ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

JUNIPERUS OXYCEDRUS L. (KATRAN ARDICI) OLGUNLAŞMAMIŞ MEYVELERİNDEN SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE BİTKİ REJENERASYONU

Mustafa KAHYA

TARIM VE YAŞAM BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mustafa KAHYA tarafından hazırlanan "*Juniperus oxycedrus* L. (Katran ardıcı) olgunlaşmamış meyvelerinden somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım ve Yaşam Bilimleri Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Sezer OKAY

Hacettepe Üniversitesi, Aşı Enstitüsü

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Cem KARAKOÇ

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Yapraklı Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JUNIPERUS OXYCEDRUS L. (KATRAN ARDICI) OLGUNLAŞMAMIŞ MEYVELERİNDEN SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE BİTKİ REJENERASYONU

Mustafa KAHYA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarım ve Yaşam Bilimleri Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Bu araştırmanın amacı, *Juniperus oxycedrus* (Katran ardıcı) olgunlaşmamış meyvelerinden somatik embriyogenesis yoluyla, *in vitro* şartlarda yoğun ve klonal üretimdir. Somatik embriyogenesisi (SE) uyarmak amacıyla başlangıç aşamasında, Murashige ve Skoog (MS), Driver ve Kuniyuki Walnut (DKW) ve Woody Plant Medium (WPM) temel besin ortamlarına, sakkaroz (30 g/L), L-glutamin (500 mg/L), gelrite (2,1 g/L) ve 6 farklı bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu [(1) BA (1 mg/L)+NAA (0,5 mg/L), (2) BA (1 mg/L)+IBA (0,1 mg/L), (3) KIN (2 mg/L)+NAA (0,5 mg/L), (4) KIN (2 mg/L)+IBA (0,1 mg/L), (5) BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+NAA (0,5 mg/L), (6) BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+IBA (0,1 mg/L)] kullanılmıştır. Petri kaplarına, *J. oxycedrus*'un olgunlaşmamış meyvelerinden elde edilen eksplantlar 5'er adet/Petri olacak şekilde dikilmiştir. Deneme toplam 180 adet petri kabı içerisinde 900 eksplant ile yürütülmüştür ve en az ikişer kez tekrarlanmıştır. Ancak, çalışmada hedeflenen *J. oxycedrus* eksplantlarından somatik embriyogenesis uyarımı sağlanamamıştır. Araştırmada elde edilen verilerden daha sonra yapılacak çalışmalara yol göstermesi amacıyla, meydana gelen kallusların oluşum interaksiyonları ve somatik embriyogenesisin oluşmama nedenleri incelenmiştir. Buna göre; temel besin ortamlarının kallus oluşumu üzerindeki etkisinde; % 82 ile WPM en iyi temel besin ortamı olduğu ve onu % 43 ile MS ve % 28 ile DKW besin ortamlarının izlediği belirlenmiştir.

Aralık 2019, 29 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bitki rejenerasyonu, somatik embriyogenesis, Katran ardıcı, *Juniperus oxycedrus* L.

ABSTRACT

M.S. Thesis

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM IMMATURE FRUITS OF *JUNIPERUS OXYCEDRUS* (PRICKLY JUNIPER)

Mustafa KAHYA

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agriculture and Life Sciences

Supervisor: Dr. Mehmet SEZGİN

The objective of this study is intensive and clonal propagation of *Juniperus oxycedrus* (prickly juniper) *in vitro* by somatic embryogenesis from immature fruits. In the initial phase, to induce somatic embryogenesis (SE), sucrose (30 g/l), L-glutamine (500 mg/L), gelrite (2.1 g/L) and 6 different plant growth regulator combinations [(1) BA (1 mg/L)+NAA (0.5 mg/L), (2) BA (1 mg/L)+IBA (0.1 mg/L), (3) KIN (2 mg/L)+NAA (0.5 mg/L), (4) KIN (2 mg/L)+IBA (0.1 mg/L), (5) BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+NAA (0.5 mg/L), (6) BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+IBA (0.1 mg/L)] were added in the Murashige and Skoog (MS), Driver and Kuniyuki Walnut (DKW) and Woody Plant Medium (WPM) basal media. The explants obtained from the immature fruits of *J. oxycedrus* were planted in Petri dishes as 5 pieces/Petri dish. Experiments were conducted with a total of 900 explants in 180 Petri dishes and were repeated at least twice. However, somatic embryogenesis induction from the immature fruits of *J. oxycedrus*, the objective of the study, was not achieved. In order to guide future studies from the data obtained in the study, the formation interactions of the calluses obtained, and the reasons for the absence of somatic embryogenesis were examined. According to this; the effect of basal media on callus formation; WPM was the best with 82%, followed by MS with 43% and DKW with 28%.

December 2019, 29 pages

Key Words: Plant regeneration, somatic embryogenesis, prickly juniper, *Juniperus oxycedrus* L.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Juniperus oxycedrus* L.(Katran ardıcı)'un olgunlaşmamış meyvelerinden somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu" adlı bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım ve Yaşam Bilimleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tez çalışması olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından BAP FF061218L05 numaralı Lisansüstü Tez Projesi olarak desteklenmiştir. Bize her aşamada her türlü desteği sunan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma konusunun seçiminden, çalışmanın sonlandırılmasına kadar her aşamada desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden sıkça yararlandığım danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN'e ve desteği ile yanımda olan aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Mustafa KAHYA
Çankırı, Aralık 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1.GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **5**
2.1. *JUNİPERUS* SP.'NİN KULLANIM ALANLARI **5**
2.2 *JUNİPERUS* SP.'NİN *İN VİTRO* ÇOĞALTIMI **6**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **9**
3.1 MATERYAL TEMİNİ **9**
3.2 *IN VİTRO* ÇOĞALTIM AŞAMASI **10**
3.2.1 Sterilizasyon ***10***
3.2.2 Eksplantların dikime hazırlanması ***11***
3.2.3 In vitro çoğaltım için besin ortamı bileşimleri ***11***
3.2.4. I. deneme için eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi ***13***
3.2.5. I. deneme için alt kültüre alma ve denemenin sonlandırılması ***14***
3.2.6. II. deneme için eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi ***14***
3.2.7. II. deneme için eksplantların alt kültürlere alınması ***15***
3.2.8. Verilerin istatistiksel analizi ***18***
4. BULGULAR **19**
4.1 SOMATİK EMBRİYO OLUŞUMU **19**
4.2 KALLUS OLUŞUMU **19**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **22**
KAYNAKLAR **25**
ÖZGEÇMİŞ **28**

SİMGELER DİZİNİ

2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik asit
BA	Benziladenin
DKW	Driver and Kuniyuki Walnut temel besin ortamı
g	Gram
g/L	Gram/litre
IBA	İndolbütirik asit
KIN	Kinetin
M	Molarite
mg/L	Miligram/litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
NAA	Naftalenasetik asit
ppb	Milyarda bir kısım
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
WPM	Woody Plant Medium temel besin ortamı
%	Yüzde konsantrasyon
% h/h (% v/v)	Hacimce yüzde
°C	Celcius

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Katran ardıcı ve olgunlaşmamış meyveleri……. 2
Şekil 3.1 Türkiye'de doğal olarak yetişen ardıç (Juniperus) türlerinin dağılımı…… 9
Şekil 3.2 J.oxycedrus'nin olgunlaşmamış meyvelerinin yıkanması ……. 10
Şekil 3.3 J.oxycedrus meyvelerine sterilizasyon uygulamaları ……. 11
Şekil 3.3a %70'lik EtOH uygulaması 11
Şekil 3.3b %20'lik NaOCl uygulaması…….. 11
Şekil 3.4 J.oxycedrus'nin olgunlaşmamış meyvelerinin eksplant haline getirilmesi. 11
Şekil 3.5 Embriyogenik kotiledonların besin ortamına dikimi ……. 15
Şekil 3.6 Sıvı kültür ortamları.……... 17
Şekil 3.6 a-b Sıvı besin ortamındaki kallus dokuları ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyolar……... 17
Şekil 3.6 c Sıvı besin ortamlarının karanlık koşullarda bekletilmesi…….. 17
Şekil 3.6 d Sıvı besin ortamındaki kallus dokuları ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyoların 25°C'de sabit ısıda,110 rpm/dakika hızda çalkalanması..... 17
Şekil 4.1 J.oxycedrus eksplantlarından elde edilen kalluslar…….. 21
Şekil 4.1 a-b WPM temel besin ortamı 3 no'lu KIN (2mg/L)+NAA (0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu bulunan ortamdaki kallus dokuları …….. 21
Şekil 4.1 c-d MS temel besin ortamı 1 no'lu BA (1 mg/L)+NAA (0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu bulunan ortamdaki kallus dokuları…….. 21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Temel besin ortamlarının içeriği……. 14

Çizelge 4.1 Temel besin ortamlarına göre kallus oranı (%) ve ortalama kallus sayısı…….. 19

Çizelge 4.2 Temel besin ortamı x büyümeyi düzenleyici madde kombinasyon interaksiyonu (P≤0.045)…… 29

1.GİRİŞ

Ardıç ağacı (*Juniperus* sp.) cinsinin dünya üzerinde 70 kadar türünün olduğu bilinmektedir. Ardıç türleri, genellikle kuzey yarım kürede geniş bir yayılış alanına sahiptirler. Yayılış alanları, Japonya ve Doğu Asya'dan başlayıp, Asya ve Avrupa'yı içine alır. Kuzey ve Doğu Afrika'dan Kuzey Amerika ve kutup bölgesine kadar ulaşmaktadır (Adams and Hagerman 1977).

