

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAVİ LADİN (*Picea pungens* Engelm.)'İN  
FARKLI ÇEŞİTLERİNİN *IN VİTRO*'DA  
BİTKİ REJENERASYON  
KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bilge KIRAÇ  
EYLÜL 2011**

**Mavi Ladin (*Picea pungens* Engelm.)'in Farklı  
Çeşitlerinin *In Vitro*'da Bitki Rejenerasyon  
Kapasitelerinin Araştırılması**

**Gaziantep Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Tezi**


**Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ**

**Bilge KIRAÇ  
Eylül 2011**

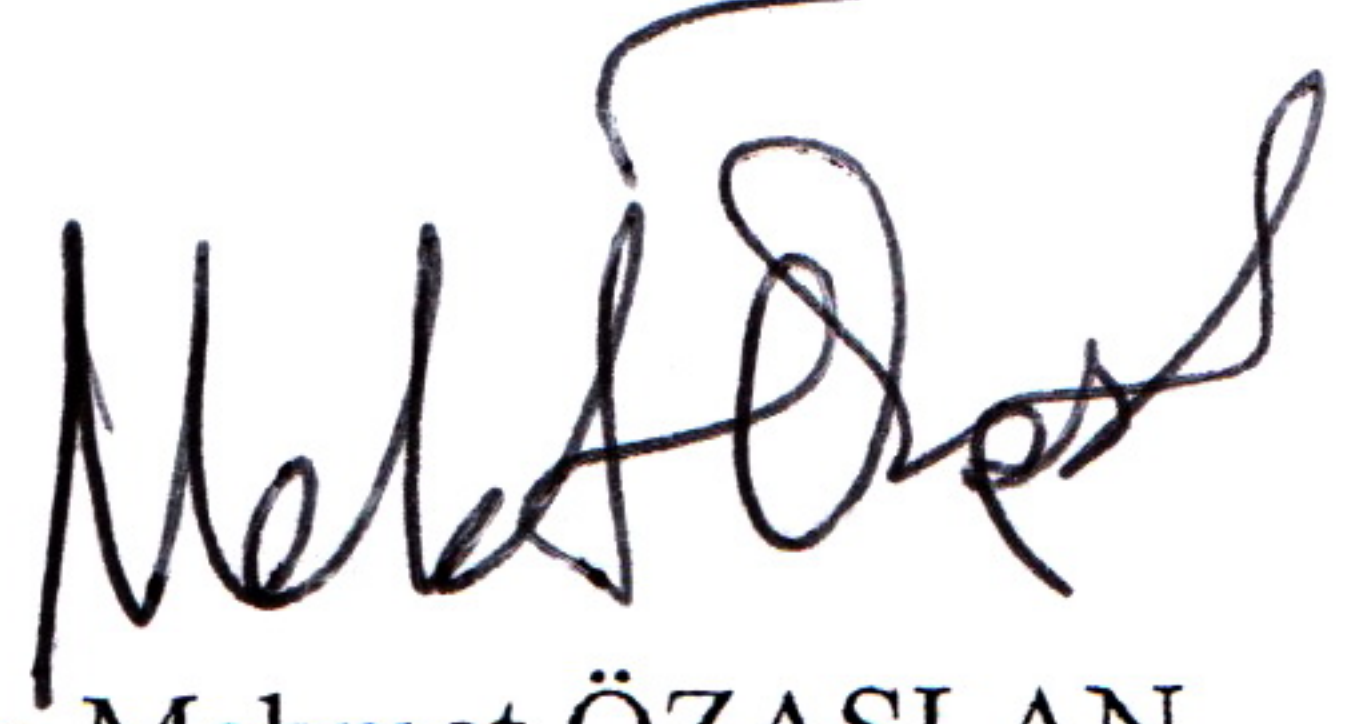
T.C.  
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Mavi Ladin (*Picea pungens* Engelm.)'in Farklı Çeşitlerinin *In Vitro*'da Bitki Rejenerasyon Kapasitelerinin Araştırılması  
Öğrencinin, Adı Soyadı: Bilge KIRAÇ  
Tez Savunma Tarihi: 07\09\2011


Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

  
Prof. Dr. Ramazan KOÇ  
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

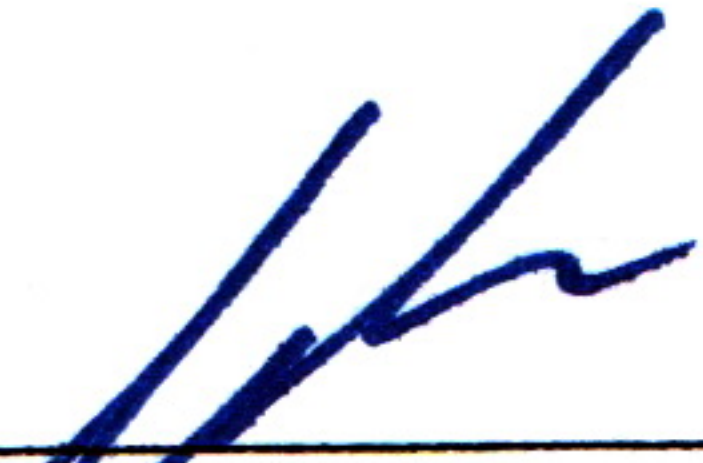
  
Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

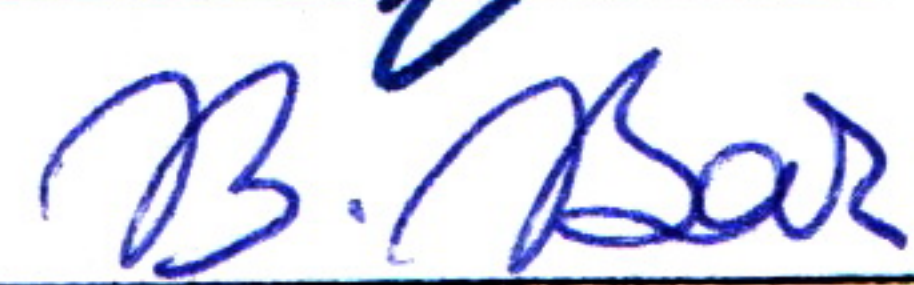
Jüri Üyeleri:  
(Unvanı, Adı ve SOYADI)

İmzası

Doç. Dr. Canan CAN



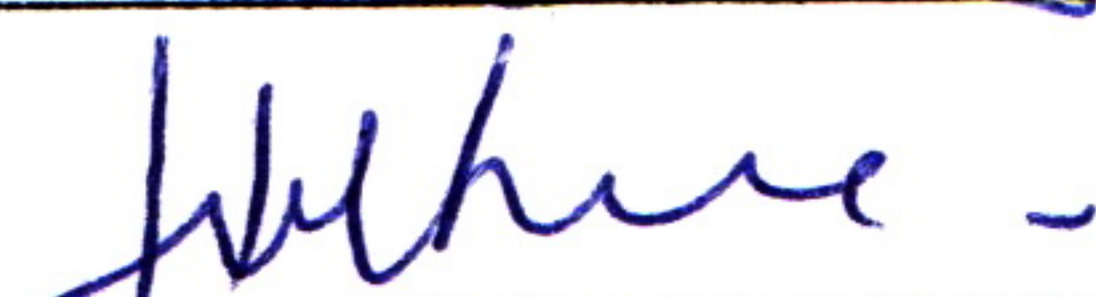
Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ



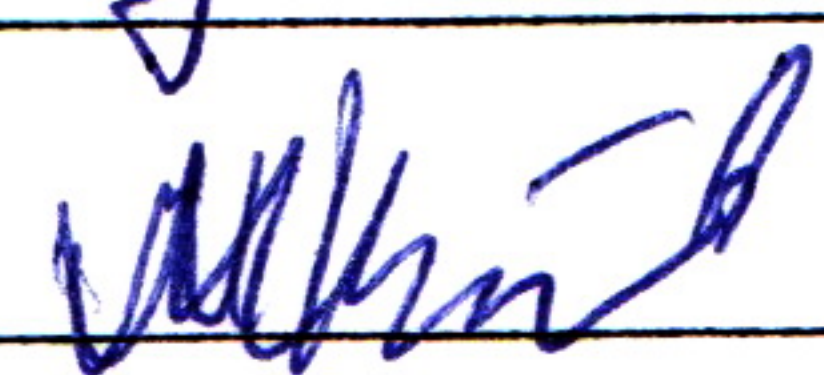
Yrd. Doç. Dr. Murat KÜTÜK



Yrd. Doç. Dr. H. İbrahim KILIÇ



Yrd. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK



## ÖZET

### MAVİ LADİN (*Picea pungens* Engelm.)'İN FARKLI ÇEŞİTLERİNİN *IN VİTRO*'DA BİTKİ REJENERASYON KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

KIRAÇ, Bilge

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Eylül 2011, 39 Sayfa

Park-bahçe ve peyzaj düzenlemelerinin önemli aktörlerinden Mavi Ladin (*Picea pungens* hoopsi), Türkiye'de ağırlıklı olarak ithal edilen bitkiler arasında yer almakta ve Türkiye'de doğal olarak yetişmemektedir. Ülkemizde bulunmayan ya da yetişmesi zor olan bitkilerin yüksek fiyatlarla ithal edilmesi ülkemiz ekonomisine olumsuz etki yapmaktadır. Bu çalışmada *in vivo* 'da yetişen bitkinin yaprak eksplantları toplanıp yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra oksin ve sitokinlerin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren bazal MS ortamında alt kültüre alınmış ve ortama % 2 sakkaroz ile %0.5 agar ilave edilmiştir. Kültürler 25 °C±1 ısıya sahip klima odalarında 16 saat ışık rejimi altında muhafaza edilmiştir. Kallus teşviki en iyi 0,1mg<sup>-1</sup> 1-Naftalin asetik asit + 7.0 mg<sup>-1</sup> 6-Benzilaminopurin ilave edilen bazal MS ortamında gözlenirken, 0,5mg<sup>-1</sup> 1-Naftalin asetik asit + 3.0 mg<sup>-1</sup> 6-Benzilaminopurin ve 0,5mg<sup>-1</sup> 1-Naftalin asetik asit + 7.0 mg<sup>-1</sup> 6-Benzilaminopurin içeren bazal MS ortamında ise somatik embriyogenezis 8 hafta içinde elde edilmiştir. Ancak kallus ve embriyolar 2-3 hafta içinde kahverengine dönmüş olup, en ideal kallus ve embriyo indüksiyonu 5-15 Mayıs arasında 5-6 yaşındaki ağaçlardan toplanan örneklerden elde edilmiştir. İthal edilen mavi ladinin *in vitro* klonal çoğaltımı çok zorluklar çıkarmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Mavi Ladin, Konifer, *In Vitro*, Çoğaltım

## ABSTRACT

### ***IN VITRO* INVESTIGATION OF REGENERATION CAPABILITY FROM DIFFERENT OF BLUE SPRUCE (*Picea pungens* Engelm.)**

KIRAÇ, Bilge

M. Sc. in Biology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Berna BAŞ

September 2011, 39 pages

One of the most popular conifers of park, garden and landscape architecture is blue spruce (*Picea pungens* hoopsi) which is imported plants, is not native plant of Turkey. Import ornamental plants dependence makes come at very high financial cost. In this study, after surface sterilization, *in vivo* leaf explants of plant were cultured on basal MS medium containing at various combination and concentration of cytokinines and auxins supplemented with 2% sucrose and 0.5% agar as solidifying agent. These cultures were maintained in the climate room at 25 °C±1 temperature with 16 hours fluorescent Although callus induction was the best on 0,1mg<sup>-1</sup> 1-Naphthaleneacetic acid + 7.0 mg<sup>-1</sup> 6-Benzylaminopurine, somatic embryogenesis were developed on 0,5mg<sup>-1</sup> 1-Naphthaleneacetic acid + 3.0 mg<sup>-1</sup> 6-Benzylaminopurine and 0,5mg<sup>-1</sup> 1-Naphthaleneacetic acid + 7.0 mg<sup>-1</sup> 6-Benzylaminopurine approximately in 8 week. However callus and embryos were turned to brownish in two-three weeks, specimens collected from 5-6 years adult trees between May 5-15 was suitable for inciting calli and embryogenesis. Imported blue spruce was very recalcitrant plant for clonal propagation via *in vitro* tissue culture.

