

Paulownia tomentosa Steud.'NİN İN VİTRO DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ
KULLANILARAK ÇOĞALTILMASI

Yüksek Lisans Tezi

730893

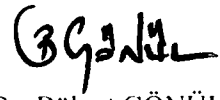
Biyoloji Bölümü
Gaziantep Üniversitesi

Türkan AYTEKİN

Mayıs 2003

Y.Ü. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

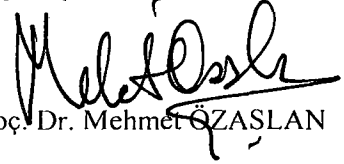
Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı



Prof. Dr. Bülent GÖNÜL

(Unvan ve İsim)
FBE Müdürü

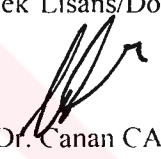
Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

(Unvan ve İsim)
Bölüm Başkanı

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



Yrd. Doç. Dr. Canan CAN

(Unvan ve İsim)
Danışman

Sınav Jüri Üyeleri

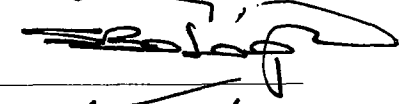
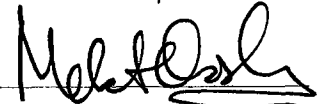
Yrd. Doç. Dr. Canan CAN

Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU (Çukurova Üniversitesi)

Doç. Dr. Elman İSKENDER

Yrd. Doç. Dr. İsmail VAROL



ÖZ

Paulownia tomentosa Steud.'NİN *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ
KULLANILARAK ÇOĞALTILMASI

AYTEKİN, Türkan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Canan CAN

Mayıs 2003, 47 sayfa

Ülkemize yeni girmeye başlayan *Paulownia* türleri (Scrophulariaceae), kereste imalatında, kağıt sanayinde, hayvan yemi ve yeşil gübre olarak, bal üretiminde, kent ormanlarının düzenlenmesinde ve zirai ormancılıkta geniş bir kullanım alanına sahiptir. *P. tomentosa* -25°C 'lik kış donlarına dayanabilmesi ve deniz seviyesinden 1800 m.'lik yükseltilere kadar yaşayabilmesi açısından dünyada özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika'da yetişen en yaygın türdür. Çelik yada tohumla üretimi zor ve zaman alıcı olan *Paulownia* türlerinin *in vitro* bitki doku kültürü teknikleri ile üretiminde olumlu sonuçlar alınmaktadır.

Bu çalışmada *in vivo* ve *in vitro*'da geliştirilen *P. tomentosa*'nın bitki doku kültürü teknikleri ile klonal olarak çoğaltılması üzerine farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarının etkisini belirlemek amacı ile denemeler kurulmuştur. Çalışmalar sonucunda *P. tomentosa*'nın *in vitro*'da yetişen fidelerinden elde edilen gövde eksplantından 0.1 mg/l IAA + 3.0 mg/l BAP ilaveli Murashige ve Skoog (1962)-MS ortamında direk somatik embriyogenes ile ortalama 10.5 adet sürgün elde edilmiştir. Gelişen sürgünlerin köklendirilmesi için en uygun hormon kombinasyonunun 2.0 mg/l IAA + 1.0 mg/l NAA ilaveli MS ortamı olduğu saptanmıştır. Köklendirilen sürgünler toprağa adapte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar *P. tomentosa*'nın *in vitro*'da klonal olarak çoğaltılmasına olanak sağlaması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Paulownia tomentosa*, bitki doku kültürü, klonal çoğaltım

Y. G. YÖNETİM KURULU
KARAR
11.05.2003

ABSTRACT

CLONAL PROPAGATION OF *Paulownia tomentosa* Steud. BY *IN VITRO* TISSUE CULTURE TECHNIQUES

AYTEKİN, Türkan

M.Sc. in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Canan CAN

May 2003, 47 pages

Paulownia species belonging to Scrophulariaceae family have just been introduced to our country. These species are being grown for use in paper industry, animal food, green fertiliser, honey and wood production and agricultural forestry. *P. tomentosa* is widely grown in Europe and North America since it is resistant to -25°C winter frost and could grown up to 1800 m. from the sea level. It is difficult and time consuming to propagate *P. tomentosa* through cuttings and by seeds, however they could respond to *in vitro* tissue culture techniques.

In this study, the experiments have been setted up to investigate the clonal propagation of *P. tomentosa* through the *in vitro* tissue culture techniques by using *in vivo* and *in vitro* grown plants. The aim was to determine the effect of different auxin and cytokinin combinations on clonal propagation of *P. tomentosa*. As a result of this study, Murashige and Skoog (1962) – MS media containing 0.1 mg/l IAA + 3.0 mg/l BAP resulted an average of 10.5 shoots per stem explant through direct somatic embryogenesis. The shoots were best rooted on MS media with 2.0 mg/l IAA +1.0 mg/l NAA. The seedlings were then adapted to soil. Results obtained are important for to *in vitro* clonal propagation of *P. tomentosa*.

Key words: *Paulownia tomentosa*, plant tissue culture, clonal propagation

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne,

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

Yüksek lisans tez konumu öneren ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Yard. Doç. Dr. Canan CAN'a,

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardımcı olan arkadaşım Selda BOZKURT'a

Maddi ve manevi her zaman yanımda olan AİLEM'e

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1.Materyal.....	12
3.1.1.Bitki materyali.....	12
3.1.2.Kimyasallar.....	12
3.1.2.1.Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.....	12
3.1.2.2.Kültür ortamlarına sonradan ilave edilen hormonlar.....	12
3.1.3.Kullanılan Cihazlar.....	13
3.2.Yöntem.....	13
3.2.Kültür ortamlarının hazırlanması.....	13
3.2.1.1.MS ortamının hazırlanması.....	13

3.2.1.2.Hormonların hazırlanması.....	13
3.2.1.3.Sterilizasyon.....	13
3.2.2.Somatik embriyogenesis çalışmaları.....	14
3.2.2.1. <i>İn vivo</i> 'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis çalışmaları.....	14
3.2.2.1.1.Bitkilerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları.....	14
3.2.2.2. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis çalışmaları.....	14
3.2.2.2.1.Tohumların sterilizasyonu ve <i>in vitro</i> 'da çimlendirilmesi.....	14
3.2.2.2.2. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerin çimlendirilmesi.....	15
3.2.2.2.3. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerin köklendirilmesi.....	15
3.2.2.2.4. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerin toprağa aktarılması.....	15
4.BULGULAR.....	16
4.1.Somatik Embriyogenesis Çalışmaları.....	16
4.1.1. <i>İn vivo</i> 'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis.....	16
4.1.2. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis.....	21
4.1.2.1.Tohumların <i>in vitro</i> 'da çimlendirilmesi.....	21
4.1.2.2. <i>İn vitro</i> 'da tohumdan çimlendirilen bitkilerden somatik embriyogenesis.....	22
4.1.2.3. <i>İn vitro</i> 'da gelişen bitkilerin köklendirilmesi.....	34
4.1.2.4. <i>İn vitro</i> 'da köklenen bitkilerin toprağa aktarılması.....	36
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
6.KAYNAKLAR.....	41
EKLER.....	45
BU TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1. Beş yaşındaki *Paulownia tomentosa* bitkisinin Gaziantep ili Mayıs ayındaki görüntüsü.....8
- Şekil 4.1. 2.0 mg/l IAA ve 10.0 mg/l BAP içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar.....18
- Şekil 4.2. 2.0 mg/l IAA ve 3.0 mg/l BAP içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak sapı eksplantından gelişen kalluslar.....20
- Şekil 4.3. MS (%3 sakkaroz içeren) (a) ve ½ MS (%1 sakkaroz içeren) (b) ortamlarında çimlenen tohumlar.....21
- Şekil 4.4. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu ve kök eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı (a), kök sayısı (b) ve kallus ağırlığı (c) değer.....23
- Şekil 4.5. a. 1.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen sürgünler b. 0.1 mg/l NAA ve 7.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantından direk somatik embriyogenesis ile gelişen sürgünler.....24
- Şekil 4.6. Sürgün ucu eksplantından indirek somatik embriyogenesisle gelişen sürgünler.....25
- Şekil 4.7. a. 2.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kökler b. 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantından gelişen kökler.....26

- Şekil 4.8. a. 2.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kallus b. 2.0 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantından gelişen kallus c. 0.5 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kök eksplantından gelişen kallus.....27
- Şekil 4.9. (0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 5.0 , 7.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı (a) ve kök sayısı (b) değerleri.....28
- Şekil 4.10. a.Gövde eksplantından direk somatik embriyogenesis b. 3.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan gövde eksplantından gelişen sürgünler c. Gövde eksplantından indirek somatik embriyogenesis30
- Şekil 4.11. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve Kinetin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı (a) ve kök sayısı (b) değerleri.....32
- Şekil 4.12. (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* sürgünlerinden gelişen köklerin sayı ve uzunluk değerleri.....34
- Şekil 4.13. IAA ve NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünlerinden gelişen kökler.....35
- Şekil 4.14. 0.5 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA (a) ile 2.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA (b) ortamlarında kültüre alınan sürgünlerden gelişen kökler (Sol tarafta bulunan bitkiler kontrol grubu olarak alınmıştır).....36
- Şekil 4.15. Toprağa aktarılan 1 aylık *Paulownia tomentosa* bitkisi.....36

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

2,4-D	2,4 Dichlorophenoxy acetic acid
atm.	Atmosfer basınç
BAP	6-Benzilaminopurine
cm	Santimetre
°C	Santgrad Derece
dH ₂ O	Deiyonize su
gr	Gram
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol butirik asit
l	Litre
M	Molar
m	Metre
mm	Milimetre
m ²	Metrekare
mg	Miligram
ml	Mililitre
µM	Mikromolar
MS	Murashige ve Skoog (1962)
N	Normal
NAA	Naphtalen asetik asit
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
ppm.	Milyonda bir değer
r.p.m.	Dakikadaki döngü sayısı
sp.	Cinsine ait tür
spp.	Cinsine ait türler
WPM	Lyod ve Mc Cown (1980)
WS	Wolter ve Skoog

TABLolar LİSTESİ

- Tablo 4.1. (0.0, 0.5, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak sapı ile beraber yaprak eksplantlarından elde edilen kallus değerleri.....17
- Tablo 4.2. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kallus değerleri.....19
- Tablo 4.3. *İn vitro*'da *Paulownia tomentosa* tohumlarının MS (1962) bazal ortamı (%3 sakkaroz içeren) ve ½ MS ortamı (%1 sakkaroz içeren)'nda çimlenme yüzdeleri.....21
- Tablo 4.4. (0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 5.0 , 7.0 mg/l) düzeylerinde NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen kallus değerleri.....29
- Tablo 4.5. (0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 5.0 , 7.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve Kinetin içeren MS Ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen kallus değerleri.....33

1.GİRİŞ

Son yıllarda geniş uygulama alanı bulan, bitki doku kültürü yöntemleri, genel olarak aseptik koşullarda yapay ortamlar üzerinde bitki doku, organ, hücre ve protoplastlarının kültüre alınmasını içerir. Bu amaçla, bitki hücrelerinin totipotens özelliklerinden yararlanır. Bitki doku kültürü günümüzde tarım, orman ve süs bitkilerinin patojenlerden arındırılmasında, klonal çoğaltılmasında ve daha önemlisi bitki genetik mühendisliğinde geniş uygulama alanı bulan yöntemlerden birisi olmuştur (Pierik, 1997; Babaoğlu, 2001). Doku kültürü yöntemleri, bitkilerin vejetatif olarak çoğaltılmasına alternatif olarak bir çok tekniklerin kullanılmasını sağlayacak avantajlar sunmaktadır. En önemlisi, aseptik koşullarda klonal çoğaltmayı olası kılarak, kısa bir sürede, küçük bir alanda bir bitki doku parçasından, çok fazla oranda ismine doğru bitkinin elde edilebilmesidir (Pierik, 1997; Babaoğlu, 2001).

