T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İÇ MEKAN SÜS BİTKİSİ OLARAK KULLANILAN *CITRUS SPP.* TÜRLERİ ANACI '*PONCIRUS TRIFOLIATA* L.' *NIN İN VİTRO* ÇOĞALTIMI

Elif SUBAŞI SEVİNÇ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

Prof. Dr. Bekir Erol AK danışmanlığında, Elif SUBAŞI SEVİNÇ' in hazırladığı **"İç Mekan Süs Bitkisi Olarak Kullanılan *Citrus Spp.* Türleri Anacı '*Poncirus Trifoliata* L.' nın *İn Vitro* Çoğaltımı"** konulu bu çalışma ……. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Bekir Erol AK ……

Üye : ……

Üye : ……

Bu Tezin Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAP Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 21096

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iiv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
3. MATERYAL ve YÖNTEM 8
3.1. Materyal 8
3.2. Yöntem 9
3.2.1. Bitki materyalinin (eksplant) yüzeysel sterilizasyonu 9
3.2.2. Besin ortamı, alet ve ekipmanların sterilizasyonu 10
3.2.3. Kültür şartları 11
3.3. Eksplantların Kardeşlenme Ortamında Kültüre Alınması 12
3.5. Köklendirme 15
3.6. Dış Ortama Alıştırma 18
3.7. İstatistiksel Değerlendirme 20
4.ARAŞTIMA BULGULARI ve TARTIŞMA 21
4.1. Bitki Materyalinin Yüzeysel Sterilizasyonu 21
4.2. Eksplantların Sürgün Gelişimi ve Kardeşlenme 22
4.2.1. Sürgün ucu 22
4.2.2. Kardeşlenmiş eksplanlar 23
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 26
KAYNAKLAR 29
ÖZGEÇMİŞ 31

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İÇ MEKAN SÜS BİTKİSİ OLARAK KULLANILAN *CITRUS SPP.* TÜRLERİ ANACI '*PONCIRUS TRIFOLIATA,* L.' NIN İN VİTRO ÇOĞALTIMI

Elif SUBAŞI SEVİNÇ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bekir Erol AK
Yıl:2022, Sayfa:31

Yapılan bu çalışmada, turunçgillerde kullanılan başlıca anaçlardan biri olan üçyapraklı portakal da denilen *Poncirus trifoliata* L. anacının *in vitro* çoğaltım protokolü oluşturulmuştur. Eksplant kaynağı olan bitkiye ait tek gözlü boğum parçalarının farklı konsantrasyonlarda (0.5-1.0-2.0 mg/l) BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Daha sonra 1.0 mg/l BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda sürgün oluşumu ve kardeşlenme görülmüştür. Sürgünler köklendirilmek amacıyla 500 mL/l NAA ve 500 mL/l IBA içeren MS besin ortamında yeni bir kültüre aktarılmıştır. Köklendirme ortamında %30 oranında köklenme elde edilirken, köklü bitkiciklerin % 62 si dış koşullara alıştırılabilmiştir

ANAHTAR KELİMELER: *in vitro*, süs bitkisi, çoğaltma, *Poncirus trifoliata* L., doku kültürü

ABSTRACT

MSc Thesis

IN VITRO PROPAGATION OF '_PONCIRUS TRIFOLIATA_, L.' USED AS ROOTSTOCK FOR _CITRUS SPP_. IN INDOOR ORNAMENTAL PLANT

Elif SUBAŞI SEVİNÇ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department Of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Bekir Erol AK
Year: 2022, Page:31

In this study, an *in vitro* propagation protocol of *Poncirus trifoliata* L. rootstock, which is also called trifoliate orange, which is one of the main rootstocks used in citrus, was created. Monocular node parts of the plant that is the source of explant were cultured in MS nutrient medium containing BAP at different concentrations (0.5-1.0-2.0 mg/l). Afterwards, shoot formation and tillering were observed in explants cultured in MS nutrient medium containing 1.0 mg/l BAP. The shoots were transferred to a new culture in MS nutrient medium containing 500 mL/l NAA and 500 mL/l IBA for rooting. While 30% rooting was achieved in the rooting medium, 62% of the rooted plantlets were acclimated to external conditions.

KEY WORDS: *in vitro*, ornamental plants, propagation, *Poncirus trifoliata* L., tissue culture

TEŞEKKÜR

İç Mekân Süs Bitkisi Olarak Kullanılan *Citrus spp.* Türleri anacı '*Poncirus trifoliata* L.' nın *İn Vitro* Çoğaltımı" isimli yüksek lisans bitirme tezimin konusunun seçilmesi, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında destek ve yardımını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bekir Erol AK ve sayın Dr. İbrahim Halil HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmalar sırasında çok emeği geçen ve bana destek olan, Arş. Görv. Heydem EKİNCİ'ye Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans öğrencisi Necla ŞAŞKIN'a teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmanın bütün aşamalarında maddi ve manevi anlamda sonsuz destek sunan ve beni hiçbir koşulda yalnız bırakmayan sevgili eşim Mustafa Selçuk SEVİNÇ ve çok kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Donör bitkinin ağustos ayındaki görünümü 8
Şekil 3.2. Donör bitkiden alınan sürgünlerin görünümü 8
Şekil 3.3. Sterilizasyon sonrası eksplantların görünümü 10
Şekil 3.4. Steril kabinde kültüre alma çalışmaları 11
Şekil 3.5. Kültüre alınmış eksplantlar 13
Şekil 3.6. Kültüre alınmış eksplantların iklim odasındaki görünümü 13
Şekil 3.7. Alt kültüre alınmış eksplantlar 14
Şekil 3.8. Kardeşlenme gerçekleşmiş eksplantların görünümü 15
Şekil 3.9 Yaprak döken eksplantlar 16
Şekil 3.10. Kallus oluşmuş eksplantlar 17
Şekil 3.11. Köklenen eksplantlardan görünüm 18
Şekil 3.12. Köklenmiş eksplantların dış ortama alıştırılması görüntüleri 19
Şekil 3.13. Köklenmiş eksplantlardan kök uzunluklarının ölçülmesi görüntüleri 20
Şekil 4.1. Kardeşlenmeden ayrılmış eksplantlarından sürgün gelişimi 24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Köklendirme ortamı içerikleri 15
Çizelge 4.1. Farklı Bap konsantrasyonlarındaki eksplant gelişimi çizelgesi 23
Çizelge 4.3. Farklı köklendirme konsantrasyonlarındaki eksplant gelişimi çizelgesi 24
Çizelge 4.2. Farklı besi ortamı konsantrasyonlarındaki eksplant gelişimi çizelgesi 25

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic asid
AP	Almehdi ve Parfitt besin ortamı
Atm	Atmosfer
BA	Benziladenin
BAP	6-Benzilaminopurin
BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
dk	Dakika
GA_3	Giberellik asid
HCl	Hidroklorik asid
$HgCl_2$	Civaklorür
IAA	İndol-3-Asetik Asit
IBA	İndol butirik asid
mM	Milimol
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	Naftalen asetik asid
NaOCl	Sodyumhipoklorit
NaOH	Sodyumhidr oksit
mg/dm^3	Miligram/Desimetreküp
FA	Ferulic asit

1.GİRİŞ

Besin değeri oldukça yüksek olan, aynı zamanda yüksek üretim potansiyeli bulunması sebebiyle yaygın olarak yetiştirilen önemli meyve grupları arasında olan Turunçgillerin tür ve çeşit zenginliğine sahip olması, meyvelerinin uzun dönemde olgunlaşması ve olgunlaşan bu meyvelerini ağaç üzerinde bekletilebilmesi bu meyve grubunun önemini artırmaktadır. Dünya genelinde tercih edilmesine de sebep olmaktadır (Şimşek ve ark., 2018). Turunçgiller birçok farklı alanda tercih edilen meyvelerdir. Örneğin; ticari olarak meyve suyu yapımında oldukça sık rastlanılan meyve grubu olma özelliğini taşımaktadır. Sağlık açısından da yüksek değeri olan, taze ya da kurutulmuş haliyle tüketilen meyve grupları içerisindedir. Bunun dışında, kabukları kullanılarak şekerleme yapılabilmekte ya da hayvan yetiştiriciliğinde yem olarak kullanılabilmektedir. Aromaları parfümeri sektöründe ve sabun üretiminde kullanılabilmektedir. (Iqbal ve ark., 2019).

