

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LISIANTHUS [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv. 'MARIACHI PURE  
WHITE (F<sub>1</sub>)'] SÜS BİTKİSİNİN ORGANOGENEZ İLE  
MİKROÇOĞALTIMI**

**HÜMEYRA ÖZKAN**

**KOCAELİ 2017**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LISIANTHUS [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv.  
'MARIACHI PURE WHITE (F<sub>1</sub>)'] SÜS BİTKİSİNİN  
ORGANOGENEZ İLE MİKROÇOĞALTIMI**

**HÜMEYRA ÖZKAN**

**Prof.Dr. Fazıl ÖZEN**  
Danışman, Kocaeli Üniv.

**Doç.Dr. Özlem AKSOY**  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

**Doç.Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE**  
Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniv.



**Tezin Savunulduğu Tarih: 03.07.2017**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Kesme çiçek endüstrisi, genel olarak dünya çapında avantajlı iklim ve coğrafi koşullara sahip olan ülkelere ekonomik anlamda kalkınma sağlayan uluslararası bir sektördür. Aynı zamanda birim alandan fazla sayıda ürün elde edilmesi, sektörel olarak istihdam alanına katkı sağlaması ve geniş yelpazeli ihracat yapısına olanak vermesinden dolayı, birçok ülke bugün gelişen teknoloji sayesinde doku kültürü laboratuvarlarına yatırım yaparak kesme çiçek olarak kullanılan türler üzerinde ürün geliştirme ve ıslah çalışmaları yapmaktadır. Bu çalışma, Türkiye ve dünya genelinde kesme çiçek ihracat listesinde ilk onda yer alan *Lisianthus* süs bitkisinin ‘Mariachi Pure White’ kültivarının *in vitro* ortamda farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak organogenez ile mikroçoğaltımı konusunda literatüre yeni bulgular sunacaktır.

Laboratuvarda çalışmaya başladığım ilk günden itibaren bana inanan ve güvenen, her konuda bana destek veren, keyifli bir çalışma ortamı sağlayan, bilgi donanımı ve fikirleri ile tez çalışmama ışık tutan, bilimsel konular üzerindeki ilgi ve merakıma kayıtsızca saygı duyan ve beni kaliteli fikirler ve ürünler üretebilmem konusunda cesaretlendiren, ufkumu açan yenilikler ile beni başarıya doğru yönlendiren, tez serüvenim boyunca birlikte emek verdiğimiz her çalışmamızda bana “Profesyonellik” kelimesinin anlamını idrak ettiren ve akademik alanda beni bugünlere hazırlayan, lisans üstü yolculuğumda her zaman bana varlığını hissettiren, bu yolculuğumu onunla tamamlama şansını bana lütfeden ve beni onurlandıran değerli bölüm başkanım ve kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fazıl ÖZEN’e;

Tez serüvenim boyunca, sahip olduğu bilgi donanımı ile gerek teorik, gerekse de uygulama anlamında benden yardımlarını esirgemeyen, emek verilerek başarı merdivenlerini nasıl tırmanabileceğimi ve bu yolculuğumda karşılaştığım engelleri nasıl aşabileceğim konusunda bana önderlik eden, “Mükemmeliyetçilik” kelimesinin anlamını fazlasıyla yüklediğim ve bu konuda kendime örnek aldığım değerli hocam Arş. Gör. Arda ACEMİ’ye;

Tanıdığım günden itibaren desteklerini benden esirgemeyen kıymetli dostlarım Zeynep Merve HANDERE, Gözde BUDAK, Maaz KESERCİ, Melis KARATAŞ, Buse ÇÖKMEZ, Halil TOYGAR ve Ezgi Gizem PELİN ile diğer tüm değerli dostlarım ve çalışma arkadaşlarıma;

Son olarak, kelimelerle ifade edemeyeceğim kadar minnet duyduğum ve bugünlere erişebilmem adına her türlü fedakarlığı gösteren başta ağabeyim Sinan ÖZKAN olmak üzere, kıymetli annem ve babama ve sevgili eniştem Osman BEŞİNCİ’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran - 2017

Hümeyra ÖZKAN

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
GİRİŞ .....	1
1. GENEL BİLGİLER .....	7
1.1. Bitkinin Genel Özellikleri .....	7
1.2. Süs Bitkileri Endüstrisi.....	16
1.2.1. Kesme çiçek üretiminin dünya genelindeki durumu.....	17
1.2.2. Kesme çiçek üretiminin Türkiye genelindeki durumu.....	19
1.3. Bitki Doku Kültürü.....	24
1.3.1. Bitki doku kültürünün tarihçesi.....	25
1.3.2. Bitki doku kültürünün uygulama alanları.....	30
1.3.3. Ticari süs bitkilerinin seri üretiminde doku kültürünün önemi.....	32
1.3.4. Bitki doku kültürünün avantaj ve dezavantajları.....	33
1.3.5. Bitki doku kültürü teknikleri .....	35
1.3.5.1. Organogenez metodu .....	39
1.3.5.2. Organogenezin gelişim evreleri .....	41
1.3.5.3. Organogeneze etki eden faktörler .....	42
1.4. Somaklonal Varyasyon.....	46
1.5. <i>Eustoma</i> Cinsine Ait Doku Kültürü Çalışmaları .....	47
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	54
2.1. Bitki Materyali .....	54
2.2. Yöntem .....	54
2.3. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar .....	54
2.4. DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar .....	55
2.5. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması .....	55
2.6. <i>In vitro</i> Besi Ortamı ve Bileşenleri.....	56
2.7. <i>In vitro</i> DeneYlerde Kullanılan Besi Ortamları .....	57
2.8. Besi Ortamlarının Hazırlanması .....	59
2.8.1. Malzemelerin ve besi ortamlarının sterilizasyonu .....	59
2.8.2. Besi ortamlarının petri ve magenta kaplarına aktarılması.....	60
2.9. Besi Ortamları Üzerinde Yapılan İnokülasyon İşlemleri.....	60
2.9.1. Tohum dezenfeksiyonu ve <i>in vitro</i> çimlendirme.....	60
2.9.2. Çimlenen tohumlardan oluşan sürgünlerin uzaması .....	61
2.9.3. Yetişkin bitkiciklerden yaprak eksplantları ve nodal segmentlerin alınması.....	61
2.9.4. Direkt organogenez .....	62
2.9.5. İndirekt organogenez.....	62
2.9.5.1. Kallogenez.....	62

2.9.5.2. Stok kallus kültürlerinin oluşturulması .....	63
2.9.5.3. Oluşan kallus formlarından bitkiciklerin rejenerasyonu .....	63
2.9.5.4. Milimetrik sürgünlerin <i>in vitro</i> gelişimi.....	63
2.9.6. Kültür kabınınin iklimlendirmesi .....	64
2.10. Deneylerde Kullanılan Eksplant Tipleri Üzerinde Yapılan Ölçümler .....	64
2.11. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	65
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	66
3.1. Farklı GA <sub>3</sub> Konsantrasyonlarının <i>in vitro</i> Çimlendirme Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular .....	66
3.2. Çimlenen Tohumlardan Oluşan Sürgünlerin Uzamasına Ait Bulgular .....	67
3.3. Direkt Organogeneze Ait Bulgular.....	72
3.4. İndirekt Organogeneze Ait Bulgular .....	82
3.4.1. 2,4-D ve NAA ile desteklenen ortamların kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular.....	82
3.4.2. Kallustan adventif sürgün oluşumuna ait bulgular.....	86
3.4.3. Milimetrik sürgüncüklerin <i>in vitro</i> gelişimine ait bulgular .....	93
3.5. Stok kallus kültürlerine ait bulgular .....	98
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	100
KAYNAKLAR .....	105
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER .....	116
ÖZGEÇMİŞ .....	117

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1.	Lisianthus'un Amerika kıtasındaki doğal yayılım haritası.....	7
Şekil 1. 2.	Lisianthus süs bitkisi. A: Bitkinin doğal habitatındaki genel görünümü. B: Yeni açan çiçekte anter ve stigmanın yapısı. C: Bukleli-sarmal yapıdaki çiçek tomurcuklarında petallerin gelişimi .....	12
Şekil 1. 3.	Lisianthus'un bazı kültür çeşitleri (URL-13). A: 'Mariachi Pure White'. B: 'Pink'. C: 'Pink Picotee'. D: 'Blue'. E: 'Rose Pink'. F: 'Blue Picotee' .....	15
Şekil 1. 4.	Lisianthus tohumunun taramalı elektron mikroskopunda çekilen fotoğrafı.....	16
Şekil 1. 5.	Dünya süs bitkileri endüstrisinde üretimi yapılan ürün kategorilerinin sektör içerisindeki yüzdeleri dağılımları.....	18
Şekil 1. 6.	Antalya'nın akseki ilçesinde yetiştirilen Lisianthus kültürlerinin bulunduğu seradan genel bir görünüm. A: 'Mariachi Pure White'. B: 'Blue Picotee'. C: 'Echo Blue' .....	23
Şekil 1. 7.	Bitki doku kültürünün temel ve uygulamalı bilimlerdeki uygulamaları .....	31
Şekil 1. 8.	Doku kültüründe üç farklı metod ile bitkicik oluşumunun genel şeması.....	37
Şekil 1. 9.	Doku kültüründe kullanılan mikroçoğaltım çeşitleri.....	38
Şekil 1. 10.	Organogenez metodu ile bitkilerin mikroçoğaltım aşamaları. A: Direkt organogenez. B: Kallus oluşumu ile indirekt organogenez. C: Süspansiyon hücre kültürü aracılığı ile indirekt organogenez .....	40
Şekil 1. 11.	Organogenezde sürgün oluşumunda meydana gelen hücresel olaylar .....	41
Şekil 2. 1.	Lisianthus 'Mariachi Pure White' kültürünün tohumları. A: Fungusit kaplamalı tohumların genel görünümü. B: İnoküle edilen tohumların MS1 besi ortamındaki görünümü.....	61
Şekil 3. 1.	Tohum inokülasyonundan 11 gün sonra çimlenen bitkiciklerde bifoliat yaprak görünümü .....	66
Şekil 3. 2.	Bitkiciklerin 80 günlük inkübasyon sonrası görünümü. A: Kontrol grubu (MS1), B: 0,5 mg/l GA <sub>3</sub> (MS2), C: 1,0 mg/l GA <sub>3</sub> (MS3), D: 2,0 mg/l GA <sub>3</sub> (MS4), E: 4,0 mg/l GA <sub>3</sub> (MS5).....	67
Şekil 3. 3.	80 günlük inkübasyon sonrası bitkiciklerin köklenme durumu. A: Kontrol grubu (MS1), B: 0,5 mg/l GA <sub>3</sub> (MS2), C:	

	1,0 mg/l GA <sub>3</sub> (MS3), D: 2,0 mg/l GA <sub>3</sub> (MS4), E: 4,0 mg/l GA <sub>3</sub> (MS5).....	68
Şekil 3. 4.	GA <sub>3</sub> ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin 30 günlük inkübasyon sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm).....	69
Şekil 3. 5.	80 günlük inkübasyon periyodu sonrası MS5 besi ortamında ve bitkiciklerde görülen anormallikler. A: Yaprak ucu yanıklığı. B: Besi ortamında kararma.....	70
Şekil 3. 6.	GA <sub>3</sub> ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin 80 günlük inkübasyon sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm).....	71
Şekil 3. 7.	BAP ile desteklenen ortamlarda bitkiciklerin yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular A: Kalp şeklinde yaprak morfolojisi, yaprak kenarlarında sararma ve kök kısmında kallus oluşumu (MS7). B: Birleşik yapraklılık (MS6). ....	73
Şekil 3. 8.	BAP ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm).....	74
Şekil 3. 9.	Kin ile desteklenen ortamlarda bulunan eksplantların yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular. A: Kin içermeyen MS1 besi ortamı, B: V şeklinde yaprak anormalitesi (MS11), C-D: Huni şeklinde yaprak oluşumu (MS13), E: Yaprak üzerinde nekrotik lekelenme (MS12), F: Normal ve anormal yaprak örneği (MS12) .....	75
Şekil 3. 10.	Kin ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm).....	76
Şekil 3. 11.	ZEA ile desteklenen ortamlarda bulunan eksplantların yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular. A: Birleşik yaprak morfolojisi (MS19), B: Aynı yaprak üzerinde iki adet yaprak ucu oluşumu (MS21), C: Yaprak kenarında V şeklinde girinti oluşumu (MS18).....	77
Şekil 3. 12.	ZEA ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün	

	sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm).....	78
Şekil 3. 13.	TDZ ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolojik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm).....	79
Şekil 3. 14.	TDZ ile desteklenen ortamlarda bulunan eksplantların yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular. A: V şeklinde yaprak oluşumu (MS17), B: Birleşik yaprak oluşumu (MS14), C: Yaprak kenarında V şeklinde girinti oluşumu (MS16), D: Yaprak ucunda vitrifikasyon başlangıcı (MS15), E: Birleşik yaprak görünümü (MS17), F: Yaprak ucunda deformasyon oluşumu (MS15), G: MS15 besi ortamındaki normal bir yaprak ile rejenerasyonu tamamlanmamış yaprak görünümü, H: MS16 besi ortamındaki normal bir yaprak ile kalp şeklinde oluşan yaprak görünümü.....	80
Şekil 3. 15.	2,4-D içeren besi ortamlarının kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular. A: MS22, B: MS23, C: MS24, D: MS25 .....	83
Şekil 3. 16.	Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besi ortamlarının kallogenez üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A: Kallus oluşum yüzdesi (%), B: Ortalama kallus taze ağırlığı (g) .....	84
Şekil 3.17.	Farklı konsantrasyonlarda NAA içeren besi ortamlarının kallogenez üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A: Kallus oluşum yüzdesi (%), B: Ortalama kallus taze ağırlığı (g) .....	84
Şekil 3.18.	NAA içeren besi ortamlarının kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular. A: MS26, B: MS27, C: MS28, D-E-F: MS29 .....	85
Şekil 3.19.	Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A: Ortalama sürgün sayısı (adet), B: Ortalama sürgün uzunluğu (cm).....	86
Şekil 3. 20.	Farklı konsantrasyonlarda BAP ile desteklenen besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki morfolojik etkileri. A: MS31, B: MS30, C: MS32, D: MS33, E-F: MS32 .....	87
Şekil 3.21.	Farklı konsantrasyonlarda Kin içeren besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği .....	88
Şekil 3.22.	Farklı konsantrasyonlarda Kin ile desteklenen besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki	



	morfolojik etkileri. A: MS34, B: MS35, C: MS36, D-E: MS37 .....	89
Şekil 3. 23.	KIN + IAA ve KIN + IBA içeren besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A-B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C-D: Ortalama sürgün uzunluğu (cm).....	90
Şekil 3.24.	Kin + IAA kombinasyonlarının adventif sürgüncükler üzerindeki morfolojik etkilerine ait bulgular. A: MS38, B: MS39, C: MS40, D-E-F: MS41.....	91
Şekil 3.25.	Kin + IBA kombinasyonlarının adventif sürgüncükler üzerindeki morfolojik etkilerine ait bulgular. A-B: MS42, C-D: MS43, E: MS45, F:MS44.....	92
Şekil 3. 26.	BAP + GA <sub>3</sub> ile desteklenen besi ortamlarının milimetrik sürgüncüklerin morfometrik parametreleri üzerindeki etkilerine ait bulgular.....	95
Şekil 3. 27.	Kin + IAA ve Kin + IBA ile desteklenen besi ortamlarından elde edilen milimetrik sürgünlerin inkübasyon öncesi morfolojilerine ait bulgular. A-B-C: MS38, D-E: MS39, F: MS41. ....	96
Şekil 3. 28.	BAP + GA <sub>3</sub> kombinasyonu ile desteklenen besi ortamlarından elde edilen milimetrik sürgünlerin morfolojilerine ait bulgular. A: MS1, B-C-D-E: MS46, F: MS48, G-H-I: MS49.....	97
Şekil 3. 29.	2,4-D ve NAA ile desteklenen ortamlarda alt kültüre alınan kalluslarda nekrotik lekelenmeler ve vitrifikasyon oluşumlarına ait bulgular. A-B-C-F-G-H-I: MS23, D-E-İ: MS27 .....	99

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. 1.	Lisianthus'un karakteristik özellikleri.....	8
Tablo 1. 2.	Lisianthus'un sistematik hiyerarşisi .....	10
Tablo 1. 3.	<i>Eustoma</i> cinsinin teşhis anahtarı .....	10
Tablo 1. 4.	Lisianthus'un sinonim geçmişi.....	10
Tablo 1. 5.	Meksika'nın yıllık iklim tablosu .....	13
Tablo 1. 6.	Avrupa süs bitkileri endüstrisinde en fazla tercih edilen kesme çiçekler .....	19
Tablo 1. 7.	Türkiye'de 2016 yılında üretimi yapılan kesme çiçekler .....	21
Tablo 1. 8.	2016 yılında Türkiye'de Lisianthus üretimi yapılan iller.....	22
Tablo 1. 9.	Bitki doku kültürünün tarihsel gelişimine katkı sağlayan araştırmacılar ve keşifleri .....	26
Tablo 1. 10.	Eksplantların yüzey sterilizasyonunda yaygın olarak kullanılan sterilizasyon malzemeleri .....	42
Tablo 1. 11.	Bitki büyüme düzenleyicileri .....	43
Tablo 2. 1.	Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi.....	55
Tablo 2. 2.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin çözücüleri.....	56
Tablo 2. 3.	MS besi ortamının bileşenleri ve konsantrasyonları .....	56
Tablo 2. 4.	Deneylerde kullanılan besi ortamları.....	57
Tablo 3. 1.	30 günlük inkübasyon periyodu sonrası GA <sub>3</sub> içeren MS besi ortamındaki bitkiciklere ait bulgular .....	68
Tablo 3. 2.	80 günlük inkübasyon periyodu sonrası GA <sub>3</sub> içeren MS besi ortamındaki bitkiciklere ait bulgular .....	70
Tablo 3. 3.	Farklı konsantrasyonlardaki sitokininlerin direkt sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerine ait bulgular .....	81
Tablo 3. 4.	Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve NAA hormonlarının kallogeniz üzerindeki etkilerine ait bulgular .....	83
Tablo 3. 5.	BAP, Kin, Kin + IAA ve Kin + IBA ile desteklenen besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerine ait bulgular.....	93
Tablo 3. 6.	BAP + GA <sub>3</sub> ile desteklenen besi ortamlarının milimetrik sürgünlerin <i>in vitro</i> gelişimi üzerindeki etkilerine ait bulgular .....	94

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

g	: Gram
kg/cm <sup>2</sup>	: Kilogram-kuvvet/santimetrekare
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre

### Kısaltmalar

BAP	: 6-Benzilaminopürin
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
EtOH	: Etil Alkol
GA <sub>3</sub>	: Giberellik Asit
HCl	: Hidrojen Klorür
IAA	: İndol-3-Asetik Asit
IBA	: İndol-3-Bütirik Asit
Kin	: Kinetin
MS	: Murashige ve Skoog Besiyeri
NAA	: 1-Naftalenasetik Asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
TDZ	: Thidiazuron
ZEA	: Zeatin
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit
2-İP	: 2-İzopentenil Adenin

## LISIANTHUS [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv. 'MARIACHI PURE WHITE (F<sub>1</sub>)'] SÜS BİTKİSİNİN ORGANOGENEZ İLE MİKROÇOĞALTIMI

### ÖZET

Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] Gentianaceae familyasının bir üyesi olan, genellikle annual formda bilinen, Türkiye ve dünya çapındaki kesme çiçek endüstrisinde ticari olarak önem taşıyan, son yıllarda çiçek mezatlarında ilk on listesinde yer alan, estetik görünümüne sahip kültürvarları ve çok çeşitli renk yelpazesine sahip çiçekleri ile ilgi gören bir süs bitkisidir. Bu çalışmada, Türkiye'de sera ortamlarında geleneksel yöntemler ile üretimi yapılan Lisianthus'un 'Mariachi Pure White' kültürvarı üzerinde, *in vitro* ortamda farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak organogenez ile mikroçoğaltımı çalışıldı. Direkt organogenez deneyinde maksimum yaprak sayısı 0,5 mg/l 6-Benzilaminopürin (BAP) ortamında 10,77 olarak ölçüldü. En yüksek proliferasyon oranı %100 olarak tüm Kinetin (Kin) konsantrasyonlarında gözlemlendi. Kallogenez aşamasında kallus başına maksimum taze ağırlık oranı 0,609 g olarak 2,0 mg/l 1-Naftalenasetik asit (NAA) ortamında ölçüldü. Adventif sürgün rejenerasyonunda maksimum sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 1,0 mg/l Kin ortamında sırasıyla 3,30 ve 0,94 cm olarak ölçüldü. Sürgüncüklerin *in vitro* gelişiminde maksimum sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu 1,0 mg/l BAP ve 4,0 mg/l Giberellik asit (GA<sub>3</sub>) kombinasyonundan sırasıyla 1,13 ve 2,22 mm olarak elde edildi. Kültürvarın genetik kararsızlığı ve düşük rejenerasyon yeteneğinden dolayı, organogenez metodu seçilen kültürvarın mikroçoğaltımı üzerinde verimli olamayabilir. Ancak, yapraklarındaki geniş yelpazeli somaklonal varyasyonlardan dolayı kesme çiçek endüstrisinde yeni çeşitlerin geliştirilmesi açısından değerlendirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki Büyüme Düzenleyicileri, *In vitro*, Lisianthus, Mariachi Pure White, Organogenez.

## MICROPROPAGATION OF LISIANTHUS [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv. 'MARIACHI PURE WHITE (F<sub>1</sub>)'] ORNAMENTAL PLANT VIA ORGANOGENESIS

### ABSTRACT

Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] is a member of Gentianaceae family, generally known as annual form, has a place in as commercial in cut flower industry in Turkey and world-wide, ranks among in the top ten in flower auctions in recent years, is an ornamental plant that attracts attention to cultivars with aesthetic appearance and has a wide variety of flower colours. In the present study, micropropagation via organogenesis was studied *in vitro* using plant growth regulators at different concentrations on 'Mariachi Pure White' cultivar of Lisianthus that is produced via conventional techniques in greenhouse environments in Turkey. The maximum leaf number was measured in 0,5 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP) medium as 10,77 in the experiment of direct organogenesis. The highest proliferation rate was observed as 100% all Kinetin (Kin) concentrations. Maximum rate of fresh weight per callus was measured as 0,609 g in 2,0 mg/l 1-Naphtaleneacetic acid (NAA) medium in callogenesis phase. Maximum shoot number and shoot length were obtained from 1,0 mg/l Kin as 3,30 and 0,94 cm, respectively in adventitious shoot regeneration. Maximum shoot number and shoot length were obtained from combination of 1,0 mg/l BAP and 4,0 mg/l Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) as 1,13 and 2,22 mm, respectively for *in vitro* development of shootlets. Organogenesis method may not be productive on micropropagation of selected cultivar owing to genetic instability of cultivar and lower regeneration ability. But, it may be utilized for improving the new varieties in cut flower industry due to large spectrum of somaclonal variations on leaves.

**Keywords:** Plant Growth Regulators, *In vitro*, Lisianthus, Mariachi Pure White, Organogenesis.

## GİRİŞ

Bitki biyoteknolojisi, hayvansal biyoteknoloji, farmasötik biyoteknoloji ve nanoteknoloji literatürde biyoteknolojiyi oluşturan alt bilim dalları olarak yer almaktadır. Bitki biliminde, özellikle moleküler biyoloji alanında gerçekleştirilen sıra dışı bilimsel çalışmaların literatüre sunulması ile bitki biyoteknolojisi her geçen gün zenginleşmeye devam eden bir alt bilim dalı haline gelmiştir. Bitki biyoteknolojisindeki yeni alternatif arayışları, geleneksel biyoteknolojinin arz ve talepleri yeterli derecede karşılayamadığını açık bir biçimde ortaya koymaktadır. Bitki biyoteknolojisi, temelde sistematik botanik ve organik kimya olmak üzere birçok bilimsel araştırma dalı ile uyumlu olarak multidisipliner araştırma alanlarından birini temsil etmektedir. Birçok bitki familyasının evrimsel anlamda farklılaşmasını, sistematik hiyerarşisini ve kimyasal doğasını temel alarak, literatüre kazandırılan bitki türlerinin kemotaksonomisinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda disiplinler arası bir alt bilim dalı olan bitki biyoteknolojisi, bitkilerin moleküler filogenisinden ve metabolik profillerinden faydalanarak bitki türlerinin taksonomisinin belirlenmesine ve içerdikleri sekonder metabolitlerin yapısal çeşitliliğinin araştırılmasına da imkan sağlamaktadır (Kirakosyan ve diğ., 2009).

Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkmasının yanısıra genomik, metabolomik, proteomik ve çeşitli sistem biyolojisi stratejilerini kullanan yeni yaklaşımlar da çok sayıda bilimsel çalışmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlamıştır (Cseke ve diğ., 2006). Buna ek olarak, modern bitki biyoteknolojisi çalışmaları zamanla genler, proteinler ve metabolitler seviyesine kadar inerek bilimsel çalışmalara katkı anlamında farklı bir alternatif oluşturarak yüksek verimli metodolojilerin oluşumunu da tetiklemiştir. Genetik aktarımın kontrollü bir şekilde yüksek düzeyde istenilen hedefe uygulanabilmesi, bitki biyoteknolojisini tarımsal alandaki bilimsel çalışmalara da ışık tutabilecek hale getirmiştir. Bu konu ile ilgili en çarpıcı deneme örneği, genetiği değiştirilmiş organizmalar ve transgenik bitki üretimidir (Sonnewald, 2003).

Bitkilerin vejetatif çoğaltımı için *in vitro* kültür tekniğinin kullanılması bitki biyoteknolojisinin en pratik ve ticari açıdan en verimli yöntemidir (Chen and Henny, 2008). Üretim açısından değerlendirildiğinde bitki biyoteknolojisinin başarısı bilhassa bitkilerin rejenerasyon yeteneğine bağlıdır ve bitki doku kültürü teknolojisi kullanılarak geçmişten günümüze kadar çok sayıda bitki türünün çoğaltımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Shahzad ve diğ., 2017).

Bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının kültüre alınmasına yönelik son yıllarda kaydedilen gelişmeler bu alandaki biyoteknolojik uygulamaları iki farklı araştırma konusu üzerinde toplamıştır. İlk olarak bitkilerin mikroçoğaltımının yapılması ve akabinde çoğaltımı yapılan bitki türlerinin bünyesinde mevcut olan özel kimyasalların üretimi olarak dikkat çekmektedir. Yakın geçmişte doku kültürü ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda çok sayıda virüsten arındırılmış bitkilerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca protoplast füzyonu, somatik hücre hibridizasyonu ve seleksiyon teknikleri kullanılarak seçilen bitkilere yeni ve istenilen özelliklerin kazandırılması da mümkün hale gelmiştir. Böylece doku kültürü teknikleri kısa sürede tarımsal alanda kıymetli olan birçok bitkinin ticari olarak değerlendirilmesine de katkı sağlamıştır (Singh and Singh, 2007).

Bitki doku kültürü, genellikle *in vitro* ortamda fiziksel ve kimyasal koşullar altında hücrelerin, dokuların, organların ve bu yapıların bileşenlerinin aseptik kültürü olarak tanımlanmaktadır (Street, 1977). “*In vitro*”, “steril kültür” veya “aksenik (saf) kültür” olarak da tanımlanan bitki doku kültürü, hem temel hem de uygulamalı çalışmaların yanı sıra ticari üretimler için de önemli bir araç niteliği taşımaktadır (Thorpe, 2013).

Mikroçoğaltım (mikro üretim, klonal çoğaltım), *in vitro* kültür teknikleri kullanılarak seçilen genotipin gerçeğe-uygun-modellenmiş çoğaltımını ifade etmektedir. Mikroçoğaltım, ticari anlamda ‘rekabetçi bir fiyat ölçeği ile seri üretim’ olarak tanımlanmaktadır (Debergh and Read, 1991). Başka bir deyişle, mikroçoğaltım, aseksüel (eşeysiz) ya da seksüel (eşeyli) çoğaltım yöntemleri ile oluşan organ, doku ya da hücrelerden üretilen bitkiciklerin aseksüel (eşeysiz) üretiminin devamı için kullanılan aseptik bir yöntem olarak ifade edilmektedir (Krikorian, 1982).

Tarım endüstrisi günümüzde çeşitli özellikleri ile dikkat çeken türlerin fazla sayıda ve sürdürülebilir tabanlı bir sistemle çoğaltımı üzerine temel atmış durumdadır.

Mikroçoğaltım tekniği kullanılarak geçmişten günümüze kadar birçok meyve ve sebze türü, süs bitkisi, yok olma tehlikesi altındaki endemik türler ve tıbbi ve aromatik bitkilerin istenilen sayılarda üretimi başarı ile uygulanmıştır (Sarkar, 1994). Mikroçoğaltım tekniklerinin başarı ile uygulanarak günümüzde en fazla ses getirdiği sektörlerden birisi olan kesme iek endüstrisinde, uluslararası iek mezarlarında değer gören ss bitkilerinin yüksek düzeyde çoğaltımı yapılabilmektedir.

1990'lı yılların başlangıcından itibaren *in vitro* oğaltım tekniklerinin bitki türleri üzerindeki endüstriyel amaçlı kullanımında olağanüstü bir artış gözlemlenmiştir. Organogenez, bu amaçla en çok kullanılan *in vitro* oğaltım tekniklerinden biridir. Organogenez kelime anlamı ile başka bir doku ya da organa farklılaştırılmak üzere, bir bitkinin yaprak, sürgün, gövde, kök, tomurcuk veya benzeri yapılarından seçilen eksplantlara *in vitro* ortamda uygulanan işlemler bütünü olarak tanımlanmaktadır (Chawla, 2004). Yakın geçmişten günümüze kadar tahıllar ve baklagiller, otlar, sebze ürünleri, patates ve benzeri kök ve tuber oluşumu gösteren türler, yağlı tohumlar, ılıman ve tropikal iklimlerde yetişen meyveler, ormanlarda yetişen ağaç türleri ve süs bitkileri üzerinde organogenez yöntemi başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Organogenez temel alınarak uygulanan mikroçoğaltım işlemi ile çoğaltılan tek bir eksplanttan yaklaşık olarak iki yıl içerisinde yarım milyondan daha fazla miktarda sürgün üretimi yapılabilmektedir (Ferry, 2011).

Ticari alanda süs bitkileri endüstrisinin dünya genelinde 20. yüzyılın başlarında yükselişe geçtiği bilinmektedir. Sektörün endüstriyel boyutlara taşınması ile birlikte üretim, pazarlama ve istihdam alanlarında da kapasite artışı göze çarpmaktadır. Bilimsel alanda birçok süs bitkisi üzerinde yapılan çalışmalara gelişen teknoloji sayesinde yeni teknikler de eklendiğinde süs bitkileri endüstrisinin iskeletinin oluştuğu aşıkardır. Buna ek olarak, sektörün rekabet ortamına her yıl yeni ülkelerin de eklendiği göz önüne alındığında sektörün artış ivmesi, üretim ve pazarlama ekonomisini sürdürülebilir bir potansiyele dönüştürmektedir (URL-1).

Ss bitkilerinin doku kültürü teknikleri ile çoğaltımı ve sektöre kazandırılma çalışmaları dünya genelinde 1970'li yıllara kadar uzanmaktadır. Günümüze kadar birçok bilimsel çalışma ile özellikle kesme çiçekler kategorisinde estetik görünümlü ve geniş renk yelpazesine sahip olan süs bitkileri üzerinde çeşitli doku kültürü



çalışmaları yapılarak, değerli bulunan bitki türleri ve kültivarlarının raf ve vazo ömrünün uzatılması, kısa sürede fazla sayıda bitkiciklerin üretimi, buna ek olarak genetik manipülasyon sayesinde kuraklığa, sıcaklığa, soğuğa, tuzlu ortama, patojenlere ve herbisitlere dayanıklı hale getirilen yeni çeşitlerin de sektöre kazandırılması doku kültürünü sektörün sürdürülebilirliği açısından gerekli kılmaktadır (Conover, 1992).

Kesme çiçekler, dünya genelinde süs bitkileri endüstrisinde üretimi ve ihracatı en fazla yapılan süs bitkisi grubudur. Türkiye ve Dünya süs bitkileri ticaretinin %50'sini kesme çiçekler grubu oluşturmaktadır. Ülkemiz sahip olduğu coğrafik özelliklerinden dolayı farklı iklim ve toprak yapısına ev sahipliği yapmaktadır. Bu özelliği sayesinde süs bitkilerinin yetiştirilmesi açısından oldukça verimli bir ekolojiye sahiptir. Üretim kapasitesi her yıl artış gösterse de, Türkiye dünya sıralamasında üretim payında 26. sırada yer almaktadır ve ihracat payında %0,4'lük dilimde sabit durumdadır (URL-2).

Lisianthus süs bitkisi, Gentianaceae familyasının üyelerinden biri olmakla birlikte son yıllarda kesme çiçek sektöründe dünya çapında ihracata yönelik üretimi yapılan süs bitkileri kategorisinde ilk on sıralamasında yer almaktadır. Estetik görünümlü, gösterişli çiçekleri ve geniş renk yelpazesine sahip rengarenk kültivar çeşitleri sayesinde dikkatleri üzerine çekmektedir. Bitkinin üretim ve ihracatı Amerika Birleşik Devletleri'nden Avrupa'ya hatta Asya'ya kadar uzanmaktadır (Harbaugh ve diğ., 2000). Türkiye'nin ihracata yönelik kesme çiçek üretimi yapan illeri arasında lider konumda olan Antalya ve yakın çevresinde, İzmir ve İstanbul illerinde Lisianthus'un çeşitli hibrit kültivarları, her yıl düzenli olarak geleneksel yöntemler ile üretilip uluslararası pazarlara ihraç edilmektedir. Tohumları hibrit formda olduğundan ve zor çimlenen bir yapıya sahip olmasından dolayı, tohumdan yetiştirme süreci üreticiler açısından genellikle zaman kaybı olarak görülmektedir. Üretimde erkencilik sağlanması açısından üreticiler genellikle yurtdışından ithal edilen fidecikleri kullanarak Lisianthus kültivarlarının üretimini gerçekleştirmektedir. Lisianthus'un hibrit kültivar çeşitleri genellikle annual formda olduğundan dolayı geleneksel yöntemler ile bir fidecikten fazla sayıda ürün eldesi mümkün olmamaktadır. Bundan farklı olarak, bazı üreticiler ise tohumdan çimlendirerek üretim yapmayı tercih etmektedir. Lakin bu durumda da, bitkinin hasat

süresine kadar iki aydan fazla bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır ve yalnızca yılda iki kez hasat edilerek kesme çiçek üretimi yapılabilmektedir.

Çimlenme yüzdesi düşük olan hibrit tohumların çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenen *in vitro* ortamda doku kültürü teknikleri kullanılarak çimlendirilebilmesi, klonal çoğaltımlarının yapılabilmesi ve üretilen bitkicikler üzerinde ıslah çalışmalarının yapılabilmesi göz önüne alındığında, Türkiye'nin kesme çiçek üretiminde geleneksel yöntemlerin büyük ölçekli ticari üretim açısından istenilen düzeyde yeterli olmadığı ve doku kültürü ile desteklenmeye ihtiyacı olduğu göze çarpmaktadır. Geleneksel yöntemler ile yılda iki kez hasat edilebilen bir süs bitkisinin tek bir eksplantından doku kültürü teknikleri ile mevsime bağlı olmaksızın, kısa sürede istenilen sayıda klonal bitkiciğin üretimi mümkündür.

Bu bitkiciklerin bir kısmı aklimatize edilerek *ex situ* ortamda kesme çiçek üretimine dahil edilebilirken, bir kısmı da birçok kez alt kültüre alınarak üretimin sürdürülebilirliği sağlanabilmektedir. Bu durumdaki asıl amaç geleneksel yöntemlerden farklı olarak bitkiciklerin kısımlarından seçilen eksplantlar kullanılarak kısa sürede arzu edilen sayıda büyük ölçekli seri üretim yapabilmektir. Türkiye'deki kesme çiçek üretiminde mevcut olan eksikliklere ek olarak sektörün gelişimine ket vuran unsurlardan birisi de "tek ürüne bağlılık" olarak ifade edilen, arz ve talepler doğrultusunda en fazla üretimi yapılan kesme çiçek türünde ısrarlı üretim yapılması ve listede yer alan diğer mevcut türlerin üretiminin gölgede bırakılmasıdır. Bu durumun en belirgin örneği, uluslararası pazarlara en fazla ihracatı yapılan spreycaranfilin her yıl fazla sayıda üretilmesi ve kesme çiçek sektöründe yer alan mevcut türlerin daha az sayıda üretilmesidir. Rekabet ortamında özellikle Hollanda gibi sektörde lider konumuna yakın olan ülkeler ar-ge ve doku kültürü laboratuvarlarına yatırım yaparak yeni tür, çeşit ve kültivarlar üzerinde ıslah çalışmaları yapmakta ve her geçen gün yeni pazar arayışları ile ürünlerinin ihracat kapasitesini başarılı bir ivme ile arttırmaktadır. Tek ürüne bağlılığın ortadan kaldırılabilmesi için üreticilerin listede yer alan mevcut türlerin yanısıra yeni çeşit ve kültivarların sektöre kazandırılması kaçınılmaz bir durumdur (Zaman ve diğ., 2007). Çözümüne yönelik olarak yapılması gereken çalışmalar arasında özel sektör, üniversiteler ve araştırma kuruluşları ile işbirliğinin yapılması ve böylece üretime katkı sağlanarak sektör

açısından daha sağlıklı üretim planlarının geliştirilmesi oldukça önem taşımaktadır (URL-3).

Sunulan tez çalışmasında, Türkiye kesme çiçek sektöründe özellikle ihracata yönelik üretimi yapılan kesme çiçekler grubunda yer alan *Lisianthus*'un 'Mariachi Pure White' kùltivarının *in vitro* ortamda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak organogenez ile mikroçoğaltımı üzerinde çalışılması ve geleneksel üretimden farklı olarak doku kùltürü aracılığı ile *Lisianthus*'un geniş ölçekli ticari üretimine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Literatürde *Lisianthus* bitkisinin 'Mariachi Pure White' kùltivarının ticari alanda değerlendirilmek üzere organogenez metodu ile geniş ölçekli mikroçoğaltım çalışması bulunmamaktadır.

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Bitkinin Genel Özellikleri

Lisianthus, Gentianaceae familyasının bir üyesidir. Genellikle annual formda ön plana çıkan bitkinin, bazı türleri biannual veya perennial formdadır. Yerel habitatı olan Kuzey Amerika'da (Şekil 1.1) Meksika'dan Güney Dakota'ya kadar yayılım göstermektedir (Bailey ve Baily, 1976; Fascella ve diğ., 2009). *Eustoma* kelimesi, yunancada "eu: güzel" ve "stoma: gözenek" anlamına gelen sözcüklerin birleşiminden oluşmaktadır.



Şekil 1. 1. Lisianthus'un Amerika kıtasındaki doğal yayılım haritası (URL-4)

Bitkinin bu isimle anılmasının nedeni, korolla loblarının konumlandığı çiçek boğazının geniş ve gösterişli bir açıklığa sahip olmasından kaynaklanmaktadır (URL-5). Bitkinin dünya çapındaki sembolik ismi “Lisianthus” olarak kayıtlarda yer almaktadır. Lisianthus kelimesi ise, yunancada “lissos: güzel” ve “anthos: çiçek” anlamına gelen sözcüklerin birleşiminden oluşmaktadır (URL-6).

Estetik görünümlü rengarenk çiçekleri, göz alıcı çeşitli formlardaki çiçek yapıları ve uzun vazo ömrü ile gündemde kalmayı başaran Lisianthus bitkisi yakın geçmişten itibaren dünya çapındaki kesme çiçek endüstrisinde boy göstermekte ve uluslararası çiçek mezarlarında ihraç edilen kesme çiçekler arasında ilk on listesine girmeyi başarmıştır (Halevy ve Kofranek, 1984).

Bitki, 80’li yılların başlarında Amerika Birleşik Devletleri’nde ilk kez tohum kataloglarında *Lisianthus russellianus* ismi ile yer almıştır. Kısa bir süre sonra bitkinin bilimsel adı *Eustoma grandiflorum* olarak kayıtlara geçmiştir. Tohum kataloglarında yer aldıktan sonra, o dönemde satışlarda ilk sıralarda yer alan kesme gül, karanfil ve krizantem gibi süs bitkileri arasında kısa zamanda popüler hale gelmiştir. 1933 yılında çiçekçilik endüstrisinin de ilerlemesi ile birlikte, Lisianthus Japonya’nın da ilgisini çekmeye başlamıştır. Bitkinin dünya çapında yıldız konumuna ulaştığı 2001 yılında Avrupa’da 122 milyon dal, Japonya’da ise 129 milyon dal Lisianthus satışa sunulmuştur. 2001 yılından itibaren dünyadaki mezarların ilk on listesinde yer almaya başlayan bitki, popülerliğini günümüzde halen korumaktadır (Harbaugh, 2007). Çeşitli yaprak tiplerinin yanısıra bitkinin sahip olduğu karakteristik özellikler Tablo 1.1’de belirtilmiştir.

Tablo 1.1. Lisianthus’un karakteristik özellikleri (URL-7; Harbaugh, 2007)

Parametre	Özellik
Yaşam döngüsü	: Annual, biannual veya kısa ömürlü perennial
Orijin	: Kuzey Amerika
Bitkinin boyu	: 25-60 cm
Sürgün sayısı	: Bir ya da daha fazla
İnternod uzunluğu	: 1,4-6 cm uzunluğunda
Kök tipi	: Kazık kök
Yaprak tipi	: Basit

Tablo 1.1. (Devam) Lisianthus'un karakteristik özellikleri (URL-7; Harbaugh, 2007)

Parametre	Özellik
Yaprak şekli	: Karşılıklı, eliptik-oblong, lanse-ovat
Yaprak rengi	: Mat yeşil
Gövde ve dal rengi	: Yeşil
Yaprak dokusu	: Üç damarlı
Yaprak düzeni	: Paralel
Yaprak Uzunluğu	: 1,5-7,5 cm
Yaprak Genişliği	: 3-5 cm
Çiçek özelliği	: Gösterişli
İnfloresens	: Kimoz-panikülat
Çiçek sayısı	: 2 ila 6'lı çiçek kümesi
Pedisel Uzunluğu	: 6 cm'ye kadar değişken
Çiçek görünümü	: 5 parçalı (nadiren 6 parçalı)
Kaliks	: Derinlemesine yarık görünümünde, loblar karina biçiminde, linear-lanseolat, 1,2-2,3 cm uzunluğunda ve 2-3 mm genişliğindedir.
Korolla	: Kampanulat şeklinde, derinlemesine yarık, mavi-mor, pembe veya beyazımsı, loblar eliptik / obovat, 3,5-5 mm uzunluğunda ve 1,5-2,4 cm genişliğindedir.
Stamenler	: 5 ya da 6 adet, anterler 4,5-5 mm uzunluğunda, filamentler 10-15 mm uzunluğunda, stigma iki loblu, ince, yaklaşık ovaryum kadar.
Kapsül	: Ellipsoid, 2 cm'ye kadar değişken (2n=72).
Çimlenme Sıcaklığı	: 22°C (72°F)
Rozetleşme	: $\geq 25^{\circ}\text{C}$ (77°F)
Toprak pH'ı	: 6,5-6,7

*Eustoma* cinsinin *Eustoma grandiflorum* (*Eustoma russellianum*), *E. exaltatum*, *E. exaltatum* f. *barkleyi* olmak üzere, doğal habitatı olan Amerika kıtasında yalnızca üç türü bulunmaktadır. *Eustoma* cinsinin sistematik hiyerarşisi Tablo 1.2'de ve teşhis anahtarı Tablo 1.3'de belirtildiği şekildedir.

Tablo 1. 2. Lisianthus'un sistematik hiyerarşisi (URL-8; URL-9'den düzenlenmiştir)

Takson Basamağı	Sistematik Sınıflandırma
Alem	Plantae
Alt alem	Viridiplantae
Şube	Tracheophyta
Alt şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Gentianales
Familya	Gentianaceae
Oymak	Chironieae
Alt oymak	Chironiinae
Cins	<i>Eustoma</i>
Tür	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Raf.) Shinnars
Sinonim	<i>Eustoma russellianum</i> (Hook.)
Kültivar	'Mariachi pure white'

Tablo 1. 3. *Eustoma* cinsinin teşhis anahtarı (Turner, 2014)

1. Korolla lobları çoğunlukla 2,5-5,0 cm uzunluğunda, 20-30 mm genişliğinde; kaliks lobları çoğunlukla 1,5-2,5 cm uzunluğunda ..... <i>Eustoma grandiflorum</i>
1. Korolla lobları çoğunlukla 1,5-3,0 cm uzunluğunda, 5-15 mm genişliğinde; kaliks lobları çoğunlukla 1,0-1,5 cm uzunluğunda ..... (2)
2. Yapraklar çoğunlukla lanseolat, 2-6 mm genişliğinde, 5-12 katı kadar genişlikte; kuzeydoğu Meksika ..... <i>E. exaltatum</i> f. <i>barkleyi</i>
2. Yapraklar çoğunlukla ovat ile ovat-lanseolat, 6-15 mm genişliğinde, 2-5 katı kadar genişlikte; tam açılmış ..... <i>E. exaltatum</i>

Keşfedildiği yıllardan itibaren taksonomistlerin dikkatini çeken Lisianthus'un zengin bir sinonim geçmişi bulunmaktadır (Tablo 1.4).