In vitro bitki doku ve hücre kültürü tekniklerindeki gelişmeler hastalık ve ekstrem koşullara dayanıklı bireyler geliştirilmesinde yeni olanaklar sağlamıştır (Grosser, 1985). Çok sayıda bitki hücresinin selektif agent olarak kullanılan stres faktörleri ile (hastalık etmeni mikroorganizmaların toksinleri, herbisitler, düşük sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları vb.) muamelesi sonucu bitki dokusunu oluşturan hücreler arasında var olan veya *in vitro* koşullarında uygulanan stres faktörlerinin etkisi ile ortaya çıkan mutant doku ve hücre hatlarının seçimi mümkün olabilmektedir. Böylece stres faktörlerine tolerant veya dayanıklı bireylerin seçimi tamamen laboratuvar koşullarında daha güvenilir ve daha kısa zamanda gerçekleştirilmektedir (Wenzel vd., 1984). Ayrıca yine son yıllarda bitki protoplast kültürleri ve füzyonu çalışmalarındaki hızlı gelişmeler, eşeyssel melezlemede karşılaşılan güçlükleri aşmada büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Protoplast füzyonu ile aralarında eşeyssel açıdan melezleme sorunu olan bitkilerde, somatik hibridizasyonla hibrit bitkiler elde edilebilmektedir (Dix, 1990). Protoplast kültürlerinin yeni bitkilerin geliştirilmesindeki katkısı, sadece somatik hibridizasyon ile klasik melezlemede karşılaşılan güçlüklerle çözüm getirmesi olmayıp, bunlardan daha ilginç olanı, rekombinant-DNA teknolojisi ve organel transferinde de kullanılmasıdır. Bir

bitkiden izole edilen DNA, fiziksel ve kimyasal yöntemlere bir diğer bitkiden elde edilen protoplastlara aktarılabilmekte ve somaklonal varyant bitkiler elde edilebilmektedir (De le Pena vd., 1987; Rhodes vd., 1988).

In vitro doku kültürü teknolojisinin bitki üretimi ve ıslahında kullanılabilirliği kültüre alınan hücre veya dokulardan yüksek oranda embriyo gelişimine bağlıdır. Ayrıca doku kültürlerinde embriyo gelişimini etkileyen faktörlerin (ortamın bileşimi, ışık ve ısı dereceleri, kullanılacak doku tipi, ortamın hormon kombinasyonu) kesin olarak belirlenmesi gereklidir (Murashige ve Skoog, 1962; Thorpe vd., 1991). Odunsu bitkilerinin doku kültürü ile üretimi direk somatik embriyogenesis veya kallus aracılığı ile embriyogenesis (dolaylı yöntem) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Thorpe vd., 1991). Bununla birlikte somaklonal varyasyonun artmasına neden olduğu için klonal çoğaltmada dolaylı yöntem tercih edilmemektedir (Marcotrigiano ve Jagannatham, 1988). Bu nedenle çok sayıda bitki üretimi amacı ile direk olarak morfogenez oluşumunun meydana gelmesi istenmektedir.

Paulownia cinsine ait türlerinin klasik yöntemler kullanılarak üretimi zor ve zaman alıcıdır ayrıca tohumların çimlenme oranı *in vivo* koşullarında oldukça düşüktür (Bergman ve Moon, 1997). Bu nedenler ile *in vitro* doku kültürü yöntemleri kullanılarak küçük bir alanda, fazla miktarda ve ismine doğru bitkilerin yetiştirilmesi üzerinde bazı araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Rao vd., 1996; Bergman ve Moon, 1997).

Somatik embriyogenesis bir çok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızlı klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda embriyo üretebilir. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden alınan kısıtlı miktardaki materyale bağlı olan çelikle çoğaltım karşısında çok büyük bir avantaja sahip olmaktadır. Somatik embriyoların dölllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettiklerinden dolayı klon oluştururlar (Parrott vd., 1993). Yapılan bu çalışma ile klasik yöntemler kullanılarak üretimi zor ve zaman alıcı olan *Paulownia tomentosa* Steud.'nın *in vitro* doku kültürü yöntemleri kullanılarak kısa bir zaman sürecinde, çok sayıda ve ismine doğru bitkilerin üretilmesi amaçlanmıştır.

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'ın gerçekleştirmediği , “bitki hücrelerini sürekli kültüre alma” Haberlandt'ın öğrencilerinden, Kotte ve Robbins tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilmiştir. 1934 yılında White tarafından, domates kök ucu parçaları kültüre alınmış, böylece bitki doku ve hücrelerinin kültüre alınabileceği kanıtlanmıştır. Nobecourt (1938) ve Gautheret (1938), birbirinden habersiz olarak havuçta, White (1939) tütünde kallus kültürlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu safhadan sonra, daha çok yapay ortamların gerçekleştirilmesi üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmüş, Murashige ve Skoog vd. (1962) günümüzde en fazla kullanılan doku kültürü ortamını gerçekleştirdiler. En büyük aşama, Muir vd. (1954) tarafından hücre süspansiyon kültürlerinin geliştirilmesi olmuştur. Street (1977) hücre veya süspansiyon kültürünü, “hücre veya hücre topluluklarının sallanan sıvı bir ortamda çoğaltılması” olarak açıklamış, bu gelişme, kompleks bitki hücrelerine, birçok mikrobiyal tekniklerin uygulanabilmesi olanağı sağlamıştır. Hücrenin totipotens özelliğinden faydalanarak, bir hücreden yeni bitki elde etme amacıyla ilk aşamalar, Bergmann (1960) tarafından hücrelerin katı ortam üzerine yayılarak, tek hücreden kallus elde etme çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Önemli diğer bir aşama genetik çalışmalar için haploit homozigot hücrelerin elde edilmesidir. Bu konuda Bourgin ve Nitsch (1967), ilk defa haploit bitkileri elde etmişlerdir.

Protoplast adı verilen duvarı olmayan hücrelerin izole edilmesi, doku kültürü tekniklerinde yeni bir dal ortaya çıkarmıştır. 20. yüzyılın başlarında Kuester (1909) hücre füzyonunu gözlemiştir. Protoplastlardan tüm bitkilerin elde edilebileceğinin gösterilmesi (Takebe vd., 1971), hücre araştırmaları sahasında yeni bir gelişmenin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu aşamadan sonra, en önemli adım, protoplastların birleştirilmesi olmuştur. Bu şekilde elde edilmiş olan hibrit hücreler

ilk defa tütünde (*Nicotiana glauca* + *N. Langsdoffi*) Carlson vd., (1972) tarafından gerçekleştirilmiştir. (Bhojwani ve Razdan, 1983).

Günümüzde bu konularda çok fazla çalışma yapılmakta ve doku kültürü teknikleri biyoteknolojide geniş kullanım olanakları bulmaktadır. Doku kültürleri, klonal bitki üretimi amacı ile kullanım olanaklarına sahip olduğu gibi, kültüre alınan hücrelerde meydana gelen somaklonal varyasyondan faydalanılmakta, ayrıca, mutagen uygulaması yapılarak hastalık ve stres faktörlerine dayanıklı bireyler elde edilebilmektedir. Bu konularda, *Paulownia* spp.'lerle, Amerika, Japonya, Singapur, Çin gibi ülkeler çalışmaktadırlar (Rao vd., 1996).

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi döllenmiş yumurta hücresi ile sınırlı değildir. *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). Somatik ve zigotik embriyogenesis arasındaki asıl önemli fark elde edilme yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyo döllenmiş bir zigottan geliştiğinden dolayı, elde edilen bitkiler potansiyel olarak açılma gösterirler. Öte yandan, bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluştururlar (Bournman, 1994). Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerde somatik embriyolar da globular, kalp, torpido ve kotiledon oluşum safhasını geçirirler (De Jong vd., 1993). Somatik embriyolar gövde-kök eksenine sahip olup, asıl doku ile vasküler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong vd., 1993).

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir (Steward vd., 1958). Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değişik bitki kısımları kullanılabilir. Ancak, olgunlaşmamış zigotik embriyolar somatik embriyogenesis için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bunun nedeni ise, zigotik embriyoların embriyogenik gelişme için gerekli olan genleri aktif hale getirdiklerine inanılmaktadır (De Jong vd., 1993; Parrott vd., 1993). Somatik embriyogenesis hızlı çoğaltımda, sentetik tohum üretiminde ve gen aktarımında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak, eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme

düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre şartları gibi etmenler somatik embriyogenesisi önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir (Babaoğlu vd., 2001).

In vitro çalışmalarda kullanılan başlangıç bitki parçası eksplant olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyogenesinin başarısında eksplant seçimi son derece önemli olmaktadır (Tisserat, 1991). Yüksek oranda başarı için eksplantın hızlı hücre bölünmesine sahip iyi gelişen, sağlıklı bitkilerden alınması gereklidir. Olgun ve yüksek oranda organize olmuş dokuların embriyogenesis kapasiteleri son derece düşük olmaktadır. Eksplant uygun gelişme fizyolojisindeki bitkilerden alındığı takdirde bir çok bitki kısmı somatik embriyogenesis için kullanılabilir. Ancak, genç doku ve organlar genellikle yaşlı doku ve organlardan daha başarılı olmaktadır. Eksplant alınacak bitkilerin yetiştirme şartları da embriyogenesinin 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*'da gelişen bitkilerden alınan eksplantlardan da yüksek oranda başarı sağlanabilmektedir (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 kabiliyetleri farklı olmaktadır (Parrott vd., 1993).

Bitki büyüme düzenleyicileri doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Tür ve çeşitlere göre değişmekle birlikte uygun olmayan konsantrasyonlarda 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 hormonlardır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere genel olarak hepsine bitki büyüme düzenleyicileri adı verilmektedir. En çok kullanılanlar oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir (Pierik, 1997; Babaoğlu vd., 2001).

Oksinler; fotoperiyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidirler. Oksinler doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve

somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlayabilirler. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Temel hormon formu IAA (indol-3-asetik asit)'tir. Sentetik oksinler arasında NAA (Naphtalen asetik asit), IBA (İndol butirik asit), 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) ve Piklorom sayılabilir (Pierik, 1997; Babaoğlu vd., 2001).

En çok kullanılan sitokininler adenin (aminopürin) türevleridir. Bunlar içinde de BAP (6-Benzylaminopurine) en çok kullanılanıdır. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (re-differentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup (Smith, 1992), antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler.

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovul kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesisi ve yan kök oluşumunu engellerler. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi artırırlar (Pierik, 1997; Babaoğlu vd., 2001).

Absisik asit; strese maruz kalmış yapraklarda, dormant tomurcuklarda ve tohumlarda bulunur. 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 somatik embriyo oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kültür kaplarındaki oksijen/karbondioksit ve diğer gazların yoğunluğu da başarıda etkili olmaktadır. Bitki türüne bağlı olmakla beraber en yüksek oranda embriyo gelişimi 24 –26 °C 'de gerçekleşmektedir (Pierik, 1997; Babaoğlu vd., 2001)

Bitki türü, kullanılan eksplant ve besin ortamının içeriğine bağlı olarak embriyogenesis direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Direkt somatik embriyogenesis de somatik embriyolar ara bir kallus safhası olmadan eksplant doku üzerinde bulunan tek bir hücre veya hücre gruplarından gelişirler. Direkt embriyogenesis için en fazla kullanılan eksplant olgunlaşmamış somatik embriyolardır (Finer, 1995). Bu eksplantlarda uygun bir fizyolojik gelişme

safhasında olmalıdır. Genellikle tozlanmadan 14 -15 gün sonra izole edilen zigotik embriyolar üzerinde en yüksek oranda somatik embriyo oluşumu gözlenmektedir (Finer, 1995). İndirekt embriyogenesis ise kallus oluştuktan sonra yeni embriyoların oluşumudur.

