

T. C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALEV AĞACI (*Photinia X fraseri* Dress) SÜS
BİTKİSİNİN MİKROÇOĞALTIMINDA SIVI KÜLTÜR VE
GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİNİN
KULLANIMI

TUĞÇE AKBULAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

GEBZE

2011

T. C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALEV AĞACI (*Photinia X fraseri* Dress) SÜS
BİTKİSİNİN MİKROÇOĞALTIMINDA SIVI KÜLTÜR VE
GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİNİN
KULLANIMI

TUĞÇE AKBULAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2011

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: ALEV AĞACI (*Photinia X fraseri* Dress) SÜS BİTKİSİNİN MİKROÇOĞALTIMINDA SIVI KÜLTÜR VE GEÇİCİ DALDIRMA BİYOREAKTÖR SİSTEMLERİNİN KULLANIMI.

YAZARIN ADI: TUĞÇE AKBULAK

Dünyada süs bitkilerine olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Ancak, ticari bir süs bitkisi olan alev ağacının vejetatif yollar ile çoğaltılmasında kullanılan çeliklerde köklenme sorunlarına rastlanılmaktadır. Vejetatif üretimde karşılaşılan bu zorlukların aşılmasında birçok türde bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Bu nedenle tezin amacı önemli bir ekonomik değere sahip olan alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için uygun besiyeri ve bitki büyüme düzenleyicisi içeriğinin yarı-katı kültür sisteminde belirlenmesi ve optimize edilen besiyeri içeriğinin güncel çoğaltım teknikleri olan sıvı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde de denenmesidir.

Tez kapsamında öncelikle farklı besiyertamı içerikleri [MS (Murashige ve Skoog besiyeri, 1962), WPM (Odunsu bitkilerin çoğaltım besiyertamı; Lloyd ve McCown, 1980), QL (Quoirin ve Lepoivre besiyertamı, 1977), DKW (Driver ve Kuniyuki besiyertamı, 1984)], sitokinin tipleri [BA (6-benziladenin), TDZ (Tidiazuron), KIN (Kinetin), 2-iP (2-izopentiladenin)] ve miktarları (1, 2, 4 mg l⁻¹) ve çeşitli karbon kaynakları (sukroz ve glikoz) ve miktarları (0, 15, 30 g l⁻¹) yarı-katı besiyertamında denenmiştir. Alev ağacına ait gövde uçlarından en yüksek proliferasyon (%100) ve eksplant başına en fazla gövde oluşumu (3.7) 2 mg l⁻¹ BA ve 30 g l⁻¹ sukroz ile desteklenen yarı-katı MS besiyertamında elde edilmiştir.

Aynı besiyertamı içeriğine sahip sıvı kültürlerde ise denenilen farklı çalkalama hızlarına (50, 100 ve 200 rpm) bakılmaksızın, oluşan gövdelerin tümünde vitrifikasyon elde edilmiştir. Ancak, vitrifikasyon miktarı membran taşıyıcı destek sistemi kullanılarak kısmen, gövde ucu eksplantlarının geçici daldırma biyoreaktör

sisteminde sıvı besiortamı ile 24 saatte 1 kez 16 dakikalığına temas etmesi (24s/16') ile ise büyük oranda azaltılmış ve biyoreaktörde %80 proliferasyon elde edilmiştir. Oluşan gövdelerde en yüksek köklenme (%40) 4 mg l⁻¹ IBA (İndol-3-bütirik asit) ile desteklenen yarı-katı besiortamında 1 hafta kültürleme ve sonrasında oksin içermeyen besiortamına aktarılma ile sağlanmıştır. Köklenen gövdeler daha sonra *in vivo* koşullara başarıyla iklendlendirilmişlerdir.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: USAGE OF LIQUID CULTURE AND TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR SYSTEMS IN MICROPROPAGATION OF ORNAMENTAL FRASER PHOTINIA (*Photinia x fraseri* Dress.)

AUTHOR: TUĞÇE AKBULAK

There is an increasing demand to ornamental plants all over the World. However, problems faced with the rooting of cuttings in the propagation of ornamental fraser photinia plants. Plant tissue culture techniques are used in several plant species to overcome such difficulties of vegetative production. Therefore, the aim of this thesis concerns the identification of optimum medium composition and plant growth regulator in semi-solid culture together with assessment of optimized conditions in liquid and temporary immersion culture systems for the micropropagation of economically important Fraser photinia.

Initially, different media compositions [MS (Murashige and Skoog's medium, 1962), WPM (Woody Plant Medium; Lloyd and Mcown, 1980), QL (Quoirin and Lepoivre medium, 1977) and DKW (Driver and Kuniyuki Walnut Medium, 1984)], cytokinin type [BA(6-benzyladenine), TDZ (thidiazuron), KIN (kinetin) and 2-iP (2-isopentyl adenine)] and amounts (1, 2, 4 mg l⁻¹) and various carbon sources (sucrose and glyose) and amounts (0, 15, 30 g l⁻¹) were assessed in semi-solid medium. The highest proliferation rate (100%) and the maximum number of shoots proliferated per explant (3.7) were obtained in shoot tips of fraser photinia on semi-solid MS medium supplemented with 2 mg l⁻¹ BA (6-benzyladenine) and 30 g l⁻¹ sucrose. All of the shoots cultured on liquid culture with this optimum medium composition showed vitrification irrespective of the tested different shaking speeds (50, 100, 200 rpm). However, vitrification was slightly decreased with the usage of membran raft system. Moreover, vitrification was more decreased with immersion of shoot tip explants for

16' in every 24 h (24h/16') in temporary immersion systems and indeed 80% of proliferation was obtained. The highest rooting (40%) was achieved in proliferated shoots on semi-solid medium supplemented with 4 mg l⁻¹ IBA (Indole-3-butyric acid) for 1 week followed by transfer of the microshoots to auxin-free medium. Rooted shoots were then successfully acclimatized to *in vivo* conditions.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında her zaman her türlü bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, teşvik ve özveride bulunan danışman hocam sayın **Yrd. Doç. Dr. Yelda ÖZDEN'** e; Yüksek lisans eğitimim sırasında ders aldığım GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı sayın **Prof. Dr. Füsun Gümüşel'e** ve diğer hocalarıma; deney süreci boyunca bana yardımını esirgemeyen ve istatistiksel değerlendirmelerde katkıda bulunan arkadaşım GYTE yüksek lisans öğrencilerinden **Biyolog Veysel Süzerer'e** ;deneysel çalışmalarım sırasında güler yüzleri ile yardımlarını esirgemeyen GYTE Araştırma Görevlisi **P. Hülya Akdemir, Doğa Gümüşel, İbrahim Koç, Ergun Kaya'ya** ve sınırsız destekleri, anlayışları ve sabırları nedeniyle çok sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Canım Annem'e...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
KISALTMA VE SİMGELER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
 1.GİRİŞ	 1
1.1. Alev Ağacı (<i>Photinia X fraseri</i> Dress.)	1
1.2. Alev ağacı süs bitkisinde yapılan <i>in vitro</i> çoğaltım çalışmaları	5
1.3. <i>In vitro</i> çoğaltım tekniklerinde sıvı kültürlerin kullanımı	10
1.3.1.Farklı sıvı kültür tekniklerinin Kullanımı	11
1.3.2. Sıvı kültür sistemlerinde destek matrikslerinin kullanımı	12
1.3.3. İnce hücre katman (TCL)	16
1.3.4. Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri	19
1.4. Tezin Amacı ve Literatüre Katkısı	22
 2. GEREÇ VE YÖNTEM	 24
2.1. Gereçler	24
2.1.1 Bitki materyali	24
2.1.2 Kullanılan malzemeler	24
2.1.3 Kullanılan cihazlar	26
2.2. Yöntem	26
2.2.1 Proliferasyon besiyerinin belirlenmesi	26
2.2.2 Sitokininlerin <i>in vitro</i> proliferasyona olan etkilerinin belirlenmesi	28
2.2.3 Farklı karbon kaynaklarının <i>in vitro</i> proliferasyona olan etkilerinin belirlenmesi	29
2.2.4 <i>In vitro</i> proliferasyonun sıvı kültür ortamlarında denenmesi	29

2.2.5 Proliferasyonun iyileştirilmesinde membran taşıyıcı destek sistemlerinin denenmesi	30
2.2.6 Proliferasyonun geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde denenmesi	31
2.2.7 Gövdelerin <i>de novo</i> köklendirilmesi ve <i>in vivo</i> koşullara iklimlendirilmesi	32
2.2.8 Sonuçların toplanması ve verilerin istatistiksel olarak Değerlendirilmesi	33
3. BULGULAR	35
3.1. Proliferasyon besiyerinin belirlenmesi	35
3.2. Sitokinlerin <i>in vitro</i> proliferasyona olan etkilerinin belirlenmesi	37
3.3. Farklı karbon kaynaklarının <i>in vitro</i> proliferasyona olan etkilerinin belirlenmesi	40
3.4. <i>In vitro</i> proliferasyonun sıvı kültür ortamlarında denenmesi	44
3.4.1.Çalkalama Kültürleri	44
3.4.2. Membran Taşıyıcı Destek Sistemi	45
3.4.3 Geçici daldırma biyoreaktör sistemi	47
3.5. <i>In vitro</i> köklenme ve <i>in vivo</i> koşullara iklimlendirme	49
4. TARTIŞMA	55
4.1.Proliferasyon besiortamının belirlenmesi	55
4.2.Optimum sitokin tür ve miktarının belirlenmesi	56
4.3.Optimum karbon kaynağının belirlenmesi	58
4.4.Sıvı kültür ortamlarında <i>in vitro</i> proliferasyon	60
4.5. <i>In vitro</i> köklenme	64
5.SONUÇ	66
Kaynakça	68
Özgeçmiş	85

KISALTMA VE SİMGELER

IBA : İndol-3-bütirik asit.

PG : Floroglukinol.

PGPR: Bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler (Plant growth-promoting rhizobacteria).

BA : 6-benziladenin.

WPM: Odunsu bitkilerin çoğaltım besiortamı (Lloyd ve McCown, 1980).

QL: Quoirin ve Lepoivre besiortamı (Quoirin ve Lepoivre, 1977).

MS : Murashige ve Skoog besiortamı (Murashige ve Skoog, 1962).

Na-Alg : Sodyum aljinat.

TCL: İnce hücre katman sistemi.

TIS: Geçici daldırma biyoreaktör sistemi.

MR: Membran taşıyıcı destek sistemi.

ITCL: Boyuna ince hücre katman sistemi.

tTCL: Enine ince hücre katman sistemi.

NAA: Naftalen asetik asit.

TDZ: Tidiazuron.

IAA: İndol asetik asit.

PB: Paklobutrazol.

DKW: Driver ve Kuniyuki (1984) tarafından geliştirilen besiortamı.

2-IP: 2- izopentiladenin.

KIN: Kinetin.

G.O.K.: Gövde oluşturma kapasitesi.

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. A) Alev ağacı süs bitkisinin genel görünümü, B) Gövdenin ucunda oluşan kırmızı yapraklar, C) Kırmızı yaprakların yakından görünümü, D) Alev ağacında bahar aylarında oluşan beyaz çiçekler.	2
1.2. <i>Gladiolus hybridus</i> Hort. cv. Wedding Bouquet bitkisine ait tomurcukların membran taşıyıcı sistem kullanılarak çoğaltımı. A) Tomurcukları içeren membran taşıyıcı sistemin yandan görünüşü, B) MR (Membran taşıyıcı destek sisteminin) üstten görünüşü (Prasad ve Dutta Gupta, 2006)	15
1.3. Mikroçoğaltılan bitkilere ait gövdelerin internod kısımlarında alınan enine (tTCL (enine ince hücre katman sistemi) ince hücre katmanlarının kültüre alınması (Teixeira da Silva, 2003).	16
1.4. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminin bir örneği olan RITA [®] sisteminin genel çalışma prensibi (Alvard ve ark., 1993; Teisson ve Alvard, 1995)	20
2.1. Çalkalama işlemi	30
2.2. Membran taşıyıcı destek sistemi. (A: bar: 1,79 cm, B: bar: 1,79 cm)	31
2.3 TIS kapları ve geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım (A: bar: 1,17 cm, B: bar: 2,8 cm)	32
3.1. Farklı besiyentimlerinde elde edilen proliferasyon sonuçları A)DKW + 1mg l ⁻¹ BA B)QP+ 1mg l ⁻¹ BA C)MS+ 1mg l ⁻¹ BA D)WPM+ 1mg l ⁻¹ BA. (A: bar: 1,68 cm, B: bar:1,63 cm, C: bar: 2,7 cm, D: bar: 2,7 cm)	36

3.2 A) MS + 2 mg l⁻¹ BA B) MS + 2 mg l⁻¹ TDZ C) MS + 2 mg l⁻¹ KIN D) MS + 2 mg l⁻¹ 2-iP içeren yarı-katı besiortamlarında gövde uçlarından elde edilen proliferasyon.(A: bar: 1 cm, B: bar: 1 cm, C: bar: 1,15 cm, D: bar: 1,17 cm)

40

3.3. Farklı şeker tip ve miktarlarında gövde uçlarından elde edilen proliferasyon.

A)MS+2mg l⁻¹BA-0 şeker B) MS+2mg l⁻¹ BA-15gr sukroz C) MS+2mg l⁻¹ BA-15 gr glikoz D) MS+2mg l⁻¹ BA- 15gr glikoz+15gr sukroz E) MS+2mg l⁻¹BA-30gr sukroz F) MS+2mg l⁻¹BA-30gr glikoz. (A: bar: 0,93 cm, B: bar: 1,12 cm, C: bar: 0,93 cm, D: bar: 1,12 cm, E: bar: 1,04 cm, F: bar: 1,02 cm)

43

3.4. Çalkalama kültür kaplarında elde edilen proliferasyon. A-B)50 rpm C-D)100 rpm E-F) 200 rpm (A: bar: 1,42 cm, B: bar: 1,2 cm, C: bar: 1,66 cm, D: bar: 1,05 cm, E: bar: 1,36 cm, F: bar: 1,5 cm)

45

3.5. A-F) Membran taşıyıcı destek sisteminde elde edilen proliferasyon (A: bar: 3,33 cm, B: bar: 2,66 cm, C: bar: 1,12 cm, D: bar: 2,4 cm, E: bar: 1,42 cm, F: bar: 2,31 cm).

46

3.6.Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde elde edilen proliferasyon.

A-B)8s/16'sürelı daldırma C-D)24s/16' sürelı daldırma. .(A: bar: 2,27 cm, B: bar: 2,20 cm, C: bar: 3 cm, D: bar: 1,37 cm, E: bar: 1,34 cm, F: bar: 1,41 cm)

48

3.7. Farklı IBA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları. A-B)MS 0 besiyeri

C-D) MS+1 mg l⁻¹ IBA E-F)MS+2 mg l⁻¹ IBA, G-H)MS+4 mg l⁻¹ IBA. (A: bar: 2,04 cm, B: bar: 3 cm, C: bar: 1,4 cm, D: bar: 1,33 cm, E: bar: 1,14 cm, F: bar: 1,6 cm, G: bar: 1,71 cm, H: bar: 1,26 cm)

52

3.8. Farklı IAA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları. A-B) MS+1 mg l⁻¹ IAA Besiyeri, C-D) MS+2 mg l⁻¹ IAA besiyeri, E-F)MS+4 mg l⁻¹ IAA besiyeri. (A: bar: 1,71 cm, B: bar: 0,96 cm, C: bar: 1,62 cm, D: bar: 0,96 cm, E: bar: 1,26 cm, F: bar: 2 cm)

53

3.9. *In vivo* koşullara iklimlendirme aşamaları. A) Köklendirme besiyerindeki köklenmiş bitkiciklerin besiyerinden çıkarılması, B) Su ile köklenmiş bitkiciklerin köklerinin yıkanması ve kurutma kağıdında sularının süzülmesi. C)Bitkiciklerin steril torf içeren viyollere dikilmesi ve sulanması, D) Viyollerin üzerinin plastik bir örtü ile örtülmesi, E) Her gün plastik örtüde iki delik açılarak nem oranlarının düşürülmesi, F)Adapte olan bitkilerin saksılara aktarımını takiben 2 ay sonraki görünüşleri. (A: bar: 2,48 cm, B: bar: 2,6 cm, C: bar: 2,55 cm, D: bar: 1,8 cm, E: bar: 1,45cm, F: bar: 6,54 cm)

54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Süs bitkilerinin üretiminde <i>in vitro</i> tekniklerin kullanım alanları (Reuther, 1985).	4
1.2. Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı ve <i>in vitro</i> konzervasyonu konusunda yapılan çalışmalar.	7
1.3. Süs bitkilerinin sıvı kültür sistemlerinin farklı destek materyalleri ile mikroçoğaltımına yönelik yapılan bazı <i>in vitro</i> çalışmalar.	14
1.4. Süs bitkilerine ait eksplantların ince hücre katman sistemi ile çoğaltımı konusunda yapılan çalışmalar.	18
1.5. Geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak farklı bitki türlerinde yapılan <i>in vitro</i> çalışmalar	21
2.1. Tez kapsamında kullanılan sarf malzeme listesi.	25
2.2. Kullanılan cihaz listesi.	26
2.3. Besiyeri içerikleri.	28
3.1. <i>In vitro</i> çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının 1 mg l ⁻¹ benzil adenin (BA) içeren farklı besiortamlarında gösterdikleri proliferasyon sonuçları.	36
3.2. <i>In vitro</i> çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı miktarlarda sitokinin içeren MS besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları	39

- 3.3.** *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı miktarlarda şeker ve 2 mg l⁻¹ BA içeren MS besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları 42
- 3.4.** *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının membran taşıyıcı destek sistemde 30 g l⁻¹ sukroz ve 2 mg l⁻¹ BA içeren sıvı MS besiortamında gösterdiği proliferasyon sonucu 46
- 3.5.** *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı daldırma zamanlarında 30 g l⁻¹ sukroz ve 2 mg l⁻¹ BA içeren sıvı MS besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları 48
- 3.6.** *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerin farklı miktarlarda oksin içeren MS besiortamında 4 hafta kültürleme sonucunda gösterdikleri köklenme sonuçları 50
- 3.7.** *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerin farklı miktarlarda oksin içeren besiortamında 1 hafta kültürleme ve sonrasında oksin sonuçları 51

1.GİRİŞ

1.1 ALEV AĞACI (*Photinia X fraseri* Dress.)

Alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) her dem yeşil olan ve 3-5 metreye kadar uzayabilen odunsu bir süs bitkisidir (Şekil 1.1.). *Rosaceae* ailesinin bir üyesi olan bu tür, Japonya kökenli *Photinia glabra* ve Çin kökenli *Photinia serrulata* arasında yapılan bir hibrit bitkidir (Larraburu ve ark., 2007).

60 kadar türü olan *Photinia* genusu Asya, Meksika ve özellikle endemik türlerinin de içinde bulunduğu 43 türle Çin’de yayılış gösterir. Bu türlerden *P. glabra* 3-4 metreye kadar uzayabilen ve yaprakları bronz-kırmızı renkte iken, *P. serrulata* 6-9 metre uzayabilmektedir. Hem *P. fraseri* hem de *P. glabra*’ya oranla daha geniş bir bitkidir ve yaprakları açık yeşil-bronz renktedir.

P. fraseri etkileyici yaprak özellikleri, renkleri, hızlı büyüme özelliği ile fidecilikte çok tercih edilen bir süs bitkisidir (Kane, 1987). Uzun, düz ve parlak olan yaprakları soğuk koşullara dirençlidir ve sahip olduğu yoğun kırmızı rengi nedeniyle en uçtaki yapraklar oldukça dikkat çekicidir (Şekil 1.1B ve C).

Çiçeklenme büyük terminal kümecikler halinde bahar aylarında gerçekleşir (Brickell, 1996; Şekil 1.1D). Çiçekler 2-3 hafta dalları süsler. Baharda açan çiçekleri takiben kırmızı renkli meyveler sonbaharda görülür (Lingdi ve Spongberg, 2003). Yaprakları düz ve parlaktır. Yeni çıkan yapraklar açık kırmızı renklidir ve yapraklar bu kırmızı rengi 2-4 hafta yeşil renge dönünceye kadar korumaktadır (Slater ve ark., 2007).

Photinia park ve bahçelerde, yol kenarlarında çit ya da süs bitkisi olarak kullanılır. Hava kirliliğine, zayıf drenaja, kurak topraklara sahip şehir alanlarında bile yetişebilen ağaçtır (Gilman EF, Watson DG, 1994). Etkileyici yaprakları ve olumsuz çevre şartlarına olan direnci ile türün ekonomik ve çevresel değeri artmaktadır (Deng ve ark., 2004).

Yapılan araştırmalar *Photinia*'nın ağır metal kirliliği olan topraklarda da gayet iyi büyüme gösterdiğini ortaya çıkartmıştır. Bazı araştırmacılar türün ağır metal absorbe etme özelliğinin ileride yapılacak çalışmalarda incelenebileceğini belirtmişlerdir (Yang ve ark., 2004).



Şekil 1.1: A) Alev ağacı süs bitkisinin genel görünümü, B) Gövdenin ucunda oluşan kırmızı yapraklar, C) Kırmızı yaprakların yakından görünümü, D) Alev ağacında bahar aylarında oluşan beyaz çiçekler.

Dünyada ve Türkiye’de, süs bitkilerinin üretimi önemli bir sektör olarak yer almaktadır. Gelişmiş ülkeler yanında gelişmekte olan bazı Afrika, Asya ve Güney

Amerika ülkeleri, uygun ekoloji ve ucuz iş gücü olanaklarını süs bitkileri üretiminde kullanarak, önemli ölçüde ihracat geliri elde etmektedirler.

