

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNDOL-3-ASETİK ASİT VE KİNETİN'İN
Aeonium haworthii Webb&Berthel (L.1841)
BİTKİSİNİN *in vitro*
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NECİP NALÇACI
KASIM 2007**

**İNDOL-3-ASETİK ASİT VE KİNETİN'İN
Aeonium haworthii Webb&Berthel (L.1841)
BİTKİSİNİN *in vitro* GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
M.Sc. Tezi**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Berna BAŞ**

**Necip NALÇACI
Kasım 2007**

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

İndol-3-Asetik Asit ve Kinetin'in
Aeonium haworthii Webb&Berthel (L.1841)
Bitkisinin *in vitro* Gelişimi Üzerine Etkileri
Necip NALÇACI
Kasım 2007

Prof. Dr. Sadettin ÖZYAZICI

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yard. Doç. Dr. Berna BAŞ

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Yrd. Doç. Dr. Erdoğan ÇİÇEK

ÖZET

İndol-3-Asetik Asit ve Kinetin'in
Aeonium haworthii Webb & Berthel (L.1841)
Bitkisinin *in vitro* Gelişimi Üzerine Etkileri

NALÇACI, Necip
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Berna BAŞ
Kasım 2007, 30 sayfa

Süs bitkileri olarak dekoratif amaçlı kullanılan bazı sukulent bitki türlerinin *in vitro* klonal çoğaltım olanakları bilinmekle beraber, *Aeonium haworthii* türüne ait henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, farklı hormonların tek olarak ve ikili kombinasyonlar şeklinde yapılan uygulamalarında, *A. haworthii* bitkisinin kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, yetişkin bitki üzerinden alınan sürgün ve yapraklar yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra IAA (İndol-3-Asetik asit) ve Kinetin (6-Furfurilaminopürin) hormonlarını ve %3 sakkaroz içeren bazal MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamlarına ekilmiş ve daha sonra gelişmeleri izlenmiştir.

Yapılan periyodik takipler sonucunda, IAA ve Kinetin'in düşük konsantrasyonlarını içeren ortamların, *A. haworthii* bitkisinde daha etkili bir gelişmeye neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca, ekimi yapılan bitki kısımlarından en iyi sürgün verme ve gelişme oranını, esas olarak tepe noktaları ve onları takiben de genç yapraklar göstermiştir.

Elde edilen bitkilerin 1:1:1 oranlarında kırmızı toprak:kum:torf karışımı içeren toprağa aktarılması sonrasında, bunların % 80 oranında adaptasyon ve iki hafta içinde başlangıç büyüklüğüne göre % 100 gelişme gösterdikleri gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Aeonium haworthii*, doku kültürü, klonal çoğaltım, IAA (İndol-3-Asetik asit), Kinetin (6-Furfurilaminopürin), Murashige ve Skoog (MS) ortamı.

ABSTRACT

Effects of Indol-3-Acetic Acid and Kinetin on *in vitro* Growth of
Aeonium haworthii Webb & Berthel (L.1841) Plant

NALÇACI, Necip

M.Sc. in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Berna BAŞ

Nov 2007, 30 pages

Although possibilities of *in vitro* clonal propagation of some succulent plant species which are used for decoration as ornamental plants are known, there has been yet no study reported about *Aeonium haworthii* species. In this study, the effect of hormones which were applied alone and in different dual combinations at various concentrations on root length, leaf length and leaf number of *A. haworthii* was determined. With this purpose, shoots and leaves from mature plants investigated were cultured on basal media of MS (Murashige and Skoog, 1962) containing IAA (Indole-3-Acetic acid), Kinetin (6-Furfurylaminopurine) and 3% sucrose, after surface-sterilization and then their growth was observed.

According to the results from the periodical followings, the media containing low concentrations of IAA and Kinetin caused more distinctive and dominant growth for *Aeonium haworthii* plant. Additionally, among the plant parts cultured, mainly apexes and later fresh leaves showed the best young auxiliary shoots and growth rate.

After the plants used were transferred to the soil which was composed of red soil: sand:peat mixture with 1:1:1 ratios of each it was observed that they showed 80 % adaptation and 100 % growth compared to their initial size in two weeks.

Keywords: *Aeonium haworthii*, tissue culture, clonal propagation, IAA (Indole-3-Acetic acid), Kinetin (6-Furfurylaminopurine), Murashige & Skoog (MS) medium.

TEŞEKKÜR

Bölümün olanaklarından yararlanmamı sağlayan, sayın Bölüm Başkanım Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER'e; tez konumu belirleyerek çalışmam süresince beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım, sayın Yard. Doç. Dr. Berna BAŞ'a; her zaman, her soruma ve sorunuma çözüm bulan ve eğitimin, kişinin aklında yeni fikirler ve merak oluşturmak olduğuna inanan, sayın Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a; değerli bilgilerinden hiçbir zaman beni mahrum etmeyen, sayın Doç. Dr. Canan CAN'a; engin bilgileriyle her zaman bizi aydınlatan ve tez üzerinde tartışmasız önemli emekleri bulunan, sayın Doç. Dr. Yusuf ZEYNALOV'a; kıymetli sohbetleriyle ve çalışkanlığıyla örnek teşkil eden, sayın Yard. Doç. Dr. M. İsmail VAROL'a, bu tezin süresince yaşantıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezin yazım aşamasında her zaman yanımda olan, işlerini aksatmak pahasına yardımlarını esirgemeyen, bana istatistiği yeniden öğreten ve tezin bütün istatistiksel verilerini düzenleyen, tezin tüm yazım aşamalarını yakından takip edip, bana pek çok konuda yardım eden, Uludağ Üniversitesi Bursa Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Dr. Nihal TÜRKMEN'e özellikle teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarımın başından sonuna kadar her zaman yanımda ve bana bütün sorunların üstesinden gelmekte yardımcı olan, sevgili eşim Seval NALÇACI, çocuklarım A. Doğa ve Evrim NALÇACI'ya, sabır ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Rakamlarla ifadesi mümkün olmayan gen havuzundan, doğal seçim denizine beni bir damla olarak ekleyerek, yaşam denilen mucizevi gerçekliği bana layık gören, ancak kendisi bu günleri göremeden aramızdan ayrılan sevgili annem merhum Şükran NALÇACI ve sevgili babam Hacı Ahmet NALÇACI'ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Her zaman zekasıyla hayranlık uyandıran ve yaşam boyu karşılaştığım her türlü güçlükte yardımcı olan sevgili ağabeyim Engin NALÇACI ve her zaman sevgisi ve şefkatiyle sarmalayarak beni mutlu eden sevgili ablam Belgin NALÇACI'ya, bana kardeş olmanın hazzını tattırdıkları için teşekkür ederim.

Zor anlarımda daima yanımda bulduğum, çocukluk günlerimin acı, tatlı bütün anılarının baş aktörü, dostluğunun karşılığını asla ödeyemeyeceğim, sevgili can dostum Ahmet Güney ÖZDİNÇ'e, yaşam boyu devam eden dostluğumuz adına şükranlarımı sunarım.

Bana çalışmanın ne olduğunu öğreten ve bu günlere gelmeme vesile olan, asla unutmadığım ilk öğretmenim Sevim ATALAY'a teşekkür ederim.

Çocuğunun büyüdüğünü göremeden yakın zaman önce aramızdan ayrılan, engin bilgisini asla esirgemeyerek bana hayatı öğreten, her zaman yüreğinin sıcaklığına hasret kalacağım sevgili dostum merhum Bülent UYAROĞLU'na, bana kazandırdıklarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Biyoloji biliminin derinliklerinden gelen sesiyle, sıcak ve samimi kişiliğiyle hep yanımda olmuş, ismi Türkiye’de biyoloji ile özdeşleşmiş, hocaların hocası sayın Prof. Dr. Ali DEMİRİSOY’a; lisans eğitimim boyunca bana verdiği ders ve nasihatleriyle beni, onun yetiştirdiği bir biyolog olmakla gururlandırdığı için en derin saygılarımı sunarım.

Beni hep etkileyen, öğrencisi olmaktan daima onur ve gurur duyduğum, yine hocaların hocası; sorduğu sorularla bütün jürilerin en korkulan ve aranan ismi, eşsiz bilim adamı, sayın hocam Prof. Dr. M. Nihat ŞİŞLİ’ye, örnek bilim adamı ve eşsiz bir öğretmen olmasından dolayı teşekkür ederim.