Tablo 1. 4. Lisianthus'un sinonim geçmişi (Turner, 2014)

Binomial Adlandırma	Yazar
<i>Eustoma russellianum</i>	(Hook.) G. Don ex Sweet
<i>Bilamista grandiflora</i>	Raf.

Tablo 1.4. (Devam) Lisianthus'un sinonim geçmişi (Turner, 2014)

Binomial Adlandırma	Yazar
<i>Eustoma russellianum</i>	(Hook.) G. Don ex Sweet
<i>Bilamista grandiflora</i>	Raf.
<i>Eustoma andrewsii</i>	(Hook.) G. Don ex Sweet
<i>Eustoma exaltatum</i> subsp. <i>russellianum</i>	(Hook.) Kartesz
<i>Eustoma gracile</i>	A. Gray
<i>Eustoma grandiflorum</i>	(Raf.) Shinnery
<i>Eustoma grandiflorum</i> f. <i>album</i>	(Holz) Waterf.
<i>Eustoma grandiflorum</i> f. <i>bicolor</i>	(Standl.) Shinnery
<i>Eustoma grandiflorum</i> f. <i>fisheri</i>	(Standl.) Shinnery
<i>Eustoma grandiflorum</i> f. <i>flaviflorum</i>	(Cockerell) Shinnery
<i>Eustoma grandiflorum</i> f. <i>roseum</i>	(Standl.) Shinnery
<i>Eustoma russellianum</i> f. <i>bicolor</i>	Standl.
<i>Eustoma russellianum</i> f. <i>fisheri</i>	Standl.
<i>Eustoma russellianum</i> f. <i>flaviflorum</i>	Cockerell
<i>Eustoma russellianum</i> f. <i>roseum</i>	Standl.
<i>Eustoma russellianum</i> var. <i>flavum</i>	A. M. Davis
<i>Eustoma russellianum</i> var. <i>gracile</i>	A. Gray
<i>Lisianthus russellianus</i>	Hook.
<i>Urananthus russellianus</i>	(Hook.) Benth
Yaygın Adlandırma (Roh ve diğ., 1989; URL-7; URL-10)	
Lisianthus	
Texas Bluebell	
Showy Prairie Gentian	
Prairie Tulip	
Prairie Rose	
Tulip Gentian	
Gentian	
Lira de San Pedro	

Lisianthus süs bitkisinin doğal habitatu olan Amerika Birleşik Devletleri üzerinde Rocky dağlarının doğu kısmı boyunca uzanan geniş bozkırlarla kaplı alan olarak ifade edilen "Great Plains" bölgesidir. Doğal habitatında ilk kez mavimsi-mor



rengiyle keşfedilen Lisianthus bitkisi (Şekil 1.2) tek katmanlı, oval tipten oblonga hatta lanseolat tipe kadar farklılık gösteren huni ve gül benzeri çiçek yapıları ile üne kavuşmuştur (Uddin ve diğ., 2013).

Bitkinin gelişimindeki ideal sıcaklık aralığı 15 ila 25°C arasındadır. Ancak bitkinin daha yüksek sıcaklıklara karşı toleranslı olduğu bilinmektedir. 25°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda fide döneminde bitkinin yaprakları rozet şeklini almakta ve üç farklı yaprak oluşum evresi geçirerek mukavemetini arttırmaktadır (Harbaugh ve diğ., 1992). Bitki kuvvetli ışık ve yüksek sıcaklığa maruz kaldığında ağır hidrojenli suya ihtiyaç duymaktadır (Brian ve Katz, 1997).

Bitkinin anavatanı olarak kabul edilen ve Great Plains bölgesinin sınırları içerisinde yer alan Meksika'da sıcak ve ılıman iklim etkisi görülmektedir. Yaz aylarındaki yağış miktarı kış aylarından daha fazladır. Yıllık ortalama sıcaklık 15,9°C ve yıllık ortalama yağış miktarı 625 mm olarak kayıtlarda yer almaktadır.



Şekil 1. 2. Lisianthus süs bitkisi. A: Bitkinin doğal habitatındaki genel görünümü. B: Yeni açan çiçekte anter ve stigmanın yapısı. C: Bukleli-sarmal yapıdaki çiçek tomurcuklarında petallerin gelişimi (URL-11)

Aralık ayı 6 mm'lik yağış miktarı ile yılın en kurak geçen ayıdır. Ortalama 124 mm'lik yağış miktarı ile Temmuz ayı yılın en fazla yağış alan ayıdır. Haziran ortalama 18,3°C ile yılın en sıcak ayı konumunda iken, Ocak ortalama 12,6°C ile yılın en düşük sıcaklığının yaşandığı aydır (Tablo 1.5).

Lisianthus, 80'li yılların başında Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez Sakata tohum şirketi tarafından hazırlanan kataloglarda piyasaya sunulmuştur. Bitkinin yoğun ilgi görmesinden dolayı, bitkiye farklı özellikler kazandırmayı planlayan şirket aynı cinse ait *Eustoma exaltatum* bitkisini *Eustoma grandiflorum* ile melezleyerek ilk jenerasyon (F<sub>1</sub>) hibritini oluşturmuştur. Oluşturulan hibritin çiçekleri son derece ihtişamlı görüldüğünden dolayı bu çalışma yeni hibritlerin de ilerleyen zamanlarda piyasaya sunulacağı habercisi niteliğinde gündeme gelmiştir. İlk hibridizasyon denemesi 1984 yılında Kolorado State Üniversitesinde yapıldığından dolayı, üretilen hibrit 'Colorado Blue Bell' adını almıştır (Azrak, 1984). Yeni üretilen F<sub>1</sub> hibritin ana bitkiden farklı olarak çiçeğin yapraklarında katmerli görünüm olduğunu farkedilince, bitkiye daha farklı özellikler kazandırmak adına tek sıralı, katmerli, rengarenk ve daha gösterişli yapraklara sahip kültürvarlar üretilmeye başlanmıştır (Harbaugh, 2007).

Tablo 1. 5. Meksika'nın yıllık iklim tablosu (URL-12'dan düzenlenmiştir)

Aylar	O	Ş	M	N	M	H	T	A	E	E	K	A
Ort. Sıcaklık (°C)	12,6	13,8	16,2	17,5	18,2	18,3	17,4	17,6	17	15,9	14	12,7
Min. Sıcaklık (°C)	2,9	3,7	6,1	7,8	9,3	11	10,6	10,5	10,5	8,2	5,2	3,5
Max. Sıcaklık (°C)	22,3	24	26,4	27,2	27,2	25,7	24,3	24,7	23,6	23,6	22,9	21,9
Ort. Sıcaklık (°F)	54,7	56,8	61,2	63,5	64,8	64,9	63,3	63,7	62,6	60,6	57,2	54,9
Min. Sıcaklık (°F)	37,2	38,7	43,0	46,0	48,7	51,8	51,1	50,9	50,9	46,8	41,4	38,3
Max. Sıcaklık (°C)	72,1	75,2	79,5	81,0	81,0	78,3	75,7	76,5	74,5	74,5	73,2	71,4
Yağış Miktarı (mm)	9	7	11	23	54	110	124	119	102	52	8	6

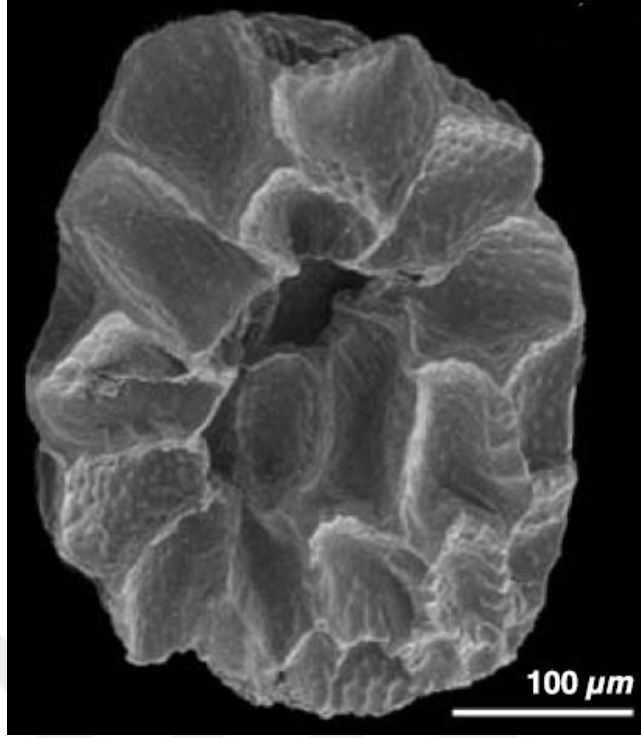
Üretimde sağlam adımlarla ilerlenebildiğini farkedene Miyoshi Seeds, PanAmerican Seed ve Gold Smith Seed gibi tohum firmaları da kùltivar üretimine başlamıştır (Wazir, 2014). 90'lı yılların sonlarında Amerika Birleşik Devletleri'nde 200, Japonya'da ise 125 kùltivar piyasaya sunulmuştur (Harbaugh ve diğ., 2000). Sakata tohum şirketi bitkinin ıslah çalışmalarına günümüzde de hız kesmeden devam etmekte ve Lisianthus kùltivarlarının üretiminde dünyadaki lider şirket konumundadır.

Uzun vazo ömrü ile kesme çiçek sektörüne adını yazdıran Lisianthus çiçek rengi, şekli ve boyutu bakımından oldukça geniş bir yelpazeye sahiptir. Doğal habitatında yetişen türü ve ilk jenerasyona ait olan kùltivarı tek sıralı çiçeklere sahiptir ve tipik çiçek şekli çan benzeri bir yapıdadır. Fidelikler tomurcuk evresinde gülü, açmaya hazırlanırken laleyi, tam anlamıyla açıldığında da gelincik çiçeğine benzer bir görünüm sergilemektedir. Çift sıralı katmerli çiçek yapısında olan kùltivarların stigma yapılarının şekilleri birbirinden farklı biçimlerde konumlanmaktadır. Aynı zamanda çiçek yapısında stamenler bulunmamaktadır. Lisianthus süs bitkisinin kùltivar üretiminde renk yelpazesi ağırlıklı olarak parlak maviden açık mavi tonlarına, açıktan koyu mor tonlarına, açık pembeden koyu pembe tonlarına, gül renginden leylak tonlarına, krem renginden saf beyaza, sarı tonlarına, şarap kırmızısı tonlarına, şeftali tonları ve yeşil tonlarına kadar toplamda 15 renk seçeneği ile üretilmektedir (Şekil 1.3). Özellikle iki renkli olan kùltivarların çiçeklerinde beyaz renkli petal ve mavi kenar şeritleri çiçeğe oldukça estetik bir görünüm kazandırmaktadır. Çiçek renginin ıslahı ile ilgili yapılan çalışmalarda mavi petal renginin beyaz ya da pembe renge göre daha baskın olduğu, pembe rengin de beyaza göre dominant olduğu not edilmiştir. Saf homozigot beyaz renk ile mavi/mor renk çaprazlandığında, oluşan çiçeğin rengi açık mavi olmaktadır. (Harbaugh, 2007). Tohumlarının 19,000 tohum/gm oranında (Ghanati ve diğ., 2012) ve çok küçük olmasından dolayı Lisianthus'un birçok kùltivarının tohum kökenli çoğaltımı, günümüzde kesme çiçek sektörüne bitki yetiştirmek adına zaman kaybı olarak görülmektedir. Özellikle Türkiye'deki üreticiler yurtdışından ithal ettikleri fidelikleri kullanarak, üretimde erkencilik sağlamak ve geleneksel yöntemlerle bitki üretimini gerçekleştirmektedir. Lisianthus'un tohum yapısı büyük ölçüde elips biçiminden dairesel şekle doğru oluşum göstermektedir.



Şekil 1. 3. Lisianthus'un bazı kültür çeşitleri. A: 'Mariachi Pure White'. B: 'Pink'. C: 'Pink Picotee'. D: 'Blue'. E: 'Rose Pink'. F: 'Blue Picotee' (URL-13)

Tohumların büyüklüğü ortalama 330-450 x 270-370 µm olarak kayıtlarda yer almaktadır. Hilum (tohum göbeği) / mikropil içe gömülü haldedir. Tohum testası yoğun olarak konkav biçimde bir çukur görünümünü andırmaktadır ve testa hücrelerinin yığılma gösterdiği kısımdır. Testa hücreleri poligonal yapıdadır. Antiklinal duvarlar düz yapıdan kavisli bir yapıya doğru eğilim göstermektedir ve bir dizi geniş çukur görünümünün oluşumunu sağlar. Dış duvar ince bir yapıda ve batık görünümündedir, iç duvarın tüysü yapısını belirgin hale getirir. İç duvar ise, küçük ve az sayıda tüy benzeri yapılar ile retikülat bir yapıya sahiptir ve yuvarlak bir çukur görünümünü andırmaktadır (Şekil 1.4). Kütikül ise, düz şekilde konumlanmaktadır (Bouman ve diğ., 2002).



Şekil 1. 4. Lisianthus tohumunun taramalı elektron mikroskobunda çekilen fotoğrafı (Bouman ve diğ., 2002)

## 1.2. Süs Bitkileri Endüstrisi

Asırlar boyunca büyümeye devam eden nüfus yoğunluğuna paralel olarak çeşitli çevre sorunlarının ortaya çıkması, yeşil alanların göze hitap eden manzarasının kentleşmeden dolayı tahribata uğramasına sebep olmuştur. Bu durum, insanlarda doğaya karşı yoğun bir özlemin oluşmasına ve insanların buldukları çevreyi manevi anlamda huzur ve ferahlık hissettirecek biçimde güzelleştirme isteğinin doğmasını sağlamıştır. Ayrıca düğün ve cenaze gibi diğer özel günlerde de kişi başına düşen çiçek tüketim oranının da artış göstermesi ile birlikte, süs bitkilerinin önem ve gerekliliği yakın geçmişten itibaren giderek artma eğilimindedir. Özellikle son yüzyıl içerisinde insanların estetik ve dekoratif ihtiyaçları doğrultusunda süs bitkileri ticari alanda değerlendirilmesi, günümüze kadar dünya çapında 145 ülke arasında büyük bir rekabet ortamının oluşmasını sağlamıştır. Ekonomik anlamda ülkelere yüksek derecede kazanç sağlaması, istihdam alanı ile gündeme gelmesi, üretim, pazarlama, ithalat ve ihracat gibi makro boyutlara taşınması ile birlikte "Süs Bitkileri Endüstrisi" bağımsızlığını ilan ederek dünya çapındaki sektörler arasına adını yazdırmayı başarmıştır. Süs bitkileri endüstrisi günümüzde mezat sistemlerinde

kesme çiçekler (kesme yeşillikler), dış mekan süs bitkileri, iç mekan süs bitkileri ve doğal çiçek soğanları olmak üzere dört ana grup altında kategorize edilmektedir (Yazgan ve diğ., 2005).

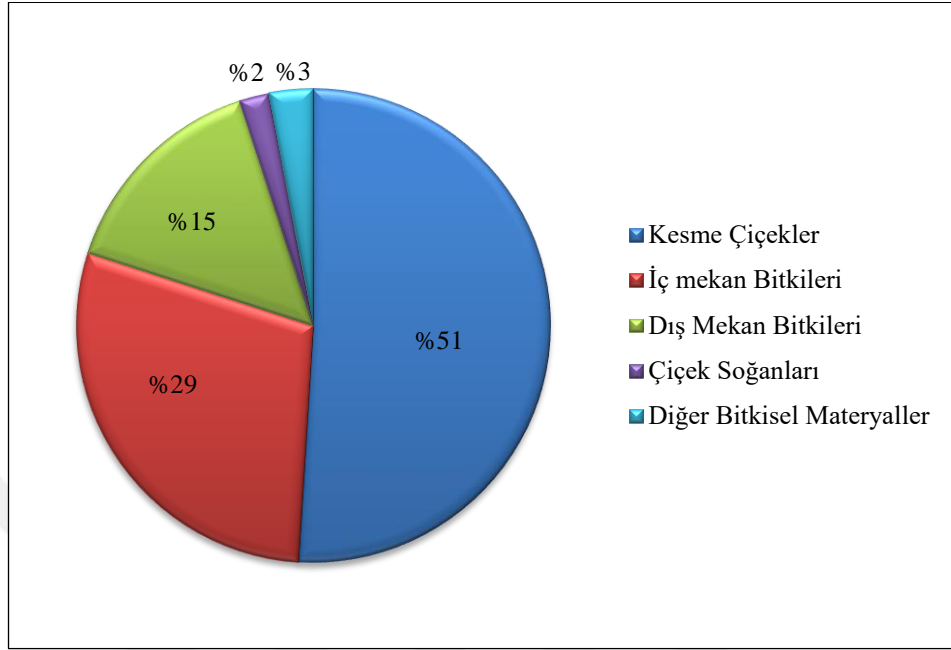
Bitkilerin dünya genelinde “süs bitkisi” kategorisinde sektör kapsamında değerlendirilmesi 20. yüzyılın başlarında gündeme gelmiştir. Bu dönemde özellikle New York, Londra, Berlin, Paris, Amsterdam ve Tokyo gibi gelişmiş şehirlerde sektör özellikle kesme çiçek üretimi ile hızla artışa geçmiştir. Ancak, II. dünya savaşı sektörün gelişimine ciddi boyutlarda ket vurarak duraklama döneminin zeminini hazırlamıştır (Noordegraaf, 1998). Savaş sonrası 1950’li yıllarda sektör yeniden canlanmaya başlayarak, coğrafi konumları avantajlı olan ülkelerin de sektöre dahil olması ile birlikte sektörün hacmi dünya çapında kıtalar arası boyuta ulaşmıştır. İhracat kapsamında sektörün en parlak dönemi 1970’li yıllar olarak kayıtlarda yer almaktadır. 80’li yılların başlarında Güney Afrika, Kenya, Ekvador, Kolombiya gibi ucuz işgücü ile yüksek gelir sağlayabilen ülkelerin de sektöre dahil olması ile rekabet ortamında dengeler değişmeye başlamıştır. 1985 yılından sonra Türkiye de diğer üretici ülkeler ile birlikte sektördeki yerini almıştır (Karagüzel ve diğ., 2010).

### **1.2.1. Kesme çiçek üretiminin dünya genelindeki durumu**

Kesilerek toplanan, çeşitli kombinasyonlar ile biraraya getirilerek buket, sepet veya çelenk gibi çeşitli kompozisyonlar oluşturularak satışa sunulan çiçekler “kesme çiçek” olarak ifade edilmektedir (URL-2; URL-14). Kompozisyonların oluşturulmasında bitkilerin taze yeşil kısımları, çiçek veya goncaları üzerinde çeşitli kurutma, boyama, ağartma işlemleri yapılarak çiçeklerin farklı biçimlerde sunulması sağlanmaktadır (URL-15). Kazanç payı dünya genelinde 50 milyar dolardan fazla olan süs bitkileri endüstrisinin üretim kategorisinde (Şekil 1.5) ilk sırada 24,7 milyar dolarlık hasılat ile kesme çiçekler almaktadır (De Groot, 1998). Kesme çiçekler günümüzde ticareti en fazla yapılan süs bitkileridir ve aynı zamanda süs bitkileri endüstrisinde %50’den fazla ticaret payına sahiptir. Dünya genelinde üretimi yapılan kesme çiçekler 550,000 hektar alan üzerindeki hakimiyeti ile toplam süs bitkileri üretiminin %39’luk payına sahiptir (URL-14). Kuzey Amerika, Güney Amerika, Ortadoğu, Asya ve Afrika kıtası da dahil olmak üzere sektördeki rekabet ortamında



Avrupa Birliği özellikle kesme çiçek ve bitki materyali üretimi, ithalatı ve ihracatında dünya çapında lider konumdadır (Yazgan ve diğ., 2005; Ay, 2009).



Şekil 1. 5. Dünya süs bitkileri endüstrisinde üretimi yapılan ürün kategorilerinin sektör içerisindeki yüzdeleri dağılımları (Karagüzel ve diğ., 2007'den düzenlenmiştir).

Özellikle Re-export uygulaması sayesinde dünya genelinden Hollanda mezarlarına ulaşan ithal bitkileri (Tablo 1.6) yeniden işleyerek piyasa sürmektedir (URL-16). Hollanda bu özelliğinden dolayı aynı zamanda sektörün önemli bir dağıtım merkezi konumundadır (URL-17).

Üretim alanı açısından değerlendirildiğinde 183 000 hektar alan ile Hindistan birinci sırada, 133 767 hektar alan ile Çin ikinci sırada ve 51 437 hektar alan ile Brezilya üçüncü sıradadır. 2014 yılı verilerine göre 3 765 581 bin dolar ile %44,9'lük ihracat payına sahip olan Hollanda dünya çapındaki liderliğini korurken, 1 374 246 bin dolar ile %16,4'lük ihracat payına sahip olan Kolombiya ikinci ve 798 433 bin dolar ile %9,5'lik ihracat payına sahip olan Ekvador üçüncü sıradadır.

2014 yılı verilerine göre 1 285 411 bin dolar ile %15,3'lük ithalat payına sahip olan Almanya lider durumda iken, bu sıralamayı 1 219 529 bin dolar ile %14,5'lik ithalat payına sahip Amerika ve 1 137 765 bin dolar ile %13,5'lik ithalat payına sahip olan İngiltere takip etmektedir (URL-2).

Tablo 1. 6. Avrupa süs bitkileri endüstrisinde en fazla tercih edilen kesme çiçekler (URL-14'den düzenlenmiştir)

Sıra no	Kesme Çiçek
1	Gül
2	Krizantem
3	Lale
4	Zambak
5	Orkide
6	Frezya
7	Hippeastrum
8	<b>Lisianthus</b>
9	Alstroemeria

### 1.2.2. Kesme çiçek üretiminin Türkiye genelindeki durumu

Türkiye’de kesme çiçek üretimi ilk kez 1940’lı yıllarda İstanbul ve Adalar çevresinde başlayarak, sonraki dönemlerde Yalova’da ses getirmeye başlamıştır (URL-14). 1945 yılında kooperatiflerin kurulmaya başlaması ile ticari alanda kesme çiçekler üretimi dikkatleri üzerine çekmeyi başarmıştır. Bu gelişmeyi takiben 1970’li yıllarda kesme çiçek üretimi İzmir’de de ilgi görmeye başlayarak faaliyet gösteren üretim sahaları oluşturulmuştur (Yazgan ve diğ., 2005). 1985 yılından sonra Antalya bölgesinde seracılık faaliyetlerinin artması ile birlikte ihracat tabanlı kesme çiçek üretiminin 4 hektarlık bir alanda yapılması ile bu alandaki sektörel girişimlerin temelleri atılmıştır (Zaman ve diğ., 2007). Aynı zamanda 1985 yılı, kesme çiçek üretiminde yeni bir rejime de ev sahipliği yapmıştır. Antalya’da kurulan seralarda üretilen kesme çiçekler ihraç edilerek 1 milyon dolarlık gelir elde edilmesini sağlamıştır. Ekonomi açısından olumlu bakış açısı yaratan bu kazançtan sonra, Türkiye’de -çiçeğin lüks tüketimi olduğu- düşüncesi çoğunlukla değişme göstermiştir. Aynı yıl içerisinde Türkiye ithalat yolu ile dünya çapında üretilen yeni ve gösterişli çiçeklere sahip bitkiler ile tanışarak ürün artışına gitmeyi hedeflemiştir (Yazgan ve diğ., 2005). 1990 yılı sonrası yapılmaya başlayan ihracat ile Türkiye’nin kesme çiçek piyasası dinamik bir şekilde günümüze kadar canlılığını sürdürerek dünya çapındaki sektöre adını yazdırmayı başarmıştır.



Günümüzde Türkiye’de kesme çiçek üretimi çoğunlukla Marmara, Ege ve Akdeniz bölgesinde yoğunlaşmış durumdadır. Marmara Bölgesinde İstanbul ve Yalova, Ege Bölgesinde ise İzmir ve Aydın illeri çoğunlukla iç piyasaya yönelik olarak üretim yapmaktadır. Akdeniz Bölgesinde ise Antalya ili ve çevresinde çoğunlukla ihracata yönelik üretim mevcuttur (Özkan ve Karagüzel, 1997). Üretim yapan diğer iller ise çoğunlukla iç ve dış mekan bitkileri ile çiçek soğanları üretimi üzerinde yoğunlaşmaktadır.

2014 yılı verilerine göre Türkiye genelinde 26 ilde kesme çiçek üretimi yapılmaktadır. Aynı zamanda kesme çiçek ihracatı Türkiye’nin süs bitkileri ihracatının yaklaşık olarak yarısını elinde tutmaktadır (URL-14). Günümüzde Türkiye’de üretilen kesme çiçekler yaklaşık 60 ülkeye ihraç edilmektedir (URL-15). Bu durum, kesme çiçek sektörünün ülkemiz ekonomisi açısından güçlü bir potansiyele sahip olduğunu ve aynı zamanda dinamik bir yükselişte olduğunu gözler önüne sermektedir.

Türkiye 2014 yılı içerisinde 1,326 hektarlık bir alanda kesme çiçek üretimi tamamlayarak yıl sonundaki istatistiklerde %0,2’lik bir üretim payı ile dünya genelindeki ülkeler arasında 26. sırada yer almıştır. Yine aynı içerisinde üretilen kesme çiçeklerin ihracatından Türkiye’nin elde ettiği gelir 32,018 bin dolar olarak kayıtlara geçmiştir ve dünya genelindeki ülkeler arasında ülkemiz %0,4’lük bir ihracat payı ile 21. sırada yer almıştır (URL-2). 2014 yılı içerisinde Türkiye’de toplamda 1,5 milyar ton kesme çiçek üretilip piyasaya sunulmuştur.

2016 yılında Türkiye’de en fazla üretimi ve ihracatı yapılan kesme çiçek karanfil olarak Türkiye İstatistik Kurumunun kayıtlarında yer almaktadır. Sektör kayıtlarına 2006 yılından itibaren dahil olan ve değer kazanmaya başlayan Lisianthus 2016 yılını 9.521.500 adet ve üretim adedi ile 12. sırada tamamlamıştır (Tablo 1.7). Türkiye genelinde kesme çiçek üretimi yapılan başlıca illerde Lisianthus üretimi günümüzde halen ihracata yönelik olarak her yıl düzenli bir şekilde yapılmaktadır. Özellikle Türkiye kesme çiçek sektörünün lideri konumunda olan Antalya seralarında yılın belirli zamanlarında yurtdışı mezarlarına ve yurtiçi piyasaya gönderilmek üzere coğrafi koşullara adapte olabilen Lisianthus kültürvarlarının fidecikleri ithal edilerek seralarda geleneksel yöntemlerle kültürvarların üretimi yapılmaktadır (Tablo 1.8).

Tablo 1. 7. Türkiye’de 2016 yılında üretimi yapılan kesme çiçekler (URL-17’den düzenlenmiştir)

Ürün	Ekilen alan (m <sup>2</sup> )	Üretim (adet)
Karanfil	4 823 955	593 260 930
Gerbera	1 136 032	128 063 850
Gül (Kesme)	1 808 882	89 415 150
Krizantem	637 215	44 915 925
Lale	413 430	40 601 005
Solidago	127 900	18 302 500
Gypsophila	252 040	17 980 040
Frezya	155 989	17 820 150
Glaiyöl	586 900	15 068 000
Nergiz	415 560	13 808 850
Lilyum	767 589	13 310 185
<b>Lisianthus</b>	<b>152 864</b>	<b>9 521 500</b>
Şebboy	161 199	6 425 640
Sümbül	44 870	1 568 350
Anemon	10 400	1 188 000
İris	24 650	1 038 000
Orkide	18 750	269 000
Deniz Lavantası	27 000	183 000
Diğer kesme çiçekler	384 012	25 256 300

Türkiye’nin ürün ihraç ettiği ülkelerin başında Hollanda gelmektedir. Hollanda’yı takiben İngiltere, Türkmenistan, Almanya, Irak, Azerbaycan, Ukrayna, Rusya, Özbekistan ve Romanya ihraç pazarlarımız olarak kayıtlarda yer almaktadır.

Türkiye’nin kesme çiçek üretim ve ihracatının merkezi olarak kabul gören Antalya ilinde neredeyse tüm kesme çiçek üretim alanları %92,6’lık bir oranla plastik seralarda yapılmaktadır (Taşçıoğlu ve Sayın, 2005). Ayrıca, Türkiye’de süs bitkileri üretimi için kullanılan alanların yaklaşık %30’u Antalya ilinde bulunmaktadır. Antalya ilini diğer üretim alanlarından özel kılan durum büyük ölçüde ihracata yönelik üretim hedeflemesinden kaynaklanmaktadır. İhracatın yanı sıra iç piyasaya ürün yetiştirme konusunda da diğer illere nazaran oldukça ön plandadır.

Tablo 1. 8. 2016 yılında Türkiye’de Lisianthus üretimi yapılan iller (URL-18’den düzenlenmiştir)

İller	Ürün Grubu	Ürün Adı	Ekilen Alan (m <sup>2</sup> )	Üretim (adet)
Antalya	Kesme çiçek	Lisianthus	53 750	4 247 500
İzmir	Kesme çiçek	Lisianthus	56 300	4 093 000
Yalova	Kesme çiçek	Lisianthus	29 364	834 100
İstanbul	Kesme çiçek	Lisianthus	2 300	37 400

Antalya genelinde yapılan süs bitkileri üretim sahalarının yaklaşık %78’i kesme çiçek ürün grubuna aittir. Buna ek olarak, 2014 yılı içerisinde Türkiye’nin kesme çiçek ihracatının %74’lük kısmını Antalya ili üstlenmiştir. Diğer süs bitkisi üretim sahalarına göre Antalya’nın iklimi çevre koşullarına karşı hassas olan süs bitkilerinin üretimi için yılın belirli zamanlarında kesme çiçek yetiştiriciliği için elverişli olmaktadır (Şekil 1.6). Antalya ve çevresinde kesme çiçek üretimi yılın sekiz ayı boyunca sürdürülebilmektedir (Zaman ve diğ., 2007).

Kesme çiçek sektörü son 40 yıl içerisinde dünya çapında hatırı sayılır derece bir dinamizm oluşturarak günümüzde de büyümeye devam etmektedir. Rekabet ortamı ile başa çıkabilmek adına bugün sektörün devleri olarak adlandırılan üretici ve ihracatçı ülkelerin birçoğu özellikle son zamanlarda bitki bilimi ile ön plana çıkan yeni teknoloji ve teknik donanımlar sayesinde üretimde yeni bir dönem içerisine girmişlerdir. Yeni tip üretimler sayesinde sektörün en güçlü olan ülkeleri ile gelişmekte olan ülkeler arasındaki ekonomik kazanç farkı daha da büyümektedir.



Şekil 1. 6. Antalya'nın akseki ilçesinde yetiştirilen Lisianthus kültürlerinin bulunduğu seradan genel bir görünüm (URL-19). A: 'Mariachi Pure White'. B: 'Blue Picotee'. C: 'Echo Blue' (URL-13)

### 1.3. Bitki Doku Kültürü

Aksenik kültür, *in vitro* kültür, steril ya da aseptik kültür olarak da ifade edilen bitki doku kültürü hücre, doku veya organların *in vitro* ortamda kimyasal ve fiziksel şartlar altında kültüre alınmasını ifade etmektedir (Street 1977; Thorpe, 1990). Başka bir deyişle, bitki doku kültürü hücre, doku ya da organ gibi bitkinin öncül yapılarının ayrılarak tekrar yeni bir bitkiyi oluşturmaları için *in vitro* koşullar altında çeşitli kimyasallar ile manipule edilerek kültüre alınmalarını ifade etmektedir (Caponetti ve diğ., 2000). Bitki doku kültürü halen bitki biyoteknolojisinin yapıtaşı olarak bilimsel çalışmalarındaki önemini korumaktadır. Uzun ve köklü bir geçmişe sahip olan bitki doku kültürü geçmişten günümüze kadar çalışmacıların düşüncelerinde “her canlı bitki hücresinin mutlaka bir bütünü oluşturmak üzere yeniden organize olma potansiyeli vardır” algısını yaratmıştır. Bu algının varlığı günümüze kadar gerek literatüre gerekse de uygulama alanlarına birçok ürün, yeni bilgi ve donanım kazandırmıştır (Mohan Ram, 1999). Bugün dünya çapında bilimsel çalışmalar yürütmekte olan birçok bitki doku kültürü araştırma laboratuvarları mevcuttur. Hücresel düzeyde klonlama ve genotiplerin seri çoğaltımında, polen ve anter kültürlerinden elde edilen haploid dokuların manipule edilerek rejenerasyonu ile üretiminde, somatik klonlar ve indüklenen mutasyonlar sayesinde genetik çeşitlilik yelpazesinin zenginleştirilerek seçilen varyantların istenilen düzeyde üretilmesinde, hücre büyüme ve farklılaşması üzerinde çeşitli besi ortamlarının, vitaminlerin ve hormonların etkileri incelenerek izole edilen kallusların ve hücre kültürlerinin oluşturulmasında bitki doku kültürü yöntemleri kullanılmaktadır. Aynı zamanda bitki doku kültürü teknikleri ekonomik önemi olan süs bitkilerinin ticari alanda vejetatif çoğaltımında büyük bir potansiyele sahip olduğundan dolayı endüstriyel boyutta da yaygın biçimde kullanılmaktadır (Torres, 1989).

*In vitro* koşullar altında bitkilerin öncül kısımlarının aseptik kültüre alınması mikroçoğaltım işlemi ile gerçekleştirilmektedir. Mikroçoğaltım (mikro üretim, klonal çoğaltım), *in vitro* kültür teknikleri kullanılarak seçilen genotipin gerçeğe-uygun-modellenmiş çoğaltımının yapılmasını ifade etmektedir. Mikroçoğaltım terimi ticari alanda çoğunlukla rekabetçi fiyat ile seri üretimi simgelemektedir (Debergh ve Read, 1991). Başka bir deyişle, mikroçoğaltım eksplant adı verilen küçük boyutlardaki bitki kısımları üzerinde kültür öncesi yapılan işlemdir. Mikroçoğaltım tekniği genetik

olarak hastaliksız üniform tipteki bitkiciklerin geniş ölçekli seri üretimi için güvenilir ve elzem bir tekniktir. Geniş yelpazeli çalışmaların temelinde kullanılan bir teknik olduğundan dolayı günümüzde bitki biliminden endüstriyel boyutlara kadar ulaşan üretim çeşitlerinde sıkça kullanılmaktadır (Jha ve Gosh, 2005).

### 1.3.1. Bitki Doku Kültürünün Tarihçesi

17. yüzyılda İngiliz araştırmacı Robert Hook'un mikroskopta gözlemediği boş odacıklara "hücre" adını vermesinden sonra, 1838 yılında botanikçi M. V. Schleiden ve zoolog Theodore Schwann bitkiden ayrılan hücrelerin büyümeye devam ederek tam bir bitkiyi oluşturabilme kabiliyetlerini keşfederek bitki doku kültürünün yapıtaşı kabul edilen hücresel totipotensi teorisini ortaya atmışlardır. 1902 yılında Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt her ne kadar deneysel çalışmalarında tam anlamıyla başarıyı yakalayamamış olsa da, vejetatif hücrelerin kültüre alınması yoluyla bitki embriyolarının üretilmesi için bir bitkide bulunan hücrelerin aralarındaki ilişkiyi anlayabilmek adına hücre kültürünün gerekli bir araç olmasının farkına varılmasını sağlamıştır. Bu gelişmeden sonra, 1904 yılında başka bir Alman botanikçi E. Hannig çeşitli krusifer embriyolarını kültüre almayı başarmıştır. 20. yüzyıla girildiğinde bitki doku kültürü hızla gelişen ve büyüme kateden bir döneme girmiştir. Aseptik kültürdeki agar ortamında orkide fideciklerini çimlendirilip büyütülmesi ile ticari öneminin de ortaya çıkarılması hemen hemen eşzamanlı olarak L. Knudsen, Noel Bernard ve Burgeff isimli araştırmacılar tarafından başarıya ulaşılmıştır (Rao, 2014). P. R. White 1934 yılında domates bitkisinden sürekli kök kültürü düzeneği kurarak ölümüne kadar geçen sürede belirli periyotlar ile elde ettiği kökleri tekrar alt kültürlerle almayı başarmıştır. 1939 yılında Roger J. Gautheret indolasetik asit ve B vitaminlerini kullanarak havuç kök kambiyumundan sürekli kültür düzeneği kurmayı başarmıştır. 1960 yılına gelindiğinde E. Ball, G. Morel ve C. Martin tarafından kurulan hastaliksız *Dahlia* meristem kültüründen sonra, sürgün ucu kültürleri hastaliksız orkidelerin üretimi için bitkicikler üzerinde denenmiştir. Morel ve arkadaşları bu çalışma ile hızlı klonal çoğaltım açısından bu tekniğin güçlü bir potansiyele sahip olduğunu kanıtlamışlardır. Bu çalışma ile bir yıl içerisinde tek bir sürgünden yaklaşık olarak 4 milyon kadar genetiği tanımlanmış bitki üretilbileceği kanıtlanmış oldu. Orkide endüstrisi için devrim niteliği taşıyan bu farkındalık sayesinde *in vitro* klonal çoğaltım aynı zamanda mikroçoğaltım adı ile de anılmaya

başlayarak bu teknik diğer angiosperm bitkiler üzerinde de denenmeye başlamıştır. Orkide endüstrisinde oldukça ses getiren bu gelişmeden sonra, Amerika'dan Toshio Murashige isimli araştırmacı popüler hale gelen mikroçoğaltım tekniğini kullanarak tarımsal bitkiler üzerinde çalışmalar yapmıştır (Tablo 1.9). Böylece, ticari alanda değerli sayılan bitkilerin seri üretiminde mikroçoğaltım tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik halen günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kurulan teknik donanımlı laboratuvarlarda birçok ticari bitkinin üretiminde kullanılmaktadır (Bhojwani ve Dantu, 2013).

Tablo 1. 9. Bitki doku kültürünün tarihsel gelişimine katkı sağlayan araştırmacılar ve keşifleri (Chawla, 2004; Purohit, 2013; Bhatia, 2015)

Yıl	Araştırmacı	Keşif
1756	H. L. Duhamel du Monceau	Kabuğu soyulmuş karaağaçtan alınan eksplantlardan kallus üretimi. Bu çalışma bitki doku kültürünün keşfinde öncü niteliğindedir.
1838	M. V. Schleiden ve T. Schwann	Bir hücrenin tam bir bitkiyi oluşturabilme yeteneğinin tanımlanması ve hücresel totipotensi teorisinin ortaya atılması
1839	T. Schwann	Çok hücreli bir organizmanın her canlı hücresinin dış ortamda uygun koşullar altında bağımsız olarak gelişebileceği düşüncesinin ortaya atılması.
1853	A. Trecul	<i>Robinia</i> , <i>Paulownia</i> ve <i>Ulmus</i> gibi kabuğu soyulan ağaçlardan kallus oluşturma deneyleri.
1893	C. Reehinger	İzole edilen gövde kısımları ve kök parçalarından kallus oluşumunun tanımlanması.
1902	G. Haberlandt	İzole edilen bitki hücrelerinden <i>in vitro</i> hücre kültürü kurulması (başarısız)
1904	E. Hannig	Çeşitli krusifer bitki türlerinden embriyo kültürü oluşturulması.
1922	W. Kotte	Çeşitli besi ortamlarında bulunan bezelye ve mısır kök uçlarının uzun süreli kültüre alınması.
1922	W. J. Robbins	Steril koşullar altında mısırdan ayrılan gövde ve kök uçlarının kültüre alınması (başarısız).
1922	L. Knudson	Orkide tohumlarının <i>in vitro</i> ortamda asimbiyotik çimlendirilmesi.
1925	F. Laibach	<i>Linum perenne</i> ile <i>L. austriacum</i> hibritlerinden embriyo kültürü oluşturulması.
1926	F. W. Went	İlk büyüme hormonu indolasetik asitin keşfi.
1934	R. J. Gautheret	Katılaştırılmış agar ortamında eksplantlardan sağlıklı kallus üretimi.
1934	P. R. White	Domates kök uçlarının kültüründe B vitamini kullanılarak sürekli kültür oluşturulması.

Tablo 1.9. (Devam) Bitki doku kültürünün tarihsel gelişimine katkı sağlayan araştırmacılar ve keşifleri

Yıl	Araştırmacı	Keşif
1939	P. R. White, R. J. Gautheret ve P. Nobecourt	Eş zamanlı olarak uzun süreli kallus kültürlerinin kurulması.
1940	R. J. Gautheret	Ulmus ağacının kambial dokularının <i>in vitro</i> kültüre alınarak adventif sürgün rejenerasyonu denemeleri.
1941	V. Overbeek	Hindistan cevizi suyunun besleyici öge olarak besi ortamına ilave edilmesi ve <i>Dahlia</i> bitkisinin olgunlaşmamış embriyoları ve kallus oluşumu üzerinde pozitif etki göstermesi.
1942	P. R. White, A. C. Braun	Taç tümörü oluşumu görülen dokuların <i>in vitro</i> kültüre alınması.
1944	F. Skoog	Tütün kallusları üzerinde organogenez çalışmaları.
1946	E. A. Ball	<i>Tropaeolum</i> ve <i>Lupinus</i> 'un sürgün ucu kültürlerinden tam bir bitki oluşturulması.
1947	C. D. La Rue	Mısır bitkisinden endosperm kültürü kurulması ve alt kültüre alınması.
1950	A. C. Braun	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'in bitki genomuna transferinin gerçekleştirilmesi.
1952	G. Morel, C. Martin	<i>Dahlia</i> bitkisinin eksplantlarından sürgün ucu kültürü oluşturularak ilk kez hastaliksız bitki üretiminin gerçekleştirilmesi.
1953	Tulecke	<i>Ginkgo biloba</i> bitkisinden haploid kallus üretimi.
1954	Muir ve arkadaşları	İzole edilen tek hücre kültürlerinde mekanik olarak bölünmenin uyarılması.
1955	Miller ve arkadaşları	Kinetin hormonunun keşfi.
1957	Skoog ve Miller	Oksin:sitokinin oranındaki değişim ile organ oluşumunun düzenlenmesinin keşfi.
1958	Steward, Reinert	Birbirinden bağımsız olarak eş zamanlı yapılan çalışmalarda havuç bitkisi üzerinde somatik embriyogenez denemeleri ile embriyo oluşturulması.
1960	Jones ve arkadaşları	İzole edilen tek hücrelerin şartlandırılmış ortamda asılı damla tekniği ile büyütülmesi için mikrokültür metodunun kullanılması.
1960	Cocking	Enzimatik yöntemlerle bitki protoplastlarının izole edilmesi.
1960	Bergmann	İzole edilen tek hücrelerin kültürü için hücre plağı tekniğinin geliştirilmesi.
1960	G. Morel	Apikal meristem ve orkide mikroçoğaltımı için metot geliştirilmesi.
1962	Kanta ve arkadaşları	Çıplak yumurta hücrelerinin <i>in vitro</i> tozlaşması ile canlılığını sürdürebilen tohumların üretimi.
1962	Murashige ve Skoog	Murashige & Skoog besi ortamının geniş ölçekli formülasyonunun tamamlanması.
1964	Guha ve Maheshwari	Anter ve mikrospor kültürü ile <i>Datura</i> bitkisinde ilk kez androjenik haploid bitki üretilmesi.



Tablo 1.9. (Devam) Bitki doku kültürünün tarihsel gelişimine katkı sağlayan araştırmacılar ve keşifleri

Yıl	Araştırmacı	Keşif
1965	Johri ve Bhojwani	Triploid endosperm hücrelerin totipotensi özelliğinin ispatlanması.
1965	V. Vasil, A. C. Hildebrand	Tütün bitkisinden izole edilen tek hücrelerin rejenerasyonu ile tam bir bitki oluşturulması.
1966	Kohlenbach	<i>Macleaya cordata</i> bitkisinden izole edilen olgun mezofil hücrelerinde bölünmenin uyarılması.
1968	Meselson ve Yuan	Restriksiyon endonükleaz teriminin enzim sınıfına kazandırılması.
1970	Carlson	Doku kültürü kökenli varyasyonlar kullanılarak <i>in vitro</i> ortamda biyokimyasal mutantların seçilmesi.
1970	Power ve arkadaşları	İlk başarılı protoplast füzyonu denemesi.
1971	Heinz ve Mee	Şeker kamışı bitkisinin kallus kültürlerinden elde edilen rejenerantlar üzerinde somaklonal varyasyonun rapor edilmesi.
1971	Takebe ve arkadaşları	Protoplastlardan ilk kez üretilen bitkilerin rejenerasyonunun gerçekleştirilmesi.
1972	Carlson ve arkadaşları	<i>Nicotiana glauca</i> ve <i>N. langsdorffii</i> bitkilerinden izole edilen protoplastların füzyonu ile ilk kez interspesifik hibridizasyon denemesi.
1973	Nitsch ve Norreel	Tütün bitkisinden izole edilen mikrospor kültürlerinden haploid bitkilerin üretilmesi.
1973	Nag ve Street	-196°C'deki sıvı azot içerisinde dondurulmuş havuç hücrelerinden üretilen bitkilerin rejenerasyonu.
1973	Pierik ve arkadaşları	<i>Gerbera</i> bitkisinden alınan kapitulum eksplantlarının dormansi evrelerinin sitokin ile kırılabilceğinin ispatlanması.
1974	Kao ve arkadaşları, Walin ve arkadaşları	PEG'in bitki protoplastlarının füzyonu için çok yönlü bir kimyasal olduğunun tanımlanması.
1974	Reinhard	Bitki doku kültürü kullanılarak biyotransformasyon işleminin gerçekleştirilmesi.
1974	Binding	Protoplastlardan üretilen <i>Petunia hybrida</i> haploidinin rejenerasyonu
1975	Gengenbach ve Green	<i>Helminthosporium maydis</i> 'in T toksisine karşı dayanıklı olan mısır kallus kültürlerinin <i>in vitro</i> pozitif seçilimi.
1976	M. Seibert	Kriyoprezerve edilmiş bir karanfil sürgününden çoğaltılan sürgünlerin rejenerasyonu.
1976	San Noeum	Arpa bitkisinin döllenmemiş yumurtalıklarının kültürlerinden ginogenik haploidlerin geliştirilmesi.
1977	Chilton ve arkadaşları	Agrobacterium tumefaciens'in Ti plazmidinin yalnızca bir bölümünün taç tümörü oluşumundan sorumlu olduğunun ispatlanması.
1978	Melchers ve arkadaşları	Domates ve patatesin birlikte somatik hibridizasyonu.