Bazı ülkelerde süs bitkileri, özellikle de kesme çiçekler, geleneksel ana ihraç ürünleri arasına girmiştir. Kolombiya, İsrail, Kenya, Ekvator gibi ülkeler örnek olarak verilebilir. Rabo Bank/ Hollanda'nın tahminlerine göre dünyada süs bitkileri ticaret hacmi 50 milyar \$ civarındadır.

Süs Bitkileri genel bir kavram olup; dört alt grupta incelenmektedir:

- *Kesme çiçekler
- *İç mekan (Saksı-salon) süs bitkileri
- *Dış mekan süs bitkileri
- *Doğal çiçek soğanları (Geofitler)

Teze konu olan alev ağacı bitkisi dış mekan süs bitkileri arasına girmektedir. Dış mekan süs bitkileri genellikle park ve bahçelerin düzenlenmesinde, karayolu ve metropollerin ağaçlandırılmalarında ve rekreasyon sahalarında kullanılan odunsu ve otsu bitkilerdir (S.B.Y.K Planı, 2001).

Ekonomik değeri yüksek olmasından dolayı süs bitkileri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Günümüzde süs bitkilerinin kitle üretimi doku kültürleri sayesinde gerçekleşmektedir. Bitki doku kültürü günümüzde iyi yapılanmış bir teknoloji halini almıştır. Bu teknik çoklu klonal bitki çoğaltımı adını alan mikroçoğaltımın gelişmesini sağlamıştır. Dünyanın birçok yerinde bahçe bitkilerinin mikroçoğaltımı için ticari amaçlı laboratuvarlar kurulmuştur (Akin-Idowu, 2009).

Odunsu bitkilerin üretilmesinde bitki doku kültürü teknikleri özellikle köklenmenin zor olduğu türlerde çeliklerin köklenmesi ile ilgili sorunların giderilmesinde, hastalıklara dirençli türlerin çoğaltılmasında ve genetik aktarım

çalışmaları için hedef materyalin sağlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Merkle ve Dean, 2000; von Aderkas ve Bonga, 2000).

Özellikle ticari öneme sahip olan vejetatif veya generatif olarak üretilen odunsu süs bitkileri yukarıda sayılan kullanım alanlarına ek olarak, hızlı klonal üretim, patojenlerin eliminasyonu ve hibrit bitkilerin klonlaması amacıyla da *in vitro* teknikler kullanılarak, üretilmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1: Süs bitkilerinin üretiminde *in vitro* tekniklerin kullanım alanları (Reuther, 1985).

Vejetatif olarak üretilen türler	Generatif olarak üretilen türler
1) Tek bir donör bitkiden genetik olarak aynı bitkilerin hızlı ve büyük ölçekli üretimi,	1) Kültüre alınma süresinin kısaltılması amacıyla tohum ile üretim yerine vejetatif olarak üretimin sağlanması,
2) Patojenlerin eliminasyonu,	2) Hibrit bitkilerin klonlanması,
3) Hastalıktan arı <i>in vitro</i> bitkilerin üretimi,	3) F ₁ hibrit tohum üretme yeteneğine sahip ebeveyn bitkilerin klonlanması.
4) <i>In vitro</i> koşullar altında bitkinin uzun süreli saklanması,	
5) Kendiliğinden veya uyarılma ile oluşan mutasyonlarla mutant bitkinin hızlı üretilmesi,	
6) Odunsu süs bitkilerinin köklendirilmesi.	

1.2 ALEV AĞACI SÜS BİTKİSİNDE YAPILAN *IN VITRO* ÇOĞALTIM ÇALIŞMALARI

Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için günümüze kadar yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (Kane ve ark., 1987; Leifert ve ark., 1992, Çizelge 1.2). Türün *in vivo* köklenmesinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle son zamanlarda daha çok *in vitro* çoğaltılan gövdelerin yüksek derişimde oksin (IBA; 3-indol bütirik asit) kullanılarak uyarılması ve besiyerine floroglukinol (PG) gibi fenolik bileşenler eklenmesi (Ramirez-Malagón ve ark., 1997) veya bitkilerin köklenmesini teşvik eden ve bitkinin rizosferinde kolonize olan rizobakterilerin (PGPR) eklenmesi (Larraburu ve ark., 2007) ile köklenmenin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Fenolik bileşenlerin bitki gelişimine hem uyarıcı hem de baskılayıcı etkileri olduğu bilinmektedir. Floroglukinol fenolik bileşeninin alev ağacı gibi bir *Rosaceae* ailesinin bir üyesi olan elma (*Malus domestica* Borth.) (Hammatt ve Grant, 1993) bitkisinde ve farklı bitki türlerinde kök oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, Ramirez-Malagón ve arkadaşları (1997) tarafından alev ağacı bitkisinin köklendirilmesine floroglukinol fenolik bileşeninin etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada çeşitli derişimlerde (4.4, 13.3, 22.2 veya 44.4 μ M) 6-benziladenin (BA) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiortamına 634.4 μ M PG eklenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, gövde çoğaltımının uyarılmasını en iyi sağlayan besiortamının PG içermeyen 44.4 μ M BA ile desteklenmiş MS besiyeri olduğunu göstermiştir. En iyi köklenme ise gövdelerin 442.9 μ M 3-indolbütirik asitin (IBA) 6 gün uygulanmasını takiben 634.4 μ M PG içeren besiortamına aktarılması ile elde edilmiştir. Fenolik bileşenlerin kültür ortamına katılmasına ek olarak, *in vitro* koşullarda kültüre alınan bitkilerde köklenmenin ve büyümenin teşvik edilmesi ve hiperhidrisitenin azaltılması için yararlı mikroorganizmaların kullanımı konusunda da yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Burns ve Schwarz, 1996; Shetty ve ark., 1996; Nowak, 1998; Mirza ve ark., 2001). PGPR (Bitki büyümesini teşvik edici

rizobakteriler) olarak bilinen bu mikroorganizmalar başlıca *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerini içermektedir.

Doku kültüründe PGPR kullanımının mikroçoğaltım ile elde edilen gövdelerin köklendirilmesine olan etkisinin alev ağacı bitkisinde denendiği çalışmada (Larraburu ve ark., 2007), gövde uçlarının köklenmesi, kültür besiyerine hem oksin hem de *Azospirillum brasilense* ve *Azotobacter chroococcum* inoküle edilerek arttırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bakteriyel inokülasyon, alev ağacı gövdelerinin daha erken köklenmesini sağlamıştır. Özellikle *A. brasilense* ile beraber yapılan 49.2 µM IBA uyarımının kökün taze ve kuru ağırlığını (sırasıyla %105 ve %137), kök yüzey alanını (%65) ve gövdenin taze ve kuru ağırlığını (sırasıyla %32 ve %62) belirgin olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Köklenmeye ek olarak, gövdelerin çoğaltımı için MS besiyerine farklı derişimlerde (0.0; 2.2; 4.4; 8.0; 44.4 µM) BA büyüme düzenleyicisi eklenmiş ve en yüksek çoğaltım oranı (4.3) 4.4 µM BA içeren besiyerinde elde edilmiştir. Ramirez-Malagon ve arkadaşları (1997) alev ağacı bitkisinden gövdelerin uyarılması için 44.4 µM BA kullanımının en iyi sonucu verdiğini rapor etmesine karşın, Kane ve arkadaşları (1987) ve Leifert ve arkadaşları (1992) sırasıyla 8.0 ve 2.2 µM derişimin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

Çizelge 1.2: Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı ve *in vitro* konzervasyonu konusunda yapılan çalışmalar.

Çalışmanın amacı	Kullanılan yöntem	Kullanılan besiyortamı	Kaynak
<i>In vitro</i> çoğaltım	Mikroçoğaltım	WPM* + 8 µM BA*	Kane, 1987
<i>In vitro</i> çoğaltım	Mikroçoğaltım	MS + 2.2 µM BA	Leifert ve ark., 1992
Köklenmenin iyileştirilmesi	Mikroçoğaltım	MS + 44.4 µM BA	Ramirez- Malagón ve ark., 1997
	Köklenme	MS + 442.9 µM IBA* (6 gün)	
		MS + 634.4 µM BA PG*	
Köklenmenin iyileştirilmesi	Mikroçoğaltım	MS + 4.4 µM BA	Larraburu ve ark., 2007
	Mikroorganizma inokulasyonu	MS + 49.2 µM IBA + <i>Azospirillum brasilense</i>	
Orta süreli saklama	Enkapsülasyon	MS + %3 Na-Alg* MS + 100 mM CaCl ₂ . 2H ₂ O	Ozden Tokatlı ve ark., 2008
	Yavaş büyütme saklaması	QL* + 1 mg l ⁻¹ BA	
Uzun süreli saklama	Damlacık vitrifikasyon	QL+ 4.4 µM BA	Ozden Tokatlı ve Akdemir, 2010

* WPM: Odunsu bitkilerin çoğaltım besiyortamı (Lloyd ve McCown, 1980) ; BA: 6-Benzil adenin; IBA: 3-indol bütirik asit; PG: Floroglukinol; Na-Alg: Sodyum aljinat; QL: Quoirin ve Lepoivre besiyortamı (Quoirin ve Lepoivre, 1977); PGPR: Plant growth-promoting rhizobacteria (bitki büyümesini teşvik edici bakteriler).

Alev ağacı bitkisinde yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarına ek olarak, tür özellikle ticari bitki doku kültürü laboratuvarlarında üretildiğinden, türe duyulan gereksinimlerin azaldığı zamanlarda çoğaltımını yavaşlatmak ve üretim maliyetini azaltmak için orta dereceli saklama yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışma da (Ozden Tokatlı ve ark., 2008) yapılmıştır. Bu çalışmada alev ağacı bitkisinin *in vitro* çoğaltılan gövdeciklerinden alınan aksiler tomurcuklardan aseptik koşullar altında Na-alginat (%3) ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mM) kullanılarak, sentetik tohumlar hazırlanmış ve yapay tohumlar 4°C'da saklanmıştır. Elde edilen bulgular, 3 ay saklanan sentetik tohumların normal proliferasyon koşullarına alınmalarını takiben aktarıldıkları besi ortamında, saklama sonrası canlılıklarını (%100) ve rejenerasyon (%91) potansiyellerini koruduklarını göstermiştir.

Son zamanlarda Akdemir ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir diğer çalışma ise alev ağacına ait sentetik tohumların bu koşullar altında 6 ay ve mikrogövdelerin ise 15 g l⁻¹ sukroz ve 15 g l⁻¹ mannitol içeren QL besi ortamında 4°C'de 15 aya kadar saklanabildiğini göstermiştir. Bu bulgular, türün orta süreli saklanması için alev ağacının aksiler tomurcuklarını içeren sentetik tohumların ve mikrogövdelerin uygun materyal olduğunu ortaya çıkartmıştır. Ozden Tokatlı ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada ayrıca yine sentetik tohumların laminar akımlı kabin içinde 8 saat dehidre edilmelerini takiben sıvı azota aktarılmasını ve kriyogenik saklama sonrasında çözölmelerini içeren enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği kullanılarak, sentetik tohumların kriyoprezervasyonu konusunda umut verici sonuçlar (kriyogenik saklama ve çözölme sonrası %12 rejenerasyon) elde edilmiştir.

Enkapsülasyon-dehidratasyon yöntemine ek olarak, alev ağacına ait gövde uçları son zamanlarda damlacık-vitrifikasyon tekniği kullanılarak, kriyoprezerve edilmiştir (Ozden Tokatlı ve Akdemir, 2010). Soğuğa alıştırılan ve 0.5 M sukroz içeren MS besi ortamında önkültüre alınan çıplak gövde uçlarının alüminyum folyo şeritlerinin üzerine yerleştirilen vitrifikasyon solüsyonu (PVS2, Sakai ve ark., 1990) ile 120 dakika 0°C'da inkübe edilmelerini takiben kriyoprezervasyonu ve çözölmesinin ardından %40.3 rejenerasyon elde edilmiştir. Kriyogenik saklama

sonrasında enkapsülasyon-dehidratasyon tekniğine görece daha fazla elde edilen rejenerasyon verimi, damlacık vitrifikasyon tekniğinin türe ait germplazmanın saklanması için kullanılabileceğini göstermektedir.

Alev ağacı bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımı ve saklanması konusunda yapılan ve Çizelge 1.2’ de özetlenen çalışmaların hepsinde çoğaltım, doku büyümesi için katı bir platform sağlamak ve besin maddelerinin alınmasını kolaylaştırmak için deniz yosunundan üretilen agar ile katılaştırılan yarı-katı besiortamları kullanılmıştır. Bununla birlikte, agar ile besiortamının katılaştırılması birçok açıdan doku büyümesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Dokunun bazı kısımları agar ile katılaştırılan besiortamına gömülmekte ve yeterli havalandırılmaları sağlanamamaktadır. Agar ile polimerleştirme aynı zamanda dokuya oksijen ve besinlerin difüzyonunda da mekaniksel direnç oluşturarak, doku gelişimi ve farklılaşmayı önemli ölçüde etkilemektedir (Scholten ve Pierik, 1998). Geniş ölçüde çoğaltım uygulamalarında, agar ile besiortamının katılaştırılması, besiyeri hazırlanması, alt kültürlenme, iklimlendirme öncesi köklerin temizlenmesinde manuel iş gücü gerektiren ve bulaşa neden olabilen gereksinimler içerdiğinden ekonomik değildir (Weathers ve Giles, 1988).

Buna ek olarak, agar ile katılaştırılmış besiortamında uyarılan kökler, bazen görece daha az kök tüylerine sahip olmaları nedeniyle düzgün işlev gösterememekte ve tarla koşullarına aktarılan bitkilerin canlılıklarını etkilemektedir. Katı kültürlerde aynı zamanda besin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin besiyerinde dengesiz dağılımı ve kültüre alınan dokuların çeşitli agar markalarına karşı gösterdikleri farklı hassasiyetin neden olduğu sorunlar da bulunmaktadır (Dutta Gupta ve Prasad, 2006). Yine besiyerine eklenen agar kalsiyum miktarının 1/3’ nü immobilize ederek, gövde ucu nekrozuna neden olabilmektedir.

Besiyerine sadece matriks potansiyelini arttırmak amacıyla eklenen agar bitki doku kültürü besiyerinin en pahalı bileşenidir. Bu nedenle, agara alternatif olarak düşük maliyetli farklı jelleştirici ajanlar denenmiştir (Bhattacharya ve ark., 1994;

Prakash ve ark., 2004) ve bitki kökenli nişastalar (örneğin, *Plantago ovata*’ dan türevlenen Isabgol, Barbar ve Jain, 1998), reçineler (örneğin, *Cyamopsis tetragonolobata*’ dan türevlenen bir galaktomannan olan Guar reçinesi, Babbar ve ark., 2005) ve rezinler (örneğin, Supersorb, Teng ve Liu, 1993) denen bitki türüne göre değişebilen sonuçlar vermiştir. Bununda ötesinde, denen bitki türüne göre değişebilen sonuçlar vermiştir. Bununda ötesinde, denen bitki türüne göre değişebilen sonuçlar vermiştir. Bununda ötesinde, denen bitki türüne göre değişebilen sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, ticari olarak büyük ölçekli mikroçoğaltım için kullanılacak düşük maliyetli jelleştirici ajan henüz daha bulunamamıştır. Biyolojik olarak inert olan, tekrar kullanılabilen ve dokuya destek sağlamak için ısıtma veya daha farklı bir kimyasal muamele gerektirmeyen bir maddenin kullanımı tercih edilmektedir.

1.3 IN VITRO ÇOĞALTIM TEKNİKLERİNDE SIVI KÜLTÜRLERİN KULLANIMI

Ticari olarak bitkilerin kitle üretimi kültüre alınan dokuların üniform ve hızlı çoğaltımını sağlayan otomize sistemlerin kullanımını gerektirmektedir. Agar ile katılaştırma otomize bitki çoğaltım sistemleri için en önemli engeli oluşturmaktadır. Sıvı besiyerlerinin kullanımı, hazırlanma, ultrafiltrasyon, manipulasyon ve pH’ ın sabitlenmesi konularında daha fazla kontrolü sağlaması bakımından bitki dokularının otomize kitle çoğaltımı için görece daha uygundur. Bu nedenle daha fazla tomurcuk oluşturma potansiyelleri olan sıvı kültürler (Ziv, 2000), manuel iş gücünde ve üretim maliyetinde belirgin azalmalar sağlayarak, bitki dokularının üretiminde ölçeğin büyütülmesi için uygun sistemler olarak görülmektedir (Levin ve ark., 1988). Çalkalama kültürleri ve biyoreaktör yaklaşımını içeren sıvı kültür sistemleri kullanılarak, bitki rejenerasyonu, *Agapanthus* (Supaibulwatana ve Mii, 1997), *Dianthus* (Pareek ve Kothari, 2003), *Fritillaria* (Paek ve Murthy, 2002), *Gladiolus* (Steinitz ve ark., 1991; Ziv ve ark., 1998; Nhut ve ark., 2004), *Lillium* türleri (Nakano ve ark., 2000; Hee Han ve ark., 2004), *Muscari* (Suzuki ve Nakano, 2001), *Tulipa* (Famalaer ve ark., 1996) da içeren bir çok önemli süs bitkisi türünde başarıyla elde edilmiştir.

Çalkalanan sıvı kültürlerde, karıştırmanın neden olduğu mekaniksel doku hasarı, hücre çöküntülerinin birikmesi, hiperhidrisite, anormal bitki morfogenezi, dokunun az miktarda havalandırılması ve tarla koşullarına aktarımı takiben oluşan strese karşı hassasiyet en sık karşılaşılan sorunlardır. Bu nedenle, sıvı kültür uygulanması, çeşitli destek matrikslerinin kullanılmasına yönelik olarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Sıvı kültürlerde matriks desteği kullanımının esas temeli, sıvı besiyerine dokuların tamamen daldırılması nedeniyle kültür materyalinde oluşan oksijen yetersizliğinin önlenmesi ve dokuya bir büyüme platformunun sağlanmasıdır. Üniform bir geçirgenliğe sahip olan destek matriksleri, çeşitli jelleştirici ajanların sağladıkları avantajları sunmakta ve daha da önemlisi kültür besiyerinin kimyasal kararlılığı ve besin içeriklerinin hareketliliğini etkilememektedirler. Destek matrikslerinin kullanımı hem katı hem de sıvı besiyeri kültürlerinin üstünlüklerini birleştirmektedir.

1.3.1 Farklı Sıvı Kültür Tekniklerinin Kullanımı

Genel olarak, bitki hücre ve dokuları sıvı besi ortamında durgun bir halde veya kültür materyalini yeterli havayı sağlayacak şekilde kültür edilebilir. Her ne kadar iki tekniğinde hızlı ve yüksek büyüme cevaplarının oluşumunu uyardıkları belirlenmişse de bazı eksiklikleri bulunmaktadır. Durgun sistemlerde sıvı besiyerinin kültürlerle doğrudan ve uzun süreli teması hiperhidrisiteye ve hücrelerin köklenmesine neden olmaktadır.

Sıvı besi ortamının çalkalanması hücrelerde fiziksel hasara ve hücre çöküntülerinin birikmesine yol açmaktadır. Bu sorunların giderilmesi için sıvı kültür sistemlerine sıvı besiyerinin bitki dokuları için oluşturduğu sıkıntıyı giderebilecek şekilde görece daha ucuz ve bitki dokularını destekleyecek bir matriks materyalinin kullanımı olabilir. Bir başka çözüm ise ince hücre katman (TCL, Teixeira da Silva, 2003; Nhut ve ark., 2003) ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin (TIS) kullanımı olabilir (Alvard ve ark., 1993; Teisson ve Alvard, 1995; Adelberg, 2006; Afreen, 2006, Eibl and Eibl, 2006).

1.3.2 Sıvı Kültür Sistemlerinde Destek Matrikslerinin Kullanımı

Sıvı besiortamında kültüre alınan eksplantlarda sıvı ortam ile doğrudan ve uzun süreli temas nedeniyle oluşan ve dokularda fizyolojik, anatomik ve büyük morfolojik anormalliklere yol açan alışılmadık şekilde bir apoplastik su yığılma eğilimi görülmektedir. Hiperhidrisite denilen bu sorun, kültüre alınan dokuların hassas olmasına yol açmakta ve bitkileri tarlaya aktarım aşamasına kadar olumsuz etkilemektedir. Agar ile katılaştırılmış besiortamından farklı olarak, sıvı besiortamında dokuları destelemek için kullanılacak bir matriks, eksplantların sıvı besiyeri ile doğrudan temasını engelleyecek ve kesintisiz besiyeri alınımını sağlarken aynı zamanda kültürlerin yeterli şekilde havalandırılmasına da olanak tanıyacaktır.

Sıvı kültür sistemlerinin durağan doğası dokuların bipolar büyümesini kolaylaştırmakta ve bitki gelişimi için doğal habitatı taklit etmektedir. Destek matrikslerinin durağan yapısı aynı zamanda yüzey kırınım gerilimlerini azaltmakta ve diğer sıvı kültür sistemlerinde çalkalamanın neden olduğu dokularda oluşan mekaniksel zarar oluşma riskini ortadan kaldırmaktadır (Dutta Gupta ve Prasad, 2006).

Bitki doku kültürü sistemlerinde kullanılan destek sistemleri temel olarak kimyasal olarak inert (besiyerinin kimyasal bütünlüğü ile sorun oluşturmayacak şekilde) ve otoklavlanabilir özelliktedir. Matriks genel olarak, besiortamını geçiren ayrı bir ünitelidir ve besiortamında çözülen veya vizkoziteyi arttıran bir bileşikten yapılmış değildir. Sıvı kültür sistemleri için pamuk fiberleri, selüloz, cam beadler, poliüretan ve vermikülit gibi çeşitli destek matriksleri denenmiştir (örneğin, Janick ve ark., 1994; McCulloch ve ark., 1994; Watad ve ark., 1995 Afreen-Zobayed ve ark., 1999; Dutta Gupta ve Prasad, 2010, Çizelge 1.3).