Sevgili dostlarım Dr. Ergi Deniz ÖZSOY ve Yard. Doç. Dr. Mehmet DEMİRER’e de hep yanımda ve yardımcı olmalarından, engin bilgi kaynağı olarak etraflarına hep ışık saçmalarından, bana hep azim ve çalışkanlıklarıyla örnek olmalarından ve bilhassa; zekanın kıymetinin canlı örnekleri olmalarından dolayı şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2: KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
BÖLÜM 3: MATERYAL VE YÖNTEM.....	8
3.1. Materyal.....	8
3.2. Yöntem.....	9
3.2.1. Bitki besi yerlerinin hazırlanması.....	9
3.2.2. Bitki örneklerinin hazırlanması.....	10
3.2.3. Bitkilerin besi yerlerine ekilmesi.....	10
3.2.4. Bitki örneklerinin saklanması.....	10
3.2.5. Bitkilerin toprağa adaptasyonu.....	10
3.3. Verilerin Değerlendirilmesi.....	11
3.4. İstatistiksel Analiz.....	11
4. BULGULAR.....	12
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	20
6. KAYNAKLAR.....	26
EK 1.	29
EK 2. A.....	30
EK 2. B.....	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

	sayfa
Şekil 1.1 <i>A. haworthii</i> bitkisinin a) genel ve b) çiçekli görünümü.....	3
Şekil 4.1 <i>A. haworthii</i> bitkisinin a, b, c, d, i) 1I1K; e, i) 1I10K; f) 10I10K; g,	13
h) 10K ortamlarında gösterdiği 60 günlük gelişim.....	14
Şekil 4.2 Toprak adaptasyonundan önce tüpte geliştirme çalışması.....	18
Şekil 4.3 Toprağa aktarma aşamasında kökleri agardan temizlenmiş bitkiler	18
Şekil 4.4 Toprağa adaptasyonu sağlanmış bitkiler.....	19
Şekil 5.1 Kök boyunun hormon tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 60	
günlük değişimi.....	21
Şekil 5.2 Yaprak boyunun hormon tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 60	
günlük değişimi.....	22
Şekil 5.3 Yaprak sayısının hormon tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 60	
günlük değişimi.....	22

TABLolar LİSTESİ

	sayfa
Tablo 1.1 Türkiye'nin Süs Bitkileri İthalatı.....	2
Tablo 1.2 Türkiye Süs Bitkileri İhracatının Mal Gruplarına Göre Dağılıımı....	2
Tablo 3.1 Denemelerde kullanılan hormonlar ve kombinasyonları.....	9
Tablo 4.1 Kök boyu (mm), yaprak boyu (mm) ve yaprak sayısının (tane) hormon kombinasyonuna (mg/ml) göre değişimi.....	15
Tablo 4.2 Kök boyunun (mm) hormon miktarı (mg/ml) ve hormon tipine göre değişimi.....	15
Tablo 4.3 Yaprak boyunun (mm) hormon miktarı (mg/ml) ve hormon tipine göre değişimi.....	15
Tablo 4.4 Yaprak sayısının (tane) hormon miktarı (mg/ml) ve hormon tipine göre değişimi.....	16
Tablo 4.5 Kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısının hormon kombinasyo- nuna göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	16
Tablo 4.6 Kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısının IAA için hormon çeşidine göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	17
Tablo 4.7 Kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısının Kinetin için hormon çeşidine göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	17

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<i>A. haworthii</i>	<i>Aeonium haworthii</i> Webb & Berthelot (L.1841)
ABD.....	Ana Bilim Dalı; Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA.....	tek veya iki yönlü varyans analizi yöntemi; (Analysis of Variance between groups)
BAP.....	6-Benzilaminopürin
%.....	yüzde
+.....	ve; artı; toplam
±.....	ve/veya
°C.....	santigrat derece
µm.....	mikrometre
2,4,5-T.....	2,4,5-Triklorofenoksiasetik asit
2,4-D.....	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
dH ₂ O.....	distile su
F.....	F (Fisher) değeri
g.....	gram
GA ₃	Gibberellik asit
GLM.....	genel linear model
IAA.....	İndol-3-asetik asit
IBA.....	İndol-3-bütirik asit
Kin.....	Kinetin
Kinetin.....	6-Furfurilaminopürin
KO.....	kareler ortalaması
l.....	litre
mg.....	miligram
ml.....	mililitre
mm.....	milimetre
MS.....	Murashige ve Skoog vd. (1962) besi ortamı
Na ₂ HClO ₃	sodyum hipoklorit; çamaşır suyu
NAA.....	Naftalen asetik asit
p<0.05.....	olasılığın istatistiksel önem ya da anlam derecesi
pH.....	hidrojen iyonları konsantrasyonu
Pikloram.....	4-amino-3,5,6-Trikloropikolinik asit
SD.....	serbestlik derecesi
SPSS.....	istatistiksel analiz programı; (Statistical Package for the Social Sciences)
vb.....	ve benzerleri
vd.....	ve diğerleri
a/h.....	ağırlığın hacme oranı

1. GİRİŞ

Sukulent bitkiler, çelikleme olarak isimlendirilen genellikle gövde parçalarının doğrudan toprağa dikilmesi yoluyla, bir kısmı da tohumla üretilmektedir. Ancak, bu yöntemlerle üretim, her zaman hızlı, ekonomik ve kitle halinde üretim için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, günümüzde bir çok bitki türünün üretiminde, alternatif bir yöntem olarak doku kültürü üzerinde yoğunlaşmaya başlanmıştır. Bu amaçla, çeşitli bitki türleri için farklı doku kültürü yöntemleri denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, sağlıklı ve istenilen özelliklere sahip bitki yetiştirilmesinin sağlanması amacıyla da doku kültürü çalışmalarına hız verilmektedir.

Bitki biyoteknolojisini oluşturan iki unsur bitki doku kültürü ve bitki genetik mühendisliğidir. Her ikisi de ticarî, hobi ve araştırma bazında alışılmış çalışma yöntemi olarak uygulanmaktadır. Bitkilerin hücre, doku veya organlarının laboratuvarında, kontrollü ve steril koşullarda, çeşitli besi ortamlarında kültüre alınması; onlardan yeni hücreler, dokular, organlar, yeni bitkiler veya çeşitli metabolitler gibi bitkisel ürünlerin üretilmesi işlemlerinin tümü, bitki doku kültürü olarak adlandırılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001). Genellikle bitkilerin yaprak, gövde veya köklerinden alınan parçalarındaki somatik hücrelerin, özel besi ortamlarında kültüre alınması yoluyla uygulanır. En sık kullanılan uygulama, somatik rejenerasyon adı verilen, somatik bitki veya bitkiler üretim metodudur. Ayrıca, tek başına hücreler veya organlar çoğaltılabilmekte ve çeşitli amaçlar için kullanılabilir. Bu işlem aynı zamanda, bitkilerin amaca uygun olarak genetik yönden değiştirilmesine de olanak sağlamaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak da bitki doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle de genetik ıslah çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde de çeşitli doku kültürü yöntemleri uygulanmaktadır (Kocaçalışkan, 2002).

Türkiye, doğal kaynakları ve zengin florasının yanında, Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinin uygun iklim yapısı nedeniyle süs bitkisi üretiminde yeterli bir görünüm sunmasına karşılık, ihracattan daha fazla ithalat yapmaktadır (Tablo 1.1, Tablo 1.2). Dünya florasında çok çeşitli ve dikkat çekici süs bitkileri mevcut bulunmakta ve bunların büyük çoğunluğu, genellikle kaynağındaki üreticilerden elde edilebilmektedir. Bu tarz bir dışa bağımlılığı ortadan kaldırmak için, Türkiye’de de çeşitli üretim metotları denenmekte olup, doku kültürü çalışmaları da bu metotlar arasında yer almaktadır.

Tablo 1.1 Türkiye’nin Süs Bitkileri İthalatı*

Ürün Tipi	2004 Yılı Gerçekleşen İthalat(ABD Doları)	2005 Yılı İlk Altı Ayı Gerçekleşen İthalat(ABD Doları)
Doğal Çiçek Soğanları	1.520.813	607.179
Canlı Bitkiler	21.261.739	18.547.405
Kesme Çiçekler	308.010	237.534
Yosunlar Ve Ağaç Dalları	413.958	220.096
Toplam	23.604.520	19.612.214

* Dış Ticaret Müsteşarlığı Bilgi Sistemi (Anonim, 2006)

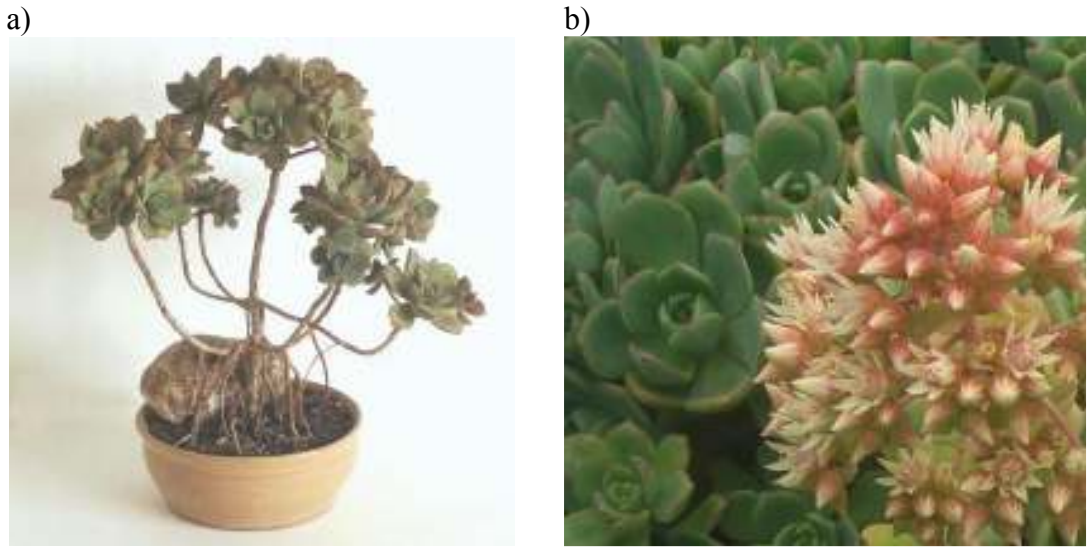
Tablo 1.2 Türkiye Süs Bitkileri İhracatının Mal Gruplarına Göre Dağılımı*