Ardıçlar; ağaç, küçük ağaç, çalı ve sürünücü gibi farklı yapıda bulunmaktadır. Çok sık ibre yapıları nedeniyle rüzgâr, kar ve ses perdesi olarak kent ormanlarında kullanılan önemli türler olmalarının yanı sıra yaban hayatında da önemli bir yere sahiptir. Anadolu'da kurulan uygarlıklar ardıç odunlarını; çürümeye, suya dayanaklığı ve ses iletiminin yüksek olması nedeniyle; bina, çatı, kuyu inşaatlarında, bahçe çitlerinde, müzik aleti (saz ve kemençe) yapımında kullanmışlardır. Bununla birlikte Ardıcın çeşitli organları ise yün boyamada, tıbbi amaçlı, insanların ve hayvanların doğrudan beslenmesinde kullanmışlardır (Anşin ve Özkan 1997; Baytop, 1999; Yaltırık ve Efe, 2000; Tümen ve Hafızoğlu, 2003).

Ardıç ağaçları; kök, meyve ve yapraklarında bulunan uçucu yağ, tanen, flavanoit, reçine, lignan ve triterpen nedeniyle tarih boyunca ağrı, öksürük, romatizma, tüberküloz vb. hastalıklara karşı ilaçlar hazırlanarak antiseptik olarak kullanmışlardır. Ayrıca, ardıçların çeşitli kısımları kozmetik ve gıda sanayinde ham madde olarak kullanıldığı gibi kozalaklarının içerdikleri karbonhidrat ve yağlar nedeniyle de besincilikte doğrudan kullanılabilecekleri farklı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir.

Ardıç, türleri Türkiye'deki toplam orman alanlarının %2,7'sinde bulunmakta olup artan nüfus, aşırı otlatma ve aşırı tüketim ile birlikte miktarı giderek azalmaktadır. Bunun nedenleri; tohumlarının çimlendirilememesi, fidanlık tekniği, ağaçlandırma ve doğal gençleştirme tekniklerinin uygun bir şekilde ortaya konamamasıdır. Bunun yanı sıra otlak alanlarının tarımsal amaçlı kullanımı, keçi otlatmasının daha çok ardıç ormanlarına yönelmesi, ardıç ormanlarının yaban hayatına çok iyi barınma ve beslenme ortamı oluşturması nedeniyle yoğun avlak alanları olarak kullanılması, özellikle de ardıç

kuşlarının yasa dışı yöntemlerle avlanması, bunun sonucunda ardıç tohumlarının yayılmasını sağlayan yabani hayvan varlığının hızla azalması; yasal yöntemlerle elde edilemeyen ardıç ürünlerinin yasa dışı yöntemlerle temin edilmesidir (Anşin ve Özkan 1997; Tümen ve Hafızoğlu, 2003).

Bu çalışmada kullanılan Katran ardıcı (*Juniperus oxycedrus* L.), Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Korunma Birliği [International Union for Conservation of Nature (IUCN)] tarafından yok olma tehlikesi altındaki bitkiler listesinde (The IUCN Red List of Threatened Species) en az endişe verici (least concern, LC) sınıfında yer almaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Katran ardıcı ve olgunlaşmamış meyveleri

Ardıç türlerinin tohumlarında, çimlenme engelli bulunduğu bilinmektedir. Bu engelin; yetersiz embriyo gelişmesi, tohum kabuğunun geçirgenliğinin azlığı veya yapısındaki çimlenmeyi engelleyici "blastakolin" adı verilen maddenin varlığı gibi çeşitli nedenlerden kaynaklandığı birçok kaynakta vurgulanmaktadır (Şimşek 1993; Ürgenç 1998; Gültekin ve Gültekin 2006).

Bitki embriyoları; polenden gelen sperm hücreleri ile yumurta hücresinin döllenmesi sonucu oluşan 2n kromozoma sahip zigottun bir sıra mitoz bölünmesi ile meydana gelmektedir. 1950 yılında, doku kültürü çalışmalarında kallustan da embriyo ve embriyo benzeri yapıların geliştiği gözlenmiştir. Steward vd. (1958)'de tarafından ilk somatik embriyogenesis çalışması havuçta somatik dokulardan gerçekleştirilmiştir.

Kallus ve vejetatif dokulardan gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Özellikle zigotik embriyolar yüksek totipotensi kabiliyeti bulunması nedeniyle önemli bir eksplant kaynağıdır. Günümüzde doku kültürü teknikleri kullanılarak bir bitkinin herhangi bir doku veya organındaki somatik hücreden, doğrudan ve kallus yolu ile embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir (Özcan vd. 2002). Somatik embriyo ile zigotik embriyo arasındaki en önemli fark; somatik embriyodan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluştururken, zigotik embriyodan gelen bitkiler bir açılım göstermektedir.

Biyoteknolojik yöntemler tek başlarına ya da klasik yöntemler ile birlikte kullanılarak odunsu bitki türlerinde ıslah ve çoğaltımda kısa zamanda ve başarıyla sonuçlanmasını olası kılmaktadır. Klasik yöntemler ile yapılan çalışmalarda zamanın etkin olarak kullanımı, klonların kısa sürede oluşturulması ve gerekli testlerin *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmesi için rejenerasyon sorunu olmayan hücre ve dokulara gereksinim bulunmaktadır. Özellikle hızlı hücre bölünmesine sahip ve içsel büyüme hormonlarını diğer dokulara nazaran bünyesinde fazlaca bulunduran olgunlaşmamış tohumlardan başarıyla elde edilebilen somatik embriyolar, sürgün ucu kültürü gibi diğer *in vitro* tekniklerin başarılı olamadığı odunsu türlerde zigot orijinli yoğun klonal çoğaltım için çok uygundur. Bu kapsamda somatik embriyogenesis, birçok türde yoğun klonal çoğaltım ve bunun sonucu olarak bol ve temiz fidan üretimi, gen transferi, genetik materyalin korunması, çok amaçlı *in vitro* testler, melezleme çalışmaları sonucunda elde edilen hibritlerden kısa zamanda klonların oluşturulması, moleküler teknikler için temiz DNA ekstraksiyonu gibi birçok alanda büyük kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Hatipoğlu 1999; Özcan vd. 2002).

Tıp, ormancılık ve peyzaj alanında büyük bir öneme sahip olmasının yanı sıra IUCN tarafından yok olma tehlikesi altında bulunan bitkiler listesinde bulunan Katran ardıcının, olgunlaşmamış meyvelerinden somatik embriyogenesis yoluyla *in vitro* şartlarda yoğun ve klonal üretim amaçlan bu çalışma ile;

(i) *Juniperus oxycedrus* bitkisinin olgunlaşmamış meyveleri eksplant kaynağı olarak kullanılarak, değişik dozlarda ayarlanmış bitki büyüme düzenleyiciler ve organik madde içeren farklı besin ortamlarında kültüre alınması,

(ii) Kültüre alınan eksplantlardan, direkt olarak ya da önce kallus elde ederek somatik embriyo oluşumunun sağlanması,

(iii) Somatik embriyoların sürgün ve kök rejenerasyonun sağlanması,

(iv) Aklimitizasyon aşaması için rejenere olmuş bitkilerin serada yetiştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Juniperus* sp.'nin Kullanım Alanları

Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Korunma Birliği [International Union for Conservation of Nature (IUCN)], tarafından yok olma tehlikesi altındaki bitkiler (The IUCN Red List of Threatened Species) listesinde en az endişe verici (least concern, LC) olarak sınıflandırılan Katran ardıcı (*Juniperus oxycedrus*), Akdeniz boyunca maki ve ormanlık alanlarda yayılış gösteren bir türdür (Farjon 2013). Kaya ve Raynal (2001) yaptıkları çalışmada Türkiye ormanlarının biyoçeşitliliği ve korunmasının önemini vurgularken *Juniperus* sp. türlerinin ağaç step vejetasyonları ve çalı formasyonlarındaki önemini belirtmiştir.

Salido *et al*. (2002) *J. oxycedrus* sp. *badia*'dan elde ettikleri uçucu yağların kimyasal özellikleri üzerine çalışmıştır. Diğrak vd. (1999) yine ardıçtan elde ettikleri uçucu yağların antimikrobiyal etkilerini araştırmış ve bazı bakterilerin gelişimini baskılamasının yanı sıra antifungal etki gösterdiğini bildirmiştir.

Tümen ve Hafızoğlu (2003) yaptıkları çalışmada, *J. oxycedrus*'un yapraklarından elde ettikleri uçucu yağda, toplam 72 farklı madde belirlemiş ve bu maddelerden 67 tanesini teşhis etmiştir. Tespit edilen kimyasal bileşikler 6 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar; monoterpen hidrokarbonlar (19 adet), oksijenli monoterpenler (15 adet), seskiterpen hidrokarbonlar (18 adet), oksijenli seskiterpenler (9 adet), diterpenler (6 adet) ve diğerleri (5 adet) olarak bulunmuştur.

