

KABUL ve ONAY

Şenay GÖRÜ'nün tez çalışması G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../2002 tarih sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye
(Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Abdulkadir AKÇİN
Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Üye :

Üye :

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../2002 tarih ve sayılı kararı

.....

ÖZET

Bu çalışmada, karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) bitkisinde meristem kültürü tekniği ile virüs eliminasyonu ve bitki üretilmesi denenmiştir. Meristem kültüründe kullanılacak explantlar, *Dianthus caryophyllus*'un genç çeliklerinin meristem uçlarıdır. Denemede MS (Murashige-Skoog) ve ½ MS temel besin ortamları kullanılmıştır. Yapılan çalışmada en iyi bitki gelişiminin MS besiyerinde gerçekleştiği gözlenmiştir. Bunun dışında denemede virüse dayanıklılık, vitrifikasyon (camsılaşma) olasılığı, kök ve sürgün gelişimi de gözlenmiştir. Gözlem sonucunda, gerek virüs belirtisi, gerekse camsılaşma bakımından MS ortamı ½ MS ortamına göre daha iyi sonuç vermiştir.

Sürgün oluşumu ve kök gelişimi için MS ve ½ MS besiyerlerine Kinetin ve NAA'nın iki farklı doz kombinasyonu eklenmiştir. En iyi sürgün oluşumunun 1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin ilaveli MS ortamında gerçekleştiği gözlenmiştir. Yine en iyi kök oluşumu, 1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin, 1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin ilaveli MS besiyerinde gerçekleşmiştir. Virüs belirtisi göstermeyen bitkilerin oranlarına bakıldığında en sağlıklı bitki gelişiminin MS besiyerinde olduğu gözlenmiştir.

ABSTRACT

In this study, virus-free *Dianthus caryophyllus* L. was raised by using meristem culture method. Explants were meristem tips of young cutting. MS (Murashige-Skoog) and ½ MS was used as main culture media. At the end of the study, the best growing was observed in MS culture media. Moreover, resistance to virus, vitrification, root and shoot growth was observed. MS culture media, better than ½ MS media about virus symptoms, vitrification, root and shoot growth. Two different dose combinations of kinetin and NAA were added to MS and ½ MS culture media. 1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin added culture media was determined as the best for shoot growth. Also, 1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin, 1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin added was determined as the best for root growth. When virus-free plants were checked, best results taken from MS culture media.

TEŞEKKÜR

Ülkemizde bilimin hızla geliştiği ve buna paralel olarak bitkiler için geniş ve ümit vadeden araştırmalar yapıldığı bir gerçektir. Ancak geleneksel ıslah ve çoğaltma tekniklerinin, bu gelişmelere rağmen cevap bulamadığı bazı sorunlar da günümüzde devam etmektedir. Doku kültürü çalışmaları, bu anlamda yetiştirme tekniklerine bir alternatif teşkil etmekte ve ıslah çalışmalarını bütünlüleyici önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmamızda, doku kültürünün bu özellikleri düşünülerek, bitkilerde meristem kültürü tekniği ile hastaliksız ve virüssüz materyal üretme amacına gidilmiştir. Bu çalışmada, karanfilin, meristem kültürü tekniği ile üretilmesi sürecinde, sonsuz hoşgörüsünü, deneyimlerini esirgemeyen ve çalışma cesareti veren Danışman Hocam, Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e (GYTE) teşekkürlerimi sunarım. Doku kültürü laboratuvarını kullanmam ve olanaklarından yararlanmam konusunda, bana sonsuz destek ve hoşgörüyle yardım eden, Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Masum BURAK'a, aynı kurumda çalışan, denememi kurmamda ve sürdürmemde yardımcı olan Ziraat Mühendisi Ayşe FİDANCI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	8
3.1. Materyal.....	8
3.2. Yöntem.....	8
3.2.1. Materyalin Alınma Zamanı.....	8
3.2.2. Besin ortamının Belirlenmesi.....	8
3.2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Belirlenmesi.....	10
3.2.4. Hormon Dozu Kombinasyonları.....	10
3.2.5. Sterilizasyon.....	11
3.2.5.1. Besin Ortamının Sterilizasyonu.....	11
3.2.5.2. Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu.....	11
3.2.5.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanların sterilizasyonu.....	12
3.2.5.4. Diğer Sterilizasyonu İşlemleri.....	12
3.2.6. Materyalin Kültüre Alınması.....	13
3.2.7. Besin Ortamının pH'sının Ayarlanması.....	15
3.2.8. Eksplantların Gelişme Koşulları.....	15
3.2.9. Sıcaklık İsteği	15
3.2.10. Işık İsteği.....	15
3.2.11. Işık Yoğunluğu.....	16
3.2.12. Aydınlanma Süresi.....	16
3.2.13 .Eksplantların Gelişimi ve Sürgün Oluşumu.....	16
3.2.14. Köklü Fideciklerin Şaşırtılması.....	17
3.2.15. Virüs İndeks.....	17
3.2.16. Verilerin Değerlendirilmesi.....	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. Sürgün Uzunluğu.....	18
4.2. Kök Uzunluğu.....	22
4.3. Virüs Belirtisi.....	26
4.4. Vitrifikasyon.....	28
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	32
KAYNAKÇA.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
GYTE	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
NAA	Naphtalen Acetic Acid
mg	miligram
l	litre
mm	milimetre
ml	mililitre
cm	santimetre
MS	Murashige-Skoog
ns	no significant(fark yok yada önemsiz)
ort.	ortalama

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil .3.1. Karanfil çeliklerinde yüzey sterilizasyonu.....	13
Şekil .3.2. Karanfil çeliklerinden meristem izolasyonu.....	14
Şekil .3.3. Karanfil meristemlerinin kültüre alınması.....	14
Şekil .4.1. MS besin ortamı ve hormon uygulamalarının sürgün uzunluğuna etkisi	19
Şekil .4.2. ½ MS besi yeri ve hormon uygulamalarının sürgün uzunluğuna etkisi	20
Şekil .4.3. MS besi yeri ve hormon uygulamalarının kök uzunluğuna etkisi.....	23
Şekil .4.4. ½ MS besin yeri ve hormon uygulamalarının kök uzunluğuna etkisi.....	24
Şekil.4.5. MS besi yerinde yetiştirilen bitkilerde virüs belirtisi oranları.....	27
Şekil .4.6. ½ MS besi yerinde yetiştirilen bitkilerde virüs belirtisi oranları.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS ve Modifiye MS Temel Besi Yerlerinin Bileşimi.....	9
Çizelge 3.2. MS esi rinde Hormon Dozu Kombinasyonlarının Belirlenmesi.....	10
Çizelge 3.3. ½ MS Besi Yerinde Hormon Dozu Kombinasyonlarının Belirlenmesi.....	11
Çizelge 4.1. MS Ortamı ve Ortama Uygulanan Hormon Dozu Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Sürgün Uzunluğuna Etkileri	19
Çizelge 4.2. ½ MS Ortamı ve Ortama Uygulanan Hormon Dozu Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Sürgün Uzunluğuna Etkileri	19
Çizelge .4.3. Varyans Analiz Tablosu.....	21
Çizelge .4.4. Sürgün Uzunluğuna Besin Ortam Faktörünün Etkisi Duncan Çoklu Testi.....	21
Çizelge .4.5. Sürgün Uzunluğuna Hormon Kombinasyonunun Etkisi Duncan Çok Çoklu Testi.....	22
Çizelge .4.6. MS Besi Yerine Uygulanan Hormon Dozu Kombinasyonlarının Kök Oluşumu ve Kök Uzunluğun Etkileri.....	23
Çizelge .4.7. ½ MS Besi Yerine Uygulanan Hormon Dozu Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Kök Uzunluğun Etkileri	24
Çizelge .4.8. Varyans Analiz Tablosu.....	25
Çizelge .4.9 Kök Uzunluğu Üzerine Besin Ortamının Etkisi Duncan Çoklu Testi.....	25
Çizelge .4.10. Kök Uzunluğu Üzerine Hormon Dozu Kombinasyonlarının Etkisi Duncan Çoklu Testi.....	26
Çizelge .4.11. MS Besi Yerinde Yetiştirilen Bitkilerde Gözlenen Virüs Belirtisi Oranları.....	27
Çizelge .4.12. ½ MS Besi Yerinde Yetiştirilen Bitkilerde Gözlenen Virüs Belirtisi Oranları.....	28
Çizelge .4.13. MS Besi Yeri ve Uygulanan Hormon Dozu Kombinasyonlarının	

Bitkiciklerde Görülen Vitrifikasyon Üzerine Etkileri.....	28
Çizelge .4.14. ½ MS Besi Yeri ve Uygulanan Hormon Dozu	
Kombinasyonlarının Bitkiciklerde Görülen Vitrifikasyon	
Üzerine Etkileri.....	29

1. GİRİŞ

İn vivo yetiştirilen bitkiler, fungal, bakteriyal ve viral hastalıklarla enfekte olabilir. Bu hastalık etmenleri vegetatif çoğaltım sırasında bulaşabilirler. Üretime temiz bir başlangıç materyali ile başlanması önemlidir. Temiz üretim materyallerinin elde edilmesinde bazı doku kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır. Doku kültürü teknikleri, hastalıklara dayanıklılığı arttırmak, dayanıklı bitki genotiplerini korumak, bitki hastalıklarına karşı somaklonal dayanıklılık meydana getirmek ve dayanıklı bitkileri seçmek için kullanılır.

Genellikle in vitro çoğaltılan bitkiler hastalıksız olabilmektedir. Mantar ve bakteri enfeksiyonları bazen kültüre alınan bitkilerde büyük kayıplara neden olabilmektedir. Özellikle meristem ve sürgün ucu kültürleri, hızlı klonal çoğaltım ve virüssüz bitki elde etme amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Meristem kültürü alanında ilk girişim 1933 yılında White'ın *Stelleria media* sürgün ucunu kültüre alması ile başlamıştır. Daha sonra 1945 yılında Loo, *Asparagus officinalis*'de 5 mm uzunluğunda gövde uçlarını kültüre almayı başarmıştır. Meristem ucu kültürlerinin virüsten arı bitki üretmedeki potansiyeli ilgi görmüş ve 1952 yılında Morel ve Martin tarafından Dahlia'da 1955 yılında 6 patates çeşidinde virüsten arı bitkiler elde edilmiştir (Bürün ve Türkoğlu, 1996).

Meristem tekniği ile hızlı klonal çoğaltma *Cymbidium spp*'de (orkidelerde) çoklu protokorm oluşumunun teşviki ile başarılmış ve 1962 yılında Murashige-Skoog ortamının geliştirilmesi sonucu mikroüretimi yapılan bitki sayısı artmıştır (Bürün ve Türkoğlu, 1996).

Başlıca, saksı bitkileri, kesme çiçekler, meyve ağaçları ve geofit üretilen bitkiler olmak üzere mikroüretilen bitki sayısı 1991'de 600 milyon olarak belirtilmiştir.