Mal Grubu	Değer (ABD Doları)						
	Yıllar	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Doğal Çiçek Soğanları		1.319.008	2.504.244	2.820.798	2.837.651	2.747.802	2.645.506
Canlı Bitkiler		1.985.236	2.815.861	4.067.724	6.329.616	5.671.929	7.769.165
Kesme Çiçekler		7.750.215	11.429.727	14.918.053	20.170.343	20.397.089	23.437.593
Yosunlar ve Ağaç Dalları		3.227.529	5.549.567	9.679.012	8.410.453	7.412.887	6.453.097
Toplam		14.281.988	22.299.399	31.485.587	37.748.063	36.229.707	40.305.361

* Dış Ticaret Müsteşarlığı Bilgi Sistemi (Anonim, 2006)

Aeonium haworthii Webb & Berthel (L.1841) bitkisi (Şekil 1.1), Doğal olarak Kanarya Adaları florasına ait, Crassulaceae familyasından, sukulent bir bitkidir. İklimine göre, bahçe veya salon süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Söz konusu bitkinin nispeten pahalı sayılabilecek fiyatlarla üreticiler tarafından satışa sunulmasından dolayı, bu çalışmada bitki doku kültürü yöntemlerinden klonal çoğaltım yoluyla üretimi amaçlanmıştır. Ayrıca, klasik yollardan bitki üretimine karşılık, *in vitro* klonal çoğaltım metodu birim zamanda kitle üretimine de olanak tanımaktadır.

A. haworthii bitkisinin yaprakları toprakta kolayca yaprak sürgünleri vermesine rağmen, oluşan yaprakların yavaş gelişmesi nedeniyle, bu çalışmada adı geçen bitkinin *in vitro* klonal çoğaltım olanakları araştırılarak, farklı bitki hormonları ile bu hormonların değişik konsantrasyonlarının tek olarak veya ikili kombinasyonlarının kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısı üzerine etkisi incelenmiştir.



Şekil 1.1. *A. haworthii* bitkisinin a) genel ve b) çiçekli görünümü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitki hücrelerinin izolasyonu ve kültüre alınabileceği ilk olarak, Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt tarafından 1902 yılında ileri sürülmüş, fakat araştırmacı hücreleri kültüre alamamıştır (Haberlandt, 1902). Haberlandt'ın gerçekleştiremediği bitki hücrelerini sürekli kültüre alma, Haberlandt'ın öğrencilerinden Kotte ve aynı anda başka bir bitki üzerinde çalışan Robbins tarafından gerçekleştirilmiştir (Kotte, 1922; Robbins, 1922). White tarafından, domates kök ucu parçaları kültüre alınmış, böylece bitki doku ve hücrelerinin kültüre alınabileceği kanıtlanmıştır (White, 1934). Nobecourt ve Gautheret, birbirinden habersiz olarak havuçta, White tütünde kallus kültürlerini gerçekleştirmişlerdir (Nobecourt, 1937; Gautheret, 1937; White, 1939). Bu safhadan sonra, daha çok yapay ortamların gerçekleştirilmesi üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmüş; Miller ve Skoog Kinetin'i bulmuşlar, Murashige ve Skoog vd. günümüzde en fazla kullanılan doku kültürü ortamını geliştirmişlerdir (Miller ve Skoog, 1955; Murashige ve Skoog, 1962). En büyük aşama, Muir vd. tarafından hücre süspansiyon kültürlerinin geliştirilmesi ile olmuştur (Muir et al., 1954). Hücrenin totipotens özelliğinden faydalanarak, bir hücreden yeni bitki elde etme konusunda ilk aşama, Bergmann tarafından hücrelerin katı ortam üzerine yayılarak, tek hücreden kallus elde etme çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir (Bergmann, 1960).

Önemli diğer bir aşama genetik çalışmalar için haploit homozigot hücrelerin elde edilmesidir. Bu konudaki çalışmalar, *Datura* çiçek tozlarından haploit embrioidler oluşabileceğinin gösterilmesiyle başlamıştır (Guha ve Maheshwari, 1964).

Günümüzde bu konularda çok fazla çalışma yapılmakta ve doku kültürü teknikleri biyoteknolojide geniş kullanım olanakları bulmaktadır.

In vitro kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar, somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Doku kültürü ortamlarının en önemli unsuru bitki büyüme düzenleyicileridir. Tür ve çeşitlere göre değişmekle birlikte, uygun olmayan konsantrasyonlarda ortama ilave

edildiklerinde genellikle hiçbir etki ortaya çıkarmazlar. Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan, endojen organik bileşiklerdir. İndol-3-asetik asit, Zeatin, Zeatin ribozid, Gibberellik asit, Absisik asit ve Etilen bitkiler tarafından doğal olarak üretilen hormonlardır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere, genel olarak hepsine birden bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. En çok kullanılanları oksinler, sitokininler, giberellinler, Absisik asit ve Etilendir (Babaoğlu vd., 2001).

Oksinler; fotoperyodizm, köklendirme, apikal dominansi, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus (yara dokusu) uyarımını, hücre süspansiyonları elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını; sitokininlerle birlikte uygulandıklarında ise, yine kallus oluşumunu ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını, ayrıca sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) da sağlayabilirler. Özellikle elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiplerdir. Bitki tarafından sentezlenen temel hormon formu IAA (İndol-3-asetik asit) olup, sentetik oksinler arasında NAA, IBA, 2,4-D, 2,4,5-T ve Pikloram sayılabilir (Babaoğlu vd., 2001).

Genel olarak sitokininler, Adenin (6-Aminopürin) türevleridir. Bunların içinde BAP (6-Benzilaminopürin) ve Kinetin (6-Furfurilaminopürin) en çok kullanılanlarıdır. Sitokininler, çoğunlukla tohumlar, genç yapraklar ve en çok kök ucu meristeminde üretilir (Kocaçalışkan, 2005). Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (redifferentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup, antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler (Smith, 1992).

Giberellinler meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovul kültürlerinde kullanılmaktadır (Kocaçalışkan, 2002). Kallus gelişimini, organogenesisi ve adventif kök oluşumunu engellerler. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi arttıırırlar (Babaoğlu vd., 2001).

Absisik asit strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunur. Genellikle bitkinin yaşlı kısımları tarafından sentezlendiği ve en çok bu bölgelerde bulunduğu için, yaşlılık hormonu adı ile de anılmaktadır. Sonbaharda bitkide miktarı artar ve ilkbaharda azalır; dolayısıyla, dormansiden sorumlu hormondur (Kocaçalışkan, 2005). Absisik asitin doku kültürlerinde rolü henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, halen somatik embriyoların olgunlaştırılmasında kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Işık kaynağı, yoğunluğu ve süresi ile sıcaklık da somatik embriyo oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kültür kaplarındaki oksijen, karbondioksit ve diğer gazların yoğunluğu da yapılan doku kültürü çalışmasının başarısında etkili olmaktadır. Bitki türüne bağlı olmakla beraber, en yüksek oranda embriyo gelişimi 24 -26 °C'de gerçekleşmektedir (Babaoğlu vd., 2001).

In vitro çalışmalarda kullanılan başlangıç bitki parçası eksplant olarak adlandırılmaktadır. *In vitro* çalışmaların başarısında eksplant seçimi son derece önemlidir (Tisserat, 1991). Yüksek oranda başarı elde etmek için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen, sağlıklı bitkilerden alınması gereklidir. Olgun ve yüksek oranda organize olmuş dokuların embriyogenesis kapasiteleri son derece düşüktür. Eksplant, bitkinin en uygun gelişme fizyolojisinde olduğu dönemde alınırsa bitkinin birçok parçası somatik embriyogenesis için kullanılabilir. Bu bağlamda, genç doku ve organlar, genellikle yaşlı doku ve organlardan daha başarılı olmaktadır (Kocaçalışkan, 2002).

Eksplant alınacak bitkilerin yetiştirme şartları da embriyogenesisin başarısında önemli rol oynamaktadır. Işık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler etkili olmaktadır (Warren, 1991). Genellikle sera şartlarında gelişen bitkiler, tarlada yetişen bitkilerden daha iyi sonuç vermektedir. Ayrıca, tüm gelişme şartları optimum düzeyde olduğundan dolayı, *in vitro* gelişen bitkilerden alınan eksplantlardan en yüksek oranda başarı sağlanabilmektedir (Kocaçalışkan, 2002; Babaoğlu vd., 2001).

Genel olarak, otsu bitkiler ağaç ve çalılara göre daha kolay rejenerasyon sağlamaktadır (Pierik, 1987). Somatik embriyo oluşturma frekansı bakımından türler arasında önemli farklılıklar gözlemlendiği gibi, aynı tür içindeki farklı genotip ve çeşitlerin dahi embriyo oluşturma yetenekleri farklı olmaktadır (Parrott et al., 1993).

Bitkilerin *in vitro* doku kültürü ile üretimi, kullanılan eksplantın özelliğine göre; embriyo, anter, hücre, protoplast kültürü vb olarak adlandırılır. Ancak çoğunlukla üretimde; tek boğum (nod), aksiller dallanma, adventif sürgün, hücre, protoplastlardan bitki regenerasyonu kullanılmaktadır. Mikroçoğaltım da denilen bu yöntemle; zor üretilen türlerin daha kolay üretilmesi, seçilen belirli üstün genotiplerin hızlı üretilmesi, üretimde daha az anaç kullanılması ve klasik geleneksel yöntemlerden daha kısa sürede bitki üretilmesi sağlanır (Babaoğlu vd., 2001).