Üç yapraklı anacı dünyada yetiştiriciliği yapılan önemli turunçgil anaçlarından biridir. Turunçgil kök ur nematodu, Citrus Tristeza Virüsü ve Phytophthoraya tolerans gösterdiği, düşük sıcaklıklara karşı da fazlasıyla toleranslı olduğu söylenmektedir (Jiang vd. 2006). Ülkemizde Karadeniz iklimi görülen bölgeler içerisinde bulunan özellikle Kuzeydoğu Ege, Doğu Karadeniz bölgelerinde *Poncirus trifoliata* anacı tercih edilen neredeyse tek anaç olduğu söylenmektedir. Ayrıca bazı araştırmacılar Geçit Ege bölgesi olarak bilinen Büyük Menderes vadisi bölgesinde turunç bitkisi ve üç yapraklı anacı kullanıldığını dile getirmişlerdir (Tuzcu vd. 2001).

Rutaceae ailesi ve *Citrus* ailesi ile akrabalık ilişkisi olduğu ve hatta bazı kaynaklarda bu aile içerisine dahil edilen bir Turunçgil cinsi olduğundan bahsedilir. Daha önceden bilim adamları bu türü Citrus cinsi olarak kabul etmiştir. Fakat 1838'de ünlü bir botanikçi olan Constantine Rafinesque bu türü; bazı farklılıkları sebebiyle *Citrus* cinsinin türlerinden farklı bir tür olduğu kabul etmiştir. Bunun sonucunda *Poncirus* isminde bir cins oluşturulmuş ve *Poncirus trifoliata* anacı *Poncirus* cinsine dahil edilmiştir. Fakat bu konu ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Çünkü bu

bitkinin *Citrus* ailesindeki diğer türlerle oldukça fazla benzerliği bulunmasına karşın kışın soğukta yapraklarının tamamını dökerek uyku moduna geçmesi ve yaprak özellikleri gibi benzerlikleri de bulunmaktadır.

Poncirus trifoliata, Citrus ailesinin üzerine aşılanabildiği bir türdür. Aynı zamanda *Citrus* ailesinin geri kalan üyeleri ile doğal yollardan veya insan eliyle çaprazlama yoluyla oluşan yeni hibrit türler oluşturabilme özelliğine sahiptir. Diğer turunçgillerden farklı olarak yapraklarını döken ağaçlar gibi uyku periyodunda uzun süre kalmaktadır.

Soğuğa karşı aşırı toleransı bu türün en önemli özelliğidir (Dikenleri sayesinde -25 dereceye kadar dayanıklılık gösterebilmektedir). Ancak sıcak bölgelerde yetiştirildiğinde soğuğa karşı dayanıklığı düşmekte ve soğuğa karşı oldukça hassasiyet göstermektedir. Bu nedenle anaç olarak kullanımı çok sıcak bölgelerde tercih edilmemektedir.

Bu tür ağır-killi topraklara uyum sağlayabilmektedir. Aynı zamanda Nematodlara, turunçgillerdeki cüceleşme hastalığına ve kireçli-tuzlu topraklara karşı duyarlıdır. *Tristeza* (Göçüren), *Phytophthora,* (Uçkurutan), *Psorosis* (Kavlama), *Xyloporosis* (Gözenek) gibi Turunçgillerde görülen hastalıklara karşı dayanıklılık göstermektedir. *Poncirus trifoliata,* üzerine aşılı olduğu bitkinin erken meyveye yatmasına sebep olur ve meyve kalitesi üzerinde olumlu etkiler gösterir. Buna karşın uyumsuzluk gösterdiği turunçgil türleri de vardır: misket limonu (limelar) ve *Eureka* grubu limonlar (ör. Kütdiken) ile anaç olarak çok iyi uyuşmadığı söylenen türlerdir.

Anaç olarak üzerine aşılandığı ağaçları bodurlaştırması sayesinde meyvelerin toplanmasına rahatlık sağlamaktadır. Ve bu bodurlaştığı varyantları dikenli olduklarından çit bitkisi olarak tercih edilebilmektedir.

Uzakdoğuda bulunan ülkelerde geleneksel tıp uygulamalarında alerjik enflamasyona karşı kullanıldığı bilinmektedir. Bu türün farklı çalışmalarda tıbbi yönlerden faydalarına rastlanılmıştır. Bazı *in vitro* çalışmalarında Mast hücrelerinde

meyvelerinden elde edilen ekstrelerinin NF-kappa B aktivitesine engel olduğunu saptamışlardır. *Poncirus trifoliata* dan alınan ekstrenin anti-allerjik, antiviral, antitümör ve anti-enflamentuar olarak kullanılabileceği saptanan bilgiler arasındadır. Su ile hazırlanan 10 hafta süresince bu ekstrelerin uygulandığı fareler üzerinde kilo alımına engel olduğu saptanmıştır (Shin ve ark., 2006).

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitkilerin doku kültürü ile mikroçoğaltım şartlarında daha hızlı üretiminin yapılması, günümüzde birçok bitkide kullanılmaktadır. Meyve türlerinin çoğunun heterozigotik yapıda olması vejetatif yollarla üretimini zorunlu kılmaktadır. Klasik yöntemlerle gerçekleştirilen vejetatif çoğaltmalarda başarı farklı tür ve çeşitlere göre değişiklik göstermekte ve genelde çoğaltım katsayısı düşük olmaktadır. Bitki doku kültürü teknikleriyle *in vitro* tekniği ile çoğaltım, bilinen klasik yöntemlere göre daha hızlı üretim sunmaktadır (Gönülşen, 1987). Daha hızlı üretim yapmak amacı ile kullanılabilecek doku kültürü teknikleri sırasıyla; *somatik embriyogenesis*, sürgün ucu kültürü, *organogenesis* ve meristem olarak sayılabilir (Ak ve Özden, 2007).

Anaç üzerine aşılanan gözlerin uyarılması yöntemiyle çoğaltılan turunçgillerin (*Citrus spp.)* yıllardır bu yötemle ıslah edildiği ve yetiştirildiği yaygın olarak bilinmektedir. Bundan farklı olarak bilinen klasik yöntemler kullanılarak çoğaltım yapılırken karşılaşılan problemli durumlarda ya da daha kısa zaman harcanarak üretim yapmak amacıyla küçük bitki dokularının kullanılmasıyla gerçekleştirilen doku kültürü teknikleri tercih edilmektedir.