Tablo 1.9. (Devam) Bitki doku kültürünün tarihsel gelişimine katkı sağlayan araştırmacılar ve keşifleri

Yıl	Araştırmacı	Keşif
1981	P. J. Larkin, W. R. Scowcroft	Bitki ıslahı için hücre kültürlerinde gözlemlenen somaklonal varyasyon teriminin tanımlanması.
1982	F. A. Krens, L. Molondijk, G. J. Williams ve R. A. Schilperoort	Protoplastların içerisindeki DNA'nın verimi için polietilen glikol metodunun geliştirilmesi.
1982	J. L. Zimmerman	Protoplast füzyonu için elektrofüzyon tekniğinin geliştirilmesi.
1983	G. Pelletier, C. Primard, F. Vedel, F. Chetri, R. Remy, P. Rouselle ve M. Renard	Turp ve üzüm bitkisinde intergenerik sitoplazmik hibridizasyon denemeleri.
1984	J. W. Watts, J. M. King	Protoplastların geniş ölçekli elektrofüzyonu için basit bir method geliştirilmesi.
1984	N. Brisson, J. Paszkowski, J. R. Penswick, B. Gronenborn, I. Potyrkus ve T. Hohn	Seçilebilir markör tarafından yeri değiştirilebilen Karnabahar mozaik virüs genomunun transformasyonu.
1984	Horsch ve arkadaşları, De Block ve arkadaşları	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> kullanılarak alt kültüre alınan tütün yaprak disklerinden ilk transgenik bitkinin üretimi.
1985	K. Nomura ve A. Komamine	Protoplast yerine bir hücre süspansiyonundan elde edilen havuç üzerinde mikroinjeksiyon yöntemi kullanılarak hücre bölünmesi ve farklılaşmasının %50 frekansına ulaştırılması.
1986	R. Abdullah, E. C. Cocking ve J. A. Thompson	Somatik embriyogenez ile pirinç protoplastlarından üretilen normal bir yeşil pirinç bitkisinin sürekli olarak yeniden üretilebileceğinin ispatlanması.
1986	A. Kinsara, S. N. Patnaik, E.C. Cocking, J. B. Power	<i>Lycopersicon esculentum</i> ve <i>L. peruvianum</i> arasında somatik hibritlerin üretimi.
1987	R. Terada, J. Kyozuka, S. Nishibayashi ve K. Shimamoto	<i>Oryza sativa</i> ve <i>Echinochloa oryzicola</i> bitkilerinin somatik hibrit hücrelerinden rejenere bitkilerin üretimi.
1987	T. M. Klein, E.D. Wolf, R. Wu ve J.C. Sanford	Bitki transformasyonu için biyolistik gen transfer metodunun geliştirilmesi.
1987	Fujita ve Tabata	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> 'un hücre kültürlerinden şikonin üretimi için ticari proses geliştirilmesi.
1987	Barton ve arkadaşları	<i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisinden Bt geninin izolasyonu
1988	C. A. Rhodes, D. A. Pierce, I. J. Mettler, D. Mascarenhas ve J. J. Detmer	Elektroporasyon tekniği ile transgenik mısır bitkisinin üretimi.
1989	K. Schimamoto, R. Terada, T. Izawa ve H. Fujimoto	Transforme edilen protoplastlardan rejenere olan fertil transgenik pirinç bitkilerinin üretimi.
1990	A. Iida, M. Seki, M. Kamada, Y. Yamada ve Morikawa	Pinömatik partikül tabancası kullanılarak hızlandırılmış DNA-kaplı altın partikülleri ile kültüre alınan bitki hücrelerinin içerisine gen aktarımının yapılması.
1990	-	İnsan genom projesinin başlatılması.

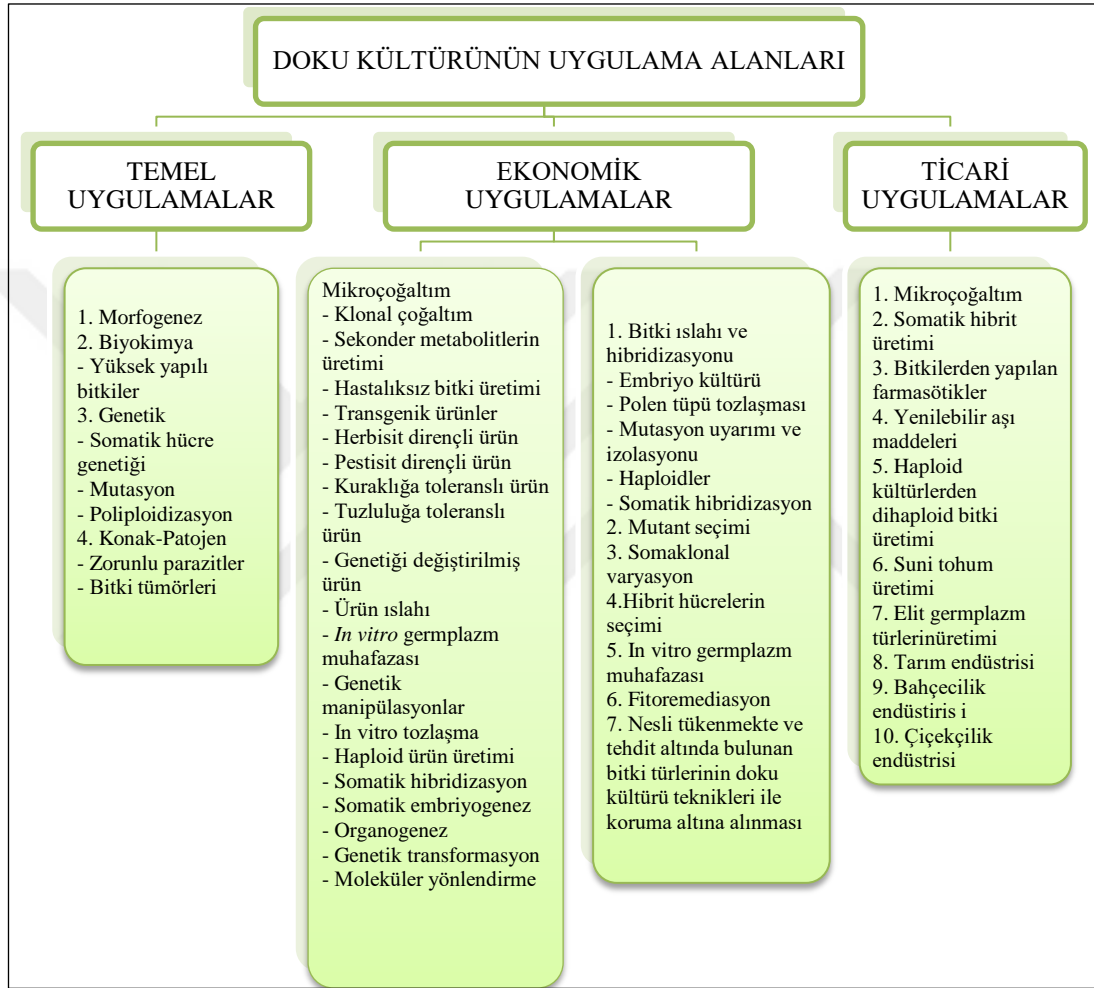
Tablo 1.9. (Devam) Bitki doku kültürünün tarihsel gelişimine katkı sağlayan araştırmacılar ve keşifleri

Yıl	Araştırmacı	Keşif
1991	G. Spangenberg, E. Freydl, M. Osusky, J. Nagel ve I. Potrykus	Sitoplastlar ve karyoplastlar kullanılarak parçalı genomların öngörülen transferi için metod geliştirilmesi.
1991	C. Sautter, H. Waldner, A. Galli, G. Neuhaus ve I. Potrykus	Mikroprojektilerin hızlandırılması için özgün bir metodun geliştirilmesi.
1993	E. Kranz ve H. Lorz	Mısır bitkisinin <i>in vitro</i> ortamda döllenmiş yumurtalarından kullanılarak oluşturulan tam bir bitkinin rejenerasyonunun tamamlanması ( <i>In vitro</i> fertilizasyon).
1994	Holm ve arkadaşları	Arpa bitkisinin <i>in situ</i> ortamdan alınan döllenmiş yumurtalarından tam bir bitkinin oluşumunun başarılması.
1995	Fleischmann ve arkadaşları	<i>Haemophilus influenzae</i> bakterisinin DNA sekansının tamamlanmasının genomik araştırmalar ile rapor edilmesi.
1995	Vos ve arkadaşları	AFLP tekniği ile DNA parmak izinin geliştirilmesi.
1997	Blattner ve arkadaşları	<i>E. coli</i> genomunun sekans analizi
1998	<i>C. elegans</i> sekanslama birliği	Çok hücreli bir organizmanın ( <i>Caenorhabditis elegans</i> ) genomunun sekans analizinin yapılması.
2001	İnsan genom projesi birliği	İnsan genomunun sekans analizinin başarılı bir şekilde tamamlanması.
2001	Venter ve arkadaşları	Genetiği değiştirilmiş ürün güvenliğinin kayıt altına alınması.
2001	Martineau	Virüs kaynaklı kıvrımlı RNA yapısı kullanılarak <i>A. tumefaciens</i> aracılı transformasyonun gerçekleştirilmesi.
2005	Yu ve arkadaşları	<i>Indica</i> ve <i>Japonica</i> pirinçlerinin genomları için tam bir genomun çifte sekanslamasının geliştirilmesi.
2007	James	Genetik olarak transforme edilen yaklaşık 140 angiosperm türünün rapor edilmesi.
2007	Vain	Kültür bitkilerine transfer edilen genleri ile bağlantılı olarak bitki genetik mühendisliğinin yükselişe geçmesi.
2007	Thorpe	Bitki doku kültüründeki tarihsel gelişimlerin revize edilmesi.
2008	Clarke ve arkadaşları	İlk kez noel yıldızı bitkisinde <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonun gerçekleştirilmesi.

### 1.3.2. Bitki doku kültürünün uygulama alanları

Totipotensi teorisi ile ortaya atılan -bitki hücrelerinin hızlı bir şekilde rejenerasyon kabiliyetleri- bitki biliminde olağanüstü bir dönemin başlangıcını simgelemektedir.

Totipotensi teorisinin kabul görmesinden bu yana bitki hücre ve dokularından oluşturulan kültürlerin kurulmuş olan sürekli deney düzeneklerinde yer alması günümüze kadar uygulamalı ve temel bilimlerin gelişmesinde büyük rol oynamıştır. Geçmişten günümüze kadar doku kültürü teknikleri ile yapılan çalışmalar, çeşitli alanların temelini oluşturabilecek nitelikte gelişim göstermiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1. 7. Bitki doku kültürünün temel ve uygulamalı bilimlerdeki uygulamaları (Bhatia, 2015'den düzenlenmiştir)

Bu alanlardan birisi olan bitki genetik mühendisliği, bitki doku kültürü ile üretilen bitkilerin moleküler yollarının anlaşılması, bitkilerin fizyolojik durumlarının incelenmesi ya da somaklonal varyasyon gibi *in vitro* koşullar altında bitki hücre ve dokularında gözlemlenen sıradışı oluşumların araştırılması, doku morfolojilerinin, biyokimyasal proseslerinin ve somatik hücre genetiğinin araştırılması, transgenезis, somatik hibridizasyon, mutant seçimi, somatik embriyogenez, organogenez gibi çalışmalarda doku kültürüne bağımlıdır (Meiri ve Altman, 1998).

### 1.3.3. Ticari süs bitkilerinin seri üretiminde doku kültürünün önemi

Geçmişten günümüze kadar özel günlerde hediye olarak sunulan, huzur ve ferahlık simgesi olarak park, bahçe, ev ve ofislerde dekoratif amaçlı kullanılan estetik görünümlü ve gösterişli yaprakları olan çiçekler insan hayatının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Kişi başına düşen tüketim miktarı arttıkça çeşitli bitki grupları (kesme çiçekler, kesme yeşillikler, saksılı salon bitkileri vb.) insanların kullanım amaçlarına göre kategorize edilerek geleneksel yöntemler ile çoğaltılmıştır. Arz-talep durumunda görülen hızlı yükseliş ve buna paralel olarak çiçekçiliğin endüstriyel boyutlara taşınması, bugün dev bir sektör olarak nitelendirilen çiçekçilik endüstrisinin oluşumunu sağlamıştır. (Van Tuyl ve diğ., 2014 ).

1960'lı yıllarda G. Morel'in *Dahlia* bitkisini kullanarak meristem kültürleri ile klonal çoğaltımı başarılı bir şekilde gerçekleştirmesinden sonra, orkideler üzerinde yapılan klonal çoğaltım denemelerinin de başarılı olması bitki doku kültürü ile vejetatif çoğaltımın geleneksel yöntemlere göre daha avantajlı olduğunun ispatıdır. Yapılan çalışmaların dönemin orkide endüstrisinde büyük yankı uyandırmış olması ile birlikte doku kültürü tekniği ticari alan ile etkileşime geçmiştir. Orkidelerden sonra glayöl, krizantem ve ökaliptus gibi çiçekler üzerinde de beklenen sonucu vermesi ile doku kültürü tekniğinin süs bitkilerinin çoğaltımı için vazgeçilmez bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Bu bağlamda, doku kültürü tekniklerinin aynı zamanda günümüze kadar çeşitli bilimsel çalışmalar ile desteklenmesi ve farklı sektörlerle ait biyoteknolojik üretimler (sekonder metabolitler, aşı maddeleri, antibiyotikler, terapötik proteinler, çeşitli farmasötik bileşikler vb.) ile etkileşimde olması, doku kültürünün başarısının dünya çapında kabul görmesini sağlamıştır (Dubey, 2005).

Gösterişli çiçeklere sahip olan süs bitkilerinin ticari ölçekte doku kültürü ile üretilmesi, dünya çapındaki sektöre yeni bir boyut kazandırmıştır. Mevsime bağlı kalınmaksızın yıl boyunca fazla sayıda üniform tipte hastaliksız bitkiciklerin üretilmesi, sektörde boy gösteren gelişmiş ülkeler arasında ciddi bir rekabete neden olmuştur. Geleneksel yöntemlerin dışına çıkarak *in vitro* teknikleri üretim yelpazelerine taşıyan gelişmiş ülkeler günümüzde doku kültürü laboratuvarlarına yatırım yaparak üretim kapasitesi ve verimliliğini arttırmayı başarmışlardır (Chen and Henny, 2008). Aynı zamanda *in vitro* teknikler ile seçilen elit varyantların

germplazm muhafazası ve hastalıklı çeşitlerin eliminasyonu mümkündür (Altman ve Loberant, 1998). Buna ek olarak, doku kültürü ile üretilen süs bitkilerine özgü patojenlerin tespit edilmesi ve farklı bilimsel çalışmalar ile desteklenerek bitki sağlığının korunması, temiz stoklama programlarının geliştirilmesi, konukçu direncinin kontrol altına alınması, biyolojik, kimyasal, çevresel ve kültürel kontrol çalışmaları ile birleşik zararlı organizma denetiminin düzenlenmesi mümkündür (Daughtrey and Benson, 2005). Ayrıca, moleküler çalışmalar ile doku kültürü teknikleri kombine edildiğinde *in vitro* mutagenез ile çiçek şekli, rengi, boyutu üzerinde ıslah çalışmaları yapılarak yeni kültürlerin oluşturulması ve çevre koşullarına toleranslı bitki ve bitki materyallerinin üretimi de yapılabilmektedir (Misra ve Saema, 2016). Bu hususta makro boyutta verilebilecek en çarpıcı örneklerden birisi, Amerika ve Japonya'nın yakın geçmişten bu yana *Lisianthus* süs bitkisi üzerinde ıslah çalışmaları yaparak çeşitli renk, şekil ve karakterlere sahip 300'den fazla kültürünü dünya çapındaki sektöre kazandırmış olmalarıdır. Yeni oluşturulan hibritlerin daha fazla ilgi görmesi, *Lisianthus* süs bitkisinin özellikle Avrupa mezarlarında ilk on listesine girmesini sağlamıştır (Harbaugh ve diğ., 2000).

#### **1.3.4. Bitki doku kültürünün avantaj ve dezavantajları**

Bitki doku kültürü mikroçoğaltım, somatik hücre genetiği ve transgenik bitki üretimi olmak üzere ilk olarak üç büyük saha ile ön plana çıkmaktadır. Geleneksel bitki çoğaltımı ile kıyaslandığında doku kültürü ile üretimin geleneksel üretime göre üstün gelen birtakım avantajları bulunmaktadır. Özellikle büyümenin erken evrelerinde orijinal germplazmın küçük bir miktarı kullanılarak yeni genotiplerin geniş ölçekli hızlı çoğaltım potansiyeli ve virüs ya da bakteriden arındırılmış hastaliksız bitki materyallerinin üretimi bu avantajlardan sadece birkaçı olarak örneklendirilebilir.

1970'li yılların başlarında süs bitkileri gibi özellikle ticari önemi olan bitki gruplarının klonal çoğaltımları üzerine yoğunlaşılması ile birlikte *in vitro* ortamda bitki çeşitliliğinin önemli ölçüde artmasına sebep olmuştur. Tekniğin güvenilirliği sayesinde dönemin çalışmacıları doku kültürünü ticari alana taşıyarak yaklaşık olarak 500 milyona yakın bir rakam aralığında yıllık üretim yapmaya başlamışlardır. Bu üretimin yaklaşık %50-75'i süs bitkilerine aittir. Dönemin araştırmacıları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli yayınlar çıkartılmaya başlayarak doku kültürü

tekniki ile yapılan üretimde istenilen ve istenmeyen durumlar rapor edilmeye başlamıştır (Altman ve Loberant, 1998). Günümüzde doku kültürü; kısa bir zaman içerisinde bitki türlerinin seçilen eksplantlarından çok sayıda üretim yapılabilmesine, virüs, bakteri ya da mantar kaynaklı kontaminasyonlarda eliminasyon ile hastalısız bitki materyalinin üretilmesine, gerçeğe-uygun-modellenerek klonal çoğaltımı yapılan materyalin uzun süreli stok kültürlerinin yapılabilmesine (Altman ve Loberant, 1998), stok kültüre alınan materyallerin belirli periyotlar ile ortamları yenilenecek uzun süre sağlıklı bir şekilde muhafaza edilebilmesine, bitki materyallerinin mevsime bağlı olmaksızın yıl boyu seri üretimlerinin yapılabilmesine, biyokimyasal reaksiyonlar ya da biyotransformasyon işlemleri için bitki hücreleri üzerinde immobilizasyon denemelerinin yapılabilmesine, aynı zamanda çok sayıda mutajenin etkilerinin çalışılmasına, farmasötik ürün üretimi açısından bitki özütleri veya yapılarının sağlıklı ve güvenilir bir şekilde koruma altına alınabilmesine, bunun yanında kuraklığa, tuzluluğa ve çeşitli çevre kaynaklı streslere karşı toleranslı bitkilerin üretilmesine ve sekonder metabolit üretimi için istenilen özellikte bitki üretimine imkan vermektedir (Bhatia, 2015). Tüm bu özellikler doku kültürünün diğer çalışma alanlarını beslediğini ve gerek bitki bilimi açısından gerekse de yan sanayi dallarına ham madde niteliği taşıyabilecek materyallerin üretiminin devamı açısından oldukça avantajlı bir teknik olduğunu gözler önüne sermektedir (Meiri ve Altman, 1998). Açık alanda yetiştirilen bitkilerle göre doku kültürü ile üretilen bitkilerin bulunduğu ortamın belirli periyotlar ile besleyici öğelere bağımlı olması, bazı bitki türlerinde kallus oluşumunun çok uzun zaman alması ya da kallus oluşumunun tam anlamıyla gözlemlenmemesi, *in vitro* ortamda üretilen bitkiciklerin ilk başta minyatür halde olması ve bazı bitkiciklerin morfolojileri üzerinde inkübasyon sonrası istenmeyen oluşumların (somaklonal varyasyon vb.) ön plana çıkması, aklimatizasyon sürecine kadar geçiş döneminden önce *in vitro* koşullar altında kapalı kaplar içerisinde inkübasyonları tamamlanmaya kadar kalmak zorunda olmaları ve ototrofik olarak fonksiyonlarını tam anlamıyla yerine getirememeleri, *in vitro* bitkiciklerin yüksek nispi nem altında kontaminasyon riskine karşı hassas olması, uzun süren kültür periyotlarında su kaybı yaşama olasılıklarının bulunması doku kültürünün birtakım dezavantajlara sahip olduğunu ifade etmektedir (Altman ve Loberant, 1998; Bhatia, 2015).

### 1.3.5. Bitki doku kültürü teknikleri

Bitki doku kültürü, temel olarak bitki materyalinin *in vitro* kültürü ve izolasyonundan sorumlu organize olmuş hücrelerin büyümesi ve ileri düzeyde farklılaşmadan sorumlu olan organize olmamış hücrelerin büyümesini sağlayan manipülasyon tekniklerinden oluşmaktadır.

Apikal meristemler, birincil yapraklar, genç çiçek tomurcukları ya da ufak yapılı meyveler gibi bitki organlarının kültür ortamına alınarak korunan yapıları ile sürekli büyümenin sağlanabilmesi için organize olmuş hücrelerin büyütülmesi esaslı bir yöntemdir. Organ uyarımı gerçekleştiğinde büyüme de paralel olarak tutarlı bir şekilde gelişim göstermektedir. *In vitro* ortamda organ oluşumu, eksplant adı verilen kültür ortamındaki küçük bir doku parçası üzerinde ya da inkübasyona alınan organize olmamış dokuların kültür periyodu sürecince gözlemlenebilmektedir. Bu süreç gelişim formuna bağlı olarak organogenez ya da morfogenez olarak bilinen “*de novo* (yeniden)” organ oluşum sürecidir.

Sürekli olarak büyümesi sağlanan organize formdaki kültür tiplerine genel bir kavram olarak “organ kültürü” denilmektedir. Yaprak primordiyası, olgunlaşmamış çiçekler ve meyveler gibi belirli yapıların tam bir bitkiden aseptik izolasyon yolu ile elde edilmesini ifade etmektedir. Bitki çoğaltımında kullanılan organ kültürleri 5 farklı sınıfta incelenebilir:

- (i) Meristem kültürleri, bir yada iki yaprak primordiyası olmayan ya da her biri apikal meristemik tepeciğe sahip olan çok küçük sürgün apikallerinin büyütüldüğü kültür tipidir. Meristem kültüründe sürgün uçları tipik olarak tek bir sürgün oluşturacak şekilde büyüme gösterirler.
- (ii) Sürgün ucu ya da sürgün kültürleri, meristem kültürlerinde kullanılan sürgün tepeliklerinden daha büyük, birkaç adet yaprak primordiyasına sahip, tomurcuklar ya da sürgün uçlarından alınarak kurulan kültür tipidir. Kullanılan sürgün tepelikleri genellikle çoklu sürgün oluşturacak şekilde büyüme gösterirler.
- (iii) Nod kültürleri, lateral tomurcuklardan ayrılan veya gövde parçalarından ayrılan nodal segmentlerin kullanılması ile kurulan kültür tipidir.
- (iv) İzole kök kültürleri, köklerin büyümesi sürgünlerden bağımsızdır. Kültürleri eksplantın büyüme durumuna göre dallanmış kök yapıları gözlemlenebilmektedir.



(v) Embriyo kültürleri, olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış tohum veya meyvelerden izole edilen zigotik embriyolar kullanılarak oluşturulan kültür tipidir.

Farklılaşmaya yönelimi olan ve belirli bir amaç için özelleşebilen hücrelerin bir araya gelerek belirli bir yapıyı oluşturmaları ile meydana gelen organların oluşumu organize olmayan bir büyümenin sonucu olarak nitelendirilebilir. Organize olmamış hücre büyümesi doğada nadiren rastlanan bir oluşum olmasına rağmen, *in vitro* kültürlerde yer alan bitki eksplantlarında sıkça meydana gelen bir oluşumdur. Organize olmayan büyüme, sınırlı sayıda özelleşebilen ve farklılaşma yetenekleri olan hücreleri içeren sağlıklı bir bitkiden izole edilen eksplantlarda bulunan hücrelerin biraraya gelerek kümeleşmesi ile oluşturdukları yapıları ifade etmektedir. Farklılaşmış hücre tiplerinin oluşumu yalnızca *in vitro* ortamda sınırlı bir derecede kontrol altına alınabilmektedir. Fakat organize olmamış organlar sıvı ya da katı kültür ortamları içerisinde uzun periyotlarda alt kültürlerle alınarak çoğaltılabilmektedir. Farklılaşma kavramı bitki biliminde birbiri ile ilişkili olan organların morfogenez yolu ile oluşumu olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.8).

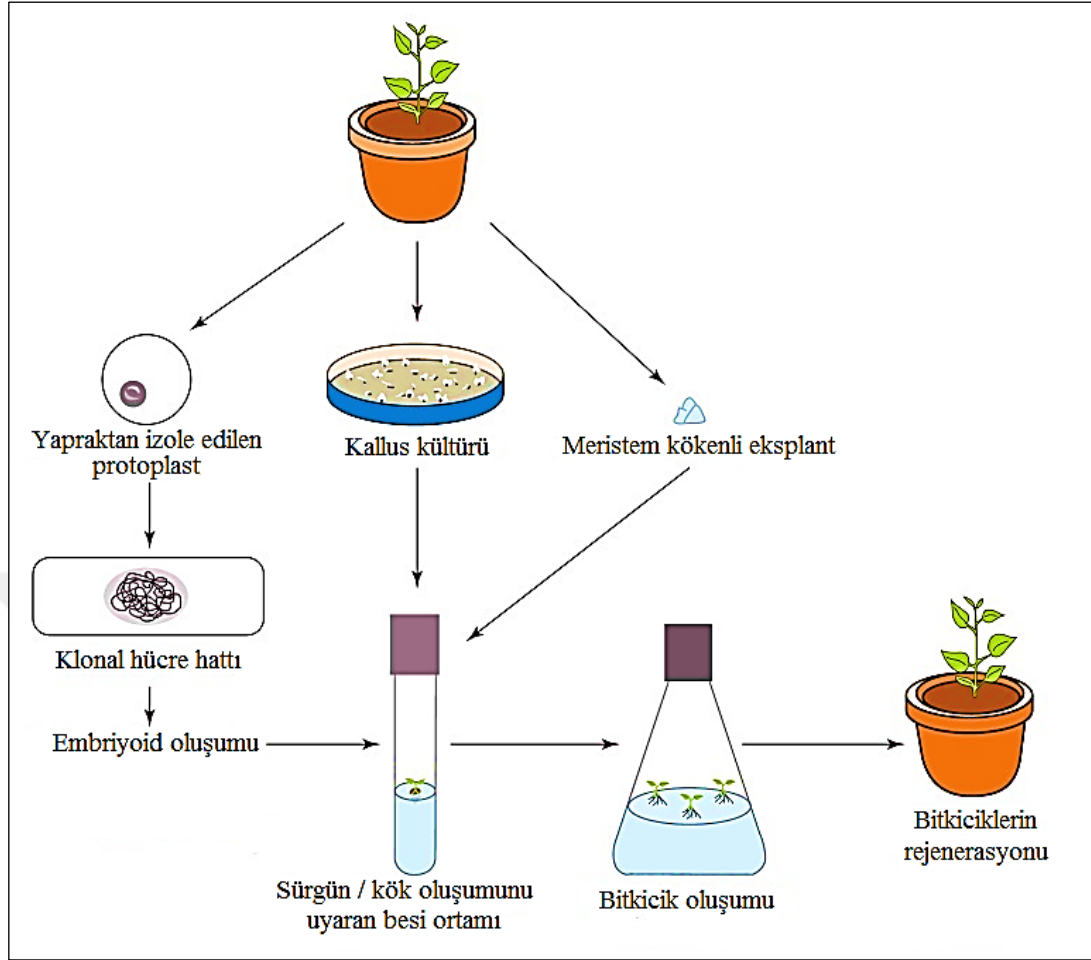
*In vitro* ortamda organize olmamış hücre kümelerinin kullanıldığı kültür tipleri 4 farklı sınıfta incelenebilir:

(i) Kallus veya doku kültürlerinde, önceden kültüre alınmış hücreler, bitki doku parçaları veya küçük bitki organları kullanılarak yapılarında bulunan hücrelerin düzensiz ve organize olmamış şekilde büyümesi ile hücre yığınları oluşturulmaktadır.

(ii) Süspansiyon veya hücre kültürleri, sıvı ortam içerisinde çalkalama yöntemi ile dağıtılan ve havalandırılan küçük hücre yığınları veya bitki hücreleri kullanılarak oluşturulan kültür tipidir.

(iii) Protoplast kültürleri, hücre çeperlerinden izole edilen bitki hücreleri kullanılarak oluşturan kültürlerdir.

(iv) Anter kültürleri, olgunlaşmamış polen mikrosporlarını içeren anterlerin kültüre alınması ile oluşturulmaktadır. Anter kültüründeki amaç, direkt olarak çoğunlukla polenden bazen de organogenez aracılığı ile kallustan somatik embriyoların elde edilmesi ile haploid bitki üretmektir (George ve diğ., 2008).



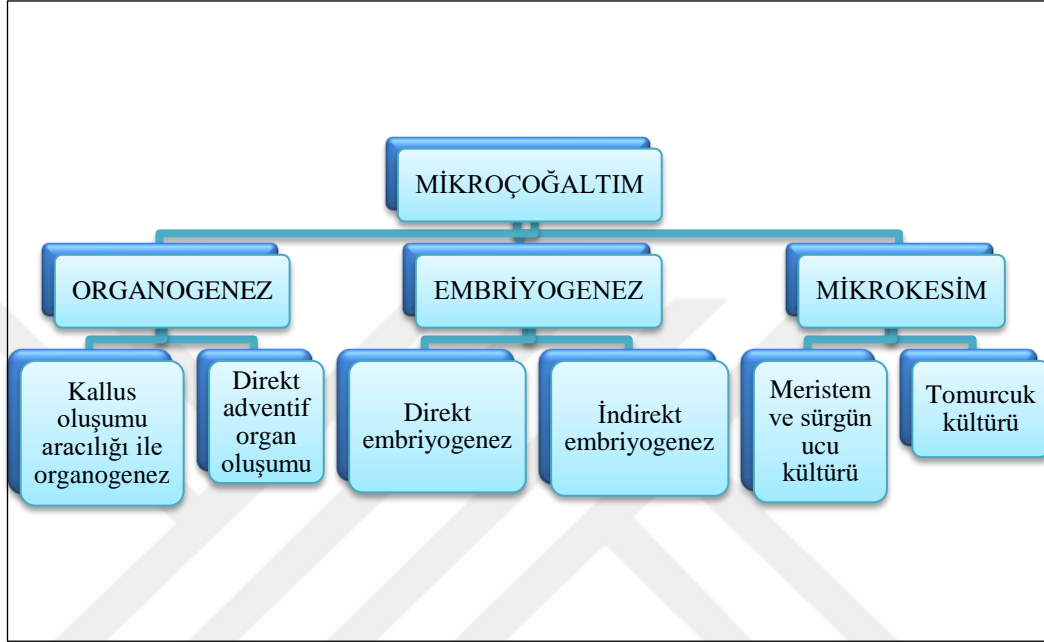
Şekil 1. 8. Doku kültüründe üç farklı metod ile bitkicik oluşumunun genel şeması (Arteca, 2015)

Mikroçoğaltım *in vitro* kültür teknikleri (Şekil 1.9) kullanılarak seçilen bir genotipin gerçeğe-uygun-modellenerek çoğaltılmasıdır (Debergh ve Read, 1991). Bitkilerin mikroçoğaltımı dünya çapında milyar dolarlık kazanç payı sahip birçok endüstrinin yapıtaşıdır. Günümüzde her ne kadar bitki biyoteknolojisi ile ön plana çıkmış olsa da, geniş ölçekli birçok ticari üretimde söz sahibidir. Günümüze kadar 1000'den fazla bitki türünün mikroçoğaltımı başarıyla gerçekleştirilmiştir (Murashige, 1989). Geçmişten günümüze özellikle süs bitkilerinin üretimi ile popülerliğini korusa da (Ammirato ve diğ., 1990), birçok tarımsal ürünün, tıbbi ve aromatik bitkilerin çoğaltımı (Bajaj ve diğ., 1988) ve çoğaltımı zor olan ağaçsı formların üretiminde de başarısını korumaktadır (Bajaj, 1986).

Debergh ve Maene (1981), mikroçoğaltım işlemini 5 aşamada tanımlamaktadır:

1. Aşama: Hazırlık aşaması. Donör bitki seçimi ve hazırlanması,

2. Aşama: Aseptik kültürün kurulması,
3. Aşama: Uygun eksplantların çoğaltımı,
4. Aşama: *In vitro* sürgün çoğaltımı ve köklendirilmesi,
5. Aşama: Bitkiciklerin *in vitro* ortamdan *ex vitro* ortama aktarılması.



Şekil 1. 9. Doku kültüründe kullanılan mikroçoğaltım çeşitleri (Bhatia, 2015'den düzenlenmiştir)

Mikroçoğaltım işlemi, bitki türüne ve kültürel şartlara bağlı olarak 4 temel metod ile uygulanmaktadır (Sathyanarayana ve Varghese, 2007):

1. Aksiller sürgün çoğaltımı (sürgün kültürü),
2. Nod kültürü,
3. Sürgün organogenezi aracılığı ile adventif sürgün oluşumu,
4. Somatik embriyogenez aracılığı ile adventif sürgün oluşumu.

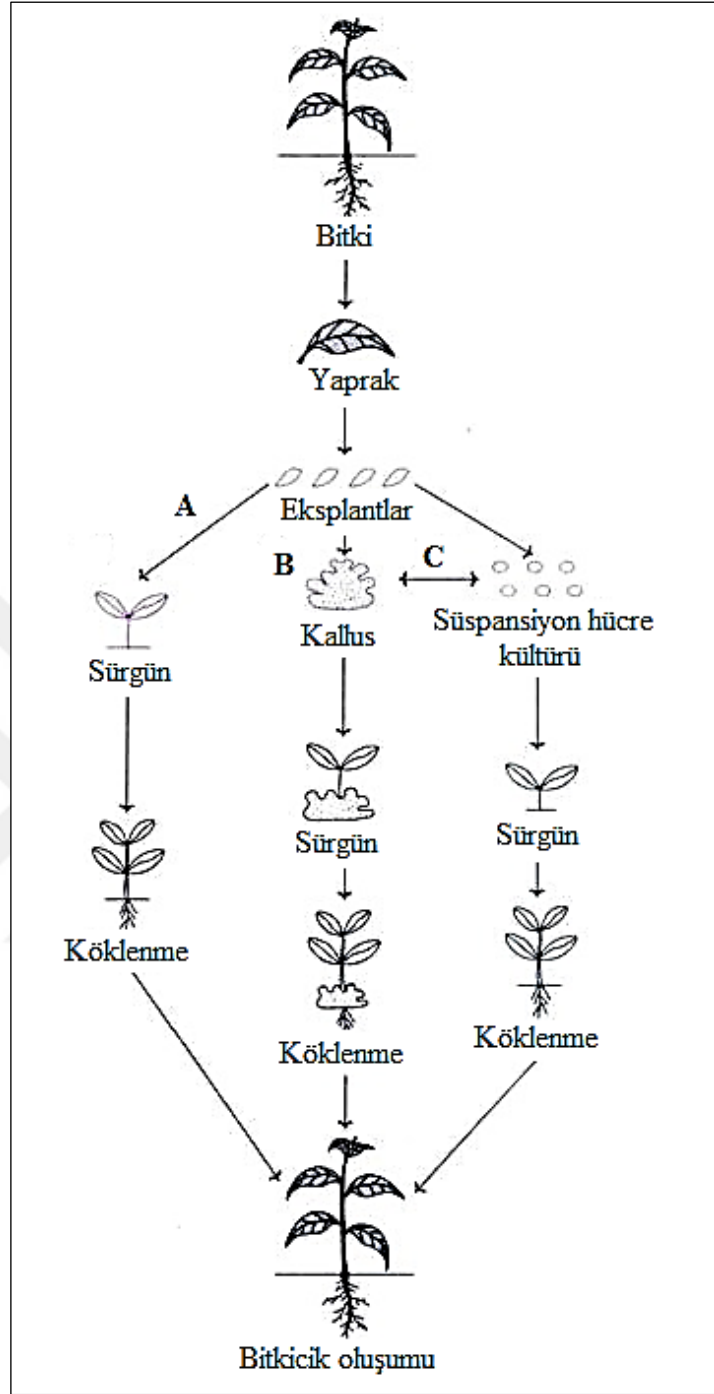
#### 1.3.5.1. Organogenez metodu

Organogenez metodu bitki doku kültüründe sık kullanılan ve hücre bölünmesini ve büyümesini, hücre ve doku farklılaşmasını ve bütün bir organ oluşumunun düzenlenmesini sağlayan *in vitro* gelişim yollarından biridir (Irish, 2008). Organogenez kelime anlamıyla kontrollü çevresel şartlar altında iyi tanımlanan bir besi ortamı içerisinde bir hücrenin, dokunun, izole protoplastın ya da mikrosporun farklılaşarak adventif organ ya da primordiya oluşturma süreci olarak tanımlanabilir.

Organogenez prosesi direkt (inoküle edilen eksplantlardan direkt olarak) ve indirekt (kallus oluşum fazından sonra indirekt olarak) olmak üzere iki farklı yoldan oluşmaktadır (Ganapathi ve diğ., 2003). Organogenez metodunda uygun bir eksplant seçilerek, kültür ortamı ve çevresel faktörlerinin manipulasyonu aracılığı ile hücre, doku ya da organ gelişimi kontrol altına alınabilmektedir (Evans ve diğ., 1981; Thorpe, 1990). Eksplant seçimi, besi ortamı bileşenleri ve fiziksel şartların kontrolü, sürecin tamamlanabilmesi açısından kritik önem taşımaktadır (Brown ve Thorpe, 1986).

Direkt adventif organ oluşumunda, yüksek yapıları bitkilerin somatik dokuları belirli koşullar altında rejenere olabilen adventif bitkiler oluşturabilmektedir (Şekil 1.10). Adventif tomurcuklar bir bitki organı ya da kısmından direkt olarak meydana gelebilmektedir. Sağlıklı bitkilerin kökleri, yaprakları, soğanları ya da diğer organları kullanılarak adventif sürgün oluşturulması doku kültüründe yaygın olarak kullanılan bir çoğaltım metodudur. Bu metod özellikle otsu yapıda olan bitki türlerinin çoğaltımı için oldukça elverişlidir. Kallus oluşumu ile organogenezde birçok bitki türünün kotiledon, hipokotil, gövde, yaprak, sürgün tepeciği, kök, genç çiçekler, çiçek petalleri, petiyoller, embriyo gibi yapılarından seçilen eksplantlar belirli koşullar altında kültüre alınarak kallus oluşumunda kullanılırlar. Seçilen eksplantların mitotik olarak aktif hücrelerden oluşması sağlıklı bir kallus kültürünün kurulması için gereklidir.

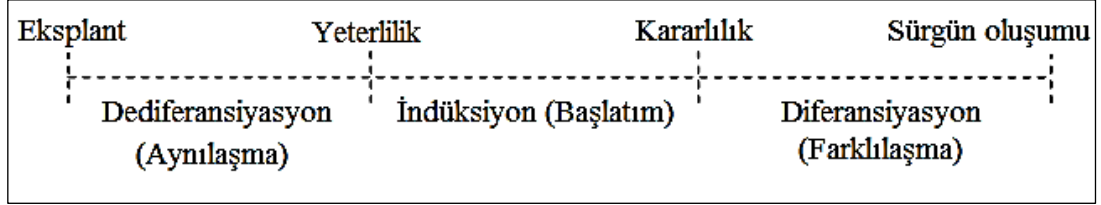
Düzensiz hücre kümelerinin biraraya gelmesi ile oluşan kallus yapıları *in vitro* ortamda belirli koşullar altında uygun bir besi ortamı içerisinde manipule edilerek farklı eksplantlara dönüştürülebilirler (Chawla, 2004). Kallus yapısı, yaralanma ile anaç dokunun ince duvarlı parankimatöz yapıda olan hücrelerinin biraraya gelerek dağınık hatlar oluşturması ile meydana gelmektedir (Bhatia, 2015).



Şekil 1. 10. Organogenez metodu ile bitkilerin mikroçoğaltım aşamaları. A: Direkt organogenez. B: Kallus oluşumu ile indirekt organogenez. C: Süspansiyon hücre kültürü aracılığı ile indirekt organogenez (URL-20'den düzenlenmiştir)

### 1.3.5.2. Organogenezin gelişim evreleri

*De novo* sürgün oluşumunda meydana gelen hücresel olaylar Şekil 1.11’de gösterilmiştir.



Şekil 1. 11. Organogenezde sürgün oluşumunda meydana gelen hücresel olaylar (Shen, 2007)

Sürgün oluşumunda genel olarak dediferansiyasyon (aynılaştırma), indüksiyon (başlatım) ve diferansiyasyon (farklılaştırma) olmak üzere 3 evre görülmektedir. Aynılaştırma durumu, eksplant içeriğindeki farklılaşmış hücrelerin aynı hale gelmesini, hücrelerin daha az iş yükü ile daha fazla elastik hale gelebilmelerini ve biçimlenebilme kabiliyetlerini kullanarak gelişme durumlarını tamamlamalarını ifade etmektedir. İndirekt sürgün organogenezinde eksplantın yapısında bulunan hücreler yeni sürgünleri oluşturacak olan kallus oluşuna doğru aynılaştırırken, direkt sürgün organogenezinde eksplant dokularında bulunan bazı hücreler ilk baştaki yapıyı oluşturmak üzere direkt olarak aynılaştırılır. Aynılaştırmanın bir sonucu olarak, eksplantın yapısındaki aynılaştırılan bazı hücreler diğerlerinden farklı olarak yetkin bir biçimde spesifik uyarıcı sinyallere karşı yanıt verebilirler. Bitki büyüme düzenleyicileri yetkin hücreler tarafından algılanan spesifik uyarıcı sinyal çeşitlerinden biridir (Shen, 2007).

İndüksiyon (başlatım) fazında primordiyal üretim için tamamen kararlı hale gelen hücreler yetkin hale erişmektedir ve indüksiyon evresi boyunca yetkin özellikteki bir hücre ya da hücrelerin bir grubu gelecek olan tetikleyici bir sinyal uyarısına karşı kendine özgü bir gelişim göstererek yolaktaki akıbetlerini belirlerler. İndüksiyon fazının sonunda hücreler artık tamamen kararlı haldedir ve gelecek olan herhangi bir sinyale karşı hazırlıklı olarak sürgün organogenezini gerçekleştirebilecek durumdadır (Schwarz ve Beaty, 2000). Morfolojik farklılaşmanın ve yeni oluşmaya başlayan organın gelişimi farklılaştırma evresinde gözlemlenmektedir. Gelişim evreleri üzerinde birtakım fiziksel ve kimyasal faktörler görev almaktadır.

### 1.3.5.3. Organogeneze etki eden faktörler

1. Hijyenik koşullar: *In vitro* denemede kullanılacak olan kültür kapları ve diğer gereçlerin, hazırlanan besi ortamının otoklav içerisinde 121°C’de 15-20 dakika sterilizasyonlarının yapılması gerekmektedir. Isıya dayanıksız olan termolabil besi içeriklerinin filtre sterilizasyonu ile steril hale getirilmesi kritik önem taşımaktadır. Buna ek olarak, seçilen eksplantın sterilizasyonu *in vitro* organogenez sürecinin sağlıklı bir şekilde tamamlanabilmesi için en önemli aşamadır (Tablo 1.10). Eksplant steril şartlarda çimlendirilen bir bitkicikten alınmayıp, dış ortamdan seçilerek *in vitro* ortama nakledilecek ise, bitki eksplantının yüzey sterilizasyonu için doku ölümüne neden olmayacak bir konsantrasyon aralığında ve süresinde belirlenerek aşağıda belirtilen kimyasallar uygulanabilmektedir:

Tablo 1. 10. Eksplantların yüzey sterilizasyonunda yaygın olarak kullanılan sterilizasyon malzemeleri (Sathyanarayana ve Varghese, 2007)

Sterilizasyon malzemesi	Konsantrasyon (%)	Sterilizasyon süresi (dakika)
Cıva klorür	0,01-0,1	0,5-10
Kalsiyum hipoklorit	9-10	5-30
Sodyum hipoklorit	2	5-30
Hidrojen peroksit	10-12	5-15
Brom suyu	1-2	2-10
Gümüş nitrat	1	5-30
Gümüş klorür	0,1-1	2-30
Benzalkonyum klorür	0,01-0,1	5-20

2. Besi ortamı bileşenleri: Kültüre alınan eksplantların büyüme ve gelişmesini sağlayan besin bileşenlerinin seçimi uygun bir besi ortamının oluşturabilmesi için elzemdir. Farklı eksplant tipleri farklı içerikli besi ortamlarına ihtiyaç duyabilmektedir. Bu nedenle mikro ve makro besin tuzları, şeker oranları, vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi besi içeriklerinin formülasyonunun en uygun şekilde hesaplanması gerekmektedir (Jha ve Gosh, 2005). Bitki büyüme düzenleyicileri genellikle düşük konsantrasyonlarda (0,001-10 µM) etkin bir sonuç göstermektedirler (Tablo 1.11). Sürgünlerden ya da köklerden seçilen eksplantların, yarı katı besin ortamındaki embriyoların ve sıvı ortam kültürlerinin başlangıç ve gelişim düzeylerini kontrol altına alabilmektedir (Beyl, 2011).