Paulownia spp. Scrophulariales ordosu içerisindeki Scrophulariaceae familyasına bağlıdır ve 9 farklı türü bulunmaktadır (Zhu vd., 1986). Anavatanı Çin olan *Paulownia* spp., Japonya, Avustralya, Brezilya, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yetiştirilmektedir. Çok hızlı büyüyen, derin kök sistemine sahip (kazık veya saçak köklü), sonbaharda yapraklarını döken, iri yapraklı ve düzgün gövdeli bir ağaçtır (Şekil 2.1). Yetişkin ağacın boyu 15 - 20 m'yi bulur. Ortalama ömrü 70 yılın üzerindedir. İlk büyüme mevsiminde boyu 4-7 m'ye kadar uzar. 22° - 40° enlemler arasında -25°C - +50° C sıcaklık aralığında yetişir. Kumlu, çakıllı topraktan orta derecede killi topraklara kadar, geniş bir aralıkta yetişir. En sevdiği verimli ve kumlu topraktır. Sadece killi ve çok su tutan topraklarda yetişmezler. Toprak altı su seviyesinin 2 m'nin altında olması gerekir. pH değeri 5.0 - 8.5 arası topraklarda yetişirler. En uygun pH değeri 6.0 - 7.0 arasındadır. Toprak tuzluluk oranı 1000 ppm'i geçmemelidir (<http://www.paulownia.gen.tr/paulownia.nsf/main>).



Şekil 2.1. Beş yaşındaki *Paulownia tomentosa* Steud. bitkisinin Gaziantep ili Mayıs ayındaki görüntüsü

Bitki 3 yıl gibi kısa bir sürede fide halinden 5-7 metre uzunluğa ulaşması, yapraklarının besin değerinin yüksek olması ve böylelikle tarım için gübre, hayvanlar için yem olarak kullanılması, hoş kokulu beyaz ve leylak rengi karışımındaki çiçeklerinden dolayı süs bitkisi ve arıcılıkta kullanım olanaklarının bulunması, kerestesinin hafif ve dayanıklı olması, erozyonu önlemesi, hava kirliliğini azaltması, dikili olduğu toprakların nitrojen değerini yükselterek verimin artmasına neden olması ve geniş iklim koşullarına adapte olması gibi nedenler ile ülkemizde de son 4-5 yıldır yetiştiriciliği yapılmaktadır (<http://www.paulownia.cjb.net>; <http://www.bitinya.net/sayfa3.htm>). Bu özelliklerin yanı sıra bir hektar *Paulownia* spp. yılda 6 kg atmosferik kükürt emme kabiliyetine sahiptir (<http://www.paulownia.gen.tr/paulownia.nsf>). Amerika Birleşik Devletlerinde en yaygın olarak yetiştirilen tür *P. tomentosa* (Hemmerly, 1989) olup *P. elongata* S.Y.Hu., *P. fortunei* Hemsl., *P. taiwaniana* T.W.Hu. (Ho vd., 1988) ve *P. catalpifolia* T.Gong. (Song vd., 1991) ekonomik öneme sahip diğer türler olarak belirtilmektedir. Tüm türler arasındaki genel görüntü benzer olmakla birlikte yaprak boyutları, şekilleri ve çiçek renkleri farklılıklar göstermektedir.

P. tomentosa'nın gövdesi diğer türlerden daha kısa sürede odun dokusunu geliştirir ve kabuklanır. Bu nedenle diğerlerinden daha düşük sıcaklıklara dayanabilir. Diğer

türler ise kabuk yapısını ilk yıl tam olarak geliştiremediğinden, ilk kış olabilecek bir don olayından hasar görür ve kurur (<http://www.paulownia.gen.tr/paulownia.nsf/main>).

P.kawakamii Ho., *P.tomentosa* ve *P.tomentosa* × *P.fortunei*'nin yaprak eksplantları kullanılarak direk sürgün oluşumu sağlamak amacı ile yapılan çalışmalarda optimum kültür ortamı, 10 µM IAA + 50µM BA ilaveli MS ortamı olarak tespit edilmiştir. Her yaprak eksplantından 4 ay kültüre alma periyodundan sonra 40'ın üzerinde sürgün elde edilmiştir. Yaklaşık 1 cm uzunluğundaki sürgünler MS ortamında alt kültüre alınmış ve sürgünlerden kök gelişimi gözlenmiştir. Köklenen bitkiler toprağa aktarılmıştır (Rao vd., 1996).

P.cv. Henan 1, *P.fortunei* ve *P. elongata*'nın yaprak lamina ve petiollerinden *in vitro*'da yan sürgün oluşumu araştırılmıştır. Çalışmaların sonucunda tamamen büyümüş, koyu yeşil, kalın yaşlı yapraklar (olgunlaşmış yapraklar); genç yapraklardan daha sağlıklı ve daha büyük kallus ve sürgün oluşumu göstermiştir. Yan sürgün oluşumu için çeşitli büyüklüklerde 10 klon kullanılmıştır. Her bir laminanın merkezinden tek bir eksplant kültüre alındığı zaman, *Henan 1* ve *P. elongata* benzer sürgün oluşumu göstermiştir ve her iki türün de *P. fortunei*'den daha verimli olduğu gözlenmiştir. *P. elongata* ve *Henan 1*'den yaprak aracılığıyla sürgün oluşumunda 3 şerit olarak kesilen lamina ve yarım kesilen petioller, bütün yaprak petiol ve laminasından daha çok gelişme göstermiştir. Klonlar arasında maksimum sürgün oluşumu için gerekli hormon konsantrasyonlarının farklı olduğu fakat hepsinde 0,2 ya da 0,5 mg/l NAA ve 5,0 ya da 7 mg/l BAP gerekli olduğu saptanmıştır. 4 hafta sonunda yan sürgün oluşumu sayısının ortalama 2, *Henan 1*'de 63, *P. elongata*'da ise 48 olduğu gözlenmiştir (Bergmann ve Moon, 1997).

Olgun *P. catalpifolia*'nın meristem kültürlerinden eksplant alınarak MS ortamının kullanıldığı bir çalışmada yaprak ve petiol eksplantlarına Kinetin ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarında 15 kombinasyon uygulanmıştır. 10 gün sonunda kültürde sürgün başlangıcı gözlenmiştir. NAA'nın bulunmadığı ortamlarda kök oluşumu gözlenmemiştir. Genel olarak eksplantlar aracılığıyla 1 ve 3 sürgün, maksimum ise 7 sürgün oluşmuştur. En iyi sürgün oluşumu 0,5 mg/l NAA ve 8 mg/l Kinetin içeren MS ortamında sağlanmıştır (Song vd., 1991).

P. fortunei'nin *in vitro*'da büyüyen sürgünlerinin kullanıldığı bir çalışmada yaprak petiollerinin son kısımlarından elde edilen eksplantlardan hızlı rejenerasyonla çok sayıda sürgün elde edilmiştir. 20 μ M BAP ve 4 μ M NAA ilave edilmiş MS ortamında optimum sürgün oluşumu sağlanmıştır. Kültürde 7 gün sonunda çoğunlukla petiollerin son kısımlarından kesilen eksplantların % 80'inden fazlasında sürgün tomurcuğu gözlenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda petiollerin epidermal ve alt epidermal dokularında direk sürgün gelişimi olduğu saptanmıştır. Sürgün gelişimini yükseltmek için her 2 hafta da bir eksplantlar yeni ortama aktarılmış ve 13 hafta sonunda eksplantlardan 43 sürgün elde edilmiştir. Çalışma sonunda köklendirilen sürgünler turba karışımı saksılara aktarılmıştır (Rao vd., 1993).

BAP ve NAA ilave edilen MS ortamında, aseptik koşullarda kültüre alınan *P. elongata*'nın 2 aylık fidelerinin yapraklarından, internodlarından, nodlarından ve sürgün uçlarından elde edilen eksplantlar kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunda 0,1 mg/l NAA ve 0,5 mg/l BA ilaveli ortamlarda yaprak kallusundan en iyi sürgün üretimi sağlanmıştır (25 mm² segmentten 50 sürgün oluşmuştur). 30 gün sonunda, sürgün üretiminde, 1 mg/l BA içeren ortamda, sürgün uçlarının kültüre alınması sonucunda 9,7 kat çoğalma ortaya çıkmıştır. Üretilen sürgünler hormonlar olmaksızın MS ortamında köklendirilmiştir (Chang ve Donald, 1992).

Dört *Paulownia* türünün farklı eksplantlarının organogenetik kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada *P. fortunei*'nin , *P. tomentosa*'nın ve *P. taiwaniana* T.W.Hu. (*P. fortunei* \times *P. kawakamii*) 'nin organogenesis gösterdiği saptanmıştır (Ho vd., 1994).

P. taiwaniana'nın yumru kültürlerinde bakım ve yenileme amaçlı bir çalışmada *P. taiwaniana*'nın yumru kültürleri düzenli alt kültürler ile 1 yılı aşkın bir süre devam etmiştir. Yaprak eksplantlarından güçlü kallus kümeleri 3 mg/l IBA ve 3 mg/l BA ilaveli MS ortamında oluşmuştur. 6 haftada yumru kültürlerden üretilen kalluslar, 130 r.p.m. çalkalayıcıda IBA ve BA konsantrasyonları içeren MS sıvı ortamına transfer edilmiştir. Sonuç olarak 3 aylık alt kültürlerden elde edilen örnekler 1 yıl sonunda da büyümelerine devam etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında büyüme evrelerinde hücre farklılıkları ve vasküler organizasyonlar araştırılmıştır. İlk birkaç

alt kültürde yumru oluşturma yeteneği sürdürülmüş fakat devam eden alt kültürler boyunca kaybedilmiştir (Ho vd., 1994).

Meristem kültürü amaçlı bir çalışmada 7 *Paulownia* türünün 1 veya 2 yetişkin ağacından (12-18 m yüksekliğinde, 22-38 cm çapında) yaklaşık 0,5 mm uzunluğunda meristemler alınmış ve meristem kültürü için tüplerin optimum kültür ortamı araştırılmıştır (Bu ortamlar MS , WPM ve WS). *P. tomentosa*, *P. glabrata* Rehder. ve *P. taiwania* eksplantlarının kültürde 30 gün sonunda en iyi dayanıklılık hızı gösterdiği ortamlar MS, ve WPM olarak saptanmıştır. Benzer araştırmalar ile *P. fortunei* ve *P. coreana* Uyeki. içinde en ideal ortamların MS ve BTM olduğu gözlenmiştir. *P. kawakamii* ve *P. elongata* için araştırma yapılmamıştır. Aynı ortamda alt kültürlerden 30 gün sonunda WPM ortamında *P. glabrata* ve *P. tomentosa*'nın daha büyük sürgün oluşturduğu kaydedilmiştir (Song vd., 1989).

Mikroçoğaltım ile gelişen *P. elongata* sürgünlerini köklendirmek için yapılan bir çalışmada sürgünler MS bazal ortamında köklendirilmiş fakat 10 gün boyunca 0,2 mg/lt NAA ve 0,4 mg/lt IBA içeren ortamda daha kısa sürede ve çok sayıda köklenme meydana gelmiştir ve kısa kökler kolaylıkla seralara transfer edilmiştir. 1,1 veya 2,0 cm yüksekliğindeki sürgünlerin daha uzun olan sürgünlerden daha elverişli olduğu saptanmıştır (Bergmann ve Whetten, 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Araştırmalarda *P. tomentosa* Steud. 'nın *in vitro*'da ve *in vivo*'da yetiştirilen tohum, yaprak, yaprak sapı, gövde ve kök eksplantları kullanılmıştır. Bitki materyali Gaziantep Üniversitesi kampüsünden 2001 yılı Eylül-Kasım ayları arasında temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Calbiochem, Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir

3.1.2.1. Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Bütün çalışmalarda Murashige ve Skoog (1962)-MS doku kültürü ortamı kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve bu kimyasalların kullanılan miktarları Ek.1 de verilmiştir.