Bazı turunçgiller nuseller embriyoni gösterme eğiliminde olduğundan genellikle turunçgillerde *somatik embriyogenesis*in daha avantajlı olduğu söylenmektedir. Ovuller, *embriyogenesis* için gerekli özellikler nuseller embriyoni gösteren genotiplerde çok kolay oluşması için oldukça uygun yapıdadır. Ayrıca, endosperm kallusları (Gmitter ve ark., 1990), usare kesecikleri ve henüz gelişmemiş ovuller (Coelho ve ark., 1998), gövdeye ait parçalar (Chatuvedi ve Mitra, 1975) mikro çoğaltım uygulamalarında kullanılmaktadır. Turunçgil türlerinde klonal varyasyon görülmesine karşın çoğunlukla ana bitkiyle benzerlik gösteren bitkicikler elde

edilebilmektedir. Bununla beraber, kolaylıkla, daha kısa sürede ve sağlıklı turunçgil fidanı üretmek için mandarinlerde in vitro tekniğiyle aşılama başarıyla sonuçlanmaktadır (Parthasaraty ve ark., 1997).

Mikroçoğaltım, bitkilerin yeni bir bitki oluşturma yeteneğine sahip çeşitli yerlerinden alınan dokuların insan eliyle oluşturulmuş besin ortamlarında ve steril koşullarda genetik yapıları benzer birden çok bitki üretilmesi amacıyla tercih edilen doku kültürü ile çoğaltım tekniğidir. Mikroçoğaltımla klasik yöntemlere göre daha kısa sürede, daha küçük bir alanda, dış dünyadaki yetiştirme mevsimine bağlı kalmadan, hastalık riski daha düşük olarak bitki üretimi yapılabilmektedir. Mikroçoğaltım tekniğinin yaygınlaşmasıyla günümüzde bu teknik kullanılarak karanfil, kasımpatı, gladiol, fuchsia gibi farklı süs bitkilerinin ticari amaçla üretimi; yer fıstığı, soğan, brassica, kuşkonmaz, pancar ve çim türleri, nohut türleri, mısır soya gibi bazı otsu ve *Prunus*, *Malus*, *Pyrus*, *Atriplex*, *Ribes*, *Betula* gibi odunsu türlerin ve bazı orman ağaçlarının da (kavak, okaliptüs gibi) üretimi gerçekleştirilebilmekte ve sağlıklı sonuçlar alınabilmektedir (Kozai ve ark. 1997; Nquyen ve Kozai 1998; Hatipoğlu 1999; Mansuroğlu ve Gürel 2001).

Bu çalışmada ülkemizde turunçgillerde anaç olarak kullanılan ve bir çok peyzaj düzenleme çalışmalarında iç mekan düzenlemelerinde süs bitkisi olarak tercih edilen cinsi '*Poncirus trifoliata* L.' in vitro koşullarında çoğaltımı denenmiştir, farklı eksplantlardan sürgün elde edildikten sonra değişik besin ortamı konsantrasyonlarında köklenme yeteneği araştırılmıştır, Böylece üçyapraklı anacının in vitro koşullarında köklenmesi için farklı konsantrasyonlar geliştirilmiştir. Bu anaçla ilgili gelecek yıllarda yapılacak olan in vitro çalışmalarına referans bir kaynak olabilmek amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ali ve Mirza (2006), *Citrus jambhiri Lush*. (Kaba limon) eksplantlarından doku kültürü tekniği ile çoğaltım denemelerinde kallus oluşumunu sağlamak için uygun bulunan ortamın 1.5 mg/l 2,4 D eklenen MS ortamı olduğunu, köklendirme için de 3 mg/l BA eklenen MS ortamı olduğunu tecrübe etmişlerdir.

Amgai ve ark. (2016), çalışmalarında, MS ortamı içerisinde BAP ve IAA içeren 10 farklı hormon düzeyinin ve 4, 8 ve 12 hafta olmak üzere 3 farklı kültür süresinin *C. reticulata Blanco* (mandarin) bitkisinin *in vitro* koşullarında çoğaltımı üzerine etkilerini araştırmışlardır. En başarılı sürgün oluşumunu 0.2 mg/l IAA ve 0.5 mg/l BAP içeren besin ortamı koşullarında elde etmiştir.

Cengiz ve Kaçar (2019), çalışmasında, '*C-35 sitranji*' ve '*Tuzcu 31-31 turuncu'* isimli turunçgil anaçlarının, doku kültüründe geleneksel bilinen katı kültür ve geçici daldırma prensibinin etkisinde Plantform biyoreaktör sistemiyle karşılaştırmalı olacak şekilde mikroçoğaltım ve köklendirme denemelerini yürütmüştür. Turunçgil anaçları üzerinde katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, Murashige, Woody Plant (WPM) ve Skoog (MS) besin ortamlarıyla bitki büyüme düzenleyici olarak da Kinetin (KIN) (0; 0,5; 1,0 mg L-1) , Isopentenyl adenine (2IP) (0; 1,0; 2,0 mg L-1) ve Benzylaminopurine (BAP) (0; 1,0; 2,0 mg L-1) gibi farklı üç konsantrasyon denemiştir. Köklenme denemelerinde; MS, ½ MS, WPM besin ortamlarına Indole-3-butyric acid (IBA) (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L-1) ve Naphthaleneacetic acid (NAA) (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L-1) bitki büyüme düzenleyicilerinin eklendiği farklı konsantrasyonları dahil edilerek incelemiştir. Bu iki genotip arasında daha uygun bulunan mikroçoğaltım sonuçları 2,0 mg L-1 BAP içeren MS besin ortamı ve daha uygun bulunan köklenme sonuçları ise 0,5 mg L-1 NAA içeren ½ MS besin ortamı olmuştur. Mikroçoğaltım denemeleri ve köklenme denemeleri için daha uygun bulunan besin ortamı ile Plantform biyoreaktör sisteminde çalışıldığı söylenmiştir. Plantform sistemi bitki kalitesi açısından bu denemeler sonucunda, bu iki farklı genotipte kardeşlenme ortamında iyi sonuçlar elde edilmiştir. Köklenme amacıyla hazırlanan ortamda ise

Plantform sistemi yine katı kültür besin ortamına nazaran daha avantajlı olduğu gözlemlenmiştir. Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde; SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda herhangi bir gelişimin olmadığını belirlemiştir.

Chamandoosti (2017), *C. latifolia Tan* bitkisinin *in vitro* koşullarında sürgün oluşu ile ilgili araştırma yapmıştır. Yaptığı çalışmada en başarılı sürgün gelişiminin 0.053 uM NAA ve 4.44 uM BA içeren besin ortamında olduğunu gözlemlemiştir. Bitkinin boyu bakımından en başarılı bulunan ortam ise 0.049 uM IBA ve 4.44 uM BA eklenen besin ortamı olmuştur. Yine bu çalışmasında, 9 farklı genotipin köklendirmesinde 1 mg/l NAA ve 1 mg/l IBA'nın etkisini incelemiştir. Köklendirme çalışmalarında ise kökün uzunluğu, kök sayısı ve bitki boyuna ait verileri değerlendirmiştir. Köklendirme çalışmalarında bitkinin boyu ve köklerinin uzunluğunda en etkili büyüme düzenleyici olarak IBA, köklerinin sayısı için ise en etkili büyüme düzenleyici NAA olarak belirlenmiştir.

Grewal ve ark. (1994), Ticari amaçla yetiştirilmesi çok tercih edilmeyen turunçgil türleri içerisinden *C. latipes C. İndica* ve *C. Assamensis* doku kültürü yöntemiyle çoğaltabilmiştir (Baruah ve ark., 1996). Almeida ve ark. (2002), 'Rangpur' laymı ve portakalda epikotil kısımları kullanılarak organogenesis yöntemiyle mikroçoğaltımı başarı ile sonuçlandırmışlardır.