Tablo 1. 11. Bitki büyüme düzenleyicileri (Beyl, 2011'den düzenlenmiştir)

BBD	Kısaltma	Molekül ağırlığı	Bitki büyüme düzenleyicilerinin mg/L birimindeki denklik konsantrasyonları				Bitki büyüme düzenleyicilerinin $\mu$ M birimindeki denklik konsantrasyonları			
			0,1	1,0	10,0	100,0	0,1	0,5	1,0	10,0
Absisik asit	ABA	264,3	0,0264	0,264	2,64	26,4	0,38	1,89	2,78	27,8
Benziladenin	BA	225,2	0,0225	0,225	2,25	22,5	0,44	2,22	4,44	44,4
Dihidrozeatin	2hZ	220,3	0,0220	0,220	2,20	22,0	0,45	2,27	4,53	45,3
Giberellik asit	GA <sub>3</sub>	346,4	0,0346	0,346	3,46	34,6	0,29	1,44	2,89	28,9
İndolasetik asit	IAA	175,2	0,0175	0,175	1,75	17,5	0,57	2,85	5,71	57,1
İndolbütirik asit	IBA	203,2	0,0203	0,203	2,03	20,3	0,49	2,46	4,90	49,0
IBA (potasyum tuzu)	K-IBA	241,3	0,0241	0,241	2,41	24,1	0,41	2,07	4,14	41,4
Kinetin	Kin	215,2	0,0215	0,215	2,15	21,5	0,46	2,32	4,65	46,5
Naftalenasetik asit	NAA	186,2	0,0186	0,186	1,86	18,6	0,54	2,69	5,37	53,7
Pikloram	Pic	241,5	0,0242	0,242	2,42	24,2	0,41	2,07	4,14	41,4
Thidiazuron	TDZ	220,3	0,0220	0,220	2,20	22,0	0,45	2,27	4,54	45,4
Zeatin	ZEA	219,2	0,0219	0,219	2,19	21,9	0,46	2,28	4,56	45,6
2-izopentenil adenin	2-İP	203,3	0,0203	0,203	2,03	20,3	0,49	2,46	4,92	49,2
2,4-Diklorofenoksi asetik asit	2,4-D	221,04	0,0221	0,221	2,21	22,1	0,45	2,26	4,52	45,2

Bitkilerin bünyesinde doğal olarak sentezlenen, büyüme ve gelişme ile birlikte diğer fizyolojik olayların da kontrolünü sağlayan, üretildiği bitki kısımlarından diğer kısımlara taşınabilen ve taşındığı kısımlarda etkin roller üstlenebilen organik moleküller “bitki büyüme düzenleyicileri” olarak adlandırılmaktadır (Öktüren ve Sönmez, 2005; Algül ve diğ., 2016). Bitki büyüme düzenleyicileri genel olarak 5 ana sınıfa ayrılmaktadır:

(i) Oksinler: Hücre büyüme ve gelişmesi, hücre duvarı asitlenmesi, hücre bölünmesinin uyarılması, organize olmayan doku (kallus) ya da belirli organ (genellikle kök) oluşumunu sağlayan meristemlerin organizasyonu, vasküler farklılaşmanın düzenlenmesi, organize olan dokularda apikal dominansın sürdürülmesi, yaprak ve meyve dökülmesi, kök oluşumunun düzenlenmesi, yaprak senesensinin geciktirilmesi ve meyve olgunlaşmasının sağlanması gibi hücresel süreçler üzerinde oksinler kilit rol oynamaktadır (Bandurski ve diğ., 1995; Gaspar ve diğ., 1996).



(ii) Sitokininler: Genellikle oksinler ile birlikte kullanıldığında hücre bölünmesini uyarması ve lateral tomurcuk dormansisinin açığa çıkartması, sitokininlerin kültür ortamı için elzem olmasının iki önemli özelliğidir. Buna ek olarak, sitokininlerin adventif tomurcuk oluşumunu uyardığı da bilinmektedir (Krikorian, 1995). Hücre bölünmesinin düzenlenmesi oksin ve sitokininlerin ortak eylemleri ile sağlanmaktadır. Her ikisi de hücre döngüsünün farklı fazları üzerinde etki göstermektedirler. Sitokininler mitoz ve sitokinez süresince meydana gelen bazı olayların kontrolünü sağlarken, oksinler de DNA replikasyonu üzerinde etkili olmaktadır (Vesely ve diğ., 1994). Bundan dolayı sağlıklı bir kültür ortamının kurulabilmesi için oksin ve sitokinin dengesinin makul şekilde ayarlanması gerekmektedir. Ayrıca sitokininler, sağlıklı bitkilerde lateral tomurcuk büyümesi ve yapraklanmanın düzenlenmesi, yaprak senesensinin geciktirilmesi, klorofil sentezinin düzenlenmesi ve kloroplast gelişimine katkı sağlaması ile bilinmektedir (Kuhnle ve diğ., 1977).

(iii) Giberellinler: Özellikle uzun gün bitkilerinde ya da soğuk ortama adapte olabilen türlerde çiçeklenmenin düzenlenmesi, bazı konifer türlerinde kozalak oluşumunu sağlaması, tohum çimlenmesi ve gövde uzaması üzerine etkili olmaktadır. Bazı giberellin türevleri spesifik enzimlerin aktivitesi ve biyosentezinin artması ya da azalmasına neden olabilmektedir (Sponsel, 1995; Gasper ve diğ., 1996). Bazı türler üzerinde adventif kök ya da sürgün oluşumunu yavaşlatıcı etki gösterse de, oluşumunu tamamlamak üzere şekillenen organların büyüme ve gelişmeleri için elzemdir (Thorpe ve Murashige, 1970). Besi ortamına giberellin eklenmesi, sürgün uzamasında arttırıcı etki gösterebilmektedir (Fry ve Street, 1980).

(iv) Absisik asit: Genellikle tohum ve tomurcuk dormansisinin sürdürülmesinde ve hücre uzamasının yavaşlatılmasında aktif rol oynadığından dolayı inhibitör etkisi ile ön plandadır. Stomaların kapanmasında, köklerden su ve iyon alınımının kontrolünde, diğer hormonlar ile kombine edildiğinde yaprak dökülmesi ve senesensinin düzenlenmesinde, tohum olgunlaşması üzerinde (gelişmeye başlayan tohumlarda depo proteinlerinin sentezinin indüklenmesinde), etilen ile kombine edildiğinde birçok çevresel strese karşı bitkide yanıt oluşturulmasında, etilen ve jasmonik asit ile kombine edildiğinde böceklere karşı savunma mekanizmasının oluşturulmasında kilit rol oynamaktadır. Absisik asit giberellinlerin sistemleri ile antagonistik olarak çalışmaktadır (Walton ve Li, 1995). Doku kültürü

uygulamalarında, özellikle kallus büyümesi üzerinde ve organogenez çalışmalarında eksplantların bulunduğu besi ortamlarında düşük konsantrasyonlarda ilave edildiğinde pozitif sonuç verirken, yüksek konsantrasyonlarda kullanılması inhibitör etkisinin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Roberts ve diğ., 1990). Buna ek olarak, sürgün büyümesi üzerinde inhibitör olarak, kök büyümesi üzerinde aktivatör olarak görev almaktadır (Davies, 2004).

(v) Etilen: Diğer hormonlar ile birlikte kullanıldığında, etilen gazı meyve olgunlaşması, senesens ve yaprak dökülmesi üzerinde etkilidir. Etilen gazının yüksek konsantrasyonlarda uygulanması mikrotübül ve mikrofibril yapılarında değişikliğe neden olarak hücre uzamasını engellemektedir (Steen ve Chadwick, 1981). Doku kültüründe alt kültürlerin periyoduna bağlı olarak etilen büyümeyi uyarabilmekte ya da inhibe etmekte ve *in vitro* kültürlerdeki organogenezi etkilemektedir (Huxter ve diğ., 1981). Etilen kallus büyümesini, süspansiyon kültürlerinde gövde ve kök uzamasını, aksiller ve adventif tomurcuk oluşumunu, köklenmeyi ve embriyogenezi spesifik olarak etkilemektedir (Gaspar ve diğ., 1996). Buna ek olarak, apikal kıvrımların devamlılığı, yaralanma ya da hastalanma durumlarında savunmaya karşı uyarım, adventif sürgün oluşumu, yaprak ve meyve dökülmesi, bazı bitkilerde çiçeklenmenin uyarılması, çiçek açımı, çiçek ve yaprak senesensi ve meyve olgunlaşması üzerinde de aktif rol oynamaktadır (Davies, 2004).

3. Eksplant Seçimi: Eksplant tipi organogenezin başarısında kritik rol oynamaktadır. Olgunlaşmamış dokulardan alınan tam olarak farklılaşmamış eksplant tipleri direkt organogenez ile kolayca rejenere olabilmektedir. İleri derecede farklılaşmış dokulardan alınan eksplantlar *in vitro* ortama karşı daha hassas olduklarından dolayı genellikle indirekt organogenez metodu ile kolayca manipüle edilebilmektedirler (Shen, 2007). Birçok bitki türünde, bitkinin çeşitli organlarından izole edilen eksplantların büyüme ve rejenere olma oranları farklılık gösterebilmektedir. Belirlenen tekniğe göre uygun eksplant seçilmediği takdirde mikrobiyal kontaminasyon riski de artmaktadır. Hücrelerinin yüksek oranda bölünme kabiliyetleri olduğundan dolayı yaygın olarak en çok kullanılan doku eksplantları bitkilerin meristematik uçlarından (gövde ucu, aksiller tomurcuk ucu ve kök ucu) seçilmektedir (Akin-Idowu ve diğ., 2009). Dünya genelinde doku kültürü çalışmalarında mikroçoğaltım aşamasında en çok kullanılan eksplant tipi aksiller

tomurcuk olarak kayıtlarda yer almaktadır. Yapraklardan seçilen eksplantlar ise kallus oluşumunda kullanılmaktadır (Kaviani, 2015).

4. Çevresel Etmenler: Kültür odasındaki çevresel faktörler dokuların büyüme ve farklılaşması üzerinde geniş yelpazeli bir etkiye sahiptir. Tüm eksplant tipleri kontrol edilebilen sıcaklık, nem, aydınlatma ve hava sirkülasyonu koşulları altında kültür odasında inkübe edilmektedirler. Tipik bir kültür odası 24 saatlik bir periyot ile programlanabilen ışık ve sıcaklık donanımına sahiptir. Genellikle iklimlendirici ve ısıtıcı sistem sıcaklığı yaklaşık olarak  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de kullanılmaktadır. Fotoperiyodik saatler kullanılarak aydınlatma sistemi düzenlenmektedir. Nem aralığı %20 ila %98 arasında belirlenmektedir (Razdan, 2003).

#### **1.4. Somaklonal Varyasyon**

Doku kültürü teknikleri ile üretilen bitkiciklerde meydana gelen genetik varyasyonlar “somaklonal varyasyon” olarak tanımlanmaktadır (Larkin ve Scowcroft, 1981). Doku kültürü ile üretilen bitkiciklerde somaklonal varyasyon oluşumu, *in vitro* koşullar, seçilen genotip ve genetik kararsızlık ile doğru orantılıdır. Somaklonal varyasyon oluşumu genetik değişimler yolu ile meydana geldiğinden dolayı fenotipik ve genotipik olarak kalıtsaldır. Bitki morfolojisi, yaprak morfolojisi, çiçek rengi ve şekli, yaprak tipinde çeşitlenme gibi parametreler üzerinde etkilidir (Jain ve diğ., 1998). Genetik varyasyonlar özellikle doku kültürü ile üretilen süs bitkilerinde sıkça karşılaşılan bir sorundur. Bitki eksplantlarında meydana gelen genetik değişimlerden dolayı stabil olmayan özellikler çoğaltım yolu ile bir sonraki aşamada üretilmek istenen yapıda da gözlemlenmektedir. Somaklonal varyasyon genelde adventif meristemlerden üretilen bitkilerde görülmektedir. Fenotipik değişkenlik hücre süspansiyon kültürü ve kallus kültürlerinde yaygın olarak görülmektedir. Mutasyonlar ise direkt organogenez, somatik embriyogenezde daha az, fakat kallus kültürlerinde ise çok sık görülmektedir. Süs bitkileri endüstrisinde doku kültürü teknikleri somaklonal varyasyon sayesinde orijinal materyalden çok daha kaliteli ve geniş yelpazeli çeşitlerin üretimi açısından kritik önem taşımaktadır (Korkmaz ve Çölgeçen, 2013).

### 1.5. *Eustoma* Cinsine Ait Doku Kültürü Çalışmaları

Uddin ve diğ. (2017), *Lisianthus*'un 'Pink Bell Light' kùltivarının yaprak eksplantlarını farklı konsantrasyonlardaki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ve B5 besi ortamları içerisinde kültüre almışlardır. MS ve 1,5 mg/l NAA ile desteklenen besi ortamındaki eksplantlar B5 besi ortamındaki eksplantlara göre daha erken kallus oluşumu göstermişlerdir. Sürgün rejenerasyonunda dört farklı konsantrasyonda BAP ve GA<sub>3</sub> kombinasyonları hazırlanmıştır. En yüksek ortalama sürgün sayısı (16,3) ve sürgün uzunluğu (2,6 cm) olarak 1,0 mg/l BAP ve 1,5 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ortamından elde edilmiştir. Köklendirme için farklı konsantrasyonlardaki IBA ve IAA ile desteklenen 1,0 MS, ½ MS ve B5 ortamları içerisinde en iyi köklenme 1,5 mg/l IBA ile zenginleştirilen besi ortamlarında gözlemlenmiştir. *In vitro* ortamda rejeneren bitkiler 1:1:1 oranındaki kum, solucan kompostu ve toz formdaki hindistan cevizi ile hazırlanan ortamda başarılı bir şekilde aklimatize edilmiştir.

Ghanati ve diğ. (2012), *Lisianthus* süs bitkisinin çeşitli eksplantlarından kallus üretmek için sürgün rejenerasyonunu sağlamışlardır. Deneysel çalışmada B5, LS ve MS besi ortamlarını farklı konsantrasyonlardaki büyüme düzenleyicileri ile zenginleştirmişlerdir. Kullanılan çeşitli eksplant tiplerinden yaprak eksplantları kallus oluşumunda en etkili bulunan eksplant tipi olarak not edilmiştir. Kallus oluşumunda en etkili bulunan ortamlar 3 mg/l IAA, 3 mg/l NAA ve 0,1 mg/l Kin ile desteklenen LS besi ortamı ve 0,225 mg/l BA ve 1,86 mg/l NAA ile desteklenen B5 ortamı olmuştur. LS ortamındaki organogenez, B5 ortamından ve 3 mg/l IAA, 3 mg/l NAA ve 2 mg/l glisin içeren MS ortamından daha erken sürede oluşum göstermiştir. Kallogenez aşamasında kullanılan tüm besi ortamları içerisinde yeni bitkiciklerin rejenerasyonu başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Çiçeklenmenin başlangıcı 16/8 saat periyodu ve 25±2 °C'deki büyüme koşulları altında inkübasyondan 84 gün sonra gözlemlenmiştir.

Kaviani (2014), *Lisianthus* süs bitkisinin ana formundan seçtiği yaprak eksplantlarını ve nodal segmentlerini kullanarak direkt ve indirekt organogenez metodunu uygulamıştır. Sürgün ucu eksplantlarını 0, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/l konsantrasyonlardaki NAA ve Kin hormonlarını içeren MS besi ortamında kültüre almıştır. Köklenen sürgünleri eş zamanlı olarak 0,5-1,0 mg/l konsantrasyonda kinetin içeren MS

ortamına nakletmiştir. En iyi sürgün sayısını (2,68) ve sürgün uzunluğunu (2,158 cm) 1,0 mg/l kinetin içeren besi ortamında gözlemlemiştir. En yüksek nod sayısını (8,75) 0,5 mg/l kinetin içeren besi ortamından elde etmiştir. En yüksek kök sayısı 2,0 mg/l Kin ve 0,5 mg/l NAA ile desteklenen besi ortamında 2,55 olarak ölçülmüştür. 2,0 mg/l Kin içeren besi ortamında büyüyen sürgün uçları en fazla kallus oluşumu gösteren eksplant olarak not edilmiştir. En yüksek taze ağırlık, kuru ağırlık ve klorofil içeriği 0,5 mg/l Kin ve 0,5 mg/l Kin + 1,0 mg/l NAA içeren besi ortamlarında gözlemlenmiştir.

Mousavi ve diğ. (2012a), *Lisianthus* süs bitkisinin üç aylık olgunlaşmış fidelerinden elde ettikleri iki yapraklı aksiller tomurcukları farklı konsantrasyonlarda BAP ve GA<sub>3</sub> içeren MS ve B5 besi ortamlarına inoküle etmişlerdir. 1,0 mg/l GA<sub>3</sub> ve 1,0 BAP içeren B5 besi ortamı direkt organogenez denemesinde en etkili bulunan ortam olarak kaydedilmiştir. En iyi kök oluşumu 1,5 mg/l NAA içeren B5 ortamında gözlemlenmiştir. Bitkicikler başarılı bir şekilde aklimatize edilmiştir.

Kaviani ve diğ. (2014), *Lisianthus* süs bitkisinin ana formundan seçtiği nodal eksplantları farklı konsantrasyonlarda (0, 0,1, 0,2 ve 2,0 mg/l) NAA ve BA içeren MS besi ortamına inoküle etmişlerdir. Maksimum sürgün uzunluğu (2,07 cm) olarak 0,1 mg/l BA içeren ortamda gözlemlenirken, maksimum sürgün sayısı (5,80) ise 0,1 mg/l BA ve 0,2 mg/l NAA kombinasyonunu içeren ortamda gözlemlenmiştir. En yüksek nod sayısı (3,20) 0,2 mg/l NAA ve 0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BA içeren besi ortamlarından elde edilmiştir. En iyi kök sayısı (14,53) ve kök uzunluğu 3,87 cm olarak 0,2 mg/l NAA, 0,2 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA ve 0,2 mg/l BA içeren besi ortamlarında not edilmiştir. Rejenere olan bitkicikler %98'i aklimatizasyon süresince sera ortamında canlılığını sürdürebilmiştir. Aklimatize edilen bitkilerin morfolojik olarak ana bitkinin tıpatıp benzeri olduğu not edilmiştir.

Akbari ve diğ. (2014), direkt ve indirekt organogenez metodunu kullanarak farklı *Lisianthus* süs bitkisinin bir yıllık olgunluktaki fidelerinden genç yaprakları, gövde segmentleri ve iki yapraklı aksiller tomurcukları üzerinde farklı besi ortamları ve büyüme düzenleyicilerinin etkisini araştırmışlardır. İndirekt rejenerasyonda en iyi kallus oluşumu 1,5 mg/l NAA ile desteklenen B5 besi ortamında gözlemlenmiştir. Kallustan sürgün rejenerasyonu 1,5 mg/l Kin + 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> içeren B5 besi

ortamında sağlanmıştır. Yeni köklerin oluşumu 1,5 mg/l NAA içeren B5 besi ortamında gözlemlenmiştir. Direkt rejenerasyonda en yüksek aksiller tomurcuk üretimi 1 mg/l GA<sub>3</sub> + 1 mg/l BAP ile desteklenen B5 ortamından sağlanmıştır.

Kaviani ve diğ. (2012), Lisianthus süs bitkisinin ana formundan izole ettikleri sürgün ucu eksplantlarını 0, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/l konsantrasyonlarda NAA ve Kin ile desteklenen MS besi ortamında kültüre almışlardır. Köklenmiş çoklu sürgünler eş zamanlı olarak 0,5-1,0 mg/l Kin konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamına inoküle edilmişlerdir. En iyi sürgün uzunluğu (2,058 cm) ve sürgün sayısı (2,62) yalnızca 1 mg/l Kin ile desteklenen besi ortamında gözlemlenmiştir. En yüksek nod sayısı yalnızca 0,5 mg/l Kin içeren besi ortamında 8,86 olarak ölçülmüştür. Sürgün başına en yüksek kök sayısı 2,40 olarak 2,0 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA içeren besi ortamından elde edilmiştir. En iyi kallus oluşumu yalnızca 2,0 mg/l NAA ile desteklenen besi ortamında gözlemlenmiştir. En iyi sürgün üretimi 0,5 mg/l ya da 1,0 mg/l Kin içeren MS besi ortamında başarılmıştır. Rejenere olan bitkicikler 1:1 oranında torf ve perlit içeren ortamda başarılı bir şekilde aklimatize edilerek %100 oranında canlı kalabildikleri gözlemlenmiştir.

Paek ve Hahn (2000), Lisianthus süs bitkisinin tohumdan çimlendirilen 'Janobong' kùltivarından elde ettikleri varyantları sürgün ucu kùltürüne alarak sitokinlerin, oksinlerin ve aktif kömürün organogenez ve anatomik özellikler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan BA (13,32-22,2 µM) ve Kin (13,94-23,23 µM) hormonlarının sürgün oluşumunu sağladığını, fakat sürgünlerin yüksek oranlarda hiperhidrisite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. IAA ve IBA konsantrasyonlarının arttırılması ile kalite kök oluşumu sağlanırken, NAA konsantrasyonlarındaki artışın ters etki gösterdiğini not etmişlerdir. Sürgün ve kök gelişimi aktif kömür etkisi ile baskılanmıştır. En yüksek rejenerasyon yüzdesi ve en fazla mat yeşil sürgün sayısı 4,44 µM BA, 1,47-4,92 µM IAA ve IBA ile desteklenen MS besi ortamında inkübasyon başlangıcından 4 hafta sonra eksplant başına ortalama 15 sürgün olarak kaydedilmiştir. Toprağa nakledildiğinde mat yeşil bitkiciklerin %80'i hayatta kalırken, hiperhidrik bitkiciklerin canlılıklarını sürdürmedikleri not edilmiştir.

Semeniuk ve Griesbach (1987), *Lisianthus*'un 'Dwarf Purple' kùltivarından izole ettikleri sürgün ucu eksplantlarını, internodal gövde kısımlarını ve yaprak segmentlerini modifiye ettikleri MS besi ortamında kùltüre almışlardır. 3 mg/l BA ve 0,2 mg/l NAA ile desteklenen MS ortamındaki yaprak segmentlerinde kloroz oluşumu gözlemlenirken, sürgün ucu eksplantlarından ve internodal gövde kısımlarından çoklu sürgünlerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. 3 mg/l BA içeren ortamda sürgün uçlarından ve yaprak segmentlerinden sürgün rejenerasyonu sağlandığını, fakat internodal gövde kısımlarında nekrozlaşma ve doku ölümlerinin gerçekleştiğini not etmişlerdir. 2 mg/l NAA ile desteklenen ½ MS ortamında alt kùltüre alınan çoklu sürgünlerde kök oluşumu gözlemlenmiştir. Köklenen bitkicikler toprak ortamına başarılı bir şekilde nakledilmiştir.

Ruffoni ve diğ. (1990), *Lisianthus* süs bitkisinin direkt sürgün organogenezi ve somatik embriyogenezi üzerinde hücre süspansiyon kùltürü oluşturarak inceleme yapmışlardır. Zeatin, 2İP ve BA ile desteklenen sıvı besi ortamında yaprak eksplantlarını kùltüre almışlardır. Sıvı kùltürdeki hücre ve hücre yığınlarını aynı şekilde hazırlanan besi ortamında alt kùltüre almışlardır. Kùltürden 4 hafta sonra Zeatin ya da 2İP'nin düşük konsantrasyonlarını içeren ortamda sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Histolojik sonuçlara göre, somatik embriyoların gelişimin erken aşamalarında üretildiğini not etmişlerdir. Rejenere olan bitkicikler köklendirilerek başarılı bir şekilde sera ortamına nakledilmiştir.

Miri ve diğ. (2016), *Lisianthus* süs bitkisinin yaprak eksplantlarını kullanarak kallus oluşumu, rejenerasyonu ve çoğaltımı üzerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerini araştırmışlardır. Yaprak eksplantları farklı konsantrasyonlardaki IAA, NAA ve 2,4-D ile desteklenen MS ortamında kùltüre alınmıştır. Maksimum kallus oluşumu 100 µM NAA içeren MS besi ortamında gözlemlenmiştir. Sürgün rejenerasyonunda kalluslar 0,5 µM IAA ve NAA içeren veya içermeyen farklı konsantrasyonlarda BA (4,4, 13,3 ve 22,2 µM) ile desteklenen MS ortamında kùltüre alınmıştır. En yüksek sürgün sayısı 22,2 µM BA + 0,5 µM NAA ile desteklenen MS ortamında 12,3 olarak ölçülmüştür. Gelişimini tamamlayan sürgünlerin 1 cm uzunluğunda oldukları kaydedilmiştir. Maksimum sürgün üretimi (10,2 ve 11,2) kùltürün 4. Haftasından sonra 2,2 µM BA ve 2,22 µM BA + 0,5 µM NAA ile

desteklenen MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir.

Wang ve diğ. (2014), anter kültürü kurarak double haploid üretimi üzerinde çalışmışlardır. 'Art Peach' kùltivarının anterini oksin ve sitokininler ile desteklenen ve %3 oranında şeker içeren MS besi ortamında kültüre almışlardır. Anterlerden en yüksek kallus gelişimi (%100) ve 100 kallus başına üretilen en fazla yeşil bitkicik sayısı (60 rejenerant) olarak 8 mg/l BA ve 0,1 mg/l NAA ile desteklenen besi ortamında gözlemlenmiştir. Anterler 2 mg/l BA ve 0,5 mg/l NAA ile desteklenen besi ortamında kültüre alındıklarında, kallusların %33,3'ünde bitkicik oluşumu gözlemlenmiştir. Lisianthus'un beş farklı kùltivarında ('Cessna White', 'Cessna Green', 'Curly Tanther', 'Violet Spring' ve 'Lilac Shadow') anter kültürü kullanılarak kallus oluşumu ve bitkicik rejenerasyonu farklı şekillerde gelişim göstermiştir. Anter kültürünün Lisianthus için elverişli, yeni ve farklı bir teknik olabileceği ileri sürülmüştür.

Mousavi ve diğ. (2012b), kallus oluşumu ve Lisianthus kallusundan *in vitro* bitki rejenerasyonu üzerinde hormonların etkisini araştırmışlardır. Steril eksplantlar karanlık ve aydınlık fotoperiyot koşulları altında 2,4-D ve NAA'in farklı konsantrasyonları ile desteklenen B5 ortamına inoküle edilmişlerdir. Kallogenez aşamasında yalnızca yaprak eksplantları kullanılmıştır. Deneysel çalışmada NAA miktarının artırılması ile hormonal dengede yaşanan değişimden dolayı kallogenez 2,4-D'den daha fazla gözlemlenmiştir (P<0,05). İndirekt rejenerasyonda, tek tek ya da kombinasyon halinde NAA, IAA ve GA<sub>3</sub> ile desteklenen farklı konsantrasyonlardaki Kin ve BAP hormonlarını içeren MS ortamında kalluslar alt kültüre alınmıştır. Kallustan maksimum sürgün rejenerasyon oranı GA<sub>3</sub> ve Kin içeren besi ortamında gözlemlenmiştir.

Winarto ve diğ. (2015), Lisianthus süs bitkisinin 'White Lavender' kùltivarından izole edilen yaprak eksplantlarını kullanarak çeşitli besi ortamlarının kallus oluşumu, rejenerasyon, çoğaltım, kök oluşumu ve aklimatizasyon üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. En yüksek kallus oluşum oranı ve adventif sürgün oluşumu 3,0 mg/l TDZ ve 0,3 mg/l NAA ile desteklenen MS besi ortamından elde edilmiştir. Yüksek kaliteli sürgünler 0,5 mg/l BA ve 0,002 mg/l NAA ile zenginleştirilen MS besi



ortamında 8,0 olarak ölçülmüştür. Aynı besi ortamı içerisinde, adventif sürgünler 1,74 oranında dördüncü alt kültüre kadar çoğaltılabilmektedir ve sonraki alt kültürlerde çoğaltım oranı 1,57'ye kadar düşüş göstermiştir. Sürgünler 0,1 mg/l BA ve 0,02 mg/l NAA ile desteklenen MS ortamında köklenmiştir ve kök oluşum oranı sürgün başına 3,9 olarak kaydedilmiştir. Bitkiciklerin 1:1 oranında hazırlanan yanık piriç çeltiği ve organik gübre kombinasyonu içerisinde başarılı bir şekilde aklimatize edildiği ve %90 oranında hayatta kalmayı başarabildikleri not edilmiştir.

Pop ve diğ. (2016), Lisianthus süs bitkisinin üç farklı hibritinden ('Echo Lavender', 'Flamenco White' ve 'Mirage Pastel Pink') izole ettikleri nodal segmentleri (1,5 cm) ve aksiller tomurcukları 0,50 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP ve 0,50 IAA ile desteklenen MS besi ortamına inoküle etmişlerdir. TDZ ile kıyaslandığında BAP ile desteklenen ortam en yüksek sürgün sayısının elde edilmesinde en etkili ortam olarak not edilmiştir. Kök oluşumunun başlatılmasında, MS besi ortamı IBA oksininin iki farklı konsantrasyonu (0,5 mg/l ve 1,5 mg/l) ile eş zamanlı olarak desteklenmiştir. En yüksek kök sayısı 1,5 mg/l IBA ile zenginleştirilen ortamda gözlemlenmiştir. Sürgün sayısının ve kök rejenerasyonunun kültivar çeşidine bağlı olarak sonuç verdiği kaydedilmiştir. En yüksek sürgün sayısı 1,0 mg/l BAP ve 0,50 mg/l IAA ile desteklenen MS ortamındaki 'Mirage Pastel Pink' kültivarında 6,91 olarak ölçülmüştür.

Ördöğh ve diğ. (2006), 20 g/l sükröz, 11 g/l agar ve farklı konsantrasyonlarda BA ile desteklenen MS besi ortamına Lisianthus süs bitkisinin dört farklı 'Echo' kültivarlarını ('Echo White', 'Echo Blue', 'Echo Rose' ve 'Echo Blue Picotee') inoküle ederek sürgün çoğaltımı üzerinde çalışmışlardır. Çoğaltım deneyinde en yüksek sürgün sayısı ve en düşük yaprak sayısı 0,10 mg/l BA içeren ortamda 'Echo White' kültivarından izole edilen eksplantlar üzerinde gözlemlenmiştir. BA ile desteklenmeyen besi ortamında sürgün sayısında azalma ve yaprak sayısında artış olduğu not edilmiştir. Diğer üç kültivarın eksplantlarında yüksek oranda yapraklanma oluşumu gözlemlenmiştir. Deneysel çalışmanın devamında köklendirme ortamı farklı konsantrasyonlarda NAA (0,5, 1,0, 2,0 ve 3,0 mg/l) ile zenginleştirilmiştir. En yüksek kök sayısı 1,0 mg/l NAA ile desteklenen besi ortamında 'Echo Rose' kültivarından izole edilen eksplantlar üzerinde gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki NAA (2,0 ve 3,0 mg/l) dört farklı

kültivardan izole edilen eksplantların kök sayısında azalmaya neden olmuştur. Bitkiciklerin aklimatizasyonu başarı ile gerçekleştirilirken, en uzun boy ve yapraklara sahip olan bitkicikler 'Echo Blue Picotee' kùltivarından elde edilmiştir.

Literatürde Lisianthus süs bitkisinin 'Mariachi Pure White' kùltivarına ait *in vitro* ortamda çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak organogenez metodu ile mikroçoğaltım çalışması bulunmamaktadır.



## **2. MALZEME VE YÖNTEM**

Çalışmanın deneyleri 2015-2017 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yürütüldü.

### **2.1. Bitki Materyali**

Sakata tohum firmasının Türkiye distribütörü aracılığı ile temin edilen 555506 sertifika numaralı 'Mariachi Pure White' hibritinin tohumları deneysel çalışmanın başlangıç materyali olarak kullanıldı. Çalışmanın devamında sürgün rejenerasyonu için bitkinin nodal eksplantları ve kallus oluşumu için ise, bitkinin yaprak eksplantları kullanıldı.

### **2.2. Yöntem**

Tohumdan çimlendirme ile başlatılan deneylerde uygulanan organogenez metodu çeşitli eksplantlar kullanılarak direkt ve indirekt olmak üzere iki kısımda incelendi. İki bölümden oluşan metodun deneysel çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü.

### **2.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar**

- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph / MR Hei-Standard)
- Vorteks (Biosan / Multi-Vortex V-32)
- pH Metre (İnolab WTW Series pH 720)
- Hassas Terazî (AND GR-200)
- Distile Su Cihazı (MP Mini Pure Dest / ROC CCT-3300 Series)
- Laminar Hava Akışlı Kabin (Tez-San Class II)
- Otoklav (HMC Hiclave HG-80)
- Bitki Büyütme Kabini (Sanyo MCR-351H)
- Buzdolabı (Arçelik 5243 NEB / +4°C)
- Mikropipet [200 µL ve 1000 µL] (Eppendorf Research)

## 2.4. Deneyselerde Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Deneyselerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal Madde	Üretici Firma	Katalog No
Murashige & Skoog Bazal Tuz Karışımı (Vitaminli)	Caisson Labs	MSP09-50LT
Sükroz	Duchefa Biochemie	S809.1000
Plant Agar	Duchefa Biochemie	P1001.1000
Polisorbat 20 (Tween 20)	Duchefa Biochemie	P1362.0500
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich	S8045
Hidroklorik Asit	Sigma-Aldrich	H1758
Etanol (%99)	Tek-Kim	TK.200655
Sodyum hipoklorit	Unilever	-
Giberellik asit	Sigma-Aldrich	G7645-5G
6-benzilaminopürin	Caisson Labs	B001-5GM
Kinetin	Sigma-Aldrich	K0753-5G
Thidiazuron	Duchefa Biochemie	T0916
Zeatin	Sigma-Aldrich	Z0164
2,4-diklorofenoksi asetik asit	Sigma-Aldrich	D7299-250G
1-Naftalenasetik asit	Sigma-Aldrich	N0640-100G
İndol-3-asetik asit	Fluka	57333
İndol-3-bütirik asit	Sigma-Aldrich	57310

## 2.5. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Stok çözeltilerin hazırlanmasında her biri 100 ml hacimli kapaklı şişeler kullanıldı. Işığa duyarlı olan BBD’ler için aynı hacimdeki koyu renkli amber şişeler kullanıldı. Toz formdaki bitki büyüme düzenleyicilerinin her birinden hassas terazide 50 mg tartıldı. Üzerlerine her birinin çözücüsü olan maddelerden (Tablo 2.2) 3 ml eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürülmeleri sağlandı. Homojen hale gelen çözelti üzerine 47 ml distile su eklenerek 50 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin her mililitresinde 1 mg BBD bulunması sağlandı. Hazırlanan stok çözeltiler

buzdolabında +4°C’de saklandı ve periyodik olarak belirtilen şekilde yeniden hazırlandı.

Tablo 2. 2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin çözücüleri

BBD	Çözücü
Giberellik asit (GA <sub>3</sub> )	Su
6-benzilaminopürin (BAP)	NaOH
Kinetin (Kin)	NaOH
Thidiazuron (TDZ)	KOH
Zeatin (ZEA)	NaOH
2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)	EtOH
1-Naftalenasetik asit (NAA)	EtOH
İndol-3-asetik asit (IAA)	EtOH
İndol-3-bütirik asit (IBA)	EtOH - NaOH

## 2.6. *In vitro* Besi Ortamı ve Bileşenleri

Yapılan tüm deneylerde Murashige & Skoog (MS) besi ortamı kullanıldı. Besi ortamı %3 oranında sükröz, %0,7 oranında agar ve çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonlarda hazırlanan BBD’ler ile desteklendi. Kullanılan MS besi ortamının içeriği Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3. MS besi ortamının bileşenleri ve konsantrasyonları

Besi Ortamı Bileşenleri	Konsantrasyon (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-
KCl	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-

Tablo 2.3. (Devam) MS besi ortamının bileşenleri ve konsantrasyonları

Besi Ortamı Bileşenleri	Konsantrasyon (mg/l)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
Nikotinic asit	0,5
Pridoksin - HCl	0,5
Thiamin - HCl	0,1
Biotin	-
Folik asit	-
<i>myo</i> -inositol	100
l-inositol	-
Glisin	2
Sakkaroz	30,000

## 2.7. *In vitro* Deneylede Kullanılan Besi Ortamları

Deneylede kullanılan besi ortamlarının kombinasyonları ve konsantrasyonları Tablo 2.4'de belirtilmiştir.

Tablo 2. 4. Deneylede kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı Kodu	Uygulama	BBD	Konsantrasyon (mg/l)
MS0	Kontrol grubu	-	-
MS1	Çimlendirme	-	1,0

Tablo 2.4. (Devam) Deneylerde kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı Kodu	Uygulama	BBD	Konsantrasyon (mg/l)
MS2			0,5
MS3	Sürgün	GA <sub>3</sub>	1,0
MS4	Uzaması		2,0
MS5			4,0
MS6	Direkt		0,5
MS7	Sürgün	BAP	1,0
MS8	Organogenez		2,0
MS9			4,0
MS10	Direkt		0,5
MS11	Sürgün	Kin	1,0
MS12	Organogenez		2,0
MS13			4,0
MS14	Direkt		0,5
MS15	Sürgün	TDZ	1,0
MS16	Organogenez		2,0
MS17			4,0
MS18	Direkt		0,5
MS19	Sürgün	ZEA	1,0
MS20	Organogenez		2,0
MS21			4,0
MS22	Kallus Oluşumu		0,5
MS23	(İndirekt	2,4-D	1,0
MS24	Organogenez)		2,0
MS25			4,0
MS26	Kallus Oluşumu		0,5
MS27	(İndirekt	NAA	1,0
MS28	Organogenez)		2,0
MS29			4,0
MS30	Kallustan		0,5
MS31	Adventif	BAP	1,0
MS32	Sürgün		2,0
MS33	Rejenerasyonu		4,0
MS34	Kallustan		0,5
MS35	Adventif	Kin	1,0
MS36	Sürgün		2,0
MS37	Rejenerasyonu		4,0

Tablo 2.4. (Devam) Deneylerde kullanılan besi ortamları

Besi Ortamı Kodu	Uygulama	BBD	Konsantrasyon (mg/l)
MS38	Kallustan		1,0 + 0,5
MS39	Adventif	Kin + IAA	1,0 + 1,0
MS40	Sürgün		1,0 + 2,0
MS41	Rejenerasyonu		1,0 + 4,0
MS42	Kallustan		1,0 + 0,5
MS43	Adventif	Kin + IBA	1,0 + 2,0
MS44	Sürgün		1,0 + 2,0
MS45	Rejenerasyonu		1,0 + 4,0
MS46			1,0 + 0,5
MS47	Sürgün	BAP + GA <sub>3</sub>	1,0 + 1,0
MS48	Uzaması		1,0 + 2,0
MS49			1,0 + 4,0

## 2.8. Besi Ortamlarının Hazırlanması

DeneySEL çalışmaların tümünde besi ortamları vitaminleri içeren tam güçlü MS besin tuzu kullanılarak hazırlandı. 200 ml besi ortamının hazırlanmasında hassas terazide alüminyum folyo üzerinde 0,88 g (1 litre için 4,44 g) tartıldı. İçerisinde 195 ml distile su bulunan şişeye aktarıldı. Farklı bir alüminyum folyo üzerinde 6 g sükröz (1 litre için 30 g) tartılarak aynı şişenin içerisine aktarıldı. MS tuzu ve sükröz eklenen şişe, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürüldü ve akabinde kullanılmak istenen BBD'ler mikropipet yardımı ile çekilerek şişe ortamına eklendi. 1 N NaOH ve 1 N HCl yardımı ile çözeltinin pH'ı 5,7±1'e ayarlandı. Son işlem olarak, çözelti üzerine katılaştırıcı ajan olarak 1,4 g plant agar eklendi.

### 2.8.1. Malzemelerin ve besi ortamlarının sterilizasyonu

Ekimlerde kullanılan Magenta GA-7 kültür kapları, petri kapları, şişeler ve diğER tüm cam malzemeler çamaşır suyu ile yıkanıp temizlendi ve distile su ile çalkalandıktan sonra kurutulup dörTLÜ gruplar halinde buzdolabı poşetlerine sarılarak poşetler otoklav bandı ile kapatıldı. Bistüri, pens ve cetvel alüminyum folyoya, kurutma kağıdı ve kesim tablası gibi klonlama esnasında kullanılan malzemeler ise buzdolabı poşetlerine sarılarak otoklav bandı ile kapatıldı. Tohum dezenfeksiyonunda kullanılan eppendorf tüpleri ağzı kapalı cam kavanozlara konuldu. Çalışmalarda



kullanılan distile su ve diğer tüm besi ortamları kapaklı şişeler ile otoklava yerleştirildi. Tüm malzemeler otoklav cihazında 121°C'de 1,2 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında 20 dakika süre ile sterilize edildi. Deneysel çalışmalardan önce laminar hava akışlı kabinin içi %70'lik EtOH ile steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra UV lambası yaklaşık 40 dakika çalıştırıldı. İnokülasyon işlemlerinden önce maske takıldı, eldiven giyildi ve eller %70'lik EtOH ile ekim işlemi esnasında belirli periyotlar ile steril edildi.

### **2.8.2. Besi Ortamlarının petri ve magenta kaplarına aktarılması**

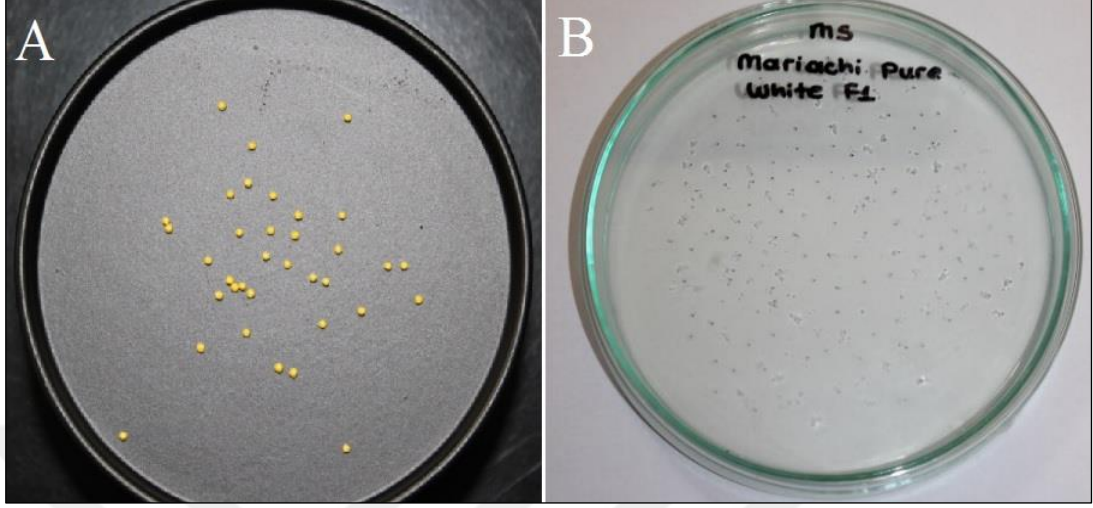
Otoklavda steril edilen petriler ve magenta kaplarının sarılı olduğu poşetlerin üzerine %70'lik EtOH püskürtülerek kültür kapları laminar hava akışlı kabin içerisine alındı. Üzerlerindeki poşetler yırtılarak kabin içerisinden uzaklaştırıldı. Otoklavdan alınan besi ortamlarının bulunduğu şişeler, eldiven ile tutulabilecek sıcaklığa erişinceye kadar üzerlerine %70'lik EtOH püskürtülerek kabin içerisinde soğumaya bırakıldı. İstenilen koşullar elde edildiğinde besi ortamlarının bulunduğu şişelerin kapakları bunzen alevine yaklaştırılarak açıldı, şişelerin ağızları bunzen alevinden geçirildi ve yatay 45 derecelik pozisyonda tutularak içindeki sıvıların GA-7 magenta kaplarına ve petrilere her bir kapta 30 ml olacak şekilde döküldü. Donma işlemi tamamlandıktan sonra inokülasyon basamaklarına geçildi.

## **2.9. Besi Ortamları Üzerinde Yapılan İnokülasyon İşlemleri**

### **2.9.1. Tohum dezenfeksiyonu ve *in vitro* çimlendirme**

Dış kısmı fungusit kaplamadan oluşan 'Mariachi Pure White' hibritinin tohumları her birinde iki adet bulunması koşuluyla önceden steril edilen eppendorf tüplerin içerisine steril pens yardımı ile aktarıldı. *In vitro* çimlendirme deneyinde toplamda 190 adet hibrit tohum belirtildiği şekilde tüplere yerleştirildi. Dezenfeksiyon işleminde tohumların dış kısmındaki fungusit kaplamaların çözdürülmesi için tüplerin içerisine 5-6 damla %70'lik EtOH ilave edildi ve vorteks cihazında 1 dakikayı geçmeyecek şekilde muamele edildikten sonra fungusit kaplamaların çözünmesi ile açığa çıkan mikro boyutlardaki tohumlar steril pens kullanılarak tüplerin içerisinden alındı ve steril şartlar altında makro boyutlardaki petrilerin içerisnde bulunan MS1 besi ortamına dengeli bir şekilde dağıtılarak inoküle edildi

(Şekil 2.1). İnokülasyon işlemi tamamlandıktan sonra petrilerin etrafı parafilm ile sarılarak çimlenmek üzere bitki büyüme kabininde inkübasyona bırakıldı.