Bununla birlikte, süs bitkilerinin mikroçoğaltımı için daha çok polipropilen membran taşıyıcı (MR, membran taşıyıcı destek sistemi) destekler daha başarılı

bulunmuş (Watad ve ark., 1995; 1997; Teng, 1997; Dutta Gupta ve Prasad, 2003) ve MR desteği farklı bitki türleri için yaygın olarak denenmiştir.

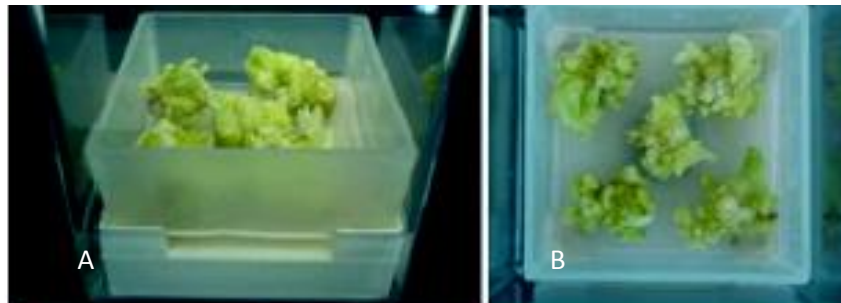
Çizelge 1.3: Süs bitkilerinin sıvı kültür sistemlerinin farklı destek materyalleri ile mikroçoğaltımına yönelik yapılan bazı *in vitro* çalışmalar.

Tür adı	Destek materyali	Elde edilen sonuç	Kaynakça
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	MR*	Gövde proliferasyonu	Janick ve ark., 1994
<i>Rubus</i>	Cam beadler	Gövde çoğaltımı	McCulloch ve ark., 1994
<i>Trifolium</i>	Cam beadler	Gövde çoğaltımı	McCulloch ve ark., 1994
<i>Aconitum napellus</i>	MR	Yarı-katı besiyerine göre daha fazla çoklu gövde rejenerasyonu	Watad ve ark., 1995
<i>Artemisia</i>	Pamuk fiberleri	Kallus oluşumu ve organogenez	Moraes-Cerdeira ve ark., 1995
<i>Cattleya</i>	MR	Bitki rejenerasyonunda artış	Adelberg ve ark., 1997
<i>Ipomoea batatas</i>	Vermikülit	Bitkiciklerin büyümesinde artış	Afreen-Zobayed ve ark.1999
<i>Gladiolus</i>	MR	Bitki rejenerasyonunda artış	Dutta Gupta ve Prasad, 2003
<i>Gladiolus</i>	MR	Bitki rejenerasyonunda artış	Dutta Gupta ve Prasad, 2010

*MR: Membran taşıyıcı destek sistemi.

Membran taşıyıcı destek sisteminde taşıyıcı çok delikli polipropilen membran filminden yapılan ve dokunun büyümesini destekleyecek şekilde üniform bir kalınlığı ve geçirgenliği olan otoklavlanabilen bir ünedir. Membran taşıyıcı destek sisteminde destek ile sağlanan verim, dokunun daha iyi havalandırılması ve delikli olan yüzeyi ile kolaylaşan besin alınımı nedeniyledir. Sıvı besiortamlarında membran taşıyıcı destek sistem kullanımının çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. Bu üstünlükler, dokuların daha iyi havalandırılmasını, zararlı fenolik bileşenlerin besiortamına yayılmasının sağlanmasını, hücre çöküntülerinin yığılmasının engellenmesini ve daha da önemlisi diğer sıvı kültür sistemlerinde oluşması muhtemel olan ve hiperhidrisiteyi oluşturan suyun doku etrafında birikmesinin engellenmesini içermektedir. Yine bu sistemin kullanılması ile dokuların gelişimsel evreleri, dokuların altkültürlenmesi sırasında besiortamına aktarımının agar ile katılaştırılmış besiortamına göre daha kolay olduğundan daha iyi kontrol edilebilmektedir.

Polipropilen membran taşıyıcı destek sisteminin kullanımı ile *Aconitum napellus* (Watad ve ark., 1995), *Allium sativum* (Kim ve ark., 2003), *Anthurium* (Teng, 1997), *Dianthus caryophyllus* (Watad ve ark., 1996), *Spathiphyllum* ve *Syngonium* (Watad ve ark., 1997), *Chrysanthemum* (Hahn ve Paek, 2002), *Picea abies* (Vagner ve ark., 1995) ve *Gladiolus hybridus* (Prasad ve Dutta Gupta, 2006, Şekil 1.2) bitkilerinin mikroçoğaltımı için olumlu sonuçlar sağlamakla birlikte, sistem henüz alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için denenmemiştir.



Şekil 1.2: *Gladiolus hybridus* Hort. cv. Wedding Bouquet bitkisine ait tomurcukların membran taşıyıcı destek sistemi kullanılarak çoğaltımı. A) Tomurcukları içeren membran taşıyıcı destek sistemin yandan görünüşü, B) Membran taşıyıcı destek sistemin üstten görünüşü (Prasad ve Dutta Gupta, 2006).

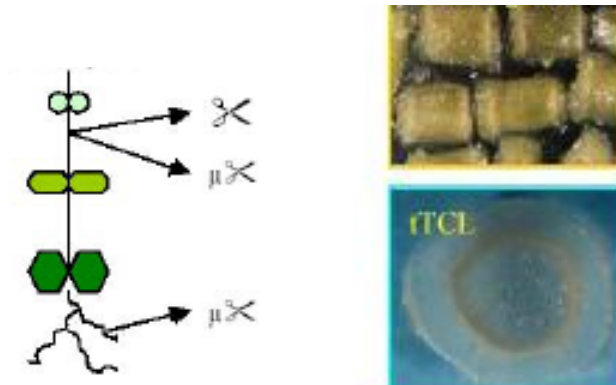
1.3.3 İnce Hücre Katman Sistemi (TCL)

İnce hücre katman sistemi gövde, yaprak, çiçek primordiyası, kotiledon ve hipo veya epikotil gibi farklı bitki organlarından boyuna (ITCL) veya enine (tTCL; Şekil 1.3) kesilen küçük boyuttaki eksplantların yarı-katı veya sıvı besi ortamında kültüre alınmasını içermektedir.

ITCL epidermal hücrelerin tek bir katmanı gibi tek bir doku tipi içerirken, tTCL epidermal, kortikal, kambiyum ve parenkima hücreleri gibi farklı doku tiplerine sahip az sayıda hücre içermektedir (Tran Thanh Van, 1980). TCL sistemi ile izole edilen özgün bir hücre veya doku katmanında ışığın, sıcaklığın, pH' nın kontrol altına alındığı büyüme koşulları altında özgün morfogenetik programların *in vitro* uyarımına yol açabilmektedir. Bir TCL' nin morfogenetik bir yola girmesi, kullanılan hücre ve dokunun fizyolojik durumu ve kökenine bağlıdır.

Mikroçoğaltılan bitki

Internoda ait alınan tTCL kesitleri



Şekil 1.3: Mikroçoğaltılan bitkilere ait gövdelerin internod kısımlarında alınan enine (tTCL) ince hücre katmanlarının kültüre alınması (Teixeira da Silva, 2003).

TCL sistemi kullanılarak, günümüze kadar farklı süs bitkilerinden (örneğin, *Begonia rex*, Takayama ve Misawa, 1983; *Nicotiana tabacum*, Tran Thanh Van ve Trinh, 1986; *Dendranthema grandiflora*, Teixeira da Silva ve Fukai, 2003; *Gerbera*

jamesonii, Nhut ve ark., 2006, Çizelge 1.4) *in vitro* rejenerasyon elde edilmesine karşın, eksplantın büyüklüğü, kökeni ve yerleşimi kallus, organogenez, rizogenez veya somatik embriyogenezin uyarılmasını etkilemekte (Nhut ve ark., 2003) ve her bir morfojenetik işlemin uyarılması için üzerinde daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir (Nhut ve ark., 2006).

Çizelge 1.4: Süs bitkilerine ait eksplantların ince hücre katman sistemi ile çoğaltımı konusunda yapılan çalışmalar.

Tür adı	Eksplant tipi	Besi ortamı	Yöntem	Kaynakça
<i>Begonia rex</i>	petiyol (tTCL)	MS* + NAA* + BA*	Organogenez	Takayama ve Misawa, 1983
<i>Nicotiana tabacum</i>	çiçek sapı (lTCL)	MS + IBA	Kallogenez	Tran Thanh Van ve Trinh, 1986
<i>Lillium longiflorum</i>	yaprak (tTCL)	MS + BA + NAA	Organogenez	Nhut, 1998
<i>Dendranthema gransiflora</i>	internod (tTCL)	MS + 2,4-D* + TDZ	Somatik embriyogenez	Teixeira da Silva ve Fukai, 2003
<i>Lillium spp.</i>	gövde parçaları (tTCL)	MS + TDZ*	Organogenez	Nhut ve ark., 2003
<i>Begonia tuberosa</i>	petiyol (tTCL)	MS + BA	Organogenez	Nhut ve ark., 2005
<i>Cynara scolymus</i>	gövde parçaları (tTCL)	MS + TDZ + IAA*	Organogenez	Hang ve ark., 2005
<i>Gerbera jamesonii</i>	çiçek tablası (tTCL)	MS + TDZ	Organogenez	Nhut ve ark., 2006
<i>Sinningia scolymus</i>	gövde parçaları (lTCL)	MS + BA	Organogenez	Nhut ve ark., 2006
<i>Gladiolus spp.</i>	çiçek sapı (lTCL)	MS + BA + NAA	Organogenez	Nhut ve ark., 2006

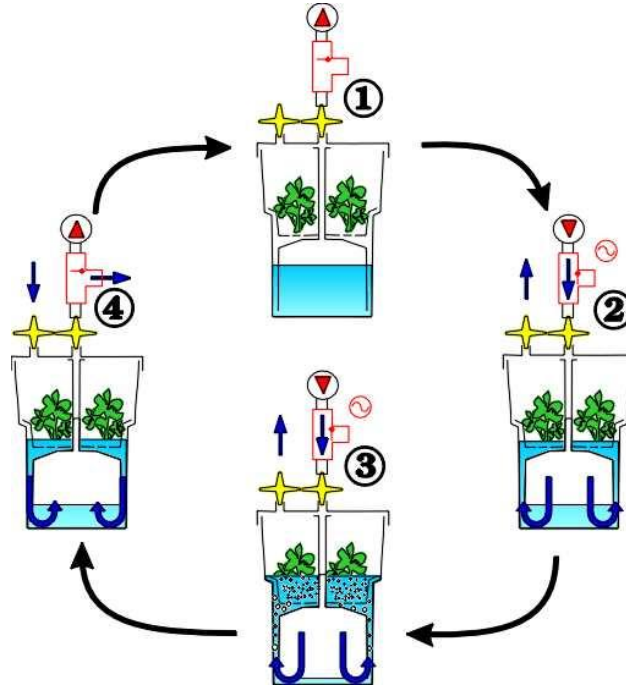
*NAA, naftalen asetik asit; 2,4-D, 2,4-difenoksiasetik asit; TDZ, tidiazuron; IAA, indol asetik asit; BA, 6-benziladenin; MS, Murashige ve Skoog besiyeri.

1.3.4 Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri

Son zamanlarda sıvı besiyerlerinin kullanıldığı yarı otomatik geçici daldırma sistemleri (TIS) arasında RITA® sistemi (Vitropic, Fransa) ilgi çekmektedir. 1990'lı yıllarda geliştirilen cihaz (Alvard ve ark., 1993; Teisson ve Alvard, 1995, Şekil 1.5) bitkilerin sıvı besiyerine periyodik olarak daldırılması temeline dayandığından mikroçoğaltıma tamamen yeni bir yaklaşım getirmektedir.

Sıvı kültür sistemleri geçici daldırma sistemlerinin kullanımına izin veren aletlerle birleştirildiğinde, kültür kaplarının havalandırılması ve eksplantların belli aralıklarda besiyeri ile temas etmesiyle sonuçlanan, daha iyi havalandırma ve daha düşük hiperhidrisite riski gibi pek çok ek üstünlük içermektedir. TIS sistemi katı ve sıvı besiyerlerinin üstünlüklerini birleştirmekte, özellikle de besin maddelerinin bitki hücreleri tarafından kolaylıkla alınmasını sağlarken, aynı zamanda bitkilerin katı olmayan bir ortamda büyümelerine de izin vermektedir.

Farklı TIS sistemlerinden özellikle RITA® biyoreaktör sisteminin farklı bitki türlerinde olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmektedir (örneğin; McAlister ve ark., 2005). Yine RITA® sistemi kullanılarak, ananas bitkisinin *in vitro* sürgünlerinin çoğaltım oranının arttığı rapor edilmiştir (Escalona ve ark., 1999). Buna ek olarak, çeşitli araştırmacılar sistemin bitki kalitesini arttırdığını (Özden-Tokatlı ve ark., 2007), kimyasal malzeme giderlerini azalttığını (Berthouly ve Etienne, 2005), yaprak gelişimini iyileştirdiğini ve gövde camsılaşmasını azalttığını (Aitken-Christie ve ark., 1995) belirtmektedir. Ayrıca geçici daldırma sisteminden gelen bitkilerin iklimlendirme ve fotoototrofik gelişmeye daha uygun olduğu da rapor edilmiştir (Aitken-Christie ve ark., 1995). Farklı bitki türlerinin mikroçoğaltımında olumlu sonuçlar veren bu güncel sistem (Çizelge 1.5), henüz alev ağacı bitkisinin *in vitro* proliferasyonunda denenmemiştir.



Şekil 1.4: Geçici daldırma biyoreaktör sisteminin bir örneği olan RITA® sisteminin genel çalışma prensibi (Alvard ve ark., 1993; Teisson ve Alvard, 1995) Durağan fazda sıvı besiyeri kabın alt tarafında, eksplantler ise sıvı besiyeri ile temas etmeyecek şekilde poliüretandan diskin üzerine yerleştirilmektedir (1). Ayarlanabilir pnömatik pompa arayıcılığı ile sağlayan hava, filtrelerden geçerek sıvı besiyeri ile eksplantlerin istenilen süre temasını sağlar (2). Kaba verilen hava aynı zamanda besiortamının ve kültür kabı içinde havalandırılmasını sağlar (3). Pompanın durması ile sıvı besiortamı tekrar kabın aşağı kısmına geçerek, eksplant ile besiortamının sürekli teması engellenir.

Çizelge 1.5: Geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak farklı bitki türlerinde yapılan *in vitro* çalışmalar

Tür adı	Eksplant tipi	Besiortamı	Yöntem	Kaynakça
<i>Ananas comosus</i>	Sürgün	MS+BA+NAA+PB*	Mikroçoğaltım (3 sa 2')	Escalona ve ark., 1999
<i>Crescentia cujete</i>	Nodal segment	MS + KIN	Mikroçoğaltım (3 sa 3')	Murch ve ark., 2004
<i>Eucalyptus</i>	Nod	MS+BA+NAA	Mikroçoğaltım (10' 30 sn)	McAlister ve ark., 2005
<i>Fragaria ananassa</i>	Yaprak	MS+TDZ+IBA	Mikroçoğaltım (4 sa 5')	Hanhineva ve ark., 2005
<i>Alocasia amazonica</i>	Gövde	MS+TDZ	Mikroçoğaltım (Günde 4 kez 30')	Jo ve ark., 2008
<i>Ilex dumosa</i>	Nodal segment	MS+BA	Mikroçoğaltım (4 sa 1')	Luna ve ark., 2008
<i>Saccharum</i> spp.	Gövde	MS +BA + PB	Mikroçoğaltım (3 sa 3')	Bernal ve ark., 2008
<i>Theobroma cacao</i>	Embriyogenik kallus	DKW besiyeri*	Somatik embriyogenez	Niemenak ve ark., 2008
<i>Musa</i> spp.	Sürgün	MS	Mikroçoğaltım (3 sa 4')	Aragón ve ark., 2009
<i>Bactris gasipaes</i>	Zigotik Embriyo	MS + 2 IP*	Somatik embriyogenez	Steinmacher ve ark., 2011

*PB, paklobutrazol; DKW, Driver ve Kuniyuki (1984) tarafından geliştirilen besiortamı; 2 IP: :2- izopentiladenin.

1.4.TEZİN AMACI VE LİTERATÜRE KATKISI

Alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) ticari olarak üretilen önemli bir süs bitkisidir. Ancak türün özellikle vejetatif çoğaltılmasında karşılaşılan zorluklar, üretimini güçleştirmekte ve dolayısıyla üretim maliyetini ve süresini arttırmaktadır. Hızlı bir şekilde klonal çoğaltıma olanak tanıyan ve bir bitki doku kültürü yöntemi olan mikroçoğaltım tekniğinin alev ağacı bitkisi için geliştirilmesinin bu türün önemli bir genetik değişikliğe uğramadan hızlı çoğaltımını sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

Bu nedenle, tezin amacını önemli bir ekonomik değere sahip olan alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için uygun besiyeri ve bitki büyüme düzenleyicisi içeriğinin yarı-katı kültür sisteminde belirlenmesi ve optimize edilen besiyeri içeriğinin güncel çoğaltım teknikleri olan sıvı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde de denenmesi ve adı geçen farklı kültür ortamlarında elde edilen sonuçların karşılaştırılarak, türün *in vitro* üretiminin artırılması oluşturmaktadır.

Mikroçoğaltım tekniğinin ekonomik bir öneme sahip olan alev ağacı bitkisinde geliştirilmesi, türün hızlı ve klonal çoğaltımını sağlayacaktır. Buna ek olarak, *in vitro* proliferasyon tekniklerinin yarı-katı ve sıvı biyoreaktör sistemlerinde denenmesi türün ticari olarak üretilmesine ve farklı kültür sistemlerinin karşılaştırılmasına olanak tanıyacaktır. Çalışma aynı zamanda sıvı kültür sistemlerinin alev ağacı gövdelerinin köklenmesine olan etkisini de ortaya çıkartması bakımından da önemlidir.

Günümüze kadar membran taşıyıcı destek sistemi ve RITA® sistemi, aksiller ve bazal gövde proliferasyonu kullanılarak çoğaltılan birçok bitki türünde denenmiş (örneğin, muz, Alvard ve ark., 1993) ve bu denemeler sıklıkla proliferasyon oranlarının ve kültür kalitesinin artması ile sonuçlanmıştır. Buna karşın, genellikle alev ağacı gibi uzayan gövdelerden alınan gövde ucu ve nodal eksplantlar aracılığıyla

çoğaltılan odunsu türlerin mikroçoğaltımının geliştirilmesinde sıvı ve geçici daldırma sistemlerinin potansiyeli hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında, alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımının iyileştirilmesi için özellikle RITA® sistemlerinin kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Alev ağacı bitkisinin mikroçoğaltımı için sıvı kültür sistemlerinin denendiği bir çalışmanın literatürde bulunmaması çalışmayı özgün kılmaktadır. Elde edilecek sonuçların çoğaltımında ve köklendirilmesinde sorunlar ile karşılaşılan diğer süs bitkilerinin büyük ölçekli çoğaltılmasında model olması beklenmektedir. Tez kapsamında geliştirilmesi planlanan *in vitro* proliferasyon yöntemi, bu bitki türünde gelecekte yapılması planlanan gen aktarım teknikleri ile transgenik bitki üretimi ve bu bitkilerin hızlı çoğaltımını sağlama potansiyeli bakımından da önemlidir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereçler

2.1.1 Bitki Materyali

Tez çalışmasında kullanılan *Photinia X fraseri* Dress. bitkisine ait *in vitro* kültürler, Vivai Battistini fidanlığından (Cesena, İtalya) alınmış ve GYTE, Biyoloji Bölümü, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda düzenli zaman aralıklarında alt kültürlenerek yaşatılmıştır. Tez kapsamında *in vitro* geliştirilen bu kültürlerden aseptik şartlarda gövde uçları alınarak, tez çalışmasında yer alan deneylerin yürütülmesi sağlanmıştır.

2.1.2 Kullanılan Malzemeler

Tez kapsamında kullanılan sarf malzeme listesi Çizelge 2.1' de sunulmuştur.

Çizelge 2.1: Tez kapsamında kullanılan sarf malzeme listesi.

Kimyasal Adı	Üretici Firma
KNO ₃	SIGMA P-8291
NH ₄ NO ₃	SIGMA A-3795
MgSO ₄ .7H ₂ O	SIGMA M-7774
MnSO ₄ .H ₂ O	SIGMA M-7899
ZnSO ₄ .7H ₂ O	SIGMA Z-1001
CuSO ₄ .5H ₂ O	SIGMA C-8027
CaCl ₂ .2 H ₂ O	SIGMA C-2536
KI	Ridel-de Haen 03124
CoCl ₂ .6 H ₂ O	SIGMA C 2911
KH ₂ PO ₄	SIGMA P-8416
H ₃ BO ₃	SIGMA B-9645
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	SIGMA M-1651
FeSO ₄ .7H ₂ O	SIGMA F-8263
Na ₂ EDTA	SIGMA E-6635
KNO ₃	SIGMA P- 8291
Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	SIGMA C- 2786
Myo-Inositol	SIGMA I-3011
Thiamine HCl	SIGMA T-3902
Nikotinik asit	SIGMA N-0765
L-Glisin	Merck K 27061401
Piridoksin HCl	SIGMA P-8666
Sukroz	Merck K 31845651
Agar	SIGMA A-1296
NaOH	Merck I 06462
HCl	J.T. Baker 6081
6-Benzil amino purin (BAP)	SIGMA B-3408
Naftalen asetik asit (NAA)	SIGMA N-0640
Kinetin (KIN)	SIGMA K-3378
Indol-3-bütirik asit (IBA)	SIGMA I-5386
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Merck K 31954097
Etanol	Prolab Kimya
Domestos (Ticari çamaşır suyu)	Domestos
Tidiazuran	Duchefa T- 0916.0250
K ₂ SO ₄	SIGMA P-8541

2.1.3 Kullanılan cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihaz listesi Çizelge 2.2’ de sunulmuştur.

Çizelge 2.2: Kullanılan cihaz listesi.