Embriyo kültürleri, sekonder metabolit üretimi amacıyla farklılaşmış ve organize olmuş kültür ile metabolit üretimi yapılan kültürlerdir. Bitkilerin, canlıların temel besin kaynağı olarak ürettiği karbonhidrat, protein ve yağlar primer metabolit; kimya,

besin, kozmetik ve ziraî mücadele sektörlerinde kullanılan ve ekonomik açıdan önemi bulunan odun, selüloz, zambak ve lastik gibi bazı kimyasallar da sekonder metabolit olarak isimlendirilir. Şayet, bir metabolit embriyoda üretiliyor veya birikiyorsa, bu metabolitin üretimi, embriyo kültürleri ile gerçekleştirilebilir. Bu kültürler, ya doğrudan somatik embriyogenezle yani, zigotik embriyo, kotiledon, yaprak ve hatta gövde dokuları gibi kaynak bitki dokularından aseksüel embriyoların oluşturulmasıyla ya da dolaylı somatik embriyogenesisle yani, kallus veya hücre süspansiyon kültürlerinde farklılaşma teşvik edilerek embriyoların oluşturulmasıyla elde edilir (Babaoğlu vd., 2001).

Meristem kültürü, hastaliksız bitkiler elde etmek üzere geliştirilmiş, *in vitro* kültür tekniklerinden biridir. Bu yöntem, önce vegetatif olarak çoğaltılan bitkilerin hızlı klonal çoğaltımı, virüssüz materyal elde etme ve hem vegetatif hem de tohumla üretilen bitkilerin germplazmalarının muhafazası gibi alanlarda kullanılmış, daha sonra bitki ıslahında, gen transferleri ile genetik transformasyonları gerçekleştirmede kullanılmaya başlanmıştır. (Nehra ve Kartha, 1994).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Denemelerde materyal olarak kullanılan *A. haworthii* örnekleri, Gaziantep Üniversitesi Botanik Bahçesi'nden ve Biyoloji Bölümü Serası'ndan temin edilmiştir. Denemede kullanılan diğer malzemeler aşağıdaki şekildedir.

- a) Tohum ve bitkilerin sterilizasyonu, besi yerine aktarımı ve ortamlara eklenecek olan hormonların soğuk sterilizasyonu için steril yatay hava akışlı kabin kullanılmıştır.
- b) Alet ve ekipmanları, besin ortamlarını, bitki örneklerini, su, kurutma kağıdı, havlu vb. kullanılan diğer malzemeleri steril hale getirmek için otoklav ve etüv kullanılmıştır. Ayrıca soğuk sterilizasyon amacıyla, 0.2 µm por çapında selüloz nitrat filtreler (Millipore) kullanılmıştır.
- c) Bir litre, 500 mililitre, 100 mililitre ve 50 mililitrelik ölçü kapları; 100 mililitrelikten iki litreliğe kadar çeşitli ebatta beherler; otoklava dayanıklı, ağzı kapaklı çeşitli ebatta laboratuvar tipi cam şişeler; 1, 2, 5 ve 10 mililitrelik pipetler, mikropipetörler ve bunların pipetleri, çeşitli ölçüm işleri için kullanılmıştır.
- d) Kimyasal maddelerin tartımı için hassas terazi, çeşitli ebatta dara kapları ve ıspatula kullanılmıştır.
- e) Isıtcılı karıştırıcı ve pH metre de diğer malzemelerdendir.
- f) Bitki örneklerinin ekime hazırlanmasında; ticarî Na_2HClO_3 'ün %5'lik çözeltisi, Tween20, damlalık, çeşitli ebatta pensler ve bisturiler kullanılmıştır.
- g) Besi yeri için çeşitli kimyasallar, sakkaroz ve agar, otoklav aşamasından önce doğrudan veya sonradan soğuk sterilizasyonla eklenen bitki büyüme düzenleyicileri (GA_3 , BAP, IAA ve Kinetin) kullanılmıştır.
- h) Ekim için, on iki santimetre çapında petri kapları, ekimden sonra bitkilerin barınması için iklim odası kullanılmıştır.
- i) Çalışmanın tamamında dH_2O kullanılmıştır.
- j) Bitki gelişiminin ölçümü için Optic Iyymen System stereo binoküler mikroskop ve Mitutoya Digimatic Caliper CD-15CP (measuring range 0.00-150.00 mm) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki besi yerlerinin hazırlanması

Sterilizasyondan sonra ekimi yapılan ve daha sonra bunlardan gelişen veya dışarıdan temin edilen bitki örneklerinin içinde geliştirilmesi amacıyla Murashige ve Skoog (1962) besi ortamı (MS besi yeri) (Ek 1) kullanılmıştır.

MS besi yeri hazırlamak için, içeriğinde belirtilen altı farklı stok çözelti (Ek 2) ve uygulama aşamasında eklenen kimyasal maddeler (Ek 3) ve Sakkaroz (%3 a/h), hassas terazide tartıldıktan sonra, dH₂O'ya eklenerek karıştırıcıyla çözülmesi sağlanmış, daha sonra 100'er mililitrelik erlenmeyerlere bölünerek pH ölçümü yapılmış (pH=5.70-5.75) ve besiyerlerini katılaştırmak için agar (9 g/l) eklenerek otoklavda, 121 °C'de 15 dakika olacak şekilde, sterilizasyona tâbi tutulmuştur. (Hazırlanan MS stok çözeltileri, daha sonra da kullanılabilirdiğinden, buzdolabında saklanmıştır.)

Sterilizasyondan sonra, besiyerleri 40-50 °C 'a gelince, yine steril koşullarda milipor filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril edilmiş olan Gibberelik Asit, Benzilaminopürin, İndol-3-asetik asit ve 6-Furfurilaminopürin hormonları 1 mg/l, 5 mg/l ve 10 mg/l konsantrasyonları ve bu hormonların ikili farklı kombinasyonları eklenmiştir (Tablo 3.1). Steril kabin içerisinde besiyerleri petri kaplarına döküldükten sonra ortamlar tamamen katılaşmış ve kullanıma hazır hale gelmiştir. Daha sonraki uygulamalarda, hormon ilavesi pH ölçümü yapılmadan hemen önce gerçekleştirilerek otoklavda sterilizasyon sağlanmıştır.

Tablo 3.1 Denemelerde kullanılan hormonlar ve kombinasyonları

Kod	Tanım
1 IAA	: 1 mg/l IAA
10 IAA	: 10 mg/l IAA
1 Kin	: 1 mg/l Kinetin
10 Kin	: 10 mg/l Kinetin
1 IAA + 1 Kin	: 1 mg/l IAA-1 mg/l Kinetin
1 IAA + 10 Kin	: 1 mg/l IAA-10 mg/l Kinetin
10 IAA + 1 Kin	: 10 mg/l IAA-1 mg/l Kinetin
10 IAA + 10 Kin	: 10 mg/l IAA-10 mg/l Kinetin

3.2.2. Bitki örneklerinin hazırlanması

Gaziantep Üniversitesi'nin Botanik Bahçesi'nden ve Biyoloji Bölümü Serası'ndan alınan bitki örnekleri, çeşme suyunda yıkanarak peçeteyle suyu alındıktan sonra, gölgede kurutulmuştur. Daha sonra steril kabin içerisinde, pens yardımıyla %70'lik etil alkolde üç dakika bekletilmiştir. Bitki eksplantları, 4-5 damla Tween 20 damlatılan %5'lik Na₂HClO₃ çözeltisinde beş dakika bekletildikten sonra, 3 kez 5'er dakika steril dH₂O içinde yıkanmış ve otoklavda steril edilen kurutma kağıtları üzerine aktararak suyun fazlasının alınması sağlanmıştır.

3.2.3. Bitkilerin besi yerlerine ekilmesi

Besi yerleri soğuyup katılaştıktan sonra, elde edilen steril bitki örnekleri, yine steril kabin içerisinde, pens ve bisturi yardımıyla, önceden hazırlanmış olan steril besi yerlerine, her petriye 5'er bitki parçası gelecek şekilde ekilmiştir. Ekimi yapılan petri kaplarının kapakları parafilmle dış ortamdan izole edilmiştir. Denemenin her iki tekrarı için de aynı prosedür uygulanmıştır.

3.2.4. Bitki örneklerinin saklanması

Yukarıdaki şekilde hazırlanan bitki örnekleri, kültür şartları ekimi yapılan bütün örnekler için aynı ve sabit olmak kaydıyla, 16 saat ışık (1000 lux/h)/8 saat karanlık zamanlamasıyla uygulanan soğuk flüoresan ışığı ve 25 ± 1 °C sıcaklık olarak sağlanmış, nem ise kültürlerin ağzı parafilmle izole edilmiş halde petri kaplarında bulunmalarından dolayı sabit olarak varsayılmıştır.