İnceoğlu (2018), çalışmasında, *Carrizo sitranjı*nın doku kültürü koşullarında çimlendirilmiş tohumlarından geliştirilen kök eksplantlarını kullanılarak bitki kökünden elde edeceği bitki rejenerasyonu optimizasyonu hedeflemiş, *Carrizo sitranjı*ndan alınan kök eksplantlarını BA (Benzil amino purin) ve NAA (Naftalenasetik asit)'nın 21 değişik konsantrasyonu eklenen MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı içerisinde kültüre almışlardır. Deneme sonucunda saptanan en iyi kallus oluşumu 1.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA; 0.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA; 1 mg/L BA+1 mg/L NAA; 0.5 mg/L BA; 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA; 2 mg/L BA veya 2.5 mg/L BA+1.5 mg/L NAA eklenen MS ortamlarında

gözlemlenmiştir. Sürgün oluşumunda ise 2 mg/L BA, 0.5 mg/L BA veya 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA eklenen MS besin ortamlarında %100 başarıya ulaşmıştır.

Kurt ve ark. (2009), çalışmasında; *Flying Dragon,* T*royer sitranjı, Rusk sitranjı* ve *Carrizo sitranjı* anaçlarının bazı farklı portakal çeşitlerinde sürgün ucuna aşılanması başarısının üzerine etkilerini belirlemeye çalışmış, yaptığı bu denemde, sürgün ucu aşılanması başarısının, *Troyer sitranjı* anacında diğerlerinden daha yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Şimşek ve ark. (2018), önemli turunçgil anaçlarından Troyer sitranjı ve C-35 sitranjına doku kültürü koşullarında kuraklık stresi uygulanarak mikroçoğaltım performansları araştırmışlardır. Bitkisel materyallerine ait tohumları çimlendirdikten sonra in vitro koşullarında kuraklık stresi uygulamışlardır. Bitkilerin doku kültürü koşullarında kuraklık stresi altında çoğaltım performanslarını ve gösterdikleri tepkileri gözlemlemişlerdir. Bu iki anacın fazlalaşan PEG dozlarında yaşamlarına ve çoğalmalarına devam ettiklerini fakat performanslarının düştüğünü saptamışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Gerçekleştirilen doku kültürü tekniğiyle mikroçoğaltım çalışması, Şanlıurfa ilinde bulunan Harran Üniversitesine bağlı Ziraat Fakültesinin Bahçe Bitkileri Bölümüne ait doku kültürü laboratuvarında yürütülecektir. Çalışmada materyal olarak ise *Poncirus trifoliata*'ın çelikleri kullanılmıştır. (Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Donör bitkinin ağustos ayındaki görünümü



Şekil 3.2. Donör bitkiden alınan sürgünlerin görünümü

*Poncirus trifoliata'*nın dallarında yaklaşık 3-5 cm boyunda dikenlere ve 3 ya da çok sık görülmese de 5 loblu yapraklara sahiptir. Yaprakların ortasında bulunan lobu genelde 3–5 cm boyunda, diğer 2 lobları ise genelde 2–3 cm boyundadır. Sahip oldupu çiçekler diğer turunçgillerin sahip olduğu çiçeklerden daha büyük olup, pembe stamenlere ve 3–5 cm çapında beyaz renkli çanak yapraklara sahiptir. Tıpkı diğer turunçgillerin sahip olduğu çiçekleri andıran kokulu çiçeklere ve ezildiğinde hafif baharatımsı bir koku bırakan yapraklara sahiptir.

Meyvelerinin rengi yeşil olup, bu yeşil meyveler olgunlaştıklarında sarı renk alırlar. Meyvelerin her biri yaklaşık 3–4 cm çapında ve nispeten küçük bir portakalı andırmaktadır. Meyvelerin tadı acı olduğu için dalından taze olarak yenmemekte fakat Japonya, Çin gibi anavatanına yakın yerlerde reçel olarak ve toz haline getirildikten sonra baharat olarak da kullanılmaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki materyalinin (eksplant) yüzeysel sterilizasyonu

Doku kültürü tekniği ile gerçekleştirilen bu denemede bitkisel materyal olarak *Poncirus trifoliata* L. anacının sürgünleri kullanılmıştır. Bitkinin genç kısımlarından alınan sağlıklı ve optimum fizyolojik durumda olan *Poncirus trifoliata* L anacından alınan sürgünler öncelikle doku kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Bitkiden alınan yeni sürmüş çeliklerin, yaprakları kesilip, yaprakları ayrıştırıldıktan sonra yaklaşık 15-20 mm'lik yeşil çelikler elde edilmiştir. Laboratuvar ortamında 30 dakika boyunca akan su altında yıkanan çelikler, %70'lik etil alkol konsantrasyonu içerisinde 1 dk kadar daha bekletilip sonra sterilize edilmiş saf suyla durulanmıştır. Bitkisel materyaller durulama aşamasından sonra sterilizasyon için öncelikle 1-2 damla kadar Tween 20 eklenen %5, %10 ve %20' lik ticari olarak kullanılan çamaşır suyu (% 0.525 NaOCl) içerisine daldırılarak 15 dk boyunca yüzey temizliği sağlandıktan sonra 3 kez 5 dk kadar steril distile suyla yıkanıp sterilizasyonu tamamlanmıştır. Hazırlanan bu 3 farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarında steril edilen eşit sayıda (10ar adet) materyalin sürgün gelişimi gözlenmiş olup %10 ve %20' lik

konsantrasyonlarda hiçbir kontamine görülmemiştir. %5'lik konsantrasyonda %20 oranında kontaminasyon görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalara %10'luk konsantrasyonla devam edilmeye karar verilmiştir.

Sterilizasyon tamamlandıktan sonra eksplantlar kültür ortamına aktarılmıştır. 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar, 4.4 g/l MS ve bitkinin büyümesini ve gelişimini desteklemek amacıyla 1 mg/l BAP içeren kültür ortamının, pH değeri 5.8'e NaOH ve HCl yardımıyla ayarlanmış ve kaynatılmıştır. Kültür ortamı kaynatıldıktan sonra bitkinin boyuna büyümesini destekleyen 0.3 g GA3 hormonu eklenmiştir. Daha sonra 7 günde bir, kültür ortamında kontamine belirtisi gösteren ve sağlıklı gelişen eksplantların oranları yüzde olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Sterilizasyon sonrası eksplantların görünümü

3.2.2. Besin ortamı, alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Denemede kullanılacak magenta kapları, kurutma kağıtları, bistüri ve pensler gibi ekipmanlar yeterli miktarda (tamamı kaplanacak şekilde) alüminyum folyoya sarılıp 15 dakika boyunca 1 atm. basınç altında, 121°C'de otoklav içerisinde sterilizasyonu yapılmıştır. Çalışmanın her aşamasında kullanılan pensler ve bistüriler

%96'lık etil alkol konsantrasyonuna batırılarak sürekli sterilize edilmiştir. Kabin içerisinde çalışmaya başlamadan 15 dakika önce steril kabinin içinin temizliği %70 oranında etil alkol konsantrasyonuyla yapılmıştır. Daha sonra 15 dk boyunca UV ışıkları açık tutularak kabin içerisinin sterilizasyonu tamamlanmış ve daha sonrasında kabinde çalışmaya başlanılmıştır. Hazırlanan besin ortamlarının 1 atm basınç altında, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklav içerisinde sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Steril kabin içerisinde kültüre alma çalışmaları

3.2.3. Kültür şartları

Deneme için ışık yoğunluğu 2 500-3 000 lüks'e, ışık şiddeti 2 500-10 000 lüks'e ayarlanan iklim kabini kullanılmıştır. Kabin içerisi 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olarak 16 saat fotoperiyot olacak şekilde programlanması yapılmıştır. Kabin içerisindeki ortamın sıcaklığı 24±1°C'de sabit tutulmuştur. İklim odasının nemi nemlendirici ile sıcaklığı ise klimayla sağlanmıştır.