Cihaz Adı	Cihazın Markası
Hassas terazi	Sartorius BL 2105
Analitik terazi	Sartorius BL 3100
Otoklav	Hirayama HVE-50 Varioklav 300
Bitki büyütme odası	Botes Klima-Taahüt San. ve Tic. Ltd.Şti.
Mikroskop	Olympus ST-PT-11
pHmetre	WTW pH526
Manyetik karıştırıcı	Schoot Heidolph MR3001
Sterilizatör	SIGMA S-3273
Laminar akımlı kabin	Tekno A.Ş.
İklimlendirme dolabı	WTC Binder
-20 Buzdolabı	Indesit
+4 Buzdolabı	Indesit

2.2. Yöntem

Tez çalışmasında aşağıda belirtilen basamaklar sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

2.2.1 Proliferasyon Besiyerinin Belirlenmesi

In vitro geliştirilen alev ağacı kültürlerinden alınan eksplantlar, öncelikle farklı bitki türlerinin çoğaltılması için kullanılan ve 1962 yılında Murashige ve Skoog adlı araştırmacılar tarafından içerdiği makro ve mikroelementler ve vitamin miktarları formüle edilen yarı-katı MS besiyerine aktarılmıştır. Buna ek olarak, özellikle alev ağacı gibi odunsu bitkilerin çoğaltımında kullanılan başta WPM (Lloyd ve McCown,

1980), DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) ve QL (Quoirin ve Lepoivre, 1977) besiyeleri de alev ağacı bitkisinin *in vitro* proliferasyonu için denenmiş ve denenmiş bu 4 besiyeri içeriğinden en iyi gövde proliferasyonunu sağlayan besiyeri, daha sonra ki çalışmaların yürütülmesinde kullanılmıştır.

Bu dört farklı besiyeri aynı oranda fitohormon içeriği ile MS+1mg l⁻¹ BA (6-benziladenin) , QP+1mg l⁻¹ BA, WPM+1mg l⁻¹ BA, DKW+1mg l⁻¹ BA şeklinde 150 ml olarak hazırlanmıştır. Laminar kabinde steril şartlarda kültür ortamından alınan gövde uçları her petride 25'şer adet olacak şekilde aktarım gerçekleştirilmiştir. Bir besiyeri için 2 petri hazırlanmıştır.

Petri kapları 4 haftalık sürede *in vitro* proliferasyon için bitki büyütme odalarına konulmuştur. 4 haftalık sürenin sonunda ise yine aseptik şartlarda laminar kabinde eksplantlardan oluşan gövdeler ve uzunlukları ölçülmüştür.

Tez kapsamında kullanılan besiortamlarının içerikleri Çizelge 2.3'de sunulmuştur.

Çizelge 2.3: Besiyeri içerikleri.

Makro Elementler	MS (mg l ⁻¹)	WPM (mg l ⁻¹)	QL (mg l ⁻¹)	DKW (mg l ⁻¹)
KNO ₃	1900	0	1800	0
NH ₄ NO ₃	1650	400	400	1416
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	368	356	740
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	72	0	150
KH ₂ PO ₄	170	168	272	260
Ca(NO ₃). 4H ₂ O	0	460	1204	1950
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	55.6	0
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	74	0
K ₂ SO ₄	0	988	0	1560
Mikro Elementler				
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.9	16.9	16.9	33
KI	0.83	0.83	0.83	0
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	16
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.4
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0
Organik Bileşikler				
Nikotinik asit	0.5	0.5	0.5	0.5
Pridoksin-HCl	0.5	0.5	0.5	0.5
Tiamin-HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Glisin	2	2	2	2
Myo-inositol	100	100	100	100

2.2.2 Sitokininlerin *In Vitro* Proliferasyona Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında bitki parçalarının klonal çoğaltımı aşamasında farklı bitki büyüme hormonları, farklı derişimlerde denenmektedir. En iyi proliferasyonu sağlayan besiyeri (MS) içeriğine öncelikle farklı sitokinin büyüme düzenleyicileri [6-benziladenin (BA), kinetin (KIN), tidiazuron (TDZ) ve 2-izopentiladenin (2-iP)] çeşitli miktarlarda (1, 2, 4 mg l⁻¹) eklenerek, bu sitokininlerin alev ağacı gövde uçlarının proliferasyonuna olan etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar

karşılaştırılarak, eksplanttan en yüksek proliferasyonu sağlayan sitokininin türü ve miktarı optimize edilmiştir.

MS besiyerleri içerik olarak aynı şekilde hazırlanmıştır, ancak sitokininlerden TDZ ve 2-iP hormonlarının yüksek sıcaklıklarda yapısı bozulduğu için bu hormonlar besiyerleri otoklavdan çıktıktan sonra filtre ile steril edilerek, eklenmiştir. Diğer iki sitokinin BA ve KIN'ler ise hazırlanan besiyerlerine otoklavdan önce konulmuştur. Farklı sitokinlere sahip besiortamlarına gövde uçları aktarıldıktan sonra eksplantlar rejenerasyon için bitki büyüme odasında 4 hafta bekletilmişlerdir.

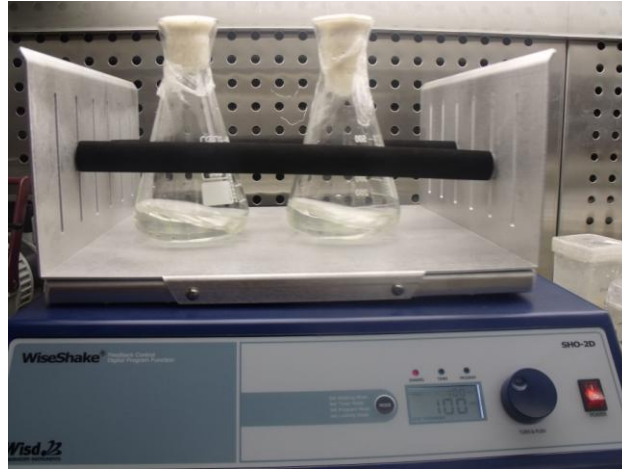
2.2.3 Farklı Karbon Kaynaklarının *In Vitro* Proliferasyona Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Tezin bu basamağında ise en iyi proliferasyonu sağlayan sitokinine sahip besiyerinde karbon kaynakları üzerinde denemeler yapılmıştır. *In vitro* koşullarda geliştirilen bitki kültürlerinin heterotrofik olması nedeniyle alev ağacına ait gövde uçlarının proliferasyonu için çeşitli karbon kaynakları (glukoz ve sukroz) farklı miktarlarda (0, 15, 30 g l⁻¹) optimize edilen besiyerine aktarılmış ve ilgili şekerlerin proliferasyona olan etkileri belirlenmiştir. Yine eksplant olarak alınan gövde uçları 4 hafta proliferasyon için bitki büyüme odasına aktarılmıştır.

2.2.4 *In Vitro* Proliferasyonun Sıvı Kültür Ortamlarında Denenmesi

Yarı-katı ortamda optimize edilen besiyeri çeşidi, bitki büyüme düzenleyicisi ve karbon kaynağı olan şeker türü ve miktarı, alev ağacına ait gövde uçlarından *in vitro* proliferasyonun denenmesi için sıvı ortam koşullarında denenmiştir. Bu amaçla aseptik koşullarda çıkartılan alev ağacına ait gövde uçları uygun besiyeri içeriğine sahip sıvı kültürlerde farklı çalkalama hızlarında (50, 100, 200 rpm) çalkalanmış, bu yolla besiyerinin karıştırılması ve eksplantların havalandırılması sağlanmıştır.

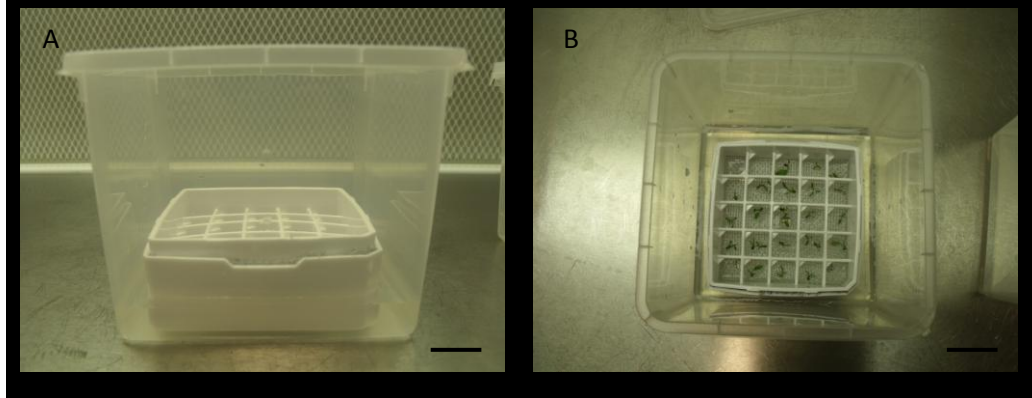
Bu işlemler için steril erlenmayerler ve sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Ve çalkalama işlemi için gerekli çalkalayıcı 4 hafta süre ile farklı çalkalama hızlarında ayarlanarak, kullanılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Çalkalama işlemi.

2.2.5 Proliferasyonun iyileştirilmesinde membran taşıyıcı destek sistemlerinin denenmesi:

Membran taşıyıcı destek sistemi, Magenta kapları gibi uygun bitki doku kültürü kaplarına yerleştirilmiş ve steril edilmiştir. En iyi proliferasyonu sağlayan sıvı besiyerini aseptik koşullarda membran taşıyıcı destek sistemi içeren kültür kaplarına aktarılmıştır. Besiyerinin aktarımını takiben aseptik koşullarda çıkartılan alev ağacına ait gövde uçları membran taşıyıcı destek sistemin üzerine yerleştirilerek, eksplantların sıvı besiyerini ile sürekli teması sağlanmıştır (Şekil 2.2).

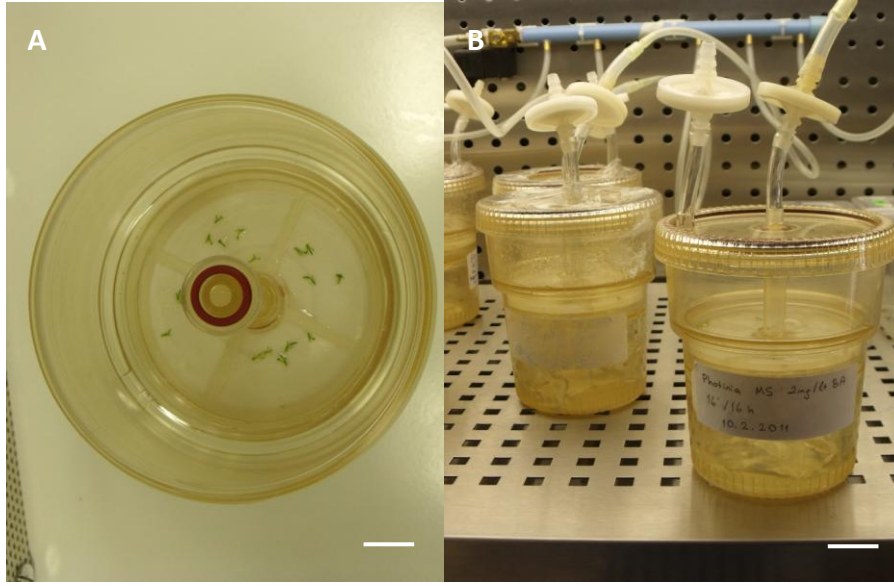


Şekil 2.2 : Membran taşıyıcı destek sistemi. (A: bar: 1,79 cm, B: bar: 1,79 cm)

2.2.6 Proliferasyonun Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemlerinde Denenmesi

Alev ağacın bitkisinin *in vitro* proliferasyonu için tez kapsamında son zamanlarda farklı bitkilerin mikroçoğaltımında olumlu sonuçlar veren geçici daldırma biyoreaktör sistemleri de denenmiştir. Bu nedenle, optimize edilen besiyeri içeriği sıvı ortamda hazırlanmış ve aseptik koşullarda biyoreaktöre eksplantların aktarımından sonra, eksplantların besiyeri ile çeşitli temas aralıkları (daldırma sıklığı: 8,16, 24 saatte 1 kez) ve süre (16 dakika) denenmiştir.

Tezin bu basamağında kullanılan TIS (temporary immersion system) kapları otoklavda steril edilmiş ve yine steril ortamda sıvı besiyeri ve gövde uçlarının kaplara aktarımından sonra kaplar kapatılmış ve bitki büyütme odasında besiortamının kaba aktarılmasını sağlayacak olan pompaya bağlanmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : TIS kapları ve geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım.
(A: bar: 1,17 cm, B: bar: 2,8 cm)

2.2.7 Gövdelerin *De Novo* Köklendirilmeleri ve *In Vivo* Koşullara İklmlendirilmeleri

In vitro çoğaltılan gövdeler uygun besiyerinde düzenli aralıklarla (her 4 haftada bir) altkültürlendikten sonra en az 10 mm olan gövdeler *in vitro* köklendirilmeleri için farklı oksin çeşitleri [indol-3-bütirik asit (IBA) ve indol asetik asit (IAA)] farklı miktarlarda (0, 1, 2, 5 mg l⁻¹) denenmiştir.

Köklendirme işlemi için farklı miktarlarda IBA ve IAA içeren besiyerleri steril şartlarda hazırlanarak bebek maması kaplarına konulmuş ve her bir kaba 15 adet aynı uzunlukta bitkicikler aktarılmıştır. Kaplar köklenmenin sağlanabilmesi için 4 hafta bitki büyütme odasına konulmuştur. Bir başka denemede ise yukarıda adı geçen oksin türleri ve miktarları ile mikrogövdeler 1 hafta boyunca muamele edildikten sonra oksin içermeyen MS0 besiortamına aktarılmışlardır.

En az 10 mm köke sahip olan heterotrofik bitkicikler, stomalarının çalışır hale getirilmesi ve tekrar fotosentez yaparak, ototrof olmaları için sera koşullarında iklimlendirilmişlerdir. Bu amaçla önce bitkiciklerin köklerini şekerden arındırmak için distile su ile köklere zarar vermeden yıkanmıştır. Köklerde şeker bulunması iklimlendirme aşamasında bakterilerin köklerde çoğalmasına ve bitkinin gelişimini olumsuz etkilemesine sebep olacağı için yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra suların süzülmesi için kurutma kağıdına aktarılmış ve bir süre bekletilmiştir. Kurutma kağıdında suyu süzülen bitkicikler önceden otoklavda steril edilen torflarla birlikte viollere aktarılmıştır. Üzeri plastik örtü ile kapatılarak yüksek nem altında gelişmeleri izlenmiştir.

Daha sonra nem içeriği aşamalı olarak plastik örtü üzerinde her gün 2 delik açılması yoluyla düşürüldü ve en sonunda örtü tamamen kaldırılarak, *in vivo* koşullara alıştırmaları sağlandı.

2.2.8 Sonuçların Toplanması ve Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yarı-katı ve sıvı besi ortamına aktarılan her eksplanttan oluşan gövde proliferasyonu (%), eksplant başına oluşan gövde sayısı ve ortalama gövde boyu (mm), besiyerinde eksplantların $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık (3000 lüks) ve 8 saat karanlık koşullar altında 4 hafta kültürleme sonrası kaydedilmiştir.

Çoğaltılan gövdeler köklenme besiyerine aktarılıp, köklenen bitkilere ait veriler (köklenme yüzdesi, gövde başına oluşan kök sayısı ve kök uzunluğu) besiyerine aktarımdan en az 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant ile yapılmış ve 2 kez tekrarlanmıştır.

Bunun yanı sıra, gövde oluşturma kapasitesi (G.O.K. indeksi) Lambardi ve arkadaşlarının 1993 yılında rapor ettikleri formüle göre;

Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı X

Rejenerasyon yüzdesi

GOK indeksi =-----

100

hesaplandı.

Tez kapsamında mikroçoğaltım sonrasında elde edilen veriler değerlendirilirken, oransal veriler arasındaki farklılıklar X2 testi ile, üç veya daha fazla yüzdelere arasındaki farklılıklar ise Post hoc çoklu karşılaştırma testine (Marascuilo ve McSweeney, 1977) göre yapıldı. Farklı verilerin karşılaştırılması için, varyans analizleri (ANOVA) takiben ortalamaları karşılaştırmak için $P \leq 0.05$ olacak şekilde anlamlı en az farklılık (LSD) testi kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1 PROLİFERASYON BESİYESİNİN BELİRLENMESİ

Tez kapsamında alev ağacının QL besiortamında çoğaltılan mikrogövdelerinden alınan gövde uçlarında optimum proliferasyon besiortamının belirlenmesi için farklı makro ve mikro element bileşenlerini ve/veya aynı makro ve mikro elementleri farklı miktarlarda içeren (Bkz. Çizelge 2.3) MS, WPM, DKW ve QL olmak üzere 4 çeşit besiortamı denenmiştir. Denenen 4 besiortamında da yüksek proliferasyon yüzdesi (%98-100, Çizelge 3.1) ve çoklu gövde oluşumu (gövde/eksplant >1, Şekil 3.1) elde edilirken, eksplant başına en fazla gövde (2.58) MS besiortamında sağlanmıştır. İstatistiksel olarak da bu besiortamında elde edilen çoklu gövde oluşumu, denenen diğer besiortamlarında görülen sonuçlardan anlamlı olarak farklılık göstermektedir. WPM ve QL besiortamlarında eksplant başına sırasıyla 1.9 ve 1.8 gövde oluşurken, görece en az gövde oluşumu (1.5) DKW besiortamında elde edilmiştir.

Gövde oluşturma kapasitesi bakımından sonuçlar incelendiğinde en fazla çoklu gövde oluşumunu sağlayan MS besiortamının yine alev ağacının proliferasyonu için en uygun makro ve mikro element bileşenlerini içerdiği görülmektedir. Denenen 4 besiortamında da 4.5 mm' den uzun gövdeler elde edilmiş ve farklı besiortamlarında oluşan gövde boylarında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir.

Çizelge 3.1: *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının 1 mg l⁻¹ benzil adenin (BA) içeren farklı besiortamlarında gösterdikleri proliferasyon sonuçları.

Besiortamı	Proliferasyon ^b (%)	Gövde/eksplant ^b (Ort±S.H.) ^c	G.O.K. İndeksi ^d	Gövde boyu ^b (Ort±S.H.) ^c (mm)
MS ^e	100.0a	2.58±0.08a	2.58	4.89±0.14a
WPM ^e	100.0a	1.92±0.14b	1.92	4.90±0.31a
DKW ^e	98.0a	1.52±0.07c	1.49	4.56±0.13a
QL ^e	100.0a	1.82±0.07b	1.82	4.69±0.09a

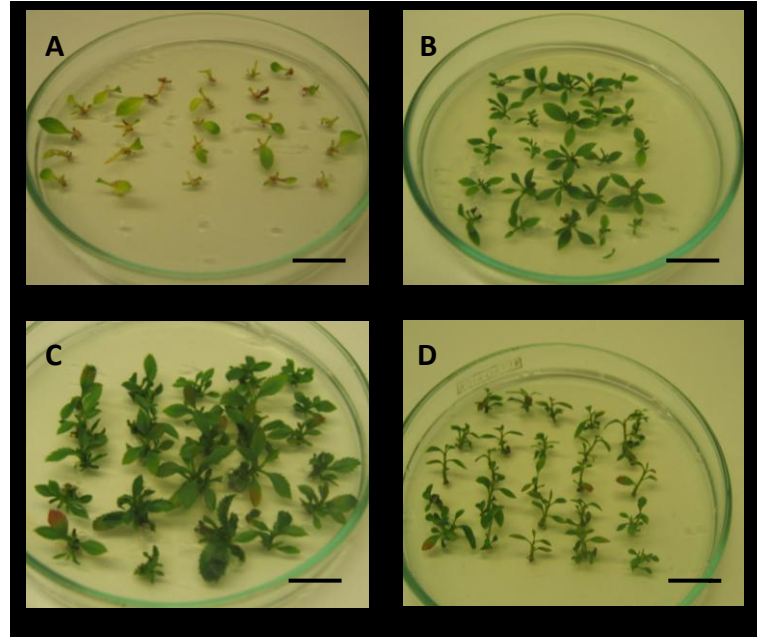
^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c SH: Standart hata

^d G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.

^e MS: Murashige ve Skoog (1962) besiortamı, WPM: Odunsu bitkiler besiortamı (Lloyd ve McCown, 1980), DKW: Driver and Kuniyuki (1984) besiortamı, QL: Quoirin ve Lepoivre (1977) besiortamı.



Şekil 3.1: Farklı besiortamlarında elde edilen proliferasyon sonuçları. A) DKW + 1 mg l⁻¹ BA B) QP+ 1 mg l⁻¹ BA C) MS+ 1 mg l⁻¹ BA D) WPM+ 1 mg l⁻¹ BA (A: bar: 1,68 cm, B: bar:1,63 cm, C: bar: 2,7 cm, D: bar: 2,7 cm).

3.2 SİTOKİNİNLERİN *IN VITRO* PROLİFERASYONA OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Alev ağacına ait gövde uçlarının mikroçoğaltımı için MS besiortamına 4 farklı sitokinin türü (BA, KIN, TDZ ve 2-iP) 3 farklı miktarda (1, 2, 4 mg l⁻¹) eklenmiştir. 4 mg l⁻¹ BA hariç denenen 4 farklı sitokinin türünde de %100 proliferasyon elde edilmiştir (Çizelge 3.2). Eksplant başına oluşan gövde sayısında ise besiortamına eklenen sitokinin türü ve miktarının önemli etkileri olduğu görülmüştür. Eksplant başına en fazla gövde oluşumu 2 mg l⁻¹ BA içeren MS besiortamında elde edilmiştir. BA miktarının 4 mg l⁻¹ e çıkartılması ise hem proliferasyon yüzdesini hem de eksplant başına oluşan gövde sayısını azaltmıştır.