Şekil 2. 1. Lisianthus ‘Mariachi Pure White’ kùltivarının tohumları. A: Fungusit kaplamalı tohumların genel görünümü. B: İnoküle edilen tohumların MS1 besi ortamındaki görünümü

### 2.9.2. Çimlenen tohumlardan oluşan sürgünlerin uzaması

İnkübasyondan 11-14 gün sonra çimlenmeye başlayan hibrit tohumlar, klonal çoğaltıma hazır hale getirilmek üzere sürgün gelişimlerini tamamlayabilmeleri için farklı konsantrasyonlarda  $GA_3$  içeren MS2, MS3, MS4 ve MS5 (Tablo 2.4) besi ortamlarına dikey pozisyonda inoküle edildi ve magentalarının kapakları parafilm ile sarılarak inkübasyona bırakıldı. Deneysel çalışma kontrol grubu ile birlikte her magentaya 5 adet eksplant gelecek şekilde tasarlandı.

### 2.9.3. Yetişkin bitkiciklerden yaprak eksplantları ve nodal segmentlerin alınması

Farklı konsantrasyonlarda  $GA_3$  ile desteklenen besi ortamında inkübasyondan 30 gün sonra elde edilen bitkiciklerde sürgün gelişimi yeterli bulunmadığından dolayı inkübasyon süresinin uzatılmasına karar verildi. İnkübasyonun ikinci periyodu 80 gün sonra sona erdirildi. Yaprak ve sürgün gelişimlerini tamamlayan bitkiciklerin yaprak eksplantları ve nodal segmentleri aseptik ortamda bistüri yardımıyla eşit parçalara bölünerek bitkiden izole edildi. Bu aşama ile tez çalışmasının ilk bölümü tamamlandı. Alınan nodal segmentler direkt organogenezde ve yaprak eksplantları

ise indirekt organogenezde kullanılmak üzere eş zamanlı olarak tasarlanan deneyler için hazırlandı.

#### **2.9.4. Direkt organogenez**

Farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> ile zenginleştirilen besi ortamlarında gelişimlerini tamamlayan bitkiciklerden izole edilen nodal segmentler direkt organogenez deneylerinde bitki materyali olarak kullanıldı. Direkt organogenezde kullanılan MS besi ortamları sırasıyla BAP, Kin, TDZ ve ZEA ile desteklenecek şekilde tasarlandı. Eşit parçalara ayrılan nodal segmentler sırasıyla farklı konsantrasyonlarda BAP içeren MS6, MS7, MS8 ve MS9 (Tablo 2.4) besi ortamları içerisine, Kin içeren MS10, MS11, MS12 ve MS13 besi ortamlarına, TDZ içeren MS14, MS15, MS16 ve MS17 besi ortamlarına ve ZEA ile desteklenen MS18, MS19, MS20 ve MS21 besi ortamlarına dikey pozisyonda inoküle edildi. İnokülasyon işleminden sonra magentaların kapakları parafilm ile sarılarak kültür kaplarında eksplantlar bitki büyütme kabini içinde inkübasyona bırakıldı. Her bir denemenin inkübasyon periyodu 30 gün olarak belirlendi ve deney düzeneği her denemede kontrol grubu da dahil olmak üzere her magentaya 5 adet eksplant gelecek şekilde tasarlandı.

#### **2.9.5. İndirekt organogenez**

Farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> ile zenginleştirilen besi ortamlarında gelişimlerini tamamlayan bitkiciklerden izole edilen yaprak eksplantları indirekt organogenez deneylerinde bitki materyali olarak kullanıldı. İndirekt metod, kallogenez, stok kallus kültürlerinin oluşturulması, oluşan kalluslardan bitkiciklerin rejenerasyonu ve milimetrik sürgünlerin *in vitro* gelişimi olmak üzere 4 aşamalı olarak tasarlandı.

##### **2.9.5.1. Kallogenez**

İzole edilen yaprak eksplantları steril bistüri yardımı ile yaklaşık 1 cm uzunluğunda ve genişliğinde karelere ayrılarak eksplantların yüzeyleri bistüri ucu ile hafif şekilde yaralandı ve kallogenez için belirlenen farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ile desteklenen MS22, MS23, MS24 ve MS25 (Tablo 2.4) besi ortamları üzerine ve NAA ile desteklenen MS26, MS27, MS28 ve MS29 besi ortamları üzerine yaprak eksplantlarının yaralanan yüzeyleri ortam ile temas edecek şekilde yatay pozisyonda

inoküle edildi ve petrielerin etrafı parafilm ile sarılarak inkübasyona bırakıldı. Deney düzeneği her denemede kontrol grubu da dahil olmak üzere her magentaya 5 adet eksplant gelecek tasarlandı.

#### **2.9.5.2. Stok kallus kültürlerinin oluşturulması**

Direkt organogenez ile eş zamanlı olarak yürütülen indirekt organogenez metodunda, direkt organogenezden her denemede elde edilen yaprak eksplantları indirekt organogenez deneylerinde kallogenez oluşumu için kullanılmak üzere 1,0 mg/l konsantrasyonda 2,4-D ve NAA ile desteklenen besi ortamlarında 3 kez alt kültüre alınarak stok kallus kültürleri oluşturuldu.

#### **2.9.5.3. Oluşan kallus formlarından bitkiciklerin rejenerasyonu**

İnkübasyondan yaklaşık 7-8 hafta sonra oluşumlarını tamamlayan kalluslar steril şartlar altında bistüri yardımı ile 4 eşit parçaya bölünerek sırasıyla farklı konsantrasyonlarda BAP içeren MS30, MS31, MS32 ve MS33 besi ortamları üzerine ve Kin ile desteklenen MS34, MS35, MS36 ve MS37 besi ortamları üzerine kesilen kısımları ortam ile temas edecek şekilde yatay pozisyonda inoküle edildi. İnkübasyondan 30 gün sonra iki ortam arasından en iyi gelişmeyi ve büyümeyi sağlayan ortam ve konsantrasyonu seçilerek (1,0 mg/l Kin) ilk olarak IAA ile desteklenen MS38, MS39, MS40 ve MS41 besi ortamları ile, ikinci olarak da IBA içeren MS42, MS43, MS44 ve MS45 besi ortamları ile kombine edilerek hazırlandı ve kalluslar 4 eşit parçaya bölünerek her iki ortam üzerine kesilen kısımları ortam ile temas edecek şekilde yatay pozisyonda inoküle edildi. İnkübasyon işleminden sonra magentaların kapakları parafilm ile sarılarak inkübasyona bırakıldı. Bitkicik rejenerasyonunda uygulanan her 4 deneme için deney düzeneği kontrol grubu da dahil olmak üzere her magentaya 5 adet eksplant gelecek tasarlandı.

#### **2.9.5.4. Milimetrik sürgünlerin *in vitro* gelişimi**

Kallus formlarından bitkicik rejenerasyonunda inkübasyonunu tamamlayan sürgüncüklerin gelişimi yetersiz bulunduğundan dolayı oluşan milimetrik düzeydeki sürgüncükler *in vitro* gelişimleri için kalluslardan bistüri yardımı ile izole edilerek 1,0 mg/l BAP ve farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> ile desteklenen MS46, MS47, MS48

ve MS49 besi ortamlarına dikey pozisyonda inoküle edildi. İnokülasyondan sonra magenta kapakları parafilm ile sarılarak inkübasyona bırakıldı. Deneysel çalışmada deney düzeneği kontrol grubu da dahil olmak üzere her magentaya 5 adet eksplant gelecek tasarlandı.

#### **2.9.6. Kültür kabininin iklimlendirmesi**

Deneysel çalışmalarda kurulan tüm kültürler  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve %65 nispi nemde, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta ve  $80\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  fotosentetik foton akısı yoğunluğunda kırık beyaz ışıklı floresan lambalar altında inkübe edildi.

#### **2.10. Deneylerde Kullanılan Eksplant Tipleri Üzerinde Yapılan Ölçümler**

Çalışmasının başlangıç aşaması olarak belirlenen çimlendirme aşamasının ardından sürgün gelişimi için farklı konsantrasyonlardaki  $\text{GA}_3$  ile desteklenen besi ortamlarında inkübasyona bırakılan bitkiciklerde ilk inkübasyon periyodu sonunda (30. gün) ve ikinci inkübasyon periyodu sonunda (80. gün) yaprak sayısı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu olmak üzere 5 farklı morfometrik parametrenin ölçümleri cetvel yardımıyla tamamlandı ve en iyi gelişim sağlayan konsantrasyonlar belirlenerek sonuçlar not edildi.

Direkt organogenez metodunda uygulanan BAP, Kin, TDZ ve ZEA hormonlarının denemeleri için 30 günlük inkübasyon periyodu sonunda yaprak sayısı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu olmak üzere 5 farklı morfometrik parametrenin ölçümleri cetvel yardımı ile tamamlanarak sonuçlar not edildi ve direkt organogenez üzerinde en iyi gelişim sağlayan bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları belirlendi.

İndirekt organogenez metodunda ilk olarak kallogenez aşamasında 2,4-D ve NAA besi ortamlarına inoküle edilen yaprak eksplantlarının bulunduğu petriler hassas terazide tek tek tartılarak, her petri içerisinde 5 eksplant bulunduğundan dolayı her bir petri için bulunan ağırlık 5'e bölündü ve inkübasyon öncesi eksplant başına düşen taze ağırlık miktarı belirlendi. Kallus oluşumundan sonra inkübasyondan alınan petriler yine aynı şekilde toplam ağırlıkları eksplant sayısına bölünerek inkübasyon sonrası eksplant başına düşen taze ağırlık miktarı belirlendi. Daha sonra her iki

ağırlığın arasındaki fark alınarak taze ağırlık miktarı belirlendi ve sonuçlar not edildi. Ölçümlerin devamında kallus oluşum sıklığının frekansı ve oluşan kallusların morfolojisi belirlendi. Oluşan kallus formlarından bitkicik rejenerasyonunda kallus başına düşen sürgün sayısı belirlendi ve sürgüncüklerin uzunlukları cetvel yardımı ile ölçülerek kallus başına düşen sürgün uzunlukları not edildi.

Milimetrik sürgüncükler *in vitro* gelişim ortamında inkübasyonlarını tamamladıktan sonra sürgüncüklerin sayısı ve uzunlukları belirlenerek sürgünlerin dokusunda meydana gelen morfolojik değişimler kaydedildi.

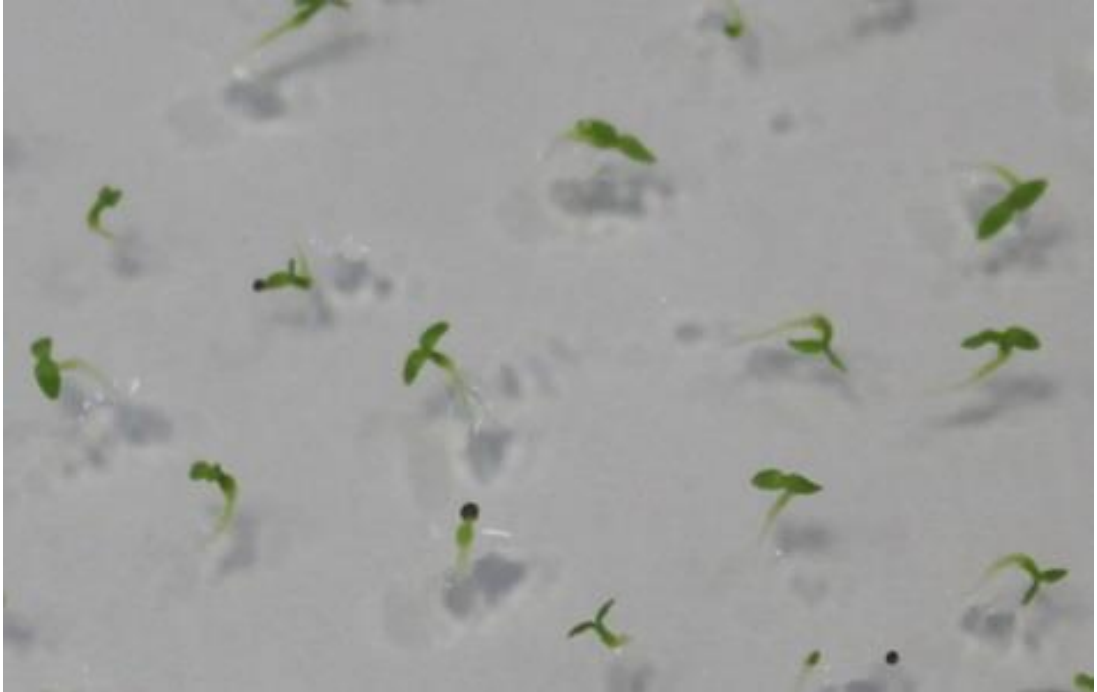
### **2.11. Verilerin İstatistiksel Analizi**

DeneySEL çalışma tesadüf blokları deneme desenine göre 6 tekrarlı olmak koşulu ile tasarlandı. Her tekrarda 5 adet eksplant kullanılarak her konsantrasyon için toplamda 30 adet eksplant üzerinde deneme yapılması sağlandı. Her deneme için toplamda kontrol grubu ile birlikte 150 birey kullanıldı. Ölçümlerden elde edilen verilere Varyans Analizi (ANOVA) testi uygulandı ve ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlendi. Çalışmada yer alan tüm deneysel ölçümlerin istatistik testleri için IBM SPSS 22 istatistik programı kullanıldı.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Farklı GA<sub>3</sub> Konsantrasyonlarının *In vitro* Çimlendirme Üzerindeki Etkileri

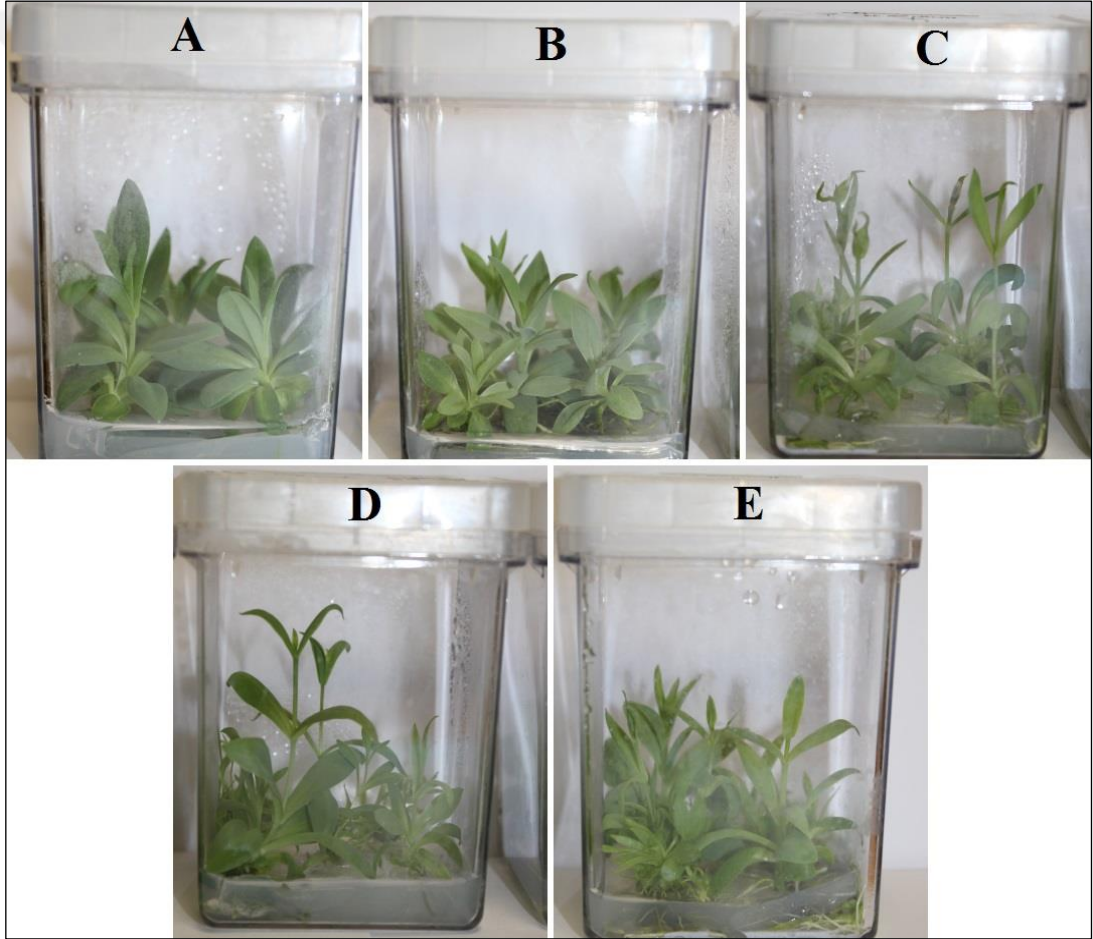
İnoküle edilen ‘Mariachi Pure White’ hibriti tohumlarında çimlenme başlangıcı inokülasyondan yaklaşık 11-14 gün sonra kaydedildi. İnoküle edilen toplam 190 adet hibrit tohumdan 151 adedinin çimlendiği belirlendi. Roh ve diğ. (1989), *Lisianthus* bitkisinin tohumlarının çok küçük olduğunu (1 ml’de 10,000 adet) ve yaklaşık 10-15 gün içerisinde çimlenebildiğini rapor etmişlerdir. Çimlenen bitkiciklerde bifoliat yapıda yaprak oluşumları gözlemlendi (Şekil 3.1). Kültivarın çimlenen bitkicikleri çok kısa boya sahip olduğundan, yaprak oluşumu minimal düzeyde kaldığından ve klonal çoğaltım için yeterince gelişemediğinden dolayı, bitkiciklerin *in vitro* gelişimi için farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> içeren besi ortamları hazırlandı ve yeni besi ortamına aktarılmaları sağlandı.



Şekil 3. 1. Tohum inokülasyonundan 11 gün sonra çimlenen bitkiciklerde bifoliat yaprak görünümü (Özkan ve Özen, 2016)

### 3.2. Çimlenen Tohumlardan Oluşan Sürgünlerin Uzamasına Ait Bulgular

Farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> ile desteklenen besi ortamına aktarılan bitkiciklerin 30 günlük inkübasyon periyodunun sonunda klonal çoğaltım için yeterli düzeyde gelişmediği, nodal segmentler arasındaki mesafelerin çok kısa kaldığı, bodur yapıda olduklarından dolayı her birinin nod sayısının 1 adet olduğu saptandı. İlk periyodun ölçümleri alındıktan sonra bitkicikler aynı kültür kapları içerisinde ikinci periyot için inkübasyona bırakıldı. 80 gün tamamlandığında bitkiciklerin yaprak gelişimlerinin ve nodal segment sayılarının yeterli olduğuna karar verildi (Şekil 3.2) ve morfometrik parametrelerin ölçümleri tamamlandı.



Şekil 3. 2. Bitkiciklerin 80 günlük inkübasyon sonrası görünümü. A: Kontrol grubu (MS1), B: 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> (MS2), C: 1,0 mg/l GA<sub>3</sub> (MS3), D: 2,0 mg/l GA<sub>3</sub> (MS4), E: 4,0 mg/l GA<sub>3</sub> (MS5)

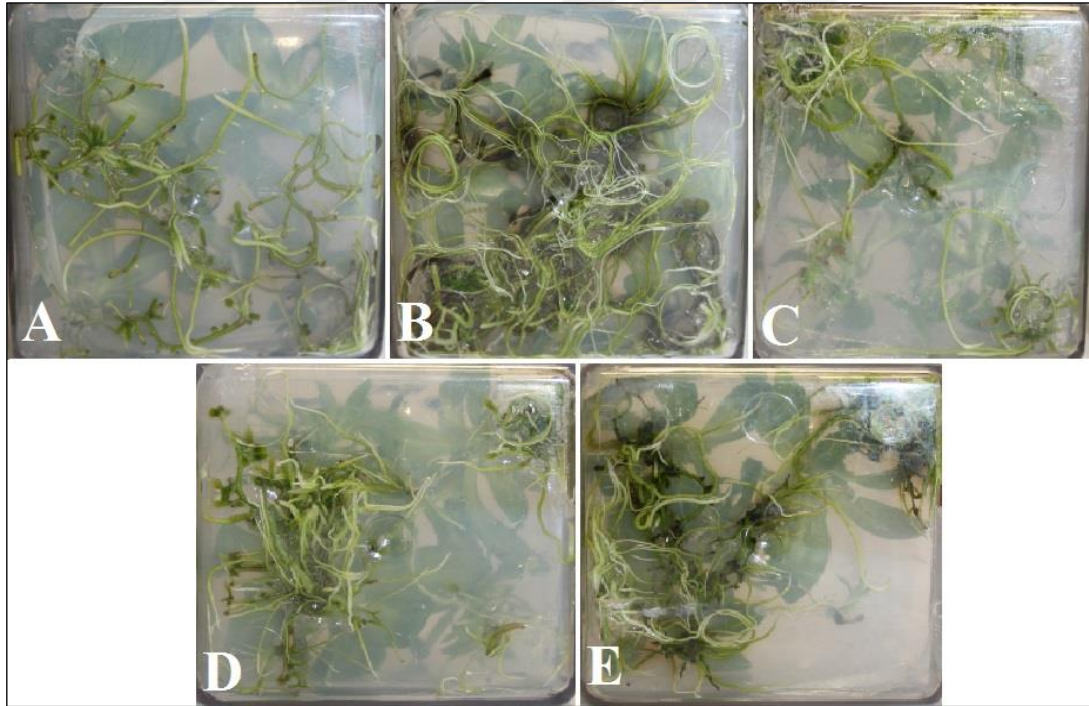


30 günlük inkübasyon periyodu sonunda en yüksek ortalama yaprak sayısı  $8,47 \pm 0,77$  adet olarak MS3 ortamında gözlemlendi ve en iyi ortalama kök uzunluğu  $3,00 \pm 0,53$  cm olarak MS2 ortamında ölçüldü. Ortalama sürgün sayısı üzerinde kontrol ile kıyaslandığında önemli bir değişim gözlemlenmedi fakat ortalama sürgün uzunluğu ve kök sayısında önemli oranda azalma tespit edildi (Tablo 3.1; Şekil 3.4).

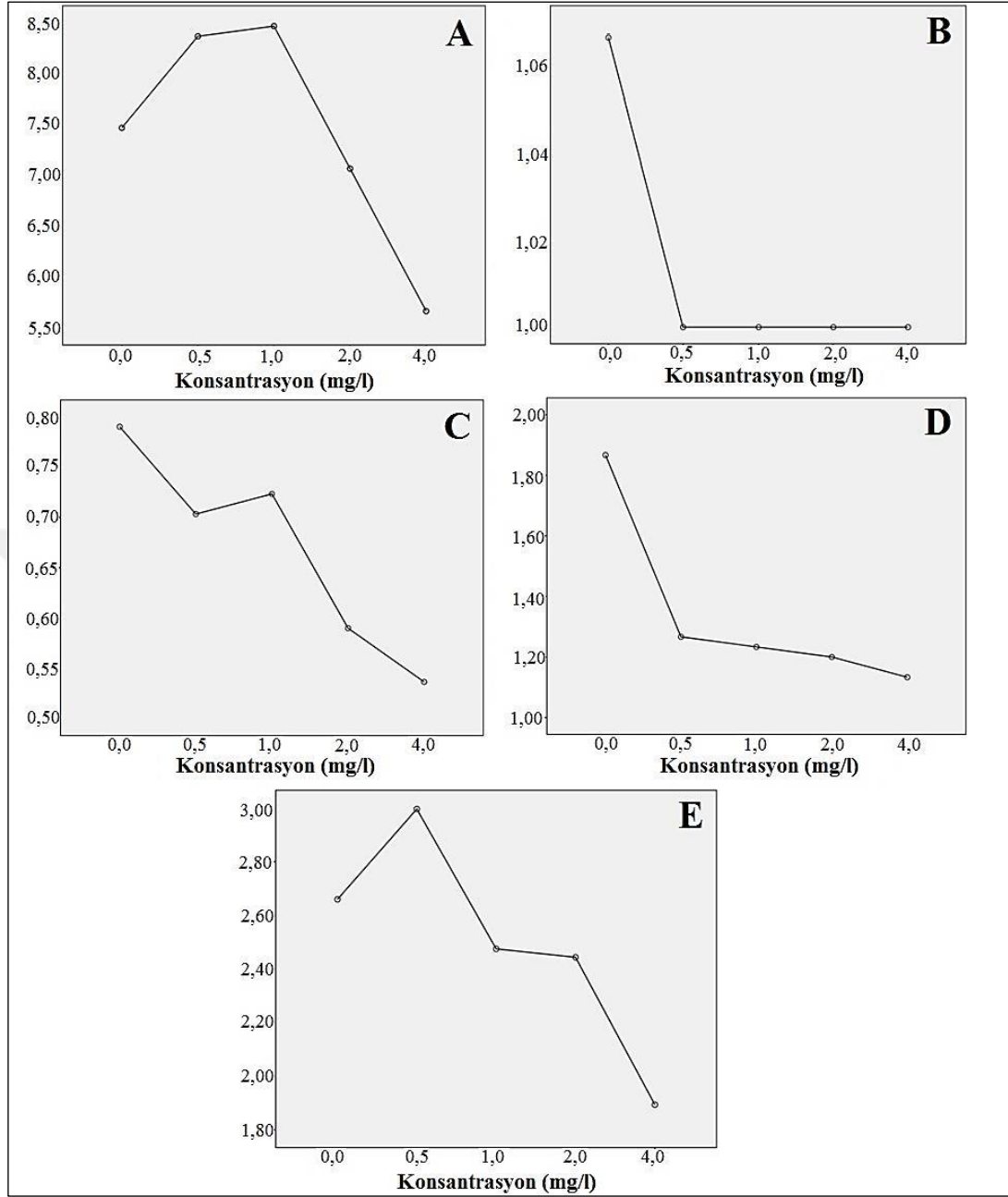
Tablo 3. 1. 30 günlük inkübasyon periyodu sonrası  $GA_3$  içeren MS besi ortamındaki bitkiciklere ait bulgular (Özkan ve Özen, 2016)

Hormonal konsantrasyon (mg/l)	Yaprak sayısı (adet)	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)	Kök sayısı (adet)	Kök uzunluğu (cm)
0,0	$7,47 \pm 0,82^{ab}$	$1,07 \pm 0,16^a$	$0,79 \pm 0,10^c$	$1,87 \pm 0,56^b$	$2,66 \pm 0,52^{ab}$
0,5	$8,37 \pm 1,02^b$	$1,00 \pm 0,00^a$	$0,70 \pm 0,05^{bc}$	$1,27 \pm 0,27^a$	$3,00 \pm 0,53^b$
1,0	$8,47 \pm 0,77^b$	$1,00 \pm 0,00^a$	$0,72 \pm 0,12^c$	$1,23 \pm 0,32^a$	$2,47 \pm 0,17^{ab}$
2,0	$7,07 \pm 3,36^{ab}$	$1,00 \pm 0,00^a$	$0,59 \pm 0,12^{ab}$	$1,20 \pm 0,54^a$	$2,47 \pm 0,85^{ab}$
4,0	$5,68 \pm 2,17^a$	$1,00 \pm 0,00^a$	$0,54 \pm 0,11^a$	$1,13 \pm 0,39^a$	$1,90 \pm 0,96^a$

\* Her sütunda aynı harfle belirtilen ortalamalar arasında  $P < 0,05$  anlamlılık düzeyinde farklılık yoktur. ( $\pm$  Standart sapma)



Şekil 3. 3. 80 günlük inkübasyon sonrası bitkiciklerin köklenme durumu. A: Kontrol grubu (MS1), B: 0,5 mg/l  $GA_3$  (MS2), C: 1,0 mg/l  $GA_3$  (MS3), D: 2,0 mg/l  $GA_3$  (MS4), E: 4,0 mg/l  $GA_3$  (MS5)



Şekil 3. 4. GA<sub>3</sub> ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin 30 günlük inkübasyon sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm)

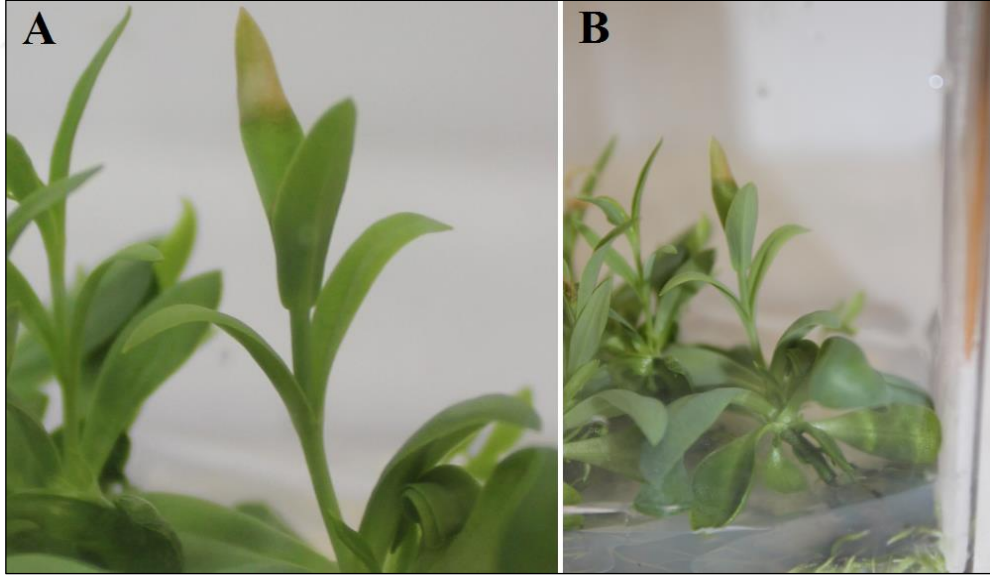
80 günlük inkübasyon periyodu sonunda en yüksek ortalama yaprak sayısı  $14,17 \pm 4,59$  adet olarak MS4 ortamında gözlemlendi (Şekil 3.2) ve en iyi ortalama kök uzunluğu  $2,48 \pm 1,25$  cm olarak MS4 ortamında ölçüldü (Şekil 3.3). Ortalama sürgün sayısı üzerinde kontrol ile kıyaslandığında önemli bir değişim gözlemlenmedi (Şekil 3.6). En yüksek ortalama sürgün uzunluğu  $3,32 \pm 0,34$  cm olarak MS3 ortamında ölçüldü. Kök sayısında önemli oranda azalma tespit edildi (Tablo 3.2).

Tablo 3. 2. 80 günlük inkübasyon periyodu sonrası GA<sub>3</sub> içeren MS besi ortamındaki bitkiciklere ait bulgular (Özkan ve Özen, 2016)

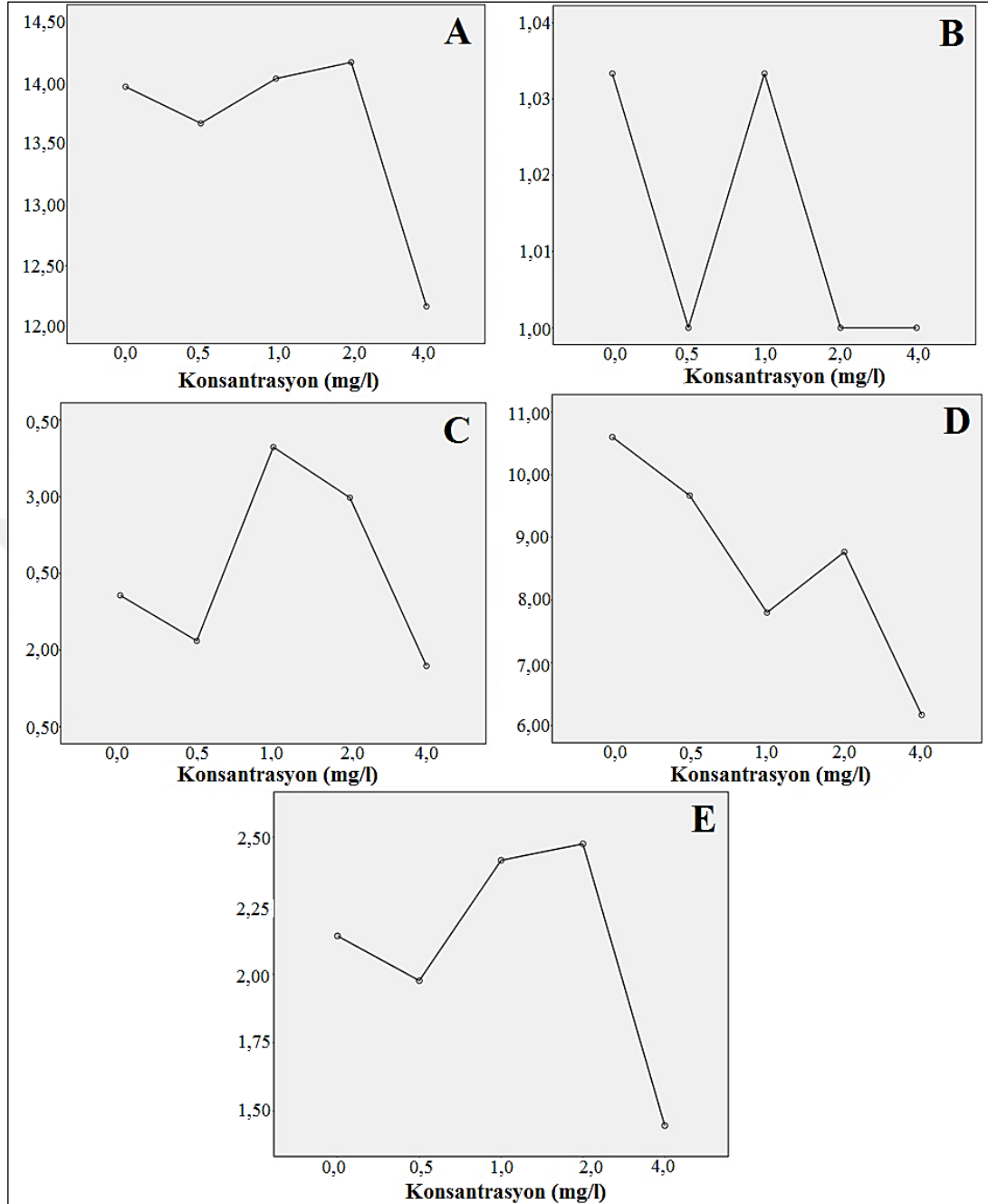
Hormonal konsantrasyon (mg/l)	Yaprak sayısı (adet)	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)	Kök sayısı (adet)	Kök uzunluğu (cm)
0,0	13.97 ± 1.56 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.90 <sup>ab</sup>	10.60 ± 1.6 <sup>b</sup>	2.14 ± 1.22 <sup>a</sup>
0,5	13.67 ± 1.12 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.06 ± 0.44 <sup>a</sup>	9.67 ± 0.65 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.72 <sup>a</sup>
1,0	14.03 ± 1.85 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.32 ± 0.34 <sup>c</sup>	7.80 ± 2.01 <sup>ab</sup>	2.42 ± 0.77 <sup>a</sup>
2,0	14.17 ± 4.59 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.99 ± 0.89 <sup>bc</sup>	8.77 ± 3.58 <sup>ab</sup>	2.48 ± 1.25 <sup>a</sup>
4,0	12.17 ± 2.81 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.51 <sup>a</sup>	6.17 ± 2.64 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.80 <sup>a</sup>

\* Her sütunda aynı harfle belirtilen ortalamalar arasında P<0,05 anlamlılık düzeyinde farklılık yoktur. (± Standart sapma)

80 günlük inkübasyon periyodundan sonra MS5 besi ortamında bulunan bitkiciklerin yaklaşık olarak yarısında tepe ucu ölümleri, kloroz benzeri yaprak ucu yanıkları (Şekil 3.5) ve aynı ortamdaki bitkiciklerin hemen hepsinin kök uçlarında kararmalar olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak kültür kaplarının içerisindeki besi ortamının rengi şeffaftan koyu dumanlı bir görünüme dönüştü ve besi ortamında yoğun bir koku oluşumu tespit edildi.



Şekil 3. 5. 80 günlük inkübasyon periyodu sonrası MS5 besi ortamında ve bitkiciklerde görülen anormallikler. A: Yaprak ucu yanıklığı. B: Besi ortamında kararma (Özkan ve Özen, 2016)



Şekil 3. 6. GA<sub>3</sub> ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin 80 günlük inkübasyon sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm)

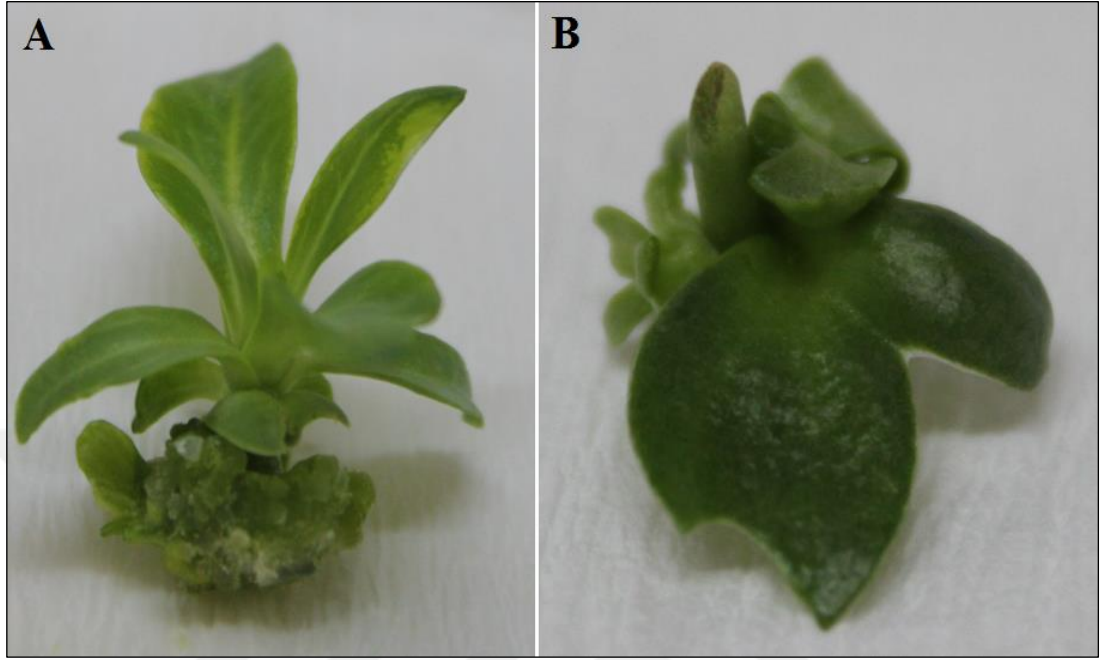
Farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> ile desteklenen ortamların 30 ve 80 günlük inkübasyon periyotları sonunda yapılan ölçümlerin verileri ışığında 80 günlük inkübasyon periyodu 30 günlük periyoda göre yaprak sayısı, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu olmak üzere üç farklı parametre üzerinde daha fazla etki göstermiştir. Fakat 80 günlük inkübasyon periyodu geniş ölçekli ticari üretim açısından uzun bir

süreç olarak değerlendirildiğinden dolayı, GA<sub>3</sub>'in farklı BBD'ler ile kombinasyon şeklinde kullanılabilmesi önerilmektedir (Özkan ve Özen, 2016). Literatürden bilindiği üzere gibberellinler bazı bitki türlerinde aktivatör olarak görev yaparken, bazı türlerde ise büyüme ve gelişmeyi inhibe edici etkiler göstermektedir. *Lisianthus* süs bitkisinin sürgün uzaması ve rejenerasyonu üzerinde GA<sub>3</sub> kullanımı diğer araştırmacılar tarafından genellikle farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile kombinasyon şeklinde ya da yaprakların üzerine spreyleme şeklinde kullanılmıştır. Çalışmada GA<sub>3</sub>'in kullanımına dair elde edilen sonuçlar *Lisianthus* (Mousavi ve diğ., 2012a), *Momordica charantia* L. (Thiruvengadam ve diğ., 2010), *Atriplex canescens* (Wochok ve Sluis, 1980), *Acacia mearnsii* (Quoirin ve diğ., 2001) ve *Eucalyptus tereticornis* Smith. (Das ve Mitra, 1990) üzerinde yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Buna ek olarak, MS5 besi ortamında saptanan anormalliklere *Vaccinium macrocarpon* Ait. (Marcotrigiano ve McGlew, 1991), *Artemisia dracuncululus* L. (Yaşar ve diğ., 2014), *Ficus carica* L. (Fraguas ve diğ., 2004), *Prunus institia* (Reeves ve diğ., 1985) ve *Rosa canina* (Pahnekolayi ve diğ., 2014) üzerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında da rastlandığı diğer araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir.

### 3.3. Direkt Organogenez Ait Bulgular

Direkt organogenez deneylerinde bitki materyali olarak GA<sub>3</sub> ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin nodal segmentleri kullanıldı. BAP denemesinde 30 günlük inkübasyon periyodu sonunda en yüksek ortalama yaprak sayısı 10,77±3,12 adet olarak MS6 ortamında gözlemlendi ve bitkiciklerin yapraklarında anormallikler ile bitkiciklerin kök kısmında kallus oluşumları gözlemlendi (Şekil 3.7). En iyi ortalama sürgün uzunluğu 1,58±0,17 cm (MS7) ve 1,58±0,28 cm olarak MS8 ortamlarında ölçüldü. Ortalama sürgün sayısı üzerinde kontrol ile kıyaslandığında önemli bir değişim gözlemlenmedi. Ortalama kök uzunluğu ve kök sayısında önemli oranda azalma tespit edildi (Şekil 3.8). BAP hormonu özellikle doku kültürü ve ıslah çalışmalarında en çok kullanılan sitokininlerden biridir. Genellikle sürgün çoğaltımı çalışmalarında yalnız başına ya da diğer BBD'ler ile kombinasyon şeklinde tercih edilmektedir ve çoğunlukla sürgün uzaması üzerinde düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında olumlu etkiler göstermektedir. *Lisianthus* üzerinde yapılan direkt organogenez çalışmalarının çoğunda benzil adeninin kullanımı tercih edilmiştir.

BAP hormonu genelde *Lisianthus* sürgünleri üzerinde kombinasyon şeklinde kullanılmıştır.