3.2.5. Bitkilerin toprağa adaptasyonu

Bitkiler toprağa tutunabilecek kadar kök ve yaklaşık iki üç sıra kadar yaprak geliştirdikten sonra, petri kaplarından alınarak, daha hızlı gelişebilmeleri ve toprağa adapte edilmeye hazır olmaları amacıyla tüplerde hazırlanan besi yerlerine teker teker ekilmişlerdir. Burada tek bitkiye düşen besin, hormon ve hava miktarı daha fazla olduğundan, yaklaşık iki ila dört hafta arasında aktarma boyutunun iki katına çıkarak güçlü ve gelişkin bir hale gelmektedir. Böylelikle toprak adaptasyonuna hazırlanmış olan bitkiler, köklerine ve yapraklarına herhangi bir zarar vermemeye maksimum özen gösterilerek tüplerden çıkarılmıştır. Kökleri agardan temizlendikten sonra, daha önceden hazırlanarak plastik bardaklara doldurulmuş ve kırmızı toprak:kum:torf (1:1:1) karışımı içerisinde açılan küçük çukurlara, kökleri tamamen

kapanacak şekilde, büyük bir hassasiyetle aktarılmıştır. Aktarımı yapılan bitkiler, sadece toprak neme doyana kadar sulanarak her gün takip edilmiştir. Başlangıçta iki gün süreyle bitkilerin atmosfer şartlarına kademeli olarak alışabilmeleri ve ani bir şok yaşamamaları için üstlerine birkaç yerden delinmiş polietilen poşetler geçirilmiş, daha sonra poşetler çıkarılarak, bitkiler normal atmosfer şartlarına maruz bırakılmıştır.

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

İklim odalarında inkübe edilen bitkilerin gelişmesinin takibi haftalık olarak yapılmış, ilk sürgün başlangıçları yaprakların kültüre alınmasından yaklaşık bir ay sonra gözlenmiştir. İlk çıkışlar bir ay sonra gözlemlenmeye başlanmasına rağmen, ekşiplantların boyutları ile ilgili ölçümler, kültüre alındıktan sonraki altmışıncı günden itibaren yapılmıştır.

Ölçümler için bitkiler ortamdaki çıkarılmış ve stereo mikroskop altında, dijital kumpas ile ilgili kısımların ölçümleri yapılmıştır. Kök boyu ölçümleri, ana kök boyu olarak, kökün gövdeden çıktığı yerle uç noktası arasını; yaprak boyu ölçümleri, petiyol ile yaprağın uç noktası arasını kapsamaktadır. Kökteki mikro düzeydeki dallanma ve tüyler ölçüm dışı tutulmuştur.

Kallus veya organ oluşumuna ait veriler kaydedildikten sonra, içerdikleri hormon çeşidi ve miktarına bağlı olarak birbiriyle kıyaslanmış, böylece hangi hormon konsantrasyonunun veya kombinasyonunun daha iyi gelişme sağladığı belirlenmeye çalışılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS programı (10.1 versiyonu) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 2 tekrarlı ve muhtelif paralelli ölçümlerin ortalaması, \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Varyans analizleri, tek yönlü ANOVA ve genel linear model (GLM) olarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar, Duncan çoklu karşılaştırmalı testi ile belirlenmiştir. Farklılıkların $p < 0.05$ seviyesinde önemli olduğu düşünülmüştür (Sokal ve Rohlf, 1995).

4. BULGULAR

Laboratuvarımızda yaklaşık bir yıldır devam eden ve adı geçen bitki materyalinin klonal çoğaltılması amacıyla ele aldığımız çalışmanın, cetvel ile yapılan ölçümler ve gözlemsel sonuçlarına göre, en iyi gelişme sağlayan hormonlar olarak IAA ve Kinetin ile bunların ikili kombinasyonları olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda GA₃, BAP, K ve IAA hormonlarının tek olarak ve/veya bunların ikili kombinasyonlarından elde edilen 60 günlük sonuçlara göre eksplant başına en fazla ortalama 4 adet yaprak çıkış sayısı ile 5 m/l IAA + 5 m/l Kinetin içeren ortamdaki örneklerden sağlanmış olup, yeni çıkan yapraklarda en uzun boy ortalamasına 2.5 -3 mm ile 1 m/l IAA + 10 m/l Kinetin içeren kültür ortamındaki yapraklardan sağlanmıştır. En uzun kök boyuna ise yaklaşık 8 mm ortalama değerle 5 m/l IAA + 5 m/l Kinetin içeren ortamlarda kültüre alınan bitkilerle ulaşılmıştır. IAA ve Kinetin kombinasyonlarının bulunduğu kültür ortamlarında denemeye alınan yapraklar, genel olarak total gelişme üzerinde denememizde kullandığımız diğer hormonlardan daha iyi sonuçlar verdiği için, bundan sonraki denemelerde IAA ve Kinetin ile ilgili hormonların denemeleri tekrar ele alınarak daha hassas ölçümlerle sonuçlar tekrarlanmıştır.

Çeşitli hormon kombinasyonları ve konsantrasyonları içeren bazal MS ortamında kültüre alınan *A. haworthii* yapraklarından ortaya çıkan sürgünlere ait kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısı ölçümleriyle ilgili değerler Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, farklı hormon kombinasyonlarını içeren bazal MS ortamında kültüre alınan *A. haworthii* yapraklarından altmış gün sonunda ortaya çıkan kök boyu değerleri, 10 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin içeren ortamlardaki ortalama değer 0,18 mm ile en zayıf gelişmeyi gösterirken, en iyi kök boyu uzunluğu 1 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin içeren MS ortamında, ortalama 4,16 mm değer ile elde edilmiştir. En iyi ikinci gelişmeyi ortalama değeri 2,80 mm kök uzunluğu ile 1 mg/l IAA + 10 mg/l Kinetin içeren kültür ortamındaki bitkiler izlemiş olup, bu sonuç 10 mg/l Kinetin içeren ortamda elde edilen ortalama 2.79 mm kök uzunluk değerine hemen hemen çok yakın bir sonuç olarak elde edilmiştir (Şekil 4.1).

a)



b)



c)



d)



e)



f)



g)



h)



i)



Şekil 4.1 *A. haworthii* bitkisinin a, b, c, d, i) 1 IAA + 1 Kin; e, i) 1 IAA + 10 Kin; f) 10 IAA + 10 Kin; g, h) 10 Kin ortamlarında gösterdiği 60 günlük gelişim.

Yaprak boyunda da 10 mg/l IAA + 10 mg/l Kinetin içeren kültür ortamında ortalama 0,15 mm uzunluk ile en yavaş gelişme sağlanmış olup, en iyi gelişme 1 mg/l IAA içeren MS ortam üzerindeki bitkilerden çıkış yapan yaprakların ortalama boy uzunlukları 2,10 mm'lik değer ile elde edilmiştir (Tablo 4.3). Benzer şekilde 10 mg/l Kinetin içeren ortamda elde edilen 1,90 mm (Tablo 4.3) ve 1 mg/l IAA + 1 mg/l

Kinetin içeren ortamda elde edilen 1,68 mm (Tablo 4.1) yaprak boyu değerleri de önemli bulunmuştur (Şekil 4.1). Yaprak boyu ölçümleri arasında önemli düzeyde farklılıklar gözlenmiş ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Tablo 4.1 Kök boyu (mm), yaprak boyu (mm) ve yaprak sayısının (tane) hormon kombinasyonuna (mg/ml) göre değişimi

Hormon Kombinasyonu	Kök Boyu	Yaprak Boyu	Yaprak Sayısı
Kontrol	1,98 ± 0,37 ^b	0,23 ± 0,23 ^a	0,50 ± 0,50 ^a
1 IAA + 1 Kin	4,16 ± 0,23 ^c	1,68 ± 0,15 ^c	4,25 ± 0,25 ^c
1 IAA + 10 Kin	2,80 ± 0,71 ^{bc}	0,89 ± 0,08 ^b	1,88 ± 0,38 ^b
10 IAA + 1 Kin	0,18 ± 0,08 ^a	0,45 ± 0,20 ^{ab}	0,70 ± 0,10 ^a
10 IAA + 10 Kin	0,33 ± 0,18 ^a	0,15 ± 0,08 ^a	0,22 ± 0,08 ^a

* Her hormon kombinasyonu için aynı sütundaki farklı harfler (a-c) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Tablo 4.2 Kök boyunun (mm) hormon miktarı (mg/ml) ve hormon tipine göre değişimi

Hormon Tipi	Kök Boyu		
	Hormon Miktarı		
	0	1	10
IAA	1,98 ± 0,37	1,97 ± 0,22	2,38 ± 0,49
Kin	1,98 ± 0,37	2,36 ± 0,54	2,79 ± 1,14

Tablo 4.3 Yaprak boyunun (mm) hormon miktarı (mg/ml) ve hormon tipine göre değişimi

Hormon Tipi	Yaprak Boyu		
	Hormon Miktarı		
	0	1	10
IAA	0,23 ± 0,23 ^a	2,10 ± 1,90 ^a	1,18 ± 0,54 ^a
Kin	0,23 ± 0,23 ^a	1,30 ± 0,10 ^b	1,90 ± 0,32 ^b

* Her hormon tipi için aynı sütundaki farklı harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Tablo 4.1 'de verilen sonuçlara göre yaprak sayısı ölçümlerinde ise 1 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin içeren bazal MS ortamında kültüre alınan yapraklardan 60 gün sonunda ortalama olarak 1 adet yapraktan 4,25 adet yaprak elde edilmiştir. Bunu 10 mg/l Kinetin içeren ortamdaki yapraklar, 3,59 adet/yaprak sayısı ile takip etmiştir (Tablo 4.4). Hormon içermeyen kontrol grubu ise eksplant başına yaklaşık 0,50 adet yaprak çıkışı vermiş olup, 10 mg/l IAA + 10 mg/l Kinetin içeren kültür ortamında ise ortalama 0,22 adet/yaprak eldesi ile en az yaprak çıkış sayısı olarak elde edilmiştir. Benzer şekilde 10 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin içeren kültür ortamında da yaprak başına ortalama 0,70 adet yaprak çıkışı ile oldukça düşük bir rakamsal veri elde edilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.4 Yaprak sayısının (tane) hormon miktarı (mg/ml) ve hormon tipine göre değişimi

Hormon Tipi	Yaprak Sayısı		
	Hormon Miktarı		
	0	1	10
IAA	0,50 ± 0,50	1,25 ± 0,75	1,17 ± 0,50
Kin	0,50 ± 0,50	2,13 ± 0,88	3,59 ± 0,92

Yapılan 2 yönlü varyans analizi (Tablo 4.7) sonucuna göre, hormon konsantrasyonu parametresinde gruplar arası etkileşiminin etkisi önemli bulunmuştur.