BA' dan sonra en fazla çoklu gövde oluşumu besiortamına TDZ eklenmesi ile sağlanmıştır. 1 mg l⁻¹ TDZ içeren besiortamında eksplant başına 2.5 gövde elde edilirken, TDZ miktarının artması ile oluşan gövde sayısında iyileşmeler görülmüş ve 4 mg l⁻¹ TDZ içeren besiortamında 3.3 gövde elde edilmiştir. KIN içeren besiortamında BA ve TDZ ile desteklenen besiortamlarına görece daha düşük gövde/eksplant oranı görülmüştür ancak yine de denenen en yüksek KIN miktarında (4 mg l⁻¹) eksplant başına 2.4 gövde oluşmuştur.

Denenen sitokininler içersinde eksplant başına en az gövde besiortamına 2-iP eklenmesi ile elde edilmiştir. 2-iP' nin eklendiği besiortamında gövde/eksplant oranı en fazla 1.4' dür ve besiortamında 2-iP' nin arttırılması ile bu oran 1.3' lere düşmüştür.

Besiortamına BA' nın eklenmesinin çoklu gövde oluşumuna olan olumlu etkisi nedeniyle en fazla gövde oluşturma kapasitesi (3.7) gövde/eksplant oranının en yüksek olduğu 2 mg l⁻¹ BA içeren besiortamında elde edilmiştir (Şekil 3.2). 4 mg l⁻¹ TDZ içeren besiortamında sağlanan gövde oluşturma kapasitesi de BA dışında

denenen diğ er sitokinlere g orece daha fazladır (3.3). Besiortamına 2-iP' nin eklenmesi, en düşük gövde/eksplant oranını verdiğ inden bu bitki büyüme düzenleyicisinin alev ağıacına ait gövde uçlarında gövde oluşturma kapasitesi de düşüktür (1.3-1.4). Bununla birlikte, uzun gövdelere (>6.5 mm) 2-iP içeren besiortamında elde edilmiştir. En uzun gövde (7.7 mm) 4 mg l⁻¹ 2-iP ile desteklenen besiortamında belirlenirken, en kısa gövde (3 mm) 4 mg l⁻¹ BA içeren besiortamında saptanmıştır. Dolayısıyla oluşan gövdelerin boyları bakımından denenen sitokin tipleri ve miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Çizelge 3.2: *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı miktarlarda sitokinin içeren MS besiortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları^a.

Sitokinin	Proliferasyon ^b (%)	Gövde/eksplant ^b (Ort±S.H.) ^d	G.O.K. İndeksi ^c	Gövde boyu ^b (Ort±S.H.) ^d (mm)
<i>BA^e</i> (mg l ⁻¹)				
1	100a	2.58±0.11d	2.58	4.89±0.14d
2	100a	3.66±0.08a	3.66	3.17±0.14g
4	98b	3.60±0.08a	3.58	3.04±0.07g
<i>KIN^e</i> (mg l ⁻¹)				
1	100a	2.10±0.05e	2.10	3.77±0.01f
2	100a	2.02±0.04e	2.02	3.10±0.07g
4	100a	2.42±0.07d	2.42	4.71±0.12d
<i>TDZ^e</i> (mg l ⁻¹)				
1	100a	2.51±0.05d	2.51	4.35±0.10e
2	100a	2.96±0.04c	2.96	4.53±0.07d
4	100a	3.32±0.04b	3.32	4.43±0.06de
<i>2-iP^e</i> (mg l ⁻¹)				
1	100a	1.42±0.03f	1.42	6.59±0.10c
2	100a	1.32±0.03g	1.32	6.87±0.10b
4	100a	1.36±0.03fg	1.36	7.69±0.10a

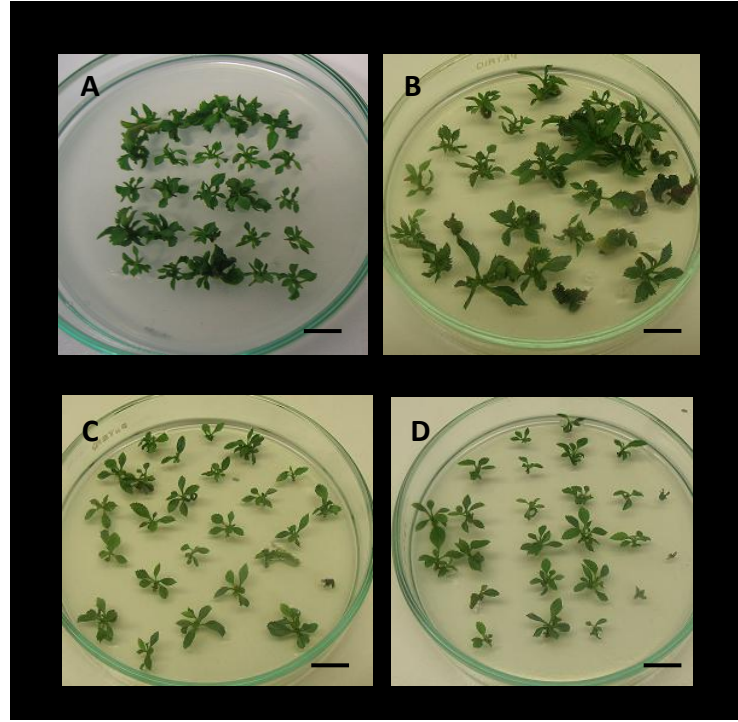
^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.

^d SH: Standart hata.

^e BA: 6-benziladenin, KIN: kinetin, TDZ: tidiazuron, 2-iP:2-izopentil adenin.



Şekil 3.2: A) MS + 2 mg l⁻¹ BA B) MS + 2 mg l⁻¹ TDZ C) MS + 2 mg l⁻¹ KIN D) MS + 2 mg l⁻¹ 2-iP içeren yarı-katı besiortamlarında gövde uçlarından elde edilen proliferasyon. (A: bar: 1 cm, B: bar: 1 cm, C: bar: 1,15 cm, D: bar: 1,17 cm)

3.3 FARKLI KARBON KAYNAKLARININ *IN VITRO* PROLİFERASYONA OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Alev ağacına ait gövde uçları karbon kaynağı içermeyen besiortamında %60 canlılık ve proliferasyon göstermiştir (Çizelge 3.3). Canlılık ve proliferasyon, besiortamına karbon kaynağının eklenmesi ile %100' e ulaşmıştır ve bu sonuç besiortamına eklenen karbon kaynağının tipi ve miktarından bağımsızdır. Denenen karbon kaynaklarına karşı gövde uçlarının oluşturduğu farklı tepkiler asıl eksplant başına oluşan gövde sayısında görülmektedir (Şekil 3.3). Eksplant başına en yüksek gövde sayısı (3.7) besiortamına 30 g l⁻¹ sukroz eklenmesi ile elde edilmiştir. Genel olarak, besiortamına sukroz eklenmesi denenen diğer karbon kaynağı olan glikoza göre daha fazla gövde/eksplant oranını sağlamıştır. Yine de 15 g l⁻¹ glikoz ile

desteklenen besiortamında eksplant başına 3 gövde oluşmuştur. Besiortamında glikoz miktarının 30 g l^{-1} e çıkartılması ise eksplant başına oluşan gövde sayısını azaltmıştır. İki karbon kaynağının besiortamına eşit miktarda eklenmesi ise, besiortamının sadece sukroz ile desteklenmesine göre daha düşük gövde/eksplant oranını sağlamıştır.

GOK indeksleri karşılaştırıldığında en yüksek veri (3.7) yine 30 g l^{-1} sukroz ile desteklenen besiortamında elde edilmiştir. En düşük GOK indeksi (0.6) ise herhangi bir karbon kaynağı eklenmeyen besiortamında görülmüştür. Ancak bu besiortamında görece uzun gövdeler (7 mm) elde edilmiştir. Genel olarak, glikoz ile desteklenen besiortamlarında sukrozun eklendiği besiortamlarına göre daha uzun (sırasıyla $> 4.5 \text{ mm}$ ve $> 3 \text{ mm}$) gövdeler oluşmuştur. Gövde uzunluğu haricinde sukroz ile desteklenen besiortamlarında daha fazla gövde/eksplant oranı elde edildiğinden sonraki denemelerde besiortamı 30 g l^{-1} sukroz ile desteklemiştir.

Çizelge 3.3: *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının farklı miktarlarda şeker ve 2 mg l⁻¹ BA içeren MS besiyortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları^a.

Şeker Türü	Canlılık ^{bc} (%)	Proliferasyon ^b (%)	Gövde/eksplant ^b (Ort±S.H.) ^e	G.O.K. İndeksi ^d	Gövde boyu ^b (Ort±S.H.) ^e (mm)
Sukroz (g l ⁻¹)					
0	60.0b	60.0b	1.04±0.03e	0.62	7.04±0.30a
15	100.0a	100.0a	3.34±0.08b	3.34	3.93±0.11c
30	100.0a	100.0a	3.66±0.07a	3.66	3.17±0.11d
Glikoz (g l ⁻¹)					
0	60.0b	60.0b	1.04±0.03e	0.62	7.04±0.30a
15	100.0a	100.0a	3.06±0.07c	3.06	4.85±0.10b
30	100.0a	100.0a	2.64±0.07d	2.64	4.65±0.08b
Sukroz + Glikoz (g l ⁻¹)					
15 + 15	100.0a	98.0a	2.90±0.06c	2.84	4.87±0.10b

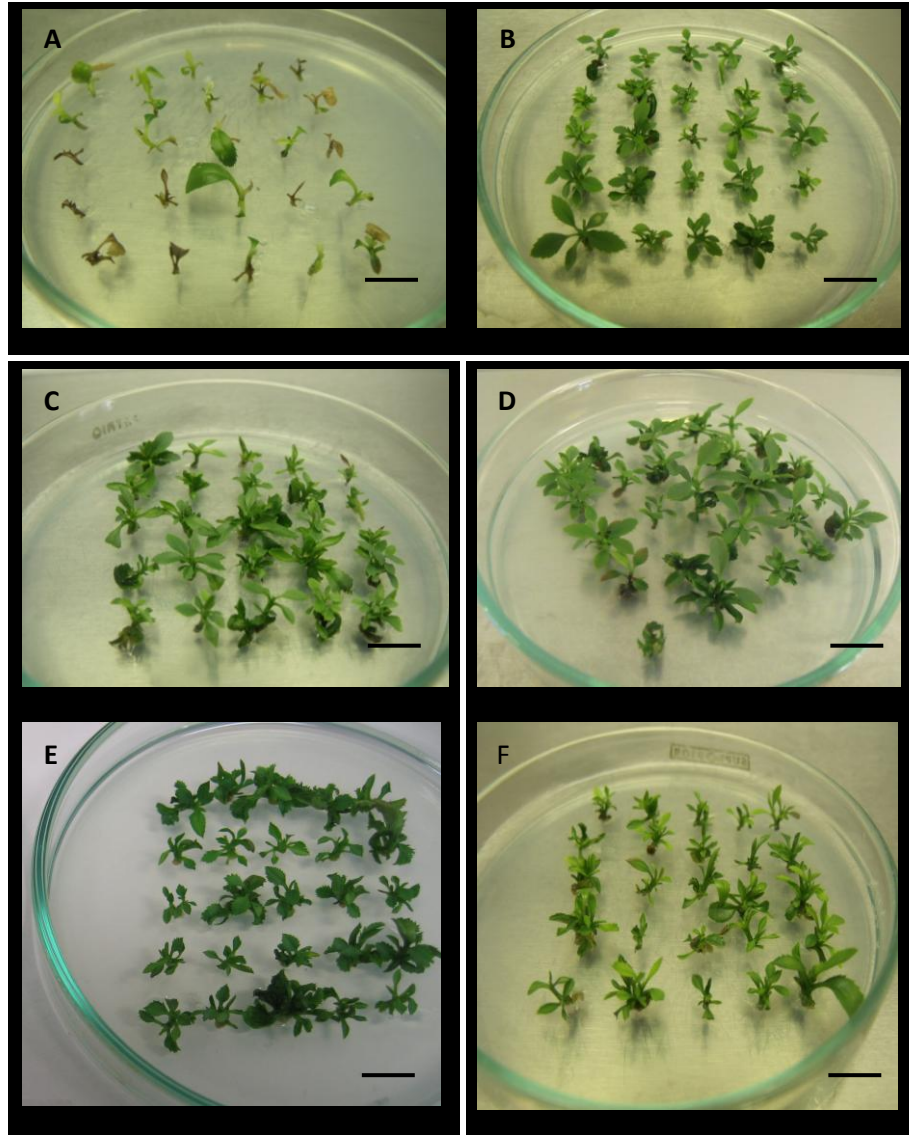
^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c 4 haftalık kültür sonucunda kahverengi eksplantler ölü, yeşil eksplantler canlı sayılmış ve yeşil eksplantlerden oluşan gövdeler ise proliferasyon olarak sayılmıştır.

^d G.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.

^e SH: Standart hata.



Şekil 3.3: Farklı şeker tip ve miktarlarında gövde uçlarından elde edilen proliferasyon. A)MS + 2 mg l⁻¹ BA-0 şeker, B) MS + 2 mg l⁻¹ BA-15 g l⁻¹ sukroz, C) MS + 2 mg l⁻¹ BA-15 g l⁻¹ glikoz, D) MS + 2 mg l⁻¹ BA-15 g l⁻¹ glikoz + 15g l⁻¹ sukroz, E) MS + 2 mg l⁻¹ BA-30 g l⁻¹ sukroz, F) MS + 2 mg l⁻¹ BA-30 g l⁻¹ glikoz. (A: bar: 0,93 cm, B: bar: 1,12 cm, C: bar: 0,93 cm, D: bar: 1,12 cm, E: bar: 1,04 cm, F: bar: 1,02 cm)

3.4. *IN VITRO* PROLİFERASYONUN SIVI KÜLTÜR ORTAMLARINDA DENENMESİ

Tez kapsamında alev ağacına ait gövde uçları *in vitro* proliferasyon kaplarının çalkalanması, membran taşıyıcı destek sistemi ve geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak, sıvı kültür ortamlarında da denenmiştir.

3.4.1 Çalkalama Kültürleri

Aseptik koşullarda çıkartılan alev ağacına ait gövde uçları 2 mg l⁻¹ BA ve 30 g l⁻¹ sukroz içeren sıvı MS besiortamında farklı hızlarda (50, 100, 200 rpm) çalkalanmış ve bu yolla besiyerinin karıştırılması ve eksplantların havalandırılması sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak, Şekil 3.4' de görüldüğü gibi denenilen tüm çalkalama hızlarında sağlıklı proliferasyon sağlanamamış ve oluşan gövdelerde %100 vitrifikasyon tespit edilmiştir.



Şekil 3.4 : Çalkalama kültür kaplarında elde edilen proliferasyon. A-B)50 rpm C-D)100 rpm E-F) 200 rpm. (A: bar: 1,42 cm, B: bar: 1,2 cm, C: bar: 1,66 cm, D: bar: 1,05 cm, E: bar: 1,36 cm, F: bar: 1,5 cm)

3.4.2. Membran Taşıyıcı Destek Sistemi

Tez kapsamında yapılan deneyler sonucu en iyi proliferasyonu sağlayan sıvı besiortamı aseptik koşullarda membran taşıyıcı destek sistemi içeren kültür kaplarına aktarılmıştır. Aseptik koşullarda çıkartılan alev ağacına ait gövde uçları, sıvı besiortamı içeren membran taşıyıcı destek sistemin üzerine yerleştirilmiştir. 4 hafta sonunda oluşan bazı gövdelerde vitrifikasyon (%65) görülmüştür ancak yine de gövde uçlarından düşük de olsa proliferasyon (%35) sağlanmıştır (Çizelge 3.4, Şekil 3.5). Eksplant başına ise 3 gövde oluşmuştur.

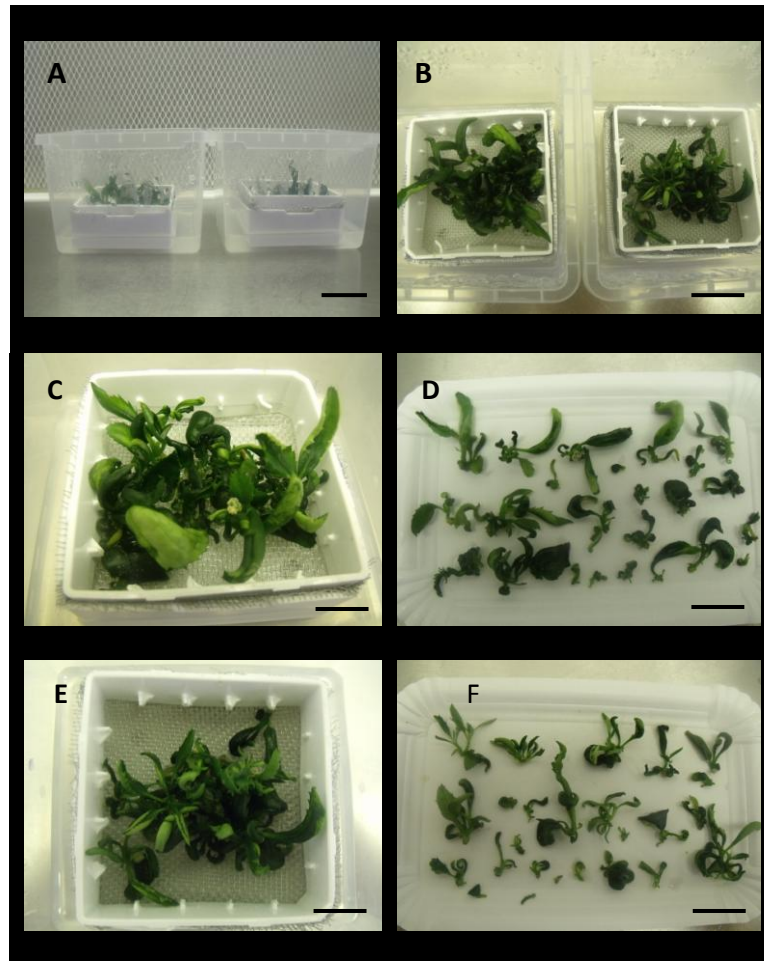
Çizelge 3.4. *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının membran taşıyıcı destek sistemde 30 g l⁻¹ sukroz ve 2 mg l⁻¹ BA içeren sıvı MS besiortamında gösterdiği proliferasyon sonucu^a

Proliferasyon (%)	Vitrifikasyon (%)	Gövde/Eksplant (Ort±SH ^b)	Gövde Uzunluğu (Ort±SH) ^b (mm)	G.O.K. ^c
35	65	3.05±0.41	4.97±0.32	1.06

^aVeriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b SH: Standart hata.

^cG.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.



Şekil 3.5 : A-F) Membran taşıyıcı destek sisteminde elde edilen proliferasyon (A: bar: 3,33 cm, B: bar: 2,66 cm, C: bar: 1,12 cm, D: bar: 2,4 cm, E: bar: 1,42 cm, F: bar: 2,31 cm).

3.4.3 Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemi

Tez kapsamında denenen sıvı kültür sistemlerinden birisi de geçici daldırma biyoreaktör sistemleridir. 3 farklı daldırma zamanında (sırasıyla 8 ,16 ve 24 saat) 16 dakika boyunca sıvı besiortamı ile muamele edilen alev ağacına ait gövde uçlarından elde edilen proliferasyon sonuçları Çizelge 3.5’ de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, 8 saatte dolayısıyla günde 3 kez 16 dakika süreyle (toplam 48 dakika) sıvı besiortamı ile temas, gövde uçlarında yüksek miktarda vitrifikasyona neden olmuş (%92, Şekil 3.6) ve gövde uçlarının ancak %6’ında proliferasyon görülmüştür. Eksplant başına oluşan gövde sayısı 2’ dir.

16 saatte bir kez 16 dakika süreyle sıvı besiortamıyla temas eden gövde uçlarında ise vitrifikasyon görece azalmış (%16) ve proliferasyon ise artmıştır (%76). Eksplant başına oluşan gövde sayısı 1.5’ dir. Sıvı besiortamı ile temas süresinin günde 48 dakikadan 16 dakikaya indirilmesi ile vitrifikasyon oluşumu azalmaya başlamıştır.

Eksplantların sıvı besiortamı ile temas aralığının 24 saate çıkartılması ile ise (günde 16 dakika) vitrifikasyon oldukça düşmüş (%10) ve gövde uçlarının %80’inde proliferasyon elde edilmiştir. Eksplant başına ise 1.9 gövde oluşmuştur. Üç deneme gövde oluşturma kapasiteleri bakımından değerlendirildiğinde de yine günde daha uzun aralık ile sıvı besiortamıyla temasın sağlandığı denemenin proliferasyon için daha uygun olduğu görülmektedir. Sıvı besiortam ile temas ile 7.0 mm’den uzun gövdeler elde edilmiştir. Her üç deneme en fazla gövde oluşturma kapasitesi bakımından karşılaştırıldığında ise 16 ve 24 saatte bir 16 dakikalık yapılan sıvı besiortamı ile temasın gövde uçlarında 1’den fazla gövde oluşturduğu görülmektedir. Yine de en yüksek indeks (1,52), en fazla proliferasyonun ve eksplant başına gövde oluşumunun görüldüğü eksplantların 24 saatte bir sıvı besiortamına temas etmesi ile elde edilmiştir.