3.3. Eksplantların Kardeşlenme Ortamında Kültüre Alınması

Yüzeysel sterilizasyonu gerçekleştirilen çeliklerin üzerinde en az bir adet göz bulunacak şekilde kesildikten sonra 10 ml başlangıç kültür ortamı içeren kaplara dikilmiştir. Eksplantlar, başlangıç kültür ortamında yaprak ve sürgün elde edilinceye kadar 7 günde bir gelişimi takip edilmiştir.

Sürgünlerin çoğaltımının gerçekleşmesi için, kardeşlenme görülen sürgün kümeleri bireysel sürgünler olacak şekilde ayrıştırılarak kardeşlenme sayıları saptanmış ve yeni kültür ortamına transfer sağlanmıştır. Başlangıç kültür ortamı olarak tercih edilen, 6 g/l agar, 1 mg/l BAP, 20 g/l sakkaroz içeren MS kültür ortamı pH değeri, otoklavlanmadan öncesinde 5.8'e HCl ve NaOH yardımıyla ayarlanmıştır. Bu işlemden sonra hazırlanan kültür ortamının 15 dakika boyunca 121°C de sterilizsyonu sağlanmıştır.

3.4. *In vitro* Sürgün Çoğaltımı ve Çevre Koşulları

Sterilize edildikten sonra sürgünlerin üzerinde bulunan gözlere hasar verilmeden yaklaşık 2-4 cm uzunluğunda eksplantlar alınarak hazırlanan in vitro sürgün kültür ortamına transferi gerçekleştirilmiştir. Bu eksplantların, sürgün kültür ortamı içerisinde yaprak oluşumu görülene kadar ve yeni sürgün oluşumu gözlemlenene kadar 4 er hafta aralıklarla tekrardan aynı sürgün kültür ortamı içerisinde alt kültüre transfer edilmiştir (Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.).



Şekil 3.5. Kültüre alınmış eksplantların görünümü



Şekil 3.6. Kültüre alınmış eksplantların iklim odası içerisindeki görünümü

Sürgün oluşturma kültürü devamında daha fazla eksplant elde etmek için, oluşan yeni sürgün kümeleri bireysel sürgünler olacak şeklinde ayrıştırılarak yeni sürgün oluşturma kültür ortamına transferi sağlanmıştır. Sürgün oluşturma kültür ortamı, vitamin ve mineralleri içeren 6 g/l agar, 1 mg/l BAP ve 20 g/l sakkarozdan oluşmaktadır.

Sterilizasyon yapılmadan önce NaOH ve HCl yardımıyla ortamın pH'sı, 5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan kültür ortamının sterilizasyonu 15 dk boyunca otoklavda 121 ^{o}C de gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca kullanılan iklim odasının ortam sıcaklığı ve nem oranı 24±1°C, ve %45 e ayarlanmıştır.



Şekil 3.7. Alt kültüre alınmış eksplantların görünümü



Şekil 3.8. Kardeşlenme gerçekleşmiş eksplant görünümü

3.5. Köklendirme

Kallus oluşturmuş eksplantların 2-5 cm boyundaki her bir sürgünü ayrılarak farklı kaplar içerisine transferleri sağlanmıştır. (Şekil 3.9.) 3 farklı sürgün köklendirme ortamı oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. Köklendirme ortamı içerikleri

KO1 Köklendirme Ortamı	KO2 Köklendirme Ortamı	KO3 Köklendirme Ortamı
20 g/l sakkaroz 2,2 g/l MS 6 G/L agar 2,5 mL /l NAA	20 g/l sakkaroz 2,2 g/l MS 6 G/L agar 1,5 mL /l NAA 1,5 mL /l IBA	20 g/l sakkaroz 2,2 g/l MS 6 G/L agar 3 mL /l IAA

Hazırlanan 3 farklı ortamdaki materyallerin 4 hafta boyunca gelişimi incelenmiş herhangi bir köklenme belirtisi görülmemiştir. Bitkilerin yapraklarında sararmalar ve dökülmeler gözlenmiş olup bunun sebebinin; bitkiler üzerinde meyve ve yaprak dökümüne neden olmasından, olgunluğu ve renk oluşumunu hızlandırma etkisinden dolayı, “Olgunlaştırma veya Yaşlandırma Hormonu” olarak adlandırılan etilen üretimi

olduğu kanaatine varılmıştır. (Walsh, 2003) Ortam içerisindeki etileni tahliye ederek materyaldeki yaprak kaybı engellenmeye çalışılmış fakat sonuç alınamamıştır.



Şekil 3.9 Yaprak döken eksplantların görünümü

Daha sonra bu konuda yapılan literatür çalışmalarında gümüş nitratın etilen etkisinin çok etkili bir inhibitörü olduğunu kanıtlayan çalışmalara rastlanılmıştır. Ve hazırladığımız MS ortamına 2 mL/l BAP ve ortamdaki fenolik madde miktarını azaltmak amacıyla 2 mL/l gümüş nitrat (AgNO3) eklenmiştir. Bu çalışmadan sonuç alınıp sararma ve yaprak dökme sorununa çözüm bulunmuştur. Hazırlanan köklenme ortamında materyaller kallus oluşturmuş fakat köklenme görülmemiştir. (Şekil 3.10.)



Şekil 3.10. Kallus oluşmuş eksplantların görünümü

Köklenme sorununa çözüm bulmak adına yeni bir köklenme ortamı hazırlanmıştır. 20 g/l sakkaroz, 6 g/l agar içeren 2,2 g/l MS'den oluşan ortama köklenmeye destek olmak amacıyla büyüme hormonu olan 500 mL NAA ve çelik köklendirilmesinde yaygın olarak kullanılan büyüme hormonu olan 500 mL IBA eklenmiştir. Köklendirme besin ortamının pH değeri, sterilizasyon yapılmadan önce NaOH veya HCl ile 5.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan bu köklendirme ortamının sahip olduğu çevre şartları ise önceki denemelerin sahip olduğu çevresel şartlar ile uyumlu olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu denemeden sonuç alınmış ve materyallerde köklenme görülmüştür. (Şekil 3.11.)



Şekil 3.11. Köklenen eksplantların görünümü

3.6. Dış Ortama Alıştırma

Köklendirme ortamındaki eksplantların yaklaşık 30-35 gün sonrasında mikroçoğaltım koşulları altında yeterli miktarda kök oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu aşamadan sonra eksplantlar besin ortamından çıkarıldıktan sonra kökleri saf su ile yıkanarak agardan temizlenmiştir. Daha sonra 1/2 oranında torf ve ½ oranında perlit karışımı hazırlanarak bu karışım 121 ^{o}C de 15 dk sterilize edilmiştir. Ve plastik kaplara eşit olarak dağıtılan bu steril toprak ortamına eksplantların şaşırtılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin dış ortama alışmasını kolaylaştırmak amacıyla eksplantların üzeri delikli saydam kaplarla kapatılmış ve nem oranı dengede tutulmaya çalışılmıştır. Dışarıdaki koşullara alıştırılmaya çalışılan bitkilerin bulunduğu kaplar yaklaşık bir hafta sonrasında her gün öncekinden fazla (5-10 dk.) sürede üstleri açılarak, bitkiciklerin dış ortama hazırlığı desteklenmiştir. (Şekil 3.12.)