**Key words:** Blue Spruce, Conifers, Clonal, In Vitro, Propagation

## TEŞEKKÜR

Tez araştırmaları için Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nün bütün imkanlarını sunan bölüm başkanımız sayın **Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a**,

Yüksek Lisans eğitimimde ve tez çalışmamın her aşamasında gösterdiği anlayış ve bilimsel katkılarından dolayı danışman hocam **Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ'a**,

Çalışmam sırasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren çok değerli hocam **Doç. Dr. Yusuf ZEYNALOV'a**,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen sevgili arkadaşım **Rukiye KARLIĞA'ya**,

Hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi her türlü destekleriyle bana güç veren **Ailem'e**,

Bana ve bu teze emeği geçmiş olan **Herkese**;

**Teşekkür ederim.**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	8
KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
BÖLÜM 3.....	13
MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. MATERYAL.....	13
3.1.1. Bitki Materyali.....	13
3.1.2 Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar.....	13
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması.....	14
3.2.2. Yaprak eksplantlarının kültüre alınması.....	14
3.2.2.1 Bitkilerin Sterilizasyonu.....	14
BÖLÜM 4.....	18
BULGULAR.....	18
4.1. <i>Picea pungens</i> hoopsi'nin Yaprak Eksplantlarının Kültüre Alınması.....	18
4.1.1. İn vivo' da Gelişen Bitki Yapraklarının Kültüre Alınması 1. Denemesi.....	18
4.1.2. İn vivo' da Gelişen Bitki Yapraklarının Kültüre Alınması 2. Denemesi.....	20
4.2. <i>P. pungens</i> glauca ve <i>P. pungens</i> sp. Yaprak Eksplantlarının Kültüre Alınması.....	31
BÖLÜM 5.....	33
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
KAYNAKLAR.....	36
EKLER.....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.1</b> <i>Picea pungens</i> hoopsi'nin Gaziantep Botanik Bahçesi'nden 2010 Mayıs ayındaki görüntüsü	7
<b>Şekil 3.1.</b> Yaprak eksplantlarından oluşan kallus büyüklükleri değerlerinin gösterilmesi	17
<b>Şekil 4.1.</b> Farklı konsantrasyonlardaki NAA ilaveli 7.0 mg/lt BAP hormonlarının etkisiyle kallus oluşumu. A: 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından kallus görüntüsü B: 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından kallus görüntüsü	19
<b>Şekil 4.2.</b> 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından kallus oluşumu	22
<b>Şekil 4.3.</b> 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kallusların kahverengileşmesi	23
<b>Şekil 4.4.</b> 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında genişleyen yaprak eksplantları	23
<b>Şekil 4.5.</b> 0.5mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında somatik embriyogenezis oluşumu.	25
<b>Şekil 4.6.</b> 0.5mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında somatik embriyogenezis oluşumu.	25
<b>Şekil 4.7.</b> 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında kallus oluşumu	27
<b>Şekil 4.8.</b> 0.5mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında yaralı doku oluşturularak elde edilen kallus oluşumu	28
<b>Şekil 4.9.</b> %2 sakkaroz+1mg/lt tyrosin içeren MS ortamında kültüre alınan kallusların kararması	31



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 3.1.</b> (0.0, 0.1, 0.5,2.0,3.0,5.0,7.0 mg/Lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamının içerikleri	15
<b>Tablo 3.2.</b> (0.0,1.0,2.0,3.0,5.0,6.0,7.0 mg/Lt) düzeylerinde alınan IAA/ BAP ve IAA/ kinetin kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamının içerikleri	16
<b>Tablo 4.1.</b> (0.1, 0.5,2.0,3.0,5.0,7.0 mg/Lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan <i>P. pungens</i> hoopsi'nin yaprak eksplantlarından elde edilen kallus oluşturan yaprak sayıları	18
<b>Tablo 4.2.</b> MS ortamının BAP ilaveli farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan <i>P. pungens</i> hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	20
<b>Tablo 4.3.</b> MS ortamının 0.1mg/Lt NAA ilaveli BAP'ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan <i>P. pungens</i> hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	21
<b>Tablo 4.4.</b> MS ortamının 0.5mg/Lt NAA ilaveli BAP'ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan <i>P. pungens</i> hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	24
<b>Tablo 4.5.</b> 1.0 mg/Lt NAA+ 7.0 mg/Lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan <i>P. pungens</i> hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	26
<b>Tablo 4.6.</b> MS ortamının 2.0 mg/Lt NAA ilaveli BAP'ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan <i>P. pungens</i> hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	26
<b>Tablo 4.7.</b> 0.1mg/Lt NAA+ 7.0 mg/Lt BAP içeren MS ortamı diğer NAA ilaveli ortamda BAP'ın kullanılan tüm farklı kombinasyon ve konsantrasyonları ile karşılaştırılması ve ortamların kallus oluşumu üzerine etkisi	29
<b>Tablo 4.8.</b> MS ortamına ilave edilen bitki düzenleyicilerinin içerikleri ve kallus oluşturan yapraklardan ekilen yaprak sayısı	30
<b>Tablo 4.9.</b> (0.1, 0.5,3.0,7.0 mg/Lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan <i>P. pungens</i> glauca'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	32
<b>Tablo 4.10.</b> (0.1,2.0,3.0,7.0 mg/Lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan <i>P. pungens</i> sp'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri	32

## SİMGELER VE KISALTMALAR

2,4-D	2,4 Dicholophenoxy acetic acid
atm	Atmosfer basıncı
BAP	6-Benzilaminopurin
cm	Santimetre
°C	Santgrad Derece
dH <sub>2</sub> O	Deiyonize su
gr	Gram
HCl	Hidroklorik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol butirik asit
Kin	Kinetin
l	Litre
M	Molar
m	Metre
mm	Milimetre
m <sup>2</sup>	Metrekare
mg	Miligram
mg/lt	Miligram/litre
ml	Mililitre
µM	Mikromolar
MS	Murashige ve Skoog
N	Normal
NAA	Naftalin asetik asit
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Mavi Ladinler ABD'nin Colorado ve Arizona eyaletlerinin yüksek rakımlı, karlı ve soğuk bölgelerindeki doğal orman alanları içinde yaşamaktadırlar. Tohumlar bu eyaletlerdeki Milli Ormanlardan ve özel bölgelerden toplanır. Bu bölgelerden başlıcaları Colorado'nun Rio Grande ve San Isabel Milli Ormanları, yine Colorado'nun San Juan Bölgesi, Arizona'daki Kaibab Milli Ormanı ve yine Arizona'nın Apache Bölgesi'dir.

Mavi ladin; piramidal formu ve masmavi ibreleri ile peyzaj uygulamalarında çokça tercih edilen dekoratif türlerin başında gelmektedir. Genel olarak monotonluğu bozmak ve arka plan ile kontrast oluşturmak amacıyla soliter kullanımı yaygındır. Bununla birlikte gruplarda karakter bitkisi olarak ta değerlendirilmektedir.

Mavi ladin (*P. pungens*), 25-30 m'ye kadar boylanan ve 1,5 m'ye kadar çap yapabilen bir ladin türüdür. Ağacın kabuğu ince ve pulludur. Genç ağaçlarda taç konik, yaşlılarda ise silindirikdir. Sürgünler kalın, turuncu-kahverengi, genellikle pürüzsüzdür. İğne yapraklar 15-30 mm uzunlukta, kalın, soluk boz-yeşil veya parlak mavi, ucu sivridir ve altında tek bir stoma bandı yer alır. İğne yapraklar koparılnca kötü bir koku verir. Kozalaklar sarkık, ince uzun, silindirik, 6-11 cm uzunlukta, kapalıyken 2 cm genişliğinde, açıkken ise 4 cm genişliğindedir. İnce bükülebilen kozalak pulları 20-24 mm uzunluğunda kenarları dalgalıdır. Kırmızımsı menekşe renkli kozalaklar 5-7 ay sonunda olgunlaşır. Tohumlar ise siyah, 3-4 mm uzunluğunda, ince uzun, tohum kanadı 10 -13 mm olup donuk kahverengidir.

Kar düşen iklimlerde peyzaj uygulamalarında kullanılan en popüler ağaçlardandır. Pek çok toprakta uyum sağlar, kuraklığa, fakir topraklara ve kirli şehir havasına dayanıklıdır. Topraktan itibaren piramidal taç yaparlar. En önemli özellikleri ibrelerinin mavi rengidir.

Mavi Ladin, ABD’de yetiştiği iklime çok benzer iklimi olan Ankara, İç Anadolu ve Doğu Anadolu’da çok başarılı bir ağaçtır. –45C ‘ye kadar dayanıklıdır. Özellikle Ankara’da 70-80 yaşında Mavi Ladin ağaçları vardır. İç ve Doğu Anadolu Bölgelerinde yaşanan kış soğukları nedeni ile bu bölgelerde tohumdan yetiştirilen Mavi Ladin fidanları Marmara, Ege ve Karadeniz bölgelerinde yetiştirilenlere göre daha belirgin boncuk mavisi renk almaktadırlar. Ancak Mavi Ladin fidanları ılıman iklimlerde ve gölgeli koşullarda kendilerine has mavi renklerini kaybederler.

Alpin kuşağının bir türü değildir. Genel olarak dağların vadi boyunca devam eden nemli düz topraklarında iyi bir büyüme gösterir, diğer yandan az yağmur alan yerlerde yavaş büyüme yapar. Mavi ladin diğer ladin türleriyle melez yapmaz, Engelman ladini ile nadiren melez yapar.

Mavi Ladin fidanları ilk 4-5 sene çok yavaş büyüme gösterir. Fidanlarda kök yapılarının oluşması, gövdelerinin odunlaşması ve yeterli kalınlığa ulaşması ancak 4-5 yaşlarında tamamlanmaktadır. Fidanlar 4-5 yaşlarına gelene kadar her yıl belli oranlarda fire vermektedirler. Bu yaştan sonra bu kayıplar yaşanmamaktadır.

Peyzaj uygulamalarında 8-12 yaşlarındaki ve boyları 150-250 cm. olan fidanların kullanılması uygun olmaktadır. Sığ ve saçak kök yapılarından dolayı yer değiştirme, boylu dikilme gibi işlemlere çok dayanıklıdırlar. Uygun mevsimde sökmek şartı ile 4-5 m boylarına kadar rahatlıkla sökümler ve dikim yapılabilirler.