Kesme çiçekler içerisinde karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) Türkiye'de yaygın bir şekilde üretilen bir çiçek türüdür. Kesme çiçek üretimi içerisinde % 50 paya sahiptir. Kesme çiçek ihracatında ise temel çiçek olma niteliğini korumakta ve kesme çiçek ihracatının % 95'ini karanfil oluşturmaktadır. Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) de düzenli ve sağlıklı bir çiçek üretimi için kullanılan köklü çeliklerin hastalık etmenlerinden ve virüslerden arındırılmış olması büyük önem taşımaktadır. Hastalık ve virüsler karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) de üretimi

ve kaliteyi önemli ölçüde düşürmektedir. Damızlıklara uygulanan ilaçlı mücadele programları buralarda alınacak çelikleri hastalık etmenlerinden arındırmasına rağmen bu yolla karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) de virüslerin eliminasyonu olanaksızdır. Bu nedenle karanfilde önemli zararı olan ve gelişmeyi yavaşlatan virüslerin eliminasyonu için Termoterapi veya Meristem Kültürü yapılması ve bu uygulamaların virüs test programları ile tamamlanması gerekir. Ancak karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) de virüs eliminasyonunda termoterapi yöntemi uygulanmamaktadır. Bunun yerine damızlıklar tamamen meristem kültüründen elde edilmiş ve virüs testleri yapılmış bitkilerden oluşturulmaktadır. Bu şekilde virüssüz fide elde edilmesinin yanında meristem dokunun hızlı ve güçlü büyüme özelliğinden de faydalanılmaktadır.

Bu çalışmada karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) in virüssüz materyalinin elde edilmesinin yanı sıra, meristemle çoğaltılmasında uygun besi yeri ve bu besi yerlerine uygulanan hormon dozu kombinasyonları saptanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Babaoğlu, Gürel ve Özcan (2001), kültür ortamındaki azot oranının meristem kültürünün başarısında kritik bir etkiye sahip olduğunu, otsu bitkiler için azot miktarının MS formülasyonunda alındığı gibi tutulduğunda başarı oranının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan aynı araştırmacılar meristem kültüründe, explantların çoğunlukla yarı katı ortamda kültüre alındığını ve kültür ortamının katılaştırılması için de Agar kullanıldığını belirtmişlerdir.

Bürün ve Türkoğlu (1996), yapılan çalışmalarda Murashige-Skoog (1963) besiyerinin meristem kültürü için en uygun ortam olduğunu ve modifikasyonlarının da başarılı sonuçlar verdiğinin gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Debergh ve Ark. (1990), meristem kültüründe başarıyı etkileyen bir diğer belirleyici faktörün ise bitkinin fizyolojik durumu olduğunu bildirmişlerdir. Meristemler genellikle vegetatif büyümenin aktif olduğu bir dönemde alınır ve başarı oranı artmaktadır. Bununla birlikte in vitroda köklenmiş çeliklerden alınan meristemlerin daha hızlı geliştikleri ve kök oluşturdıkları gözlemlenmiştir.

Dodds (1986) ve Werbrouck (1993), meristem ve sürgün ucu kültürün, sadece meristematik bölgenin veya birkaç yaprak promordiası ile beraber meristemin ve sürgün ucunun steril koşullarda ve besin ortamlarında kültüre alınması ile tam teşekküllü bitkilerin elde edilmesinin mümkün olduğunu belirtmişlerdir.

Gönülşen (1981), karanfil çeliklerinden alınan 0,1 mm'lik meristem virüssüz olduğunu ancak bunun yanında meristemin yaşama şansının az olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada optimum karanfil meristemi boyutu 0,5 mm alınmıştır.

Grout (1990), meristem ve sürgün ucu kültürlerinden virüssüz bitki elde etmek, mikroçoğaltım, germplazm muhafazası, genetik transformasyonlar, bitki materyallerinin uluslararası değişimi ve bakteri ve mantarlardan arı bitkilerin üretilmesi amacıyla yararlanıldığını bildirmektedir. Yine Grout, meristem kültürün uygulanması aşamasında binoküler stereo mikroskop altında en az 15x büyütme ile explantlardan meristemlerin izole edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Buna göre çalışmamızda, ayrılan meristemler besin ortamı bulunan tüplere yerleştirildi ve kurumasını önlemek için streç film ile kapatıldı. Tüpler kültür

odasına alındı 10.000 l x ışıkta $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de ve 16 saatlik fotoperiyotta bırakıldı. 10 gün içerisinde bitkicik gelişimi ve uzama gözlendi. Gelişen bitkicikler steril koşullarda kültür kaplarından çıkarıldı. Boğumlarına ayrıldı ve taze ortama aktarıldı. Böylece virüssüz bitki  oğaltabilecek duruma geldi. Ancak daha öncesinde virüs testi uygulanıp bitkiciğın virüsten ari olup olmadığı saptandı.

Grout (1993), donör bitkilerin damlama sulama sistemi ile sulanmasının enfeksiyon sorunlarını azaltmada yardımcı olacağını bildirmektedir.

Yine Grout, çok küçük bir explantın (sadece meristematik kubbenin) kültüre alınmasının başarı şansını etkilediğini ve meristemin gelişme şansının zayıf olduğunu, bu nedenle meristemin yaprak taslakları ile kültüre alınmasının başarılı bir kültür için gerekli olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, meristemi kesmenin sonucu olarak ortaya çıkacak fenolik oksidasyon olasılığını ortadan kaldırmak için explantların 125 ppm'lik ascorbic acid çözeltisinde 1-2 saat bekletilmesi gerektiğini belirtmektedir.

Hackett ve arkadaşları (1976), Phillips (1962), karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) meristemi için kullandıkları ortamda sadece oksin (NAA) 1 mg/l kullanmışlardır.

Hatipoğlu (1999), meristem kültürünün ilk uygulandığı yıllarda White besiyerinin en sık kullanılan besiyeri olduğunu, daha sonra bu besiyerinin özellikle N, P, K konsantrasyonlarının arttırılması, Ca konsantrasyonunun azaltılması ve demirin yüksek pH konsantrasyonlarında çökelmesinin önlenmesi ile amaca daha uygun hale getirildiğini bildirmektedir. Bazı çeşitlerle çalışılırken sıvı ortamların tercih edildiğini, ancak sıvı ortamın vitrifikasyon olasılığını arttırdığını bildirmektedir. Çalışmamızda MS ve   MS ortamları denendi. Çok tuzlu MS ortamının    MS ortamına göre taze ağırlığın oransal olarak daha fazla artmasına neden olduğu gözlendi.

Holling and Stone (1970)'e göre, termoterapi uygulanmadan Carnation Mottle Virüs meristem kültürü yolu ile temizlenebilir. Ayrıca, karanfilde (*Dianthus caryophyllus* L.)  nemli olan Ringspot (CRSV), Mottle (MV), Vein Mottle (Car.VMV), Latent (Car.LV) meristem kültürü ile elimine edilebilir (Smith 1972).

Yapmış olduğumuz virüs testi sonucunda 150 klondan 109 tanesinde virüs belirtisi gözlendi. Bu da meristem kültürü ile elde edilen bitkilerin virüslü olabileceğini gösterdi. Bunun yanında 41 bitkinin virüs belirtisi göstermeyişi

meristem kültürü ile temiz bireylerin elde edilebileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar Gönülşen(1981), Stone(1968) ve Quak((1971) ile paralellik olduğunu gösteriyor.

Jelaska ve Arkadaşları (1977) ise, 0,02 mg/l oksin (NAA) ve 2 mg/l kinetinden iyi sonuç almışlardır. Ancak bu durumda daha çok kallus oluşumu gözlenmiştir. Burada her iki hormon dozunun dengeli bir biçimde kullanılması zorunluluğu çıkmıştır.

Kayım ve Koç (1992)'a göre, meristem kültürü ile edilen karanfil (*Dianthus caryophyllus L.*) ler virüslü olduğu gibi virüssüz de olabilir. Bunların virüs testleri ile kontrol edilmesi, bulaşık olanların atılması ve temiz olan bitkilerin hijyen koşullarda yetiştirilerek çelikle çoğaltılması gerekir.

Love and Rhodes (1985), karbon kaynağının meristem kültürü için kullanılan kültür ortamının önemli bir unsuru olduğunu belirtmişlerdir. Karanfilde (*Dianthus Caryophyllus L.*) sükrozun meristem canlılığını ve rejenerasyon frekans hızını arttırdığı belirtilmektedirler.

Lu and Wang (1990), meristem kültüründe başarıyı explant boyutu kadar besi yerinin de etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Meyer and Foroughr (1987), birçok araştırmada explant boyutunun önemi üzerinde durmuşlar ve büyük explantların daha canlı olarak daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğunu, küçük explantların da virüs eliminasyonunda daha avantajlı olduğu belirtmişlerdir. Bu nedenle explant boyutu, çalışmanın amacına ve türe göre deneysel olarak belirlenmektedir. Amaç virüs eliminasyonu olduğunda ise mümkün olan en küçük explantların dahi kültüre alınması uygun olmaktadır.

Murashige (1977), Karanfil (*Dianthus caryophyllus L.*) meristemlerinin gelişmeleri sırasında kinetinin çok sayıda sürgün oluşumuna neden olurken, oksin (NAA) eklenince yaprak sayısının azalmış olduğunu ve aynı zamanda kök oluşumunun gerçekleştiğini belirtmiştir. Oksin tek uygulandığı zaman, sadece kallus ve kök oluşumu gözlemlendiğini bildirmiştir. Bu çalışmada iki hormon, her hormonun iki ayrı dozu ve kombinasyonları denendi. 0,5 mg/l ve 1 mg/l Oksin(NAA) ile 1 mg/l ve 2 mg/l Kinetin. 1mg/l oksin X 1mg/l kinetin kombinasyonu sürgün ve kök oluşumu bakımından en iyi sonucu verdiği gözlemlendi.

Nehra and Kartha (1994), meristematik bölgenin virüsten temiz olduğunu düşünerek, virüssüz bitki elde etmek için küçük boyuttaki explantların kullanılmasını önermekte, bitki türüne göre optimum explant boyutunun belirlenmesi gerektiğini bildirmektedirler.

Bununla beraber aynı bilim adamları, karanfil (*Dianthus caryophyllus L.*) de, meristemlerin erken ilkbahar ve sonbaharda alınmasının, yaz ve kış aylarında alınmasından daha iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. miştir. Bu çalışmada meristemler ilkbaharda (Mayısın üçüncü haftası) alındı. Gelişme bakımından herhangi bir engel gözlenmedi.