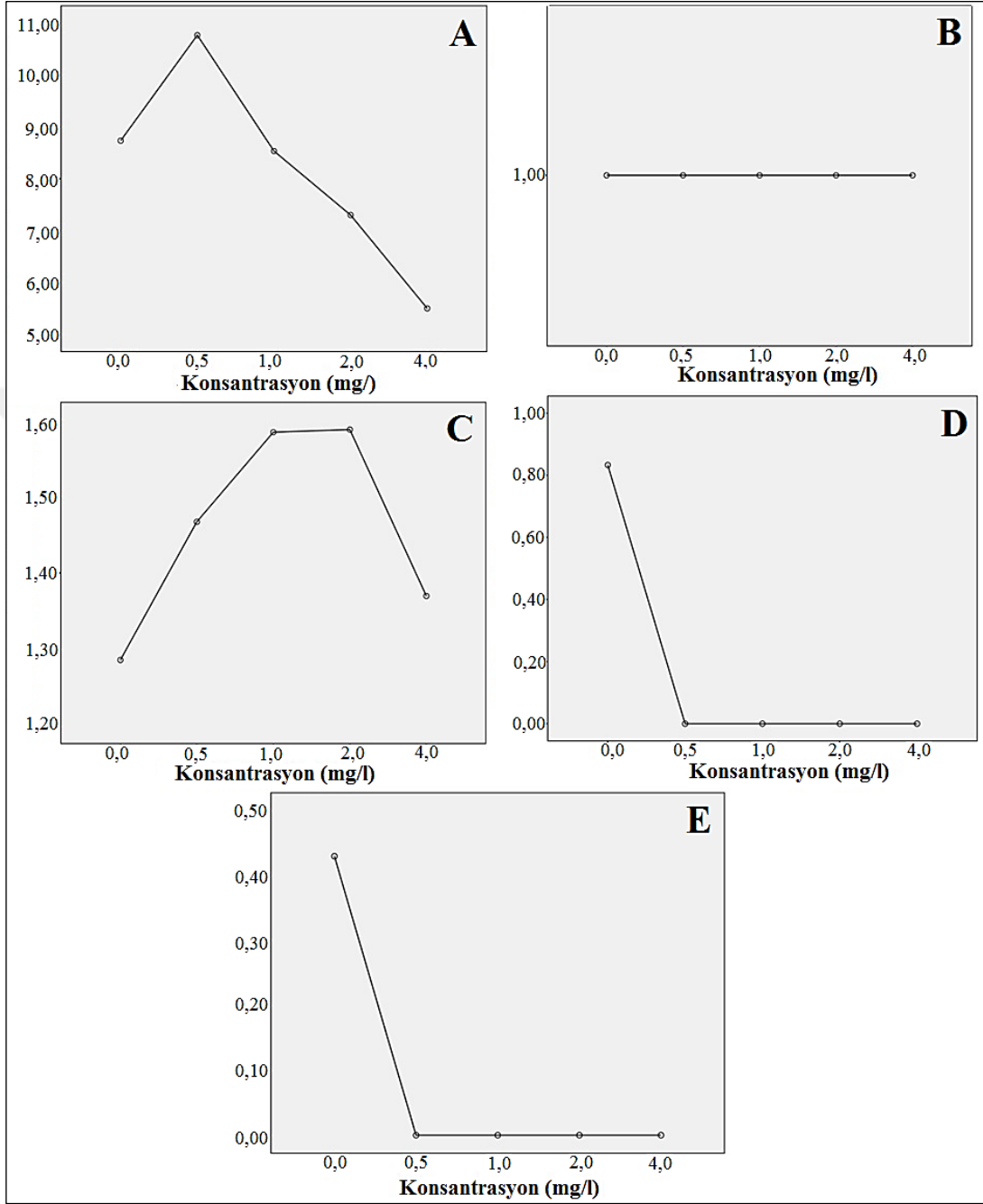


Şekil 3. 7. BAP ile desteklenen ortamlarda bitkiciklerin yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular A: Kalp şeklinde yaprak morfolojisi, yaprak kenarlarında sararma ve kök kısmında kallus oluşumu (MS7). B: Birleşik yapraklılık (MS6)

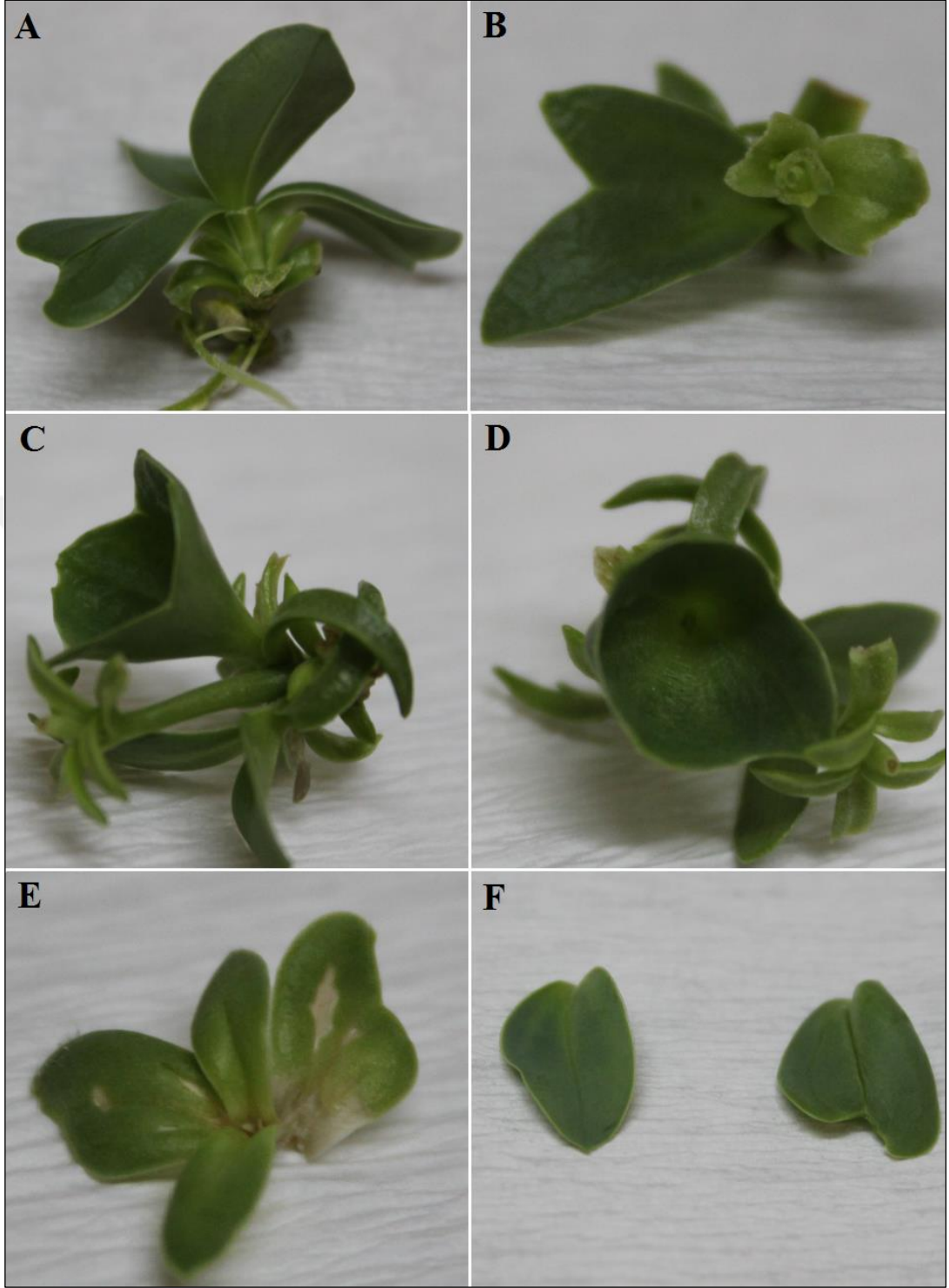
Kin denemesinde inkübasyon periyodu sonunda en yüksek ortalama yaprak sayısı  $8,43 \pm 1,56$  adet olarak MS13 ortamında ve en yüksek proliferasyon yüzdesi tüm ortamlarda %100 olarak kaydedildi (Paek ve Hahn, 2000). Bitkilerin yapraklarında birtakım anormallikler gözlemlendi (Şekil 3.9). Ortalama sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve kök sayısında önemli oranda azalma tespit edildi. (Şekil 3.10., Tablo 3.3). Özellikle yüksek konsantrasyonlarda Kin kullanımı yapraklar üzerinde lekelenmelere ve hiperhidrisitenin oluşmasına neden oldu. Paek ve Hahn (2000), *Lisianthus* yüksek dozda Kin kullanımının sürgün oluşumu üzerinde olumlu etki gösterdiğini fakat hiperhidrisiteye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda yüksek Kin dozlarının farklı bitkiler üzerinde de genellikle hiperhidrisiteye neden olduğu literatürden bilinmektedir (Cachita ve Craciun, 1990). Yapılan çalışma ile *Lisianthus* üzerinde yapılan diğer doku kültürü çalışmaları karşılaştırıldığında genellikle 1,0 mg/l Kin'in sürgün uzunluğu üzerinde etkili olduğu not edilmiştir. Fakat deneysel çalışmada Kin kullanımının yalnızca yaprak sayısı üzerinde etkili



olduğu ifade edilebilir. Diğer çalışmalarda ise, farklı BBD'ler ile kombinasyon şeklinde kullanıldığı literatürden bilinmektedir.

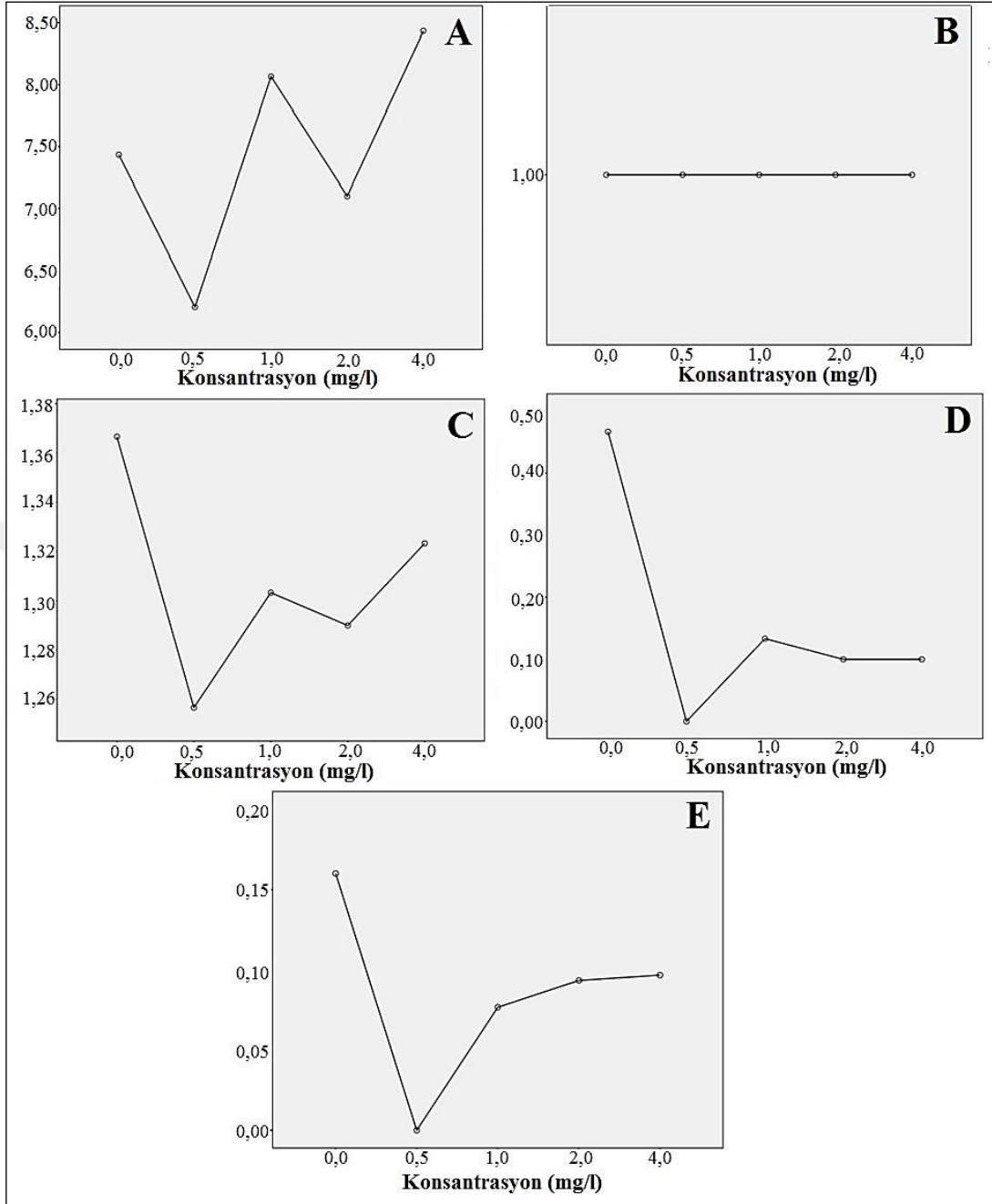


Şekil 3. 8. BAP ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolojik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm)



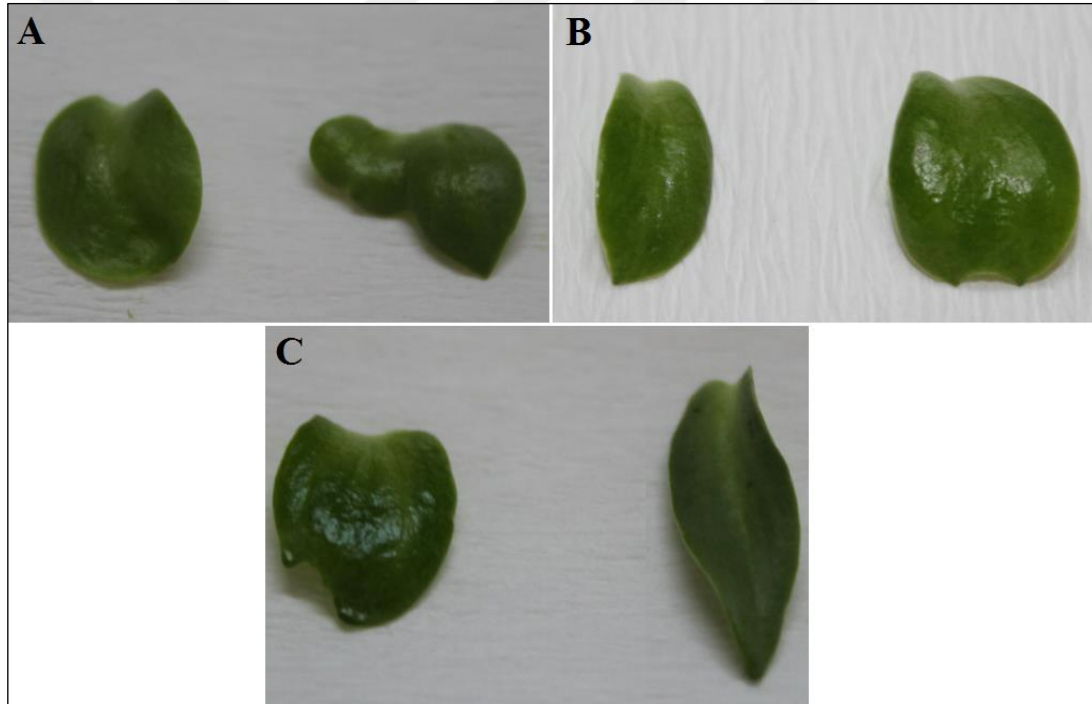
Şekil 3. 9. Kin ile desteklenen ortamlarda bulunan eksplantların yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular. A: Kin içermeyen MS1 besi ortamı, B: V şeklinde yaprak anormalitesi (MS11), C-D: Huni şeklinde yaprak oluşumu (MS13), E: Yaprak üzerinde nekrotik lekelenme (MS12), F: Normal ve anormal yaprak örneği (MS12)



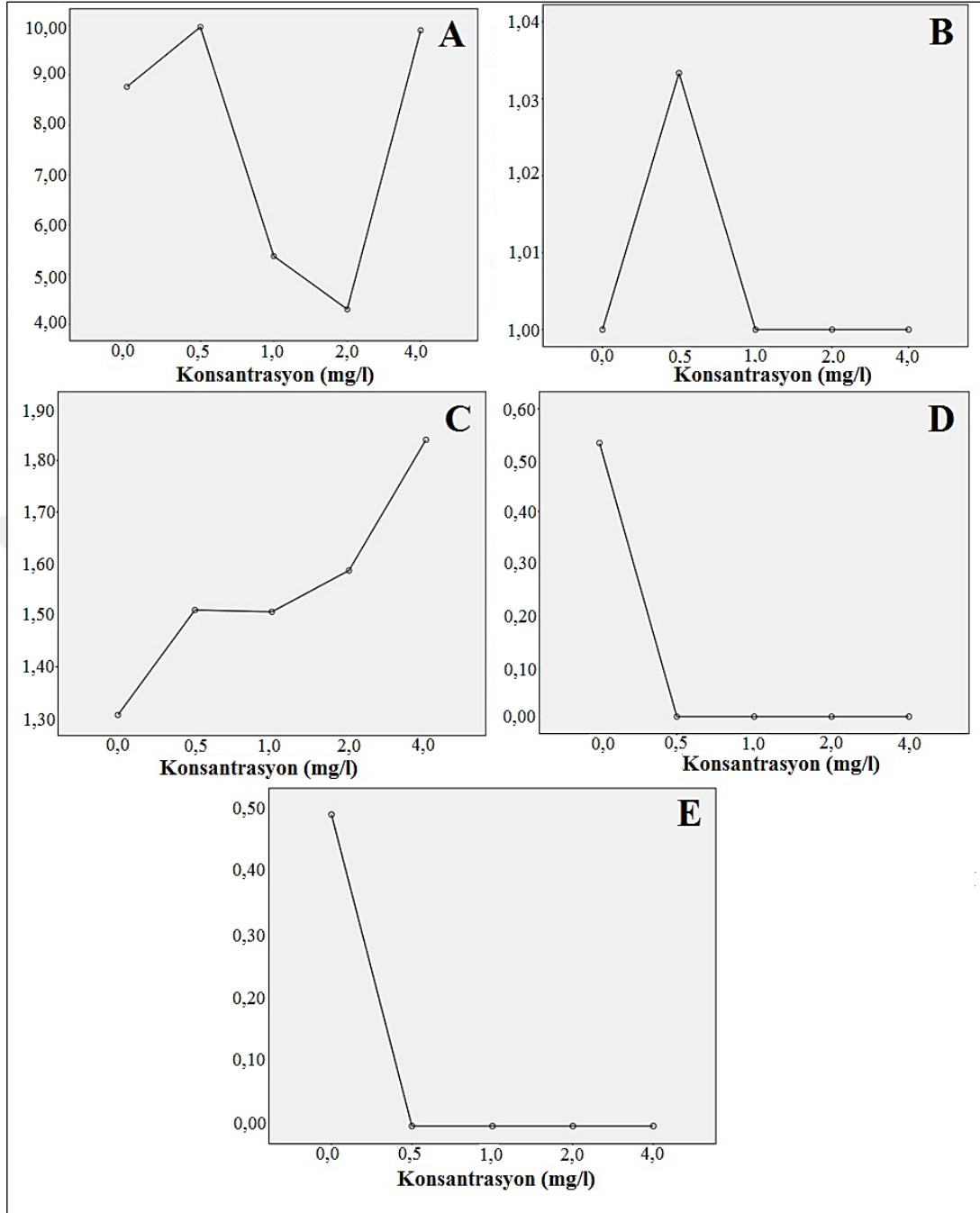


Şekil 3. 10. Kin ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolojik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm)

ZEA denemesinde 30 günlük inkübasyon periyodu sonunda en yüksek ortalama yaprak sayısı  $9,97 \pm 3,17$  adet olarak MS18 ortamında ölçüldü (Tablo 3.3). En iyi ortalama sürgün sayısı  $1,03 \pm 0,08$  adet olarak MS18 ortamından elde edildi. Ortalama en yüksek sürgün uzunluğu  $1,84 \pm 0,25$  cm olarak MS21 ortamında gözlemlendi. Bitkiciklerin yaprak uçlarında ve oluşumlarında bazı anormallikler ile kök kısımlarında kallus oluşumları gözlemlendi ve çok sayıda bitişik yapraklara sahip bitkiciklerin üretildiği not edildi (Şekil 3.11). Ortalama kök sayısı ve kök uzunluğu kontrol ile kıyaslandığında parametrelerde azalma tespit edildi (Tablo 3.3., Şekil 3.12). Lisianthus'un mikroçoğaltımı üzerinde ZEA denemesi literatürde yalnızca 1990 yılına ait bir yayında, hücre süspansiyonu düzeneğinde 3 ppm dozda sıvı besi ortamında farklı bir BBD ile kombine edilerek kullanılmıştır.

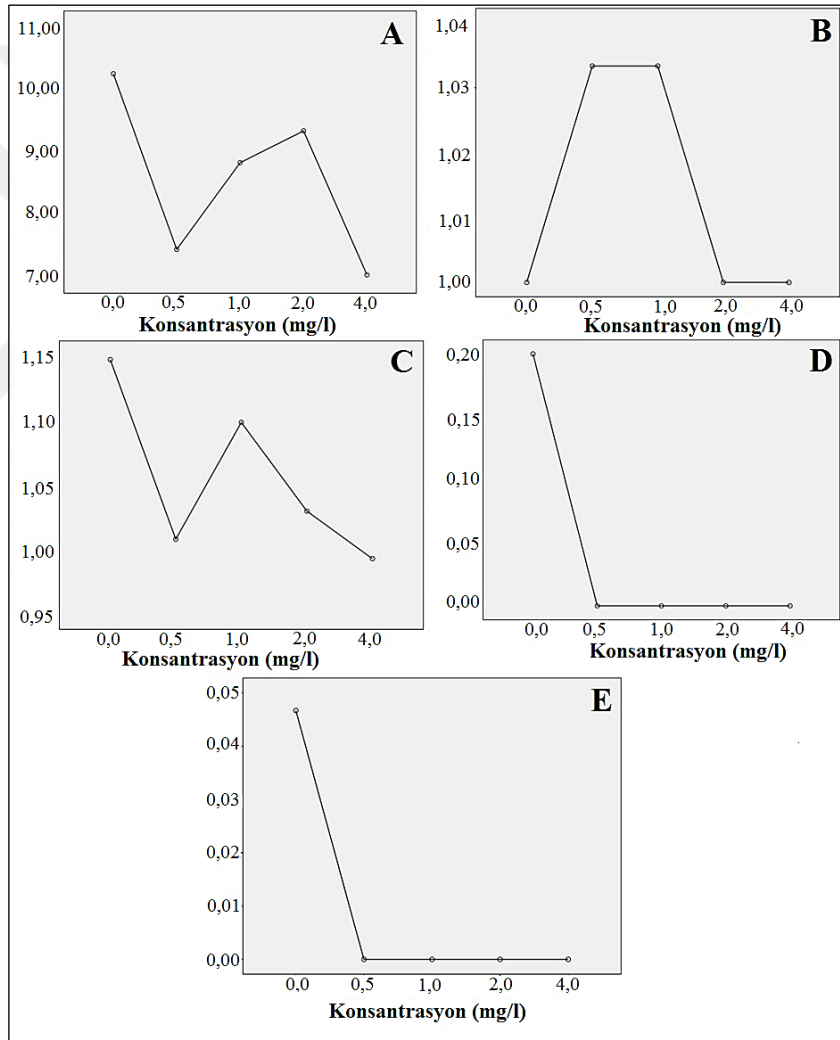


Şekil 3. 11. ZEA ile desteklenen ortamlarda bulunan eksplantların yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular. A: Birleşik yaprak morfolojisi (MS19), B: Aynı yaprak üzerinde iki adet yaprak ucu oluşumu (MS21), C: Yaprak kenarında V şeklinde girinti oluşumu (MS18)

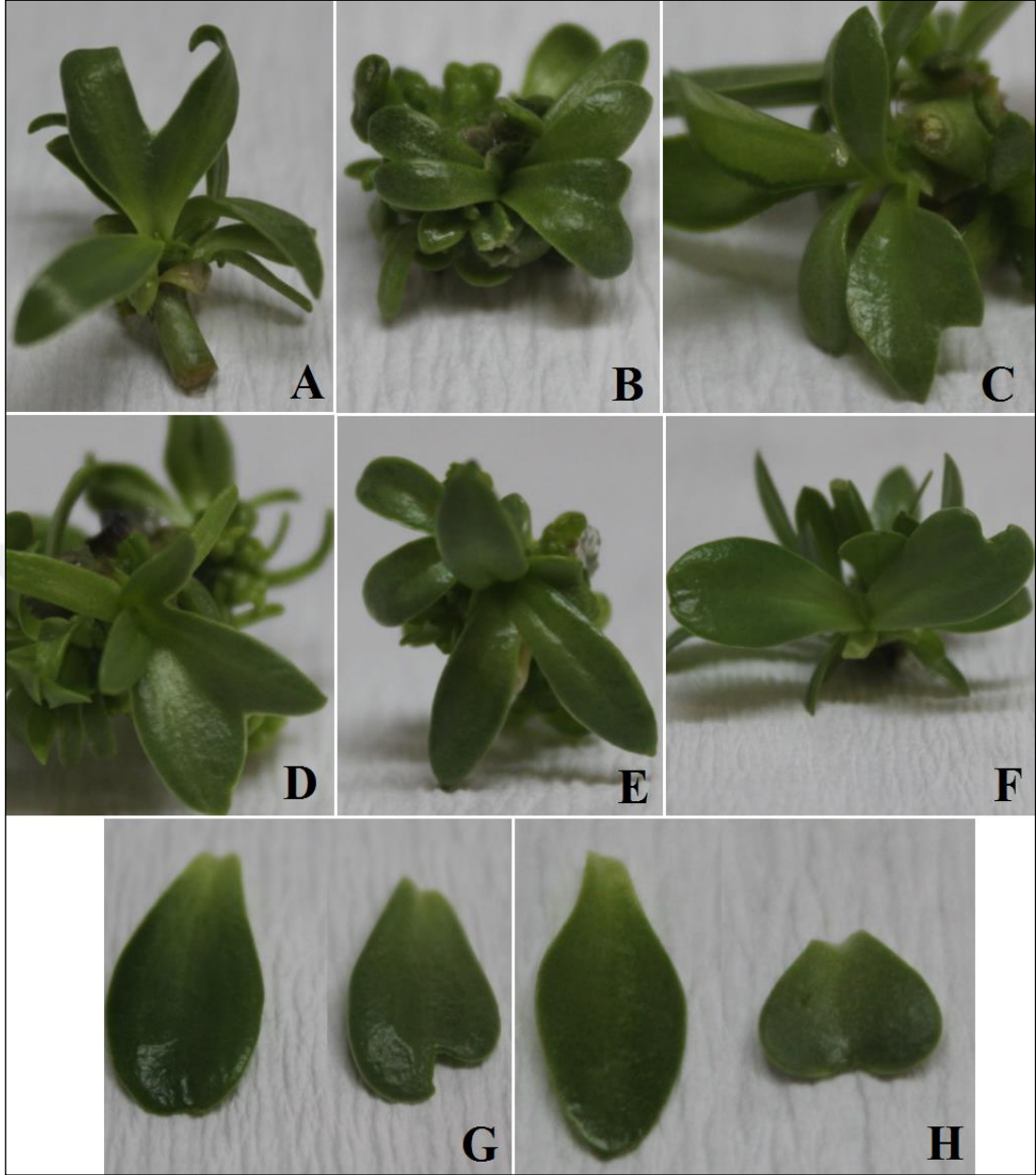


Şekil 3. 12. ZEA ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfolometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm)

TDZ denemesinde 30 günlük inkübasyon periyodu sonunda en yüksek ortalama sürgün sayısı  $1,03 \pm 0,08$  adet olarak MS14 (Pop ve diğ., 2016) ve MS15 ortamlarından elde edildi (Tablo 3.3). Ortalama yaprak sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu kontrol ile kıyaslandığında parametrelerde azalma tespit edildi (Şekil 3.13). TDZ içeren tüm besi ortamlarında yaprak anormallikleri gözlemlendi (Şekil 3.14). Lisianthus ile yapılan diğer çalışmalarda TDZ hormonu farklı BBD'ler ile kombinasyon şeklinde kullanılmıştır. TDZ hormonu diğer adenin türevlerine göre daha iyi etki göstermesi ile bilinirken (Te-chato ve diğ., 2008), çalışmada yalnızca ortalama sürgün sayısı üzerinde etkili olmuştur.



Şekil 3. 13. TDZ ile desteklenen ortamlardaki bitkiciklerin direkt sürgün organogenezi sonrası morfometrik değişimlerinin çizgi grafiği. A: Ortalama yaprak sayısı (adet), B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C: Ortalama sürgün uzunluğu (cm), D: Ortalama kök sayısı (adet), E: Ortalama kök uzunluğu (cm)



Şekil 3. 14. TDZ ile desteklenen ortamlarda bulunan eksplantların yapraklarında somaklonal varyasyona ait bulgular. A: V şeklinde yaprak oluşumu (MS17), B: Birleşik yaprak oluşumu (MS14), C: Yaprak kenarında V şeklinde girinti oluşumu (MS16), D: Yaprak ucunda vitrifikasyon başlangıcı (MS15), E: Birleşik yaprak görünümü (MS17), F: Yaprak ucunda deformasyon oluşumu (MS15), G: MS15 besi ortamındaki normal bir yaprak ile rejenerasyonu tamamlanmamış yaprak görünümü, H: MS16 besi ortamındaki normal bir yaprak ile kalp şeklinde oluşan yaprak görünümü



Tablo 3. 3. Farklı konsantrasyonlardaki sitokininlerin direkt sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerine ait bulgular

BBD	Konsantrasyon (mg/l)	Besi Ortamı Kodu	Sürgün Proliferasyonu (%)	Yaprak Sayısı (adet)	Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Sayısı (adet)	Kök Uzunluğu (cm)
BAP	0,0	MS1	100	8.73 ± 2.47 <sup>bc</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.73 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.42 <sup>b</sup>
	0,5	MS6	100	10.77 ± 3.12 <sup>c</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	1,0	MS7	100	8.53 ± 1.88 <sup>bc</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	2,0	MS8	96	7.30 ± 1.17 <sup>ab</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	4,0	MS9	100	5.50 ± 0.76 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Kin	0,0	MS1	100	7.43 ± 1.77 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.76 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.30 <sup>a</sup>
	0,5	MS10	100	6.20 ± 2.16 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	1,0	MS11	100	8.07 ± 1.50 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.12 <sup>a</sup>
	2,0	MS12	100	7.10 ± 1.72 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.15 <sup>a</sup>
	4,0	MS13	100	8.43 ± 1.56 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.24 <sup>a</sup>
ZEA	0,0	MS1	93	8.77 ± 2.55 <sup>bc</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.78 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.70 <sup>b</sup>
	0,5	MS18	90	9.97 ± 3.17 <sup>c</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	1,0	MS19	83	5.37 ± 0.93 <sup>ab</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	2,0	MS20	66	4.30 ± 1.68 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	4,0	MS21	90	9.90 ± 5.30 <sup>c</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
TDZ	0,0	MS1	93	10.23 ± 3.48 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.11 <sup>a</sup>
	0,5	MS14	83	7.47 ± 3.41 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	1,0	MS15	86	8.83 ± 1.92 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	2,0	MS16	86	9.33 ± 2.10 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
	4,0	MS17	100	7.07 ± 1.61 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>

\* Her sütünde aynı harfle belirtilen ortalamalar arasında P<0,05 anlamlılık düzeyinde farklılık yoktur (=Standart sapma)

Direkt organogenez denemesinde kullanılan sitokininler birbirleri ile kıyaslandığında, ZEA hormonu yaprak sayısı, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu olmak üzere üç farklı parametre üzerinde pozitif etki göstermesinden dolayı en etkili bulunan hormon olarak not edilmiştir. Sitokininler sürgün çoğaltımı için bitki doku kültüründe kullanılması elzem olan ve bitki büyümesini düzenleyici maddelerdir (Davies, 2014). Direkt organogenez metodu ile yapılan mikroçoğaltım uygulamalarında kullanılan tüm sitokininler 'Mariachi Pure White' kültivarının nodal eksplantlarından üretilen bitkicikler üzerinde bodurlaşmaya neden olmuştur. Oluşan bitkiciklerin nodal segmentleri arasındaki mesafeler bodurlaşmadan dolayı çok kısa kalmıştır. Sitokinin uygulamalarından sonra yapılan gözlemlerde yapraklar üzerinde meydana gelen birtakım morfogenetik değişimler göze çarpmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin klonal çoğaltım ile üretilen bitkicikler üzerinde morfogenetik değişimlere yol açtığı literatürden bilinmektedir (Piqueras ve Debergh, 1999). Sitokinin gruplarının farklı aktivitelere sahip olması ve kullanılan bitki materyallerindeki yapılar farklı düzeyde etki etmelerinden dolayı elde edilen sonuçlar üzerinde beklenmedik farklılıklar gözlemlenebilmektedir (Blakesly, 1991).

### **3.4. İndirekt Organogeneze Ait Bulgular**

#### **3.4.1. 2,4-D ve NAA ile desteklenen ortamların kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular**

İndirekt organogenez metodunda, direkt organogenez uygulamasından elde edilen yaprak eksplantları bitki materyali olarak kullanıldı. Böylece, her iki organogenez metodunun deneysel çalışmaları eş zamanlı olarak yürütüldü. Deneysel çalışmanın başlangıcında bitkiciklerden izole edilen ve aseptik ortamda steril bistüri yardımıyla parçalara ayrılarak farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS22, MS23, MS24 ve MS25 besi ortamlarına ve farklı konsantrasyonlarda NAA içeren MS26, MS27, MS28 ve MS29 besi ortamları üzerine inoküle edilen sağlıklı yaprak eksplantlarında kültürden yaklaşık olarak 7-8 hafta sonra kallus oluşumu gözlemlenmeye başladı.

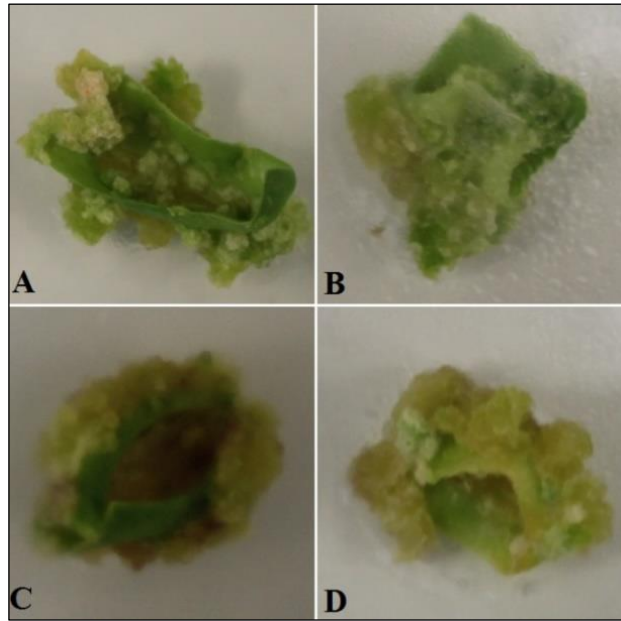
Deneysel çalışmada kullanılan iki hormonun da farklı konsantrasyonları kallogenez üzerinde beklenen etkiyi gösterdi (Tablo 3.4; Şekil 3.15). 2,4-D'in farklı konsantrasyonları ile yapılan denemede, en yüksek ortalama kallus oluşum yüzdesi MS23 besi ortamında %100 oranında gözlemlendi (Şekil 3.16). En iyi kallus taze

ağırlığı ise  $0.332 \pm 0.54$  g olarak MS24 besi ortamında ölçüldü. Oluşan kallusların dokusunun kırılğan yapıda olduğu gözlemlendi. Kallus renklerinin MS22 ve MS23 besi ortamında yeşil homojen renkli, MS24 ve MS25 besi ortamlarında ise heterojen sarı renkli olduğu not edildi.

Tablo 3. 4. Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve NAA hormonlarının kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular

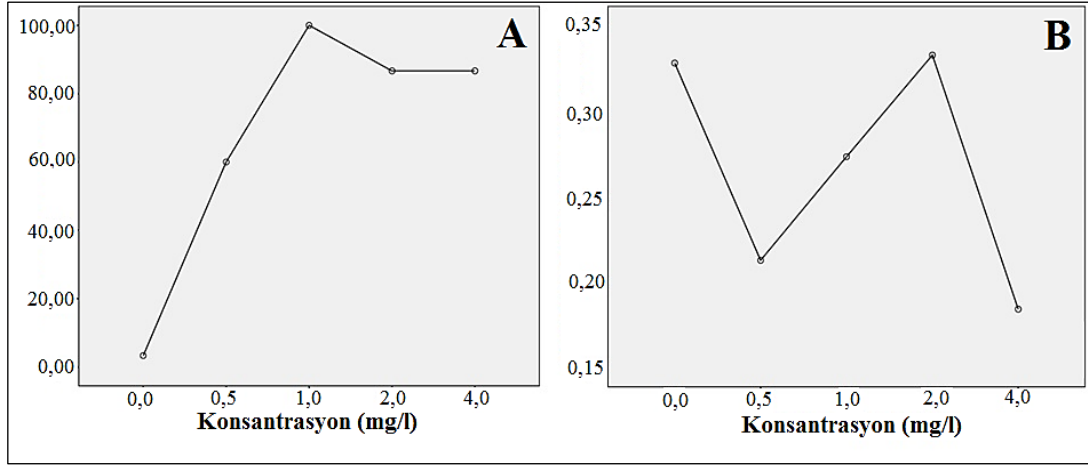
BBD	Konsantrasyon (mg/l)	Besi Ortamı Kodu	Kallus Oluşum Yüzdesi (%)	Kallus Taze Ağırlığı (g)	Kallus Dokusu
2,4-D	0,0	MS1	3	$0,328 \pm 0,27^a$	Yeşil - Kırılğan
	0,5	MS22	60	$0,212 \pm 0,18^a$	Yeşil - Kırılğan
	1,0	MS23	100	$0,273 \pm 0,20^a$	Yeşil - Kırılğan
	2,0	MS24	86	$0,332 \pm 0,54^a$	Sarı - Kırılğan
	4,0	MS25	86	$0,184 \pm 0,14^a$	Sarı - Kırılğan
NAA	0,0	MS1	3	$0,328 \pm 0,27^a$	Yeşil - Kırılğan
	0,5	MS26	90	$0,420 \pm 0,21^a$	Yeşil - Kırılğan
	1,0	MS27	96	$0,324 \pm 0,23^a$	Yeşil - Kırılğan
	2,0	MS28	90	$0,609 \pm 0,29^a$	Sarı - Kırılğan
	4,0	MS29	93	$0,419 \pm 0,31^a$	Sarı - Kırılğan

\* Her sütunda aynı harfle belirtilen ortalamalar arasında  $P < 0,05$  anlamlılık düzeyinde farklılık yoktur ( $\pm$  Standart sapma)



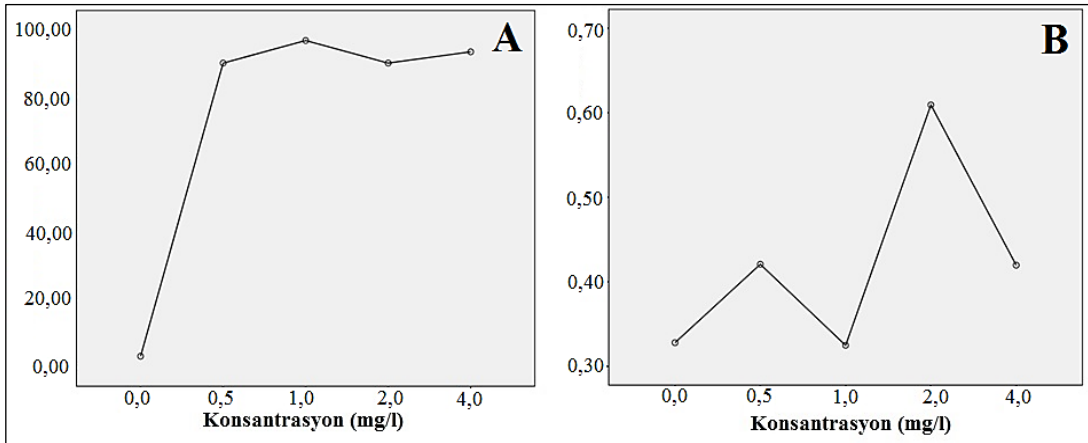
Şekil 3. 15. 2,4-D içeren besi ortamlarının kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular. A: MS22, B: MS23, C: MS24, D: MS25



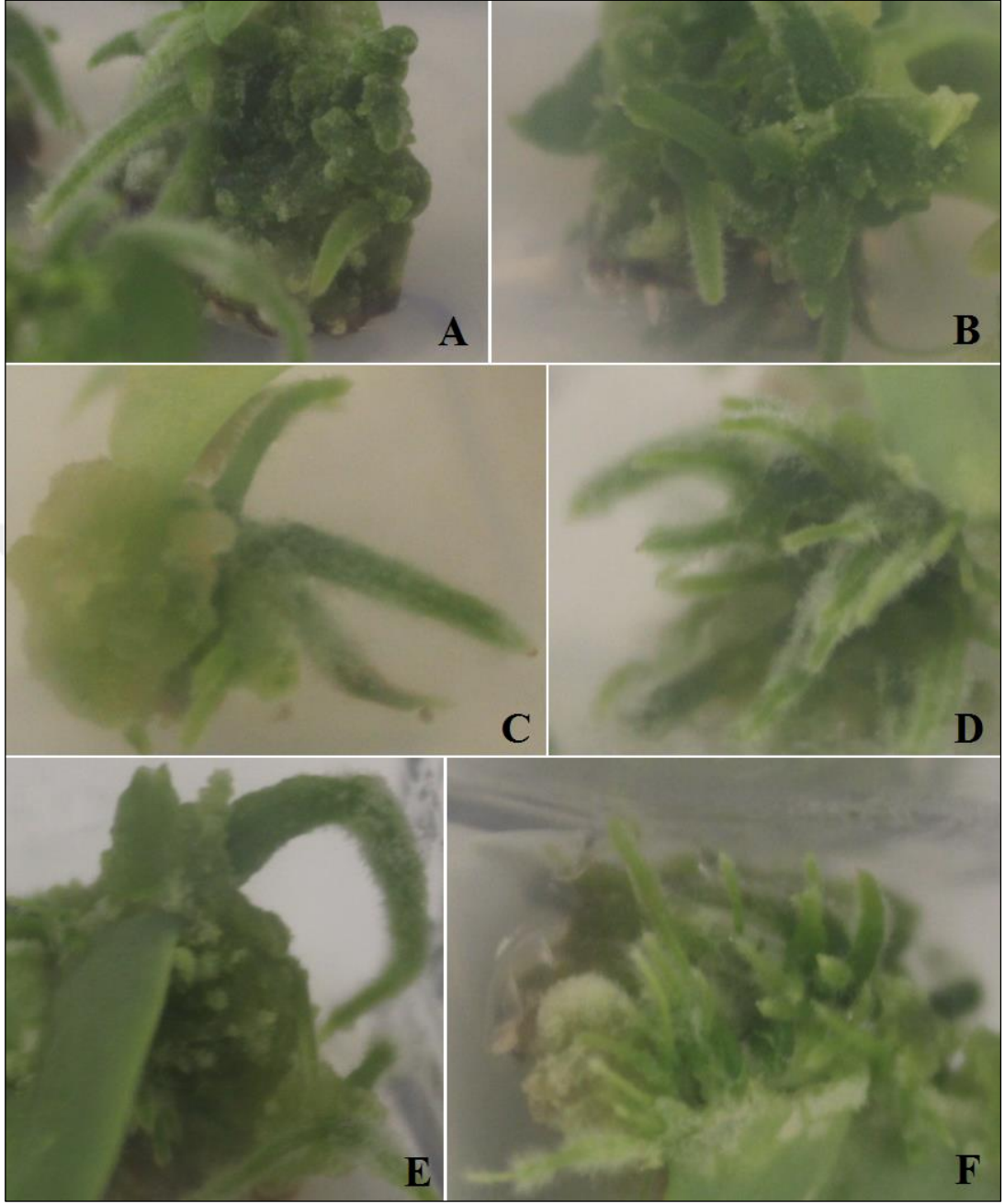


Şekil 3. 16. Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren besi ortamlarının kallogeniz üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A: Kallus oluşum yüzdesi (%), B: Ortalama kallus taze ağırlığı (g)

NAA'in farklı konsantrasyonları ile yapılan denemede, en yüksek ortalama kallus oluşum yüzdesi MS27 besi ortamında %96 oranında gözlemlendi (Tablo 3.4; Şekil 3.17). En iyi kallus taze ağırlığı ise  $0.609 \pm 0.29$  g olarak MS28 besi ortamında ölçüldü. Oluşan kallusların dokusunun kırılgen yapıda olduğu gözlemlendi . Kallus renklerinin MS22 ve MS23 besi ortamında yeşil homojen renkli, MS24 ve MS25 besi ortamlarında ise heterojen sarı renkli olduğu not edildi. Buna ek olarak, NAA ile desteklenen besi ortamlarında bulunan eksplantlarda kallus oluşumunun yanısıra küçük kök çıkıntıları oluşumu da gözlemlendi (Şekil 3.18).



