm, G. ve Patil, G. (2011). Benefits Of Indoor Plants On Attention Capacity In An Office Setting. Journal of Environmental Psychology 31: 99-105.
- Royal FloraHolland, (2021). Annual Report.
- Sanikhani, M., Frello, S. ve Serek, M. (2006). TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85(1), 75–82. doi:10.1007/s11240-005-9050-6.
- Sezen, I., Aytatlı, B., Ağrılı, R.A, ve Patan, E. (2017). İç Mekân Tasarımında Bitki Kullanımının Birey Ve Mekân Üzerine Etkileri. *Ata Planlama Ve Tasarım Dergisi*, 1(1): 25-34.
- Schneider, M., Moldrickx, R. ve Horn, W.(1985). In vitro propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* hybrids, callus and suspension cultures. Gartenbauwissenschaft 50: 9–13
- Schwabe, W.W. (1969). *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. In: Evans LT (ed) The induction of flowering. Macmillan, Melbourne, Australia, pp 227–246.
- Sharma, G.K. (1970). Effects of cool nights on flowering of *Kalanchoe fedtschenkoi*. Trans Missouri Acad Science, 3, 22–28.
- Smith, G. F., Figueiredo, E. ve Van Wyk, A. E. (2019). *Kalanchoe* (Crassulaceae) in Southern Africa: classification, biology, and cultivation. Academic Press.
- Street, H. E. (1973). Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Sci. Publ. Oxford.
- Tang, J. (2007). Study on tissue culture and rapid propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* Leaves. Northern Horticulture 10.
- Uludağ, A. ve Ertürk, Y.E. (2012). İthal Ev Hayvanları ve Süs Bitkilerinin Çevreye Etkileri. Tarih, Kültür ve Sanat Araştırmaları Dergisi, Tüketim Toplumu ve Çevre Özel Sayısı, I (4), ISSN: 2147-06261, DOI: 10. 7596/taksad.v1i4, Karabük Üniversitesi.
- URL-1, (2018). <https://aggie-horticulture.tamu.edu/floriculture/hort429/Lecture /kalanchoe.pdf>. Erişim Tarihi: 11.03.2018.
- URL-2, (2018) Queen Ürün Katalogu. Erişim Adresi (20.12.2018): <https://queenflowers.dk/tr/ueruenler>
- Van Voorst, A ve Arends J.C. (1982). The origin and chromosome number of cultivars of *Kalanchoe blossfeldiana*. Euphytica 31:573–584.
- Varga, A., Thoma, L. H. ve Bruinsma, J. (1988). Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 15(3), 223-231.

- Xinzheng, S., Qingwei, L., Mingquing, M. (2006). Research on the Technology of *Kalanchoe blossfeldiana* with White Flower Tissue Culture and Rapid Reproduction. Chinese Agricultural Science Bulletin, 3. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZNTB200603010.htm.
- Yuliang, C., Xiaogang, Z. ve ZhangYanping, Z.Z. (2004). Isolation leaf disks culture and high efficient plantlet regeneration of *Kalanchoe Blossfeldianna*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 20(5), 33.
- Yusnita, S., Geneve, R.L., Kester, S.L. (1990) Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.). J. Environ. Hort. 8:177-179.
- Zhang, Y. S., Gu, S. J., Chen, J. J., & Cai, X. D. (2019). Effects of different nutrient solutions on the acclimatization of in vitro *Caladium* plantlets using a simplified hydroponic system. Sains Malays, 48, 1627-1633.
- Zencirkıran, M. (1998). Türkiye Florasında Bulunan Bazı nemli Soğanlı Ss Bitkilerinde oğaltım Yntemleri zerine Araştırmalar. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahęe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi. Bursa.113 s.
- Zencirkıran, M., Grbz, İ.B. (2009).Turkish Ornamental Plants Sector in the European Union Screening Process. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol. 17/(2) : 235-250.
- Zencirkıran, M., elik,B.H., Mdk, B., Görür, A., etiner, S., Eraslan,E., Tanrıverdi, O. (2018). İç Mekan Tasarım Bitkilerinin Kullanıcılar İçin Toksik zellikler Bakımından Değerlendirilmesi. J.of Bartın Faculty of Forestry. 20(1):26-31.
- Zhang, R. ve Guo, X. (2005). Study on Regeneration of Vitro Leaf of *Kalanchoe blossfeldiana*. Shanxi Forestry Science and Technology, 01. Erişim adresi (23.04.2018): http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SXLK200501003.htm.

ÖZGEÇMİŞ