Yine yapılan denemelerde, ışık, sıcaklık ve fotoperiyot gibi doku kültürü çevresi koşullarının in vitroda farklılaşmayı etkilediğini bildirmişlerdir. Buna göre bu çalışmada meristemler 10.000 lüks ışık altında 16 saat aydınlık olacak şekilde $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de bırakıldı

Sherwood (1993), etil alkol ile silinmiş binoküler stereomikroskobu altında meristem izolasyonunun yapılması gerektiğini belirtmiş, meristemi ayırmak için kullanılan kesicilerin keskin olmasını sağlamak için sıklıkla değiştirilmesinin uygun olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı Öncelikle dış yapraklar ve yaprak taslaklarının temizlenmesini ve daha sonra meristemin alınması gerektiğini, kurumayı önlemek için ortamın ısınmamasının şart olduğunu belirtmiştir

Slack and Tufford (1995)'a göre, fizyolojik durumu iyi olan donör bitkilerden, aktif olarak büyüyen bölgelerden çelikler alınmalıdır. Dormant durumdaki bitkilerden çelik alındığı takdirde meristemin gelişmediği gözlenmiştir.

Stone (1970), meristem kültürü tekniği ile 4 çeşit, virüsten arınmış *Dianthus barbatus* üretmiştir.

Van Os (1963), bitki büyüme düzenleyicilerinin değişik kombinasyonlarının araştırmacılar tarafından farklı şekillerde kullanıldığını bildirmektedir.

Werbrouck and Debergh (1993), yaptıkları denemelerde virüssüz bitki elde etmede kullanılan explantların optimum boyutunun $0,5\text{ mm}\pm 0,2\text{mm}$ olduğunu belirlemişlerdir.

Meristem kültürü için karanfil(*Dianthus caryophyllus L.*) de en popüler çeşit olan White Sim standart çeşidi tercih edildi. Diğer yetiştirme tekniklerine de

en iyi cevap veren çeşit olması da önemli idi. Yine Werbrouck ve Debergh'e göre meristem kültürü ile elde edilen karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) lerin virüsle infekte olma ihtimali meristemin büyüklüğü ile orantılıdır. 0,1mm'lik meristem kültüre alınabilirse virüssüz bitki elde edilir ancak yaşama şansı azdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada *Dianthus caryophyllus* L.türünün White Sim standart çeşidi kullanılmıştır. fizyolojik durumu iyi olanların genç çelikleri alınmıştır. Bitki seçiminde fenotipik seleksiyon yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Materyalin Alınma Zamanı

Materyallerin tümü aktif vegetatif büyüme döneminde, fizyolojik durumu iyi olanların genç çelikleri alınmıştır. Bitki seçiminde fenotipik seleksiyon yapılmıştır. alınmıştır. Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L) için erken ilkbahar ve sonbahar dönemi uygundur. Çelikler alındıktan hemen sonra kaba dış yaprakları temizlenmiş ve sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur (Debergh ve Ark. 1990).

3.2.2. Besin Ortamının Belirlenmesi

Meristem kültürü tekniğinde en önemli faktörlerden bir tanesi de mineral madde ve vitaminlerden oluşan besin ortamlarıdır. Doku kültürü tekniklerinin başlamasıyla pekçok besiyeri denenmiş ve günümüze kadar farklı besiyerleri geliştirilmiştir. Bunlar bitkilerin türüne ve kültür çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Meristem kültürünün ilk uygulandığı yıllarda White (1943) besiyeri kullanılmıştır. Daha sonra Murashige – Skoog (1962) MS besiyerinin daha uygun olduğu bulunmuş ve MS ortamı bazı modifikasyonlar yapılarak en fazla kullanılan ve en başarılı sonuç veren besiyeri olmuştur (Nehra ve Kartha, 1994). Bu çalışmada oldukça yüksek tuz konsantrasyonuna sahip Murashige ve Skoog tarafından geliştirilen MS temel besin ortamı ve modifiye edilmiş MS (½ MS) besiyerleri kullanılmıştır. Bu temel besiyerlerinin içerikleri Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS ve Modifiye MS Temel besin ortamlarının Bileşimi.

Besin Maddeleri	MS besiyeri (mg/l)	Modifiye MS besiyeri (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	1650
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ 2H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
MnSO ₄ H ₂ O	16,8	16,8
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	8,6
KI	0,83	0,83
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025
CaCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,025
Na-EDTA	37,3	37,3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,8
Thiamin	1,0	1,0
Niacin	0,5	0,5
Pyridoxin	0,5	0,5
Adenin	8,0	8,0
Ca-Pentatenat	1,0	1,0
Myo-inositol	100	100
Sakkaroz	30000	30000
Agar	8000	8000

Bir litre besi yeri hazırlamak için her iki ortama da istenilen miktarda sakkaroz ve bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilerek hacmi bir litre olacak şekilde destile su ile tamamlanmıştır. Besi yeri daha sonra çalkalayıcı üzerine konularak manyetik karıştırıcı ile karışımı sağlanarak pH'sı 5,5'e ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan besin çözeltisine en son olarak agar ilave edilmiştir. Kaynama işleminden sonra, kullanılacak bitki materyalinin özelliğine göre 15 x 150 mm'lik kültür tüplerine aktarılmıştır. Kültür tüplerinin ağzı ısıya ve basınca dayanıklı alüminyum kapaklarla kapatılmıştır.

3.2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Belirlenmesi

Bitki büyüme düzenleyicileri (hormonlar) besin değildirler fakat büyümeyi ve gelişmeyi düzenlerler. Genelde bitkilerde doğal olarak sentezlenirler. Bununla beraber kültürlerde yeterli miktarda sentezlenemezler bu nedenle kültür ortamına dışarıdan eklenirler.

Doku kültürü ortamlarında her bir bitki için doğru hormon çeşidinin ve doğru oranların seçilmesi çok önemlidir(Kyte ve Kleyn, 1999). Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) meristem kültüründe oksin (NAA) kök oluşumunu, Kinetin ise sürgün oluşumunu teşvik etmek üzere kullanılmıştır.

Bu çalışmada oksin ve kinetin olmak üzere iki hormon ve her hormonun iki ayrı dozu denenmiştir. 0,5 mg/l ve 1 mg/l Oksin (NAA) ile 1 mg/l ve 2 mg/l Kinetin. 1mg/l oksin X 1mg/l kinetin kombinasyonunun sürgün ve kök oluşumu bakımından en iyi sonucu verdiği gözlemlendi.

3.2.4. Hormon Dozu Kombinasyonları

Çizelge .3.2. MS Besiyeri ve Hormon Dozları

Ortam	Hormon kombinasyonları (mg/l)
MS	0.5mg/l NAA X 1mg/l Kinetin
MS	0.5mg/l NAA X 2mg/l Kinetin
MS	1mg/l NAA X 1mg/l Kinetin
MS	1mg/l NAA X 2mg/l Kinetin

Çizelge .3.3. ½ MS Besiyeri ve İlave Edilen Hormon Dozları

Ortam	Hormon kombinasyonları (mg/l)
½ MS	0.5mg/l NAA X 1mg/l Kinetin
½ MS	0.5mg/l NAA X 2mg/l Kinetin
½ MS	1mg/l NAA X 1mg/l Kinetin
½ MS	1mg/l NAA X 2mg/l Kinetin

3.2.5. Sterilizasyon

3.2.5.1. Besin Ortamının Sterilizasyonu

Hazırlanan besiyerleri 15 x 150 ml'lik kültür tüplerine, her tüpte 15 ml'lik olacak şekilde aktarılmıştır. Besiyerinin sterilizasyon süresi ortamın hacmine göre değişmektedir. Bu çalışmada kültür tüpleri otoklavda 121 °C'de ve 1.05 Kg/cm² basınç altında 20 dakika tutularak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2. Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu

Bitkisel materyal izole edilmeden önce bitki yüzeyindeki zengin mikrofloranın steril edilmesi gerekmektedir. Eksplantların sterilizasyonu doku kültürlerinde çok önemli bir sorun oluşturmaktadır. Üzerinde çalışılan materyalde yapılacak gözlemler sonucunda en iyi steril edici madde, bunun konsantrasyonu ve işlem süresinin belirlenmesi uygun olacaktır. Kalsiyum ve sodyum hipoklorit solüsyonları, hidrojen peroksit, gümüş nitrat ve cıva klorür sterilizasyon için kullanılabilen maddelerdir (Gönülşen, 1987). Bazı durumlarda izole edilen bitki parçasının %70'lik etanol içerisinde 30 sn süre daldırılıp sonradan diğer steril edici madde ile sterilize edilmesi yararlı olmaktadır. Çünkü alkol, materyallerin dışındaki mumsu tabakanın kalkmasını ve böylece steril edici maddenin daha etkili olmasını sağlamaktadır. Bitki yüzeyindeki mikroorganizmalar bu yöntemle elimine edilmekle birlikte, mikroorganizmaların dokuların içine de girdikleri bir gerçektir. Bu nedenle kültür sırasında bulaşmaya engel olunamadığı ancak antibiyotiklerle bulaşmanın kontrol altına alındığı belirlenmiştir (Gönülşen, 1987). Bu çalışmada bir boğum içeren çeliklerin kaba

dış yaprakları temizlendi. Bu explantlar önce musluk suyunda bol su ile çalkalandılar. Daha sonra % 10'luk Na-Hypoclorid solüsyonunda 30 dk bekletilmişlerdir. Bu işlemin ardından explantlar saf su ile 3 kez çalkalandılar. Daha sonra fenolik oksidasyona karşı 125 ppm'lik ascorbic acid solüsyonunda 1-2 saat muhafaza edildiler. Bu süre sonunda steril kabın içerisinde 3 defa, 3 dakika steril saf su ile durularak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.1.).

3.2.5.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Kullanılacak metal ve cam malzemeler bulaşık makinesinde yıkandıktan sonra saf su ile işleme tabi tutulmuşlardır. Daha sonra etüvde 105°C'de yaklaşık 1-2 saat bekletilmişlerdir. Cam malzemeler otoklavda 1.05 kgcm² basınç altında ve 121°C'de 20 dakika sterilize edilmişlerdir. Eksplantların yüzeysel sterilizasyonunda kullanılacak saf su da otoklavda sterilize edilmiştir. Araştırma yapılmadığı zamanlarda alıştırma kabininin sterilizasyonu uv ışınları ile yapılmıştır. Çalışmaya başlamadan 30 dakika önce ise uv ışınları kapatılmış ve steril kabin çalıştırılmıştır. Daha sonra steril kabinin iç yüzeyi %70'lik alkol ile silinmiştir. Kültüre alınma işleminde kullanılacak pens, iğne ve bisturiler çalışmaya başlamadan önce %96'lık alkole batırılarak ateşle muamele edilmiştir.