Şekil 3.12. Köklenmiş eksplantların dış ortama alıştırılması görünümü

Köklenen bitkiler toprağa şaşırtılmak üzere besin ortamlarından çıkarılıp temizlendikten sonra kök ölçümleri yapılmış. Ve her bir bitki materyalinin kök uzunluğu ölçülüp, ortalama kök uzunluğu hesaplanmıştır. (Şekil 3.13.) daha sonra %50 torf ve %50 perlit içeren ortama transferleri yapılmıştır.



Şekil 3.13. Köklenmiş eksplantlardan kök uzunlukları görünümü

3.7. İstatistiki Değerlendirme

İn vitro tekniği denemesinde araştırma sonucunda elde edilen verilerin *Poncirus trifoliata* L. anacı için istatistiki değerlendirilmesi bitki eksplantlarının bitkinin farklı kısımlarından rastgele alınmış olup, araştırmanın aşamaları birbiriyle bağımlı olmaksızın birkaç kez tekrarlanmış ve her bağımsız deneme farklı sayıda sürgünden oluşmuştur. İstatistiksel açıdan önemli sayılan işlemler saptandığında ortalama verilerin arasındaki farklılıklar $P<0.05$ seviyesinde LSD testine tabi tutulmuşlardır. Sayımları yapılarak saptanan oransal verilerde açı transformasyon işlemi uygulanmıştır

4.ARAŞTIMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bitkisel Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu

In vitro (doku kültürü) çalışmalarında en temel konu bitki materyallerinin etkili bir şekilde sterilizasyonunun yapılmasıdır. Araştırmanın ilk adımı olan literatür taramasında da öncelikli konumuz strerilizasyon konusunda yapılan araştırmaları detaylı incelemek olmuştur. Öyle ki yine *in vitro* çalışmalarda ilk sırada yapılacak olan en önemli aşama bu çalışmalarda kullanılacak bitkisel materyallerin yüzeysel sterilizasyonu ve kullanılacak materyal için en uygun sterilizasyon metodunun seçilmesidir. Sterilizasyon yöntemleri bitki materyalinin yetiştirildiği ortama ve eksplantın alındığı bitki materyalinin kısımlarına göre farklılıklar göstermektedir. Eksplantların sterilizasyonu aşamasında en fazla kullanılan dezenfektanlar genel olarak; sodyum hipoklorit, etanol, gümüş nitrat, kalsiyum, cıva, hidrojen peroksit klorür olarak sayılabilir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Araştırmaların genelinde *in vitro* denemelerinin başlangıcında eksplantların sterilizasyon işlemi, bu eksplantların yüzeysel direncini kırmak amacıyla kullanılan 1-2 damla kadar Tween-20 eklenen %0.5-15 oranında NaOCl, $HgCl_2$ ya da CaOCl solüsyonunda 6 ile 20 dakika arasında bir süre boyunca çalkalandıktan hemen sonra 3 kez 5 dk sterilize edilmiş saf su içerisinde durulanarak sonuçlandırılmıştır (Ainsley ve ark., 2001a; Channuntapipat ve ark., 2003). Bunun yanında bitki materyali sterilizasyonunu birkaç aşamada gerçekleştiren araştırmacılar da bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar (Gürel ve Gülşen, 1998b; Ainsley ve ark., 2000; Ainsley ve ark., 2001b; Pruski ve ark., 2005) bitki materyali sterilizasyonundan önce eksplantları akan su altında 5 dk ile 2 saat arasında farklı sürelerde durulanarak kaba temizliğini sağlanmıştır. Muna ve ark. (1999) ise bitki materyallerini yalnızca akan su altında durulamayı kaba temizliği sağlamak için yeterli görmemiş ve 10-15 dakika boyunca bir iki damla Tween- 20 ile yıkayıp daha sonra yüzeysel sterilizasyona geçmişlerdir. Jain ve Babbar (2003)'da yine çalışmalarında kullanacakları bitki materyallerini önce %10 oranında Teepol ile yıkamış ve daha sonra akan su altında 30 dk durulayarak

yüzeysel sterilizasyon aşamasına geçmişlerdir. Espinosa ve ark. (2006); Jain ve Babbar (2000), bitkisel materyallerini 30 sn ile 5 dk aralığında kısa bir süre %50-70 konsantrasyonunda etanol içerisinde bekletip daha sonra ticari çamaşır suyu ile bitkisel materyalin sterilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Bu çalışmada, dezenfektan solüsyonu %10'lik NaOCl içerisinde yüzeysel sterilizasyonu gerçekleştirmiş bitkisel materyallerin başlangıç kültürlerinde herhangi bir kontaminasyon görülmemiştir. *In vitro* sürgünler gözlemlenen süreçte herhangi bir morfolojik değişime uğramamış ve sağlıklı bir şekilde gelişimlerine devam etmişlerdir. Bu denemede %10'lik NaOCl dezenfektan solüsyonu bitkisel materyallerin yüzeysel sterilizasyonu için en uygun görülen konsantrasyon olduğu belirlenmiş ve araştırma süreci boyunca bitkisel materyalin sterilizasyonunda belirlenen bu konsantrasyonu kullanmaya devam edilmiştir.

4.2. Eksplantların Sürgün Gelişimi ve Kardeşlenme

Bu çalışmada bitkisel materyalin sürgünlerinin ucu ve hafif odunsu kısımlar eksplant olarak kullanılmıştır.

4.2.1. Sürgün ucu

Poncirus trifoliata L. anacının sürgün uçlarından alınan eksplantlarının sürgün gelişimleri için hazırlanan besin ortamı içerisinde 6 g/l agar, 20 g/l sakkaroz içeren MS besin ortamı bulunmaktadır. Bu ortamda '*Poncirus trifoliata* L.*'* anacının sürgün gelişimi gözlemlenmiştir. Kültür başlangıcı itibarıyla yaklaşık 4 hafta sonra, altkültüre alınabilecek kadar gelişim göstermiş eksplant ve yeterli gelişim gösterememiş eksplant oranları belirlenmiştir.

4.2.2. Kardeşlenmiş eksplanlar

Sürgün ucu eksplantları üzerinde uygulandığı gibi sürgün ortamından sonra kardeşlenmiş eksplantlar da ayrılarak oluşturulmuş bitki parçaları da aynı ortam içerisinde yetiştirilmeleri uygulanmıştır. Yine aynı kombinasyon içerisine 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l BAP eklenerek *Poncirus trifoliata* L. anacından alınan boğum eksplantlarının sürgün gelişimine etkileri araştırılmış ve takip edilen süreçte yaprak sayısı, sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı ölçümleri yapılmıştır. (Çizelge 4.1.) Kültür başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonrasında, altkültüre alınabilecek kadar gelişim göstermiş eksplant ve gelişim gösterememiş eksplant oranı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Bap konsantrasyonlarındaki eksplant gelişimi çizelgesi