Şekil 3.17. Farklı konsantrasyonlarda NAA içeren besi ortamlarının kallogeniz üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A: Kallus oluşum yüzdesi (%), B: Ortalama kallus taze ağırlığı (g)



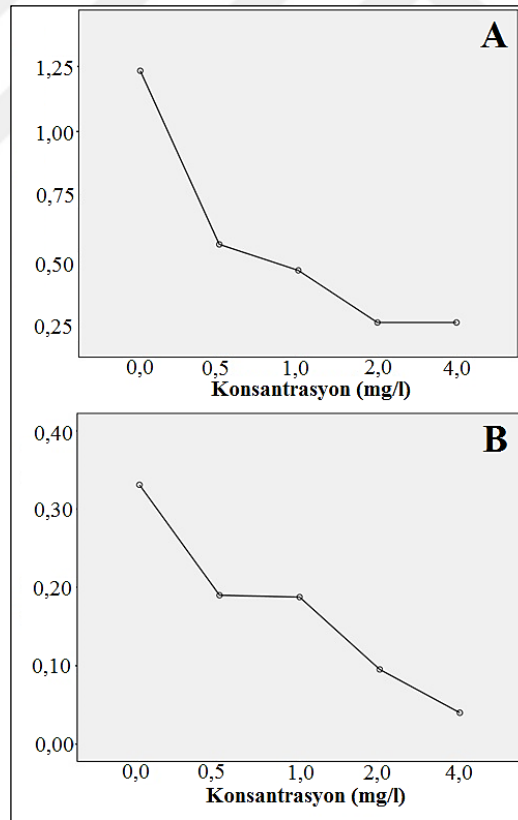
Şekil 3.18. NAA içeren besi ortamlarının kallogenez üzerindeki etkilerine ait bulgular. A: MS26, B: MS27, C: MS28, D-E-F: MS29

Kallogenez denemesinden edilen veriler ışığında her iki hormonunda 1,0 mg/l konsantrasyonundan en yüksek kallus oluşum yüzdesi, 2,0 mg/l konsantrasyonundan ise en yüksek ortalama kallus taze ağırlığı elde edilmiştir. Tablo 3.4 incelendiğinde kallus oluşum yüzdesi için 2,4-D, ortalama kallus taze ağırlığı için ise NAA hormonu etkili bulunmuştur (Miri ve diğ., 2016). Her iki hormonun aynı konsantrasyonları kallus dokusu üzerinde aynı etkileri göstermiştir. Literatürde *Lisianthus*'un kallogenezi üzerinde yapılan diğer çalışmalarda 2,4-D ve NAA diğer BBD'ler ile

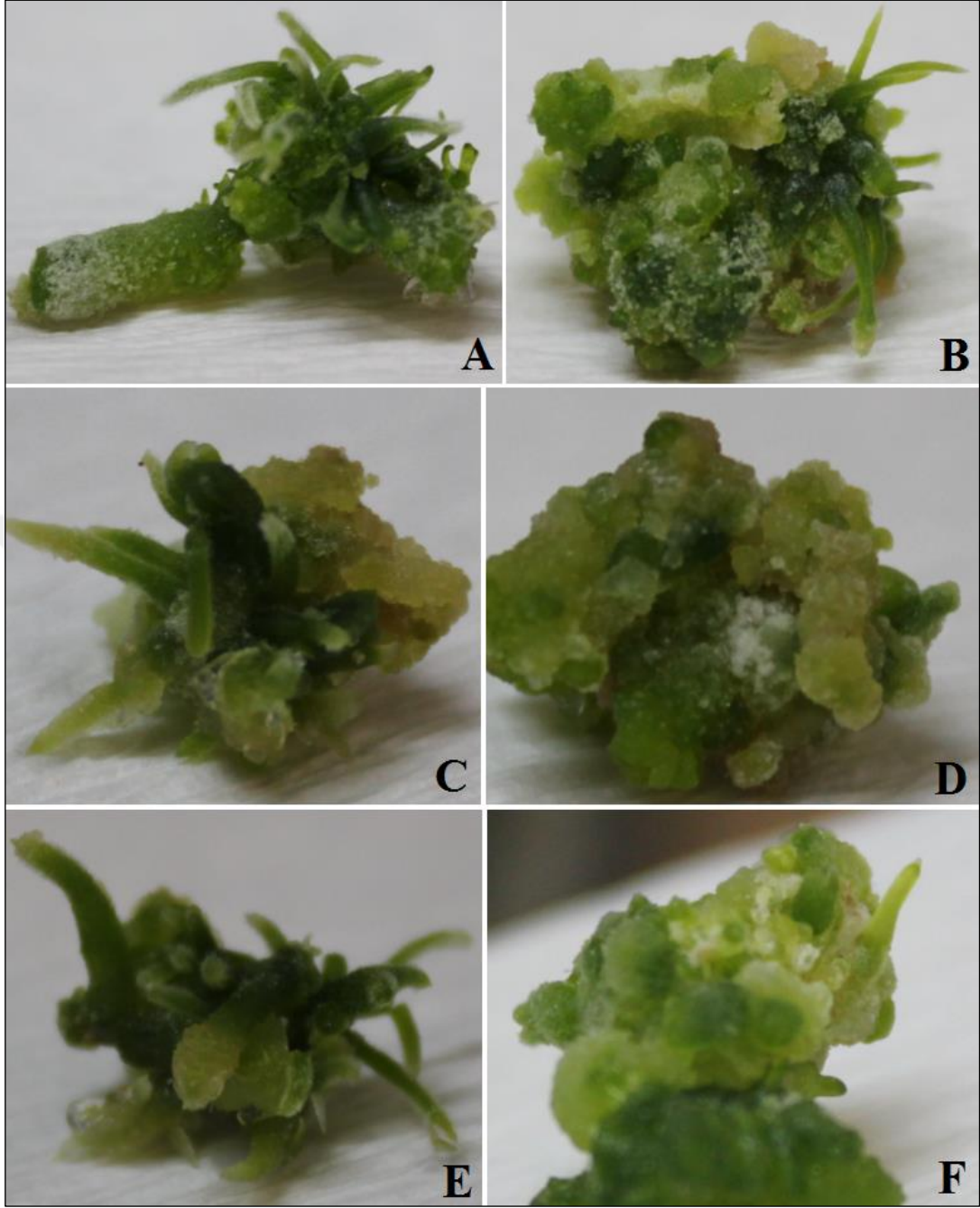
kombinasyon şeklinde kullanılmıştır. Kallogenez çalışmalarında NAA hormonu 2,4-D'den daha fazla tercih edilmiştir.

### 3.4.2. Kallustan adventif sürgün oluşumuna ait bulgular

Adventif sürgün rejenerasyonu denemesinde, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve NAA ile desteklenen besi ortamlarından izole edilen kalluslar aseptik şartlar altında steril bistüri yardımıyla dört eşit parçaya bölünerek farklı konsantrasyonlarda BAP ve Kin içeren besi ortamlarına inoküle edildi. Elde edilen veriler ışığında adventif sürgün oluşumunda en iyi sonucu veren hormon, deneysel çalışmanın devamında IAA ve IBA ile ayrı ayrı kombine edilerek yeni besi ortamları oluşturuldu. BAP denemesinden elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında besi ortamlarındaki tüm konsantrasyonlar eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı ve uzunluğu üzerinde etkili bulunmamıştır. (Şekil 3.19; Şekil 3.20; Tablo 3.5).

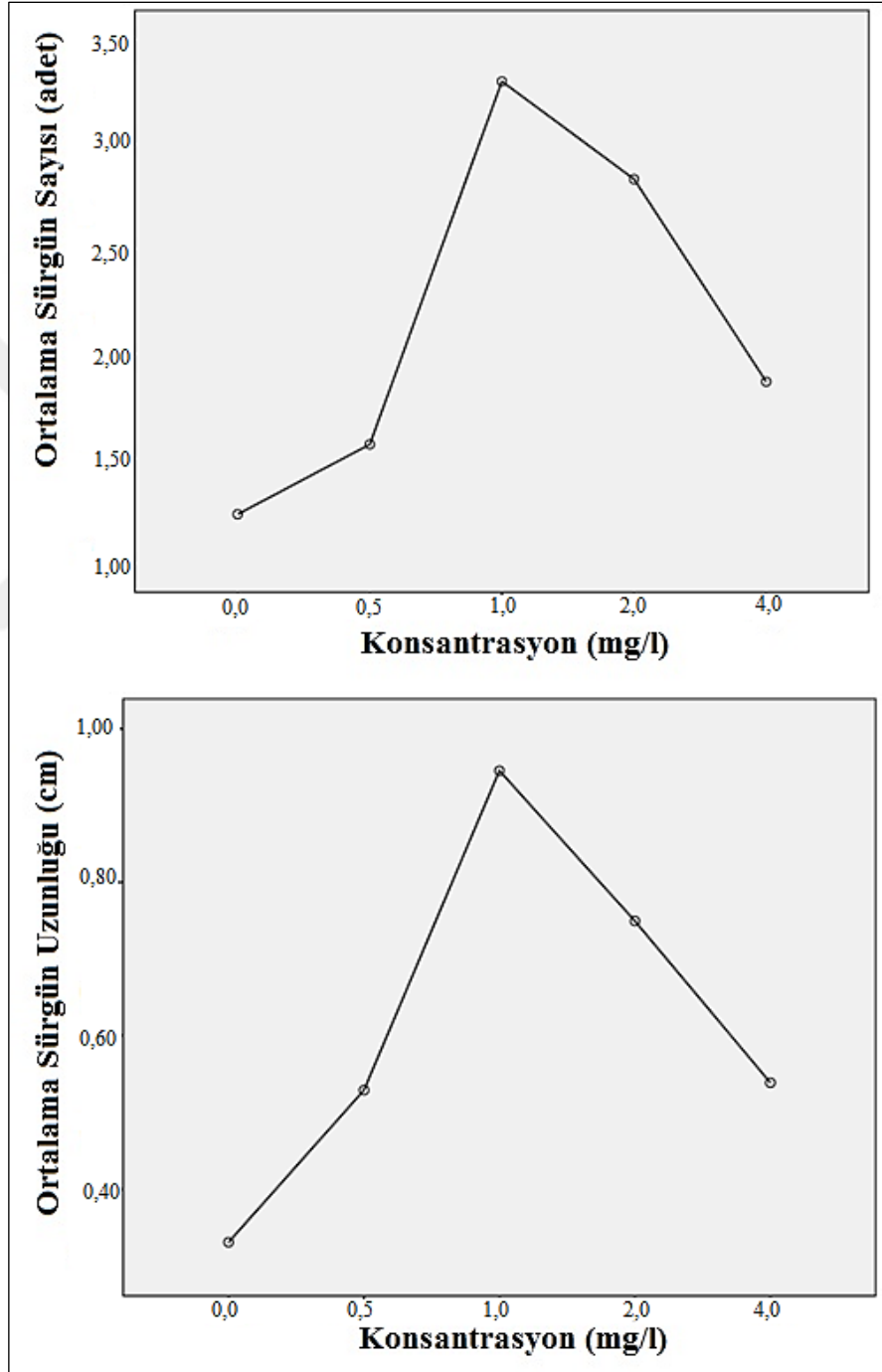


Şekil 3.19. Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A: Ortalama sürgün sayısı (adet), B: Ortalama sürgün uzunluğu (cm)



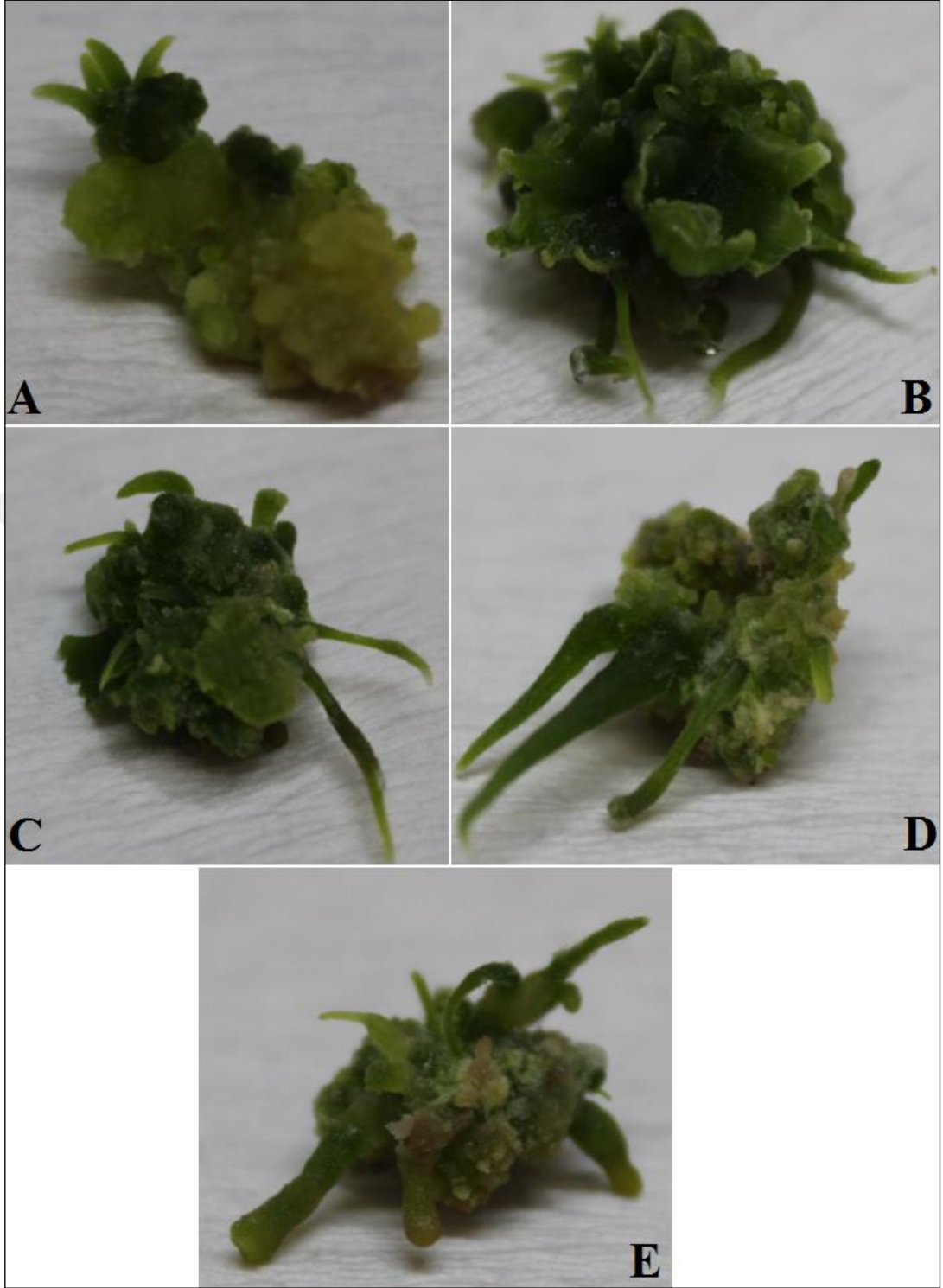
Şekil 3. 20. Farklı konsantrasyonlarda BAP ile desteklenen besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki morfolojik etkileri. A: MS31, B: MS30, C: MS32, D: MS33, E-F: MS32

Kin denemesinde eksplant başına düşen ortalama en yüksek sürgün sayısı  $3.30 \pm 0.78$  adet ve en iyi ortalama sürgün uzunluğu  $0.94 \pm 0.15$  cm olarak MS35 besi ortamında ölçüldü (Tablo 3.5). Elde edilen veriler ışığında Kin ile desteklenen MS35 (1,0 mg/l) besi ortamı BAP ile desteklenen ortamlardan daha etkili bulunarak (Şekil 3.21; Şekil 3.22), çalışmanın devamında IAA ve IBA ile kombinasyon halinde kullanıldı.



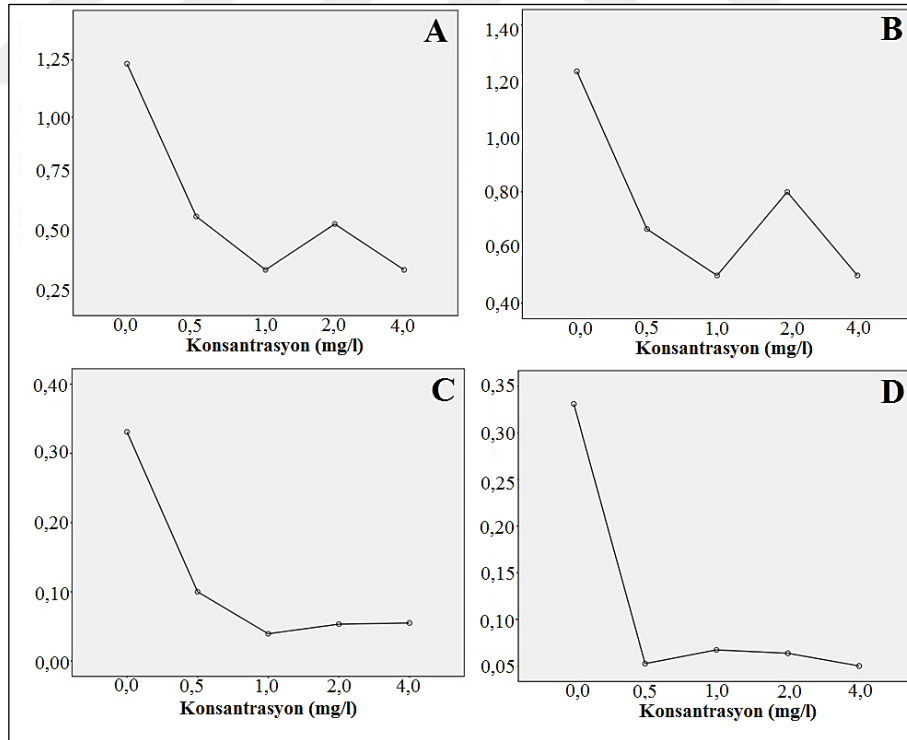
Şekil 3.21. Farklı konsantrasyonlarda Kin içeren besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği



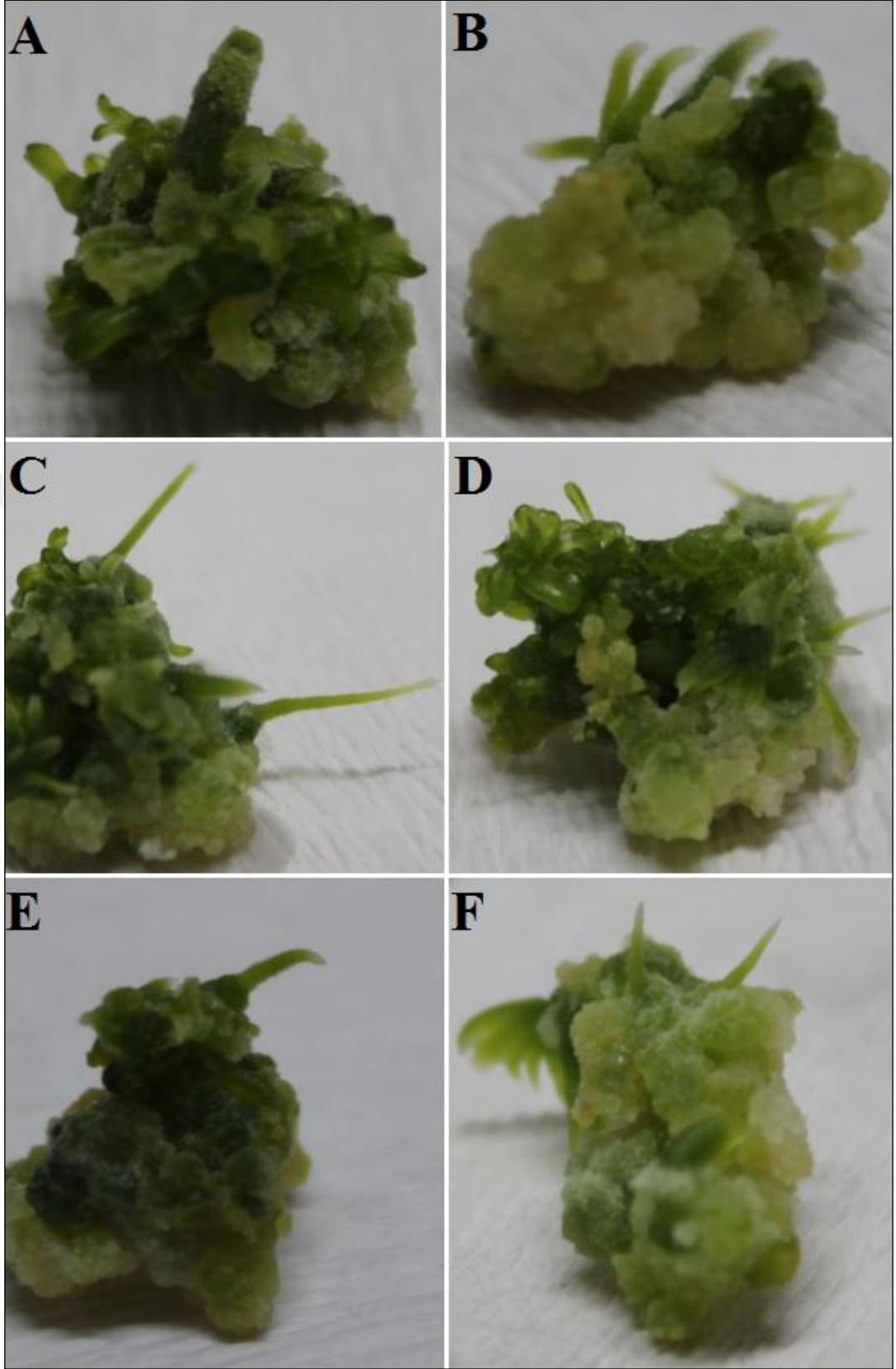


Şekil 3.22. Farklı konsantrasyonlarda Kin ile desteklenen besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki morfolojik etkileri. A: MS34, B: MS35, C: MS36, D-E: MS37

Kin + IAA ve Kin + IBA kombinasyonları ile desteklenen besi ortamlarında kallus başına düşen ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu parametreleri üzerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi ve parametrelerin ölçümlerinde kontrol grubuna göre düşüş olduğu kaydedildi (Tablo 3.5; Şekil 3.23). Buna ek olarak, oluşan kallusların dokusunda homojen görünümünden heterojen görünüme doğru geçişlerin söz konusu olduğu ve kalluslar üzerinde çeşitli sararma ve lekelenmeler gözlemlendi. Literatürden bilindiği üzere oksinler bor elementinin yoğun olarak bulunduğu dokularda birikmeye meyilli olduklarından dolayı nekrotik lekelenmelere sebep olabilmektedirler (Seçer, 1989). IAA ve IBA doku kültürü çalışmalarında sıkça kullanılan oksin tipleridir. Sitokininler ile kombine edildiklerinde genelde kallus indüksiyonunda, adventif sürgün rejenerasyonunda ve köklenme üzerinde pozitif etki gösterirler. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında oluşan sürgün çıkıntılarının uçlarında yoğun şekilde vitrifikasyon oluşumu olduğu, büyümenin yavaşladığı düşünüldüğünde kallus dokularının rejenerasyon yeteneğini yüksek oranda kaybettikleri ifade edilebilir (Şekil 3.24; Şekil 3.25).

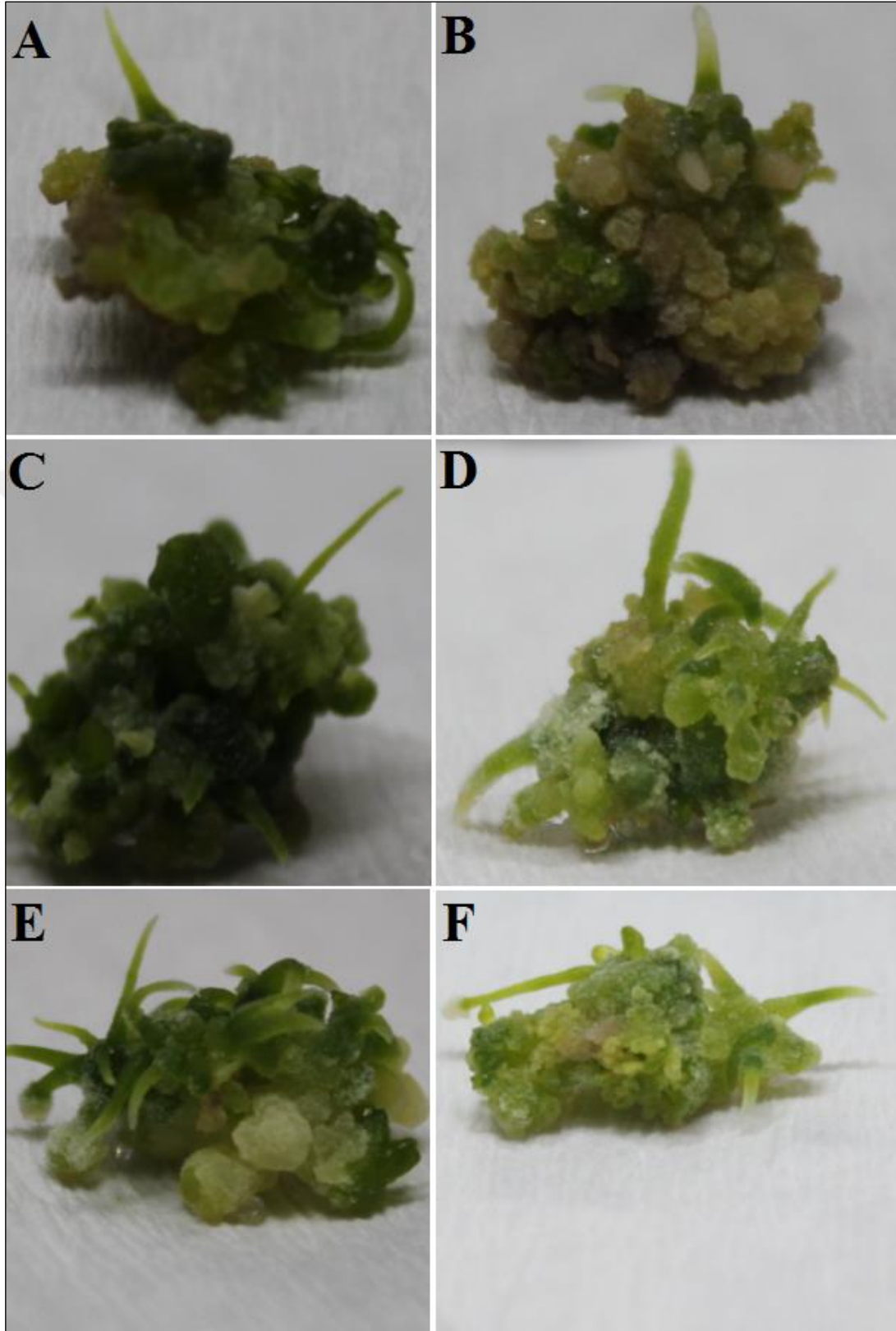


Şekil 3. 23. KIN + IAA ve KIN + IBA içeren besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin çizgi grafiği. A-B: Ortalama sürgün sayısı (adet), C-D: Ortalama sürgün uzunluğu (cm)



Şekil 3.24. Kin + IAA kombinasyonlarının adventif sürgüncükler üzerindeki morfolojik etkilerine ait bulgular. A: MS38, B: MS39, C: MS40, D-E-F: MS41





Şekil 3.25. Kin + IBA kombinasyonlarının adventif sürgüncükler üzerindeki morfolojik etkilerine ait bulgular. A-B: MS42, C-D: MS43, E: MS45, F:MS44

Tablo 3. 5. BAP, Kin, Kin + IAA ve Kin + IBA ile desteklenen besi ortamlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerine ait bulgular

BBD	Konsantrasyon (mg/l)	Besi Ortamı Kodu	Ortalama Sürgün Sayısı (adet)	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm)
BAP	0,0	MS1	1,23 ± 0,83 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,24 <sup>b</sup>
	0,5	MS30	0,57 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,16 <sup>ab</sup>
	1,0	MS31	0,47 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,18 <sup>ab</sup>
	2,0	MS32	0,27 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,06 <sup>a</sup>
	4,0	MS33	0,27 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,02 <sup>a</sup>
Kin	0,0	MS1	1,23 ± 0,83 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,24 <sup>a</sup>
	0,5	MS34	1,57 ± 0,89 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,48 <sup>ab</sup>
	1,0	MS35	3,30 ± 0,78 <sup>b</sup>	0,94 ± 0,15 <sup>c</sup>
	2,0	MS36	2,83 ± 0,29 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,13 <sup>bc</sup>
	4,0	MS37	1,87 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,12 <sup>ab</sup>
Kin + IAA	0,0	MS1	1,23 ± 0,83 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,24 <sup>b</sup>
	1,0 + 0,5	MS38	0,57 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,07 <sup>a</sup>
	1,0 + 1,0	MS39	0,33 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,02 <sup>a</sup>
	1,0 + 2,0	MS40	0,53 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,05 <sup>a</sup>
	1,0 + 4,0	MS41	0,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,05 <sup>a</sup>
Kin + IBA	0,0	MS1	1,23 ± 0,83 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,24 <sup>b</sup>
	1,0 + 0,5	MS42	0,67 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>a</sup>
	1,0 + 1,0	MS43	0,50 ± 0,45 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,07 <sup>a</sup>
	1,0 + 2,0	MS44	0,80 ± 0,47 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>
	1,0 + 4,0	MS45	0,50 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,04 <sup>a</sup>

\* Her sütunda aynı harfle belirtilen ortalamalar arasında P<0,05 anlamlılık düzeyinde farklılık yoktur. (± Standart sapma)

### 3.4.3. Milimetrik sürgüncüklerin *in vitro* gelişimine ait bulgular

Adventif sürgün rejenerasyonundan elde edilen milimetrik sürgüncükler doku kültürü uygulamaları için yeterli gelişime gösteremediğinden dolayı aseptik koşullar altında steril bistüri yardımı ile kalluslardan izole edilerek, gelişimlerini tamamlayabilmeleri adına 1,0 mg/l BAP hormonu ile farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> kombinasyonlarını içeren yeni ortamlara inoküle edildiler.

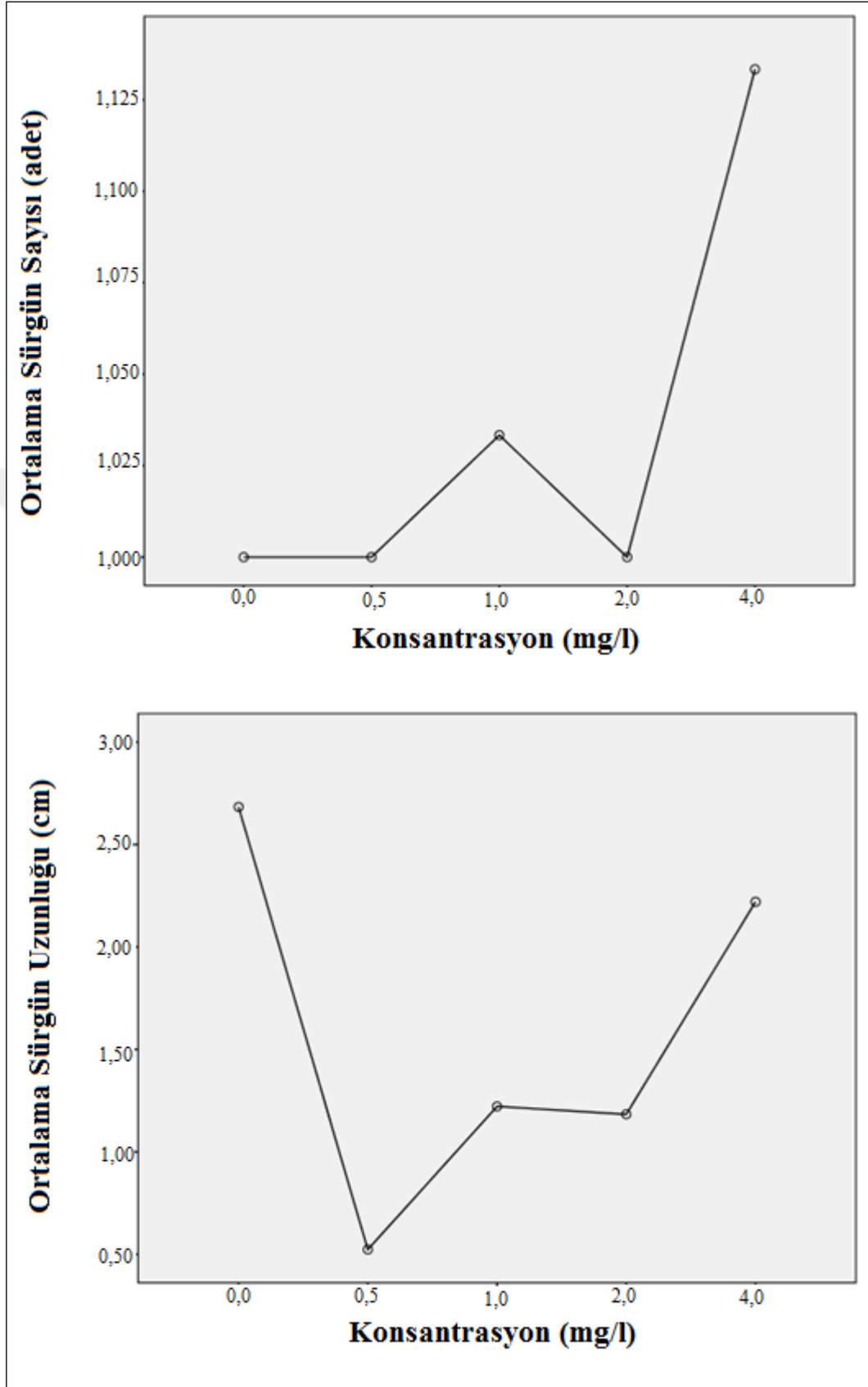
30 günlük inkübasyon periyodu sonrası sürgüncüklerin ölçümleri yapılarak, morfolojilerindeki değişimler kaydedildi. Elde edilen veriler ışığında eksplant başına düşen en yüksek ortalama sürgün sayısı MS49 besi ortamında  $1,13 \pm 0,16$  adet olarak ölçüldü (Tablo 3.6; Şekil 3.26). Eksplant başına düşen ortalama sürgün uzunluğu üzerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişim gözlemlenmedi. Buna ek olarak, oluşturulan tüm kombinasyonlar sürgün morfolojileri üzerinde renk değişimine neden oldu. İnkübasyon öncesinde kalluslardan izole edilen homojen yeşil görünümdeki milimetrik sürgüncükler (Şekil 3.27) üzerinde inkübasyon sonrası 6 farklı renk (yeşilimsi kahverengi, sarımsı kahverengi, yeşilimsi sarı, koyu kahve, beyazımsı sarı ve krem rengi) ile heterojen bir görünüm olduğu ve önemli derecede hiperhidrisite oluşumu, kararma ve apikal uç ölümlerinin meydana geldiği not edildi (Şekil 3.28). Hiperhidrisiteye bağlı olarak sürgüncüklerin büyük çoğunluğunun canlılıklarını kaybederek vitrifike oldukları gözlemlendi. Çalışmadan farklı olarak Lisianthus'un sürgünleri üzerinde BAP + GA<sub>3</sub> kombinasyonları ile çalışmış olan Mousavi ve diğ. (2012a), 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l GA<sub>3</sub> kombinasyonunu kullanarak kontrol grubuna göre pozitif sonuçlar elde etmişlerdir.

Tablo 3. 6. BAP + GA<sub>3</sub> ile desteklenen besi ortamlarının milimetrik sürgünlerin *in vitro* gelişimi üzerindeki etkilerine ait bulgular

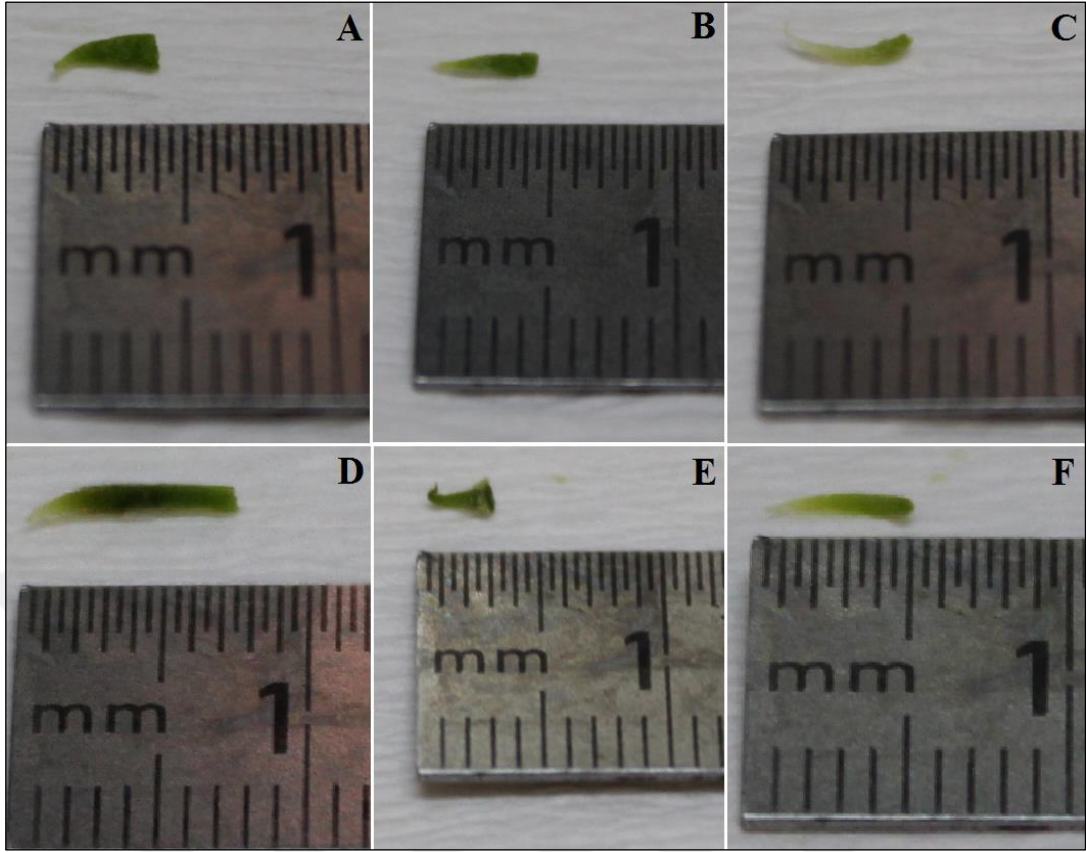
BBD	Konsantrasyon (mg/l)	Besi Ortamı Kodu	Ortalama Sürgün Sayısı (adet)	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm)	** Kallus Dokusu
	0,0	MS1	$1,00 \pm 0,00^a$	$2,68 \pm 2,11^a$	YK, SK
	1,0 + 0,5	MS46	$1,00 \pm 0,00^a$	$0,52 \pm 0,08^a$	YS, KK
BAP + GA <sub>3</sub>	1,0 + 1,0	MS47	$1,03 \pm 0,08^a$	$1,22 \pm 1,88^a$	YK, BS
	1,0 + 2,0	MS48	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,18 \pm 1,78^a$	YK, KR
	1,0 + 4,0	MS49	$1,13 \pm 0,16^b$	$2,22 \pm 1,99^a$	YK, KK

\* Her sütunda aynı harfle belirtilen ortalamalar arasında  $P < 0,05$  anlamlılık düzeyinde farklılık yoktur. ( $\pm$  Standart sapma)

\*\* YK: Yeşilimsi kahverengi, SK: Sarımsı kahverengi, YS: Yeşilimsi sarı, KK: Koyu kahve, BS: Beyazımsı sarı, KR: Krem rengi



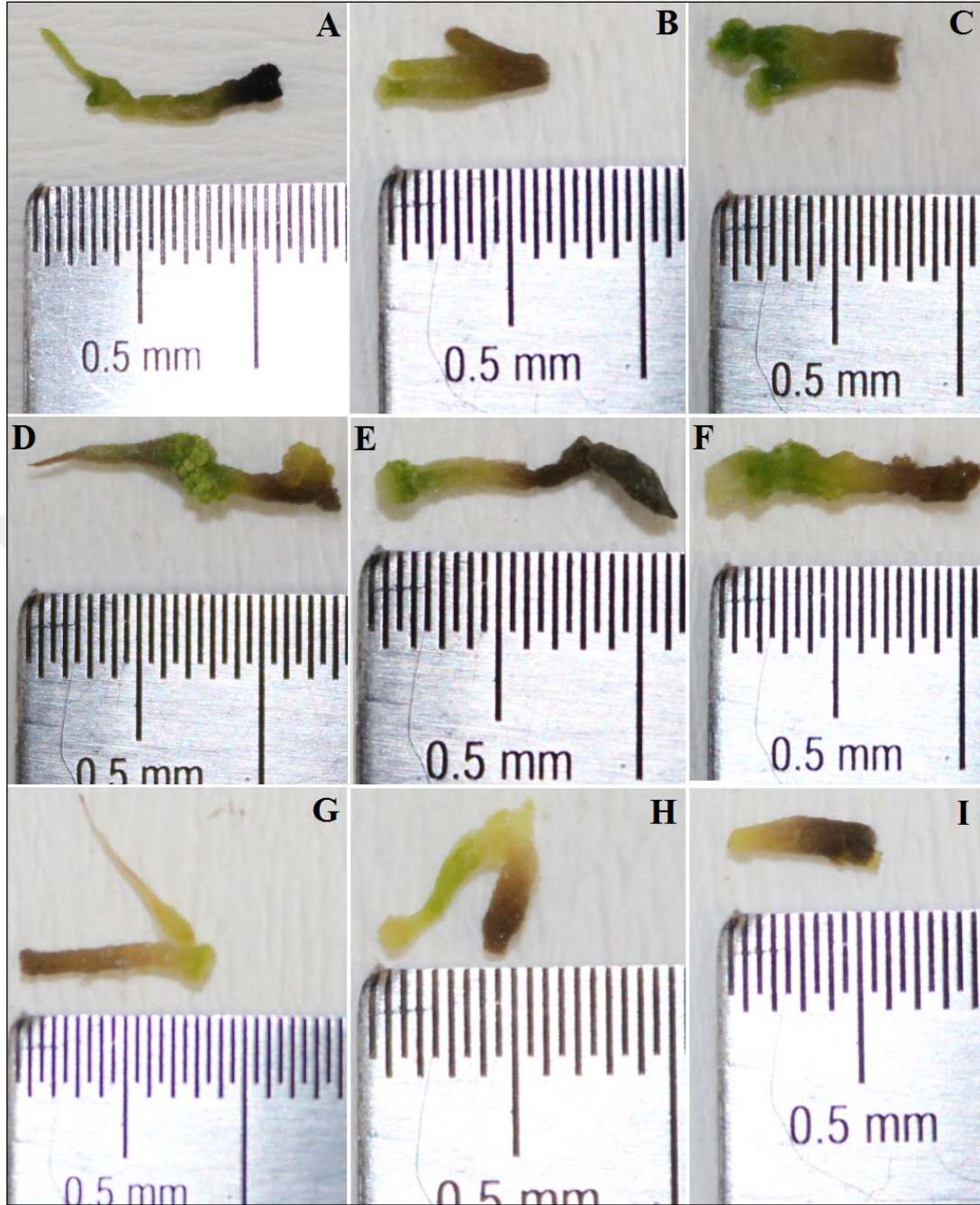
Şekil 3. 26. BAP + GA<sub>3</sub> ile desteklenen besi ortamlarının milimetrik sürgüncüklerin morfolometrik parametreleri üzerindeki etkilerine ait bulgular



Şekil 3. 27. Kin + IAA ve Kin + IBA ile desteklenen besi ortamlarından elde edilen milimetrik sürgünlerin inkübasyon öncesi morfolojilerine ait bulgular. A-B-C: MS38, D-E: MS39, F: MS41

Çalışmada *Lisianthus*'un hibrit formlarından biri olan 'Mariachi Pure White' kùltivarının tercih edilmesi ile elde edilen bulguların hassasiyeti arasında net bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Hibrit formdaki türlerin morfolojik olarak atalarından oldukça farklı davranış sergiledikleri bilinmektedir (Gottlieb, 1972). Bu bağlamda genetik olarak çeşitli değişimler ortaya çıkması kaçınılmaz bir durumdur. Genetik değişiklikleri *in vitro* ortamda rejenere olan bitkiciklerin farklı dokularında, kallus yapılarında veya morfolojileri üzerinde gözlemlemek mümkündür (Currais ve diğ., 2013). Rejenere olan yapılar üzerinde somaklonal varyasyonun ortaya çıkması bu bağlamda verilebilecek en iyi örnektir. Buna paralel olarak, çeşitli varyasyonların ortaya çıkması genetik kararlılığın dengesinin bozulmasına sebep olmaktadır (Krishna ve diğ., 2016).





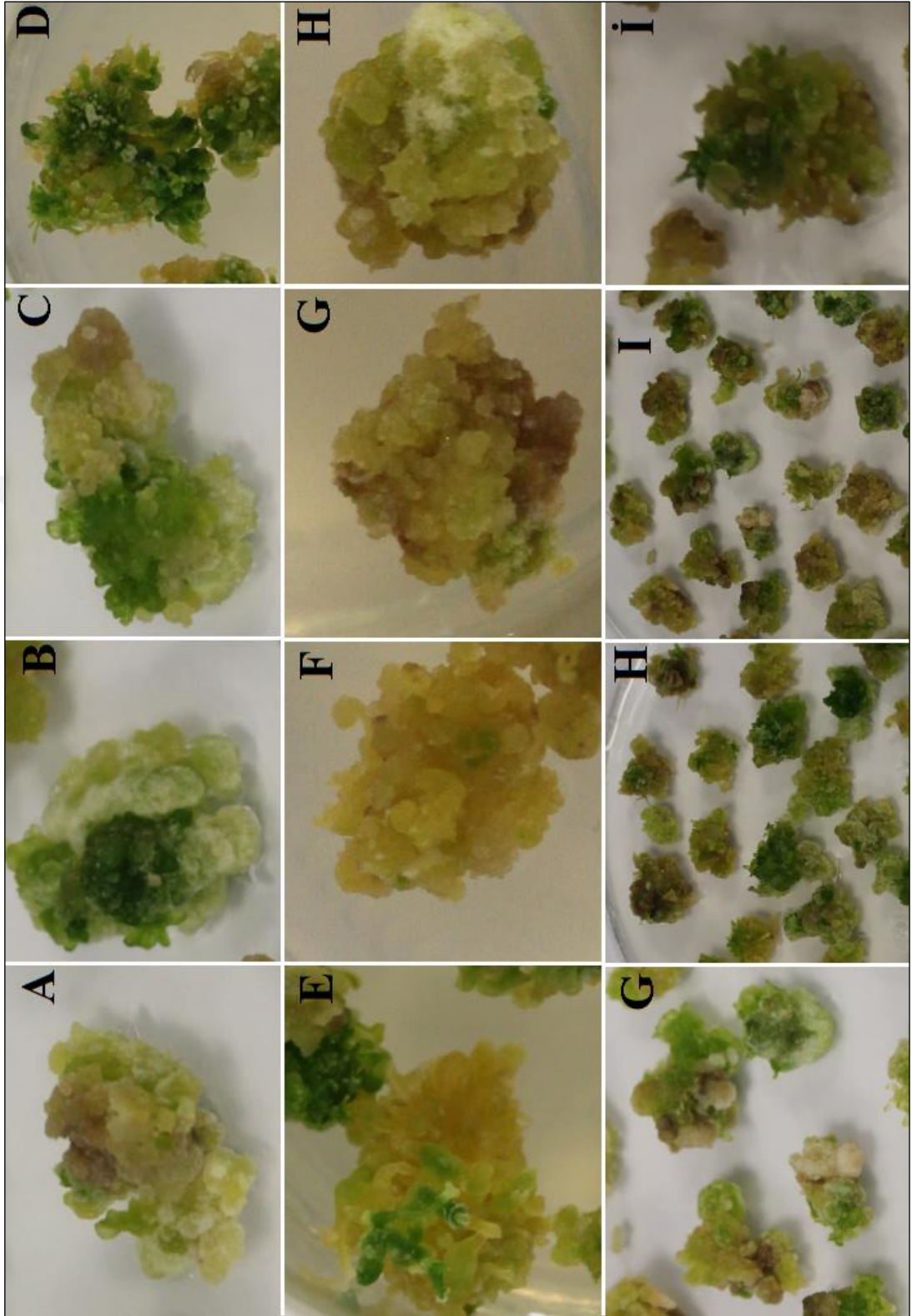
Şekil 3. 28. BAP + GA3 kombinasyonu ile desteklenen besi ortamlarından elde edilen milimetrik sürgünlerin morfolojilerine ait bulgular. A: MS1, B-C-D-E: MS46, F: MS48, G-H-I: MS49

Deneylerde kullanılan konsantrasyonlar literatürde yer alan *Lisianthus*'un mikroçoğaltımı üzerinde yapılan çalışmalara nazaran daha yüksektir. Bu bağlamda, yüksek konsantrasyonlarda BBD kullanımının yapılan denemelerin sonucunda yoğun bir şekilde somaklonal varyasyon oluşumuna sebep olabildiği düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda oksin ve sitokin kullanımının özellikle *in vitro*

kültürlerde mutasyon oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Smulders ve de Klerk, 2011). Buna ek olarak, uzun süreli inkübasyon periyotlarının da somaklonal varyasyonu indüklediği de literatürdeki diğer çalışmacılar tarafından desteklenmektedir (Etienne ve Bertrand, 2003). Ayrıca, vitrifike olmaya başlayan bitkiciklerin klorofil içeriğindeki kayıplara bağlı olarak anormal yapraklar oluşturdukları (Phan ve Letouze, 1983) ve bitkiciklerin sürekli olarak alt kültürlerle alınması ile rejenerasyon yeteneklerini kaybetmeye başladıkları ve nekrozlaşmaya daha yatkın oldukları rapor edilmiştir (Sathyanarayana ve Varghese, 2007). Ördögh ve diğ. (2006), Lisianthus'un Echo serisine ait 'Echo White', 'Echo Blue', 'Echo Rose' ve Echo Blue Picotee' kùltivarları ile yapmış oldukları çalışmanın sonucunda, Lisianthus bitkisinin farklı kùltivarları arasında yaprak sayısı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu gibi morfometrik parametrelerin farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu bağlamda, aynı bitkiden oluşturulan hibritlerin farklı özelliklere sahip olduğu ve özellikle *in vitro* çalışmalarda birbirinden farklı davranış sergileyebilecekleri göz ardı edilmemelidir.