Çizelge 3.5. *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelere alınan gövde uçlarının farklı daldırma zamanlarında 30 g l⁻¹ sukroz ve 2 mg l⁻¹ BA içeren sıvı MS besiyortamında gösterdikleri proliferasyon sonuçları^a

Daldırma Zamanı	Proliferasyon (%) ^b	Vitrifikasyon (%) ^b	Gövde/Eksplant (Ort±SH) ^{bc}	Gövde Uzunluğu (Ort±SH) ^{bc} (mm)	G.O.K. ^d
8 ^s /16 ['] ^e	6 b	92 b	2.00±0.58 a	10.33±0.93a	0.12
16 ^s /16 [']	76 a	16 a	1.59±0.13 a	8.70±0.52a	1.20
24 ^s /16 [']	80 a	10 a	1.90±0.13 a	7.06±0.32b	1.52

^aVeriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 25 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark (P≤0.05) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c SH: Standart hata.

^dG.O.K= Rejenere olan eksplant başına oluşan ortalama gövde sayısı x Rejenere olan eksplant yüzdesi / 100 formülü (Lambardi ve ark., 1993) kullanılarak, hesaplanmıştır.

^es, saat; ', dakika.



Şekil 3.6 : Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde elde edilen proliferasyon.

A -D)8s/16' süreli daldırma B-E)16s/16' süreli daldırma C-F) 24s/16' süreli daldırma.(A: bar: 2,27 cm, B: bar: 2,20 cm, C: bar: 3 cm, D: bar: 1,37 cm, E: bar: 1,34 cm, F: bar: 1,41 cm)

3.5 *IN VITRO* KÖKLENME VE *IN VIVO* KOŞULLARA İKLİMLENDİRME

Alev ağacından *in vitro* koşullarda çoğaltılan gövdelerde, herhangi bir oksin büyüme düzenleyicisi bulunmayan besiortamlarında köklenme görülmemiştir (Çizelge 3.6). Besiortamının 4 hafta IBA veya IAA ile desteklenmesi, gövdelerde köklenmeyi sağlamıştır. Denenen en düşük IBA miktarının (1 mg l^{-1}) besiortamına eklenmesi ile %13.3 köklenme elde edilirken, IBA miktarının 2 mg l^{-1} e çıkartılması, denenen IBA miktarları içerisinde en yüksek köklenmeyi (%16.7) sağlamıştır. IBA miktarının 4 mg l^{-1} 'e çıkartılması ise köklenme yüzdesini %13.3'e düşürmüştür. IBA' dan farklı olarak, düşük miktarda eklenen (1 mg l^{-1}) IAA ile görece düşük köklenme (% 3.4) elde edilirken, IAA denemeleri arasında en yüksek köklenme (%16.7) 4 mg l^{-1} IAA ile elde edilmiştir.

Gövde başına oluşan kök sayısı bakımından denemeler incelendiğinde kök/gövde oranı en fazla (1.5) besiortamına 4 mg l^{-1} IBA eklenmesi ile elde edilmiştir. Kök/gövde oranı genel olarak, IAA ile desteklenen besiortamlarında daha düşüktür. Elde edilen köklerin boyları incelendiğinde ise genel olarak 2 ve 4 mg l^{-1} IAA ile desteklenen besiortamlarında daha uzun gövdeler (sırasıyla 2.4 ve 2.1 mm) elde edilmiştir. IBA ve IAA ile besiortamın desteklenmesi sonucunda *in vitro* çoğaltılan alev ağacına ait gövdelerde görülen köklenmeler sırasıyla Şekil 3.7 ve 3.8' de sunulmuştur.

Çizelge 3.6. *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerin farklı miktarlarda oksin içeren MS besiortamında 4 hafta kültürlenme sonucunda gösterdikleri köklenme sonuçları^a

Oksin Türü (mg l ⁻¹)	Köklenme ^b (%)	Kök/Gövde ^b (Ort±S.H.) ^c	Kök boyu ^b (Ort±S.H.) ^c (cm)
<i>IBA</i>			
0	0.0e	0.00±0.00c	0.00±0.00b
1	13.3b	1.00±0.00b	1.56±0.23a
2	16.7a	1.20±0.20ab	1.63±0.86a
4	13.3b	1.50±0.29a	1.74±0.26a
<i>IAA</i>			
0	0.0e	0.00±0.00c	0.00±0.00b
1	3.4d	1.00±0.00b	1.00±0.00a
2	10.0c	1.00±0.00b	2.43±1.55a
4	16.7a	1.20±0.20ab	2.11±0.83a

^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 15 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c SH: Standart hata.

In vitro çoğaltılan gövdelerin köklenmesine uzun süre oksin ile muamelenin etkisinin belirlenmesi için gövdeler 1 hafta farklı miktarlarda (1, 2 ve 4 mg l⁻¹) IBA ve IAA içeren yarı-katı MS besiortamında kültürlendi ve sonrasında oksin içermeyen MS0 besiortamına aktarıldı.

Elde edilen sonuçlara göre, önceki denemeye göre kısa süre oksin ile muamele denenen en fazla IBA (4 mg l⁻¹) içeren besiortamı hariç genellikle hem IBA hem de IAA ile desteklenen besiortamlarında köklenmeyi düşürdü (Çizelge 3.7). Ancak, 4 mg l⁻¹ IBA içeren besiortamında 1 hafta kültürlenme sonrasında MS0'a aktarılan gövdelerde tüm köklenme denemeleri içinde en fazla köklenme (%40) elde edildi. Bu besiortamında gövde başına 1.6 kök oluştu. Her ne kadar kök/gövde oranı 4 mg l⁻¹ IAA içeren besiortamında görece yüksekse de (3.00), bu besiortamında köklenme oldukça düşüktür (%3.3). Köklenme denemeleri arasında en uzun kök boyu (3.3 cm) yine 1 hafta 4 mg l⁻¹ IBA ile desteklenmiş MS besiortamında elde edilmiştir.

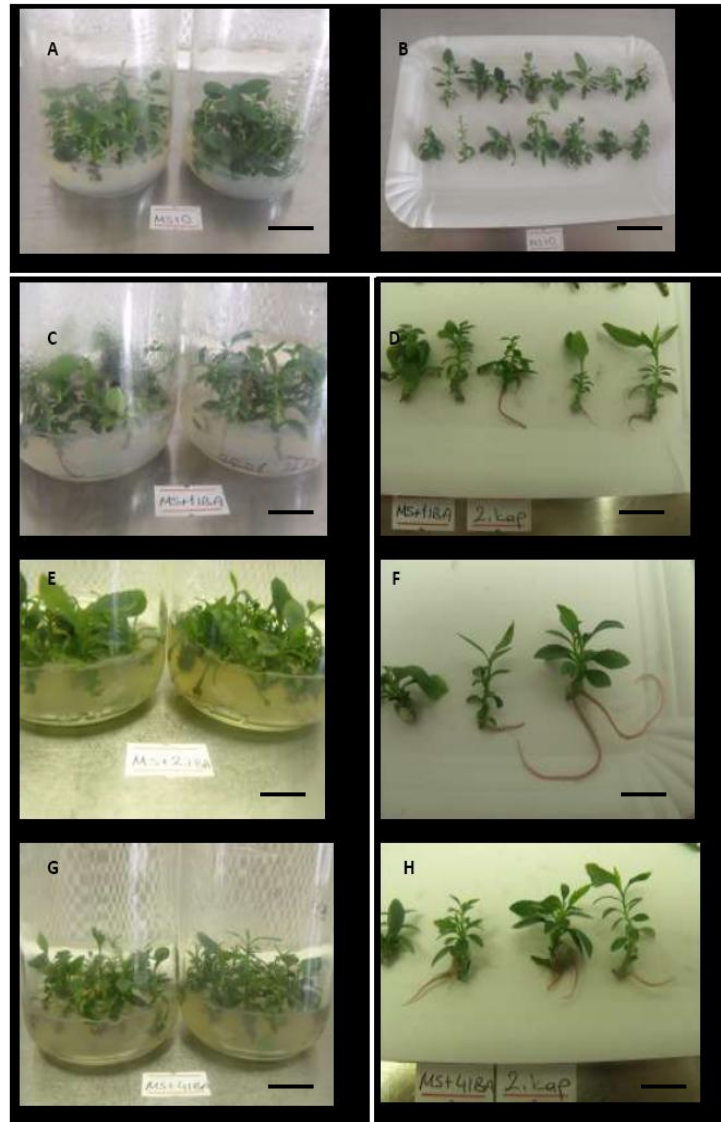
Çizelge 3.7. *In vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerin farklı miktarlarda oksin içeren besiortamında 1 hafta kültürlenme ve sonrasında oksin içermeyen MS besiortamına aktarılımları ile gösterdikleri köklenme sonuçları^a

Oksin Türü (mg l ⁻¹)	Köklenme (%) ^b	Kök/Gövde ^b (Ort±SH) ^c	Kök Boyu ^b (Ort±SH) ^c (cm)
IBA			
1	6.0 b	1.00±0.00 c	2.60±1.00 a
2	3.0 c	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b
4	40.0 a	1.58±0.15 b	3.29±0.41 a
IAA			
1	0.0 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d
2	3.3 c	1.00±0.00 c	1.00±0.00 b
4	3.3 c	3.00±0.00 a	0.66±0.00 c

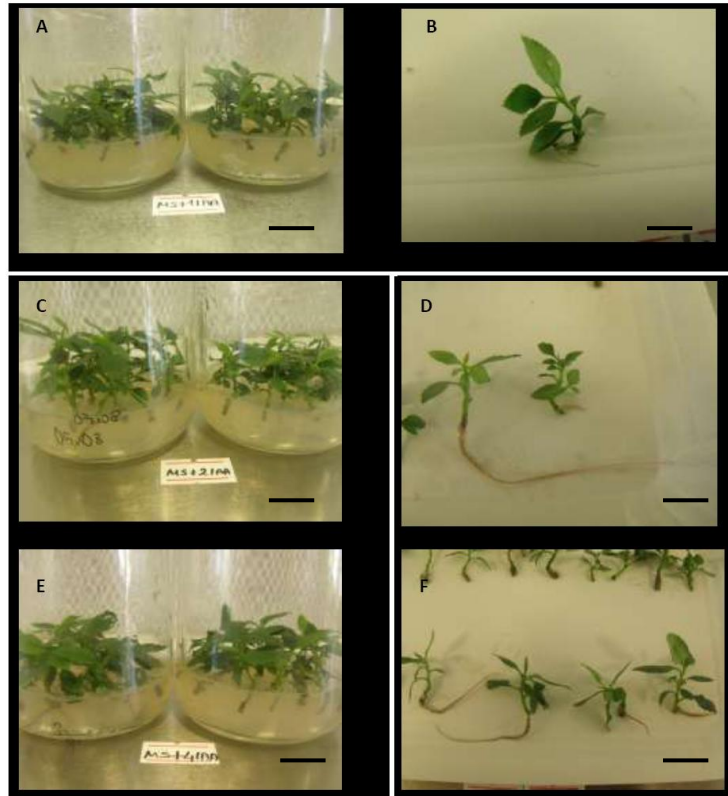
^a Veriler kültür başlatılmasından 4 hafta sonra toplanmıştır. Her bir deneme en az 15 eksplant kullanılarak yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^b Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^c SH: Standart hata.

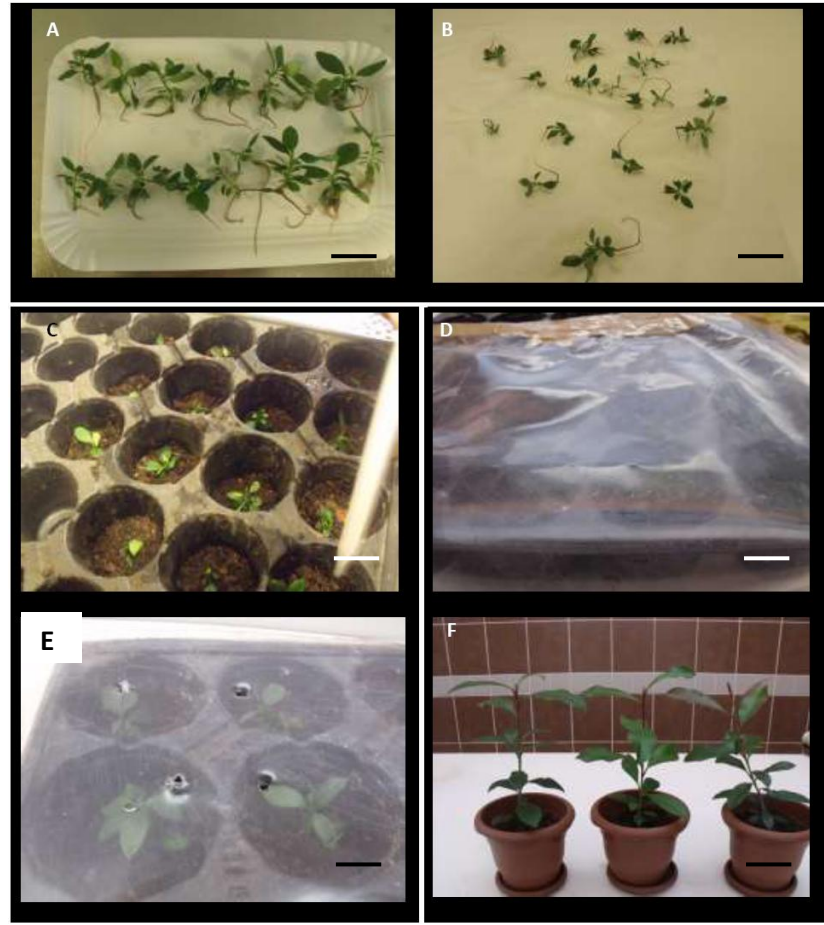


Şekil 3.7 : Farklı IBA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları. A-B)MS 0 besiyeri C-D) MS+1 mg l⁻¹ IBA E-F)MS+2 mg l⁻¹ IBA, G-H)MS+4 mg l⁻¹ IBA. (A: bar: 2,04 cm, B: bar: 3 cm, C: bar: 1,4 cm, D: bar: 1,33 cm, E: bar: 1,14 cm, F: bar: 1,6 cm, G: bar: 1,71 cm, H: bar: 1,26 cm)



Şekil 3.8. Farklı IAA içeriklerinde elde edilen köklenme sonuçları. A-B) MS+1 mg l⁻¹ IAA Besiyeri, C-D) MS+2 mg l⁻¹ IAA besiyeri, E-F)MS+4 mg l⁻¹ IAA besiyeri. (A: bar: 1,71 cm, B: bar: 0,96 cm, C: bar: 1,62 cm, D: bar: 0,96 cm, E: bar: 1,26 cm, F: bar: 2 cm)

Köklenen bitkiler *in vivo* koşullara nemin kademeli olarak azaltılması ile iklmlendirilmiş ve sağlıklı gövdeler elde edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. *In vivo* koşullara iklmlendirme aşamaları. A) Köklendirme besiyerindeki köklenmiş bitkiciklerin besiyerinden çıkarılması, B) Su ile köklenmiş bitkiciklerin köklerinin yıkanması ve kurutma kağıdında sularının süzülmesi. C) Bitkiciklerin steril torf içeren viyollere dikilmesi ve sulanması, D) Viyollerin üzerinin plastik bir örtü ile örtülmesi, E) Her gün plastik örtüde iki delik açılarak nem oranlarının düşürülmesi, F) Adapte olan bitkilerin saksılara aktarımını takiben 2 ay sonraki görünüşleri. (A: bar: 2,48 cm, B: bar: 2,6 cm, C: bar: 2,55 cm, D: bar: 1,8 cm, E: bar: 1,45cm, F: bar: 6,54 cm)

4.TARTIŞMA

4.1 PROLİFERASYON BESİORTAMININ BELİRLENMESİ

In vitro koşullarda proliferasyonun sağlanması için besiortamına makro ve mikroelementlerin ve vitaminlerin uygun bileşen ve miktarlarının eklenmesi gerekmektedir. Proliferasyon çoğu zaman tütün bitkisi için geliştirilen MS besiortamı kullanılarak, gerçekleştirilse de optimum çoğaltımı sağlayan besiortamı her bitki türü için belirlenmelidir. Bu nedenle tez kapsamında alev ağacı gibi odunsu bitkilerin çoğaltımında tercih edilen ve esasen azot içerikleri farklı olan MS, QL, WPM ve DKW besiortamları denenmiştir.

Alev ağacında günümüze kadar yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmalarında MS (Leifert ve ark., 1992; Ramirez-Malagón ve ark., 1997; Larraburu ve ark., 2007), WPM (Kane, 1987) ve QL (Akdemir ve ark., 2010) besiortamları denenmiştir. Akdemir ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada QL ve MS besiortamlarına aktarılan gövde uçlarında en iyi proliferasyon MS besiortamına eksplant başına görece daha fazla gövde elde edilen QL besiortamında sağlanmıştır. Bu çalışmanın bir devamı olan tez kapsamında alev ağacına ait mikrogövdeler, 2 sene boyunca 4 haftada bir QL besiortamında altkültürlenmiştir. 2 senelik altkültür sonrasında elde edilen mikrogövdelerden alınan gövde uçları, 4 farklı besiortamına aktarıldığında MS besiortamının daha iyi proliferasyonu sağladığı görülmüştür.

Aynı içeriğe sahip besiortamında uzun süre çoğaltılan bitkilerin proliferasyon potansiyellerinde azalma veya artış görülebilmektedir (Nagakubo ve ark., 1997). Bu nedenle, proliferasyonunda azalma görülen mikrogövdelerde çoğaltımın iyileştirilmesi için besiortamının içeriğinin veya besiortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicisinin türünün veya derişiminin değiştirilmesi gerekmektedir. Uzun süre

QL besiortamında altkültürlenmiş mikrogövdelerden alınan gövde uçlarının MS besiortamında görece daha fazla bulunan azota (sırasıyla QL' de 35 mM ve MS' de 60 mM, Ciccotti ve ark., 2008) gereksinim duyduğu, bu kimyasal fazla içeren MS besiortamında daha iyi proliferasyona olmasından anlaşılmaktadır. Her ne kadar, azot miktarı DKW besiortamında da fazla olsa da (44 mM, Ciccotti ve ark., 2008), MS ve DKW besiortamları azot kaynağı bakımından farklılık göstermektedir. DKW besiortamında NH_4NO_3 ' e ek olarak, azot kaynağı olarak $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ iken, MS besiortamında NH_4NO_3 ' e ek olarak, azot kaynağı olarak KNO_3 bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlar, alev ağacına ait gövde uçlarının NH_4NO_3 ' e ek olarak, azot kaynağı olarak KNO_3 ' ü tercih ettiğini ve bu nedenle KNO_3 içeren MS ve QL besiortamlarında daha iyi proliferasyona olduğunu göstermektedir. Azota ek olarak, WPM ve DKW' de bulunan K_2SO_4 ' e gereksinim duymadığı yine bu kimyasal içermeyen MS ve QL besiortamlarında proliferasyonun görece daha iyi olması nedeniyle anlaşılmaktadır.

Gövde ucu eksplantı *Rhododendron* (McCown ve Lloyd, 1983; Ettinger ve Preece, 1985; Brand ve Kiyamoto, 1994 a,b), *Zantedeschia albomaculata* (Chang ve ark., 2003) ve *Ebenus cretica* (Hatzilazarou ve ark., 2001) gibi bir çok süs bitkisinin çoğaltımı için rutin olarak kullanılmaktadır. Tez kapsamında da alev ağacının mikroçoğaltımı gövde ucu eksplantı kullanılarak, MS besiortamında yapılmıştır.

4.2 OPTİMUM SİTOKİNİN TÜR VE MİKTARININ BELİRLENMESİ

Ticari olarak kullanılan çoğu süs bitkisi oksin ve sitokinin ile desteklenen doku kültürü besiortamlarında çoğaltılmaktadır (Rout ve Jain, 2004). Bununla birlikte, kültür besiyerine sadece sitokinin eklenmesinin de birçok bitkide gövde oluşumunu uyardığı rapor edilmiştir (Rout ve ark., 2006). Bu nedenle, tez kapsamında 4 farklı sitokinin alev ağacının mikroçoğaltımı için denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre proliferasyonu en iyi sağlayan bitki büyüme düzenleyicisi bir adenin türevi olan BA'

dır. BA ile mikroçoğaltım *Ficus benjamina* (Rzepka-Plevnes ve Kurek, 2001), *Rosa hybrida* (Hasegawa, 1980; Wulster ve Sacalis, 1980) gibi farklı süs bitkilerinde ve alev ağacı gibi odunsu bitkiler olan *Bupleurum kaoi* (Chen ve ark., 2006) ve *Celastrus paniculatus* Willd.' da (Rao ve Purohit, 2006) rapor edilmiştir.

BA' dan sonra alev ağacında proliferasyonu en iyi sağlayan sitokinin bir üre türevi olan TDZ' dir. Bazı bitkilerde (örneğin; *Humulus lupulus*, Roy ve ark., 2001; *Andrographis neesiana*, Karuppusamy ve Kalimuthu, 2010) TDZ' nin aksiler ve adventitatif gövde oluşumunun uyarılmasında adenin türevi bileşiklerden daha etkin olduğu rapor edilse de (Gaspar ve ark., 1996), TDZ' nin biyokimyasal aksiyonu tamamen anlaşılamamıştır (Hosokawa ve ark., 1998).

Buna ek olarak, TDZ ile oluşan gövdelerin yeterince uzayamadıkları da önceki çalışmalarda (Gaspar ve ark., 1996; Anis ve ark., 2010) rapor edilmiştir. Kısa gövdelerin oluşması alev ağacına ait gövde uçlarından gelişen gövdelerde gözlenmemiştir. Her ne kadar, en uzun gövdeler 2-iP ile desteklenen besiortamında elde edilse de TDZ ile oluşan gövdelerin boyu BA ve KIN ile oluşan gövdelerin boyları ile karşılaştırılabilir seviyededir. Besiortamına 2-iP eklenmesinin gövde uzamasına olan olumlu etkisi alev ağacı bitkisinin gövdelerinde olduğu gibi *Elliottia racemosa* (Woo ve Wetzstein, 2008) bitkisinde de gözlenmiştir.