Ardıç, kozalak ve yaprakları, tıp ve kozmetik sanayinde, cilt hastalıkları, kurt düşürücü, uyarıcı ve antiseptik olarak kullanıldığı ve adi ardıç (*J. communis* L.) meyvelerinin cin yapımında kullanıldığı Baytop (1984) tarafından bildirilmiştir. Tıbbın henüz yeterince gelişmemiş olduğu eski devirlerde bitkiler ile tedavi yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ardıç türlerinin orta çağda her derde deva bir ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. İdrar arttırıcı, terletici ve antiseptik özelliklerinin yanı sıra değişik hastalıkların tedavisinde dahili olarak yaygın şekilde kullanıldığı gibi, harici olarak da cilt üzerine

uygulandığı Koç (2002)'de vurgulanmıştır. Halen halk ilacı olarak ülkemizde ve başka ülkelerde deri iltihapları, baş ağrıları, şeker hastalıkları, sindirim yolu hastalıkları, bronşit, astım, böbrek ve idrar yolu rahatsızlıkları, sarılık, siyatik, romatizma, nefes yolu rahatsızlıkları, sinüzit, karaciğer rahatsızlıkları, metabolizma bozukluklarına iyi geldiği bilinmekte ve kullanılmaktadır (Acartürk, 1996; Erenler, 1997; Gürkan, 2003). Ayrıca Anadolu'da *J. oxycedrus* yağının ardıç yağı olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Baytop, 1999).

2.2 *Juniperus* sp.'nin *in vitro* Çoğaltımı

Gomez and Segura (1994) yaptıkları çalışmada, *J. oxycedrus*'un yetişkin bireylerinin sürgün uçlarından aldıkları eksplantları, Murashige and Skoog (MS) ve Schenk and Hildebrandt (SH) besin ortamlarına 0, 0,05, 0,5, 5, 10 ve 25 µM benziladenin (BA) veya kinetin (KIN), veya 0 ve 0,05 µM naftalenasetik asit (NAA)'i tek başına ya da bunların kombinasyonlarını ilave ederek dikmişlerdir. Elde ettikleri kallojenik dokunun sürgün ve kök oluşturarak bitkiye dönüşümü sağlanmıştır.

Gomez and Segura (1996), aynı bitkideki çalışmalarında yine eksplant kaynağı olarak yetişkin bireylerin sürgün uçlarını kullanmışlardır. Bu çalışmalarında MS, SH, Gressoff and Doy (GD) ve Heller (H) besin ortamlarına BA'nın 0, 0,05 veya 0,5 µM dozlarını tek başına ya da 0,05 µM indolasetik asit (IAA) ile birlikte kombinasyonlarını kallus uyarımı için denemişlerdir. Sürgün oluşumunu teşvik etmek amacıyla SH besin ortamına BA (0, 0,05 veya 0,5 µM) dozlarını yalnız ya da 0,05 µM KIN ile birlikte uygulamışlardır. Bitkiye dönüşüm miktarının %7-10 arasında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

J. phoenicea L.'nin mikroçoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada Loureiro *et al*. (2007), en iyi gelişimi oranlarını Driver and Kuniyuki (DKW) besin ortamına yalnız başına KIN ya da NAA, ilave edilmiş Rugini Olive (OM) ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Köklendirme aşamasında 2,4 µM indolbütirik asit (IBA) içeren OM ortamında %40 oranında başarı elde etmişlerdir.

Castro *et al*.(2011) tarafından yayınlanan çalışmada, endemik *J. navicularis*'in mikro çoğaltımında OM ve Gupta and Durzan (GD bu kısaltma daha önce Gressoff and Doy için kullanılmış), besin ortamlarının her ikisinde de 0,45 µM BA ilave edilmiş ortamda en iyi sürgün gelişimini, 12,3 µM IBA ilave edilmiş ortamda da %60 oranında köklenme oranını başarmışlardır.

J. oxycedrus'un olgun bireylerin sürgün uçlarından alınan yaprakların eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada, SH besin ortamına 0,6 µM 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 100 mg/L kazein hidrolizat içeren ortamda kallus dokusu teşvik edilerek embriyogenik doku oluşumu %18 oranında uyarılmıştır. Oluşan kallus dokusu 6 µM veya 10 µM 2,4-D ya da pikloram içeren SH besin ortamında somatik embriyogenesis sağlanmıştır. Ancak embriyoların hiçbiri bitkiye dönüşmemiştir. Araştırmacılar ayrıca yaprak dokusundan meydana gelen kallus dokusunun hücre kültürü çalışmaları için uygun bir materyal olmasına karşın, somatik embriyogenesis ve embriyolardan bitki rejenerasyonu için uygun olmadığını vurgulamışlardır (Gomez and Segura 1996).

Koçer *et al*. (2011) tarafından *Juniperus communis* L. *in vitro* şartlarda rejenerasyonu için yapılan çalışmada; kallus uyarımı, organogenesis ve köklendirme deneyleri yapılmıştır. Eksplant pozisyonu, genotip, cinsiyet, besin ortamı ve örnekleme tarihinin, kallus oluşumunda önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Deney sonucunda, eksplant kaynağı olarak bahar döneminde toplanan *J.communis* L.'in sürgün uçlarının dikildiği MS besin ortamı; 0,1 mg/1 BA, 0,5-4,0 mg/1 IBA, %3 sakkaroz ve %0,7 agar içeriği ile kallus oluşumu için en uygun besin ortamı olduğu bulunmuştur. Ayrıca, organ gelişimi için eksplant pozisyonuna bakılmaksızın iki aylık kültür döneminin ardıçta kallus indüksiyonu için yeterli olduğu düşünülmüştür. İki aylık inkübasyon evresinden sonra, kallus dokularından adventif tomurcuk oluşumunu saptamak amacıyla, eksplantlar hazırlanan besin ortamlarına transfer edilmiştir. Kallus yaşlanmasının adventif tomurcuk oluşumunu olumsuz etkilemesine rağmen; 1,0 mg/L BAP ve 0,5 mg/L 2,4-D içeren besin ortamının %37,5 adventif tomurcuk oluşturma kapasitesi ile optimum kültür ortamı olduğu bulunmuştur. Adventif sürgünlerin köklenme köklendirme deneylerinde *Juniperus communis* L. *in vitro* olarak kök elde edebilmek için uygulanan besin ortamlarının hiçbiri başarılı olmamıştır.

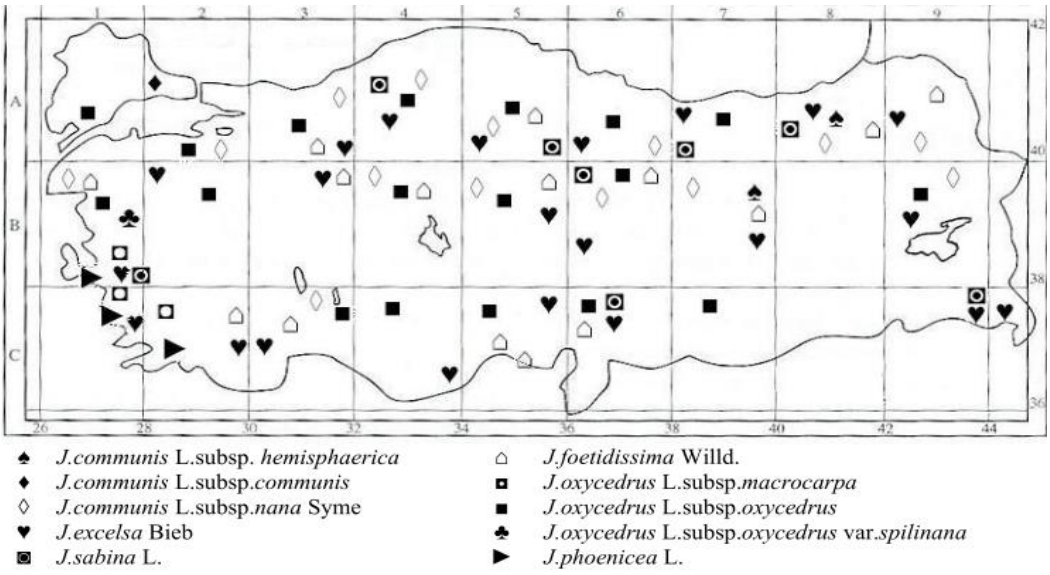
Helmersson and Von Arnold (2009) *J. communis*'te, embriyogenik hücre hatları ve embriyo olgunlaştırması amacıyla yaptıkları çalışmada, olgunlaşmamış kozalaklar içerisindeki tohum dokusundan elde ettikleri zigotik embriyoları ½ LP besin ortamında karanlık koşullarda saklamışlardır. Embriyoları olgunlaştırmak amacıyla 60 µM absisik asit (ABA) içerisinde inkübe etmişlerdir. Çalışmada araştırıcılar, olgunlaşmamış meyve içerisinde bulunan tohumların bütününü (megagametofit) besin ortamı, büyüme düzenleyici madde, organik madde vs. gibi *in vitro* doku kültürü bileşenlerini açıklamamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan Biyoteknoloji Laboratuvarında 2018-2019 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1 Materyal Temini

Ardıçlar (*Juniperus* L.), Cupressaceae (Pul yapraklılar) ailesine aittirler ve hemen hemen yurdumuzun tamamında yayılış gösterirler. Çankırı Merkez Orman İşletmesi Eldivan Bülbülpınarı mevkiinde, *Pinus nigra* Arnold. (karaçam), *Quercus cerris* L. (saçlı meşe), *Q. pubescens* Willd. (tüylü meşe), *Q. robur* L. (saplı meşe), *Corylus avellana* L. var *avellana* (adi fındık), *Acer campestre* L. (ova akçaağacı), *Populus tremula* L. (titrek kavak) ve *Salix alba* L. (aksöğüt) ile karışık meşcereler oluşturan (Öner ve İmal 2006) *Juniperus oxycedrus* (Katran ardıcı) alanda değişik yaşlarda, bol miktarda bulunmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Türkiye'de doğal olarak yetişen ardıç (*Juniperus*) türlerinin dağılımı (Tümen ve Hafızoğlu 2003).