3.1.2.2. Kültür ortamlarına sonradan ilave edilen hormonlar

a) Sitokininler

6-Benzylaminopurine (BAP, $C_{12}H_{11}N_5$)

6-Furfurylaminopurine (Kinetin, $C_{10}H_9N_5O$)

b) Oksinler

Naphthalene acetic acide (NAA, $C_{12}H_{10}O_2$)

Indole 3- acetic acide (IAA, $C_{10}H_9NO_2$)

3.1.3.Kullanılan Cihazlar

Sterio Zoom Trinoküler Araştırma Mikroskobu (Soif SQF-D)

Fuji Film Fotoğraf Makinesi (S602 Zoom)

3.2.Yöntem

3.2.1. Kültür ortamlarının hazırlanması

3.2.1.1. MS ortamının hazırlanması

Ek.2.'de verilen oranlarda A, B, D stok solüsyon grubundaki kimyasallar tartılmış ve dH₂O ile çözülerek üzerileri 100 ml'ye tamamlanmıştır. Stok C'nin hazırlanmasında ise FeSO₄. 7H₂O belirtilen oranda tartılmış ve 90 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Bu çözelti karıştırılarak ısıtılmış ve açık sarı-berrak bir solüsyon haline getirilmiştir. Daha sonra Na₂EDTA-2H₂O (Titriplex) ilave edilmiş, çözeltinin tamamı dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve pH 5.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok solüsyonlar belirli aralıklar ile kontrol edilmiş ve herhangi bir mikrobiyal bulaşıklık saptandığında yeniden hazırlanmıştır. 1 litre kültür ortamının hazırlanması için stok solüsyonlardan 10'ar ml ve Ek.3.'de verilen kimyasallardan da (agar hariç) belirtilen oranlarda alınarak çözelti, saf su ile 1 l' ye tamamlanmıştır. pH 1M NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5,7 ye ayarlanmıştır. Son olarak agar ilave edilmiştir (Can vd., 1992 a; Koç ve Can., 1992).

3.2.1.2. Hormonların hazırlanması

Hormonlar stoklar halinde hazırlanmıştır. Kullanılan oranlarda tartılan hormonlar 1M NaOH ile çözüldükten sonra saf su ile istenilen miktara tamamlanmıştır. Hormonlar ortama agar ilave edilmeden ve pH ayarlanmadan önce ilave edilmiştir (Can vd., 1992 a)

3.2.1.3. Sterilizasyon

Ortamlar 1 atm. basınçta 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Can vd., 1992 b).

3.2.2.Somatik embriyogenesis çalışmaları

3.2.2.1. *İn vivo*'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis çalışmaları

3.2.2.1.1. Bitkilerin sterilizasyonu ve hormon kombinasyonları

Sterilant olarak %70'lik etil alkol ve içerisinde 2-3 damla Tween-20 bulunan %5'lik sodyum hipoklorid kullanılmıştır. Yaprak petiol ve laminası yarım saat akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Sonra %70'lik alkol içerisinde 10 saniye bekletildikten sonra %5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 8 dakika bekletilmiştir. Bu işlemlerin arkasından bitki materyalleri 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir ve içerisinde steril kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınarak, kültüre alınmak üzere hazır hale getirilmiştir (Can vd., 1992 a; Koç vd., 1992).

Somatik embriyogenesisi teşvik etmek amacı ile yaprak ve yaprak sapı eksplantları, farklı oksin ve sitokinin kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Hazır MS (Sigma) (%3 sakkaroz) ve stok solüsyonlardan hazırlanan MS ortamlarına, IAA/BAP hormonları (0.0, 0.5, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 mg/l) düzeylerinde kombine edilerek yaprak sapı ile beraber yaprak eksplantlarından, NAA/BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde kombine edilerek yaprak sapı eksplantlarından somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Kültürler 26 ± 2 °C de, 16 saat ışık 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 4 – 8 hafta sonra yapılmıştır.

3.2.2.2. *İn vitro*'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis çalışmaları

3.2.2.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve *in vitro*'da çimlendirilmesi

Sterilant olarak %70'lik etil alkol ve içerisinde 2-3 damla Tween-20 bulunan %5'lik sodyum hipoklorid kullanılmıştır. Tohumlar % 70'lik etil alkole daldırılıp çıkarıldıktan sonra % 5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 4 dakika bekletilmiştir. Bu işlemlerin arkasından tohumlar 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir ve içerisinde steril kurutma kağıdı bulunan steril petrilere alınarak, çimlendirilmek üzere hazır hale getirilmiştir (Can vd., 1992 b; Koç vd., 1992). Bu tohumlar içerisinde 25 ml ortam bulunan petrilere yerleştirilerek kültüre alınmıştır. Bu amaçla MS Bazal Ortamı (%3 sakkaroz içeren) ve ½ MS Ortamı (%1 sakkaroz içeren) kullanılmıştır.

Besin ortamları MS stok solüsyonlar kullanılarak hazırlanmıştır. pH'sı 1M NaOH ve 1N HCl ile 5.7' ye ayarlanan ortamlar, 1 atm.de 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Can vd., 1992 a).

3.2.2.2.2. *İn vitro*'da gelişen bitkilerin çimlendirilmesi

Bitki materyali olarak aseptik koşullarda tohumdan çimlenen bitkilerin yaprak sapı ile beraber yaprağı, üst sürgün ucu, kökü ve gövde eksplantları kullanılmıştır.

Hazır MS (Sigma) (%3 sakkaroz) ortamına, NAA/BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l), IAA/BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) ve IAA/Kinetin hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde kombine edilerek bitki eksplantlarından somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalarda Difco Bacto-Agar (8 gr/l) kullanılmıştır. Kültürler 26-28 °C de, 16 saat ışık 8 saat karanlık olan klima odalarına yerleştirilerek değerlendirmeler 6 – 8 hafta sonra yapılmıştır.

3.2.2.2.3. *İn vitro*'da gelişen bitkilerin köklendirilmesi

Embriyogenesis meydana gelmiş ve sürgün oluşturmuş eksplantların kullanılmasıyla yapılan çalışmalarda, içinde 25 ml ortam bulunan petriler içerisine bu sürgünler yerleştirilmiştir. Denemede MS ortamına (Sigma) (%3 sakkaroz) IAA/NAA hormonlar (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilmiştir. Bu çalışmada Difco Bacto-Agar (8 gr/l) kullanılmıştır.

3.2.2.2.4. *İn vitro*'da gelişen bitkilerin toprağa aktarılması

Köklendirilen sürgünler, uygun toprak koşullarını saptamak amacıyla Metil Bromid ile steril edilmiş 1:1:1 oranında hazırlanan torf, kum ve perlit karışımı saksılara aktarılmıştır. Fidelerin kökleri toprağa aktarılmadan önce 0.6 g/l oranında hazırlanan fungusit (Benomyl) çözeltisinden geçirilmiştir. Evaporasyonu önlemek için saksılar naylon torbalar içerisine koyulmuş ve naylonlar üst kısımlarından ipe bağlanmıştır. Saksılar seraya yerleştirilmiş ve naylon torbalar 1 hafta sonra açılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Somatik Embriyogenesis Çalışmaları

4.1.1. *İn vivo*'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis

Somatik embriyogenesis amacı ile yapılan ilk çalışmada stok solüsyonlardan hazırlanan MS ortamı ve Difco Bacto-Agar (8gr /l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/BAP hormonları (0.0, 0.5, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde yaprak sapı ile beraber yaprak ana damarını da içeren yaprak eksplantları 11/09/2001 tarihinde kültüre alınmış, somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Yaklaşık 4–5 hafta sonunda elde edilen sonuçlarda sadece kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışma ile ilgili sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. (0.0, 0.5, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak sapı ile beraber yaprak eksplantlarından elde edilen kallus değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/l)	Kallus
Kontrol (MS Bazal)	+
2.0 BAP	+
4.0 BAP	++
10.0 BAP	+
20.0 BAP	-
0.5 IAA	+
0.5 IAA + 2.0 BAP	+
0.5 IAA + 4.0 BAP	+
0.5 IAA + 10.0 BAP	++
0.5 IAA + 20.0 BAP	-
2.0 IAA	-
2.0 IAA +2.0 BAP	++
2.0 IAA +4.0 BAP	+++
2.0 IAA +10.0 BAP	+++
2.0 IAA +20.0 BAP	-
4.0 IAA	-
4.0 IAA +2.0 BAP	-
4.0 IAA +4.0 BAP	-
4.0 IAA +10.0 BAP	+++
4.0 IAA +20.0 BAP	-
10.0 IAA	-
10.0 IAA + 2.0 BAP	++
10.0 IAA + 4.0 BAP	+
10.0 IAA + 10.0 BAP	+++
10.0 IAA + 20.0 BAP	+

+ : 0.25 cm²

++ : 0.5 cm²

+++ : 1.0 cm²

Tablo 4.1 'de görüldüğü gibi en fazla kallus oluşumu 2.0 mg/l IAA ve 4.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l IAA ve 10.0 mg/l BAP, 4.0 mg/l IAA ve 10 mg/l BAP, 10.0 mg/l IAA ve 10.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında meydana gelmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 2.0 mg/l IAA ve 10.0 mg/l BAP içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar

Somatik embriyogenesis amacı ile yapılan diğer bir çalışmada da stok solüsyonlardan hazırlanan MS ortamı ve Difco Bacto-Agar (8gr /l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına NAA/BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde yaprak sapı eksplantları 24/10/2001 tarihinde kültüre alınmış, somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Yaklaşık 6 - 8 hafta sonunda elde edilen sonuçlarda sadece kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışma ile ilgili sonuçlar Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.2. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kallus değerleri

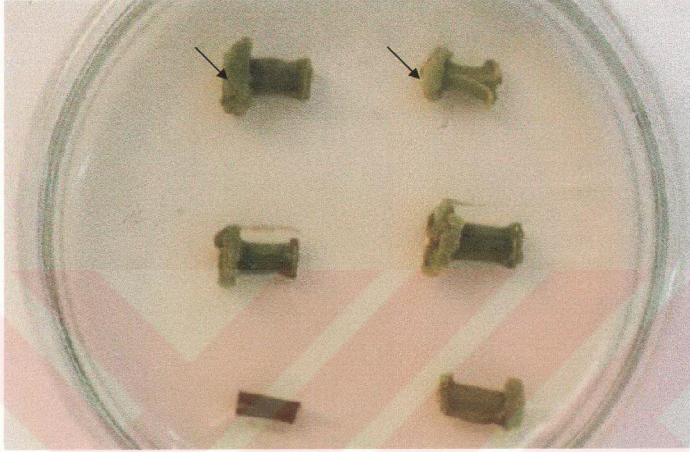
Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg / l)	Kallus
Kontrol (MS Bazal)	-
1.0 BAP	-
3.0 BAP	-
5.0 BAP	-
7.0 BAP	-
0.1 NAA	-
0.1 NAA + 1.0 BAP	-
0.1 NAA + 3.0 BAP	-
0.1 NAA + 5.0 BAP	-
0.1 NAA + 7.0 BAP	-
0.5 NAA	-
0.5 NAA + 1.0 BAP	-
0.5 NAA + 3.0 BAP	-
0.5 NAA + 5.0 BAP	-
0.5 NAA + 7.0 BAP	-
1.0 NAA	-
1.0 NAA +1.0 BAP	+
1.0 NAA +3.0 BAP	-
1.0 NAA +5.0 BAP	+
1.0 NAA +7.0 BAP	+
2.0 NAA	-
2.0 NAA +1.0 BAP	++
2.0 NAA +3.0 BAP	+++
2.0 NAA +5.0 BAP	+++
2.0 NAA +7.0 BAP	-

+ : 0.25 cm²

++ : 0.5 cm²

+++ :1.0 cm²

Tablo 4.2 'de görüldüğü gibi en fazla kallus oluşumu 2.0 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP, 2.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında meydana gelmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 2.0 mg/l IAA ve 3.0 mg/l BAP içeren MS (1962) ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak sapı eksplantından gelişen kalluslar

Somatik embriyogenesis amacı ile *in vivo*'da yetişen bitkiden alınan eksplantlar ile yapılan diğer bir çalışmada hazır MS (Sigma) ortamı (%3 sakkaroz) ve Difco Bacto-Agar (8gr /l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına NAA/BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek elde edilen ortamlar üzerinde yaprak sapı eksplantları 08-11-2001 tarihinde kültüre alınmış, somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Eksplantlarda herhangi bir gelişme kaydedilmemiş ve eksplantların karardığı gözlenmiştir.