Tablo 4.5 Kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısının hormon kombinasyonuna göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON KAYNAKLARI	KÖK BOYU			YAPRAK BOYU			YAPRAK SAYISI		
	SD [†]	KO [†]	F [†]	SD	KO	F	SD	KO	F
Hormon Kombinasyonu	4	22,69	19,67*	4	3,14	15,89*	4	21,98	29,31*

*p<0.05 düzeyinde önemli

[†]SD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri

Yapılan 2 yönlü varyans analizi (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6) sonucuna göre, hormon çeşidi parametresinde gruplar arası etkileşiminin etkisi önemli bulunmuştur.

Tablo 4.6 Kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısının IAA için hormon çeşidine göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON KAYNAKLARI	KÖK BOYU			YAPRAK BOYU			YAPRAK SAYISI		
	SD ^t	KO ^t	F ^t	SD	KO	F	SD	KO	F
Hormon Çeşidi (IAA)	2	0,21	0,38*	2	3,51	0,66*	2	0,67	0,47*

*p<0.05 düzeyinde önemli

^tSD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri

Tablo 4.7 Kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısının Kinetin için hormon çeşidine göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON KAYNAKLARI	KÖK BOYU			YAPRAK BOYU			YAPRAK SAYISI		
	SD ^t	KO ^t	F ^t	SD	KO	F	SD	KO	F
Hormon Çeşidi (Kinetin)	2	0,65	0,28*	2	2,86	13,51*	2	9,52	3,85*

*p<0.05 düzeyinde önemli

^tSD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri

Toprağa aktarımı yapılan bitkilerden iki hafta içinde %80'i adapte olarak hayatta kalmayı başarmış, hatta başlangıç büyüklüklerinin, kabaca iki katına kadar gelişme göstermişlerdir. Toprağa aktarım ve gelişme süreci takip edilen bitkilere ait veri kaydı yapılmamış olup, bitkiler halen toprakta yetiştirilmeye devam edilmektedir (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.2 Toprak adaptasyonundan önce tüpte geliştirme çalışması



Şekil 4.3 Toprağa aktarma aşamasında kökleri agardan temizlenmiş bitkiler



Şekil 4.4 Toprağa adaptasyonu sağlanmış bitkiler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada farklı bitki hormonlarının iki farklı konsantrasyonu ve dört çeşit ikili kombinasyonunun *A. haworthii* bitkisinin kök boyu, yaprak boyu ve yaprak sayısı üzerine etkisi incelenmiştir.

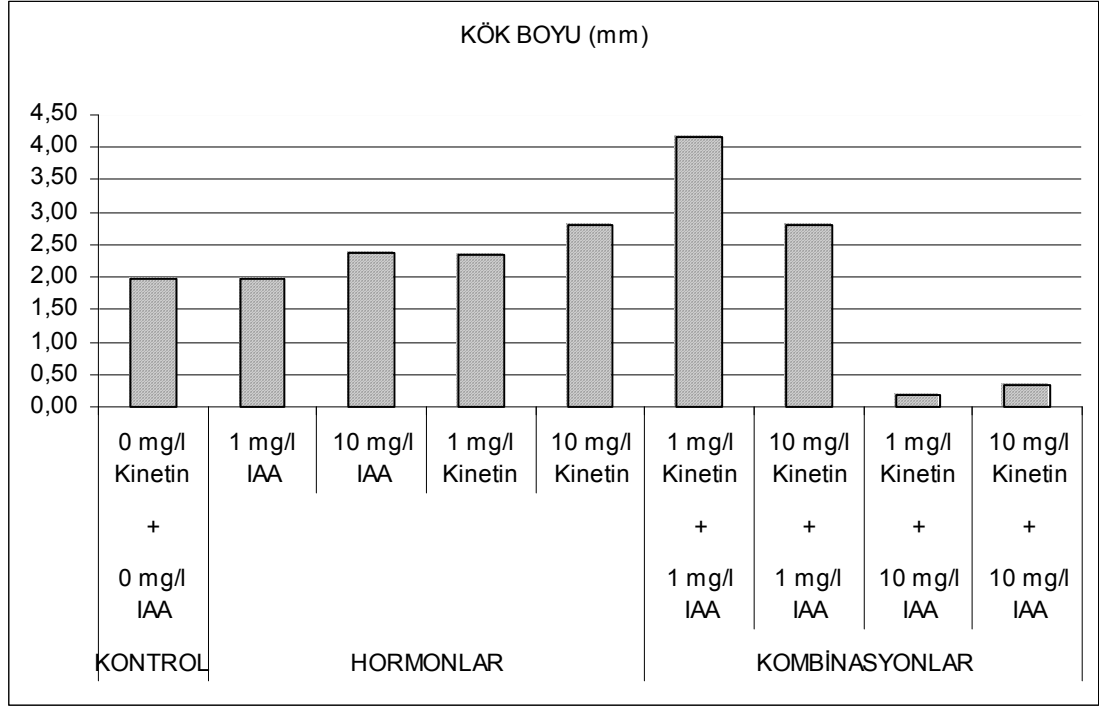
Yapılan ön araştırmalar ve literatür taramasında, adı geçen bitkinin *in vitro* klonal çoğaltımına dair herhangi bir makale çalışmasına rastlanmamıştır.

A. haworthii bitkisinden alınan bütün halindeki yaprak örnekleri, sterilizasyon işlemleri yapıldıktan sonra, tek tek IAA, Kinetin ve bunların ikili kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda köklenmeyi teşvik etmek için IAA ve yeşil aksam gelişimini teşvik etmek için BAP hormonlarının değişik kombinasyonları kullanılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen gözlemsel sonuçlarda, 5mg/l IAA + 1mg/l BAP içeren besi ortamının başlangıçta en iyi kök ve sürgün oluşumu sağladığı belirlenerek, eksplant sayısını artırmak için bu hormon kombinasyonu kullanılmıştır. Ancak, ön deneme çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre daha farklı hormon tipleri ve hormon kombinasyonlarının daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Doku kültürü alanında yapılan diğer çalışmalarda, Kinetin ve BAP'nin yüksek konsantrasyonlarının, IAA veya NAA'in düşük konsantrasyonlarıyla birlikte kullanıldığında sürgün oluşumunda etkili olduğu belirtilmektedir (Start ve Cumming, 1976; Harney ve Knap, 1979).

Yapılan araştırma sonuçlarına göre, IAA ve Kinetin yalnız başına kullanıldıklarında fazla etkili olmazken, birlikte kullanıldıkları zaman, düşük konsantrasyonlu kombinasyonlarında oldukça verimli sonuçlar vermekte olup, bunun aksine yüksek konsantrasyonlu kombinasyonlarında ise kök sayısı ve uzunluğunu olumsuz yönde etkilemektedir (Koç vd., 1992). Yapılan çalışmalarda, düşük konsantrasyon ve 1:1 oranında oksin:sitokinin kombinasyonlarının, *Saintpaulia ionantha* Wendl.'de köklenmenin meydana gelmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Kukulezanka ve Suczynska, 1972; Harney ve Knap, 1979).