4.3 OPTİMUM KARBON KAYNAĞININ BELİRLENMESİ

İn vitro koşullarda gelişen bitki dokularında fotosentetik aktivite düşük ışık yoğunluğu, sınırlı gaz alışverişi ve yüksek bağıl nem nedenleriyle azaldığından besiortamına ekzojen olarak karbon kaynağının eklenmesi gerekmektedir (Kozai, 1991).

Farklı bitki türlerinin *in vitro* morfogenezini besiortamına eklenen karbon kaynağının etkilediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Biahoua ve Bonneau, 1999; Petersen ve ark., 1999; Fuentes ve ark., 2000). Karbonhidratlar morfogenezini enerji kaynağı olarak kullanılmalarının yanı sıra hücre duvarının özelliğini (esnekliği, içeriği vb.) belirleyen ozmotik potansiyeli değiştirme yoluyla da etkilemektedir (Pritchard ve ark., 1991). Besin gereksinimi türler arasında oldukça farklılık göstermektedir. Bitki dokularının karbonhidratları kullanma kapasitesi türler ve eksplantlar arasında değişmekte (Tremblay ve Tremblay, 1991; Taber ve ark., 1998) ve türlerin karbonhidrat tercihi özgün karbon kaynağının moleküllerini absorbe ve metabolize etme kapasitelerine göre değişmektedir (Mezzetti ve ark., 1991). Bu nedenle, karbonhidrat gereksinimi her tür/genotip ve eksplant için mikroçoğaltım protokollerinin geliştirilmesinde optimize edilmelidir.

Tez kapsamında sukroz ve glikoz gibi farklı karbon kaynaklarının alev ağacına ait gövde uçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltımına olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak da ekzojen olarak eklenen bir karbon kaynağı olmadığında, hem proliferasyon yüzdesinin hem de eksplant başına oluşan gövde sayısının diğer denemelere göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Dışarıdan eklenen bir karbon kaynağının olmadığı durumda endojen olarak bulunan karbonhidratın bazı gövdelerde gelişimi sağlamakta ancak endojen karbon kaynağı tamamen tükendiğinde gövde gelişimi muhtemelen temel metabolik yollar için yeterli enerji/karbon olmadığı için durmaktadır.

Gövde dormansisinin kırılması, gövde gelişiminin başlaması ve sürdürülmesi için fazla miktarda şeker alınımına gereksinim duymaktadır (Gemas ve Bessa, 2006). Muhtemelen bu nedenle, eksojen olarak karbon kaynağının eklenmediği durumda alev ağacına ait gövde uçlarından çoklu gövde oluşumu gerçekleşmemiştir. Elde edilen sonuçlar, yüksek proliferasyon ve çoklu gövde oluşumu için alev ağacı gövde uçlarının bir karbon kaynağına gereksinim duyduğunu göstermektedir. Benzer sonuç farklı bitkilerin (örneğin, kaju ve sakız ağacı) mikroçoğaltımında da elde edilmiştir (sırasıyla, Gemas ve Bessa, 2006; Koç, 2011).

Denenen karbon kaynakları arasında 30 g l⁻¹ sukrozun daha fazla sayıda eksplant başına gövde oluşturmaları bakımından en etkin olduğu görülmüştür. Yine besiortamına bu miktarda eklenen sukrozun en etkin proliferasyonu sağladığı daha önce pek çok çalışmada (Takayama ve Misawa, 1981; Hung ve ark., 2006; Ghimire ve ark., 2010; Koç, 2011) rapor edilmiştir.

Hagen ve arkadaşları (1991) ve Mezzetti ve arkadaşları (1991) tarafından yapılan çalışmalardan otoklavlama sırasında sukrozun %5' nin glikoz ve fruktoza hidroliz edildiği bilinmektedir. Yine Ślesak ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmadan da besiortamında kademeli olarak sukroz miktarı azalırken, glikoz ve fruktoz içeriğinin arttığı görülmektedir. Sukroz hücre duvarına bağlı invertaz enzimi tarafından glikoz ve fruktoza hidroliz edilmekte ve hücre içine alınmaktadır.

Tez kapsamında yapılan denemelerde besiortamı sadece glikoz ile desteklendiğinde de çoklu gövde oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak, bu oluşumun sukroz ile desteklenen besiortamında daha fazla olması alev ağacına ait gövde uçlarının proliferasyonunda sukrozun parçalanması ile oluşan glikozun yanı sıra yine adı geçen disakkaritin parçalanma ürünü olan fruktoza da gereksinim duyduğunu göstermektedir.

4.4 SIVI KÜLTÜR ORTAMLARINDA *IN VITRO* PROLİFERASYON

Son zamanlarda sıvı kültürler bitkilerin *in vitro* çoğaltımı ve hızla büyümesi için etkin olarak kullanılmaktadır (Örneğin Ziv, 1989; İlan ve ark., 1995; Park ve ark., 2000; Kim ve ark., 2004; Luna ve ark., 2008; Steinmacher ve ark., 2011). Tez kapsamında uygun besiortamı içeriği, bitki büyüme düzenleyicisi ve sukroz miktarı belirlendikten sonra gövde proliferasyonu için yarı-katı ortamın yanı sıra sıvı kültür sistemleri de denenmiştir. Sıvı kültür için tez kapsamında 3 farklı seçenek denenmiştir. İlk seçenekte herhangi bir destek matriksi olmadan 2 mg l⁻¹ BA ve 30 g l⁻¹ sukroz içeren sıvı MS besiortamına aktarılan kültürler, farklı hızlarda (50, 100 ve 200 rpm) devamlı olarak çalkalanmıştır. Denenen bir diğer seçenek ise eksplantların sıvı besi ortamına membran taşıyıcı destek sistemi aracılığıyla temasını içermektedir. Üçüncü seçenekte ise sıvı besiortamı ile eksplantların belirli periyotlarda ve istenilen sürede temasını sağlayan geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılmıştır.

Sıvı çalkalama kültürlerinin bitki doku kültürü çalışmalarında başarılı olduğu süs bitkilerini de içeren birçok çalışma bulunmaktadır (Takayama ve Misawa, 1981; Takayama ve ark., 1991; Bergoñón ve ark., 1992; Tewary ve Oka, 1999; Kadota ve Niimi, 2004; Piatczak ve ark., 2005; Hung ve ark., 2006). Yarı-katı besiortamında elde edilen sonuçların sıvı besiortamı ile karşılaştırıldığı *Begonia X hiemalis* bitkisinde yaprak parçalarından en fazla tomurcuk gelişimi 30-150 ml MS besiortamı içeren 300 ml'lik Erlermayr kaplarının 180 rpm'de çalkalanması ile elde edilmiştir (Takayama ve Misawa, 1981). Bir başka çalışmada ise *Wasabi japonica* bitkisine ait gövde uçları 5 µM BA ile desteklenen sıvı MS besiortamında 80 rpm' de çalkalanarak, yarı-katı besiortamına göre daha fazla çoğaltım oranları ve taze ağırlık artışları göstermiştir (Hung ve ark., 2006). Gövde proliferasyonu *Dioscorea japonica* (Kadota ve Niimi, 2004) ve *Centaurium erythraea* (Piatczak ve ark., 2005) bitkilerinde de katı besiortamlarına göre sıvı besiortamında 3 kat daha iyi olmuştur. Sıvı kültürün olumlu etkisi muhtemelen sıvı besiortamına tamamen batırılan

eksplantların besiortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerini tüm yüzeyi ile daha iyi ve çabuk almaları nedeniyledir (Hung ve ark. 2006).

Gövdelerin hızla büyümesini ve çoğalmasını uyaran *in vitro* kültür koşulları bazen yapısal ve fizyolojik olarak anormal bitkilerin oluşması ile sonuçlanmaktadır (Ziv ve ark., 1987). Özellikle sıvı besiortamında kültüre alınan eksplantlar agar ile katılaştırılan besiortamına göre fizyolojik, anatomik ve büyük morfolojik anormallikler ile sonuçlanan suyun olağandışı apoplastik yığılmasına daha açıktır (Ziv, 1991; Paek ve ark., 2001). Bu anormalliklerin tamamı hiperhidrisite olarak bilinmekte ve rejenere olan bitkilerde değişik oranlarda camsılaşma (Deberg ve ark., 1992), mezofil ve gövde korteksinde hipertrofi, bozuk ve işlevsel olmayan stoma, epidermal devamsızlık (Apóstolo ve Llorente, 2000) görülmektedir. Kültür kabındaki yüksek bağıl nem hiperhidrisitenin asıl nedenidir (Benson, 2000; Kevers ve ark., 2004).

Tez kapsamında alev ağacına ait gövde uçlarının hiçbir destek matriksi kullanmadan farklı hızlarda çalkalanarak karıştırılması ve eksplantların havalandırılması ile sıvı kültüre aktarımı, sağlıklı bir proliferasyonu sağlayamamış ve gelişen gövdelerin hepsinde hiperhidrisite (vitrifikasyon) tespit edilmiştir. Her ne kadar çalkalanarak, besiortamının karıştırılması ve eksplantların havalandırılması sağlanmaya çalışılsa da, eksplantlar sürekli sıvı besiortamı ile temas nedeniyle normal gelişim gösterememişlerdir. Sıvı kültürlerde hiperhidrisite oluşumu bilinen bir sorun olduğundan tez kapsamında elde edilen sonuçta bir kez daha sıvı kültürlerde oluşan bu soruna dikkat çekmektedir.

Birçok bitkide sıvı kültürlerde oluşan hiperhidrisite sorunun giderilmesi için pamuk fiberleri, selüloz, cam bilyeler, poliüretan köpük, Florialite[®], kaya yünü ve şekerkamışı küspesi gibi inert destek matriksleri kullanılmıştır (Conner ve Meredith, 1985; Kozai, 1991; Young ve ark., 1991; McCulloch ve ark., 1994; Ichimura ve ark., 1995; Kirdmanee ve ark., 1995a,b; Afreen-Zobayed ve ark., 1999; Prakash ve ark., 2004; Soccol ve ark., 2004). Destek matriksleri yüksek seviyede havalandırma

sağlayarak ve kesintisiz ve kolay besin alınımını sağlayarak, gövde büyümesine izin vermektedir (Prasad ve Dutta Gupta, 2006).

Tez kapsamında gövde uçlarından proliferasyonun gerçekleşmesinde hiperhidrisitenin ortadan kaldırılması ya da azaltılması amacıyla membran taşıyıcı destek sistemi kullanılmıştır. Membran taşıyıcı destek sistemi sıvı kültür ortamında destek aracılığıyla eksplantların besin alınımını sağlamakta ve en önemlisi eksplantların tamamen sıvıya gömülmelerini engellemektedir. Membran taşıyıcı destek sistemi yarı-katı ve sıvı besiortamlarının özelliklerini birleştirmektedir. Sistem hem eksplantlara yarı-katı besiortamındaki gibi tutunma zemini sağlanmakta hem de sıvı besiortamı ile temas olanağı sunmaktadır. *Gladiolus hybridus* yapraklarının kullanıldığı, membran taşıyıcı destek sistemi ile yapılan bir çalışmada ise membran taşıyıcı destek sistemi yarı-katı besiortamından daha yüksek oranda ve daha hızlı bir proliferasyon sağlamıştır. Çalışmada 35 günlük deney süresince gövde sayısındaki artışın en fazla olduğu ve en fazla sürgün oluşumunu sağlayan ortamın da membran taşıyıcı destek sistemi olduğu görülmüştür. Deney sonunda yarı-katı besiortamında oluşan gövde sayısı 24,79 iken, membran taşıyıcı destek sisteminde ise 32,0'dir (Dutta Gupta ve Prasad, 2010).

Yine Watad ve arkadaşlarının 1995'te *Carnation* ile yaptıkları çalışmada membran taşıyıcı destek sistemindeki proliferasyon (%45), yarı-katı besiortamından daha fazladır.

Membran taşıyıcı destek sisteminde tez kapsamında yapılan denemelerde ise , çalkalama kaplarında oluşan vitrifikasyon %100'den %65'e kadar inmiştir. Proliferasyon oranı ise membran taşıyıcı destek sisteminde %35'lere kadar yükselmiştir. Bu sistemin kullanılması ile hiperhidrisite kısmen engellenmiş ve proliferasyon sağlansa da yarı-katı besiortamındaki proliferasyon oranına ulaşamamıştır.

Sıvı kültürlerde destek matrislerinin kullanımının yanı sıra hiperhidrisitenin azaltılmasında ince-film kültürleri (Adelberg, 2006) ve geçici daldırma biyoreaktör sistemleri (Afreen, 2006) de kullanılmaktadır. Tez kapsamında alev ağacına ait gövde uçları farklı daldırma periyotlarında sıvı besiyortamı ile temas ettirilerek, geçici daldırma biyoreaktör sisteminin alev ağacına ait vejetatif tomurcukların çoğaltılmasındaki etkinliği araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, geçici daldırma biyoreaktör sisteminde gövde uçlarının çalkalama kaplarına ve membran taşıyıcı destek sisteme göre daha fazla proliferasyonu sağladığını göstermektedir. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde sıvı ile sürekli temas söz konusu değildir. Sürekli sıvı besiyortamı ile temas yerine belirli zamanlarda istenilen süre sıvı besiyortamına daldırma, oluşan gövdelerde vitrifikasyonu görece azaltmıştır. Geçici daldırma biyoreaktör sistemi bitki büyümesi sırasında yüksek havalandırma imkanı sağlanır.

Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde eksplantların sıvı besiyortamı ile temas sıklığı ve süresi proliferasyonu etkilemektedir. Uzun daldırma süresi (her 6sa/1 sa) patatesta tüberizasyonda etkili olurken, kısa süreli daldırma zamanları (12sa/1dk) *Hevea brasiliensis*' te ise somatik embriyo oluşumuna neden olmuştur (sırasıyla Etienne ve Berthouly, 2002; Etienne ve ark., 1997). Roels ve arkadaşlarının (2005) *Musa* ile yaptıkları çalışmada denenen 4, 12, 22 dakikalık daldırma sürelerinde en iyi proliferasyonun (% 5,9) 22 dk'lık deneme ile elde edildiği görülmüştür. Ancak daldırma süresi ve daldırma sıklığı proliferasyon üzerinde birlikte etkilidir.

Uzun süreli daldırma ve sık daldırma bitkide vitrifikasyona neden olabilmektedir. *Eucalyptus* ile yapılan çalışmada her 5dk/10dk'lık yapılan daldırma hiperhidrisiteye neden olmuştur. Daldırma her 20 dk/10dk olarak uygulandığında ise proliferasyonda artış gözlenmiştir. Daldırma sıklığının azaltılması vitrifikasyonu azaltırken, proliferasyonu arttırmıştır. Yapılan çalışmada en yüksek proliferasyon (%3,8) ise her 10dk/30sn ile sağlanmıştır (McAlister,2005). Benzer şekilde Kruger ve arkadaşları (1991) *Amelanchier* × *grandiflora* ile yaptıkları çalışmada, her

30dk/5dk'lık daldırmanın hiperhidrisiteye neden olduğunu, ancak 60dk/5dk'lık daldırmada ise hiperhidrisitenin oluşmadığını belirtmişlerdir.

Berthouly ve arkadaşlarının (1995) *Coffea* bitkisi ile yaptıkları çalışmada ise her 6saatte 1, 5 ve 15 dakikalık daldırma süreleri uygulanmış ve en iyi proliferasyonun 6sa/15dk ile sağlandığını belirlenmiştir. Hergün 2 veya 6 kez yapılan 15 dakikalık daldırmalar ise sırasıyla %64 ve %90 hiperhidrisiteye neden olmuştur.

Tez kapsamında yaptığımız denemelerde günde 3 kere 16 dakika süreyle (8s/16') sıvı besiortamı ile temas sonucunda %92 vitrifikasyon elde edilmiştir. Bu yüksek vitrifikasyonun nedeni gövdelerin sıvı besiortamına çok sık daldırılmaları nedeniyledir. Diğer bir daldırma aralığında (16s/16') ise vitrifikasyon %16 olarak elde edilmiştir. Daldırma aralığının arttırılması (16 saate çıkarılması) sıvı besiortamı ile daha seyrek teması sağladığı için vitrifikasyonun azalması ile sonuçlanmıştır. Nitekim, sıvı besiortamı ile temasın 24 saatte bir kereye (24s/16') uzatılması ile vitrifikasyon %10'a düşürülmüş ve gövde uçlarında %80 proliferasyon sağlanmıştır. Bununla birlikte, alev ağacı gövde uçlarında *in vitro* proliferasyonun sağlanması için 24 saate bir yapılan daldırma süresi optimize edilerek, proliferasyon oranı daha da iyileştirilebilir.

4.5 *IN VITRO* KÖKLENME

Organize olan dokularda oksinlerin apikal dominansı sağlaması ve absisyonu etkilemesinin yanı sıra kök oluşumunu teşvik ettiği de bilinmektedir (Tamas, 1995). Bu nedenle tez kapsamında iki farklı oksinin (IBA ve IAA) *in vitro* çoğaltılan alev ağacına ait mikrogövdelerin *de novo* köklenmesine olan etkileri araştırılmıştır. Buna ek olarak, köklenme için oksin ile görece uzun süreli muamelenin sonuçları da değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, denenen oksin türleri içinden IBA' nın IAA' ya göre özellikle kısa süreli muamele sonucunda daha etkin olduğunu göstermiş ve bu deneme ile %40 köklenme elde edilmiştir. IBA ve IAA' nın besiortamına denature olmaya eğilimli olduğu ve bitki dokuları tarafından hızla metabolize edildiği bilinmektedir (Gaspar ve ark., 1996). Hızlı metabolizasyon nedeniyle kısa süreli ama görece yüksek miktarda IBA içeren besiortamında en fazla köklenme elde edilmiş olabilir. Kısa süreli düşük miktarda IBA veya fazla miktarda IAA ile besiortamının desteklenmesi ise görece daha düşük köklenmeye neden olmuştur.

5. SONUÇ

Alev ağacına ait gövde uçlarının *in vitro* proliferasyonu için yarı-katı ve sıvı besiortamlarının denendiği tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Alev ağacına ait gövde uçları NH_4NO_3 'e ek olarak, azot kaynağı olarak KNO_3 'ü tercih etmekte ve bu nedenle de KNO_3 içeren MS ve QL besiortamlarında daha iyi proliferasyona olmaktadır.
- Denenen 4 farklı sitokinin içinde alev ağacının *in vitro* koşullarda proliferasyonunu en iyi sağlayan bitki büyüme düzenleyicisi bir adenin türevi olan BA'dır. Görece düşük miktardaki BA (2 mg l^{-1}) ile desteklenen yarı-katı MS besiortamında %100 proliferasyon ve eksplant başına yaklaşık 3.7 gövde elde edilmiştir.
- Yüksek proliferasyon ve çoklu gövde oluşumu için alev ağacı gövde uçları bir karbon kaynağına gereksinim duymaktadır. Denenen karbon kaynakları arasında 30 g l^{-1} sukrozun daha fazla sayıda eksplant başına gövde oluşturması bakımından en etkin olduğu görülmüştür.
- Alev ağacına ait gövde uçlarının hiçbir destek matriksi kullanmadan farklı hızlarda çalkalanarak karıştırılması ve eksplantların havalandırılması ile sıvı kültüre aktarımı, sağlıklı bir proliferasyonu sağlayamamış ve gelişen gövdelerin hepsinde hiperhidrisite (vitrikasyon) tespit edilmiştir.
- Vitrikasyonun engellenmesi ya da azaltılması amacıyla membran taşıyıcı destek sistemi denenmiştir. Alev ağacına ait gövde uçları membran taşıyıcı destek sistemine konulmuş ve 4 haftalık süre boyunca sıvı besi ortamıyla destek materyali aracılığıyla teması sağlanmıştır. Vitrikasyon oranı %65'e düşürülmüş ve %35 oranında proliferasyon sağlanmıştır.
- Vitrikasyon miktarı görece geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak ve alev ağacına ait gövde uçlarının günde 1 kez 16 dakikalığına ($24\text{s}/16'$) sıvı besi ortam ile temas etmesi sonucunda %10'a düşürülmüş ve gövde uçlarından yüksek proliferasyon (%80) sağlanmıştır.
- *In vitro* çoğaltılan gövdelerde en fazla köklenme (%40), 4 mg l^{-1} IBA ile desteklenen yarı-katı MS besiortamında 1 hafta kültürlenme sonrasında oksin

içermeyen besiortamına aktarım ile sağlanmıştır. Köklenen gövdeler, başarılı bir şekilde *in vivo* koşullara aktarılmış ve iklimlendirilmişlerdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adelberg JW (2006) Agitated thin-films of liquid media for efficient micropropagation. In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds.) Plant Tissue Culture Engineering, Springer, The Netherlands, pp. 103-117.
2. Adelberg JW, Desamero NV, Hale SA, Young RE (1997) Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid/membrane system. Plant Cell Tissue Organ Culture 48: 1-7.
3. Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (1995) Glossary, In: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwer, Dordrecht pp: ix-xii.
4. Afreen F (2006) Temporary immersion bioreactor engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds.) Plant Tissue Culture Engineering, Springer, The Netherlands, pp. 189-202.
5. Afreen-Zobayed F, Zobayed SMA, Kubota C, Kozai T, Hasegawa O (1999) Mass propagation of *Eucalytus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. Annals of Botany 85: 587-592.
6. Akdemir H, Kaya E, Ozden Y (2010) *In vitro* proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium,sugar combinations and culture vessels. Scientia Horticulturae 126:268-275.
7. Akin-Idowu P, Ibitoye D, Ademoyegun O (2009) Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African Journal of Biotechnology 8(16): 3782-3788.
8. Alvard D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell Tissue Organ Culture 32: 55-60.