Bülbülpınarı mevkiinin dışında Korgun'da ve Ilgaz Dağı'nda da karaçam ile karışık meşcereler içerisinde Katran ardıcı bulunmaktadır. Her dem yeşil olan bitkinin

meyveleri iki yılda olgunlaşmaktadır ancak, bölgede değişik yaşlarda ve yeterli miktarda bulunması materyal teminini kolaylaştırmaktadır.

Bu çalışma için 04 Nisan 2018 günü Çankırı İli Yapraklı ilçesi sınırları içerisinde bulunan 40º45'59″N, 33º46'27″E koordinatlarındaki bölgeden ağaçların doğal yaşam alanlarına, üremelerine ve çoğalmalarına engel olmayacak şekilde *Juniperus oxycedrus*'un genç dallarında bulunan henüz olgunlaşmamış meyveleri toplanarak laboratuvar ortamına getirilmiştir.

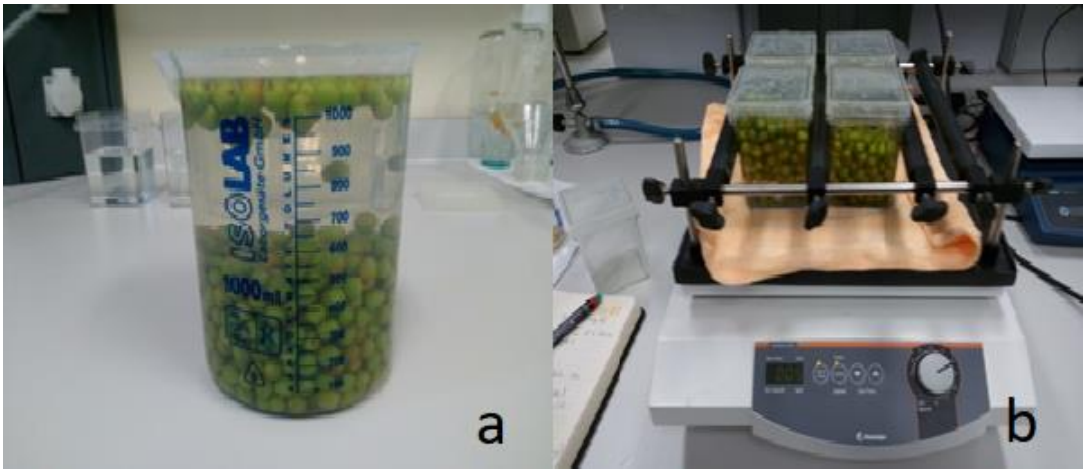
3.2 *In vitro* Çoğaltım Aşaması

3.2.1 Sterilizasyon

Araziden laboratuvar ortamına getirilen olgunlaşmamış meyveler, öncelikle yüzey sterilizasyonu için akan musluk suyu altında (Şekil 3.2) 20 dakika yıkandıktan sonra %70'lik etanolde 3 dakika süresince bekletilmiştir (Şekil 3.3). Etanol uygulamasından sonra meyveler steril saf su ile yıkanmıştır. İçerisinde %15 klorin bulunan ticari sodyum hipokloritin birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş %20'lik solüsyonunda, 10 dakika boyunca sterilize edilmiştir. Sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaşması için 3 defa 5'er dakika süre ile steril saf su ile aseptik koşullarda çalkalanmıştır (Şekil 3.3) (Sezgin and Dumanoğlu 2014).



Şekil 3.2 *J.oxycedrus*'nin olgunlaşmamış meyvelerinin yıkanması



Şekil 3.3 *J.oxycedrus* meyvelerine sterilizasyon uygulamaları **a)** %70'lik EtOH uygulaması **b)** %20'lik NaOCl uygulaması

3.2.2 Eksplantların dikime hazırlanması

Olgunlaşmamış meyveler, sterilizasyon işlemi sonrasında laminar hava akışlı kabin içerisinde meyve dış kabukları bir bistüri yardımıyla soyulmuş ve steril kurutma kağıtları üzerinde yaklaşık 0,5 cm ebatlarında kesilerek dikime hazır eksplantlar haline getirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 *J.oxycedrus*'nin olgunlaşmamış meyvelerinin eksplant haline getirilmesi

3.2.3 *In vitro* çoğaltım için besin ortamı bileşimleri

Çalışma için Katran ardıcının (*Juniperus oxycedrus*) olgunlaşmamış tohumları eksplant kaynağı olarak kullanılmış, somatik embriyogenesis uyarımı için farklı bileşimlerdeki

besin ortamları (Çizelge 3.1) ile oksin ve sitokinin grubu bitki büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonları hazırlanmıştır (Şan *et al*. 2007; Sezgin and Dumanoğlu 2014).

1) Temel besin ortamı

a) MS (Murashige and Skoog 1962) (Çizelge 3.1)

b) DKW (Tulecke and McGranahan 1985) (Çizelge 3.1)

c) WPM (Lloyd and McCown 1981) (Çizelge 3.1)

2) Büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonları

1) BA (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) (Şan *et al*. 2007)

2) BA (1 mg/L) + IBA (0,1 mg)

3) KIN (2 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)

4) KIN (2 mg/L) + IBA (0,1 mg/L)

5) BA (1 mg/L) + KIN (2 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)

6) BA (1 mg/L) + KIN (2 mg/L) + IBA (0,1 mg/L)

Juniperus oxycedrus'nin olgunlaşmamış tohumlarından elde edilen eksplantlar için 3 farklı temel besin ortamı ve 6 farklı büyümeyi düzenleyici maddenin (BDM) yer aldığı 18 farklı kombinasyonda hazırlanan besin ortamlarına; katılaştırıcı olarak Gelrite (2,1 g/L), organik madde kaynağı olarak L-glutamin (500 mg/L) ve sakkaroz (30 g/L) ilave edilmiştir. Ortamın pH'sı 5,7'ye ayarlanmıştır. Her bir kombinasyon 10'ar tekerrür ve her bir tekerrürde 5'er adet eksplant olacak şekilde hazırlanmıştır (Sezgin and Dumanoğlu 2014).

Besin ortamlarının sterilizasyonu dijital kontrollü otoklav ile 121°C ve 1,2 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle yapılmıştır. Otoklavdan çıkarılan besin ortamları laminar hava akışlı kabin içerisinde katılaşmasından hemen önce steril petri kaplarına (100x10 mm) 40'ar mL olarak dağıtılmıştır.

Çizelge 3.1 Temel besin ortamlarının içeriği

(A) MAKRO ELEMENTLER	g/mol	MS Ortamı mg/L	DKW Ortamı mg/L	WPM Ortamı mg/L
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	80,04	1650	1416	400
Potasyum nitrat (KNO_3)	101,11	1900	-	-
Kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$)	147,02	440	149	96
Kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$)	236,15	-	1968	-
Çinko nitrat heksahidrat ($Zn(NO_3)_26H_2O$)	297,48	-	26.68	-
Potasyum sülfat (K_2SO_4)	174,27	-	1559	-
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	136,09	170	265	-
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$)	246,48	370	740	370
(B) DEMİR				
Sodyum-demir EDTA ($C_{10}H_{12}N_2FeNa$)	367,1	36,7	-	-
Sodyum EDTA (Na_2EDTA)	372,24	-	45,4	37,3
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4$ 7 H_2O)	278,02	-	33,8	27,8
(C) MİKRO ELEMENTLER				
Mangan sülfat monohidrat ($MnSO_4$. H_2O)	169,02	16	33,4	22,3
Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$)	287,54	8,6	-	8,6
Nikel sülfat heksahidrat ($NiSO_4.6H_2O$)	262,90	-	0,05	-
Borik asit (H_3BO_3)	61,83	6,2	4,8	6,2
Potasyum iyodür (KI)	166,01	0,83	-	-
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	136,09	-	265,0	-
Sodyum molibdat dihidrat ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	241,95	0,25	0,39	0,25
Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$)	249,68	0,025	0,25	0,25
Kobalt klorür heksahidrat ($CoCl_2$. $6H_2O$)	237,9	0,025	-	-
(D)VİTAMİNLER				
Myo-Inositol ($C_6H_{12}O_6$)	180,16	100	100	100
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	75,07	2	2	2
Thiamin klorid hidroklorid ($C_{12}H_8C_{l2}N_4OsxH_2O$)	337,27	0,1	2	1
Nikotinik asid ($C_6H_5NO_2$)	123,11	0,5	1	0,5
Pridoksol hidroklorid ($C_8H_{12}ClNO_3$)	205,64	0,5	-	0,5

3.2.4. I. deneme için eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi

Sterilizasyon sonrasında dikim için hazır hale getirilmiş olan eksplantlar 04 Nisan 2018 tarihinde, başlangıç ortamları içerisine yatay pozisyonda 5 adet/Petri olarak dikilmiştir. Petri kaplarının etrafı streç film ile sarılarak besin ortamın nem ve gaz dengesinin korunması ve dış çevreden kaynaklı olası bir kontaminasyon durumunun önlenmesi sağlanmıştır. Somatik embriyogenesin uyarılması amacıyla tüm kültürler 25±1°C sıcaklıkta ve tamamen karanlık koşullara sahip iklim kabininde 4 hafta süreyle inkübe edilerek her gün düzenli olarak kontrol edilmiştir.