3.2.5.4. Diğer Sterilizasyon İşlemleri

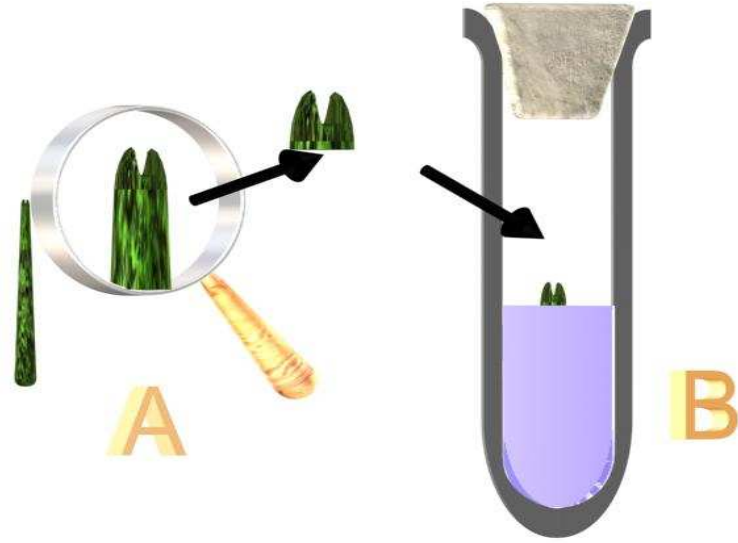
Steril kabinde çalışmadan önce laboratuvar elbisesi giyilerek, eller deterjan, su ve alkolle steril hale getirilmiş, bone ve yüz maskesi kullanılmıştır. Dış yüzeyleri steril edilmemiş tüp ve kavanozlar steril kabine alkollü pamuk ile silindikten sonra alınmıştır. Bir defa kullanılan bisturi, pens ve petri kapları alkolden geçirildikten sonra ateşle muamele edilerek yeniden kullanıma hazır hale getirilmiştir. Paketleri açılan petri kapları ve su şişeleri sadece o gün için steril olduğundan, ertesi gün kullanılmamıştır. Eksplantlardaki bulaşmayı önlemek amacıyla yapılan tüm bu sterilizasyon işlemlerinin yanında, laboratuvar da daima temiz tutulmuştur.

3.2.6. Materyalin Kültüre Alınması

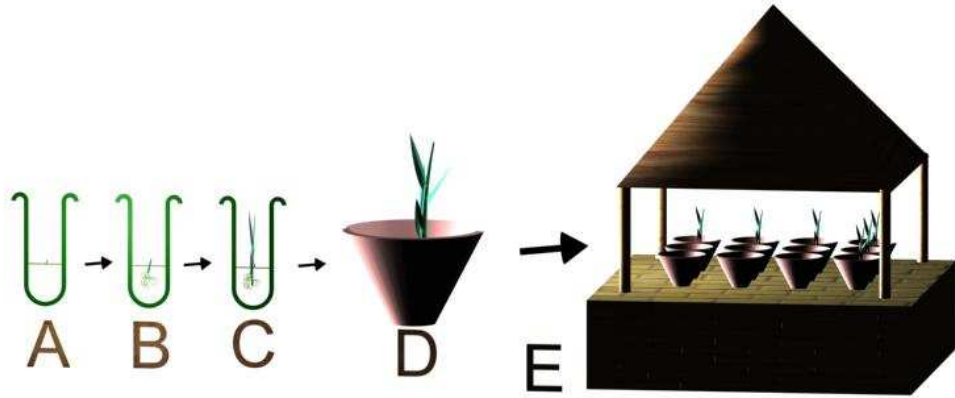
Yüzey sterilizasyonundan sonra steril hale gelen *Dianthus caryophyllus* L. çeliklerinden meristem izolasyonu, binoküler mikroskop altında yapılmıştır (Şekil 3. 2.). Meristem izolasyonunda dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır; meristem bölgesi, genç yapraklardan zedelenmeden tek bistüri darbesi ile ayrılmalı, pens yada bisturi tarafından ezilmemelidir. Her bir meristemin çıkarılmasında, her defasında, bisturi ve pens değiştirilmeli ve bisturi, pens ve petri, alkolle sterilize edilmelidir. Her meristem çıkarılışında kesici aletlerin değiştirilmesinin nedeni bu aletlerin keskinliğini kaybetmesidir. Explantlar binoküler mikroskop altında bisturi ve pens yardımıyla dış pullarından arındırılmıştır. 1-2 yaprak taslağı taşıyan 0.5 mm uzunluğundaki eksplantlar; içerisinde steril besiyerinin bulunduğu kültür tüplerine alınmıştır (Şekil 3.3.). Meristemlerin kubbesi ortamla temas etmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Tüplerin ağız kısmı ateşten geçirilerek streç film ile kapatılmıştır.



Şekil 3.1. (A) Sağlıklı bitkilerden alınan çelikler kaba dış yapraklarından temizlenir. (B) Çok genç yapraklar sterilizasyon amacıyla üzerinde bırakılır. (C) % 10'luk Na-Hypoclorid Çözeltisinde yüzey sterilizasyonu. (D) 125 ppm'lik Ascorbic Acid Çözeltisinde Fenolik Oksidasyona karşı çeliklerin bekletilmesi.



Şekil 3.2. (A) *Dianthus caryophyllus* L. çeliklerinden binoküler mikroskop altında meristem izolasyonu. (B) 0.5 mm büyüklüğündeki explantların kültür tüplerine alınması.



Şekil 3.3. (A) Meristemlerin kültür tüplerine yerleştirilmesi. (B) Ekimi izleyen 5. günün sonunda çimlenen meristemler. (C) Ekimi izleyen 1 ayın sonunda bitkiciklerin ulaştığı form. (D) Sağlıklı gelişen ve virüs belirtisi göstermeyen bitkilerin saksılara şaşırtılması. (E) Sağlıklı bitkilerin hijyen serada büyütülmesi.

3.2.7. Besin Ortamının pH'sının Ayarlanması

Doku kültürlerindeki besin ortamlarının asidik veya bazik olması çok önemlidir. Her bitki türünün ihtiyaç duyduğu pH değeri farklıdır. *Dianthus caryophyllus* L. İhtiyaç duyduğu pH=5,5'tir. (Kyte ve Kleyn, 1999). Bu çalışmada besin ortamlarının pH'sı 5.5 olarak ayarlanmıştır.

3.2.8. Eksplantların Gelişme Koşulları

Doğal yetiştirme ortamlarında olduğu gibi doku kültürlerinde de eksplantların normal gelişimlerini sağlayabilmeleri için çevre koşullarının uygun olması gereklidir. Işık, sıcaklık ve rutubet bu çevre faktörlerinin en önemlilerindendir. Kültür kapları içerisinde genellikle %100'e varabilen yüksek bir rutubet sağlandığı için eksplantların gelişmesinde özellikle rutubetin ayarlanmasına gerek yoktur. Ortam rutubeti %80-90 seviyesinde tutulmalıdır (Kyte ve Kleyn, 1999). Bu nedenle kültürlerin gelişmesi için ışık ve sıcaklığı ayarlanabilen yetiştirme ortamlarına gereksinim duyulmaktadır.

3.2.9. Sıcaklık İsteği

Eksplantlar sıcaklığın uygun olduğu ortamlarda tutulmalıdır. Genellikle, doku kültürleri için uygulanan yetiştirme ortamı sıcaklıkları 25°C'dir (Nehra and Kartha, 1994). Optimal sıcaklık derecesi bitki türüne göre ayarlanmalıdır *Dianthus caryophyllus* L. da bu değer yine 25°C olarak kullanılmıştır.

3.2.10. Işık İsteği

Bitki doku kültürlerinde kullanılan ışığın yoğunluğu ve aydınlanma süresi önemlidir. Eksplantların ışık isteği ototrof olarak gelişen bitkilere benzememektedir. Kültürler için gerekli karbonhidratlar sağlandığından, kültürün

son devresi dışında fotosentez yapılması gerekli değildir. Ancak ışığa, bazı morfogenetik işlemleri regüle etmek için gereksinim duyulmaktadır (Gönülşen, 1987).

3.2.11. Işık Yoğunluğu

Kullanılan bitki türüne, izole edilen eksplantın cinsine ve gıda ortamına bağlı olarak 300-10000 lükse kadar değişen ışık yoğunluğuna gereksinim vardır (Murashige ve Skoog, 1962). Optimal ışık yoğunluğu bitki türüne göre ayarlanmalıdır. *Dianthus caryophyllus* L.'ta bu değer 10000 lüks olarak kullanılmıştır.

3.2.12. Aydınlanma Süresi

Uygulanan günlük aydınlanma süresi, kullanılan bitki türü, ışık kalitesi ve amaca göre değişebilmektedir (Murashige ve Skoog, 1962). *Dianthus caryophyllus* L. İçin bu süre 16 saattir.

3.2.13. Eksplantların Gelişimi ve Sürgün Oluşumu

Bu çalışmada kültüre alınma işleminden sonra eksplantlardaki değişimler, canlılık durumları ve sürgün oluşturmaları düzenli bir şekilde incelenmiştir. Meristemlerin yerleştirilmesi 24 Mayıs 2001'de sona ermiştir. Ekimi izleyen ilk 5 gün içerisinde çimlenme gözlenmiş, bunu izleyen günlerde de sürgün ve kök oluşumu başlamıştır.. 20 Haziran 2001'de yapılan gözlemlerde bitkiciklerin belli bir forma ulaştığı tespit edilmiştir. Gelişen meristemler 5 Ağustos 2001'de dış koşullara alıştırılmak üzere laboratuarda 16-19°C'de bekletilmiş, iki hafta sonra değerlendirme yapılmıştır (20 Ağustos 2001). Sağlıklı gelişen bitkiler, içerisinde steril harç (kum-toprak-gübre) bulunan 8 cm'lik plastik saksılara şaşırtıldı. Bitkiler yaklaşık 45 gün süre ile bu saksılarda sıkı hijyen koşullarının bulunduğu steril serada büyütülmüştür. Daha sonra virüs indexi yapılmıştır.

3.2.14. Köklü Fideciklerin Şaşırtılması

Gelişen meristemler 5 Ağustos 2001'de dış koşullara alıştırılmak üzere laboratuvarda 16-19°C'de bekletilmiştir. İki hafta sonra değerlendirme yapılarak (20 Ağustos 2001), sağlıklı gelişen bitkiler, içerisinde steril harç (kum-toprak-gübre) bulunan 8 cm'lik plastik saksılara şaşırtılmıştır. Toprağa transferin ilk başlangıcında fideciklerin dış ortama adaptasyonu için dikim saksılarının üzeri hava deliklerine sahip şeffaf malzemeye kapatılmıştır. Daha sonra bu kapak kademeli olarak açılmış ve dış ortama adaptasyon sağlanmış ve fidecikler seraya aktarılmıştır. Bitkiler yaklaşık 45 gün süre ile bu saksılarda sıkı hijyen koşullarının bulunduğu steril serada büyütülmüş, daha sonra virüs indexi yapılmıştır.

3.2.15. Virüs Index

Tüplerdeki bitkicikler saksılara şaşırtılırken diğer yandan virüs test bitkisi *Chenapodium quinea* tohumları seraya ekilmiştir. *Chenapodium* fideleri saksılara şaşırtılarak bir süre büyütülmüştür. Test bitkilerine indexleme yapılmıştır (27-28 Ekim 2001) Bu amaçla 0,5 M KH_2PO_4 (Tampon fosfat çözeltisi) tartılmış, % 0,1'lik Thio glucalic asit katılarak pH= 7,6'ya ayarlanmıştır. Her meristem klonundan (her saksıdan) ayrı ayrı alınan bir yaprak tampon çözelti içinde ezilerek Carborandum ile yaralanan *Chenapodium quinea* yapraklarına sürülmüş, kısa sürede test bitkilerinde belirti gösteren bitkiler atılmıştır. Virus belirtisi göstermeyen karanfil (*Dyanthus caryophyllus* L.) bitkileri damızlığa dikilmiştir. 288 meristemle denemeye başlanmıştır, bunlardan 108 sağlıklı bitki damızlık serasına şaşırtılmıştır.