		1.Ortam (1 mg/L BAP)	2.Ortam (1 mg/L BAP)	3.Ortam (1 mg/L BAP)	LSD (%5)
1.Ölçüm	Yaprak Sayısı	1.50±1.14b	3.00±0,57a	1.68±1,52b	0.943
	Sürgün Sayısı	1.20±0.91b	2.10±0,57a	1.30±0,57b	0.518
	Sürgün Boyu	1.16±0,30b	1.63±0,15a	1.84±0,35b	0.468
2.Ölçüm	Yaprak Sayısı	2.10±0,57b	4.00±1,53a	2.40±1,15b	1.079
	Sürgün Sayısı	1.70±1,00b	2.70±0,82a	1.70±0,57b	0.668
	Sürgün Boyu	1.49±0,21b	2.19±0,72a	1.27±0,37b	0.469
Ortalama	Yaprak Sayısı	1.80±0.30	3.50±0.50	2.04±0.36	1,011±0,068
	Sürgün Sayısı	1.45±0.25	2.40±0.30	1.50±0,20	0,593±0,075
	Sürgün Boyu	1.32±0.16	1.91±0.28	1.55±0.28	0,468±0,005



Şekil 4.1. Kardeşlenmeden ayrılmış eksplantlarından sürgün gelişimi görünümü

Yapılan BAP denemesinde başlangıç kültür ortamı olarak belirlenen 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar, 1 mg/l BAP içeren MS kültür ortamındaki eksplantları aktarmak için 2 farklı besi ortamı kombinasyonu denenmiş ve eksplantların yarısı 20 gr/l sakkaroz, 2.2 mg/l MS, 6gr/l agar, 1 mg/l BAP, 0.5 mg GA_3 içeren 1. ortama; diğer yarısı ise 20 gr/l sakkaroz, 2.2 mg/l MS, 6gr/l agar içeren 2. ortama alınmıştır. 2 hafta boyunca gelişimleri gözlemlenmiş ve ölçüleri yapılmıştı.(Çizelge 4.2.)

Çizelge 4.2. Farklı besi ortamı konsantrasyonlarındaki eksplant gelişimi çizelgesi

		1.Ortam (20 gr/l sakkaroz, 2.2 mg/l MS, 6gr/l agar,1 mg/L BAP)	2.Ortam (20 gr/l sakkaroz, 2.2 mg/l MS, 6gr/l agar, 1 mg/l BAP, 0.5 mg GA_3)	LSD (%5)
1.Ölçüm	Yaprak Sayısı	12.44±2.51a	8.37±9.33b	3.816
	Sürgün Boyu	1.80±0.30a	1.43±0.62a	0.581
2.Ölçüm	Yaprak Sayısı	14.56±3.05a	11.11±3.05a	4.657
	Sürgün Boyu	2.10±0.43a	1.87±0.43a	0.659
Ortalama	Yaprak Sayısı	13.50±1.06	9.74±1.37	4,236±0.420
	Sürgün Boyu	1.95±0.15	1.65±0.22	0.620±0.551

Daha sonra uygun dozda belirlenen BAP ortamında gelişimlerini tamamlayan eksplantlar için hazırlanan 3 farklı köklendirme konsantrasyonundaki eksplantların gelişimleri gözlemlenmiş ve ölçümleri yapılmıştır.(Çizelge 4.3.) Bu ölçümlerde eksplantların yaprak sayısı, sürgün boyu ve kallus oluşumu incelenmiştir. Fakat köklenmeye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.3. Farklı köklendirme konsantrasyonlarındaki eksplant gelişimi çizelgesi

		1.Ortam (0,25 mL/l NAA)	2.Ortam (0,15 mL/l NAA) (0,15 mL/l IBA)	3.Ortam (0,15 mL/l IBA)	LSD (%5)
1.Ölçüm	Sürgün Boyu	2.50±0.57a	2.70±1.00a	1.90±1.00a	0.898
	Yaprak Sayısı	9.43±2.08a	10.00±0.68a	8.80±6.08a	6.044
2.Ölçüm	Sürgün Boyu	2.75±0.57a	4.20±2.33a	2.60±0.57a	3.638
	Yaprak Sayısı	6.00±2.08a	11.00±8.18a	11.89±4.35 a	8.968
Ortalama	Sürgün Boyu	2.62±0,12	3.45±0,75	2.25±0.35	2,268±1.370
	Yaprak Sayısı	7.71±0,71	10.50±0,50	10.34±1.54	7,506±1.462

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmada ilk olarak bitkiden alınan eksplantlar farklı BAP dozlarında (0.5 mg/L, 1 mg/L ve 2 mg/L) sürgün ortamına alınıp gelişimi incelenmiştir. Sürgün oluşturma ortamları içerisinde yapılan yaprak sayısı, sürgün sayısı ve sürgün boyu ölçümlerinde eksplantların büyüme oranları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda 1 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlar diğer ortamlardaki eksplantlara göre daha fazla gelişim göstermiştir. Bu ortamdaki eksplantlar yaprak sayısı bakımından 0.5 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre %11.11; 2 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre %20,48 daha fazla artış göstermiştir. Sürgün sayısı bakımından 0.5 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre %5; 2 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre %20 daha fazla artış göstermiştir. Sürgün boyu bakımından ise 0.5 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre %69; 2 mg/L BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre %40 daha fazla büyüme göstermiştir. Böylece 1 mg/L içeren sürgün ortamı en uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Daha sonra başlangıç kültür ortamı olarak belirlenen, 1 mg/l BAP, 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar içeren MS kültür ortamındaki eksplantları aktarmak için 2 farklı besi ortamına transferleri denenmiştir. Eksplantların yarısı 20 gr/l sakkaroz, 2.2 mg/l MS, 6gr/l agar, 1 mg/l BAP, 0.5 mg GA_3 içeren 1. ortama; diğer yarısı ise 20 gr/l sakkaroz, 2.2 mg/l MS, 6gr/l agar içeren 2. ortama alınmıştır. 2 hafta boyunca gelişimleri gözlemlenen eksplantların 2 hafta sonra ortamlardaki ortalama değerleri hesaplanmıştır. 1. Ortamdaki eksplantların sürgün boyu ortalaması 1.97 cm ve yaprak sayısı ortalaması 11.11 iken, 2. Ortamdaki eksplantların sürgün boyu ortalaması 2.18 cm ve yaprak sayısı ortalaması 15.12 olduğu saptanmıştır.

Eksplantların köklenme aşaması için 3 farklı köklenme ortamı hazırlanmıştır. Bu ortamlarda 3 farklı konsantrasyon denenmiştir. KO1 olarak adlandırdığımız ortamda çelik köklenmesini destekleyen 0.25 mL/l NAA; KO2 olarak adlandırdığımız ortamda çelik köklenmesi için 0.15 mL/l IBA ve 0.15 mL/l NAA; KO3 olarak adlandırdığımız ortamda ise hücrelerin genişlemesine ve bitki büyümesine destek olup, dokuların

gelişimi ve köklenme oluşumu sağlayan 0.15 mL/l IAA kullanılmıştır. Bu ortamdaki materyallerin 3 hafta boyunca gelişimleri takip edilmiştir. eksplantlarda kallus oluşumu görülmüş fakat köklenmeye rastlanmamıştır. Daha sonra 20 g/l sakkaroz, 6 g/l agar içeren 2,2 g/l MS'den oluşan ortama köklenmeyi desteklemek için köklenme hormonu olarak 500 mL NAA ve 500 mL IBA eklenmiştir. Köklendirme besin ortamının pH'ı, önce 5.8'e ayarlanmıştır. Bu denemeden sonuç alınmış ve eksplantların köklenme aşaması gerçekleşmiştir. Köklenen eksplantların %50 torf ve %50 perlite şaşırtılması dış ortama alıştırılması için köklerinin iyice gelişmesi beklenmiş ve yeterince geliştikten sonra hazırlanan ortama transferi yapılmış ve gözlemlenmeye devam edilmiştir. Bu bitkilerin %62 si sağlıklı bir şekilde yaşamına devam etmiştir.