3.2.5. I. deneme için alt kültüre alma ve denemenin sonlandırılması

Eksplantlar dikim tarihinden 2 hafta sonra birinci alt kültüre alınmıştır. Alt kültür aşamasında eksplantlar, başlangıç aşamasında dikildikleri MS, DKW ve WPM temel besin ortamları ile büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu ortamlara aktarılmıştır. Kültürler üzerinde fenolik oksidasyon kaynaklı kararma meydana gelen eksplantlar alt kültür ortamına alınırken, endojenik ve ekzojenik kaynaklı kontamine olmuş ekplantlar ayrılmıştır. Tüm denemeler karanlık şartlarda tekrar inkübe edilmiştir.

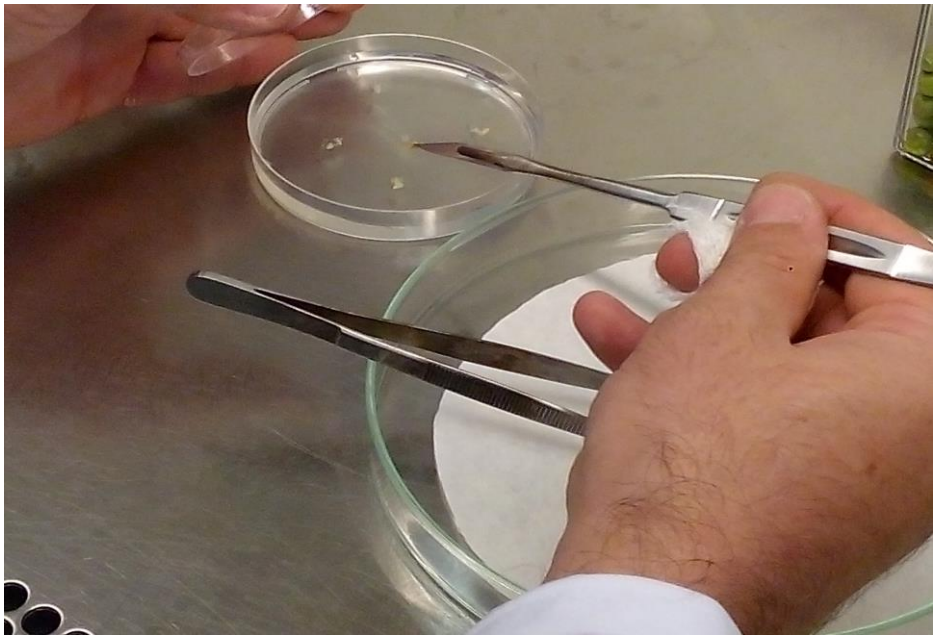
İlk denemedeki tüm tekerrürler 15 Mayıs, 06 Haziran ve 02 Temmuz 2018 tarihlerinde üç kez daha alt kültüre alınmıştır. Ancak, yeniden alt kültüre alınan eksplantlar da dahil olmak üzere kallus oluşum aşamasına geçen çok az tekerrür olması, oluşan kallusların ise yoğun fenolik oksidasyon sebebiyle kararması, alt kültürler arası dönemde hacim artışının sınırlı kalması nedeniyle birinci denemeye 07 Ağustos 2018 tarihinde son verilmiştir.

3.2.6. II. deneme için eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi

İlk denemede elde edilen veriler dikkate alınarak ikinci deneme 17 Eylül 2018 tarihinde tekrardan kurulmuştur. İlk denemedeki eksplant kaynağı olarak kullanılan Katran ardıcı (*J. oxycedrus*)'ın olgunlaşmamış meyveleri I. deneme için toplanan lokasyondan 17 Eylül 2018 tarihinde tekrar toplanmış, olgunlaşmamış meyvelere I. denemedeki sterilizasyon protokolü uygulanarak steril eksplantlar elde edilmiştir.

I. denemeden farklı olarak II. denemede Katran ardıcı (*J.oxycedrus*)'nın olgunlaşmamış meyvelerinin embriyogenik kotiledonları penset ve bistüri yardımıyla çıkarılarak eksplant kaynağı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Bu embriyogenik kotiledonlar için de yine 3 farklı temel besin ortamı (MS, DKW ve WPM) ve 6 farklı büyümeyi düzenleyici madde (BDM) yer aldığı 18 farklı kombinasyonda ve 5'er tekerrür halinde besin ortamları hazırlanmıştır.

Embriyogenik kotiledonların yanı sıra I. denemedeki gibi olgunlaşmamış meyvelerden elde edilen ekplantlardan dikim için hazırlanmıştır (Şekil 3.6). Her iki eksplant için hazırlanan besin ortamlarına; katılaştırıcı olarak gelrite (2,1 g/L), organik madde kaynağı olarak L-glutamin (500 mg/L) ve sakkaroz (30 g/L) ilave edilmiş ve ortamın pH'sı 5,7'ye ayarlanmıştır. Tüm ortamlara aynı zamanda 1 ml/L PPM (Plant Preservative Mixture^{TM}-Plant Cell Technology) ilave edilerek olası bir kontaminasyonun önüne geçilmeye çalışılmıştır (Sezgin 2018).



Şekil 3.5 Embriyogenik kotiledonların besin ortamına dikimi

3.2.7. II. deneme için eksplantların alt kültürlere alınması

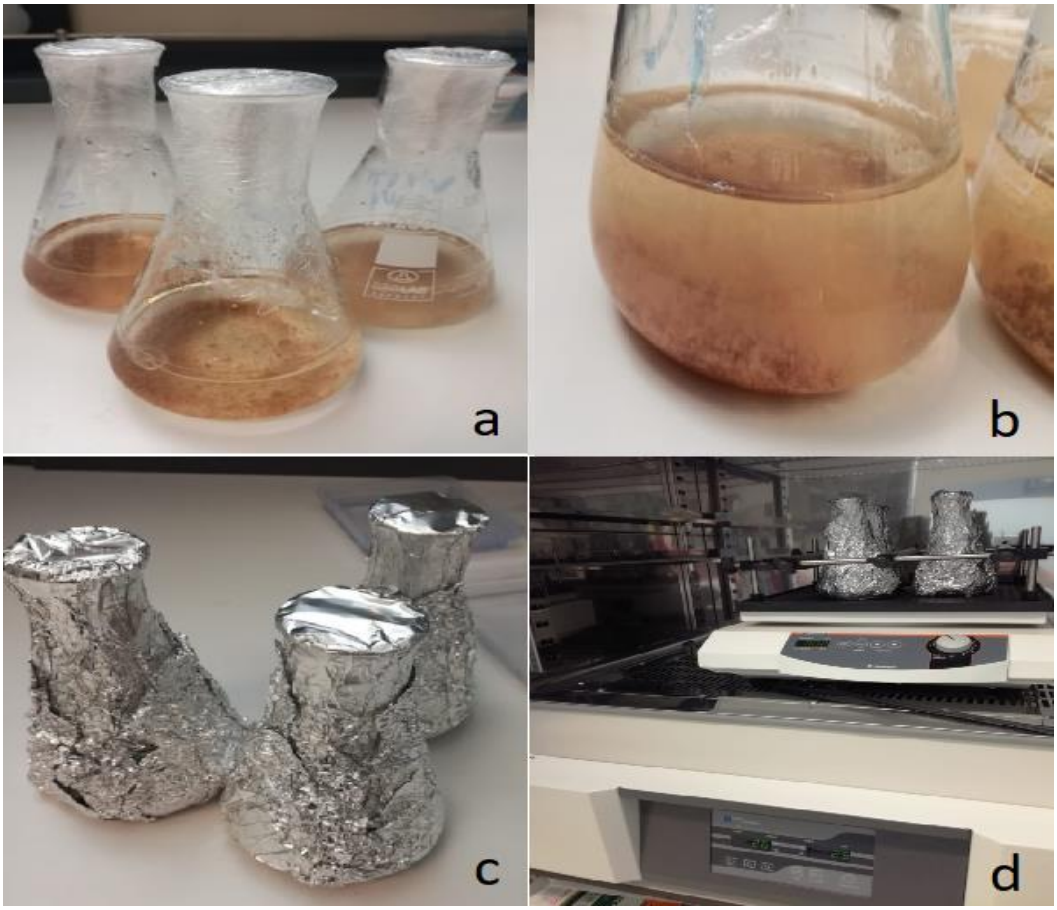
06 Ekim 2018, 07 Kasım 2018, 07 Aralık 2018, 18 Ocak 2019 tarihleri olmak üzere kültürler 4'er haftalık periyotlarda 4 kez daha alt kültüre alınmıştır. *J. oxycedrus*'un olgunlaşmamış meyvelerinin embriyogenik kotiledonlarının eksplant kaynağı olarak denemede kallus ve herhangi bir doku gelişimi gözlenememiş ve bu denemeye 07 Aralık 2018 tarihinde son verilmiştir.