3.2.16. Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler sonucunda elde edilen veriler, varyans analizi yöntemi ile değerlendirilmiştir. F testi ile 0.05, 0.01 ve 0.001 yanılmayla kontrol edildikten sonra, farklı grupların tespitinde Duncan testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sürgün Uzunluğu

White Sim standart karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) çeşidinin meristemle in vitro'da üretilmesi çalışmasında sürgün uzunluklarının 25. gün verileri, MS için (Bkz. Çizelge .4.1. ve Şekil 4.1.), ½ MS için, (Bkz.. Çizelge .4.2. ve Şekil 4.2.). Sürgün uzunluklarının 25. gün verilerinin değerlendirilmesi ile elde edilen değerlere yapılan varyans analizi sonucunda sürgün uzunluğu üzerine ortam faktörünün etkisi %99,9 güven sınırı içerisinde istatistiki önemde etkili olduğu saptanmıştır. Hangi ortam uygulamasının anlamlı olduğu Duncan Çoklu Testi ile irdelenmiştir. Sonuç olarak MS besin ortamı uygulamasının ½ MS besin ortamına göre sürgün uzunlukları üzerine daha fazla etkili olduğu gözlenmiştir. MS ortamında yetiştirilen fertlerin sürgün uzunlukları ortalaması 2,069 cm'dir. ½ MS besin ortamında yetiştirilen fertlerin ise sürgün uzunlukları ortalaması ise 0,681 cm olmuştur.

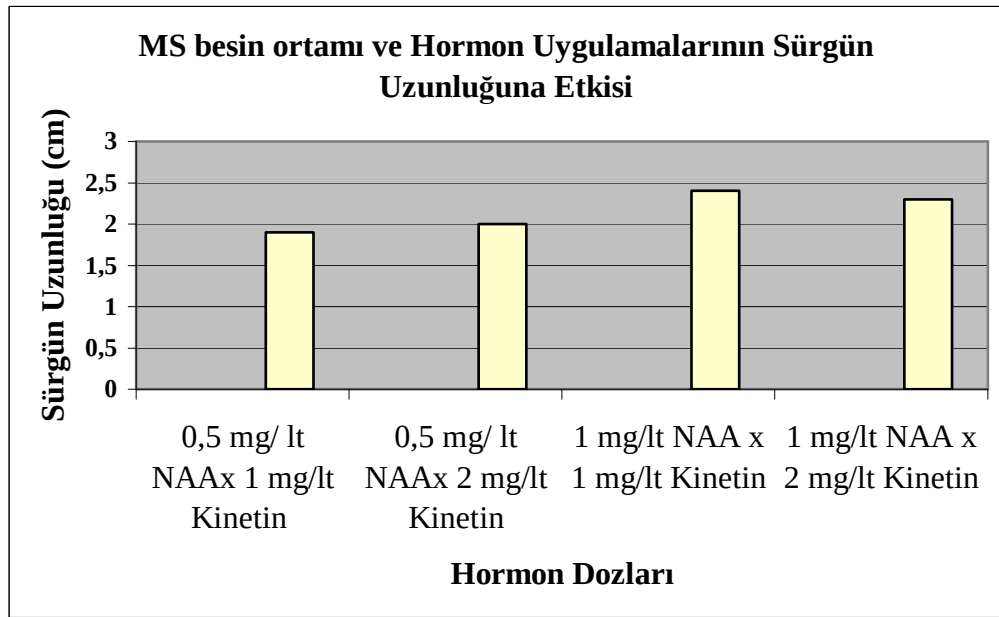
MS ortamına uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının % 99,9 güven sınırında ve istatistiki önemde etkisini incelemek için varyans analizi yapılmıştır. Hangi doz kombinasyonun etkili olduğunun tespit edilmesi için Duncan Çoklu Testi uygulanmıştır.

1 mg/ l NAA X 1 mg/l Kinetin ve 1 mg/l NAA X 2 mg/l Kinetin kombinasyonunun etkisinin eşit ve istatistiki önemde olduğu saptanmıştır.

1 mg/l NAA X 1 mg/l Kinetin uygulanan fertlerin sürgün uzunlukları ortalaması 2,4 cm, 1 mg/l NAA X 2 mg/l Kinetin uygulanan fertlerin sürgün uzunlukları ortalaması ise 2,3 cm olmuştur.

Çizelge .4.1. MS besiyerine uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının sürgün oluşumu ve sürgün uzunluğuna etkileri.

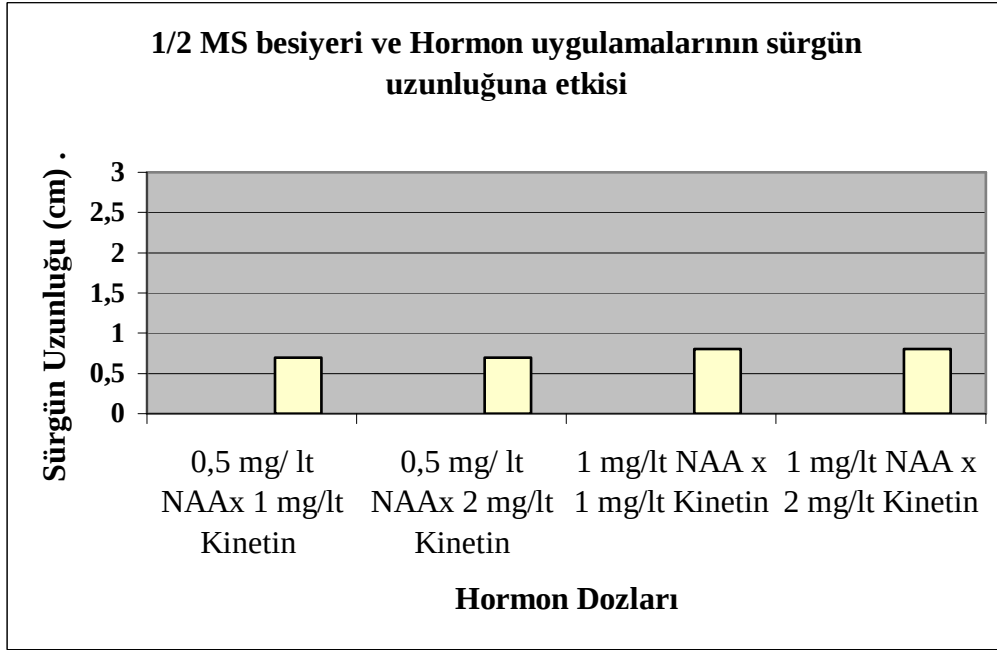
MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Sürgün oluşumu (Tüp Adet)	Sürgün uzunl. Ort.(cm)
0,5 mg/ l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	33	1,9
0,5 mg/ l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	33	2,0
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	36	2,4
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	36	2,3



Şekil.4.1. MS besiyerinde ve dört farklı hormon dozu kombinasyonu uygulanan karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) meristemlerinin çimlenmeden itibaren 25. gün sürgün uzunlukları ortalamaları.

Çizelge. 4.2. ½ MS besiyerine uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının, sürgün oluşumu ve sürgün uzunluğuna etkileri.

½ MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Sürgün oluşumu (Tüp Adet)	Sürgün uzunl. Ort. (cm)
0,5 mg/ l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	34	0,7
0,5 mg/ l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	34	0,7
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	36	0,8
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	36	0,8



Şekil .4.2. 1/2 MS besiyerinde, dört farklı hormon dozu kombinasyonu uygulanan karanfil(*Dianthus caryophyllus*) meristemlerinin çimlenmeden itibaren 25. gün sürgün uzunlukları ortalamaları.

Yapılan varyans analiz sonuçları çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Çizelge 4.3.'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi; besin ortamları arasındaki farklılık % 1 ihtimal sınırına göre istatistiki bakımdan çok önemli olmuştur. Nitekim, hesaplanan F değeri 278.966 olarak bulunmuştur. Duncan testine göre yapılan önem kontrolünde, ortalama sürgün uzunluğu bakımından (2.069 cm) tam besiyeri ortamı 1. gruba (a), ½ besiyeri (1/2 MS) ise 2. gruba (b) girmiştir (0.681 cm)(Çizelge 4.4.).

Kullanılan değişkenler:

Faktör A : Besin Ortamı

Seviyesi 1-2

Faktör B : Hormon dozu kombinasyonu

Seviyesi 1-4

Analizi Yapılan Karakter: Sürgün Uzunluğu

Çizelge .4.3. Varyans Analiz Tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Hesaplanan F değeri
Faktör A	1	15.401	15.401	278.966**
Faktör B	3	0.910	0.303	5.494*
A*B	3	0.384	0.128	2.317ns
Hata	24	1.325	0.055	
Genel	31	18.020	0.581	

Ns : Önemsiz

* : Önemli % 5 seviyesinde

** : Önemli % 1 seviyesinde

Çizelge 4.4. Sürgün Uzunluğuna Besin Ortam Faktörünün Etkisi

Duncan Çoklu Testi

Orijinal Sıra		Testten Sonra < 1	
MS	2.069	1	2.069..a
½ MS	0.861	2	0.681..b

< 1. Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık % 5 seviyesine göre önemli değildir.

Buradan anlaşılıyor ki, Duncan testine göre, ortalama sürgün uzunluğu arasındaki fark 1.388 cm gibi tam besin ortamı lehine önemli seviyededir. Farklı hormon seviyelerinin, denemeye alınan karanfil çeşidinin sürgün uzunlukları üzerine etkisi, önemli olmuştur. Nitekim, bu amaçla yapılan varyans analiz tablosunda (Çizelge 4.3.) sürgün uzunlukları üzerine farklı hormon seviyelerinin etkisi % 5 ihtimal sınırına göre önemli olmuştur.

(F= 5.494) ortalama sürgün uzunluğu bakımından hormon seviyelerine göre yapılan Duncan önem kontrolünde (Çizelge 4.5.), 1 No'lu hormon dozu 1. Grubu (a) (1.550 cm), 2 No'lu hormon dozu 2. grubu (ab) (1.525 cm), 3 No'lu hormon dozu 3. grubu (bc) (1.275 cm) ve 4 No'lu hormon dozu ise 4. grubu (cd) (1.150) oluşturmuştur. Duncan önem kontrolüne göre 1 No'lu hormon dozu uygulanan karanfildeki ortalama sürgün uzunluğu ile 4 No'lu hormon dozu uygulanan karanfillerdeki ortalama sürgün uzunluğu arasındaki fark 1.400 olmuştur. (Çizelge 4.5.)