Bitkisel üretim genel, olarak generatif veya vejetatif üretim teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Özellikle dış mekan süs bitkilerinin üretiminde ebeveynine tıpatıp benzeyen dolayısıyla aynı renk ve forma sahip bitki elde etmek vejetatif üretim yöntemleriyle mümkündür. Mavi ladin (*P. pungens* Engelm.) gibi ibrelili türlerde ise en çok kullanılan vejetatif üretim yöntemi aşılı ile üretme tekniğidir. Aşılı ile üretme; ayrı genotiplere ait iki bitkiden yeni bir bitki meydana getirme tekniğidir. Aşılı ile üretme, bugün süs ve orman ağacı türlerinde başarı ile kullanılan bir tekniktir (Ürgeç,1992). Ancak, birçok araştırmacının da belirttiği gibi aşılı çalışmalarının başarısına bazı faktörler etki etmektedir. Nitekim, Doran (1953), Nienstaedt ve ark. (1958) ve Fielding (1969) gibi araştırmacılar genetik özelliğinden dolayı bazı fertlerden alınan sürgünlerin tutma başarısı yüksek aşılı kalemi verdiğini

belirtmişlerdir. Mirov (1940) ve Dormling'in (1964); aşı kalemi alınacak sürgünün ağaç üzerindeki yerinin, aşı kalemi toplama yönteminin, stokların hazırlanmasının ve aşığı yapma zamanının aşı başarısı üzerinde etkili faktörler olduğu belirtilmiştir. Larsen (1956) ise başarılı bir üretim yapılabilmesi için kuvvetli anaç fidanlara ihtiyaç bulunduğunu ve iyi bir aşı bıçağının da aşı ile üretmede en etkili faktörlerden biri olduğunu belirtmektedir.

Ticari değeri son derece yüksek olan mavi ladinin yeşilimsi mavi iğne yaprakları için tohumdan ve vejetatif olarak aşı ile üretimi yapılmaktadır. Tohumla üretimi zordur aynı zamanda açılımda meydana geldiği için yeni bireyler ana bitki ile aynı özellikleri taşımamaktadır. Aşı ile üretim daha çok mavi ve değerli bitkilerin üretiminde kullanılır. Çünkü tohumla üretimde genetik açılım nedeniyle mavi türlerin çöğürlerinin çoğu daha az mavi olur. Ancak vejetatif üretimde 10 yılın üzerindeki ağaçlardan alınan aşılar köklenmemektedir. Ağaçtan alınan lateral aşı bölgeleri ağaç üzerinde geniş bir alana yayılarak aşağıya doğru bir gelişme göstermektedir. Yani ağaç dik olarak yukarı doğru gelişemezler. Yalnızca apikal bölgeden alınan aşılar ağacın yukarı doğru gelişmesine olanak sağlar, lateral aşılar ise yukarı doğru dik büyümeye engel olmaktadır. Bu özellik bazı koniferlerde de gözlenmektedir.

Ülkemizde kamu kurumları, yerel yönetimler ve özel kuruluşların peyzaj düzenlemelerine ağırlık vermesi nedeniyle bitkisel materyale olan ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Özellikle kentsel ve kırsal alanlarda yapılan peyzaj düzenlemelerinde yerli veya yabancı çok sayıda dış mekan süs bitkisi kullanılmaktadır. Ancak ülkemizde dış mekan süs bitkilerinin üretimi yeterli düzeyde değildir. Bununla birlikte, tercih edilen bitki türünün egzotik oluşu, üretiminde zorluk bulunması ve gelişiminin yavaş olması, istenilen türlerin İtalya ve Hollanda gibi yabancı ülkelerden ithal edilmesine sebep olmaktadır (Anonim,2001).

Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Modern ıslah ve muhafaza yöntemleri içerisinde; sürgün ucu kültürü, embriyogenik kallus eldesi, somatik embriyogenesis, somatik hibridizasyon, gen aktarma çalışmaları yer almaktadır.

Bitki ıslahında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisi somatik embriyogenesisidir. Vegetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar. Somatik embriyogenesisin en önemli kullanım alanları; somatik hibridizasyon, partikül tabancası ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile bitkilere gen aktarımıdır (Özcan vd., 2001).

Somatik embriyogenesis direk olacağı gibi, embriyogenik kalluslardan da (indirek somatik embriyo oluşumu) elde edilebilir. Direkt somatik embriyogenesis; embriyo kallus oluşumu olmadan direkt olarak somatik bir hücreden oluşur. Bu tip embriyogenesis için çok genç bitki doku ve hücreleri kullanılır. İndirekt somatik embriyogenesis ise önce kallus oluşur. Daha sonra bu kallustan somatik embriyolar oluşur. Somatik embriyo oluşturan kallusa embriyogenik kallus adı verilir. Embriyogenik kallus; kompakt yapıda ve beyazdan açık sarı renge kadar değişen renklindedir (Hatipoğlu,1997).

Somatik embriyogenesis, somatik hibridizasyon ve gen aktarma çalışmalarında ara ürün olarak embriyogenik kallusların elde edilmesi çok önemlidir.

Embriyogenik kalluslar tek hücre kaynaklı olduğundan özellikle gen aktarma çalışmalarında amaca ulaşmada önemli rol oynar. Bunların yanında hücre süspansiyonu hazırlama ve protoplast füzyonunda kaynak olarak yine embriyogenik kalluslar kullanılır (Özcan vd., 2001).

Somatik embriyogeneze çalışmaları, bitkilerin klonal hızlı çoğaltımında, sentetik tohum üretiminde ve gen aktarım çalışmaları gibi önemli alanlarda kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenezi önemli ölçüde etkileyen temel faktörler arasındadırlar (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku, organ ve hücre kültürü çalışmaları, bitki genetik kaynaklarının korunmasında, bitkilerin uzun süreli muhafazasında, genetik ıslah çalışmalarında, klonal çoğaltım ve hastaliksız bitki üretimi gibi birçok alanda çok sayıda bitki türünde rahatlıkla kullanılabilinen çalışmalardır. Teknikte temel olarak aseptik koşullarda hazırlanan ve bitki tarafından gereksinim duyulan makro, mikro besin elementleri, vitaminler ve hormonları (oksinler, sitokininler ve giberellinler) içeren sentetik besin ortamları üzerinde, doku, organ, hücre, ve protoplast gibi bitki eksplantları kültüre alınır ve kültürler klima odalarında bekletilirler (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Bitkilerin büyüme ve gelişmesini artıranlar veya durduranları vardır. Tür ve çeşitlere göre değişmekle birlikte uygun olmayan konsantrasyonda ortama ilave edildiklerinde genellikle hiçbir etki ortaya çıkmaz. Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşiklerdir. İndol asetik asit, zeatin, zeatin ribozid, GA, absisik asit ve etilen bitkilerce üretilen hormonlardandır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. En çok kullanılanlar; oksinler, sitokininler, giberellinler, absisik asit ve etilendir (Babaoğlu vd., 2002).

Pierik, (1997) ve Babaoğlu vd., (2001) Oksinler, fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellediğini ve hücre gelişiminde etkili olduklarını ayrıca, oksinlerin doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, organogenez ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabildiklerini rapor etmişlerdir.

Smith, (1992) yılında sitokininlerin, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretildiklerini, hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olduklarını ve antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirdiklerini bunların yanı sıra sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenezi engellediklerini rapor etmiştir.

Babaoğlu, (2001) Giberellerinlerin, meristem bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, bitki boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kùltùrlerinde kullanıldıklarını belirtmiştir. Ayrıca, kallus gelişimi, organogenez ve adventif kök oluşumunu engellediklerini ve bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi de arttırdıklarını vurgulamıştır.

Babaoğlu, (2001) Absisik asitin, strese maruz kalmış bitkilerde, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunduğunu ve bitki doku kùltùrlerindeki rolünün henüz tam olarak anlaşılmamış olduğunu ve halen somatik embriyoların olgunlaştırılmalarında kullanıldığını belirtmiştir.

*Picea pungens* sistematik açıdan;

- Alem : Plantae (Bitkiler)
- Bölüm : Pinophyta (Açık tohumlular)
- Sınıf : Pinopsida
- Takım : Pinales (İğne yapraklılar)
- Familya : *Pinaceae* (Çamgiller)
- Cins : *Picea*
- Tür : *Picea pungens* Engelm.
- 1.Çeşit : *P. pungens* hoopsi (hoopsi çamı)
- 2.Çeşit : *P. pungens* glauca
- 3.Çeşit : *P. pungens* sp.





**Şekil 1.1** *P. pungens hoopsi*'nin Gaziantep Botanik Bahçesi'nden 2010 Mayıs ayındaki görüntüsü

Mavi ladinin hem ülkemizin ekolojik şartlarına uyum sağlayıp tesis yeteneğine sahip olması hem de peyzaj değeri yüksek ithal türlerin başında gelmesi, kitlesel üretimi konularında araştırmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır. Dolayısıyla bu araştırma, mavi ladinin önemli bir kültüvarı olan "Hoopsi" nin laboratuvar koşullarında bu sorunların üstesinden gelen bitki doku kültürü teknik yöntemleri kullanılarak genç ladinin çeşitli kısımları özellikle iğne yapraklarının kallus, embriyo ve bitkicik oluşturma kapasitesinin araştırılması amacıyla bu çalışma ele alınmıştır.

## BÖLÜM 2

### KAYNAK ÖZETLERİ

Orman ağaçlarının *in vitro* kültür yoluyla üretilmesine yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Bazı orman ağaçlarının dokuları, yaşlı fertlerden alınmış ise, çok zor köklenmektedir. Bu nedenle araştırmalarda genç bitkilerin embriyo, hipokotil, sürgün uçları veya tomurcuk eksplantları gibi doku parçaları kullanılmaktadır.

İğne yapraklı ağaçlarda doku kültür yöntemleriyle *in vitro* çoğaltım olanaklarını araştırmak amacıyla Hazubska-Przybyl T. vd., (2007), 4 ladin türünde (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* 'Glauca' ve *P. breweriana*) somatik embriyogenesis çalışması yapmıştır. Buna göre en fazla embriyogenik doku elde etmek için eksplant kaynağı olarak olgun zigotik embriyolar kullanılmasının uygun olduğunu rapor eden araştırmacılar, bu 4 çeşitte elde edilen verim oranının %10,8 (*P. breweriana* için) - %23,75 (*P. omorika* ve *P. pungens* 'Glauca' için) arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında embriyogenik doku teşvikinin özellikle kültür ortamının bileşenlerinden etkilendiği belirtilmiş olup, en uygun oksinlerin 2,4-D, NAA, Picloram ve en uygun sakkaroz miktarının 10-20 g/l arasında olduğu saptanmıştır. Yine *P. omorika* 'ya ait eksplant kaynağı olarak megagametofit (endospermiler olgunlaşmamış zigotik embriyolarla birlikte) kullanıldığı zaman %10 dolayında oldukça düşük düzeylerde embriyogenik doku elde eden araştırmacılar hipokotiller, kotiledonlar ve iğne yapraklardan embriyogenik doku üretilmediğini bildirmişlerdir. Böylece *Picea abies* ve *P. omorika* çeşitlerinden somatik bitkiciklerin elde edilmesiyle fidanlıkta üretim veya genetik ve ıslah çalışmaları amacıyla doku kültür yöntemleriyle mikroçoğaltımın uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Diğer mavi ladin çeşitlerinden *Picea pungens* Engelman 'ın kültüre alınan olgun zigotik embriyolarından somatik embriyogenesis ve bitkicik elde edildiği bildirilmiştir (Afele vd., 1992). Adı geçen çalışmada bitkicik ve embriyogenesis teşviki için yarı oranlarda kullanılan LP, LM ve BLG kültür ortamlarının etkisi

araştırılmış, LM kültür ortamının en fazla somatik embriyo teşvik ettiği, BLG ortamının ise embriyonal-suspansör yığını üretmeden somatik embriyo teşvik ettiği saptanmıştır. Embriyonal suspansör yığınının oksin/sitokinin ile teşvik edildiği denemede ise 2 µM NAA + 10 µM BA veya 10 µM NAA + 5µM BA içeren ortamların ise en fazla bitkicik üreten somatik embriyo verdiği bildirilmiş olup, AgNO<sub>3</sub>'ün (10 -100 µM) ilave edildiği induksiyon ortamında ise somatik embriyoya dönüşüm oranı azaldığı rapor edilmiştir.