20 Şubat 2019 tarihinde *Juniperus oxycedrus*'un olgunlaşmamış meyvelerinin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde ise MS ve WPM temel besin ortamlarında kallus oluşumu ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyolar (PEM-Proembriyonic masses)

gözlenmiştir. Oluşan kallus dokularından ve embriyogenik kütlelerden somatik embriyogenesisi teşvik etmek ve mevcut kallusların miktarını artırmak amacıyla süspansiyon kültürü denenmiştir.

Süspansiyon kültürü için; steril haldeki erlenmayer kaplarına içine 100'er ml sıvı haldeki MS, DKW ve WPM besin ortamı ve büyüme düzenleyici madde kombinasyonları ve L glutamin (500 mg/L) ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ortamlara bu dokular eşit olarak aktarılmıştır. Ortamlar karanlık şartlarda, 25°C'de sabit ısıda, 110 rpm/dakika hızda çalkalayıcı yardımıyla sürekli çalkalanmıştır. Bu işlem 30 gün boyunca devam etmiş ve her gün kontrol edilmiştir.

Sıvı besin ortamındaki kallus dokuları ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyolar 30 günde hacimce ve miktarca artış göstermiştir. Dokuların gelişimini sürdürmesi için içerisinde büyüme düzenleyici madde bulunmayan MS, DKW, WPM besin ortamlarına Gelrite (2,1 g/L) ve L glutamin (500 mg/L) eklenerek tekrar yarı katı ortama alt kültürleri yapılmıştır. Denemeler 25±1 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde 4'er haftalık periyotlarla alt kültürlere alınmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.6 Sıvı kültür ortamları a-b) sıvı besin ortamındaki kallus dokuları ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyolar c) sıvı besin ortamlarının karanlık koşullarda bekletilmesi d) sıvı besin ortamındaki kallus dokuları ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyoların 25°C'de sabit ısıda, 110 rpm/dakika hızda çalkalanması

Kallus dokularından somatik embriyogenesis uyarımı ve ön oluşum aşamasındaki somatik embriyoların gelişimlerinin hızlandırılması amacıyla 05 Mayıs 2019 tarihinde sakkaroz miktarı 30 g/L'den 40 g/L'ye çıkarılmıştır (Hatipoğlu 1999). Besin ortamındaki bu değişiklik için 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde kallus dokusu artışı veya somatik embriyo oluşumuna neden olmadığı anlaşılmıştır.

09 Haziran 2019 tarihinde kallus dokusunun yaşlanması, fenolik oksidasyona bağlı kararmalar ve somatik embriyo oluşmaması nedeniyle denemelere son verilmiştir.

3.2.8. Verilerin istatistiksel analizi

Bu çalışmada denemelerin tamamı “Tesadüf Parselleri Deneme Deseni” ne göre kurulmuştur. Denemelerden elde edilen verilerin ortalaması varyans analizi yöntemi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma testine göre MSTAT 5.4 istatistik analiz paket programı kullanılarak kontrol edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Somatik Embriyo Oluşumu

Çalışmada hedeflenen ve sürgün ucu kültürü gibi diğer *in vitro* tekniklerin başarılarının sınırlı olduğu odunsu türlerde zigot orijinli yoğun klonal çoğaltım için çok uygun olan ve özellikle olgunlaşmamış tohumlardan başarıyla elde edilebilen somatik embriyolar *Juniperus oxycedrus*'un olgunlaşmamış meyvelerinden elde edilememiştir. Bu doğrultuda somatik embriyo oranı (SEO) ve ortalama somatik embriyo sayısı (OSES) gibi veriler hesaplanamamıştır.

4.2 Kallus Oluşumu

Çalışmada somatik embriyoların uyarılamamasından sonra eksplantların üzerinde meydana gelen kallus dokusuna ait veriler toplanarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla eksplantların tamamı değerlendirilmiş ve üzerinde kallus dokusu meydana gelenlerin başlangıç ortamına dikilmiş olan toplam eksplant sayısına oranlanması ve sonucun 100 ile çarpılması kallus oluşturma oranı (%) bulunmuştur. Kallus oluşturmuş eksplantların sayısı, uygulamadaki tüm eksplant sayısına bölünmesi ile adet/ kallus eksplant olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Temel besin ortamlarına göre kallus oranı (%) ve ortalama kallus sayısı

Besin Ortamları	Eksplant sayısı	Kallus oluşturan eksplant sayısı	Ortalama kallus sayısı	Kallus oluşturma oranı
1. MS	300	128	0,4	%43
2. DKW	300	85	0,3	%28
3. WPM	300	221	0,7	%82

Juniperus oxycedrus'un olgunlaşmamış meyvelerinden kallus oluşum oranı üzerine "temel besin ortamı x büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonu" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P \leq 0.05$).

En yüksek kallus oluşum oranı WPM besin ortamı ile 3 no'lu KIN (2 mg/L) + NAA (0,5 mg/L) büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonunda ve 6 no'lu BA (1 mg/L) + KIN (2 mg/L) + IBA (0,1 mg/L) büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonunda elde edilirken, DKW besin ortamı x 2 no'lu BA (1 mg/L) + IBA (0,1 mg) büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonunda en düşük miktarda kallus meydana gelmiştir. Temel besin ortamı x Büyüme düzenleyici madde kombinasyonu interaksiyonlarına ait kallus oluşum verileri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

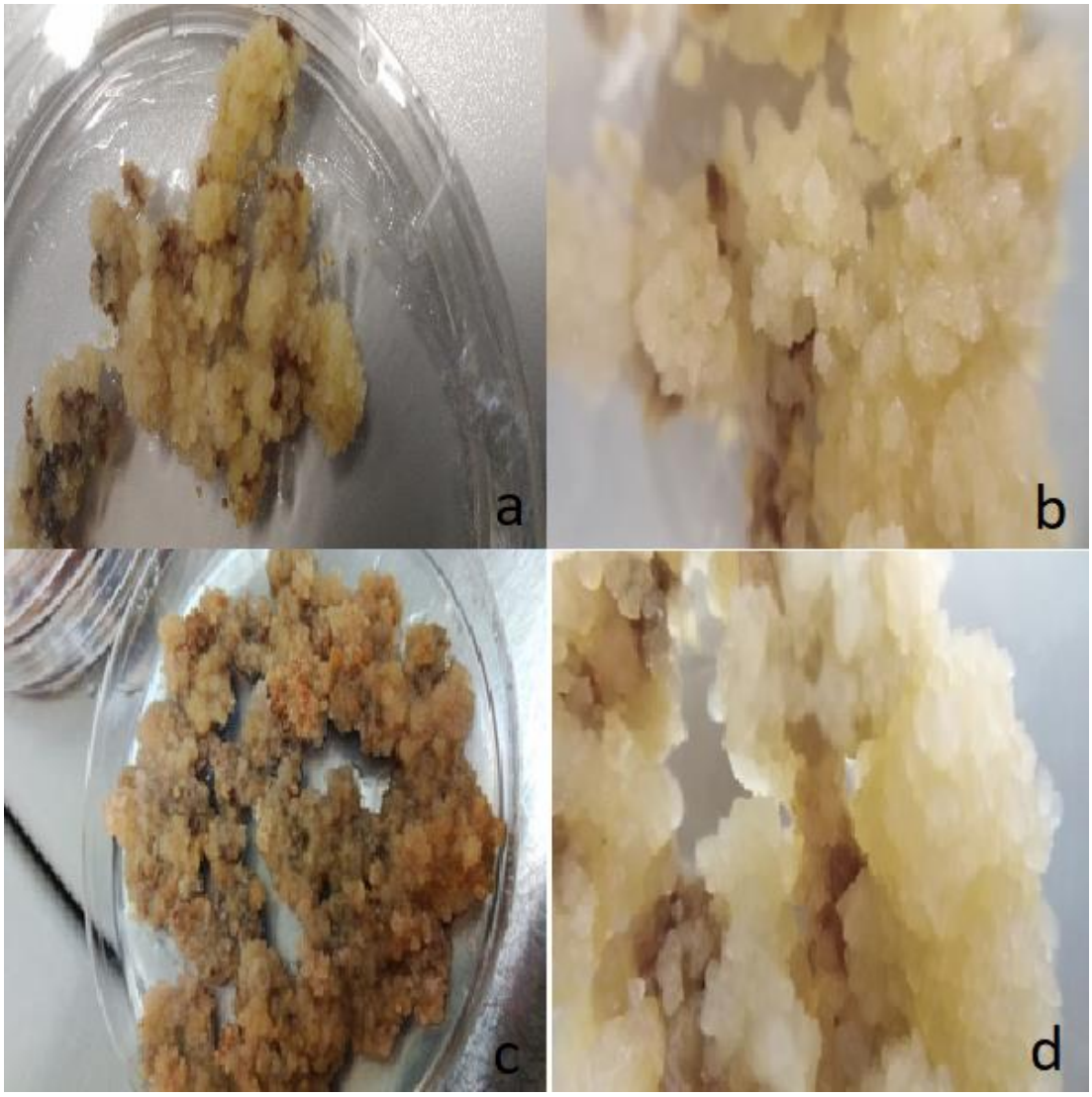
Çizelge 4.2 Temel besin ortamı x büyümeyi düzenleyici madde kombinasyon interaksiyonu ($P \leq 0.045$)