4.1.2. *İn vitro*'da gelişen bitkilerden somatik embriyogenesis

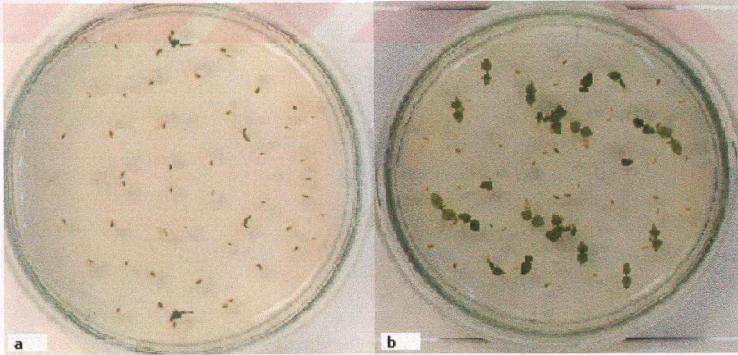
4.1.2.1. Tohumların *in vitro*'da çimlendirilmesi

Tohumların *in vitro*'da çimlendirilmesi amacı ile yapılan çalışmalarda stok solüsyonlardan hazırlanan MS (1962) Bazal Ortamı (%3 sakkaroz içeren) ve ½ MS Ortamı (%1 sakkaroz içeren) kullanılmıştır. Tohumlar 16 saat ışık 8 saat karanlık olan klima odalarında çimlendirilmiştir. 7-8 hafta sonunda yapılan değerlendirmeler, iki farklı ortama yerleştirilen tohumların çimlenme yüzdeleri Tablo 4.3. de verilmiştir.

Tablo 4.3. *İn vitro*'da *Paulownia tomentosa* tohumlarının MS (1962) bazal ortamı (%3 sakkaroz içeren) ve ½ MS ortamı (%1 sakkaroz içeren)'nda çimlenme yüzdeleri

Ortamlar	Çimlenme Yüzdeleri
MS Bazal Ortamı (%3 sakkaroz)	%20-25
½ MS Ortamı (%1 sakkaroz)	%35-40

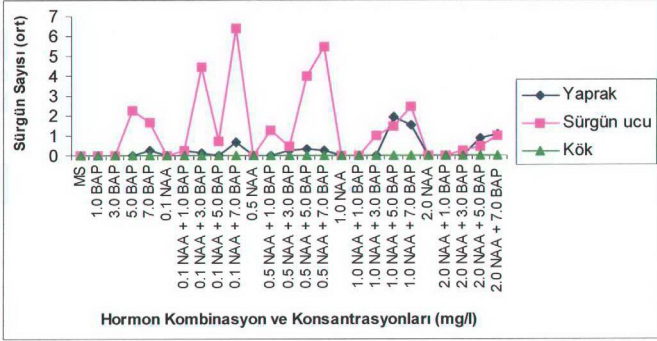
Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi tohumlar ½ MS Ortamı (%1 sakkaroz)'nda (Şekil 4.3.b) MS Bazal Ortamı (%3 sakkaroz)'na (Şekil 4.3.a) göre daha fazla çimlenme göstermiştir.



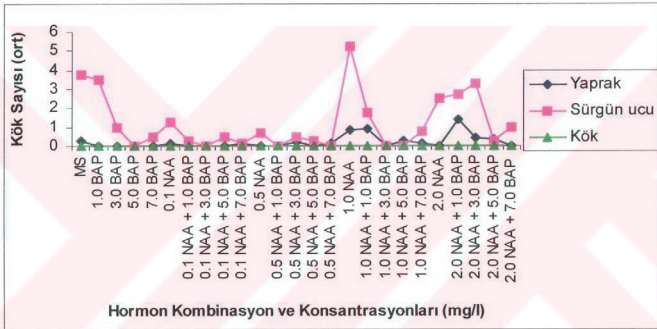
Şekil 4.3. MS (%3 sakkaroz içeren) (a) ve ½ MS (%1 sakkaroz içeren) (b) ortamlarında çimlenen tohumlar

4.1.2.2. *İn vitro*'da tohumdan çimlendirilen bitkilerden somatik embriyogenesis

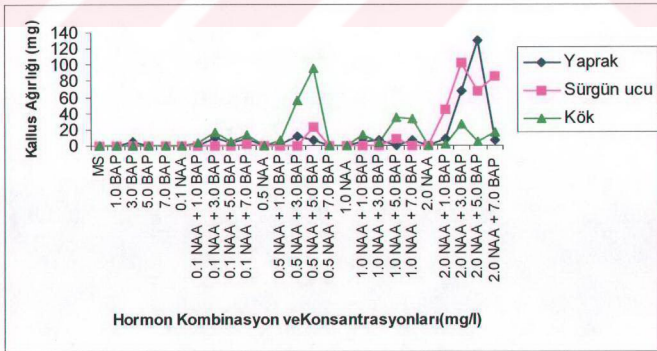
Somatik embriyogenesis amacı ile yapılan çalışmada hazır MS (Sigma) (%3 sakkaroz) ortamı ve Difco Bacto-Agar (8gr /l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına NAA/ BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek, elde edilen ortamlar üzerinde yaprak sapı ile beraber yaprak, üst sürgün ucu ve kök eksplantları 09-10-2001 tarihinde kültüre alınmış, somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Yaklaşık 7-8 hafta sonunda sonuçlar eksplantlara göre elde edilen sürgün sayısı, kök sayısı ve kallus ağırlığı olarak Şekil 4.4'de verilmiştir.



a



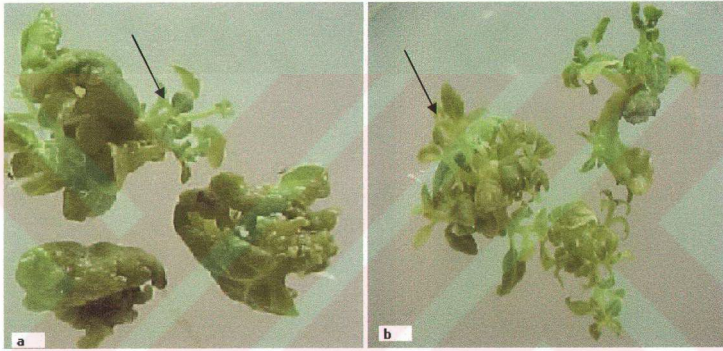
b



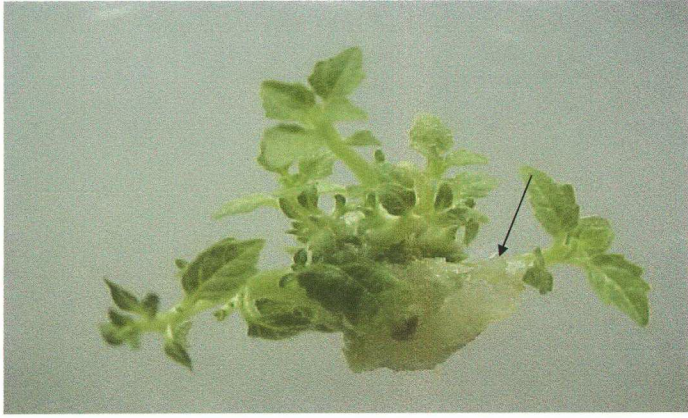
c

Şekil 4.4. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu ve kök eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı (a), kök sayısı (b) ve kallus ağırlığı (c) değerleri

Şekil 4.4. a'da görüldüğü gibi; yaprak eksplantından en fazla sayıda sürgün 1,2 adet olup 1.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP ilave edilen MS ortamından elde edilmiştir ve 6 cm ile en uzun sürgün de bu kombinasyondan sağlanmıştır (Şekil 4.5.a). Sürgün ucu eksplantından elde edilen en fazla sürgün sayısı 6,4 adet olup 0.1 mg/l NAA ve 7.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.5.b). Bu eksplanttan elde edilen en uzun sürgün ise 13 cm olup 5.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında gözlenmiştir. Kök eksplantından ise hiçbir kombinasyonda sürgün oluşumuna rastlanılmamıştır.

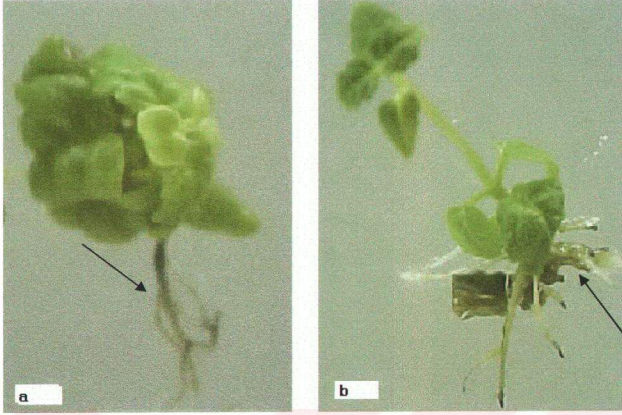


Şekil 4.5. a. 1.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen sürgünler b. 0.1 mg/l NAA ve 7.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantından direk somatik embriyogenesis ile gelişen sürgünler



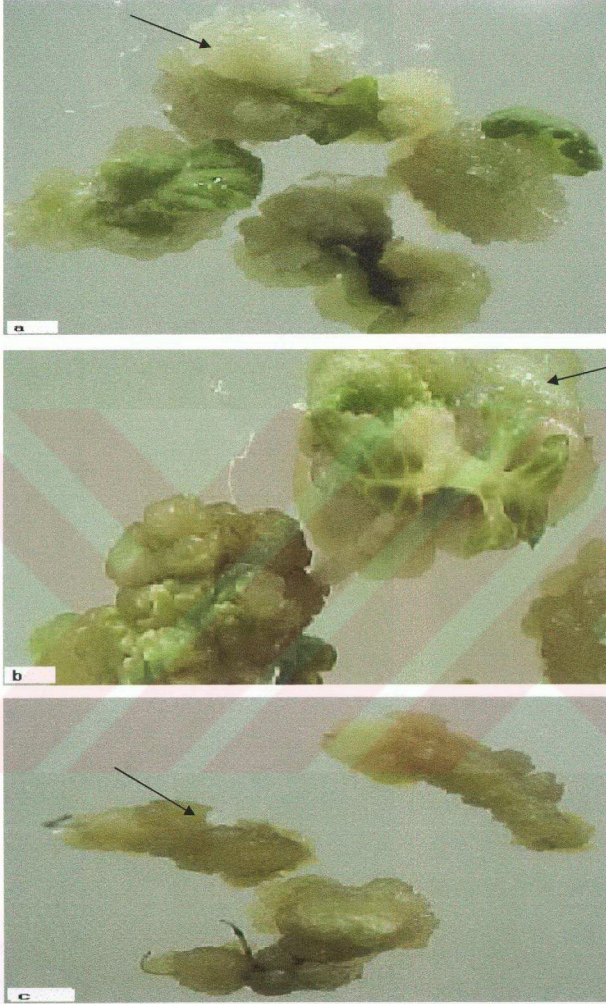
Şekil 4.6. Sürgün ucu eksplantından indirek somatik embriyogenesisle gelişen sürgünler

Şekil 4.4. b’de verildiği gibi; yaprak eksplantından en fazla sayıda kök 1,4 adet olup 2.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiş (Şekil 4.7.a), 1,9 cm ile en uzun kök gelişimi ise 2.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında sağlanmıştır. Sürgün ucu eksplantından elde edilen en fazla kök sayısı 5.3 adet olup 1.0 mg/l NAA ilave edilen MS ortamından elde edilmiş (Şekil 4.7.b), en uzun kök ise 6,25 cm ile 1.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamında sağlanmıştır. Kök eksplantında ise herhangi bir kök oluşumu gözlenmemiştir.