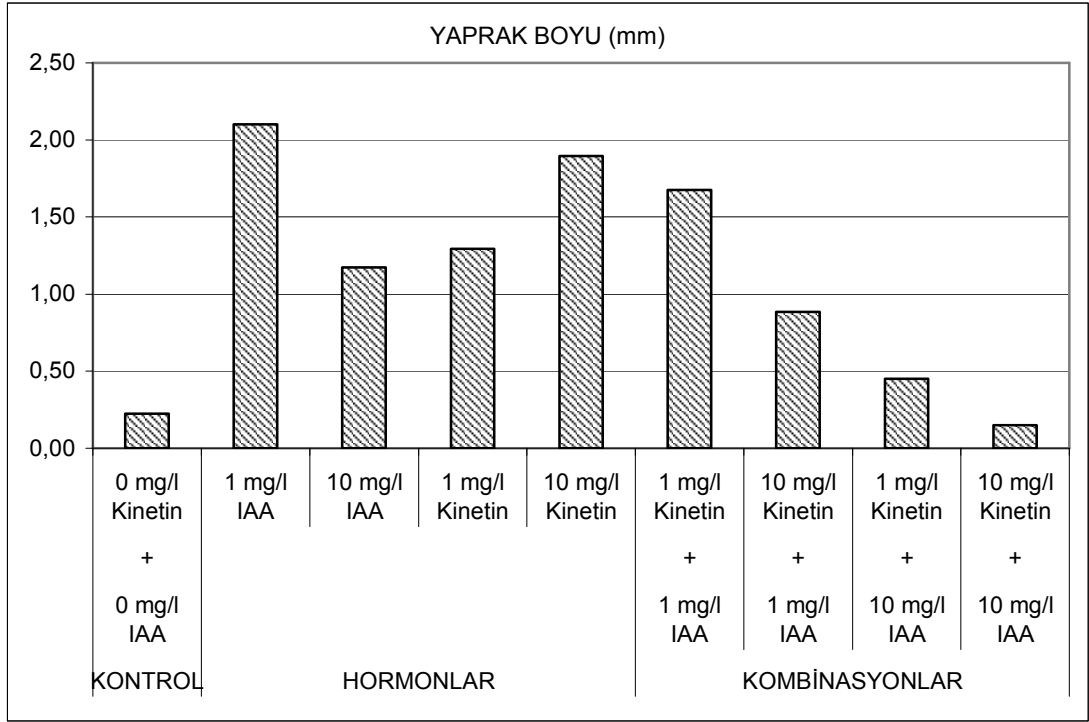
Şekil 5.1’de görüldüğü üzere, bitkiler hormon içermeyen kontrol grubunda da kök gelişimi göstermiştir. Kültüre alınan eksplantların, kök oluşturabilmek için her zaman oksine gerek duymadığı, bitkide mevcut endojen oksinlerin de köklenmede etkili olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından da vurgulanmıştır (Start ve Cumming, 1976; Cooke, 1977).



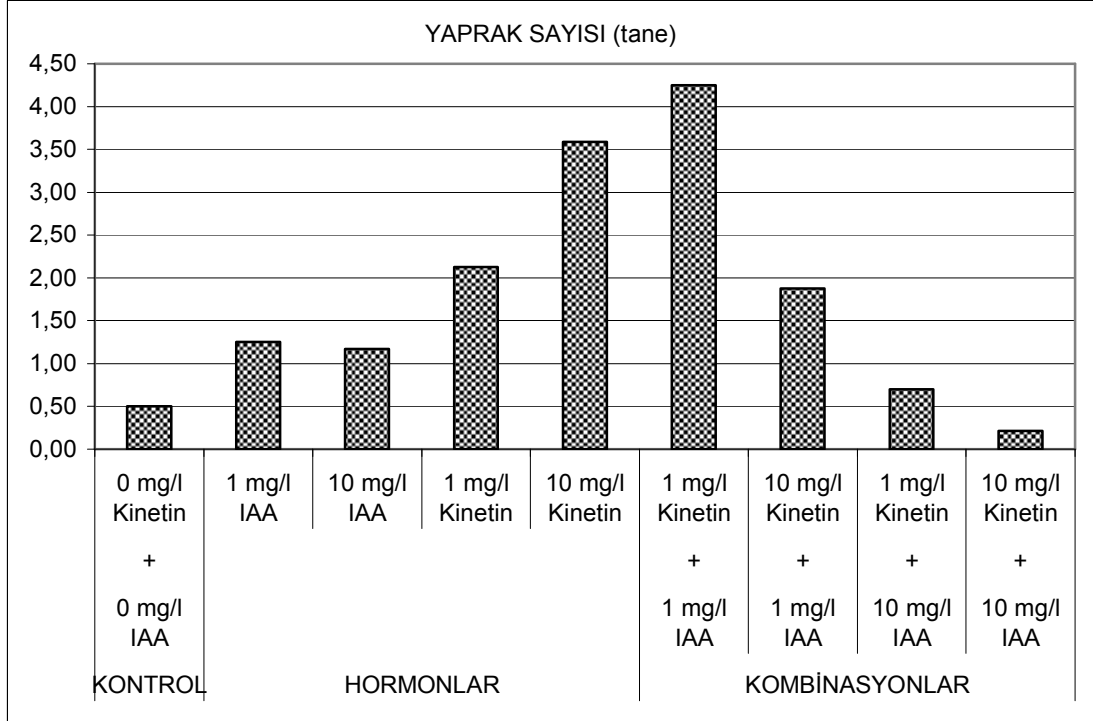
Şekil 5.1 Kök boyunun hormon tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 60 günlük değişimi

Bitkinin endojen hormon miktarı ve sterilizasyon aşamasında geçirdiği stres koşulları, besi ortamına aktarılan eksplantların kültürasyona yanıt süresi üzerinde etkili olabilir (Koç, 1994). Bitkiler stres koşullarını aşmak için dışarıdan eklenen hormonlara gereksinim duymaktadır.

Çalışmanın temelini oluşturan bitkisel büyüme düzenleyicilerine de bitki eksplantları farklı reaksiyon göstermiştir. Hormon kullanılmayan kontrol denemelerinde ve hormon miktarının en yüksek olduğu kombinasyonlarda, hem en fazla bitki ölümü hem de en zayıf gelişim gözlenmiştir. Bunun yanında, bazı tekli hormon ve hormon kombinasyonu denemelerinde de hormon uygulaması yapılmayan kontrol grubu bitkilerinden daha zayıf gelişme ve yine hormon uygulaması yapılmayan kontrol grubu bitkilerine göre çok üstün gelişmeler gözlenmiştir (Şekil 5.2 ve Şekil 5.3).



Şekil 5.2 Yaprak boyunun hormon tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 60 günlük değişimi



Şekil 5.3 Yaprak sayısının hormon tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 60 günlük değişimi

Bitkilerin fizyolojik yaşları, eksplantların bitkiden alınma zamanı ve eksplantın alındığı bitki bölgesi ve kaynak olarak kullanılan bitkinin gelişme koşulları (sera veya tarla koşulları vb) gibi birçok faktör bitkilerin endojen hormon dengesini etkileyebilmektedir. Ön deneme sonuçlarımıza göre bütün yaprak, yarım yaprak, tepe sürgünü, nodlara sahip gövde, köke sahip gövde ve kök eksplantları arasında, en iyi sürgün oluşumu tepe sürgünlerinden elde edilmiş olup; bunu, bütün yapraklar izlemiştir. Köke sahip gövdeler, nodlara sahip olan gövdeler ve yarım yapraklardan çok az sayıda sürgün alınmış, köklerden ise hiçbir sürgün başlaması sağlanamamıştır. Buradan, içinde yaprak içeren bitki eksplantlarının yaprak içermeyen eksplantlara göre kültüre alınmaya daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Uç sürgünler ve genç yapraklar, oksinlerin üretim merkezleri olduğu için sürgün başlatmak için en uygun bitki kısımları olmuştur. Ancak, başlangıç materyalinin yeterli sayıda olmamasından dolayı, ikinci denemelerimizde tepe sürgünü yerine bütün yapraklar tercih edilmiştir. Başlangıç çalışmasından elde edilen bir sonuç olarak, genç yapraklardan ekimden sonra hemen sürgün oluşumu elde edilmesine karşılık, yaşlı ve büyük yaprakların sürgün verme potansiyellerinin düşük ve çıkış zamanlarının aşırı geç olduğu ortaya çıkarılmıştır. Genellikle yaşlı yaprakların endojen hormon üretim kapasiteleri yetersiz olup, bitki hormonlarının üretim bölgeleri genç doku veya organlar olması sebebiyle tekli hormon ve hormon kombinasyonları denemelerinde iri ve yaşlı yaprakların eksplant olarak seçilmesinden kaçınılmıştır. Zaten kullanılan her iki grup hormon oksin ve sitokininlerin de bitkideki üretim yeri genç yaprakların uçlarıdır (Koç, 1994; Babaoğlu vd., 2001; Kocaçalışkan, 2005). Tepe noktalarının en iyi gelişmeyi göstermesinde etken olarak, bitkinin apikal kısımlarının büyüme fizyolojisi bakımından en aktif kısımları olduğu düşünülebilir. Zira, oksinlerin asıl sentez bölgesi de bitkinin apikal noktalarıdır (Koç, 1994; Babaoğlu vd., 2001; Kocaçalışkan, 2005). İkinci olarak en verimli gelişme bölgesi olan yaprakların da yüksek bölünme potansiyeli olan meristem hücrelerince zengin olduğu bilinmektedir. Gövde ve köklü sap kısımlarının geç ya da zayıf gelişmesinin nedeni olarak ise bu kısımlarda endojen hormon üretimi yapılmayıp, sadece hormon taşınmasının yapıldığından kaynaklanabileceği olduğu düşünülmüştür.

Benzer şekilde eksplantların bitkiden alındığı zamanlara göre de gelişme farklılıkları görülmüştür. Nisan ve Temmuz aylarında ekimi yapılan örneklerin gelişimi, Ekim ve Şubat aylarında ekimi yapılan eksplantların gelişiminden daha iyi olmuştur. İlkbahar ve yaz başlarında bitkiler fizyolojik olarak en aktif, sonbahar ve kış mevsimlerinde

ise dormant halde bulunmaktadır (Kocaçalışkan, 2002; 2005). Buna dayanarak, ebeveyn bitki seçiminin zamanlanmasında, mevsimsel periyodun sonuçlar üzerine etkisi olabileceği düşünülebilir. Ayrıca denememizde ilkbahar periyodunda yapılan çalışmalarda kullanılan bitkiler 5-6 ay hormon içeren yapay ortamda inkübe edildikten sonra ortamdaki alınarak deneme kurulmuş olup, sonbahar periyodunda ise direk topraktan alınan bitkiler kullanılmıştır. Dolayısıyla ilkbahar ve sonbahar fizyolojilerinin farklı olmasının yanı sıra ilkbahar döneminde çalışılan bitkilere yoğun olarak yapılan ekzojen hormon yüklemesinin de gelişmeye olumlu katkısı olabilir. Bitkilerin sürgün veriminin sezona bağımlılığı, ebeveyn bitkilerin sera veya klima odalarında uygun sıcaklık ve nem içeren koşullarda tutulması ile en aza indirgenebilir (Koç, 1994).