### **3.5. Stok Kallus Kùltürlerine Ait Bulgular**

Direkt organogenez deneylerinde her inkübasyon periyodu bitiminde elde edilen bitkiciklerden izole edilen yaprak eksplantları kullanılarak oluşturulan alt kùltürlerin tekrarı MS23 ve MS27 besi ortamlarında en fazla üç kez yapılabilmektedir ve alt kùltürlerden elde edilen toplam kallus sayısı yaklaşık olarak 860 adet olarak not edilmiştir. İkinci alt kùltür inkübasyonu sonrası kalluslarda yoğun bir şekilde sararma ve vitrifikasyon oluşumlarının başladığı gözlemlenmiştir. Üçüncü alt kùltürden 15 gün sonra kalluslar tamamen vitrifike olarak sarı renkten kahverengi ve beyaz renge dönüşmüştür (Şekil 3.29). Alt kùltürlerin sürekli olarak devam ettirilememe problemi, Lisianthus'un kallus eksplantları ile çalışmış olan Ghanati ve diğ. (2012) tarafından da desteklenmiştir. Kallus eksplantlarının alt kùltüre alınmasından sonra bir aylık inkübasyon süreci tamamlanmadan kalluslar üzerinde nekrozlaşma belirtileri gözlemlediklerini belirtmişlerdir.



Şekil 3. 29. 2,4-D ve NAA ile desteklenen ortamlarda alt kültüre alınan kalluslarda nekrotik lekelenmeler ve vitrifikasyon oluşumlarına ait bulgular. A-B-C-F-G-H-I: MS23, D-E-İ: MS27



#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Deneysel çalışmada Lisianthus'un 'Mariachi Pure White' kùltivarına ait hibrit tohumlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan kùltivarın tercih edilmesinin nedeni, her yıl Türkiye'de geleneksel yöntemler ile üretilen, kesme çiçek sektöründe ihracatı gerçekleştirilen ve iç piyasaya ithalatı yapılan Lisianthus kùltivarlarından biri olmasıdır. Her yıl Avrupa çiçek mezarlarındaki satışlarda ilk on listesindeki yerini koruyan ve dünya çapındaki sektörde popülerliğini sürdüren Lisianthus süs bitkisi, kesme çiçek sektöründe rekabet içerisinde olan ülkeler açısından ekonomik kazanç sağlayan süs bitkilerinden biridir. Bitkinin çeşitli hibrit kùltivarları üzerinde günümüzde halen Japonya ve Amerika tarafından ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Sektöre her yıl yeni ülkelerin de dahil olması ile birlikte rekabet ortamında arayış açmak isteyen güçlü üretim kapasitesine sahip olan ülkeler günümüzde doku kùltürü laboratuvarlarına yatırım yaparak sektörde satışı yapılan ya da sektöre kazandırılması planlanan bitkiler üzerinde tohum ıslahı, çeşitli özelliklere sahip hibrit üretimi, virüssüz bitki materyali üretimi gibi geliştirme çalışmaları yapmaktadırlar. Lisianthus süs bitkisinin sektörel boyutta üretimi Türkiye'de 2010 yılında istatistiklerde yer almaya başlamıştır. Üretimin geleneksel yöntemler ile yapılmasının yanında tohumları güçlükle çimlendiği bilinen bitkinin ithal fidelikleri yurtdışından getirilerek sera ortamlarına nakledilmektedir. Böylece üretimde erkencilik sağlanarak Lisianthus kesme çiçekleri satış dönemlerine kadar hasat edilip mezarlara gönderilmektedir. Annual formda olduğundan dolayı her yıl ithal fidelikler sipariş edilmek durumundadır.

Hollanda gibi sektörde söz sahibi olan ülkelerin çoğu mevsimsel değişiklik ve doğal afet gibi faktörlerden etkilenmemek adına ve yıl boyu seri üretim yapabilmek için doku kùltürü teknikleri ile çeşitli süs bitkileri, kesme çiçek ve bitki materyali üretimine başlamışlardır. Ülkemizde fındık sektöründen sonra gelen ikinci büyük sektör olarak nitelendirilen süs bitkileri endüstrisi her yıl farklı arayışlar içerisinde dinamik bir yapı ile dünya sıralamasındaki yerini korumaya çalışmaktadır. Süs

bitkileri endüstrisinin üretim payının %50'den fazlasının kesme çiçeklere ait olduğu bilinmektedir. İstihdam düzeyi yüksek olan ve ekonomik açıdan süreklilik vaat eden bir sektör olmasına rağmen ülkemiz dünya sektöründeki ticaretten büyük bir pay alamamaktadır (URL-14). Bu durumun nedenleri araştırıldığında üretim adına geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı görülmektedir. Özellikle kesme çiçek üretiminin merkezi olan Antalya'da örtüaltı kesme çiçek üretiminde birtakım sorunlar karşımıza çıkmaktadır. Kesme çiçek üretiminin büyük bir bölümü naylon seralarda, küçük bir bölümü ise modern seralarda yapılmaktadır. Kış aylarında beklenilenden daha fazla düşük sıcaklığa, şiddetli rüzgarlara, aşırı yağışlara, yaz aylarında ise sıcaklık değerlerinin aşırı derecede yükselmesi (45°C) ile oluşan yoğun buharlaşma bitkilerde aşırı su kaybına neden olduğundan dolayı üretim faaliyetinin kesintiye uğraması söz konusudur. Bu dönemlerde üretici aksayan üretim faaliyetini canlandırmak adına kesme çiçek üretimini yakın çevrede sıcaklık oranları normal seviyelerde seyreden illere kaydırmaktadır. Şiddetli ve fırtınalı dönemlerde seraların naylon örtüleri kolayca zarar görebilmekte ve şiddetli yağışlarda özellikle dere kenarındaki yataklarda kurulan seralar su baskınlarına maruz kalabilmektedir. Tahliye edilmesi güç olan sel baskınları kesme çiçekler üzerinde "kara leke" hastalığına neden olmaktadır. Tüm bu dönemleri takiben Antalya'nın kıyı kuşağında ekim ve mayıs ayları arasında üretim planı yapılmakta ve yaz aylarında üretim durmaktadır. En önemlisi, don olayına karşı teknik donanım yetersizliğinden dolayı çiçeklerde standart kalite yakalanamamakta, ihraç edilmek üzere gönderilen kesme çiçekler kalite denetimi sonrası geri gönderilmekte ve geri gönderilen ürünler iç piyasaya sunulmaktadır (Zaman ve diğ., 2007). Bu sorunların yanında, kesme çiçek sektörüne ket vuran en önemli problem ihracata yönelik ürün yelpazesinin kısıtlı olması ve kesme çiçek üretiminde belirli türlere bağlı kalınmasıdır. Karanfil, gerbera ve kesme gül Türkiye kesme çiçek endüstrisinde üretimi en fazla yapılan ilk üç süs bitkisidir. Özellikle karanfil yurtdışı ihracatından %90 oranında pay almaktadır. Türkiye yakın geçmişten günümüze kadar uluslararası pazar yelpazesini genişletmeyerek ihracatta sürekli müşteri konumunda olan ülkeler ile alışveriş içerisinde olmuştur. Fakat son zamanlarda Avrupa genelindeki karanfil taleplerinde düşüş yaşanması ülkemizin ihracatını da olumsuz yönde etkilemiştir. Teknolojik yöntemler ile ürün ıslahı yapan ve ürün yelpazesini genişletmiş olan ülkeler bu

durumdan etkilenmeyerek üretim faaliyetlerini yine lider konumda sürdürmeye devam etmişlerdir.

Ülkemiz bazında değerlendirildiğinde 2016 yılında Türkiye’de üretimi yapılan kesme gül üretimi bir önceki yıla göre %4,3 oranında, lale üretimi %1,8 oranında ve Lisianthus üretimi %13,7 oranında azalmıştır ve bunlar ile birlikte 6 farklı kesme çiçek türünde de üretim faaliyetlerinin azaldığı rapor edilmiştir. Üretimdeki toplam düşüş %2,7 olarak kaydedilmiştir (URL-21). Bu sonuçlar, sektördeki dengelerin olumsuz yönde değiştiğinin kanıtı olarak ifade edilebilir. Sektörümüzde halen karanfil üretimine yoğunlaşma devam etmekte, alternatif türlerin üretimi geri planda bırakılmakta ve sektörde ürün yelpazesi giderek daralmaktadır (Titiz ve diğ., 2000). Lisianthus süs bitkisi 2015 yılını 11 037 500 üretim adeti ile 11. sırada kapatırken 2016 yılını 9 521 500 üretim adedi ile 12. sırada kapatmıştır. Tek ürüne bağlılığın ortadan kaldırılabilmesi ve Türkiye’nin hem sektördeki yerini hem de uluslararası pazardaki ekonomik dengesini korunabilmesi adına ürün çeşitliliğinin artırılması gerekmektedir (Taşçıoğlu ve Sayın, 2005; Ay, 2009). Bu bağlamda, Ar-Ge ve doku kültürü laboratuvarlarının büyük önemi taşıdığı ortaya çıkmaktadır. Kesme çiçek sektör raporlarında da her yıl belirtildiği üzere ülkemiz, kesme çiçek üretiminde teknolojik yöntemlerin kullanımına muhtaç durumdadır (URL-22). Özellikle doku kültürü laboratuvarlarının kurulması sektörün devamlılığı ve ürün yelpazesinin genişletilebilmesi için kritik önem taşımaktadır (Karagüzel ve diğ, 2010; URL-14; URL-2).

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitkilerin seri üretiminin *in vitro* ortamda mevsime bağlı kalınmaksızın, istenilen özellikte ve sayıda yıl boyunca yapılabilmesi mümkündür. Geçmişten günümüze yaklaşık 1000’den fazla bitki türü laboratuvar ortamında çeşitli teknikler ile üretilebilmiştir. Bitki bilimi, gelişen teknoloji ve bilimsel çalışmalar sayesinde günümüzde ileri düzeyde araştırmaların yapılabildiği, geliştirilen ürünlerin ve özütlerden elde edilen ham maddelerin çeşitli endüstri dallarına kazandırılmasına olanak sağlayan bir çalışma alanı haline gelmiştir.

Yapılan çalışmada, kesme çiçek sektöründeki üretim payının artırılmasına yönelik dikkat çekmek ve seri üretimine katkıda bulunabilecek sonuçlar elde etmek amacı ile Lisianthus süs bitkisinin Türkiye’de geleneksel yöntemler ile üretilen

kültivarlarından biri olan ‘Mariachi Pure White’ kùltivarı üzerinde çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak direkt ve indirekt organogenez metodu ile kùltivarin mikroçoğaltımı üzerinde çalışma yapıldı. Eş zamanlı olarak yürütölen iki ayrı metod sayesinde elde edilen yeni bulguların literatüre sunulması ve faydalı olabilecek şekilde değerlendirmeye alınması amaçlandı. Çimlenen tohumlardan elde edilen bitkicikler sürgün rejenerasyonu için 80 günlük inkübasyon periyodundan sonra yaprak sayısı  $14,17\pm 4,59$  adet (MS4), sürgün uzunluğu  $3,32\pm 0,34$  cm (MS3) ve kök uzunluğu  $2,48\pm 1,25$  cm (MS4) parametreleri üzerinde etkili bulundu. Fakat, doku kùltürü ile seri üretim amaçlandığından dolayı 80 gün uzun bir süreç niteliğindedir. Bundan dolayı, kullanılan kùltivarin sürgün rejenerasyonunda  $GA_3$  sürgün uzamasını teşvik eden farklı BBD ‘ler ile kombinasyon şeklinde kullanılması önerilmektedir.

Direkt organogenez metodunda nodal eksplantlar kullanılarak gerçekleştirilen sürgün rejenerasyonunda ZEA hormonu diğer sitokininlere göre yaprak sayısı ( $9,97\pm 3,17$  adet-MS18), sürgün sayısı ( $1,03\pm 0,08$  adet-MS18) ve sürgün uzunluğu ( $1,84\pm 0,25$  cm-MS21) parametreleri üzerinde etkili bulundu. Buna ek olarak, elde edilen bitkiciklerin kök kısımlarında kallus oluşumları gözlemlendi ve yaprak morfolojilerinde ileri derecede çeşitlenmeye sebep olan somaklonal varyasyonun oluşumu kaydedildi.

İndirekt organogenez metodunun kallogenez evresinden elde edilen verilere göre kallus oluşum yüzdesi (%100) (MS23) için 2,4-D hormonu, ortalama kallus taze ağırlığı ( $0,609\pm 0,29$  g) (MS28) için ise NAA hormonu etkili bulunmuştur. Her iki hormonun aynı konsantrasyonları kallus dokusu (yeşil/kırılğan ve sarı/kırılğan) üzerinde aynı etkileri göstermiştir. Rejenerasyon yeteneği bakımından NAA hormonu 2,4-D hormonundan daha etkili bulunmuştur. Kallustan sürgün rejenerasyonunda Kin hormonu ile desteklenen MS35 besi ortamı BAP ve diğer kombinasyonlar ile oluşturulan ortamlara göre ortalama sürgün sayısı ( $3,30\pm 0,78$  adet) ve ortalama sürgün uzunluğu ( $0,94\pm 0,15$  cm) parametreleri üzerinde etkili bulundu. Buna ek olarak, kullanılan tüm BBD konsantrasyonları somaklonal varyasyon oluşumuna neden olarak çeşitli morfolojilerde yaprak tiplerinin oluşmasını sağlamıştır. Adventif sürgün rejenerasyonundan elde edilen milimetrik sürgüncüklerin *in vitro* gelişimleri için BAP ve farklı konsantrasyonlarda  $GA_3$  ile

kombine edilen ortamlardan MS49 besi ortamı ortalama sürgün sayısı ( $1,13 \pm 0,16$  adet) ve ortalama sürgün uzunluğu ( $2,22 \pm 1,99$  cm) parametreleri üzerinde etkili bulundu. Sürgüncüklerin büyük bir bölümünde kararma, apikal uç ölümleri ve hiperhidrisite oluşumu meydana geldi. Buna paralel olarak canlılıklarını ve rejenere olma yeteneklerini kaybeden sürgüncükler inkübasyon süresinin sonunda tamamen vitrifiye olduklarından dolayı indirekt organogenezin devamında planlanan köklendirme ve aklimatizasyon denemeleri yapılamamıştır.

Elde edilen veriler ışığında, yaprak eksplantları kullanılarak oluşturulan indirekt organogenez düzeneğinde yapılan uygulamalar adventif sürgün rejenerasyonunda durma noktasına gelmiştir. Fakat direkt organogenez metodu ile sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Buna paralel olarak, 'Mariachi Pure White' kültivarının BBD'lerine karşı hassas olduğu ifade edilebilir. Kullanılan en düşük doz miktarı olan 0,5 mg/l konsantrasyonda kullanılması da dahil olmak üzere, yaprak morfolojilerinde önemli derecede çeşitlenme meydana geldiği kaydedildi. Çalışmada kullanılan dozlar literatürde *Lisianthus*'un mikroçoğaltımı üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılan dozlara göre yüksek seviyelerdedir. Yüksek dozda BBD kullanımının ileri derecede somaklonal varyasyon oluşumunu tetiklemesi mümkündür (Smulders ve de Klerk, 2011). Bu durumda, doku kültürü kullanılarak yeni çeşitlerin geliştirilmesi için avantajlı bir araç olarak görülen somaklonal varyasyon aracılığı ile farklı BBD'lerin ikili ya da üçlü kombinasyonları oluşturularak optimizasyon çalışmaları yapılabilmesi ve aynı zamanda aynı kültivara ait seçilen farklı genotipler sayesinde uniform tipte çok sayıda bitkiciğin direkt sürgün organogenezini ile üretilebilmesi mümkündür.

## KAYNAKLAR

Akbari H., Pajooheshgar R., Karimi N., Evaluating The Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) as An Important Ornamental Plant, *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 2014, **4**(2), 596-602.

Akin-Idowu P. E., Ibitoye D. O., Ademoyegun O. T., Tissue Culture as A Plant Production Technique for Horticultural Crops, *African Journal of Biotechnology*, 2009, **8**(16), 3782-3788.

Algül B. E., Tekintaş F. E., Dalkılıç G. G., Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kullanımı ve İçsel Hormonların Biyosentezini Arttırıcı Uygulamalar, *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2016, **13**(2), 87-95.

Altman A., Loberant B., Micropropagation: Clonal Plant Propagation *In Vitro*, Editor: Altman A., *Agricultural Biotechnology*, 1st ed., Marcel Dekker INC., New York, 19-42, 1998.

Ammirato P. V., Evans D. A., Sharp W. R., Bajaj Y. P. S., *Handbook of Plant Cell Culture Volume 5: Ornamental Species*, 1st ed., McGraw-Hill, New York, 1990.

Arteca R. N., *Introduction to Horticultural Science*, 2nd ed., Cengage Learning, USA, 2015.

Ay S., Süs Bitkileri İhracatı, Sorunları ve Çözüm Önerileri: Yalova Ölçeğinde Bir Araştırma, *Süleyman Demirel Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*, 2009, **14**(3), 423-443.

Azrak M. F., Cultural Studies of Greenhouse Grown *Eustoma grandiflorum*, MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, 1984.

Bailey L. H., Baily E. Z., *Hortus Third*, MacMillian, New York, 1976.

Bajaj Y. P. S., Biotechnology of Tree Improvement for Rapid Propagation and Biomass Energy Production, Editor: Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 1: Trees I*, Springer, New York, 1-23, 1986.

Bajaj Y. P. S., Cryopreservation and The Retention of Biosynthetic Potential in Cell Cultures of Medicinal and Alkaloid-Producing Plants, Editor: Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 4: Medicinal and Aromatic Plants I*, Springer, New York, 169-187, 1988.

Bandurski R. S., Cohen J. D., Slovin J., Auxin Biosynthesis and Metabolism, Editor: Davies P. J., *Plant Hormones*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 39-65, 1995.

Beyl C. A., PGRs and Their Use in Micropropagation, Editors: Trigiano R. N., Gray D. J., *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 33-56, 2011.

Bhatia S., Application of Plant Biotechnology, Editors: Bhatia S., Sharma K., Dahiya R., Bera T., *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 1st ed., Elsevier, UK, 157-202, 2015.

Bhatia S., History and Scope of Plant Biotechnology, Editors: Bhatia S., Sharma K., Dahiya R., Bera T., *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 1st ed., Elsevier, UK, 1-25, 2015.

Bhojwani S. S., Dantu P. K., *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 1st ed., Springer, India, 2013.

Blakesly D., Uptake and Metabolism of 6-benzyladenine in Shoot Cultures of *Musa* and *Rhododendron*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, **25**, 69-74.

Bouman F., Cobb L., Devente N., Goethals V., Maas P. J. M., Smets E., The Seed of Gentianaceae, Editors: Struwe L., Albert V. A., *Gentianaceae Systematics and Natural History*, 1st ed., Cambridge University Press, New York, 498-572, 2002.

Brian C., Katz P., A Grower's Guide to Lisianthus Production, *Floraculture International*, 1997, **7**, 16-19.

Brown D. C. W., Thorpe T. A., Plant Regeneration by Organogenesis, Editor: Vasil I. K., *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Volume 3: Plant Regeneration and Genetic Variability*, 1st ed., Academic Press INC., Florida, 49-66, 1986.

Cachita C., Craciun C., Ultrastructural Studies on Some Ornamentals, Editors: Ammirato P., Evans D. A., Sharp W. R., Bajaj Y. P. S., *Handbook of Plant Cell Culture*, 1st ed., McGraw-Hill, New York, 57-94, 1990.

Caponetti J. D., Gray D. J., Trigiano R. N., History of Plant Tissue Culture, Editors: Trigiano R. N., Gray D. J., *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, 2nd ed., CRC Press LLC, Boca Raton, 11-20, 2000.

Chawla H. S., *Introduction to Plant Biotechnology*, 2nd ed., Science Publisher INC., Enfield, USA, 2004.

Chen J., Henny R. J., Ornamental Foliage Plants: Improvement Through Biotechnology, Editors: Kumar A., Sopory S. K., *Recent Advances in Plant Biotechnology and Its Applications*, 1st ed., I. K. International Publishing House, New Delhi, 140-156, 2008.

Conover C. A., Foliage Plants, Editor: Larson R. A., *Introduction to Floriculture*, 2nd ed., Academic Press INC., London, 571-598, 1992.

Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A., Brielmann H. L., *Natural Products From Plants*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2006.

Currais L., Loureiro J., Santos C., Canhoto J. M., Ploidy Stability in Embryogenic Cultures and Regenerated Plantlets of Tamarillo, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2013, **114**, 149-159.

Daughtrey M. L., Benson D. M., Principles of Plant Health Management for Ornamental Plants, *Annual Review of Phytopathology*, 2005, **43**, 141-169.

Das T., Mitra G. C., Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, **22**(2), 95-103.

Davies P. J., The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Function, Editor: Davies P. J., *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, 3rd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-15, 2004.

Debergh P. C., Maene L. J., A Scheme for Commercial Propagation of Ornamental Plants by Tissue Culture, *Scientia Horticulturae*, 1981, **14**, 335-345.

Debergh P. C., Read P. E., Micropropagation, Editors: Debergh P. C., Zimmerman R. H., *Micropropagation Technology and Application*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-14, 1991.

De Groot, N. S. P., Floriculture Worldwide Trade and Consumption Patterns, *World Conference on Horticultural Products*, Rome, Italy, 1-20 June 1998.

Dubey R. C., *A Textbook of Biotechnology with Biotechnology Practicals for Class-XII*, 1st ed., S. Chand & Company PVT. LTD, New Delhi, 2005.

Etienne H., Bertrand B., Somaclonal Variation in *Coffea arabica*: Effects of Genotype and Embryogenic Cell Suspension Age on Frequency and Phenotype of Variants, *Tree Physiol.*, 2003, **23**, 419-426.

Evans D. A., Sharp W. R., Flick C. E., Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis, Editor: Thorpe T. A., *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*, 1st ed., Academic Press, New York, 45-113.

Ferry M., Potential of Date Palm Micropropagation for Improving Small Farming Systems, Editors: Jain S. M., Al-Khayri J. M., Johnson D. V., *Date Palm Biotechnology*, 1st ed., Springer Science + Business Media B.V., 15-28, 2011.

Fraguas C. B., Pasqual M., Dutra L. F., Cazetta J. O., Micropropagation of Fig (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' Plants, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2004, **40**(5), 471-474.

Fry S. C., Street H. E., Gibberellin-Sensitive Cultures, *Plant Physiology*, 1980, **65**, 472-477.

Ganapathi A., Anbazhagan V. R., Amutha S., Anand P. R., *In Vitro Organogenesis*, Editors: Jaiwal P. K., Singh R. P., *Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology*, 1st ed., Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, 65-86, 2003.



- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M., Thorpe T. A., Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1996, **32**, 272-289.
- George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J., *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*, 3rd ed., Springer, Dordrecht, 2008.
- Ghanati F., Rezaee F., Boroujeni L. Y., Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) from Different Explants to Flowering Onset, *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2012, **3**(1), 583-587.
- Gottlieb L. D., Levels of Confidence in The Analysis of Hybridization in Plants, *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 1972, **59**, 435-446.
- Halevy A. H., Kofranek A. M., Evaluation of Lisianthus As A New Flower Crop, *HortScience*, 1984, **19**(6), 845-847.
- Harbaugh B. K., Roh M. S., Lawson R. H., Pemberton B., Rosetting of Lisianthus Cultivars Exposed to High Temperatures, *HortScience*, 1992, **27**, 885-887.
- Harbaugh B. K., Bell M. L., Liang R., Evaluation of Forty-seven Cultivars of Lisianthus as Cut Flowers, *HortTechnology*, 2000, **10**(4), 812-815.
- Harbaugh B. K., Lisianthus *Eustoma grandiflorum*, Editor: Anderson N. O., *Flower Breeding and Genetics*, 1st ed., Springer, Dordrecht, 645-663, 2007.
- Huxter T. J., Thorpe T. A., Reid D. M., Shoot Initiation in Light-and Dark-Grown Tobacco Callus: The Role of Ethylene, *Physiologia Plantarum*, 1981, **53**(3), 319-326.
- Irish V. F., The *Arabidopsis* Petal: A Model for Plant Organogenesis, *Trends in Plant Science*, 2008, **13**(8), 430-436.
- Jain S. M., Buiatti M., Gimelli F., Saccardo F., Somaclonal Variation in Improving Ornamental Plants, Editors: Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S., *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, 1st ed., Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, 81-104, 1998.
- Jha T. B., Ghosh B., *Plant Tissue Culture Basic and Applied*, 1st ed., Universities Press, India, 2005.
- Karagüzel O., Aydınşakir K., Kaya A. S., Dünyada ve Türkiye’de Çiçek Soğanları Sektörünün Durumu, *Derim Dergisi*, 2007, **24**(1), 1-10.
- Karagüzel O., Korkut A. B., Özkan B., Çelikel F. G., Titiz S., Süs Bitkileri Üretiminin Bugünkü Durumu, Geliştirilme Olanakları ve Hedefleri, *Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 11-15 Ocak 2010.
- Kaviani B., Esizad S. G., Tarang A., Zanjani S. B., Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), An Ornamental Plant, *Plant Omics Journal*, 2012, **5**(3), 314-319.

Kaviani B., Micropropagation of Ten Weeks (*Matthiola incana*) and Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (Two Ornamental Plants) by Using Kinetin (KIN), Naphthalene Acetic Acid (NAA) and 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D), *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 2014, **13**(1), 141-154.

Kaviani B., Zamirae F., Zanjani S. B., Tarang A., Torkashvand A. M., *In Vitro* Flowering and Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in Response to Plant Growth Regulators (NAA and BA), *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 2014, **13**(4), 145-155.

Kaviani B., Some Useful Information About Micropropagation, *Journal of Ornamental Plants*, 2015, **5**(1), 29-40.

Kirakosyan A., Kaufman P. B., Cseke L. J., Overview of Plant Biotechnology from Its Early Roots to The Present, Editors: Kirakosyan A., Kaufman P. B., *Recent Advances In Plant Biotechnology*, 1st ed., Springer Science + Business Media LLC, 3-13, 2009.

Korkmaz Y., Çölgeçen H., Bitki Doku Kültürü Çalışmalarında Somaklonal Varyasyon, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2013, **6**, 74-78.

Krikorian A. D., Cloning Higher Plants from Aseptically Cultured Tissues and Cells, *Biological Reviews*, 1982, **57**(2), 151-218.

Krikorian A. D., Hormones in Tissue Culture and Micropropagation, Editor: Davies P. J., *Plant Hormones*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 774-796, 1995.

Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sadh R. K., Somaclonal Variations and Their Applications in Horticultural Crops Improvement, *3 Biotech*, 2016, **6**(54), 53-71.

Kuhle J. A., Fuller G., Corse J., Mackey B. E., Antisenescent Activity of Natural Cytokinins, *Physiologia Plantarum*, 1977, **41**(1), 14-21.

Larkin P. J., Scowcroft W. R., Somaclonal Variation – A Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement, *Theor. Appl. Genet.*, 1981, **60**, 197-214.

Marcotrigiano M., McGlew S. P., A Two-Stage Micropropagation System for Cranberries, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1991, **116**(5), 911-916.

Meiri H., Altman A., Agriculture and Agricultural Biotechnology: Development Trends Toward the 21st Century, Editor: Altman A., *Agricultural Biotechnology*, 1st ed., Marcel Dekker INC., New York, 1-19, 1998.

Miri S. M., Savari A., Behzad K., Iravani B. M., Promotion of Callus Initiation, Shoot Regeneration and Proliferation in Lisianthus, *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2016, **6**(4), 1855-1860.

Misra P., Saema S., Plant Tissue Culture for *In Vitro* Mutagenesis, Large-Scale Propagation, and Genetic Transformation, Editors: Anis M., Ahmad N., *Plant Tissue*

*Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*, 1st ed., Springer Science + Business Media, Singapore, 309 – 342, 2016.

Mohan Ram H. Y., Plant Tissue Culture in India, Editor: Kishor P. B. K., *Plant Tissue Culture and Biotechnology Emerging Trends*, 1st ed., Universities Press, India, 2005.

Mousavi E. S., Behbahani M., Hadavi E., Miri S. M., Karimi N., Plant Regeneration in *Eustoma grandiflorum* from Axillaries Buds (Gentianaceae), *Trakia Journal of Sciences*, 2012a, **10**(2), 75-78.

Mousavi E. S., Behbahani M., Hadavi E., Miri S. M., Callus Induction and Plant Regeneration in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), *Trakia Journal of Sciences*, 2012b, **10**(1), 22-25.

Öktüren F., Sönmez S., Bitki Besin Maddeleri ve Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicileri (Hormonlar) Arasındaki İlişkiler, *Derim Dergisi*, 2005, **22**(2), 20-32.

Ördögh M., Jambor-Benczur E., Tilly-Mandy A., Micropropagation of ‘Echo’ Cultivars of *Eustoma grandiflorum*, *V. International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, Debrecen, Hungary, 30 November 2006.

Özkan B., Karagüzel O., Antalya’da Kesme Çiçek Üretiminin Mevcut Durumu, *Derim Dergisi*, 1997, **14**, 50-61.

Özkan H., Özen F., The Effect of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) on Post-Germination Morphometric Parameters of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] ‘Mariachi Pure White (F<sub>1</sub>)’ Cultivar, *Muğla Journal of Science and Technology*, 2016, **2**(2), 145-151.

Paek K. Y., Hahn E. J., Cytokinins, Auxins and Activated Charcoal Affect Organogenesis and Anatomical Characteristics of Shoot-Tip Cultures of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.], *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2000, **36**, 128-132.

Pahnekolayi M. D., Tehranifar A., Samiei L., Shoor M., Micropropagation of *Rosa canina* Through Axillary Shoot Proliferation, *Journal of Ornamental Plants*, 2014, **4**(1), 45-51.

Pele M., Cimpeanu C., *Biotechnology An Introduction*, 1st ed., WIT Press, Boston, 2012.

Phan C. T., Letouze R., A Comparative Study of Chlorophyll, Phenolic and Protein Contents and of Hydroxycinnamate: CoA Ligase Activity of Normal and Vitreous Plants (*Prunus avium* L.) Obtained *In Vitro*, *Plant Sci. Letters*, 1983, **31**, 323-327.

Piqueras A., Debergh P. C., Morphogenesis in Micropropagation, Editors: Soh W. Y., Bhojwani S. S., *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*, 1st ed., Springer Science + Business Media LLC, 443-462, 1999.

Pop R., Cantor M., Buta E., Csete I., *In Vitro* Plant Propagation and Crop Improvement in Lisianthus (*Lisianthus russellianus* Hook.), *Bulletin UASVM Horticulture*, 2016, **73**(2), 168-174.

Purohit S. D., *Introduction to Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1st ed., PHI Learning Private Limited, Delhi, 2013.

Quoirin M., da Silva M. C., Martins K. G., de Oliveira D. E., Multiplication of Juvenile Black Wattle by Microcuttings, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, **66**, 199-205.

Rao C. K., *Adoption of Tissue Culture in Horticulture*, 1st ed., Cambridge Scholars Publishing, UK, 2014.

Razdan M. K., *Introduction to Plant Tissue Culture*, 2nd ed., Science Publishers INC, USA, 2003.

Reeves D. W., Edwards H. J., Thompson J. M., Horton B. D., Influence of Ca Concentration on Micronutrient Imbalances *In Vitro* Propagated *Prunus* Rootstock, *J. Plant Nutr.*, 1985, **8**, 289-302.

Roberts D. R., Flinn B. S., Webb D. T., Webster F. B., Sutton B. C. S., Abscisic Acid and Indole-3-Butyric Acid Regulation of Maturation and Accumulation of Storage Proteins in Somatic Embryos of Interior Spruce, *Physiologia Plantarum*, 1990, **78**(3), 355-360.

Roh M. S., Halevy A. H., Wilkins H. F., *Eustoma grandiflorum*, Editor: Halevy A. H., *Handbook of Flowering Volume VI*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 322-327, 1989.

Ruffoni B., Damiano C., Massabo F., Esposito P., Organogenesis and Embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook, *Acta Horticulturae*, 1990, **280**, 83-88.

Sathyanarayana B. N., Varghese D. B., *Plant Tissue Culture Practices and New Experimental Protocols*, 1st ed., I. K. International Publishing House PVT. LTD, New Delhi, 2007.

Sarkar A. N., *Integrated Horticulture Development in Eastern Himalayas*, 1st ed., MD Publications PVT LTD, New Delhi, 1994.

Schwarz O. J., Beaty R. M., Organogenesis, Editors: Trigiano R. N., Gray D. J., *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 125-138, 2000.

Seçer M., Doğal Büyüme Düzenleyicilerinin (Bitkisel Hormonların) Bitkilerdeki Fizyolojik Etkileri ve Bu Alanda Yapılan Araştırmalar, *Derim Dergisi*, 1989, **6**(3), 109-124.

Semeniuk P., Griesbach R. J., *In Vitro* Propagation of Prairie Gentian, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, **8**, 249-253.

Shahzad A., Sharma S., Parveen S., Saeed T., Shaheen A., Akhtar R., Yadav V., Upadhyay A., Ahmad Z., Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture, Editors: Abdin M. Z., Kiran U., Kamaluddin, Ali A., *Plant Biotechnology: Principles and Applications*, 1st ed., Springer Nature, Singapore, 1-36, 2017.

Shen X., Indirect Shoot Organogenesis and Selection of Somaclonal Variation in *Dieffenbachia*, Master Thesis, University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida, 2007.

Smulders M., de Klerk G., Epigenetics in Plant Tissue Culture, *Plant Growth Regul.*, 2011, **63**, 137-146.

Singh B. S., Singh M. P., *Fundamentals of Plant Biotechnology*, 1 st ed., Satish Serial Publishing House, Delhi, India, 2007.

Sonnewald U., Plant Biotechnology: From Basic Science to Industrial Applications, *Journal of Plant Physiology*, 2003, **160**, 723-725.

Sponsel V. M., The Biosynthesis and Metabolism of Gibberellins in Higher Plants, Editor: Davies P. J., *Plant Hormones*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 66-97, 1995.

Steen D. A., Chadwick A. V., Ethylene Effects in Pea Stem Tissue, Evidence of Microtubule Mediation, *Plant Physiology*, 1981, **67**, 460-466.

Street H. E., Introduction, Editor: Street H. E., *Plant Tissue and Cell Culture*, 2nd ed., University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 1-10, 1977.

Taşçıoğlu Y., Sayın C., Türkiye’de Kesme Çiçek Üretim ve İhracat Yapısı, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2005, **18**(3), 343-354.

Te-chato S., Hilae A., In-peuy K., Effects of Cytokinin Types and Concentrations on Growth and Development of Cell Suspension Culture of Oil Palm, *Journal of Agricultural Technology*, 2008, **4**(2), 157-163.

Thiruvengadam M., Rekha K. T., Yang C. H., Jayabalan N., Chung M., High-Frequency Shoot Regeneration from Leaf Explants through Organogenesis in Bitter Melon (*Momordica charantia* L.), *Plant. Biotechnol. Rep.*, 2010, **4**, 321-328.

Thorpe T. A., Murashige T., Some Histochemical Changes Underlying Shoot Initiation in *Tobacco* Callus Cultures, *Canadian Journal of Botany*, 1970, **48**(2), 277-285.

Thorpe T. A., Organogenesis: Structural, Physiological and Biochemical Aspects, Editors: Rodriguez R., Tomes R. S., Durzan D. J., *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, 1st ed., Plenum Press, New York, 191-197, 1990.

Thorpe T. A., The Current Status of Plant Tissue Culture, Editor: Bhojwani S. S., *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 1-33, 1990.

Thorpe T. A., History of Plant Cell Culture, Editor: Smith R.H., *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*, 3rd ed., Elsevier Academic Press, UK, 1-22, 2013.

Titiz S., Çakıroğlu N., Yıldırım T. B., Çakmak S., Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler, *Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 17-21 Ocak 2000.

Torres K. C., *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*, 1st ed., An AVI Book, New York, 1989.

Turner B. L., Taxonomic Overview of *Eustoma* (Gentianaceae), *Phytologia*, 2014, **96**(1), 7-11.

Uddin A. F. M. J., İslam M. S., Mehraj H., Roni M. Z. K., Shahrin S., An Evaluation of Some Japanese *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) Varieties Grown in Bangladesh, *The Agriculturists*, 2013, **11**(1), 56-60.

Uddin A. F. M. J., Rahman S. S., Ahmad H., Parvin S., Momena K., *In Vitro* Regeneration of *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* Grise), *International Journal of Business, Social and Scientific Research*, 2017, **5**(2), 126-135.

URL-1:<http://docplayer.biz.tr/6426331-Sus-bitkileri-endustrisi-sektor-raporu.html>, (Ziyaret tarihi: 30 Mart 2017).

URL-2:[www.dogaka.gov.tr/Icerik/Dosya/www.dogaka.gov.tr\\_624\\_OW7B27CN](http://www.dogaka.gov.tr/Icerik/Dosya/www.dogaka.gov.tr_624_OW7B27CN), (Ziyaret tarihi: 1 Mayıs 2017).

URL-3:<http://www.susbir.org.tr/belgeler/raporlar/susbir-rapor-mart-16.docx>, (Ziyaret tarihi: 30 Mart 2017).

URL-4:<http://www.ngpherbaria.org/portal/map/googlemap.php?maptype=tax>, (Ziyaret tarihi: 30 Mart 2017).

URL-5:<http://www.wildflower.org/plants/result.php?idplant=EUEXR>, (Ziyaret tarihi: 30 Mart 2017).

URL-6:<http://www.eol.org/pages/37981/details#habitat>, (Ziyaret tarihi: 30 Mart 2017).

URL-7: [http://www.navigate.botanicgardens.org/weboi/oecgi2.exe/INET\\_ECM\\_Dis](http://www.navigate.botanicgardens.org/weboi/oecgi2.exe/INET_ECM_Dis), (Ziyaret tarihi: 30 Mart 2017).

URL-8:<https://www.itis.gov./servlet/SingleRpt/SingleRpt?search-topic=TSN&searc>, (Ziyaret tarihi: 2 Nisan 2017).

URL-9:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, (Ziyaret tarihi: 2 Nisan 2017).

URL-10:<https://www.revolvy.com/main/index.php?s=Eustoma%20russellianum>, (Ziyaret tarihi: 2 Nisan 2017).

URL-11:[http://www.sbs.utexas.edu/bio406d/images/pics/gen/eustoma\\_russellianum.](http://www.sbs.utexas.edu/bio406d/images/pics/gen/eustoma_russellianum.),  
(Ziyaret tarihi: 2 Nisan 2017).

URL-12:<https://tr.climate-data.org/location/1093/>, (Ziyaret tarihi: 5 Nisan 2017).

URL-13:<http://www.sakataornamentals.com/index.cfm/fuseaction/plants.kwsearchp>,  
(Ziyaret tarihi: 8 Nisan 2017).

URL-14:[www.ankaratb.org.tr/lib\\_upload/Dünyada%20ve%20Türkiye'de%20Kes](http://www.ankaratb.org.tr/lib_upload/Dünyada%20ve%20Türkiye'de%20Kes),  
(Ziyaret tarihi: 1 Mayıs 2017).

URL-15:[www.ekonomi.gov.tr/portal/content/conn/UCM/uuid/dDocName:EK-1592](http://www.ekonomi.gov.tr/portal/content/conn/UCM/uuid/dDocName:EK-1592),  
(Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2017).

URL-16: [www.serka.gov.tr/store/file/common/5c7c6690c86e447f48209103e9ccc5d](http://www.serka.gov.tr/store/file/common/5c7c6690c86e447f48209103e9ccc5d),  
(Ziyaret tarihi: 1 Mayıs 2017).

URL-17:[www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001), (Ziyaret tarihi: 4 Mayıs 2017).

URL-18:<https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>,  
(Ziyaret tarihi: 4 Mayıs 2017).

URL-19:[www.optimushaber.com/yaylada-kesme-cicekcilik-21660h.htm](http://www.optimushaber.com/yaylada-kesme-cicekcilik-21660h.htm),  
(Ziyaret tarihi: 5 Mayıs 2017).

URL-20:[www.biologydiscussion.com/biotechnology/clonal-propagation/micro](http://www.biologydiscussion.com/biotechnology/clonal-propagation/micro),  
(Ziyaret tarihi: 6 Mayıs 2017).

URL-21:<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21664>,  
(Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2017).

URL-22:[http://www.dogaka.gov.tr/Icerik/Dosya/www.dogaka.gov.tr\\_622\\_LK5L4](http://www.dogaka.gov.tr/Icerik/Dosya/www.dogaka.gov.tr_622_LK5L4),  
(Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2017).

Van Tuyl J. M., Arens P., Miller W. B., Anderson N. O., The Role of Ornamentals in Human Life, Editors: Dixon G. R., Aldous D. E., *Horticulture: Plants for People and Places, Volume 1: Production Horticulture*, 1st ed., Springer, Dordrecht, 407-434, 2014.

Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J. J., Donella D. A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues, *European Journal of Biochemistry*, 1994, **224**(2), 771-786.

Noordegraaf C. V., Trends and Requirements in Floriculture in Europe, *Acta Horticulturae*, 1998, **454**, 39-48.

Walton C. D., Li Y., Abscisic Acid Biosynthesis and Metabolism, Editor: Davies P. J., *Plant Hormones*, 1st ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 140-157, 1995.

Wang J., Gui M., Zhou X., Mo X., Qu S., Tian M., Wu X., Wu M., Li J., Luo Y., Comparison of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) Cultivars Based on The Selected Regeneration Media Using Anther Culture, *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 2014, **55**(2), 125-128.

Wazir J. S., Evaluation of *Eustoma* / Lisianthus Cultivars for Assessing Their Suitability As Prominent New Cut Flower Crop Under Mid Hill Conditions of H. P., *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 2014, **2**(1), 105-110.

Winarto B., Rachmawati F., Setyawati A. S., da Silva J. A. T., Leaf-Derived Organogenesis *In Vitro* for Mass Propagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn), *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2015, **27**(6), 495-501.

Wochok Z. S., Sluis C. J., Gibberellic Acid Promotes *Atriplex* Shoot Multiplication and Elongation, *Plant Science Letters*, 1980, **17**(3), 363-369.

Yaşar F., Türközü D., Ellialtıoğlu Ş. Ş., Yıldırım B., Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Bitkisinin Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerinde Çalışmalar, *Yyü. Tar. Bil. Derg.*, 2014, **24**(3), 300-308.

Yazgan M. E., Korkut A. B., Barış E., Erkal S., Yılmaz R., Erken K., Gürsan K., Özyavuz M., Süs Bitkileri Üretiminde Gelişmeler, *VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 3-7 Ocak 2005.

Zaman S., Özdemir Ü., Sever R., Coğrafı Yönleriyle Antalya'da Örtü Altı Süs Bitkileri Yetiştiriciliği, *Doğu Coğrafya Dergisi*, 2007, **12**(8), 301-326.



## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

**Özkan H.**, Özen F., The Effect of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) on Post-Germination Morphometric Parameters of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] 'Mariachi Pure White (F<sub>1</sub>)' Cultivar, *Muğla Journal of Science and Technology*, 2016, **2**(2), 145-151.



## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İstanbul'da doğdu. 2010 yılında İstanbul Taksim Özel Tarhan Koleji'nden mezun olduktan sonra aynı yıl içerisinde Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