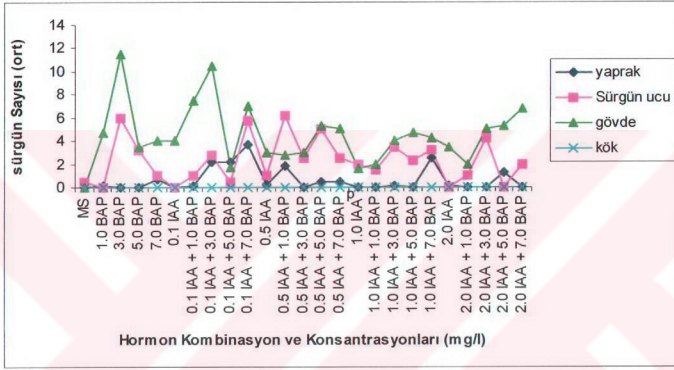
Şekil 4.7. a. 2.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kökler b. 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantından gelişen kökler

Şekil 4.4. c' de verildiği gibi ; yaprak eksplantından 129,6 gr ile 2.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren (Şekil 4.8.a) , sürgün ucu eksplantından ise 101,7 gr ile 2.0 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP ilave edilen (Şekil 4.8.b) ve kök eksplantından da 95,7 gr ile 0.5 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP ilaveli (Şekil 4.8.c) MS ortamlarından en fazla ağırlıkta kallus oluşumu sağlanmıştır.

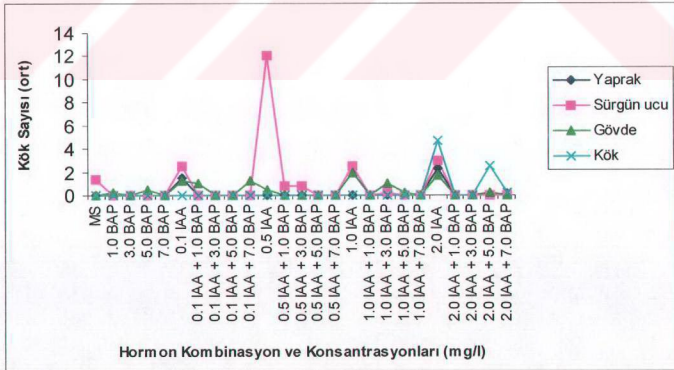


Şekil 4.8. a.2.0 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantından gelişen kallus
b.2.0 mg/l NAA ve 3.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgün ucu eksplantından gelişen kallus
c.0.5 mg/l NAA ve 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kök eksplantından gelişen kallus

Somatik embriyogenesis amacı ile yapılan diğer bir çalışmada yine hazır MS (Sigma) (%3 sakkaroz) ortamı ve Difco Bacto-Agar (8gr/l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/ BAP hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek, elde edilen ortamlar üzerinde yaprak sapı ile beraber yaprak, üst sürgün ucu, gövde ve kök eksplantları 12-02-2001 tarihinde kültüre alınmış, somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Yaklaşık 7-8 hafta sonunda sonuçlar eksplantlara göre elde edilen sürgün sayısı ve kök sayısı olarak Şekil 4.9'de, kallus oluşumu olarak da Tablo 4.4' de verilmiştir.



a



b

Şekil 4.9. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa*'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı (a) ve kök sayısı (b) değerleri

Tablo 4.4. (0,0 , 0,1 , 0,5 , 1,0 , 2,0 , 3,0 , 5,0 , 7,0 mg/l) düzeylerinde NAA ve BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen kallus değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/l)	Yaprak	Sürgün ucu	Gövde	Kök
MS BAZAL(KONTROL)	-	-	-	-
1.0 BAP	-	-	-	-
3.0 BAP	+	+	+	-
5.0 BAP	+	+	-	+
7.0 BAP	-	+	+	+
0.1 IAA	-	-	-	-
0.1 IAA + 1.0 BAP	-	-	-	+
0.1 IAA + 3.0 BAP	+	+	-	+
0.1 IAA + 5.0 BAP	+	-	-	+
0.1 IAA + 7.0 BAP	+	-	+	+
0.5 IAA	-	-	-	-
0.5 IAA + 1.0 BAP	-	-	-	+
0.5 IAA + 3.0 BAP	+	+	-	+
0.5 IAA + 5.0 BAP	+	+	-	+
0.5 IAA + 7.0 BAP	+	+	-	-
1.0 IAA	-	-	-	-
1.0 IAA + 1.0 BAP	+	+	-	+
1.0 IAA + 3.0 BAP	+	-	-	+
1.0 IAA + 5.0 BAP	+	-	-	+
1.0 IAA + 7.0 BAP	+	+	+	+
2.0 IAA	+	-	-	-
2.0 IAA + 1.0 BAP	-	-	-	+
2.0 IAA + 3.0 BAP	-	-	-	+
2.0 IAA + 5.0 BAP	+	-	+	+
2.0 IAA + 7.0 BAP	+	+	+	+

- : Kallus yok

+ : Kallus var

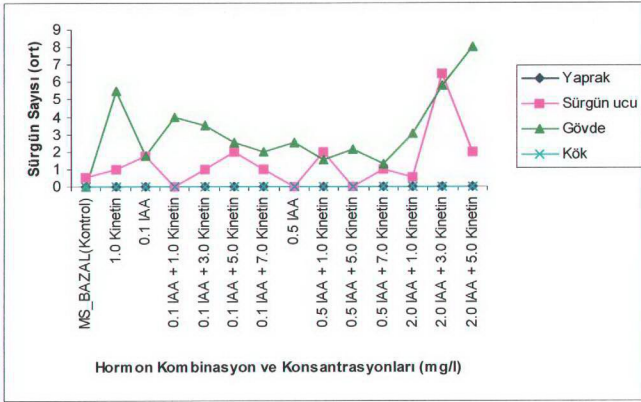
Şekil 4.9. a'da görüldüğü gibi; yaprak eksplantından en fazla sayıda elde edilen sürgün 3,6 adet olup 0.1 mg/l IAA ve 7.0 mg/l BAP ilave edilen MS ortamından elde edilmiştir ve 0.8 cm ile en uzun sürgün de 2.0 mg/l IAA ve 5.0 mg/l BAP kombinasyondan sağlanmıştır. Sürgün ucu eksplantından en fazla sayıda elde edilen sürgün 6,3 adet olup 0.5 mg/l IAA ve 5.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamından elde edilmiştir. Bu eksplanttan elde edilen en uzun sürgün ise 2 cm olup 5.0 mg/l BAP içeren MS ortamında gözlenmiştir. Gövde eksplantından ise en fazla elde edilen sürgün sayısı 11,5 adet olup 3.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamından elde edilmiştir ve 3.3 cm ile en uzun sürgün de 0.1 mg/l IAA ve 1.0 mg/l BAP ilave edilen MS ortamından sağlanmıştır (Şekil 4.10.b). Son olarak kök eksplantında ise hiçbir gelişmeye rastlanılmamıştır.



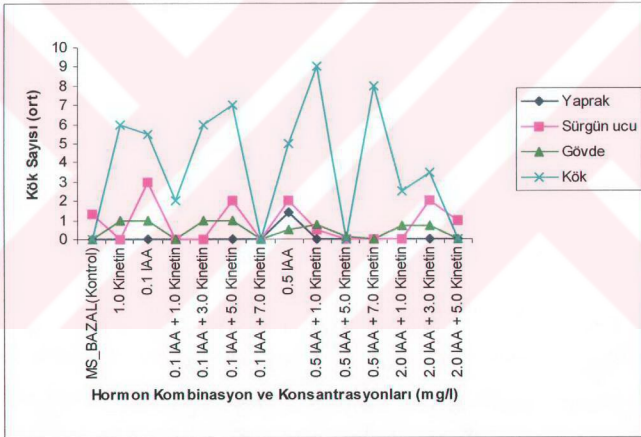
Şekil 4.10. a.Gövde eksplantından direk somatik embriyogenesis b. 3.0 mg/l BAP içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan gövde eksplantından gelişen sürgünler c. gövde eksplantından indirek somatik embriyogenesis

Şekil 4.9. b'de verildiği gibi ; yaprak eksplantından en fazla sayıda elde edilen kök 2,4 adet olup 2.0 mg/l IAA ilaveli MS ortamından elde edilmiştir ve 1,8 cm ile en uzun kök gelişimi ise 2.0 mg/l IAA içeren MS ortamında sağlanmıştır. Sürgün ucu eksplantından en fazla elde edilen kök sayısı 3 adet olup , 2.0 mg/l IAA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir , en uzun kök ise 4 cm ile 1.0 mg/l IAA ile 3.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l IAA ilave edilen MS ortamlarından sağlanmıştır. Gövde eksplantından ise en fazla elde edilen kök sayısı 2 adet olup 1.0 mg/l IAA ilaveli MS ortamından sağlanmıştır ve 3 cm ile en uzun kök 2.0 mg/l IAA ve 5.0 mg/l BAP kombinasyonundan elde edilmiştir. Diğer bir eksplant olan kökten ise en fazla sayıda elde edilen kök 4.8 adet olup 2.0 mg/l IAA içeren kombinasyondan sağlanmıştır ve 2 cm ile en uzun kök de bu kombinasyondan sağlanmıştır.

Somatik embriyogenesis amacı ile yapılan son çalışmada ise diğer iki denemede olduğu gibi hazır MS (Sigma) (%3 sakkaroz) ortamı ve Difco Bacto-Agar (8gr /l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/ Kinetin hormonları (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek, elde edilen ortamlar üzerinde yaprak sapı ile beraber yaprak, üst sürgün ucu, gövde ve kök eksplantları 27-06-2002 tarihinde kültüre alınmış, somatik embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Yaklaşık 7-8 hafta sonunda sonuçlar eksplantlara göre elde edilen sürgün sayısı ve kök sayısı olarak Şekil 4.11'de, kallus oluşumu olarak da Tablo 4.5' de verilmiştir.



a



b

Şekil 4.11. (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve Kinetin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen sürgün sayısı (a) ve kök sayısı (b) değerleri

Tablo 4.5. (0.0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 5.0 , 7.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve Kinetin içeren MS Ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* 'nın yaprak (sapı ile beraber), sürgün ucu, gövde ve kök eksplantlarından elde edilen kallus değerleri

Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonları (mg/l)	Yaprak	Sürgün ucu	Gövde	Kök
MS BAZAL(KONTROL)	-	-	-	-
1.0 Kinetin	+	+	+	+
0.1 IAA	+	-	-	+
0.1 IAA + 1.0 Kinetin	+	+	-	+
0.1 IAA + 3.0 Kinetin	-	+	-	+
0.1 IAA + 5.0 Kinetin	-	+	-	+
0.1 IAA + 7.0 Kinetin	+	+	-	-
0.5 IAA	-	-	-	-
0.5 IAA + 1.0 Kinetin	+	-	-	-
0.5 IAA + 5.0 Kinetin	+	+	+	-
0.5 IAA + 7.0 Kinetin	+	+	+	+
2.0 IAA + 1.0 Kinetin	+	+	-	-
2.0 IAA + 3.0 Kinetin	+	+	+	-
2.0 IAA + 5.0 Kinetin	+	-	+	-

- : Kallus yok

+ : Kallus var

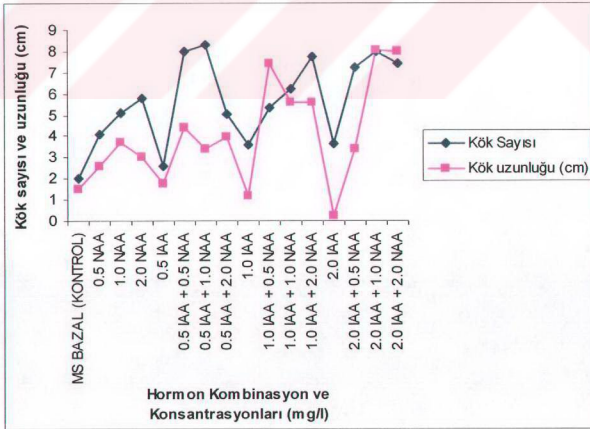
Şekil 4.11.a'da görüldüğü gibi ; yaprak ve kök eksplantlarından oluşan herhangi bir sürgün gelişimine rastlanılmamıştır. Sürgün ucu eksplantından en fazla sayıda elde edilen sürgün 6,5 adet olup 2.0 mg/l IAA ve 3.0 mg/l Kinetin içeren MS ortamından elde edilmiştir. Bu eksplanttan elde edilen en uzun sürgün ise 8 cm olup 2.0 mg/l IAA ve 5.0 mg/l Kinetin içeren MS ortamında gözlenmiştir. Gövde eksplantından ise en fazla elde edilen sürgün sayısı 8 adet olup 2.0 mg/l IAA ve 5.0 mg/l Kinetin ilaveli MS ortamından elde edilmiştir ve 6.5 cm ile en uzun sürgün de 0.1 mg/l IAA ilave edilen MS ortamından sağlanmıştır.