Kaynak olarak kullanılan ebeveyn bitkinin gelişme koşulları da farklı gelişme sonuçları vermiştir. Gaziantep Üniversitesi Botanik Bahçesi'ndeki açık seradan alınan bitki eksplantları daha hızlı ve iyi bir gelişim gösterirken, Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü kapalı serasından alınan bitki eksplantları daha geç ve zayıf bir gelişim göstermiştir. Bu da doğal koşullarda yetişen bitkilerin, sera bitkilerine göre, sterilizasyon aşamasındaki son derece zorlu koşullara karşı daha dirençli olmaları ile ilişkilendirilmiştir.

İlkbahar fizyolojisi ile kullanılan bitkilerden en iyi gelişim sonuçları 1 mg/l IAA + 10 mg/l K hormon içeren ortamda elde edilmiştir. Sonbahar fizyolojisi ile en iyi sonuçların elde edildiği 1 mg/l IAA + 1 mg/l K hormon içeren kültür ortamında kullanılan bitkiler yeni sürgün oluşturmak için ilkbahar fizyolojisine göre daha az ekzojen sitokinin ihtiyacı duymuştur.

Sonuç olarak, oksinler genelde büyüme hormonu olarak adlandırılırlar. Bu özellikleriyle sadece kök uyarılmasıyla beraber bitkinin genel gelişimini de etkilerler. Çalışmadan elde edilen sonuç da bunu destekler niteliktedir. Sitokininler ise genellikle yalnızca yeşil aksam uyarılmasından sorumludurlar. Buldukları bitki kısmına çeşitli kimyasal maddeleri çekip birikimine neden oldukları (sink effect) varsayılmaktadır ki, bunların arasında diğer bitki hormonları da vardır (Mittelheuser ve Van Steveninck, 1971; Maitra ve Sen, 1987). Bunun yanında en önemli özellikleri, hücre bölünmesini teşvik etmeleridir (Koç, 1994; Babaoğlu vd., 2001; Kocaçalışkan, 2005). Hücre bölünmesi ise toplam bitki hacminde artış, dolayısıyla büyüme anlamına gelir.

Araştırmaya konu olan hormonlardan Kinetin, tekli denemelerde umulan sonucu vermemiş, buna karşılık ikili hormon kombinasyonlarında en canlı ve hacim olarak daha büyük bitkilerin gelişmesini sağlamıştır.

Bütün denemelerden çıkarılabilecek öneriler şöyle sıralanabilir: Ebeveyn bitkiden eksplantın alınımının, bitkinin fizyolojik olarak aktif olduğu ilkbahar ve yaz aylarında yapılması; bitkinin endojen hormon konsantrasyonunun göz önünde bulundurularak yüksek hormon kombinasyonlarından kaçınılması; mümkün olabilirse genç doku ve organların eksplant olarak kullanılması; yapılacak yeni çalışmaların, üçlü hormon kombinasyonu denemeleri veya diğer sentetik hormonlarla yapılması değişik sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Ayrıca *A. haworthii* bitkisi için hızlı geliştirme amaçlı hormon kombinasyonları IAA + Kinetin, onu takiben IAA + GA₃ kombinasyonu şeklinde, çapraz yer değiştirme yoluyla da uygulanabilir.

6. KAYNAKLAR

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Eds.). (2001). *Bitki biyoteknolojisi-1-doku kültürü ve uygulamaları*. Selçuk Ün. Vakfı Yayınları.

Bergmann, L. (1960). Growth and division of single cells of higher plants *in vitro*. *J.GEN. Physiol.*, **43**, 841-851.

Cooke, R. L. (1977). Tissue culture propagation of african violets, *Hortscience*, **12**, 549.

Dodds, I. H., Roberts. W. (1986). *Experiments in plant tissue culture*, USA, 113-121.

Gautheret, R.J. (1938). Sur le repiquage des cultures de tissu cambial de *Salix caprea*. *CR Acad. Sci.*, **206**, 125-127.

Guha, S., Maheshwari, S. C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*, *Nature (London)*, **212**,97-98.

Haberlandt, G. (1902). Hulturversuche mit isolierten pflanzenzellen, *Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien. Math-Natur. Kl.*, **111**, 69-92.

Harney, P. M., Knap, A. (1979). A Technique for the *in vitro* propagation of african violets using petiols. *Can. J. Plant. Sci.*, **59**, 263-266.

Kocaçalışkan, İ. (2002). *Bitki kültürleri (organ, doku ve hücre)*. Kütahya.

Kocaçalışkan, İ. (2005). *Bitki fizyolojisi*. Bizim Büro Basımevi, Ankara.

Koç, N.K., (1994). *Bitki biyoteknolojisi*. Çukurova Ün. Ziraat Fak. Yay., Adana.

Koç, N.K., Can, C., Kayım, M. (1992). *In vitro* doku kültürü teknikleri kullanılarak afrika menekşesinin (*Saintpaulia ianantha* Wendl.) klonal çoğaltılması. *Çukurova Ün. Ziraat Fak. Dergisi*, **7**, **1**, 171-180.

Kotte, W. (1922). Kultur versuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Beitr. Allg. Bot.*, **2**, 413-434.

Kukulezanka, K., Suczynska, D. (1972). Regeneration properties of *Saintpaulia ianantha* Wendl. leaves cultured *in vitro*. *Soc. Bot. Pol. XL.*, **1**, 503-505.

Maitra, N., Sen, S. P. (1987). Hormonal regulation of source-sink relationship: Effect of hormones on excised source and sink organs of cereals. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1005-1012.

- Miller C.O., Skoog F. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 1392.
- Mittelhauser, C. J., Von Steveninck, R. F. M. (1971). The ultrastructure of wheat leaves II. The effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the light. *Protoplasma. Springer Wien*, **73**, **2**, 253-262.
- Muir, W.H., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J. (1954). Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. *Science*, **119**, 877-878.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-493.
- Nehra, N. S., Kartha, K. K. (1994). Meristem and shoot tip culture: Requirements and applications. In: Vasil I. K. and Thorpe T. A. (eds), *Plants cell and tissue culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL., 37-70.
- Nobecourt, P.(1938). Sur les proliferations spontanees de fragments de tubercules de carotte et leur culture sur milieu synthetique, *Bull. Soc. Bot. FR.*, **85**, 1-7.
- Parrott, W.A., Merkle, S.A., Williams, E.G. (1993). Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer system. In : Murray, D.R. (Eds.). *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, C.A.B International, DK., 158-200.
- Pierik, R.L.M. (1987). *In vitro culture of higher plants*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, NL., 183-230.
- Robbins, W. J. (1922). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot. Gaz.*, **73**, 376-390.
- Smith, R. (1992). *Plant tissue culture techniques and experiments*, Academic Press Inc., UK., 1-27.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995). *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Co., NewYork.
- Start, N. D., Cumming, B. G. (1976). In vitro propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl., *Hortscience*. **11**, 204-206.
- Tisserat, B. (1991). Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon, R.A. (Eds.), *Plant cell culture: A practical approach*, IRL Press, Oxford, UK., 79-105.
- Warren, G. (1991). The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In : Stafford, A., Warren, G. (Eds.). *Plant cell and tissue culture*, Open University Press, Milton Keynes, UK., 83-100.
- White, P.R. (1939). Potentially unlimited growth of excised tomato root-tips in a liquid medium, *Plant Physiol.*, **9**, 585-600.

White, P. R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in artificial nutrient. *Amer. Jour. Bot.*, **26**, 54-64.

Dış Ticaret Müsteşarlığı Bilgi Sistemi, (Anonim, 2006).

<http://www.tufts.edu/~gdallal/p05.htm>

<http://tr.wikipedia.org/wiki/SPSS>

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>

<http://www.alanwood.net/pesticides/picloram.html>

EK 1. MS Ortamının Kimyasal Bileşenleri

Kimyasal Madde	Miktarı (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
H ₃ BO ₃	6.2
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine HCl	0.5
Nicotinic HCl	0.5
Glycine	2
Myo-inositol	100
	Miktarı (g/l)
Sucrose	30
Agar	8-10

EK 2. A. MS Stok Çözeltileri

Çözelti Kodu	Kimyasal Madde	Miktarı (mg/100 ml)
A	H ₃ BO ₃	62.00
	KH ₂ PO ₄	1700.00
	KI	8.30
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.50
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.25
B	MgSO ₄ .7H ₂ O	3700.00
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.00
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	86.00
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
C	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.00
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	373.00
D	Thiamine HCl	1.00
	Pyridoxine HCl	5.00
	Nicotinic HCl	5.00
	Glycine	20.00

EK 2. B. Sonradan Eklenen Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Miktarı (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
Myo-inositol	100
	Miktarı (g/l)
Sucrose	30
Agar	8-10