Büyüme Düzenleyici Kombinasyonları	Besin Ortamları		
	MS	DKW	WPM
1. BA (1 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	4,500 ab*	3,000 def	3,200 cde
2. BA (1 mg/L) + IBA (0,1 mg)	1,900 fg	1,200 g	3,200 cde
3. KIN (2mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	2,800 def	2,700 ef	5,000 a
4. KIN (2 mg/L) + IBA (0,1 mg/L)	2,600 ef	3,200 cde	3,900 abcd
5. BA (1 mg/L) + KIN (2 mg/L) + NAA (0,5 mg/L)	4,200 abc	3,500 bcde	4,400 ab
6. BA (1 mg/L) + KIN (2 mg/L) + IBA (0,1 mg/L)	2,300 ef	2,400 ef	4,800 a

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

Besin ortamlarında en iyi kallus oluşumunun sırasıyla Woody Plant Medium (WPM), Murashige ve Skoog (MS) ve Driver ve Kuniyuki Walnut (DKW) olarak gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonlarında ise WPM besin ortamı ile en iyi sonuca 3 no'lu KIN (2 mg/L)+NAA (0,5 mg/L) ve 6 no'lu BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+IBA (0,1 mg/L) kombinasyonlar ile ulaşırken yine aynı kombinasyonlar diğer temel besin ortamları ile buna yakın sonuçlara ulaşamamışlardır. MS besin ortamı ile 1 no'lu BA (1 mg/L)+NAA (0,5 mg/L) ve 5 no'lu BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+NAA (0,5 mg/L) kombinasyonların etkili olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *J.oxycedrus* eksplantlarından elde edilen kalluslar a-b) WPM temel besin ortamı 3 no'lu KIN(2mg/L)+NAA(0,5 mg/L) bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu bulunan ortamdaki kallus dokuları c-d) MS temel besin ortamı 1 no'lu BA(1 mg/L)+NAA(0,5 mg/L) bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu bulunan ortamdaki kallus dokuları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, doku kültürü tekniklerinden olan somatik embriyogenesis yöntemi ile *Juniperus oxycedrus*(Katran ardıcı)'un olgunlaşmamış meyvelerini eksplant olarak kullanarak yoğun bir klonal çoğaltım hedeflenmiştir. Bunun için, değişik dozlarda ayarlanmış bitki büyüme düzenleyiciler ve organik madde içeren farklı besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan, direkt ya da indirek somatik embriyo oluşumunun sağlanması ve bu embriyoların sürgün ve kök rejenerasyonun gerçekleştirilerek, rejenere olan bitkilerin aklimitizasyonu amaçlanmıştır.

Çalışma boyunca gerçekleştirilen deney ve gözlemlerde, doku kültürü ortamında bulunan uygun besin ve büyüme düzenleyici kombinasyonu ile direk ve indirekt somatik embriyogenesis ve kallus oluşumu sağlanmaktadır. Eksplantlar üzerinde direk somatik embriyo oluşumu elde edilememiştir. Bunun yanı sıra meydana gelen kallus dokusu da somatik embriyoya dönüşememektedir. Bunun temel nedeninin; Şimşek (1993), Ürgenç (1998), Gültekin ve Gültekin (2006), Gomez and Segura (1996), Helmersson and Von Arnold (2009), Koçer *et al.* (2011)'unda çalışmalarında belirtildiği üzere meyvenin yapısında bulunan ve çimlenme engeli meydana getirdiği düşünülen, kolin grubu bir bitki sekonder metaboliti olan "blastakolin" maddesinin varlığı olabileceği kanısına varılmıştır.

J.oxycedrus'un olgunlaşmamış meyveleri doğal yaşam döngüsü içinde incelendiğinde; tohumun meyve, kabuk ve embriyo kaynaklı çimlenme engelini aşması için ortalama 2 yıllık bir zamana ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle aynı ağaç üzerinde farklı zamanlarda tohumlar oluştuğundan tohum toplama zamanı da eksplant kaynağının seçilmesi açısından önem kazanmaktadır. *J. oxycderus* L. için en uygun tohum toplama zamanın Haziran-Ağustos ayları olduğu yapılan araştırmalarda anlaşılmıştır (Gültekin ve Bayav 2005).

Yapılan çalışmaya benzer olarak Gomez and Segura (1996) *J.oxycedrus*'un yetişkin bireylerin sürgün uçlarını eksplant kaynağı olarak kullandıkları denemelerde Murashige and Skoog (MS), Schenk and Hildebrandt (SH), Gressoff and Doy (GD) ve Heller (H)

besin ortamlarına BA'nın 0, 0,01 veya 0,1 mg/L dozlarını tek başına ya da 0,01 mg/L indolasetik asit (IAA) ile birlikte kombinasyonlarını kallus uyarımı için denemişlerdir. Oluşan embriyogenik kallusların bitkiye dönüşüm oranının %7-10 arasında oldukça düşük bir oranda gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Eksplant kaynağı olarak *J. oxycedrus*'un olgun bireylerinin sürgün uçlarından alınan yaprakların kullanıldığı çalışmada, SH besin ortamına 0,1 mg/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 100 mg/L kazein hidrolizat eklendiğinde kallus dokusu uyarılarak embriyogenik doku oluşumu %18 oranında olmuştur (Gomez and Segura 1996). Ancak embriyoların hiçbiri bitkiye dönüşmemiştir. Araştırmacılar ayrıca yaprak dokusundan meydana gelen kallus dokusunun hücre kültürü çalışmaları için uygun bir materyal olmasına karşın, somatik embriyogenesis ve embriyolardan bitki rejenerasyonu için uygun olmadığını vurgulamışlardır.

Juniperus oxycedrus'un olgunlaşmamış tohumlarından elde edilen kalluslar doku kültürü çalışmalarında birçok deneme için uygun bir kaynaktır. Elde edilen kallus dokularından somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu için Blastakolin maddesinin tohumun etli dokularından uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, tohumlar çimlenme açısından en verimli olduğu Haziran–Ağustos döneminde toplanmalıdır. Olgunlaşmamış tohumların sterilizasyonu yapılırken, etil alkol uygulaması ya da suda kaynatmak, çeşitli konsantrasyonda sülfürik asit, sitrik asit ve hidrojen peroksit ile mekanik aşındırma işlemi blastakolin maddesinin bir kısmının dokulardan uzaklaşmasını sağlayacaktır.

Çalışmada eksplantlar üzerinde, Woody Plant Medium (WPM) besin ortamında 3 no'lu bitki büyüme düzenleyici madde kombinasyonu KIN (2 mg/L)+NAA (0,5 mg/L) veya 6 no'lu BA (1 mg/L)+KIN (2 mg/L)+IBA (0,1 mg/L) büyüme düzenleyici madde kombinasyonu içeren ortama, katılaştırıcı olarak gelrite (2,1 g/L), organik madde kaynağı olarak L-glutamin (500 mg/L) ve sakkaroz (30 g/L) ilave edilerek pH'sı 5,7'ye ayarlanmalı ve karanlık koşullarda 4 hafta süre ile başlangıç aşamasında kültüre alınmalıdır. İlk alt kültürde, başlangıçtaki büyüme düzenleyiciler olmadan aynı besin ortamında ve karanlık şartlarda inkübe edilerek bol miktarda kallus dokusu elde

edilebilmektedir. Bu yoğun miktarda üretilen kallus dokusu da farklı *in vitro* çalışmalarda kullanılabilir.

TÜBİTAK tarafından hazırlanan Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesinde de (Anonim 2011), sürdürülebilir kalkınma hedefi doğrultusunda, "Gen kaynaklarının karakterizasyonu, muhafazası ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik teknolojiler geliştirebilmek" hedefi belirtilmiştir. Bu çalışmada, ormancılık ve peyzaj alanında büyük bir öneme sahip olmasının yanı sıra IUCN tarafından yok olma tehlikesi altında en az endişe verici (least concern, LC) bitkiler listesine alınan Katran ardıcı (*Juniperus oxycedrus*)'nda, olgunlaşmamış tohumlardan somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu çalışması birçok deneme ile yapılmaya çalışılmış ancak bitkinin içsel ve fizyolojik engellerinden kaynaklı sorunlar yüzünden hedeflenen seviyede başarılamamıştır. Ardıç, Türkiye'deki toplam orman alanlarının %2,7'sinde bulunmakta olup artan nüfus, aşırı otlatma ve aşırı tüketim ile birlikte miktarı giderek azalmaktadır. Bu çalışmada, Katran ardıcı (*Juniperus oxycedrus*) bitkisinin neslinin devam ettirilmesi amacıyla atılmış olan bir adım vardır. Bu konuda ileride yapılması planlanan çalışmalara ışık tutulacaktır.