Çizelge 4.5. Sürgün Uzunluğuna Hormon Kombinasyonunun Etkisi

Duncan Çoklu Testi

Orijinal Sıra		Testten sonra		
1	1.150		3	1.550.....a
2	1.275		4	1.525.....ab
3	1.550		2	1.275.....bc
4	1.525		1	1.150.....cd..

<1. Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık %5 seviyesine göre önemli değildir.

Öte yandan tam besiyeri ortamına (MS) uygulanan hormon seviyelerinin ortalaması olarak, karanfil çeşidinde ölçülen sürgün uzunlukları 1.9 cm (0.5 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin) ve 2.4 cm (1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin) arasında değişmektedir.(Çizelge 4.1. Şekil 4.1.)

Aynı şekilde; ½ MS besiyerine uygulanan hormon seviyelerinin ortalaması olarak karanfil çeşitlerindespit edilen sürgün uzunlukları ise 0.7 cm (0.5 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin, 0.5 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin) ile 0.8. cm (1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin, 1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin) arasında değişmiştir (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.). Buradan da anlaşıyor ki, ½ MS MS besiyerine uygulanan hormon dozlarının ortalaması alınacak sürgün uzunluğuna etkisi önemsiz bulunmuştur.

4.2. Kök Uzunluğu

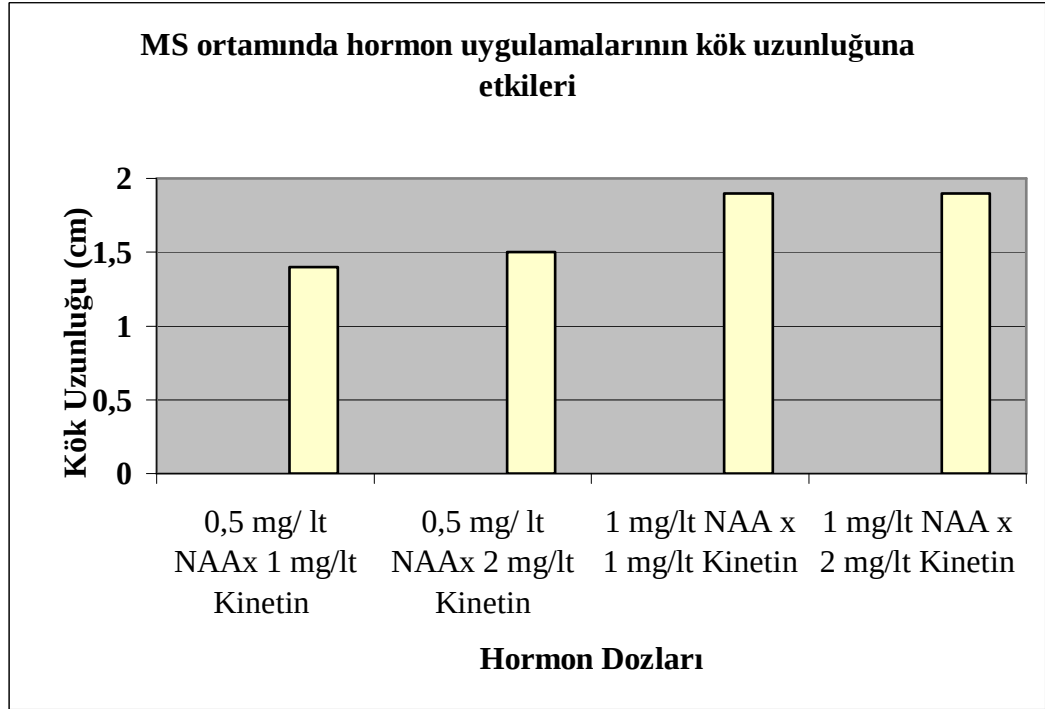
Denemeye alınan, White Sim standart karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) çeşidinin meristem kültürü ile in vitro'da üretilmesi çalışmasında 25 gün sonra tespit edilen kök uzunlukları Tablo 4.3. verilmiştir (Tablo 4.3. Şekil 4.3.).

Uygulanan besiyeri ve hormon dozu kombinasyonlarının etkileşimlerinin kök uzunluğu üzerine etkisi incelendiğinde MS besiyerinde yetiştirilen fertlerde 1 mg/l NAA X 1 mg/l Kinetin ile 1 mg/l NAA X 2 mg/l Kinetin kombinasyonlarının etkili ve etkisinin eşit olduğu saptanmıştır. ½ MS besiyerinde ise tüm hormon uygulamalarının etkilerinin eşit olduğu saptanmıştır.

MS ortamında yetiştirilen fertlerin kök uzunlukları ortalaması 1,556 cm, ½ MS besiyerinde yetiştirilen fertlerin kök uzunlukları ortalaması ise 0,619 cm olmuştur (Çizelge .4.5. ve Şekil 4.4.)

Çizelge .4.6. MS besiyerine uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının, kök oluşumu ve kök uzunluğuna etkileri.

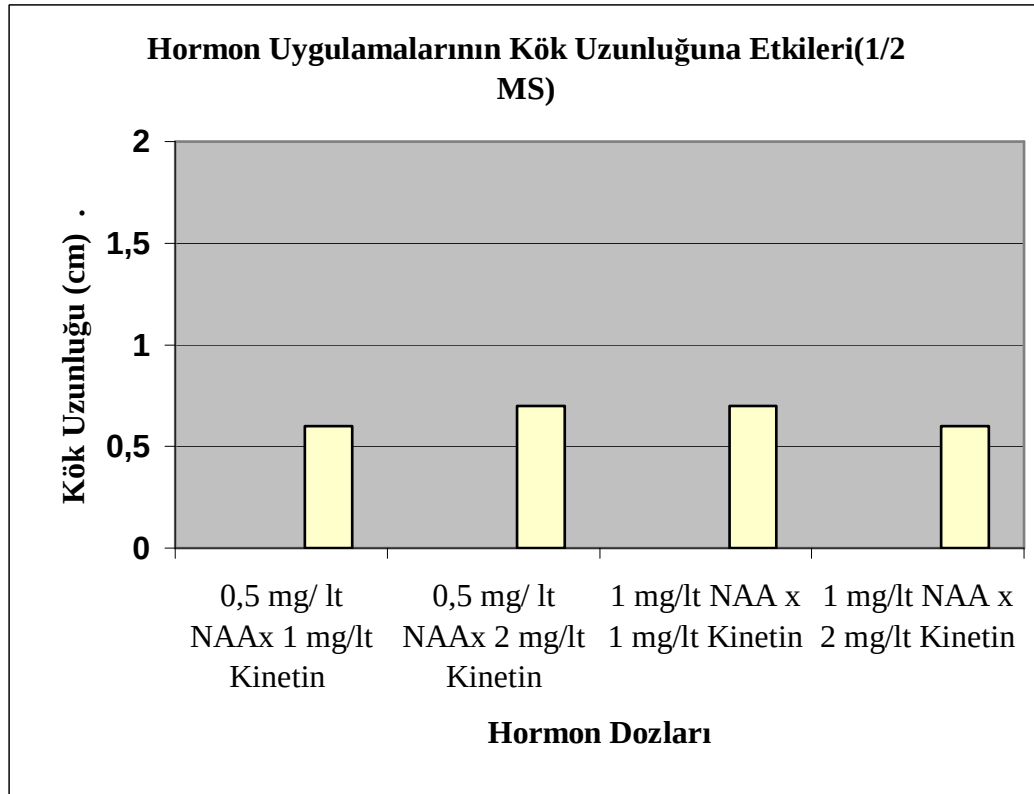
MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Kök oluşumu (Tüp Adet)	Kök uzunluk ort. (cm)
0,5 mg/ l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	33	1,4
0,5 mg/ l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	33	1,5
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	36	1,9
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	36	1,9



Şekil .4.3. MS besin ortamında, dört farklı hormon dozu kombinasyonu uygulanan karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) meristemlerinin çimlenmeden itibaren 25. gün kök uzunlukları ortalamaları.(cm)

Çizelge .4.7. ½ MS besiyerine uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının, sürgün oluşumu ve sürgün uzunluğuna etkileri.

½ MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Kök oluşumu (Tüp Adet)	Kök uzunluk ort. (cm)
0,5 mg/ l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	35	0,6
0,5 mg/ l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	35	0,7
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	36	0,7
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	36	0,6



Şekil .4.4. ½ MS besiyerinde dört farklı hormon dozu kombinasyonu uygulanan karanfil (*Dianthus caryophyllus*) meristemlerinin çimlenmeden itibaren 25. gün kök uzunlukları ortalamaları.(cm)

Kullanılan Değişkenler

Faktör A :Besin Ortamı

Faktör B :Hormon Dozu Kombinasyonu

Analizi Yapılan Karakter:Kök Uzunluğu

Yapılan varyans analiz sonuçları çizelge 4.5.'te verilmiştir. Çizelge 4.5.'in incelenmesinden anlaşılabileceği gibi besin ortamları arasındaki farklılık % 0.01 ihtimal sınırına göre istatistiki bakımdan önemli olup hesaplanan F değeri 312.500 bulunmuştur.

Çizelge .4.8. Varyans Analiz Tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Hesaplanan F değeri
Faktör A	1	7.031	7.031	312.500***
Faktör B	3	1.072	0.357	15.889***
A*B	3	0.831	0.277	12.315***
Hata	24	0.540	0.022	
Genel	31	9.475	0.306	

Ns: Önemsiz

* : Önemli % 5 alfa seviyesinde

** :Önemli % 1 alfa seviyesinde

*** :Önemli % 0.1 alfa seviyesinde

(F=312.500, F=15.889, F=12.315) ortalama kök uzunluğu değerleri bakımından istatistiksel anlamda %0.01 seviyesinde önemli bulunan değerlere Duncan çoklu testi uygulanmış (1) No'lu besiyeri 1. Grubu (a)(1.556 cm) (2) nolu besiyeri 2. Grubu (b) oluşturmuştur.

Çizelge 4.9. Kök Uzunluğu Üzerine Besin Ortamının Etkisi

Duncan Çoklu Testi

Orijinal Sıra		Testten Sonra	
1	1.556	1	1.556 ...a
2	0.619	2	0.619 ...b

<1. Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık % 0.01 seviyesine göre önemli değildir.