Mavi ladin (*Picea pungens*) 'in *in vitro* hücre ve doku kültürüyle ilgili ilk çalışmalar Manandhar ve Gresshoff (1980) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar olgun ağaçların yaprak ve gövde parçalarından elde ettiği hücre kültürlerini başlatmak için 10 µM 2.4-D + 1µM kinetin ilave edilen B5 ortamı ve 5µM 2.4-D + 1µM kinetin ilaveli bazal MS ortamının optimum olduğunu belirtmişlerdir. Yaprak ve gövde kalluslarından yeşillenme, vasküler farklılaşma ve yalancı tomurcuk gelişimlerinin çok sınırlı olduğu bir organogenesis potansiyele sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bitkinin sitolojik çalışmalarını da yapan araştırmacılar 24 metasentrik kromozomların bir diploid karyotip olduğunu ve tekrarlı alt kültürler sonucunda karyotip ve ploidi düzeyinin stabil kaldığını saptamışlardır. Ayrıca gövde kalluslarının hacimleri ve kolay görünmelerinden dolayı da kromozomlarının ideal bir sitolojik materyal olduğu belirtilmiştir.

Attree and Fowke, (1991) ve Becwar vd., (1989), Malabadi vd., (2004), "embriyogenik kültürlerin başlatılmasının pek çok faktör tarafından etkilendiğini ve bunlar arasında en önemlisinin doğru hasat zamanı ve *in vitro* çalışmalar için kullanılacak olan uygun eksplantın seçimi" olduğunu bildirmiştir. Doğru hasat zamanı ve uygun eksplantın seçimi çok önemlidir. Çünkü farklı gelişim safhalarındaki bir organ ya da dokunun çeşitli hücreleri *in vitro*'ya tepkide kendi yeterliliklerinde farklıdır.

Pulman vd., (2004), *Pinus taeda*'da somatik embriyogenesis başlangıcının, değiştirilmiş ½ P6 tuzları konsantrasyonu, 50 mg/lt aktif karbon, aktif karbonun adsorbsiyonunu desteklemek için ayarlayıcı Cu ve Zn, % 1,5 maltoz, %2 myo-inositol, 500 mg/lt casamino asit, 450 mg/lt glutamine, 2 mg/lt NAA, 0,63 mg/lt BAP, 0,61 mg/lt kinetin, 3,4 mg/lt gümüş nitrat, 10 µM 8-Br-CGMP, 0.1 µM

brassinolide ve 2 g/lt gelrite içeren temel ortama 0,05 mg/lt biotin, 0,5 mg/lt folik asit ve 250 mg/lt pH tampon ajanı MES ilave edildiğinde geliştirildiğini açıklamışlardır.

Yine Pulman vd., (2004), *Pinus taeda*, *Pinus elliotti*, *Pseudotsuga menziesii* ve *Picea abies* adlı ibreli türlerde yaptıkları araştırmada ise somatik embriyogenesinin başlatılmasının, paclobutrazol'un ortama farklı dozlarda ilavesiyle mümkün olduğunu bildirmektedirler.

Malabadi ve Hiranjit (2002), *Pinus kesiya*'da olgun zigotik embriyoların, 8,87 µM BA, 26,85 µM NAA ve 22,62 µM 2,4-D ilave edilmiş 4g/lt gellan gum ve 30 g/lt maltoz içeren yarı seyreltik değiştirilmiş MS ortamında kültüre alındığında proembriyonal kütleli, beyaz, yarı geçirgen ve cıvık embriyogenik kallus ürettiğini bildirmektedirler.

Yine aynı çalışmada, üstte açıklanan embriyogenik kallusların yarı seyreltik MS ortamında (60 g/lt maltoz ve 4 g/lt gellan gum içeriyor, 2,262 µM 2,4-D, 2,685 µM NAA, 0,887 µM BA ilave edilmiş) yapılan alt kültürünün, erken safha kotiledonal embriyoların başlatılmasıyla sonuçlandığı açıklanmaktadır. İlave üç haftadan sonra ise 60 g/lt maltoz, 10 g/lt gellan gum 37,84 µM ABA ve 0,2 g/lt aktif karbonlu ortamda embriyogenik kallus kültürünün, kotiledonal embriyo ürettiğini ve tam bitkiciklerin ise sözü edilen somatik embriyolardan ayrılıp düzenleyicisiz, 4 g/lt gellan gum ile kuvvetlendirilmiş yarı seyreltik ortamında kültüre alındığında elde edildiğini ifade etmektedirler.

Tang and Guo (2000), *Pinus taeda*'nın 8 genotipinin olgun zigotik embriyolarını 2,4-D ya da NAA, BA ve kinetin içeren teşvik ortamında 2-3 hafta kültüre alıp sonra farklılaşma ortamına aktarmışlar. Daha sonra da 1 mg/lt BA, 0,5 mg/lt GA3, 0,5 mg/lt IBA ilave edilen TE ortamında köklenme elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Valdes vd., (2001) ise, fıstıkçamının çimlenmiş embriyolarından izole edilerek in vitro kültüre alınan kotiledonların, 4,4 µM BA uygulamasına sürgün organogenesisi tepkisi verdiğini bildirmektedirler.

Lelu vd., (1999), *Pinus pinaster* ve *Pinus sylvestris*'te büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu ya da bulunmadığı ortamlarda, somatik embriyo gelişimi ve bitkicik

rejenerasyonunu araştırdıkları çalışmalarında; zigotik embriyoları önce 2,4-D’li ya da 2,4-D’siz ve BA’lı ve BA’sız değiştirilmiş Litvay ortamında (LM) kültüre almışlar ve ardından ABA’lı ya da ABA’sız gellan gum’lu ve gellan gum’suz LM ‘na aktarmışlardır. Somatik embriyogenesis her iki ortamda da başlatılmış ve srdrlmştir. *Pinus sylvestris*’de kültür ortamının embriyogenik kültürlerin başlatılması ve çoğaltılmasında önemli bir etkiye sahip olmadığını, *Pinus pinaster*’da ise en iyi tepkinin büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu ortamda, kotiledon primordialarının uzamasından önceki sayfada kesip çıkarılan zigotik embriyolarla elde edildiği belirtilmektedir.

Conifer türlerinin sürgün organogenesisi ve/veya somatik embriyogenesisi ile başarılı çoğaltılması üzerine bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak *Pinus* türlerinde çoğaltmanın zor olduğu düşünülmektedir. (Salajova vd., 1999) ve sadece az sayıda *Pinus* türü embriyogenik ve/veya somatik dokulardan tekrar oğaltılabilmiştir.

Haggmon vd., (1999), somatik embriyogenesisin başarılı olduğu durumlarda kullanılan zigotik embriyo eksplantlarının ya proembriyo ya da erken embriyolar olduğunu bildirmektedirler.

*Pinus elliotti*’ de somatik embriyogenesis yoluyla bitkicik rejenerasyonunun aıklanığı bir çalışmada, embriyogenik kallus,4 mg/lt BA ve 1 mg/lt 2,4-D içeren Le Poivre (LP) ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış zigotik embriyolarda başlatılmış ve 1 mg/lt 2,4-D ve 0,5 mg/lt BA’ lı LP ortamında çoğalması sağlanmıştır. Erken safha embrioidleri,4 mg/lt ABA,75 g/lt polietilen glikol (PEG) ve 5g/lt aktif karbon ilaveli LP ortamında kotiledonal embrioid olarak geliştirilmiştir. Olgun somatik embriyolar hormonsuz ortamda çimlendirilmiş ve bitkicik haline getirilmiştir. Bitkiciklere dönüşen somatik embriyoların frekansı % 15,6 olarak bulunmuştur (Tang vd., 1997).

Garcia-Ferriz vd., (1994), değiştirilmiş MS, SH ve GD ortamlarında BA (benziladenin)’nın 5, 25, 50  $\mu$ M dozlarının amda organogenik tepki üzerine olumlu etki yaptığını belirtmişlerdir.

Mac An t-saor vd. tarafından *Picea sitchensis*'de yapılan in vitro çalışmalarında olgun dönemde 13 yaşlarındaki bireylerden sürgünler alınmış ve bu sürgünler terminal ve lateral tomurcuk taşıyacak şekilde 2 cm uzunluğunda parçalara ayrılmışlardır. Ortam olarak Webb ve Street (WS) ile Schenk ve Hildebrandt (SH) ortamları kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre terminal tomurcuklar lateral tomurcuklara göre daha uzun sürgün vermişlerdir. Ağaç yaşının da tomurcukların büyümesi üzerine bir etkisi görülmemiştir. SH ortamındaki eksplantlar WS ortamındakilere nazaran daha uzun sürgünler oluşturmuşlardır. Ayrıca, birçok eksplantın sürgünlerinde tomurcuk oluşumu tespit edilmiştir (Mac An t-saor vd., 1992).

*Pinus palustris* ve *Pinus elliottii*'de hipokotil seksiyonları kullanılarak en az bir kısıtlayıcı ve dört teşvik edici hormon tespit edilmiştir (Allen, 1960). Araştırmacı ağaç yaşı arttıkça büyüme teşvik edici maddelerinin oranının azalmaya, bunun aksine büyüme kısıtlayıcılarının oranının da artmaya başladığını belirtmiştir.

IAA, IBA ve NAA genellikle kullanılan oksinler olup konsantrasyonlarına, tür ve köklenme yeteneğine bağlı olarak değişik tesirler göstermektedirler (Thiman ve Delisle, 1939,1942; Snow ve May,1962; Jesinger ve Hopp,1967).

Oksinlerin; Kinetin, Adenin, Glikoz gibi kimyasallarla kombine olarak tatbik edilmeleri tek olarak uygulamalarından daha iyi sonuçlar vermektedir (Grigsby,1965; İktüeren'den 1972; Larsen ve Dingle,1969). Thimann ve Delisle (İktüeren'den 1972) ve Doran vd., (1940) şekerin tek başına *Pinus strobus* çeliklerinde köklenme yüzdesini arttırdığını bildirmektedir.

Heitmüller (1952) *Picea abies*, *Picea omorica*, *Pseudotsuga douglasii viridis* ve *caesia*, *Larix europea*, *Larix laricina* (kısa sürgün), *Pinus sylvestris*, *Abies grandis* ve *Abies nordmanniana* türlerinde IAA, IBA ve NAA hormonlarının değişik konsantrasyonları uygulanarak çelikle üretimlerini denemiş ve başarılı sonuçlar elde etmiştir. (Yahyaoğlu'ndan, 1980)

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Bitki Materyali

Çalışmada Gaziantep Botanik Bahçesi'nden alınan 3 farklı mavi ladin (*P. pungens* hoopsi, *P. pungens* glauca, *P. pungens* sp.) bitkisel materyal olarak kullanılmış, denemeler Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Mavi ladin bitkisinin 2009 (birinci deneme) ve 2010 (ikinci deneme) Mayıs-Haziran ayları arasında temin edilen yaprak eksplantları kullanılmıştır. Alınan eksplantlar laboratuvara getirilmiş ve kültür öncesi sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.2 Kültür Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Bütün çalışmalarda Murashige ve Skoog (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture) MS ortamı (Sigma) kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve bu kimyasalların miktarları Ek.1 de verilmiştir.

##### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Bitki doku kültürü çalışmalarında, steril kabin (Bilser, Ankara), etüv (Nüve), orbital karıştırıcı (Nüve), inkübatör (Nüve), karıştırıcılı ısıtıcı (Are), otoklav (Nüve), dijital fotoğraf makinesi (SONY DSC- S730 zoom), hassas terazi (Precisa 160 M), buzdolabı (Profilo), mikrodalga fırın (Arçelik) kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması**

Bu çalışmada makro, mikro besin elementleri ve vitaminleri içeren bazal MS 4,3 gr/lt tartılıp dH<sub>2</sub>O' da çözülmüştür. Karışıma karbon kaynağı olarak 20 gr/lt olacak şekilde sakkaroz ilave edilmiş ve hormonlar belirli kombinasyon ve konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Ortamın pH'sı 1 M NaOH ve 1 N HCl kullanılarak pH 5,7'ye ayarlanmıştır. Ortamlara 5 gr/lt agar ilave edilerek katılaştırılmıştır. Ortamlar otoklavda 1 atm basınçta 121<sup>o</sup> C' ye ulaştıktan sonra 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besin ortamları laminar hava akışlı kabin içerisinde katılaşmadan hemen steril cam petrilere belirli oranlarda dökülmüş ve katılaştıktan sonra kullanılmış veya kullanılmıncaya kadar aseptik koşullarda saklanmıştır.

### **3.2.2. Yaprak eksplantlarının kültüre alınması**

Yapılan çalışmalar yaprak eksplantlarından gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.1 Bitkilerin Sterilizasyonu**

Doğadan alınan bitkiler laminar hava akışlı kabin içerisinde ilk aşamada 15-20 dk süre ile akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Daha sonra eksplantlar sırasıyla önce % 5'lik sodyum hipokloridinin içerisine Tween-20 ilave edilmiş solüsyonunda 3 dakika boyunca sterilize edilmiş ve ardından sodyum hipokloridin dokulardan uzaklaşması için 3 defa steril dH<sub>2</sub>O ile aseptik koşullarda çalkalanmıştır. Sterilizasyonun tamamlanmasından sonra bitki eksplantları, içinde kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınmıştır. Eksplantlar bir bistüri yardımıyla kesilerek besin ortamına ekilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

#### **3.2.2.2. *In vivo* ' da Gelişen Bitki Yapraklarının Kültüre Alınması**

Mayıs-Haziran aylarında alınan yaprak eksplantları ilk olarak bazal MS ortamında kültüre alınmış fakat herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılmıştır. Otoklavı takiben



kültür ortamları hemen steril cam petrilere belirli oranlarda dökülmüş ve çalışma sırasında kullanılmıştır. Kültürler 25 °C±1 ısıya sahip klima odalarında 16 saat ışık rejimi altında muhafaza edilmiştir. Değerlendirmeler inokülasyonu takiben 4-7 hafta sonra, kallus oluşumu ve somatik embriyogenezis sonuçları alınarak gerçekleştirilmiştir. Oksin (NAA ve IAA) ve sitokinin (BAP ve Kinetin) hormonları farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verildiği gibi ilave edilerek kültüre alınmıştır.

**Tablo 3.1.** (0.0, 0.1, 0.5, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamının içerikleri

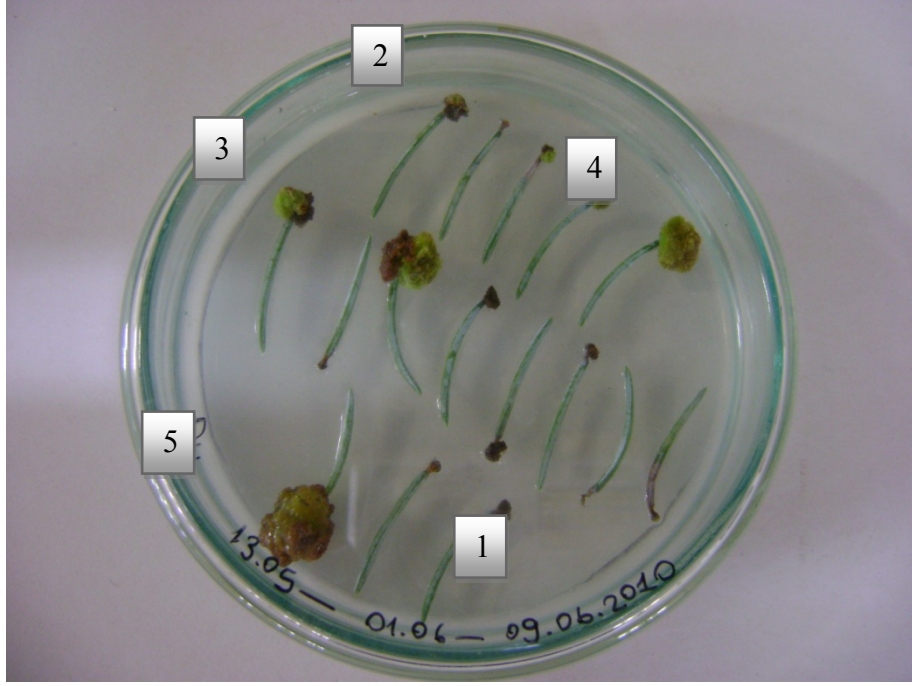
<b>NAA (mg/lt)</b>	<b>BAP (mg/lt)</b>
0.0 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt
0.1 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt
0.5 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt
2.0 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt

**Tablo 3.2.** (0.0,1.0,2.0,3.0,5.0,6.0,7.0 mg/lt) düzeylerinde alınan IAA/ BAP ve IAA/ kinetin kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamının içerikleri

IAA/BAP içeren ortamlar		IAA/Kinetin içeren ortamlar	
IAA (mg/lt)	BAP (mg/lt)	IAA (mg/lt)	KİNETİN (mg/lt)
0.0 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt	0.0 mg/lt	3.0 mg/lt 6.0 mg/lt
1.0 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt	1.0 mg/lt	3.0 mg/lt 6.0 mg/lt
2.0 mg/lt	0.0 mg/lt 3.0 mg/lt 5.0 mg/lt 7.0 mg/lt	2.0 mg/lt	3.0 mg/lt 6.0 mg/lt

Tablo 3.2'deki IAA/BAP ve IAA/kinetin hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında herhangi bir gelişim gözlenmemiştir. Böylece yaprak eksplantlarının bir kısmı Tablo 3.1'deki kallus oluşumu veren besin ortamlarında alt kültüre alınmıştır. Oluşan kalluslarda kararırma gözleendiği için besin ortamına farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilerek alt kültüre alınmıştır.

Çalışmada başlangıç aşamasında kullanılan farklı kombinasyonlardaki ortam bileşimlerinin kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı (%) ve somatik embriyogenezis sayısı (adet) hesaplanması ile belirlenmiştir. Oluşan kallusların büyüklükleri -, +, ++, +++, +++++ olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlere sahip kallus büyüklükleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



1: - (kallus yok)

2: + (az kallus)

3: ++ (orta kalus)

4: +++ (iyi kallus)

5: ++++ (çok iyi kallus)

**Şekil 3.1.** Yaprak eksplantlarından oluşan kallus büyüklükleri değerlerinin gösterilmesi

### 3.2.2.3. İstatiksel Analizler

Bu çalışmadan elde edilen veriler, kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı kallus oluşturan yaprak sayılarının 100 ile çarpılıp kalan yaprak eksplant sayısına bölünmesi ile elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde One-Way ANOVA LSD testi [SPSS (SPSS 11.0 for Windows)] ile en iyi sonuç alınan ortam diğer ortamlarla karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

#### 4.1. *Picea pungens* hoopsi'nin Yaprak Eksplantlarının Kültüre Alınması

##### 4.1.1. İn vivo' da Gelişen Bitki Yapraklarının Kültüre Alınması 1. Denemesi

*Picea pungens* hoopsi'nin yaprak eksplantları birinci deneme olarak bazal MS ortamında kültüre alınmış, in vitro'da rejenerasyon kapasiteleri çalışılmıştır. Kültür ortamlarında bitki transferini takiben yaklaşık 3 ay sonunda herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Böylece bazal MS ortamına oksin (NAA ve IAA) ve sitokinin (BAP ve kinetin) hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonları ilave edilerek kültüre alınmıştır.

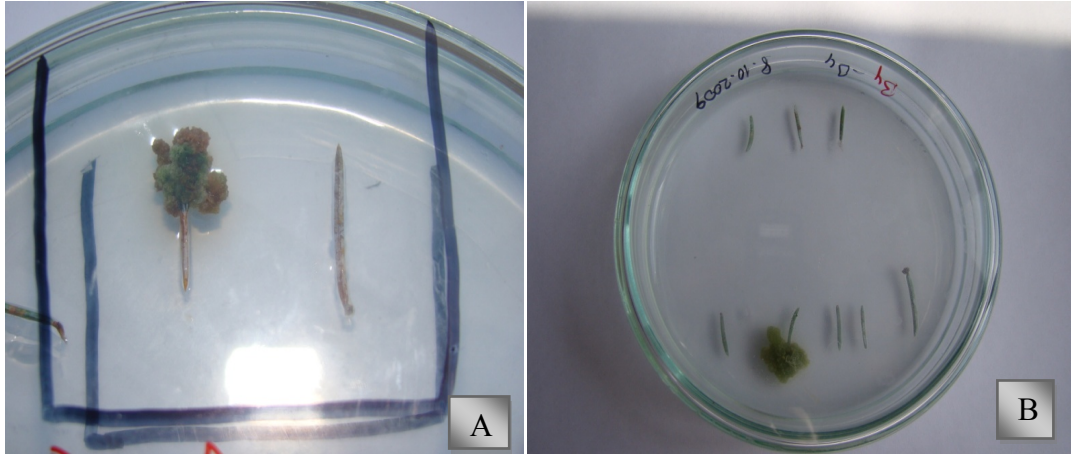
Bazal MS ortamında gelişme göstermeyen yaprak eksplantları 8 hafta sonra NAA ve BAP içeren hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarında kültüre alınmış ve 6-8 hafta sonra kallus oluşmaya başlamıştır. Kültürün yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayısı Tablo 4.1 de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** (0.1, 0.5,2.0,3.0,5.0,7.0 mg/l) düzeylerinde alınan NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *P. pungens* hoopsi'nin yaprak eksplantlarından elde edilen kallus oluşturan yaprak sayıları

Besin Ortamı (mg/l)	Ortama Yerleştirilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oluşturan Yaprak Sayısı
3.0 BAP	20	0
5.0 BAP	20	5
7.0 BAP	20	7
0.1 NAA	20	0
0.1 NAA+ 3.0 BAP	20	1
0.1 NAA+ 5.0 BAP	20	0
0.1 NAA+ 7.0 BAP	20	5
0.5 NAA	20	5
0.5 NAA+ 3.0 BAP	20	8

Besin Ortamı (mg/lt)	Ortama Yerleştirilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oluşturan Yaprak Sayısı
0.5 NAA+ 5.0 BAP	20	8
0.5 NAA+ 7.0 BAP	20	8
2.0 NAA	20	7
2.0 NAA+ 3.0 BAP	20	8
2.0 NAA+ 5.0 BAP	20	8
2.0 NAA+ 7.0 BAP	20	9

Tablo 4.1 de görüldüğü gibi en çok kallus oluşturan yaprak sayısı 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir. 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında ise az sayıda kallus oluşmuşken diğer ortamlarda oluşan kalluslara göre 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında 4 kallus oluşturan yaprak sayısından 1 tanesinde Şekil 4.1 B'deki gibi açık yeşil renkli, yumuşak yapıda ve daha büyük çaplı kallus oluşumu gözlenmiştir. 2.0 mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında ise kallus oluşturan yaprak sayısı olarak en iyi sonuç alınmışken, 9 kallus oluşturan yapraktan 1 tanesinde şekil 4.1 A'daki gibi koyu yeşil renkli, sert yapıda büyük kallus oluşumu gözlenmiştir. Diğer ortamlarda küçük çaplı kallus gelişimi gözlenmiştir. Oluşan kalluslar 2 hafta sonra kararmıştır.