KAYNAKLAR

Acartürk, R. 1996. Şifalı Bitkiler Flora ve Sağlığımız (1.Basım). Ankara: OGM Mensupları Yardımlaşma Vakfı Yayınları.

Adams, R.P. and Hagerman, A. 1977. Diurnal variation in the volatile terpenoids of *Juniperus scopulorum* (Cupressaceae). American Journal of Botany, 64(3), 278-285.

Anonim, 2011. Ulusal Gıda Ar-Ge ve Yenilik Stratejisi Ek-3 https://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/ek3_ulusal_gida_arge_yenilik_stratejisi.pdf. Erişim Tarihi:05.10.2019.

Anşin, R. ve Özkan, Z.C. 1997. Tohumlu Bitkiler (2.Basım). Trabzon: KTÜ Orman Fak.Yay. No: 19.

Aygun, A., San, B., Dumanoglu, H. and Celik, M. 2006. Propagation by mound layering of some selected 'SO' quince genotypes (*Cydonia oblonga*) as a compatible rootstocksfor pears (*Pyrus communis*), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 34,191-193.

Baytop, T. 1984. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi (1.Basım). İstanbul: İ.Ü. Yayınları, Yayın No: 3255.

Baytop, T. 1999. Türkiye'de Tıbbi Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün) (İlaveli 2. Baskı). Ankara:Nobel Tıp Kitapevleri.

Castro,M.,Belo A.F., Afonso, A. and Zavattieri M.A. 2011. Micropropagation of *Juniperus navicularis*, an endemic and rare species from Portugal SW coast, Plant Growth Regul (2011), 65;223–230

Dığrak M., İlçim A. and Alma M.H. 1999. Antimicrobial activities of several parts of Pinus brutia, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. Phytotherapy Research, 13, 584–587.

Dumanoglu, H. 2000. Desiccation using saturated salt solutions and improvement germination rate of walnut (*Juglans regia* L.) somatic embryos, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24, 491-498.

Erenler, R. 1997. Yüksek Ardıç (*Juniperus excelsa* Bieb.)'ın Meyvelerindeki Bileşiklerin İzolasyonu, Yapı Tayini ve Aktivite Testleri. Tokat: Gaziosmanpaşa Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (yayımlanmamış).

Farjon, A. 2013. *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T16347367A16348080.

Gültekin, H.C. ve Gültekin, Ü.G. 2006. Türkiye ardıç türlerinin (*Juniperus* L.) silvikültür teknikleri, Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü DOA Dergisi 12, 38-65.

Gültekin C. ve Bayav A. 2005. Bodur Ardıç (*Juniperus communis* L. subsp. *nana syme*.), Diken Ardıç (*Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*) ve sabin ardıçta (*Juniperus sabina* L.) tohumların çimlenmesi üzerine farklı ekim zamanlarının etkisi, Kafkas Üniversitesi Artvin Orman Fakültesi Dergisi 6 (1-2);102-112

Gürkan, E. 2003. Bitkisel Tedavi (1.Basım). İstanbul: Marmara Üniversitesi Yayınları, No:699, Fak.Yayın No:19.

Gómez M.P. and J. Segura. 1994. Factors controlling adventitious bud induction and plant regeneration in mature *Juniperus oxycedrus* leaves cultured in vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol. 30,210--218.

Gómez M.P. and J. Segura. 1996. Morphogenesis in leaf and single-cell cultures of mature *Juniperus oxycedrus*. Tree Physiology 16, 681--686

Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi (2.Basım). Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Genel Yayın No:190.

Helmersson A. and Von Arnold S. 2009. Embryogenic cell lines of *Juniperus communis*; easy establishment and embryo maturation, limited germination.Plant Cell Tissue and Organ Culture 96, 211‑217.

Kaya, Z. and Raynal D.J. 2001. Biodiversity and conservation of Turkish forests. Biological Conservation 97 (2001); 131-141

Koçer A.Z., Gözen G.A., Önde S. and Kaya Z. 2011. Indirect organogenesis from bud explants of *Juniperus communis* L.: Effects of genotype, gender, sampling time and growth regulator combinations . Dendrobiology. Vol 66,33-40

Koç, T. 2002. Bitkilerle Sağlıklı Yaşam (1.Basım). Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları.

Lloyd, G. and McCown, B.H. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proceedings International Plant Propagators' Society, 30,421-427.

Loureıro, L. Capelo, A., Brıto, G., Rodrıguez, E., Silva, S., Pinto, G. and Santos C., 2007. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry, Bıologıa Plantarum 51 (1); 7-14.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Phsiologia Plant,15,473-497.

Öner, N. ve İmal, B. 2006. Bülbülpınarı (Eldivan-Çankırı) yöresi meşcere kuruluşları üzerine araştırmalar. Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, A(2); 67-79.

Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak, C. 2002. Somatik Embriyogenesis. Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.

Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A., Pannecouque C.,Witvrouw, M. and De Clercq E. 2002. Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Badia*. Journal of Ethnopharmacology, 81 (2002); 129-134.

Sezgin, M. 2018. In vitro propagation of *Quercus pubescens* Willd. (Downy Oak) via organogenesis from internodes. Fresenius Environmental Bulletin, 27(7/2018);5163-5172.

Sezgin, M. and Dumanoğlu, H. 2014. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 50(1); 58-68.

Steward, F.C., Mapes, M.O. and Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cell. American Journal of Botany 45, 705-708.

Şan, B. and Dumanoglu, H. 2006. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of apomictic and non-apomictic seeds in walnut (*Juglans regia* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 30,111-117.

Şan, B., Sezgin, M., Dumanoğlu, H. and Köksal, A. İ. 2007. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of some European chestnut (*Castanea sativa Mill*.) cultivars. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 31,175-179.

Şimşek, Y. 1993. Orman Ağaçları Islahına Giriş (1.Basım). Ankara: Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları.

Tulecke, W. and McGranahan, G. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut (*Juglans regia* L.). Plant Science, 40,57-63.

Tümen, İ. ve Hafızoğlu, H. 2003.Türkiye'de yetişen ardıç (*Juniperus* L.) türlerinin kozalak ve yaprak uçucu yağlarının bileşiminde bulunan terpen grupları. ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 5, 88-95.

Ürgenç, S.İ. 1998. Ağaç ve Süs Bitkileri Fidanlık Yetiştirme Tekniği (2. Basım). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları No:442.

Yaltırık, F. ve Efe, A. 2000. Dendroloji Ders Kitabı (2.Basım). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayın No: 4265.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa KAHYA

Doğum Yeri : Konya

Doğum Tarihi : 23.09.1979

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Burç Mah. Yenimahalle / ANKARA

Tel : 0530 932 23 80

E-posta : mkahya50@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mustafa Kemal Lisesi Yenimahalle / Ankara (1993-1996)

Ön Lisans : Anadolu Üniversitesi / Açık öğretim Fakültesi / Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü / Tarım Programı (2018-)

Lisans : 1. Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Kamu Yönetimi (2002-2006)
2. İstanbul Üniversitesi Açık ve Uzaktan Öğretim Fakültesi Coğrafya Bölümü (2012 – 2016)

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım ve Yaşam Bilimleri (2017-)

Çalıştığı Kurum / Kurumlar ve Yıl

1998- İçişleri Bakanlığı

Yayınları (SCI ve diğer)

1. Sözlü sunum;
Kahya M. and Sezgin M. 2017. Bitki Hormonları (Phytohormones). Conference: International Conference on Multidisciplinary, Science, Engineering and Technology (IMESET'17) at Bitlis/ Turkey - Nov 30, 2017

2. Makale:
Sezgin M. and Kahya M. 2018. Phytohormones. Bitlis Eren University Journal of Science and Technology, 8 (1), 35-39.

3. Poster sunum:
Kahya M. and Atikmen Çiçek N. 2018. The Regenerative Effect of Vermicompost in Sustainable Soil Concept, Conference: Internatıonal Congress on Agriculture and Animal Sciences (ICAGAS), 2018 at Antalya/ Turkey 7-9 November 2018.

4. Sözlü sunum:
Kapdan E., Sezgin M. ve Kahya M. 2019. Ardıç *(Juniperus* L.*)* türlerinin halk arasında ve Modern Tıp'ta hastalıkların tedavisinde kullanımı.2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian BioChem 2019) June 28-29, 2019 / Ankara, Turkey.

5. Sözlü sunum:
Kahya M., Atikmen Çiçek N. 2019. Evaluation of plant development according to CIE-Lab color space system parameters, Conference: Muş Ovası Uluslararası Tarım Kongresi , 2019 at Muş / Turkey 24 -27 September 2019.

6. Sözlü sunum:
Karakaya Y., Atikmen Çiçek N. ve Kahya M. 2019. Evaluation of Ankara Keçiören Kanuni semt park in terms of Soil and plant properties, Conference: Muş Ovası Uluslararası Tarım Kongresi ,2019 at Muş / Turkey 24 -27 September 2019