Yapılan Duncan çoklu testinde 4 ve 3 nolu hormon dozlarının etkileri eşit ve ilk sırada, 1. Grupta (a)(1.275), (a)(1..250), yer almışlardır 2 ve 1 nolu hormon dozlarının da etkilerinin eşit olduğunda ikinci sırada ve 2. Grupta (b) (0.987), (b) (0,838) yer almışlardır. Duncan önem kontrolüne göre

Çizelge 4.10. Kök Uzunluğu Üzerine Hormon Doz Kombinasyonlarının Etkisi
Duncan Çoklu Testi

Orijinal Sıra		Testten Sonra	
1	0.838	4	1.275...a
2	0.987	3	1.250...a
3	1.250	2	0.987...b
4	1.275	1	0.838...b

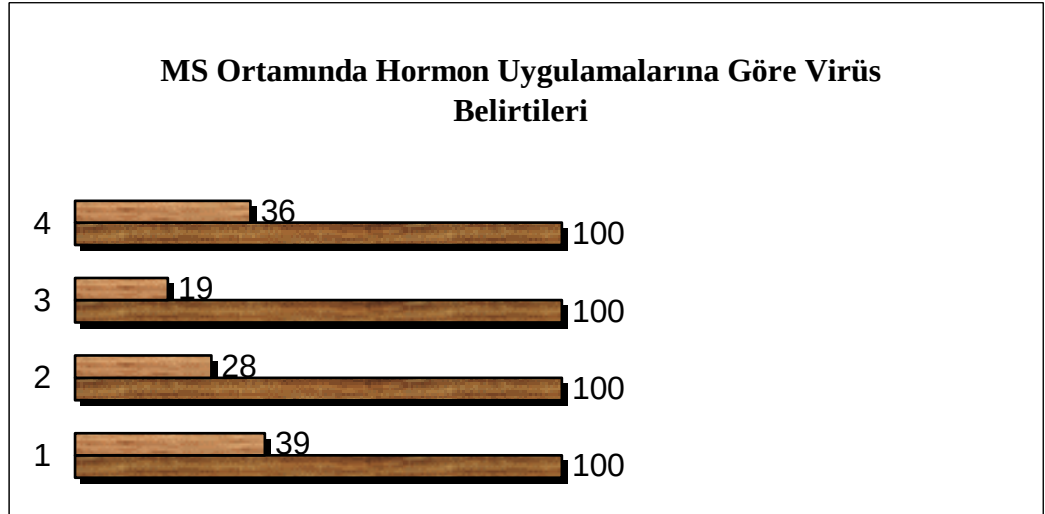
Farklı hormon seviyelerinin, denemeye alınan karanfil çeşidinin kök uzunlukları üzerine etkisi önemli olmuştur. Varyans analiz tablosunda sonuçlarında kök uzunlukları üzerine farklı hormon seviyelerinin etkisi % 0.01 ihtimal sınırına göre önemli olmuştur.

4.3. Virüs Belirtisi

Virüs belirtisi gösteren bitkilerin oranlarına bakıldığında; MS besiyerinde yetiştirilen bitkilerin $\frac{1}{2}$ MS besiyerinde yetiştirilen bitkilere oranla virüslere daha dirençli olduğu göze çarpmaktadır. Bu oranlar üzerinde sadece besin ortamı ve hormon dozu kombinasyonları etkili değildir. Bunun yanında çalışılan ortam koşulları, çalışan uzmanların temizlik konusundaki titizlikleri ve kullanılan alet ve ekipmanların temizliğinin de etkisi son derece önemlidir. Doku kültürü ile yapılan üretimlerde başarıda çalışan uzmanın titizliği doğrudan etkilidir. Çalışan uzmanın elinin enfekte olması, kullanılan alet ekipmanın enfekte olması, kabinin enfekte olması tüm bitkilerin enfekte olmasına ve ölmesine neden olur. Bu çalışmada laboratuvarın durumunun çok iyi olmaması , yetiştirme serasının sterilizasyonunun iyi olmaması, iklim odasında meydana gelen olumsuzluklar (elektrik kesintisi vs.) virüsle enfekte olmuş bitki sayısının artmasına neden olmaktadır.

Çizelge .4.11. MS besiyerinde yetiştirilen bitkilerde gözlenen virüs belirtisi oranları.

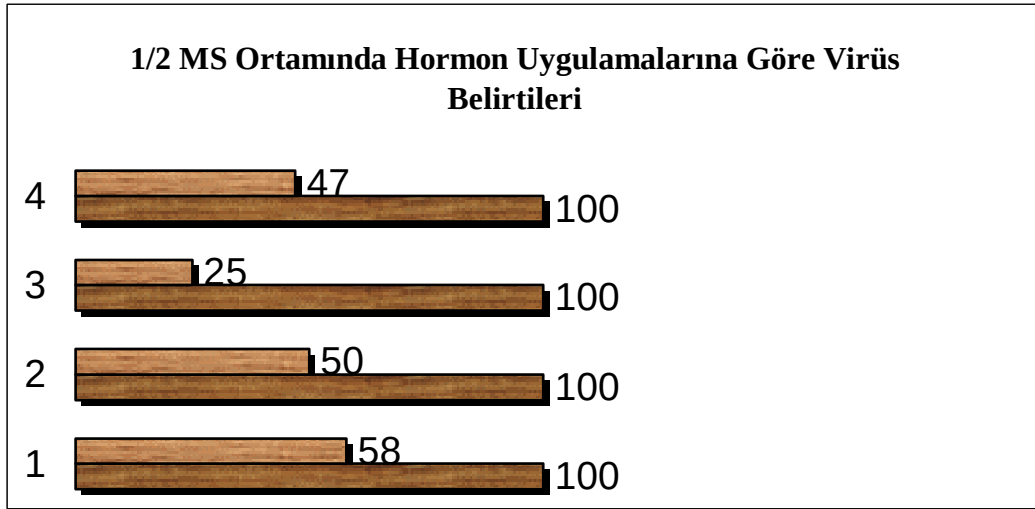
MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Virüs Belirtisi (Tüp Adet)	Virüs Belirtisi % oranları
0,5 mg/ l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	14	39
0,5 mg/ l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	10	28
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	7	19
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	13	36



Şekil .4.5. MS besiyerinde, dört farklı hormon dozu kombinasyonu uygulanan ve iklim odasından geçici laboratuvar koşullarına alınan karanfil(*Dianthus caryophyllus*) bitkiciklerinde gözlenen virüs belirtisi oranları.

Çizelge .4.12. ½ MS besiyerinde yetiştirilen bitkilerde gözlenen virüs belirtisi oranları.

½ MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Virüs Belirtisi (Tüp Adet)	Virüs Belirtisi % oranları
0,5 mg/l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	21	58
0,5 mg/l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	18	50
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	9	25
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	17	47



Şekil .4.6. ½ MS besiyerinde, dört farklı hormon dozu kombinasyonu uygulanan ve iklim odasından geçici laboratuvar koşullarına alınan karanfil (*Dianthus caryophyllus*) bitkiciklerinde gözlenen virüs belirtisi oranları.

4.4. Vitrifikasyon (Camsılaşma)

Çizelge .4.13. MS besiyeri ve uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının, bitkiciklerde görülen vitrifikasyon (camsılaşma) üzerine etkileri.

MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Vitrifikasyon (Tüp Adet)	Vitrifikasyon % oranları
0,5 mg/l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	5	14
0,5 mg/l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	7	19
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	1	3
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	1	3

Çizelge 4.14. ½ MS besiyeri ve uygulanan hormon dozu kombinasyonlarının, bitkiciklerde görülen vitrifikasyon (camsılaşıma) üzerine etkileri

½ MS Hormon Dozu Kombinasyonu	Explant sayısı (Tüp Adet)	Vitrifikasyon (Tüp Adet)	Vitrifikasyon % oranları
0,5 mg/ l NAAx 1 mg/l Kinetin	36	15	42
0,5 mg/ l NAAx 2 mg/l Kinetin	36	10	28
1 mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin	36	7	19
1 mg/l NAA x 2 mg/l Kinetin	36	7	19

Vitrifikasyon, bitki dokularının çeşitli faktörlere bağlı olarak camsı, şeffaf ve kırılgan bir durum almasıdır. Vitrifikasyon çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Bazı araştırmacılar bu durumun klorofil eksikliğinden ve hücre su içeriğinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler (Bonga and Durzan 1987). Sıvı besin ortamlarında veya düşük yoğunlukta agar içeren besiyerlerinde çok sık vitrifikasyon sorunu ile karşılaşılır (Hatipoğlu, 1999). Besiyerindeki agar ve şeker yoğunluğunun arttırılması ile vitrifikasyon olasılığı azaltılabilir. Sıcaklık ve ışık yoğunluğunun da sıklık kontrol edilmesi gerekir. Düşük ışık yoğunluğu ve yüksek sıcaklık vitrifikasyonu teşvik eder. Son yıllarda iki fazlı besiyeri kullanımının da vitrifikasyonu azalttığı ortaya çıkmıştır(Hatipoğlu, 1999). Bu çalışmada, sürgün ve kök gelişimi gözlenmeyen 18 bitki ayrıldığında geriye kalan 228 bitkiden, 53'ünde vitrifikasyon gözlenmiştir. Bu oran yaklaşık % 20 olup, bu da laboratuvar koşullarında yapılan bir üretim için, yüksek bir oran olarak göze çarpmaktadır. Hastalık etmeni taşıyan bitkilerin sayısı da çıkarıldığında geriye 41 sağlıklı bitki kalmaktadır ki bu da başlangıçtaki explant sayısından çok azdır.

5. TARTIŞMA

Doku kültürü yöntemi gelecekte birçok türün kitlesel üretimi için potansiyel konumdadır. Bitki doku kültürleri ile bitkinin herhangi bir parçasından yada tek bir hücreden bütün bir bitkinin yetiştirilmesi için her bitkiye ait uygun ortamın ve koşulların bulunması gerekmektedir.

Doku kültürü yöntemlerinde sürgün ve kök gelişimi için bitki büyüme düzenleyicileri büyük önem taşırlar. Genelde bitkilerde doğal olarak sentezlenirler. Bununla beraber kültüre alınan eksplantlarda yeterli miktarda sentezlenemezler. Bu nedenle kültür ortamına dışarıdan eklenirler. Oksin, sitokinin, giberellin ve etilen büyüme düzenleyici olarak kullanılır. Genellikle oksin hücre genişlemesini ve kök gelişmesini buna karşın kinetin sürgün büyümesini ve hücre bölünmesini teşvik eder. Doku kültürü ortamlarında her bir bitki için doğru hormon çeşidinin ve doğru oranların seçilmesi çok önemlidir (Kyte ve Kleyn, 1999).

Doku kültürü tekniği kullanılmasından bu yana meristem kültürü ile ilgili çalışmalarda yapılmıştır. Karanfilin, meristem kültürü ile virüsten arındırılmış bitki üretimi çalışmaları da 1960'lı yıllardan beri yapılmaktadır. Bu kültürlerde değişik ortamlar kullanılmıştır (Phillips, 1962). Phillips ve ark. (1964), karanfil meristem kültüründe $\frac{1}{2}$ KNOP besiyerini kullanmışlardır. Bazı araştırmacılar ise (Murashige-Skoog, 1962) MS ortamını, karanfil meristem kültürü için kullanmışlardır. Bu çalışmada MS ve $\frac{1}{2}$ MS besin ortamları kullanılmıştır.