Şekil 4.11.b'de verildiği gibi ; yaprak eksplantından sadece 0.5 mg/l IAA içeren MS ortamında kök gelişimi gözlenmiş (1.4 adet), diğer kombinasyonlarda böyle bir

gelişime rastlanılmamıştır. Sürgün ucu eksplantından en fazla elde edilen kök sayısı 3 adet olup, 0.1 mg/l IAA ilaveli MS ortamında elde edilmiştir, en uzun kök ise 7 cm ile 0.5 mg/l IAA ve 1.0 mg/l Kinetin içeren MS ortamından sağlanmıştır. Gövde eksplantından ise en fazla elde edilen kök sayısı 1 adet olup 1.0 mg/l Kinetin, 0.1 mg/l IAA, 0.1 mg/l IAA + 3.0 mg/l Kinetin ve 0.1 mg/l IAA + 5.0 mg/l Kinetin ilave edilen MS ortamlarından sağlanmıştır ve 7.3 cm ile en uzun kök de 2.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l Kinetin kombinasyonundan elde edilmiştir. Diğer bir eksplant olan kökten ise en fazla sayıda elde edilen kök 9 adet olup 0.5 mg/l IAA + 1.0 mg/l Kinetin ilave edilen kombinasyondan sağlanmıştır ve 4.5 cm ile en uzun kök de 0.5 mg/l IAA ilaveli kombinasyondan sağlanmıştır.

4.1.2.3. *İn vitro*'da gelişen bitkilerin köklendirilmesi

Elde edilen sürgünlerin köklendirilmeleri amacı ile, MS ortamı (Sigma) (%3 sakkaroz) ve Difco Bacto-Agar (8 gr/l) kullanılmıştır. Bu amaçla MS ortamına IAA/ NAA hormonları (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) düzeylerinde ilave edilerek bu ortamlar üzerinde *in vitro*'da gelişen sürgünler 16-05-2002 tarihinde kültüre alınmıştır. Yaklaşık 7 – 8 hafta sonunda sonuçlar elde edilen kök sayısı ve kök uzunluğu olarak Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) düzeylerinde IAA ve NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan *Paulownia tomentosa* sürgünlerinden gelişen köklerin sayı ve uzunluk değerleri

Şekil 4.12'de verildiği gibi bütün kombinasyonlarda sürgünlerden kök gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.13). En fazla gelişen kök sayısı 8.33 adet olup 0.5 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir (Şekil 4.14.a). 8.07 cm ile en fazla kök uzunluğu 2.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA ilaveli MS ortamından sağlanmıştır (Şekil 4.14.b).



Şekil 4.13. IAA ve NAA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan sürgünlerinden gelişen kökler

- a. Kontrol (MS Bazal)
- c. 1.0 mg/l NAA
- e. 0.5 mg/l IAA
- g. 0.5 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA
- i. 1.0 mg/l IAA
- k. 1.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA
- m. 2.0 mg/l IAA
- o. 2.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA

- b. 0.5 mg/l NAA
- d. 2.0 mg/l NAA
- f. 0.5 mg/l IAA ve 0.5 mg/l NAA
- h. 0.5 mg/l IAA ve 2.0 mg/l NAA
- i. 1.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l NAA
- l. 1.0 mg/l IAA ve 2.0 mg/l NAA
- n. 2.0 mg/l IAA ve 0.5 mg/l NAA
- ö. 2.0 mg/l IAA ve 2.0 mg/l NAA



Şekil 4.14. 0.5 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA (a) ile 2.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l NAA (b) ortamlarında kültüre alınan sürgünlerden gelişen kökler (Sol tarafta bulunan bitkiler kontrol grubu olarak alınmıştır).

4.1.2.4. *İn vitro*'da köklenen bitkilerin toprağa aktarılması

3.2.2.2.4.'de belirtildiği şekilde hazırlanan karışımlara aktarılan köklendirilmiş sürgünler Şekil 4.15 de verilmiştir.



Şekil 4.15. Toprağa aktarılan 1 aylık *Paulownia tomentosa* bitkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki doku kültürü tekniklerinde meydana gelen gelişmeler, klonal ve non klonal bitki materyallerinin elde edilmesine olanak sağladığı gibi istenilen koşullara ayarlanabilen klima odalarında küçük bir alanda yapılabilen çalışmalar ile klasik ıslah yöntemlerinin pek çok dezavantajlarının ortadan kalkmasını mümkün hale getirmiştir. Ayrıca bu gelişmeler kültür bitkileri üzerinde genetik çalışmalar yapılmasını olası hale getirmiş, bitki patolojisi üzerinde geniş uygulama alanı bulmuş, istenilen özelliğe sahip bitkilerin rejenerasyonuna olanak sağlamıştır.

Bu çalışmada *in vitro* bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanarak *P.tomentosa*'nın üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amacın doğrultusunda bitki hücrelerinin totipotens özelliğinden faydalanılarak somatik embriyogenesis yoluyla tek bir hücreden tüm bitki elde edilmeye çalışılmıştır. *In vitro* koşullarında farklı oksin/sitokinin kombinasyonları üzerinde kültüre alınan eksplantlardan çok sayıda bitkinin rejenerasyonu yapılarak, klonal üretim sağlanabilir.

4.1.1.'de verilen sonuçlara göre *in vivo*'da yetişen bitki eksplantlarının kullanıldığı çalışmalarda sürgün oluşumu gözlenmemiş, sadece kallus gelişimi meydana gelmiştir. Bergman vd.(1997)'nin yaptıkları çalışmada ise *in vivo*'da yetişen *P.cv.Henan* , *P.fortunei* ve *P.elogata* türlerinin yaprak ve yaprak sapı eksplantları kullanılarak, 0.2-0.5 mg/l NAA ve 5.0-7.0 mg/l BAP ilave edilen MS ortamlarında maksimum düzeyde sürgün oluşumu sağlanmıştır.

Eksplant elde etmek amacı ile *P.tomentosa* tohumları iki farklı ortamda kültüre alınmış ve %3 sakkaroz içeren MS bazal ortamında %20-25 oranında çimlenme gözlenirken, %1 sakkaroz içeren ½ MS ortamında % 35-40 oranında çimlenme gözlenmiştir. BAP ile NAA hormonlarının ve *in vitro*'da gelişen bitki eksplantlarının (yaprak, sürgün ucu ve kök) kullanıldığı denemede 0.1 mg/l NAA + 7.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA + 7.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamlarında diğer kombinasyonlara oranla daha fazla sayıda sürgün, sürgün ucu eksplantından elde edilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi bu denemede düşük oranda NAA ile yüksek oranda

BAP sürgün oluşumunda daha etkili olmuştur. 0.1 mg/l NAA + 7.0 mg/l BAP ortamında sürgünler (6.41 adet) kallustan indirek olarak gelişirken, 0.5 mg/l NAA + 7.0 mg/l BAP ortamında sürgünler (5.5 adet) direk somatik embriyogenesis yoluyla gelişmişlerdir.

BAP ile IAA hormonlarının ve yine eksplant kaynağı olarak *in vitro*'da gelişen bitkilerin (yaprak, sürgün ucu, kök ve gövde) kullanıldığı diğer bir denemede 3.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IAA + 3.0 mg/l BAP içeren MS ortamlarında gövde eksplantından diğer kombinasyonlara oranla daha fazla sayıda sürgün elde edilmiştir. 3.0 mg/l BAP içeren ortamdan 11.5 adet sürgün indirek somatik embriyogenesisle, 0.1 mg/l IAA + 3.0 mg/l BAP ilaveli ortamdan ise gelişen 10.5 adet sürgün direk somatik embriyogenesis yoluyla olmuştur.

In vitro'da yetişen bitki eksplantları açısından değerlendirildiğinde kök eksplantından sürgün gelişimi gözlenmezken, yaprak, sürgün ucu ve gövde eksplantlarından sürgün elde edilmiş ve bu eksplantlar arasında da en fazla sayıda sürgünü gövde vermiştir.

Rao vd.(1996) tarafından yapılan bir çalışmada *P.kawakamii*, *P.tomentosa* ve *P.tomentosa* × *P.fortunei*'nin *in vitro*'da tohumdan çimlenen yaprak eksplantlarının kullanılması ile sürgün eldesi için optimum ortamın 50 µM BAP ve 10 µM IAA ilave edilen MS ortamı olduğu saptanmıştır. Bu ortamda her yaprak eksplantından 4 ay kültüre alma periyodundan sonra 40'ın üzerinde sürgün elde edilmiştir.*P.catalpifolia*'nın meristem kültürlerinde yaprak ve petiol eksplantlarının alınıp; MS ortamın denendiği diğer bir çalışma da sürgün gelişimi için en uygun ortamın 0.5 mg/l NAA ve 8.0 mg/l Kinetin ilave edilen MS ortamı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada her eksplanttan maksimum 7 sürgün elde edilmiştir (Song vd., 1991). Chang vd.(1992)'nin yaptığı çalışmada aseptik koşullarda kültüre alınan *P.elongata* fidelerinin yaprak, internod, nod ile sürgün uçları kullanılmış ve yaprak kallusundan 0.1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP ortamında en iyi sürgün üretimi sağlanmıştır (25mm² segmentten 50 sürgün oluşmuştur).Sürgün elde etmek amacıyla başka bir çalışmada Rao vd. (1993) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *P.fortunei*'nin *in vitro*'da büyüyen sürgünlerinin petiollerinin son kısımları kullanılarak , 20 µM BAP ve 4 µM NAA ilaveli MS ortamında çok sayıda sürgün elde edilmiştir.

Yukarıda verilen çalışmalarda farklı eksplantlar kullanılarak farklı sayıda ve miktarda hormon içeren ortamlardan değişik sayılarda sürgünler elde edilmiştir. Bu tezin kapsamında yapılan çalışmalarda ise yaprak (sapı ile beraber), gövde sürgün ucu ve kök gibi farklı eksplantlar, NAA, IAA, BAP ve Kinetin gibi hormonlarında farklı kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılmış ve bu çalışmalar sonucunda da direk sürgün oluşumunda en iyi sonucu eksplant olarak gövde, besin ortamı olarak da 0.1 mg/l IAA + 3.0 mg/l BAP ilaveli MS ortamı vermiştir. Gerek daha önce yapılan çalışmalar gerekse de bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklı sonuçlara, eksplant kaynağı açısından bakıldığında; doku kaynağı olarak kullanılan organ, organın ontogenetik ve fizyolojik yaşı, eksplantın bitkiden alındığı dönem, eksplantın büyüklüğü ve eksplantın alındığı bitkinin yetiştirme şartları (serada, tarlada ve *in vitro*'da yetiştirilmesi gibi) neden olabilir (Babaoğlu vd., 2001).Yine bunun yanı sıra kullanılan besin ortamının stoklardan hazırlanması yada hazır olarak kullanılması, farklı firmalardan elde edilen kimyasalların farklılıkları, klima odalarındaki ışığın şiddeti ve periyodu gibi çok farklı etkenler farklı sonuçlar alınmasının nedenleri arasında olabilir.