9. Anis M, Varshney A, Siddique I (2010) *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Agroforest Systems - DOI 10.1007/s10457-009-9238-6.
10. Apostolo NM, Llorente BE (2000) Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link.) Schn. *In Vitro Cellular Developmental Biology -Plant* 36:243-249.
11. Aragón CE, Escalona M, Rodriguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2009) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular Developmental Biology — Plant* DOI 10.1007/s11627-009-9246-2.
12. Barbar SB, Jain N (1998) ‘Isugol’ as an alternative gelling agent in plant tissue culture media. *Plant Cell Reports* 17: 318-322.
13. Babbar SB, Jain R, Walia N (2005) Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 41: 258-261.
14. Benson E (2000) Do free radicals have role in plant tissue culture recalcitrance? Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 36:163–170.
15. Bergoñón S, Codina C, Bastida J, Viladomat F, Melè E (1992) The shake liquid culture as an alternative way to the multiplication of *Narcissus* plants. *Acta Horticulturae* 325: 447-452.
16. Bernal A, Machado P, Cortegaza L, Carmona ER, Rivero O, Zayas CM, Odalis N, Perez A, Santana I, Arencibia AD (2008) Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS). *Sugar Technology* 10(1) : 42-47.
17. Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, New York, pp 165–195.

18. Berthouly M, Dufour M, Alvard D, Caraco C, Alemano L, Teisson C (1995) Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: American Society of Irrigation Consultants Publishers (eds) 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon (pp 514-519), Vevey.
19. Bhattacharya P, Dey S, Bhattacharya BC (1994) Use of low-cost gelling agents and support matrixes for industrial scale plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 37: 115-123.
20. Biahoua A, Bonneau L (1999) Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Reports* 19: 185–190.
21. Brand MH, Kiyamoto R (1994a) Behaviour of *Rhododendron* tissue affected by tissue proliferation. *In Vitro Cellular Developmental Biology* 30A:72.
22. Brand MH, Kiyamoto R (1994b) Tissue proliferation apparently not lignotubers. *Yankee Nursery Q* 3:5-6.
23. Brickell C (1996) *Enciclopedia de Plantas y Flores*. Royal horticultural society, Grijalbo Mondadori, Verona, Italy, pp566.
24. Burns JA, Schwarz OJ (1996) Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) seedling explants. *Plant Cell Reports* 15:405–408.
25. Chang HS, Chakrabarty D, Hanh EJ, Paek KY (2003) Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 39:129-34.
26. Chen U, Hsia C, Yeh M, Agrawal D, Tsay H (2006) *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of bupleurum kaoi- an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 42:128-133.

27. Ciccotti AM, Bisognin C, Bottocletti I, Salvadori A, Herdemertens M, Jarausch W (2008) Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research*, 6(2): 445-458.
28. Conner AJ, Meredith CP (1985) An improved polyurethane support system for monitoring growth in plant cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3–4(1):59–68.
29. Debergh PC, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term ‘vitrification’ as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 30:135–140.
30. Deng XM, Huang MR, Wang MX (2004) Establishment of high regeneration system of *Photinia fraseri* “Red Robin”. *Jiangxi For Science Technology* 4:19-21.
31. Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* propagation of *Paradox* walnut rootstock. *Horticultural Science* 19 (4): 507-509.
32. Dutta Gupta S, Prasad VSS (2003) *In vitro* shoot multiplication and regeneration kinetics of *Gladiolus* as effected by Triadimefon. *Indian Journal of Plant Physiology International Conference on Pharmacy and Pharmacology Issue*, pp. 719-723.
33. Dutta Gupta S, Prasad VSS (2006) Matrix-supported liquid culture systems for efficient micropropagation of floricultural plants. In: Teixeira da Silva JA (ed.) *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and Topical Issues*, Vol. II, Global Science Books, UK, pp. 487-495.
34. Dutta Gupta S, Prasad VSS (2010) Shoot multiplication kinetics and hyperhydric status of regenerated shoots of *Gladiolus* in agar-solidified and matrix-supported liquid cultures. *Plant Biotechnology Reports* 4: 85–94.
35. Eibl R, Eibl D (2006) Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds.) *Plant Tissue Culture Engineering*, Springer, The Netherlands, pp. 205-226.

36. Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez B, Daquinta M, Gonzalez JL, Desjardins Y, Barroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18, 743-748.
37. Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion system in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69:215-231.
38. Etienne H, Lartaud M, Michaux-Ferrière N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro Cellular Developmental Biology* 33:81-87.
39. Ettinger TL, Preece JE (1985) Aseptic micropropagation of *Rhododendron*. P.J.M. hybrids. *Journal of Horticultural Sciences* 60:269-74.
40. Famalaer I, Ennik E, Eikelboom W, Van Tyl JM, Cremers Molenaar J (1996) The initiation of callus and regeneration from callus of *Tulipa gesneriana*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 47: 51-58.
41. Fuentes SRL, Calheiros MBP, Manetti-Filho J & Vieira LGE (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 60: 5–13.
42. Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 32: 272-289.
43. Gemas V, Bessa A (2006) Influence of various carbohydrates in shoot development in nodal culture of Guinean *Anacordium occidentale* genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 85:103-108.
44. Ghimire BK, Seong ES, Goh EJ, Kim NY, Kang WH, Kim EH, Yu CY, Chung IM (2010) High-frequency direct shoot regeneration from *Drymaria cordata* Willd. leaves. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 100:209–217.

45. Gilman EF, Watson DG (1994) *Photinia glabra* Red-Leaf Photinia. Fact Sheet ST-442.
46. Hagen SR, Muneta P, Augustin J & Letoumeau D (1991) Stability and utilization of picloram, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 25: 45–48.
47. Hahn EJ, Paek KY (2002) Plantlet growth and CO₂ concentration in the culture vessels as affected by medium supply in bioreactor culture of *Chrysanthemum*. In: *Proceedings of the 1st international symposium for in vitro mass propagation of plants*, Agricultural University, Norway, p. 25.
48. Hammatt N, Grant NJ (1993) Apparent rejuvenation of mature wild cherry (*Prunus avium* L.) during micropropagation. *Journal of Plant Physiology* 141: 341–346.
49. Hang JS, Kim CK, Park SH, Hirschi KD, Mok JG (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of bottle gourd. (*Lagenaria siceraria* Standl.) *Plant Cell Reports* 23:692-698.
50. Hanhineva K, Kokko H, Renlampi S (2005) Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant* 41: 826–831.
51. Hatzilazarou S, Economou A, Antoniou T, Ralli P (2001) Propagation of *Ebenus cretica* L. by tissue culture. *Propagation Ornamental Plants* 1:25-7.
52. Hasegawa PM (1980) Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose tips. *Journal of American Society for Horticultural Science* 105(2):216-20.
53. Hee Han B, Yu JJ, Yae BW, Paek KY (2004) *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* (Gorgia) by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. *Scientia Horticulturae* 103: 39-49.
54. Hosokawa K, Oikawa Y, Yamamura S (1998) Mass propagation of ornamental gentian in liquid medium. *Plant Cell Reports* 17: 747-751.

55. Hung CD, Johnson K, Torpy F (2006) Liquid culture for efficient micropropagation *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura. *In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant* 42:548–552.
56. Ichimura K, Uchiumi T, Tsuji K, Oda M, Nagaoka M (1995) Shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in tissue culture using several kinds of supporting materials. *Plant Science* 108:93–100.
57. Ilan A, Ziv M, Halevy A H (1995) Propagation and corm development of *Brodiaea* in liquid cultures. *Scientia Horticulturae* 63: 101–112.
58. Janick J, Whipkey A, Kitto SL, Frett J (1994) Micropropagation of *Cephalotaxus harringtonia*. *Horticultural Science* 29(2): 120-122.
59. Jo E A, Murthy HN, Hahn E J, Paek KY (2008) Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 44 (1): 26-32.
60. Kadota M, Niimi Y (2004) Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and semi-solid medium culture. *Scientia Horticulturae* 102:461–466.
61. Kane ME, Sheehan TJ, Philman NL (1987) A micropropagation protocol using fraser *Photinia* for mutation induction and new cultivar selection. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 100: 334-337.
62. Karuppusamy S, Kalimuthu K (2010) Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis neesiana*: a valuable endemic medicinal plant. *Advances in Biological Research* 4(4):211-216.
63. Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dimmes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typical stress induced state of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 77:181–191.
64. Kim EK, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2003) High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 73: 231-236.

65. Kim E K, Hahn E J, Murthy H N, Paek K Y (2004) Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor system. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 818–822.
66. Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T (1995a) Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*: anatomical comparisons. *Acta Horticulturae* 393:111–115.
67. Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T (1995b) Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 31:144–149.
68. Koç İ (2011) Sakız ağacının (*Pistacia lentiscus*) *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı ve saklanması. GYTE, Yüksek Lisans Tezi.
69. Kozai T (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh PC & Zimmerman RH (eds) *Micro-propagation Technology and Application* (pp. 447–469). KluwerAcademic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
70. Kozai T (1991) Acclimatization of micropropagated plants. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, high-tech micropropagation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 127–141.
71. Kruger S, Robacker C, Simonton W (1991) Culture of *Amelanchier X grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 27:219-226.
72. Lambardi M, Sharma KK, Thorpe TA (1993) Optimization of *in vitro* formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) *Plant* 29,189-199.
73. Larraburu EE, Carletti SM, Rodríguez Cáceres EA, Llorente BE (2007) Micropropagation of *Photinia* employing rhizobacteria to promote root development. *Plant Cell Reports* 26: 711–717.

74. Leifert C, Pryce S, Lumsden PJ, Waites WM (1992) Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Culture 30: 171–179.
75. Levin R, Gaba V, Tal B, Hirsch S, De Nalo D, Vasil IK (1988) Automated plant tissue culture for mass propagation. Biotechnology 6: 1035-1040.
76. Lloyd G, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip cultures. Combined Proceedings International Society 30: 421-427.
77. Lingdi L, Spongberg SA (2003) Photinia. Flora of China 9:121-137.
78. Luna C, Collavino M, Mroginski L, Sansberro P (2008) Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis. Plant Cell Tissue Organ Culture 95: 13–19.
79. Marascuilo LA, McSweeney M (1977) Post-Hoc Multiple Comparisons in sample preparations for test of homogeneity. In: McSweeney M, Marascuilo LA (eds.) Non-Parametric and Distribution Free Methods the Social Sciences. Books/Cole Publication. Belmont CA. pp. 141-147.
80. McAllister B, Finnie J, Watt MP, Blakeway F (2005) Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalytus* clones in Mondi Forests (SA), Plant Cell Tissue Organ Culture 81, 347-358.
81. McCown BH, Lloyd GB (1983) A survey of responses of *Rhododendron* to *in vitro* culture. Plant Cell Tissue Organ Culture 2:77-85.
82. McCulloch SM, Briggs BA, Spethmann W (1994) Rooting and establishment of *Rhododendron* microcuttings. Acta Horticulturae 364: 27-34.
83. Merkle SA, Dean JF (2000) Forest tree biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 11: 298–302.

84. Mezzetti B, Coute LS, Rosati P (1991) *Actinidia deliciosa in vitro* II. Growth and exogenous carbohydrate utilization by explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 26: 153–160.
85. Mirza MS, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P, Mallik KA (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237: 47–54.
86. Moraes-Cerdeira RM, Krans JV, McChesney JD, Pereira AMS, Franca SC (1995) Cotton fiber as a substitute for agar support in tissue culture. *Horticultural Science* 30: 1082-1083.
87. Murashige T, Skoog M (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473-497.
88. Murch SJ, Liu C, Romero RM, Saxena PK (2004) *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 63–68.
89. Nagakubo T, Takaichi M, Oeda K (1997) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 39:5-19.
90. Nakano M, Sakakibara T, Suzuki S, Saito H (2000) Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lillium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor, 2,3,5- triiodobenzoic acid. *Plant Science* 158: 129-137.
91. Nhut DT (1998) Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Reports* 117: 913-916.
92. Nhut DT, Teixeira da Silva JA, Le BV, Tran Thanh Van K (2003) Thin cell layer morphogenesis as a powerful tool in ornamental plant micropropagation and biotechnology. In: Nhut DT, Le BV, Tran Thanh Van K, Thorpe T (eds.) *Thin Cell Layer Culture System*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 247-284.

93. Nhut TD, Teixeira da Silva JA, Huyen PX, Paek KY (2004) The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. *Scientia Horticulturae* 102: 407-414.
94. Nhut DT, Hai NT, Huong DTQ, Hang NTT, Teixeira da Silva JA (2005) Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in begonia petiole-leaf transverse thin cell layer culture. *Propagation Ornamental Plants*. 5: 149-155.
95. Nhut DT, Nguyen TH, Trinh Don N, Teixeira da Silva JA, Tran Thanh Van K (2006) Latest applications of thin cell layer (TCL) culture systems in plant regeneration and morphogenesis. In: Teixeira da Silva JA (ed.) *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and Topical Issues, Vol. II*, Global Science Books, UK, pp. 465-471.
96. Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Omokolo ND, Lieberei R (2008) Regeneration of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports*, 27, 667–676.
97. Nowak J (1998) Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 34:122–130.
98. Ozden Tokatli Y, De Carlo A, Gumusel F, Pignatelli S, Lambardi M (2008) Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants* 8 (1):17-22.
99. Ozden Tokatli Y, Akdemir H (2010) Cryopreservation of fraser Photinia (*Photinia x fraseri* Dress.) via vitrification-based one-step freezing techniques. *Cryoletters* (baskıda)
100. Özden-Tokatlı Y, Ozudogru EA, Kaya E, Akdemir H, Benelli C, Gümüşel F, Lambardi M, (2007) Geçici daldırma biyoreaktör sisteminin bitki doku kültürü çalışmalarında kullanımı. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, pp. 148-150.
101. Paek KY, Murthy HN (2002) High frequency bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 68: 247-252.

102. Paek K Y, Hahn E J, Son S H (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37:149–157.
103. Pareek A, Kothari SL (2003) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae* 98: 449-459.
104. Park S Y Murthy H N, Paek K Y (2000) Mass multiplication of protocorm-like bodies (PLBs) using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 63: 67–72.
105. Petersen KK, Hansen J, Krogstrup P (1999) Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus ogiformis* Honda ‘*Giganteus*’. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 58: 189–197.
106. Piatczak E, Wielanek M, Wysokinska H (2005) Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurea erythraea* Rafn. *Plant Science* 168:431–437.
107. Prakash S, Hoque MI, Brinks T (2004) Culture media and containers. In: Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a technical meeting organised by the Joint FAO/IAEA, Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, pp. 29-40.
108. Prasad VSS, Dutta Gupta S (2006) *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 87: 263–271.
109. Pritchard J, Wyn-Jones RG, Tomos AD (1991) Turgor, growth and rheological gradients in wheat roots following osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* 42: 1043–1049.

110. Ramirez-Malagón R, Borodanenko A, Barrera-Guerra J L, Ochoa-Alejo N (1997) Micropropagation for fraser photinia (*Photinia fraseri*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 219–222.
111. Rao MS, Purohit SD (2006) *In vitro* shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Celastrus paniculatus* Willd. - Biology Plant. 50: 501-506.
112. Reuther G (1985) Principles and application of the micropropagation of ornamental plants. In: Shafer-Menuhr (ed.) *In vitro* Techniques Propagation and Long-term Storage, Martinus Nijhaff, W. Junk Publishers, Luxembourg, pp. 1-15.
113. Roels S, Escalona M, Cejas I, Noceda C, Rodriguez R, Canal MJ, Sandoval J, Debergh P (2005) Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. Plant Cell Tissue Culture 82:57-66.
114. Rout GR, Mohapatra A, Jain SM (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Science Direct Biotechnology Advances 24:531-560.
115. Rout GR, Jain SM (2004) Micropropagation of ornamental plants-cut flowers. Propagation Ornamental Plants 4(2):3-28.
116. Roy AT, Leggett G, Koutoulis A (2001) Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, 37, 79-83.
117. Rzepka-Plevnes D, Kurek J (2001) The influence of media composition on the proliferation and morphology of *Ficus benjamina* plantlets. *Acta Horticulturae* 560:473-6.
118. Quoirin M, Lepoivre P (1977) Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae* 78:437-442.
119. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.var. Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.

120. Scholten HJ, Pierik RLM (1998) Agar as gelling agent: differential biological effects *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 77: 109-116.
121. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, (2001) Ankara.
122. Shetty K, Carpenter TL, Curtis OF, Potter TL (1996) Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* spp. *Plant Science* 120:175–183.
123. Slater R, Russ K, Blake JH (2007) Home and Garden Information Center 1081 , Clemson University.
124. Slesak H, Skoczowski A, Przywara L (2004) Exogenous carbohydrate utilisation by explants of *Brassica napus* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 45–51.
125. Soccol CR, Mohan R, Quoirin M, Pandey A (2004) Use of sugarcane bagasse as an alternative low-cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 40:408-411.
126. Steinitz B, Cohen A, Goldberg Z, Kochba M (1991) Precocious gladiolus corm formation in liquid shake cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 26: 63-70.
127. Steinmacher DA, Guerra MP, Saare-surminski K, Lieberei R (2011) A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany* DOI 10.1093.
128. Supaibulwatana K, Mii M (1997) Organogenesis and somatic embryogenesis from young flower buds *Agapanthus africanus* Hoffmanns. *Journal Plant Biotechnology* 14: 23-28.
129. Suzuki S, Nakano M (2001) Organogenesis and somatic embryogenesis from callus cultures in *Muscari armeniacum* Leichtl. Ex Bak. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, 37: 382-387.

130. Taber RP, Zhang C, Hu WS (1998) Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menzeiesii*) somatic embryo development. Canadian Journal of Botany 76:863-871.
131. Takayama S, Misawa M (1983) A scheme for mass propagation of *Lillium in vitro*. Horticultural Science 18: 353-362.
132. Takayama S, Amo T, Fukano M (1991) Rapid clonal propagation of *Hyacinthus orientalis* bulbs by shake culture. Scientia Horticulturae 45 (3-4): 315-321.
133. Takayama and M. Misawa (1981) Mass propagation of *Begonia* × *hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Physiology 22: 461-467.
134. Tamas IA (1995) Hormonal regulation of apical dominance. In: Davies P.J. (ed.). Plant Hormones. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers Pp. 572-597.
135. Teisson C, Alvard D (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A (eds) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 105-110.
136. Teixeira da Silva JA (2003) Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (12): 683-691.
137. Teixeira da Silva JA, Fukai S (2003) Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. Asian Journal Plant Science 2: 505-514.
138. Teng WL (1997) Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft technique. Plant Cell Tissue Organ Culture 49: 153-156.
139. Teng WL, Liu YJ (1993) Restricting hyperhydricity of lettuce using screen raft and water absorbent resin. Plant Cell Tissue Organ Culture 34: 311-314.
140. Tewary PK, Oka S (1999) Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture. Plant Cell Tissue Organ Culture 59 (3): 223-226.

141. Tran Thanh Van K (1980) Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. *International Review of Cytology* 32: 291-311.
142. Tran Thanh Van K, Trinh TH (1986) Fundamental and applied aspects of differentiation *in vitro* and *in vivo*. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV (eds.) *Handbook of Plant Cell Culture, Techniques and Application*. Vol 4, McMillan Publishing Company, New York, pp. 316-335.
143. Tremblay L, Tremblay FM (1991) Carbohydrates requirement for the development of a black spruce (*Picea mariana* (Mill) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg) somatic embryo. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 27:95-99.
144. Vagner M, Vondrakova Z, Fischerova L, Opatrna J (1995) Norway spruce somatic embryogenesis: membrane rafts as a compromise between liquid and semisolid media. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*, Kluwer Academic Publishers., Dordrecht, pp. 295-302.
145. Von Aderkas P, Bonga JM (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* 20: 921–928.
146. Watad AA, Kochba M, Nissim A, Gaba V (1995) Improvement of *Aconitum napellus* micropropagation by liquid culture of floating membrane rafts. *Plant Cell Reports* 14: 345-348.
147. Watad AA, Ahroni A, Zuker A, Shejtman H, Nissam A, Vainstein A (1996) Adventitious shoot formation from carnation stem segments: a comparison of different culture procedures. *Scientia Horticulturae* 65: 313-320.
148. Watad AA, Raghothama KG, Kochba M, Nissim A, Gaba V (1997) Micropropagation of *Spathiphyllum* and *Syngonium* is facilitated by use of interfacial membrane rafts. *Horticultural Science* 32: 307-308.

149. Weathers PJ, Giles KL (1988) Regeneration of plants using nutrient mist cultures. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 24: 727-732.
150. Woo SM, Wetzstein HY (2008) An efficient tissue culture regeneration system for Georgia Plume, *Elliottia racemosa*, a threatened Georgia endemic. *Horticultural Science* 43 (2): 447-453.
151. Wulster G, Sacalis J (1980) Effects of auxins and cytokinins on ethylene evolution and growth of rose callus tissue in sealed vessels. *Horticultural Science* 15:736-7.
152. Yang XJ, Tang DQ, Wang XH, Pan GH (2004) Characters of greening tree species in heavy metal pollution protection in Shanghai. *Chinese Journal of Applied Ecology* 15:687-690.
153. Young RE, Hale A, Camper ND, Keese RJ, Adelberg JW (1991) Approaching mechanization of plant micropropagation. *Transactions of the American Society Agricultural and Biological Engineers* 34:328–333.
154. Ziv M (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. In: Janick J (ed.) *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 1-30.
155. Ziv M, Ronen G, Raviv M (1998) Proliferation of meristematic clusters in disposable pre-sterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 34: 152-158.
156. Ziv M (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro shoots. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation*. Kluwer, Dordrecht, pp 45–69.
157. Ziv M (1989) Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 17: 101–110.
158. Ziv M, Schwartz A, Fleminger D (1987) Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation plants propagated *in vitro*: implication for hardening. *Plant Science* 52:127–134.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe Akbulak 12.04.1983'te Ankara doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2002 yılında Marmara Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2006 yılında eğitimini tamamladı. Lisans eğitimi sonrasında çeşitli kurumlarda biyoloji öğretmenliği yaptı.

2009 yılında GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Yard.Doç.Yelda Özden danışmanlığında “Alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress) süs bitkisinin mikroçoğaltımında sıvı kültür ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin kullanımı.” konulu tez çalışmasını gerçekleştirdi.