**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlardaki NAA ilaveli 7.0 mg/lt BAP hormonlarının etkisiyle kallus oluşumu. A: 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından kallus görüntüsü B: 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından kallus görüntüsü

Bazal MS ortamında gelişme göstermeyen yaprak eksplantları 8 hafta sonra Tablo 3.2 deki IAA/ BAP ve IAA/ kinetin hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantlarında herhangi bir gelişim gözlenmemiştir. Böylece yaprak eksplantlarının bir kısmı Tablo 3.1'deki kallus oluşumu veren besin ortamlarında alt kültüre alınmıştır.

#### 4.1.2. İn vivo' da Gelişen Bitki Yapraklarının Kültüre Alınması 2. Denemesi

*P. pungens* hoopsi'nin yaprak eksplantları ikinci deneme olarak kültüre alınmıştır. NAA ve BAP içeren hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarda kallus oluşumu elde edildiği için aynı ortamlarda daha fazla sayıda yaprak eksplantları kullanılarak tekrarlanmıştır.

MS ortamına NAA ve BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/lt) düzeylerinde ilave edilerek hazırlanan ortamlar üzerinde yaprak eksplantları kültüre alınmış, *in vitro*'da rejenerasyon kapasiteleri çalışılmıştır. Yaklaşık 4-6 hafta sonra elde edilen sonuçlarda kallus oluşumu gözlenmiştir.

Bu ortamlarda ise yoğun bakteri bulaşması sonucu ekilen yaprak eksplant sayısı ile bulaşmamış steril yaprak eksplant sayısı arasında değişken farklılıklar elde edilmiştir.

Bu çalışma ile ilgili MS ortamının BAP ilaveli farklı konsantrasyonlarının içerikleri ve ilgili sonuçlar Tablo 4.2 de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** MS ortamının BAP ilaveli farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan *P. pungens* hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kalan Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++++	-
3.0 BAP	93	17	0					-
5.0 BAP	99	19	0					-
7.0 BAP	186	98	13.26	13				

-: kallus yok

+: az

++: orta

+++ iyi

++++: çok iyi

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı %13.26 oranla 7 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir. 7 mg/lt BAP içeren MS ortamında oluşan kallus büyüklüklerinin değerlerinde az bir gelişme gözlenmiştir. MS ortamının BAP ilaveli farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan yaprak eksplantlarının çoğunluğu, besin ortamına yerleştirildiği şekil ve renkte kalmışlardır. Buna göre 7 mg/lt BAP içeren MS ortamlarında en iyi sonuç elde edilmiştir.

*In vitro*’da rejenerasyon kapasitelerini araştırmak amacı ile kurulan bir diğer denemede ise farklı oksin ve sitokin hormonlarının farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında, yaprak eksplantlarının kültüre alınmasını takiben 3 hafta sonra değerlendirmeler yapılmıştır. Bununla birlikte yaprak eksplantlarında kallus oluşumu saptanmıştır. Çalışma ile ilgili sonuçlar Tablo 4.3’de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** MS ortamının 0.1mg/lt NAA ilaveli BAP’ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan *P. pungens* hoopsi’nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kalan Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++++	-
0.1 NAA	97	25	0					-
0.1 NAA+ 3.0 BAP	122	37	5.4	2				
0.1 NAA+ 5.0 BAP	144	41	7.3	3				
0.1 NAA+ 7.0 BAP	385	300	63.3	15	47	88	40	

-: kallus yok

+: az

++: orta

+++ : iyi

++++: çok iyi

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi en çok kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı %63.3 oranla 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiş, bunu sırasıyla %7.3 ile 0.1mg/lt NAA+ 5.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı, %5.4 ile 0.1mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamları izlemiştir. 0.1mg/lt NAA içeren MS ortamına yerleştirilen yaprak eksplantlarında ise herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

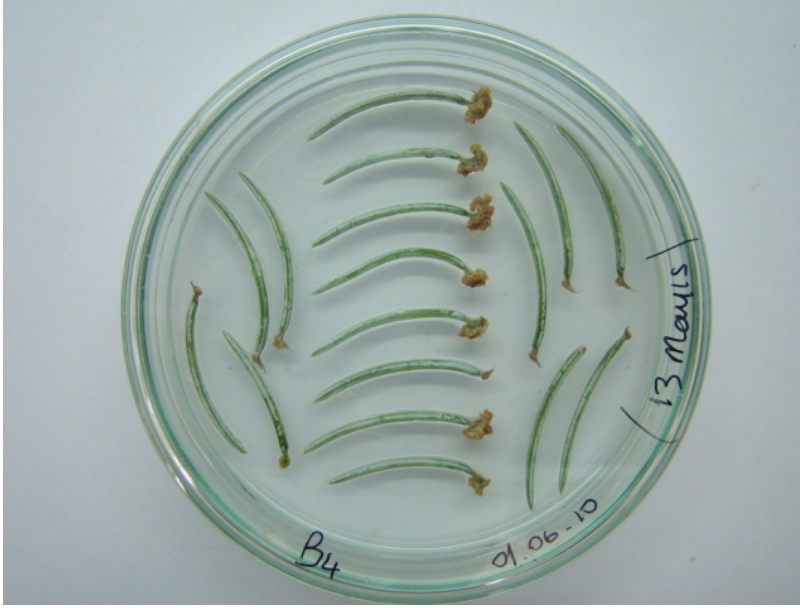
0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamına ekilen yaprak eksplantlarında 3. haftada hızlı büyüyen yapıda kallus oluşumu başlamıştır. 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı diğeri NAA ilaveli BAP'ın kullanılan tüm farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamlarına göre daha erken sürede kallus oluşturmada etkilidir.



**Şekil 4.2.** 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından kallus oluşumu

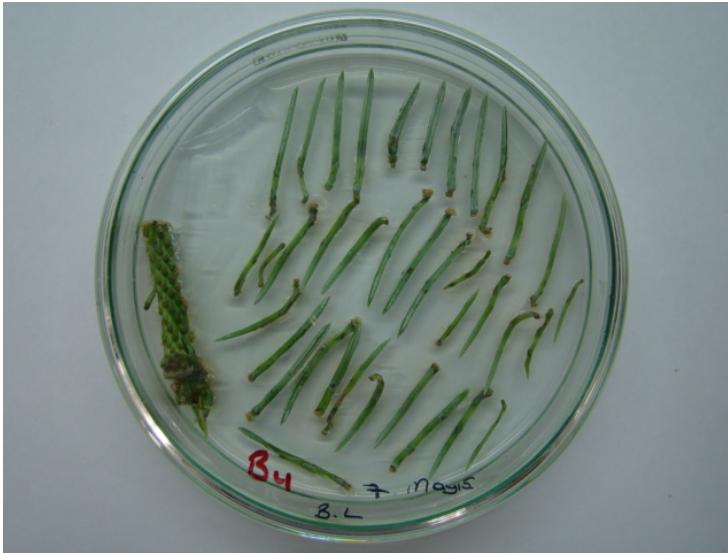
0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kalluslar Şekil 4.2'de görüldüğü gibi açık yeşil renkte, yumuşak yapıda olmuştur. Kalluslar oluşumlarının yaklaşık 2 hafta sonra kahverengileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.3).





**Şekil 4.3.** 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kallusların kahverengileşmesi

Şekil 4.4’de görüldüğü gibi 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamına yerleştirilen bir kısım yaprak eksplantlarında genişleme gözlenmiştir.



**Şekil 4.4.** 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında genişleyen yaprak eksplantları

Tablo 4.3 ‘de görüldüğü gibi *P. pungens* hoopsi bitkisinin yaprak eksplantlarının kültüre alındığı denemede en iyi kallus büyüklük değerleri 0.1 mg/lt NAA+7 mg/lt

BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Ayrıca BAP ve NAA hormonlarının ikisinin beraber kullanıldığı kombinasyonlarda BAP hormon miktarının artırılmasıyla kallus oluşturan yaprak sayısı oranında artış gözlenmiştir. 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kallus oluşturan yaprak sayısı oranında yüksek verim elde edilmişken, 0.1mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt ve 0.1mg/lt NAA+ 5.0 mg/lt BAP içeren MS ortamlarında düşük verim elde edilmiştir.

0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı yüksek oranda kallus oluşumu göstermesine rağmen ortamların hiç birinde somatik embriyogenez gerçekleşmemiştir.

**Tablo 4.4.** MS ortamının 0.5mg/lt NAA ilaveli BAP'ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan *P. pungens* hoopsi'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplat Sayısı	Kalan Yaprak Eksplnt Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++ ++	-
0.5 NAA	77	75	17.3	4	6	1	2	
0.5 NAA+ 3.0 BAP	75	72	20.8	2	5	7	1	
0.5 NAA+ 5.0 BAP	77	70	18.5	6	6	1		
0.5 NAA+ 7.0 BAP	151	118	26.2	10	7	13	1	

-: kallus yok

+: az

++: orta

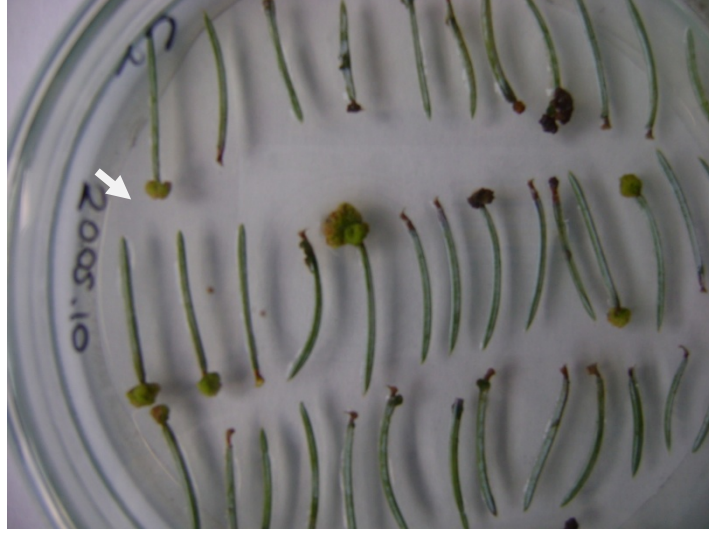
+++ : iyi

++++: çok iyi

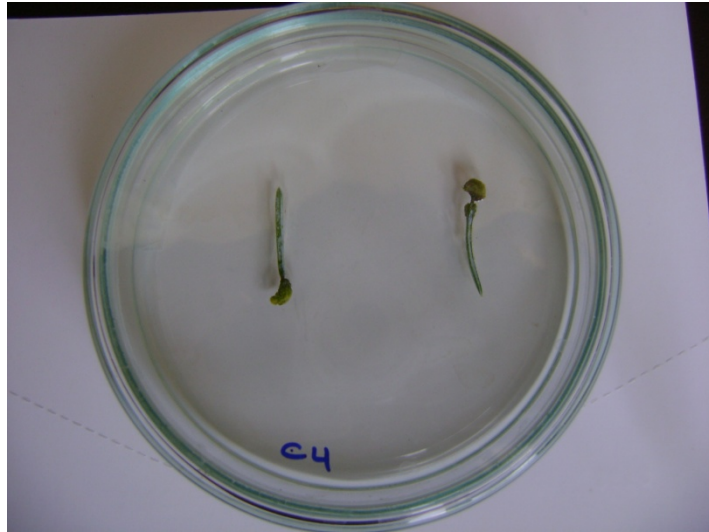
*In vitro*'da rejenerasyon kapasitelerinin araştırılması amaçlı çalışma için denenen MS ortamının 0.5mg/lt NAA ilaveli ve BAP'ın kullanılan tüm farklı konsantrasyonları içerisinde yaprak eksplantlarında en yüksek kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı görülen ortam %26.2 oranı ile 0.5mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS, ardından da %20.8 oranıyla 0.5mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamlarıdır. Bu ortamları sırasıyla %17.3 ile 0.5mg/lt NAA içeren MS ve %18.5 ile 0.5mg/lt NAA+ 5.0 mg/lt BAP içeren MS izlemektedir (Tablo 4.4).