Tezin amaçları doğrultusunda yapılan çalışmalarda kallus gelişimine bütün eksplantlarda rastlanılmış, yalnız fazla miktarda kallus yaprak eksplantından, 2.0 mg/l NAA + 5.0 mg/l BAP içeren ortamda sağlanmıştır.

Chang vd. (1992)'nin *P. elongata* , Rao vd. (1996)'nin *P.kawakamii* , *P.tomentosa* ve *P.tomentosa* × *P. fortunei*'nin *in vitro*'da gelişen sürgünleri köklendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarda MS bazal ortamında sürgünlerin istenilen şekilde köklendiği sonucunu elde etmişlerdir. Bergmann ve Whetten (1998) ise *P.elongata* sürgünlerini MS bazal ortamda köklendirmiş fakat 0.2 mg/l NAA ve 0.4 mg/l IBA ilaveli MS ortamında daha kısa sürede ve çok sayıda kök geliştiğini kaydetmişlerdir. Bu tezin içeriğinde yapılan çalışmalarda ise sürgün elde etmek amacıyla farklı ortamlara yerleştirilen eksplantların bir kısmında kök gelişimi gözlenmiş , 0.5 mg/l IAA içeren ortamda ise sürgün ucu eksplantında 12 tane kök gelişerek diğer örneklere oranla daha fazla sayıda bir gelişme sağlanmıştır. Gelişen sürgünlerin köklendirilmesi için yapılan çalışmada ise 0.5 mg/l IAA içeren ortamda sadece 2.6 adet kök gelişmiştir. Aynı ortamın kullanılmasına rağmen birbirinde farklı iki sonucun elde edilmesinde , birinde sürgün ucu eksplantının kullanılması, eksplantın boyu ve bu eksplantın ortama

yatay olarak yerleştirilmesi, diğesinde ise sürgünün tamamının kullanılması, sürgünün boyu ve dikey olarak ortama yerleştirilmesi ve ayrıca doku parçalarının içerdiği endogen hormon miktarının farklı düzeylerde olmasının neden olabileceği düşünülebilir. Köklendirme çalışmalarında en fazla elde edilen kök sayısı 8 adet olup 0.5 mg/l IAA + 0.5 mg/l NAA ve 2.0 mg/l IAA + 1.0 mg/l NAA içeren ortamlarda gözlenmiştir. Yalnız gelişen köklerin uzunlukları kıyaslandığında 8.07 cm kök uzunluğu ile 2.0 mg/l IAA + 1.0 mg/l NAA ilave edilen ortam diğer ortama oranla daha elverişli olmuştur.

Şekil 4.12 de görüldüğü gibi bitkiler hiç hormon içermeyen MS bazal ortamı üzerinde de kök oluşturmuşlardır. Kök oluşumu için kültür ortamları üzerinde kültüre alınan eksplantların her zaman kök oluşturabilmeleri için oksine gerek duymayacağı bitki dokusu içerisinde endogen olarak teşekkül eden oksinlerinde köklenme de etkili olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Start ve Cumming, 1976; Cooke, 1977).

6.KAYNAKLAR

- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Eds.). (2001). *Bitki Biyoteknolojisi-1-Doku kültürü ve uygulamaları*. Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları
- Bergmann, B.A., Moon, H.K. (1997). *In vitro* adventitious shoot production in Paulownia. *Plant Cell Reports*, **16** (5), 315-319
- Bergmann, B.A., Whetten, R. (1998). *In vitro* rooting and early greenhouse growth of micropropagated *Paulownia elongata* shoots. *New Forest*, **15** (2), 127-138
- Bhojwani, S.S., and Razdan, M. K. (1983). *Plant Tissue Culture; Theory and Practice*, Elsevier-Amsderdam, Oxford, New York.
- Bourman, C.H. (1994). Micropropagation and somatic embryogenesis. In : Hayward, M.D., Bosmark, N.O. and Romagosa I. (Eds) , *Plant Breeding : Principles and Prospects*, pp.246-260, Chapman & Hall, London.
- Can, C., Koç, N.K., Çınar, A. (1992 a). Meristem kültürü tekniği ile karanfilde (*Dianthus sp.*) *in vitro* çoğaltım olanaklarının araştırılması. *Doğa Dergisi*, **16**, 641-648.
- Can, C., Koç, N.K., Çınar, A. (1992 b). *In vitro* clonal propagation of sour orange (*Citrus aurantium* var. *Brezilia*) by using epicotyl segments. *Doğa Dergisi*, **16** (1), 132-139.
- Carlson, P.S., Smith, H.H., Dearing R.D. (1972). Parasexual interspecific plant hybridisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 2292-2294.
- Chang, S.H., Donald, D.G.M. (1992). *In vitro* organogenesis and plantlet formation of *Paulownia elongata*. *South African Forestry Journal*, **163**, 27-29
- Cooke, R.L. (1977). Tissue culture propagation of African violets, *Hortscience*, **12**, 549.
- De Jong, A.J., Schmidt, E.D.L., De Vries, S.C. (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, **22**, 367-377.
- De la Pena, A., Lörz, H., Schell-J. (1987). Transgenic Plants obtained by infecting DNA into young Floral Fillers. *Nature*, **325**, 274-276.
- Dix, J. Philip. (1990). *Plant Cell Line selection. Procedures and applications*. Weinheim New Work, Borel, Cambridge.
- Finer, J.J. (1995). Direct somatic embryogenesis. In : Gamborg, O.L., Philips, G.C. (Eds.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, pp. 92-102, Springer, Berlin.

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

Grosser, J.W. (1985). Tissue culture and biotechnology: Additional research tools for Citrus improvement. *The Citrus Industry*. 33-35.

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

Hemmerly, T.E. (1989). *J. Tenn Acad. Sci.* **64** (1):5-8.

Ho, C.K., Chang, S.H., Yang, J.C. (1988). In: *Symp Tree Improv and Tiss Cult in Taiwan*, Exp For National Taiwan Univ: 97-113, Chine

Ho, C.K., Chen, S.H., Yang, J.C. (1994). Regeneration and maintenance of nodule cultures of *Paulownia taiwaniana*. *Toward enhanced and sustainable agricultural productivity in the 2000's: breeding research and biotechnology. Proceedings of SABRAO seventh international congress and WSAA symposium held at Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan, November 16-20, 1993. Volume II. Special Publication Taichung District Agricultural Improvement Station*, **35**, 523-533

Koç, N.K., Can, C. (1992). Turunçta (*Citrus aurantium L.*) kallus kültürlerinin elde edilmesinde bazı oksin, sitokin ve kültür ortamlarının etkileri. *Doğa Dergisi*, **16** (1), 148-157.

Koç, N.K., Can, C. Çınar, A. (1992). Effect of some culture media on somatic embriyogenesis and rooting in ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Doğa Dergisi*, **16** (1), 140-147.

Kuester, E. (1909). Über die Verschmelzung nachter Protoplasten, *Ber Dtsch Bot Ges*, **27**, 589-598

<http://www.bitinya.net/sayfa3.htm>

<http://www.paulownia.cjb.net>

<http://www.paulownia.gen.tr/paulownia.nsf/main>

Marcotrigiano, M., Jagannathan, L. (1988). *HortScience*, **23**, 226-227.

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). *Phsiol. Plant.*, **15**, 473-493.

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 embriyogenesis: Potantial for use in propagation and gene transfer system. In : Murray, D.R. (Eds.). *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, pp. 158-200, C.A.B International, UK.

- Pierik, R.L.M. (1987). *In vitro Culture of Higher Plants*, pp 183-230, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Pierik, R.L.M. (1997). *In vitro Culture of Higher Plants*. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Rao, C.D., Goh, C.J., Kumar, P.P. (1996). High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports*, **16** (3-4), 204-209
- Rao, C.D., Goh, C.J., Kumar, P.P. (1993). High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia fortunei*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, **29** (2), 72-76
- Rhodes, C. A., Pierce, D. A., Mettler, I. J., Mascarenhas, D., Detmer, J.J. (1988), Genetic Transformed Maize Plants from Protoplasts, *Science*, **240**, 204- 207.
- Smith, R. (1992). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. pp. 1-27, Academic Press Inc., UK.
- Song, S.L., Sato, T., Saito, A., Ohba, K. (1989). Meristematic culture of seven *Paulownia* species. *Journal of the Japanese Forestry Society*, **71** (11), 456-459
- Song, S.L., Suda, K., Ishii, K., Saito, A., Ohba, K. (1991). Plantlet regeneration from leaf and petiole explants of *in vitro* cultured *Paulownia catalpifolia*. *Journal of the Japanese Forestry Society*, **73** (1), 60-63
- Start, N.D., and Cumming, B.G. (1976). *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl., *Hortscience*, **11**, 204-206.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., Mears, K. (1958). Growth and Organized Development of Cultured Cells, II. *Organisation in Cultures Grown Freely Suspend ed Cells*. *Amer. Jour. Bot.*, **45**, 705
- Street, H.E. (1977). Plant tissue and cell culture. *Botanical Monograph*, Vol 11. University of California Pres, Berkeley, CA.
- Takabe, I., Labib, G., Melehers, G. (1971). Regeneration of wholeplants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco, *Naturwissenschaften*, **58**, 318-320
- Thorpe, T.A., Harry, I.S., Kumar, P.P. (1991). Application of micropropagation to forestry. In: Micropragation, technology and application. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (Eds.). *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, pp.311-336.
- Tisserat, B. (1991). Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Dixon, R.A. (Eds.), *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, pp. 79-105, IRL Press, Oxford.

Warren, G. (1991). The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In : Stafford, A., Warren, G. (Eds.). *Plant Cell and Tissue Culture*, pp 83-100, Open University Press, Milton Keynes.

Wenzel, G., Köhler, F., Schuhmann, R., Foroughi-Wehr, B. (1984). *In Vitro Selection Towards Resistyance in: Efficiency in Plant Breeding*, Eucarpia, Wageningen.

White, P.R. (1939). Potentially unlimited growth of excised tomato root-tips in a liquid medium, *Plant Physiol*, **9**, 585-600

Zhu, Z.H., Chao, C.J., Lu,X.Y., Xiong, Y.G. (1986). Paulownia in China: *Cultivation and utilization*. Asian Network Biol. Sci. And Intl. Dev. Res. Ctr., Singapore.



EKLER**EK 1. MS Ortamının Kimyasal Bileşenleri**

KİMYASAL	mg/lt
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	2.0
Myo-inositol	100
Sucrose	30 g/lt
Agar	8-10 gr/lt

EK 2. Stok Solüsyonlar

	Kimyasallar	Oranlar (mg/100 ml)
A-	H ₃ BO ₃	62
	KH ₂ PO ₄	1700
	KI	8.3
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.5
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.25
B-	MgSO ₄ . 7H ₂ O	3700
	MnSO ₄ .H ₂ O	169
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	86
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
C-	FeSO ₄ . 7H ₂ O	278
	Na ₂ EDTA-2H ₂ O	373
D-	Thiamine HCl	1
	Pyridoxine HCl	5
	Nicotinic HCl	5
	Glycine	20

EK 3. Sonradan İlave Edilen Kimyasallar

Kimyasal	mg/lt
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
Myo-inositol	100
Sucrose	30 g/lt
Agar	8-10 gr/lt

BU TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR;

1.Aytekin, T., Can, C., Özaslan, M., 2002. *Paulownia tomentosa*'nın *in vitro*'da çoğaltılması üzerine bazı oksin ve sitokinin'lerin etkisi. *XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 4-7 Eylül, Malatya. Sayfa: 42.