Çalışma sonucunda denemede kullanılan bitki materyalinin sterilizasyonu için en uygun konsantrasyon olarak %10'lik NaOCl dezenfektan solüsyonu belirlenmiş ve araştırma süreci boyunca bitki materyalinin yüzeysel sterilizasyonunda bu konsantrasyonun kullanımına devam edilmiştir. Başlangıç ortamı için ise bitkilerin en iyi gelişim gösterdiği 1.0 mg/l oranında BAP içeren ortam en iyi konsantrasyon olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyonla işleme devam edilmiştir. Çalışma devam ederken yaprak sararması ve dökülmesi sorunuyla karşılaşılmış bu sorunun sebebi ortamda etilen üretimi sanılarak ortamdaki etilen tahliye edilmeye çalışılmış fakat sonuç başarısız olmuştur. Daha sonra gümüş nitratın etilen etkisinin çok etkili bir inhibitörü olduğunu kanıtlayan çalışmalara rastlanılmıştır. MS ortamına 2 mL/l BAP, 2 mL/l ve ortamdaki fenolik madde miktarını azalttığı düşünülen gümüş nitrat (AgNO3) eklenmiştir. Bu çalışmadan sonuç alınıp sararma ve yaprak dökme sorununa çözüm bulunmuştur. Ve son olarak köklendirme için çeşitli denemeler yapılmış ve 20 g/l sakkaroz, 6 g/l agar içeren 2,2 g/l MS'den oluşan ortama 500 mL/l NAA ve 500 mL/l IBA eklenmesiyle sonuca ulaşılmıştır.

Sonuç olarak önemli turunçgil anaçlarından biri olan, yaygın bilinen bir çit bitkisi ve aynı zamanda çok tercih edilen bir iç mekan peyzaj bitkisi olan *Poncirus trifoliata* L.'nin in vitro koşullarında çoğaltımı denenmiştir, farklı eksplantlardan sürgün elde edildikten sonra değişik besin ortamı konsantrasyonlarında köklenme

yeteneği araştırılmıştır, Böylece üçyapraklı anacının in vitro koşullarında köklenmesi için farklı konsantrasyonlar geliştirilmiştir. Bitki doku kültürü denemeleri ile bitkilerin daha hızlı bir şekilde farklı özelliklerinin taranması ve saptanması aynı zamanda çoğaltılması mümkün olabilmektedir. Yapılan çalışmada görülüyor ki *Poncirus trifoliata* L. anacı doku kültürü ile çoğaltım için oldukça uygun bir materyal olabilmektedir. Ancak bitki doku kültürü denemelerinin sonucunda saptanan bilgilerin arazi koşulları altında tekrar denenmesi önerilmektedir. Günümüzde Turunçgil yetiştiriciliği oldukça önemsenen bir konudur. Dünya'da bazı ülkelerde hiç turunçgil yetişmediği gerçeği, turunçgil ithalat ve ihracatının ne kadar önemli olduğunun kanıtıdır. Bu sebeple günümüzde gerek ticari olarak gerekse bilimsel çalışmalar sebebiyle turunçgil anaç ve çeşitlerinin ıslah çalışmaları dünyada ve ülkemizde hız kesmeden etmektedir.

KAYNAKLAR

AINSLEY, P.J., COLLINS, G.G. and SEDGLEY, M., 2000. Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explants of Almond (*Prunus dulcis Mill*.), In vitro Cellular and Development Biology-Plant, 36(6): 470-474.

AINSLEY, P. J., HAMMERSCHLAG, F. A., BERTOZZI, T., COLLINS, G.G. and SEDGLEY, M., 2001a. Regeneration of Almond from Immature Seed Cotyledons. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 221-226.

AINSLEY, P. J., COLLINS, G.G. and SEDGLEY, M., 2001b. In Vitro Rooting of Almond (*Prunus dulcis Mill*.). In vitro Cellular and Development BiologyPlant, 37:778-785.

AK, B.E. ve ÖZDEN, A.N., 2007. Meyve yetiştiriciliğinde Doku kültürü Yoluyla Çoğaltma Yöntemleri ve Önemi. GAP V. Tarım Kongresi, 17-19 Ekim 2007, Şanlıurfa, s. 507-519

AMGAİ, R. B., PRASAİ, H. K., and PANDEY, Y. R. (2016). Hormonal effect on mandarin orange (Citrus reticulata Blanco) micropropagation. Nepal Journal of Biotechnology, 4(1), 33-36. doi: 10.3126/njb.v4i1.16344

BABAOĞLU, M., GÜREL, E. ve ÖZCAN, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374s.

CHAMANDOOSTİ (2017). International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR). 2454-1850 .

CHANNUNTAPİPAT, C., SEDGLEY, M. and COLLİNS, G., 2003. Micropropagation Of Almond Cultivars Nonpareil And Ne Plus Ultra And The Hybrid Rootstock Titan×Nemaguard. Scientia Horticulturae, 98: 473–484.

ESPINOSA, A.C., PIJUT, P.M. and MICHLER, C.H., 2006. Adventitious Shoot Regeneration and Rooting of *Prunus serotina* in vitro Cultures. Hortscience, 41(1): 193-201.

GÜREL, S. and GÜLŞEN, Y., 1998. The Effects of IBA and BAP on İn vitro Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.).Tr.J. of Botany, 22: 375-379.

HATİPOĞLU, R., 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniv. Zir. Fak. Genel Yayın No:190, Ders Kitabı Yayın No: A-58, Adana,176s.

JAIN, N. and BABBAR, S.B., 2000. Recurrent Production of Plants of Black Plum Syzygium cuminii (L.) Skeels, a Myrtaceous Fruit Tree, From In Vitro Cultured Seedling Explants. Plant Cell Reports, 19: 519-524.

JAIN, N. and BABBAR, S.B., 2003. Regeneration of "Juvenile" Plants of Black Plum, Syzygium cuminii Skeels, From Nodal Exp of Mature Trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 257-263.

KOZAI, T., KUBOTA, C. and JEONG, B.R., 1997. Environmental Control For The Large-Scale Production Of Plants Through *In Vitro* Techniques. Plant Cell Tiss. Organ Culture, 51: 49-56.

MANSUROĞLU, S. ve GÜREL, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü Ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 281s.

MUNA, A.S., AHMAD, A.K., MAHMOUD , K. and ABDUL-RAHMAN, K., 1999. In Vitro Propagation Of A Semi-Drawting Cherry Rootstock. Plant Cell and Tissue And Organ Culture, 59: 203- 208.

PRUSKI, K., ASTATKIE, T. and NOWAK, J., 2005. Tissue Culture Propagation of Mongolian Cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking Cherry (*Prunus tomentosa*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82: 207-211.

SHIN T.-Y., OH J.M., CHOI B.-J., PARK W.-H., KIM C.-H., JUN C.-D. and KIM S.-H.,"Anti-inflammatory effect of Poncirus trifoliata fruit through inhibition of NF-B activation in mast cells". Toxicology in Vitro. 20 (7) (pp 1071-1076), 2006.

WALSH, C. S., 2003. Plant Hormones. Concise Encyclopedia of Temperate Tree Fruit, Edited by Baugher T.A. and Singha, 245-250, ISBN 1560229411, Haworth Press.