Bu denemede gelişen kaluslar yavaş büyüyen, yeşil renkte, sert yapıda olmuştur. Kalluslar yaklaşık 2 hafta içerisinde kahverengileşip kararmıştır.

Bununla birlikte 0.5 mg/lt NAA+ 3 mg/lt BAP içeren MS ortamı ve 0.5 mg/lt NAA+ 7 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında somatik embriyogenezis elde edilmiştir. 0.5mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında 1 tane somatik embriyogenezis (Şekil 4.5), 0.5mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında ise 2 tane somatik embriyogenezis (Şekil 4.6) elde edilmiştir. 1- 2 hafta sonra herhangi bir gelişme göstermemiş ve kararmıştır.



**Şekil 4.5.** 0.5mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında somatik embriyogenezis oluşumu.



**Şekil 4.6.** 0.5mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantında somatik embriyogenezis oluşumu.

1.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı hazırlanmıştır. Bu çalışma ile ilgili sonuçlar Tablo 4.5’ de verilmiştir.

**Tablo 4.5.** 1.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan *P. pungens* hoopsi’nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kalan Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++++	-
1.0 NAA+7.0 BAP	42	25	16	2	2			

-: kallus yok      +: az      ++: orta      +++: iyi      ++++: çok iyi

1.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı %16 oranında meydana gelmiş, yerleştirilen yaprak eksplantlarında ise kallus büyüklüklerinin değerlerinde çok az bir gelişme gözlenmiştir.

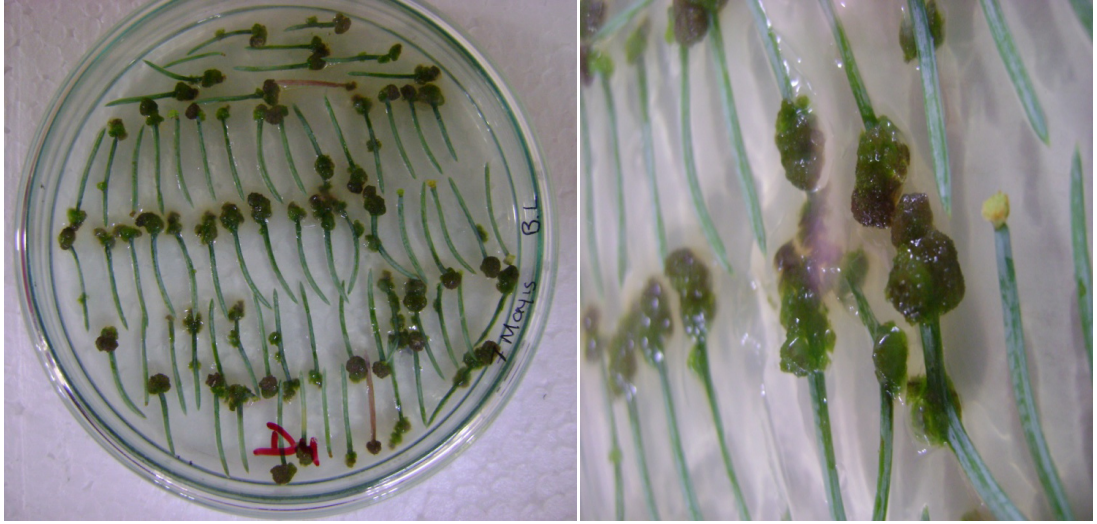
**Tablo 4.6.** MS ortamının 2.0 mg/lt NAA ilaveli BAP’ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında kültüre alınan *P. pungens* hoopsi’nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kalan Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++++	-
2.0 NAA	63	57	5.2	1	1	1		
2.0 NAA+ 3.0 BAP	60	56	3.5		1	1		
2.0 NAA+ 5.0 BAP	55	46	0					-
2.0 NAA+ 7.0 BAP	222	210	43.3	11	15	33	32	

-: kallus yok      +: az      ++: orta      +++: iyi      ++++: çok iyi

Kültürün 4. haftalarında MS ortamının 2.0 mg/lt NAA ilaveli BAP’ın kullanılan farklı konsantrasyonlarındaki ortamlarda yaprak eksplantlarındaki kallus durumu

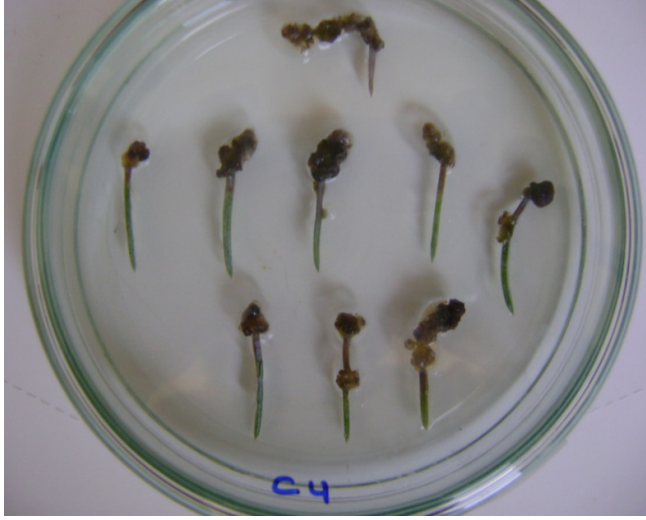
Tablo 4.6’da verilmiştir. Şekil 4.7’ye göre 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında 4. haftada koyu yeşil renkte, sert yapılı kallus gözlenmiştir. Kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı % 43.3 ile 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişenlerde en yüksek verim elde edilmiştir. 2.0 mg/lt NAA+ 5.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında hiçbir gelişim gözlenmemiş, 2.0 mg/lt NAA içeren MS ortamında %5.2 ve 2.0 mg/lt NAA+ 3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında %3.5 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir.



**Şekil 4.7.** 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında kallus oluşumu

Yapılan MS ortamının NAA ilaveli BAP’ın kullanılan farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarındaki ortamlarda en çok kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı %63.3 oranla 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiş ve bunu %43.3 oranı ile 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı izlemiştir. Fakat 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kallusların çoğunluğu daha büyük çaplı (çok iyi gelişmiş), koyu yeşil renkte ve sert yapıda oluşmuştur (Şekil 4.7). 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kalus oluşumları 3. haftada oluşmaya başlamışken 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında 4. haftada kallus oluşmaya başlamıştır. Diğer ortamlarda kallus oluşturan yaprak sayıları oranı düşük elde edilmiş, yaprak eksplantlarının çoğunluğu besin ortamına yerleştirildiği şekil ve renkte kalmışlardır.

Yaprak eksplantları bistüri ile çizilip yaralı doku oluşturularak kallus oluşturmak istenmiştir. Kallus oluşumu yaprak eksplantlarının besi ortamına değdiği yerde yaralı bölgeden başlayarak yayılmıştır (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** 0.5mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında yaralı doku oluşturularak elde edilen kallus oluşumu

Yapılan istatistiki analiz sonucunda (Tablo 4.7) en iyi sonuç alınmış 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı diğer NAA ilaveli ortamda BAP'ın kullanılan tüm farklı kombinasyon ve konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamının kallus oluşturan yaprak sayılarının kallus oluşturma etkisi ( $p \leq 0.05$  göre) önemli çıkmıştır. Fakat 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı karşılaştırma sonucunda 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamına göre kallus oluşturma etkisi önemli çıkmamıştır.

**Tablo 4.7.** 0.1mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamı diğer NAA ilaveli ortamda BAP'ın kullanılan tüm farklı kombinasyon ve konsantrasyonları ile karşılaştırılması ve ortamların kallus oluşumu üzerine etkisi

<b>A (mg/lt)</b>	<b>D (mg/lt)</b>	<b>K</b>	<b>A</b>
0.1 NAA+ 7.0 BAP %63.3	3.0 BAP	%0	≤ 0.002
	5.0 BAP	%0	≤ 0.002
	7.0 BAP	% 13.26	≤ 0.004
	0.1 NAA	%0	≤ 0.002
	0.1 NAA+ 3.0 BAP	%5.4	≤ 0.003
	0.1 NAA+ 5.0 BAP	%7.3	≤ 0.003
	0.5 NAA	%17.3	≤ 0.004
	0.5 NAA+ 3.0 BAP	%20.8	≤ 0.005
	0.5 NAA+ 5.0 BAP	%18.5	≤ 0.004
	0.5 NAA+ 7.0 BAP	%26.2	≤ 0.008
	1.0 NAA+7.0 BAP	%16	≤ 0.008
	2.0 NAA	%5.2	≤ 0.003
	2.0 NAA+ 3.0 BAP	%3.5	≤ 0.003
	2.0 NAA+ 5.0 BAP	%0	≤ 0.002
2.0 NAA+ 7.0 BAP	%43.3	≥ <b>0.08</b>	

E: En iyi kallus oranı veren ortam

D: Diğer kullanılan ortamlar

K: Yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı

A: En iyi kallus oranı elde edilen ortamın diğer ortamlarla istatistiksel olarak karşılaştırılarak hesaplanan sonuçlar

Kültürün 8. haftasından itibaren besin ortamlarındaki yaprak eksplantlarının büyük bir çoğunluğunda oluşan kallusların somatik embriyo oluşturmada renkleri koyulaşmıştır. Elde edilen kallusların kararmaması için farklı kombinasyon ve konsantrasyonlar içeren MS ortamları hazırlanarak 2.0 mg/lt NAA+ 7.0 mg/lt BAP

içeren MS ortamındaki kallusların bir kısmı Tablo 4.8'deki ortamlara yerleştirilmiştir. Yapılan çalışmada kalluslarda herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Kalluslar 1-2 hafta sonra kararmıştır (Şekil 4.9).

**Tablo 4.8.** MS ortamına ilave edilen bitki düzenleyicilerinin içerikleri ve kallus oluşturan yapraklardan ekilen yaprak sayısı

<b>Besin Ortamı Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)</b>	<b>Ekilen yaprak sayısı</b>
MS+%2 sakkaroz+ %5 gliserol	5
MS+%2 sakkaroz+ %5 gliserol + 0.1 NAA+ 7.0 BAP	6
MS+%2 sakkaroz+ %3 gliserol	5
MS+%2 sakkaroz+ %3 gliserol + 0.1 NAA+ 7.0 BAP	5
MS	4
MS+%2 sakkaroz	3
MS+%2 sakkaroz +11 2,4-D +2 Kinetin	4
MS+%2 sakkaroz +5 2,4-D + 1 Kinetin	4
MS+%2 sakkaroz +0.5 K+ 0.5 IBA	6
MS+%2 sakkaroz+0.5 K+ 1.0 NAA	6
MS+%2 sakkaroz+2 BAP+0.0 1 2.4D	6
MS+%2 sakkaroz+1mg/lt Phenyalanin	3
MS+%2 sakkaroz+1mg/lt tryptophan	3
MS+%2 sakkaroz+1 mg/lt tyrosin	3





**Şekil 4.9.** %2 sakkaroz+1 mg/lt tyrosin içeren MS ortamında kültüre alınan kallusların kararması

#### **4.2. *P. pungens glauca* ve *P. pungens* sp. Yaprak Eksplantlarının Kültüre Alınması**

*P. pungens glauca* ve *P.pungens* sp. yaprak eksplantları ilk deneme olarak bazal MS ortamında kültüre alınmış, *in vitro*'da rejenerasyon kapasitelerinin araştırılması çalışılmıştır. 8 hafta sonunda MS ortamında gelişme göstermeyen yaprak eksplantları Tablo 3.1'de verilen (0.0, 0.1, 0.5,2.0,3.0,5.0,7.0 mg/lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmış fakat hiçbir gelişme gözlenmemiştir.