Hormon konsantrasyonları birçok araştırmacı tarafından farklı şekillerde kullanılmıştır. Hackett ve ark. (1976), Phillips(1962), karanfil meristemi için kullandıkları ortamlarda sadece oksin kullanmışlardır. Jelaska ve ark. (1977), ise 0.02 mgr /l oksin ve 2 mgr/l kinetinden iyi sonuç almışlardır. Davis ve Ark. MS ortamında NAA ve kinetin kombinasyonlarını incelemişler ve oksinin 1 mgr ve üzerinde olduğu durumlarda sürgünlerin şekil aldığını gözlemişlerdir. Bu çalışmada ise NAA ve kinetin iki farklı dozu kombinasyon halinde kullanılmış (0.5 mg/l, 1 mg/l NAA ve 1mg/l, 2 mg/l kinetin) ve en iyi sonucu MS besiyeri ve 1mg/l NAA ve 1mg/l kinetin kombinasyonunun verdiği gözlenmiştir. $\frac{1}{2}$ MS besiyerinde gelişen sürgünlerin son derece cılız olduğu ve bu bitkiciklerde

vitrifikasyon (camsılaşma) oranlarının da buna paralel olarak yüksek olduğu gözlenmiştir.

Meristem kültürü ile elde edilen karanfillerin virüsle enfekte olma ihtimali meristemin büyüklüğü ile orantılıdır. 0.1 mm büyüklüğünde karanfil meristemi virüssüzdür ancak yaşama olasılığı düşüktür (Quak,1977). Meristem uçlarının genellikle virüssüz olduğu kabul edilebilir (Gönülşen,1987). Ancak bununla birlikte meristem dokularında virüslerin varlığı da kanıtlanmıştır (Quak,1972). Stone meristem ucu kültürü ile 4 çeşit virüsten arınmış *Dianthus barbatus* klonları üretmiştir. Smith (1970)'e göre karanfilde önemli olan Ringspot (CRSV), Mottle(CMV), Vein Mottle(CVMV) ve Latent (CLV) gibi hastalık etmenleri meristem ucu ile elimine edilebilir.

Yapmış olduğumuz virüs testi sonucunda, 221 klondan 112 tanesi virüs belirtisi gösterdi. Bu sonuç Quak(1972) ile uyum göstermektedir. Ancak bunu sadece meristemde bulunan virüs partiküllerine bağlamak yanlış olur. Kültürü yaptığımız laboratuvarın hijyen koşullarının yetersiz olduğu ve çok steril çalışılmamasının da etken olduğu bir gerçektir.

Bu durum meristem kültürü ile elde edilen karanfillerin virüssüz olduğu gibi virüslü de olabileceğini göstermektedir. Virüsle bulaşık olan klonlar atılıp, virüs belirtisi göstermeyen klonlar hijyenik koşullarda çelikle çoğaltılabilir. Ayrıca meristemden elde edilen bitkilerin hızlı ve kuvvetli büyüme yeteneğine sahip olduğu, meristem kültürün virüs eliminasyonunun yanında hızlı gelişme avantajı da olduğu bilinmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada *Dianthus caryophyllus*'ta meristem kültürü tekniği ile virüs eliminasyonu amaçlanmıştır. Sürgün ve kök oluşumu için farklı temel besiyerlerinin ve farklı oksin ve kinetin hormon dozu kombinasyonunun eksplantlar üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Çalışmada temel besiyerlerinde MS ve ½ MS besiyerleri ile çalışılmış, ancak vitrifikasyon (camsılaşma) sonucu kullanılan explantların yarısı atılmıştır. MS besiyerinde sürgün oluşumu ve gelişimi gerçekleşmiştir. ½ MS besiyerinde ise sürgün ve kök gelişimi düşük oranda ve zayıf olmuştur.

Sürgün gelişimi, çoğalması ve kök gelişimi için NAA'nın ve Kinetinin farklı konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının ilave edildiği ortamlar kullanılmıştır. En iyi sürgün ve kök oluşumu 1 mg/l NAA ve 1mg/l kinetin ilaveli MS ortamı içeren tüplerde gerçekleşmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda sürgün oluşumu ve gelişimi için 1 mg/l NAA dozu ve 1 mg/l kinetin dozu kullanılmalıdır. Sürgün ve kök oluşumunun ve gelişiminin en iyi gerçekleştiği besin ortamı MS ve en iyi geliştikleri hormon dozu kombinasyonu ise 1mg/l NAA x 1 mg/l Kinetin'dir. Dolayısıyla bu hormon konsantrasyonları ve besin ortamı bundan sonraki denemelerde tercih edilmelidir.

Meristem kültürü tekniği ile bitki üretiminde dikkat edilecek bir başka nokta, meristem ucunun büyüklüğüdür. Meristemin boyu küçüldükçe virüs içerme olasılığı azalır buna karşın yaşama şansıda buna paralel azalır. Denediğimiz ve düşüğe olsa başarı şansını yakaladığımız ve bu çalışmada tercih edilen meristem büyüklüğü 0.5 mm'dir. Kültürün başarısı aynı zamanda çalışan kişinin konudaki uzmanlığına ve çalışılan ortam ve kullanılan alet ve ekipmanın sterilizasyonuna bağlıdır. Çalışmaya 228 explantla başlanmış ve ancak klonlardan 150 tanesi virüs testi aşamasına kadar gelmiştir. 150 klondan 109 tanesi virüs belirtisi göstererek atılmış ve temiz olarak 41 birey elde edilmiştir. Sayı ve başarı küçük görünse de bu bitkilerden alınacak çeliklerden üretilecek olan bitki sayısı hayli fazla olacaktır. Virüs eliminasyonu ve bitkinin hızlı ve kuvvetli gelişmesi bakımından meristem kültürü tekniği üç yönlü avantaj sağlamaktadır. Meristem kültürü pratikte bu amaçlar için rahatlıkla kullanılabilir.

KAYNAKÇA

1. **Ahmed, H. A. and M. Andrea 1987.** Effect of Heat Treatment on Acceleration of Chrysanthemum Multiplication by Meristem –Tip Culture. *Acta Horticulture*, 212(1): 99-106. *Horticulturel Abstracts* 1988, Abstract No:058-03544
2. **Babaoğlu, M., E. Gürel ve S. Özcan, 2001.** Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları Kitabı s.190-210. Konya
3. **Bonga, J.M. and Don J. Durzan, 1987.** Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/ Boston/ Lancaster.
4. **Bürün, B. ve G. Türkoğlu, 1996.** Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi 6(3) 103-111. ISSN 1018-9424.
5. **Debergh, P., 1990.** In Vitro Culture of Ornamentals p. 561-573. (In *Plant Cell and Tissue Culture*, Eds: I.K. Vasil and T.A. Thorpe. 593 pp) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
6. **Dodds, J.H. and L.W. Roberts, 1993.** Micropropagation With Shoot Apex Cultures, p. 113-121. (In: *Experiments In Plant Tissue Culture*, 231pp), USA.
7. **George, E.F. 1993.** Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Thecnology. Exegetic Ltd. Edington, Wilts, England.
8. **Gönülşen, N., 1987.** Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No: 78, 140s , Menemen, İzmir.
9. **Grout, B.W.W., 1990.** Meristem-Tip Culture. In: Pollard, J.W. and Walker, J.M. (eds), *Plant Cell and Tissue Culture-Methods in Molecular Biology*, Vol.6, pp. 81-91. The Humana Press, USA.
10. **Hackett, W.P. and Anderson, S.M., 1976.** Aseptic Multiplication and Maintenance of Differentiated Carnation Shoot Tissue Derived from Shoot Apices. *Proc. Amer. Soc. Hort. Science*. 90: 365-369.
11. **Hatipoğlu, R., 1999.** Biyoteknolojiye Giriş. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, No: 129, 114s, Adana.
12. **Hollings, M. and Stone, O.M., 1970.** Carnation Mottle Virus. Description of Plant Viruses No: 7. C.M.I. / Association of Applied Biologists.
13. **Jelasca, S. and Sutina R., 1977.** Maintained Culture of Multiple Plantlets from Carnation Shoot Tips. *Acta Horticulture* 78.

14. **Kayım, M. and Koç, N.K., 1992.** Obtaining of Virus-free Potato (*Solanum tuberosum* L.) Planting Stock Material Through Meristem Culture. Doğa Tarım ve Ormancılık Dergisi. 16(2): 380-391.
15. **Love, S.L. and B.B. Rhodes, 1985.** Improved Methods for Meristem Culture of Sweet Potatoes Hort Science, 20(4):655. Plant Breeding Abstracts, 1986, Abstract No: 056-02009.
16. **Lu, M.K. and B. Wang, 1990.** Elimination of Carnation Mottle Virus from Carnation Plants. Chinese Journal of Virology, 6(4): 341-346. Review of Plant Pathology, 1992, Abstract No: 071-03449
17. **Meyer, K. and B. Foroughr-Wehr, 1987.** Possible Ways of Simplifying Potato Meristem Culture. Plant Research and Development, 26: 12-18. Plant Breeding Abstracts, 1988, Abstract No: 058-05206.
18. **Murashige, T. and F. Skoog, 1962.** A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiology Plant., 15: 473-497.
19. **Nehra, N.S. and K.K. Kartha, 1994.** Meristem and Shoot-Tip Culture Requirements and Applications, p. 37-70. (In: Plant Cell and Tissue Culture, Eds.: I.K. Vasil and T.A. Thorpe, 593 pp) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
20. **Phillips, G.C. and G.B. Collins, 1964.** Virus Symptom-Free Plants of Red Clover Using Meristem Culture. Crop Science, 19:213-218.
21. **Quak, F., 1972.** Review of Horticulture, Treatment and Meristem Tip Culture as Methods to Obtain Virus Free Plants. In: Proc. 18 Int. Horticulture Congre, 1970. Vol. 3.: 12-15.
22. **Sherwood, J.L., 1993.** Applied Aspects of Plant Regeneration, 6B., Virus-Free Plants, p. 135-138. (In: Plant Cell Culture A Practical Approach, Eds.: D.A. Dixon and R.A. Gonzales, 230 pp), New York.
23. **Slack, S.A. and L.A. Tufford, 1995.** Meristem culture for Virus Elimination. In: Gamborg O.L. and Phillips G.C. (eds), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods, pp.117-128, Springer-Verlag, Berlin.
24. **Smith, K.M., 1972.** Plant Virus Diseases Longman Group Ltd. London. Third Edition. p. 134-144.
25. **Van Os, E.A., J.J. Amsing, A.J. van Kuik and H. Willers. 1999.** Slow Sand Filtration: A Potential Method for The Elimination of Pathogens and Nematodes

in Recirculating Nutrient Solutions from Glasshouse-Grown Crops. *Acta Hort.* 481:519-526.

ÖZGEÇMİŞ

Şenay GÖRÜ, 10.10.1970 tarihinde Diyarbakır’da doğdu. İlk,orta ve lise öğrenimini Diyarbakır’da tamamladı. 1990-1995 yılları arasında AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ ZİRAAT FAKÜLTESİ Tarla Bitkileri Bölümü’nde lisans eğitimi aldı. 1996-2001 yılları süresince Kocaeli Üniversitesi’nde Meslek Yüksekokullarının tarımsal programlarında Öğretim Görevlisi olarak görev yaptı. Halen Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü’nde Ziraat Mühendisi olarak görev yapmaktadır.