*P. pungens glauca* ve *Picea pungens* sp. yaprak eksplantları ikinci deneme olarak BAP ve NAA hormon içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür ortamının içerikleri ve ilgili sonuçlar Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.9.** (0.1, 0.5, 3.0, 7.0 mg/lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *P. pungens glauca*'nın yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kalan Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++++	-
0.1 NAA+7.0 BAP	24	16	18.7	3				
0.5NAA+3.0 BAP	37	32	28.1	2	5	2		

-: kallus yok      +: az      ++: orta      +++: iyi      ++++: çok iyi

Tablo 4.9'da görüldüğü gibi kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı %28.1 oranla 0.5 mg/lt NAA+3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında ve % 18.7 oranla 0.1 mg/lt NAA+7.0mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Ortamlara yerleştirilen yaprak eksplantlarındaki kallus oluşumları 5. haftada gözlenmiş ve oluşan kalluslar 2 hafta sonra kararmıştır.

**Tablo 4.10.** (0.1,2.0,3.0,7.0 mg/lt) düzeylerinde alınan NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *P. pungens sp.*'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı ve kallus büyüklüklerinin değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/lt)	Ekilen Yaprak Eksplant Sayısı	Kalan Yaprak Eksplant Sayısı	Kallus Oranı (%)	Kallus				
				+	++	+++	++++	-
0.1 NAA+7.0 BAP	20	12	0					-
2.0 NAA+3.0 BAP	50	35	8.5	2	1			

-: kallus yok      +: az      ++: orta      +++: iyi      ++++: çok iyi

0.1 mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında hiçbir gelişim gözlenmemiş ve 2.0 mg/lt NAA+3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında %8.5 oranında kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı gözlenmiştir. Kallus oluşumları 5. haftada gözlenmiş ve oluşan kalluslar 2 hafta sonra kararmıştır. kallus büyüklüklerinin değerlerinde iyi bir gelişim gözlenmemiş ve verimli bir sonuç elde edilmemiştir.

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızlı, klonal çoğaltılmasında somatik embriyogenesis önemli bir potansiyele sahiptir. Bu yöntemde tek bir bitki parçasından, teorik olarak sınırsız sayıda embriyo üretmek mümkündür (Babaoğlu vd., 2001).

Bu tez kapsamında, peyzaj değeri yüksek ithal türlerin başında gelen *P. pungens* spp. bitkilerinin *in vitro*'da rejenerasyon kapasiteleri araştırılmıştır. *P. pungens* hoopsi bitkisinin yaprak eksplantları kullanılarak yapılan çalışmada kallus ve somatik embriyogenesis elde edilmiştir. *P. pungens glauca* ve *P. pungens* sp. bitkilerinin yaprak eksplantlarında kallus oluşumu saptanmıştır.

Tezin amaçları doğrultusunda yapılan çalışmalarda *P. pungens* hoopsi bitkisinde kallus gelişimine MS ortamının NAA ilaveli BAP'ın kullanılan farklı konsantrasyonlarında rastlanılmıştır.

Yaprak eksplantlarında en yüksek kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı en fazla 0.1mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında sağlanmıştır. Bu ortamdaki kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı %63.3'tür. Bu ortamı sırasıyla %43.3 oranı ile 2.0 mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP ve %26.2 oranı ile 0.5mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamları izlemiştir. En iyi sonuçlar 7.0 mg/lt BAP ilaveli NAA'in farklı konsantrasyonlarında alınmıştır. Böylece 7.0 mg/lt BAP içeren sitokin miktarı kallus oluşumu için en uygun konsantrasyondur denilebilir.

0.1mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamına ekilen yaprak eksplantları 3. haftada hızlı büyüyen, açık yeşil renkte, yumuşak yapıda kallus oluşturmaya başlamışken 2.0 mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında 4. haftada yavaş gelişen, koyu yeşil renkte ve sert yapıda kallus oluşmuştur. 0.1mg/lt NAA+7.0 mg/lt

BAP içeren MS ortamında diğer ortamlara göre daha kısa sürede kallus oluşumu ve en yüksek kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı gözlemiştir. 2.0 mg/lt NAA+7.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gelişen kallusların çoğunluğunun kallus büyüklüklerinin değerleri ise diğer ortamlardaki kalluslara oranla daha büyüktür.

Bununla birlikte 0.5 mg/lt NAA+ 3 mg/lt BAP içeren MS ortamı ve 0.5 mg/lt NAA+ 7 mg/lt BAP içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında somatik embriyogenezis elde edilmiştir.0.5 mg/lt NAA+ 3 mg/lt BAP içeren MS ortamında 1 tane somatik embriyogenezis, 0.5 mg/lt NAA+ 7 mg/lt BAP içeren MS ortamında ise 2 tane somatik embriyogenezis elde edilmiştir.1-2 hafta sonra herhangi bir gelişme göstermemiş ve kararmıştır.

Yaklaşık 4-6 hafta sonunda oluşan kallusların embriyogenik olma ihtimali olmakla birlikte, 2 hafta sonunda oluşan kallusların çoğunluğu kahverengine dönüşüp kararmıştır.

Yaprak ve gövde kalluslarından önemli miktarda yeşile doğru gelişim, vasküler farklılaşma ve yalancı tomurcuk gelişmeye eğilimli olan bir organogenesis potansiyelinin çok sınırlı olduğu rapor edilmiştir. Ancak sitokininlerin yükselen konsantrasyonlarının yeşilimsi-sert kallus teşvikinde olumlu sonuç verdiği bildirilmiştir (Manadhar and Gresshoff, 1980).

Pinaceae familyasının somatik embriyogenesisine karşı zor tepki gösterdiği bilinmektedir.

*Picea pungens* hoopsi bitkisinin Mayıs-Haziran aylarında alınan yaprak eksplantlarından kallus ve somatik embriyogenezis oluşumu elde edilmiştir. Birinci yıl yapılan ilk demede bitki materyali mayıs ayının sonunda alınmış ve kallus oluşumu 6. haftada gözlenmiş, ikinci yıl yapılan ikinci denemede mayıs ayının başında alınan bitkilerde kallus oluşumu 3. haftada gözlenmiştir. İkinci yılın denemelerinde hem daha erken kallus oluşumu gözlenmiş hem de oluşan kallusların büyüklüğü ve gelişimleri daha iyi olmuştur, ancak haziran ayının sonuna doğru alınan yaşlı yapraklardan kallus indüksiyonu da çok zorlaşmaktadır. Halbuki

Manadhar ve Gresshoff (1980) kallus indüklenmesinin yaprak yaşı ile ilgili olmadığını bildirmiştir.

*P. pungens glauca* bitkisinde en iyi kallus oluşturan yaprak sayılarının oranı 0.5 mg/lt NAA+3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında meydana gelmiştir. *P. pungens* sp. bitkisinde ise kallus oluşumu sadece 2.0 mg/lt NAA+3.0 mg/lt BAP içeren MS ortamında gözlenmiş ve kallus gelişimlerinde verimli bir sonuç elde edilmemiştir.

İthal edilen mavi ladinin *in vitro* klonal çoğaltımı çok zorluklar çıkarmaktadır. Bundan sonra yapılacak somatik embriyogenezis çalışmaları için bu besin ortamlarına, diğer Pinaceae familyasında kullanılmış spesifik bazı bitki düzenleyicilerinin ve kimyasalların ilave edilerek denenmesi önerilebilir.

## KAYNAKLAR

A. Manandhar and P. M. Gresshoff, 1980. *Blue spruce (Picea pungens) tissue and cell culture* **29**: 175-182

Allen, R. M. (1960) Changes in acid growth substances in terminal buds of Longleaf pine saplings during the breaking of winter dormancy, *Physiol. Plant.* **13**: 555-558.

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (2001). Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. M. Babaoğlu., M. Yorgancılar., M.A. Akbudak (Eds.), *Bitki Biyoteknolojisi-1-Doku kültürü ve uygulamaları* içinde (s.1-22). Konya: Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları.

Becwar, M. R., Nagmani. S. R. Wann, 1990. *Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (Pinus taeda)*. *Canadian Journal of Forest Research* **20** (6): 810 -817

Garcia –Ferriz L, L. Serrano and A. Pardo, 1994. In vitro shoot organogenesis from excise immature cotyledons and microcuttings production in stone pine. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* **36** (1): 135-140

Haggman, H., A. Jokela, J. Krajnakova, A. Kauppi, K. Niemi, T. Aronen, 1999. Somatic embryogenesis of scots pine: cold treatment, characteristics of explant affecting induction. *Journal of Experimental Botany* **50** (431): 1769- 1778

Hazubska – Przybyl T.200 8. *Somatic Embryogenesis of Selected Spruce Species (Picea abies, P. omorica, P. pungens ‘glauca’ and P. breweriana)* **3**: 189-199.

J. C. Afele, 1992. *Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (Picea pungens Engelman)*.

Lelu, M. A., C. Bastein, A. Drugeault, M. L. Gouez, K. Klimaszewska. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus*

*pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia plantarum* 10 5 (4): 719-728.

Mac An t-Saoir, S.; O'Brien, J. and Selby, C. (1992) The Effect of Explant Type on the Establishment of Sitka Spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr. in Culture, *Annals of Botany* 69,161-165

Malabadi, R. B. and C. Hiranjit. 2002. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord). *Applied biological Research* 4 (1/2): 1-10.

Pulman, G. S. J. Mein, S. Johnson and Y. Zhank. 2004. Giberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep.* 23: 596-60 5.

Salajova, T.; J. Salaj, A. Kormutak. 1999. Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science* 145: 33-40.

Snow, A. G. and May, C. (1962) Rooting of Virginia Pine cuttings, *J. For.* 60 : 257-258.

Tang, W. and Z. Guo. 2000. In vitro propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33: 25-31.

Tang, W., OuYang Fan, Z. Guo. 1997. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliotti* L.). *Journal of Plant Resources and environment* 6 (2): 8-11.

Valdes, A. E., R. J. Ordas, B. Fernandez, and M. L. Centeno. 2001. Relationships between hormonal contents and organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 377-384.

Yahyaoglu, Z. (1980) Doğu Ladini (*Picea orientalis* (L.) Link'in Vejetatif Yolla (Çelikle) Üretilmesi Olanakları Üzerine Araştırmalar, K.T.Ü. Orm. Fak. (Yayınlanmamış Doçentlik Tezi), Trabzon

[http://tr.wikipedia.org/wiki/Mavi\\_ladin](http://tr.wikipedia.org/wiki/Mavi_ladin)

<http://www.forumpaylas.net/ziraat-tarim-hayvancilik/34377-bitkisel-hormonlar-bgd-bitki-gelisim-duzenleyiciler.html>

<http://www.maviladinuretimi.com/mavi-ladinin-picea-pungens-engelm-asi-ile-uretimi-uzerine-arastirmalar.html>

[http://www.maviladinfidan.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=50](http://www.maviladinfidan.com/index.php?option=com_content&task=view&id=50)



## EKLER

### MS Ortamının Kimyasal Bileşenleri

Kimyasal	mg/l
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.0 2
MnSO. H <sub>2</sub> O	16.9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0 25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0 25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3
Thiamine	0.1
Pyridoksin HCL	0.5
Nicotinic HCL	0.5
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Sakkaroz	20 g/l
Agar	5-7 g/l